[별지 19]

최 종 보 고 서

주 의 (편집순서 8)	20110211 친환경·저독성·내동형 소독제의 개발 농림수산식품부	**발 간 등 록 번 호** 11-1543000-000275-01 친환경·저독성·내동형 소독제의 개발 (Development of non-toxic and non-freezing disinfectant) 건국대학교 산학협력단 농 림 축 산 식 품 부(17포인트 명조계열)

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “친환경·저독성·내동형 소독제의 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2013 년 9 월 22 일

주관연구기관명 : 건국대학교 산학협력단
주관연구책임자 : 최 농 훈
연 구 원 : 이 수 진
연 구 원 : 장 양 호
연 구 원 : 김 효 비

요 약 문

Ⅰ. 제 목 : 친환경·저독성·내동형 소독제의 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

○ 2010년 겨울 구제역 발생이 짧은 시간 안에 전국적으로 확산된 것은 초동 방역시기를 놓친 것뿐만 아니라 이례적으로 동절기에 발생하여 소독제를 이용한 질병의 기본적인 방역이 제대로 이루어지지 않았기 때문으로 추정된다.

○ 대부분의 소독제는 15-20℃에서 최적의 소독력을 발휘하며, 온도가 낮을수록 소독력이 떨어진다. 유난히 혹독했던 올해의 겨울날씨 때문에 대부분 지역의 기온이 영하로 떨어졌으며, 소독제가 얼지 않았더라도 제대로 된 소독력을 발휘하지 못했을 것이다. 특히, 기온이 영하 10℃ 이하로 떨어진 경기북부, 강원지역의 경우 발포형 소독제 및 기타 액상의 소독액(발판소독조 등)이 얼어붙어 소독효과가 거의 없었을 것으로 생각된다.

○ 낮은 온도에 효력이 유지되는 소독제의 개발은 주로 조류인플루엔자를 대상으로 국외에서 연구가 진행되고 있으나 국내에서의 연구는 전무하다.

○ 국내의 실정이 적용하기 위해서는 낮은 온도(영하)에서 화학적 · 물리적 성상이 변하지 않는 근본적인 내동형 소독제의 개발이 필요하다. 그러므로 기존의 소독제의 화학적· 물리적 성상을 안정화시킬 수 있는 물질, 즉 내동형 물질의 개발 또는 발굴을 통해 근본적인 내동형 소독제를 개발 필요성이 절실히 요구된다.

○ 소독제를 이용한 방역은 가축질병을 제어하는 가장 기본적이면서도 효과적인 방법이다. 그러므로 내동형 소독제의 개발은 향후 소독제가 다량, 장기적으로 사용될 가능성이 높으므로 여러 적용범위에 있어 효능이 뛰어나면서도 친환경·저독성의 소독제 개발이 절실하다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 친환경·저독성·내동형 소독제 개발

(1) 전문가 자문단 구성

(2) 내동형 물질 발굴

- 문헌조사를 통해 내동형 물질 후보군을 조사하고 친환경·저독성·내동형에 부합되는 내동형 물질은 선정하였다.

(3) 소독제 선정

- 소독제 유효성분에 따라 구연산제제, 구연산 및 사급암모늄 복합제제, 삼종염, 삼종염 및 NaDCC 복합제제, NaDCC 단독제제, 글루타르알데히드제제로 총 6종 선정하였다.

- 실험을 통해 실제 내동형 소독제 개발에서 가장 적합한 소독제를 선택하여 사용하였다.

(4) 내동형 소독제 개발

- 내동제와 소독제를 내동제 비율별로 섞고 화학적 반응을 확인하였다.
- 내동성 확인은 내동제와 소독제 혼합액의 어는점을 측정하여 확인하였다.

2. 환경적인 요인(낮은 온도, 유기물 여부)에 따른 내동형 소독제의 효력 평가

(1) 온도변화에 따른 효력평가

① 온도변화에 따른 효력평가는 25, 15, 4, 0, -10℃에서 진행하였다.

② 소독제와 균액의 반응 시간은 5,10,15,30분으로 정하였다

③ 유기물에 의한 효력저하를 배제하기 위해 유기물이 없는 조건에서 실험을 진행하였다.

④ 온도조건을 설정하기 위해 0℃ 경우, 소독제 희석액이 들어있는 시험관을 아이스에 30분 보관 후 실험을 진행하였고 -10℃ 실험을 위해 아이스에 30분 보관한 시험관을 -10℃로 맞춰진 냉동고에 15분간 보관한 다음 실험을 실시하였다.

⑤ 기본적인 실험방법은 농림축산검역본부 제2013-34호를 기본으로 하였다.

(2) 유기물 유무에 따른 효력평가

① 유기물 조건과 온도조건을 결합하여 효력평가를 실시하였다.

② 기본적인 실험 방법은 농림축산검역본부 제2013-34호에 따라 진행하였으며, 유기물은 살모넬라의 경우 bovine serum albumin을, 조류인플루엔자의 경우 fetal bovine serum을 사용하였다. 소독제와 균액의 반응 시간은 외부조건 반영을 위해 살모넬라의 경우 1,5분으로 설정하였고, 조류인플루엔자 바이러스의 경우 5분으로 설정하였다. 자세한 실험법은 '온도 변화에 따른 효력평가'와 같다.

(3) 소독대상(porus, non-porus surface)에 따른 효력평가

① 소독대상에 따른 효력평가는 야외실험을 위한 준비과정으로 stainless steel과 wood로 carrier를 제작하여 실험을 진행하였다.

② 농림축산검역본부에는 carrier 실험에 대한 규정이 없으므로 carrier를 이용한 실험은 ASTM(2002), "Standard quantitative disk carrier test method for determining the bactericidal, virucidal, fungicidal, mycobactericidal and sporidical activities of liquid chemical germicides"를 기본으로 하여 실시하였다.

(4) 소독방법(분무, 침지) 에 따른 효력평가

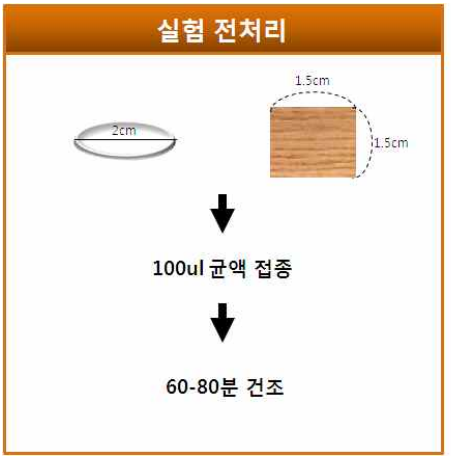
- 1차년도 연구결과를 바탕으로 내동제와 혼합하였을 때 낮은 온도에서 효력이 유의하게 증가한 citric acid와 4급암모늄 제제를 대상으로 2차년 분무실험을 통해 내동형 소독제의 formula를 설정하고자 하였다.

- CA+QACs 제제가 액체형태이기 때문에 겨울철 사용 시 현장에서 선호되고 내동제와의 혼합이 산제에 비해 자유롭다는 장점이 있다.

- 살모넬라를 대상으로 온도에 따른 소독제 효력 변화 시험 결과 25℃에서 0.2%CA + 0.1% QACs에서 1분 이내 충분한 소독 효력이 발휘되는 것을 확인하였으며, -10℃에서는 0.4% CA + 0.2% QACs에서 1분 이내 충분한 효력이 발휘되는 것을 확인하였다. 따라서 분무 실험에는 위 두 가지 농도를 이용하기로 하였다.

- 조류인플루엔자 바이러스를 대상으로 온도에 따른 소독제 효력 변화 시험결과 25,-10℃ 모두에서 0.2% CA + 0.1% QACs에서 1분이내 충분한 효력이 발휘되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 분무 실험에서는 살모넬라와 마찬가지로 2가지 농도 조건에서 실험을 실시하였다.

- 분무로 적용되는 실험은 온도조절이 되는 냉동컨테이너에서 진행하였으며 간략한 방법은 아래와 같다.



3. 구제역 바이러스에 대한 효능 검증

-pirbright institute에 의뢰하여 구제역바이러스에 대한 효력을 확인중에 있다.

4. 산업화

(1) 내동형 소독제 제품허가

(2) 국내특허 출원

Ⅳ. 연구개발결과

1. 친환경·저독성·내동형 소독제 개발

(1) 전문가 자문단 구성

- 동물약품분야, 행정, 경제성, 화학, 세균, 바이러스 분야 총 6명의 전문가 자문단을 구성하였다.

(2) 내동형 물질 발굴

- 기존에 사용되고 있던 내동형 물질 중 안전성이 가장 높다고 알려진 propylene glycol과 제조과정이 친환경적이며 상대적인 독성이 propylene glycol보다 낮은 1,3-propanediol을 선정하여 비교실험을 진행하였다.

(3) 소독제 선정

- 소독제 유효성분에 따라 구연산제제, 구연산 및 사급암모늄 복합제제, 삼종염, 삼종염 및 NaDCC 복합제제, NaDCC 단독제제, 글루타르알데히드제제로 총 6종 선정하였다.

(4) 내동형 소독제 개발

- 내동제와 소독제의 화학적 반응을 확인하고 내동성 확인을 통해 가장 적합한 내동제와 소독제 간의 성분비율 및 소독제 효력변화를 확인하였다.

- 내동제와 6종의 소독제 혼합 시 침전물 발생 등의 화학적 변화는 관찰되지 않았으며, suspension test방법을 이용한 효력시험 결과 내동제가 소독제 효력에 큰 영향을 주지 않는 것

으로 확인되었다.

- 그러나 실제 소독제는 분무를 통해 적용되므로 2차년도(2013년) 냉동컨테이너에서 분무를 통해 소독제를 적용하여 내동형 소독제를 개발하고자 하였다.

- 분무를 통해 적용할 소독제는 친환경·저독성·내동성을 고려하여 구연산과 복합사급암모늄제제를 선택하였고 친환경적인 소재인 1.3-propanediol을 내동제로 선택하여 실험을 실시하였다.

2. **환경적인 요인(낮은 온도, 유기물 여부)에 따른 내동형 소독제의 효력 평가**

(1) 온도변화(25, 15, 4, 0, -10℃)에 따른 효력평가

- 모든 소독제가 온도가 낮아짐에따라 효력이 감소하고 영하의 온도에서 효력저하가 극심한 것을 확인하였다.

- 산화제 계열 (NaDCC, MPS, MPS+NaDCC) 소독제가 온도변화에 대해 다른 소독제에 비해 온도에 따른 소독제 효력 감소가 적은 것을 확인할 수 있었으며 내동제를 섞은 소독제와 소독제 단독 사용 소독제를 비교했을 때 효력차이는 없었다. 다만 조류인플루엔자 바이러스를 대상으로 한 소독제 효력시험에서 CA+QACs제제의 경우 0. -10℃에서 두가지 내동제를 섞은 소독제에서 소독제 단독 사용 시보다 효력이 유의하게 증가되는 양상을 보였다.

- 낮은 온도에서 내동제 혼합이 소독제가 어는 것을 막아주기는 하지만 본 연구 기획 시 기대되었던 소독제 효력 상승 작용은 하지 않으므로 낮은 온도에서 소독제를 적용할 때 각각의 소독제 희석배수를 제시해 주는 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

(2) 유기물 유무에 따른 효력평가

- 살모넬라의 경우 5% yeast extract, 조류인플루엔자 바이러스의 경우 5% 소태아혈청을 이용하였다.

- 조류인플루엔자 바이러스에 대한 유기물 조건 실험에서는 citric acid와 4급암모늄 복합제제에서 -10℃ 조건에서 내동제를 혼합한 경우 효력이 증가됨을 확인하였고 유기물 없이 진행된 온도조건에 따른 효력평가의 결과와 마찬가지로 소독제의 농도 조절을 통해 이상적인 내동형 소독제 개발이 가능할 것으로 생각되었다.

(3) 소독대상(porus, non-porus surface)에 따른 효력평가

- suspension test와 carrier test는 균액의 양과 적용하는 소독제의 양이 다르기 때문에 절대적으로 비교는 할 수 없으나 살모넬라와 조류인플루엔자 모두 carrier test 시 소독제 효력이 떨어지는 양상을 보였다.

- 소독제 개발에 있어 suspension test로 결과를 도출 시 실제 적용했을 때 소독제 효력발휘에 있어 차이가 있을 것으로 판단되었다.

(4) 소독방법(분무, 침지) 에 따른 효력평가

- 분무로 소독제를 적용 시 소독제와 균액을 섞는 suspension test에 비해 적은 양의 소독제가 carrier에 분무로 적용되기 때문에 소독제 효력이 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 내동제 혼합 시 내동제가 유기물로 작용하여 소독제 단독 적용한 시험군에 비해 효력감소가 뚜렷함을 확인할 수 있었다. 따라서 현장에서 소독제 사용 시 동결을 막고자 내동제를 혼합한 소독제가 소독제를 얼지 않게 도와주기는 하지만 소독제 효력에는 부정적인 영향을 줄 수 있음을 확인하였다.

3. 구제역 바이러스에 대한 효능 검증

-구연산과 사급암모늄 복합제제를 기본으로 한 소독제를 pirbright institute에 의뢰하였다.

4. 산업화

(1) 내동형 소독제 제품허가

- 제품의 품목허가의 경우 소독약품 제조업체에 한해 농림축산검역본부에 제품허가를 신청할 수 있다.

(2) 국내특허 출원

- 분무제 이외 발판소독제로 사용할 수 있는 내동형 소독제를 국내 특허 출원할 예정이다.

