



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)



博士學位論文

에센셜 아로마오일의 세포독성과  
3종의 어류병원성 세균 항균활성에  
미치는 영향

濟州大學校 大學院

地球海洋科學科

金 仁 煥

2012 年 2 月



博士學位論文

에센셜 아로마오일의 세포독성과  
3종의 어류병원성 세균 항균활성에  
미치는 영향

濟州大學校 大學院

地球海洋科學科

金 仁 煥

2012 年 2 月



# 에센셜 아로마오일의 세포독성과 3종의 어류병원성 세균 항균활성에 미치는 영향

指導教授 崔 永 贊

金 仁 煥

이 論文을 理學 博士學位 論文으로 提出함

2012 年 2月

金仁煥의 理學 博士學位 論文을 認准함

審査委員長 \_\_\_\_\_

委 員 \_\_\_\_\_

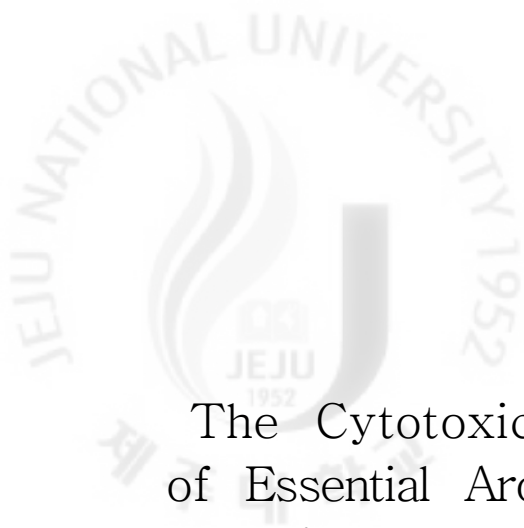
委 員 \_\_\_\_\_

委 員 \_\_\_\_\_

委 員 \_\_\_\_\_

濟州大學校 大學院

2012 年 2 月



# The Cytotoxicity and Antimicrobial Activities of Essential Aroma Oil on Three Pathogenic Fish Bacteria

In-Hwan Kim

(Supervised by professor Young-Chan Choi)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement  
for the degree of Doctor of Earth and Marine Sciences

2012 . 2 .

Department of Oceanography  
GRADUATE SCHOOL  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

## 목 차

LIST OF FIGURES .....	iii
LIST OF TABLES .....	v
ABSTRACT .....	vii
I. 서 론 .....	1
II. 실험재료 및 방법 .....	6
1. 실험재료 .....	6
1) 시료 .....	6
2) 시약 및 기기 .....	8
(1) 시약 .....	8
(2) 기기 .....	8
2. 실험방법 .....	9
1) Essential aroma oil의 세포독성 변화 .....	9
(1) Essential aroma oil의 선정과 희석방법 .....	9
(2) 실험에 사용한 세포주 및 세포 배양 방법 .....	9
(3) MTT assay를 이용한 세포 생존율 검사 .....	10
(4) Sirius red 또는 formazan 염색과 세포 형태 관찰 .....	10
2) Essential aroma oil의 항균 활성 효과 .....	11
(1) Essential aroma oil의 선정 .....	11
(2) 실험에 사용한 균주 및 배양법 .....	11
(3) Disc diffusion method를 이용한 항균제 감수성 실험 .....	13
(4) VITEK 60 auto analyzer를 이용한 MIC 측정 .....	14
(5) Essential aroma oil 항균제감수성 검사용 disc 제작 .....	16

(6) Essential aroma oil disc를 이용한 항균제 감수성 실험 .....	16
<b>III. 결과</b> .....	17
<b>1. Essential oil의 세포 안정성 검사</b> .....	17
1) Liver cell의 세포 생존율과 형태학적 변화 .....	17
2) Brain cell의 세포 생존율과 형태학적 변화 .....	23
3) Kidney cell의 세포 생존율과 형태학적 변화 .....	29
<b>2. 일반 항균제 disc 및 VITEC 60 autoanalyzer의 감수성 검사</b> .....	35
1) Disc diffusion method를 이용한 감수성 결과 .....	35
2) VITEK 60 auto analyzer를 이용한 최소억제농도(MIC)측정 결과 .....	38
(1) <i>S. iniae</i> 의 MIC 측정 결과 .....	38
(2) <i>E. tarda</i> 의 MIC 측정 결과 .....	40
(3) <i>V. ichthyoenteri</i> 의 MIC 측정 결과 .....	42
<b>3. Essential aroma oil disc를 이용한 항균활성 검사</b> .....	44
1) <i>S. iniae</i> 의 항균활성 결과 .....	44
2) <i>E. tarda</i> 의 항균활성 결과 .....	47
3) <i>V. ichthyoenteri</i> 의 항균활성 결과 .....	50
<b>IV. 고찰</b> .....	53
<b>V. 결론</b> .....	57
<b>참고문헌</b> .....	59

## LIST OF FIGURES

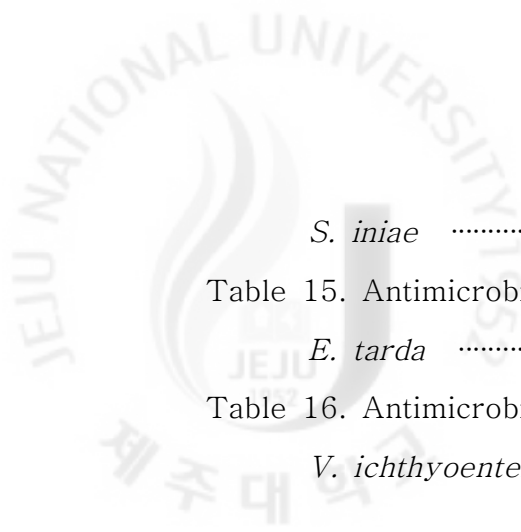
Fig. 1. 3 species fish pathogenic bacterial culture of 48 hours on 37.5°C .....	12
Fig. 2. Cell viability of various diluted carrier and essential oils on liver cell .....	19
Fig. 3. Viability of essential aroma oils treated liver cell by MTT assay .....	20
Fig. 4. 50% viability of essential aroma oils treated liver cell by MTT assay .....	21
Fig. 5. Microscopical observation of morphological change on liver cell by formazan staining .....	22
Fig. 6. Cell viability of various diluted carrier and essential aroma oils on brain cell .....	25
Fig. 7. Viability of essential aroma oils treated brain cell by MTT assay .....	26
Fig. 8. 50% viability of essential aroma oils treated brain cell by MTT assay .....	27
Fig. 9. Microscopical observation of morphological change on brain cell by no staining .....	28
Fig. 10. Cell viability of various diluted carrier and essential aroma oils on kidney cell .....	31
Fig. 11. Viability of aroma essential oils treated kidney cell by MTT assay .....	32
Fig. 12. 50% viability of essential aroma oils treated kidney cell by MTT assay .....	33
Fig. 13. Microscopical observation of morphological change on kidney cell by formazan staining .....	34



Fig. 14. Inhibition zone of commercial antibacterial disc against 3 fish pathogenic bacteria species .....	36
Fig. 15. Growth inhibition zone formations of essential aroma oil discs against <i>S. iniae</i> .....	45
Fig. 16. Growth inhibition zone formations of essential aroma oil discs against <i>S. iniae</i> .....	46
Fig. 17. Growth inhibition zone formations of essential aroma oil discs against <i>E. tarda</i> .....	48
Fig. 18. Growth inhibition zone formations of essential aroma oil discs against <i>E. tarda</i> .....	49
Fig. 19. Growth inhibition zone formations of essential aroma oil discs against <i>V. ichthyenteri</i> .....	51
Fig. 20. Growth inhibition zone formations of essential aroma oil discs against <i>V. ichthyenteri</i> .....	52

## LIST OF TABLES

Table 1. Bacterial disease control of fish .....	5
Table 2. The components and effect of JoJoba, Ginger, Rosemary and Cypress oils .....	7
Table 3. Identification card & Susceptibility cards of VITEK 60 autoanalyzer .....	15
Table 4. Cell viability various diluted carrier and essential aroma oils on liver cell .....	18
Table 5. 50% viability of essential aroma oils treated liver cell by MTT assay .....	21
Table 6. Cell viability of various diluted carrier and essential aroma oils on brain cell .....	24
Table 7. 50% viability of essential aroma oils treated brain cell by MTT assay .....	27
Table 8. Cell Viability of various diluted carrier and essential oils on kidney cell .....	30
Table 9. 50% viability of essential aroma oils treated kidney cell by MTT assay .....	33
Table 10. Antibacterial activity of commercial antibacterial disc against 3 pathogenic bacteria species .....	37
Table 11. Antibacterial activity of VITEK 60 auto analyzer on the <i>S. iniae</i> .....	39
Table 12. Antibacterial activity of VITEK 60 auto analyzer on the <i>E. tarda</i> .....	41
Table 13. Antibacterial activity of VITEK 60 auto analyzer on the <i>V. ichthyenteri</i> .....	43
Table 14. Antimicrobial activity of essential aroma oil discs on the	



<i>S. iniae</i> .....	45
Table 15. Antimicrobial activity of essential aroma oil discs on the	
<i>E. tarda</i> .....	48
Table 16. Antimicrobial activity of essential aroma oil discs on the	
<i>V. ichthyoenteri</i> .....	51

## ABSTRACT

### The Cytotoxicity and Antimicrobial Activities of Essential Aroma Oil on Three Pathogenic Fish Bacteria

Recently, four different essential aroma oils extracted from jojoba, ginger, cypress, and rosemary have been highly regarded for their various physiological functions. In order to determine which oil has the highest anti-microbial activity, the study examined the anti-microbial activity against fish pathogenic bacteria such as *S. iniae*, *E. tarda*, *V. ichthyenteri*. At the same time, to verify the possibility that the oils could be an alternative to antibiotics, the study also investigated cytotoxicities of liver cells, brain cells, and kidney cells against the four oils and assessed the effects on a human body.

1. In regard to viability and morphological change, jojoba oil did not show any anti-microbial activity, nor did it cause any morphological changes to the three different cells (liver, brain, and kidney). However, it stimulated cell growth and proliferation in those cells. In addition, cypress oil showed the lowest cell viability in a concentration of  $0.00066 \mu\text{L/mL}$  and showed growth inhibition and endolysis in the liver cells and the kidney cells.

2. The susceptibility disc diffusion method for general anti-biotic substance and VITEC 60 autoanalyzer showed the same anti-bacterial effect even for the same series of antibiotics. The results of comparison and analysis from the 2 methods showed the same susceptibility for the same series of antibiotics but the amount differed from 3 to 10 times.

Here, it is confirmed that the injection amount shall be determined based on MIC values.

3. The anti-microbial activity of each essential aroma oil differed according to fish pathogenic bacteria but they all showed suppression in both undiluted solutions and diluted solutions of the oils. That indicates that essential oils include anti-microbial activities against various fish pathogenic bacteria.

Rosemary oil in particular did not produce toxicity in the cells, but had the various anti-microbial effects and the physiological ability to enhance other effects. Also, it was found that the cells did not develop a resistance to the oil. This result suggests that rosemary oil could be used as an antibiotic alternative for infections of *S. iniae*, *E. tarda*, *V. ichthyoenteri*.

In order to put these results to practical use, further studies on anti-microbial activity of fish, treatment for infected fish, and the effects on the human body by diluting rosemary oil are required at a clinical level.

Lastly, this study is expected to be the basis of developing a natural anti-microbial vaccine.

## I. 서론

우리나라의 주요 해산어류 수출국인 일본에서 양식되고 있는 식용담수어는 잉어, 뱀장어, 은어, 무지개송어 및 산천어, 등의 재래송어로 2002년의 생산량은 각각 12,030톤, 21,930톤, 21,971톤, 9,540톤, 12,524톤이며, 주요 양식 해산어종은 방어류, 전갱이, 흑점줄전갱이, 참돔, 넙치, 복어류, 은연어로 각각 146,849톤, 3,412톤, 2,568톤, 82,516톤, 7,605톤, 5,389톤, 8,721톤이다(통계청, 2011).

어류 수출확대에 따라 우리나라의 양식업도 1990년 이후 크게 발전하여 2011년 6월말 현재 사육중인 어류는 5억 5805만 마리며 양식어종은 조피볼락등 20종으로, 조피볼락이 3억 3108만 마리(59.3%)로 가장 많이 사육되고, 다음으로 넙치가 1억 35만 마리(18%)로 두 어종이 전체 사육량의 77.3%를 차지하고 있다(통계청, 2011).

어류양식 생산량은 37,977톤으로 태풍과 겨울철 동사 등으로 해상 가두리 양식어종 생산량이 전년 동기보다 4,449톤(-10.5%)이 감소한 반면 사료 투입량은 205,152톤으로 전년 동기보다 7,558톤(3.8%)가 증가하여 어가들의 비용지출이 더 늘어났다(통계청, 2011).

2011년 6월 현재 우리나라에서 양식중인 수면은 446만 $m^2$ 로 전년 동기보다 7만 $m^2$ (1.7%) 증가하였는데, 양식방법별로 보면 해상가두리가 1,176만 $m^2$ 로 5.2% 감소하였고, 육상수조식이 241만 $m^2$ 로 6.3%로 증가하였으며, 축제식은 87만 $m^2$ 로 0.4% 감소하였다(통계청, 2011).

지역별 양식수 면적은 제주 135만 $m^2$ 로 전년 동기보다 13.9% 증가하여 가장 넓었고, 전남은 11.4% 감소한 131만 $m^2$ 로 제주 다음이며, 경남 70만 $m^2$ , 전북 40만 $m^2$ , 충남 38만 $m^2$  순이었다(통계청, 2011).

이렇듯 우리나라 국민의 4천명 이상이 종사하고 있는 어류양식업이 어병세균의 감염으로 양식 어류의 폐사율이 절반가까이에 이르고 있으며 전국에서 가장 넓은 양식수면적은 가진 제주산 양식넙치의 폐사량은 해마다 증가하여 2006년

3,601톤, 2007년 3,869톤, 2008년 4,519톤, 2009년 4,427톤, 2010년 5,601톤으로 이로 인한 피해액은 409억 원으로 추정되고 있다(통계청, 2011).

이러한 현상은 우리나라뿐만 아니라 전 세계적으로 심각한 문제가 되고 있으며 각종 어패류의 종묘생산이나 양식생산과정에서 생기는 질병의 대부분은 자연계에서 침입하거나 유입된 바이러스, 세균, 진균, 원생동물, 후생동물등의 기생생물에 기인하며, 이들은 사육 집단에서 개체간 전파에 의해 큰 피해를 입히고 있다(Kim *et al.*, 2006).

*Streptococcus iniae*, *Edwardsiella tarda*에 의한 질병은 항생제 경구투여와 Vaccine등의 개발로 치료확률이 높아졌으나 *Vibrio ichthyoenteri*는 넙치 자어에 체색의 흑화, 소화관의 위축과 백탁, 복부의 함몰을 보이고 발병 1-2일에 사망한다. 조직학적 소견으로는 장관 점막상피에 감염하여 국한된 괴사병소를 형성하므로 박리성 카타르성 장염을 발생시킨다(Muroga *et al.*, 1996). 감염양상은 사육해수나 윤충류의 먹이생물을 통하여 전파되므로 사육수나 먹이생물을 소독하는 것이 유일한 예방방법이며 일단발병하면 약욕이나 약제를 경구투여해도 거의 효과를 기대할 수 없어 큰 피해를 야기하고 있다. 현재까지는 넙치이외의 다른 어종에도 이 균이 감염하는지는 분명하게 밝혀지지 않았지만 다양한 어종으로 확산되었을 경우 경제적인 피해도 클 수밖에 없다(江草周三, 2006).

최근 우리나라 국민의 소득증가와 식생활문화의 변화로 수산식품과 활어에 대한 소비가 급증하고 있는데, 1980년 27.0kg에서 2008년 54.9kg으로 103.3%가 증가한 반면, 수산물 자급률은 매년 감소되어 2008년에는 수산물 자급률이 43.1%나 감소하게 되었다. 이에 각 어가에서는 수산물을 빨리 성장시켜 생산량을 증가시키기 위한 방안으로 과도하게 시료들을 투입하게 되었으며, 세균성 질환 치료를 위해 정확한 진단 없이 많은 양의 항균제들을 사용하면서, 잔류된 항균제들이 어류의 근육 속에 축적되어 있다가(Kim *et al.*, 2006) 인체 내로 유입되어 여러 가지 부작용을 일으키거나 면역력을 저하시키고 있다. 또한 항균제 내성균 발생을 증대시키고(Mcphearson *et al.*, 1991; Heo *et al.*, 1992) 항균제가 함유된 배출수를 해역으로 방출함으로써 해양오염도 유발시키고 있다.

