



"정부3.0, 국민과의 약속"



충북대학교 산학협력단



수신 (주)씨엔엘
(경유)

제목 최종 보고서 제출

1. 귀 기관의 무궁한 발전을 기원합니다.
2. 우리대학 모인필교수가 수행한 연구용역의 최종 보고서를 붙임과 같이 제출합니다.

과제명	과제기간	연구비	비고
은이온 살균기의 닭 유래 병원체들에 대한 살균효과 검증	2015. 5. 1. ~ 2015. 12. 31.	15,000천원	

붙임 최종보고서 1부(원본 별도송부). 끝.

충북대학교 산학협력단장



★사무담당자 신윤정 팀장
협조자

전결 09/03
임한숙

시행 산학협력단-12969 (2015.09.03.) 접수 ()

우 28644 충청북도 청주시 서원구 충대로 1 / <http://www.chungbuk.ac.kr/>

전화 (043)261-3894 /전송 (043)261-3334 / yunjo31@chungbuk.ac.kr / 공개

은이온 활성수기에서 생산된
은이온수의 닭 유래 병원체들에 대한
항바이러스 및 살균효과 검증

제출일자: 2015. 09. 01

충북대학교 수의과대학 조류질병학교실

책임교수: 모 인 필 

제 출 문

(주) 씨엔엘 귀하

본 보고서를 “은이온 활성수기에서 생산된 은이온 활성수의 닭 유래 병원체들에 대한 항바이러스 및 살균효과 검증” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2015년 09월01일

충북대학교 수의과대학 조류질병학 교실
연구책임자 : 모 인 필

결과 요약

1. 제 목

은이온 활성수기에서 생산된 은이온활성수의 닭 유래 병원체들에 대한 항바이러스 및 살균효과 검증

2. 시험목적

H9N2 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스 (Low pathogenic avian influenza virus:LPAI)와 2종류 살모넬라균 (Salmonella enteritidis :SE, Salmonella gallinarum:SG)에 대한 은이온 활성수기에서 생산된 은이온 활성수의 항바이러스 및 살균효과를 측정하는 것임.

3. 시험내용 및 범위

검증시험은 다음과 같은 과정으로 진행하였다.

○ LPAI 바이러스에 대한 항바이러스 효과

- 은이온 활성수기를 통해 얻은 각 농도별 원료물질(은이온 활성수)를 LPAI 바이러스의 배양액과 섞은 후 최장 24시간까지 반응시간별로 SPF (Specific Pathogen free) 계란을 이용하여 종란접종법을 실시하였다. 모든 실험은 두 번 반복하였으며 최종 바이러스 농도 (EID 50) 는 Reed and Muench 방법을 통해 측정하였다.

○ 살모넬라균에 대한 효과

- 은이온 활성수기를 통해 얻은 각 농도별 원료물질(은이온 활성수)를 두 종류의 살모넬라균 SE와 SG 배양액과 섞은 후 그 혼합액을 BSA 배지에 도말하여 2일 동안 배양한 후 살균효과를 측정하였다. 모든 실험은 두 번 반복하였다.

4. 시험결과 결과요약

○ SPF 종란 접종법을 통하여 은이온 활성수의 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 효능을 비교하여 보았다. 그 결과 고농도의 은이온 활성수(2, 5, 10ppm)를 함유한 시료를 LPAI 바이러스와 혼합한 후 24시간 동안 반응한 실험군에서 음성 대조군과 비교하였을 때 통계학적으로 유의성있는 항바이러스 효과를 확인할 수 있었다.

- 국내 양계농장에서 경제적 피해를 주는 주된 병원체 중에 하나인 Salmonella gallinarum 균주와 주요 식중독균인 Salmonella enteritidis 균에 대한 은이온 활성수의 억제효과를 측정한 결과 저농도의 은이온 활성수와 30분 이상 반응한 모든 실험군에서 명확한 살균효과를 관찰할 수 있었다.

