공학박사 학위논문

해조류 넓패 및 고리매 유래의 방오물질 분리 및 특성

지도교수 홍 용 기

이 논문을 공학박사 학위논문으로 제출함

2002년 2월

부경대학교 대학원

생 물 공 학 과

조 지 영

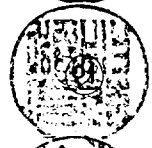
조지영의 공학박사 학위논문을 인준함

2001년 12월 26일

주 심 공 학 박 사 김 성 구

부 심 농 학 박 사 장 영 진

위 원 농 학 박 사 안 동 현

위 원 이 학 박 사 신 현 응 

위 원 농학·이학박사 홍 용 기

목 차

초 록 (Abstract) V

서 론 X

제1장 해조류 추출물에 의한 가시파래와 진주담치의 부착저해 효과 1

1.1 Abstract 1

1.2 서 론 2

1.3 재료 및 방법 3

1.3.1 해조류 채집 3

1.3.2 추출물 조제 3

1.3.3 포자부착에 대한 bioassay 4

1.3.4 Foot-stimulating을 이용한 진주담치의 부착저해효과 5

1.3.5 부착패류 유생의 부착여부 확인 6

1.3.6 통계처리 6

1.4 결 과 6

제2장 넓패 추출물로부터 가시파래에 대한 방오물질 분리 및 특성 17

2.1 Abstract 17

2.2 서 론 19

2.3 재료 및 방법 20

2.3.1 넓패 채집 20

2.3.2 추출물 조제 20

2.3.3 포자 부착에 대한 bioassay ····· 21
2.3.4 극성에 의한 분리 ····· 21
2.3.5 유기용매에 따른 용해도 ····· 22
2.3.6 Silica gel chromatography ····· 22
2.3.7 Sephadex gel filtration ····· 23
2.3.8 HPLC ····· 23
2.3.9 GC-Mass 분석 ····· 24
2.3.10 방오물질의 농도별 영향 ····· 24
2.3.11 부착저해 물질의 물리·화학적 처리 ····· 25
2.3.12 방오물질의 독성 검사 ····· 25
2.4 결 과 ····· 26
제3장 넓패 추출물로부터 진주담치에 대한 방오물질 분리 및 특성 ····· 44
3.1 Abstract ····· 44
3.2 서 론 ····· 46
3.3 재료 및 방법 ····· 46
3.3.1 넓패 채집 ····· 46
3.3.2 추출물 조제 ····· 47
3.3.3 Foot-stimulating을 이용한 진주담치의 부착저해효과 ····· 47
3.3.4 극성에 의한 분리 ····· 47
3.3.5 유기용매에 따른 용해도 ····· 48
3.3.6 Silica gel chromatography ····· 48
3.3.7 Sephadex gel filtration ····· 49
3.3.8 HPLC ····· 49

3.3.9 GC-Mass 분석 49
3.3.10 방오물질의 농도별 영향 50
3.3.11 부착저해 물질의 물리·화학적 처리 50
3.3.12 방오물질의 독성 검사 50
3.4 결 과 51
제4장 고리매 추출물로부터 진주담치에 대한 방오물질의 분리 및 특성 67
4.1 Abstract 67
4.2 서 론 69
4.3 재료 및 방법 69
4.3.1 고리매 채집 69
4.3.2 추출물 조제 69
4.3.3 Foot-stimulating을 이용한 진주담치의 부착저해효과 70
4.3.4 극성에 의한 분리 70
4.3.5 유기용매에 따른 용해도 70
4.3.6 Silica gel chromatography 71
4.3.7 Sephadex gel filtration 71
4.3.8 HPLC 72
4.3.9 GC-Mass 분석 72
4.3.10 방오물질의 농도별 영향 73
4.3.11 부착저해 물질의 물리 화학적 처리 73
4.3.12 방오물질의 독성 검사 73
4.4 결 과 74

고 찰 90
국문 초록 95
참고문헌 100
감사의 글 108

Isolation and properties of antifouling substances from the seaweed *Ishige sinicola* and *Scytosiphon lomentaria*

Ji-Young CHO

Department of Biotechnology and Bioengineering, Graduate School
Pukyong National University

Abstract

Twenty-seven species of common seaweeds from the coast of Korea have been screened for antifouling activity. The seaweed extracts were tested in laboratory assays against the marine fouling green alga *Enteromorpha prolifera* and the blue mussel *Mytilus edulis*. Spore settlement of the *E. prolifera* were inhibited by the methanol extracts of the seaweed *Ishige sinicola (= I. foliacea)* and *Sargassum horneri*. Spore settlement was strongly inhibited at extract concentrations as low as 30 $\mu g\ mL^{-1}$ for *I. sinicola* and 120 $\mu g\ mL^{-1}$ for *S. horneri*. Repulsive activity of the mussel foot was completely inhibited by the methanol extracts of the seaweed *I. sinicola* and *Scytosiphon lomentaria* at each concentration of 40 μg per 10 μL drop to each mussel.

Their extracts also showed strong antifouling activities on larval settlement with no settled spat and only 6% settled spat, respectively, at a concentration of 0.8 mg mL^{-1}.

And then I have isolated the antifouling agent against *E. prolifera* spore settlement from *I. sinicola* methanol extract and against mussel foot repulsion from *I. sinicola* and *S. lomentaria* methanol extract by chromatography procedures: silica gel chromatography, gel filtration chromatography and HPLC. At first I have isolated antifouling agent from *I. sinicola* against *E. plorifera* spore settlement. I obtained one fraction from silica gel chromatography using chloroform:ethylacetate = 3:7 elution. This was loaded on sephadex LH-25 gel filtration column using 100% methanol as eluant. Two mL fraction was collected at a flow rate of 0.5mL min^{-1}. Fractions 72-78 were collected for future purification. This fraction was injected into reverse phase C8 column using HPLC. Chromatography with linear gradient show a single peak of antifouling agent with 60% acetonitrile. Structure of this antifoulant was analysed by GC-Mass spectrum. From the result, it was revealed as di-2-ethylhexylphtalate. Spore settlement was strongly inhibited at concentration 0.1 mM by di-2-ethylhexylphtalate isolated from *I. sonicola*.

To measure the stability of antifouling substance, the purified substance was pretreated with various phsico-chemical agents, and the remained activity was measured. Antifouling activity was

decreased when the substance was pretreated in acidic condition, while the other treatments of heat, light, alkali and salt did not effect the antifouling activity. To measure toxicity of antifouling substance, the purified substance was assayed against phyto -plankton *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis suecica*, macroalgae *Pterocladia tenuis* and *Enteromorpha linza* spores and zoo-plankton *Artemia salina*. LC_{50} values of di-2-ethylhexylphtalate against *I. galbana and T. suecica* were 0.3 mM and 0.5 mM respectively and LC_{50} against *P. tenuis* and *E. linza* spores were 0.3 mM and 1 mM. LC_{50} values of this against *Artemia salina* was 5 mM.

Secondly I have isolated antifouling agent against *Mytilus edulis* from *I. sinicola* as the same method like above. I obtained one fraction from silica gel chromatography using ethylacetate: methanol = 6:4 elution. This was loaded on sephadex LH-25 gel filtration column using 100% methanol as eluant. Fractions 82-88 were collected for future purification. This fraction was injected into reverse phase C8 column using HPLC. Chromatography with linear gradient show a single peak of antifouling agent with 45% acetonitrile. Structure of this antifoulant was analysed by GC-Mass spectrum. From the result, it was revealed as butyl-carboxylmethyl 2-butylphtalate. Repulsive activity of mussel foot was completely inhibited by the butylcarboxylmethyl 2-butyl-phtalate at a concentration of 2.5 mM.

To measure the stability of antifouling substance, the purified

substance was pretreated with various phsico-chemical agents, and the remained activity was measured. Antifouling activity was decreased when the substance was pretreated in acidic condition, while the other treatments of heat, light, alkali and salt did not effect the antifouling activity. To measure toxicity of antifouling substance, the purified substance was assayed against phyto-plankton *I. galbana* and *T. suecica*, macroalgae *P. tenuis* and *E. linza* spores and zooplankton *A. salina*. LC_{50} values butyl-carboxylmethyl 2-butylphtalate against *I. galbana* and *T. suecica* were 0.5 mM and against *P. tenuis* and *E. linza* spores 0.3 mM and 1 mM respectively. LC_{50} values of this against *A. salina* was 5 mM.

