

## 2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride를 이용한 병원성 미생물 확인시험에 관한 연구

강 정 옥<sup>†</sup> · 배 준 태 · 연 재 영 · 김 영 호 · 김 진 화 · 이 근 수 · 표 형 배

한불화장품(주) 기술연구원  
(2014년 3월 4일 접수, 2014년 3월 12일 수정, 2014년 5월 6일 채택)

### Study of 2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride for Detection of Pathogenic Microorganisms

Jung Wook Kang<sup>†</sup>, Jun Tae Bae, Jae Young Yeon, Young Ho Kim, Jin Hwa Kim, Geun Soo Lee, and Hyeong Bae Pyo

R&D Center, Hanbul cosmetics Co. Ltd, 62, Daeseong-ro 547beon-gil,  
Samseong-myun, Eumseong-gun, Chungcheongbuk-do 369-834, Korea  
(Received March 4, 2014; Revised March 12, 2014; Accepted May 6, 2014)

**요약:** 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC)는 산화환원지시약으로 미생물의 증식에 의한 산소 소비를 쉽게 확인할 수 있다. 용해 후 무색의 형태를 띠고 있으나 생리활성이 있는 조직에서는 탈수소 효소(dehydrogenases)에 의해 환원되어 빨간색의 불용성 1,3,5,-triphenylformazan (TPF)가 된다. 본 연구에서는 병원성 미생물(*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Candida albicans*)에 TTC 지시약을 활용하여 미생물 성장시험에 대해 확인하였다. 시험 균주에 TTC를 첨가하여 확인한 결과, 모두 탈수소효소 반응으로 인한 TPF 형성으로 붉은색 콜로니를 관찰하였다. 이후 TTC 0.04% 이상의 농도 및 12 h 이상 배양조건으로 최적화 실험 후 균주별 CFU 값을 통해 TPF 발현능을 확인하였다. 결국 TTC가 병원성 세균 및 효모균 성장에 큰 영향을 끼치지 않으며 배양 시 세균의 경우 12 h, 효모균의 경우 48 h 이후부터 확인이 가능하였다. 이러한 결과들로부터 TTC를 활용한 미생물 성장 확인 시험법이 더 신속 정확한 방법으로 화장품 연구에 활용 가능할 것으로 사료된다.

**Abstract:** 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) is used as a redox indicator in culture media. It is colorless in the oxidized form and is reduced to formazan, an insoluble pigment, by dehydrogenases in actively growing microbial cells. The aim of this study was to assess by microbial test of the pathogenic microorganisms using TTC reduction. The pathogenic microorganisms were reduced in medium by dehydrogenase to produce insoluble red formazan. We observed that the optimization method of TTC allowed more than 12 h incubation in 0.04% concentration. Also, the growth of microorganisms with media was increased formazan production. We confirmed that microorganisms were quickly observed to grow colonies cultured red color without affecting the growth of microorganisms. It is suggested that the microbial test using TTC can provide better and quicker test method in cosmetics development.

**Keywords:** 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, microorganism, microbial test, 1,3,5,-triphenylformazan

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: jwkkang@hanbul.co.kr)

## 1. 서 론

미생물 시험은 신속 정확해야 하며 쉽게 반복할 수 있으며 시험비용이 비싸지 않아야 한다. 또한, 시험 샘플을 다양하게 다루기 위한 시료처리의 극대화도 필요하다. 미국 임상시험표준협회(clinical and laboratory standards institute, CLSI)에는 agar dilution methods를 이용한 항생제 관련 정량적 시험법, colorimetric method 등의 다양한 미생물 시험법이 존재한다. 특히 colorimetric assay는 다양한 indicator들이 존재한다. Alamar blue, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT), 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 등이 있다[1-2].

TTC는 산화환원지시약으로 미생물의 증식에 의한 산소 소비를 쉽게 확인할 수 있는 생화학 시약으로 1894년 처음 합성된 이후 세포성장과 관련된 시험에 주로 사용되어 왔다. 흰색 파우더로 구성되어 있으며 물, 에탄올 등에 쉽게 용해가 가능하다. 용해 후 무색의 형태를 띠고 있으나 생리활성이 있는 조직에서는 탈수소 효소(dehydrogenases)에 의해 환원되어 빨간색의 불용성 1,3,5-triphenylformazan (TPF)가 된다[3-5]. 이런 특징을 활용하여 보다 쉽게 미생물의 성장 유무를 확인할 수 있는 장점을 가지고 있으며, 이를 활용해 토양 미생물, 해양 대형조류 및 생물막 등의 평가 방법으로 소개되고 있다[6-7]. 또한, TTC는 미생물의 증식에 의한 산소 소비가 배양기의 산화환원전위를 저하시키기 때문에 환원에 의해서 색깔이 변하는 색소를 미생물 성장에 저해하지 않는 정도로 배지에 첨가하면 배지 중의 미생물의 활성을 알 수 있다.