Ⅴ. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 논문 (SCI/E에 2편 게재확정 및 예정)

(1) Evaluation of changes induced by temperature, contact time, and surface in the efficacies of disinfectants against avian influenza virus. Poultry science,2013.(In press)

(2) Efficacy Evaluation of anti-freezing disinfectants applied by spray. Letters in applied microbiology. (submission)

2. 초록발표 :

(1) Efficacy Evaluation of anti-freezing disinfectants applied by spray at -10°C, 대한수의학회. 2013년 10월

(2) Evaluation of disinfectant efficacy under low temperature, 한국예방수의학회.2012년 5월

(3) Evaluation of changes induced by temperature and storage after dilution in the efficacies of disinfectants against the avian influenza virus, 한국보건종합학술대회.2013년 4월

3. 인력양성(박사 1명)

The evaluation of disinfectants efficacy changes by temperature and contact time against *Salmonella typhimurium* and avian influenza virus. 2013년 2월

4. 활용계획

(1) 향후 겨울철 국가방역에 기초자료로 활용

(2) 발판소독조용 내동형 소독제 특허 출원 예정

(3) 소독제 관련 연구인력양성을 통해 이 분야의 연구 활성화 도모

SUMMARY
(영문요약문)

Disinfection with chemical agents is considered as the most effective and easiest method to reduce the pathogens in diverse fields such as farm, slaughter house and research institute. The efficacy of disinfectants is affected by disinfectant type, mode of application, temperature, contact time, natural microbial population, organic materials, and surfaces.

The infectious disease such as avian influenza virus and food and mouth disease outbreaks occurred during late falls to early spring in Korea . Monthly average temperature of winter was -3.4℃. Morevover the temperature of the disinfectant solution is rapidly lowered at the moment of spraying in a field in winter. That may be one of the reasons for fail the quarantine. When the infectious disease outbreaks occurred in winter, anti-freezer was mixed with disinfectants for just not freezing the disinfectants without any verification about their activity in Korea. Further ethylene glycol also used as anti-freezer which may cause adverse reproductive effects and birth defects (teratogenic) based on animal test data. No human data has been reported at this time however it may affect genetic material (mutagenic). The purpose of this study was to develop the effective disinfectant for cold season which is not toxic and environmental friendly product with mixture of an antifreezer. Propylene glycol and 1,3 - propanediol were selected among various antifreezer candidates. Six disinfectants were combined with these two anti-freezers and then conducted efficacy tests against *Salmonella typhimurium* and avian influenza virus under several environmental conditions - temperature (25,15,4,0,-10℃), organic materials, surfaces(wood and stainless steel) and disinfectant application methods (spray and dipping). The suspension test was based on QIA guidelines.

The results from suspension tests indicated that antifreezers could keep the liquid non-freeze however the efficacy of disinfectants were not affected by antifreezer except citric acid and quaternary ammonium compounds complex(CA+QACs). CA+QAC with antifreezers inactivated the avian influenza virus in significant difference comparing with disinfectant only (p<0.01). Although it did not show adequate virucidal efficacy, this limitation was able to overcome by concentration re-establishment. After the concentration re-establish study, 0.4% CA+0.2% QACs was applied with spray at -10℃. When disinfectants and antifreezer mixture was applied with spray, it did not show adequate

efficacy comparing with disinfectant only.

Therefore antifreezer and disinfectant mixture was not suitable for disinfectants which applied by spray however, it will be developed for foot bath tub. The data from this research are going to be used for set up an winter disinfection policy in Korea.

CONTENTS
(영 문 목 차)

Chapter 1. Abstract.....10

Chapter 2. The present condition in domestic and foreign countries.....11

Chapter 3. Materials, Methods and Results.....12

Chapter 4. Accomplishment and Contribution to related subjects.....46

Chapter 5 Achievement and Plan to contribution.....47

Chapter 6. References.....48

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요.....10

제 2 장 국내외 기술개발 현황.....11

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과.....12

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....46

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획.....47

제 6 장 참고문헌.....48

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 목적 및 필요성

○ 지난해 11월29일 경북 안동에서 발생한 구제역은 두 달만에 전국 11개 시·도 75 개 시·군으로 번져 2011년 3월말을 기준으로 346만6천173마리의 소·돼지 등을 살처분한 것으로 집계되었다. 이는 구제역이 처음 발생한 2000년부터 지난해 상반기까지 10여 년간 매몰한 625곳의 약 8배 수준이다. 돼지는 전체 사육두수(988만마리)의 33.4%인 330만4582마리, 소는 335만마리의 4.5%인 15만870마리가 매몰됐다. 이에 따라 살처분 보상금과 예방백신 접종, 방역비 등 구제역 관련 비용이 3조 원대를 넘어선 것으로 추정된다. 또한 연관 산업 등의 생산감소액도 수조원대가 될 것으로 전망된다. 구제역은 환경오염, 식품가격 급등과 같은 2차 피해도 유발했다. 전국 4700여곳에 이르는 매몰지 주변은 침출수 유출에 따른 식수오염, 악취에 대한 공포가 커지고 있다(가축전염병발생월보 참고).

○ 구제역 발생이 짧은 시간 안에 전국적으로 확산된 것은 초동 방역시기를 놓친 것뿐만 아니라 이례적으로 동절기에 발생하여 소독제를 이용한 질병의 기본적인 방역이 제대로 이루어지지 않았기 때문으로 추정된다. 대부분의 소독제는 15-20℃에서 최적의 소독력을 발휘하며, 온도가 낮을수록 소독력이 떨어진다(McDonnell, G.E. 2007). 유난히 혹독했던 올해의 겨울 날씨 때문에 대부분 지역의 기온이 영하로 떨어졌으며, 소독제가 얼지 않았더라도 제대로 된 소독력을 발휘하지 못했을 것이다. 특히, 기온이 영하 10℃ 이하로 떨어진 경기북부, 강원지역의 경우 발포형 소독제 및 기타 액상의 소독액(발판소독조 등)이 얼어붙어 소독효과가 거의 없었을 것으로 생각된다.

○ 내동형 물질을 이용한 소독제의 효력 연구는 국내·외 각각 한건으로 국외의 경우 1999년 Avian Disease에 게재되었으며, 이 연구에서 내동형 물질로 사용한 화학물은 methyl alcohol, ethylene glycol, propylene glycol이었다. methyl alcohol의 경우 휘발성과 소독제와의 반응성(침전물 생성)으로 인해 적용할 수 없었으며, ethylene glycol은 인체독성 및 환경독성이 심각하여 소독제와 병행하여 살포용으로 사용할 수 없다. propylene glycol은 spray 또는 mist로 접촉했을때 eye irritation이 있으나 환경독성이 적어 'generally recognized as safe'(GRAS) 로 미국 식약청에서 인정되어 많이 분야에 사용되고 있다. 그러나 낮은 온도에서 점도(-15℃에서 점도1000 : 끈적한 정도)가 높아지기 때문에 소독제에 적용하기는 부적합하다.

○ 내동형 소독제에 대한 국내 연구는 국립수의과학검역원에서 뉴캐슬바이러스를 대상으로 진행되었으며, 이 또한 기존의 부동액을 첨가하여 실험을 실시하였고 빙점 조사 후 실제 효력 테스트는 sodium chloride, ethylene glycol를 첨가하여 20℃에서 실험을 진행하였다. 두 가지 내동물질 모두 국외의 연구와 마찬가지로 실제 소독제에 적용하기에는 한계가 있다.

○ 국내의 실정이 적용하기 위해서는 낮은 온도(영하)에서 화학적 · 물리적 성상이 변하지 않는 근본적인 내동형 소독제의 개발이 필요하다. 그러므로 기존의 소독제의 화학적· 물리적 성상을 안정화시킬 수 있는 물질, 즉 내동형 물질의 개발 또는 발굴을 통해 근본적인 내동형 소독제를 개발 필요성이 절실히 요구된다.

○ 소독제를 이용한 방역은 가축질병을 제어하는 가장 기본적이면서도 효과적인 방법이다. 그러므로 내동형 소독제의 개발은 향후 소독제가 다량, 장기적으로 사용될 가능성이 높으므로 여러 적용범위에 있어 효능이 뛰어나면서도 친환경·저독성의 소독제 개발이 절실하다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

○ 낮은 온도에 효력이 유지되는 소독제의 개발은 주로 조류인플루엔자를 대상으로 국외에서 연구가 진행되고 있으나 국내에서의 연구는 전무하다.

○ 외국의 연구사례들을 살펴보면, 주로 기존의 소독력을 나타내는 화합물을 섞어 4℃에서 소독력의 변화가 있는지를 확인하고 있다. 그러나 이런 소독제는 영하의 온도에서는 기존의 다른 소독제와 마찬가지로 소독력이 떨어질 것으로 예상된다.

○ 그 외에 본 연구와 마찬가지로 내동제를 활용한 내동형 소독제 개발의 경우 국·내외 각 1건이 보고되어 있다. 국외 연구의 경우 H7N2 조류인플루엔자 바이러스를 대상으로 하였으며, 총 5가지 소독제와 내동제 -에틸렌글라이콜, 프로필렌글라이콜, 메틸알콜과 소독제를 혼합하여 정성적인 효력평가를 실시하였다(Davison *et al.*, 1999 , Avian Diseases). 연구 결과 sodium hypochloride, combination제제 등과 내동제를 혼합 시 침전물이 형성되거나 소독제 효력이 감소하는 것을 확인하였다.

○ 국내에서 진행된 내동제를 혼합한 소독제 효력평가 연구는 2003년 수의과학검역원 (현재 농림축산검역본부)에서 수행된 “ND virus에 대한 동절기 소독효과 비교연구”였다. 내동제로는 NaCl, $CaCl_2$ Methyl alcohol, Ethyl alcohol, propylene glycol을 이용하였고 소독제는 계면활성제, 산성제, 산화제, 염기제, 알데히드제를 사용하였다. 연구 결과 NaCl은 벤잘코늄클로라이드, potassium monosulfate, potassium peroxymonosulfate(삼종염), citric acid, coaltar acid 2종에 대해 침전물을 형성하였고 따라서 효력시험은 이 외의 소독제에 대해서만 진행하였다. 나머지 내동제는 침전물 형성은 하지 않았지만 휘발성 증기압이 높아 내동제로 활용하기에는 부적합하다는 결론을 얻었다. 프로펠렌글라이콜이 가장 적합한 내동제로 추천되었으며, citric acid와 혼합 시 소독제 단독 사용 시와 비교하여 소독 효력이 증가하는 현상을 확인할 수 있었다.

○ 내동제를 활용한 연구뿐 아니라 낮은 온도, 특히 영하의 온도에서 소독제 효력을 확인하는 국내외연구가 미진한 이유는 동절기 질병발생이 많지 않기 때문에 연구의 필요성이 대두되지 않았을 것으로 추측된다. 그러나 국내의 경우 이례적으로 발생한 겨울철 구제역과 조류인플루엔자의 경우 겨울철 발생을 특징으로 하기 때문에 영하의 온도에서 사용할 수 있는 소독제 개발 및 연구가 필요하다고 생각된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1. 친환경·저독성·내동형 소독제의 개발

가. 전문가 자문단 구성

(1) 전문가 자문단 구성

① 동물약품 분야 : 한국동물약품협회 부회장 곽형근 원장 위촉, 국내 소독제 시장에 대한 전반적인 정보 및 내동형 소독제의 산업화에 대한 자문을 구하였다. 독성화학 전공인 이광직 연구관 위촉하여 독성 분야에 대한 자문을 구하였다.

② 동물방역 및 행정 분야 : 농림수산검역검사본부 이명헌 연구관 위촉, 실제 국내 방역행정 및 방역 시 소독제의 한계점에 대한 자문 및 내동형 소독제 개발 후 소독제의 허가 절차에 대한 자문을 구하였다.

③ 화학 및 경제성(산업화) 분석 분야 : 참여기업인 태원시스켐 장성화 대표 위촉, 소독제의 대량 생산에 대한 자문 및 화학전공자이므로 소독제의 화학적 성상에 대한 자문을 구하였다.

④ 세균 분야 : 농림수산검역검사본부 윤선종 연구관 위촉, 소독제 효력시험 시 세균을 이용한 실험에 대한 자문을 구하였다.

⑤ 바이러스 분야 : 건국대학교 수의과대학 이중복 교수 위촉, 소독제 효력시험 시 바이러스를 이용한 실험에 대한 자문을 구하였다.

(2) 전문가 자문회의 진행

① 1차 회의 (2011년 9월 29일)

- 전문가 자문단 구성
- 연구과제 진행 일정 등 추후 일정 논의

② 2차 회의 (2012년 7월 9일)

- 내동형 소독제 개발 및 진행사항 확인
- 야외실험을 위한 의견 수렴
- 구제역 바이러스의 대체 바이러스에 대한 정보 및 구제역 바이러스를 이용한 실험을 위한 검역검사본부와의 협조체계 구축에 대한 논의

Fig 1. 전문가 자문단 구성

③ 3차 회의 (2013년 2월 6일)

- 내동형 소독제 개발 및 진행사항 확인
- 내동형 소독제 개발에 활용될 소독제 1종 선정
- 저독성, 친환경성에 대한 설명 필요

나. 내동형 물질의 발굴

(1) 내동제 후보군

: 내동물질 후보군 : NaCl, $CaCl_2$, methyl alcohol, ethyl alcohol, ethylene glycol, propylene glycol, 1,3-propanediol

① NaCl, $CaCl_2$

- 2003년 수의과학검역원에서 진행된 'ND virus에 대한 동절기 소독효과 비교연구' 에 의하면 계면활성제, 산성제, 산화제와 혼합 시 침전물이 형성되는 것으로 확인되었으므로 본 연구에서는 내동물질로 부적합하다고 판단하였다(Fig 2).

● 침전 ◆ 동결

	소독제	내동 물질			
		NaCl	$CaCl_2$	메탄올	에탄올
계면활성제	Ammonium chloride	◆			
	Benzalkonium chloride	●			
산화제	Potassium monopersulfate	●	●◆		
	Potassium peroxymonosulfate	●	●	●	
	Sodium dichlorocyanurate	◆	◆		◆
	Sodium hypochloride		◆		
산성제	Citric acid	●	●		
	Coaltar acid	●	●	●	
염기제	Sodium hydroxide	◆	●		

Fig 2. 2003년 수의과학검역원에서 진행된 'ND virus에 대한 동절기 소독효과 비교연구

② ethyl alcohol, methyl alcohol

- 두 물질 모두 휘발성 증기압이 59.3 , 127mmHg(물의 증기압 : 23.8)으로 휘발성이 강하므로 내동물질로 부적합하다고 판단하였다.

