

발 간 등 록 번 호

11-1543000-001482-01

가
축
질
병
대
응
기
술
개
발
사
업
R&D
Report

천연물 지실(탱자) 추출물을 이용한 친환경 SI 소독제 개발 및 환경영향평가 최종보고서

2016. 12. 07.

주관연구기관 / 건국대학교 산학협력단
협동연구기관 / 주식회사 구을리

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “천연물 지실(탱자) 추출물을 이용한 친환경 AI 소독제 개발 및 환경영향 평가”(개발기간 : 2014. 6. 20 ~ 2016. 06. 19)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2016. 12. 05.

주관연구기관명 : 건국대학교 산학협력단 (대표자) 서정향 (인)
협동연구기관명 : ㈜ 구울리 (대표자) 문치웅 (인)



주관연구책임자 : 김영봉
협동연구책임자 : 문치웅

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	314003-2	해당단계 연구기간	2015.06.20. ~2016.06.19	단계구분	(해당2단계)/ (총2단계)
연구사업명	중사업명				
	세부사업명	가축질병대응기술개발사업			
연구과제명	대과제명				
	세부과제명	천연물 지실(탕자) 추출물을 이용한 친환경 AI 소독제 개발 및 환경영향평가			
연구책임자	김영봉	해당단계 참여 연구원 수	총: 17명 내부: 13명 외부: 4명	해당단계 연구개발비	정부: 200,000 천원 민간: 67,000 천원 계: 267,000 천원
		총연구기간 참여 연구원 수	총: 17명 내부: 13명 외부: 4명	총연구개발비	정부: 400,000 천원 민간: 134,000 천원 계: 534,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	건국대학교 산학협력단			참여기업명 (주) 구을리	
요약				보고서 면수 90쪽	
○ 일반세균에 대한 살균효과를 위해 구연산50% 와 조류 인플루엔자에 대한 항바이러스 효능을 위해 탕자 추출물 0.5%의 함량으로 친환경 소독제를 개발하여 시험한 결과 기존 소독제와 비교하여 저 농도의 높은 희석배수(1458배)에서도 높은 항바이러스 효능을 보여주었음. ○ 구연산 함량이 동일한 산성제 소독제 제품과 비교하여 천연물 신소재 소독제가 높은 희석배수에서도 항바이러스 효능을 보여줌으로써 저 농도에서의 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 효능은 구연산 보다 탕자추출물이 항바이러스 효능에 더 영향을 준다는 것을 확인하였음.					

1. 국문 요약문

		D-01			
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기존 소독제와 차별화된 조류 인플루엔자 항바이러스 활성 효과를 갖는 천연 바이오소재의 개발 및 제조 원천기술 확보. ○ 조류 인플루엔자 항바이러스 후보물질에 대한 조성 설계의 최적화를 통하여 유효성의 극대화 및 천연물 소재의 대량 정제 조건 확립에 의한 대량생산 산업화 기술 개발을 통한 친환경 조류 인플루엔자 소독제 개발 				
연구개발성과	<p>1. 천연물 탱자 추출물 조류 인플루엔자 소독제의 원료 및 원재료 표준화를 위한 지표물질 선정</p> <ul style="list-style-type: none"> (1) 조류 인플루엔자 소독제의 표준화를 위한 지표 물질을 선정하기 위해 건조된 탱자 씨앗 분말을 에탄올로 추출 (2) Hexane 분획물을 Liquid column chromatography를 이용하여 지표물질을 분리 (3) 분리된 지표성분의 구조 분석 및 규명을 위해 핵자기공명분광법 (1H-NMR, 13C-NMR)과 LC/MS 분석을 실시하여 지표성분이 Bergapten임을 확인 <p>2. 탱자씨 추출물의 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 효능 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 탱자씨 추출물은 타미플루와 비교하여 세포독성은 낮으면서도 인플루엔자 바이러스에 대해서는 동등한 수준의 항바이러스 효능을 보여주었음. <p>3. 천연물 탱자 추출물 조류 인플루엔자 소독제의 조성별 효능 최적화</p> <ul style="list-style-type: none"> (1) 일반세균에 대한 살균효과를 위해 구연산50% 와 조류 인플루엔자에 대한 항바이러스 효능을 위해 탱자 추출물 0.5%의 함량으로 소독제를 조성하여 항바이러스 효능을 분석함. (2) 천연물 신소재 인플루엔자 바이러스 소독제 (바이로케이투) 가 기존 소독제와 비교하여 저 농도의 높은 희석배수(1458배)에서도 높은 항바이러스 효능을 보여주었음. (3) 구연산 함량이 동일한 산성제 소독제 제품과 비교하여 천연물 신소재 소독제가 높은 희석배수에서도 항바이러스 효능을 보임으로써 저 농도에서의 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 효능은 구연산 보다 탱자추출물이 항바이러스 효능에 더 영향을 준다는 것을 확인하였음. 				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 제품 개발과 상품화로 국내 축산, 양계 분야의 조류 인플루엔자 예방 및 대응 제품으로 사업화 ○ 국내 인플루엔자 전염병에 대한 예방 및 통제 기대효과 ○ 내성과 독성이 없는 안전성과 바이러스 type에 관계없이 약효를 보이는 친환경 소독제 효능을 바탕으로 수출 기대 효과 ○ 축산, 양계 분야에 대규모로 피해를 입히는 조류 인플루엔자에 소독제 효력을 보이는 예방물질 개발 기술 확보로 백신의 한계 극복 및 치료제로서의 개발 가능 효과 				
중심어 (5개 이내)	조류 인플루엔자바이러스	탱자추출물	친환경소독제	구연산	항바이러스효능

2. 영문 요약문

< SUMMARY >

		D-02
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> ○ Development of a differential natural disinfectant material and possession of manufacturing source technology having an antiviral activity against the avian influenza through comparison with other commercial disinfectants ○ Maximization of effectiveness through the optimization of composition ratio about candidate substance having an antiviral activity against the avian influenza and development of eco-friendly AI disinfectant through development of industrialized technology on a mass production basis under mass purification conditions 	
Results	<p>1. Selection of Index material for standardization of raw material of eco-friendly AI disinfectant</p> <p>(1) Trifoliolate orange extract was obtained from seeds using ethanol extraction method in order to select the index material for standardization of raw material of eco-friendly AI disinfectant.</p> <p>(2) Hexane fraction was obtained from trifoliolate orange extract using hexane extraction.</p> <p>(3) ¹H-NMR and LC/MS analysis were used for structural analysis and identification about separated index material. So, we confirmed that index component for trifoliolate orange extract is Bergapten.</p> <p>2. Antiviral efficacy test against AI influenza virus for the extract from trifoliolate orange seeds</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Extract from trifoliolate orange seeds showed the low cell cytotoxicity and similar high level of antiviral activity as compared with tamiflu. <p>3. Optimization of antiviral activity about AI disinfectant from trifoliolate orange extract under the condition of composition ration</p> <p>(1) We performed the test of antiviral activity about AI disinfectant with 50% content of citric acid for antimicrobial activity and 0.5% of trifoliolate orange extract for antiviral activity.</p> <p>(2) AI disinfectant showed the high antiviral effect at even high dilution (lower concentration) compared with other commercial disinfectants.</p> <p>(3) As AI disinfectant showed the antiviral effect at higher dilution as compared to acidic disinfectant with equivalent content of citric acid, we confirmed that trifoliolate orange extract have a more influence on antiviral activity than citric acid.</p>	
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ○ Commercialization of eco-friendly disinfectant against avian influenza for livestock and poultry farming field ○ Prevention and control of influenza endemic in Korea 	

	<ul style="list-style-type: none"> ○ Expectation effectiveness for export based on eco-friendly AI disinfectant with safety without resistance and toxicity and having the antiviral effect without any type of virus ○ New potential therapeutic agent having antiviral activity against avian influenza could be prevent the massive damage in livestock and poultry farming field and overcome the limitations of the vaccine effect. 				
Keywords	Avian influenza virus	Trifoliate orange extract	eco-friendly disinfectant	Citric acid	Antiviral activity

3. 영문목차

Table of contents >

Chapter1. Summary of Research and development project	8
Chapter2. Situation of Domestic and international technology developments ...	16
Chapter3. Research results	24
Chapter4. Achievement and contribution of the related fields	72
Chapter5. Application plan of research result	74
Chapter6. International scientific and technical information	77
Chapter7. Security level of research and developments output	78
Chapter8. Research facilities, equipment status registered in National Science & Technology Information (NTIS)	79
Chapter9. Performance result of Safety procedure for Research and development project	80
Chapter10. Representative Research capabilities of Research and development project	82
Chapter11. Other detail	83
Chapter12. References	84

[An attached paper1] Research paper

[An attached paper2] Certificate of patent

[An attached paper3] Laboratory safety training participation list and certificate

4. 본문목차

목 차 >

1장. 연구개발과제의개요	8
2장. 국내외 기술개발 현황	16
3장. 연구수행 내용 및 결과	24
4장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	72
5장. 연구결과의 활용계획 등	74
6장. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	77
7장. 연구개발성과의 보안등급	78
8장. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	79
9장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	80
10장. 연구개발과제의 대표적 연구실적	82
11장. 기타사항	83
12장. 참고문헌	84

[별첨 1] 논문게재사본

[별첨 2] 특허등록증사본

[별첨 3] 실험실 안전관리 교육 참여 명단 및 이수증

1장. 연구개발과제의 개요

1절. 연구개발 목적

1. 연구개발의 개요

가. 양계산업에서 지속적으로 발생하고 있는 조류인플루엔자의 감염에 의한 피해를 최소화하기 위한 대응 기술 개발로서 천연물 유래 항바이러스 효능을 가지는 신소재를 이용하여 조류인플루엔자 감염 예방 및 2차 감염 예방을 위한 친환경 소독용 제품 개발과 이를 통한 산업화.

나. 기존 소독제와 차별화된 조류 인플루엔자 제어용 천연 바이오 소재의 실용화를 위하여 소독제 효력시험을 통한 항바이러스제로서 유효성 평가를 통한 항바이러스 활성 효과를 갖는 천연 바이오소재를 개발 및 제조 원천기술을 확보함.

(1) 조류 인플루엔자 항바이러스 후보물질에 대한 조성 설계의 최적화를 통한 유효성이 극대화 및 천연물 소재의 대량 정제 조건 확립에 의한 대량생산 산업화 기술 개발을 통한 친환경 조류 인플루엔자 소독제를 개발함.

(2) 조류 인플루엔자 천연물 소재 소독제에 대한 환경 영향평가를 통한 안전성을 평가함.

(가) 환경부 고시 환경영향평가 기준 항목은 대기오염 영향도 평가, 수질오염 영향도 평가, 폐기물 영향도 평가, 토양오염 영향도 평가, 에너지 영향도 평가, 소음/진동 영향도 평가 및 생태계 영향도 평가 등이 있음.

(나) 그러나 환경영향평가 대상 사업의 종류 및 범위들은 시설 개발 사업 등을 대상으로 규정하고 있으며, 현재 소독제에는 해당되지 않고 있음 (환경영향평가법 시행령[시행 2014. 04. 29.] [대통령령 제25339호, 2014.04.29., 타법개정] 참조).

(다) 그러므로 본 과제의 친환경 소독제 제품의 개발에 있어서 생산시설이 아닌 소독제에 국한하여 환경영향평가를 실시하며, 기존 살충제에 대한 환경영향 평가에서 실시되고 있는 급성 독성 및 식물 발아 영향 시험을 통한 유해성 평가를 통하여 수질 및 토양 오염에 대한 환경영향 평가를 실시함으로써 종합적인 생태계 환경영향평가를 하고자 함.

2절. 연구개발의 필요성

1. 조류 인플루엔자 발생 국내의 현황

가. 조류 인플루엔자에 의한 국내의 피해 현황

- (1) 가축 전염병에 의한 피해는 축산총생산의 20%를 차지할 정도로 막대하며, 가축사육 규모가 커지고 집단화됨에 따라 가축질병 발생으로 인한 피해규모는 커지고 있음. 특히 시장개방에 따라 해외로부터 구제역 또는 고병원성 조류 인플루엔자와 같은 악성 전염병의 국내 유입으로 인한 피해가 날로 커져 가축질병의 예방 및 전파방지 대책이 시급함.
- (2) 최근 조류 인플루엔자의 확산에 의한 피해를 겪으면서, 가축 전염성에 대한 예방 및 전파방지에 대한 대책이 절실히 요구됨.
- (3) 가축전염성 질병 중 조류독감은 닭, 오리, 칠면조, 철새 등 조류에 감염되는 바이러스성 전염병으로서 전파속도가 매우 빠르며, 고병원성 조류 인플루엔자는 감염되면 폐사율이 거의 100%에 달함.
- (4) 특히, 2014년 1월 전북 고창에서 오리농장에서 발생한 조류인플루엔자의 경우 혈청형이 H5N8으로서 기존에 우리나라에서 발생한 적이 없는 새로운 혈청형의 조류인플루엔자로서, 고병원성으로 조류에 높은 폐사율을 가지는 것으로 알려져 있음.
- (5) 100여마리 폐사한 가장오리에 대한 혈청학적 검사 결과 이번에 오리농장에서 발생한 H5N8형과 똑 같은 혈청형으로 밝혀져, 대규모 철새이동에 따른 전파로 추정되고 있음.



그림1. 국내 및 아시아 조류 인플루엔자 발생 현황 (자료: 세계보건기구, 농림축산식품부)

- (6) 일반적으로 고병원성 조류 인플루엔자의 경우라도 오리에서는 종오리에서만 산란율과 부화율에 영향을 끼치는 것으로 알려져 있으나 일반사육 오리에서는 큰 폐사없이 지나가는게 대부분이었는데 이번 조류 인플루엔자의 경우 일반사육 오리에서도 높은 폐사율을 나타내었음.
- (7) 최근 H7N7, H7N9 등 각종 새로운 변종바이러스들이 발견되고, 인체 감염까지 보고되고

있어 중국, 일본 등과 빈번한 인적 교류를 하고 세계적인 철새도래지인 한국은 자칫 전 세계 조류인플루엔자의 근원이 될 수도 있다는 우려가 높아지고 있음.

(8) 국제수역사무국(OIE)에서는 고병원성 조류 인플루엔자는 리스트 A 등급으로, 한국에서는 제 1종 가축전염병으로 분류하고 있으며, 국민들의 보건에 대한 사회적 파장뿐만 아니라 전국 농가 및 국가 경제에도 막대한 타격을 입히고 있음.

(9) 과거 국내 조류 인플루엔자는 총 4회에 걸쳐 발생했고, 이 중 그 피해규모가 가장 컸던 지난 2008년에는 조류 인플루엔자로 인해 전국의 1500개 농가에서 약 1020만4000마리 가량의 닭, 오리 등의 가금류가 폐사된 것으로 나타났으며, 이에 따른 피해 규모는 약 3070억원에 달하였음.

표1. 국내 주요전염성 가축질병 발생 대표 사례

구 분	구 제 역		조류 인플루엔자	
발생시기	2010년 11월 28일~2010년 4월 21일		2008년 4월 1일~ 5월 12일	
발생건수	153건	소 97건, 돼지 55건, 염소 1건	32건	- 닭 21건, 오리 6건 - 닭과 오리 복합 6건
방역조치	살처분	6,241 농가, 약 350만 마리	살처분	1,500 농가, 약 1,020만 마리
재정지출액	2조 7,383억원		3,070억원	

(자료: 현대경제연구원)

(10) 그러므로 올해 발생한 조류 인플루엔자로 인한 경제적인 피해도 막대한 규모에 이를 것으로 예상되고 있으며, 1월 29일까지 총 16건의 의심 신고가 발생하는 등 신고 건수가 지속적으로 늘고 있는 상황임.

(11) 농림축산식품부는 1월 26일 기준 이미 살처분된 가금류 등은 64만4000마리, 살처분 예정인 가금류도 81만3000마리에 달한다고 발표한 바 있음.

표2. 2014년 고병원성 조류 인플루엔자 발생 관련 살처분 현황

살처분 완료			살처분 예정(잠정)		
축 종	농 장	두 수	축 종	농 장	두 수
오 리	39	544,000	오 리	6	164,000
닭	4	100,000	닭	21	649,000
계	43	644,000	계	27	813,000

(자료: 현대경제연구원)

(13) 이러한 피해 규모는 지난 2008년의 사례를 바탕으로 추산된 경제적 피해 규모는 최초 발생일인 지난달 16일부터 열흘간 약 438억3565만원으로 집계됐으며, 하루 피해액만 약 43억8000만원으로 예상됨.

(14) 이 같은 추세가 전국적으로 확대될 경우 농가 등에 대한 직접피해 뿐만 아니라 사료회사나 유통 등 관련 업체들에게도 그 직·간접 피해가 전가돼 그 손실액이 기하급수적으로 늘어날 것으로 예상되고 있음.

(15) 2008년 발생 시의 경제적 피해를 바탕으로 예상한 결과, 전국에 걸쳐 조류 인플루엔자 감염률이 5%일 때 농가와 정부의 직접 기회손실 피해규모는 각각 837억원, 2046억원으로 감염률이 10%일 경우 직·간접적 총 피해규모는 6802억원, 15%는 1조203억원에 달할 것으로 예상됨.

표3. 2014년 조류 인플루엔자 감염 단계별 직·간접 기회손실 규모

(단위: 억원)

감염률	직접기회손실		간접기회손실			계 두 수
	농가 (살처분, 생산 감소 등)	기타정부지출 (각종 보상금 및 지원금, 방역비 등)	사료산업	육류 및 육가공업	음식업	
5%	837	2,046	8	460	51	3,402
10%	1,673	4,092	15	920	102	6,802
15%	2,510	6,138	23	1,380	153	10,203

(자료: 현대경제연구원)

(16) 조류 인플루엔자는 대규모 확산에 의한 피해뿐만 아니라 돌연변이에 의한 변종이 쉽게 생기기 때문에 H5N1와 같이 인체 발병 케이스가 발견될 가능성도 배제할 수 없으므로 철저한 방역이 필수적임.

(17) 또한 돌연변이에 의한 신변종 조류 인플루엔자에 대한 약제나 백신의 개발에 시간도 오래 걸리고, 개발이 되더라도 한 개의 타입에만 작용하기 때문에 가장 효과적인 방역은 어떠한 종류의 조류 인플루엔자 바이러스 타입에 관계없이 즉시 살균 소독이 되는 살균 소독제를 사용하는 것이라 사료됨.

나. 기존 조류인플루엔자 소독제의 현황

(1) 농림축산식품부에 의하면 2016년 7월 현재까지 전국 지자체에 보급된 조류 인플루엔자 소독제의 규모는 액상(수용성·물에 희석한 소독약) 155톤과 생석회 124톤으로 잠정 집계되었으며, 추가 보급될 소독제는 액상 4000톤, 생석회 6800톤으로 보고된 바 있음.

(2) 현재 조류 인플루엔자의 방역에 사용되는 소독약의 성분은 염기(알칼리) 체제, 산성 체제, 알데하이드계, 산화제 등을 사용하고 있음.

표4. 조류인플루엔자 소독제 적용대상

소독제(제제)		적용대상	비고
염기	가성소다(2%) 탄산소다(4%)	축사·시설, 폐수·분뇨 기계·차량, 의복	사람·가축 사용금지
	생석회(pH11~12)	축사바닥, 토양(m ² 당 300~400g)	인체에 닿지 않도록 주의
산성	염산(2%)	분뇨	콘크리트·금속 부식
	구연산	분뇨	항공 방제에 사용
알데하이드	글루타알데하이드(1~2%)	유기물질 소독	사람·가축 사용금지
	포르말린(8%)		사람·가축 사용금지
	폼알데하이드 혼중	밀폐공간(축사, 창고, 차량 등)	15~24시간 소독 후 환기
산화제	치아염소산(pH6~9)	축사, 기구, 숙소, 의복	
	이염화이소시안산나트륨	축사, 기구, 숙소, 의복	
	복합염류	축사, 기구, 숙소, 의복	
비누세정제		축사, 시설, 숙소, 기계, 차량, 의복 등	

(자료: 농림축산검역본부)

(3) 염기 제제는 가성소다와 탄산소다가 쓰이는데 비용이 저렴하지만 부식성이 강해 축사나 하수구에만 사용하고 사람이나 차량 소독에는 금지하고 있으며, 산도(pH) 11~12의 강염기인 생석회는 사체나 토양 소독제로 광범위하게 사용되고 있음.

(4) 그리고 산성 제제인 염산과 구연산은 주로 분뇨 소독에 쓰이며, 특히 구연산은 항공 방재용으로 많이 사용하고 있음.

다. 기존 소독제의 문제점

(1) 현재 조류 인플루엔자의 확산을 막기 위한 방역에 주로 사용되는 소독약의 성분은 염기(알칼리) 제제, 산성 제제, 알데하이드계, 산화제 등이 있음.

(2) 염기 제제는 가성소다와 탄산소다가 사용되는데 비용이 저렴하지만, 부식성이 매우 강한 문제점을 지니고 있어 사람이나 차량 소독에는 금지하고 있으며, pH 11~12의 강염기인 생석회는 사체나 토양 소독제로 광범위하게 사용되고 있어 방역지역의 주위 토양 및 지하수의 수질 오염 등의 환경오염을 유발할 가능성이 높음.

(3) 산성 제제인 염산과 구연산은 주로 분뇨 소독에 쓰이며, 특히 구연산은 항공 방재용으로 많이 사용하고 있어, 광범위한 지역살포로 인한 토양의 산성화 및 수질오염을 유발할 가능성 높음.

- (4) 가장 문제되고 있는 기존 조류 인플루엔자 소독제의 성분은 글루타알데하이드와 폼알데하이드로서 고독성의 발암물질로 잘 알려져 있지만, 탁월한 소독 효과 때문에 조류 인플루엔자의 소독제에 포함돼 있어 있는 실정임.
- (5) 그러므로 방역 당국의 소독제의 대량 살포가 사람과 주변 환경에 피해를 가져올 수 있을 가능성이 증대되고 있음.
- (6) 또한 소독제 성분 자체도 문제지만, 올해와 같이 고병원성 조류인플루엔자 발생이 경북과 강원, 제주를 제외한 전 지역으로 확대되면서 소독 주기나 1회 소독량도 대폭 강화된 상황에서, 일선 방역현장의 경우 소독약 사용설명서 준수나 안전수칙 등이 제대로 지켜지지 않을 가능성이 매우 큼.
- (7) 그러므로 염소계나 알데하이드계 등 기존 소독제들에 의한 발암물질을 부산물로 생성하거나, 자체 독성이 강한 소독제 의해 바이러스뿐 아니라 토양에 살고있는 유익한 미생물까지 모두 사멸시켜 환경 파괴의 주범이 될 가능성이 매우 큼.

2. 천연물을 이용한 신규 소독제의 개발 필요성

가. 친환경 소독제의 개발 필요성

- (1) 기존 조류 인플루엔자 소독제의 인체에 미치는 독성문제, 조류인플루엔자의 전국적 확산으로 인한 양계농가의 막대한 피해를 막기 위해 소독제의 대량 살포로 인한 환경오염 문제 및 이에 따른 친환경 제제 사용에 대한 사회적 요구가 계속적으로 증가하고 있는 상황에서 친환경적 천연 약용식물을 이용한 소독제의 연구와 기술 개발에 대한 요구 및 필요성이 매우 절실한 실정임.
- (2) 또한 현재 친환경적 천연 약용식물을 이용한 소독제의 연구와 기술 개발이 일부 이루어져 왔으나 현장적용에 문제점을 개선한 실용화된 조류 인플루엔자에 대한 소독제는 거의 전무한 상황임.
- (3) 기존 조류 인플루엔자 소독제에 의한 환경파괴, 주변 지하수 오염에 의한 발암 및 고독성 성분들의 잔류 농산물, 방역 종사자나 주변 양계농가의 축산물의 유해성분 체내 축적으로 인한 농축산물에 대한 소비자의 관심이 커지고 있으므로 식용, 약용으로 사용한 천연물 유래 신소재를 이용한 소독제의 활용에 대한 관심과 노력이 절실히 요구되고 있는 실정임.
- (4) 식물체로부터 유래한 천연물 소재는 전통적으로 제약업계에 있어 선도화합물의 가장 중요한 원료의 하나로서 역할을 하였으므로, 천연물 소재로부터 조류 인플루엔자 소독제 연구는 신규 물질 발견 시 가장 빠르게 현장 적용이 가능한 장점을 지님.