어류 세균성질병의 예방과 치료 대책은 Table 1에 제시한 것처럼 8가지의 방법을 들 수 있다. 이는 Amend(1976)가 연어과 어류의 바이러스성 질병의 대책

으로 제시한 내용을 약간 수정한 것이며 세균성질병뿐만 아니라 다른 감염증 또는 기생충병에도 적용할 수 있다(Muroga, 1997). 그러나 이러한 예방과 치료대책에도 불구하고 근래 합성 약품의 무분별한 남용과 공해, 환경 호르몬, 신종 바이러스나 세균들의 출현 등으로 인한 인간 생활의 또 다른 피해가 반복되면서 서서히 면역성과 항상성이 저하되기 시작하였다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서 최근에 자생물질이나 천연물 자원을 이용한 생리활성물질에 대한 개발과 연구가 활발히 진행되고 있지만 극히 한정된 범위내에서만 이루어지고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 수천 년 동안 사용되고, 효능이 증명된 수백 가지 생화학적 성분 중에서 alcohol, ester, terpene, ketone, cinna alcohol등을 함유하여 살균, 방부효과를 가지고 있는 essential aroma oil을 이용하여 항균활성능을 검증하여 친환경적인 양식기술에 응용하고자 하였다.

essential aroma oil의 항균효능에 관한 연구는 식품, 의약품, 화장품, 대체의학 등 모든 관련분야에서 적용되고 있으며 생리활성물질의 보고라고 할 정도로 다양한 성분들이 함유되어 있어 심리적 안정, 통증해소와 근육 이완, 향미생물, 항바이러스, 항염, 항불안, 항산화, 면역 기능 강화, 노폐물 배설 등의 작용이 있으며, 지금까지 알려진 종류는 60 여종 이상이 있다(Loizzo *et al.*, 2008; Emani *et al.*, 2007; Komiya *et al.*, 2006; Kuriyama *et al.*, 2005; Lehrner *et al.*, 2005; Gedney *et al.*, 2004; Ohno *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2003; Hada *et al.*, 2001; Diego *et al.*, 2001; Caelli *et al.*, 2000; Price *et al.*, 1999; Erenmemisoglu *et al.*, 1997; Ironson *et al.*, 1996).

그중에서 Sesquiterpene는 불포화 탄화수소로 증류법으로 추출이 어려운 반면 효과는 강력하여 함염증, 항알레르기, 진정효과가 탁월하고, alcohol은 강력한 방부효과와 항바이러스, 항박테리아, 항진균 효과가 있으며, 면역 강화작용이 있어 폭넓게 사용되고 있다(사공 등, 2008).

Phenol은 가장 강력한 방부, 항박테리아, 항바이러스 효과가 있는 반면 장기간 사용시 독성을 나타내는 것으로 알려져 있다. Aldehyde는 항염, 항바이러스, 항진균 효과가 있고, Ketone은 점액용해 효과와 진해효과를 가지고 있어 상부기도 질환에 유효하며 세포방어 효과와 세포 성장촉진, 상처 치료효과가 뛰어나지만 신경계를 자극하여 중추신경마비, 간질 등을 유발할 수 있어 과도한 양을 사



용할 때는 주의해야 한다.

본 연구에서는 물에 녹인 albumin을 어체가 체 표면을 통하여 체내로 흡수하는 침지백신의 예방 접종법(Amend *et al.*, 1976)의 원리를 응용하여 최근 다양한 생리활성 기능으로 주목을 받고 있는 essential aroma oil을 새로운 침지백신으로 사용할 수 있는지의 가능성을 검증하고자 하였다. 이를 위하여 4종의 essential aroma oil 즉 jojoba, ginger, cypress 및 rosemary oil을 이용하여 어류병원성 세균의 대부분을 차지하는 *S. iniae*, *E. tarda* 그리고 *V. ichthyenteri*에 essential aroma oil을 처리하여 항균활성을 조사함으로써 가장 항균활성이 우수한 oil을 검증하여 최소적정량으로 어류병원성 질병치료와 예방이 가능함을 증명하고자 하였다. 동시에 liver cell, brain cell, kidney cell을 이용하여 4종의 essential aroma oil에 대한 세포독성을 조사하여 인체에 미치는 영향을 평가함으로써 인체 영향을 최소화하고 일반 항생제의 대체물질로 사용할 수 있는 이용 가능성을 검증하였다.

Table 1. Bacterial disease control of fish (江草周三)

Measure	Resolution
Source of infection and infection countermeasure	1) 방역(좁은의미): 감수성이 있는 숙주와 병원균의 접촉을 피한다. 2) 환경제어: 특정 병원세균의 생존, 증식을 억제시키는 환경을 유지한다.
Host countermeasure	1) 내병성육종: 특정질병의 저항성이 높은 품종을 만든다. 2) 예방면역: 특정병원세균의 예방접종을 한다. 3) 생체방어기능의 활성화: 면역증강제 또는 영양제를 투여하여 비특이적 생체방어기능을 높게 유지한다. 4) 최적의 사육관리: 최적의 사육관리로 숙주의 생체방어기능을 높게 유지한다.
Therapeutic countermeasure	1) 화학요법: 원인 병원균에 유효한 약제를 사용해 치료한다. 2) 생물학적 치료: 파지요법과 같이 생물을 이용하여 치료한다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1) 시 료

Carrier oil인 jojoba oil(*Simmondsia chinensis* oil)은 Dr. Eberhardt사 (Austria) 제품을 사용하였고, ginger oil(*Zingiber officinale* oil), cypress oil(*Cupressus sempervirens* oil) 그리고 rosemary oil(*Rosmarinus officinalis* oil)은 Florial사 (France) 제품을 구입하여 실험에 사용하였다.

본 실험에 사용한 jojoba oil은 jojoba의 열매, ginger oil은 ginger의 근경, cypress oil은 cypress의 목부 그리고 rosemary oil은 rosemary의 엽과 가지로 부터 수증기 증류법으로 추출한 100% 순수한 것을 사용하였다.

Carrier oil인 jojoba oil 과 essential aroma oil인 ginger oil, cypress oil, rosemary oil의 함유 성분과 효능은 Table 2에 설명하였다.

Table 2. The Components and effect of Jojoba, Ginger, Rosemary and Cypress oils (Salvatore Battaglia)

Essential aroma oil name	Component	Effect
Jojoba (Simmondsia chinensis)	Palmitic (1.5%) Palmitoleic (0.4%) Stearic (13.9%) Oleic (0.3%) Linolenic (trace) Nonadecenoic (-) Eicosenoic (0.1%) Behenic (0.2%) Erucic (11.2%) Lignoceric (0.1%) Nervonic (0.9%)	액체왁스로 구성 (긴 단일 수산화 알코올 사슬과 긴 지방산사슬이 ester결합을 한 것-부패성이 없고 분자의 안정성, 수분공급성, 치료성 때문에 화장품에 많이 사용) 항염, 항균
Ginger (Zingiber officinale )	Keton(trace) Oxaid (trace) Terpene (trace ) Geranial (3-20%) Nerol (1-10%) Arcurumeme (6-10%) zingiberene (20-28%) $\beta$ -sesquiphellandrene (7-11%) $\beta$ -bisabolene (5-9%) Eudesmol(trace)	진통제, 항산화제, 살균제, 항경련제, 항구토제, 식욕촉진제, 최음제, 항균제, 구풍제, 두부제, 발한제, 거담제, 발열제, 발적작용, 연하제, 조홍제, 순환촉진제, 건위제, 강장제 (임산부 사용금지)
Rosemary (Rosmarinus officinalis)	$\alpha$ -Pinene (10.3-11.6%) Borneol (2.8-4.2%) $\beta$ -pinene (4.9-7.7%) Camphor (9.9-12.5%) Bornyl acetate (1.0-1.2%) Camphene (4.0-4.3%) 1,8-cineole (40.1-44.45%) Limonene (2.0-4.8%)	두뇌활성, 자극, 신경안정, 진통, 진경, 통경, 소화, 간장, 담즙촉진, 부신피질촉진, 강심, 이뇨, 거담, 수렴, 살균, 상처치유, 반흔제거 (고혈압환자, 임신중)
Cypress (Cupressus sempervirens)	Ketons (camphene (3.6%) Terpene (20.48%) Alcohols (0.07%) Cedrol (5.35%) Sabinene (2.8%) $\beta$ -pinene (2.9%) $\zeta$ -3-carene (21.5%) Myrcene and $\alpha$ -terpinene (1.1%) Terpinolene (6.3%) Bornyl acetate (0.3%) Cadinene (1.7%)	방부성, 항경련, 수렴, 탈취, 이뇨, 지혈, 간강, 지혈, 발한, 정맥울혈 제거, 강장, 살균, 방취 (임신중 사용금지, 심한 천식중 사용금지)

## 2) 시약 및 기기

### (1) 시약

Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM), Minimum Essential Medium (MEM), Trypsin-EDTA와 heat inactivated Fetal Bovine Serum (FBS)는 Gibco BRL사(Grand Island, NY, USA) 제품, Roswell Park Memorial Institute (RPMI) - 1640은 Cambrex 사(MD, USA) 제품, Dimethylsulfoxide (DMSO), 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), Sirius red, Trichloro acetic acid (TCA)와 Formazan은 Sigma Biochemicals사(St. Louis, MO, USA)사의 제품, Haemalam은 Merk 사(Darmstadt, Germany)의 제품, Sheep Blood Agar Plate와 Muller Hinton II Agar 90, Brain heart infusion Agar는 Asan제약 제품을 사용하였다.

### (2) 기기

Centrifuge (Centrifuge 5414R, Eppendorf Co., Hamburg, Germany), Clean bench (DVB 912, Daeil Engineering Co., Asan, Korea), CO2 Incubator (MCO-17AIC, Sanyo Electric Co., Tokyo, Japan), Enzyme-linked immunosorbent assay reader (ELISA reader, Spectra Max 250, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA), pH meter (MP220, Mettler-Toledo, Greifensee, Switzerland), Spectrophotometer (Optizen 2120 UV Mecasys Co., Daejeon, Korea), Ultra-low temperature freezer (MDF-U32V, Santo Electric biomedical Co., Japan), Vortex mixer (Eppendorf Co., Germany), Inverted microscope (Nikon eclipse TS100-F, Tokyo, Japan), Digital camera (DSC-F717, Sony Co., Japan), VITEK 60(bioMerieux SA, France) 등을 사용하였다.

## 2. 실험방법

### 1) Essential aroma oil의 세포 독성 변화

#### (1) Essential aroma oil의 선정과 희석 방법

essential aroma oil들이 공통적으로 가지고 있는 여러 가지 의학적인 효과 중에서 살균, 방부효과는 인체와 일상 환경에 필요성이 부각되어 현대인들의 많은 관심을 가지고 있다. 인체에 유해성이 적고 항염, 항균작용이 증명된 oil을 선정하였는데, 정유 성분을 공기 중으로 휘발되지 않도록 유지하면서 침투를 돕는 천연 식물성 오일로 고급 불포화 지방산과 고급 불포화 alcohol의 ester로 구성되어 항염, 항균작용을 가지고 있는 jojoba oil, 항균작용에 직접 작용하는 terpene과 ketone이 풍부한 ginger oil, cinnamon과 alcohol이 풍부한 rosemary oil과 cypress oil들을 선정하였다(Knobloch, 1989).

또한 물에 희석되어야 하기 때문에 aldehyde, Ketone, Monoterpene, Alcohol로 구성되어 수용성의 성격을 지닌 것도 고려하였다(사공 등, 2008).

essential aroma oil의 희석방법은 jojoba oil, ginger oil, rosemary oil, cypress oil을 10% DMSO(dimethyl sulfoxide)에 용해시킨 후 다시 배양액과 혼합하여 각 농도별 영향을 관찰하기 위하여 0.00066, 0.0005, 0.001, 0.002, 0.01  $\mu$ L/mL의 5가지 농도로 세포에 처리하였다.

#### (2) 실험에 사용한 세포주 및 세포 배양 방법

세포독성 연구에 가장 많이 사용하는 kidney cell은 한국 세포주 은행(Korean Cell Lines Bank)에서 분양받았으며, liver cell 와 brain cell은 원광대 의대 미생물학 교실과 해부학 교실로부터 분양 받아 배양액(RPMI-1640, DMEM, MEM)에 10% FBS (heart inactivated fetal bovine serum)와 1% Gentamycin을 가하여 5% CO<sub>2</sub> incubator 37℃ 에서 배양하였다.

### (3) MTT assay를 이용한 세포 생존율 검사

MTT assay는 Doyle의 방법에 따라 시행하였다(Doyle *et al.*, 1993). MTT assay는 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색을 띄는 비수용성의 MTT formazan 로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법으로 MTT formazan의 흡광도는 540nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아있고 대사가 왕성한 세포의 농도를 반영한다.

일차적으로 배양한 liver cell, brain cell, kidney cell을  $4 \times 10^4$  cell/mL로 희석하여 96-well plate에 0.2 mL/well 씩 분주하여 brain cell과 kidney cell은 24hrs, liver cell은 48 hrs 동안 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양한 후, 0.5% 의 DMSO에 용해시킨 essential aroma oil(jojoba, ginger, rosemary, cypress)을 0.00066, 0.0005, 0.001, 0.002, 0.01  $\mu$ L/mL 농도로 처리하고 control에는 0.5% DMSO를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 그 후 배양액을 제거하고 배양액에 용해시킨 2.5% formazan 용액 50  $\mu$ L 씩을 각 well에 분주하여 4시간 동안 반응시켜 제거하고, 100  $\mu$ L의 DMSO를 가하여 형성된 formazan 결정을 용해시켰다. 그런 다음 ELISA reader로 540 nm 에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율(%)을 계산하였다.

### (4) Sirius red 또는 formazan 염색과 세포 형태 관찰

kidney cell, liver cell, brain cell( $1.0 \times 10^5$  cell/well)를 6-well plate에 분주하여 2mL의 배지를 가하고 24 hrs(Liver cell은 48시간) 동안 5% CO<sub>2</sub>, incubator에서 배양한 후에 4종의 essential aroma oil을 0.00066, 0.0005, 0.001, 0.002, 0.01  $\mu$ L/mL 농도로 희석하여 처리하였다. 그 후 24hrs 동안 배양 후 배양액과 Carrier oil 또는 essential aroma oil을 제거하였다. 10% TCA(trichloroacetic acid) 2ml를 가하고 1시간 동안 고정시킨 후 PBS(phosphate buffer solution)으로 세정하였다. Sirius red 염색은 1% Sirius red 용액을 넣고 1시간 동안 실온에서 반응시킨 다음 0.5% acetic acid로 세정한 후

에 haemalam 액으로 10분 염색하였고, formazan 염색은 2.5% formazan을 가하고 3시간 방치 후 PBS로 세정하였다. 광학현미경으로 80배와 160배에서 cell growth과 hyperplasia, atrophy, cytoplasm karyolysis, nucleus karyorrhexis, pknosis 등을 관찰하였다.

## 2) Essential aroma oil의 항균 활성 효과

### (1) Essential aroma oil의 선정

세포독성변화 실험에서와 같이 인체에 유해성이 적고 항염, 항균작용이 증명된 oil을 선정하였는데, 정유 성분이 공기 중으로 휘발되지 않도록 유지하면서 체내로 침투하는 것을 도와주는 천연 식물성 오일로 고급 불포화 지방산과 고급 불포화alcohol의 ester로 구성되어 항염, 항균작용을 가지고 있는 jojoba oil, 항균작용에 직접 작용하는 terpene과 ketone이 풍부한 ginger oil, cinnamon과 alcohol이 풍부한 rosemary oil과 cypress oil들을 선정하였다(Knobloch, 1989). 또한 물에 용해되어야 하기 때문에 aldehyde, ketone, monoterpene, alcohol로 구성되어 수용성의 성격을 지닌 것도 고려하였다(사공 등, 2008).

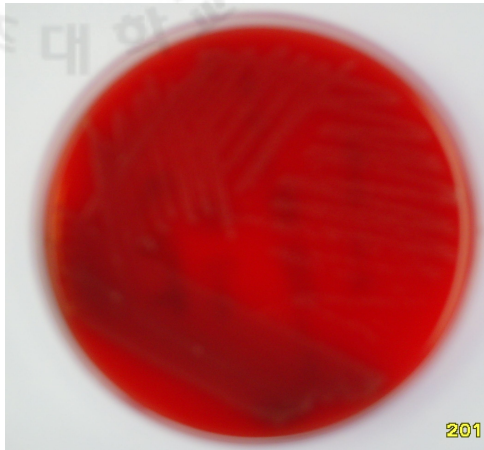
### (2) 실험에 사용한 균주 및 배양

균주는 국립수산과학원에서 동결 건조된 *Streptococcus iniae*(FP 5228), *Edwardsiella tarda*(FP 5060), *Vibrio ichthyenteri*(FP 4004) 3종을 분양받아 동결 건조된 균주에 멸균식염수를 첨가하여 부유시킨 후 sheep blood agar plate(BAP), Muller Hinton Agar 90(MH)에 도말하여 37.5℃에서 48시간 배양한 후 순수배양을 위해 추가 계대배양을 하였다.