③ etylene glycol

- MSDS에 의하면 etylene glycol은 mammalian somatic cell에 돌연변이를 유발할 수 있다는 독성평가가 있으며 propylene glycol, 1,3-propanediol에 비해 급성독성 및 생물농축성이 있으므로 친환경에 부합하지 않다고 판단하여 제외하였다.

④ propylene glycol

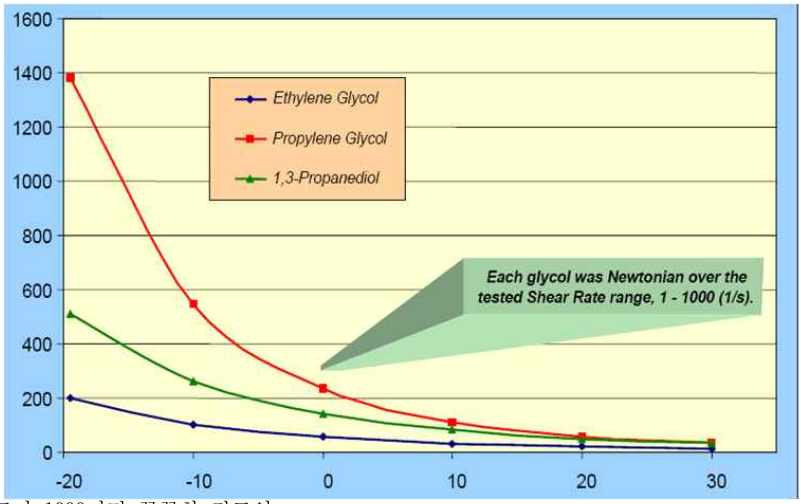
- 어는점이 -60℃이며, 휘발성이 없는 물질로 ethylene glycol과 함께 내동물질로 함께 사용되고 있는 물질로 비교적 안전하여 화장품, 식품에 사용되고 있다. 급성독성 및 생물농축성도 미비하여 본 실험에 사용하기 적합하다고 판단하였다 (Table 1,2,3).

- spray 또는 mist로 접촉했을 때 eye irritation이 있으나 환경독성이 적어 'generally recognized as safe'(GRAS)로 미국 식약청에서 인정되어 많은 분야에 사용되고 있다. 다만 낮은 온도에서 점도가 높아지기 때문에 내동제로 사용할 경우 첨가되는 농도에 따라 소독제의 효력이 변할 소지가 있으므로 효력변화 확인실험이 필요하다.

⑤ 1,3 propanediol

- 옥수수당의 미생물학적 발효로 생성되는 천연원료로 낮은 독성과 내동성을 특징으로 한다. 미국 듀폰과 테이트앤라일이 공동합작하여 개발한 제품으로 제품명 써스테라-피디오 또는 써스테라-프로판디올(susterra TM - Propanediol)로 불린다. 어는점은 -27℃이며 휘발성은 없다.

- propylene glycol과 마찬가지로 독성이 낮아 내동형 소독제 개발에 활용할 수 있을 것으로 판단하였다(Table 1,2,3). 또한 낮은 온도에서 점도의 변화가 없으므로 내동형 소독제 개발에 적합할 것을 생각된다.



* 점도가 1000이면 끈끈한 정도임.

Fig 3. 온도에 따른 점도변화

Table 1. 내동물질 후보군의 화학적 성상 비교

	Ethylene Glycol	Propylene Glycol	1,3 Propanediol
형태	액체	액체	액체
어는점 (℃)	-12.7	-60	-27
증기압 (mmHg@25℃)	0.06	<0.1	0.08
용해성	water, acetone	water, alcohol	water, alcohol

.

Table 2. 내동물질 후보군의 독성 평가 비교

독성평가		Ethylene Glycol	Propylene Glycol	1,3 Propanediol
피부자극		약간	거의 없음	거의 없음
눈 자극		약간	약간 or 없음	없음
돌연변이 유발		mammalian somatic cells	없음	없음
급성독성	경구 LD50	4,700	18,500	15,670
	피부 LD50	>2,000	20,800	>20,000

Table 3. 내동물질 후보군의 생태독성 평가 비교

		Ethylene Glycol	Propylene Glycol	1,3Propanediol
생태독성	어류 LC50 (mg/l)	22,800-72,860	>5,000	> 5,000
	조류 EC50 (mg/l)	6,500 – 13,000	> 1,000	1,600
log Kow		-1.93	-1.4	-0.71
생물농축성 (BCF)		200	< 1	3.162

다. 내동물질 선정

- 여러 후보 물질들의 화학적, 독성 평가 결과에 따라 본 연구과제에서는 propylene glycol과

1.3-propanediol을 선정하였고 두 가지 내동물질을 이용하여 비교실험을 진행하였다.

2. 소독제의 선정

- 농림수산검역검사본부에서 조류인플루엔자와 구제역 바이러스에 효과가 있다고 허가된 소독제 중 소독제의 작용기전에 따른 분류에 따라 총 6종의 소독제를 선정하였다(Table 4).

Table 4. 실험에 사용된 소독제

소독제 분류	유효성분	약어
산성제제	Citric acid	CA
	Citric acid + QACs	CA+QACs
산화제제	삼종염	MPS
	삼종염+ NaDCC	MPS+NaDCC
	NaDCC	Na
알데하이드제	Glutaraldehyde	GA

CA : citric acid
QACs : quaternary ammonium compounds
MPS : potassium peroxymonosulfate
NaDCC : sodium dichloroisocyanurate
GA : glutaraldehyde

3. 내동형 소독제 개발

가. 내동성 실험

① 내동물질의 농도를 설정하기 위해 경수에 내동제 비율을 5-10%로 하여 섞어 용매를 만든 후 각각의 소독제를 유기물 존재 시 고시된 희석배수로 희석한다(Table 5).

Table 5. 유기물 조건의 희석배수

소독제 분류	유효 성분	희석배수
산성제제	Citric acid	1:100
	Citric acid + QACs	1:50
산화제제	MPS	1:300
	MPS + NaDCC	1:16
	NaDCC	1:600
알데하이드제	Glutaraldehyde	1:100

② 온도 -20℃, 습도 60%로 맞춰진 냉동고에 각 소독제 100ml을 넣고 각 소독제에 온도계를 설치 후, 온도변화를 용액이 얼 때까지 5분마다 측정하였다.

③ 내동물질의 농도는 내동제를 넣지 않은 소독제와 비교하여 내동형 소독제가 5분에서 길게는 10분까지 액체 상태로 유지되는 농도로 확정하였다.

④ 6가지 소독제와 두 가지 내동제의 혼합 시 침전물 형성은 관찰되지 않았다.

소독제		어는점	시간	소독제		어는점	시간
CA	con	-1.0	20	MPS + NaDCC	con	-2.0	15
	P5	-2.9	30		P5	-2.9	30
	p10	-3.9	45		p10	-5.6	30
	S5	-3.4	30		S5	-3.8	30
	S10	-4.2	35		S10	-5.1	45
CA + QACs	con	-0.9	15	NaDCC	con	-0.5	15
	P5	-2.5	30		P5	-2.0	20
	p10	-4.0	35		p10	-4.1	40
	S5	-2.7	25		S5	-2.5	30
	S10	-3.8	35		S10	-4.4	40
MPS	con	-1.5	20	GA	con	-0.7	20
	P5	-2.2	30		P5	-2.9	30
	p10	-4.7	45		p10	-4.5	45
	S5	-3.0	35		S5	-2.6	25
	S10	-4.4	40		S10	-4.3	35

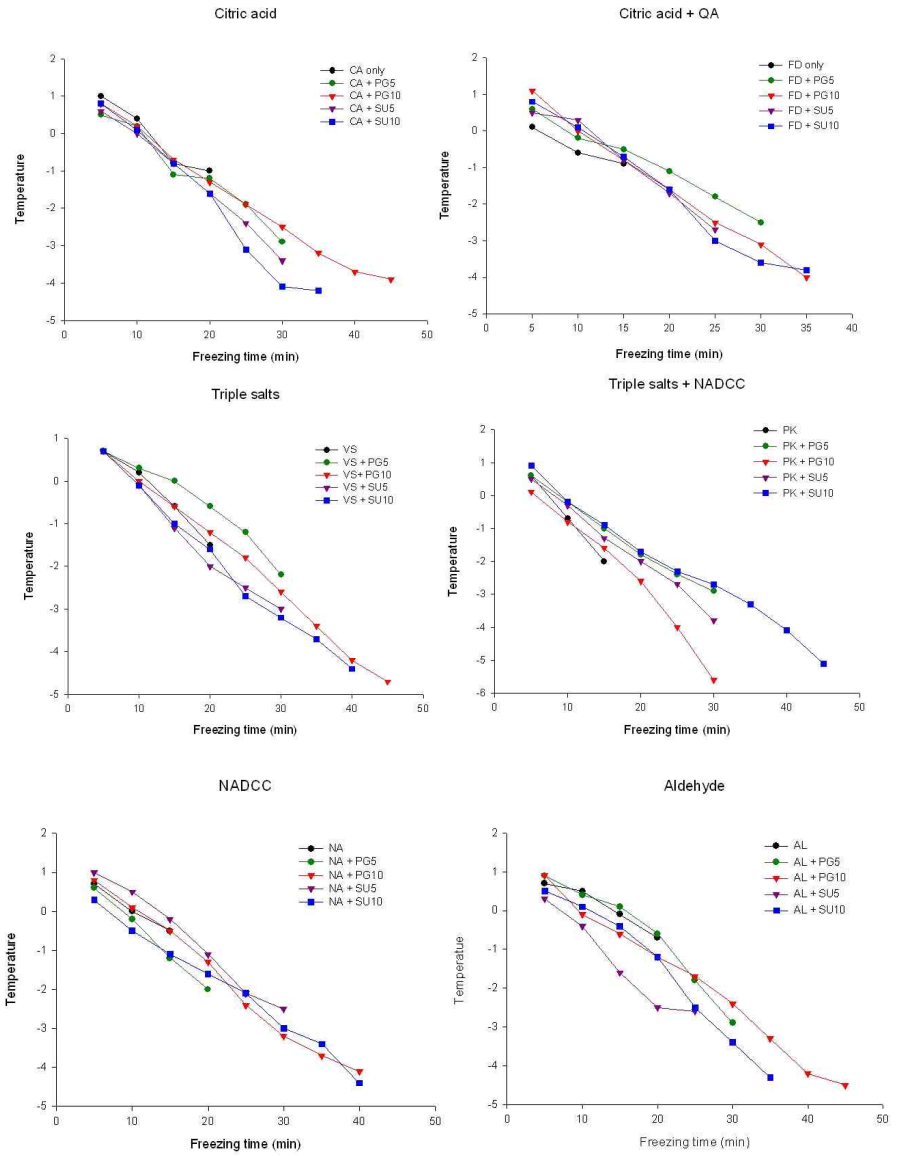


Fig 4. 각 소독제의 내동성 실험 결과

PG : propylene glycol, SU : 1,3-propanediol

2. 내동형 소독제의 효력평가

가. 온도변화에 따른 내동형 소독제 효력평가(Against *Salmonella typhimurium*)

① 온도변화에 따른 효력평가는 25, 15, 4, 0, -10℃에서 진행하였다.

② 소독제와 균액의 반응 시간은 5,10,15,30분으로 정하였다

③ 유기물에 의한 효력저하를 배제하기 위해 유기물이 없는 조건에서 실험을 진행하였다.

④ 온도조건을 설정하기 위해 0℃ 경우, 소독제 희석액이 들어있는 시험관을 아이스에 30분 보관 후 실험을 진행하였고 -10℃ 실험을 위해 아이스에 30분 보관한 시험관을 -10℃로 맞춰진 냉동고에 15분간 보관한 다음 실험을 실시하였다.

⑤ 기본적인 실험방법은 농림축산검역본부 제2013-34호을 기본으로 하였다. 조건별 희석액은 다음과 같다.

- 경수 : 증류수(DW) 1L에 $CaCl_2$ 0.305g과 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.139g(w/v)를 녹여 제조한 후, 고압멸균(121℃, 15분)하여 4℃에 보관하며 사용한다.
- 유기물 희석액 : 소독제의 희석을 위해 사용되는 유기물을 함유한 경수 효모추출물(yeast extract) 20%(w/v)가 함유되도록 경수에 용해한 다음 고압멸균(121℃, 15분)하여 4℃에 보관하면서, 사용 시에는 경수로 4배 희석하여 효모추출물 5% 함량의 유기물 희석액으로 만들되, 1N 수산화나트륨액(NaOH)으로 pH 7.0이 되도록 조정한다.
- 세균 중화용 용액 : D/E neutalizing broth (Difco , USA)

⑥ 살모넬라에 대한 소독효력 시험법

- **세균배양 :** *Salmonella typhimurium* ATCC 13311을 고압멸균 한 영양배지(nutrient broth)에 접종하고, 37℃에서 22~26시간 동안 배양한 후 사용직전까지 37℃를 유지시키며 본 시험에 사용한다. 또한 세균의 농도는 1×10^8 CFU/ml 이상인 것을 사용하였다.

- 소독제 희석 : 경수에 각각 지정비율로 소독제를 혼합한다. 혼합한 소독제는 온도조건을 맞추기 위해 0℃ 경우, 소독제 희석액이 들어있는 시험관을 아이스에 30분 보관 후 실험을 진행하였고 -10℃ 실험을 위해 아이스에 30분 보관한 시험관을 -10℃로 맞춰진 냉동고에 15분간 보관한 다음 실험을 실시하였다.

- 소독제 반응 : 37℃에서 배양한 세균 4 ml를 유기물, 경수 조건에 따라 경수, 세균용 유기물 희석액 96.0 ml와 각각 혼합한 후, 혼합액 2.5 ml를 취하여 각 온도별로 보관중인 동량의 해당 소독제 희석액이 들어있는 시험관에 넣고 혼합한 다음(총 5 ml) 각 반응시간에 맞게 반응시켰다.