목 차

제1장 연구개발과제의 개요-----	1
제2장 은이온 활성수의 LPAI 바이러스에 대한 항바이러스 실험(1차실험: 저농도 실험)	
가. 목적 -----	1
나. 재료 및 방법 -----	1
다. 실험결과 및 고찰 -----	3
제3장 은이온 활성수의 LPAI 바이러스에 대한 항바이러스 실험(2차실험: 고농도 실험)	
가. 목적 -----	4
나. 재료 및 방법 -----	4
다. 실험결과 및 고찰 -----	6
제4장 은이온 활성수의 Salmonella enteritidis 억제 실험 -	
가. 목적 -----	7
나. 재료 및 방법 -----	7
다. 실험결과 및 고찰 -----	9
제5장 은이온 활성수의 Salmonella gallinarum 억제 실험	
가. 목적 -----	10
나. 재료 및 방법 -----	10
다. 실험결과 및 고찰 -----	12
제6장 연구개발과제에 대한 최종 고찰-----	13

1. 개요

은이온 활성수기를 이용하여 생산된 원료물질(이하 은이온 활성수로 명명)의 항바이러스 혹은 살균효과에 대하여 검증하였다. 항바이러스 효과는 국내 양계산업에서 유행하고 있는 저병원성 조류인플루엔자바이러스(Low Pathogenic Avian Influenza: LPAI H9N2 형)을 대상으로 종란접종법을 이용하여 측정하였으며 실험의 신뢰성을 높이기 위하여 2회 반복하여 실시하였다. 살균효과는 살모넬라균의 여러 혈청형 중 공중보건학적으로 중요한 Salmonella enteritidis(SE)와 국내 양계산업에서 직접적 경제적 피해를 끼치는 Salmonella gallinarum(SG)를 대상으로 측정하였으며 모든 실험은 2회 반복하여 실시하였다.

2. 은이온 활성수의 LPAI 바이러스에 대한 항바이러스 실험(1차실험: 저농도 실험)

가. 목적

은이온 활성수기에서 생성된 저농도 은이온 활성수의 H9N2 형 LPAI 바이러스에 대한 항 바이러스 효과를 종란접종법을 이용하여 검증한다.

나. 재료 및 방법

1) 공시동물

미국의 SPAFAS 회사로부터 수입된 SPF (Specific Pathogen Free)종란을 구입한 후 충북대학교 수의과대학 조류질병학교실의 부화기(윤선부화기, 수원)에서 발육시켜 11일령이 되었을 때 시료를 접종하였다.

2) 바이러스 및 배양

국내에서 분리되어 특성이 규명된 A/CK/ANYANG/MS96(H9N2) AI 바이러스를 SPF 계란에서 증식시킨 후 Reed and Muench 방법을 이용하여 $10^{9.3}$ EID₅₀/ml 으로 증폭시킨 후 다음과 같이 실험에 사용하였다.

3) 농도별 은이온 수와 바이러스 배양액 혼합

은이온 활성수기를 4단계 농도별 (0.25ppm, 0.5ppm, 1ppm, 2ppm)로 설정한 다음, 생성된 은이온 활성수를 시험용액으로 사용하였다. 각 농도별 시험용액 9.9ml에 LPAI 바이러스 배양액 0.1ml을 혼합하였다.

혼합 직후, 30분, 1시간, 2시간, 6시간, 24시간 동안 상온에서 반응시킨 후 각각 반응시간별로 10^3 부터 10^8 으로 희석한 후 각 농도별로 5개씩 SPF 종란에 접종하였다. 접종 후 2일 동안 37°C 배양을 하고 냉장 온도에서 4시간 이상 칠링(chilling)시킨 후 계란 요막강액을 채취하였다. 채취한 요막강액은 5% 닭 적혈구를 이용한 평판 혈구응집 반응을 실시하여 바이러스 양성여부를 판단하였으며 혈구응집 후 바이러스 농도는 Reed and Muench 방법을 이용하여 EID₅₀/ml 을 측정하였다.

