

과제  
번호

117113-1

가  
축  
사  
육  
장  
내  
바  
이  
오  
매  
직  
용  
액  
의  
상  
시  
살  
포  
에  
의  
한  
바  
이  
러  
스  
성  
질  
환  
예  
방  
법  
개  
발  
최  
종  
보  
고  
서

2018

농  
림  
축  
산  
식  
품  
부  
농  
림  
식  
품  
기  
술  
기  
획  
평  
가  
원

보안 과제( ), 일반 과제( 0 ) / 공개( 0 ), 비공개( )발간등록번호( )

## 가축질병대응기술개발사업 제1차연도 최종 보고서

발간등록번호

11-1543000-002684-01

### 과제명:

가축사육장 내 바이오매직 용액의 상시살포에  
의한 바이러스성 질환 예방법 개발

최종보고서

2019. 2. 15.

(별색바탕 : C50, M20, Y59, K0)

주관연구기관 / 수원대학교  
협동연구기관 / 지앤비솔루션(주)

농림축산식품부

농림식품기술기획평가원

<제출문>

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “가축사육장 내 바이오매직 용액의 상시살포에 의한 바이러스성 질환 예방  
법 개발”(개발기간 : 2017. 12. 28 ~ 2018. 12. 27.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 4. 29.

주관연구기관명 : 수원대학교 산학협력단 (대표자) 단장 임교빈



협동연구기관명 : 지앤비솔루션주식회사 (대표자) 이희규



주관연구책임자 : 김 영 호

협동연구책임자 : 김 기 흥

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의  
합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	117113-1	해 당 단 계 연 구 기 간	2017. 12. 28 ~2018. 12. 27	단 계 구 분	(1차년도)/ (1차년도)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	가축질병대응기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	가축사육장 내 바이오매직 용액의 상시살포에 의한 바이러스성 질환 예방법 개발			
연구책임자	김 영 호	해당단계 참여연구원 수	총: 3 명 내부: 2 명 외부: 1 명	해당단계 연구개발비	정부: 40,000천원 민간: 20,000천원 계: 60,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 3 명 내부: 2 명 외부: 1 명	총 연구개발비	정부: 40,000천원 민간: 20,000천원 계: 60,000천원
연구기관명 및 소속부서명	수원대학교 산학협력단 공과대학 바이오화학산업학부			참여기업명: 지앤비솔루션주식회사	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
-------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약

보고서 면수 27

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>돼지(FMDV, PEDV, IAV, PRRSV), 가금류(AIV) 및 소(FMDV) 등에게 바이러스성 질환을 일으키는 바이러스들은 주로 RNA를 유전체로 갖고 있으며, 구조적으로는 이십면체 캡시드와 피막을 가지면서 숙주세포 표면에 있는 수용체 단백질과 결합한다. 지엔비솔루션에서 개발한 바이오매직 용액은 돼지 사육장 내 악취제거에 탁월한 성능을 발휘하고 있었다. 이 바이오매직 용액을 살포하던 농장에서는 구제역이나 돼지 설사병에 걸리는 돼지들의 숫자가 현저히 감소한다는 보고를 듣고 이를 확인하기 위한 “농장에서의 돼지 PEDV 바이러스 감염을 저하효과를 확인”하고자 하였다.</p>				
<p>연구개발성과</p>	<p>바이오매직 용액 처리에 의한 H1N1 AIV 바이러스, PEDV 바이러스 및 PRRSV 바이러스 등의 구조가 불활화시키는 성능을 확인하였음.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 전자현미경 하에서의 처리 후 바이러스 구조의 변화를 확인함.</li> <li>- 각 바이러스 세포주에서의 바이오매직 용액 처리에 의한 감염력 저하 확인</li> </ul> <p>돼지 분뇨에 침투한 PEDV 바이러스와 바이러스 유전체 RNA의 바이오매직 용액에 의한 파괴효과 검증.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 바이러스 구조 단백질의 변성확인</li> <li>- 바이러스 유전체의 파괴여부 확인</li> </ul> <p>악취 제거를 위한 바이오매직 용액 살포에 따른 FMDV, PEDV, PRRSV, AIV 등의 사육장 내 침투를 검증하기 위한 돼지 분뇨 랜덤채취에 의한 RT-PCR 실시.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 안성 상록수 농장(경기도 안성시 금석동 38):바이오매직 용액 살포 및 음용</li> <li>- 보령 도요농장(충남 보령시 청소면 죽림리): 바이오매직 용액 간헐적 살포</li> <li>- 아산 동인농장(충남 아산시 염치읍 방현리): 바이오매직 용액 간헐적 살포</li> <li>- 화성농장(경기도 화성시 향남읍 성재길 19): 바이오매직 용액 살포안함</li> </ul>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>바이오매직 용액의 1차적인 살포효과는 돼지 사육장 내 악취제거 효과가 검증되어 이미 상품화가 진행되어 그 효과에 대한 신뢰가 쌓여져 가고 있음.</p> <p>바이오매직 용액의 살포로 악취제거와 동시에 바이러스 침투 및 감염율을 크게 저하시킬 수 있는 예방적인 방역활동이 될 수 있다.</p> <p>특히 악취가 심하게 발생하는 돼지 사육장과 가금류 사육장에서의 바이오매직 살포에 의한 악취제거 및 조류독감바이러스(avian influenza), 돼지설사병 바이러스(PEDV) 등의 농장 침투율과 사육장 내 돼지-돼지 사이의 감염율을 크게 감소시킬 수 있다고 기대된다.</p> <p>또한 바이오매직 용액을 희석하여(100 ~200배) 가금류 및 돼지의 음용수로 공급할 경우, 동물 소화기관 내에서의 바이러스 증식억제 및 분뇨감염을 저하시켜 집단 사육하는 동물과 동물 사이의 감염을 크게 줄일 수 있는 효과가 기대된다.</p>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>바이오매직용액</p>	<p>돼지설사병 바이러스</p>	<p>조류독감 바이러스</p>	<p>악취제거</p>	<p>유전체 측정</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>BM Solution</p>	<p>PEDV</p>	<p>Avian Influenza Virus</p>	<p>deodorant</p>	<p>RT-PCR</p>

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 .....	6
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	8
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	23
4. 연구결과의 활용 계획 등 .....	24
붙임. 참고 문헌 .....	25

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발 목적

돼지에게 치명적인 바이러스성 질병에는 구제역, 돼지 설사병, 인플루엔자 등이 있으며, 이들은 FMDV, PEDV, IAV(Influenza A Virus)가 각각 원인 바이러스이며, 닭이나 오리나 같은 가금류에게는 조류독감이 Avian Influenza Virus에 의해 발병하며, 소에게는 주로 구제역을 일으키는 FMDV 바이러스가 문제가 되고 있다. 이들 바이러스들은 주로 그 유전체로 ssRNA를 가지고 있으며, 바이러스 구조를 보면 정이십면체(icosahedron) 또는 피막을 가진 구조(enveloped virus)이다. 따라서 이들은 숙주에 감염할 경우 숙주표면에 있는 수용체 단백질과 결합한다.

열대성 과일을 주 원료로 하여 발효시킨 바이오매직용액(Bio Magic Solution)을 희석하여 이들 바이러스와 접촉해본 결과, 전자현미경하에서 관찰된 결과를 보면 바이러스의 구조를 붕괴시키며, 숙주세포에 감염시키면 바이러스 감염율이 현저히 감소되는 것이 확인되었다. 따라서 돼지 사육장에 악취제거용으로 살포되고 있는 바이오매직용액은 돼지 사육장에 침투하는 바이러스들의 감염력(infectivity)을 떨어뜨리고, 돼지 체내에서의 증식력도 감소시켜 다른 건강한 돼지에게 전염되는 전염력도 떨어뜨리는 것으로 추정된다.

따라서, 본 연구과제의 목적은 돼지 사육장에서의 악취제거 능력이 출중한 바이오매직 용액을 정기적으로 살포하여 돼지사육장 돼지에게 침투하고 전파되는 여러 바이러스들을 제어할 수 있음을 살포농장과 살포하지 않는 농장에서의 돼지 분뇨 시료에 섞여 있는 여러 바이러스들의 유전체를 RT-PCR 방법의 특이성으로 검증하고자 한다.

## 1-2. 연구개발의 필요성

바이오매직용액의 구성은 오렌지, 파파야, 라임 등의 열대 과일류와 기타 식물의 추출물을 발효시킨 제품이다. 따라서 본 제품에는 단백질 분해효소(protease), 전분분해효소(amyase), 지방분해효소(lipase) 등이 풍부하고, 아미노산, 미네랄, 비타민 등도 풍부하다. 이러한 구성품 요소들은 우선 축산 분뇨, 음식물 쓰레기, 생활 쓰레기, 하수 슬러지 등에서 나오는 각종 악취를 제거하는데 탁월한 효능을 갖고 있음이 입증되었다.

바이오매직용액은 돼지에게 감염할 수 있는 FMDV, PEDV, AIV(avian influenza virus) 등의 표면 구조를 파괴시켜 바이러스의 감염력과 생존력을 감소시키는 것으로 생각된다. 또한 가금류 동물에게도 감염하는 여러 바이러스, 특히 조류독감 바이러스 등에게도 같은 활성을 가진 것으로 확인되고 있다. 그러므로 본 연구의 필요성은 최근 가장 많이 사용되고 있는 화학소독제들의 방역 능력과 차별성 있게 악취도 제거하고 바이러스 감염도 감소시킬 수 있는 바이오매직 용액에 의한 현장에서의 바이러스 감염제어 능력을 확인할 필요가 있다고 생각한다.

또한 그 동안 돼지 농장에서의 악취제거를 목표로 바이오매직용액을 살포해왔던 여러 농장에서는 구제역이 발생하였을 때 그 피해로부터 벗어날 수 있었음을 상기하면 확실히 바이러스 제거 효과가 있음을 유추할 수 있으므로 연구할 필요가 분명하다고 본다. 더욱이나 바이오매직 용액은 방역이 필요할 때에만 살포해야 하는 화학소독제와 다르게 천연물질로 구성되어 있어서 상시방역 용품으로의 활용이 크다고 생각되어 그에 대한 연구의 필요성은 크다고 생각된다.