Thirdly I have isolated antifouling agent against *Mytilus edulis* from *S. lomentaria* as the same method like above. I obtained one fraction from silica gel chromatography using ethylacetate: methanol = 4:6 elution. This was loaded on sephadex LH-25 gel filtration column using 100% methanol as eluant. Fractions 91-97 were collected for future purification. This fraction was injected into reverse phase C8 column using HPLC. Chromatography with linear gradient show a single peak of antifouling agent with 25% acetonitrile. Structure of this antifoulant was analysed by GC-Mass spectrum. From the result, it was revealed as dimethylcyclohexane ethanamine. Repulsive activity of mussel foot was completely inhibited by dimethylcyclohexane ethanamine at a concentration of 0.25 mM.

To measure the stability of antifouling substance, the purified substance was pretreated with various phsico-chemical agents, and the remained activity was measured. Antifouling activity was decreased when the substance was pretreated in acidic condition, while the other treatments of heat, light, alkali and salt did not effect the antifouling activity. To measure toxicity of antifouling substance, the purified substance was assayed against phytoplankton *I. galbana* and *T. suecica*, macroalgae *P. tenuis* and *E. linza* spores and zooplankton *A. salina*. LC_{50} values of dimethylcyclohexane ethanamine against *I. galbana* and *T. suecica* were 3 mM and against *P. tenuis and E. linza* spore were 3 mM and 5 mM. LC_{50} values of this against *A. salina* was 10 mM.

서 론

해조류와 부착성 패류는 양식장 시설뿐만 아니라 해양 인공시설물, 선박표면, 잠수함 표면 원자력 발전소의 냉각장치, 교각, 양식장의 가두리 망 등에 부착하여 이들의 기능을 저하시키는 문제를 발생시키는데 그 피해는 심각한 실정이다. 선박이나 해양구조물에 부착하는 오손생물 (fouling organism) 중 해조류로는 대표적으로 *Enteromorpha* 종류들을 들 수 있고 패류로는 따개비, 담치류들이 주를 이룬다. 이들 부착생물들은 화물선과 유조선 등과 같은 대형선박에 특히 많이 부착하여 마찰력의 증가를 야기시키고 이것에 의한 속력 감소와 연료소모와 같은 문제점을 야기시킨다. 선박의 밑면에 부착생물들이 붙게 되면 선체 표면이 거칠어져 자주 보수를 해줘야 하며, 속도저하 등의 문제점이 있다. Voulvoulis et al. (1999)에 의하면 부착생물에 의해 두께가 10 ㎛ 증가 할 때 연료소비 6% 증가하고 Wang et al. (1999)에 의하면 fouling 비율이 5%이면 연료소비는 약 10% 증가하고, 12~50% 이면 30% 증가, 50~100%가 되면 연료소비는 40%에 달한다고 한다. 대형 선박의 경우 연료비가 선박운영비의 50%를 차지하므로 선박 밑면의 부착생물 문제는 여간 심각한 것이 아니다.

부착 방지를 위한 물리적 방법으로는 주로 인위적인 세척법을 사용하고 있지만 번거로운 문제로 인해 방오제를 첨가한 방오페인트를 사용하고 있다. 방오제로는 주로 구리와 주석류의 물질들이 알려져 있는데, 종래에는 산화제1구리가 주로 쓰였으나 1970년대 이후부터는 뛰어난 방오효과를 가진 TBT (tributyltin)가 주로 사용되어왔다.

TBT를 비롯한 유기주석 화합물들은 PVC 안정제, 각종 플라스틱 첨가제, 산업용 촉매, 살충제, 살균제, 목재 보존제 등으로 매우 광범위하게 사용되고 있다. 특히 선박용 페인트 속에 첨가되는 TBT는 높은 부착 방해효과로 인해 1970년대 이후 널리 사용되기 시작하였다. 종래에는 구리가 첨가된 선박 페인트를 사용했었지만 부착 방해효과가 월등한 TBT로 대체되어 쓰이기 시작했으며, TBT는 선박뿐만 아니라 해양구조물, 어망 등에 부착생물들이 달라붙지 못하도록 하는 부착방해제로도 널리 사용되기 시작했다 (Voulvoulis et al., 1999). 경제적 문제점으로 인해 방오도료에 TBT 화합물을 첨가하여 사용하고 있지만, 이들 물질은 비표적 생물 (non-target organism)에게 영향을 미치어 수산생물의 감소와 생물체내에 축척 등 치명적인 문제를 일으키고 있는 실정이다. 외국의 경우, 굴양식장의 생산량 감소는 채묘 부진에서 많은 연유를 찾을 수 있는데 그 이유는 바로 연안해역의 TBT 오염 때문인 것으로 알려져 있다. TBT는 매우 강한 독성을 지닌 화합물로서 어패류 등에 농축되며 농도에 따라 수정억제, 발생억제, 운동성저하 등의 문제를 일으키고 오염이 매우 심화되면 굴의 패각이 기형화되고 성장도 더디게 된다 (Voulvoulis et al., 1999). 특히 고둥, 대수리, 소라 등 복족류에서는 임포섹스 (imposex) 현상을 일으킨다 (Oehlmann et al., 1997).

임포섹스란 복족류의 암컷에 수컷의 생식기관인 페니스 (penis)가 생김으로써 불임을 유발하는 현상을 말하며 항구와 같은 선박활동이 활발한 지역에서 임포섹스가 증가하고, 이곳으로부터 거리가 멀어질수록 발현율이 감소한다는 사실이 밝혀진 이후 많은 학자들에 의해 임포섹스의 발현이 보고되어 왔다 (Bryan et al., 1986; Horiguchi et al., 1994). TBT에 의한 복족류의 임포섹스 현상은 연

체동물의 암수 성의 발현을 조절하는 신경호르몬에 TBT가 영향을 미치기 때문인 것으로 이해되고 있다. 즉, TBT가 환경호르몬으로 작용하여 복족류의 정상적인 호르몬 기능을 교란시키고 있는 것이다. 그 결과 복족류의 암컷은 페니스의 형성과 함께 수정관이 형성되고 완전히 형성된 뒤에도 페니스의 과대 성장하여 결국 음문(vulva)을 막아 난의 방출이 억제됨으로써 불임이 유발되고 이로써 개체군이 감소하게 되는 것이다 (Black et al., 1998).

이제까지의 연구 결과에 따르면 TBT는 패류 유생의 치사와 착생의 실패에 영향을 줄뿐만 아니라, 굴의 성장저하와 껍질이 두꺼워지는 등의 변형을 일으키는 것이 실험적으로 증명되었다. 또한 어류에 대한 TBT의 급성독성 작용은 연구자에 따라 결과가 상당히 차이를 보이고 있지만 반수치사농도 범위가 1.5에서 240 $\mu g\ L^{-1}$나 된다고 보고하고 있다. 연이은 독성 실험을 통해서 TBT가 굴의 성장억제와 패각기형을 일으키고 (Stepheson et al. 1986; Stepheson, 1991), 치패의 성장에 영향을 미치며 (Lawer and Aldrich, 1987), 담치의 성장 속도를 감소시키고, 담치 유생의 높은 사망률을 유도한다는 것이 발혀졌다 (Stepheson et al., 1986). 또한 복족류에 임포섹스를 일으키는 것이 밝혀지면서 임포섹스는 TBT 오염의 유용한 생물지표로 활용되고 있으며, 해수내 1 ng L^{-1}이하의 TBT 농도에서도 임포섹스가 유발되는 것으로 알려져 있다 (Bryan et al., 1986). 유기 주석화합물의 독성은 유기 그룹 (organic group)의 개수 및 성질과 관계가 있다. 특히 triorganotin일 때 독성이 크며 그 중에서도 TBT가 가장 독성이 강하다. TBT가 주로 방오용 페인트에 사용되는데 효과를 증대시키기 위해서 TPhT (triphenyltin)이 함께 사용된다 (Black et al., 1998). TBT에 의한 생물의 피해는 굴 산업에 큰 타격

을 받은 프랑스에서 최초로 보고되기 시작하였다. 많은 생물의 번식, 성장에 치명적 영향을 준다는 사실을 들어 방오도료제의 사용을 규제하고 있다. 이러한 추세로 보트에도 TBT 사용을 금지 시켰고, 그 결과 TBT 농축은 어느 정도 감소되었고 굴 생산량도 다시 회복되었지만 최근 연구에 의하면 TBT 사용은 억제 되었지만 퇴적물에 농축되어 있는 TBT는 아직도 널리 퍼져 있는 상태라고 보고되고 있다 (Voulvoulis et al.,1999). 프랑스에서의 굴 사건 이래로 상업성이 높은 패류에 대한 TBT의 영향에 관한 연구가 광범위하게 수행되었다. 이러한 독성으로 인해 프랑스, 영국, 캐나다, 미국 등에서 우선적으로 선체 길이 25 m이하의 선박에 사용을 금지하고 있다.