현재 화장품의 미생물 시험은 2011년도에 개정된 ‘미생물한도 기준 및 시험방법 가이드라인’에 의해 미생물 시험을 진행하고 있다. 또한 최근 식약처의 “화장품 안전기준 등에 관한 규정” 개정 고시(제2013-2호)에 따른 유통화장품의 미생물 검사 판정(통보) 등의 안전 관리 기준이 강화되고 있다. 본 연구에서는 관련 규정에 속한 병원성 미생물에 TTC를 적용시켜 미생물 검사 확인시험을 통해 기존보다 신속 정확한 안전성 확보의 가능성을 확인해 보았다.

## 2. 실험 방법

### 2.1. 사용균주, 배지 및 시약

균주는 세균에 그람 양성균 *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), *Enterococcus faecium* (HB 2003)과 그람 음성균 *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027)와 *Escherichia coli* (ATCC 8739)를 이용하고 세균용 배지는 tryptic soy agar (TSA, Merck, USA)와 tryptic soy broth (TSB, Merck, USA)를 사용하였다. 진균에는 효모류인 *Candida albicans* (ATCC 10231)를 이용하였으며 배지는 potato dextrose agar (PDA, Merck, USA)와 potato dextrose broth (PDB, Merck, USA)를 사용하였다. 본 실험에 사용된 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (231121, BD, USA)는 Gibco inc.에서 구입 후 사용하였다.

### 2.2. TTC assay

본 실험은 Kim 등에 의해 사용된 TTC 방법을 변형하여 사용하였다[8]. 미생물 시험에 사용되는 각각의 배지 조성 후 멸균시키고, 정해진 농도에 맞춰 첨가 후 사용하였으며 배지에 빛이 통과하지 못하게 봉한 후 배양기에서 배양하였다. 일정시간 배양 후 TTC에 의한 formazan 형성을 확인 후 490 nm 흡광도에서 측정하여 반응을 확인하였다.

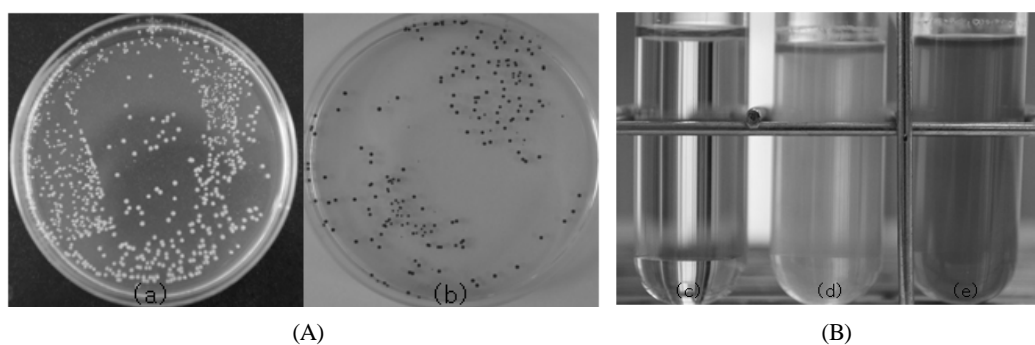
### 2.3. 미생물 한도시험

화장품의 미생물한도 기준 및 시험방법 가이드라인을 근거로 하여 미생물 한도 시험을 실시하였다. 제품 1 g을 TSB에 9 mL에 첨가 후 충분히 교반한다. 농도별 희석액을 만든 후 TSA 및 PDA배지에 각각 1 mL씩 분주 후 배양한다. 세균은 37 °C에서 2 d, 진균은 25 °C에서 5 d 배양 후 미생물 생성 유무를 관찰한다.

