

<원 저>

## Citronella 및 lemongrass oil의 생리활성 및 단회 경구 투여 독성시험

박지용<sup>1,2</sup> · 김진윤<sup>2</sup> · 장승희<sup>1</sup> · 김해중<sup>1</sup> · 이승진<sup>2</sup> · 박승춘<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>(주)크린바이오 부설연구소, <sup>2</sup>경북대학교 수의과대학

(접수: 2015년 2월 9일, 수정: 2015년 2월 23일, 게재승인: 2015년 3월 5일)

## Biological activities and acute oral toxicity of citronella and lemongrass oil

Ji-Yong Park<sup>1,2</sup>, Jin-Yoon Kim<sup>2</sup>, Seung-Hee Jang<sup>1</sup>, Hae-Jung Kim<sup>1</sup>, Seung-Jin Lee<sup>2</sup>, Seung-Chun Park<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Cleanbio Research Institute, Daejeon 301-212, Korea

<sup>2</sup>College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

(Received: February 9, 2015; Revised: February 23, 2015; Accepted: March 5, 2015)

**Abstract :** This study was performed to investigate the antibacterial, antioxidant, and termite repellent effects of citronella oil (CiO) and lemongrass oil (LO). When the antibacterial activity against *Staphylococcus (S.) aureus* with various levels of antibacterial resistance were tested, a 0.05% concentration of CiO and LO completely inhibited the growth of all tested *S. aureus* strains. Evaluation of the antioxidant effect demonstrated that the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity of CiO was 2~3 times greater than that of LO. Among trial products made with various combinations of CiO and LO, a CiO : LO ratio of 6 : 4 had the most potent termite repellent effects. Assessment of acute toxicity of the trial product showed that the LD<sub>50</sub> was more than 2,000 mg/kg. Based on the above results, CiO and LO have antibacterial, antioxidant, and termite repellent activities. Therefore, both compounds could be potential termites repellent reagents.

**Keywords :** citronella oil, lemongrass oil, DPPH, termites repellent

## 서 론

흰개미는 세계적으로 약 2,800여 종이 분포하고 우리나라에는 흰개미(*Reticulitermes speratus kyushuensis* Morimoto)와 집흰개미(*Coptotermes formosanus* Shiraki) 2종이 서식한다고 알려졌다. 우리나라 전역에 분포하고 있는 흰개미는 일본흰개미다. 흰개미는 흰개미목(Isoptera)에 속하는 곤충으로 최근에는 흰개미목을 바퀴목(Dictyoptera)의 아목으로 취급하기도 한다 [2]. 흰개미는 자연계에서는 부패한 산물을 분해하는 익충이지만 목조 문화재를 위협하는 해충이므로 합성 살충제가 아닌 천연 기피제로 목조 문화재 근처에는 서식하지 못하게 하면서 생태환경을 보존하는 방법이 중요하다. 공중보건학적인 관점에서도 사람과 동물에서 개미의 구제가 중요한 이유는 일차적으로 개미로부터 발생할 수 있는 개미 독에 의한 알레르기 반응이 있고, 이차적으로는 개미가 병원균의 매개체나 기생충의 중간 숙주로 활동하고 있어서다 [16].

1938년부터 DDT가 개발되어 해충방제에 많은 공헌을 한 것은 사실이나 이러한 살충제의 장기간 사용은 생태계를 파괴하는 엄청난 부작용을 일으켰다. 최근에는 생태계를 보전하는 한 방법으로 유해동물 및 곤충에 대한 기피 효과가 있는 식물 정유의 개발이 한창 진행 중이다. 식물 정유는 식물이 생존을 위하여 분비하는 물질로서 여러 유해동물에 대한 기피제로 개발되고 있으며 향균제의 역할도 가능하다 [12, 15, 28]. 또한 식물 정유는 휘발성 2차 대사산물로서 항산화, 항염증, 항암활성을 가진다 [21]. 이러한 식물 정유를 함유한 방향성 식물은 17,500여 종 [5]이 있으며 알려진 식물 정유만 해도 3,000여 종이다. 이 중에서 300여 종류가 화장품 또는 제약업에 이용되고 있다 [3].

Citronella oil (CiO)은 무독성의 biopesticide이다. CiO는 해충 기피제 혹은 사료섭취 억제제뿐만 아니라 동물 기피제로 사용하고 있다 [24, 29]. CiO는 *Cymbopogon nardus* (Rendal)과 *Cymbopogon winterianus*(Jowitt)에서 증류추출이

\*Corresponding author

Tel: +82-53-950-5964, Fax: +82-53-950-5964

E-mail: parksch@knu.ac.kr

된다. CiO는 Ceylon type과 Java type이 있다. Lemongrass oil(LO)은 45여 종의 다양한 풀에서 추출되며 학명은 *Cymbopogon citrates*(또는 *Cymbopogon Flexus*)이다. LO는 유기농 채소의 *Salmonella enterica*에 대한 항균작용이 보고 되었으며 [22], *Staphylococcus (S.) aureus*에 대한 항균작용 뿐만 아니라 anti-biofilm 활성이 뛰어난 것으로 보고되었다 [1]. CiO와 LO는 모기 기피 효과와 항균활성으로 많이 알려졌다 [14, 20]. 특히, 최근 연구에서 CiO의 항진균효과도 밝혀졌다 [18].