- (5) 식용 천연물 소재들의 경우, 수백년 이상 이미 사람에게서 식용으로 사용되어 왔으므로 소독제의 적용 시 환경오염 및 방역 종사자들과 가축에 대한 부작용 문제가 기존 소독제 성분들에 비하여 적다는 장점을 지니고 있음.
- (6) 이러한 장점을 바탕으로 최근에는 조류 인플루엔자에 대한 항바이러스 활성을 지닌 플라보노이드, terpenoids, sulphides, polyphenolics, saponins, alkaloids, lignans, polyines, thiophenes, peptides 등 다양한 phytochemicals 등이 알려졌으며, 높은 수준의 항바이러스 효능을 가진 천연물성분들에 대한 많이 연구되고 있으나 현장 적용이나 활용면에서는 천연물 성분 연구는 시작 단계에 불과한 실정임.
- (7) 전 세계적으로도 조류 인플루엔자에 대한 예방 목적의 친환경적 소독제는 거의 전무한 상황인데, 최근 조류 인플루엔자 감염에 의한 피해는 더욱 빈번하게 발생하고 그 피해도 대량폐사로 이어지고 있음.
- (8) 시장개방에 따라 해외로부터 조류인플루엔자의 국내 유입으로 인한 피해가 날로 커져 예방대책이 시급한 실정이며, 사람으로의 감염에 대한 우려가 높아짐으로서 효과적인 친환경 소독제의 개발에 대한 사회적 관심과 요구가 높아지고 있음.

나. 다양한 종류의 인플루엔자에 효능을 갖는 소독제의 개발 필요성

- (1) 올해 한국에서 발견된 조류 인플루엔자 바이러스인 H5N8은 H5N1의 변형 바이러스로서, 조류인플루엔자바이러스는 변형이 매우 쉽게 되는데다, 약제나 백신의 개발에 시간도 오래 걸리고, 개발이 되더라도 한 개의 타입에만 작용하기 때문에 가장 효과적인 방역이란 어떠한 종류의 조류 인플루엔자 바이러스 타입이건 관계없이 즉시 살균 소독이 되는 살균소독제를 사용하는 것임.
- (2) 이로 인하여 조류 인플루엔자의 조기 확산 방지를 위한 방역비용에 대한 국가적인 지출 또한 커지고 있음.
- (3) 특히, 조류 인플루엔자는 생산과 소비, 무역협정과 같은 경제적인 측면에서 중요한 이슈이고, 인간의 건강 및 생존을 위협하여 사회적인 불안도 야기함.
- (4) 조류 인플루엔자의 전염에 따른 양계농가의 닭과 오리 등의 가축 폐사와 같은 직접적 피해와 함께 관련 산업으로의 간접적인 피해도 적지 않으며, 인간에게 전파될 경우 인명 피해로 이어져 관광 및 무역에도 영향을 끼치고, 지역 간 또는 국가 간 교류의 장벽과 사회, 경제적 손실을 초래함. 따라서 이러한 전염병을 사회경제적 질병(Socio-economic disease)라고 지칭함.

(5) 이와 같이 국제적으로 지대한 관심을 불러일으키는 조류 인플루엔자는 특히 인간의 사회, 경제적 활동과 변화에 따른 환경 및 생태계 변화에서 유래되어, 광범위한 숙주(reservoir)나 전파매개체에 의해 그 피해가 막대함. 또한 이에 대한 진단, 예방, 치료 등 제반 문제를 해결하는 과정에 있어 막대한 시간과 예산이 요구되는 관계로 공중보건 측면에서 매우 중요한 위치를 차지함.

(6) 그러므로 올해 국내 조류 인플루엔자의 유행에 맞춰 바이러스에 대한 높은 제어능력을 가진 친환경 소독제 개발이 절실히 요구되고 있으며, 국내외 사회·환경변화에 따라 새롭게 부각되는 신·변종 조류인플루엔자 위협요인 등에 대한 정부차원의 대응기술 개발의 필요성 제기되고 있음.

3절. 연구개발 범위

1. 기존 소독제와 차별화된 조류 인플루엔자 제어용 천연 바이오 소재의 실용화를 위하여 소독제 효력시험을 통한 항바이러스제로서 유효성 평가를 통한 항바이러스 활성 효과를 갖는 천연 바이오소재 개발 및 제조 원천기술 확보.
2. 조류 인플루엔자 항바이러스 후보물질에 대한 조성 설계의 최적화를 통한 유효성이 극대화 및 천연물 소재의 대량 정제 조건을 확립에 의한 대량생산 산업화 기술을 개발을 통한 친환경 조류 인플루엔자 소독제 개발.
3. 조류 인플루엔자 천연물 소재 소독제에 대한 환경 영향평가를 통한 안전성 평가.

2장. 국내외 기술개발 현황

D-04

1절. 국외 기술개발 현황

1. 기존 조류 인플루엔자에 대한 소독제의 성분들이 환경오염 및 파괴의 원인으로 제기되고 있으며, 발암 및 독성을 지닌 물질이지만 이를 대체할 수 있는 친환경적인 천연물 소재의 소독약 개발은 전무한 실정임.
2. 전 세계적으로 천연물 유래 조류 인플루엔자 예방을 위한 소재 연구 및 기술 개발은 확산을 막기 위한 방역에 사용되는 소독제가 아닌 사람이나 가축의 치료용 신약개발을 중심으로 활발히 이루어지고 있음.
3. 많은 전통 약용식물들은 강한 항바이러스 활성을 가지고 있다고 보고되었으며, 그 들 중 일부는 바이러스에 감염된 동물이나 사람을 치료하기 위해 사용되고 있음.
4. 2차 세계대전 후에 유럽에서 항바이러스제 개발이 시작되어 최근까지 세계각지에서 약용 식물의 항바이러스 활성을 평가하기 위해 수많은 광범위한 스크리닝 프로그램이 진행되고 있음.
5. 항-인플루엔자 바이러스 제제 개발 및 효능 평가 분야
 - 가. 영국 The Boots Drug Company: 1952년 계태아를 이용하여 인플루엔자 A에 대하여 288가지 식물체의 효과를 검사하였으며, 이 중 12개가 바이러스 증식을 억제한다는 것을 발견함.
 - 나. 영국 레트로스크린 바이러스 연구소: 1989년 설립된 영국 런던 소재의 바이러스 전문 연구 기관으로 조류인플루엔자, HIV, SARS 바이러스등 각종 바이러스에 대한 시험과 임상 을 진행하는 연구기관
 - 다. St Jude Children's Hospital (Dr. Webster): 고병원성 H5N1 백신 개발 및 Reverse genetic System 개발

표5. 세계 바이오 벤처 및 제약회사의 천연물 신약 개발 현황

개발회사	화합물	기원(학명)	적용증	개발단계
Abbott Lab	ABT-594	Ecuadorian frog	진통제	전임상
AMRAD	Conocurvone alogue(AM1401)	Western australian smokebush	항 HIV	전임상
Bristol-Myers Squibb	Eleutherobin	Rare Australian soft coral	유방암, 난소암	전임상
	Paclitaxel(Taxol)	<i>Taxus brevifolia</i>	불응성유방암, 난소암	시판
Eli-Lilly&Co	Cryptophycins	Blue-green algae	항암	전임상
Calbiomarine	Product aquaculture	<i>Bugula neritina</i>	전이성 melanoma	임상

Tech.				
Intrabiotics	IB-367	Protegrin	구강점막염	임상
Marine habor branch	Discodermolide	Sponge	항암	전임상
NCI	Dolostatin 10	Mollusc (<i>Dolabella auricularia</i>)	항암	임상
NCI / Eisai US	Halichondrin B	Marine sponge	항암	전임상
Pharmaprint	Standardized ext	Saw palmetto berries	전립선 과형성증	임상
Phytera	Cyclomarin	Caribbean sea whip	항염증	전임상
Pharmacia & upjohn	9-Amino-camptothecin	<i>Camptotheca acuminata</i>	항암	임상
	Irinotecan		항종양	시판
Rhone- Poulenc rorer	Docetaxol	European yew needles	항종양	시판
Shaman Pharmaceuticals	Provir, Vired	Ethnobotanical leads	AIDS, Herpes	임상
	Nikkomycin Z		Systemic mycosis	임상
Pharmacia & upjohn	9-Amino-camptothecin	<i>Camptotheca acuminata</i>	항암	임상
Irinotecan	항종양	시판		
Xenova	XR5000/XR9051	Bacteria	항암	임상
Magainin Pharmaceuticals	Aminosterol	Dogfish	고형암	임상
	Cytalex(MSI-78)	African clawed frog	당뇨성폐양감염	임상
VimRx Pharmaceuticals	Hyperin	<i>Hypercurium perfora</i>	항암	임상
	Pseudopterosin	Pseudopterogorgia sp	항종양, 난소암	전임상

2절. 국내 기술개발 현황

1. 전통의약의 역사가 오래되었고, 우수 연구자들 및 기술, GMP 제약 생산시설 등을 갖추고 있어 전통의약에 대한 정보 및 인프라는 풍부하지만, 천연물 소독제 개발에서는 아직 미흡한 상태임.
2. 최근 전통약물로부터 신약을 개발하고자 하는 인식 확산과 더불어 천연물 소독제의 개발에 대한 관심이 높아지고 있음.
3. 정부 및 민간의 연구개발 투자규모 미약한 실정으로 2001년 천연물 신약연구개발 분야 연구개발비는 30억원으로 정부 전체 연구개발비 중 0.07%에 불과함. 또한 주요 제약사의 연구개발비 투자는 매출액대비 약 5%수준 (선진국은 15~20%)이나 절대적인 투자규모 작음.
4. 그러나 조류 인플루엔자 확산 방지를 위한 천연물 소독제의 개발은 전혀 이루어지지 않고 있는 실정임.

3절. 생산 및 시장 현황

1. 국내 천연물질의 신약 개발 현황

가. 국내 천연물 의약품 시장 규모는 약 5,000억원으로 추산하고 있다. 제약공장의 생산과정을 거치지 않은 한방약까지 포함할 경우 국내 시장 규모는 1조원에 달하게 된다. 국내 오리지널 제품이 전혀 없는 합성신약의 경우 대부분 100억원 이하의 낮은 매출에 비해, 천연물 신약은 발매 첫 해부터 수백억원 이상의 매출을 올리고 있다(한국보건산업진흥원).

나. 최근 허가된 천연물 신약으로 애엽 성분의 스티렌캡셀(급만성위염), 하고초, 위령선, 팔루근 성분의 조인스정(관절염/진통제), 약쑥 성분의 스티렌 등은 연 매출액 100억이 넘는 제품으로 성장했으며 현재 약 30개의 품목이 천연물신약으로 동물시험 또는 임상시험을 진행하고 있는 실정이다(한국보건산업진흥원).

다. 보건복지부는 우리나라 신약개발을 지원하기 위하여 1995년 제정된 보건의료기술진흥법에 의거하여 보건의료기술 연구개발사업의 연구 분야 중 하나로 1995년부터 2010년까지 16년간 총 4,340억을 투자하는 신약개발 지원 사업을 추진하고 있으며, 2010년까지 최소 10종의 신약개발과 세계 신약 개발국 7위에 진입하는 것으로 목표로, 기초탐색부터 전임상시험, 임상시험까지 신약개발의 전 단계를 지원하는 사업을 시행하고 있다(한국보건산업진흥원).

라. 보건복지부는 생물다양성 협약에 의해 국내 자생생물자원의 활용 가능성을 극대화하기 위해 자원의 보호, 보전 및 응용을 위한 「천연물신약연구개발촉진법」이 공포(법률 제 6125호, 2000년 1월 12일)됨에 따라 한약 등 전통 의약품으로 오랫동안 임상을 거쳐 사용되어온 생약자원을 이용한 신약 개발을 추진하게 되었다(한국보건산업진흥원).

마. 연구 분야는 천연물신약 개발을 위한 신물질 탐색, 천연물신약 전임상 및 임상시험, 천연물신약 개발을 위한 기초기반 기술연구 등으로 천연물효능검색 등 천연물과학 기반기술 구축부터 천연물 응용신약개발까지 총체적으로 지원하고 있으며, 지원 가능 프로그램은 단독기초연구지원, 제품화기술개발지원, 특정센터연구지원이 있는데, 천연물신약연구개발전문기관을 특정센터로 지정하여 이를 중심으로 산·학·연·관간의 공동협동연구개발, 천연물신약 연구개발정보의 관리·보급 및 지원체계를 구축하도록 하고 있다(한국보건산업진흥원).

2001년도 보건 의료기술 진흥사업(한국보건산업진흥원)

구분		사업 개요
보건의료기술 진흥사업	보건의료기술 연구개발사업	<ul style="list-style-type: none"> • 국민 건강증진과 보건산업발전을 위한 연구 개발 사업 • 의과학, 생명공학 및 유전체, 의약품, 식품 및 영양, 보건의료 생체, 보건의료정보, 기능성화장품, 치의학, 정책 연구 분야 등의 연구지원
	신약개발연구 지원사업	<ul style="list-style-type: none"> • 의약품 연구개발 과정에서 초기단계인신물질 탐색, 안정성평가 및 제제화 기술, 신약개발의 생산성 및 효율성을 극대화하기 위한 초고속 검색(HTS), 조합화학(CombiChem), 임상시험기반기술등 기초/기반연구부터 제품화 연구(벤처및중소기업 지원 포함)를 총체적으로 지원
	뇌의약학 연구개발사업	<ul style="list-style-type: none"> • 21세기 유망분야인 뇌의약학 연구증진을 위한 연구개발사업 • 뇌연구촉진법에 의거 과기부 과학연구개발사업과 공동 추진하는 범부처사업
	천연물신약 연구개발사업	<ul style="list-style-type: none"> • 천연물 신약 창출을 위한 연구개발사업 • 천연물 신약 연구개발 촉진법에 의거 추진
	한방치료기술 개발사업	<ul style="list-style-type: none"> • 5대난치성질환(뇌질환, 골관절질환, 내분비·대사성질환, 역계질환, 암분야)에 대한 한방치료기술 및 한의약제의개발

2. 국내 천연물질유래 식품 및 의약품 시장 현황

가. 국내 시판중인 천연물질원료 의약품

상품명(제조사)	연 매출액(2007년, 제조사 발표 기준)
스티렌(동아제약)	600억원
조인스(SK 케미컬)	140억원
푸로스판(안국약품)	-
은행엽엑스 외 은행잎 제제	1000억원

나. 국내 천연물 유래 식품 및 의약품의 시장규모

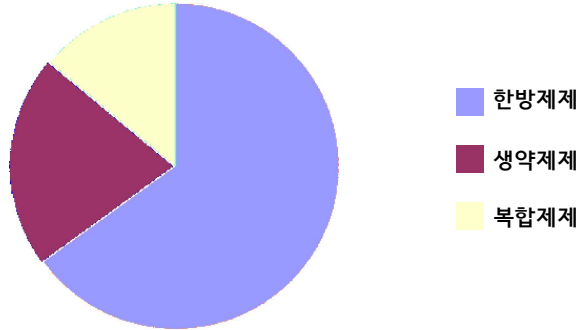
(출처 : IMS Health 2003, 2004. 2003년 FOOD JOURNAL)

- 총 약 5조 8,300억원 규모

단위 : 천원

구분	2004 년	
	판매액	점유율
기능성식품	3,500,000,000	60.0 %
건강기능식품	1,980,000,000	34.0 %
천연의약품	350,000,000	6.0 %
합 계	5,830,000,000	100 %

천연의약품 시장



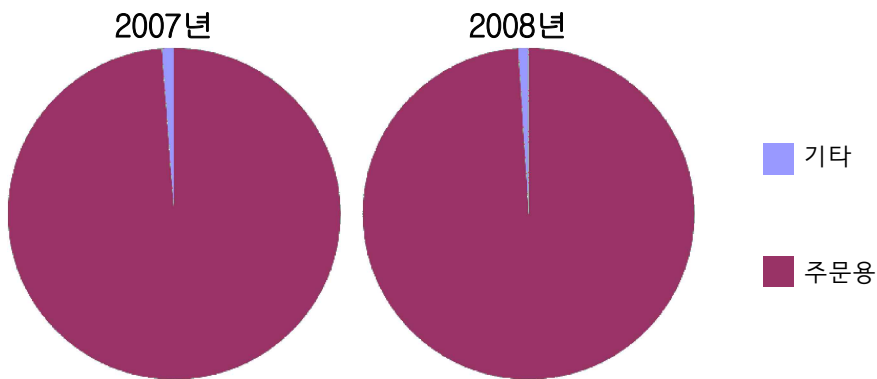
○ 국내의 천연의약품 시장을 살펴보면, 우황청심원 및 쌍화탕류를 포함한 한방제제가 2,270억원 규모로 천연의약품 시장의 65% 정도, 은행잎 제제 및 식물유래 생약제제가 730억원 규모로 시장의 21%정도, 복합마테카술 및 정로환 등과 같은 복합제제가 500억원 규모로 시장의 14% 정도를 점유하고 있다.

다. 국내 사료첨가제 시장 현황

(출처 : 한국동물약품협회 2008년 통계자료)

단위 : 천원

구분	2007년		2008년		전년대비 성장률
	판매액	점유율	판매액	점유율	
기타 사료첨가제	630,962	1.2%	756,564	1.0%	19.9%
주문용 사료첨가제	53,433,227	98.8%	73,796,477	99.0%	38.1%
보조적 의약품 합계	54,064,189	100.00%	74,553,041	100.00%	37.9%



(1) 사료 첨가제의 2002년도 사업체 수는 42개소에서 2005년 48개 업소로 4.35% 증가 하였으며, 사료첨가제 분야의 총 판매량은 2008년 약 746억원으로 2007년 약 541억원에 비해 37.9% 증가하였다.

(2) 현재 시판 중인 사료 첨가제 중, '임퓨포르테'의 경우 연간 매출액은 약 20억원 규모로 단일 제제 중 가장 높은 매출액을 보이는 사료첨가제이다.

3. 국외 제품생산 및 시장 현황

가. 세계 천연물질의 신약 개발 현황

(1) 1940년대 초까지 미국 의약품의 90% 이상은 천연물 유래 물질이었으나 이후 화학합성물질로 바뀌어 1985년에는 미국 시판 의약품의 75%가 화학합성물질이었다. 그러나 1990년대 중반이후 천연물 유래물질이 의약품의 60%를 차지하면서 시장구도가 변하였다((주) 바이오톡스텍).

(2) WHO 자료에 의하면, 전 세계 의약품 생약 시장 수요는 2004년 600억 달러로, 매년 15%의 성장률을 보여 2050년에는 5조 달러에 이를 것으로 추산되고 있다.

(3) 현재 미국의 한약제품 시장규모는 생약 시장의 1/10인 50억 달러로 인삼, 마늘, 은행잎, 가시오가피 등의 매우 초보적인 제품들이 매출 상위를 점하고 있으며 이러한 현실은 천연물을 이용한 민간요법이 대중화되어 있는 우리로서 국내의 기술로도 충분히 미국시장에 상품화하는 것이 가능하다는 좋은 예라 하겠다.

(4) 일반적으로 신약 개발의 실패 요인 중 15~25%가 독성과 안전성이 문제가 되지만 천연물은 민간에서 오랜 역사에 걸쳐 약효가 입증됐기 때문에 부작용이 적고 안전성이 높다는 장점을 가지고 있다.

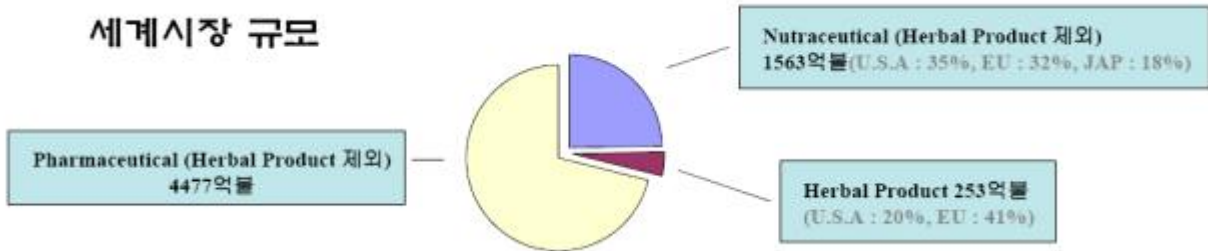
(5) 합성의약품의 경우 오랜 개발 기간과 천문학적 비용이 드는데 비해 천연물 신약은 개발기간이 5~8년 걸리며 투자비는 50~100억원으로 합성의약품의 1/20 이하 이지만 단기간 내 상품화가 가능한 장점이 있다.

(6) 한 예로서, 뱀독에서 유래한 고혈압 치료제인 '캅토프릴'은 연 20억 달러, 은행잎에서 추출한 혈액순환장애 치료제는 연 20억달러, 도마뱀의 침에서 개발한 당뇨 치료제인 '바이에타'는 연 10억 달러가 넘는 제품으로 성장하였다((주) 바이오톡스텍).