- 중화반응 및 배양 : 각 반응시간이 끝나면 소독제의 효능을 중화시키기 위하여 즉시 1.0 ml를 꺼내어 37℃의 9.0 ml의 세균 중화용 용액에 넣고 혼합한 다음, 9ml의 멸균희석액을 이용하여 희석하여 3M petri film로 남은 균을 정량하였다.

- **결과의 해석 :** 99.999% (5 log reduction)을 효력있는 것으로 판정하였다.

나. 온도변화에 따른 내동형 소독제 효력평가(Against Avian influenza virus)

① 온도변화에 따른 효력평가는 25, 0, -10℃에서 진행하였다.

② 소독제와 균액의 반응 시간은 5분으로 정하였다

③ 유기물에 의한 효력저하를 배제하기 위해 유기물이 없는 조건에서 실험을 진행하였다.

④ 온도조건을 설정하기 위해 0℃ 경우, 소독제 희석액이 들어있는 시험관을 아이스에 30분 보관 후 실험을 진행하였고 -10℃ 실험을 위해 아이스에 30분 보관한 시험관을 -10℃로 맞춰진 냉동고에 15분간 보관한 다음 실험을 실시하였다.

⑤ 기본적인 실험방법은 농림축산검역본부 제2013-34호을 기본으로 하였다. 조건별 희석액은 다음과 같다.

- 경수 : 증류수(DW) 1L에 $CaCl_2$ 0.305g과 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.139g(w/v)를 녹여 제조한 후, 고압멸균(121℃, 15분)하여 4℃에 보관하며 사용한다.
- 유기물 희석액 : 소독제의 희석을 위해 사용되는 유기물을 함유한 경수 5%(v/v) 소태아혈청(fetal bovine serum; FBS)을 함유하도록 멸균된 경수에 용해하여 사용한다.
- 종란배양 중화용 용액 : 멸균된 경수 또는 증류수에 10% FBS 함유
- 세균 중화용 용액 : D/E neutalizing broth (Difco , USA)

⑥ 조류인플루엔자바이러스에 대한 소독효력

- **바이러스 배양 :** AIV MS96주를 10일령 계태아 발육란에 연속 2~3회 계대배양하여 활력이 있는 바이러스를 사용한다. 바이러스는 요막강(allantoic cavity) 접종하고 약 72시간 동안 배양한 후, 3시간 이상 4℃에 정치한 다음 요막강액(allantoic fluid)을 수확하여 원심분리(3,000 rpm, 4℃, 30분)를 통해 고형성분을 제거한 후, 바이러스를 함유한 요막강액을 EID_{50}/ml 표준역가산정법에 준해 바이러스 역가를 확인하여 -80℃에 보관해 둔다. 바이러스의 역가는 $10^7 EID_{50}$/ml 이상을 사용하였다.

- **소독제 희석 :** 경수에 각각 지정비율로 소독제를 혼합한다. 혼합한 소독제는 온도조건을 맞추기 위해 0℃ 경우, 소독제 희석액이 들어있는 시험관을 아이스에 30분 보관 후 실험을 진행하였고 -10℃ 실험을 위해 아이스에 30분 보관한 시험관을 -10℃로 맞춰진 냉동고에 15분간 보관한 다음 실험을 실시하였다.

- **소독제 반응 :** 바이러스액(요막강액) 1.0 ml를 처리구의 조건에 따라 경수, 바이러스용 유기물 희석액 19.0 ml와 각각 혼합한 후, 혼합물 2.5 ml를 취하여 각 온도별로 보관중인 동량의 해당 소독제 희석액이 들어있는 시험관에 넣고 혼합한 다음(총 5.0 ml) 5분 반응시켰다.

- **중화반응**

소독제의 반응이 끝나면 소독제의 효능을 중화시키기 위하여 즉시 반응액 1 ml을

취하여 37℃ 동량의 10% FBS 중화용 용액에 넣어 혼합하여 소독제를 중화시킨다.

- 바이러스 증식여부 판정

중화처리가 끝난 반응액은 PBS를 이용하여 10진 단계희석(원액, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} 및 10^{-5})하여 희석배수 당 5개의 10일령 계태아 발육란의 요막강(allantoic cavity) 내에 0.2 ml씩을 접종하고, 37℃의 부화기내에서 5일간 배양한다. 매일 검란을 실시하며, 접종 후 24시간 이내에 죽은 발육란은 접종사로 간주하고 시험성적에서 제외한다. 접종 24시간부터 5일 이내에 죽은 접종란은 모두 4℃에 보관한다. 5일 후, 모든 접종란을 회수하여 요막강액(allantoic fluid)을 채취하여 혈구응집반응(HA test)을 실시한다. 혈구응집반응은 채취 즉시 평판응집반응으로 확인하였다.

- 바이러스 함유량 계산

바이러스 함유량은 Kärber method에 준해 산정하며, 대조바이러스 감염량에 비하여 소독제 처리군의 바이러스 감염량이 $10^{4.0}$ EID_{50}/ml 이상 불활화가 인정되는 경우 소독효과가 있다고 판정하였다.

다. 살모넬라와 조류인플루엔자 대상 온도변화 따른 내동형 소독제 효력평가 결과 및 고찰

(Fig 5-11)

① 살모넬라와 조류인플루엔자를 대상으로 한 실험 모두 소독제의 농도가 낮을 때 내동제가 유기물과 비슷한 역할을 함으로써 소독제의 효력이 떨어지는 것을 확인할 수 있었다.

② 온도에 대한 소독제의 효력변화는 소독제의 종류(산성제, 산화제, 알데하이드제) 등에 따라 확연한 차이를 보이는 것을 확인할 수 있었다. 조류인플루엔자 바이러스에 대한 실험에서 citirc acid제제나 citric acid와 사급암모늄 복합제제의 경우 -10℃에서 1,3-propandediol과 혼합 시 효력이 상승하는 것을 확인할 수 있었다. 물론 5분간 충분한 reduction을 보이지는 못하였지만 소독제 농도 조절로 이러한 한계점을 극복할 수 있을 것으로 판단된다.

③ 살모넬라, 조류인플루엔자 대상 실험에서 모두 알데하이드제제는 낮은 온도에 가장 취약한 소독제로 겨울철 사용에 부적한 것으로 나타났다.

④ 낮은 온도에서 내동제 혼합이 소독제가 어는 것을 막아주기는 하지만 본 연구 기획 시 기대되었던 소독제 효력 상승 작용은 하지 않으므로 낮은 온도에서 소독제를 적용할 때 각각의 소독제 희석배수를 제시해 주는 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