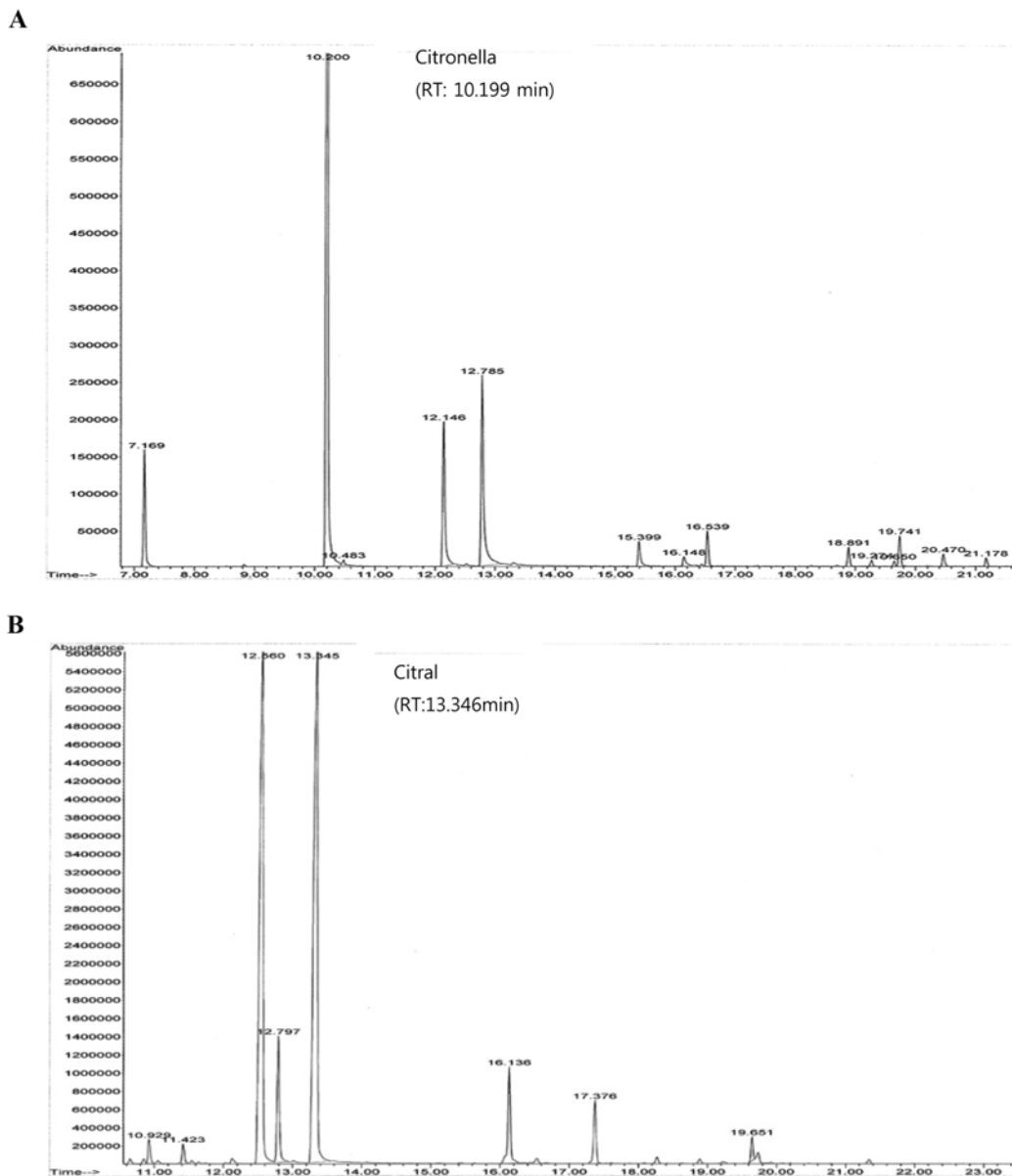
따라서 본 연구에서는 CiO와 LO를 이용하여 병원성 세균의 전파를 억제하는 항균기능, 정유 자체의 항산화 작용, 흰

개미를 이용한 개미 기피 효과 그리고 CiO와 LO의 혼합 정유의 안전성을 확보하기 위한 단회 경구 투여 독성시험을 시행하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료 및 추출

실험에 사용된 식물 정유인 CiO와 LO는 *Cymbopogon winterianus* Jowitt와 *Cymbopogon Flexus*에서 각각 증류분리 추출법과 증류필터 추출법으로 추출한 오일을 (주한빛향료(한국)에서 구매하여 사용하였다. CiO와 LO에 대한 지표



**Fig. 1.** Chromatogram of (A) citronella oil (CiO) and (B) lemongrass oil (LO) using by GC-MS. The most common component of citronella oil was citronella (retention time [RT]: 10.199 min) and lemongrass oil was citral (RT: 13.346 min). Citronella and citral were selected standard compounds of two essential oils.

물질로 citronella 35% 이상, 그리고 LO는 citral 60% 이상 함유한 것을 GC-MS로 지표물질을 확인한 후에 사용하였다 (Fig. 1). 해당 시험에 적절한 농도로 희석하여 건냉암소에 보관하며 사용하였다.

### 항균활성 검색

CiO와 LO의 항균효력을 측정하기 위하여 병원성 시험 균주인 *S. aureus* KCCM 11593, KCCM 11812, KCCM 40510, KCCM 40511, KCCM 40881, KCCM 41291, 그리고 KCCM 41294의 7종을 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM)에서 분양받아 시험에 사용하였다. 이들 균주에 대한 각각의 특성은 Table 1에 요약하였다. 시험 균주의 배양배지는 tryptic soy broth (TSB; Difco, USA)로 37°C에서 하룻밤 배양하였다. 전배양된 균주는 항균활성 시험에 사용하였고 항균활성 측정배지는 Mueller-Hinton broth(MHB; Difco)를 사용하였다.