다. 실험 결과 및 고찰

표1. 농도별 은이온수의 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 효과

Concentration of silver ion (ppm)	Incubation time (hr)	EID ₅₀ /ml (log ₁₀ value) ^b		Average	p value
		1	2		
0	0	8.7	9.1	8.9	
	0.5	8.8	8.4	8.6	
	2	8.7	8.6	8.65	
	6	9.5	8.6	9.05	
	24	8.6	8.6	8.6	
0.25	0	9.2	9.4	9.3	0.107768
	0.5	8.8	9.3	9.05	0.147533
	2	8.6	8.2	8.4	0.174528
	6	8.8	9.2	9	0.464194
	24	8.6	8.5	8.55	0.211325
0.5	0	9.4	9.3	9.35	0.115825
	0.5	9.6	8.8	9.2	0.155876
	2	8.8	8.6	8.7	0.349244
	6	8.6	9.4	9	0.470689
	24	8.5	8.8	8.65	0.385292
1	0	8.6	8.6	8.6	0.136197
	0.5	8.3	9.2	9.25	0.394721
	2	8.5	9.4	8.95	0.287868
	6	8.4	8.6	8.5	0.177584
	24	7.6	8.5	8.05	0.173059
2	0	8.6	9.5	9.05	0.394721
	0.5	8.5	8.6	8.55	0.415485
	2	8.7	8.8	8.75	0.146447
	6	8.5	8.8	8.65	0.243926
	24	7.5	7.8	7.65	0.012018*

* 통계학적으로 음성 대조군에 비교하여 항바이러스 효과 유효 (p < 0.05)

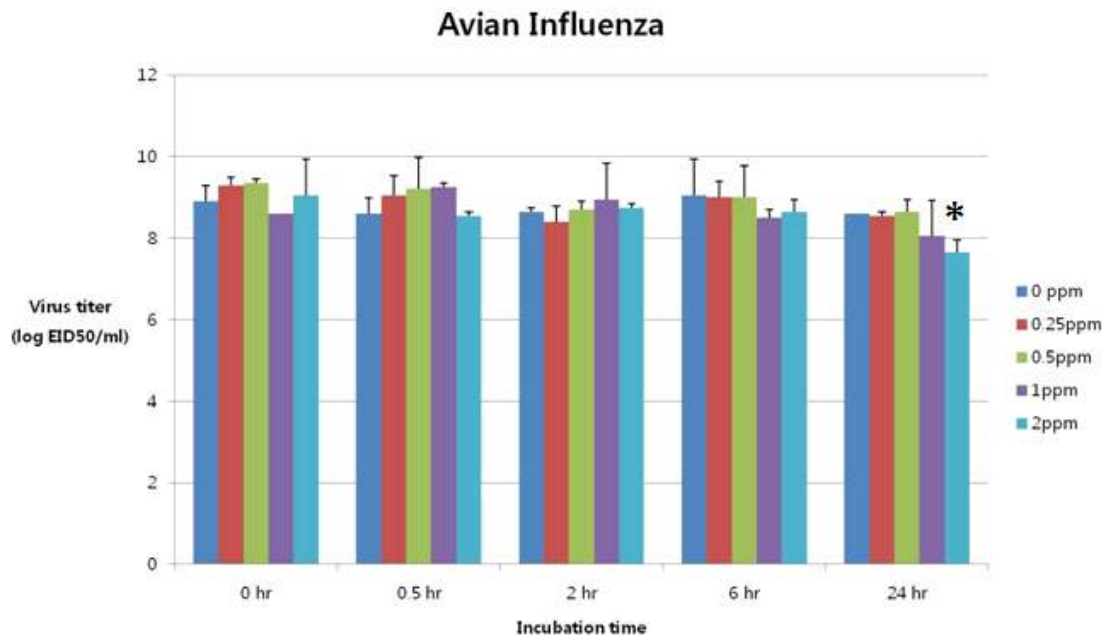


그림 1. 은이온 활성수의 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 효과

에러바 : 95% 신뢰구간

* 통계학적으로 음성 대조군에 비교하여 항바이러스 효과 유효($p < 0.05$)