최근들어 TBT의 사용금지 추세와 함께 TBT 대체 물질 개발이 진행되고 있다. 현재 개발 되어진 방오 후보물질로는 chlorathalonil, irgarol, dichlofuanoid (Volvoulis et al., 1999)등이 대표적이라 할수 있으며 해면에서 분리한 kalihinene (Okino et al., 1995)과 ceratinamide (Tsukamoto et al., 1996) 등도 보고되었다. 일부 해조류에서도 방오 활성물질을 가지고 있다는 사실이 외국의 연구자들에 의해 알려져 왔다. 그 중 *Sargassum natans*로부터는 tannin (Sieburth & Conover, 1965)이 *Rhodomela larix*로부터는 bromophenol (Phillips & Towers, 1982)이, *Dictyota menstrulais*로부터는 diterpen (Schmitt et al., 1995)이, *Delisea pulchra*로부터는 halogenated furanone (de Nys et al., 1995)이 분리되어 부착저해 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

그러나 이러한 개발에도 불구하고 방오제 개발 연구 성과는 아직 미진한 상태이다. 부착생물의 착생에 대한 이해 부족으로 환경 친화적인 방오제의 개발 기술이 부족한 실정이며 해조류와 무척추동물

의 생리활성 물질 추출과 방오기능에 대한 검증 방법 등이 불분명하다. 현재 우리나라에서는 방오제에 대한 개발보다는 주석류에 의한 오염 정도를 파악하는 연구가 진행되고 있는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 부작용 없는 환경 친화적인 방제 수단으로서 해조류 유래의 천연 방오물질 즉, 부착방지물질을 개발하고자 하였다. 대표적인 착생 종 중에서 식물로서는 해역에 광범위하게 서식하면서 인위적인 제거가 어려운 가느다란 실 모양의 형태를 가진 가시파래 (*Enteromorpha prolifera*)를 선택하고, 동물로서는 해양시설물이나 양식장에 많이 부착되는 진주담치 (*Mytilus edulis*)를 선택하여 각종 해조류 추출물들에 의한 이들의 부착저해 효과를 확인하였다. 한국연안에 대량으로 서식 분포하는 해조류를 수집 분류한 후 각각의 해조류들의 methanol 추출물과 물 추출물을 제조하였고 해조류 추출물에 대한 가시파래와 진주담치의 부착방지 효과를 확인하고 독성을 조사하여 해양생물에 피해를 적게 미치면서도 부착저해에 효과가 있는 물질을 탐색하고자 하였다.

제 1 장 해조류 추출물에 의한 가시파래와 진주담치의 부착 저해 효과

Abstract

Twenty-seven species of common seaweeds from the coast of Korea have been screened for antifouling activity. The seaweed extracts were tested in laboratory assays against the marine fouling green alga *Enteromorpha prolifera* and the blue mussel *Mytilus edulis*. Spore settlement of the *E. prolifera* were inhibited by the methanol extracts of the seaweed *Ishige sinicola (= I. foliacea)* and *Sargassum horneri*. Spore settlement was strongly inhibited at extract concentrations as low as 30 $\mu g\ mL^{-1}$ for *I. sinicola* and 120 $\mu g\ mL^{-1}$ for *S. horneri*. Repulsive activity of the mussel foot was completely inhibited by the methanol extracts of the seaweed *I. sinicola* and *Scytosiphon lomentaria* at each concentration of 40 μg per 10 μL drop to each mussel. Their extracts also showed strong antifouling activities on larval settlement with no settled spat and only 6% settled spat, respectively, at a concentration of 0.8 $mg\ mL^{-1}$. This work is the first stage towards the development of novel antifouling agents from marine macroalgae.

서 론

연안 해역에서 해조류와 부착패류는 양식장 시설뿐만 아니라 취수구 어선바닥 등에 부착하여 그 피해는 심각한 실정이다. 해조류에 의한 부착은 잎 파래 가시파래 등이 주가 되고, 패류로는 담치와 따개비가 주를 이룬다. 이들의 부착방지를 위해서 현재까지는 염소살균, TBTO (tributyltin oxide), $CuSO_4$ 등의 처리를 하고 있지만 이러한 처리에 의해서는 또 다른 환경 문제가 야기되고 있다. 선박이나 해양구조물에 부착하는 오손 생물 (fouling organism)에는 *Enteromorpha* spp. 등의 해조류와 *Mytulis* spp. 등의 패류, 그리고 marine bacteria가 있다. 그 중 *Enteromorpha* spp.는 주된 오손생물로 전 세계에 널리 분포되어 있다. *Enteromorpha* spp.는 화물선과 대형 유조선에 부착하여 항해시 마찰력의 증가를 야기시키고 이것에 의한 선속의 감소와 연료소모와 같은 문제점을 가진다. 이러한 경제적 문제점을 줄이기 위해 방오도료 (antifouling paint)에 TBT 화합물을 첨가하여 사용하고 있지만, 이것은 해양생물에 나쁜 영향을 미치는 것으로 나타나 각 국은 TBT 화합물 사용에 대해 제한하고 있다.

기존의 연구에 의하면 여러 해조류로부터 부착 방지 물질을 탐색하였으며 그 중 *Sargassum natans*로부터 tannin (Sieburth and Conover, 1965)이 *Rhodomela larix*로부터 bromophenol (Phillips and Towers, 1982)이, *Dictyota menstrulais*로부터 diterpen (Schmitt et al., 1995)이, *Delisea pulchra*로부터 halogenated furanones (de Nys et al., 19950)가 분리되어 부착저해 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

이러한 개발에도 불구하고 방오제 개발의 연구 성과는 아직 미비한 상태이다. 따라서 본 연구에서는 해조류 추출물을 이용하여 무독

성 천연 방오물질의 탐색을 목적으로 우선 선박이나 양식장 그물 등에 많이 부착 성장하는 가시파래 (*Enteromorpha prolifera*)와 진주담치 (*Mytilus edulis*)를 대상으로 하여 부착방지 효과를 나타내는 물질을 찾고자 하였다.

재료 및 방법

해조류 채집

해조류들은 한국 연안에서 채집하였다. 채집한 해조류들은 담수로 깨끗이 씻은 다음 실온에서 완전히 건조시킨 후 분쇄하여 분말로 만들어 -20℃에서 보관하여 사용하였다. 녹조류 4종 (*Codium fragile, Ulva pertusa, Monostroma nitidum, Enteromorpha linza)*과 갈조류 13종 (*Ecklonia cava, Sargassum thunbergi, Sargassum confusum, Ishige foliacea, Undaria pinnatifida, Sargassum sagamiaum, Scytosiphon lomentaria, Colpomenia bullosa, Colpomenia sinuosa, Sargassum horneri, Endarachne binghamiae, Kjellmaniella crassifolia, Hizikia fusiformis*)과 홍조류 10종 (*Grateloupia prolongata, Gigartina intermedia, Symphyocladia latiuscula, Hypnea charoides, Porphyra yezoensis, Grateloupia turuturu, Pachymeniopsis elliptica, Chondrus ocellatus, Carpopeltis affinis, Corallina pilulifera*)을 대상으로 조사하였다.