(7) 천연물질 유래 세계시장 현황

(출처 : IMS Health 2003, 2004, 2003년 FOOD JOURNAL)

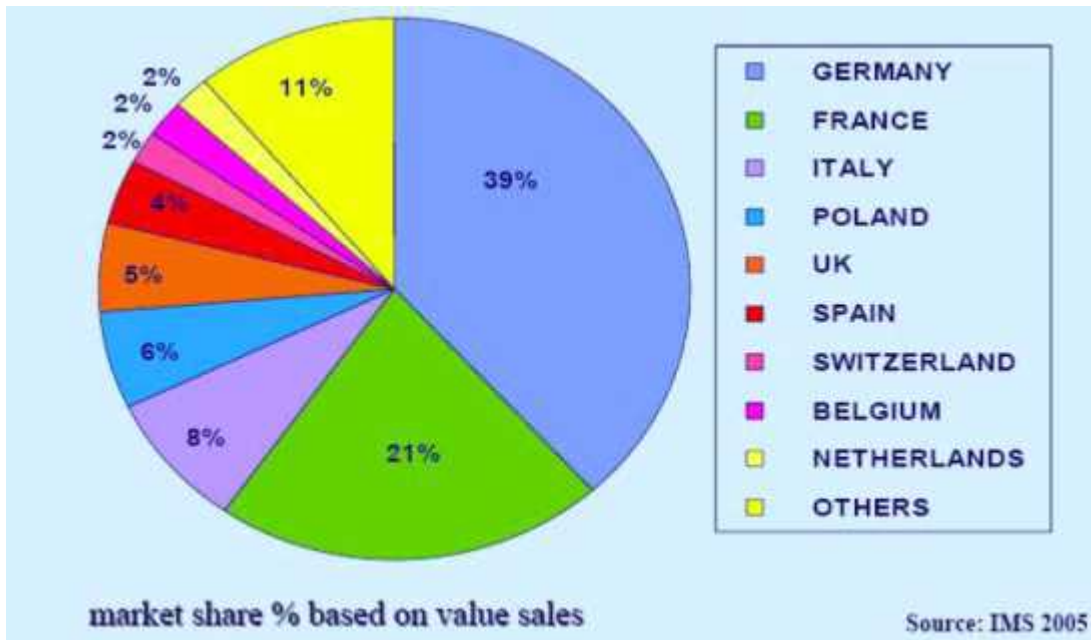
세계시장 규모



○ 천연물질 유래 건강기능식품에 대한 미국, 일본, EU의 시장규모

(출처 : 한국보건산업진흥원, 2006년, Nutrition Business Journal)

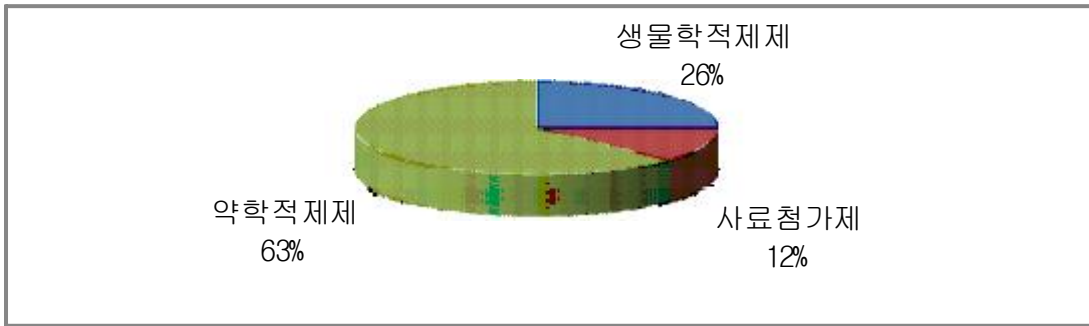
- ① 미국인들이 2000년 기준, 생약에 지출한 금액은 46억불 규모로, 이 중 에키나시아 함유 건강기능식품이 차지하는 비율은 약 12%로 약 5억불 규모를 나타내고 있다.
- ② 일본의 경우에도 2003년 기준, 72%의 의사가 한방약을 처방하고 있는 것으로 나타났는데, 한방약을 처방하는 의사들은 주로 양방에서 기대할 만한 효과를 못 보았을 때 양약의 보조수단으로 내과에서 가장 많이 사용하고 있는 것으로 나타났다. 일본 한방 제제 시장규모는 2002년 기준 약 1,000억엔(약 1조원 규모)으로 추산되고 있고, 쓰프라는 현재 한방 제제 시장에서 가장 큰 점유율을 확보하고 있으며, 2002년 매출 기준 약 75%에 가까운 시장 점유율을 유지하고 있다.
- ③ EU의 경우에도 2004년 기준, 유럽 전체 천연물의약품 시장은 45억불 규모였으며, 2000년 전세계 천연물의약품 시장은 총 222억불 규모였으며, 유럽은 주요 시장으로써 이 중 38%를 차지하였다. 2000년 Nutrition Business Journal의 자료에 따르면 유럽 천연물의약품 시장 중 독일이 42%를 차지하며 시장을 이끌었고, 그 다음 프랑스(25%), 이태리(9%), 영국(8%) 순으로 나타났다. 2005년 IMS 자료에서는 독일(39%), 프랑스(21%), 이태리(8%), 폴란드(6%), 영국(5%) 순으로 시장점유율이 보고되었다.



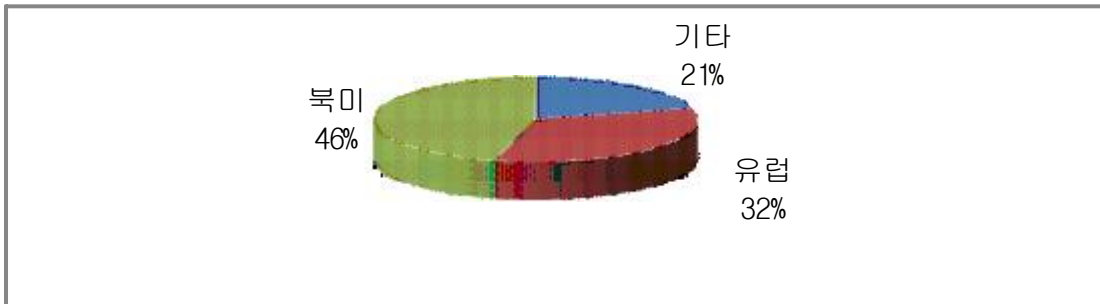
나. 2011년 세계동물약품 시장규모

○ 총 시장규모 : \$22billion (약24조 8천억원)
(제공 : Vetnosis, IFAH)

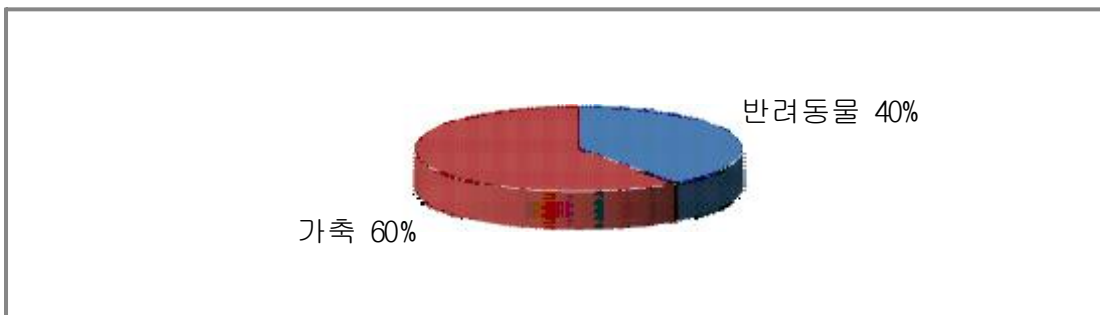
(1) 품목별



(2) 지역별



(3) 축종별



(4) 세계 동물약품시장 발전 현황

(1,130원/\$)

연도별	2006	2007	2008	2009	2010	2011
달러(\$)	16,065million	17,900million	19,190million	18,600million	20,100million	22,000million
원화(원)	18조 1천억	20조 2천억	21조 6천억	21조 1백억	22조 7천억	24조 8천억

3장. 연구수행 내용 및 결과

1절. 조류 인플루엔자에 대한 천연물 신소재 소독제 개발(제1세부)

1. 1차년도: 천연물 신소재(탱자 추출물 기반) 조류 인플루엔자 소독제의 유효 지표물질 선정 및 효능 평가

가. 천연물 신소재(탱자 추출물 기반) 조류 인플루엔자 소독제의 원료 및 원재료 표준화를 위한 지표물질 선정

(1) 조류 인플루엔자 소독제의 표준화를 위한 지표 물질을 선정하기 위해 건조된 탱자 씨앗 분말을 에탄올로 추출을 실시함.

(2) 수득한 에탄올 추출물을 Hexane으로 추출하여 탱자 씨앗 Hexane 분획을 수득함(그림 2).



그림2. 탱자 씨앗의 Hexane 분획 과정

(3) Hexane 분획물을 Liquid column chromatography를 이용하여 지표물질을 분리함(그림3).

(가) 탱자 씨앗 Hexane 분획물 1 g을 유기용매 Hexane과 Ethyl acetate를 10:1 비율부터 1:1 조건으로 Silica column을 통해 18개의 분획물을 수득하였으며 TLC를 통해 확인할 수 있었음 (그림3-A).

(나) (가)에서 분리하여 수득한 분획물 중 7번 분획물 (K2-Hexane-7) 260 mg을 유기용매 Hexane과 Methylene Chloride, MeOH를 10:10:0.2 조건으로 Lobar silica column을 통해 3개의 분획물을 수득하여 TLC를 통해 분리가 되었음을 확인함 (그림3-B).

(다) (나)에서 분리된 분획물 중 2번 분획물 (K2-Hexane-7-2) 79 mg을 100% MeOH 조건으로

Recycling HPLC를 통해 2번째 cycle에서 분리가 잘 되었으며 단일물질을 수득함 (그림 3-C).

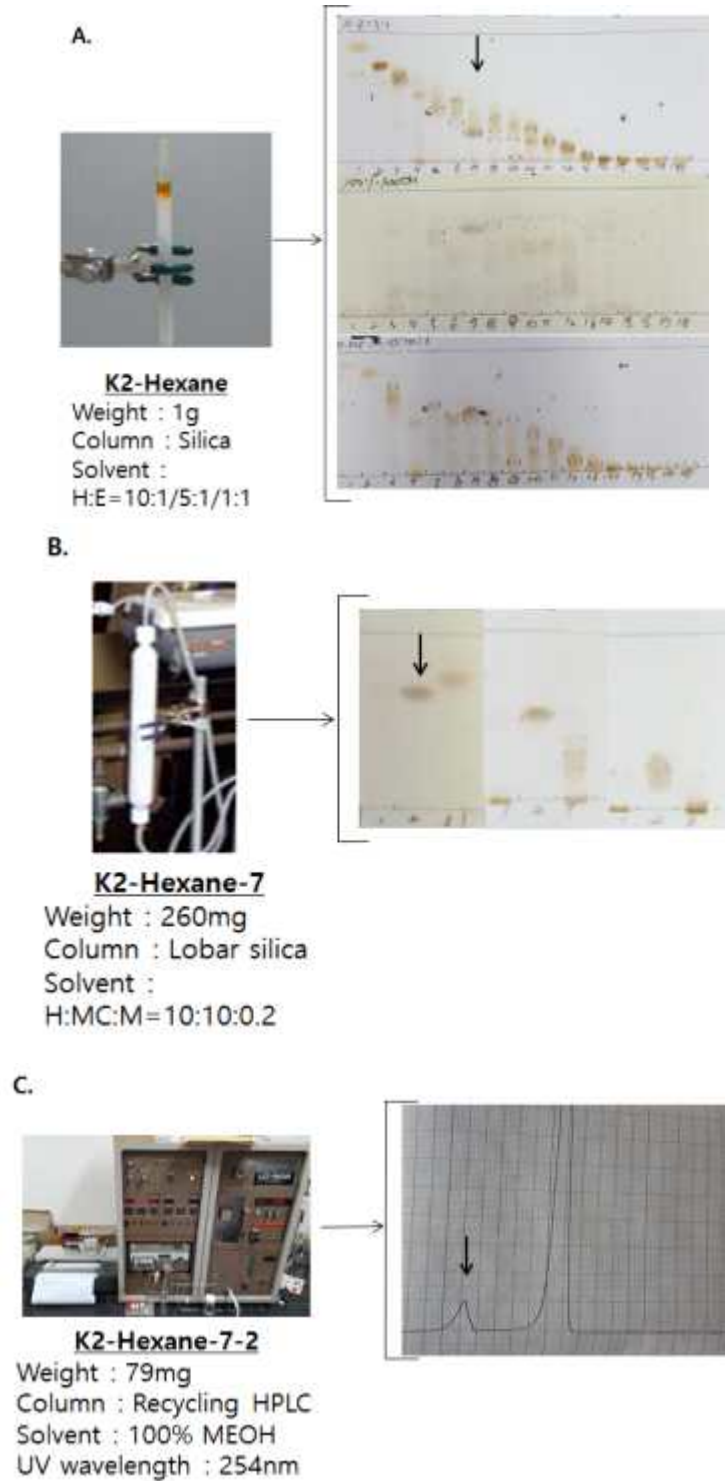


그림3. Liquid column chromatography를 이용한 지표 성분 분리 과정

- A. Hexane 분획물 chromatography 조건 및 분획 후 TLC
- B. Hexane-7 분획물 chromatography 조건 및 분획 후 TLC
- C. Hexane-7-2 분획물 chromatography 조건 및 peak data

*유기용매 ; H : Hexane, MC : Methylene Chloride, M : MeOH, E : Ethyl Acetate

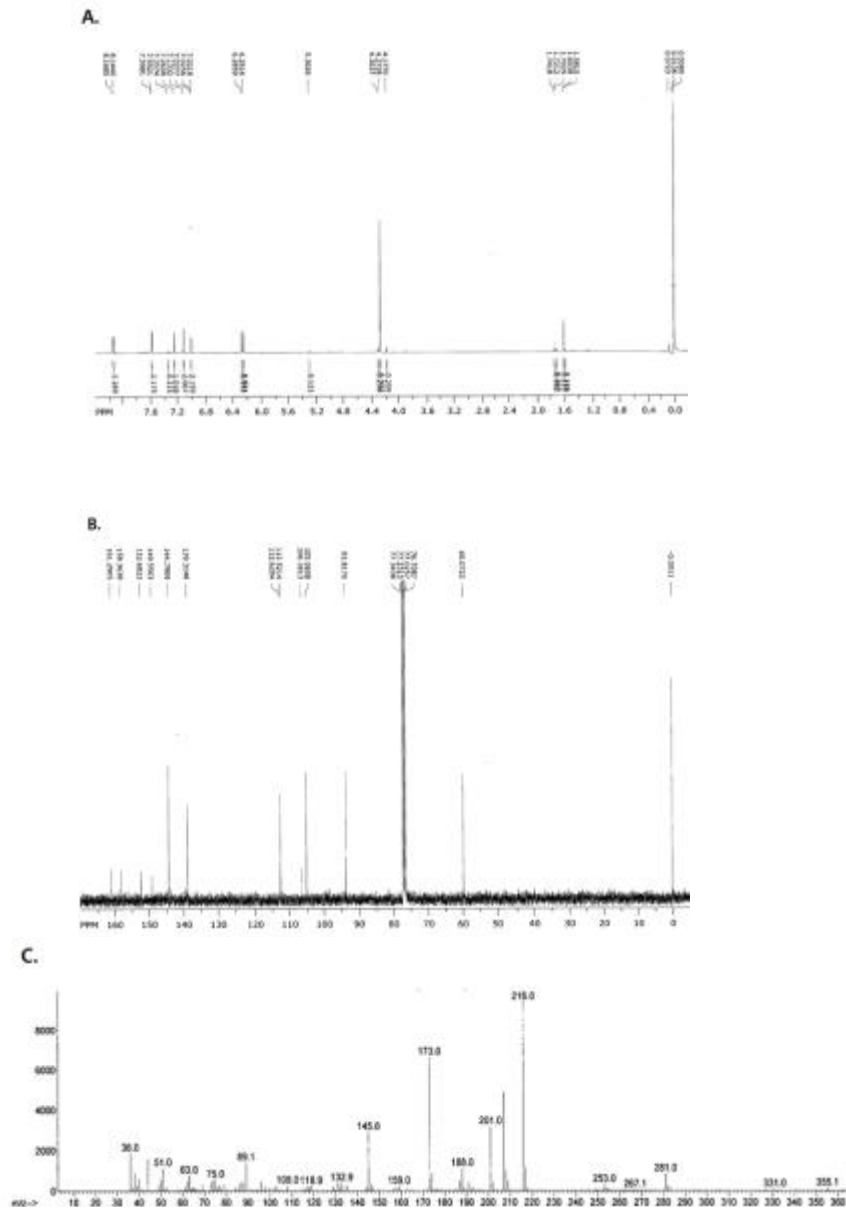
(4) 분리된 지표성분의 구조 분석 및 규명을 위해 핵자기공명분광법 (1H-NMR, 13C-NMR)과 LC/MS 분석을 실시함 (그림4).

(가) 단일 물질로 분리된 지표 성분의 구조를 규명하기 위해 1H-NMR(400MHz)를 통해 지표성분 proton의 결합 상태를 분석함 (그림4-A).

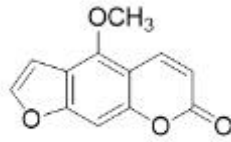
(나) 단일 물질로 분리된 지표 성분의 구조를 규명하기 위해 13C-NMR(400MHz)를 통해 지표성분 carbon의 결합 상태를 분석함 (그림4-B).

(다) LC-MS를 통해 지표성분의 분자량을 측정하고 1H-NMR과 13C-NMR을 통해 분석한 구조를 확인함 (그림4-C).

(라) 핵자기공명분광법과 LC-MS 분석을 통해 지표성분의 구조를 규명하고 지표성분이 Bergapten임을 확인함.



D.



bergapten

그림4. 지표성분의 구조 규명

- A. 지표성분의 ¹H-NMR 분석 결과
- B. 지표성분의 ¹³C-NMR 분석 결과
- C. 지표성분의 LC/MS 분석 결과
- D. 지표성분의 구조 규명

나. 조류인플루엔자 바이러스에 대한 Bergapten의 항바이러스 효과

(1) 실험방법

- (가) 333.33, 111.11, 37.04, 12.35, 4.12, 1.37 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 희석한 Bergapten과 Influenza virus를 혼합한 후 37°C에서 30분간 반응시킴.
- (나) 혼합물을 monolayer 상태의 MDCK cell에 감염시킨 후 37°C에서 48시간동안 배양함.
- (다) PBS로 세척 후 MTT solution을 첨가하여 1시간 30분동안 반응시킴.
- (라) Wave length 450nm에서 흡광도를 측정하여 cell viability (%)를 나타냄.
- (마) 항바이러스성 CPE 저하 능력은 바이러스성 저해 유효농도 50% 값(EC_{50})으로 나타냄.
- (바) 세포독성 농도의 50% 값(CC_{50})은 세포의 형태학적 변형을 기초로 결정함.
- (사) 항 인플루엔자 바이러스의 능력은 CC_{50} 값을 EC_{50} 값으로 나눈 선택도 인덱스(SI: selectivity index)로 나타냄.

(2) 실험결과

- (가) Bergapten의 CC_{50} 값은 400 $\mu\text{g/mL}$ 으로 나타났고, EC_{50} 값은 24.5 $\mu\text{g/mL}$ 로 확인하였으며, SI 값이 16.3을 보임으로써 Bergapten이 인플루엔자 H1N1에 대한 항바이러스 효과가 있음을 보여줌 (그림5).
- (나) Bergapten의 유효농도(EC_{50})는 24.5 $\mu\text{g/ml}$ 일 때 50%의 바이러스 억제 효과를 보여주며, 37 $\mu\text{g/mL}$ 이상에서는 100%의 바이러스 억제 효과를 보여주었음.

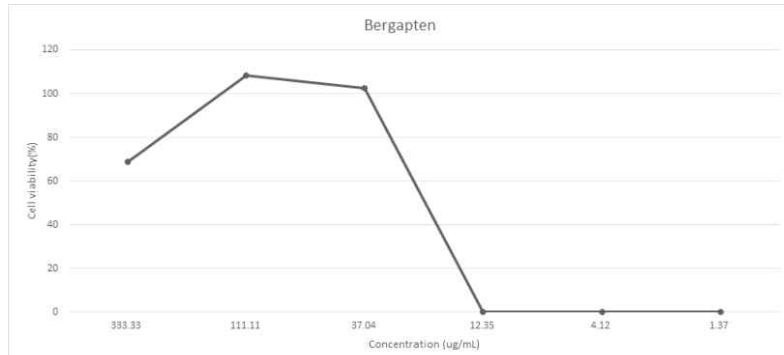


그림5. 지표물질 Bergapten의 H1N1 인플루엔자에 대한 항바이러스 효과

다. 소독 대상에 따른 저병원성 및 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스 소독제 효력 평가.

(1) 탱자씨 추출물의 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 효능 평가

(가) 시험방법

○ A형 인플루엔자 바이러스인 H5N1, H1N1, H3N2 및 B형 인플루엔자 바이러스를 MDCK(Mardin Darby Canine Kidney) 세포주에 감염시킨 후, 서로 다른 농도의 탱자씨 추출 물을 처리하여 항바이러스 활성을 분석하였음 (표6).

표6. 다른 아형 인플루엔자 바이러스에 대한 탱자씨 추출물의 CC50, EC50 측정

바이러스 균주	화합물	CC50(a) μg/ml	EC50(b) μg/ml	SI (c)
H1N1	탱자씨	3333.3	0.07	4761
H1N1	타미플루	1111.1	3.5	317
H3N2	탱자씨	3333.3	1.5	2222
H3N2	타미플루	1111.1	3.5	317
H5N1	탱자씨	3333.3	0.5	6666
H5N1	타미플루	1111.1	1.5	740
Infuenza B	탱자씨	3333.3	13.7	243
Infuenza B	타미플루	1111.1	13.7	81

*** 상기 표에서, (a)는 세포독성 농도 50% 값을, (b)는 바이러스성 저해 유효농도 50% 값을, (c)는 CC50값을 EC50값으로 나눈 선택도 인덱스(SI)를 각각 나타냄.

(나) 시험결과

- ① H1N1 감염주에 대하여 타미플루는 50% 이상의 항바이러스 효과를 보이는 EC50는 1.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 관찰되었고, 탱자씨 추출물은 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 50% 항바이러스 효과 (EC50)를 보였음 (그림6).
- ② H3N2에 대하여 타미플루는 50% 이상의 항바이러스 효과를 보이는 EC50는 1.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 관찰되었고, 탱자씨 추출물은 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 50% 항바이러스 효과 (EC50)를 보였음 (그림7).
- ③ H5N1 감염주에 대하여 타미플루는 50% 이상의 항바이러스 효과를 보이는 EC50는 3.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 관찰되었고, 탱자씨 추출물은 1.5 $\mu\text{g/ml}$ 에서 50% 항바이러스 효과 (EC50)를 보였음 (그림8).
- ④ Influenza B형에 대하여 타미플루와 탱자씨 추출물 모두 EC50는 13.7 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 항바이러스 효과가 관찰되었음 (그림9).
- ⑤ 탱자씨 추출물은 타미플루와 비교하여 세포독성은 낮으면서도 인플루엔자 바이러스에 동등한 수준의 항바이러스 효과를 보여주었음.