H9N2 저병원성 바이러스에 대한 각 농도별 은이온 활성수의 중화시험을 실시하여 표1과 그림1에 요약하였다. 각 농도별 항바이러스 효과는 2ppm 은이온 활성수를 24시간 이상 처리하였을 때에만 음성 대조군과 비교 시 통계학적으로 유효한 항바이러스 효과가 관찰되었다. 따라서 본 실험에서 사용한 은이온 활성수농도보다 더 높은 농도에서의 항바이러스 효과를 측정하기 위하여 추가 실험을 실시하였다.

3. 은이온 활성수의 LPAI 바이러스에 대한 항바이러스 실험(2차실험: 고농도 실험)

가. 목적

은이온 활성수기에서 생성된 고농도 은이온 활성수의 H9N2 형 LPAI 바이러스에 대한 항 바이러스 효과를 종란접종법을 이용하여 검증한다.

나. 재료 및 방법

1) 공시동물

미국의 SPAFAS 회사로부터 수입된 SPF (Specific Pathogen Free)종란을 구입한 후 충북대학교 수의과대학 조류질병학교실의 부화기(윤선부화기, 수원)에서 발육시켜 11일령이 되었을 때 시료를 접종하였다.

바이러스 및 배양

국내에서 분리되어 특성이 규명된 A/CK/ANYANG/MS96(H9N2) AI 바이러스를 SPF 계란에서 증식시킨 후 Reed and Muench 방법을 이용하여 $10^{9.3}$ EID₅₀/ml 으로 증폭시킨 후 다음과 같이 실험에 사용하였다.

3) 농도별 은이온 수와 바이러스 배양액 혼합

은이온 활성수기를 3단계 농도별 (0ppm, 5ppm, 10ppm) 설정한 다음, 생성된 은이온 활성수를 시험용액으로 사용하였다. 각 농도별 시험용액 9.9ml에 LPAI 바이러스 배양액 0.1ml을 혼합하였다. 혼합 직후, 30분, 1시간, 2시간, 6시간, 24시간 동안 상온에서 반응시킨 후 각각 반응시간별로 10^3 부터 10^8 으로 희석한 후 각 농도별로 5개씩 SPF 종란에 접종하였다. 접종 후 2일 동안 37℃ 배양을 하고 냉장 온도에서 4시간 이상 칠링(chilling)시킨 후 계란 요막강액을 채취하였다. 채취한 요막강액은 5% 닭 적혈구를 이용한 평판 혈구응집 반응을 실시하여 바이러스 양성여부를 판단하였으며 혈구응집 후 바이러스 농도는 Reed and Muench 방법을 이용하여 EID₅₀/ml 을 측정하였다.

다. 실험결과 및 고찰

표2. 고농도 은이온수의 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 효과

Concentration of silver ion (ppm)	Incubation time (hr)	EID50/ml (log ₁₀ value) ^b		Average	p value
		1	2		
0	0	9.6	9.8	9.75	
	0.5	9.6	9.6	9.6	
	2	9.6	9.8	9.7	
	6	9.8	9.6	9.7	
	24	8.2	8.2	8.2	
5	0	9.5	9.4	9.45	0.077423
	0.5	8.7	9.5	9.1	0.168867
	2	9.3	8.7	9	0.07865
	6	9.4	8.5	8.95	0.122634
	24	0	0	0	<0.00001*
10	0	9.4	9.2	9.3	0.052786
	0.5	9.5	8.4	8.95	0.179379
	2	7.7	9.2	8.45	0.120164
	6	8.7	8.8	8.75	0.006785*
	24	0	0	0	<0.00001*