해조류 추출물 조제

Methanol 추출물과 물 추출물로 나누어 부착방지 효과를 조사하였다. 우리나라 연안의 각종 해조류들을 채집하여 분류 동정한 후, 각각을

증류수로 조체 표면의 염분을 제거하고 실온에서 완전히 건조시켜 파쇄기로 분쇄하였다. 각각의 해조류 분말 0.02 g 당 methanol 1 mL 비율로 첨가하고 실온의 암실에서 하루동안 추출하여 상등액만을 모았다. 이를 3회 반복하여 모두 합친 후 37℃에서 methanol을 증발시켜 제거하였다. 이 해조류 추출물들의 40 ㎎ 당 methanol 1 mL 씩의 비율로 가하여 녹인 후 0.22 ㎛ filter로 여과하여 -20℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다. 그리고 methanol로 3회 추출해낸 해조류 분말들은 잔류 methanol을 제거한 후 증류수 1 mL 비율로 첨가하여 동일 방법으로 3회 추출하여 상등액을 합하였다. 이것을 37℃에서 건조시켜 40 ㎎당 증류수 1 mL 씩 비율로 가하여 녹인 후 0.22 ㎛ filter로 여과하여 -20℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다 (Fig. 1-1).

포자 부착에 대한 bioassay

해조류 추출물의 부착 방지 효과는 대표적인 부착성 해조류인 가시파래 (*Enteromorpha prolifera*)를 대상으로 실험을 하였다. 가시파래는 부산 근교의 해운대에서 채집하고 실험실로 운반하여 목적 해조체 만을 분류하였다. 분류 후, 부착생물들을 제거하기 위해서 초음파 처리를 1분 동안 3회 반복한 후 살균된 해수로 깨끗하게 씻었다. 그리고 1% betadine 및 2% triton X-100 혼합용액에 1분간 침지시켜서 간단한 멸균처리를 시킨 후 반 건조시켰다. 반 건조된 파래를 멸균해수에 넣고 80 μmol m^{-2} s^{-1}, 20℃ 배양기에 넣어 포자방출을 유도하였다 (Fletcher, 1989). 방출된 포자를 PES배지에 현탁시키고 추출물을 각각 5 μL (40㎎ mL^{-1}) 넣어 총 1 mL이 되도록 24 well plate에 접종하였다. Well plate에 slide glass (1×2.5 ㎝)를 세워서 넣고 암기로 6시간 동안 20℃에서 배양하였다. Glass (1×0.5 ㎝)에

부착한 포자수는 추출물을 넣지 않은 well에 부착한 포자수(C)에 대해 추출물을 접종한 well에 부착한 포자수(S)로 S/C의 상대 값으로 표시하였다.

Foot-stimulating method를 이용한 진주담치의 부착저해 효과

패류에 대한 부착저해 효과를 실험하기 위해 대표적인 부착패류인 진주담치 (*Mytilus edulis*)를 선택하여 실험하였고, foot-stimulating method (Hayashi and Miki, 1996)를 이용하였다. Foot-stimulating method는 다음과 같다. 진주담치의 폐각근을 제거하고 5-10분간 해수에 담구어 두었다. 패각을 벌린 다음 담치의 발에 10 μL 의 해수를 떨어뜨려 해수에 수축반응을 나타내는 개체는 제외시키고 해조류 추출물을 농도별로 10 μL 씩 발에 떨어뜨려 수축여부를 확인하였다. 그 결과 수축 반응을 하는 개체수를 전체 개체수로 나누어 백분율로 나누어 그 수축 활력을 나타내었다. 우선 실험에 적당한 크기의 담치를 선택하여 양식산과 자연산의 담치를 대상으로 $CuSO_4$ 농도별로 반응 정도를 실험하였다. $CuSO_4$는 인공해수에 희석해서 사용하였으며 실험 대상 홍합 100%가 수축하는 데 필요한 농도 RD100 (repulsive dose 100)과 50%가 수축하는 데 필요한 농도 RD50 (repulsive dose 50), 그리고 수축하지 않는 최대의 농도 MNRD (maximum non-repulsive dose)를 구하였다. 대체로 작은 개체가 큰 개체에 비해 민감하였지만 큰 개체의 경우가 안정된 값을 나타내었다. 양식산이 자연산에 비해 더욱 민감하며 낮은 농도에서도 수축을 보여주었다 (Table 1-2). 그래서 양식산의 4.5±0.2 ㎝ 개체를 사용하여 foot-stimulating method를 실시하였다. 실험에서 담치의 충분한 휴지 시간을 측정하기 위해 RD100 농도의 $CuSO_4$를 3분, 5분 간격으로 실시하였으며 시간 간격은 최소 5분이 적당하였다.

부착패류 유생의 부착여부 확인

Foot-stimulating method에서 부착저해효과가 100%인 고리매 (*Scytosiphon lomentaria*)와 넓패 (*Ishige sinicola*) 추출물을 사용하여 유생의 부착여부를 확인하였다. 진주담치는 유생을 인공 수정시킨 후 20℃에서 부착기 유생까지 *Isochrysis galbana*를 먹이로 하여 길렀다. Whatman paper를 부착기질로 사용하였으며, 직경 5.5 ㎝ 잘라 추출물을 적시고 용매를 증발시켰으며 이것을 petridish (55×12㎜)에 넣었다. 유생을 45-60마리 씩 분주하였으며 20℃에서 4일 후 부착한 개체수를 확인하였다. 대조구로는 용매만을 적시어 건조시킨 여과지를 사용하였다. 진주담치를 인공 수정 시킨 후 부착기까지 사육하여 부착직전의 것을 여과지가 담긴 petri-dish로 옮기고 4일 후 대조구의 부착률이 85-90%일 때 각 petri-dish 에서의 부착률을 확인하였다

통계처리

모든 실험은 최소 3회 반복하였으며 통계처리는 student t-test로 실시하였다.

결 과

가시파래 포자의 부착저해 효과

27종의 해조류 추출물을 대상으로 가시파래 포자의 부착저해 효과를 실험하였다. 27종의 methanol 추출물을 200 μg mL^{-1}의 농도에서 부착저해 효과를 실험한 결과 구멍갈파래 (*Ulva pertusa*), 넓패 (*Ishige sinicola*), 괭생이모자반 (*Sargassum horneri*), 진두발 (*Chondrus ocellatus*), 작은구슬산호말 (*Corallina pilulifera*), 도박

(*Pachymeniopsis elliptica*)의 추출물이 대조구에 비해 가시파래의 포자부착을 40% 이하로 저해하는 것으로 나타났으며, 그 중 넓패 추출물은 21%로 가장 큰 부착저해 효과를 나타났다 (Table 1-1). 물 추출물의 경우는 고리매 추출물에서만 43%의 저해 효과를 확인하였다. 포자부착 저해에 가장 효과가 좋은 넓패와 괭생이모자반의 methanol 추출물을 농도별로 가시파래 포자 부착에 대한 영향을 비교한 결과, 넓패 추출물은 30μg mL^{-1}, 괭생이모자반 추출물은 120μg mL^{-1}의 농도에서 최대로 포자 부착을 억제하였으며 각각의 농도에서 대조구에 비해 18%, 39% 억제하는 것으로 나타났다 (Fig. 1-3).

Foot-stimulating method를 이용한 진주담치의 부착저해 효과

해조류 추출물의 진주담치에 대한 부착방지 효과를 실험하기 위해서 담치의 foot에 대한 수축 효과를 실험하였다. 실험에 사용한 methanol의 양, 즉 1 μL/EA는 근 수축에 영향을 미치지 않음을 확인하였고, 추출물 1 μL (40 ㎎ mL^{-1})를 멸균 해수 10 μL에 녹여 농도 40 μg mL^{1}로 사용하였다. 해조류의 methanol 추출물 경우에는 넓패와 고리매 가 40 μg/EA의 경우 100%의 효과를 나타내며 감태 (*Ecklonia cava*)와 긴불레기말 (*Colpomenia bullosa*)은 94%의 효과를 나타내었다 (Table 1-3). 수용성 추출물의 경우 불레기말 (*Colpomenia sinuosa*)과 톳 (*Hizikia fusiformis*)에서 40 μg/EA의 경우 각각 60%, 50%의 효과로 methanol 추출물에 비해 낮은 효과를 나타내었다 (Table 1-3).