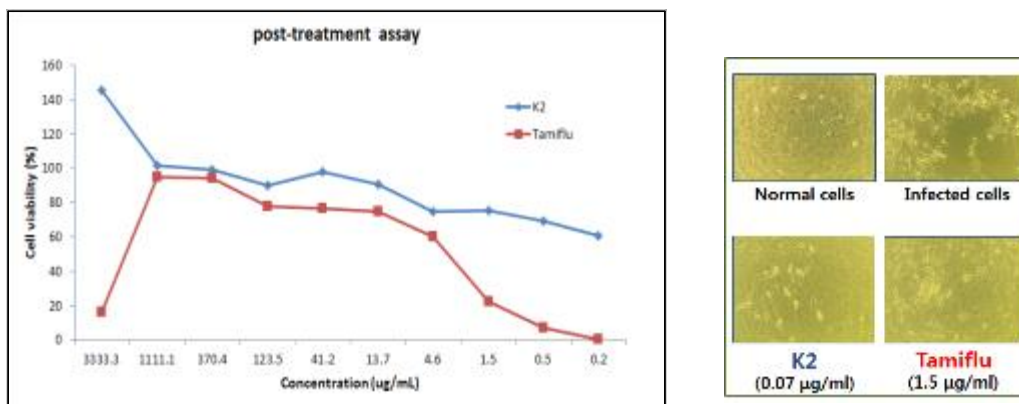


그림6. H1N1 인플루엔자에 대한 항바이러스 효과 측정

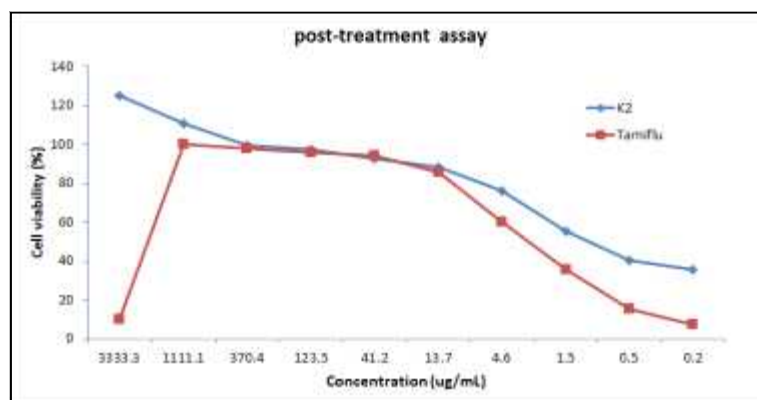


그림7. H3N2 인플루엔자에 대한 항바이러스 효과 측정

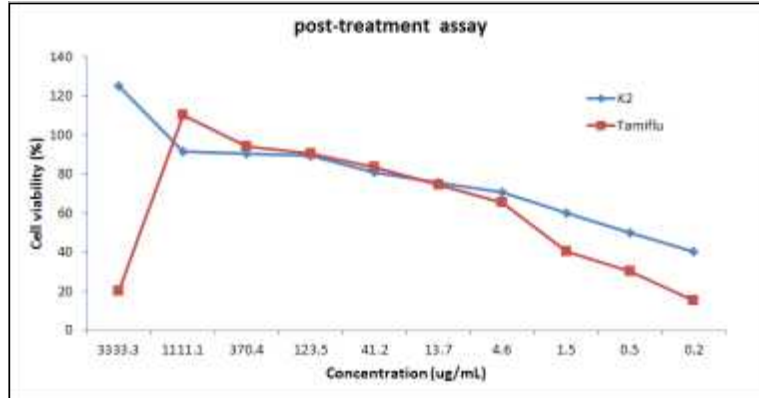


그림8. H5N1 인플루엔자에 대한 항바이러스 효과 측정

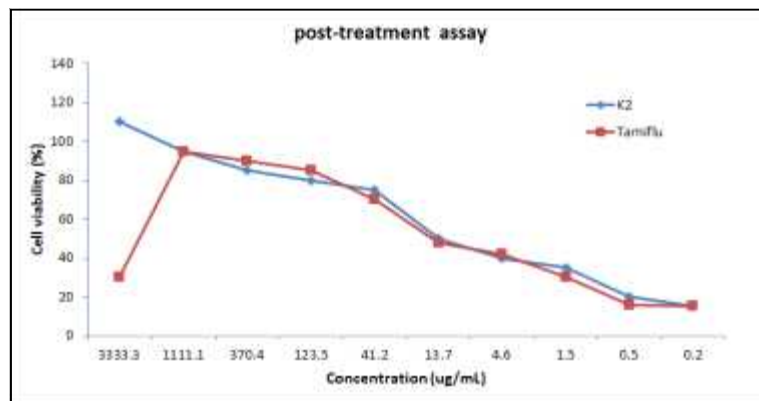


그림9. B형 인플루엔자에 대한 항바이러스 효과 측정

(2) Ethyl Acetate 추출물 분획의 항바이러스 효능 평가

(가) 시험방법

○ A형 인플루엔자 바이러스인 H1N1 인플루엔자 바이러스를 MDCK(Mardin Darby Canine Kidney) 세포주에 감염시킨 후, Ethyl Acetate 추출물 분획의 탱자씨 추출물을 처리하여 항바이러스 활성을 분석하였음.

(나) 시험결과

- ① Ethyl Acetate 추출물의 2, 6, 7, 8, 12, 14, 및 16번 분획물들 가운데 6, 8, 12, 14, 및 16번 분획물에서 항바이러스 효능을 확인하였음 (그림10).
- ② 그 결과 6번 분획물은 33.3 ug/ml, 8번 분획물은 11.1 ug/ml, 12번 분획물은 2.45 ug/ml, 14번 분획물은 11.1 ug/ml, 그리고 16번 분획물은 0.25 ug/ml의 농도까지 항바이러스 효능을 보였음 (그림10).
- ③ 14번 분획물과 16번 분획물은 33.3 ug/ml의 농도까지 cytotoxicity를 보였음 (그림 10).
- ④ Ethyl Acetate의 분획 중 12번 16번째의 분획의 구성 성분 중 지표 물질로 삼을만한 효과가 있음을 의미함.

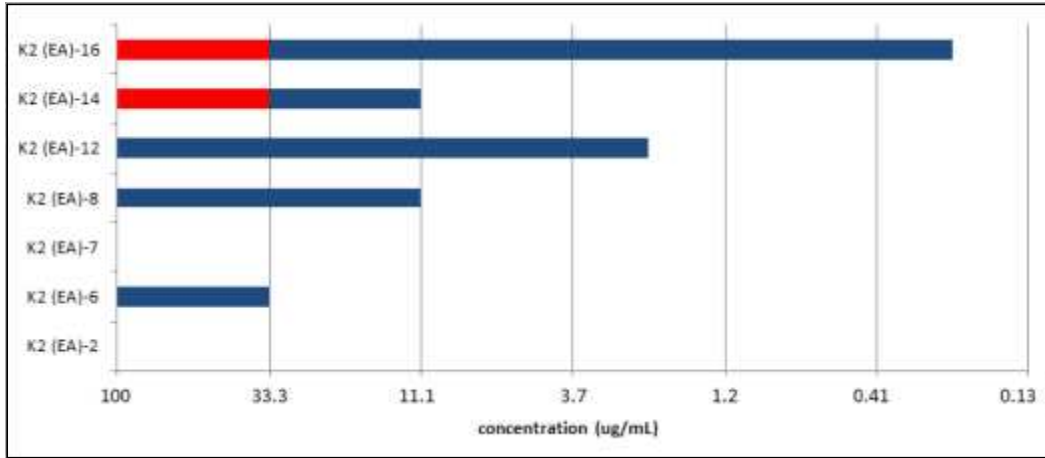


그림10. Ethyl Acetate 추출물 분획의 H1N1인플루엔자에 대한 항바이러스 효과 측정

(3) 탱자씨 추출물의 파라인플루엔자바이러스 (Bovine Parainfluenza Virus: BPIV) 에 대한 항바이러스 효능 평가

(가) 시험방법

○ 파라인플루엔자 바이러스 1000TCID₅₀/mL를 서로 다른 농도의 탱자씨 추출물과 혼합한 후에 MDBK (Mardin Darby Bovine Kidney) 세포주에 처리하여 72시간 후에 MTT assay를 통하여 cell viability를 측정하였음.

(나) 시험결과

- ① BPIV 감염주에 대하여 타미플루는 50% 이상의 항바이러스 효과를 보이는 EC50는 1.5 µg/ml의 농도에서 관찰되었고, 탱자씨 추출물은 0.5 µg/ml의 농도에서 50% 항바이러스 효과(EC50)를 보였음 (그림11와 표7).
- ② 탱자씨 추출물은 뉴캐슬병 바이러스 (NDV: Newcastle Disease Virus) 의 한 종류인 파라인플루엔자 바이러스에도 높은 항바이러스 효능을 보여주었음.

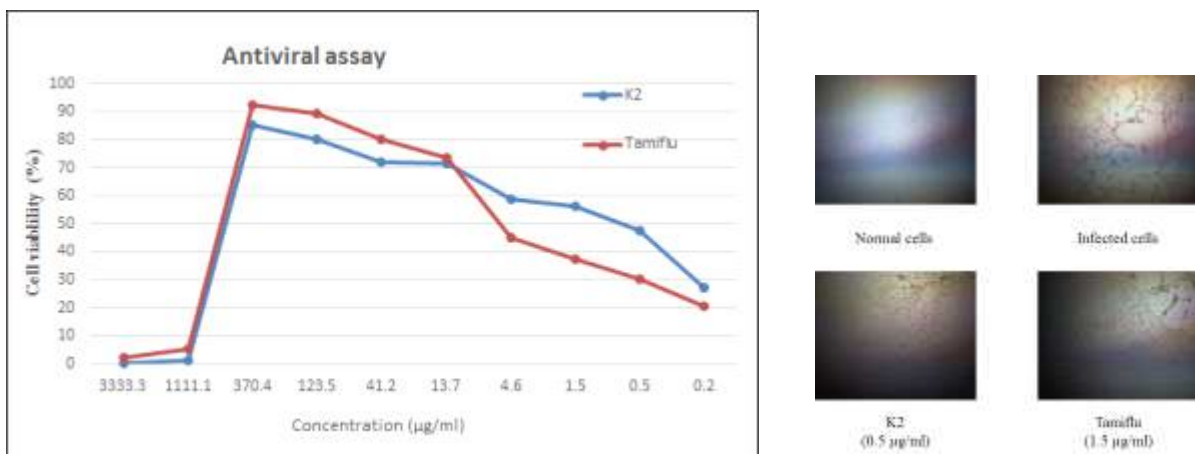


그림11. 파라인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 효과 측정

표7. 파라인플루엔자 바이러스에 대한 탱자씨 추출물의 CC50, EC50 측정

바이러스 균주	화합물	CC50(a) μg/ml	EC50(b) μg/ml	SI (c)
BPIV	탱자씨	1111.1	0.5	2222
BPIV	타미플루	1111.1	1.5	740

*** 상기 표에서, (a)는 세포독성 농도 50% 값을, (b)는 바이러스성 저해 유효농도 50% 값을, (c)는 CC50값을 EC50값으로 나눈 선택도 인덱스 (SI)를 각각 나타냄.

다. 천연물 신소재(탱자 추출물 기반) 조류 인플루엔자 소독제의 가금 티푸스의 원인균인 살모넬라 (*Salmonella typhimurium*)에 대한 살균 효력 평가.

○ 세균 등의 소독제 효력 시험을 위해 구연산과 탱자추출물을 표8과 같이 조성하여 살모넬라균에 대한 살균 효력 평가를 수행하였음.

표8. 탱자추출물을 유효성분으로 하는 소독제의 성분 및 함유량

제품명	성분	함유량 (g)/L
바이로케이투 (VIRO-KII)	구연산	500
	탱자추출물	5
	정제수	적당량

(1) 시험방법

(가) 재료

- ① 고압멸균된 영양배지(nutrient broth)
- ② 약품성분 중화배지: 영양배지에 불활화(56℃에 30분 처리)한 소혈청 5%를 함유한 배지
- ③ 유기물 희석액: 소독제의 희석에 사용. 20%(w/v) 효모추출물(yeast extract)을 증류수에 만들어 고압멸균하고, 사용시 경수로 희석하여 5% 희석액을 제조한 뒤, 1N 수산화나트륨으로 pH 7.0으로 맞추어 사용하였음.

(나) 세균배양

- ① 세균: *Salmonella typhimurium*
(등록번호48, 자체관리번호 04-6)
(Reference strain 출처: 국립수의과학검역원, 2004)
- ② 계대 중의 살모넬라균을 배지에 심어 활력이 인정되는 22~26시간동안 배양한 세균을 사용하되, 사용 당일까지 37℃를 유지시켜야 하며 사용세균의 농도는 mL 당 10⁸ 이상으로 함.

(다) 소독제의 희석

- ① 소독제 희석과 관련하여 “소독제 효력시험지침 (농림축산검역본부 고시 제 2016-29호) 별표1⁽¹⁾” 소독제 희석법을 따라 희석한다. 단, 소독제의 예상 유효농도가 상기의 범주에 해당하지 않을 경우 유효농도를 기준으로 하여 10%씩 차이를 두어 단계별로 희석함.
- ② 소독제의 희석은 조건에 맞게 경수, 5% 유기물희석액으로 하였음.

(라) 소독제의 반응

- ① 37℃에서 배양한 세균 4mL를 4℃의 5% 유기물희석액 96mL에 섞은 후, 혼합액 2.5mL를 꺼내어 4℃ 항온수조에 보관된 5개 시험관에 넣고 혼합한 다음 4℃에서 정확히 30분간 반응을 시킴.
- ② 각 시험관 처리는 차례대로 1분의 간격으로 실시하며 도중에 10분마다 혼합하여 줌.

(마) 중화반응 및 증식

- ① 정확히 30분간의 반응이 끝나면 소독제의 효능을 중화하기 위하여 즉시 1.0mL을 꺼내어 37℃의 9.0mL 중화배지에 넣고 혼합 한 다음, 각 소독제 희석별로 0.1ml씩 5개 시험관의 영양배지(nutrient broth)가 들어있는 시험관에 넣어 혼합하였음.
- ② 37℃ 항온실에서 48시간 배양하였음.

(바) 세균증식여부의 판정

- 5개의 동일 소독제 희석배수의 영양배지에서 4개 이상 증식이 인정되지 않는 최종 소독희석 단계를 희석배수로 함.

(사) 대조군의 검정

- 병원체 대조군은 경수 조건에서 소독제 없이 실험하고 중화반응 및 증식 단계에서 병원체의 역가가 mL당 2×10^5 이상이 확인되어야 함.

(2) 시험 결과

(가) 처리구 1 (경수조건) 과 2 (유기물조건)는 처리구 3를 대조군으로 하였음.

(나) 세균: 4개 이상 증식이 인정되지 않는 최종 소독희석단계

(다) 3회 반복 시험하여 20%의 오차범위 내의 결과의 중위수(median)를 공시 제품에 대한 최종 희석배수로 한다.

(라) 처리구 1의 경우 10배 희석까지 그리고 처리구 2의 경우 4배 희석까지는 살모넬라균 증식하지 않았음 (표9, 10, 11 참조).

(마) 구연산 50%와 탕자추출물 0.5% 함유된 소독제의 경우 경수조건에서는 10배 희석, 유기물 조건에서는 4배 희석까지 살모넬라균에 대한 살균 효력을 보였음 (표12 참조)

표9. *Salmonella typhimurium* 균에 대한 소독제 효능시험 1회차 결과

처리구	소독제							
	원액	1:2	1:4	1:6	1:8	1:10	1:12	1:14
1 유기물 저	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5	5/5
2 유기물 고	0/5	0/5	0/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
3 병원체 대조	5/5							

표10. *Salmonella typhimurium* 균에 대한 소독제 효능시험 2회차 결과

처리구	소독제							
	원액	1:2	1:4	1:6	1:8	1:10	1:12	1:14
1 유기물 저	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5	5/5
2 유기물 고	0/5	0/5	0/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
3 병원체 대조	5/5							

표11. *Salmonella typhimurium* 균에 대한 소독제 효능시험 3회차 결과

처리구	소독제							
	원액	1:2	1:4	1:6	1:8	1:10	1:12	1:14
1 유기물 저	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5	5/5
2 유기물 고	0/5	0/5	0/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
3 병원체 대조	5/5							

표12. *Salmonella typhimurium* 균에 대한 소독제 효능시험결과

처리구	경수	유기물	소독제	비고	조사항목	1차 시험	2차 시험	3차 시험	증위수
1 유기물 저	+	-	+	경수 조건	배수	10배	10배	10배	10배
2 유기물 고	+	+	+	유기물/경수 조건	배수	4배	4배	4배	4배
3 병원체 대조	+	-	-	처리구 1,2의 대조					

라. 천연물 신소재(탕자 추출물 기반) 조류 인플루엔자 소독제의 조성별 효능 최적화.

(1) 천연물 신소재 조류 인플루엔자 소독제 조성별 효능 시험

(가) 시험방법

○ 조류인플루엔자 소독제의 조성 최적화를 위해 바이러스 1000TCID₅₀/mL를 아래와 같은 각각의 조성물과 혼합한 후 MDCK 세포주에 처리하여 48시간 후에 MTT assay를 통하여 cell viability를 측정하였음.

- ① 조성물1: 구연산(500 g/L)
- ② 조성물2: 탕자추출물(5 g/L)
- ③ 조성물3: 구연산(500 g/L)과 탕자추출물(5 g/L)의 혼합물

(나) 시험결과

- ① 구연산을 처리한 세포주에서는 세포독성으로 인해 10배 희석에서는 세포병변효과(CPE)를 보였음 (그림12).
- ② 탕자추출물만 처리한 세포주에서는 10배 희석에서도 세포병변효과를 보이지 않았고 희석배수에서도 61%의 Cell viability를 보여주었음.
- ③ 구연산과 탕자추출물 모두를 처리한 세포주에서는 10배 희석시 구연산으로 인한 세포독성 때문에 세포병변효과를 보였지만 구연산 또는 탕자추출물을 단독으로 처리한 세포주에서보다 높은 항바이러스 효과를 보여주었음.
- ④ 조성별 효능시험 결과 평균 및 항바이러스 효과를 고려하여 Liter 당 500g의 구연산과 5g의 탕자추출물의 혼합물을 천연물 신소재 소독제의 최적의 조성비로 선정하였음.

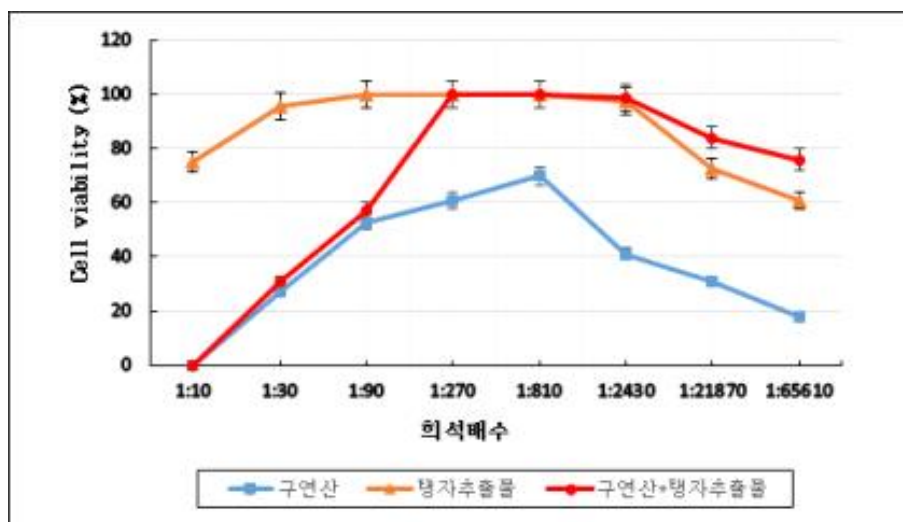


그림12. 인플루엔자 바이러스에 대한 조성별 효능 평가

(2) 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 효능 평가

○ 식용약물 소재인 탱자씨앗 추출물을 이용한 조류 인플루엔자 천연 소독제의 효능의 최적화 및 극대화를 위하여 표8과 같이 조성된 소독제를 농림축산검역본부 고시 제2012-156호의 “소독제 효력시험지침” 중 [별표2]의 「바이러스의 소독제 효력시험」에 준하여 효력시험을 수행함.

(가) 대상 조류 인플루엔자 바이러스: 저병원성 가금 인플루엔자 바이러스 (Avian influenza virus: AIV) 야외분리주 (등록번호 33, 자체관리번호 02-8, 균독주명 K228, 경기도 이천, 2002년)

(나) 시험 동물: SPF 발육란

(다) 배지시약 등

- ① 경수: 증류수 1L에 0.305g/L의 CaCl₂과 0.139g(w/v)을 함유
- ② 유기물희석액: 소독제의 희석을 위해 사용되는 유기물을 함유한 경수
 - 바이러스용: 5% 소태아혈청 (fetal bovine serum)
 - 세균용: 5%(w/v) 효모추출물(yeast extract)
 - 보관용 세균용, 곰팡이용의 유기물희석액: 효모추출물 20%(w/v)가 함유
- ③ 중화용 배지: 10% FBS가 함유된 PBS

(라) 시험방법

- ① 바이러스의 배양
 - 계대 배양 중의 활력 있는 바이러스를 사용하고 바이러스의 증식이 최대인 바이러스를 사용함. ($10^{7.0}$ EID₅₀/mL이상)
 - 바이러스를 측정하여 기준에 맞는 지 확인함.
 - 바이러스의 희석은 소독제 효력시험지침 (농림축산검역본부 고시 제 2016-29호)을 참조하여 조건에 맞게 경수희석액, 5% 유기물 희석액을 사용함.
- ② 소독제의 희석
 - 소독제를 표1에서와 같이 소독제 효력시험 처리구의 방법으로 100배, 200배, 300배, 500배, 800배, 1,000배, 1,200배, 1,600배 희석하였음. 단, 소독제의 유효예상 희석배수가 500배 이하일 경우는 50배, 100배, 150배, 200배, 250배, 300배, 400배, 500배 등으로 희석함.
 - 소독제의 희석은 소독제 효력시험지침 (농림축산검역본부 고시 제 2016-29호)을 참조하여 조건에 맞게 경수희석액, 5% 유기물 희석액으로 함 (표13).

표13. 소독제의 효력시험시 처리구 조건

처리구	경수	유기물	소독제	비고
1(유기물 저)	+	-	+	경수조건
2(유기물 고)	+	+	+	유기물/경수조건
3(병원체 대조)	+	-	-	처리구 1, 2의 대조
4(독성 대조)	+	-	+	처리구 3의 대조

③ 소독제의 반응

- 증식된 4° C의 바이러스 액(요막강액) 1.0 mL 를 4° C의 바이러스 희석용 유기물 용액(FBS가 함유된 경수) 19 mL 과 섞음.
- 준비된 바이러스액 2.5mL를 4° C 상태의 동량의 소독제 희석액이 들어있는 시험관에 넣고 혼합한 다음(총 5mL), 4° C 에서 정확히 30분간 반응을 시키며 도중에 10분마다 잘 흔들어 줌.
- 대조군은 소독액 대신에 경수를 사용하였음.

④ 중화반응

- 소독제의 반응이 끝나면 소독제의 효능을 중화하기 위하여 즉시 37° C 동량의 중화용 용액(10% FBS이 함유된 PBS) 5mL을 반응액에 넣고 혼합함.

⑤ 바이러스 감염력 상실 정도 측정

- 중화액을 PBS를 사용하여 원액, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 로 희석하고 희석배수 당 5개의 10일란 발육란에 중화된 반응액 0.2mL를 요막강 내로 접종하였음.
- 접종 후 37° C에서 5일 동안 배양하며, 매일 검란을 실시하고, 접종 24시간 이내에 죽은 발육란은 사고사로 간주하고 시험성적에서 제외하였음.
- 접종 24시간 후부터 5일 이내에 죽은 접종란은 모두 4° C에 보관하였음.
- 접종 5일 후까지 살아남은 모든 발육란과 4° C에 보관된 죽은 접종란으로부터 요막강액을 각각 채취하고, 10% 닭적혈구를 사용한 혈구응집반응을 실시하여 바이러스의 존재 유무 및 바이러스 역가를 최종 판정함.

⑥ 바이러스 함유량 계산

- Kaeber method 사용하였음.

⑦ 대조군의 검정 등

- 병원체 대조군은 경수 조건에서 소독제 없이 실험하고 위의 중화반응 단계에서 병원체의 역가가 mL당 2×10^5 EID₅₀이상이 확인 (처리구3) 되어야 하며, 독성 대조군에서는 소독제에 의한 종란독성 (처리구4) 이 일어나지 않았음을 확인하여야 함.