정부에서도 이제는 구제역이나 조류독감의 발병과 돼지설사병과 같은 만연된 질병을 상시 방역하

는 시스템으로의 전환이 시급하다고 본다. 화학소독제의 경우에는 상시방역 용품으로 사용하기에는 부적절한 특성을 갖고 있지만, 본 바이오매직 용액과 같이 천연물의 소재로서는 인체나 축체에 전혀 해가 없으며, 특히 사육장 내 악취를 아주 효과적으로 제거할 수 있는 특징점을 갖고 있어서 상시 정기적으로 살포해줄 경우 악취제거는 물론이고 침투해 들어오는 병원성 미생물, 특히 바이러스성 병원체의 방역에 적합한 방법인 것이다. 부수적으로 악취 제거와 병원성 미생물의 침투와 전파를 막아주면서 동시에 동물들에게는 환경 스트레스 제거와 병원체로부터의 스트레스를 제거해주어서 보다 더 건강하고 깨끗한 가축을 생산해낼 수 있는 길을 제공하게 될 것이다.

### 1-3. 연구개발 범위

돼지 사육장 내 감염기회가 높고, 감염될 경우 그 효과가 신속하고 광범위하게 미칠 수 있는 바이러스에는 FMDV, PEDV, AIV 등의 바이러스가 주요 타겟이 된다. 따라서 바이오 매직용액을 살포하고 있는 돼지 농장과 살포하지 않거나 비정기적으로 살포하고 있는 농장을 주요 대상으로 하여 돼지 농장에서 랜덤하게 분뇨시료를 주기적으로 채취하여 위 세 가지 바이러스에 특이적인 프라이머를 사용하여 RT-PCR 방법으로 바이러스의 감염여부를 검증하고자 하였다.

## 2. 연구수행 내용 및 결과

가. 바이오매직 용액 (Bio-Magic Solution)에 의한 인플루엔자 바이러스 불활화 효과 확인시험

### (1) 실험방법

(가) 희석액 PBS 완충용액으로 바이오매직 용액을 희석한다.

(나) 사용한 Virus: Highly pathogenic AI: A/Waterfowl/Korea/S005/ 2014 (H5N8)

(다) PBS로 바이오매직 용액(BM) 희석 후 100 uL 제거 후 900uL 시료 희석에 100uL( $10^9$  TCID<sub>50</sub>/mL)로 30분 반응 후 MDCK 세포를 이용하여 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/mL를 측정하였다.

(2) 결과: 바이오매직 용액 처리에 따라 H5N8 바이러스의 감염성이 현저히 감소되는 결과를 보여준다(표 1).

표 1. Lot 번호가 다른 BM 용액(BM-1, BM-2, BM-3)에 의한 H5N8 avian influenza virus에 대한 증식억제 효과 실험 결과.

시료 양	BM-1 (log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /mL)	BM-2 (log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /mL)	BM-3 (log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /mL)	non-treated (PBS)
500uL	<	<	<	10-9
250uL	<	<	<	
125uL	10-3.0	10-3.5	10-3.0	
62uL	10-4.0	10-4.0	10-4.5	
31uL	10-6.0	10-6.5	10-6.0	
15uL	10-9.0	10-9.0	10-9.0	

비고: Water로 희석한 결과 Water만 처리한 경우도 6로그 이상 불활화 되는 결과는 envelope 구조가 물에서도 쉽게 파괴되는 현상 때문이다.

나. 돼지 생식기호흡기증후군 바이러스(PRRSV)와 돼지 설사병바이러스(PEDV)의 생육에 미치는 바이오매직 용액의 영향력 분석실험

### (1) MTT Assay:

바이오매직 용액이 PRRSV 바이러스에 permissive cell line PAM (Pulmonary Alveolar Macrophage) 세포주와 PEDV 바이러스에 permissive cell line Vero 세포주에서 세포생장에 독성을 나타내는지 여부를 확인하였다.

결과적으로 BM 용액 0.31% 농도까지는 세포독성이 없는 것으로 보였으나, 0.63 ~ 5.0% 범위의 농도에서는 PAM 세포주는 독성이 약간 크게 나타났으며, Vero 세포주는 세포 생존력(cell viability)이 60% 이상은 유지되었다.

## MTT assay

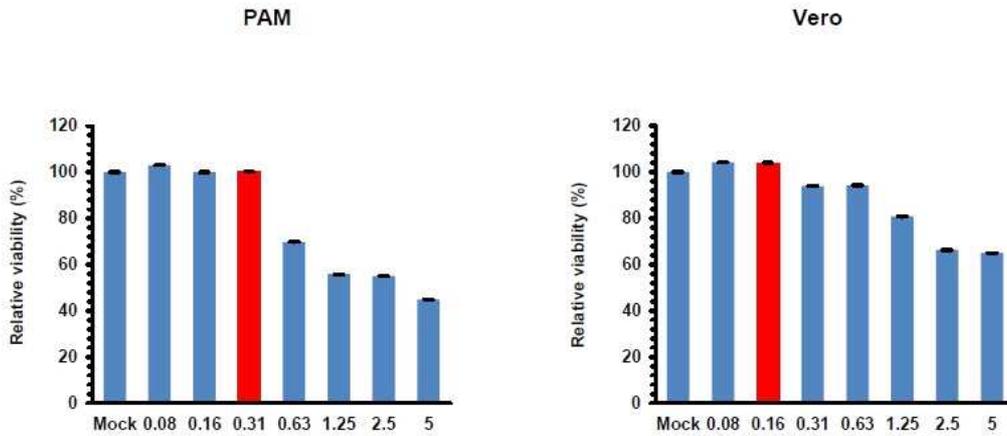


그림 1. 바이오매직 용액에 의한 PAM 세포주와 Vero 세포주에 미치는 독성 효과 테스트

## (2) 면역형광 항체검사법

각 세포주에 따라 각 바이러스의 증식률을 분석하기 위하여 FA (Fluorescent Antibody: 면역형광항체법) Assay에서의 결과를 보면, 바이오매직 용액 0.16% 또는 0.31% 농도가 세포독성이 없었다 (그림 1). 세포 독성이 없는 조건에서 바이오매직이 PRRSV와 PEDV 바이러스 생육에 영향을 미치는지 antibody를 이용하여 감염된 세포 (녹색형광)을 확인해보았다. In vitro 실험을 통해 바이오매직 용액은 PRRSV 바이러스의 감염에 크게 영향을 주지 못했지만 PEDV 바이러스 감염을 크게 감소하는 것으로 측정되었다 (그림 2).

## FA

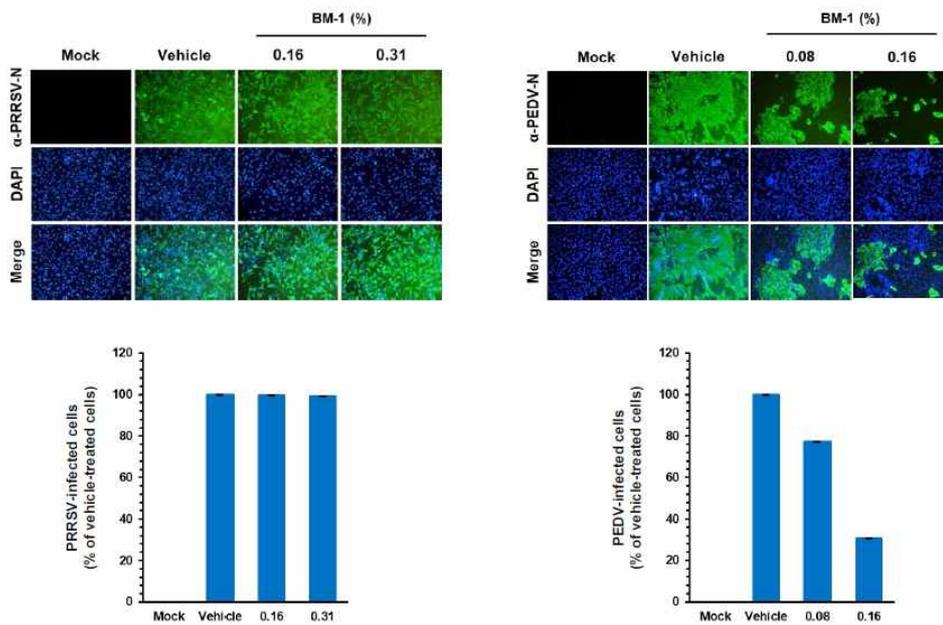


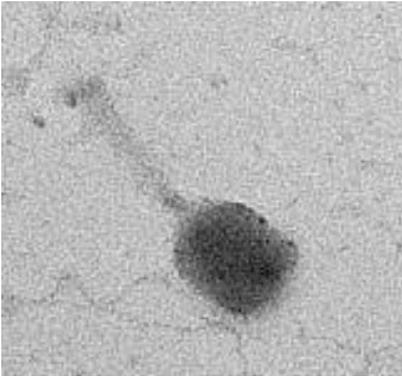
그림 2. 돼지 생식기호흡기증후군 바이러스(PRRSV)와 돼지 설사병바이러스(PEDV)의 생육에 미치는 바이오매직용액의 영향력 분석 실험.

(3) 전자현미경법

바이오매직 용액이 PRRSV 바이러스 보다 PEDV 바이러스의 생육을 저해하는 것이라면, 바이오매직 용액이 PEDV 구조를 깨뜨리는 것인가를 확인해 보기 위하여 바이오매직 0.5~1.0% 용액 내에서 바이러스를 처리한 후 전자현미경으로 관찰해볼 수 있을 것이다.

(가) 바이오매직 용액에 의한 T2 Bacteriophage 바이러스 입자의 불활화 효과 전자현미경 확인

(A)



(B)

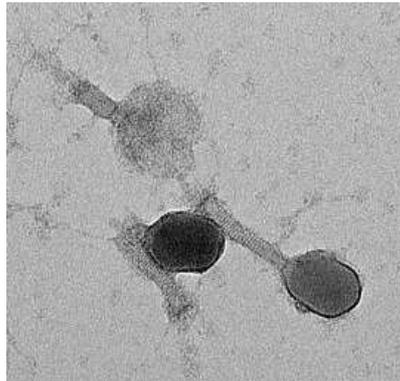


그림 3. 바이오매직 용액에 의한 박테리오파아지 구조의 변화. T2 박테리오파아지(A)가 바이오매직 용액 10%에서 2분 후 Head와 Tail 부분이 붕괴된 모습(B).