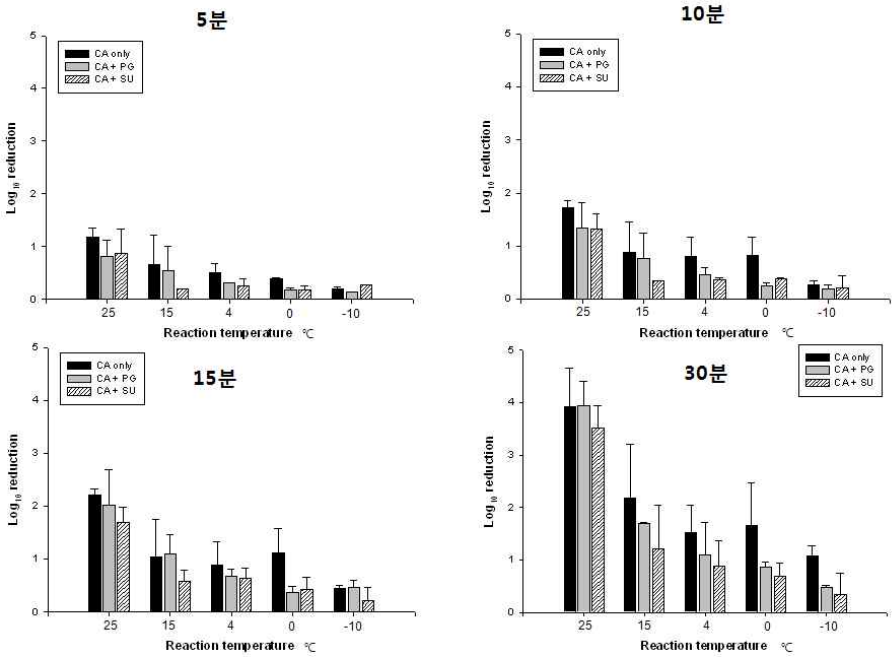


Fig 5. 살모넬라에 대한 온도변화에 따른 CA의 효력평가

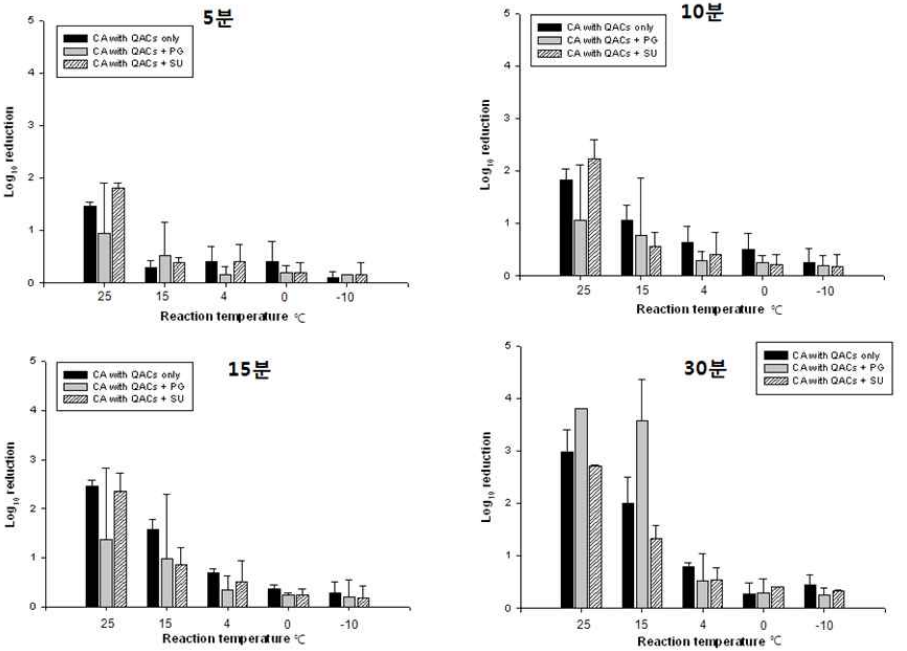


Fig 6. 살모넬라에 대한 온도변화에 따른 CA+ QACs의 효력평가

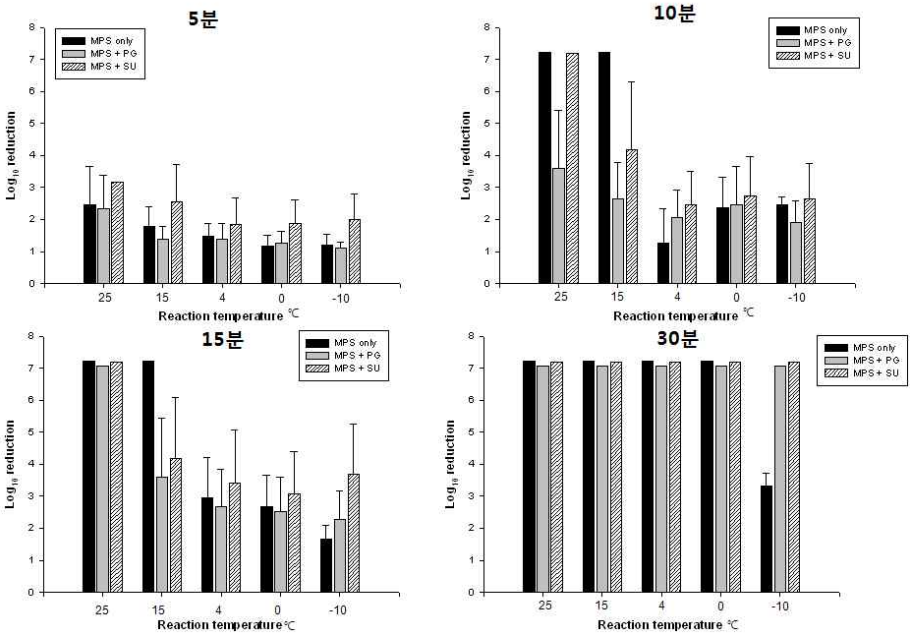


Fig 7. 살모넬라에 대한 온도변화에 따른 MPS의 효력평가

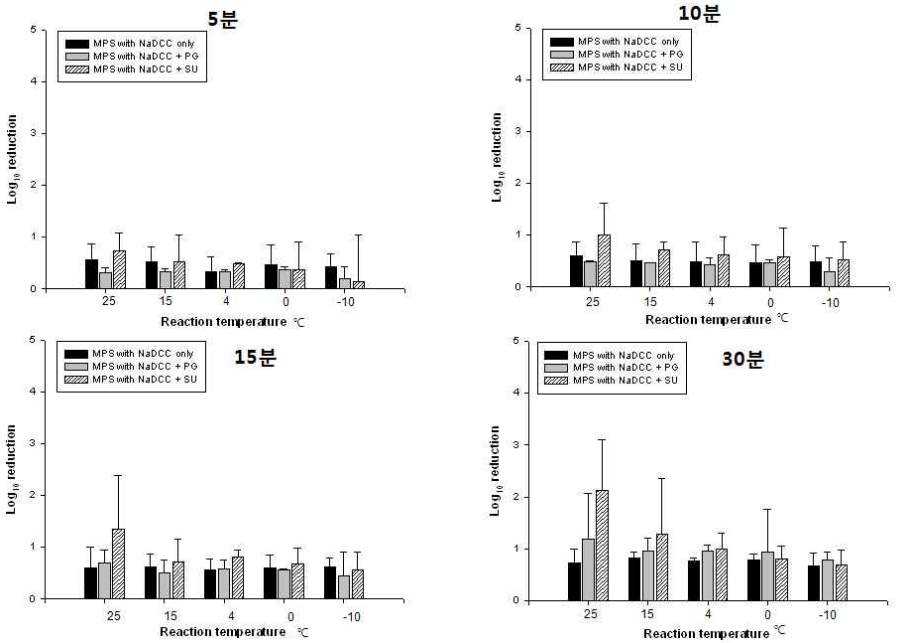


Fig 8. 살모넬라에 대한 온도변화에 따른 MPS+NaDCC의 효력평가

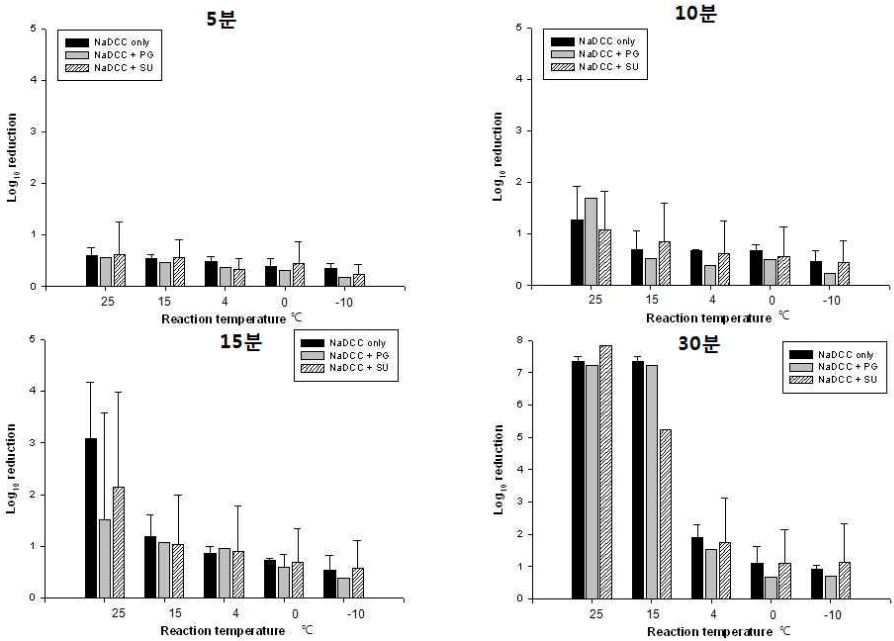


Fig 9. 살모넬라에 대한 온도변화에 따른 NaDCC의 효력평가

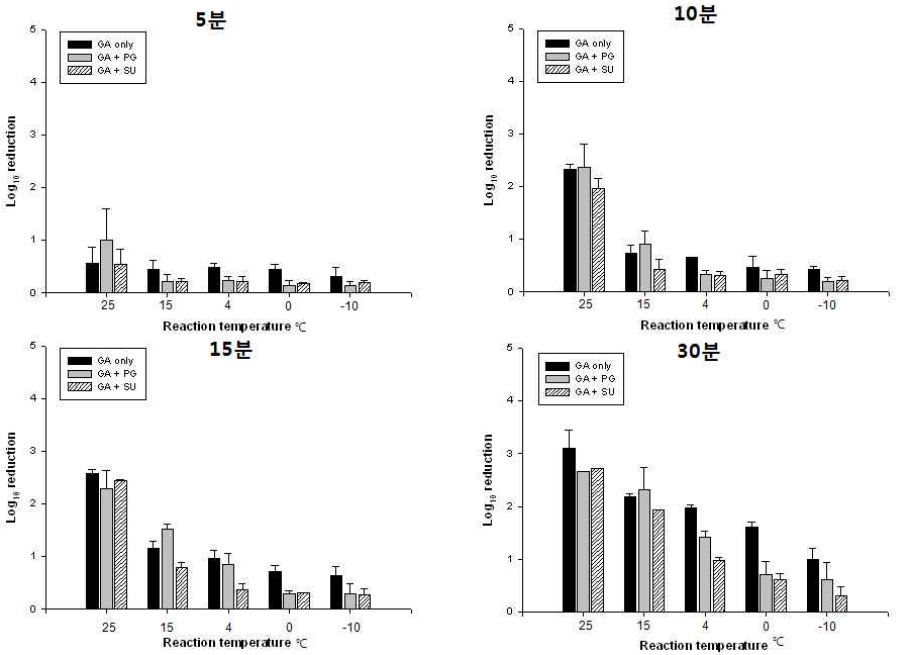


Fig 10. 살모넬라에 대한 온도변화에 따른 GA의 효력평가

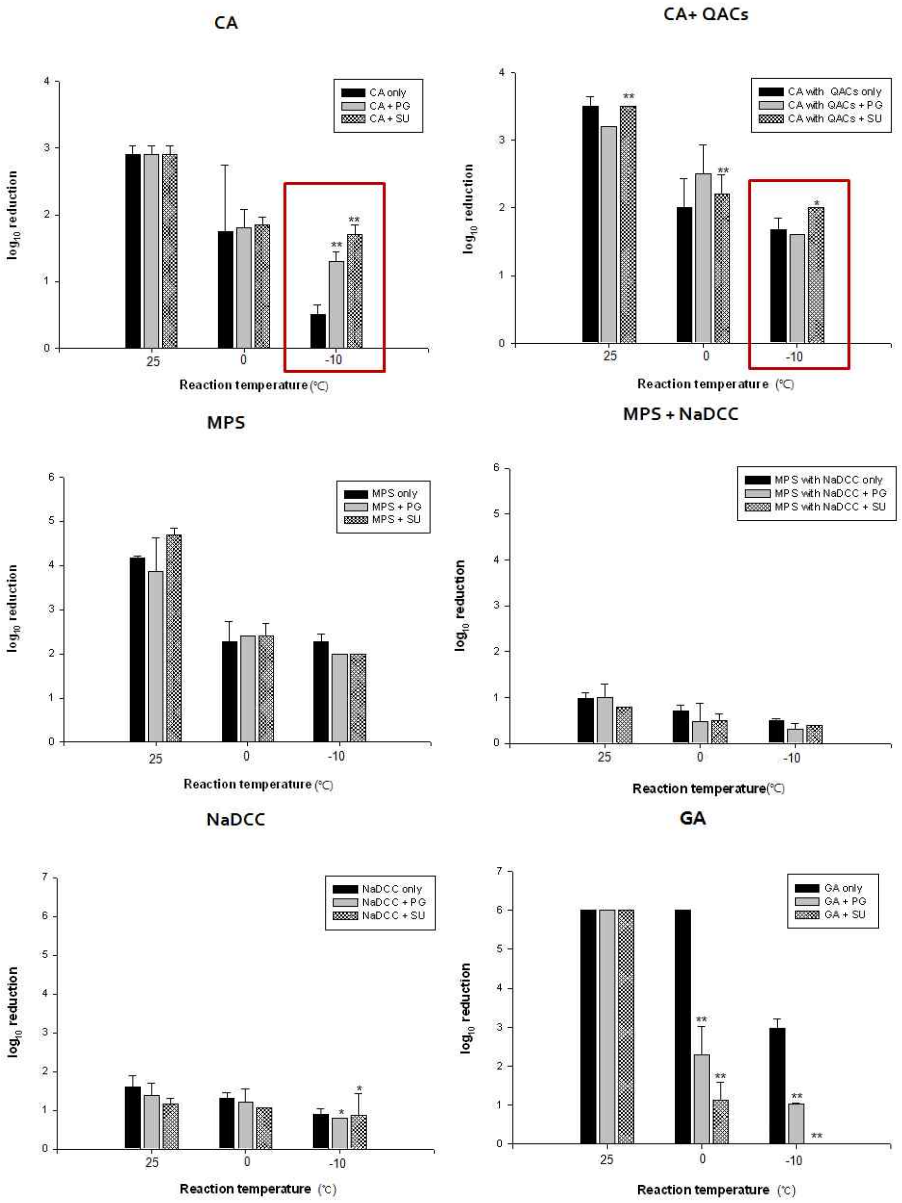


Fig 11. 조류인플루엔자 바이러스에 대한 온도변화에 따른 각 소독제의 효력평가

라. 유기물 존재 시 내동형 소독제 효력 변화 평가

① 유기물 조건과 온도조건을 결합하여 효력평가를 실시하였다.

② 기본적인 실험 방법은 농림축산검역본부 제2013-34호에 따라 진행하였으며, 유기물은 살모넬라의 경우 bovine serum albumin을, 조류인플루엔자의 경우 fetal bovine serum을 사용하였다. 소독제와 균액의 반응 시간은 외부조건 반영을 위해 살모넬라의 경우 1,5분으로 설정하였고, 조류인플루엔자 바이러스의 경우 5분으로 설정하였다. 자세한 실험법은 '가.온도 변화에 따른 내동형 소독제 효력평가'에 기술한 내용과 같다.

③ 결과 및 고찰

(Fig 12-18)

- 살모넬라에 대한 유기물 조건 실험에서는 삼종염 제제와 삼종염과 NaDCC 복합제제, NaDCC 단일제제에서 5분 이내 full reduction을 보이는 것을 확인하였다. 또한 내동제 혼합에 따른 효력 변화는 관찰되지 않았다.

- 삼종염 제제의 경우 반응시간 1분에서도 낮은 온도에서 충분한 효력을 발휘하였으며, 2가지 내동제와의 혼합 시에도 효력이 변화가 없었으므로 내동형 소독제 개발에 활용 할 수 있을 것으로 기대되었다.

- 조류인플루엔자 바이러스에 대한 유기물 조건 실험에서는 citric acid와 4급암모늄 복합제제에서 -10℃ 조건에서 내동제를 혼합한 경우 효력이 증가됨을 확인하였고 유기물 없이 진행된 온도조건에 따른 효력평가의 결과와 마찬가지로 소독제의 농도 조절을 통해 이상적인 내동형 소독제 개발이 가능할 것으로 생각되었다.

- 살모넬라와 조류인플루엔자 실험결과 모두 삼종염과 NaDCC 복합제제의 경우 각각의 제제는 낮은 온도에서 짧은 시간 내에 효력이 발휘되는 것을 확인하였으나 복합제제의 경우 단독제제에 비해 효력이 떨어지는 양상을 보이며, 내동제 1.3-propanediol과 혼합 시 효력이 더욱 감소되는 양상을 보였다. 삼종염과 NaDCC가 낮은 온도에 저항성이 있는 제제이니만큼 각 제제의 농도 조절을 통해 효과적인 내동형 소독제를 개발할 수 있을 것으로 판단하였다.

- 본 연구결과를 바탕으로 2차년도 야외실험을 통해 소독제 농도를 결정하는 연구가 반드시 필요함을 확인하였다.