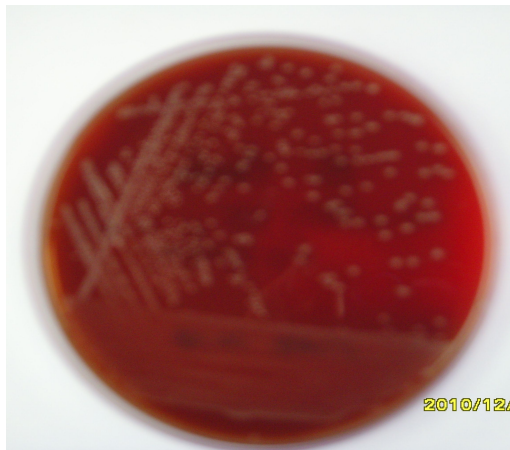
*S. iniae*는 Gram positive 구균으로 BAP agar에서 37.5℃ 24hrs에서 배양하였을때 원형이고 상아색의 작은 colony가 형성되었으며(Fig. 1a), *E. tarda*는 Gram negative 간균으로 지름 1mm정도의 회백색이고 광택 나는 정원형의 colony를 형성하였다(Fig. 1b). *V. ichthyenteri*는 Gram negative 간균으로



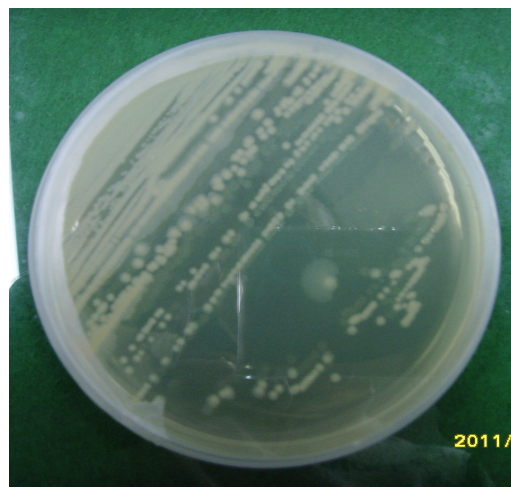
37.5°C에서 48hrs 배양하였을 때 지름 1mm정도의 원형으로 중앙부가 약간 불  
룩한 회백색의 투명감이 있는 colony를 형성하였다(Fig. 1c).



*S. iniae* (a)



*E. tarda* (b)



*V. ichrhyoenteri* (c)

Fig. 1. 3 species fish pathogenic bacteria culture of 48 hours on 37.5°C.

### (3) Disc diffusion method를 이용한 항균제 감수성 실험

essential aroma oil disc와 일반 항생제의 항균활성을 비교하고자 양성대조균으로서 시판용 항생제 disc를 사용하여 disc법에 의한 항균제 감수성 시험을 미국 FDA에서 권장하고 있는 Kirby-Bauer법으로 시행하였다.

MacFaland No.0.5로 제조된 균주를 멸균면봉에 적셔 2개의 BAP(blood agar plate)배지에 골고루 도포하였다(서로 다른 세 방향으로 streaking). 표면이 건조된 후 각 disc(Oxoid, BBL, bioDiscs, 8mm)를 접종하고 표면의 습기를 제거하기 위해 실온에서 3-5분 동안 방치하였다. disc와 disc 간격이 최소 24mm, petri dish 끝에서 disc와의 거리가 15mm가 유지되도록 disc dispenser를 이용하여 각각의 항생제를 배지표면에 떨어뜨리고, disc가 잘 부착되도록 forceps을 이용하여 한 번씩 눌러주었다. 실온에서 30분방치 후 37.5℃ incubator에서 24시간 동안 배양하여 도말 배지위에 형성된 growth inhibition zone의 지름(장경&단경)을 측정하여 감수성 정도를 판독하였다.

약제감수성 검사에는 Quinolone계열(Oxoline acid, Flumequin, Nalidixic acid, Ofloxacin, Norfloxacin, Ciprofloxacin),  $\beta$ -Lactin계열(Amoxicilin), Chlormphenicol계열(Florfenicol), Erythromycin계열(Erythromycin, Clindamycin, Vancomycin), Tetracyclin계열(Oxytetracycline, Doxyxyclyne, tetracycline), Sulfa제 계열(Trimethoprime,Sulfisoxazole), Aminoglycoside계열(Gentamycin), Cepalosporins계열(Cefazidime), Penicillin계열(Ampicillin)의 항생제를 사용하였다.

#### (4) VITEK(bioMerieux SA, France) autoanalyzer를 이용한 MIC(Minimum Inhibitory Concentration) 측정

VITEK은 1960년대 후반 미항공우주국(NASA) project의 일환으로 우주선내에서 미생물을 신속 정확하게 동정하기 위한 목적으로 개발된 미생물 자동 분석기로, 통상적으로 사용하는 paper disc diffusion법은 세균의 항균제에 대한 감수성 양상만을 알 수 있는데, VITEK을 이용한 희석법에서는 일정온도에서 일정 시간 배양 후 균주의 증식이 관찰되지 않는 항균제의 최소농도를 MIC로 판정하게 된다. VITEK system을 이용한 검사는 90x50x3mm크기의 plastic card를 사용하였는데, 30개(동정용 카드) 또는 45개(약제 감수성 검사용 카드)의 well을 가진 card는 각 well마다 초미량의 건조배지 및 각종 생화학적 반응 기질, 감수성 검사용 약제가 들어 있어서 Filler/Sealer의 내부에서 음압하에 test card의 각 방향으로 주입되어지면, 이 test card를 Reader/Incubator에 넣어서 균의 증식대사가 이루어지도록 한 후 생화학반응의 결과로 발생하는 혼탁도의 변화가 1시간마다 660nm LED를 사용하여 판정되어 printing 되었다. 각 well의 검사결과를 양성(+:Growth) 또는 음성(-:No growth)으로 판정되어 program에 의해 MIC(Minimum Inhibition Concentration)가 계산되어 NCCLS(National Committee for Clinical Laboratory Standard,2005)판정기준에 따라 감수성 결과(R/I/S)가 결정되었다.

Table 3. Identification card & susceptibility cards of VITEK 60 auto analyzer

Organism	Standard turbidity	Card type	Reaction	TaXa	Culture conditions
Gram Negative Bacili (Enterobacteaceae/ Pseudomonas, Vibrionaceae)	1McF	GNI	29 biochemical reaction	103	VITEK 35.5°C
		GNI+	29 biochemical reaction	116	
Gram Positive (Staphylococci Streptococci Rod-Listeria Corynebacteia)	0.5McF	GPI	29 biochemical reaction	53	VITEK 35.5°C

GNI Card:Oxidase ,GPI Card:Catalase ,McF:McFarland

#### (5) Essential aroma oil 항균제 감수성 검사용 disc 제작

essential aroma oil의 주성분은 탄소와 수소로 구성된 terpenes와 alcohol, phenol, aldehyde, keton, ester, oxide, coumarine, ether, lactone 등의 산소 화합물인 terpenoid hydrocarbons 으로 구성되어 있지만 이들의 약리 효과는 항상 똑같이 발현되지 않는다. 따라서 100% 원액을 사용하더라도 항균활성도는 essential aroma oil의 종류와 구성성분에 따라 차이가 있기 때문에 본 실험에서는 수용성과 방부, 살균, 인체무해성이 증명된 jojoba oil, ginger oil, rosemary oil, cypress oil 50 $\mu$ l을 paper disc(diameter 8mm, ADVATEC D0811606)에 흡수 시킨 후, 균이 접종된 MH(muller hinton) agar에 흡착시켜 감수성을 측정하였다.

이때 essential aroma oil함유량은 각 disc별로 50 $\mu$ l, 25 $\mu$ l, 10 $\mu$ l, 5 $\mu$ l이었다.

#### (6) Essential aroma oil disc를 이용한 항균제 감수성 실험

*S. iniae*는 MH(Muller Hinton) agar에서 잘 자라지 않기 때문에 4개의 BAP(Blood agar plate)배지에 골고루 접종한 후 각 Plate에 essential aroma oil이 함유된 Paper disc를 올려놓았다. 첫 번째 plate에는 jojoba oil paper disc를, 두 번째 plate에는 ginger oil paper disc를, 세 번째 plate에는 rosemary oil paper disc를, 네 번째 plate에는 cypress oil paper disc를 올려놓았다. 4개의Plate에 이용된 4종의 essential aroma oil을 50 $\mu$ l, 25 $\mu$ l, 10 $\mu$ l, 5 $\mu$ l의 4가지 농도로 처리하여 사용하였다.

*E. tarda*는 MH agar에서, *V. ichthyenteris*는 1.5% NaCl이 첨가된 BHIA(brain heart infusion agar)에 골고루 접종한 후 같은 농도로 희석된 4종의 essential aroma oil disc를 올려놓고 37.5 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양 후 1차 확인하고, 48시간 배양 후 최종 확인하여 inhibition zone diameter를 측정하였다.

### III. 결 과

#### 1. Essential aroma oil의 세포 안전성 검사

##### 1) Liver cell의 세포 생존율과 형태학적 변화

세포생존에 필수적인 에너지원인 ATP를 합성하는 기관인 mitochondria에 미치는 영향을 알아보기 위해서 jojoba oil, ginger oil, rosemary oil, cypress oil을 liver cell에 0.00066, 0.0005, 0.001, 0.002, 0.01  $\mu\text{L}/\text{mL}$  농도로 처리했을 때, jojoba oil은 고농도인 0.01  $\mu\text{L}/\text{mL}$ 에서  $85.1 \pm 8.7\%$ , 0.00066  $\mu\text{L}/\text{mL}$ 에서는  $98.9 \pm 9.7\%$ 의 세포생존율을 나타냈고, ginger oil과 rosemary oil은 0.00066  $\mu\text{L}/\text{mL}$ 에서  $99.5 \pm 6.6\%$ ,  $100.3 \pm 3.2\%$ 를 보인 반면에 cypress oil은  $61.4 \pm 1.1\%$ 로 가장 낮은 생존율을 나타냈다(Table 4, Fig. 2).

Control(100%)과 비교 했을 때 0.001  $\mu\text{L}/\text{mL}$  농도에서 ginger oil과 rosemary oil은 각각 35%, 21%로 세포생존율이 떨어졌으며, cypress oil은 92% 이하로 떨어져 가장 낮은 세포생존율을 보였다(Fig. 3).

50% 간세포 생존율은 ginger oil은 0.0012  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , rosemary oil은 0.0014  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , cypress oil은 0.00058  $\mu\text{L}/\text{mL}$  농도에서 나타났다(Table 5, Fig. 4). formazan stain후 현미경으로 세포의 형태변화는 관찰한 결과는 ginger oil과 rosemary oil은 0.001  $\mu\text{L}/\text{mL}$  농도에서, cypress oil은 0.0005  $\mu\text{L}/\text{mL}$  농도에서 세포의 형태가 대조세포와 비슷하게 뻗으면서 세포가 성장하였고, 세포질 용해 또한 관찰되지 않았다(Fig. 5a, b, c, d).

cypress oil은 고농도인 0.002  $\mu\text{L}/\text{mL}$ 에서는 세포가 길게 뻗으면서 성장하지 못하고 원형을 유지하였으며, 세포질이 용해되고 공포를 형성하였다.

Table 4. Cell viability of various diluted carrier and essential aroma oils on liver cell

Essential aroma oil	Concentration of essential aroma oils					
	control	0.00066 ( $\mu\text{L/mL}$ )	0.0005 ( $\mu\text{L/mL}$ )	0.001 ( $\mu\text{L/mL}$ )	0.002 ( $\mu\text{L/mL}$ )	0.01 ( $\mu\text{L/mL}$ )
Jojoba	100.0 $\pm$	98.9 $\pm$	92.7 $\pm$	88.6 $\pm$	86.2 $\pm$	85.1 $\pm$
(%)	1.0	9.7	9.6	7.8	11.2	8.7
Ginger	100.0 $\pm$	99.5 $\pm$	95.1 $\pm$	65.6 $\pm$	15.2 $\pm$	0.02 $\pm$
(%)	2.3	6.6	1.7*	6.5*	4.7*	0.02*
Rosemary	100.0 $\pm$	100.3 $\pm$	100.1 $\pm$	79.8 $\pm$	22.2 $\pm$	0.03 $\pm$
(%)	1.7	3.2	1.1	4.1*	3.0*	0.001*
Cypress	100.0 $\pm$	61.4 $\pm$	39.8 $\pm$	8.8 $\pm$	4.5 $\pm$	0.01 $\pm$
(%)	3.1	1.1*	4.2*	1.4*	0.6*	0.01*

Data show mean  $\pm$  S.D. in triplicate, cells were pretreated with various diluted concentrations of Essential aroma oil and cell viability was determined by the MTT assay, \*:  $p < 0.05$ , significantly different from control.

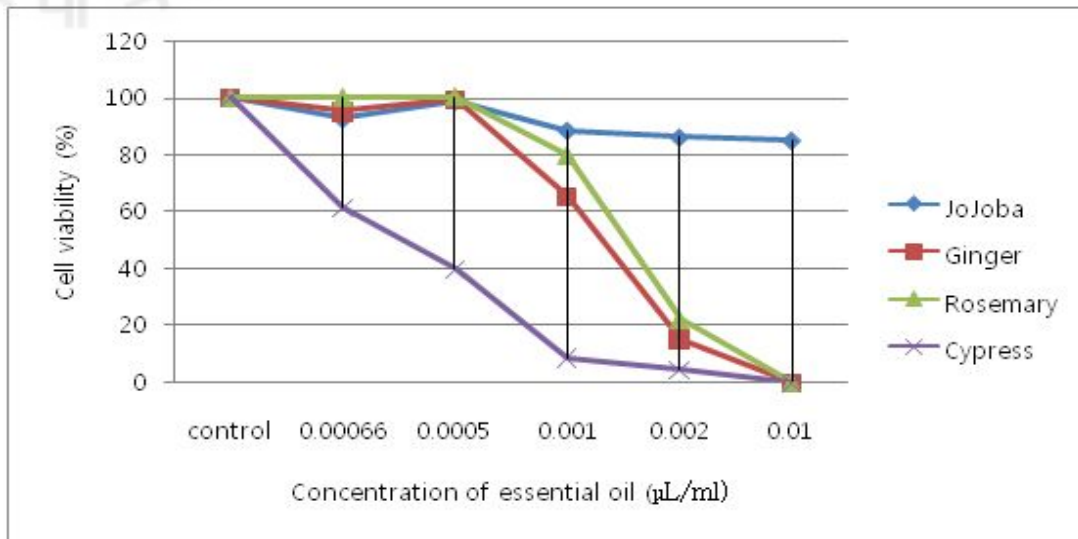


Fig. 2. Cell viability of various diluted carrier and essential aroma oils on liver cell.



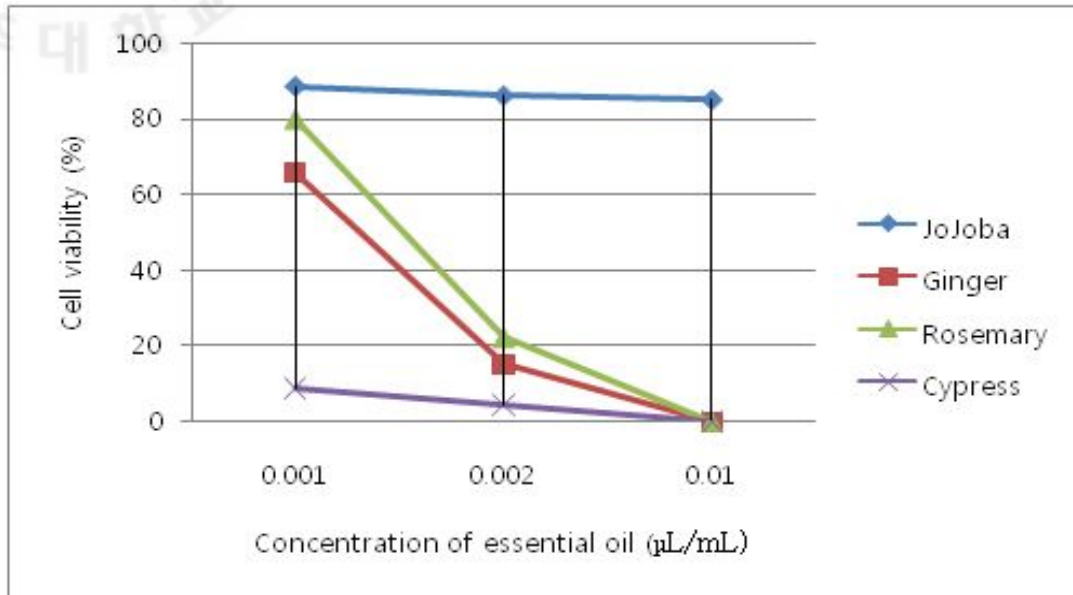


Fig. 3. Viability of essential aroma oils treated liver cell by MTT assay.