(마) 시험결과

- ① 처리구 1 (경수조건) 과 2 (유기물조건)는 처리구 3 (소독액 대신 경수를 사용한 대조군)을 대조군으로 하였음 (표14 ~ 23참조).
- ② 처리구 3은 처리구 4 (독성시험) 를 대조군으로 하였음.
- ③ 바이러스: 대조군과 비교하여 병원체가 10^4 Reduction가 확인된 희석배수
- ④ 3회 반복 시험하여 20%의 오차범위 내의 결과의 중위수(median)를 최종 희석배수로 하였음.
- ⑤ 처리구 3: $10^{5.1}, 10^{4.9}, 10^{4.9}$ (처리구 1, 2의 대조) (표24)
- ⑥ 처리구 1, 2은 10^4 reduction된 바이러스 함유량이 최소희석배수의 기준이 된다.
- ⑦ ⑤의 처리구 3에서의 바이러스 함유량과 표11에서 처리구 1, 2에서의 바이러스 함유량을 비교하여 바이러스 감염력 상실 정도를 계산하였음 (표25).
- ⑧ 처리구1 (경수조건) 에서의 경우 1600배 희석까지 그리고 처리구 2 (유기물조건) 에서의 경우 800배까지 Avian Influenza에 대한 항바이러스 효과를 보였음 (표26)

표14. 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 처리구1의 종란 접종시험 1회차 결과

처리구1		AIV 양성수수 / SPF 발육란 접종수수					
중화액 소독제		중 화 액					
		원액	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
소 독 제	1:300	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:500	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:800	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:1000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:1200	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:1600	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:2000	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5	0/5
	1:2400	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5

표15. 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 처리구2의 종란 접종시험 1회차 결과

처리구2		AIV 양성수수 / SPF 발육란 접종수수					
중화액 소독제		중 화 액					
		원액	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
소 독 제	1:100	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:200	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

	1:300	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:500	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:800	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:1000	5/5	5/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	1:1200	5/5	5/5	5/5	5/5	1/5	0/5
	1:1600	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	0/5

표16. 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 처리구1의 종란 접종시험 2회차 결과

처리구1		AIV 양성수수 / SPF 발육란 접종수수					
중화액 소독제		중 화 액					
		원액	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
소독제	1:300	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:500	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:800	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:1000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:1200	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:1600	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:2000	5/5	5/5	5/5	4/5	0/5	0/5
	1:2400	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	1/5

표17. 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 처리구2의 종란 접종시험 2회차 결과

처리구2		AIV 양성수수 / SPF 발육란 접종수수					
중화액 소독제		중 화 액					
		원액	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
소독제	1:100	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:200	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:300	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:500	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:800	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:1000	5/5	5/5	5/5	1/5	0/5	0/5

	1:1200	5/5	5/5	5/5	4/5	1/5	0/5
	1:1600	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	0/5

표18. 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 처리구1의 종란 접종시험 3회차 결과

처리구1		AIV 양성수수 / SPF 발육란 접종수수					
중화액 소독제		중 화 액					
		원액	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
소독제	1:300	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:500	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:800	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:1000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:1200	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:1600	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:2000	5/5	5/5	5/5	4/5	0/5	0/5
	1:2400	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	1/5

표19. 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 처리구2의 종란 접종시험 3회차 결과

처리구2		AIV 양성수수 / SPF 발육란 접종수수					
중화액 소독제		중 화 액					
		원액	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
소독제	1:100	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:200	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:300	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:500	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:800	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:1000	5/5	5/5	5/5	1/5	0/5	0/5
	1:1200	5/5	5/5	5/5	5/5	1/5	0/5
	1:1600	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5

표20. 종란에 대한 처리구4의 독성대조 접종시험 1회차 결과

처리구4	소독제 독성 양성수수 / SPF 발육란 접종수수
------	----------------------------

중화액 소독제		(독성대조) 중 화 액					
		원액	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
소독제	1:100	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:200	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:300	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:500	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:800	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:1000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:1200	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:1600	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

표21. 종란에 대한 처리구4의 독성대조 접종시험 2회차 결과

처리구4		소독제 독성 양성수수 / SPF 발육란 접종수수					
중화액 소독제		(독성대조) 중 화 액					
		원액	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
소독제	1:100	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:200	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:300	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:500	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:800	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:1000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:1200	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:1600	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

표22. 종란에 대한 처리구4의 독성대조 접종시험 3회차 결과

처리구4		소독제 독성 양성수수 / SPF 발육란 접종수수					
중화액 소독제		(독성대조) 중 화 액					
		원액	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
소독제	1:100	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:200	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:300	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

	1:500	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:800	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:1000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:1200	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1:1600	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

표23. 종란에 대한 처리구3의 대조군 접종시험 결과

처리구3	AIV 양성수수 / SPF 발육란 접종수수					
	(병원체대조) 중 화 액					
	원액	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
1회	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5
2회	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5
3회	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5

표24. 회석배수당 처리구 1, 2에서의 바이러스 함유량

바이러스 함유량	처리구 1	바이러스 함유량	처리구 2
300배	10 ⁰ , 10 ⁰ , 10 ⁰	100배	10 ⁰ , 10 ⁰ , 10 ⁰
500배	10 ⁰ , 10 ⁰ , 10 ⁰	200배	10 ⁰ , 10 ⁰ , 10 ⁰
800배	10 ⁰ , 10 ⁰ , 10 ⁰	300배	10 ⁰ , 10 ⁰ , 10 ⁰
1000배	10 ⁰ , 10 ⁰ , 10 ⁰	500배	10 ⁰ , 10 ⁰ , 10 ⁰
1200배	10 ⁰ , 10 ⁰ , 10 ⁰	800배	10 ⁰ , 10 ⁰ , 10 ⁰
1600배	10 ⁰ , 10 ⁰ , 10 ⁰	1000배	10 ^{2.5} , 10 ^{2.7} , 10 ^{2.7}
2000배	10 ^{3.5} , 10 ^{3.3} , 10 ^{3.3}	1200배	10 ^{3.7} , 10 ^{3.5} , 10 ^{3.7}
2400배	10 ^{4.5} , 10 ^{4.7} , 10 ^{4.5}	1600배	10 ^{4.3} , 10 ^{4.3} , 10 ^{4.5}

표25. 회석배수당 처리구1, 2에서의 바이러스 감염력 상실 정도 측정

1회차	300배	500배	800배	1000배	1200배	1600배	2000배	2400배
-----	------	------	------	-------	-------	-------	-------	-------

처리구1 (처리구3과비교)	5.1감소	5.1감소	5.1감소	5.1감소	5.1감소	5.1감소	1.6감소	0.6감소
1회차	100배	200배	300배	500배	800배	1000배	1200배	1600배
처리구2 (처리구3과비교)	5.1감소	5.1감소	5.1감소	5.1감소	5.1감소	2.6감소	1.4감소	0.8감소
2회차	300배	500배	800배	1000배	1200배	1600배	2000배	2400배
처리구1 (처리구3과비교)	4.9감소	4.9감소	4.9감소	4.9감소	4.9감소	4.9감소	1.6감소	0.2감소
2회차	100배	200배	300배	500배	800배	1000배	1200배	1600배
처리구2 (처리구3과비교)	4.9감소	4.9감소	4.9감소	4.9감소	4.9감소	2.2감소	1.4감소	0.6감소
3회차	300배	500배	800배	1000배	1200배	1600배	2000배	2400배
처리구1 (처리구3과비교)	4.9감소	4.9감소	4.9감소	4.9감소	4.9감소	4.9감소	1.6감소	0.4감소
3회차	100배	200배	300배	500배	800배	1000배	1200배	1600배
처리구2 (처리구3과비교)	4.9감소	4.9감소	4.9감소	4.9감소	4.9감소	2.2감소	1.2감소	0.4감소

표26. Avian Influenza 소독제 효능시험결과

처리구	경수	유기물	소독제	비고	조사항목	1차 시험	2차 시험	3차 시험	중위수
1 유기물 저	+	-	+	경수 조건	배수	1600배	1600배	1600배	1600배
2 유기물 고	+	+	+	유기물/경수 조건	배수	800배	800배	800배	800배
3 병원체대조	+	-	-	처리구 1,2의 대조					
4 독성대조	+	-	+	처리구 3의 대조					

(3) Newcastle Disease Virus(NDV)에 대한 항바이러스 효능 평가

(가) 바이러스의 배양

- ① 계대 배양 중의 활력있는 바이러스를 사용하고 바이러스의 증식이 최대인 바이러스를 사용하였음 ($10^{7.0}$ TCID₅₀/ml).
- ② 바이러스를 측정하여 기준에 맞는 지 확인하였음.
- ③ 바이러스의 희석은 소독제 효력시험지침 (농림축산검역본부 고시 제 2016-29호)을 참조하여 조건에 맞게 경수희석액, 5% 유기물 희석액을 사용하였음.

(나) 소독제의 희석

- ① 소독제를 “조류 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 효능 평가”의 소독제 효력 시험 처리구의 방법으로 100배, 200배, 300배, 500배, 800배, 1,000배, 1,200배, 1,600배 희석하였음. 단, 소독제의 유효예상 희석배수가 500배 이하일 경우는 50배, 100배, 150배, 200배, 250배, 300배, 400배, 500배 등으로 희석함.
- ② 소독제의 희석은 소독제 효력시험지침 (농림축산검역본부 고시 제 2016-29호)을 참조하여 조건에 맞게 경수희석액, 5% 유기물 희석액으로 하였음.

(다) 시험방법

- ① 바이러스의 준비
 - (가)에서 증식된 4℃의 바이러스 액(세포배양액) 1.0 mL를 4℃의 바이러스 희석용 유기물 용액(FBS가 함유된 경수) 19 mL 과 섞음.
- ② 소독제 반응
 - 준비된 바이러스액 2.5mL를 4℃ 상태의 동량의 소독제 희석액이 들어있는 시험관에 넣고 혼합한 다음(총 5mL), 4℃ 에서 정확히 30분간 반응을 시키며 도중에 10분마다 잘 흔들어 줌.
 - 대조군은 소독액 대신에 경수를 사용함.
- ③ 중화반응
 - 소독제의 반응이 끝나면 소독제의 효능을 중화하기 위하여 즉시 37℃ 동량의 중화용 용액(10% FBS가 함유된 배지) 5mL을 반응액에 넣고 혼합함.
- ④ 바이러스 감염력 상실 정도 측정
 - 중화액을 CEF세포 배양용 배지를 사용하여 원액, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 로 희석하고 CEF 단층 세포가 형성된 96 well tissue culture plate에 희석배수 당 8 well에 중화된 반응액 25ul를 접종함.
 - 접종 후 37℃에서 5일 동안 배양하며, 매일 현미경으로 CPE 형성 여부를 관찰하고 접종 5일 후 뉴캐슬병 바이러스의 존재 유무를 최종 판정함.
- ⑤ Kaeber method 로 바이러스 함유량 계산
- ⑥ 대조군의 검정 등
 - 병원체 대조군은 경수 조건에서 소독제 없이 실험하고 위의 중화반응 단계에서 병원체의 역가가 ml당 2×10^5 TCID₅₀이상이 확인되어야 하며, 독성 대조군에서는 소독제에 의한 세포독성이 일어나지 않았음을 확인하여야 함.
- ⑦ 결과 판정
 - 처리구 1과 2는 처리구 3를 대조군으로 함.
 - 처리구 3은 처리구 4를 대조군으로 함.
 - 바이러스: 대조군과 비교하여 병원체가 10^4 Reduction이 확인된 희석배수
 - 3회 반복 시험하여 20%의 오차범위 내의 결과의 중위수(median)를 소독제에 대한 최종 희석배수로 정함.

(라) 시험결과

- ① 처리구 3: $10^{5.0}, 10^{4.9}, 10^{4.9}$ (처리구 1, 2의 대조)
- ② 처리구 1, 2은 10^4 reduction된 바이러스 함유량이 최소희석배수의 기준 (표27 ~ 38)
- ③ 처리구1 (경수조건) 에서의 경우 20배 희석까지 그리고 처리구 2 (유기물조건) 에서의 경우 10배까지 뉴캐슬병 바이러스에 대한 항바이러스 효과를 보였음 (표39)

표27. 뉴캐슬병 바이러스에 대한 처리구1의 배양세포 접종시험 1회차 결과

처리구1		NDV 양성수수 / CEF 세포 접종수수					
중화액 소독제		중 화 액					
		원액	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
소독제	원액	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	1:5	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	1:10	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	1:15	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	1:20	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	1:25	8/8	8/8	6/8	1/8	0/8	0/8
	1:30	8/8	8/8	8/8	8/8	0/8	0/8
	1:35	8/8	8/8	8/8	8/8	6/8	0/8

표28. 뉴캐슬병 바이러스에 대한 처리구2의 배양세포 접종시험 1회차 결과

처리구2		NDV 양성수수 / CEF 세포 접종수수					
중화액 소독제		중 화 액					
		원액	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
소독제	원액	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	1:5	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	1:10	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	1:15	8/8	8/8	8/8	3/8	0/8	0/8
	1:20	8/8	8/8	8/8	7/8	0/8	0/8
	1:25	8/8	8/8	8/8	8/8	2/8	0/8
	1:30	8/8	8/8	8/8	8/8	5/8	0/8
	1:35	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	1/8

표29. 뉴캐슬병 바이러스에 대한 처리구1의 배양세포 접종시험 2회차 결과

처리구1		NDV 양성수수 / CEF 세포 접종수수					
중화액 소독제		중 화 액					
		원액	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
소독제	원액	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	1:5	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	1:10	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	1:15	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	1:20	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	1:25	8/8	8/8	6/8	0/8	0/8	0/8
	1:30	8/8	8/8	8/8	6/8	0/8	0/8
	1:35	8/8	8/8	8/8	8/8	5/8	0/8

표30. 뉴캐슬병 바이러스에 대한 처리구2의 배양세포 접종시험 2회차 결과

처리구2		NDV 양성수수 / CEF 세포 접종수수					
중화액 소독제		중 화 액					
		원액	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
소독제	원액	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	1:5	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	1:10	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	1:15	8/8	8/8	8/8	2/8	0/8	0/8
	1:20	8/8	8/8	8/8	7/8	0/8	0/8
	1:25	8/8	8/8	8/8	8/8	2/8	0/8
	1:30	8/8	8/8	8/8	8/8	6/8	0/8
	1:35	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	0/8

표31. 뉴캐슬병 바이러스에 대한 처리구1의 배양세포 접종시험 3회차 결과

처리구1		NDV 양성수수 / CEF 세포 접종수수					
중화액 소독제		중 화 액					
		원액	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
소	원액	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8

독제	1:5	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	1:10	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	1:15	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	1:20	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	1:25	8/8	8/8	7/8	0/8	0/8	0/8
	1:30	8/8	8/8	8/8	6/8	0/8	0/8
	1:35	8/8	8/8	8/8	8/8	7/8	1/8

표32. 뉴켓슬병 바이러스에 대한 처리구2의 배양세포 접종시험 3회차 결과

처리구2		NDV 양성수수 / CEF 세포 접종수수					
소독제	중화액	중 화 액					
	원액	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	
소독제	원액	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	1:5	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	1:10	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	1:15	8/8	8/8	7/8	1/8	0/8	0/8
	1:20	8/8	8/8	8/8	5/8	0/8	0/8
	1:25	8/8	8/8	8/8	8/8	1/8	0/8
	1:30	8/8	8/8	8/8	8/8	5/8	0/8
	1:35	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	0/8

표33. 배양세포에 대한 독성대조 접종시험 1회차 결과

처리구4		소독제 독성 양성수수 / CEF 세포 접종수수					
소독제	중화액	(독성대조) 중 화 액					
	원액	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	
소독제	원액	8/8	8/8	8/8	0/8	0/8	0/8
	1:5	8/8	8/8	8/8	0/8	0/8	0/8
	1:10	8/8	8/8	8/8	0/8	0/8	0/8
	1:15	8/8	8/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	1:20	8/8	8/8	0/8	0/8	0/8	0/8

	1:25	8/8	8/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	1:30	8/8	8/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	1:35	8/8	8/8	0/8	0/8	0/8	0/8

표34. 배양세포에 대한 독성대조 접종시험 2회차 결과

처리구4		소독제 독성 양성수수 / CEF 세포 접종수수					
중화액 소독제		(독성대조) 중 화 액					
		원액	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
소독제	원액	8/8	8/8	8/8	0/8	0/8	0/8
	1:5	8/8	8/8	8/8	0/8	0/8	0/8
	1:10	8/8	8/8	8/8	0/8	0/8	0/8
	1:15	8/8	8/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	1:20	8/8	8/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	1:25	8/8	8/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	1:30	8/8	8/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	1:35	8/8	8/8	0/8	0/8	0/8	0/8

표35. 배양세포에 대한 처리구4의 독성대조 접종시험 3회차 결과

처리구4		소독제 독성 양성수수 / CEF 세포 접종수수					
중화액 소독제		(독성대조) 중 화 액					
		원액	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
소독제	원액	8/8	8/8	8/8	0/8	0/8	0/8
	1:5	8/8	8/8	8/8	0/8	0/8	0/8
	1:10	8/8	8/8	8/8	0/8	0/8	0/8
	1:15	8/8	8/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	1:20	8/8	8/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	1:25	8/8	8/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	1:30	8/8	8/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	1:35	8/8	8/8	0/8	0/8	0/8	0/8

표36. 배양세포에 대한 처리구3의 독성대조 접종시험 3회차 결과

처리구3	NDV 양성수수 / CEF 세포 접종수수					
	(병원체대조) 중 화 액					
	원액	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
1회	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	4/8
2회	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	3/8
3회	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	3/8

표37. 희석배수당 처리구1, 2에서의 바이러스 감염력 상실 정도 측정

바이러스 함유량	처리구 1	바이러스 함유량	처리구 2
원액	10 ⁰ , 10 ⁰ , 10 ⁰	원액	10 ⁰ , 10 ⁰ , 10 ⁰
5배	10 ⁰ , 10 ⁰ , 10 ⁰	5배	10 ⁰ , 10 ⁰ , 10 ⁰
10배	10 ⁰ , 10 ⁰ , 10 ⁰	10배	10 ⁰ , 10 ⁰ , 10 ⁰
15배	10 ⁰ , 10 ⁰ , 10 ⁰	15배	10 ^{2.8} , 10 ^{2.8} , 10 ^{2.5}
20배	10 ⁰ , 10 ⁰ , 10 ⁰	20배	10 ^{3.4} , 10 ^{3.4} , 10 ^{3.1}
25배	10 ^{2.4} , 10 ^{2.3} , 10 ^{2.4}	25배	10 ^{3.8} , 10 ^{3.8} , 10 ^{3.6}
30배	10 ^{3.5} , 10 ^{3.3} , 10 ^{3.3}	30배	10 ^{4.1} , 10 ^{4.3} , 10 ^{4.1}
35배	10 ^{4.3} , 10 ^{4.1} , 10 ^{4.5}	35배	10 ^{4.6} , 10 ^{4.5} , 10 ^{4.5}

표38. 희석배수당 처리구1, 2에서의 바이러스 감염력 상실 정도 측정

회차	원액	5배	10배	15배	20배	25배	30배	35배
1회차 처리구1 (처리구3과비교)	5.0감소	5.0감소	5.0감소	5.0감소	5.0감소	2.6감소	1.5감소	0.7감소
1회차 처리구2 (처리구3과비교)	5.0감소	5.0감소	5.0감소	2.2감소	1.6감소	1.2감소	0.9감소	0.4감소
2회차 처리구1 (처리구3과비교)	4.9감소	4.9감소	4.9감소	4.9감소	4.9감소	2.6감소	1.6감소	0.8감소
2회차 처리구2 (처리구3과비교)	4.9감소	4.9감소	4.9감소	2.1감소	1.5감소	1.1감소	0.6감소	0.4감소
3회차	원액	5배	10배	15배	20배	25배	30배	35배

처리구1 (처리구3과비교)	4.9감소	4.9감소	4.9감소	4.9감소	4.9감소	2.5감소	1.6감소	0.4감소
3회차	원액	5배	10배	15배	20배	25배	30배	35배
처리구2 (처리구3과비교)	4.9감소	4.9감소	4.9감소	2.4감소	1.8감소	1.3감소	0.8감소	0.4감소

표39. 뉴캐슬병 바이러스에 대한 소독제 효능시험결과

처리구	경수	유기물	소독제	비고	조사항목	1차 시험	2차 시험	3차 시험	중위수
1 유기물 저	+	-	+	경수 조건	배수	20배	20배	20배	20배
2 유기물 고	+	+	+	유기물/경수 조건	배수	10배	10배	10배	10배
3 병원체대조	+	-	-	처리구 1,2의 대조					
4 독성대조	+	-	+	처리구 3의 대조					

2. 2차년도: 기존 조류 인플루엔자 소독제와의 항바이러스 효력 비교 평가 및 수질 오염에 대한 환경 영향 평가

가. 천연물 신소재(탕자 추출물 기반) 조류 인플루엔자 소독제의 기존 소독제와의 효력비교 평가

(1) 시험대상소독제

(가) 현재 시중에서 판매되고 있는 기존 소독제의 경우 작용기전에 따라 산소계 산화제, 염소계 산화제, 산성제, 염기제, 알데하이드 및 계면활성제 등 6종으로 분류되며, 약 229종의 상품이 허가되어 있음.

(나) 6가지의 작용 기전에 따라 각각 5종의 대표 소독제를 선별하여 천연물 신소재 소독제와의 효력을 비교·평가하였음.

(2) 시험방법

- 조류인플루엔자 바이러스(H1N1) 1000 TCID₅₀/mL를 서로 다른 농도의 소독제와 혼합한 후에 MDCK (Mardin Darby Canine Kidney) 세포주에 처리하여 48시간 후에 세포변성효과 (Cytopathic effect, CPE) 유무를 확인하여 항바이러스 효능을 분석하였음.

(3) 시험결과

- (가) 희석된 소독제와 인플루엔자 바이러스 혼합용액을 세포주에 처리하여 48시간 후에 세포변성효과가 관찰되지 않는 최소한의 농도를 유효희석배수로 표시하였음.
- (나) 본 시험에서 측정된 유효희석배수 모두 소독제 제품에 명시된 권장희석배수 측정값과 유사한 결과를 보였음.
- (다) 천연물 신소재 인플루엔자 바이러스 소독제 (바이로케이투) 가 기존 소독제보다 높은 유효희석배수 (1458배)를 보임으로써 저 농도에서도 높은 항바이러스 효능을 보여주었음 (표40).
- (라) 특히 구연산 함량이 동일한 산성제 소독제인 허브크린과 에코팜 제품은 유효희석배수가 각각 729배와 486배로 천연물 신소재 소독제보다 낮은 유효희석배수를 보여주었음. 이 결과는 저 농도에서의 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 효능은 구연산 보다 탱자추출물이 항바이러스 효능에 더 영향을 끼친다고 사료됨.

표40. 기존 인플루엔자 소독제 제품과 천연물 신소재 소독제와의 항바이러스 효능 비교평가

분류 (작용기전별)	제품명	주성분 및 함량 (본제L당)	유효희석배수	권장희석배수	
				경수	유기물
산성제	허브크린	Thyme extract 30mL Oregano extract 3mL 구연산 500g	x729	x1000	x300
산성제	에코팜	구연산500g, 사과산 10g, 자몽종자추출물 10g	x486	x600	x200
산화제 (산소계)	저미사이드	삼중염 50% Malic acid 15% Sodium Chloride 1.5%	x486	x500	x300
알데하이드	알데시드	Glutaraldehyde 100g	x729	x1000	x1000
계면활성제	파콤-에이	옥틸데실 미메칠 암모늄 클로라이드 2.25% 외 5성분	x81	x200	x50
산성제	바이로케이투	구연산 500g 탱자추출물 5g	x1458	x1600	x800

나. 천연물 신소재(탱자 추출물 기반) 조류 인플루엔자 소독제의 동물실험을 통한 소독제 효력 평가

(1) 시험목적

- 탱자 추출물을 음수와 함께 경구 투여를 함으로써 봄철 환절기에 발생하는 닭 호흡기 감염 증상의 완화 또는 억제 효능 유무를 판단하기 위한 실험

(2) 시험대상

(가) 육계 21일령 2개 계사 4만 수, 23일령 2개 계사 5만수

(나) 호흡기 감염 증상 발생 3일째를 보이는 닭들을 시험대상으로 함.

(3) 시험방법

(가) 2개동 실험군, 2개동은 대조군으로 설정함

(나) 1일 6시간 음수와 함께, 탱자 추출물 5g 함유 소독제 1L를 음수 500 ~ 1000L에 혼합하여 투여함.

(다) 실험 3일째에 투여량을 음수 1000L 당 소독제 혼합량을 1.5L로 높임

(라) 전체 5일 동안 실험함.