* 통계학적으로 음성 대조군에 비교하여 항바이러스 효과 유효 (p<0.05)

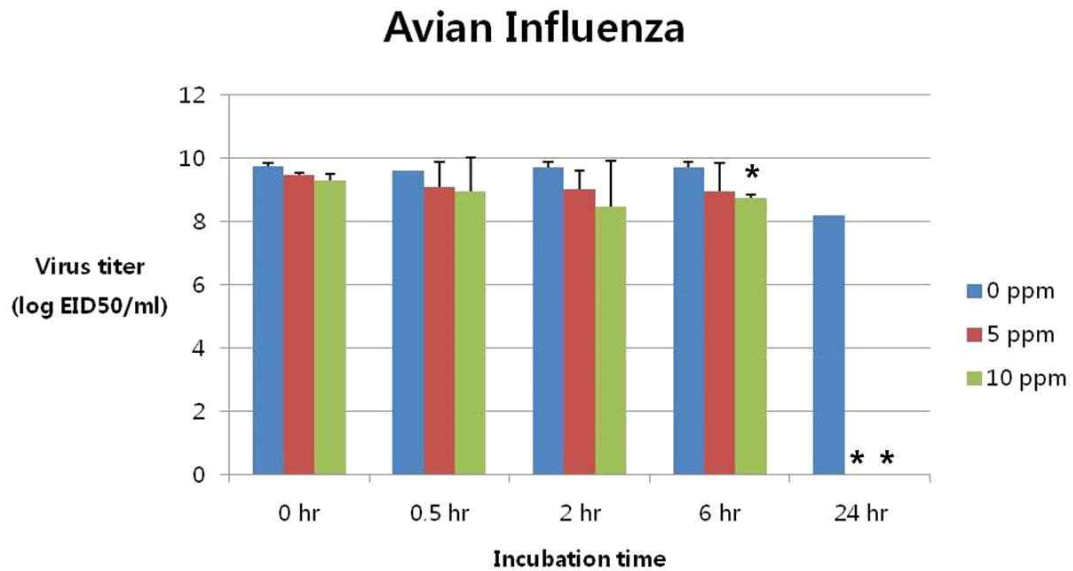


그림 2. 고농도 은이온 수의 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 효과

에러바 : 95% 신뢰구간

* 통계학적으로 음성 대조군에 비교하여 항바이러스 효과 유효 ($p < 0.05$)

H9N2 저병원성 바이러스에 대한 각 농도별 은이온 활성수의 중화시험을 실시하여 표2와 그림2에 요약하였다. 각 농도별 항바이러스 효과는 5ppm 은이온수를 24시간 처리, 10ppm 은이온 수를 6시간 이상 처리하였을 때 음성 대조군과 비교 시 통계학적으로 유효한 항바이러스 효과가 관찰되었다. 특히 24시간 이상 고농도 은이온 수를 처리 시 LPAI 바이러스는 모두 사멸된 것으로 나타났다.

4. 은이온 활성수의 *Salmonella enteritidis* 억제 실험 (장염균)

가. 목적

은이온 활성수기에서 생성된 은이온활성수의 주요 식중독균인 *Salmonella enteritidis* 균에 대한 살균 효과를 측정한다.

나. 재료 및 방법

1) 세균 배양

국내에서 양계농가에서 분리되어 혈청학적 특성이 규명된 *Salmonella enteritidis*(SE) 균을 TSB (tryptic soy broth)에 37℃, 24시간 동안 배양시킨 후 원심분리를 4000g, 20분 동안 실시하고 0.1% peptone water (pH7.1)을 이용하여 Washing 및 Resuspension을 실시하여 공시균주로 실험에 사용하였다.