(나) 바이오매직 용액 처리에 의한 Influenza Virus H1N1 Particle의 구조변화

H1N1 Influenza A Virus - Green Cross Research Institute 바이러스 제공

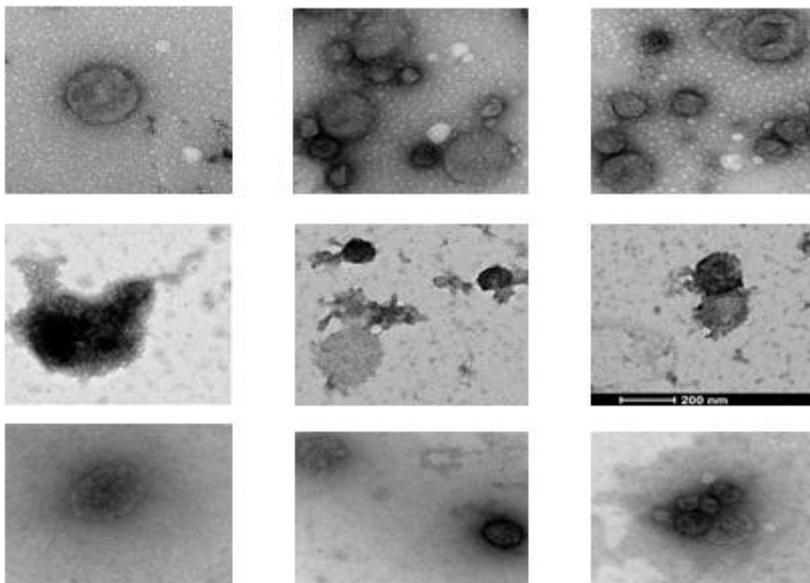


그림 4. H1N1 Influenza Virus를 바이오매직용액 처리 후 30초 뒤(중간 3개 사진)와 40초 뒤(아래 3개 사진)의 바이러스 입자의 구조적인 변화.

(다) 바이오매직 용액에 의한 바이러스의 형태적 변화를 확인하기 위한 관찰

H1N1 avian influenza virus를 정제하여 5% 바이오매직 용액에 30~40 초 처리한 후 서울대 NICEM의 FEI Microscope TalosL 120C 120KV를 사용하여 22,000배 확대하여 바이오매직 용액을 처리하지 않은 바이러스와 비교, 관찰하였다.

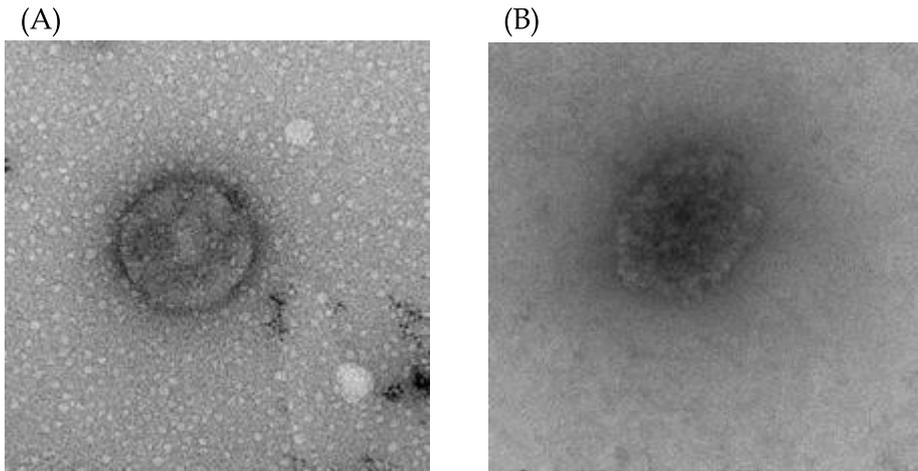


그림 5. H1N1 avian influenza virus(A)가 5% 바이오매직 용액에 의해 바이러스 입자의 구조적 변화가 발생함(B).

위 좌측 사진(A)은 순수정제된 H1N1 avian influenza 바이러스를 전자현미경 FEI Microscope TalosL 120C 120KV를 사용하여 22,000배 확대하여 관찰 모습이다. Envelope를 가진 이 바이러스를 5% 바이오매직용액으로 처리한 후 곧 바로 같은 전자현미경으로 관찰하니 우측의 사진(B)에서 보이는 것처럼 보였다. 두 사진을 비교해 볼 때, 바이러스 입자의 구조가 바이오매직 용액의 처리로 envelope 형태도 깨졌으며, 내부의 nucleocapsid 구조도 정상적이지 못하다. 이렇게 변형된 입자의 envelope에 있는 피막 단백질 HA와 NA단백질이 깨졌으며 이로 인하여 숙주세포의 바이러스 수용체 단백질에 달라붙지 못하게 되어 감염이 이루어지지 못하는 것으로 판단된다.

인플루엔자 바이러스는 보통 공기 중의 에어로졸에 달라붙어 있다가 동물이 호흡기를 통해 호흡하면 흡입되어 상부호흡기 세포에 달라붙어 감염한다. 그러나 상시 살포하는 바이오매직은 공기 중의 에어로졸과 동물의 분변 등과 섞여서 만나는 바이러스 입자를 파괴하여 감염할 수 없는 상태를 만들 것으로 생각된다. 만약 감염한 후에 내뿜는 호흡기를 통해 밖으로 방출된 바이러스도 다시 바이오매직 용액과 만나게 되면 파괴되어 전파할 수 없는 바이러스 입자가 될 것으로 생각된다.

고병원성 인플루엔자 바이러스 H5N8의 생장에 미치는 바이오매직 용액의 효과를 볼 때, 고병원성 조류인플루엔자 바이러스 H5N8 바이러스의 MDCK 세포주에서 증식에 미치는 효과를 측정하였다. 바이오매직 용액의 희석 농도의 고저에 따라 처리된 바이러스들은 MDCK 세포주에서 증식되는 정도가 고농도로 올라갈수록 억제시키고 있는 것으로 확인되었다(표 1). 대조구인 바이오매직 용액을 처리하지 않은 바이러스의 구조에 비해 처리된 바이러스의 피막은 그 형태가 파괴되어 감염성이 상실된 것으로 보인다.

(라) 돼지설사병을 일으키는 PEDV 바이러스 입자구조에 영향을 미치는 바이오매직 용액

돼지 사육장에서 돼지에게 자주 감염되어 설사병의 원인으로 알려진 PEDV 바이러스에게 바이오매직 용액을 처리한 후 바이러스 입자의 구조에 변화를 가져오는가를 확인하기 위하여 전자현미경으로 관찰하였다.

그 결과(그림 6), 역시 비리온 입자구조에 바이오매직 용액은 큰 변화를 가져다주고 있다. 바이오매직 용액 성분은 envelope를 가진 여러 종류의 바이러스 입자들의 구조를 변형시켜 구조적으로 숙주세포의 바이러스 수용체와의 결합이 완성되지 못하게 하고, 숙주세포와의 융합이 완전하게 일어나지 못하여 숙주세포내로의 바이러스 진입도 불가능하게 되어 바이러스 증식이 어렵게 되는 것으로 판단된다. 설사 일부 숙주세포가 바이러스에 감염되어 바이러스 증식이 일어나 숙주세포 밖으로 방출되더라도 바이오매직 용액에 의해 다시 변형되어 바이러스가 전파되기 어렵게 되는 것으로 유추해 볼 수 있다.

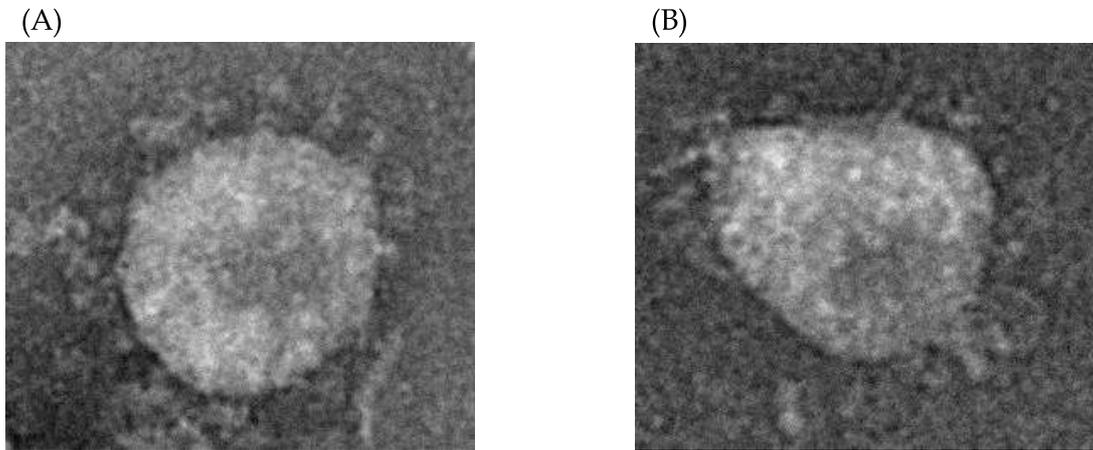


그림 6. 바이오매직 용액에 의해 PEDV 바이러스(A) 피막과 피막에 위치하는 피막단백질들의 구조적 변화가 일어난다(B).

그림 6의 좌측(A)은 PEDV 비리온 구조이며, 피막에 많은 envelope protein들이 spike로 붙어 있어서 숙주세포의 바이러스 수용체에 달라붙게 한다. 그러나 PEDV 비리온에 Bio Magic 용액 0.16% 희석액을 처리한 후 전자현미경 하에서 관찰해본 결과, 둥근 모양의 비리온 형태가 찌그러지고, 피막에 붙어 있던 많은 envelope protein들이 거의 파괴되어 있음을 볼 수 있다. 결과적으로 비리온들은 숙주세포에 침투해 들어가지 못하게 되어 감염력이 크게 떨어지며, 감염된 숙주세포에서 방출된 비리온들도 파괴되어 다시 다른 숙주세포로 전파되어 감염시키지 못하게 될 것으로 생각된다.