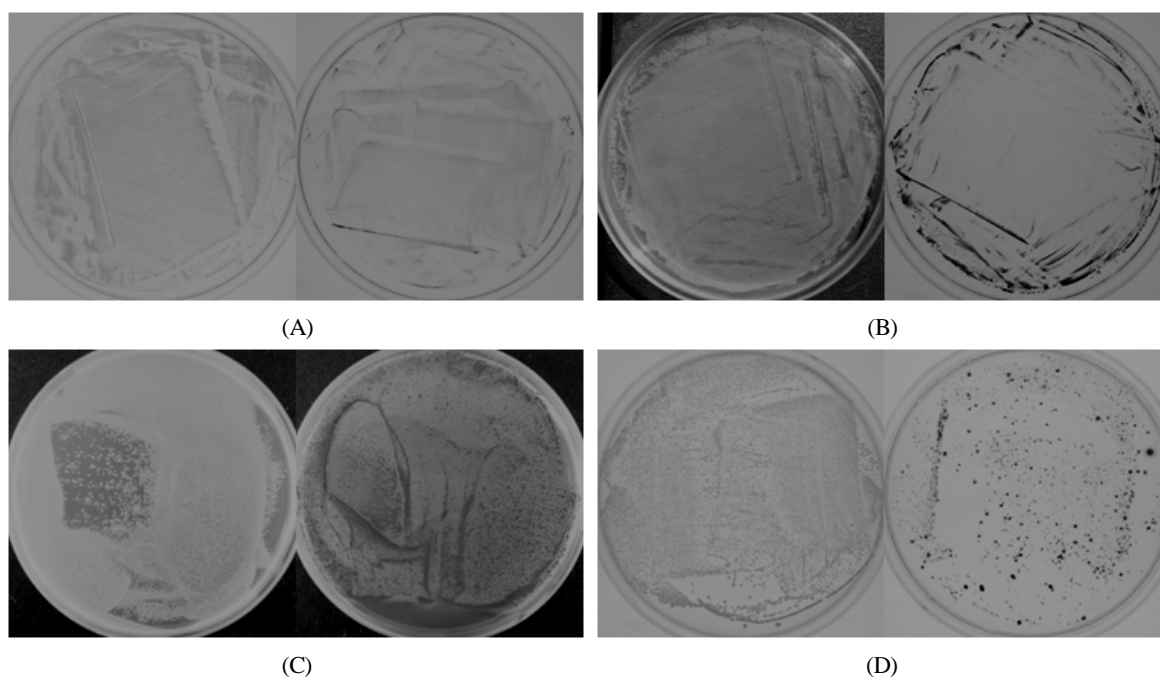
## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. TTC환원력에 의한 *E. faecium*의 TPF 관찰

TTC의 반응에 의한 TPF 형성 유무를 *E. faecium*을 이용하여 확인해 보았다. 고체 및 액체 배지를 이용하여 확인한 결과 *E. faecium*이 배양되면서 TTC의 탈수소 효소에 의한 TPF 반응으로 인해 붉은색 콜로니 형성을 관찰하였다(Figure 1). 이런 TTC 지시약은 배지



**Figure 1.** TTC-stained *Enterococcus faecium* in tryptone soy agar (A), and tryptone soy broth (B). The agar plates are not included TTC (a), added to the TTC (b). The liquid culture medium are represented control (c), including *E. faecium* (d) and TTC-stained strain (e), respectively.



**Figure 2.** TTC-reducing bacteria (red color colonies) in pathogenetic microorganisms, *Staphylococcus aureus* (A), *Pseudomonas aeruginosa* (B), *Escherichia coli* (C), *Candida albicans* (D). The samples are not included TTC (left), added to the TTC (right).

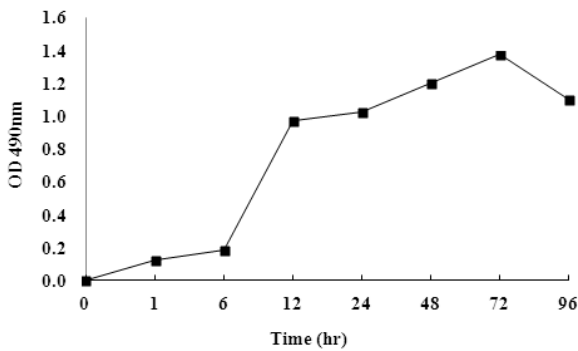
에서 성장하는 균주를 쉽고 빠르게 확인할 수 있는 방법으로 보고되고 있다[9]. 즉, TTC를 통해 화장품 미생물한도 시험방법에 적용시켜 제품 내 미생물에 대한 정확한 판정을 내릴 수 있는 가능성을 확인하였다.