2) 농도별 은이온수와 세균 배양액 혼합 및 배양

고형배지에서의 세균집락수 측정이 가능하도록 액체 배양액을 10⁵으로 희석한 후 그 희석액 0.1ml과 농도별 은이온 활성수 9.9ml을 TSA (Tryptic soy agar) 배지에 도말한 후 37℃에서 48시간 동안 배양하였다.

3) Colony 수 계산

모든 실험은 두 번 반복 실험하였으며 TSA고형배지에 배양된 세균집락 수 계산은 blind test 로 진행하였다.

표3. 은이온 활성수의 *Salmonella enteritidis*에 대한 살균 효과

Concentration of silver ion (ppm)	Incubation time(hr)	Number of colonies		Average	p value
		1	2		
0	0	388	402	395	
	0.5	168	131	149.5	
	2	30	16	23	
	6	3	4	3.5	
	24	0	0	0	
0.25	0	379	312	345.5	0.142494
	0.5	19	21	20	0.00993*
	2	0	0	0	0.04073*
	6	0	2	1	0.077423
	24	0	0	0	NA**
0.5	0	259	340	349.5	0.07289
	0.5	38	21	29.5	0.013799*
	2	0	0	0	0.040734*
	6	0	0	0	0.009902*
	24	0	0	0	NA**
1	0	208	409	308.5	0.240514
	0.5	33	33	33	0.012151*
	2	0	0	0	0.040734*
	6	0	0	0	0.009902*
	24	0	0	0	NA**
2	0	281	384	332.5	0.176105
	0.5	7	6	6.5	0.00817*
	2	0	0	0	0.040734*
	6	0	0	0	0.009902*
	24	0	0	0	NA**

* 통계학적으로 음성 대조군에 비교하여 살균 효과 유효 ($p < 0.05$)

** 해당사항없음

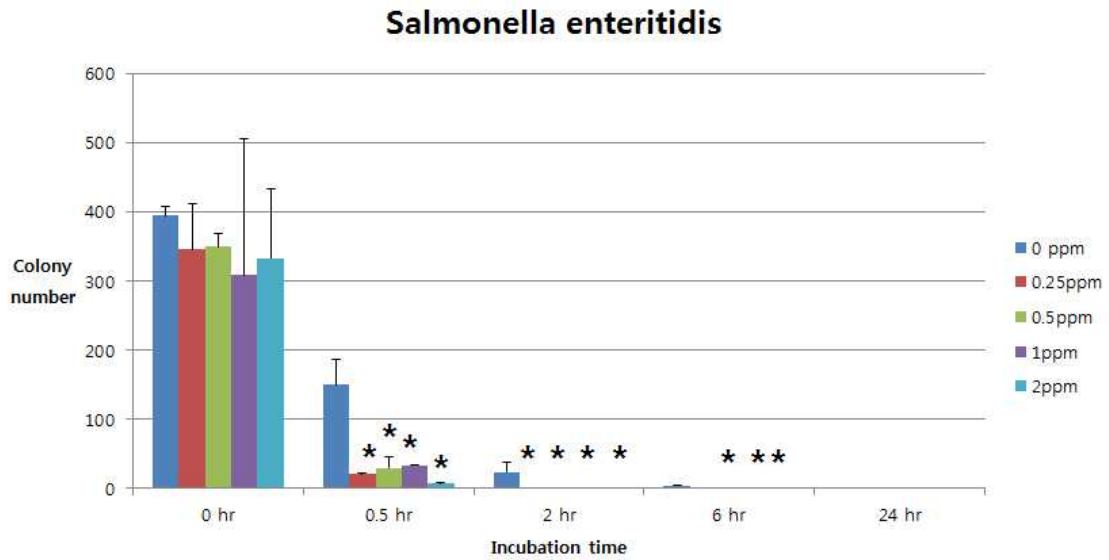


그림 3. 은이온 활성수의 *Salmonella enteritidis* 균에 대한 살균 효과

에러바 : 95% 신뢰구간

* : 통계학적으로 음성 대조군에 비교하여 항바이러스 효과 유효 ($p < 0.05$)

국내 주요 식중독균인 *Salmonella enteritidis* 균에 대한 각 농도별 은이온 활성수의 중화시험을 실시하여 표3과 그림3에 요약하였다. 각 농도별 살균 효과는 0.25ppm 이상의 모든 은이온 수를 세균 배양액과 30분 이상 처리했을 때부터 통계학적으로 유효한 살균효과가 관찰되었다.