Table 5. 50% viability of essential aroma oils treated liver cell by MTT assay.

Cell	Essential aroma oils	Ginger ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )	Rosemary ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )	Cypress ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )
Liver cell		0.0012	0.0014	0.00058

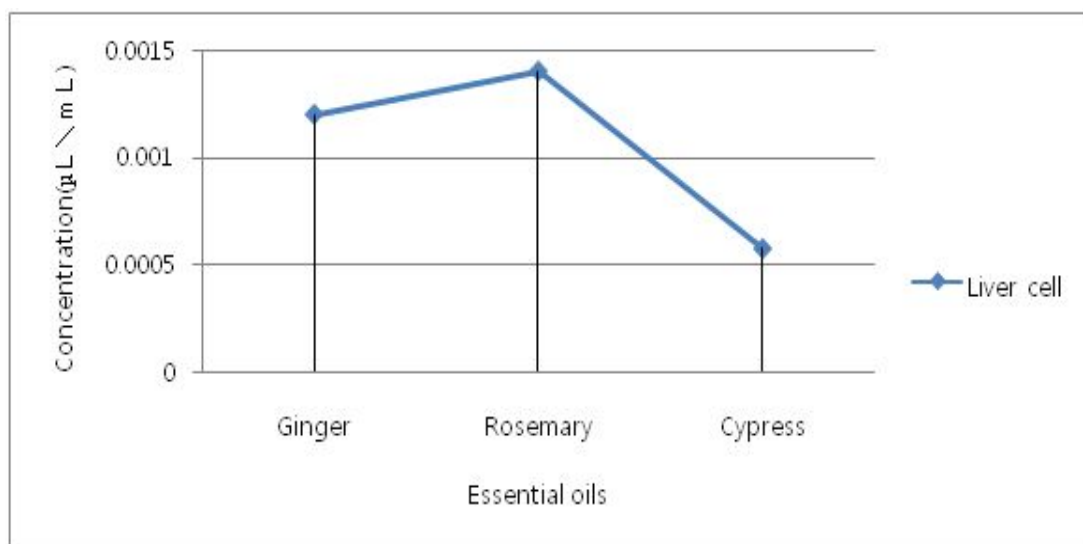
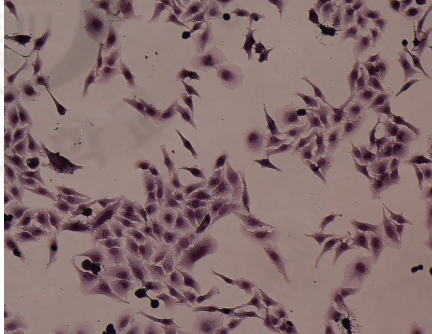
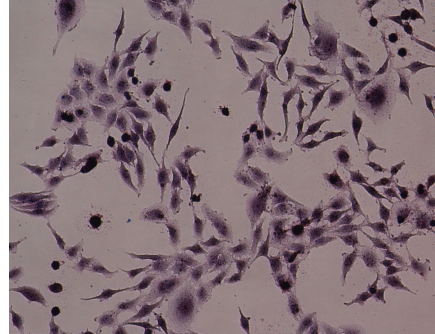


Fig. 4. 50% viability of essential aroma oils treated liver cell by MTT assay.

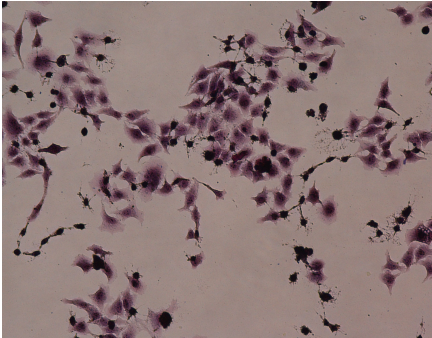
a)



b)



c)



d)

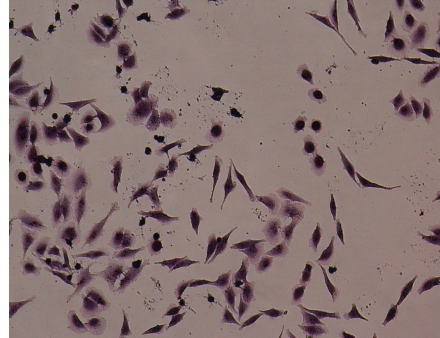


Fig. 5. Microscopical observation of morphological change on liver cell by formazan staining ( $\times 80$ ,  $\times 160$ ).

a) normal cell,

b) 0.001 $\mu$ L/mL ginger oil treated cell,

c) 0.001 $\mu$ L/mL rosemary oil treated cell,

d) 0.0005 $\mu$ L/mL cypress oil treated cell.

## 2) Brain cell의 세포 생존율과 형태학적 변화

brain cell에서 jojoba oil은 낮은 농도에서 세포에 손상을 주는 것보다는 오히려 세포의 성장과 증식을 활성화시키는 것으로 나타났다(Table 6).

jojoba oil은 고농도인  $0.01 \mu\text{L}/\text{mL}$  에서도  $99.1 \pm 13.2\%$ ,  $0.00066 \mu\text{L}/\text{mL}$  에서는  $152.3 \pm 15.7\%$ 의 세포생존율을 나타냈고, ginger oil과 rosemary oil은  $0.00066 \mu\text{L}/\text{mL}$  같은 농도에서  $72.1 \pm 0.6\%$ ,  $97.8 \pm 0.1\%$ 를 보인 반면에 cypress oil은  $47.1 \pm 17.7\%$ 로 가장 낮은 생존율을 나타냈다(Table 6, Fig. 6). control(100%)과 비교한  $0.001 \mu\text{L}/\text{mL}$  농도에서도 ginger oil과 rosemary oil은 각각 74%, 46%로 세포생존율이 떨어졌지만, cypress oil은 90% 이하로 세포생존율이 낮게 나타났다(Fig. 7).

50% 뇌세포 생존율은 ginger oil에서  $0.0006 \mu\text{L}/\text{mL}$ , rosemary oil에서  $0.0011 \mu\text{L}/\text{mL}$ , Cypress oil에서  $0.00042 \mu\text{L}/\text{mL}$ 를 나타냈다(Table 7, Fig. 8). formazan stain 후 현미경으로 세포의 형태변화는 관찰한 결과는 ginger oil은  $0.001 \mu\text{L}/\text{mL}$ 에서 대조세포와 비교해 볼 때 세포의 성장과 증식이 억제되고 원형의 세포들이 서로 이웃하고 있었으며 세포질 용해가 관찰되었으나(Fig. 9a, b) 그 이후 농도에서는 약간의 세포성장 및 증식이 시작되기 시작하였고,  $0.0005 \mu\text{L}/\text{mL}$ 에서는 세포의 성장과 증식이 정상이었다.

rosemary oil은  $0.001 \mu\text{L}/\text{mL}$ 에서 대부분의 세포의 위축과 일부는 세포의 성장 억제가 관찰되었고,  $0.0005 \mu\text{L}/\text{mL}$ 에서는 대조세포 정도로 성장하고 세포질 용해는 관찰되지 않았다(Fig. 9a, c).

cypress oil은  $0.0005 \mu\text{L}/\text{mL}$ 에서 세포의 성장이 억제되고 원형인 것이 많았고,  $0.00066 \mu\text{L}/\text{mL}$ 에서는 대조세포와 비슷하게 나타났다(Fig. 9a, d)

Table 6. Cell viability of various diluted carrier and essential aroma oils on brain cell

Essential aroma oil	Concentration of essential aroma oils					
	control ( $\mu\text{L/mL}$ )	0.00066 ( $\mu\text{L/mL}$ )	0.0005 ( $\mu\text{L/mL}$ )	0.001 ( $\mu\text{L/mL}$ )	0.002 ( $\mu\text{L/mL}$ )	0.01 ( $\mu\text{L/mL}$ )
JoJoba (%)	100.0 $\pm$ 0.2	100.8 $\pm$ 18.9*	152.3 $\pm$ 15.7*	136.7 $\pm$ 16.2*	133.7 $\pm$ 15.8*	99.1 $\pm$ 13.2
Ginger (%)	99.7 $\pm$ 1.3	72.1 $\pm$ 0.6*	36.0 $\pm$ 7.8*	26.7 $\pm$ 1.2*	20.7 $\pm$ 10.8*	0.07 $\pm$ 0.001*
Rosemary (%)	100.3 $\pm$ 0.6	97.8 $\pm$ 0.1	85.9 $\pm$ 2.6*	54.2 $\pm$ 4.4*	9.0 $\pm$ 0.7*	1.9 $\pm$ 1.2*
Cypress (%)	98.9 $\pm$ 1.5	47.1 $\pm$ 17.7*	17.7 $\pm$ 11.7*	10.4 $\pm$ 0.1*	3.8 $\pm$ 0.8*	0.1 $\pm$ 0.001*

Data show mean  $\pm$  S.D. in triplicate, cells were pretreated with various diluted concentrations of carrier and Essential aroma oil and cell viability was determined by the MTT assay, \*:  $p < 0.05$ , significantly different from control.

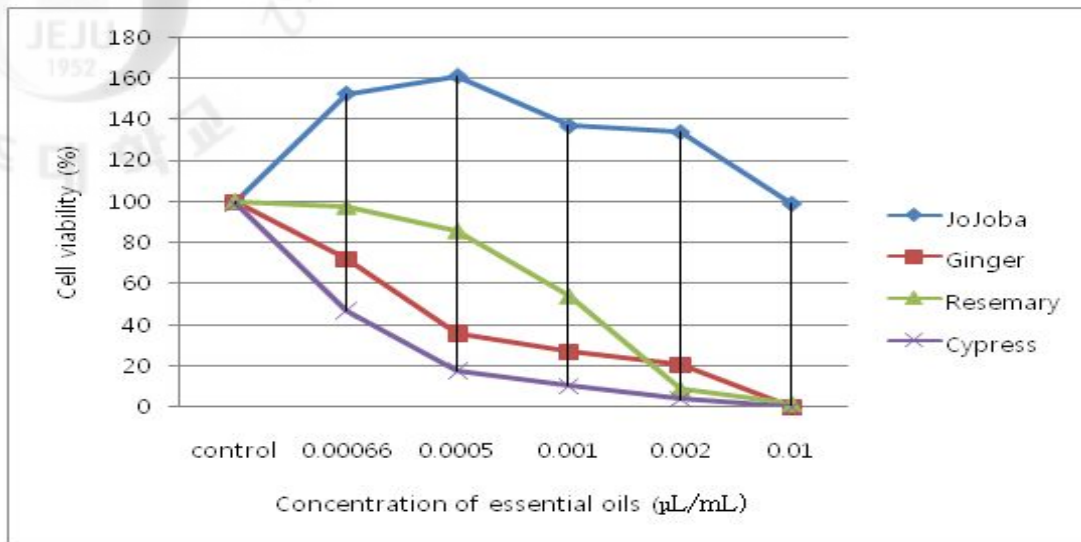


Fig. 6. Cell viability of various diluted carrier and essential aroma oils on brain cell.

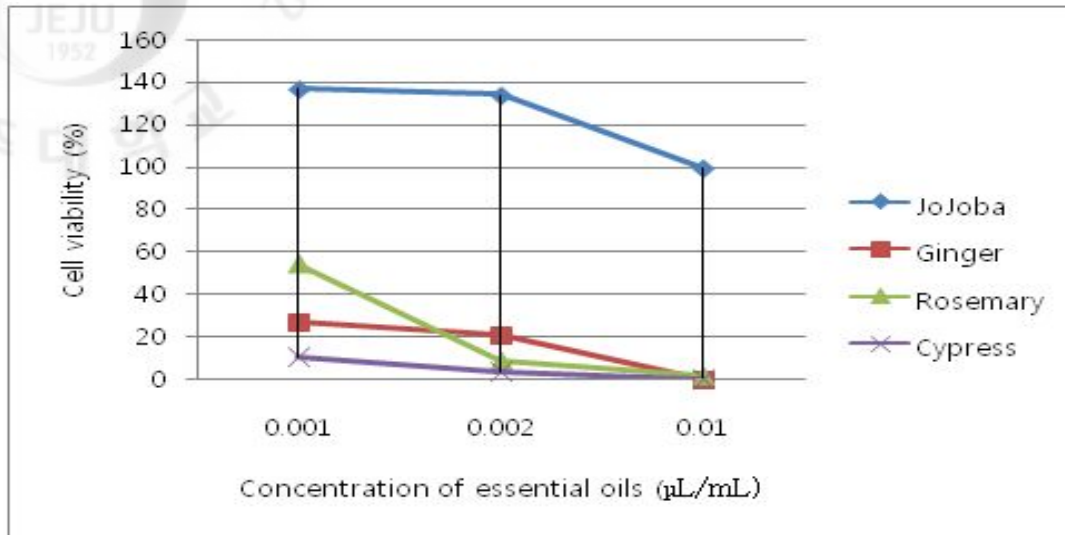


Fig. 7. Viability of essential aroma oils treated brain cell by MTT assay.

Table 7. 50% viability of essential aroma oils treated brain cell by MTT assay.

Cell	Essential aroma oils	Ginger ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )	Rosemary ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )	Cypress ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )
Brain cell		0.0006	0.0011	0.00042

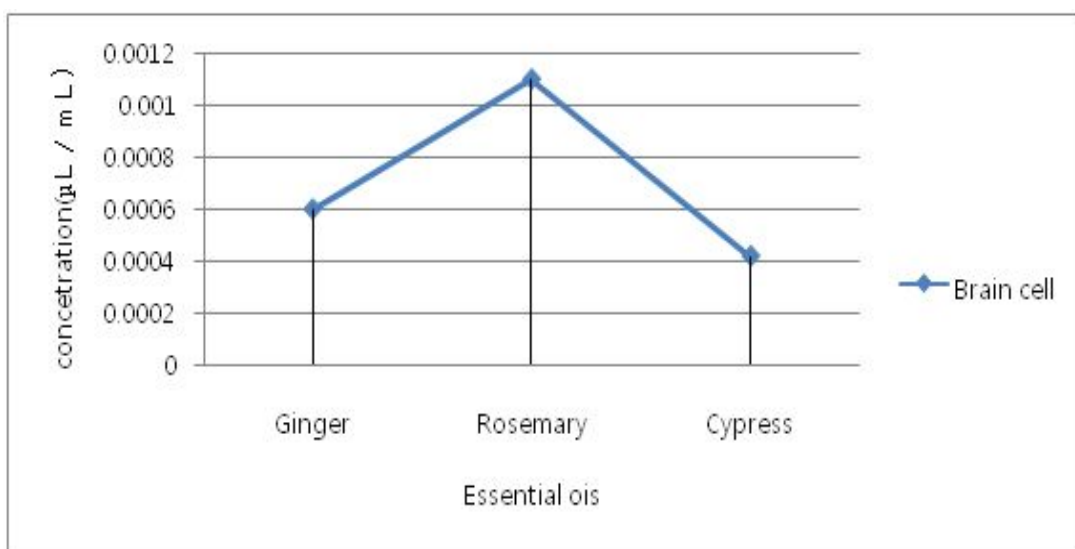
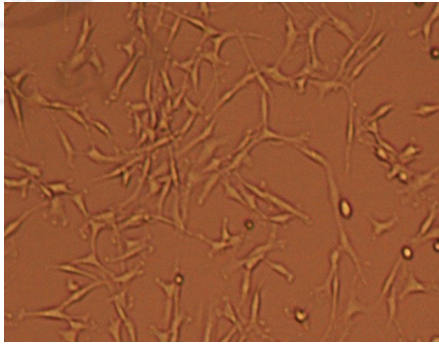


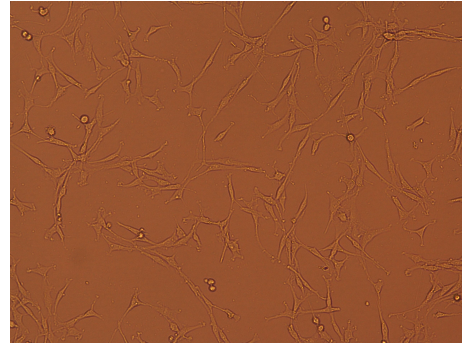
Fig. 8. 50% viability of essential aroma oils treated brain cell by MTT assay.