다. RT-PCR를 이용하여 바이오매직용액의 AIV, PEDV, PRRSV, FMDV 바이러스 RNA 분해 능력 측정

(가) 바이오매직 용액과 인플루엔자 바이러스 RNA

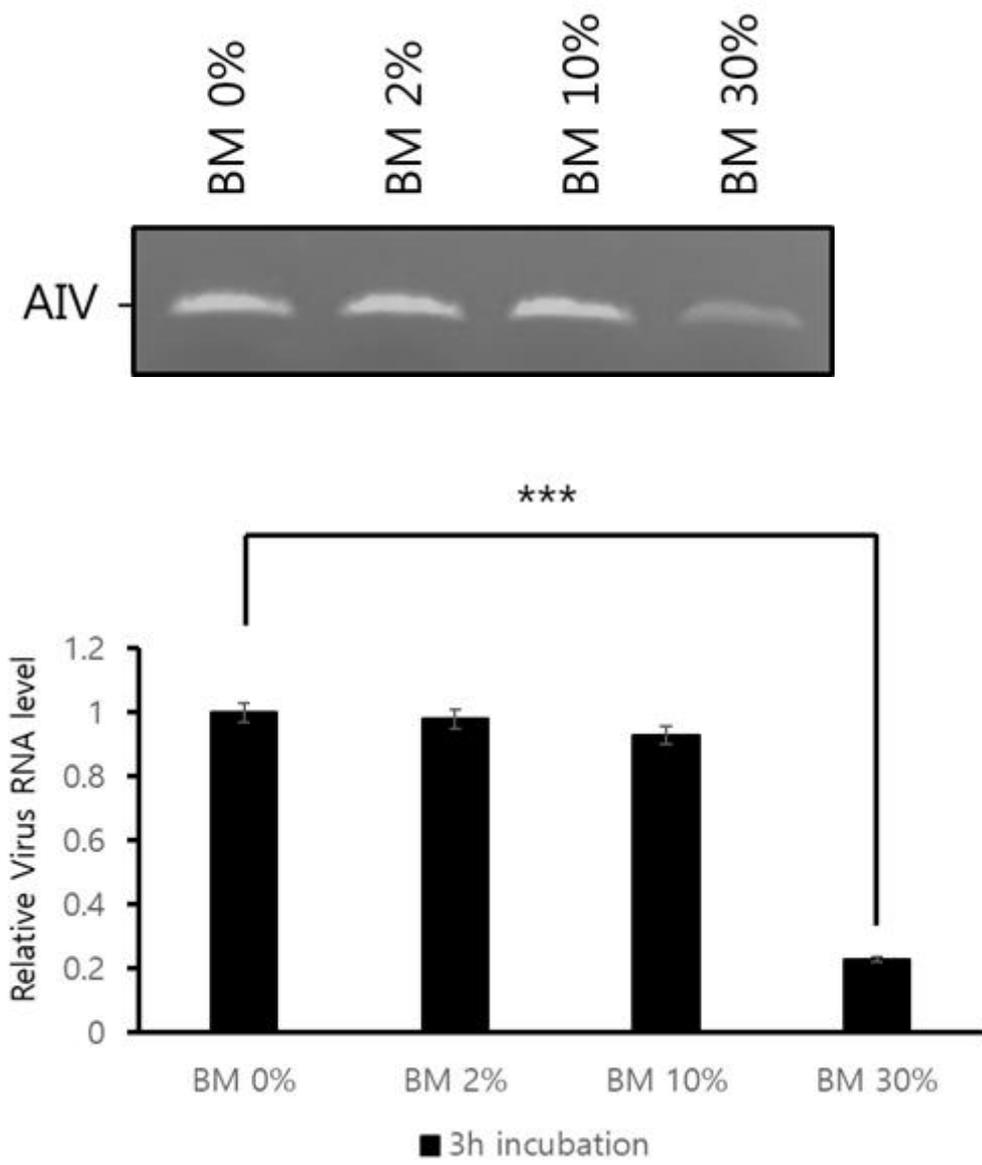


그림 8. 바이오매직 용액을 0-30%로 처리하였을 때 인플루엔자 바이러스 RNA의 주형 량의 변화(\*\*\* P ≤ 0.001)

그림 7에서는 바이오매직 용액이 바이러스 구조에 영향을 주고 피막의 envelope protein들이 파괴됨을 관찰하였다. 따라서 바이오매직용액이 바이러스 피막 내에 존재하며 바이러스 감염에 핵심적인 역할을 하는 바이러스 RNA에도 영향을 주는가를 알아보았다. 위 사진은 AI 바이러스와 바이오매직 용액을 농도별로 희석하여 3 시간 동안 처리하였다. 각 시료에서 RNA를 정제하여 RT-PCR을 진행하였다. AI 바이러스의 RNA 주형 량은 2% agarose gel 상에서 전기영동을 실시하여 측정하였다.

그림 8과 같이 30% 농도로 3시간과 24시간 동안 처리했을 때 AI 바이러스의 RNA의 주형 량이 감소하였다. 이 결과는 바이오매직 용액이 AIV 구조를 붕괴시킬 뿐 아니라 유전체 RNA를 분해하였음을 시사하는 것이다. 또한 농장 안에 살포된 바이오매직 용액이 감염된 동물로부터 증식되어 공기 중으로 전파되는 동안 바이러스 입자와 RNA 분자까지도 파괴하는 기능을 갖고 있어서 바이러스가 옆에 있는 다른 숙주 동물에게로 전파되지 못하게 하는 것으로 예측할 수 있다.

(나) 돼지 분변에 AI 바이러스 입자가 바이오매직 용액과 혼합되어 있을 경우 바이러스 RNA의 안정성.

바이오매직 용액이 AI 바이러스의 RNA의 안정성에 어떠한 영향을 미치는가를 관찰하였다. 이에 따라 AI 바이러스 입자가 돼지 분변과 섞여 있을 때, 바이오매직용액이 AI 바이러스의 RNA의 안정성에 어떻게 영향을 미치는가를 확인하였다. 그림 8에서는, 돼지분변(100mg/ml)에 AI 바이러스를 첨가한 후 바이오매직 용액의 농도에 따라 24시간 동안 방치하였다. 그 후 각 시료에서 RNA를 정제하여 RT-PCR의 주형으로 사용하여 2% agarose gel상에서 전기영동하여 파괴된 주형 RNA의 양을 비교하였다. 그 결과 30% 바이오매직 용액을 처리한 시료에서 AI 바이러스의 RNA 주형 량이 감소하였다. 바이오매직 용액이 돼지 분변에 섞여 있는 AI 바이러스 입자를 파괴시킬 뿐 아니라, RNA 주형도 분해시키는 활성이 있음을 시사한다. 그러므로 바이오매직 용액이 실제 농장 환경에서 침투하는 바이러스 및 전파되는 바이러스를 붕괴시키는 것으로 판단할 수 있다.

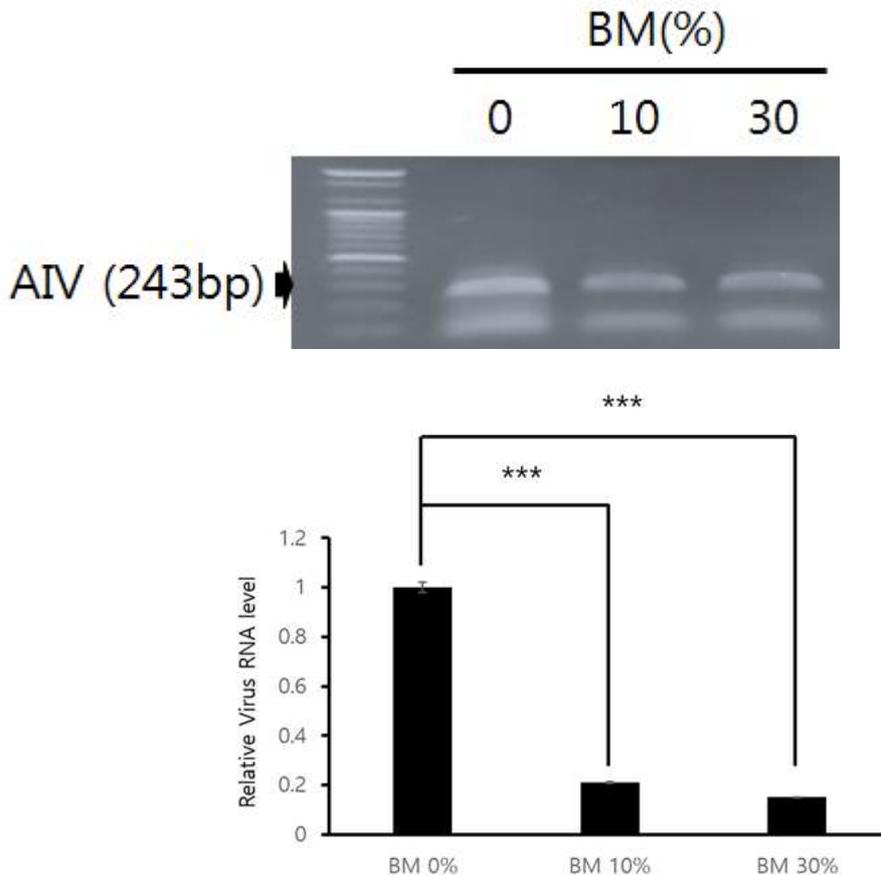


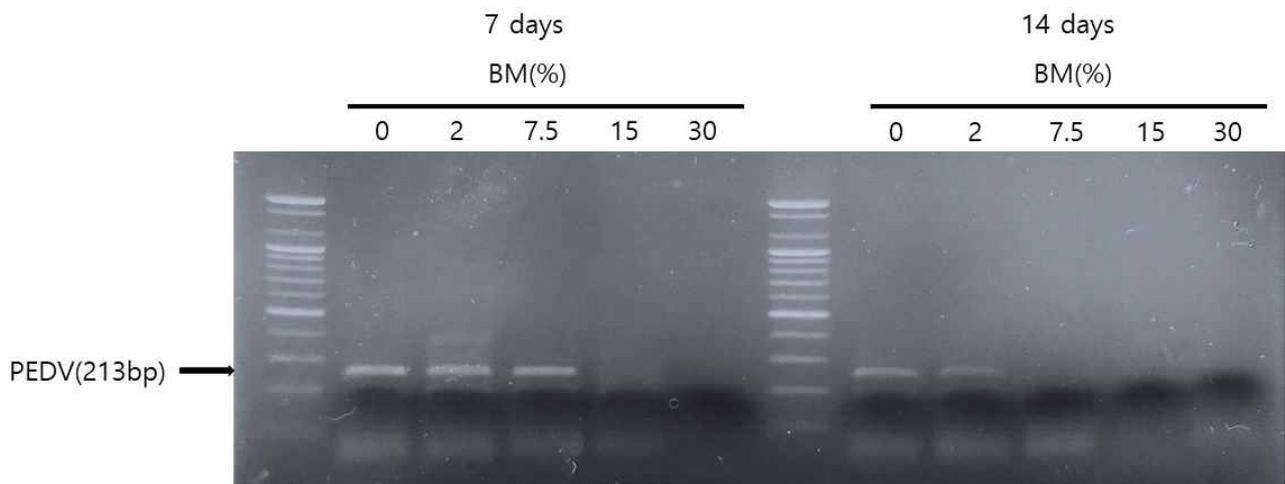
그림 9. 0-30%로 희석된 바이오매직 용액과 돼지 분변에 인플루엔자 바이러스

입자가 혼합되어 있을 때 인플루엔자 바이러스 RNA의 주형 량의 변화(\*\*\*) P ≤ 0.001)

(다) 바이오매직 용액은 PEDV 바이러스의 감염을 감소시킬 수 있다.