### 3.2. 탈수소효소 반응에 의한 병원성 미생물의 TPF 형성 확인

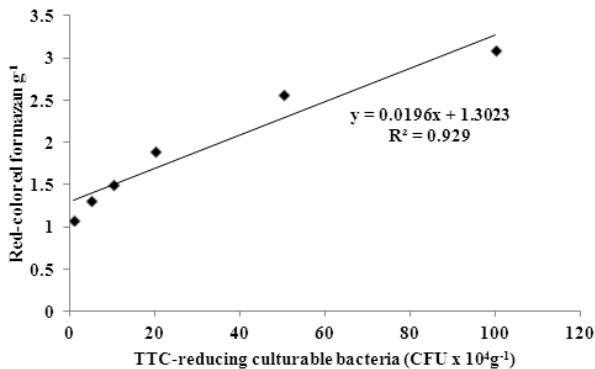
화장품의 안전기준에 의거 *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans* 등의 병원성 미생물은 불검출이 되

어야 한다[8]. 이에 TTC배지의 성능시험법을 활용하여 4종의 병원성 미생물의 검출 유무를 수행하였다. 그 결과 4개의 균주 모두 TPF 반응으로 인해 붉은색 콜로니를 형성함을 확인하였다(Figure 2). 붉은색 콜로니 형성이 배지 내 미생물 생성 유무를 확인하는데 보다 정확한 판별이 가능할 것으로 사료된다.

### 3.3. 미생물 성장 확인시험을 위한 TTC 염색의 최적화 TTC를 이용한 보다 신속하고 정확한 판정을 위해



**Figure 3.** Determination of variable for the optimal conditions of TTC reaction by *E. faecium*.



**Figure 4.** Correlation between TTC-reducing bacteria and triphenylformazan (TPF) formation.

TTC 농도 및 배양시간 등의 최적의 조건을 확인해 보았다. 0.04% 농도에서 TTC는 환원반응을 확인하였고 (Data not shown) 이를 기준으로 배양시간을 확인한 결과 12 h부터 환원력이 증가하는 것으로 나타났다 (Figure 3). 즉 미생물 성장곡선의 변화가 TTC 활성과 관련 있는 것을 확인하였다. 이를 토대로 미생물 대수기 때 급격히 변화한 TTC 활성값을 통해 보다 신속한 판정을 내릴 수 있는 기준의 시간을 확립하였다. 이런 결과를 바탕으로 TTC를 이용한 탈수소효소생성 세균 계수를 ELISA로 측정하였다. 배지에서 성장하는 균주가 증가할수록 TTC 환원력에 의한 formazan 형성도 증가하였다(Figure 4). 이는 TTC에 의한 탈수소효소 반응이 균주의 양과 유의적 관계가 있음을 알 수 있었다.

3.4. 균주별 TPF 발현능 확인

TTC의 환원력이 미생물 성장에 영향을 끼치는지를

**Table 1.** Comparison of the Cytotoxic Effects from TTC Reaction

Strains	Total number of colonies g <sup>-1</sup>		Visually observed time (h)
	Non-TTC	TTC	
<i>S. aureus</i>	1 × 10 <sup>3</sup>	1 × 10 <sup>3</sup>	12
	1 × 10 <sup>2</sup>	1 × 10 <sup>2</sup>	
	1 × 10 <sup>4</sup>	1 × 10 <sup>4</sup>	
<i>P. aeruginosa</i>	1 × 10 <sup>2</sup>	1 × 10 <sup>2</sup>	12
	3 × 10	3 × 10	
	1 × 10 <sup>4</sup>	1 × 10 <sup>4</sup>	
<i>E. coli</i>	5 × 10	5 × 10	12
	1 × 10 <sup>5</sup>	1 × 10 <sup>5</sup>	
	1 × 10 <sup>5</sup>	1 × 10 <sup>5</sup>	
<i>C. albicans</i>	1 × 10 <sup>2</sup>	1 × 10 <sup>2</sup>	48
	3 × 10	3 × 10	
	1 × 10 <sup>4</sup>	1 × 10 <sup>3</sup>	
<i>E. faecium</i>	5 × 10	5 × 10	12
	1 × 10 <sup>4</sup>	1 × 10 <sup>4</sup>	
	1 × 10 <sup>2</sup>	1 × 10 <sup>2</sup>	