5. 은이온 활성수의 *Salmonella gallinarum* 억제 실험 (가금 티푸스)

가. 목적

은이온 활성수기에서 생성된 은이온활성수의 *Salmonella enteritidis* 균에 대한 살균 효과를 측정한다.

나. 재료 및 방법

1) 세균 배양

국내에서 양계농가에서 분리되어 혈청학적 특성이 규명된 *Salmonella enteritidis*(SE) 균을 TSB (tryptic soy broth)에 37℃, 24시간 동안 배양시킨 후 원심분리를 4000g, 20분 동안 실시하고 0.1% peptone water (pH7.1)을 이용하여 Washing 및 Resuspension을 실시하여 공시균주로 실험에 사용하였다.

2) 농도별 은이온수와 세균 배양액 혼합 및 배양

고형배지에서의 세균집락수 측정이 가능하도록 액체 배양액을 10⁵으로 희석한 후 그 희석액 0.1ml과 농도별 은이온 활성수 9.9ml을 TSA (Tryptic soy agar) 배지에 도말한 후 37℃에서 48시간 동안 배양하였다.

3) Colony 수 계산

모든 실험은 두 번 반복 실험하였으며 TSA고형배지에 배양된 세균집락 수 계산은 blind test 로 진행하였다.

표4. 은이온 활성수의 *Salmonella gallinarum*에 대한 살균 효과

Concentration of silver ion (ppm)	Incubation time(hr)	Number of colonies		Average	p value
		1	2		
0	0	324	245	284.5	
	0.5	43	50	46.5	
	2	14	12	13	
	6	0	0	0	
	24	0	0	0	
0.25	0	216	200	208	0.099048
	0.5	2	0	1	0.00317*
	2	0	0	0	0.002933*
	6	0	0	0	NA**
	24	0	0	0	NA**
0.5	0	218	273	245.5	0.251426
	0.5	0	4	2	0.004053*
	2	0	0	0	0.002933*
	6	0	0	0	NA**
	24	0	0	0	NA**
1	0	221	141	181	0.103477
	0.5	1	1	1	0.002933*
	2	0	0	0	0.002933*
	6	0	0	0	NA**
	24	0	0	0	NA**
2	0	80	129	104.5	0.030338*
	0.5	0	0	0	0.002809*
	2	0	0	0	0.002933*
	6	0	0	0	NA**
	24	0	0	0	NA**

*: 통계학적으로 음성 대조군에 비교하여 살균 효과 유효 ($p < 0.05$)