진주담치 유생에 대한 부착저해 효과

Foot-stimulating method에서 가장 높은 효과를 보이는 넓패와 고리매의 부착방지 효과를 확인하기 위해서 진주담치의 유생을 대상으로 부착

에 미치는 영향을 확인하였다. Whatman paper를 부착기질로 사용하였으며, 넓패와 고리매 추출물을 적시고 용매를 증발시켰으며 이것을 petridish (55×12 ㎜)에 넣었다. 유생을 45-60마리 씩 분주하여 20℃에서 4일 배양 후 부착한 개체수를 확인하였다. 그 결과, 넓패 methanol 추출물은 0.8 ㎎ mL^{-1}의 농도에서 100%의 부착저해 효과를 나타냈고 고리매는 0.8 ㎎ mL^{-1}의 농도에서 94%, 1.6㎎ mL^{-1}의 농도에서 100%의 부착저해 효과를 나타내었다 (Fig. 1-5).

Table 1-1. Effect of seaweed extracts on spore settlement of the green alga *Enteromorpha prolifera*. Antifouling activity was expressed as percentage of the control. Data are the mean ± SD from three independent assays. * Significantly differnet from control at P<0.001

Species	Reactivity	
	MeOH extract (40 μg/10μℓ)	Water extract (40 μg/10μℓ)
Chlorophyta		
Codium fragile	78±8	71±13
Enteromorpha linza	55±3	108±15
Monostroma nitidum	77±5	57±4
Ulva pertusa	36±7	84±20
Phaeophyta		
Colpomenia bullosa	41±3*	69±7
Colpomenia sinuosa	48±5	56±12
Ecklonia cava	66±7	74±1
Endarachne binghamiae	45±1	96±3
Hizikia fusiformis	59±7	70±2
Ishige foliacea	23±2*	69±4
Kjellmaniella crassifolia	77±15	75±10
Sargassum confusum	67±3	59±8
Sargassum horneri	36±1*	50±5
Sargassum sagamiaum	38±1*	56±5
Sargassum thunbergil	74±9	63±4
Scytosiphon lomentaria	71±9	43±3*
Undaria pinnatifida	80±7	74±18
Rhodophyta		
Carpopeltis affinis	66±8	76±3
Chondrus ocellatus	35±3*	76±2
Corallina pilulifera	34±3*	88±13
Gigartina intermedia	50±8	61±10
Grateloupia prolongata	95±11	51±2
Grateloupia turuturu	96±11	50±10
Hypnea charoides	45±2	57±3
Pachymeniopsis elliptica	36±5*	97±4
Porphyra yezoensis	48±10	74±5
Symphyocladia latiuscula	50±8	74±15

Table 1-2. Comparison of repulsive activity by size and growth condition of the mussel *Mytilus edulis*. Cupric sulfate was used with a 10-fold serial dilution in artificial seawater. The repulsive concentration was determined from the dose-response curve against cupric sulfate concentrations

Group	Cultured mussel			Wild mussel	
	1	2	3	1	2
Shell length (cm)	2.5±0.3	3.3±0.2	4.5±0.2	2.1±0.3	3.1±0.3
Shell length (cm)	1.1±0.2	1.5±0.4	20.±0.3	0.9±0.2	1.2±0.3
RD 100 mg mL $^{-1}$	10	100	1000	10000	100000
RD 100 mg mL $^{-1}$	0.5	0.5	50	500	5000
RD 100 mg mL $^{-1}$	0.001	0.001	0.1	10	10

Table 1-3. Effect of seaweed extracts on foot repulsive reaction in the mussel *Mytilus edulis*. Repulsive activity was expressed as percentage of contracted mussels against tested mussels. Data are the mean ± SD from at least 50 individuals for each test using 10 μL drop. *P<0.001 as compared to control

Species	Reactivity	
	MeOH extract (40 μg/10μℓ)	Water extract (40 μg/10μℓ)
Chlorophyta		
Codium fragile	76±1	1
Enteromorpha linza	74±2	34±1
Monostroma nitidum	84±6*	34±1
Ulva pertusa	40±2	1
Phaeophyta		
Colpomenia bullosa	94±1*	0
Colpomenia sinuosa	34±1	60±2
Ecklonia cava	94±18*	10
Endarachne binghamiae	16±3	0
Hizikia fusiformis	42±2	50±1
Ishige foliacea	100*	20±1
Kjellmaniella crassifolia	56±1	20±1
Sargassum confusum	50±5	0
Sargassum horneri	24±2	0
Sargassum sagamiaum	54±1	10±2
Sargassum thunbergil	16±4	14±1
Scytosiphon lomentaria	100*	0
Undaria pinnatifida	40±4	10
Rhodophyta		
Carpopeltis affinis	20±1	0
Chondrus ocellatus	66±2	0
Corallina pilulifera	28±1	0
Gigartina intermedia	12±1	0
Grateloupia prolongata	38±3	20±1
Grateloupia turuturu	66±1	0
Hypnea charoides	62±1	4
Pachymeniopsis elliptica	34	14
Porphyra yezoensis	52±2	0
Symphyocladia latiuscula	82±2*	0

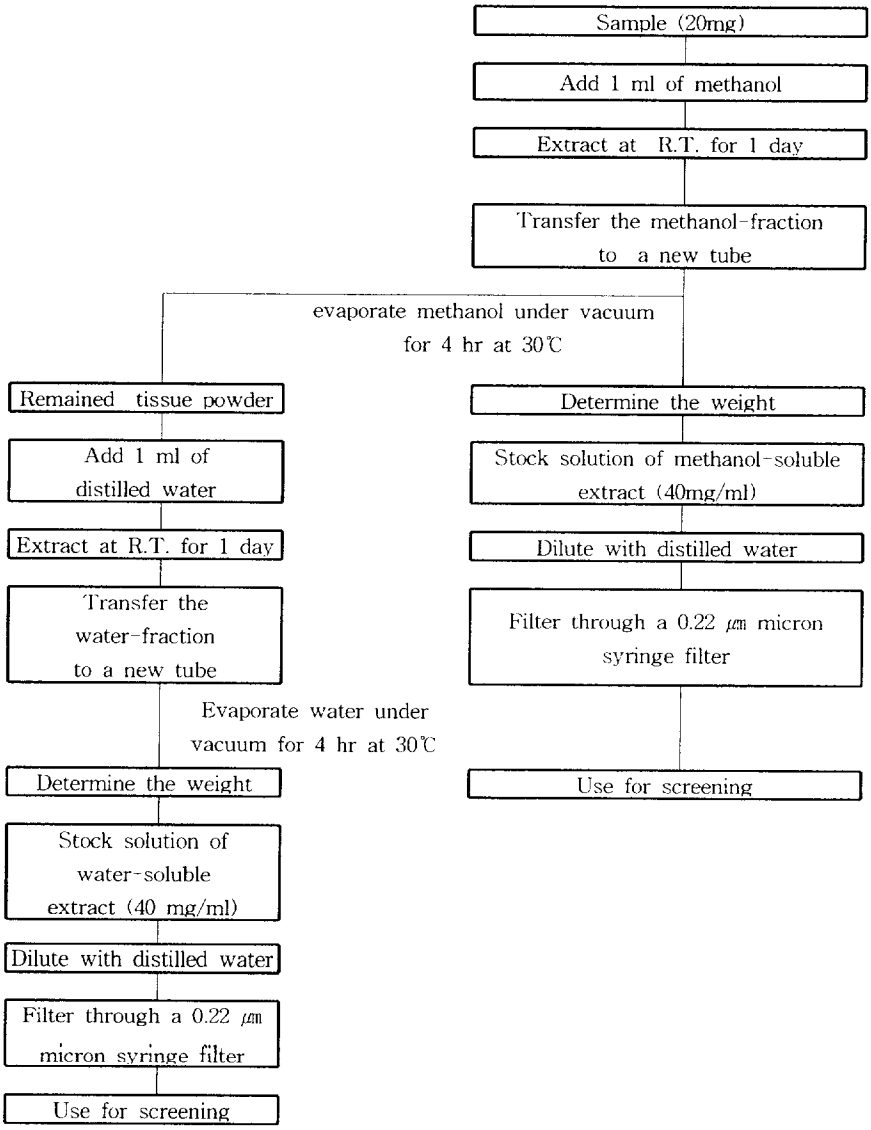


Fig. 1-1. Procedure for preparing methanol and water extracts from seaweed tissues.