바이오매직 용액을 희석처리한 후 PEDV 바이러스를 전자현미경으로 관찰한 결과, PEDV 바이러스는 바이오매직 용액에 의하여 바이러스의 피막에 있는 단백질이 분해됨을 확인하였다. 농장에서 직접 채취한 돼지 분변시료(100mg/ml) 중 PEDV 바이러스가 양성 반응으로 나온 분변에는 PEDV 바이러스가 실제로 존재한다고 가정하고 바이오매직 용액을 처리하였을 때, 바이러스 RNA가 분해되는지 여부를 확인하고자 하였다. 그림 10에서는 농장에서 채취한 돼지 분변 중 PEDV 바이러스 입자가 함유된 것을 확인한 돼지분변에 바이오매직 용액을 희석하여 그 농도별로 7일과 14일 동안 처리하였다. 각 실험군에서 RNA를 정제하여 RT-PCR을 수행하였다. PEDV 바이러스 RNA 주형 량은 2% agarose gel 상에서 전기영동을 실시하여 측정하였다.

7일간 15%와 30% 희석농도의 바이오매직 용액을 처리하였을 때, PEDV 바이러스의 RNA 양은 감소하였다. 14일간 2%, 7.5%, 15%, 30% 농도로 바이오매직 용액을 처리 하였을 때는 PEDV 바이러스 RNA 주형 량이 농도에 따라 감소하였다. 바이오매직 용액을 더 오랫동안 처리하게 되면 더 낮은 농도의 바이오매직 용액에서도 RNA가 분해되는 결과를 확인하였다. 이들 결과로 볼 때, 바이오매직 용액은 돼지분변에 섞여 있는 PEDV 바이러스를 파괴시킬 뿐만 아니라 RNA 유전체도 분해하는 활성이 있음을 시사한다.



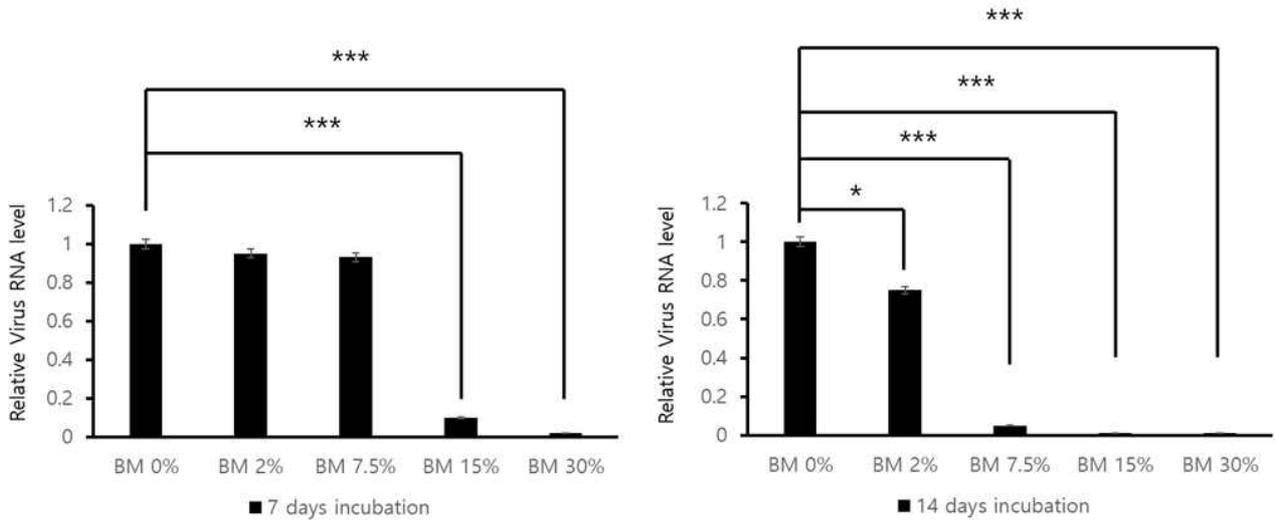
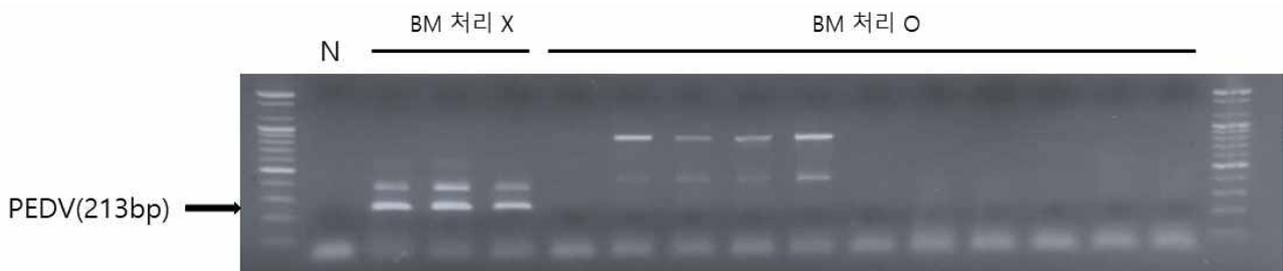


그림 10. 0-30%로 희석한 바이오매직 용액에 의해 돼지 분변에 섞여 있는 PEDV 바이러스 RNA 주형 량의 변화(\*\*\* P ≤ 0.001, \* P ≤ 0.05)

(라) 돼지농장 4곳과 소 농장 1곳에서의 바이오매직 용액살포 및 미살포에 의한 PEDV, PRRSV, FMDV 각 바이러스에 대한 억제효과 검증.

지금까지 실험실 조건에서의 바이오매직 용액을 PEDV 바이러스에 감염된 분뇨에 처리하였을 때, PEDV 바이러스 구조가 붕괴되고, 그 바이러스의 RNA 또한 파괴되는 사실을 확인하였다. 따라서, 바이오매직 용액의 항바이러스 효과가 사육농장에서는 어떻게 나타나는가를 확인하여 할 것으로 생각하여 이를 집중 살포한 농장(상록수, 재운농장)과 간헐적인 살포농장(아산, 보령농장) 그리고 전혀 살포하지 않은 농장(화성 농장)에서 직접 돼지의 분변을 채취하고 PEDV, PRRSV, FMDV 바이러스의 특이적인 프라이머를 사용하여 특이적으로 각 바이러스의 존재 여부를 확인하였다. 바이오매직 용액을 집중 처리하지 않은 3개의 국내 농장(간헐적으로 살포한 농장 포함)과 바이오매직 용액을 집중 처리한 2개의 국내 농장을 분류하여 8개월 동안 총 80개의 분변시료에서 바이러스 RNA를 정제하여 RT-PCR을 수행하였다. 각 바이러스의 RNA 주형량은 2% agarose gel 상에서 전기영동을 실시하여 측정하였다.

바이오매직 용액을 집중 처리 하지 않은 농장에서 채취한 대부분의 돼지분변에서의 PEDV 바이러스는 양성 반응이 나타났지만 바이오매직 용액을 집중 처리한 농장에서의 시료에서는 음성반응이 나타났다. (그림 11)



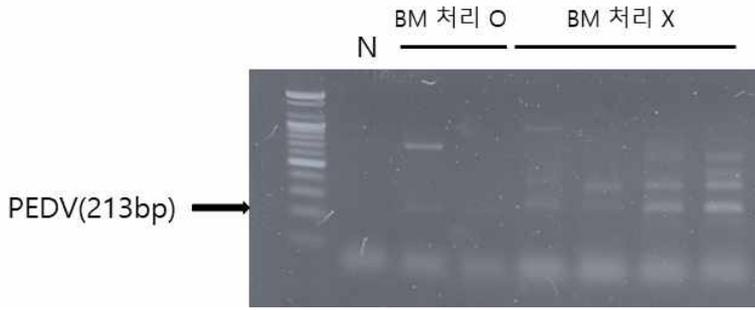


그림 11. 바이오매직을 집중처리한 농장과 집중처리하지 않은 농장의 돼지분변에서 검출된 PEDV 바이러스 RNA 주형량 (N=negative control)

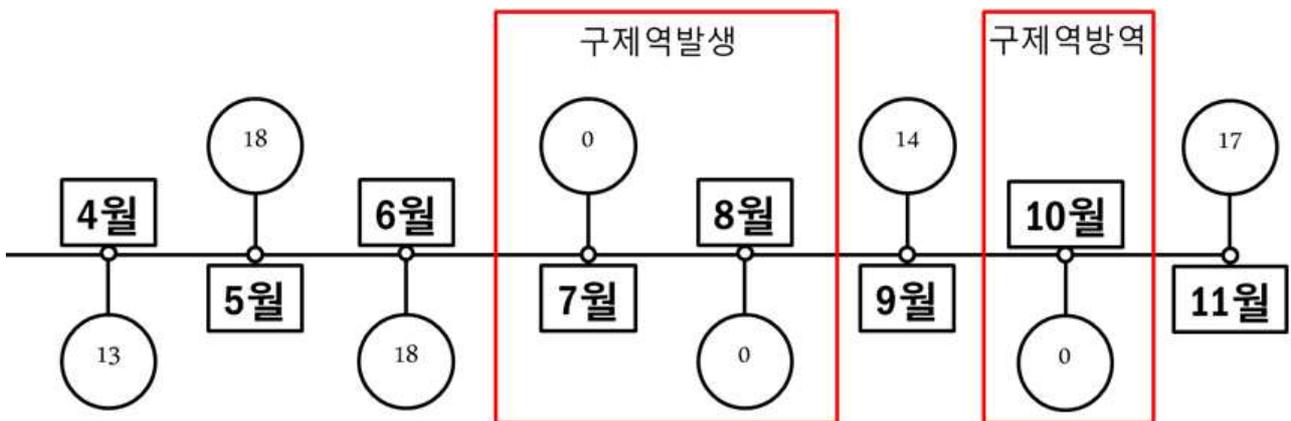


그림 12. 2018년 4월-11월(8개월) 동안 각 농장에서 80개의 분변을 채취하고 분변을 100mg/ml 으로 희석하여 RT-PCR 진행

4월에는 13개(그림13), 5월에는 18개(그림14), 6월에는 18개(그림15), 9월에는 14개(그림16), 11월에는 17개(그림17)의 돼지 분변 샘플을 채취하여 바이러스 RNA를 정제하여 RT-PCR을 수행하여 바이러스의 RNA주형량을 측정하였다. 7월과 8월은 구제역이 발생하여 샘플 채취가 어려웠고 10월은 구제역방역에 의해 농장 출입이 제한되었다. 돼지 분변은 PBS로 100mg/ml로 희석한 샘플을 이용하여 바이러스의 RNA 주형량을 측정하였다.