CiO와 LO의 항균활성의 측정법은 디스크확산법 [7]으로 다음과 같이 실시하였다. 즉, 전배양된 세균을 MHB 배양액 5 mL에 접종하여 37°C에서 진탕 배양을 하였다. 배양된 균주는 준비된 Muller-Hinton agar(MHA; Difco)에 균일하게 섞은 후 실온에서 굳혔다. 멸균 처리한 종이디스크에 준비된 CiO와 LO를 유화제 SG200(sodium gluconate)으로 1%, 5%, 10%로 각각 희석하여 60 µL씩 흡착시켰고 시험 배지 위에 흡착된 종이디스크를 올린 다음 37°C에서 하룻밤 배양하였다. 배양 후 저지환의 지름(mm)을 측정하였다.

### 최소억제농도 측정

CiO와 LO의 최소억제농도(minimum inhibitory concentration [MIC]) 측정은 미량 액체배지 희석법(broth microdilution method)을 변형하여 사용하였다. 표준 균주인 *S. aureus*(ATCC 25923)를 TSB 배지에 37°C에서 하룻밤 전배양을 하였다. 전배양 균주를 5 mL의 TSB에  $1 \times 10^8 \sim 10^6$  CFU/mL로 희석하여 사용하였다. 배양 균주와 CiO와 LO를 96-well plate에 100 µL씩 각각 주입하고 37°C에서 하룻밤 배양하고 TSA 배지로 균주의 성장 여부를 판단하였다. 대조 약물로는 노출시간-의존적 항균제인 amoxicillin과 노출농도-의존적 항균제인 norfloxacin을 사용하였다. 균의 생육이 억제된 well의 농도를 MIC로 측정하였다.

### DPPH법에 의한 free radical 소거능

Blios의 방법 [4]에 따라 CiO와 LO를 에탄올 용매로 배수 희석하여 시료를 만들고, 농도별 시료 10 µL를 DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl, 100 µM) 200 µL를 혼합하여 96-well plate에 첨가한 후 37°C에서 30분 동안 배양하였다. VERSA max microplate reader(Molecular Devices, USA)를 사용하여 517 nm에서 흡광도(optical density [OD])를 측정하였다. 대조군으로 시료 추출용매, 양성 대조군으로 비타민 C(Sigma, USA)를 사용하였으며 DPPH radical 소거능은 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{DPPH radical 소거능 (\%)} = \frac{(\text{대조군 OD} - \text{시료 처치군 OD})}{\text{대조군 OD}} \times 100$$

### 흰개미 기피 효과

CiO와 LO의 개미 기피 효과를 알아보기 위하여 보존이 잘되어 있는 흰개미를 대구시 달성군 화원읍에 소재한 비바생물원 개미왕국에서 분양받았다. 분양받은 흰개미를 7일간 적응기간을 거친 후에 개미 기피 효과 실험을 진행하였다. CiO와 LO와 함께 대조물질로 개미 기피 효과가 알려진 peppermint oil(PO) 그리고 IR3535(ethyl butylacetylaminopropionate)를 사용하여 기피 효과를 아래와 같이 실시하였다 [8, 26]. A4 용지 크기의 흡착용지에 CiO, LO, PO 그리고 IR3535를 10 cm × 10 cm 크기의 구역을 정유의 선으로 흡착시켜 1시간 건조했다. 건조 후 구역 내부에 건강한 흰개미 20마리를 넣어둔 후 구역 밖으로 탈출하는 시간을 5분 간격으로 비교하였다.

### 단회 경구 투여 독성시험

실험동물은 5주령의 Sprague-Dawley 계통의 특정 병원체 부재(specific pathogen-free) rat(오리엔트바이오, 한국)로 시험군은 암컷(102.3~107.8 g)과 수컷(110.1~127.2 g) 각각 5마리씩 대조군과 투여군으로 정하였다. 최고 용량인 2,000 mg/kg [26, 30]의 용량을 고용량으로 설정하고, 500, 50, 5, 0 mg/kg 용량으로 시험군을 분류하였다. 시험군은 시료 투여 12시간 전에 절식시키고 약 3 mL/kg로 단회 경구 투여한 후 14일 동안 관찰하였다. 독성시험의 방법은 식품의약품안전처의 독성시험기준과 OECD test guideline 420 [25]에 따랐다. 임상증상 관찰은 모든 실험동물에 시료 투여 후 6시간 동안 매시간 관찰하였으며, 다음날부터 14일까지는 1일 1회씩 동물의 일반 상태의 변화, 중독 증상의 발현 및 사망 여부를 관찰하였다. 이 동물들은 인수하여 적응기간 동안 일반 증상의 이상이 관찰되지 않았다. 본 실험은 경북대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 득한 후에 실시하였다.

### 통계처리

자료의 통계처리는 SAS(ver. 9.4; SAS Institute, USA) program에 의해 one-way ANOVA 검정과 Duncan's multiple range test 방법을 이용하여 평균값 간의 차이를 유의수준  $p < 0.05$ 에서 유의성을 검정하였다. 단회 경구 투여 독성시험에서 사망동물이 관찰되지 않아 반수치사량(LD<sub>50</sub>)의 산출을 위한 통계는 시행하지 않았다.

## 결 과

### 지표물질 분석

실험에 이용한 CiO와 LO를 GC-MS로 분석한 결과, CiO의 주성분은 citronella 57.6%, trans-geraniol 15.56%, beta-citronellol 9.81%로 확인되었으며, 이 중 citronella가 가장 높은 함량을 차지하였다. LO의 주성분은 citral 35.66%,

**Table 1.** Characterization of *Staphylococcus (S.) aureus* type strains used in the present study

Strain	KCCM number	ATCC number	Antibiotic resistance
<i>S. aureus</i>	11593	12692	Noviocrin
	11812	13301	Penicillin
	40510	33591	Methicillin
	40511	33593	Methicillin and Gentamicin
	40881	29213	Susceptibility testing organism
	41291	27659	Resistant to tetracycline, novobiocin, streptomycin; constitutive resistance to macrolide antibiotics
	41294	27660	Methicillin

KCCM: Korean Culture Center of Microorganisms, ATCC: American Type Culture Collection.

