



시 험 보 고 서

TBK-2024-003287

리 디 잇 치약

항균시험

한국화학융합시험연구원장



시 험 개 요

시 험 항 목 : 항균시험

시 험 번 호 : TBK-2024-003287

시 험 방 법 : ASTM E2315-16 준용

시 험 의뢰자

명 칭 : 주식회사 아이리스브라이트

주 소 : 서울특별시 강남구 영동대로 416, 10층(대치동, 케이티앤지 타워)

대 표 자 : 김 민 욱

시 험 기 관

명 칭 : 한국화학융합시험연구원

소 재 지 : 경기도 과천시 교육원로 98(중앙동)

고은옥 고윙

고은옥[Ko, Eun-Ok, B.S.]

Study Director

Medical device-Bio Research Institute, KTR

2024-05-09

Date

조진식

조진식[Cho, Jin Sik, M.S.]

Technical Manager

Medical device-Bio Research Institute, KTR

2024-05-09

Date

본 결과는 신청인으로부터 제공받은 시료에 대한 보고서입니다.

2024년 05월 09일

목 차

1. 요약 (Summary)	1
1.1. 시험 일정	1
1.2. 시료 사진	1
2. 시험장치 및 재료 (Equipment & materials)	2
2.1. 시험 장치	2
2.2. 시험 재료	2
3. 시험 방법 (Test method)	3
3.1. 시험 방법	3
3.2. 결과 계산	4
4. 결과 (Result)	5
4.1. <i>P. gingivalis</i> 에 대한 항균시험	5
4.2. <i>S. mutans</i> 에 대한 항균시험	5
5. 결론 (Conclusion)	6
6. 참고문헌 (References)	7
7. 별첨 (Attachment)	8
7.1. 시험결과 사진	8

표 목차

표 1. <i>P. gingivalis</i> 에 대한 시험 결과	5
표 2. <i>S. mutans</i> 에 대한 시험 결과	5
표 3. 항균시험 결과 종합	6

1. 요약 (Summary)

본 시험은 ASTM E2315-16을 준용하여 의뢰자가 제시한 시료에 대한 항균효과를 평가하기 위하여 실시하였다. 의뢰자가 요청한 균주인 *P. gingivalis* (Gram negative) 및 *S. mutans* (Gram positive)를 사용하여 시험을 실시하였다.

시험용액[농도 : 10 % (w/v)]에 시험균액을 접종하고 (22 ± 2) °C에서 5분간 방치하였다. 이후, 생균수를 측정하여 각 균주에 대한 log reduction을 확인하였다.

본 시험 조건하에서 시료 [리디잇 치약]의 시험용액에 대한 5분 후의 log reduction 값은 *P. gingivalis*에 대하여 > 5.89, *S. mutans*에 대하여 1.04로 나타났다.

1.1. 시험 일정

전체시험기간 2024-04-22 ~ 2024-05-09

1.2. 시료 사진



TBK-2024-003287

2. 시험 장치 및 재료 (Equipment & materials)

2.1. 시험 장치

Autoclave	(한백과학, 대한민국)
Chemical balance	(OHAUS, USA)
Clean bench	(Thermo Fisher, USA)
Dry oven	(Jisico, 대한민국)
Incubator	(Mettmert, Germany)
Petri dish	(SPL, 대한민국)
pH meter	(Mettler-Toledo, USA)
Shaking incubator	(Jisico, 대한민국)
Stop watch	(ACUBA, China)
Sterile pipette	(Falcon, USA)
Ultra sonicator	(화신테크, 대한민국)
Volumetric flask	(DURAN, Germany)
Vortex mixer	(Scientific Industries, USA)
Water bath	(한백과학, 대한민국)
Glove box	(글러브박스코리아, 대한민국)

2.2. 시험 재료

2.2.1. 시험균주

Porphyromonas gingivalis ATCC 33277

Streptococcus mutans ATCC 25175

2.2.2. 배지 및 시약

Tryptic soy broth (DIFCO, USA)

Tryptic soy agar (DIFCO, USA)

Tryptic Soy Agar Hemin Menadione (MB cell, 대한민국)

TSA Hemin Menadione A supplement (MB cell, 대한민국)

TSA Hemin Menadione B supplement (MB cell, 대한민국)

Sheep Blood Defibrinated (MB cell, 대한민국)

D/E neutralizing broth (DIFCO, USA)

멸균생리식염수 (자체 제조)

0.05 % polysorbate 80 solution (자체 제조)

3. 시험방법 (Test method)

3.1. 시험방법

3.1.1. 시험균의 전배양

P. gingivalis - 시험균주를 Tryptic soy agar Hemin Menadione에 접종하여 (35 ± 1) °C에서 (5 ~ 7)일 동안 혐기 배양하였다. 배양된 균주를 새로운 Tryptic soy agar Hemin Menadione에 접종하고 상기와 동일 조건으로 배양한 후, 이 과정을 1회 추가로 반복하였다.