(4) 시험결과

(가) 실험동의 호흡기증상 억제 상황이 대조군과 비슷하게 나타나 시제의 음수 투여에 대한 효과가 유의하게 나타나지 않음

(나) 폐사 수에서도 대조군과 차이가 없음

(다) 소독제의 투여로 부정적인 증상은 발견되지 않지만 소독제 투여로 인한 효능으로 볼 수 있는 폐사수 감소, 사료량 증가, 또는 쉰 목소리 감소 등의 효과는 발견되지 않음

(라) 대조군에 비해 투여동에서 폐사가 늘거나 추가적인 임상사항은 발견되지 않음.

다. 천연물 신소재(탱자 추출물 기반) 조류 인플루엔자 소독제의 수질 오염에 대한 환경 영향 평가

(1) *Zebrafish*를 이용한 조류 인플루엔자 소독제의 수질 오염 환경 영향 평가.

(가) 본 천연물 소재인 탱자씨앗 추출물을 이용한 조류 인플루엔자 소독제의 독성 및 수질에 대한 환경 영향 평가를 위하여 OECD TG ‘203. Acute Toxicity Test’⁽²⁾ 및 국립환경과학원 고시 제2009-57호 ‘화학물질 유해성 시험 연구기관의 지정 등에 관한 규정’⁽³⁾ 내 별표 5 ‘화학물질 유해성 시험 방법’에 준하여 어류 급성독성 시험을 시행하였음.

(나) 시험 대상 어류: OECD 및 국립환경과학원에서 지정하고 있는 zebrafish(*Danio rerio*)를 사용함.

(다) 사육 조건: 수온 23±1 °C, pH7.5±0.2, 용존산소 7~8 mg/L, 광주기 16/8 시간(명/암).

(라) 시험방법

① 각 농도별로 소독제가 희석된 2L의 노출용액에 10마리의 zebrafish를 96시간 노출시켜 폐사 개체수 및 이상 개체수를 관찰함(표41).

② 관찰 특이사항: 노출 3시간, 6시간, 및 노출 후 시점에서 24시간 간격으로 유영이상, 형태이상, 출혈 및 치사 등의 개체수를 확인함.

표41. 노출용액 1L에 희석된 소독제 농도 (구연산 500 mg/mL 기준)

희석배수	x100	x200	x400	x800	x1600
농도(mg/L)	5	2.5	1.25	0.625	0.3125

(마)시험결과

- ① 소독제가 100, 200, 400배 희석된 노출용액에서는 10마리의 Zebrafish 모두 폐사 및 개체 이상을 보였음 (그림13).
- ② 800배 희석된 노출용액에서는 12.3(±1.03)% 의 생존율을 보인 반면 1600배 희석된 노출용액에서는 10마리 모두 생존하였음.
- ③ 소독제 800배 이하로 희석된 노출용액에서는 Zebrafish의 생존율이 높지 않았지만 본 소독제의 유효희석배수인 1600배에서는 100%의 생존율을 보임으로써 Zebrafish를 이용한 수질 환경오염 평가에서의 수질오염에는 영향을 주지 않을 것이라 사료됨.

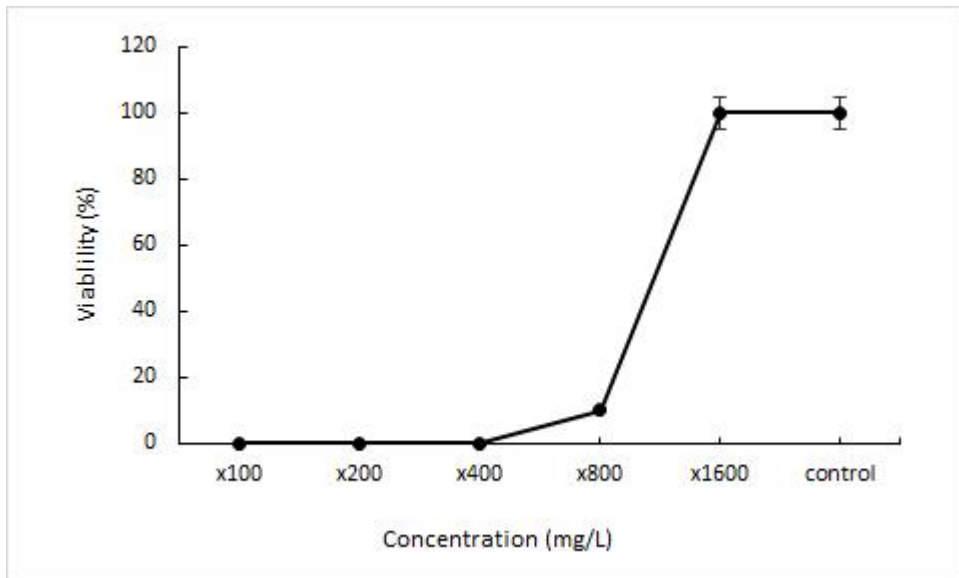


그림13. 소독제 농도에 따른 Zebrafish의 생존율

(3) 물벼룩을 이용한 조류 인플루엔자 소독제의 수질 오염 환경 영향 평가.

(가) 본 천연물 소재인 탕자씨앗 추출물을 이용한 조류 인플루엔자 소독제의 독성 및 수질에 대한 환경 영향 평가를 위하여 OECD TG ‘202. : *Daphnia* sp., Acute Immobilization Test’⁽⁴⁾에 준하여 물벼룩 (*Daphnia magna*)에 대한 유영저해(Immobilization) 시험을 수행하였음.

(나) 시험 대상 생물: OECD에서 지정하고 있는 물벼룩 (*Daphnia magna*)를 사용함.

(다) 사육 조건: 수온 20±1 °C, 조도 800 Lux, 용존산소 3 mg/L, 광주기 16/8 시간(명/암).

(라) 시험방법

- ① 각 농도별로 천연물 소재 소독제가 희석 (표41)된 50 ml의 노출용액에 20마리의 물벼룩을 48시간 노출시켜 유영능력 유무를 개체별로 관찰함.
- ② 각 농도별로 4개의 반복구를 두어 시험 농도 당 20마리의 물벼룩에 노출시킴.
- ③ 관찰 특이사항: 유영저해의 판단은 용기를 건드린 후, 약 15초 후에 관찰하여 일부기관(촉각, 후복부 등)은 움직이나 유영을 못할 경우 유영저해로 판단함.

(마) 시험결과

- ① 소독제가 100배 희석된 노출용액에서는 20마리의 물벼룩 모두 폐사 및 개체 이상을 보였음 (그림14).
- ② 200, 400, 그리고 800배 희석된 노출용액에서는 각각 $42.3(\pm 1.28)$, $57.3(\pm 2.21)$ 그리고 $87.2(\pm 1.59)\%$ 의 생존율을 보였고 1600배 희석된 노출용액에서는 20마리의 물벼룩 모두 생존하였음.
- ③ 400배 이하로 희석된 노출용액에서는 60% 미만의 생존율을 보였지만 본 소독제의 유효희석배수인 1600배에서는 100%의 생존율을 보임으로써 물벼룩을 이용한 수질 환경오염 평가에서의 수질오염에는 영향을 주지 않을 것이라 사료됨.

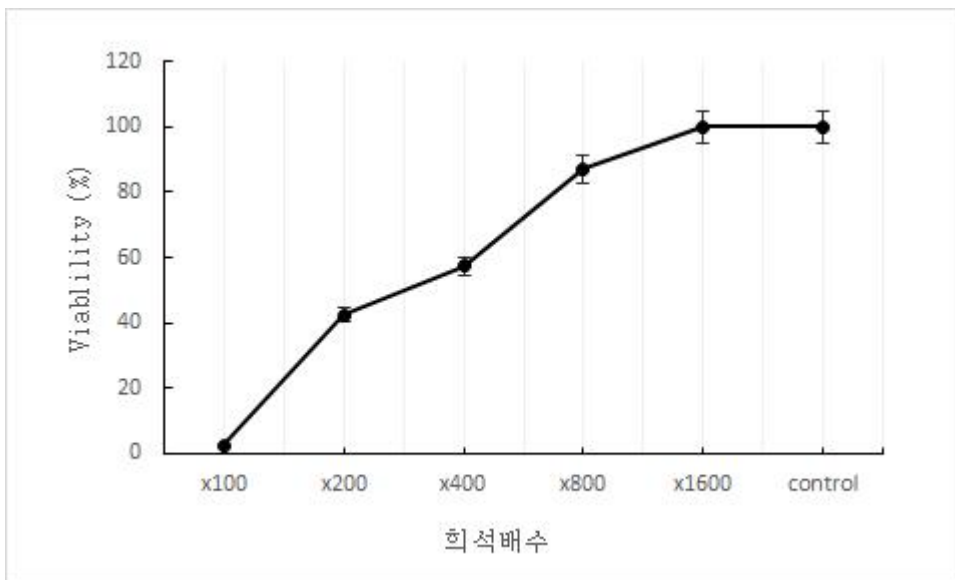


그림14. 소독제 농도에 따른 물벼룩의 생존율

2절. 조류 인플루엔자에 대한 천연물 소재(탕자 추출물 기반) 예방용 소독제의 산업화(제1협동)

1. 1차년도: 조류 인플루엔자 천연 소독제의 대량 생산 공정 확립 및 시제품 개발

가. 천연물 신소재(탕자 추출물 기반) 조류 인플루엔자 소독제의 원료 대량 생산을 위한 정제 조건 확립.

(1) 탕자 씨앗 추출물로부터 분리된 항바이러스 물질의 활성 최적화를 위한 추출 및 정제 조건을 확립시키고 활성을 평가함.

(가) 탕자씨 수급

- ① 탕자 열매는 10월~12월 사이에 국내에서 채취하며, 채취 후 열매를 1/2 등분하여 내부의 탕자씨 만을 확보하였음.

- ② 채취 1년 이상 지난 탱자의 경우 1년 이내의 탱자와 비교하여 항바이러스 효능이 떨어지는 확인함으로서 채취 후 1년 이내의 것만 사용하였음 (표42).
- ③ 경북 영천 소재 동림물산에서 채취 3개월 이내의 탱자씨 100kg이상 공급받음.

표42. 원료의 생산연도에 따른 효능 비교

생산연도 구분	추출 수율	효능 비교
추출 2년전 생산 원료	14%	0.7
추출 1년 이내 생산 원료	16%	0.95
추출 3개월 이내 생산 원료	16%	1

(나) 건조

- ① 분리된 탱자씨는 3일간 자연 상태에서 건조하여 1~2mm 크기의 입자 상태로 추말함.
- ② 분말 단계에서 추말 입자의 크기가 너무 작으면 추출 단계에서 수율이 떨어짐.
- ③ 1mm 이하의 미세 입자의 경우 입자와 입자 사이 공간이 거의 없어 추출 용매가 제대로 작용하지 못함과 동시에 입자간 서로 달라붙는 문제의 발생으로 추출 수율이 떨어지는 문제점을 발생시킴
- ④ 1mm 이하의 미세 입자의 경우 여과와 정제 과정에서도 작업시간을 2배 정도 더 걸리는 문제가 있으며, 제분 비용도 추가적으로 발생하였음
- ⑤ 롤러를 이용한 파쇄의 경우 비용적으로는 비교적 적게 소요되지만 추출 수율이 떨어져 원료 활용의 경제성에 문제가 발생하였음
- ⑥ 탱자의 추출을 위한 원료의 표준 상태는 1~2mm 크기의 추말 상태가 가장 적합하고 초기 가공 비용적인 면에서도 경제적이었음 (표43).

표43. 입자크기에 따른 추출 수율 분석

상태 구분	추출조건	수율
파쇄전의 건조 상태의 씨	에탄올 100% 추출온도 30℃ 추출시간 48시간 1시간 단위로 교반시켜줌	6%
롤러 사용 파쇄 상태 원료		9~11%
1~2mm 크기의 입자 상태		17~18%
1mm 이하		12%

(다) 추출

- 추출공정은 추말된 탱자를 전기 추출기를 이용해 일정시간 동안 특정 온도를 유지하면서 천연물이 가지고 있는 바이러스 억제 물질을 추출하는 공정임

표44. 추출 공정 상세 설명

공정요소	설 명(6. 추출)	시 간	장비	내용
작업대기	1.부직포 및 원재료 준비	-		- 추출시 교반이 가능하도록 추출포의 크기는 원료양의 1.5~2배를 포함할 수 있는 규격품을 사용함.
준비	2. 탱자와 추출용매 준비			- 추출을 위한 용매는 에탄올 99.95%를 사용하며, 원료가 완전히 잠기도록 그 양을 결정함. 실험결과 원료양의 9~10배가 적당한 것으로 사료됨. (예시: 원료 1kg당 에탄올 9~10L 준비)
운반	3. 추출 설비로 이동			
가공	4. 추출 설비에 원재료 투입		원액추출기	
가공	5. 용매 투입		원액추출기	- 원료 투입량의 10배 기준으로 용매 투입
가공	6. 추출조건 설정	48 - 24	원액추출기	- 에탄올 99.5% 사용 - 30℃ 추출시간 48시간으로 조정. 1 시간 단위로 교반 - 온도를 45℃로 맞춰 추출시간 24시간으로 조정 가능
가공	7. 추출			- 추출시 45℃ 정도의 온도 유지 - 수증기 유출이 발생하지 않도록 추출기 뚜껑부분 조임을 충분하게 밀폐함. - 추출 시간 설정
대기	8. 추출 종료 후 추출물이 일정 온도까지 떨어질 때까지 대기		추출기	- 추출기의 온도를 일정 상태까지 떨어뜨리고 여과정제를 위해 대기
운반	9. 여과 정제를 위해 파이프라인을 통한 여과기로 이송			- 외부 요인에 의한 오염이 발생하지 않도록 밀폐상태에서 이송

(라) 결과분석

- ① 추출을 통한 정제조건에서 에탄올의 농도를 99.5%, 70%, 35%로 설정하여 탱자에 대한 추출 수율을 실험한 결과 각각 17%, 11%, 5%로 나타나며, 99.5%에서 사용하는 것이

가장 높은 수율을 보였음.

- ② 용매를 정제수로 사용하여 120℃ 열추출 방식으로 탱자를 추출하였을 경우 에탄올 추출물의 10% 수준의 수율을 확인하였음.
- ③ 용매 농도별 항바이러스 효능시험 결과에서도 99.5% 에탄올 추출물에서 가장 우수한 항바이러스 효능을 보였음.

나. 천연물 신소재(탱자 추출물 기반) 조류 인플루엔자 소독제의 제품 설계

(1) 품질관리

- 추출을 통하여 정제된 탱자를 브릭스 및 pH 측정, 추출 수율 그리고 바이러스 억제 효능을 통하여 품질관리를 시행함.

(2) 여과 공정 (표45 참조) 후 제품화에 필요한 양은 농축을 통하여 진행함

표45. 여과 공정 및 상세 내용

공정요소	내용	비고
운반	추출탱크에서 1차1 μ m filtering을 위해 이송	
작업	1 μ m filtering	bag filter 상태 주기적 확인
운반	2차 0.2 μ m filtering을 위해 이송	
가공	2차 filtering	봉필터 상태 주기적 확인
작업	1 ~ 4 단계 반복	
보관	저장 탱크로 이송	
이송	저장 탱크의 정제물을 농축 설비의 용량에 맞춰 lot으로 나눠 이송	농축 설비로 이송

- 보관을 위한 보관량은 충전과 캐핑 단계로 이어짐
- 농축이나 분말화가 필요하면 농축공정으로 이어짐

(3) 농축

(가) 농축은 추출물에 포함된 에탄올을 제거하는 과정을 포함하여 분말화를 위한 동결건조 또는 진공건조 전 공정 (표46).

(나) 추출 용매로 사용한 99.5%의 에탄올은 재사용 위해 회수되었으며, 추출물과 함께 섞여 있는 에탄올은 제품화를 위해 제거함.

(다) 농축 과정을 통해 에탄올을 제거하면서 그 추출물의 영킴 방지와 제품화 배합을 위해

DMSO를 에탄올의 1/3 정도의 량을 단계적으로 투입하였음.

(라) 동결 건조를 위해 에탄올 제거함.

(마) 진공건조를 위해 에탄올 2/3 정도를 제거한 후 진공건조기로 이송함.

표46. 여과 공정 및 상세 내용

공정요소	내용	장비	비고
작업대기	농축기에 추출물 입고 대기		
운반	농축기로 이동		
가공	농축기에 추출물 투입		
가공	농축기 작동	진공농축기	- 온도와 시간 설정. 농축물의 량에 따라 다르게 설정 - 열수인 경우 진공상태 온도 80℃ 설정 - 알코올 추출에서는 진공온도 65℃ 설정
완료대기	농축물 대기		
검사	농축물 품질 검사		
운반	건조 공정으로 이동		

(4) 진공 건조

○ 농축된 추출액을 수분제거와 동시에 분말화를 위한 공정 (표47)

표47. 진공 건조 공정 및 상세내용

공정요소	내용	시 간(초)	장비	비고
작업대기	건조기에 농축물 입고 대기			
운반	건조기로 이동			
가공	건조기에 농축물 투입			
가공	진공건조 조건설정	내용물에 비례	진공건조기	온도, 시간 설정
가공	건조기 작동			
완료대기	건조물 대기			
운반	분쇄 공정으로 이동			

(5) 분쇄

- 동결 건조된 추출물을 분쇄기를 이용해 잘게 분말로 만든 후 포장을 통해 기본 반제품 및 완제품 형태로 만들어 출고 준비 완료함. 포장시 제품의 변질가능성을 제거하기 위해 진공 포장을 함 (표48).

표48. 분쇄 공정 및 상세내용

공정요소	내용	장비	비 고
작업대기	건조물 입고 대기		
운반	분말 제조기로 이동		
가공	분말화 작업	분말 제조기	
작업대기	분말 대기		
운반	진공 포장실로 운반		
작업대기	진공포장 작업 대기		
가공	진공포장기 가동	진공포장기	변질가능성 제거
작업대기	진공포장물 대기		
운반	버퍼로 이동		

(6) 충전

- 농축을 통해 에탄올을 제거하고 DMSO와 함께 액상 상태의 추출물을 소분 밀폐 용기에 충전함 (표48).

표49. 충전 공정 및 상세 내용

공정요소	내용	비고
작업대기	추출물을 보조탱크로 이송하여 충전 대기	
운반	파이프라인을 이용한 충전탱크 이송	
가공	충진기에 액상제 투입	액상인 경우 60~70℃에서 충전 공정 진행
가공	충진 용량설정	
가공	충진	
완료대기	이송	

운반	포장으로 이동	
----	---------	--

다. 천연물 신소재(탕자 추출물 기반) 조류 인플루엔자 소독제 시제품 개발.

- 상기 정제조건 및 제품화 공정을 통한 탕자 추출물 기반 조류 인플루엔자 소독제 (액상제 및 분말제) 시제품 개발 (그림15)



액상제



분말제

그림15. 천연물 신소재(탕자 추출물 기반) 조류 인플루엔자 소독제 시제품

- 2. 2차 년도: 천연물 신소재(탕자 추출물 기반) 조류 인플루엔자 소독제 시제품의 경제성 분석 및 현장 시험을 통한 사용 매뉴얼 개발과 토양 오염에 대한 환경 영향 평가

가. 천연물 신소재(탕자 추출물 기반) 조류 인플루엔자 소독제 시제품의 경제성 분석

(1) 기존 소독제의 제품 가격에 대한 시장성 조사를 통한 가격 우위

(가) 기존 소독제들의 경우 산성 계열이 주를 이루며 가격대는 5,500~250,000원대까지 다양하게 형성되어 있음 (표50).

(나) 사용 용도에 따라 희석배율은 300~3500배까지 나타나고 있음. 희석 비율이 낮은 것은 가축사체 등에 사용 시 배율이며, 차량소독을 포함한 일반 분무 소독일 경우는 3500배까지 희석하여 사용

표50. 기존 소독제의 가격 추세

기존소독제 제품	단위	가격	AI적용 희석배율	주요성분
써치팜1	1L	20,000	3500배	복합4급암모늄, 구연산, 인산, 기타
케어룩스	1L	35,000	100배 이내	복합4급암모늄, 구연산, 인산, 기타
써치팜18L	18L	250,000	3500배	복합4급암모늄, 구연산, 인산, 기타
팜솔루션	4L	52,000	300배	복합4급암모늄

뉴크린	Kg	9,000	300 ~ 3500배	산제 구연산
그린존-A	mg	8,500		사과산, 자몽추출물
팜닥터	L	10,500		구연산, 복합4급암모늄
제로킬	Kg	23,000		삼중염, 사과산
파콤-A	L	5,500		디테실디메칠암모니아염등 혼합액 4.5%, Alkyldimethylbenzylamm chloride 3%

(다) 본 과제를 통해 제안하는 천연물 유래 제품에 대한 가격분석은 다음과 같음 (표51).

(라) 소독제 개발 후보 물질을 이용한 제품 개발에 따른 원가는 1L 기준으로 5,476원으로 기존의 제품들에 비해 가격적 경쟁력을 가질 수 있음.

표51.천연물 소독제 원가 산정표

소독제원가산정								
제품명	기준제조단위	단위종량	중량	포장단위	이론수량	생산수율	생산량	
천연물 소독제	10톤	1L	1kg	15L		96.0%		
1.원재료비								
No	원료명	배합비율	투입량(Kg)	원료단가	금액(원)	제품함유단가	원료특징	
1	주원료 1	5.00%	500.00	8,800	4,400,000	440.0	농축 85%기준	
2	주원료 2	50.00%	5,000.00	1,500	7,500,000	750.0		
3	부형제 1	5.00%	500.00	300	150,000	15.0		
4	추출용매		1,500.00	6,000	9,000,000	900.0	재활용기준	
5			-	-	-	-		
원재료비 계		60.00%	7,500.0	16,600	21,050,000	2,105.0	제조Loss 포함	
2.부자재비								
No	자재명	기준량	단가	금액	단가	경비내역	Set 단가	금액
1	1L 플라스틱통	10,000	516	5,160,000	516	1)제조비	310	
2	씰	10,000	15	153,061	15	2)포장비	100	
3	포장박스	667	935	649,630	935	3)외주가공비		
4	라벨	10,000	85	885,417	85	4)부대비용	15	
5	포장자재	50		-	50	5)시험.개발비	250	
6				-	0			
7				-	0			제외
부자재비 계					1,601	경비 계	675	
제조원가 산출 (VAT별도)		항목	단가	점유비	제품 개요	제품유형	액상제품	
		1) 원재료비	2,105			제형		
		2) 부자재비	1,601			포장방법	15kg 박스단위 포장	
		3) 제조경비	675		제품구성	1L통 단위용기 + 제품라벨부착		
		소계	4,381		추가비용 (최초1회)	시험검사, 품목신고비	별도	
원가 (원)	5,476			계				
특기사항 (VAT별도)								
1)								
2)	1L 기준 원가:	5,476						
3)								
4)								
5)								

(2) 천연물 신소재 대량 생산을 위한 원재료 약용식물 및 추출을 위한 대량 생산 시스템에서의 시장 조사

(가) 천연물 추출 및 대량 생산 시스템 보유한 주요 업체들과 생산 능력 현황을 보면 다음과 같음 (표52)

(나) 천연물 추출 및 대량 생산을 설비는 각 지역별로 충분한 시설들이 있으며, 이외에 테크파크별로 2~5톤 규모의 시설들을 갖추고 있음

표52. 주요 업체 천연물의 추출 및 대량 생산 시스템 현황

업체명	생산능력	지역
SCI	1일 8톤 생산 규모 및 포장	충남 홍성
건우 FC	1일 15톤의 추출 및 포장	충북 진천
대호	1일 5톤 추출 및 포장	경기 화성
중앙바이오텍	1일 5톤 추출 및 포장	경기 안산
다미	1일 8톤의 추출 및 포장	경기 안성

나. 천연물 신소재(탱자 추출물 기반) 조류 인플루엔자 소독제 시제품의 현장 시험을 통한 사용 매뉴얼 개발

(1) 축사, 차량, 기구, 분뇨 등과 같은 소독대상에 따른 용량, 용법 개발

(가) 제품명: 바이로케이투(VIRO-K II)

(나) 성분 및 함량 (본제 1L중)

- ① 탱자추출물----- 5g
- ② 구연산----- 500g
- ③ 정제수----- 적당량

(다) 용법 및 용량

- ① 소독 대상물에 대하여 철저히 세척한 후 다음과 같이 소독을 실시한다.
- ② 적정비율로 미지근한 물로 희석하여 잘 섞은 뒤 모든 표면과 바닥에 분무한다.
- ③ 축사 내외부 소독시: 면적 제곱미터당 희석액 200~300mL (평당 약 600~900mL)를 모든 표면이 충분히 적셔지도록 한다.
- ④ 각종 축사기구, 차량의 소독시: 분무 대상기구가 흠뻑 젖도록 희석액을 분무한다.
- ⑤ 축사 공간 소독시: 100제곱미터당 희석액 1리터를 분무기로 축사 공간에 고루 고압연무 분무한다.