** 해당사항없음

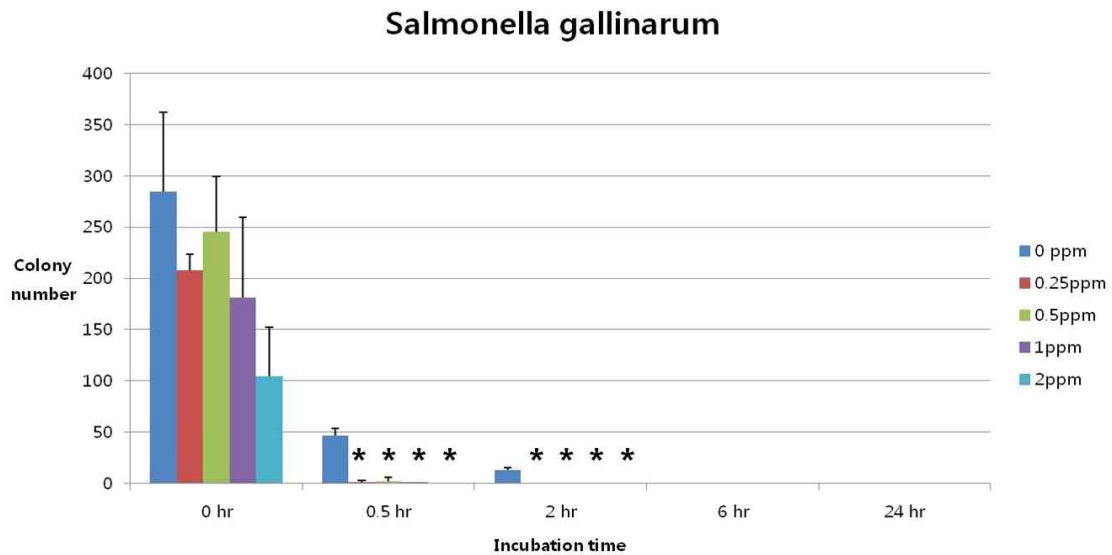


그림 4. 은이온 수의 *Salmonella gallinarum* 균에 대한 살균 효과

에러바 : 95% 신뢰구간

*: 통계학적으로 음성 대조군에 비교하여 살균 효과 유효 ($p < 0.05$)

국내 양계산업에서 경제적 피해를 일으키는 주요 병원체인 *Salmonella gallinarum* 균에 대한 각 농도별 은이온 활성수의 살균시험을 실시하여 표4과 그림4에 요약하였다. 각 농도별 살균 효과는 0.25ppm 이상의 모든 은이온 수에서 30분 이상 처리했을 때 모두 통계학적으로 유효한 것으로 판단되었다. 특히 2ppm의 은이온 활성수에서는 살균효과가 30분후부터 매우 빠르게 나타나는 것으로 확인된다.

6. 시험결과에 대한 최종 고찰

본 실험에서는 은이온 활성기에서 유래된 은이온활성수의 양계 유래 병원체에 대한 항바이러스 및 살균효과를 측정하였다. 본 실험에 사용된 H9N2 저병원성 조류인플루엔자 바이러스(LPAI)는 비교적 높은 농도 (2ppm, 5ppm, 10ppm)의 은이온 수에서 24시간 이상 반응시킬 때 통계학적으로 유효한 항바이러스 효과가 관찰되었다. 그러나 은이온 활성수 10ppm의 농도에서는 6시간 이상 반응시켰을 때부터 항바이러스 효과가 있는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 고농도인 10ppm에서는 최소 6시간 정도의 접촉이 있어야 하며 일반 적인 10ppm이하 2ppm의 농도에서는 24시간이상 은이온 활성수와 접촉이 유지되어야 바이러스가 비동화된다는 것을 의미한다.

양계 농가에서 막대한 경제적 피해와 사람의 식중독을 유발하는 두종류의 살모넬라균 (Salmonella enteritidis 및 Salmonella gallinarum)에 대한 살균 효과를 측정한 결과, 두 살모넬라균 모두 저농도 (0.25ppm)에서부터 고농도 (2ppm)까지 최소 30분간만 처리한다면 효율적인 살균효과가 있다는 것이 확인되었다.

이번 실험을 통하여 실험실내의 환경에서는 조류인플루엔자의 경우 10ppm이상, 살모넬라균의 경우 0.25ppm이상 은이온 활성수 처리 시 효율적인 항바이러스 및 살균효과가 있는 것으로 판단이 된다. 그러나 양계산업의 현실에서는 다양한 환경의 농장이 존재함으로 본 과제의 원료물질인 은이온 활성수의 항바이러스 혹은 살균효과를 보기 위해서는 다양한 농장의 다양한 요소를 고려하여 적용하여야 할 것으로 판단된다.