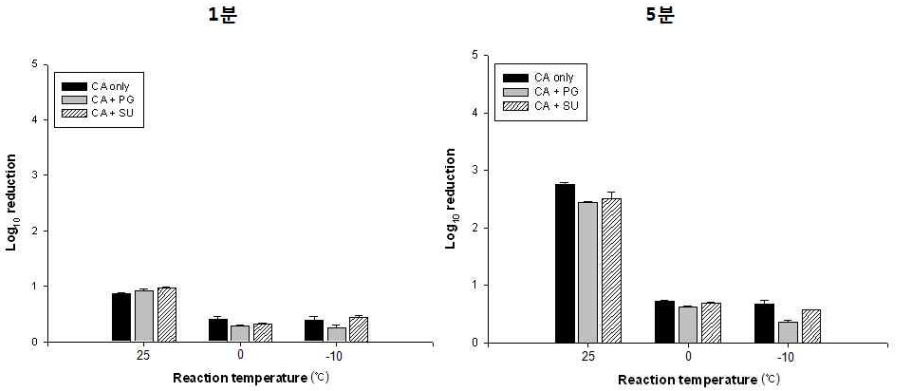


Fig 12. 유기물 조건에서 살모넬라에 대한 CA의 효력변화

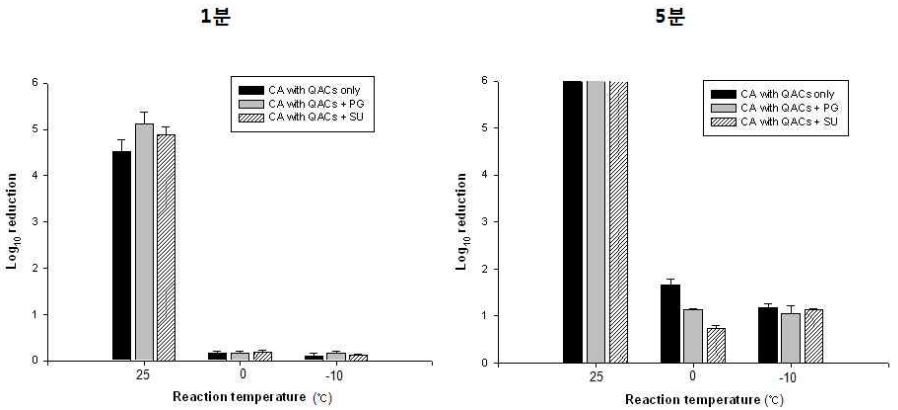


Fig 13. 유기물 조건에서 살모넬라에 대한 CA+QACs의 효력변화

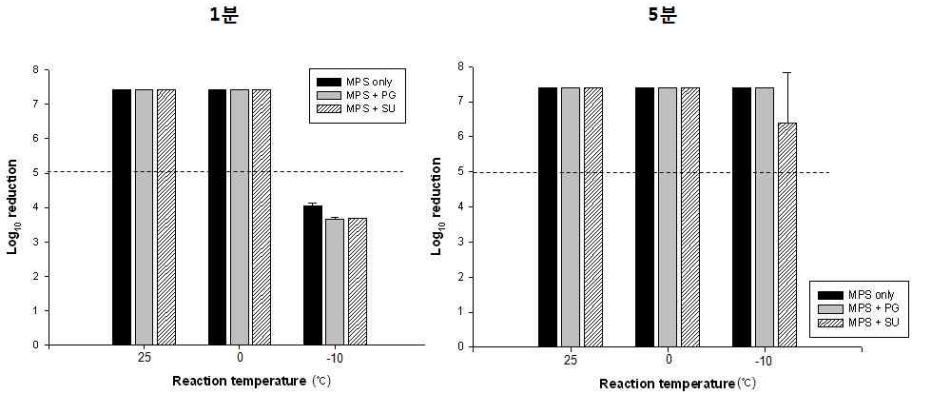


Fig 14. 유기물 조건에서 살모넬라에 대한 MPS의 효력변화

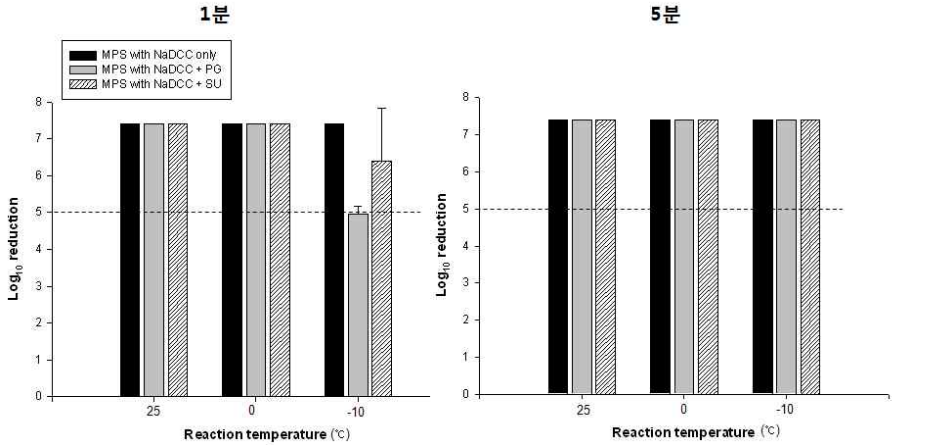


Fig 15. 유기물 조건에서 살모넬라에 대한 MPS+NaDCC의 효력변화

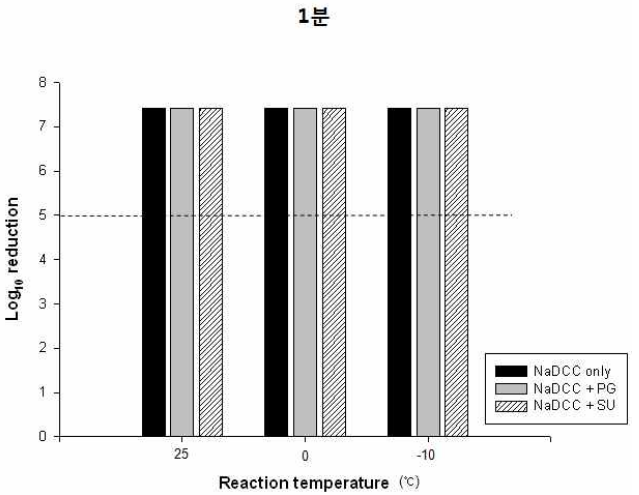


Fig 16. **유기물** 조건에서 **살모넬라**에 대한 **NaDCC**의 효력변화

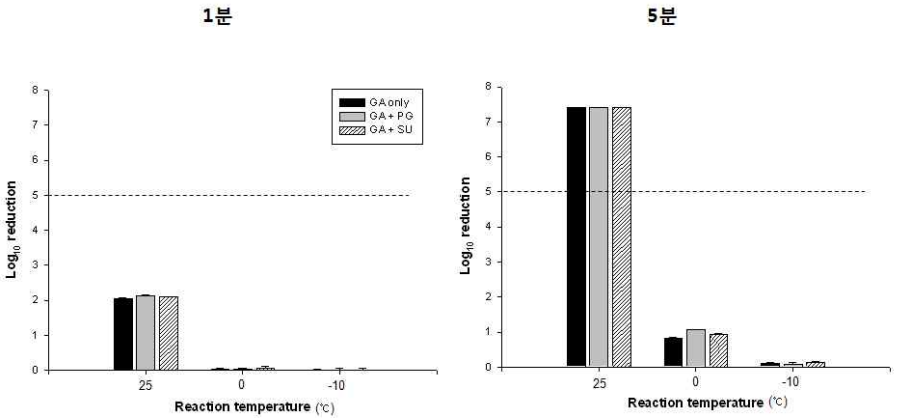


Fig 17. **유기물** 조건에서 **살모넬라**에 대한 **GA**의 효력변화

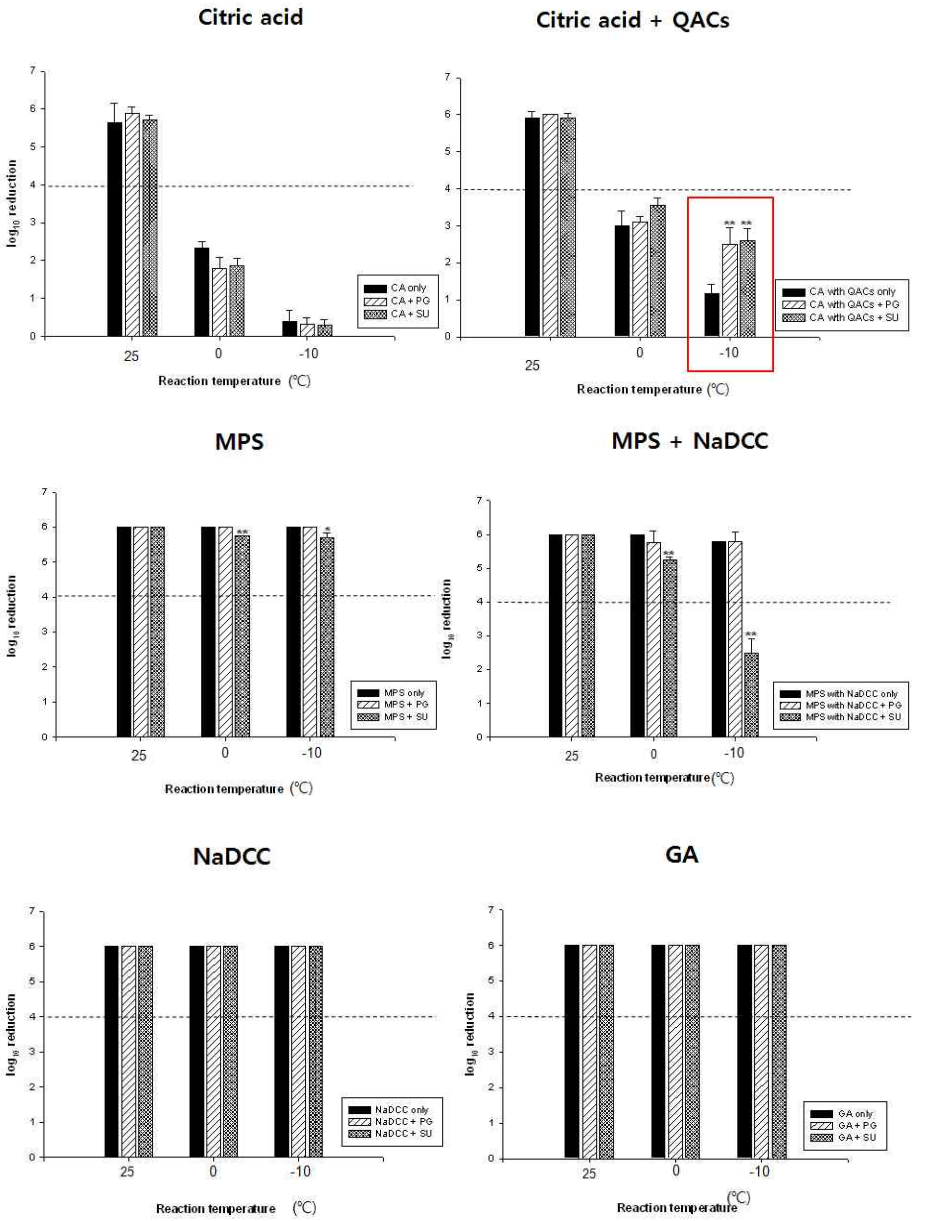
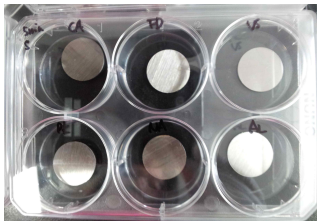
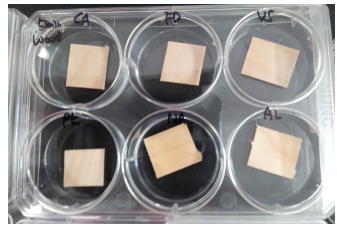


Fig 18. **유기물** 조건에서 **조류인플루엔자** 바이러스에 대한 각 내동형 소독제의 효력변화

마. 소독대상에 따른 내동형 소독제 효력평가

① 소독대상에 따른 효력평가는 야외실험을 위한 준비과정으로 stainless steel과 wood로 caiirer를 제작하여 실험을 진행하였다.





② 농림축산검역본부에는 carrier 실험에 대한 규정이 없으므로 carrier를 이용한 실험은 ASTM(2002), “Standard quantitative disk carrier test method for determining the bactericidal, virucidal, fungicidal, mycobactericidal and sporidical activities of liquid chemical germicides“를 기본으로 하여 실시하였다.

③ 살모넬라 carrier 실험

- **Carrier 전처리** : carrier는 사용 전 121℃, 15분 고압멸균하여 사용하였다.

- **세균 배양** : 균액은 영양배지에서 매일 계대하여 활성화된 것을 사용하였으며, 세균의 농도는 1×10^{8} CFU/ml 이상인 것을 사용하였다.

- **소독제 희석** : 소독제 희석은 경수를 이용하였고 -10℃에서 진행된 carrier test에 사용될 소독제는 사용하기 전까지 ice에 두었다. 25℃ 조건의 실험에 사용될 소독제는 상온에 두었다.

- **균액 접종** : 5% yeast extract와 균액을 동량으로 섞은 다음, 각각의 carrier에 100ul씩 접종하여 불이 꺼진 clean bench에서 60-80분 건조시켰다.
  -10℃ 조건 경우 건조된 carrier를 -10℃로 세팅된 냉동고에 20분 방치 후 실험을 실시하였다.

- **소독제 반응** : 각 carrier에 200ul의 소독제를 5분 동안 반응시켰다.

- **중화 및 배양** : 각 반응 시간 후 10ml의 D/E neutralizing broth 중화제가 들어있는 50ml tube에 carrier를 넣어 중화시키고 3분동안 최대 스피드로 vortex한 다음 9ml 멸균희석액을 이용하여 희석하고 3M petrifilm을 이용하여 남아있는 균을 정량한다.

④ 조류인플루엔자 carrier 실험

- **Carrier 전처리** : carrier는 사용 전 121℃, 15분 고압멸균하여 사용하였다.

- **바이러스 배양** : AIV MS96주를 10일령 계태아 발육란에 연속 2~3회 계대 배양하여 활력이 있는 바이러스를 사용한다. 바이러스는 요막강(allantoic cavity) 접종하고 약 72시간 동안 배양한 후, 3시간 이상 4℃에 정치한 다음 요막강액(allantoic fluid)을 수확하여 원심분리(3,000 rpm, 4℃, 30분)를 통해 고형성분을 제거한 후, 바이러스를 함유한 요막강액을 EID_{50}/ml 표준역가산정법에 준해 바이러스 역가를 확인하여 -80℃에 보관해 둔다. 바이러스의 역가는 10^7 EID_{50}/ml 이상을 사용하였다.

- **소독제 희석** : 소독제 희석은 경수를 이용하였고 -10℃에서 진행된 carrier test에 사용될 소독제는 사용하기 전까지 ice에 두었다. 25℃ 조건의 실험에 사용될 소독제는 상온에 두었다.

- **균액 접종** : 5% FBS와 균액을 동량으로 섞은 다음, 각각의 carrier에 100ul씩 접종하여 불이 꺼진 clean bench에서 60-80분 건조시켰다.

-10℃ 조건 경우 건조된 carrier를 -10℃로 세팅된 냉동고에 20분 방치 후 실험을 실시하였다.

- **소독제 반응** : 각 carrier에 200ul의 소독제를 5분 동안 반응시켰다.

- **중화 및 배양** : 각 반응 시간 후 10ml의 10% FBS가 들어있는 50ml tube에 carrier를 넣어 중화시키고 3분동안 최대 스피드로 vortex 하였다.

- 바이러스 증식여부 판정

중화처리가 끝난 반응액은 PBS를 이용하여 10진 단계희석(원액, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} 및 10^{-5})하여 희석배수 당 5개의 10일령 계태아 발육란의 요막강(allantoic cavity) 내에 0.2 ml씩을 접종하고, 37℃의 부화기내에서 5일간 배양한다. 매일 검란을 실시하며, 접종 후 24시간 이내에 죽은 발육란은 접종사로 간주하고 시험성적에서 제외한다. 접종 24시간부터 5일 이내에 죽은 접종란은 모두 4℃에 보관한다. 5일 후, 모든 접종란을 회수하여 요막강액(allantoic fluid)을 채취하여 혈구응집반응(HA test)을 실시한다. 혈구응집반응은 채취 즉시 평판응집반응으로 확인하였다.

- 바이러스 함유량 계산

바이러스 함유량은 Kärber method에 준해 산정하며, 대조바이러스 감염량에 비하여 소독제 처리군의 바이러스 감염량이 $10^{4.0}$ EID_{50}/ml 이상 불활화가 인정되는 경우 소독효과가 있다고 판정하였다.

④ 결과 및 고찰

- suspension test와 carrier test는 균액의 양과 적용하는 소독제의 양이 다르기 때문에 절대적으로 비교는 할 수 없으나 살모넬라와 조류인플루엔자 모두 carrier test 시 소독제 효력이 떨어지는

양상을 보였다.