Fig. 1-2. Foot of the mussel *Mytilus edulis* used for foot-stimulating method (A), original foot (B), contracted foot.

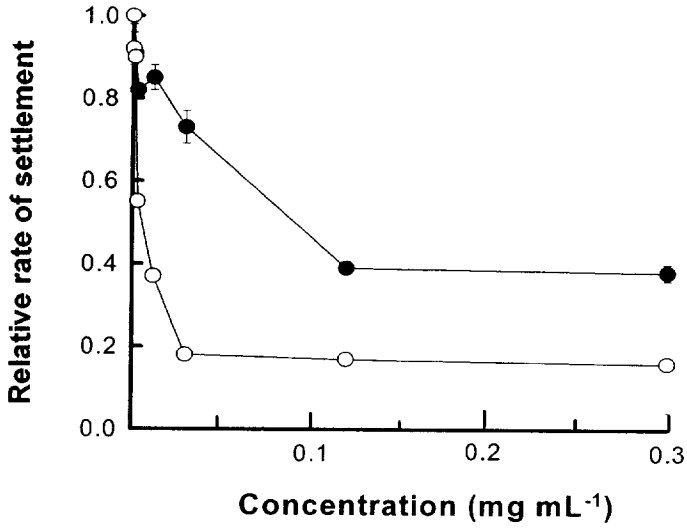


Fig. 1-3. Effect of methanol extracts from the seaweed *Ishige sinicola* (○) and *Sargassum horneri* (●) on settlement of the *Enteromorpha prolifera* spores. After 6h in the dark at 20℃, numbers of settled spores were counted and expressed as a relative rate.

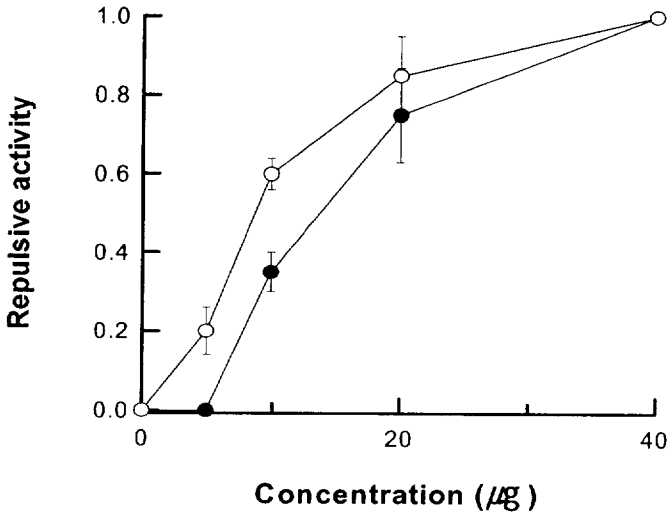


Fig. 1-4. Effect of methanol extracts from the seaweed *Ishige sinicola* (○) and *Scytosiphon lomentaria* (●) on foot repulsive reaction of the mussel *Mytilus edulis*. Repulsive activity was measured with a 10 μL drop to the mussel foot, and expressed as a rate of contracted mussels against mussels tested.

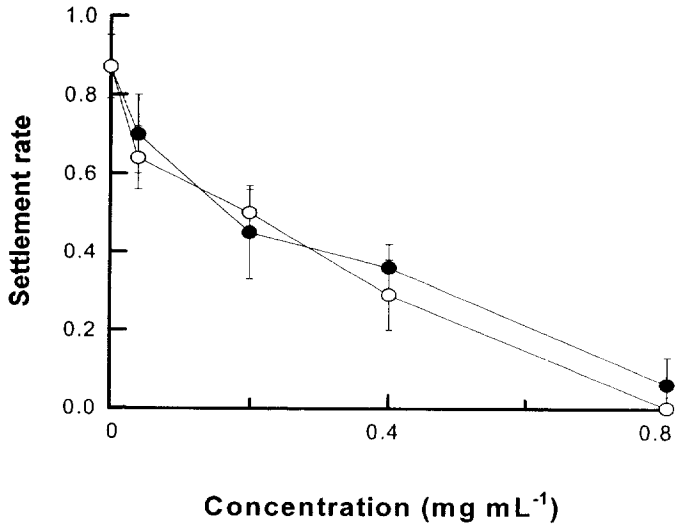


Fig. 1-5. Antifouling activity of methanol extracts from the seaweed *Ishige sinicola* (○) and *Scytosiphon lomentaria* (●) on settlement of settling-stage larvae of the mussel *Mytilus edulis*. The settlement rate was expressed as settled spats against settling-stage larvae added.

제 2 장 넓패 추출물로부터 가시파래에 대한 방오물질의 분리 및 특성

Abstract

I have isolated antifouling agent from *I. sinicola* against *E. plorifera* spore settlement. I obtained one fraction from silica gel chromatography using chloroform:ethylacetate = 3:7 elution. This was loaded on sephadex LH-25 gel filtration column using 100% methanol as eluant. Two mL fraction was collected at a flow rate of 0.5 mL min^{-1}. Fractions 72-78 were collected for future purification. This fraction was injected into reverse phase C8 column using HPLC. Chromatography with linear gradient show a single peak of antifouling agent with 60% acetonitrile. Structure of this antifoulant was analysed by GC-Mass spectrum. From the result, it was revealed as di-2-ethylhexyl phtalate. Spore settlement was strongly inhibited at concentration 0.1 mM by di-2-ethylhexylphtalate isolated from *I. sonicola*.

To measure the stability of antifouling substance, the purified substance was pretreated with various phsico-chemical agents, and the remained activity was measured. Antifouling activity was decreased when the substance was pretreated in acidic condition, while the other treatments of heat, light, alkali and salt did not effect the antifouling activity. To measure toxicity of antifouling substance, the purified substance was assayed against phyto-

plankton *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis suecica*, macroalgae *Pterocladia tenuis* and *Enteromorpha linza* spores and zooplankton *Artemia salina*. LC_{50} values of di-2-ethylhexylphtalate against *I. galbana and T. suecica* were 0.3 mM and 0.5 mM respectively and LC_{50} against *P. tenuis* and *E. linza* spores were 0.3 mM and 1 mM. LC_{50} values of this against *A. salina* was 5 mM.

서 론

해양 환경에서 해양세균, 부착패류, 해조류 등의 부착생물이 선박, 해양구조물 등에 부착함으로써 야기되는 문제점이 심각하다. 이 부착생물들은 선박의 표면에 부착하여 선박 항해 시 저항을 증가시켜 속도 감소와 연료소비를 증가시킨다. 그리고 해양구조물의 수명을 단축시켜 자주 교체해야 하는 번거로움과 인력소비, 비용증가 등을 일으킨다. 양식가두리의 그물이나 정치망에도 생물이 부착하여, 해수의 흐름을 방해하여 양식 어류를 산소 결핍증으로 죽게하기도 하고 병을 유발시키는 원인이 되기도 한다. 또, 어망으로부터 부착생물의 제거 작업이나 어망교체 작업이 매우 어려울 뿐만 아니라 양식어류의 발육을 느리게도 한다 (성, 1998). 이러한 문제점을 해결하고자 TBT (tributyltin) 화합물을 사용하고 있지만, TBT 화합물이 해양생물에 유해한 것으로 나타나 여러 나라에서 TBT 화합물 사용을 제한하고 있다 (이, 1998). TBT는 적은 농도 (5 μg L^{-1})에서도 미세조류의 성장을 억제 시킬 뿐만 아니라 해조류 포자의 발아를 억제시키는 것으로 보고되고 있다 (Sidharthan, 2001). 따라서 이에 대한 대체 물질로서 해조류 상호간의 allellochemical들을 이용하여 천연 방오물질을 사용하고자 하였다 (Suzuki et al., 1998). 최근에 다양한 생리활성 물질을 함유한 해조류가 많이 보고되고 있다 (Rinerhart, 1981; Lincoln et al., 1991; Cannell et al., 1993). 그 중에 주가 되는 연구는 항에이즈 물질, 항암 물질, 항바이러스 물질, 항산화제, 신경세포 등에 관한 것이며, 새로운 형태의 생리활성물질의 연구도 많이 진행이 되고 있다 (William et al., 1994; Hideki et al., 1997; Matsukawa et al., 1997; Takanari et al., 1997;

Matsubara et al., 2000; Jeong et al., 2000). 현재까지 해조류로부터 부착저해 효과가 있는 물질에는 *Sargassume natans*의 tannin, *Rhodomela larix*의 bromophenol, *Dictyota menstrulais*의 diterpen, *Delisea pulchra*의 halogenated furanone가 알려져 있다.