확인해보았다. 총 5종의 균주의 CFU 측정된 결과, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E. faecium* 등은 12 h부터 TTC의 발현을 확인하였다. 이때 배지에 성장된 미생물은 Non-TTC의 CFU 값이 거의 동일하게 확인되었다(Table 1). 반면 *C. albicans*의 경우 48 h이 지났을 때부터 TTC의 환원력을 확인할 수 있었다. 다만, 최초 48 h이 지났을 때 배지에 성장된 미생물의 CFU 값이 약간의 차이가 발생하였지만 5일까지 경과했을 때는 CFU값이 거의 동일하게 확인되었다. 즉, TTC 환원에 의한 붉은색 콜로니 형성을 통해 미생물 오염 여부를 미리 확인할 수 있었으며, 이는 균주의 CFU 값에 영향을 끼치지 않았다. 또한 선행 연구에서도 Bredt에 의해 최대 10<sup>7</sup> CFU/mL까지 TTC 환원이 일어난다고 보고하였다[10]. 이에 TPF 발현이 미생물의 성장에 큰 영향을 끼치지 않는 것을 확인할 수 있었으며 세균의 경우 12 h 이후, 효모균의 경우 48 h 이후부터 TTC가 발현된 미생물 성장 확인이 가능하였다.

## 4. 결 론

본 연구를 통하여 TTC를 이용하여 병원성 미생물을 이용한 미생물 성장 확인시험법을 확인하였다. 병원성 미생물에 TTC를 첨가한 배지는 탈수소효소 반응으로 인한 TPF 형성으로 붉은색 콜로니를 관찰하였다. 이에 TTC 확인시험에서는 0.04% 이상의 농도에서 12 h부터 TPF 형성을 관찰하였다. 또한, 균주별 CFU 값을 통해 TPF 발현능을 확인한 결과 유의적 관계가 있음을 확인하였다. 병원성 미생물을 활용하여 TTC가 미생물 성장에 영향을 끼치지 않으며 구체적으로 세균의 경우 12 h, 효모균의 경우 48 h 이후 배양 시 미생물 성장 확인이 가능하였다. 이상의 결과를 바탕으로 미생물 한도시험법에 의한 48 h 이상의 배양 후 관찰 가능한 가이드라인을 TTC를 활용하면 미생물 성장 확인에 정확하고 신속한 판정이 가능할 것으로 사료되며, 이는 화장품 안전성 연구에 대한 다양한 방법적 접근이 될 것으로 기대된다.

## Acknowledgement

본 연구는 2013년 지역특화산업육성(R&D) 기술개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것으로 이에 감사드립니다(과제번호 R0002319).

## References

1. A. Mohammadzadeh, P. Farnia, K. Ghazvini, M. Behdani, T. Rashed, and J. Ghanaat, Rapid and low-cost colorimetric method using 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride for detection of multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Med. Microbiol.*, **55**, 1657 (2006).
2. A. Klancnik, S. Piskernik, B. Jersek, and S. S. Mozina, Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts, *J. Microbiol. Meth.*, **81**, 121 (2010).
3. P. Kumar and J. C. Tarafdar, 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) as electron acceptor of culturable soil bacteria, fungi and actinomycetes, *Biol. Fertil. Soils*, **38**, 186 (2003).
4. B. H. Nam, H. J. Jin, S. K. Kim, and Y. K. Hong, Quantitative viability of seaweed tissues assessed with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, *J. Applied Phycol.*, **10**, 31 (1998).
5. J. Bederson, L. Pitts, S. Germano, M. Nishimura, R. Davis, and H. Bartkowski, Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats, *Stroke*, **17**, 1304 (1986).
6. H. L. Brown, A. H. M. Vliet, R. P. Betts, and M. Reuter, Tetrazolium reduction allows assessment of biofilm formation by *Campylobacter jejuni* in a food matrix model, *J. Appl. Microbiol.*, **115**, 1212 (2013).
7. W. C. Chang, M. H. Chen, and T. M. Lee, 2,3,5-triphenyltetrazolium reduction in the viability assay of *Ulva fasciata* (chlorophyta) in response to salinity stress, *Bot. Bull. Acad. Sin.*, **40**, 207 (1999).
8. S. Kim, M. J. Kim, H. Y. Kang, S. Y. Seol, D. T. Cho, and J. Kim, A simple colorimetric method for testing antimicrobial susceptibility of biofilmed bacteria, *J. Microbiol.*, **48**, 709 (2010).
9. T. Junillon and J. P. Flandrois, Diminution of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride toxicity on *Listeria monocytogenes* growth by iron source addition to the culture medium, *Food Microbiol.*, **38**, 1 (2014).
10. W. Bredt, Estimation of *Mycoplasma pneumoniae* inoculum size by rate of tetrazolium reduction, *J. Clin. Microbiol.*, **4**, 92 (1976).