**Table 2.** Susceptibility of *S. aureus* to two essential oils by the disc diffusion method

Essential oils	Concentration % (v/v)	Diameter of inhibition zone (mm)				
		KCCM 40881	KCCM 41291	KCCM 41294	KCCM 11593	KCCM 40510
Citronella oil	10	29.2 <sup>a</sup>	29.2 <sup>a</sup>	29.4 <sup>a</sup>	27.2 <sup>a</sup>	37.2 <sup>a</sup>
	5	19.7 <sup>b</sup>	17.8 <sup>b</sup>	18.2 <sup>b</sup>	18.9 <sup>b</sup>	24.1 <sup>b</sup>
	1	19.7 <sup>b</sup>	13.2 <sup>c</sup>	13.5 <sup>c</sup>	14.7 <sup>c</sup>	17.6 <sup>c</sup>
Lemongrass oil	10	36.3 <sup>a</sup>	34.6 <sup>a</sup>	33.3 <sup>a</sup>	32.0 <sup>a</sup>	41.2 <sup>a</sup>
	5	26.8 <sup>b</sup>	25.8 <sup>b</sup>	26.6 <sup>b</sup>	25.6 <sup>b</sup>	35.1 <sup>b</sup>
	1	15.6 <sup>c</sup>	14.0 <sup>c</sup>	14.6 <sup>c</sup>	15.9 <sup>c</sup>	18.5 <sup>c</sup>
Control	0	8.3	8.2	8.3	8.5	8.4

Diameter of filter disc is 8.0 mm. <sup>a</sup>Mean with difference letter within a column are significantly different by the Duncan's multiple range test (DMRT) ( $p < 0.05$ ).

beta-citral 33.04%, trans-geraniol 5.77%로 확인되었으며, 이 중 citral이 가장 높은 함량을 차지하였다. 본 연구에서 실험한 CiO와 LO의 최다 함유성분을 지표물질로 정하였다(Fig. 1).

### 항균활성

개미는 병원성 세균을 옮기는 중요한 매개체로 알려졌으므로 개미 기피제로서 항균력은 중요한 요소이다. 따라서, 본 연구에서 CiO와 LO에 대한 항균력 측정을 위하여 항균제 내성에 대한 특성이 확인된(Table 1) *S. aureus*를 분양받아서 측정한 결과를 Table 2에 요약하였다. CiO와 LO 모두 농도 의존적으로 항균력이 증가하였다. CiO와 LO의 항균력을 비교한 결과 KCCM 27660 균주가 시험한 모든 농도에서 다른 균주보다 감수성이 높은 것을 확인할 수가 있었다. 흥미롭게 항균 지름을 기준으로 비교 시 1%의 농도를 제외하고는 5%와 10%의 농도에서 LO가 CiO보다는 항균력이 우수한 것으로 확인되었다.

### MIC

CiO와 LO의 농도에 따른 항균력의 차이점을 구명하기 위하여 MIC 시험을 시행하여 그 결과를 Table 3에 나타냈다. CiO는 최종 농도 0.01%에서 KCCM 41294, KCCM 11593 균주가 성장하였고, LO는 최종 농도 0.01%에서 KCCM 11593, KCCM 40510, KCCM 11812가 성장하였다. 그러나

**Table 3.** Comparison of MIC of citronella oil (CiO), lemongrass oil (LO), amoxicillin and norfloxacin against *S. aureus*

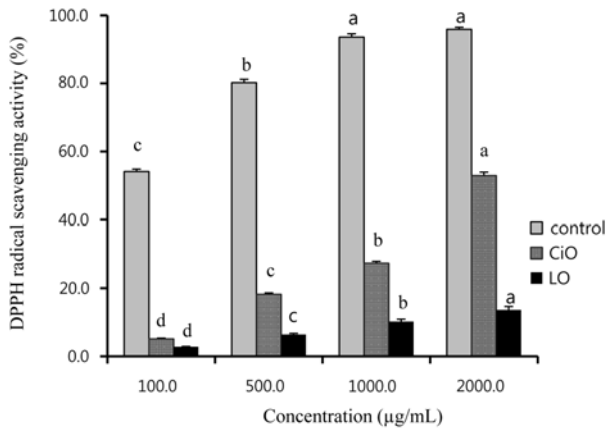
KCCM number	MIC (%)		MIC ( $\mu$ L/mL)	
	CiO	LO	Amoxicillin	Norfloxacin
KCCM 11593	0.05	0.05	0.5	1
KCCM 11812	0.01	0.05	32	4
KCCM 40510	0.01	0.05	32	4
KCCM 40511	0.01	0.01	64	1
KCCM 40881	0.01	0.05	2	2
KCCM 41291	0.01	0.01	4	1
KCCM 41294	0.05	0.01	8	2

최종 농도 0.05%에서는 CiO와 LO 모두 항생제 저항 균주의 성장을 억제했다.

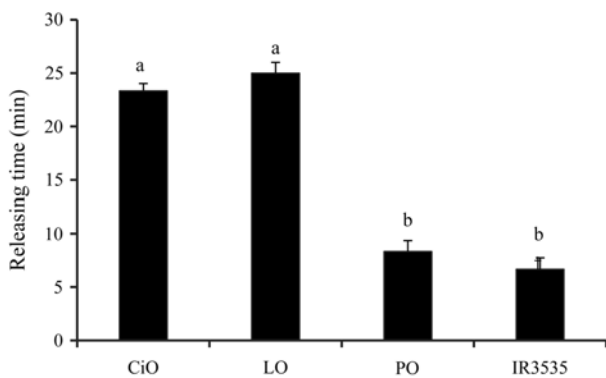
비교 항균제인 amoxicillin의 경우, penicillin과 methicillin에 저항하는 균주인 *S. aureus* KCCM 11812, KCCM 40510, KCCM 40511 등은 amoxicillin에 대한 MIC가 매우 높게 측정되어, 항균제에 저항하고 있음을 알 수 있었다.