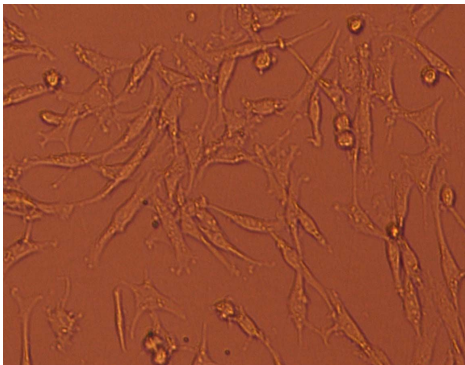
a)



b)



c)



d)

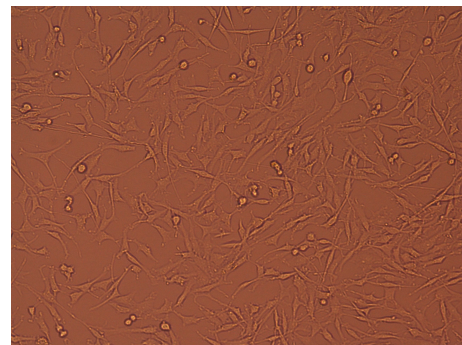


Fig. 9. Microscopical observation of morphological change on brain cell by no staining ( $\times 80$ ,  $\times 160$ ).

a) normal cell

b) 0.001 $\mu$ L/mL ginger oil treated cell

c) 0.0005 $\mu$ L/mL rosemary oil treated cell

d) 0.0005 $\mu$ L/mL cypress oil treated cell.

### 3) Kidney cell의 세포 생존율과 형태학적 변화

kidney cell에서 jojoba oil은 고농도인  $0.01 \mu\text{L}/\text{mL}$ 에서도  $96.6 \pm 5.3\%$ ,  $0.00066 \mu\text{L}/\text{mL}$ 에서는  $97.3 \pm 2.9\%$ 의 세포생존율을 나타내어 거의 독성이 없는 것으로 나타났다. ginger oil과 rosemary oil은  $0.00066 \mu\text{L}/\text{mL}$  농도에서 각각  $93.5 \pm 0.3\%$ ,  $93.4 \pm 3.0\%$ 를 보인 반면에 cypress oil은  $85.6 \pm 0.6\%$ 로 낮은 생존율을 나타냈다(Table 8, Fig. 10).

control(100%)과 비교한  $0.001 \mu\text{L}/\text{mL}$  농도에서도 ginger oil과 rosemary oil은 각각 55%, 60%로 세포생존율이 떨어졌으나 cypress oil은 63% 이하로 세포생존율이 더 낮게 나타났다(Fig. 11).

50% 신장세포 생존율은 ginger oil은  $0.0001 \mu\text{L}/\text{mL}$ , rosemary oil은  $0.0009 \mu\text{L}/\text{mL}$ , cypress oil은  $0.00098 \mu\text{L}/\text{mL}$  농도에서 나타나, cypress oil이 생존율이 더 낮게 나타났다(Table 9, Fig. 12).

formazan stain 후 현미경으로 세포의 형태변화를 관찰한 결과는 ginger oil은  $0.002 \mu\text{L}/\text{mL}$ 에서 대조세포와 비교해 볼때 세포의 성장과 증식이 억제되고 원형의 세포들이 서로 이웃하고 있었으며 세포질 용해가 관찰되었으나(Fig. 13 a, b) 그 이후 농도에서는 약간의 세포성장 및 증식이 시작되기 시작하였고,  $0.00066 \mu\text{L}/\text{mL}$ 에서는 세포가 길게 뻗으며 성장하고 증식하였다.

이노효과가 있다고 보고된 rosemary oil은  $0.02 \mu\text{L}/\text{mL}$  에서 세포의 증식이 억제되었으나,  $0.0005 \mu\text{L}/\text{mL}$ 의 농도에서 세포가 정상적으로 증식하고 성장하였다(Fig. 13a, c).

cypress oil은  $0.02 \mu\text{L}/\text{mL}$  농도에서 대부분의 신장 세포들이 핵이 용해되어 사멸하였으나,  $0.00066 \mu\text{L}/\text{mL}$  의 농도에서는 세포가 정상적으로 증식하고 성장하였다(Fig. 13a, d).

Table 8. Cell viability of various diluted carrier and essential aroma oils on kidney cell

Essential aroma oil	Concentration of Essential aroma oils					
	control	0.00066 ( $\mu\text{L/mL}$ )	0.0005 ( $\mu\text{L/mL}$ )	0.001 ( $\mu\text{L/mL}$ )	0.002 ( $\mu\text{L/mL}$ )	0.01 ( $\mu\text{L/mL}$ )
JoJoba (%)	100.2 $\pm$ 1.0	97.3 $\pm$ 2.9	97.6 $\pm$ 6.1	96.6 $\pm$ 5.3	96.1 $\pm$ 4.1	94.3 $\pm$ 6.7
Ginger (%)	99.4 $\pm$ 3.5	93.5 $\pm$ 0.3*	94.3 $\pm$ 6.5	45.4 $\pm$ 2.6*	26.2 $\pm$ 4.8*	5.7 $\pm$ 3.1*
Rosemary (%)	100.3 $\pm$ 2.3	93.4 $\pm$ 3.0*	99.6 $\pm$ 1.3	40.4 $\pm$ 6.7*	2.6 $\pm$ 0.3*	1.8 $\pm$ 1.0*
Cypress (%)	99.2 $\pm$ 5.3	85.6 $\pm$ 0.6*	94.6 $\pm$ 1.1	37.2 $\pm$ 21.4*	2.3 $\pm$ 0.8*	1.2 $\pm$ 0.6*

Data show mean  $\pm$  S.D. in triplicate, cells were pretreated with various diluted concentrations of carrier and Essential aroma oil and cell viability was determined by the MTT assay, \*:  $p < 0.05$ , significantly different from control.

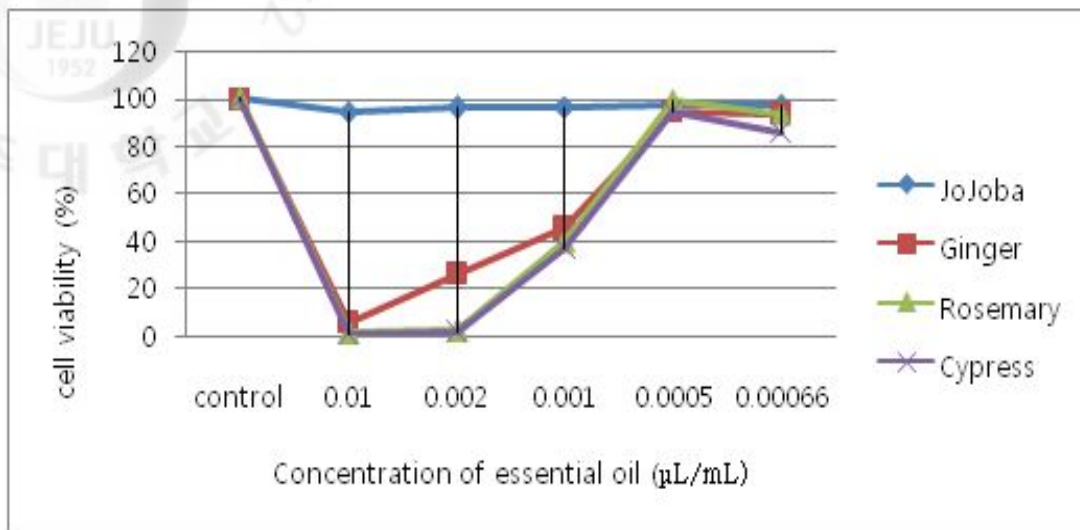


Fig. 10. Cell viability of various diluted carrier and essential aroma oils on kidney cell

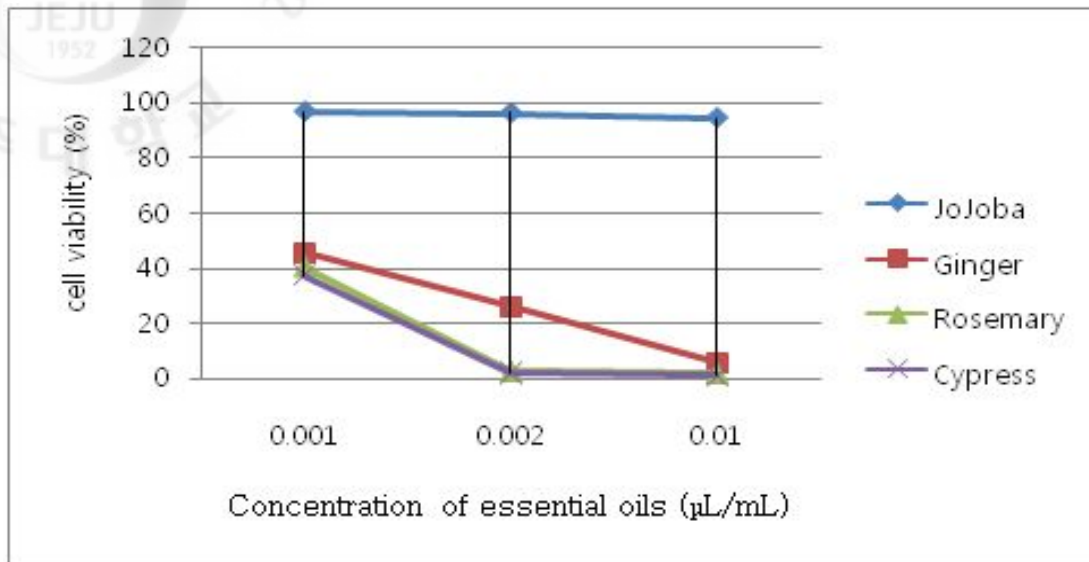


Fig. 11. Viability of essential aroma oils treated kidney cell by MTT assay.

Table 9. 50% viability of essential aroma oils treated kidney cell by MTT assay.

Essential aroma oils Cell	Ginger ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )	Rosemary ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )	Cypress ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )
Kidney cell	0.0009	0.0009	0.0001

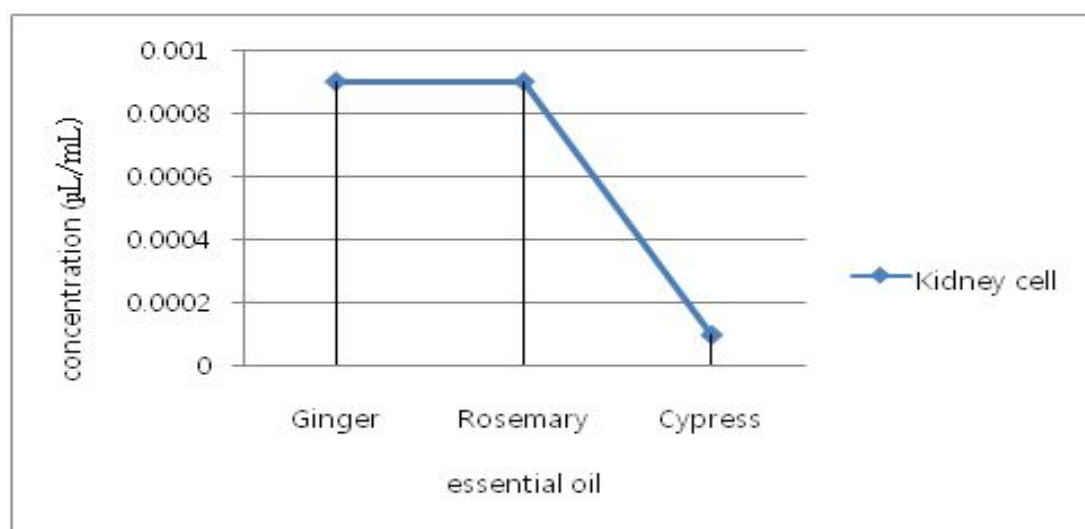


Fig. 12. 50% viability of essential aroma oils treated kidney cell by MTT assay.

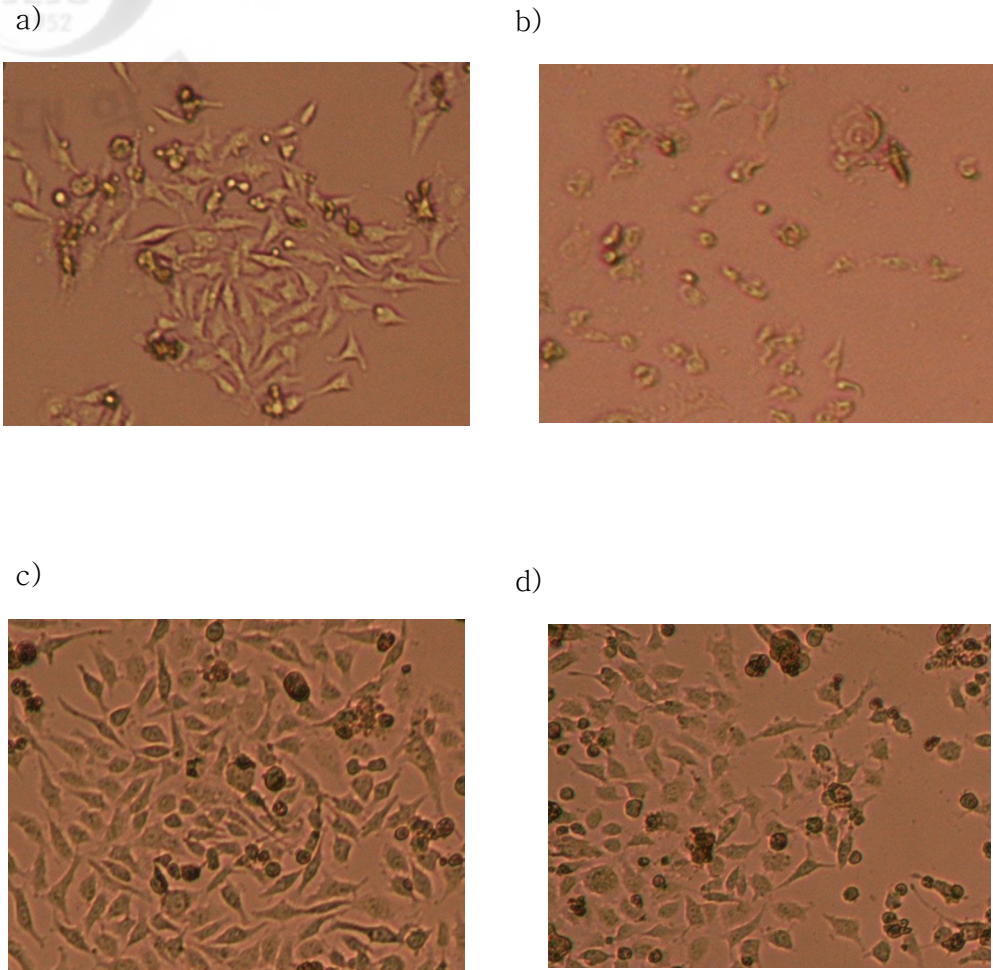


Fig. 13. Microscopical observation of morphological change on kidney cell by formazan staining ( $\times 80$ ,  $\times 160$ ).

- a) normal cell
- b) 0.002  $\mu\text{L}/\text{mL}$  ginger oil treated cell
- c) 0.0005  $\mu\text{L}/\text{mL}$  rosemary oil treated cell
- d) 0.00066  $\mu\text{L}/\text{mL}$  cypress oil treated cell.

## 2. 일반항균제 disc 및 VITEC 60 Autoanalyzer의 감수성 검사

### 1) Disc diffusion method를 이용한 감수성 결과

essential aroma oil disc와 항균활성을 비교하기 위하여 양성대조균으로 시판용 항생제 disc를 이용하여 3종의 균주에 대해 disc diffusion method 에서 항균제 감수성 시험을 한 결과는 Quinolone계열 (Ofloxacin, Norfloxacin, Ciprofloxacin), Tetracycline계열 (Doxycycline), Cephalosporins계열 (Ceftazidime)은 *S. iniae*, *E. tarda*, *V. ichthyoenteri* 3종 모두에서 감수성이 높게 나타났다(Fig. 14).

*S. iniae*는 aminoglycoside 계열과 Quinolone 계열 일부를 제외한 Penicillin 계열, Cephalosporins계열, Chloramphenicol계열, Tetracycline계열, Erythromycin계열, Sulfa제 계열 모두에서 감수성이 높게 나타났으며(Aoki, 1975), *E. tarda*는  $\beta$ -Lactin계열, Chloramphenicol계열, Erythromycin계열, Sulfa제 계열에는 약제 내성균이 존재하고 있는 것으로 나타났고 나머지 항생제에는 감수성이 높게 나타났다(Aoki *et al.*, 1985). *V. ichthyoenteri*는 Erythromycin계열(Clindamycin, Vancomycin), Oxytetracyclin계열 등을 제외한 모든 항생제에 감수성이 높게 나타났다(Table 10).