- 나무에 소독제를 적용했을 때 실험에 사용한 모든 소독제에서 효력이 떨어지는 양상을 확인할 수 있었다. 이는 carrier에 pore에 균이 깊숙이 들어갈 수 있으며, 같이 적용한 유기물에 의해 덮여져 있기 때문에 액체와 균액이 만나 소독제 효력을 확인하는 suspension test보다 빠른 소독효과를 발휘할 수 없는 것으로 생각된다.

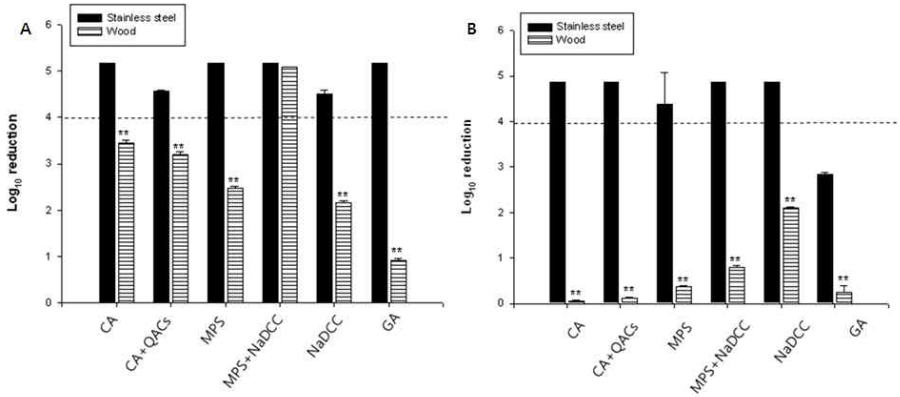


Fig 19. carrier를 이용한 효력시험 (Against *Salmonella typhimurium*)
A : 25℃ B : -10℃

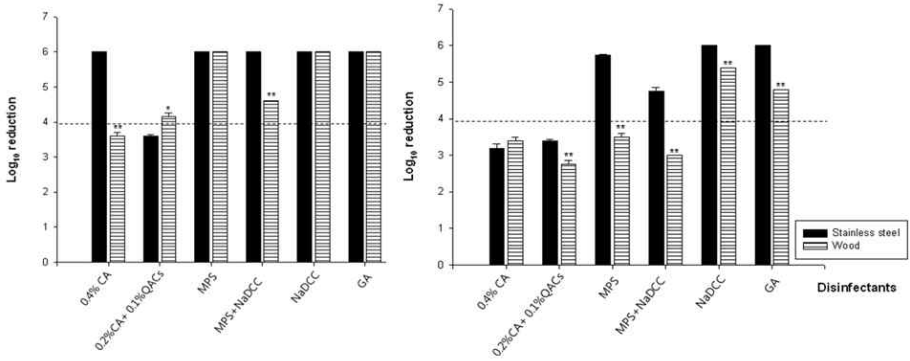
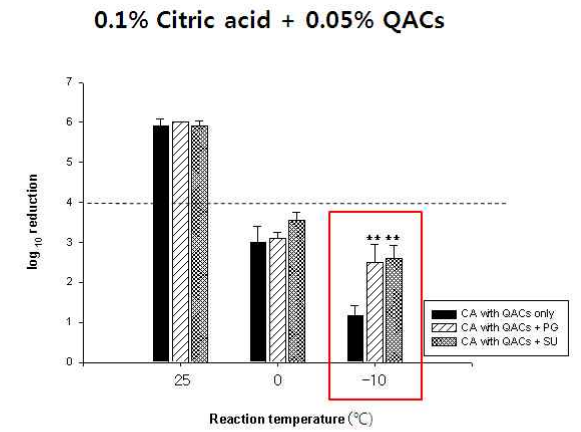


Fig 20. carrier를 이용한 효력시험 (Against Avian influenza virus)
A : 25℃ B : -10℃

바. 분무로 적용한 소독제의 효력평가

(1) 소독제 선택

① citric acid + quaternary ammonium compounds(QACs) 선택

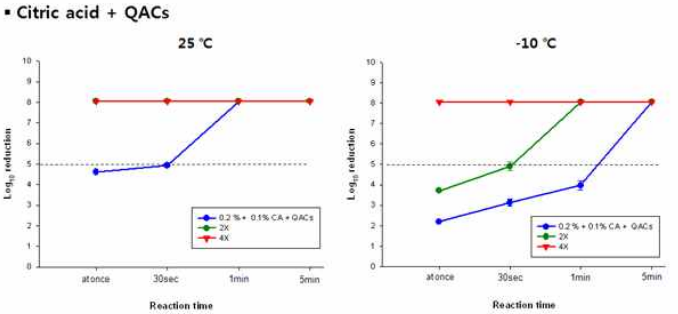


조류인플루엔자 바이러스를 대상으로 온도에 따른 소독제 효력 변화 시험 결과. 내동제 혼합한 CA+QACs 경우 control과 비교 시 통계학적으로 유의한 효력차이를 보임($p<0.01$)

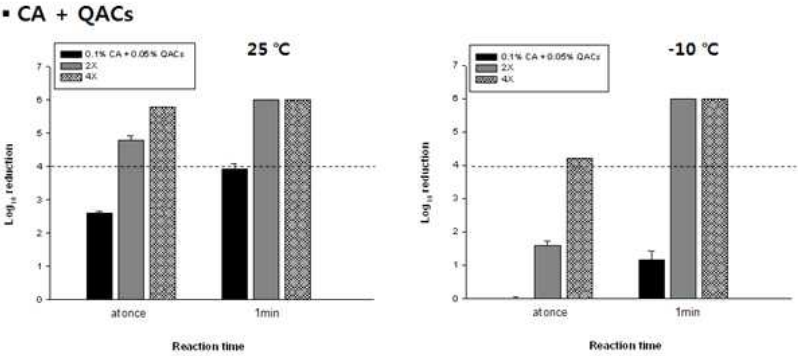
- 1차년도 연구결과를 바탕으로 내동제와 혼합하였을 때 낮은 온도에서 효력이 유의하게 증가한 citric acid와 4급암모늄 제제를 대상으로 2차년도 분무실험을 통해 내동형 소독제의 formula를 설정하고자 하였다.

- CA+QACs 제제가 액체형태이기 때문에 겨울철 사용 시 현장에서 선호되고 내동제와의 혼합이 산제에 비해 자유롭다는 장점이 있다.

② CA+QACs의 농도설정



- 살모넬라를 대상으로 온도에 따른 소독제 효력 변화 시험 결과 25℃에서 0.2%CA + 0.1% QACs에서 1분 이내 충분한 소독 효력이 발휘되는 것을 확인하였으며, -10℃에서는 0.4% CA + 0.2% QACs에서 1분 이내 충분한 효력이 발휘되는 것을 확인하였다. 따라서 분무 실험에는 위 두 가지 농도를 이용하기로 하였다.



- 조류인플루엔자 바이러스를 대상으로 온도에 따른 소독제 효력 변화 시험결과 25,-10℃ 모두에서 0.2% CA + 0.1% QACs에서 1분이내 충분한 효력이 발휘되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 분무 실험에서는 살모넬라와 마찬가지로 2가지 농도 조건에서 실험을 실시하였다.

(2) 친환경·저독성 확보

① 친환경성

- 개발될 소독제의 친환경성은 내동제로 친환경적인 소재인 1.3-propanediol을 활용함으로써 기존의 소독제에 비해 친환경성을 확보하고자 하였다.

② 저독성

- 미국 식품의약품안전청(FDA)은 구연산을 식품에 제한 없이 사용할 수 있는 안전한 물질로 분류하였다. 4급암모늄계 살균소독제인 염화벤잘코늄은 부식성이 없고 독성이 낮아 식품가공기구에 많이 사용되고 있다(차 등.J. Fd. Hyg. Safety, 2011).

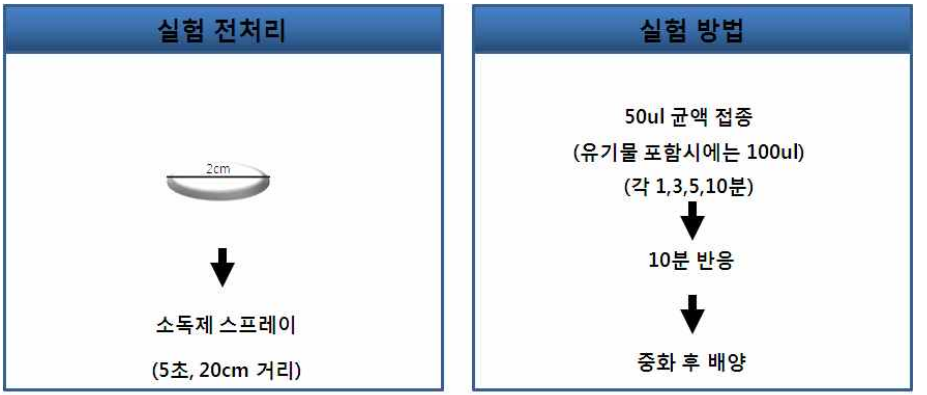
- 염화벤잘코늄(200g/L)과 구연산(100g/L)을 주성분으로 하는 살균 소독제에 대한 급성 경구독성 및 피부자극성 시험에 관한 연구에 따르면 랫트에 2000mg/kg 농도를 최고농도로 하여 1회 투여 후, 2주간 관찰한 결과, 사망, 이상증상, 증체량변화 등은 관찰되지 않았다. 또한 토끼의 등에 찰과부위와 비찰과 부위를 형성하고 여러 농도로 소독제를 도포하여 피부자극성을 확인한 결과 1차 자극지수가 0.50으로 비자극성 물질로 분류되었다(차 등.J. Fd. Hyg. Safety, 2011).

(3) 내동성 실험

① residual antimicrobial activity test

- 5,10,15,20%로 내동제 혼합 후 분무실험 진행하였다. 분무를 통해 뿌려지기 때문에 내동

성을 확인하기 위해 residual antimicrobial activity test로 내동성 간접 확인해보고자 하였다. 소독제가 얼게 되면 소독력 발휘가 되지 않을 것이라는 가정 하에 실험을 진행하였다.



- 냉동컨테이너

기종	Carrier, Daikin, Mitsubishi
규격	폭2,438mm x 길이6,096mm x 높이2,591mm
온도설정	-25도 ~ +25도 까지 냉동 냉장 Setting

- 소독제 : 소독제 희석은 경수를 이용하였고 내동제를 농도별로 각각 경수에 희석하고 만들어진 내동제 희석액에 소독제를 각각 희석하였다. 희석한 소독제는 분무기에 담고 실험 전까지 4℃에 보관하였다. 소독제 희석은 매번 실험할 때마다 만들어 사용하였다.

- 분무기 : Marolex sprayer(Poland)를 이용하였으며, 0.4Mpa압력으로 5초간 분무 시 총 30-35ml의 소독제가 분사된다. carrier(2.25-3.14㎡)의 넓이를 감안하여 계산 시 carrier당 약 620-870㎕가 적용되었다. 소독제 분무 시, carrier가 흠뻑 젖을 수 있는 분무시간을 선택, 적용하였다.

- carrier : carrier는 직경이 2㎝인 스텐리스를 주문 제작하여 사용하였으며, 나무 carrier는 가로, 세

로의 길이가 1.5㎝로 직접 만들어 사용하였다. carrier는 중성세제로 씻어 말리고 마지막으로 멸균 증류수로 헹군 다음, 120℃, 15분 autoclave하였고 UV등을 켠 clean bench에 1시간동안 건조하여 사용하였다.

② residual antimicrobial activity test 결과

- 육안으로 관찰하였을 때 -10℃ 온도조건에서 내동제 혼합이 없는 경수(control) 경우 뿌리는 즉시 동결되며, 소독제 단독으로 사용하였을 시 1-3분이내 동결되는 것을 확인할 수 있었으며 내동제 혼합군 경우 5%는 5-10분이내 동결되며 나머지 농도의 내동제 혼합군은 10분 동안 동결되지 않았다.

- residual antimicrobial activity test 결과 carrier와 같이 국소적인 소독제 적용 시 동결여부가 소독제 효력에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었으며, residual antimicrobial activity test로 내동성을 간접적으로 확인할 수 없었다. 조류인플루엔자 바이러스를 대상으로 실시한 실험의 경우 0.4% CA+0.2% QACs에서 소독제 효력이 나타나지 않았다.

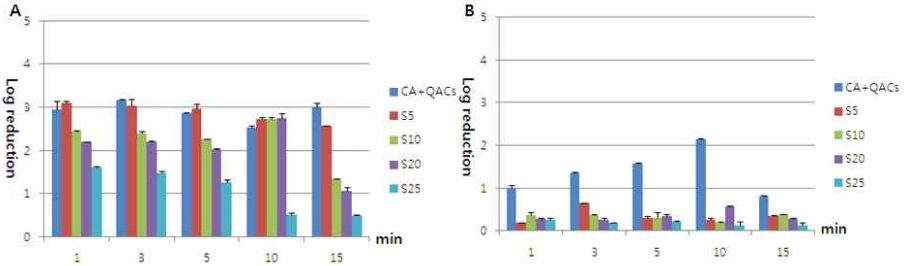


Fig 21. 0.4% CA와 0.2% QACs 소독제를 활용한 residual antimicrobial activity 실험 (against *Salmonella typhymurium)* A : 유기물무 B : 유기물조건

(4) 살모넬라 대상 분무 실험

① 실험 재료 및 방법

- **Carrier 전처리** : carrier는 사용 전 121℃, 15분 고압멸균하여 사용하였다.

- **세균 배양** : 균액은 영양배지에서 매일 계대하여 활성화된 것을 사용하였으며, 세균의 농도는 1×10^8 CFU/ml 이상인 것을 사용하였다.