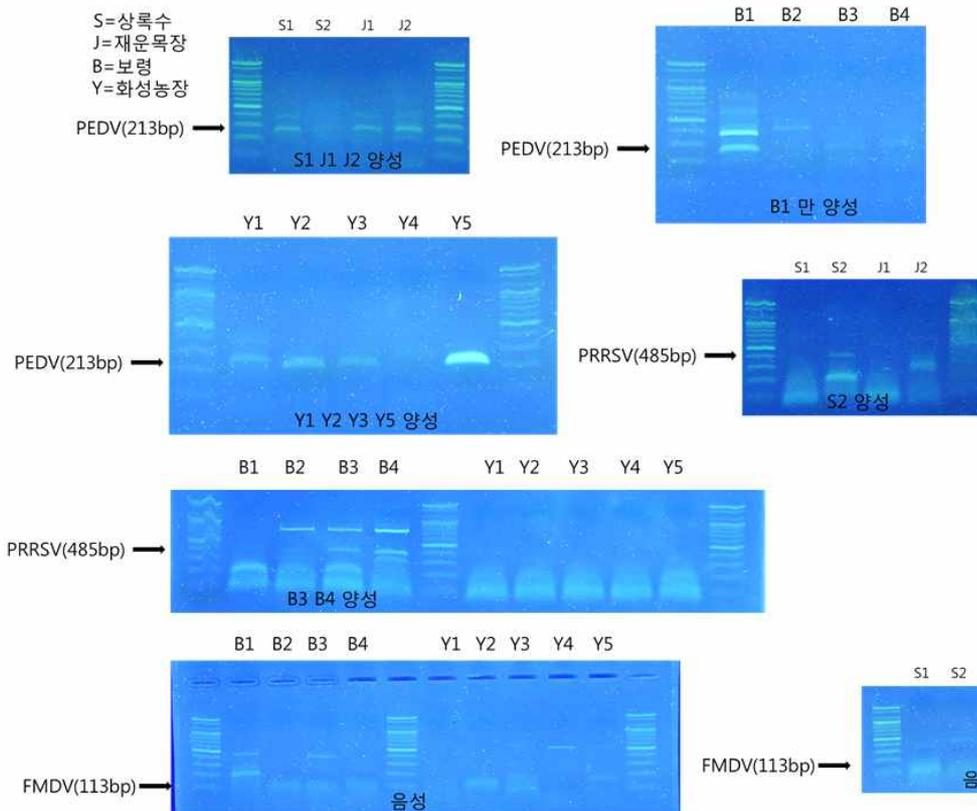


그림 13. 4월에 채취한 분변 샘플에서 RNA를 추출하여 PEDV, PRRSV, FMDV 바이러스 RNA를 기반으로 디자인한 특이적 primer를 사용하여 RT-PCR을 진행한 결과

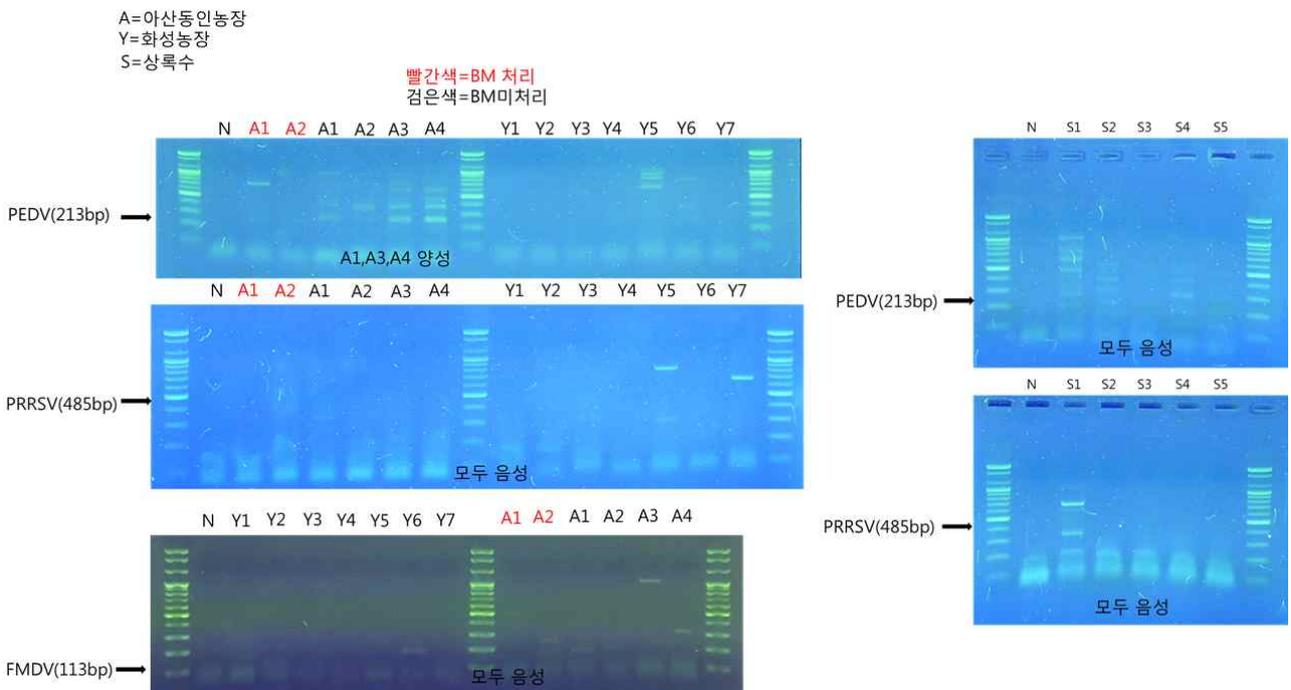


그림 14. 5월에 채취한 분변 샘플에서 RNA를 추출하여 PEDV, PRRSV, FMDV 바이러스 RNA를 기반으로 디자인한 특이적 primer를 사용하여 RT-PCR을 진행한 결과

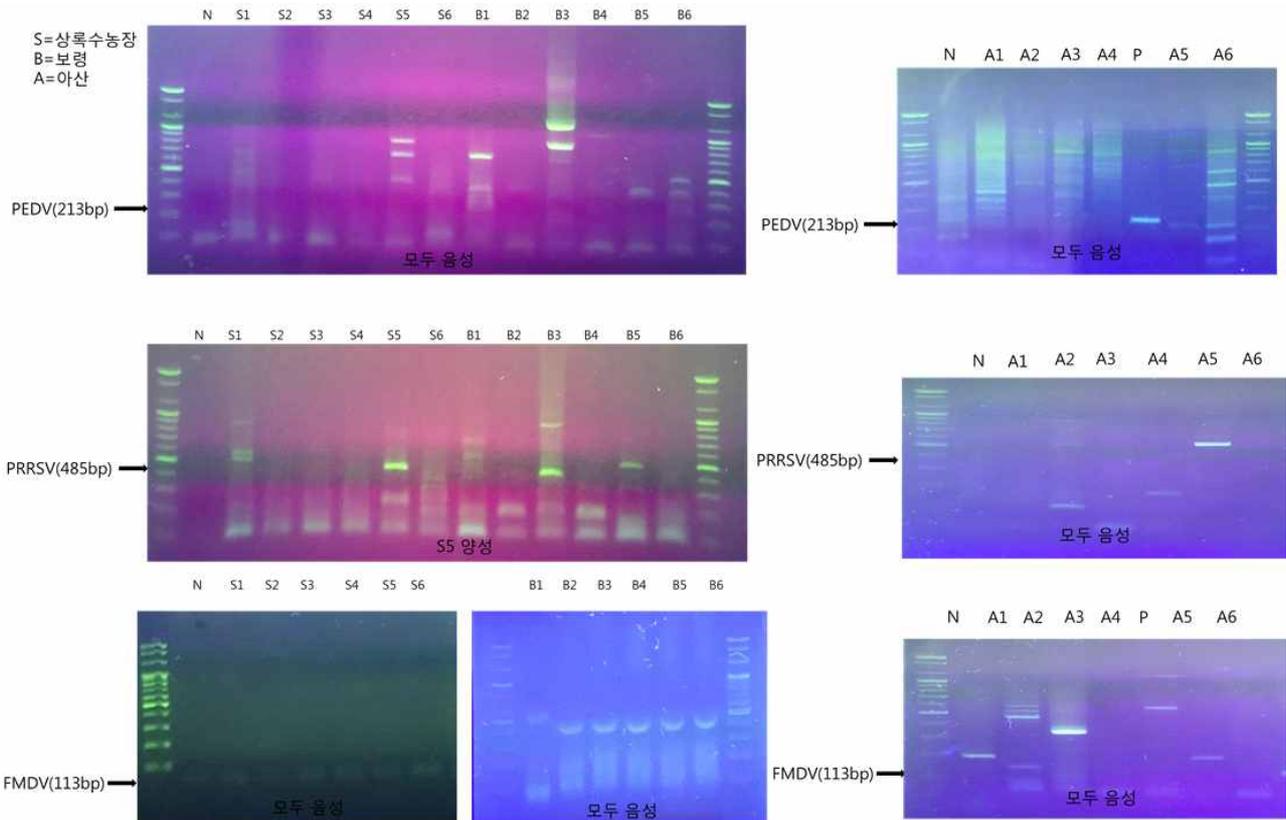


그림 15. 6월에 채취한 분변 샘플에서 RNA를 추출하여 PEDV, PRRSV, FMDV 바이러스 RNA를 기반으로 디자인한 특이적 primer를 사용하여 RT-PCR을 진행한 결과