### DPPH법에 의한 free radical 소거능

CiO와 LO 자체 원료의 항산화 능력은 제품의 구성과 안정성에 중요하다. 본 연구에서는 phenol과 aromatic amine의



**Fig. 2.** DPPH radical scavenging activity of CiO and LO following designed concentrations (0, 100, 500, 1000, and 2000 µL/mL). Ascorbic acid was used as a positive control and same concentrations. Values were expressed as mean ± SD of three independent experiments (n = 3). Mean values followed by the same letter do not differ significantly according to DMRT ( $p < 0.05$ ).



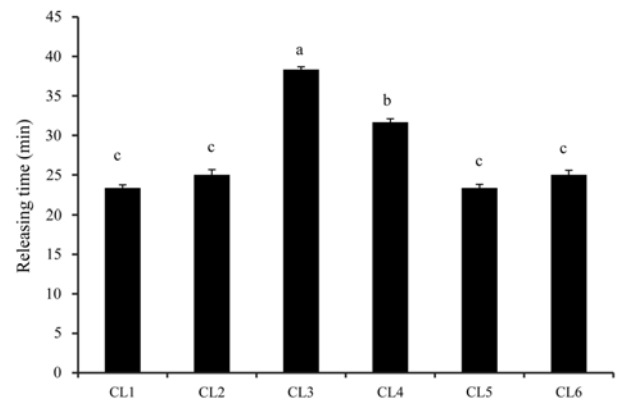
**Fig. 3.** Releasing time of termites from rectangle area using of three essential oils and a synthetic insect repellent. Values were expressed as mean ± SD of three independent experiments (n = 3). Mean values followed by the same letter do not differ significantly according to DMRT ( $p < 0.05$ ). PO: peppermint oil. IR 3535; synthetic insect repellent.

항산화 활성의 측정에 많이 사용하는 DPPH 방법을 이용하였는데, 이는 간단하면서 감도가 뛰어나서 가장 많이 사용되는 항산화력 측정방법 중 하나이다.

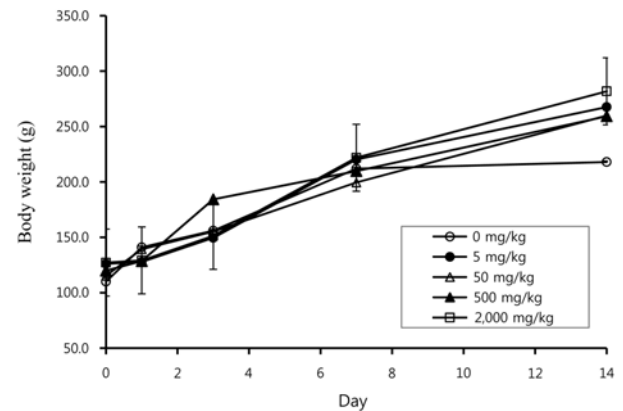
CiO와 LO는 뚜렷한 DPPH free radical 저해 활성을 나타냈으며, 농도 의존적으로 활성이 증가( $p < 0.05$ )하는 양상을 보였다(Fig. 2). DPPH 실험결과, CiO의 항산화 활성은 5.1~52.9%, LO는 2.8~13.6%로 모든 농도에서 CiO의 항산화 활성이 평균(18~38%)보다 높게 나타났다.

### 흰개미 기피 효과

흰개미의 기피 효능에 대하여 CiO와 LO를 재료 및 방법에 기술한 내용에 따라서 실시하였다. 양성 대조구는 IR3535와 일반적으로 많이 사용하는 페퍼민트 오일(PO)로 하였다. 시험은 모두 3회 반복 시행한 결과, 기피 효과는 LO(평균



**Fig. 4.** Releasing time of termites from rectangle area using of essential oil mixture. CL1 was only CiO (10 g), CL2 was the ratio CiO (8 g) to LO (2 g), CL3 was the ratio CiO (6 g) to LO (4 g), CL4 was the ratio CiO (4 g) to LO (6 g), CL5 was the ratio CiO (2 g) to LO (8 g) and CL6 was only LO (10 g). Values were expressed as mean ± SD of three independent experiments (n = 3). Mean values followed by the same letter do not differ significantly according to DMRT ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 5.** Body weight changes in male rats in single dose toxicity study. Values were mean ± SD of five independent experiments (n = 5).

25.00분), CiO(평균 23.33분), PO(8.33분) 그리고 IR3535 (6.67분)의 순으로 나타났다(Fig. 3). 위의 결과로부터 LO와 CiO는 개미 기피제의 강력한 후보 물질임을 알 수 있었다.

원료의 다양화와 공급의 원활함 측면에서 흰개미 기피제를 만들기 위한 최적의 혼합 조건을 결정하기 위하여 1차 평가를 통해 확인된 비율인 CiO 6g과 LO 4g을 기준으로 각 원료의 혼합량을 1g씩 변화를 주어 평가하였다.

2차 평가에서 CiO와 LO의 혼합비에 따라서 흰개미 기피 효과를 보였다(Fig. 4). 그중 CiO : LO(6 : 4) 혼합물인 CL3에서 단독의 CiO(CL1)와 LO(CL6)보다 뛰어난 흰개미 기피 효과를 보였다. 따라서 주요 성분으로 구성된 CiO와 LO의 혼합비율을 6g과 4g으로 결정하였다.