(라) 권장희석배수

소독대상	유기물이 적은 소독대상	유기물이 많은 소독대상
살모넬라균	10배 희석	4배 희석
뉴캐슬병	20배 희석	10배 희석
조류인플루엔자	1,600배 희석	800배 희석

- ① 유기물이 적은 소독대상: 축사 공간 및 표면, 작업 기구, 일반 차량 등

- ② 유기물이 많은 소독대상: 사체, 축사바닥, 오물, 농장용 차량, 운반 도구 등 현장에서 사용되는 기구

(마) 효능 및 효과

- ① 축사 내외부의 살균 및 소독효과: 양돈장, 양계장, 우사 등 내외부의 소독
- ② 각종 축산 기구의 살균 및 소독 효과
- ③ 바이러스, 세균의 소독효과
 - 살바이러스 효과: 조류인플루엔자(AI), 뉴캐슬병(ND)
 - 살세균효과: 살모넬라균

(바) 사용상 주의사항

- ① 약효 및 안전상에 문제가 발생할 수 있으므로 임의로 다른 약제를 혼합하여 사용하지 마십시오.
- ② 수의사 지시에 따라 사용하십시오.
- ③ 소독효과의 저하를 방지하기 위해 용법, 용량에 권장된 희석 비율을 반드시 준수하십시오.
- ④ 유기물질(분뇨, 오물, 사료찌꺼기등)이 있을 경우 소독효과가 떨어질 수 있으므로 먼저 유기물을 제거하고 난 후 소독을 하십시오.
- ⑤ 사용 후 반드시 남은 약제는 마개를 밀봉하고 직사광선을 피하여 건조한 실온에 보관하십시오. 희석액 상태로 보관시 약효가 감소하므로, 희석액은 매번 사용할 때마다 필요한 만큼만 만들어 사용하십시오.

(2) 소독제 효력 안정성 시험을 통한 보관 방법 매뉴얼 개발

(가) 지표성분과 구연산을 이용한 소독제의 표준화 및 안정성 시험

- ① 지표성분과 구연산의 HPLC 분석
 - 지표 성분 1 mg을 1 mL의 메탄올에 용해 시킨 후 30 µL를 HPLC의 injector에 주입하여 HPLC를 분석함.
 - HPLC 분석은 mobile phase는 55 % 메탄올 조건이며, UV 254 nm 파장에서 지표성분인 Bergapten을 측정하였음(그림16-A).
 - 지표 성분 Bergapten의 분석 결과 주입 5.5 분 후에 검출됨(그림16-C).
 - 구연산 1 mg을 1 mL의 물에 용해 시킨 후 30 µL를 HPLC에 주입하여 분석함.
 - HPLC 분석은 물과 0.5 % phosphoric acid의 조건으로 진행했으며, 구연산은 UV 210 nm 파장에서 검출하였음(그림16-B).
 - 구연산은 3.3 분에 검출됨 (그림16-D).

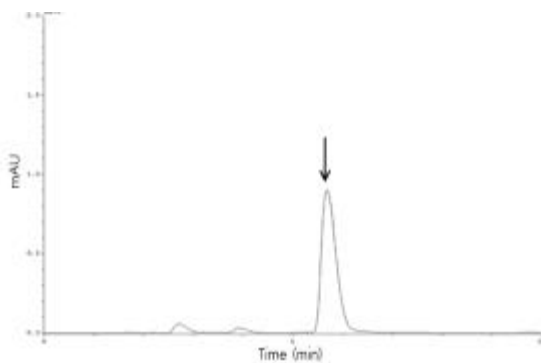
A.

Item	Conditions
Detector	UV detector
Column	Phenomenex Kinetex 5u C18 100A (150 x 4.6 mm)
Column oven (°C)	30
Mobile phase	H ₂ O + 0.5 % phosphoric acid
UV wavelength	210 nm

B.

Item	Conditions
Detector	UV detector
Column	Phenomenex Kinetex 5u C18 100A (150 x 4.6 mm)
Column oven (°C)	30
Mobile phase	55 % MeOH
UV wavelength	254 nm

C.



D.

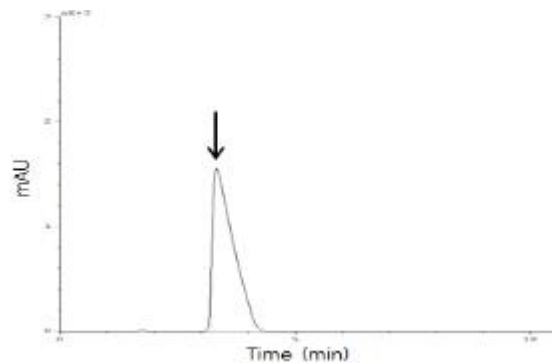


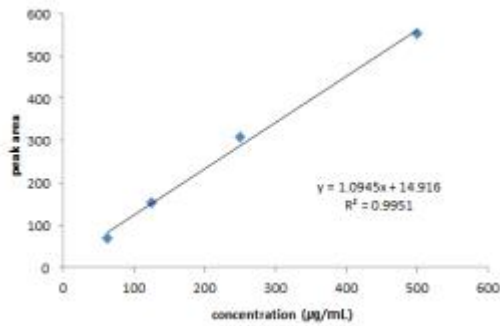
그림16. 지표성분 및 구연산의 HPLC 분석

- A. 지표성분의 HPLC 분석조건 B. 구연산의 HPLC 분석조건
C. 지표 성분의 HPLC 분석 peak D. 구연산의 HPLC 분석 peak

② 지표성분과 구연산의 검량선 작성

- 소독제 표준화를 위해 확립된 지표 성분 Bergapten과 구연산의 HPLC 분석 조건을 바탕으로 검량선을 작성함.
- 서로 다른 농도(500/250/125/62.5 µg/mL)의 Bergapten을 확립된 HPLC분석으로 측정하여 검량선을 작성함.
- Bergapten의 회귀방정식 $y=1.0945x + 14.916$ 을 구하였으며, 상관계수(R^2)값은 0.9951로 직선성이 매우 높음을 알 수 있음 (그림17-A).
- 서로 다른 농도 (200/100/50/25 µg/mL)의 구연산을 HPLC 분석을 통해 검량선을 작성함.
- 구연산의 회귀방정식은 $y=11.134x + 244.26$ 이며, 상관계수(R^2)값은 0.9815로 이는 직선성이 높음을 알 수 있음 (그림17-B).
- 이와 같이 검량선을 작성하고 회귀방정식을 구함으로써 소독제에서의 탱자 씨앗 추출물과 구연산 농도를 측정함으로써 소독제의 표준화가 가능함.

A.



B.

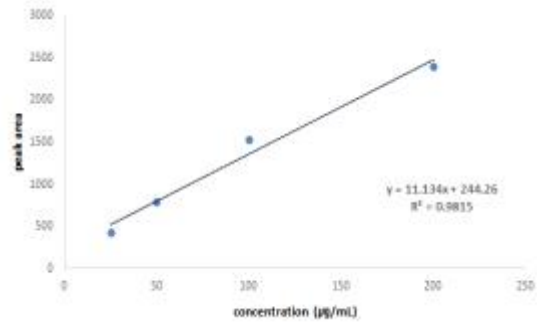
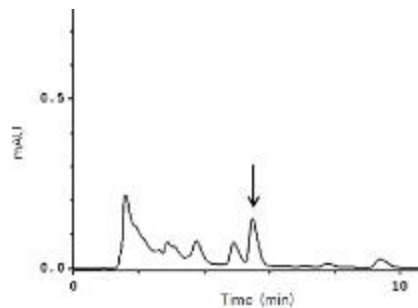


그림17. 지표성분 Bergapten과 구연산의 검량선

A. Bergapten의 검량선 B. 구연산의 검량선

③ 탱자 씨앗 추출물에서의 지표 성분 Bergapten의 함량 분석

- 소독제에서의 탱자 씨앗 추출물 함량을 분석하기 위해 먼저 탱자 씨앗 추출물에서의 Bergapten의 함량을 분석함.
- Bergapten의 함량은 HPLC 분석을 통해 탱자 씨앗 추출물 내에서 Bergapten을 검출하고 peak area를 검량선에 대입하여 그 함량을 측정함.
- 측정된 Bergapten의 함량을 바탕으로 탱자 씨앗 추출물에서 Bergapten의 함량비를 측정하여 이를 바탕으로 소독제에서의 탱자 씨앗 추출물의 함량을 확인할 수 있음.
- 탱자 씨앗 추출물 10 mg을 메탄올 1 mL에 용해시킴.
- 10 mg/mL의 탱자 씨앗 추출물을 Sepack C18 cartridge에 주입함.
- 메탄올 2 mL로 두 번 Sepack C18 cartridge에 주입하여 회수함.
- Sepack C18 cartridge을 통과해 회수된 추출물이 혼합된 메탄올 4 mL을 evaporator를 통해 농축시킨 후 1mL의 메탄올에 용해시켜 탱자 씨앗 추출물을 수득하여 HPLC를 통해 분석함.
- 그 결과 5.5분에서 Bergapten을 검출하였음.
- peak area는 32.435로 측정되었으며, 이를 Bergapten 회귀방정식을 통해 1.601 µg/mg의 농도를 구할 수 있음.
- 총 탱자 씨앗 추출물 10 mg 중 1.601 µg/mg 의 Bergapten이 함유되어 있으며 이는 0.16%의 함량비로 나타낼 수 있음(그림18).



peak area	농도 (µg/mg)	탱자 추출물에서의 함량비(%)	표준 편차 (%)
Bergapten 32.435	1.601	0.160	0.03

그림18. HPLC 분석을 통한 탱자 추출물에서의 Bergapten 측정

- ④ 천연물 신소재 조류 인플루엔자 소독제의 표준화
- HPLC 분석을 통해 Bergapten을 검출하여 탱자 씨앗 추출물의 함량과 구연산의 함량을 측정함으로써 소독제의 표준화 작업을 진행함.
 - 소독제 1 mL을 Sepack C18 cartridge에 주입함.
 - Sepack C18 cartridge에 2 mL의 물을 두 번 주입하여 총 5 mL을 추출함. 이를 구연산 분석에 사용함.
 - 메탄올 2 mL로 두 번 Sepack C18 cartridge에 주입하여 회수함. 회수한 메탄올 4 mL을 evaporator로 농축시킨 후 다시 1 mL의 메탄올로 용해한 후 이를 Bergapten의 분석에 사용함.
 - 구연산은 3.3 분에 검출되었으며(그림19-B), 소독제 1 mL 내에 500.21 μg 이 함유되어있음을 분석하였음. 이를 통해 소독제에는 구연산은 50 % 함유되어 있음을 확인함(그림16-C).
 - Bergapten은 5.5분에 검출되었으며(그림19-A), 소독제 1 mL 내에 8.316 μg 이 함유되어있으며 이를 바탕으로 탱자 추출물 함량을 분석한 결과 소독제에는 탱자 추출물이 0.52 % 함유되어 있음을 확인함(그림19-C).

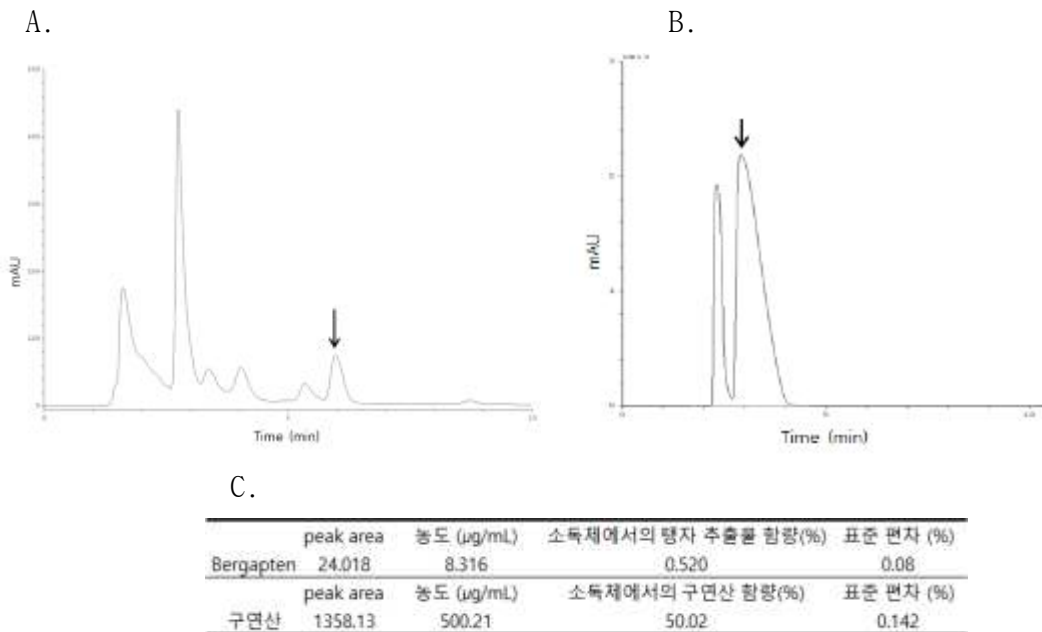
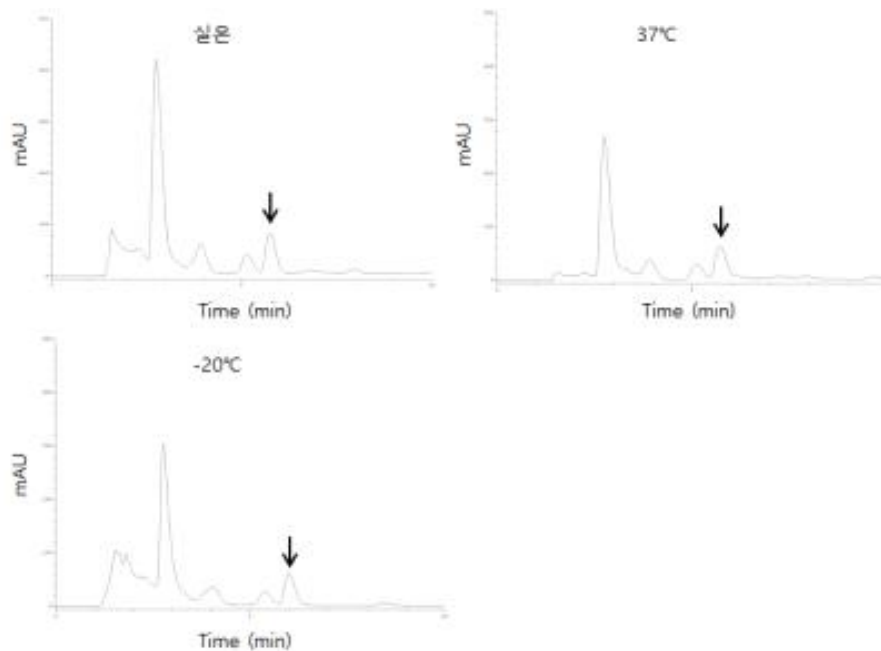


그림19. 소독제의 탱자 추출물 함량 및 구연산 함량 분석

- A. 소독제 내의 Bergapten 검출
- B. 소독제 내의 구연산 검출
- C. 소독제의 HPLC 분석 및 소독제 내의 탱자 추출물 및 구연산 함량 분석

- ⑤ 천연물 신소재(탱자 추출물 기반) 조류 인플루엔자 소독제의 안정화
- 동물용의약품등 안전성 시험지침 (농림축산검역본부 고시 제2013-43호)⁽⁵⁾ 따라 안전성 시험을 수행하였음.

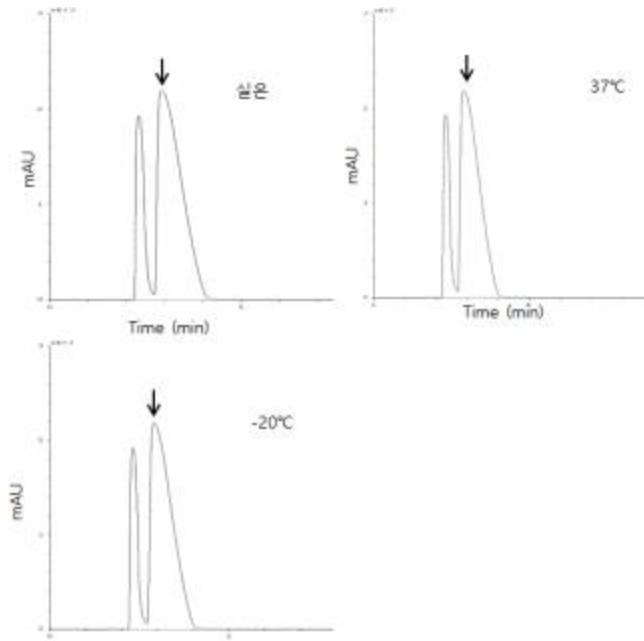
- 장기보존 시험 : 실온에서 6개월간 보관하여 시험함.
- 가속시험 : 40℃에서 6개월간 보관 후 시험함.
- 가혹시험 : -20℃에서 1주일간 보관 후 시험함.
- 보관에 따른 소독제 내 Bergapten의 농도를 분석하여 탱자 추출물 함량을 측정함.
- 실온에서 6개월간 장기보관한 소독제 내의 탱자 추출물은 0.5061%로써 거의 변화가 없음을 확인함(그림20).
- 37℃에서 6개월간 보관한 소독제 내의 탱자 추출물은 0.4070%로써 함량이 감소됨을 확인함.
- -20℃에서 1주일간 보관한 소독제 내의 탱자 추출물은 0.4704%로써 함량이 5 %정도 감소함.



	peak area	농도(μg/mL)	소독제에서의 탱자 추출물 함량(%)	표준 편차(%)
실온	23.779	8.098	0.5061	0.0081
37℃	22.043	6.512	0.4070	0.0152
-20℃	23.155	7.527	0.4704	0.0166

그림20. 보관에 따른 소독제 내 Bergapten의 농도 및 탱자 추출물 함량 분석

- HPLC 분석을 통해 보관에 따른 소독제 내의 구연산 함량을 측정함(그림21).
- 실온에서 6개월간 보관한 소독제 내의 구연산 함량은 51.16%로써 거의 변화가 없음.
- 37℃에서 6개월간 보관한 소독제 내의 구연산 함량은 51.18%로써 거의 변화가 없음.
- -20℃에서 1주일간 보관한 소독제 내의 구연산 함량은 51.24%로써 거의 변화가 없음.
- 구연산의 경우 본 실험에서 실시한 여러 보관상태에서 변화가 없음을 확인함.
- 이로써 HPLC 분석을 통해 소독제 내의 탱자 추출물의 지표 성분 Bergapten과 구연산을 측정함으로써 소독제의 표준화 및 변화를 측정하여 평가할 수 있음.



	peak area	농도(μg/mL)	소독제에서의 구연산 함량(%)	표준 편차(%)
실온	1383.41	511.56	51.16	0.15
37°C	1383.96	511.81	51.18	0.52
-20°C	1385.31	512.42	51.24	0.27

그림21. 보관에 따른 소독제 내의 구연산 함량 분석

다. 천연물 신소재(탕자 추출물 기반) 조류 인플루엔자 소독제의 토양 오염에 대한 환경 영향 평가

(1) 식물발아 영향 평가를 통한 조류 인플루엔자 소독제의 토양 오염 환경 영향 평가.

(가) 본 천연물 소재인 탕자씨앗 추출물을 이용한 조류 인플루엔자 소독제의 살포로 인한 오염토양이 생태계에 미치는 환경 영향 평가를 위하여 여과지 노출시험법과 오염 토양 시험법을 실시함.

(나) 오염토양 노출시험법은 OECD 생태영향 시험지침 208, ‘Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test’⁽⁶⁾에 따라 수행함.

(다) 시험 대상 식물

- ① 댄디무순 (Raphanus Sativus L)
- ② 밀 (Triticum aestivum L)

(라) 발아 조건: 온도 25±1 °C, 발아율 80% 이상, 파종 후 7~10일 후 수확가능

(마) 시험방법

- ① 시험에 사용되는 토양은 인공토양(OECD artificial soil)을 사용함.
- ② 건조된 인공토양을 시험용기에 담은 후, 각 농도별로 천연물 소재 소독제가 희석된 시험용액을 분주한 후, 소독제 성분이 완전히 침투하도록 30분 동안 정치함 (표54).
- ③ 각 처리구 당 20개의 종자를 사용하여, 240시간 동안 노출하며, 24시간 주기로 이탈사황을 관찰함.
- ④ 시험 이탈사황의 기준은 64%의 발아율을 기준을 함.
- ⑤ 관찰 특이사황: 시험 이탈사황의 기준은 적용시험법에서 권고하는 65%의 발아율로 함.

표54. 인공토양 1kg에 희석된 소독제 농도 (구연산 500 mg/mL 기준)

희석배수	x100	x200	x400	x800	x1600
농도(mg/kg)	5	2.5	1.25	0.625	0.3125

(사) 시험결과

- ① 소독제가 100배 희석된 인공토양에서의 무순의 발아율은 50.2(±1.32)% 의 발아율을 보였지만 200배 이상으로 희석된 토양에서는 80% 이상의 발아율을 보여주었음 (그림 22).
- ② 밀의 경우 100배 희석된 토양에서도 93.3(±1.64)% 의 발아율을 보임으로써 소독제에 의한 토양 환경오염에 전혀 영향을 주지 않았음.
- ③ 본 소독제의 유효희석배수인 1600배에서 밀과 무순 모두 100%의 발아율을 보임으로써 식물발아를 이용한 토양 환경오염 평가에서의 토양오염에는 영향을 주지 않을 것이라 사료됨.

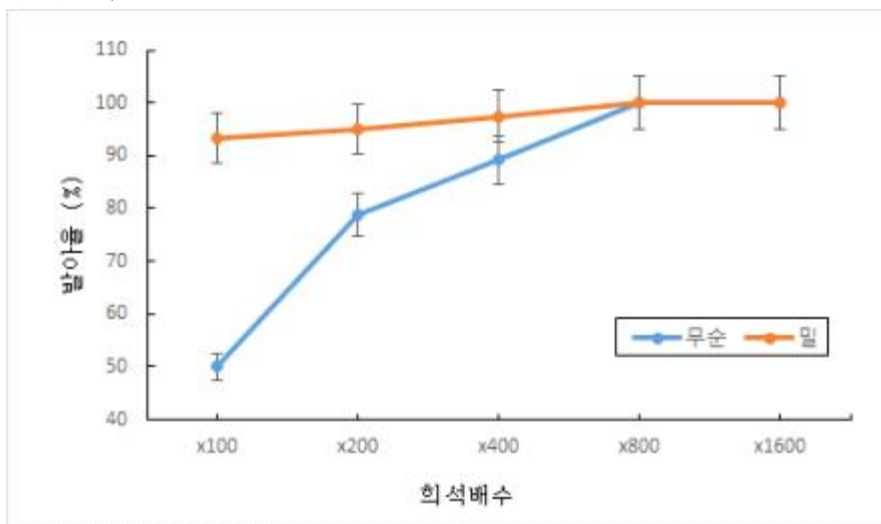


그림22. 소독제 농도에 따른 식물의 발아율

(2) 지렁이를 이용한 조류 인플루엔자 소독제의 토양 오염 환경 영향 평가.