A=아산통인농장  
Y=양돈협회지부장(화성농장)  
S=상록수

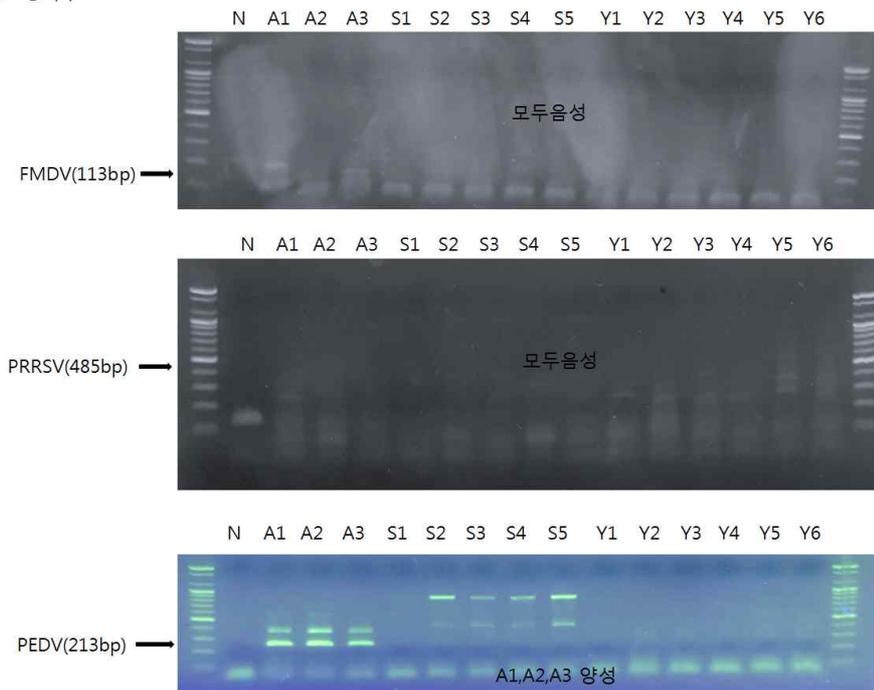


그림 16. 9월에 채취한 분변 샘플에서 RNA를 추출하여 PEDV, PRRSV, FMDV 바이러스 RNA를 기반으로 디자인한 특이적 primer를 사용하여 RT-PCR을 진행한 결과

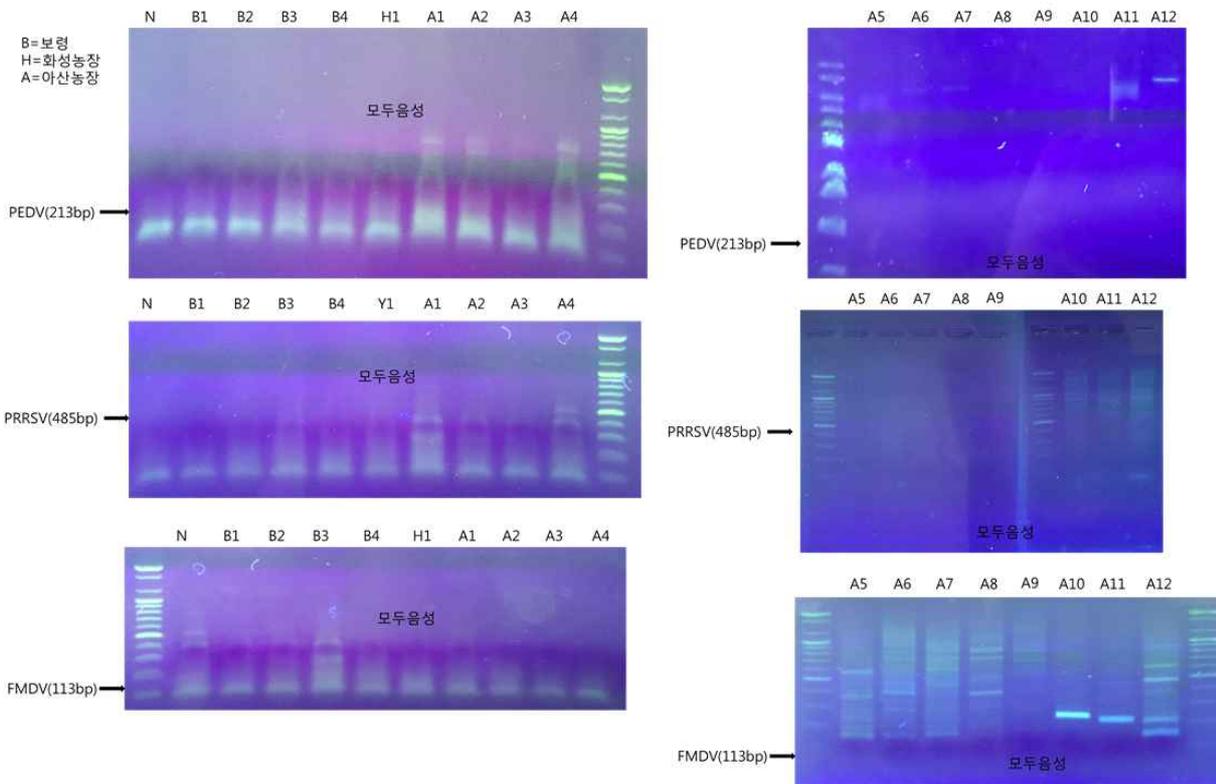


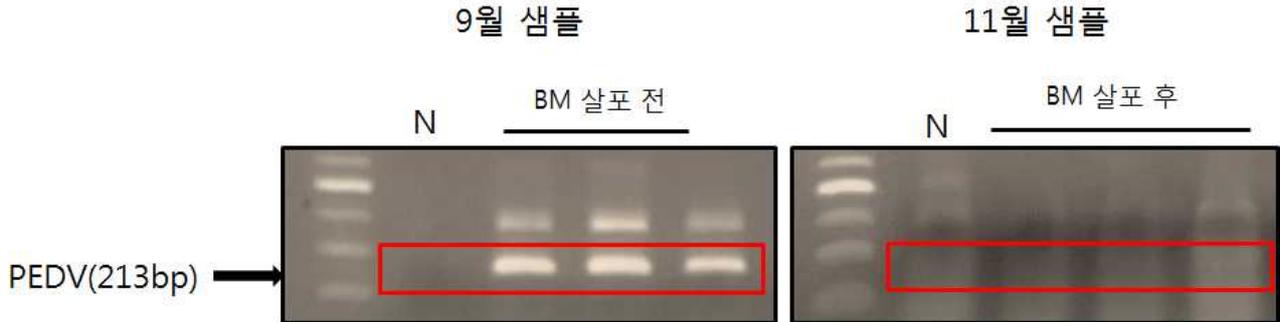
그림 17. 11월에 채취한 분변 샘플에서 RNA를 추출하여 PEDV, PRRSV, FMDV 바이러스 RNA를 기반으로 디자인한 특이적 primer를 사용하여 RT-PCR을 진행한 결과

총 80개의 분변 샘플(100mg/ml)을 분석하였을 때 바이오매직 용액을 집중 처리하지 않은 농장에서 채취한 돼지분변 시료에서 PEDV 바이러스가 21.1% 양성 반응이 나타났고 바이오매직 용액을 직접 처리한 농장에서는 10.7%로 양성 반응이 나타났다 (표2). 국내 농장에서 바이오매직 용액을 집중 처리 하였을 때 돼지 분변 시료에서 PEDV 바이러스가 집중 처리하지 않은 농장에 비해 낮은 비율로 나타나는 것으로 확인되었다. 이들 결과로 볼 때, 국내 농장에서 바이오매직 용액을 처리하게 되면 돼지 분변에 존재하는 PEDV 바이러스를 파괴하여 바이러스 감염을 억제할 수 있음을 시사한다. 하지만 PRRSV나 FMDV 바이러스 경우 국내 농장에서 채취한 돼지 분변에서 양성반응으로 나오는 시료의 수가 적어서 바이오매직용액의 효과를 확인할 수 없었다.

표 2. 바이오매직 용액을 집중 처리하지 않은 농장과 바이오매직 용액을 집중 처리한 농장의 분변샘플에서 PEDV, PRRSV, FMDV 바이러스가 양성반응으로 검출된 샘플의 수와 퍼센트(%)

	BM을 집중 처리하지 않은 시료	BM을 집중 처리한 시료
PEDV	21.1% (11/52)	10.7% (3/28)
PRRSV	3.8% (2/52)	3.5% (1/28)
FMDV	0% (0/52)	0% (0/28)

(마) PEDV 양성반응이 나온 아산농장에서 바이오매직 용액을 1달 동안 바이오매직 용액을 주기적으로 살포 했을 때 PEDV RNA 주형량이 감소



9월 아산농장의 돼지분변 샘플들이 PEDV에 감염된 것으로 확인되어 1달 동안 바이오매직 용액을 주기적으로 살포하고 11월에 아산농장 샘플을 채취하여 PEDV바이러스의 RNA 주형량에 변화가 있는지 확인하였다. 바이오매직용액을 주기적으로 살포하고 수거 했던 11월 샘플에서는 PEDV 바이러스의 RNA 주형량이 검출 되지 않았다. 이는 국내 PEDV 바이러스에 감염된 농장에 최소 1 달 동안 바이오매직을 주기적으로 살포하게 되면 분변 속에 존재하는 PEDV 바이러스 감염 억제 효과를 기대할 수 있다.