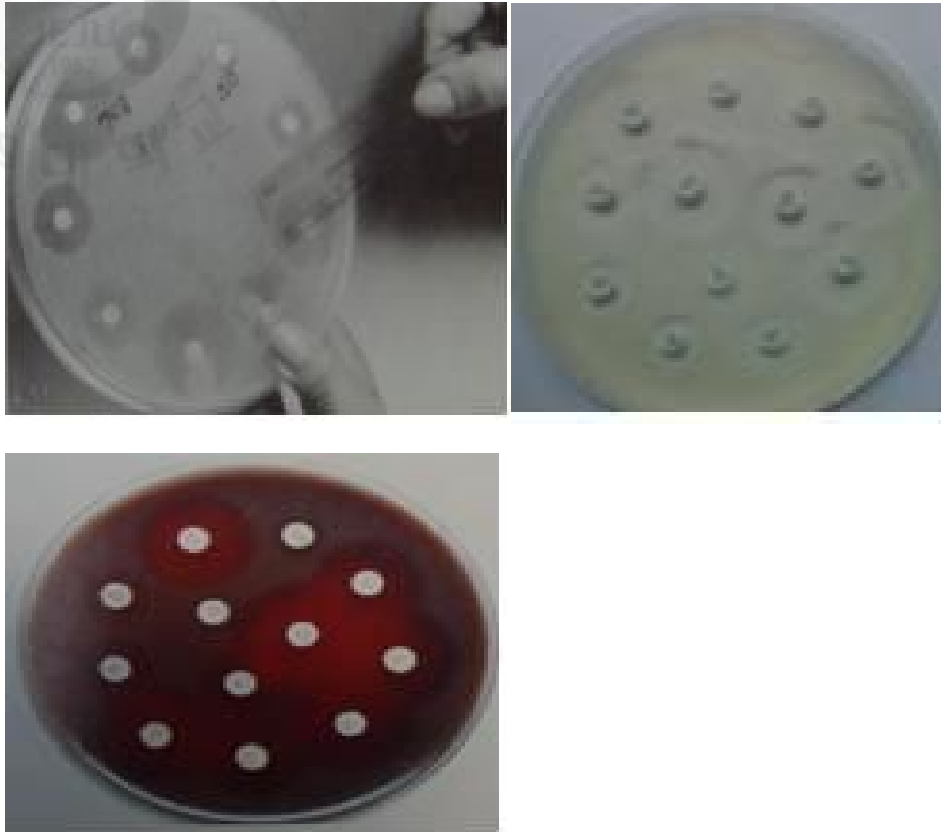


Fig. 14. Inhibition zone of commercial antibacterial discs against 3 fish pathogenic bacterial species

Table 10. Antimicrobial activity of commercial antibacterial discs against  
3 pathogenic bacterial species

Antibiotics group	Antibiotics species	Diameter of inhibition zone(mm)		
		<i>S. iniae</i>	<i>E. tarda</i>	<i>V. ichthyoenteri</i>
Quinolone	Oxoline acid (2 $\mu$ g/disc)	-	12	24
	Flumequin (30 $\mu$ g/disc)	-	15	32
	Nalidixic acid (30 $\mu$ g/disc)	-	12	31
	Ofloxacin (5 $\mu$ g/disc)	18	21	22
	Norfloxacin (10 $\mu$ g/disc)	19	22	28
	Ciprofloxacin (5 $\mu$ g/disc)	15	25	11
	$\beta$ -Lactin	Amoxicilin (20 $\mu$ g/disc)	31	-
Chloramphenicol	Florfenicol (30 $\mu$ g/disc)	24	-	12
Erythromycin	Erythromycin (15 $\mu$ g/disc)	22	-	21
	Clindamycin (2 $\mu$ g/disc)	20	-	-
	Vancomycin (30 $\mu$ g/disc)	21	-	-
Tetracycline	Oxytetracycline (30 $\mu$ g/disc)	21	16	-
	Doxycycline (30 $\mu$ g/disc)	25	23	10
Sulfase	Trimethoprim (23 $\mu$ g/disc)	14		21
	Sulfisoxazole (250 $\mu$ g/disc)	9		21
Aminoglycoside	Gentamycin (10 $\mu$ g/disc)	-	17	25
Cephalosporins	Ceftazidime (30 $\mu$ g/disc)	25	16	25
Penicillin	Ampicillin (10 $\mu$ g/disc)	20	-	15

## 2) VITEK 60 auto analyzer를 이용한 최소억제농도(Minimal Inhibitory Concentration, MIC) 측정 결과

과도한 항생제 사용으로 낮은 농도의 항균제에서 자연내성인 균주가 많아지고 이들 항생제에 대해 고도 내성인 균주가 많아짐에 따라서 발생초기에 효과를 볼 수 있는 감수성이 큰 약제를 선택해야 하는 필요성이 증대되고 있다. 따라서 disc diffusion method는 세균의 항균제에 대한 감수성 양상만을 알 수 있는데, VITEK 60 auto analyzer을 이용한 희석법에서는 일정온도에서 일정시간 배양 후 균주가 증식이 되지 않는 항균제의 최소농도를 측정할 수 있기 때문에 *S. iniae*, *E. tarda*, *V. ichthyoenteri* 3종의 균주에 대하여 두 방법 간의 감수성에 대한 차이를 비교하고, 감수성과 저항성 기준 수치를 참조하여 판정하는 MIC 값을 전자동 미생물의 동정 및 항생제 감수성 test용 기기인 VITEK 60 auto analyzer을 이용하여 측정하였다.

### (1) *S. iniae*의 MIC 측정 결과

VITEK 60 auto analyzer를 이용한 *S. iniae*의 MIC를 측정한 결과 disc diffusion method 에서와 같이 Quinolone계열, Chloramphenicol계열, Erythromycin 계열, Tetracyclin계열, Sulfa제 계열, Aminoglycoside계열, Cephalosporins계열, Penicillin계열 모두에서 감수성을 보였으며, 특히 Penicillin계열에서 높은 감수성을 보였다. 그러나 Tetracyclin계열(Doxycycline, Tetracycline)에서는 약제내성을 보였다(Table 11).

Table 11. Antimicrobial activity of VITEK 60 auto analyzer on the *S. iniae*

Antibiotics group	Antibiotic species	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	Instrument
Quinolone	Ciprofloxacin	$\leq 0.5$	S
Chloramphenicol	Florfenicol	$\leq 2$	S
	Erythromycin	$\leq 0.5$	S
Erythromycin	Clindamycin	$\leq 0.5$	S
	Vancomycin	$\leq 0.5$	S
Tetracyclin	Oxytetracycline	$\leq 32$	S
	Doxycycline	8	I
	Tetracycline	$\geq 16$	R
Sulfase	Trimethoprim	$\leq 10$	S
Aminoglycoside	Gentamycin	$\leq 2$	S
Cephalosporin	Ceftazidime	$\leq 2$	S
	Cephalothin	$\leq 2$	S
Penicillin	Oxacillin	$\leq 0.25$	S
	Penicillin-G	$\leq 0.03$	S
	Rifampin	$\leq 0.25$	S

## (2) *E. tarda* 의 MIC 측정 결과

VITEK 60auto analyzer를 이용한 *E. tarda* 의 MIC를 측정한 결과 disc diffusion method 에서는  $\beta$ -Lactin계열, Chloramphenicol계열, Erythromycin 계열, Sulfa제 계열에는 약제내성을 보였으나(Aoki *et al.*, 1981), 본 결과에서는 Erythromycin계열, Sulfa제 계열에도 감수성을 보였으나, MIC값이 크게 나타나 자연내성이 있는 것으로 보이며, 특히 Quinolone계열, Aminoglycoside계열에도 감수성이 높게 나타났다(Table 12).

Table 12. Antimicrobial activity of VITEK 60 auto analyzer on the *E. tarda*

Antibiotics group	Antibiotic species	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	Instrument
Qunolone	Ciprofloxacin	$\leq 0.5$	S
Erythromycin	Erythromycin	$\leq 8$	S
Sulfase	Trimethoprime	$\leq 10$	S
	Gentamycin	$\leq 0.5$	S
Aminoglycoside	Amikacin	$\leq 2$	S
	Tobramycin	$\leq 0.5$	S
	Aztreonam	$\leq 8$	S
	Ceftazidime	$\leq 8$	S
	Ceftriaxone	$\leq 8$	S
Cephalosporin	Cephalothin	8	S
	Cefazolin	$\leq 4$	S
	Imipenem	$\leq 4$	S
	Ampicillin	2	S
	Ampicillin sulbactam	$\leq 4$	S
Penicillin	Ticarcillin	$\leq 16$	S
	Piperacillin	$\leq 8$	S

### (3) *V. ichthyoenteri*의 MIC 측정 결과

VITEK 60 auto analyzer를 이용하여 *V. ichthyoenteri*의 일반 항생제 약제 감수성 실험을 실시한 결과 disc diffusion method에서 나타난 것과 같이 Penicillin계열(Ampicillin)을 제외한 모든 항생제에서 감수성이 나타났으며, 특히 Quinolone계열(Ciprofloxacin)과 Aminoglycoside계열(Gentamycin, Tobramycin)에서 높은 감수성을 보였다(Table 13).

Table 13. Antimicrobial activity of VITEK 60 auto analyzer on the *V. ichthyoenteri*

Antibiotics group	Antibiotic species	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	Instrument
Quinolone	Ciprofloxacin	$\leq 0.5$	S
Erythromycin	Erythromycin	$\leq 8$	S
Sulfase	Trimethoprim	$\leq 10$	S
	Gentamycin	$\leq 0.5$	S
Aminoglycoside	Amikacin	$\leq 2$	S
	Tobramycin	$\leq 0.5$	S
	Aztreonam	$\leq 8$	S
	Ceftazidime	$\leq 8$	S
Cephalosporin	Ceftriaxone	$\leq 8$	S
	Cephalothin	4	S
	Cefazolin	$\leq 4$	S
	Imipenem	$\leq 4$	S
	Ampicillin	$\geq 32$	R
	Ampicillin	8	S
Penicillin	sulbactam		S
	Ticarcillin	$\leq 16$	S
	Piperacillin	$\leq 8$	S



### 3. Essential aroma oil disc를 이용한 항균활성 검사

#### 1) *S. iniae*의 항균활성 결과

jojoba oil, ginger oil, rosemary oil, cypress oil을 멸균생리식염수를 이용하여 50 $\mu$ l, 25 $\mu$ l, 5 $\mu$ l, 2.5 $\mu$ l 농도로 희석하여 paper disc(diameter 8mm, ADVATEC D0811606)에 50 $\mu$ l씩 흡습 시킨 후 *S. iniae* 대한 항균활성을 알아보기 위해 growth inhibition zone의 직경을 측정하였다(Table 14, Fig. 15, Fig. 16).

*S. iniae*의 항균활성은 control로 사용한 일반 항생제인 vancomycin에서는 고르게 저지환을 형성하였으며, jojoba oil은 모든 농도에서 저지환이 형성되지 않았고, 50 $\mu$ l에서 rosemary oil이 50mm로 가장 큰 저지환을 형성하였고, cypress oil 30mm, ginger oil 20mm 순서로 나타났다. 25 $\mu$ l에서는 ginger oil과 rosemary oil이 20mm, cypress oil이 10mm의 저지환을 형성하였고, 5 $\mu$ l와 2.5 $\mu$ l에서는 모두 저지환이 형성되지 않았다. 따라서 원액과 50% 희석용액 모두에서 rosemary oil이 Vancomycin과 같은 저지환을 형성하여 항균 활성능이 우수하게 나타났다.

Table 14. Antimicrobial activity of essential aroma oil discs on the *S. iniae*

Oil name	Concentration of essential aroma oil				Control
	50 $\mu$ l	25 $\mu$ l	5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l	vancomycin
Ginger	20mm	20mm	–	–	60mm
Rosemary	50mm	20mm	–	–	20mm
Cypress	30mm	10mm	–	–	20mm
Jojoba	–	–	–	–	50mm

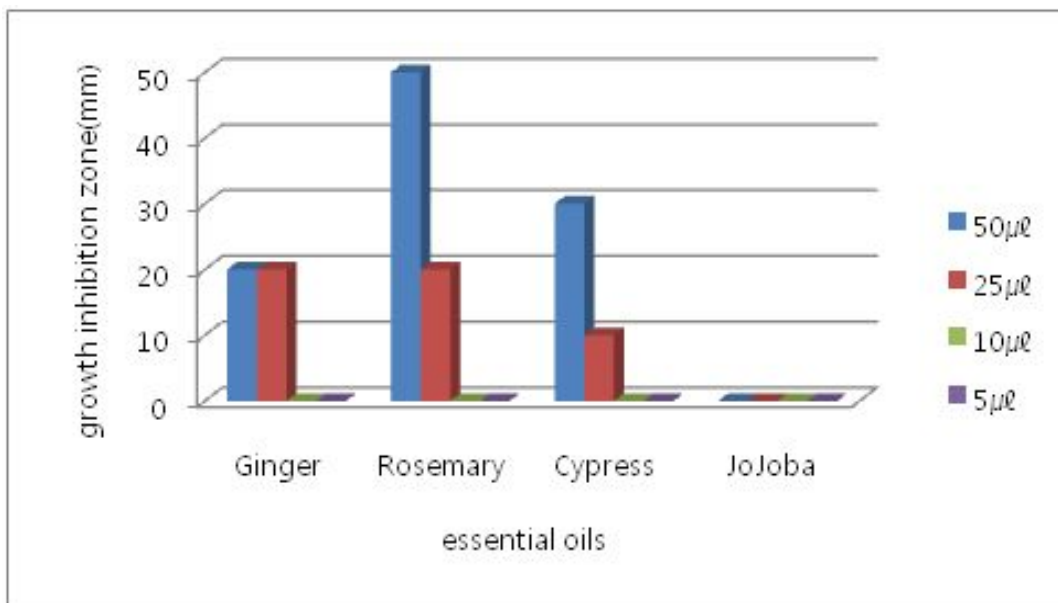
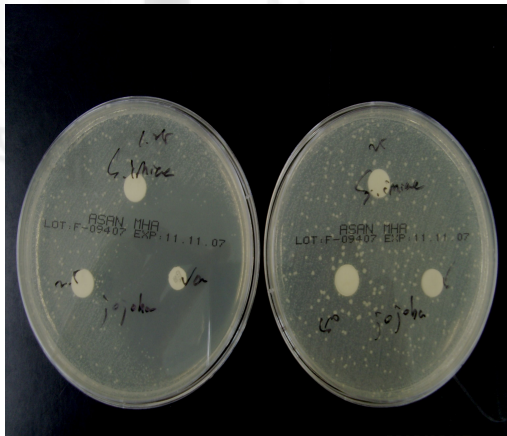


Fig. 15. Growth inhibition zone formations of essential aroma oil discs against *S. iniae*.



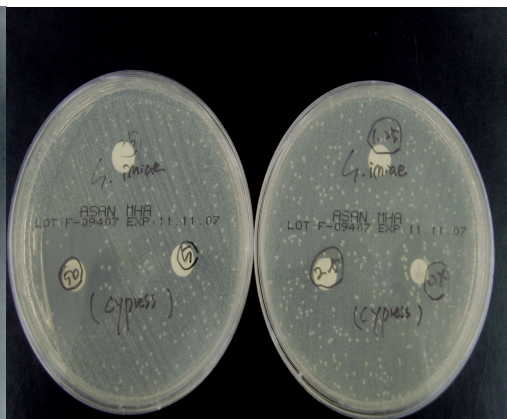
Jojoba oil



Ginger oil



Rosemary oil



Cypress oil

Fig. 16. Growth inhibition zone formations of essential aroma oil discs against *S. iniae*

## 2) *E. tarda*의 항균활성 결과

jojoba oil, ginger oil, rosemary oil, cypress oil을 멸균생리식염수로 50 $\mu$ l, 25 $\mu$ l, 5 $\mu$ l, 2.5 $\mu$ l 농도로 희석하여 paper disc(diameter 8mm, ADVATEC D0811606)에 50 $\mu$ l씩 흡습 시킨 후 *E. tarda* 대한 항균활성을 알아보기 위하여 growth inhibition zone의 직경을 측정하였다(Table 15, Fig. 17, Fig. 18).

*E. tarda*의 항균활성은 control로 사용한 일반 항생제인 vancomycin에서는 저지환이 고르게 나타났으며, jojoba oil과 ginger oil은 전 농도에서 저지환이 형성되지 않았고, 50 $\mu$ l 농도에서 rosemary oil 이 30mm, cypress oil이 20mm 저지환을 형성하였고, 25 $\mu$ l 농도에서는 rosemary oil과 cypress oil이 각각 10mm의 저지환을 형성하였으나, 그 이외의 농도에서는 저지환을 형성하지 않았다.