### 단회 경구 투여 독성시험

CiO와 LO 혼합제를 rat에 경구 투여 시 모든 시험군에서

**Table 4.** Mortality and LD50 values in male and female rats treated orally with CiO and LO mixture

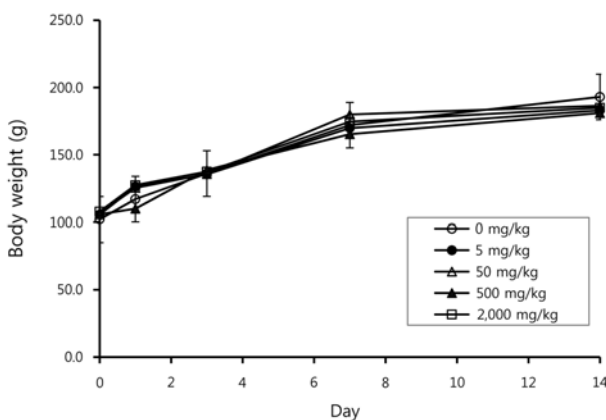
Group	Dose (mg/kg)	Days after treatment														LD <sub>50</sub> (mg/kg)	
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14
Male	0 mg/kg	0/5*	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	> 2,000 mg/kg
	5 mg/kg	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	50 mg/kg	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	500 mg/kg	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	2,000 mg/kg	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
Female	0 mg/kg	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	> 2,000 mg/kg
	5 mg/kg	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	50 mg/kg	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	500 mg/kg	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	2,000 mg/kg	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	

\*Values were expressed as no. dead/no. animal.

**Table 5.** Organ weight of male and female rats orally treated with CiO and LO mixture

Sex	Parameters	Dose (mg/kg)	0	5	50	500	2,000	
		Number of animals	5	5	5	5	5	
Male	Liver (g)		15.5 ± 0.2*	16.4 ± 0.9	16.9 ± 1.2	16.5 ± 0.7	17.5 ± 1.1	
	Spleen (g)		0.6 ± 0.9	0.7 ± 0.5	0.6 ± 0.7	0.6 ± 0.4	0.7 ± 0.7	
	Kidney (g)	Right		1.2 ± 0.2	1.3 ± 0.2	1.4 ± 0.3	1.3 ± 0.7	1.4 ± 0.2
		Left		1.1 ± 0.0	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.5	1.3 ± 0.2	1.3 ± 0.0
Female	Liver (g)		8.7 ± 0.2	9.2 ± 0.1	8.9 ± 0.5	9.1 ± 0.2	9.7 ± 0.8	
	Spleen (g)		0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.4	0.6 ± 0.3	0.6 ± 0.0	
	Kidney (g)	Right		1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.0	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.2
		Left		1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.5	1.0 ± 0.0	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.0

\*All values were presented as mean ± SD. No significant difference observed ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 6.** Body weight changes in female rats in single dose toxicity study. Values were mean ± SD of five independent experiments (n = 5).

14일 동안 사망은 관찰되지 않았으며, 시험물질에 의한 독성 증상이나 특이적 임상 소견은 나타나지 않았다(Table 4). 위의 결과로 CiO와 LO 혼합제를 rat에 단회 경구 투여 시

LD<sub>50</sub> 값은 암컷과 수컷 모두에서 2,000 mg/kg 이상임을 알 수 있었다.

시험기간 동안 체중의 변화를 관찰한 결과, 모든 시험군의 체중이 정상적으로 증가하였다(Fig. 5 6). 모든 시험군에 대하여 투여일로부터 시험시간인 14일 동안 매일 사료량과 음수량의 변화를 관찰한 결과, 모든 시험군의 암, 수 동물에서 정상적인 사료 섭취량과 음수량을 보였다. 또한 대조군과 비교 시 사료섭취량의 유의적 변화가 관찰되지 않았다. 14일 동안의 시험 종료 후 내부장기에 대하여 육안으로 병변을 관찰한 결과, 이상 소견이 발견되지 않았다. 또한, 간, 비장, 신장의 무게를 관찰한 결과, 유의적인 변화가 없었다(Table 5).

## 고 찰

흰개미는 유해곤충으로 사람과 가축에게 알레르기를 일으키고, 병원성 세균의 매개체 그리고 기생충의 중간 매개체로 활동한다. 또한 목조 문화재가 많은 우리나라에서 흰개미는 목조 문화재에 33.8%의 피해를 주며 강원도 일부를 제외한

전국에 분포하는 것으로 알려졌다. 특히, 흰개미는 양의 간 흡충의 중간 매개체로 알려져서 천연 개미 기피제의 개발이 필요하다.

이에 본 연구는 천연 향균 소재 중 방향성 식물에서 추출한 정유를 이용하여 *S. aureus* 공시 균주에 대하여 균의 증식에 미치는 효과와 항산화 작용에 대하여 알아보았으며, 정유의 일반적인 곤충 기피 특성이 흰개미에게도 기피 효과가 있는지 확인하고자 하였다.

정유 성분들은 세균의 세포벽을 파괴하고, 세포의 효소 활성을 방해하여 세균을 사멸시키는 것으로 알려졌다. *S. aureus*는 그람양성 구균으로 병원 내 감염의 주요 원인균이며, 특히 화농성 감염의 80% 이상을 차지하는 methicillin-resistant *S. aureus*는 최근 광범위 항생제에 대한 내성 문제로 더욱 주목되는 균주이다 [10]. CiO와 LO는 10% 농도에서 *S. aureus*의 성장을 억제했으며, 특히 methicillin 내성 균주에 대하여 탁월한 항균 효과를 보여주었다. 또한 MIC 측정을 통하여 CiO와 LO, 각각 0.05% 농도에서 공시된 *S. aureus* 내성균의 성장을 억제하였다. Chandra 등 [6]에 의한 *S. aureus*에 대한 CiO의 MIC값은 0.07%(700 µg/mL)으로 Naik 등 [23]은 LO의 MIC 값을 0.06%로 보고하였다. 실험을 통하여 우수한 항균효과를 알 수 있었으며, 내성 균주에 의한 감염 치료에 효과적인 천연물로서의 가능성을 기대할 수 있었다.