라. 바이오매직 용액에 의한 바이러스 입자구조의 변성 확인

(가) 인플루엔자 바이러스 입자의 구조단백질에 영향을 입히는 바이오매직 용액

표 1에서와 그림 5에서 본 바, 바이오매직 용액은 바이러스에 처리할 경우 바이러스 입자의 구조에 영향을 미쳐서 숙주세포주에 침투해 들어가지 못하게 됨을 알 수 있다. 바이오매직 용액을 처리한 후 인플루엔자 바이러스의 구조단백질에 변성을 일으킨다는 사실은 인플루엔자 바이러스에 바이오매직 용액을 농도별로 같은 시간 동안 처리한 후 바이러스의 단백질 패턴을 SDS-PAGE 전기영동으로 확인해 보면 확실히 알 수 있다(그림 12).

그림 12에서와 같이, 바이오매직 용액은 농도가 높을수록 바이러스 입자의 피막단백질인 HA 또는 NA 단백질이나 뉴클레오캡시드 구조단백질의 구조적 편성을 변화시키는 것이 확실하다.

이로써 바이오매직 용액은 바이러스 입자의 구조를 변경시켜서 바이러스 입자들이 숙주세포에 있는 바이러스 수용체와의 결합이 완성되지 못하게 함을 추론할 수 있다.

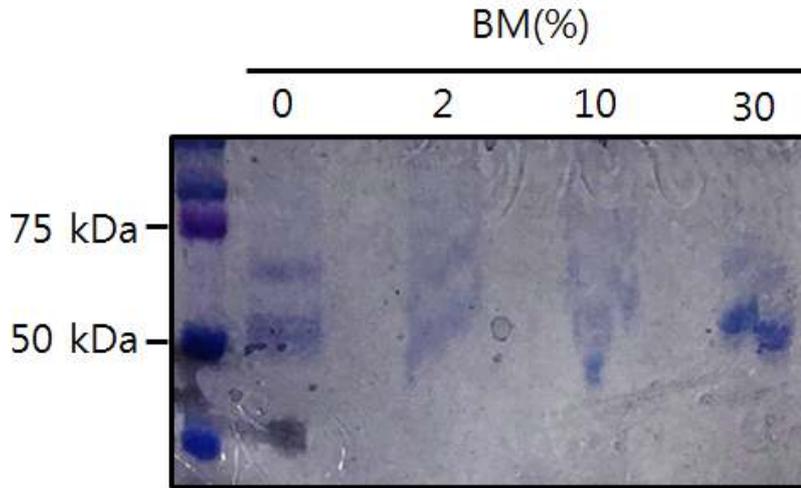


그림 19. 바이오매직 용액을 0-30%로 처리 하였을 때, 인플루엔자 바이러스 입자를 구성하는 주요 구조단백질의 변성

### 3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

#### 3-1. 목표

- 돼지에게 치명적인 질병을 가져오는 구제역(FMDV), 돼지 설사병(PEDV), 인플루엔자(IAV) 바이러스들이 있으며, 닭이나 오리들에게는 인플루엔자(AIV) 바이러스들, 그리고 소에게는 주로 구제역(FMDV) 바이러스들이 있는데, 이들은 주로 RNA를유전체로 갖고 있으며, 바이러스 구조상 icosahedron 또는 enveloped virus 구조를 하고 있다. 이들 구조가 숙주세포에 침투할 때 숙주세포 표면에 있는 수용체(viral receptor)와 결합한다.
- 지금까지의 예비 실험 결과 Bio-magic Solution은 이들 바이러스 구조를 붕괴시키거나 아직 알려지지 않은 기작으로 바이러스의 달라붙음(attachment)이나 세포 내 증식을 억제하는 것으로 나타나고 있다. 따라서 Bio-Magic Solution은 가축사육장에 침투하는 바이러스들의 감염력(infectivity)이나 생존력(viability)에 커다란 영향을 미치고 있는 것 같다.
- 따라서 본 연구의 목표는 악취 제거 능력이 출중한 Bio-Magic Solution이 가축 사육장에 침투한 여러 바이러스들을 파괴하거나 증식을 억제하게 하여 방제할 수 있는가를 현장검증으로 확인하여 상시방역 용액으로 활용하고자 하는데 있다.

#### 3-2. 목표 달성여부

- FMDV 바이러스의 경우, 5개 농장에서 채취한 분변 시료에서는 RT-PCR방법에 의해 양성판정되는 결과가 없었음.
- PEDV 바이러스의 경우;
  - \* 안성 상록수 농장의 경우, 악취제거 살포와 돼지 음용수에도 바이오매직 용액을 처리하여 PEDV 1개 시료에서 1회 검출되었음.
  - \* 보령과 아산시 농장의 경우 바이오매직 용액 살포가 정기적이지 못했으므로 인하여 자주 양성으로 검출됨.
  - \* 화성시 소재 소 농장 1개와 돼지 농장 1개에서는 바이오매직 용액을 살포하지 않음으로서 돼지 농장에서는 간헐적으로 PEDV 양성 반응으로 검출됨.
- AIV 바이러스의 경우, 5개 농장 모두에서 음성반응으로 바이러스 RNA 검출되지 않음.

#### 3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

- 결론적으로, 집단으로 사육하는 돼지의 개체별 진단이 매우 어려웠으며, 여름철에는 돼지설사병이 다수 발생하는 농장들 때문에 전반적으로 시료채취가 매우 어려웠음.
- 가장 확실한 바이오매직 용액에 의한 바이러스 감염 및 전파에 대한 결론에 도달하기 위해서는 단독의 농장에서 정해진 개체 수에 따라 그리고 바이오매직 용액의 계속 살포와 전혀 살포하지 않는 집단에 대한 개별 돼지에 따라 검출 여부를 측정하는 것이 정확한 결과를 확보할 수 있을 것으로 보임.
- 본 연구결과를 유추해 보면, 지금까지 화학소독제에 의존하는 방역문제를 바이오매직 용액과 같은 성능을 가진 방역용품으로 상시살포하여 예방적인 방역이 되는 방안이 시급히 요구된다고 본다. 따라서 차후 후속 연구계획을 세워서 “광범위 항미생물제제를 이용한 상시살포”에 의한 방역효과로 기존 감염된 농장의 병원성 미생물의 퇴치와 앞으로 감염될 수 있는 각종 위급한 병원균의 감염에 대한 대비책을 강구하는 것이 필요하다고 생각된다.

#### 4. 연구결과의 활용 계획 등

##### 가. 활용분야

- 환경 친화적인 상시방역 가능한 방역용품화

##### 나. 활용방안

- 바이오매직 용액의 약취제거제 + 사육장 내 항-바이러스 제제를 위한 친환경 방역용품화

##### 다. 추가 연구 필요성

- 별도의 실제 돼지 농장 또는 가금류 사육장을 세우고 사육되는 일정한 숫자의 가축을 사육하면서 정기적으로 바이오매직 용액을 살포하면서 개별 개체마다의 인위적인 감염과 바이러스 전파 및 방역여부를 정확히 판별할 수 있는 연구가 최소 2년간 이루어질 필요성이 분명히 있다고 판단한다.

##### 라. 참여기업 제품홍보

- 참여기업에서는 바이오매직 용액을 돼지 농장에서의 약취제거제로 판매중이지만, 이번 과제의 결과를 활용하여 돼지 농장과 가금류 사육장 그리고 축산농장 등 가축사육에 의한 약취제거 및 각종의 유해성 바이러스성 질환을 치료 또는 예방하는 차원의 제품으로 홍보하여도 좋을 것으로 사료된다.

## 붙임. 참고문헌

Huang CC, Jong MH, Lin SY. 2000. Characteristics of the foot and mouth disease virus in Taiwan. *J Vet Med Sci.* 62:677 - 679

Han HY, Zheng HH, Zhao Y, Tian RB, Xu PL, Hou HL, Chen HY, Yang MF. 2019. Development of a SYBR green I-based duplex real-time fluorescence quantitative PCR assay for the simultaneous detection of porcine epidemic diarrhea virus and porcine circovirus 3. *Mol Cell Probes.* 2019 Feb 5. pii: S0890-8508(18)30262-7.

Chen P, Wang K, Hou Y, Li H, Li X, Yu L, Jiang Y, Gao F, Tong W, Yu H, Yang Z, Tong G, Zhou Y. 2019. Genetic evolution analysis and pathogenicity assessment of porcine epidemic diarrhea virus strains circulating in part of China during 2011-2017. *Infect Genet Evol.* 69:153-165

Sirichokchatchawan W, Temeeyasen G, Nilubol D, Prapasarakul N. 2018. Protective Effects of Cell-Free Supernatant and Live Lactic Acid Bacteria Isolated from Thai Pigs Against a Pandemic Strain of Porcine Epidemic Diarrhea Virus. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 10(2):383-390

Guo N, Zhang B, Hu H, Ye S, Chen F, Li Z, Chen P, Wang C, He Q. 2018. Caerin1.1 Suppresses the Growth of Porcine Epidemic Diarrhea Virus In Vitro via Direct Binding to the Virus. *Viruses* 10(9). pii: E507

Gallien S, Fablet C, Bigault L, Bernard C, Toulouse O, Berri M, Blanchard Y, Rose N, Grasland B. 2018. Lessons learnt from a porcine epidemic diarrhea (PED) case in France in 2014: Descriptive epidemiology and control measures implemented. *Vet Microbiol.* 226:9-14

Hu H, Jung K, Wang Q, Saif LJ, Vlasova AN. 2018. Development of a one-step RT-PCR assay for detection of pancoronaviruses ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, and  $\delta$ -coronaviruses) using newly designed degenerate primers for porcine and avian fecal samples. *J Virol Methods.* 256:116-122.

Zhou X, Zhang T, Song D, Huang T, Peng Q, Chen Y, Li A, Zhang F, Wu Q, Ye Y, Tang Y. 2017. Comparison and evaluation of conventional RT-PCR, SYBR green I and TaqMan real-time RT-PCR assays for the detection of porcine epidemic diarrhea virus. *Mol Cell Probes.* 33:36-41.

Masuda T, Tsuchiaka S, Ashiba T, Yamasato H, Fukunari K, Omatsu T, Furuya T, Shirai J, Mizutani T, Nagai M. 2016. Development of one-step real-time reverse

transcriptase-PCR-based assays for the rapid and simultaneous detection of four viruses causing porcine diarrhea. *Jpn J Vet Res.* 64(1):5-14

Liu X, Wang Q. 2016. Reverse transcription-PCR assays for the differentiation of various US porcine epidemic diarrhea virus strains. *J Virol Methods.* 234:137-41.

주 의

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