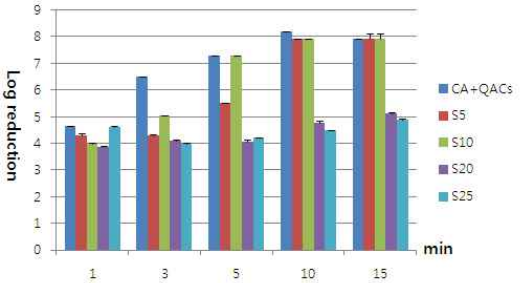
- **소독제 희석** : 소독제 희석은 경수를 이용하였고 내동제를 농도별로 각각 경수에 희석하고 만들어진 내동제 희석액에 소독제를 각각 희석하였다. 희석한 소독제는 분무기에 담고 실험 전까지 4℃에 보관하였다. 소독제 희석은 매번 실험할 때마다 만들어 사용하였다.

- **균액 접종** : 5% yeast extract와 균액을 동량으로 섞은 다음, 각각의 carrier에 100ul씩 접종하여 불이 꺼진 clean bench에서 60-80분 건조시켰다.

- **소독제 반응** : 소독제는 5초간 20cm 거리에서 분사하고 1, 3, 5, 10분 뒤 중화하였다.

- **중화 및 배양** : 각 반응 시간 후 10ml의 D/E neutralizing broth 중화제가 들어있는 50ml tube에 carrier를 넣어 중화시키고 5분동안 최대 스피드로 vortex한 다음 9ml 멸균희석액을 이용하여 희석하고 3M petrifilm을 이용하여 남아있는 균을 정량하였다.

② 실험 결과 및 고찰



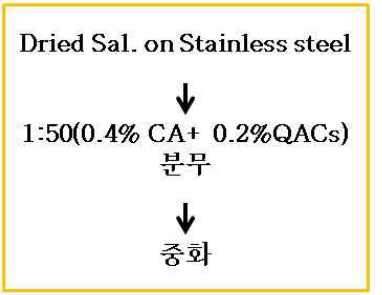


Fig 22. 유기물 없는 조건에서 살모넬라를 대상으로 분무로 적용한 소독제 효력시험 결과

- 0.2% CA + 0.1% QACs로 실시한 실험의 경우, 소독제 효력이 미비하여 0.4% CA+ 0.2% QACs로 분무실험을 실시하였다. 유기물이 없는 조건에서 내동제를 섞은 소독제와 소독제 단독으로 적용한 경우 낮은 온도에서 소독제 단독으로 사용하였을 때 훨씬 빠른 소독 효과를 내는 것을 확인할 수 있었다. 이는 내동제 자체가 유기물로 적용하여 소독제 효력을 떨어뜨리는 것으로 생각된다.

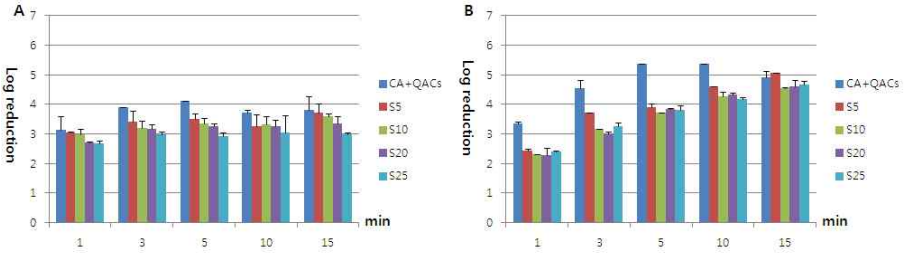


Fig 23. 유기물 조건, -10℃에서 살모넬라를 대상으로 분무로 적용한 소독제 효력시험 결과
A : 나무 carrier B : stainless steel carrier

- carrier의 종류에 상관없이 내동제의 농도가 높은 시험군에서 효력이 소독제 단독 사용 시보다 떨어지는 양상을 보였다.

(5) 조류인플루엔자 대상 분무 실험

① 실험 재료 및 방법

- **Carrier 전처리** : carrier는 사용 전 121℃, 15분 고압멸균하여 사용하였다.

- **바이러스 배양** : AIV MS96주를 10일령 계태아 발육란에 연속 2~3회 계대 배양하여 활력이 있는 바이러스를 사용한다. 바이러스는 요막강(allantoic cavity) 접종하고 약 72시

간 동안 배양한 후, 3시간 이상 4℃에 정치한 다음 요막강액(allantoic fluid)을 수확하여 원심분리(3,000 rpm, 4℃, 30분)를 통해 고형성분을 제거한 후, 바이러스를 함유한 요막강액을 EID_{50}/ml 표준역가산정법에 준해 바이러스 역가를 확인하여 -80℃에 보관해 둔다. 바이러스의 역가는 10^7 EID_{50}/ml 이상을 사용하였다.

- **소독제 희석** : 소독제 희석은 경수를 이용하였고 내동제를 농도별로 각각 경수에 희석하고 만들어진 내동제 희석액에 소독제를 각각 희석하였다. 희석한 소독제는 분무기에 담고 실험 전까지 4℃에 보관하였다. 소독제 희석은 매번 실험할 때마다 만들어 사용하였다.

- **균액 접종** : 5% FBS와 균액을 동량으로 섞은 다음, 각각의 carrier에 100ul씩 접종하여 불이 꺼진 clean bench에서 60-80분 건조시켰다.

- **소독제 반응** : 소독제는 5초간 20cm 거리에서 분사하고 1, 3, 5, 10분 뒤 중화하였다.

- **중화 및 배양** : 각 반응 시간 후 10ml의 10% FBS가 들어있는 50ml tube에 carrier를 넣어 중화시키고 3분동안 최대 스피드로 vortex 하였다.

- 바이러스 증식여부 판정

중화처리가 끝난 반응액은 PBS를 이용하여 10진 단계희석(원액, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} 및 10^{-5})하여 희석배수 당 5개의 10일령 계태아 발육란의 요막강(allantoic cavity) 내에 0.2 ml씩을 접종하고, 37℃의 부화기내에서 5일간 배양한다. 매일 검란을 실시하며, 접종 후 24시간 이내에 죽은 발육란은 접종사로 간주하고 시험성적에서 제외한다. 접종 24시간부터 5일 이내에 죽은 접종란은 모두 4℃에 보관한다. 5일 후, 모든 접종란을 회수하여 요막강액(allantoic fluid)을 채취하여 혈구응집반응(HA test)을 실시한다. 혈구응집반응은 채취 즉시 평판응집반응으로 확인하였다.

- 바이러스 함유량 계산

바이러스 함유량은 Kärber method에 준해 산정하며, 대조바이러스 감염량에 비하여 소독제 처리군의 바이러스 감염량이 $10^{4.0}$ EID_{50}/ml 이상 불활화가 인정되는 경우 소독효과가 있다고 판정하였다.

② 실험 결과 및 고찰

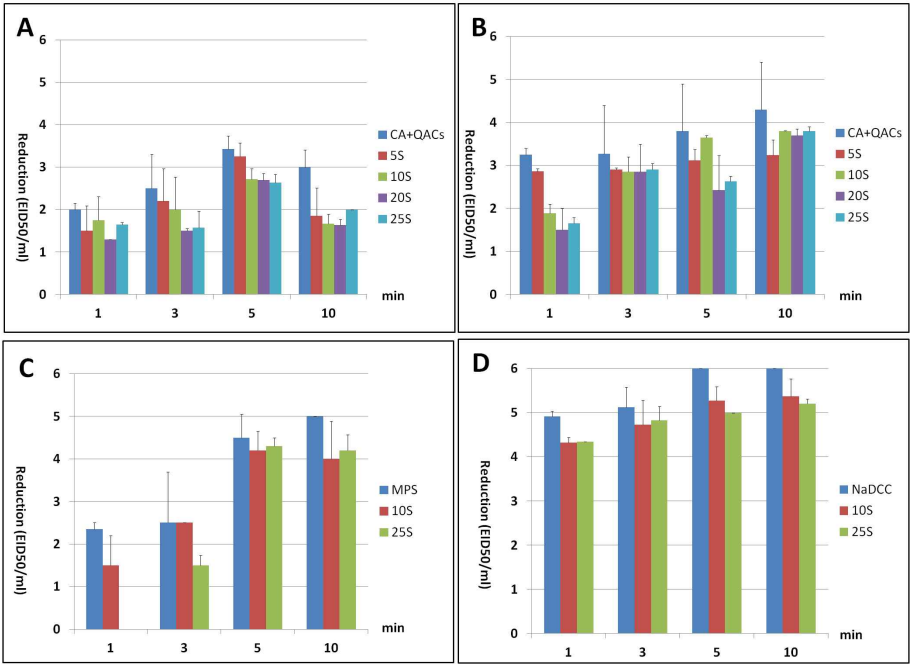


Fig 24. 유기물 조건, -10℃에서 조류인플루엔자 바이러스를 대상으로 분무로 적용한 소독제 효력시험 결과(stanless steel carrier).

A : 0.2% CA + 0.1% QACs

B : 0.4% CA+ 0.2% QACs

C : 1% MPS

D : 0.33% NaDCC

- 조류인플루엔자 바이러스를 대상으로 한 효력시험의 경우도 살모넬라와 마찬가지로 내동제를 혼합한 시험군에서 효력이 소독제 단독 사용 시험군에 비해 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. 현탁액시험에서 유기물 조건으로 소독제를 적용하였을 때 나타나지 않았던 현상으로 현탁액시험에 비해 분무로 소독제를 적용했을 때 적용되는 소독제양이 적기 때문이라고 생각된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 목표달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2011 -2012)	친환경·저독성·내동형 소독제 개발	전문가 자문단 구성	100	자문단 구성 및 회의진행
		내동형 물질의 발굴	100	1,3 propanediol 발굴
		소독제의 선정	100	산화제, 산성제, 알데하이드 제제 (총 6종)선택 후 실험 진행
		내동형 소독제 개발	100	- 내동제의 혼합 농도 확정 - 낮은 온도에서 소독제의 효력을 유지 또는 상승 시켜주는 소독제 선정 및 확인
		내동형 소독제 효력평가	100	- 소독방법에 따른 효력평가 실시
2차년 (2012 -2013) 수행할 연구 목표	환경적인 요인 (낮은 온도, 유기물 여부)에 따른 내동형 소독제 효력 평가	온도변화에 따른 효력평가	100	- 25, 0, -10℃에서 내동형 소독제 효력평가 실시함 - 온도에 따른 소독제 효력변화 확인
		유기물 유무에 따른 효력평가	100	- FBS, yeast extract하에서 내동형 소독제 효력평가 실시함
		소독대상에 따른 효력평가	100	- 나무와 스텐리스를 이용한 소독제 효력시험 결과 다공성물질인 나무에 적용 시 효력 저하를 확인
		소독방법 (분무, 침지)에 따른 효력 평가	100	- 냉동컨테이너 이용해 분무를 통해 소독제를 적용하였음. - 내동형 소독제 분무 적용 시 소독제 단독 사용 시보다 소독제 효력이 감소하는 양상을 확인하였음.
	구제역 바이러스에 대한 소독제 효력 검증	구제역 바이러스에 대한 소독제 효력 검증	100	Pirbright institute에 의뢰
	산업화	국내 특허 출원 기술전수	100	- 분무형의 경우 소독제 효력이 감소하므로 내동형 소독제 적용이 어려우므로 발판소독조용으로 변경하여 특허를 출원할 예정임.

2. 관련분야에의 기여도

○ 겨울철 사용할 수 있는 소독제에 대한 연구로 질병 전파의 차단 효과
○ 본 연구를 통해 얻어진 자료를 이용하여 질병차단 방역에 대한 정책수립 가능
○ 국내 소독제 전문가 양성을 통해 연구의 활성화 도모 및 인력확보
○ 올바른 차단 방역으로 축산 농가의 질병감소 효과로 인한 농가의 경제력 향상

제 5 장　연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 논문 (SCI/E에 2편 게재확정 및 예정)

(1) Evaluation of changes induced by temperature, contact time, and surface in the efficacies of disinfectants against avian influenza virus. Poultry science,2013.(In press)

(2) Efficacy Evaluation of anti-freezing disinfectants applied by spray. Letters in applied microbiology. (submission)

2. 초록발표 :

(1) Efficacy Evaluation of anti-freezing disinfectants applied by spray at -10°C, 대한수의학회. 2013년 10월

(2) Evaluation of disinfectant efficacy under low temperature, 한국예방수의학회.2012년 5월

(3) Evaluation of changes induced by temperature and storage after dilution in the efficacies of disinfectants against the avian influenza virus, 한국보건종합학술대회.2013년 4월

3. 인력양성(박사 1명)

The evaluation of disinfectants efficacy changes by temperature and contact time against *Salmonella typhimurium* and avian influenza virus. 2013년 2월

4. 활용계획

(1) 향후 겨울철 국가방역에 기초자료로 활용

(2) 발판소독조용 내동형 소독제 특허 출원 예정

(3) 소독제 관련 연구인력양성을 통해 이 분야의 연구 활성화 도모

* 실용화・산업화 계획(기술실시 등)
* 교육・지도・홍보 등 기술확산 계획 등
* 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등
* 추가연구, 타연구에 활용 계획 등
* 연구기획사업 등 사업별 특성에 따라 목차는 변경 가능함

제 6 장 참고문헌

농림축산식품부2007-2012. 가축전염병발생월보

농림축산검역본부. 2013. 소독제 효력시험 지침(2013-34호).

농림축산검역본부. 2003. ND virus에 대한 동절기 소독효과 비교연구

차춘남, 이여은, 손송이, 유창열, 박은기, 최현주, 김석, 이후장. 2011. 염화벤자코늄과 구연산을 주성분으로 하는 살균 소독제 라미아-킬에 대한 급성경구독성 및 피부자극성 시험에 관한 연구. J. Fd Hyg. Safety. 26:377-382.

Davison, S., C.E. Benson, A.F. Ziegler, and R.J. Eckroade. 1999. Evaluation of disinfectants with the addition of antifreezing compounds against nonpathogenic H7N2 avian influenza virus. Avian Dis. 43: 533-537.

McDonnell, G.E. 2007. Antisepsis, disinfection and sterilization: types, action and resistance. Washington DC: American Society for Microbiology.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 친환경·저독성·내동형 소독제의 개발사업의 최종연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 친환경·저독성·내동형 소독제의 개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.