Norfloxacin의 경우 amoxicillin보다는 어느 정도 일정한 항균력을 나타내고 있으며, amoxicillin에 저항하는 균주에도 효과가 있음을 보여주었다. 그러므로 최소한 저항 균주를 죽이기 위해서 CiO의 농도가 5% 또는 LO의 농도가 5%는 되어야 할 것으로 본다.

CiO와 LO 같은 페놀성 물질은 보통 식물에 존재하는 2차 대사산물의 하나로 다양한 구조와 분자량을 지니며 [17], 산화반응을 지연시키는 항산화와 항균성 등 다양한 생리활성을 갖고 있다 [13]. 항산화 실험(DPPH) 결과, 0, 100, 500, 1,000 그리고 2,000 g/mL농도에서 CiO의 항산화 활성이 LO보다 평균 18~38% 높게 나타났다. Chandra 등 [6]은 CiO의 DPPH 소거능을 50% 억제 농도를 의미하는 IC<sub>50</sub> 값으로 측정된 결과, 552.8 ± 8.90 g/mL, LO에서는 660.2 ± 11.60 g/mL로 LO보다 CiO의 항산화 활성이 우수함을 보고하였다. Lu 등 [19]은 정유 생산 식물과 그 식물의 특정 성분의 항산화 활성을 비교하여, 모든 정유의 DPPH 소거능이 정유의 연구하고자 하는 특정 성분보다 높은 경향이 있음을 보고하였다. 이를 de Martino 등 [8]은 오일 내 다양한 성분의 시너지 작용에서 기인한다고 보고하였다.

천연 오일은 최근에 유해곤충 기피제로 활용되고 있으며 현재 다양한 제품으로 개발되고 있다. 그중에서 공통으로 모기를 포함한 유해곤충의 기피제로 CiO, LO, PO 그리고 IR3535는 대표적으로 이용되고 있는 소재들이다. 이 중에서 IR3535는 세계적으로 가장 많이 이용을 하는 제품이지만 최근에 내성이 발생하고 있어 효과가 점차 감소하고 있다. 따라서 본 연구에서는 유해곤충 기피제로 공통으로 많이 사용

되고 있는 CiO와 LO를 IR3535와 비교하여 흰개미 기피 효과를 측정하였다. 그 결과, LO는 25.00 ± 5.00분, CiO는 23.33 ± 2.89분 동안 흰개미가 정유 혼중 영역으로부터 방출되지 못하도록 하는 효과를 나타내어 기피제의 강력한 후보 물질임을 알 수 있었다. Zhu 등 [30]은 LO와 clove bud oil 등 총 8가지 오일을 이용하여 흰개미 기피 효과를 측정된 결과 clove bud oil에 의해 흰개미가 사멸되는 현상이 나타났으며, LO는 흰개미들이 모여들면서 행동이 느려지는 양상을 보고하였다. Desmarchelier [9]가 식물 정유는 해충에 선택적이며, 다양한 곤충 중에 대해서 산란, 기피, 살충 활성을 나타낸다고 보고한 바와 같이, 본 실험에서도 CiO와 LO가 다른 정유와 화학물질보다 흰개미 기피 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

위와 같이 생리활성이 풍부한 CiO와 LO 혼합제의 사용과 응용에 앞서 독성에 대한 안전성을 확인하기 위하여 단회 경구 투여 독성시험을 실시하였다. 그 결과 두 가지 정유 혼합제는 0, 5, 50, 500, 2,000 mg/kg 농도 투여군에서 14일 동안 시험물질에 의한 사망은 관찰되지 않았으며, 시험물질에 의한 독성 증상과 특이적 임상증상도 나타나지 않았다. 또한 체중과 장기의 무게도 정상적으로 증가하였다. Fandohan 등 [11]은 LO를 포함한 정유를 rat에 경구 투여한 결과 LD<sub>50</sub> 값이 3,000 mg/kg까지는 독성이 나타나지 않았지만, 3,500 mg/kg 이상에서는 rat의 위장이나 간에서 형태학적 변화를 관찰하였다. Singh 등 [27]은 모기 기피 효과가 있는 Neem tree의 추출물과 pyrethrin의 LD<sub>50</sub>값이 2,000 mg/kg과 12,000 mg/kg 이상으로 안전한 물질로 각각 보고하였다. 본시험에서도 CiO와 LO의 LD<sub>50</sub>값이 2,000 mg/kg 이상으로 안전한 물질로 확인되었으며, 산업적으로 응용 가능한 소재로 개발이 가능할 것으로 생각한다.

본 연구에서는 CiO와 LO를 이용하여 흰개미 기피제의 가능성 유무를 평가한 결과, CiO와 LO는 *in vitro*에서 항산화 작용과 항균활성이 있는 것으로 나타났으며, 안전성을 입증하고자 rat에서 단회 경구 투여 독성시험 결과 LD<sub>50</sub>값이 2,000 mg/kg 이상으로 안전한 물질로 확인되었다. 또한 흰개미에 대한 기피 효과시험의 결과 CiO와 LO 혼합물이 흰개미에 대한 기피 효과가 우수함을 알 수 있었다.