S. mutans - 시험균주를 사면배지로부터 취하여 Tryptic soy broth에 접종하여 (35 ± 1) °C에서 (18 ~ 24)시간 동안 배양하였다.

3.1.2. 시험균액의 조제

배양된 균을 생균수가 (1.0 ~ 9.9) × 10⁸ CFU/mL가 되도록 멸균생리식염수에 희석하여 시험균액으로 사용하였다.

3.1.3. 시험 절차

P. gingivalis - 멸균생리식염수에 시료를 10 % (w/v) 농도로 조제하여 시험용액으로 사용하였다. 시험용액 20 mL에 시험균액 0.2 mL를 첨가하여 혼합한 후 (22 ± 2) °C에서 5분간 방치하였다. 혼합액 0.1 mL를 취하여 50 mL의 0.05 % polysorbate 80 solution을 채워놓은 Membrane filtration apparatus (membrane filter 포함)에 분주하고 필터하였다. 곧바로 200 mL의 0.05 % polysorbate 80 solution을 필터하고, 50 mL의 멸균증류수를 추가로 필터하였다. 이후, membrane filter를 분리하여 Tryptic soy agar Hemin Menadione 배지 표면에 밀착시켜 (35 ± 1) °C에서 (7 ~ 8)일 동안 혐기 배양하였다.

S. mutans - 멸균생리식염수에 시료를 10 % (w/v) 농도로 조제하여 시험용액으로 사용하였다. 시험용액 20 mL에 시험균액 0.2 mL를 첨가하여 혼합한 후 (22 ± 2) °C에서 5분간 방치하였다. 최초 희석은 D/E neutralizing broth를 이용하여 실시하였다. 중화된 시험액은 단계별로 희석하여 각 농도당 Petri dish 2매에 1 mL씩 분주하였다. 미리 준비된 (45 ~ 50) °C의 Tryptic soy agar를 Petri dish에 (15 ~ 25) mL 분주하고, 상온에서 응고시켰다. 응고된 Petri dish는 거꾸로 하여 (35 ± 1) °C에서 (24 ~ 48)시간 동안 배양하였다. 시험은 각 균주당 2회 반복하여 실시하였으며, 초기생균수의 측정에는 멸균생리식염수를 사용하여 실시하였다.

3.1.4. 결과 관찰

배양 후, 생균수의 관찰은 (15 ~ 150)개를 나타내는 Petri dish를 선택하여 실시하였다. 최저 희석 단계에서만 생균수가 관찰되는 경우에는 관찰 범위에 상관없이 계수하였다. 세균이 증식한 경우, 배지상의 균수에 희석 배수를 곱하여 산출하였다. 배지에서 세균이 증식하지 않은 경우는 중화단계에서 이루어진 희석배수를 곱하여 『10 미만(< 10)』으로 표시하였다. 생균수 계산은 3.2항 [식1.]에 따라 측정하였고, Log reduction은 [식2.]에 따라 결정하였다.

3.2. 결과 계산

3.2.1. 생균수 계산 [식1.]

$$N = C \times D$$

N : 생균수

C : 집락수 (2매의 집락 수 평균치)

D : 희석배수

3.2.2. [Log reduction (LR)] 계산 [식2.]

$$LR = \text{mean log (microbial population)} - \text{mean log (surviving test population)}$$

단, Log 값은 소수점 둘째 자리까지 표기하며 - 값이 도출되는 경우에는 0.00으로 표기한다.

4. 결과 (Result)

4.1. *P. gingivalis*에 대한 항균시험

초기 접종균수는 7.8×10^6 CFU/mL, 5분 후 시험균수는 2회 반복 시험에서 모두 < 10 CFU/mL로 관찰되었다.

표 1. *P. gingivalis*에 대한 시험 결과

구분	5분 후		
	생균수 (CFU/mL)	Log value	mean log
대조군 (초기)	7.8×10^6	6.89	6.89
시험군 I	< 10	< 1.00	< 1.00
시험군 II	< 10	< 1.00	

4.2. *S. mutans*에 대한 항균시험

초기 접종균수는 3.6×10^6 CFU/mL, 5분 후 시험균수는 2회 반복 시험에서 3.3×10^5 CFU/mL, 3.2×10^5 CFU/mL로 관찰되었다.

표 2. *S. mutans*에 대한 시험 결과

구분	5분 후		
	생균수 (CFU/mL)	Log value	mean log
대조군 (초기)	3.6×10^6	6.56	6.56
시험군 I	3.3×10^5	5.52	5.52
시험군 II	3.2×10^5	5.51	

5. 결론 (Conclusion)

본 시험 조건하에서 시료 [리디잇 치약]의 시험용액에 대한 5분 후의 log reduction¹⁾ 값은 *P. gingivalis*에 대하여 > 5.89, *S. mutans*에 대하여 1.04로 나타났다.