본 연구에서는 부착생물에 의해 야기되는 문제점에 직면하여, 해양환경에 문제가 되지 않는 무독성의 천연 방오 물질을 탐색한 결과, brown algae인 넓패 (*Ishige sinicola*)의 추출물이 부착저해 효과를 나타내는 것을 알게 되었다. 따라서 넓패로부터 가시파래 (*Enteromorpha prolifera*)의 부착을 저해하는 천연의 방오물질 즉 부착방지 물질을 분리, 정제하여 구조를 분석하고자 하였으며, 분리되어진 물질들의 온도, pH, 빛, 그리고 염에 대한 안정성과 기타의 생물에 대한 독성 검사를 실시하였다.

재료 및 방법

넓패 채집

경상남도 남해군 남면 홍현리에서 넓패를 채취하여 담수로 깨끗이 씻어 실온에서 완전히 건조시킨 다음 분쇄하여 사용하였다 (Fig. 2-1).

추출물 조제

넓패 분말 0.02 g 당 methanol 1 mL 비율로 첨가하여 실온의 암실에서 하루동안 추출하여 상등액만을 모았다. 이를 3회 반복하여 모두 합친 후 37℃에서 methanol을 증발시켜 제거하였다. 이 해조류 추출물들의 40 ㎎ 당 methanol 1 mL 씩 비율로 가하여 녹인 후 0.22 ㎛ filter로 여과하여 -20℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다 (Fig. 1-1).

포자 부착에 대한 bioassay

넓패 추출물의 부착 방지 효과는 대표적인 부착 해조류 중 녹조류인 가시파래 (*Enteromorpha prolifera*)를 대상으로 실험을 하였다. 대상 해조체인 가시파래는 부산 해운대에서 채집하여 실험실로 운반하여 목적 해조체 만을 분류하였다. 분류 후, 부착생물들을 제거하기 위해서 초음파 처리를 1분 동안 3회 반복한 후 살균된 해수로 깨끗하게 씻었다. 1% betadine 및 2% triton X-100 혼합용액에 1분간 침지시켜서 간단한 멸균처리를 시킨 후 반 건조시켰다. 반 건조된 파래를 멸균해수에 넣고 80 μmol m^{-2} s^{-1}, 20℃ 배양기에 넣어 포자방출을 유도한다 (Fletcher, 1989). 방출된 포자를 PES배지에 현탁시키고 추출물을 각각 5 μL (40 mg mL^{-1}) 넣어 총 1 mL이 되도록 24 well plate에 접종하였다. Well 내에 slide glass (1×2.5 ㎝)를 세워서 넣고 암기로 6시간 동안 20℃에서 배양하였다. 포자 현탁액에 담겨지는 glass (1×0.5 ㎝)에 부착하는 포자 부착활력은 추출물을 넣지 않은 well에 부착한 포자수(C)에 대해 추출물을 접종한 well에 부착한 포자수(S)로 S/C의 상대 값으로 표시하였다.

극성에 의한 분리

넓패로부터 가시파래 포자 부착 억제 물질을 분리하기 위하여 우선 유기용매를 사용하여 극성에 따른 분획을 만들었다. 이때 해조류의 분말에 메탄올과 물을 4:1의 비율로 넣어 추출하였고, 이것을 여과하여 여과된 것 (fraction A)과 되지 않은 것 (fraction B)으로 구분하고 fraction B는 ethylacetate로 추출하였다. Ethylacetate 추출물은 여과시켜 잔사 (fraction Ⅰ)와 여과액 (fraction Ⅱ)으로 나누었다. Fraction A는 처음 부피의 1/10부피로 증발시키고 2 M H_2SO_4를 이용하여 산성화

시켰으며 chloroform으로 3회 추출하였다. Chloroform 층은 증발시켜 fraction Ⅲ으로 하고, aqueous acid층은 NH_4OH로 pH를 10으로 적정하여 chloroform으로 추출하였다. Chloroform층은 증발시켜 fraction Ⅳ로 하였고, aqueous basic 층은 증발시켜 MeOH로 추출하여 Fraction Ⅴ로 하여 각각의 활성을 확인하였다 (Fig. 2-2).

유기용매에 따른 용해도

활성이 나타난 fraction 을 유기용매 즉, petrolem ether, hexane, carbon tetrachloride, ethylether, chloroform, methylene chloride, ethylacetate, acetonitrile, butanol, iso-propanol, ethanol, methanol, DMSO, water에 대한 용해도를 TLC를 이용하여 알아보았다. TLC plate에 메탄올 추출물 원액 10 μL 씩 찍어 14종류의 유기용매를 각각 사용하여 8 ㎝까지 전개시킨 후 spot 부분과 2 ㎝ 간격으로 나누어 총 5 fraction으로 나누었다. 각각의 부분들은 칼을 사용하여 eppendorf tube에 모은 후 1 mL의 메탄올을 첨가하여 녹였다. 원심분리하여 새로운 eppendorf tube에 상층액만 모아 건조시킨 후 활성을 확인하였다.

Silica gel column chromatography

극성 분리 실험에서 확인된 fraction Ⅲ 분획만을 silica gel chromatography을 이용하여 분리하였다. Silica gel (70-230 mesh)을 hexane을 용매로 하여 packing하였다. 용매는 TLC 결과를 바탕으로 chloroform, ethylacetate, methanol을 사용하였으며, $CHCl_3$:EtOAc = 10:0, $CHCl_3$:EtOAc = 8:2, $CHCl_3$:EtOAc = 6:4, $CHCl_3$:EtOAc = 4:6, $CHCl_3$:EtOAc = 3:7, $CHCl_3$:EtOAc = 2:8, $CHCl_3$:

EtOAc = 0:10을 순차적으로 분리하여 활성을 확인하였다. 또한 EtOAc:MeOH = 8:2, EtOAc:MeOH = 6:4, EtOAc:MeOH = 4:6, EtOAc:MeOH = 2:8, MeOH 를 순차적으로 흘려보내면서 분리하였다. 각각의 fraction에서 용매를 건조시킨 후 활성을 확인하였다.

Sephadex LH-20 gel filtration

Silica gel column chromatography 후 활성이 가장 좋은 fraction ($CHCl_3$:EtOAc = 3:7)을 다음 단계에서 sephadex LH-20 (Parmarcia, 25×800 mm) gel filtration에 의해 분리하였다. 용매로는 100% methanol을 이용하였고, flow rate는 0.5 mL min^{-1}로 행하였으며 각 fraction당 2 mL 씩 분리하였다.

HPLC

Sephadex LH-20 gel filtration을 행한 후 활성 부분 (fraction 72-77)을 HPLC C18 reversed phase μBondapak column (Waters, 3.9×300 mm)에 적용하여 linear gradient로 0-100% acetonitrile을 100분 동안 유속 1 mL min^{-1}로 용출 시키면서 220 nm에서 그 흡광도를 우선 측정하였다. 그 중 활성 부분만을 두 번째 단계로서 HPLC C8 reversed-phase column (Nova-Pak, 3.9×150 ㎜)에 40% acetonitrile로 15분 동안 세척한 후에 적용하여 linear gradient로 40-70% acetonitrile을 60분 동안 실시하였다. Flow rate는 1 mL min^{-1}로 하였으며 220 ㎚에서 흡광도를 측정하여 최종적으로 분리하였다.