Table 15. Antimicrobial activity of Essential aroma oil discs on the *E. tarda*

Oil name	Concentration of Essential aroma oil				Control
	50 $\mu$ l	25 $\mu$ l	5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l	Oxytetracycline
Ginger	–	–	–	–	50mm
Rosemary	30mm	10mm	–	–	20mm
Cypress	20mm	10mm	–	–	20mm
Jojoba	–	–	–	–	50mm

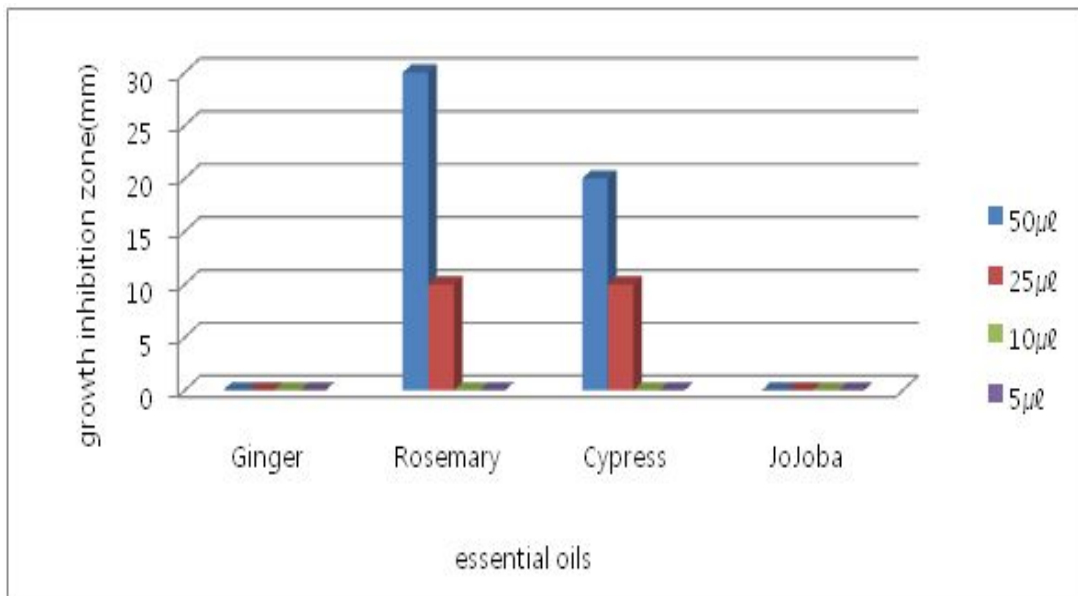
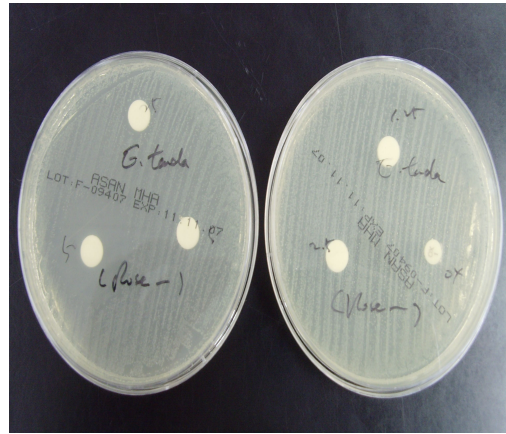


Fig. 17. Growth inhibition zone formations of essential aroma oil discs against *E. tarda*.



Ginger oil



Rosemary oil



Cypress oil



Jojoba oil

Fig. 18. Growth inhibition zone formation of essential aroma oil discs against *E. tarda*.

### 3) *V. ichthyoenteri*의 항균활성 결과

jojoba oil, ginger oil, rosemary oil, cypress oil을 멸균생리식염수로 50 $\mu$ l, 25 $\mu$ l, 5 $\mu$ l, 2.5 $\mu$ l 농도로 희석하여 paper disc(diameter 8mm, ADVATEC D0811606)에 50 $\mu$ l씩 흡습 시킨 후 *V. ichthyoenteri*에 대한 항균활성을 알아보기 위하여 growth inhibition zone의 직경을 측정하였다(Table 16, Fig. 28, Fig. 29). *V. ichthyoenteri*의 항균활성은 control로 사용한 일반 항균제인 vancomycin에서는 저지환이 고르게 나타났으며, Oxacillin에서 가장 큰 저지환을 형성하였다. jojoba oil은 전 농도에서 저지환을 관찰할 수 없었고, 50 $\mu$ l농도에서 ginger oil은 10mm, rosemary oil은 40mm, cypress oil은 30mm의 저지환이 형성되었고, 25 $\mu$ l에서 rosemary oil은 30mm, cypress oil은 15mm의 저지환이, 5 $\mu$ l농도에서는 rosemary oil은 20mm, cypress oil은 10mm의 저지환이, 2.5 $\mu$ l농도에서 rosemary oil만 20mm의 저지환이 관찰되어, rosemary oil이 전 농도에서 저지환이 형성되어, *V. ichthyoenteri*에 가장 높은 항균활성을 보였다(Table 16, Fig. 19, Fig. 20).

Table 16. Antimicrobial activity of essential aroma oil discs on the *V. ichthyenteri*

Oil name	Concentration of Essential aroma oil				Control
	50 $\mu$ l	25 $\mu$ l	5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l	vancomycin
Ginger	10mm	–	–	–	18mm
Rosemary	40mm	30mm	20mm	20mm	Oxacilin 40mm
Cypress	30mm	15mm	10mm	–	10mm
Jojoba	–	–	–	–	10mm

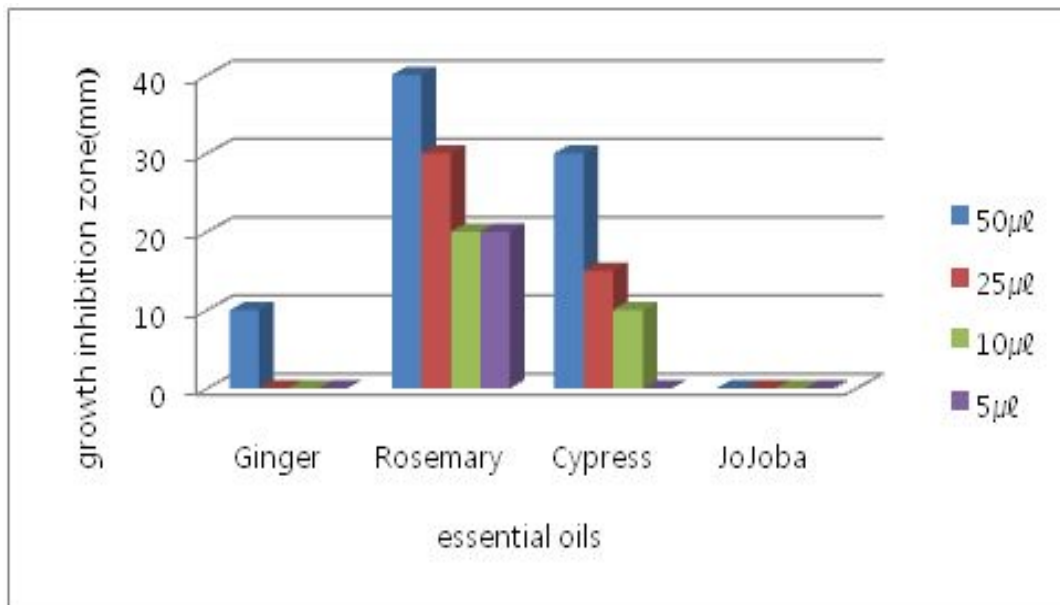


Fig. 19. Growth inhibition zone formations of essential aroma oil disc against *V. ichthyenteri*





Ginger oil



Rosemary oil



Cypress oil



Jojoba oil

Fig. 20. Growth inhibition zone formation of essential aroma oil discs against *V. ichthyenteri*

#### IV. 고 찰

본 연구에서는 최근 다양한 생리활성 기능으로 주목을 받고 있는 4종의 essential aroma oil 즉 jojoba, ginger, cypress 및 rosemary oil을 이용하여 어류병원성 세균인 *S. iniae*, *E. tarda*, *V. ichthyoenteri*에 대한 항균활성을 조사하여 가장 항균활성이 우수한 oil을 검증하고자 하였다. 동시에 liver cell, brain cell, kidney cell을 이용하여 4종의 essential aroma oil에 대한 세포독성을 조사하여 인체에 미치는 영향을 평가함으로써 인체 영향을 최소화하고 일반 항생제의 대체물질로 사용할 수 있는 이용 가능성을 검증하였다.

현재까지 보고된 천연물을 이용한 연구결과들은 손바닥선인장 줄기 가수분해 분획물을 이용한 항균활성(Jung *et al.*, 2008), 자생식물 추출물에 의한 감수성(Jang *et al.*, 2009), 한국해조류 추출물을 이용한 항균활성(Kang *et al.*, 2005) 등이 있다(Vairappan *et al.*, 2004; Ali *et al.*, 2002; Bennamara *et al.*, 1999; Ahmad *et al.*, 1996). 그러나 항균효과를 위해 사용된 추출물과 천연물질들이 인체에 어떠한 영향을 미칠 것인가에 대한 연구보고는 아직까지 전무한 실정이다. 본 연구에서 수행된 4가지 essential aroma oil이 3종의 인체 세포주에 미치는 영향을 형태학적 변화와 세포활성으로 조사한 결과 cypress oil의 경우 가장 낮은 농도인  $0.00066 \mu\text{L/mL}$ 에서 liver cell과 kidney cell의 세포질 용해 및 세포성장 억제효과가 나타나 세포독성이 있는 것으로 조사되었다. 그러나 cypress oil를 제외한 나머지 3종 jojoba, ginger, rosemary oil은 세포의 형태변화나 세포독성을 보이지 않아 항생제 대체물질로의 이용가능성을 시사 하였다. 본 연구에서 rosemary oil은 liver cell에 대한 독성이 낮은 것으로 나타났는데, 이와 유사한 결과로는 Benzo [a] Pyrene으로 DNA adduct를 유도한 인간 기관지 세포에서 유전독성(Genotoxicity)의 억제와 Benzo [a] Pyrene 또는 aflatoxin B1으로 DNA adduct를 유도한 인간 간세포와 기관지 세포에서 Procarcinogenesis의 억제에 의한 독소제거, 에탄올 독성에 대한 항산화 효과에 대한 보고가 있다(Mallikarjuna *et al.*, 2008; Offord *et al.*, 1995, 1997). 또한 rosemary oil이 kidney cell에서  $99.6 \pm 3.0\%$  세포 생존율을 보

인 본 연구 결과를 뒷받침해 줄 수 있는 보고로는 rosemaric acid가 PDGF (platelet driven growth factor)와 TNF(tumor necrosis factor)- $\alpha$ 에 의한 신장세포인 murine mesangial cell(혈관간세포)의 증식 유도 억제 효과, cis-platin으로 신부전을 유도한 동물에 ginger와  $\alpha$ -tocopherol의 병용 투여는 신부전 예방 효과, 그리고 쥐에 rosemary 추출액을 경구투여 했을 때 LD50이 2.0g/kg으로 독성이 낮다는 등의 보고가 있다(Makino *et al.*, 2000; Ajith *et al.*, 2007). 그러나 임산부와 간질 환자에 사용시에는 주의를 해야 한다(Lemonica *et al.*, 1996).

안전성에 대한 대부분의 선행연구는 Bergamot, Grapefruit, Rosemary, Lavender, Cypress, Tea tree, Thyme, Sage, Cedar 등에서 상피세포독성, 광감작과 변이원성, 태아독성, 자극성, 발작, 신경 독성 등에 관해서 보고되고 있으나 essential aroma oil의 독성과 안전성에 관한 자료와 정보는 매우 적다(Prashar *et al.*, 2004; Lemonica *et al.*, 1996; Millet *et al.*, 1981).

최근에 각 어가에서는 수산물을 빨리 성장시켜 생산량을 증가시키기 위한 방안으로 과도한 사료투입과 세균감염에 따른 치료목적으로 정확한 진단 없이 사용된 항균제들이 어류의 근육 속에 축적되어 (Kim *et al.*, 2006) 항생제 내성균 유발(Mcpherson *et al.*, 1991) 및 어병면역력 저하(Heo *et al.*, 1992)와 관련된 문제점들이 증가되고 있다. 또한 항생제가 함유된 배출수를 해역으로 방출함으로써 해양오염도의 위험성도 증가되고 있다. 치료에 사용되어지는 항균제 종류로는 erythromycin, lincomycin, tetracyclin, chlorampenicol, Doxycycline 등의 수산용 항생제를 사용하는데 2주 이상 투여해야 하며 은어와 무지개 송어에는 효과가 증명된바가 없고 약제 내성균의 출현으로 치료가 어려운 경우가 많다(전, 2000; 김, 2006).

본 연구에서는 천연물질인 essential aroma oil의 항균활성을 조사하여 어류항생제의 대체물질로의 이용가능성을 검증하기 위해 어류병원균의 대부분을 차지하는 *S. iniae*, *E. tarda* 그리고 *V. ichthyenteri*에 essential aroma oil을 처리하여 항균활성을 증명함으로써 항생제 대체 천연물질로의 이용가능성을 실험하였다. 동시에 어병치료에 사용되는 일반 항생제들의 항생제 감수성 검사를 시행하여 essential aroma oil과 항생제 간의 항균활성을 비교함으로써 essential

aroma oil을 이용하여 최소적정량으로 질병치료와 예방이 가능함을 증명하고자 하였다. 이미 많은 임상연구를 통해 essential aroma oil이 세균, 바이러스 그리고 곰팡이 균에 넓은 항미생물 활성을 보이고 있다는 것은 충분히 입증되고 있으며(Bruneton, 1999; Hammer, 1998; Carson *et al.*, 1998; Schnaubelt, 1995), 강한 면역자극제로 면역력 증진효과도 알려져 있다(Prics *et al.*, 1999).

essential aroma oil disc를 이용한 항균활성 실험 결과에서 jojoba oil은 3종 어병세균 모두에서 저지환이 형성되지 않아서 항균력이 없었으며, ginger oil은 *S. iniae*와 *V. ichthyoenteri*에서 원액(50 $\mu$ l), 2배 희석액(25 $\mu$ l) 모두에서 저지환이 관찰되어 사육수에 용해시켜 사용하더라도 항균력을 기대할 수 있으며, cypress oil은 *S. iniae*, *E. tarda*, *V. ichthyoenteri* 모두에서 저지환이 관찰되었고 특히 *V. ichthyoenteri*에서는 5 $\mu$ l의 저 농도에서도 항균능을 보였다. rosemary oil은 *S. iniae*, *E. tarda*, *V. ichthyoenteri* 모두에서 저지환이 관찰되었으며 특히 *V. ichthyoenteri*에서는 2.5 $\mu$ l 농도까지 항균력을 나타내어 대조항생제인 Oxacillin disc에 함유된 25 $\mu$ g과 비교할 때 훨씬 낮은 농도에서 항균 활성을 보여 항생제 대체물질로의 이용 가능성을 제시하였다.

또한 동일계열의 항생제라도 저지환의 크기를 기준으로 한 감수성결과와 MIC를 기준으로 한 감수성결과는 항생제 용량에서도 3배에서 10배까지 차이를 보여 내성균의 발현을 줄이기 위해서는 MIC값을 항생제 투여량으로 설정되어야 함을 확인 제시하였다.

일반적으로 사용하는 항생제는 항생제의 종류와 어병세균의 종류에 따라 항균 효과에 차이를 보임에도 불구하고, 본 연구결과에서는 하나의 essential aroma oil이 서로 다른 어병세균에도 광범위한 항균 능을 나타내고 있고, 특히 rosemary oil은 liver cell, brain cell, kidney cell에 독성을 나타내지 않을 뿐만 아니라 광범위한 항균효과와 효능을 Upgrade시키는 생리기전을 가지고 있어 본 실험결과에서 검증된 3종의 어병세균인 *S. iniae*, *E. tarda*, *V. ichthyoenteri* 감염에 의한 세균성 질병의 예방과 치료에 활용할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 essential aroma oil은 경구, 경피 모두를 통하여 흡수되고 혈액을 따라 전신으로 확산되며, 변연계를 자극하여 신진대사를 활성화시키는 기전도 가지고 있고, 자연산어류와 양식산어류의 향미의 차이를 결정하는 근육조직내의

bromophenol의 양에도 영향을 줄 수 있을 것으로 생각된다(Ma *et al.*, 2005; Whitfield *et al.*, 2002). 본 연구에서 인체에 대한 독성을 평가하기 위해 시행된 세포독성 연구는 인체독성에 대한 어느 정도의 평가는 가능하지만 세포내에서 이루어지는 생명현상과 기관이나 기관계 그리고 생체 내에서 이루어지는 생명현상에는 서로 다양한 mechanism의 작용으로 세포에서의 결과가 반드시 생체에서의 결과로 확대 해석하기 어려운 부분이 있다. 그러므로 본 연구의 결과가 널리 실용적으로 이용되기 위해서 다양한 임상시험이 선행되어야 할 것으로 생각되며, 추후에는 항균활성이 높게 나타난 rosmary oil을 육상수조에 용해시켜 감염 어류에 치료경과를 in vivo 적으로 규명하고 근육조직내의 bromophenol량의 변화를 측정하여 세균성질병의 예방과 치료뿐만 아니라 향미개선효과도 개선할 수 있음을 증명하는 연구가 더 진행되어야 할 것으로 생각된다.

## V. 결 론

*S. iniae*, *E. tarda*, *V. ichthyoenteri* 는 양식어류에 장염과 조직파괴 및 괴사를 초래하고 농창이나 육아종을 유발시켜 연간 400억 원의 피해를 입히는 원인균이다.