표 3. 항균시험 결과 종합

(단위 : mean log)

균 주	초 기	5분 후	
		생균수 평균	LR*
<i>P. gingivalis</i>	6.89	< 1.00	> 5.89
<i>S. mutans</i>	6.56	5.52	1.04

*LR: log reduction

LR = mean log (microbial population) – mean log (surviving test population)

¹⁾ 결과의 해석

Log reduction	Percent (%) reduction
1 이상	90 % 이상
2 이상	99 % 이상
3 이상	99.9 % 이상
4 이상	99.99 % 이상
5 이상	99.999 % 이상

6. 참고문헌 (References)

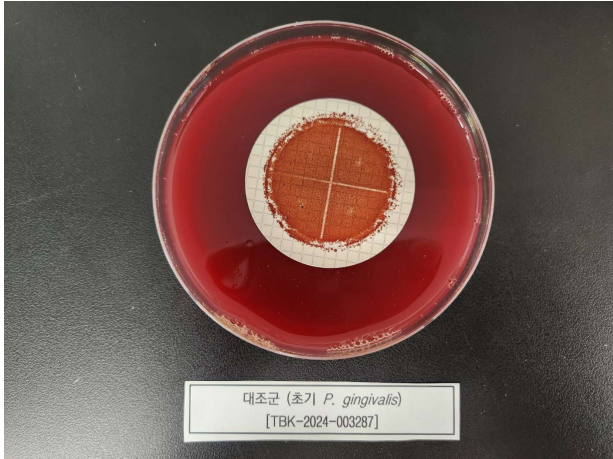
- 6.1. ASTM E2315-16, Standard Guide for Assessment of antimicrobial Activity Using a Time-Kill Procedure
- 6.2. JIS Z 2801:2012, Antibacterial products-Test for antibacterial activity and efficacy
- 6.3. KS K 0693:2022, 텍스타일 재료의 항균성 시험방법
- 6.4. BS EN 1276:2019, Chemical disinfectants and antiseptics-Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas – test method and requirements (phase 2, step 1)
- 6.5. 식품의약품안전처고시 제2023-82호

이 보고서는 한국화학융합시험연구원의 용역시험 결과입니다. 이 기술내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 한국화학융합시험연구원의 용역시험 결과임을 밝혀야 합니다.

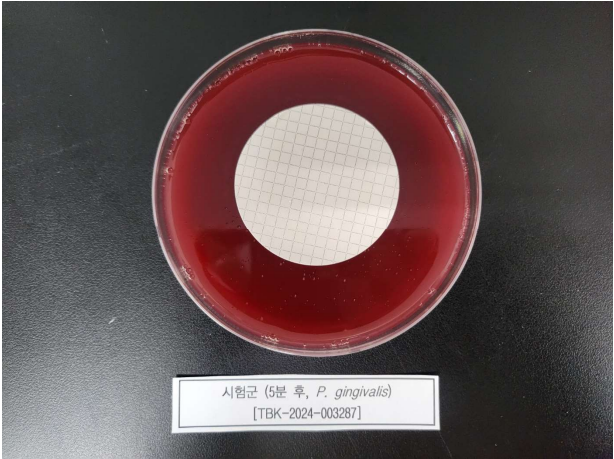
저작권자(c)한국화학융합시험연구원. 무단전재-재배포금지

7. 별첨 (Attachment)

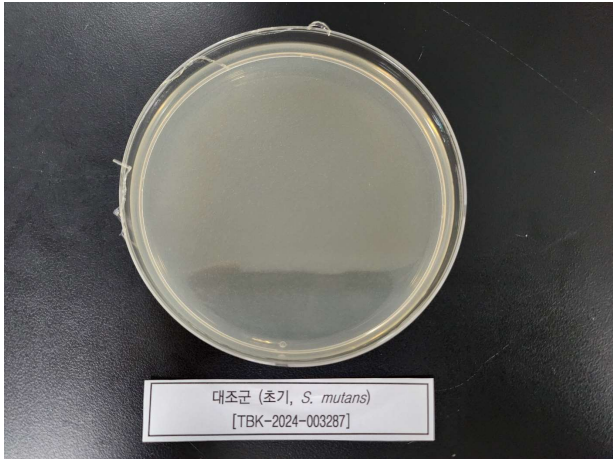
7.1. 시험결과 사진



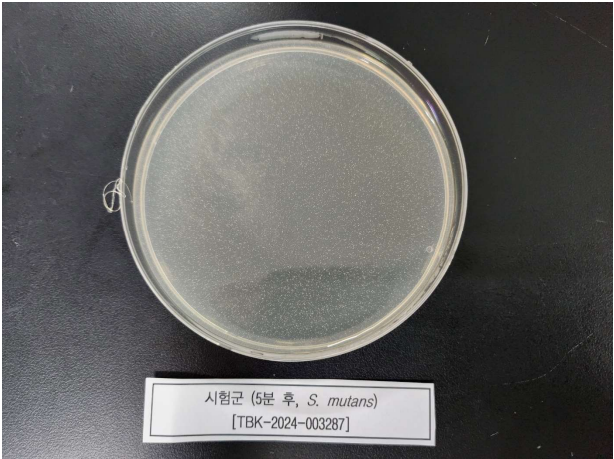
대조군 (초기, *P. gingivalis*)
[TBK-2024-003287]



시험군 (5분 후, *P. gingivalis*)
[TBK-2024-003287]



대조군 (초기, *S. mutans*)
[TBK-2024-003287]



시험군 (5분 후, *S. mutans*)
[TBK-2024-003287]