## 감사의 글

본 논문은 중소기업청 창업 성장기술 개발사업(과제번호: S2013155)의 지원으로 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

## References

1. Adukwu EC, Allen SC, Phillips CA. The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. J Appl Microbiol 2012, **113**, 1217-1227.
2. Baik MK, Hwang JM, Jung KS, Kim TW, Kim MC, Lee

- YJ, Cho YB, Park SW, Lee HS, Ku DS, Jeong JC, Kim KG, Choi DS, Shin EH, Hwang JH, Lee JS, Kim SS, Bae YS.** Checklist of Korean Insects. Nature & Ecology, Seoul, 2010.
3. **Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M.** Biological effects of essential oils - a review. FoodChem Toxicol 2008, **46**, 446-475.
  4. **Blois MS.** Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 1958, **181**, 1199-1200.
  5. **Bruneton J.** Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants. 2nd ed. pp. 461-780, Lavoisier, New York, 1999.
  6. **Chandra H, Ah AF.** Lipoxygenase inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of selected essential oils. Asian J Pharma Clin Res 2014, **7**, 79-83.
  7. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Eleventh Edition. CLSI document M02-A11. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 2012.
  8. **De Martino L, De Feo V, Fratianni F, Nazzaro F.** Chemistry, antioxidant, antibacterial and antifungal activities of volatile oils and their components. Nat Prod Commun 2009, **4**, 741-750.
  9. **Desmarchelier JH.** Grain protectants: trends and developments. In: Highley E, Wright EJ, Banks HJ, Champ BR (eds.). Stored Product Protection: Proceedings of the 6th International Working Conference on Stored-Product Protection: 17-23 April 1994, Canberra, Australia, Volume 1. pp. 722-728, CAB International, Wallingford, 1994.
  10. **Dryden MS, Dailly S, Crouch M.** A randomized, controlled trial of tea tree topical preparations versus a standard topical regimen for clearance of MRSA colonization. J Hosp Infect 2004, **56**, 283-286.
  11. **Fandohan P, Gnonlonfin B, Laleye A, Gbenou JD, Darboux R, Moudachirou M.** Toxicity and gastric tolerance of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Ocimum basilicum* in Wistar rats. Food Chem Toxicol 2008, **46**, 2493-2497.
  12. **Han SH, Lee KS, Chung YJ.** Characteristic of termite inhibits in South Korea and the control. Conserv Stud 1998, **19**, 133-158.
  13. **Hammer KA, Carson CF, Riley TV.** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J Appl Microbiol 1999, **86**, 985-990.
  14. **Kim JK, Kang CS, Lee JK, Kim YR, Han HY, Yun HK.** Evaluation of repellency effect of two natural aroma mosquito repellent compounds, citronella and citronellal. Entomol Res 2005, **35**, 117-120.
  15. **Kim SI, Chang KS, Yang YC, Kim BS, Ahn YJ.** Repellency of aerosol and cream products containing fennel oil to mosquitoes under laboratory and field conditions. Pest Manag Sci 2004, **60**, 1125-1130.
  16. **Mohammed OB, Hussein HS, Elowni EE.** The ant, *Pachycondyla sennaarensis* (Mayr) as an intermediate host for the poultry cestode, *Raillietina tetragona* (Molin). Vet Res Commun 1988, **12**, 325-327.
  17. **Lee YJ, Kim EO, Choi SW.** Isolation and identification of antioxidant polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba* L.) seeds. J Korean Soc Food Sci Nutr 2011, **40**, 517-524.
  18. **Li WR, Shi QS, Ouyang YS, Chen YB, Duan SS.** Antifungal effects of citronella oil against *Aspergillus niger* ATCC 16404. Appl Microbiol Biotechnol 2013, **97**, 7483-7492.
  19. **Lu Y, Shipton FN, Khoo TJ, Wiart C.** Antioxidant activity determination of citronellal and crude extracts of *Cymbopogon citratus* by 3 different methods. Pharmacol Pharm 2014, **5**, 395-400.
  20. **Luangnarumitchai S, Lamlertthon S, Tiyafoonchai W.** Antimicrobial activity of essential oils against five strains of *Propionibacterium acnes*. Warasan Pheasatchasat 2007, **34**, 60-64.
  21. **Miguel MG.** Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. Molecules 2010, **15**, 9252-9287.
  22. **Moore-Neibel K, Gerber C, Patel J, Friedman M, Ravishankar S.** Antimicrobial activity of lemongrass oil against *Salmonella enterica* on organic leafy greens. J Appl Microbiol 2012, **112**, 485-492.
  23. **Naik MI, Forma BA, Jaykumar E, Bhat JA.** Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacterias. Asian Pac J Trop Med 2010, **3**, 535-538.
  24. **NPIC.** Oil of citronella general fact sheet. National Pesticide Information Center, Oregon State University, Corvallis, 2013.
  25. **Organisation for Economic Co-operation and Development.** OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects. Test No. 420: Acute oral toxicity - fixed dose procedure. OECD Publishing, Paris, 2002.
  26. **Sekine N, Shibutani S.** Chemical structures of *p*-menthane monoterpenes with special reference to their effect on seed germination and termite mortality. J Wood Sci 2013, **59**, 229-237.
  27. **Singh B, Singh PR, Mohanty MK.** Toxicity of a plant based mosquito repellent/killer. Interdiscip Toxicol 2012, **5**, 184-191.
  28. **Thorsell W, Mikiver A, Malander I, Tunón H.** Efficacy of plant extracts and oils as mosquito repellents. Phytomedicine 1998, **5**, 311-323.
  29. **Tyagi BK, Shahi AK, Kaul BL.** Evaluation of repellent activities of *Cymbopogon* essential oils against mosquito vectors of Malaria, Filariasis and Dengue Fever in India. Phytomedicine 1998, **5**, 324-329.
  30. **Zhu BC, Henderson G, Chen F, Fei H, Laine RA.** Evaluation of vetiver oil and seven insect-active essential oils against the Formosan subterranean termite. J Chem Ecol 2001, **27**, 1617-1625.