어병 균들을 제어하기 위해 사용되어지는 많은 양의 항생제는 양식어민들의 경제적 부담과 내성균의 발현, 환경오염의 원인이 되며, 인체 내로 유입되어 여러 가지 문제들을 야기하고 있다.

이러한 문제점들을 극복하기 위하여 본 연구에서는 다양한 생리활성물질로 주목받고 있는 essential aroma oil인 jojoba oil, ginger oil, rosemary oil, cypress oil을 in vitro적으로 항균활성을 검색하였으며, 인체독성 여부를 알아보기 위하여 세포생존을 실험을 실시하여, 인체에 독성이 없고 항생제 대체제로 사용할 수 있는 결과를 다음과 같이 밝혔다.

1. essential oil의 세포 생존율과 형태학적 변화는 jojoba oil은 항균활성은 없었지만 3종 세포(liver, brain, kidney)에 형태학적 변화를 주지 않고, 오히려 세포성장과 증식을 활성화시키는 것으로 나타났다. 각 oil별 세포생존율은 0.00066  $\mu$ L/mL농도에서 cypress oil이 가장 낮았으며, 특히 liver cell과 kidney cell에서는 성장억제와 세포질 용해가 나타나 독성이 있는 것으로 나타났다.

2. 일반항생제 disc diffusion method과 VITEC 60 autoanalyzer의 감수성 결과는 동일계열의 항생제라도 항균효과를 나타내는데 용량 적으로 차이가 있기 때문에 본 연구에서는 essential oil의 사용으로 자연내성균주 발생도 줄이고, 항균제 투여 시 최소량으로도 효과를 나타낼 수 있음을 증명하기 위하여 두 가지의 방법으로 수행된 결과를 비교분석하였다. *S. iniaes*의 경우 Quinolone계열, Chloramphenicol계열, Erythromycin계열, Tetracycline계열, Sulfase계열, Amingoglycoside계열, Cephalosporins계열, Penicillin계열에서, *E. tarda*와 *V.*

*ichthyoenteri* 는 Quinolone계열, Chloramphenicol계열, Erythromycin계열, Sulfase계열, Amingoglycoside계열, Cephalosporins계열, Penicillin계열에서 동일한 감수성을 보였으나, 두 방법 간의 항생제 용량은 3배에서 10배까지 차이를 보여 감수성과 저항성 기준수치를 참조하여 판정하는 MIC 값을 기준으로 투여량을 설정해야 함을 확인할 수 있었다.

3. essential aroma oil의 항균활성능은 *S. iniae*와 *E. tarda*는 rosemary oil과 cypress oil에서 원액과 2배 희석액에서 저지환이 관찰되었고, *V. ichthyoenteri* 는 rosemary oil에서 모든 농도에서 저지환이 관찰되어 가장 높은 항균활성을 보였고, cypress oil은 원액과 4배 희석액에서, ginger oil은 원액에서만 저지환이 관찰되었다. 이상의 결과에서와 같이 essential oil이 여러 종류의 어병세균에도 광범위한 항균 능을 가지고 있는 것으로 관찰되었다.

특히 rosemary oil은 세포에 독성이 없고, 광범위한 항균효과와 효능을 Upgrade시키는 생리기전을 가지고 있으며, 일반 항생제와 달리 내성이 생기지 않기 때문에 *S. iniae*, *E. tarda*, *V. ichthyoenteri* 감염에 항생제 대체제로 사용할 수 있을 것으로 사료된다. 본 연구의 실용화를 위해서 항균활성이 높게 나타난 rosemary oil을 수조에 용해시켜 어류의 항균활성 및 감염 어류에 대한 치료경과 그리고 인체에 미치는 영향 등을 세포 수준이 아닌 임상적 수준에서 더 연구가 진행이 되어야 할 것으로 생각되며, 본 연구가 essential aroma oil을 이용한 천연물의 항균 vaccine의 개발에 작은 토대가 되기를 바란다.

## 참고문헌

- Ali MS, Saleem M, Yamdagni R, Ali MA. (2002). Steroid and antibacterial steroidal glycosides from marine green alga *Codium iyengarii* Borgesen. Nat. Prod. Lett. 16: 407~413.
- Amend DF. (1976). Prevention and control of viral disease of salmonides. J. Fish. Res. Board Canada, 33, 1959~1966.
- Amend DF, Fender DC. (1976). Uptake of bovin serum albumin by rainbow trout from hyperosmotic infiltration: a model for vaccinating fish. Science 192: 793~794.
- Ahmad A, Davies J, Randall S, Skinner GR. (1996). Antiviral properties of extract of *Opuntia streptacantha*. Antiviral Res. 30: 75~85.
- Ajith TA, Nivitha V, Usha S. (2007). *Zingiber officinale* Roscoe alone and in combination with alpha-tocopherol protect the kidney against cisplatin-induced acute renal failure. Food Chem Toxicol. 45(6): 921~7.
- Aoki T. (1975). Effects of chemotherapeutics on bacterial ecology in the water of ponds and the intestinal tracts of cultured fish, ayu (*Plecoglossus altiivelis*). Japan, J. Microbio. 19, 7~12.
- Aoki T, Kito T. (1985). Detection of transferable R plasmids in strains of the fish pathogenic bacterium *Pasteurella piscicida*. J. Fish Dis. 8, 340~350.
- Aoki T, Kito T. (1981). Drug resistance and transferable R plasmids in *Edwardsiella tarda* from fish culture ponds. fish pathol. 15, 249~255.
- Bennamara A, Abourriche A, Berrada M, Charrouf M, Chaib N, Boudouma M, Garneau FX. (1999). Methoxybifurcarenone: an antifungal and antibacterial meroditerpenoid from the brown alga *Cystoseira tamariscifolia*. Phytochemistry, 52: 37~40.



- Bruneton J. (1999). Pharmacognosy. 2nd edn, Lavoisier Publishing Inc, 173.
- Caelli M, Porteous J, Carson CF, Heller R, Riley TV. (2000). Tea tree oil as an alternative topical decolonization agent for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Hosp Infect, 46(3): 236~7.
- Carson CF. (1998). In vitro activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* against *Streptococcus spp.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 37(6): 1177~1181.
- Doyle A, Griffiths JB, Newell DG. (1993). Cell & Tissue culture: Laboratory procedures. John Wiley & Sons Ltd.
- Diego MA, Field T, Hernandez-Reif M, Shaw K, Friedman L, Ironson G. (2001). HIV adolescents show improved immune function following massage therapy. Int J Neurosci, 106: 35~45.
- Emani S, Yu AP, Wu EQ, Birnbaum HG, Fay M, Pohl G, Wintle M, Yang E, Oglesby A. (2007). Short-term economic impact of body weight change among patients with type 2 diabetes treated with antidiabetic agents: analysis using claims, laboratory, and medical record data. Curr Med Res Opin, 23(9): 2157~2169.
- Erenmemisoglu A, Saraymen R, Ustun S. (1997). Effect of a *Rosmarinus officinalis* leave extract on plasma glucose levels in normoglycaemic and diabetic mice. Pharmazie, 52(8): 645~6.
- Gedney JJ, Glover TL, Fillingim RB. (2004). Sensory and effective pain discrimination after inhalation of essential oils. Psychosom Med, 66: 599~606.
- Hammer KA. (1998). In vitro activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* oil and tea tree oil products against *Candida spp.* Journal of antimicrobial Chemotherapy, 42(5): 591~595.
- Hada T, Furuse S, Matsumoto Y, Hamashima H, Masuda K, Shiojima K,

- Arai T, Sasatsu M. (2001). Comparison of the effects in vitro of tea tree oil and plaunotol on methicillin-susceptible and methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Microbios*, 106(2): 133~41.
- Heo GJ, Shin KS. and Lee MH. (1992). Disease of aquaculture animals and prevention of drug residues. *Kor. J. Food Hygiene*, 7: 7~19.
- Ironson G, Field T. (1996). Massage therapy is associated with enhancement of the immune system's cytotoxic capacity. *Int. J Neurosci*, 84: 205~17.
- Jang YH, Jeong J B, Yeo IK, Kim KY, Harikrishnan, R, Heo MS. (2009). Biological characterizat on of *Tenacibaculum maritimum* isolated from cultured olive flounder in Korea and sensitivity against native plant extracts. *J. Fish pathol*, 22(1): 53~65.
- Jung SH, Lee NS, Jee BY, Park MS. (2008). Antimicrobial activity of hydrolysis compound of cactus stem (*Opuntia ficus-indica* Var. *saboten* Makino) against fish pathogenic bacteria. *J. Fish Pathol*, 21(1): 29~34.
- Kang SY, Oh MJ, Shin JA. (2005). Antimicrobial Activities of Korea marin algae against fish pathogenic bacteria. *J. Fish Pathol*, 18(2):147~156
- Kim S, Chung HS, Kang SJ, Ha JY, Jung WC, Heo SH, Shin YW, Kim KW, Kim DG, and Lee HJ. (2006). Tissue distribution after dipping administration of oxytetracycline and tetracycline in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), rockfish (*Sebastes chlegeli*), and red Sea bream (*Pagrus major*). *J. Fish Pathol*, 19: 155~164.
- Knobloch K. (1989). Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *The Journal of Essential Oil Research*, 1(3): 112~128.
- Komiya M, Takeuchi T, Harada E. (2006). Lemon oil vapor causes an

- anti-stress effect via modulating the 5-HT and DA activities in mice. Behav Brain Res. 172(2): 240~9.
- Kuriyama H, Watanabe S, Nakaya T, Shigemori I, Kita M, Yoshida N, Masaki D, Tadai T, Ozasa K, Fukui K, Imanishi J. (2005). Immunological and psychological benefits of aromatherapy massage. Evid Based Complement Alternat Med. 2(2): 179~84.
- Lemonica IP, Damasceno DC, di-Stasi LC. (1996). Study of the embryotoxic effects of an extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis*). Braz J Med Biol Res, 29(2): 223~7.
- Loizzo MR, Saab AM, Tundis R, Statti GA, Menichini F, Lampronti I, Gambari R, Cinatl J, Doerr HW. (2008). Phytochemical analysis and in vitro antiviral activities of the essential oils of seven Lebanon species. Chem Biodivers, 5(3): 461~70.
- Lehrner J, Marwinski G, Lehr S, Jöhren P, Deecke L. (2005). Ambient odors of orange and lavender reduce anxiety and improve mood in a dental office. Physiol Behav, 86(1~2): 92~5.
- Ma WC, Chung HY, Ang PO, Kim JS. (2005). Enhancement of bromophenol level in aquaculture silver seabream (*Sparus sarba*). J. Agric. Food Chem. 53: 2133~2139.
- Mcphearson RM, DePaola A, Zywno SR, Motes JM. and Guarino AM. (1991). Antibiotic resistance in gram negative bacteria from cultured catfish aquaculture ponds. Aquaculture, 99: 203~211.
- Millet Y, Jouglard J, Steinmetz MD, Tognetti P, Joanny P, Arditti J. (1981). Toxicity of some essential plant oils. Clinical and experimental study. Clin Toxicol, 18(12): 1485~98.
- Mallikarjuna K, Sahitya Chetan P, Sathyavelu Reddy K, Rajendra W. (2008). Ethanol toxicity: Rehabilitation of hepatic antioxidant defense system with dietary ginger. Fitoterapia, 79(3): 174~8.
- Makino T, Ono T, Muso E, Yoshida H, Honda G, Sasayama S. (2000).

- Inhibitory effects of rosmarinic acid on the proliferation of cultured murine mesangial cells. *Nephrol Dial Transplant*, 15(8): 1140~5.
- Muroga K. (1997). Recent advances in infectious disease of marine fish with particular reference to the case in Japan. In "Disease in Asian aquaculture III", (ed. by Flegel TW and MacRae IH), Fish Health Section, Asian Fish. Soc, Manila, 21~31.
- Muroga K, Ishimaru K, Akagawa-matsushita K. (1996). *Vibrio ichthyoenteri* sp. nov, a pathogen of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) larvae. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 46, 155~159.
- Ohno T, Kita M, Yamaoka Y, Imamura S, Yamamoto T, Mitsufuji S, Kodama T, Kashima K, Imanishi J. (2003). Antimicrobial activity of essential oils against *helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 8: 207~15.
- Offord EA, Mac K, Ruffieux C, Malne A, Pfeifer AM. (1995). Rosemary components inhibit benzo[a]pyrene-induced genotoxicity in human bronchial cells. *Carcinogenesis*, 16(9): 2057~62.
- Offord EA, Mac K, Avanti O, Pfeifer AM. (1997). Mechanisms involved in the chemoprotective effects of rosemary extract studied in human liver and bronchial cells. *Cancer Lett*, 19; 114(1-2): 275~81.
- Price S, Price L. (1999). *Aromatherapy for health professionals*. Churchill Livingstone, UK.
- Prashar A, Locke IC, Evans CS. (2004). Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. *Cell. Prolif*, 37; 221~9.
- Salvatore Battaglia. (2008). *The Complete Guide to Aromatherapy*. 2/e hyunmoon, 183~351.
- Smith CA, Collins CT, Cyna AM, Crowther CA. (2003). Complementary and alternative therapies for pain management in labour. *Cochrane Database Syst Rev*, (2): CD003521.
- Schnaubelt K. (1995). *Advanced aromatherapy*. Healing Art Press, Canada
- Vairappan CS, Kawamoto T, Miwa H, Suzuki M. (2004). Potent

antibacterial activity of halogenated compounds against antibiotic resistant bacteria. *Planta Med*, 70: 1087~1090.

Whitfield FB, Helidoniotis F, Smith D. (2002). Role of feed ingredients in the bromophenols content of cultured prawns. *Food Chem*, 79: 355~365.

江草周三. (2006). 魚貝類感染症. 寄生蟲病, kouscisha Kouseikaku Co, 173-175.

김정호. (2006). 어패류의 감염증과 기생충, 라이프사이언스: 서울, 134-269.

사공정규, 김양희. (2008). 교과서 아로마테라피, 현문사: 서울, 25-40.

전세규. (2000). 양식어류의 질병, 한국수산신보사: 서울, 48-206.

통계청. (2011). 어류양식동향조사.

## 감사의 글

이런저런 이유로 미루다 보니 봄, 여름, 가을, 겨울이 8번이나 바뀌었습니다. 꽃이 지는 건 열매를 맺기 위한 것이라는 말로 위안을 삼고자 합니다. 땅만 보고 걷던 시간들이 아쉬움의 바람이 되어 가슴을 한 바퀴 돌아 나오고 지금에서야 올려다 본 하늘에선 빙그레 웃으시는 아버님의 얼굴을 볼 수 있었습니다.

과연 할 수 있을까? 걱정을 하시면서도 묵묵히 지켜봐주시고 기다려주신 최영찬 지도 교수님께 머리 숙여 깊은 감사를 드립니다.

바쁜 일정 속에서도 논문심사를 위해 마지막까지 정리와 조언을 아끼지 않으신 이준백 교수님, 윤석훈 교수님께도 진심으로 감사를 드립니다.

그리고 바로 옆방에서 귀찮음도 마다않고 끝까지 함께 정리해준 박신영 교수님, 박혜숙 교수님께도 마음속에서 우리나라의 감사의 말을 전하고 싶습니다.

항상 걱정을 끼쳐 드리고 부족한 점이 많은 아들을 끝까지 지켜보아주신 어머니께 조금이나마 위안을 드릴 수 있을 것 같아 다행스럽게 생각하며, 그동안 은혜에 감사를 드립니다. 동생 건강을 위해 조마조마하며 안타까워했을 누님들에게도 감사의 마음을 전합니다.

마지막 탈고까지 옆에서 함께 해준 양만기 교수님에게도 고맙다는 말을 전합니다.

또한 결혼해서 지금까지 학업의 연장선을 걷고 있는 남편을 불평 한마디 없이 묵묵히 따라 와준 아내 진영미 와 넓은 세상에 발을 내딛기 위해 서울에서 혼자 학업에 정진하고 있는 아들 옥희 와도 이 기쁨을 함께 하고 싶습니다.

딸 고생에 항상 마음 아파하셨을 장인, 장모님께도 죄송한 마음과 감사의 마음을 함께 전하고 싶습니다.

그리고 오늘이 있기까지 길을 열어주신 제주한라대학교 김병찬 이사장님과 김성훈 총장님께 무한한 존경과 감사의 인사를 올립니다.

끝으로 도움을 주신 모든 분들께 지면으로나마 감사의 말씀을 전하면서 앞으로 더 많은 인내와 노력으로 이 논문이 밑거름이 되도록 노력하고자 합니다.

결에 계셨으면 아버지의 뒤를 이어 교육자로서 길을 가고 있는 아들의 모습을 보고 가장 기뻐해주실 아버지께 이 논문을 드립니다.

2012 년 12 월

김 인 환