(가) 본 천연물 소재인 탕자씨앗 추출물을 이용한 조류 인플루엔자 소독제에 의해 오염된 토양이 생태계에 미치는 독성효과에 대한 환경 영향 평가를 위하여 토양 무척추 동물인 지렁이를 사용하였음. 이 시험은 지렁이의 생존율을 평가하는 OECD 생태영향 시험지침 207, 'Earthworm Aute Toxicity Test' ⁽⁷⁾ 에 따라 수행함.

(나) 시험 대상 동물: OECD 및 ISO 화학물질 시험지침 추천종인 줄지렁이(*Eisenia fetida*) 를 사용함.

(다) 사육 조건: 온도 18~22 ℃, 암조건.

(라) 시험방법

- ① 시험에 사용되는 토양은 인공토양(OECD artificial soil)을 사용함.
- ② 노출토양은 인공토양 555.5g, 시험용액 50 ml alc 증류수 145.5 ml을 혼합하여 사용하고 인공토양에 희석된 소독제의 농도는 표54와 같이 처리함.
- ③ 각 처리구 당 10마리의 개체를 사용하여, 4회 반복함.
- ④ 14일간 동안 노출하며, 7일과 14일에 치사수를 관찰함.
- ⑤ 관찰 특이사항: 시험 종료 후 인공토양의 pH 및 수분함량과 지렁이의 폐사수를 관찰함.

(마) 시험결과

- ① 소독제의 모든 희석 농도에서 지렁이의 이상 행동이나 폐사수를 관찰 할 수 없었음.
- ② 지렁이를 이용한 토양 환경오염 평가에서의 토양오염에는 본 소독제가 전혀 영향을 주지 않을 것이라 사료됨.

2절. 연구결과의 성과

1. 기술적 성과

가. 천연물 유래 안전한 조류 인플루엔자의 예방 및 대응기술 개발 확보

나. 순수 국내 연구개발에 의한 조류 인플루엔자 대응 기술 확보로 기술적 위상 확보

다. 축산, 양계 분야에 대규모로 피해를 입히는 조류 인플루엔자에 소독제 효력을 보이는 예방물질 개발 기술 확보로 백신의 한계 극복 및 치료제로서의 개발 가능.

라. 특정 조류 인플루엔자에 내성과 중독성이 없는 안전한 친환경 소독제 개발 기술 확보

마. 다른 질병 분야의 소독제 개발 및 동물의약품 개발 기술로의 파급효과

2. 경제·산업적 성과

- 가. 조류 인플루엔자의 확산을 사전 차단할 수 있는 기술 개발로 인한 농림, 축산, 육가공 식품업의 피해 최소화와 경제적 소득 증대
- 나. 현재 거의 대부분을 외국에서 수산 의약품의 원료 및 제품에 대한 수입대체 효과
- 다. 내성과 독성이 없는 안전성과 바이러스 type에 관계없이 약효를 보이는 소독제 효능을 바탕으로 수출 기대 효과
- 라. 국내 약용식물을 원료로 사용하기 때문에 재배, 생산, 공급이 국내에서 가능하므로 국내 산업에 경제적 이익 창출 효과
- 마. 천연물 친환경 제제에 의한 안전한 농축산물에 대한 안전성에 기여

3. 정책적 성과

- 가. 정부의 조류 인플루엔자 확산 방지를 위한 질병 관리에서의 적극적 대응 가능
- 나. 천연물을 이용한 친환경 기술 개발로 국민들에 안전한 농, 축산물 제공 정책 수립
- 다. 세계적으로 전무한 친환경 소독제 개발 기술 확보로 주도적인 농림, 축산 분야 친환경 기술개발 및 질병관리 정책추진
- 라. 정부 지원에 의한 첨단 기술 확보의 정책적 사례

4장. 목표달성도 및 관련분야 기여도

1절. 목표달성도

세부연구목표			비중 (%)	달성도 (%)	
제 1 세부	1 차 년 도	천연물 신소재 조류 인플루엔자 소독제의 원료 및 원재료 표준화를 위한 지표물질 선정	8	100	
		소독 대상에 따른 고병원성 및 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 소독제 효력 평가	10	100	
		천연물 신소재 조류 인플루엔자 소독제의 가금 티푸스의 원인균인 살모넬라 (<i>Salmonella typhimurium</i>)에 대한 살균 효력 평가.	5	100	
		천연물 신소재 조류 인플루엔자 소독제 조성별 효능 최적화	10	100	
	2 차 년 도	기존 소독제와의 항바이러스 효력 비교 평가 및 수질 오염에 대한 환경 영향 평가	천연물 신소재 조류 인플루엔자 소독제의 기존 소독제와의 효력비교 평가	8	100
		천연물 신소재 조류 인플루엔자 소독제의 수질 오염에 대한 환경 영향 평가	10	100	
제 1 협 동	1 차 년 도	천연물 신소재(탕자 추출물 기반) 조류 인플루엔자 소독제의 원료 대량 생산을 위한 정제 조건 확립.	8	100	
		천연물 신소재 조류 인플루엔자 소독제의 제품 설계	7	100	
		천연물 신소재 조류 인플루엔자 천연 소독제 시제품 개발	10	100	
	2 차 년 도	천연물 신소재(탕자 추출물 기반) 소독제 시제품의 경제성 분석	천연물 신소재(탕자 추출물 기반) 조류 인플루엔자 소독제 시제품의 경제성 분석	7	100
		천연물 신소재(탕자 추출물 기반) 조류 인플루엔자 소독제 시제품의 현장 시험을 통한 사용 매뉴얼 개발과 토양 오염에 대한 환경 영향 평가	천연물 신소재(탕자 추출물 기반) 조류 인플루엔자 소독제 시제품의 현장 시험을 통한 사용 매뉴얼 개발	7	100
		천연물 신소재(탕자 추출물 기반) 조류 인플루엔자 소독제의 토양 오염에 대한 환경 영향 평가	10	100	
합계			100	100	

2절. 관련분야 기여도

1. 천연물 유래 안전한 신종인플루엔자 및 MERS와 같은 바이러스성 호흡기 질병 예방 및 대응기술 확보를 위한 제품개발 기술임.
2. 순수 국내 연구개발에 의한 바이러스성 호흡기 질병 대응 기술 확보를 통한 세계적인 제품개발에 대한 기술적 위상 확보.
3. 국민보건에 막대한 피해를 입히는 바이러스성 질병 및 병원성 미생물에 의한 질병의 항바이러스 및 항균 활성을 가진 예방물질 개발 기술 확보로 백신의 한계 극복 및 치료제로서의 개발 가능.
4. 특정 병원성 미생물과 바이러스에 대한 내성과 중독성이 없는 안전한 친환경 소독제 개발 기술 확보
5. 다른 질병 분야의 의약품 및 동물약품 개발 기술로의 파급효과
6. 국내 소독제의 개발을 통한 현재 거의 대부분을 외국에서 수입되고 있는 원료 및 제품의 수입대체 효과 및 내성과 독성이 없는 안전성을 바탕으로 수출 기대 효과 기대.
7. 국내 약용식물을 원료로 사용하기 때문에 재배, 생산, 공급이 국내에서 가능하므로 국내 산업에 경제적 이익 창출 효과.
8. 천연물 친환경 제제에 의한 안전한 소독제 개발을 통한 사회적 요구에 부합되는 친환경 제품개발 기술로서 관련산업의 녹색성장에 대한 기술적 파급효과.
9. 정부의 바이러스 및 병원성 미생물에 의한 전염성 질병 확산 방지를 위한 질병 관리에서의 적극적 대응 가능
10. 천연물을 이용한 친환경 기술 개발로 국민들에 안전한 농, 축산물 제공 정책 수립
11. 세계적으로 전무한 친환경 소독제 개발 기술 확보로 주도적인 국민보건 분야 친환경 기술개발 및 질병관리 정책추진.
12. 정부 지원에 의한 첨단 기술 확보의 정책적 사례

5장. 연구결과의 활용계획

D-07

1절. 활용계획과 사업화 전략

1. 활용 계획

가. 제품 개발과 상품화로 국내 축산, 양계 분야의 조류 인플루엔자 예방 및 대응 제품으로 사업화

(1) 조류 인플루엔자 대응 약제나 백신의 개발은 많은 시간과 비용이 필요하며, 개발이 되더라도 일반적으로 바이러스 한 개의 타입에만 작용하기 때문에 가장 효과적인 방역은 인플루엔자 타입에 관계없이 여러 종류에 대해 살균 소독력을 발휘할 수 있는 소독제로 활용이 가능하도록 제품화 함

(2) 천연물 물질의 특징을 활용하여 One - source multi-use의 전략으로 바이러스 감염이 발생하는 생명체에 폭넓게 적용할 수 있도록 신소재 물질의 기준 및 시험법, 기준 표준 물질 구조화 함.

(3) 조류 인플루엔자 감염 예방으로 질병 확산의 사전 차단으로 축산, 양계 산업의 경제적 가치 창출에 기여

○ 천연물 유래 신소재를 이용한 다양한 형태(분말, 액상, 스프레이)의 소독용 제품화로 질병 예방과 확산 방지에 기여. 특히 기존의 화학제품들이 가지는 독성, 환경적 영향, 체내 축적, 호흡기 자극 등의 문제점을 극복할 수 있으며, 이를 통해 예방적 목적의 활용에 적극적으로 사용가능하게 하여 질병 발생 최소화에 의한 경제성 향상

(4) 중국, 일본, 유럽, 동남아 등의 바이러스 피해가 많은 국가들로 수출 추진

○ 중국을 비롯한 중아시아 및 유럽, 동남아시아 등의 지역에서 인플루엔자에 의한 감염이 동물뿐만 아니라 인체에 대해서 계속되어 있어 질병의 예방과 차단방역을 위해 적극적 수출을 추진함. 수출의 추진은 아래의 에이전트들을 통해 진행함.

(5) 바이러스 센터화를 통해 지속적인 바이러스 모니터링 및 기술 개선, 신기술 개발 주도

2. 사업화 전략

. 원가 우위 전략

(1) 대상기업이 산업 내에서 최저원가 생산자가 되려는 사업 전략으로서, 경쟁기업에 비해

동일한 제품을 더 낮은 가격에 공급할 수 있으면 산업이 성숙기가 되어 가격 경쟁이 시작되어도 잘 견딜 수 있음

(2) 성장률은 i) 고객이 발생시키는 이익, ii) 새 고객 확보에 드는 비용, iii) 기존 고객의 재구매율에 의존하므로, 이를 고려하여 원가 전략을 마련

(3) 제품 공정 개선과 소량의 원료로 흡수율을 높이는 공정 개발을 통해 실현 가능

(4) 원료의 배합에서 주원료와 보조원료의 혼합으로 효능 상승효과를 극대화할 수 있는 방법 개발

나. 제품 차별화 전략

(1) 타사와 동일한 제품을 제조시 경쟁에서 이기기 어렵고, 가격 경쟁이 일어나 원가 절감으로 이어지므로 수익이 악화될 수 있음

(2) 따라서 기업이 소비자들에 의해 널리 평가된 독특한 제품을 제공하는 사업 전략으로서, 제품 차별화의 대가, 즉 고객에게 타사에는 없는 가치를 제고하거나 타사와 압도적인 차이를 고객에게 전달하는 대가로 기업은 고객에게 프리미엄 가격을 요구할 수 있음 (비싸도 팔리는 전략)

(3) 차별화 요소로는 브랜드 이미지, 기술, 서비스, 디자인, 판매망, 제품 성능, 내구성, 리드 타임, 안정성, 신용 등을 들 수 있음

(4) 차별화의 궁극적인 목표는 세상에 단 하나뿐인 존재가 되는 것이고, 고객에게 눈에 띄고, 알기 쉽고 매력적인 것을 제공하는 것

(5) 기존 제품들이 가지는 체내 축적, 항생 또는 독성 물질의 내성문제 등의 보건 의학적인 한계를 극복하여 동식물뿐만 아니라 인체에도 안전하게 사용할 수 있는 제품으로 개발하여 다양한 소독 분야에 적용

다. 집중화 전략 (focus strategy)

(1) 기업이 틈새시장에서 원가 우위나 제품 차별화를 추구하는 사업전략으로서, 특정 시장에만 집중하는 전략이며, 원가 집중화와 차별적 집중화로 나뉨

(2) 1위 기업의 기본전략은 저가시장까지 포괄하는 풀라인업(full line-up) 체제를 구축하는 것이므로, 나머지 기업들은 차별화된 특징을 만들거나 강한 분야를 전문적으로 특화하는 것에 집중 필요

(3) 인수 분야의 바이러스 대응 제품으로 특화하여 시장 점유율 확보 및 지속적 매출 증대

6장. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

		D-08
<input type="radio"/> 해당사항없음		

7장. 연구개발결과의 보안등급

	D-09
<input type="radio"/> 해당사항없음	

8 . 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

○ 해당사항없음

					D-10			
구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

9 . 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

		D-11
가. 연구실 안전 점검 체계 및 실시		
(1) 실험실 안전 점검		
위험등급	점검주기	분류 기준
A등급	분기 1회	가연성가스, 인화성 시약, 유해화학물질, 다량의 폐액배출, 독극물, 생물 및 동물의 취급, 방사성 동위원소, 위험성이 높은 기계장비가 설치된 실험실
B등급	반기 1회	일반시약, 소규모 인화성 시약, 불연성가스, 소량의 폐수발생 실험실
C등급	연 1회	이화학실험을 수행하지 않는 전기, 설계, 컴퓨터 관련 실험실
※ 본 실험실은 A등급에 해당함.		
(2) 실험실 정밀안전진단 실시		
○ 실험실안전관리규정에 의거 실험실의 위험정도에 따라, A,B,C로 관리등급을 분류하여, 실험실환경안전점검을 실시하였으며, 안전점검실시 결과 실험실의 재해예방과 안전성 확보 등을 위하여 필요하다고 인정되는 경우에는 전무기관에 의뢰하여 정밀 안전진단을 실시하였음.		
나. 교육 훈련		
○ 관련근거 : 연구실 안전 환경 조성에 관한 법령 제 18조, 동법 시행령 제 17조 및 동법 시행규칙 제 9조 “실험실 안전관리 규정” 제 16조(안전교육), 제 17조(안전교육의 관리)		
(1) 교육대상 : 실험실을 출입하는 모든 이용자 (교수, 대학원생, 실험조교, 전문직원, 소속연구원, 실험참여 학부생 및 업체직원 등		
(2) 안전교육 시간 및 수료인정기간		
- 출입하는 실험실의 위험등급(A,B,C등급) 및 전공특성에 따라 안전교육을 받았으며, 6시간 이상 교육이수 하였음.		
- 수료인정기간은 수료증의 수료인정기간 까지(유효기간이 지나면 재교육 이수하였음.)		

(3) 안전교육 과정

- 전공특성에 따라 A,B,C 코스로 구분하여 교육 실시
- A코스 : 생물·방사선 취급
- B코스 : 화학·가스 취급
- C코스 : 전기·기계 취급

※ 본 실험실 종사자들은 A코스 교육과정에 해당함.

(4) 안전교육절차



다. 보험 현황

- (1) 보험회사명 : 교육시설재난공제회
- (2) 보험기간 : 2016.05.02. ~ 2017.05.02 (1년간)
- (3) 가입금액 : ₩53,528,000 (부가세 포함)
- (4) 가입대상자수 : 10,229명

라. 안전관리추진

- (1) 각 실험 단과대학별 안전관리실무위원회 구성 및 운영
- (2) 교내 전체 건물 소방시설 통합관리체계(FMS) 구성
- (3) 실험실 내부 점검실시 후 실험등급 지정표찰 부착
- (4) 건물별 복도 및 비상계단 통로 확보와 불법 사무실 철거
- (5) 사이버 안전 교육 훈련

10장. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가			D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	1225- 8873	Therapeutic Potential of an AChERV-HPV L1 DNA Vaccine	건국대학 교	교신저 자	Journal of Microbiolo gy	1.621	2015.05.30	중복사사	SCI(E)
2	1225- 8873	Identification of Porcine Endogenous Retrovirus (PERV) packaging sequence and development of PERV packaging viral vector systems	건국대학 교	교신저 자	Journal of Microbiolo gy	1.621	2015.05.03	중복사사	SCI(E)
3	1932- 6203	Immunogenicity of Virus Like Particle Forming Baculoviral DNA Vaccine against Pandemic Influenza H1N1	건국대학 교	교신저 자	Plos one	3.057	2016.05.05	중복사사	SCI(E)
4	2090- 0023	Comparison of Repellency Effect of Mosquito Repellents for DEET, Citronella, and Fennel Oil	건국대학 교	교신저 자	Journal of Parasitolo gy research	2.81	2015.10.07	중복사사	비SCI
5	10163 70130 000	탱자추출물을 유효성분으로 포함하는 항 인플루엔자 바이러스 조성물	건국대학 교		국내		2016.06.30		

11장. 기타사항

	D-13
<input type="radio"/> 해당사항없음	

12장. 참고문헌

D-14

- (1) 소독제 효력시험지침 (농림축산검역본부 고시 제 2016-29호)
- (2) OECD TG '203. Acute Toxicity Test'
- (3) 화학물질 유해성 시험 연구기관의 지정 등에 관한 규정 (국립환경과학원 고시 제 2009-57호)
- (4) OECD TG '202. *Daphnia* sp., Acute Immobilization Test'
- (5) 동물용의약품등 안전성 시험지침 (농림축산검역본부 고시 제2013-43호)
- (6) OECD TG '208, Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test'
- (7) OECD TG '207, Earthworm Acute Toxicity Test'

Therapeutic potential of an AcHERV-HPV L1 DNA vaccine

Hee-Jung Lee¹, Jong Kwang Yoon¹,
Yoonki Heo¹, Hansam Cho¹, Yeondong Cho¹,
Yongdae Gwon¹, Kang Chang Kim¹,
Jiwon Choi¹, Jae Sung Lee², Yu-Kyoung Oh³,
and Young Bong Kim^{1*}

¹Department of Bio-industrial Technologies, Konkuk University,
Seoul 143-701, Republic of Korea

²Kolon Life Science, Gyeonggi-do 427-709, Republic of Korea

³College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742,
Republic of Korea

(Received Mar 23, 2015 / Revised Apr 30, 2015 / Accepted May 3, 2015)

Acknowledgements

This research was supported by a grant of the Korea Health Technology R&D Project through the Korea Health Industry Development Institute (KHIDI), funded by the Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (HI09C1316), iPET (Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries) from Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (314003-02-1-SB010 and 112157-03-2-SB020), and the Korea National Institute of Health (2013E5101000).

Identification of Porcine Endogenous Retrovirus (PERV) packaging sequence and development of PERV packaging viral vector system

Jiwon Choi¹, Hoon-mi Kim¹,
Jong Kwang Yoon¹, Yeondong Cho¹,
Hee-Jung Lee¹, Kang Chang Kim¹,
Chang-Kyu Kim², Gye-Woong Kim³,
and Young Bong Kim^{1*}

¹Department of Bioindustrial Technologies, Konkuk University,
Seoul 143-701, Republic of Korea

²Division of Animal Resources and Life Science, Sangji University,
Wonju 220-702, Republic of Korea

³Department of Animal Resources Community, Kongju National
University, Gongju 314-701, Republic of Korea

(Received Mar 11, 2015 / Revised Apr 9, 2015 / Accepted Apr 13, 2015)

Acknowledgements

This research was supported by a grant of the KIPET (Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries) from Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (314003-02-1-SB010 and 112157-03-2-SB020).

RESEARCH ARTICLE

Immunogenicity of Virus Like Particle Forming Baculoviral DNA Vaccine against Pandemic Influenza H1N1

Yong-Dae Gwon¹, Sehyun Kim¹, Yeondong Cho¹, Yoonki Heo¹, Hansam Cho¹, Kihoon Park¹, Hee-Jung Lee¹, Jiwon Choi¹, Haryoung Poo², Young Bong Kim^{1*}

¹ Department of Bio-Industrial Technologies, Konkuk University, Neungdong-ro, Gwangjin-gu, Seoul, Republic of Korea, ² Viral Disease Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon, Republic of Korea

Funding: This research was supported by iPET (Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries) from Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (314003-02-2-SB010), by a grant of the Korea Health technology R&D Project through the Korea Health Industry Development Institute (KHIDI), funded by the Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea. (Grant Number: HI15C1685). The funders had no role in study design, data collection and

Hindawi Publishing Corporation
Journal of Parasitology Research
Volume 2015, Article ID 361021, 6 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2015/361021>

Research Article

Comparison of Repellency Effect of Mosquito Repellents for DEET, Citronella, and Fennel Oil

Jong Kwang Yoon,¹ Kang-Chang Kim,¹ Yeondong Cho,¹ Yong-Dae Gwon,¹ Han Sam Cho,¹ Yoonki Heo,¹ Kihoon Park,¹ Yang-Won Lee,² Mijeong Kim,³ Yu-Kyoung Oh,⁴ and Young Bong Kim¹

¹*Department of Bio-Industrial Technologies, Konkuk University, Seoul 143-701, Republic of Korea*

²*Department of Dermatology, Konkuk University Hospital, Seoul 143-729, Republic of Korea*

³*Cosmetics Research Team, Department of Pharmaceutical and Medical Device Research, Ministry of Food and Drug Safety, Chungcheongbuk-do 363-700, Republic of Korea*

⁴*Department of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Republic of Korea*

Correspondence should be addressed to Young Bong Kim; kimera@konkuk.ac.kr

Received 23 April 2015; Revised 7 September 2015; Accepted 7 September 2015

Acknowledgments

This research was supported by a grant of the Ministry of Food and Drug Safety (MFDS; 11172KFDA426), Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET; 3140003-02-1-SB010), and the Ministry of Trade, Industry & Energy (MI; 10050649).

[별첨 2]

- 특허등록증 사본 -



발명의 명칭 Title of the Invention

덴자 추출물을 유효성분으로 포함하는 항 인플루엔자 바이러스 조성물

특허권지 Patentee

등록사항란에 기재

발명자 Inventor

등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.

This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.



2016년 06월 30일

특허청장
COMMISSIONER,
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

최 동 규

[별첨 3]

실험실 안전관리 교육 참여 명단 및 이수증

성명	소속	역할	2016 상반기 실험실 안전교육 이수번호
김XX	건국대학교	책임연구원	2016-정기-0045XX
이XX	건국대학교	공동연구원	2016-정기-0044XX
조XX	건국대학교	연구원	2016-정기-0041XX
허XX	건국대학교	연구원	2016-정기-0044XX
조XX	건국대학교	연구원	2016-정기-0044XX
최XX	건국대학교	연구원	2016-정기-0044XX
김XX	건국대학교	연구원	2016-정기-0045XX
허XX	건국대학교	연구원	2016-정기-0044XX
주XX	건국대학교	연구원	2016-정기-0045XX
윤XX	(주) 구을리	연구원	2016-정기-0045XX

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술개발사업의 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 가축 질병대응기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.