GC-MASS 분석

HPLC에서 활성부분 (acetonitrile 농도 60%)만을 회수하여 건조시킨 후 methanol에 녹인 다음 1 ㎎을 GC-Mass 분석에 사용하였다. 기체 크로마토그래피에는 모세관 칼럼인 HP-5 (Hewlett-Packard, 30 m ×0.25 mm×0.25 ㎛)를 사용하였으며 이동상 기체는 헬륨을 사용하였고 flow rate는 0.6 mL min^{-1}으로 분할 주입법 (1:50)을 사용하였다. 주입구의 온도는 230℃이고 칼럼의 초기 온도는 100℃였으며 이 온도에서 2분간 유지한 후 4℃ min^{-1}의 속도로 150℃까지 상온 시키고 다시 7℃ min^{-1}의 속도로 250℃까지 상온시켜서 6분간 유지시켰다. Ion source는 electron ionization mode로써 280℃에서 70 eV를 사용하였다 (Table 2-4).

Di-2- Ethykhexylphtalate의 가시파래 포자 부착에 대한 농도별 영향

가시파래 포자를 받기 위하여 우선 엽체를 무균처리 후 반건조 시켰다. 반건조된 파래를 멸균해수에 넣고 80 ㎛ol m^{-2} s^{-1}, 20℃ 배양기에 넣어 포자방출을 유도하였다 (Fletcher, 1989). 방출된 포자를 PES배지에 현탁시키고 방오물질을 농도별로 넣어 총 1 mL이 되도록 24 well plate에 접종하였다. Well plate에 slide glass (1×2.5 ㎝)를 세워서 넣고 암기로 6시간 동안 20℃에서 배양하였다. Glass (1×0.5 ㎝)에 부착한 포자수(S)는 방오물질을 넣지 않은 well에 부착한 포자수(C)에 대한 S/C의 상대값으로 표시하였다.

부착저해 물질의 물리·화학적 처리

산과 알카리에 대한 안정성을 알아보기 위하여 분리된 부착저해 물질에 1N HCl과 1N NaOH를 첨가 하여 하루동안 실온에서 보관한 후 pH 7.0으로 중화시킨 후 활성을 알아보았다. 열에 대한 안정성을 보기위하여 1시간 동안 boilling 하였고, 빛에 대한 안정성을 알아보기 위해서 형광등 빛 (40 μmol m^{-2} s^{1})과 자연광 (200 μmol m^{-2} s^{-1}), UVA (4 Kjoule)에 각각 1시간 동안 노출시켰다. 또한 염에 대한 안정성을 확인하기 위하여 2배 농도의 인공해수를 첨가하여 하루동안 실온에서 보관한 후 염을 제거하고 활성을 확인하였다.

방오물질의 독성 검사

유독성 검사는 식물플랑크톤과 동물플랑크톤, 그리고 해조류의 포자를 대상으로 실시하였다. 식물성플랑크톤은 먹이 생물로 가장 흔히 사용되는 *Isochrysis galbana*와 *Tetraselmis suecica*를 사용하여 실시하였고 F/2 배지에 각각을 2.5×10^5 cell mL^{-1}, 1.2×10^5 cell mL^{1} 농도로 96well plate의 well 당 200 μL씩 분주하고 분리된 물질을 농도별로 첨가하여 18℃에서 4일간 배양한 후 각각의 cell 수를 계측하여 LC_{50} 값을 구하였다. 해조류 중에는 홍조류인 개우무 (*Pterocladia tenuis*)와 녹조류인 잎파래 (*Enteromorpha linza*)의 포자를 사용하였다. PES 배지에 각각을 96 well plate의 well 당 100개씩 분주하고 분리된 물질을 농도별로 첨가하여 18℃에서 4일간 배양한 후 각각의 cell수를 계측하였다. 또한 동물플랑크톤에 대한 독성실험은 *Artemia salina* 유생을 대상으로 실시 하였다. *Artemia salina* 유생을 해수에 넣어 well 당 30-40 개체 씩 분주하고 분리된 물질을 농도별로 첨가하여 25℃에서 4일간 배양한 후 부화한 개체

수를 계측하였다.

결 과

극성에 의한 분리

극성에 따라 넓패 추출물을 분리하여 포자 부착에 대한 효과를 측정한 결과, fraction Ⅲ에서 활성이 강하게 나타났다. 따라서 분리의 첫 단계에서 추출물 (methanol: water = 4:1)을 농축하여 chloroform으로 추출하여 분리하였다.

유기 용매에 따른 용해도

활성이 나타난 넓패의 fraction을 TLC를 이용하여 petrolem ether, hexane, carbon tetrachloride, ethylether, chloroform, methylene chloride, ethylacetate, acetonitrile, butanol, iso-propanol, ethanol, methanol, DMSO, water에 대한 용해도를 알아보았다. 그 결과 hexane, carbon tetrachloride, water에서는 녹지 않았고 methanol, DMSO에서는 잘 녹았으며, ethylacetate, acetonitrile 에서는 잘 녹는 물질과 잘 녹지 않는 물질로 구분되었다 (Table 2-2).

Silica gel chromatography

TLC의 결과를 바탕으로 Silica gel column chromatography의 용매는 chloroform, ethylacetate, methanol을 선택하여 각 용매의 비율을 달리하여 분리 과정을 수행하였다. 분리의 첫 단계에서 활성을 나타낸 fraction Ⅲ 을 silica gel column chromatography를 이용하여 다음 단계의 분리를 수행하였으며, $CHCl_3$:EtOAc = 3:7에서 활성이 나

타났다.

Sephadex gel chromatography

Silica gel column chromatography를 행한 후 활성이 가장 좋은 fraction ($CHCl_3$:EtOAc = 3:7)을 다음 단계에서 sephadex LH-20 gel filtration을 행하였다. 용출 용매는 methanol을 사용하였으며 flow rate 0.5 mL min^{-1}, 각 fraction 당 2 mL 씩 분획하였으며, 72-77 fraction에서 활성이 나타났다.

HPLC

Sephadex gel filtration에서 활성이 있는 부분을 다음 단계로 1차 HPLC 상에서 μBondapak C18 reversed-phase column (Waters, 3.9×300 mm)을 사용하여 linear gradient로 0-100% acetonitrile을 100분 동안 유속 1 mL min^{-1}로 적용하여 65% 부분에서 활성이 있는 부분을 분리하였고 2차 HPLC 상에서 60분간 40-70% acetonitrile 농도 구배를 사용하였고 flow rate는 1 mL min^{-1}로 분리하였다. Fig. 2-4 에서 보는 것과 같이 acetonitrile 농도 60% 에서 부착방지 효과가 나타났다. 넓패로부터 가시파래의 부착억제물질의 분리과정은 Fig. 2-6과 같다.

GC-MASS 분석

분석결과 Fig. 2-5와 같은 spectrum으로 나타났으며 분자량은 390MW로 확인되었다. 이 물질은 di-2-ethylhexylphtalate로 (Fig. 2-6), 담치의 부착저해에도 효과를 나타내었다.

농도별 영향

가시파래의 경우 di-2-ethylhexylphtalate 의 농도별 실험 결과, 대조구에서는 87%의 부착률을 보이는 반면, di-2-ethylhexylphtalate는 0.01 mM 농도에서 40%의 부착률을 나타내고 0.1 mM의 경우 13%의 부착률을 나타내었다.

물리 · 화학적 처리

방오물질의 물리 · 화학적 안정성을 확인하기 위하여 pH, 열, 빛, 염 등을 처리하여 안정성을 확인하였다. 그 결과 이 물질은 산의 조건에서 불안하여 알칼리 상태 및 열, 빛 그리고 염에 대해 안정한 것으로 보인다.

방오물질의 독성검사

식물플랑크톤, 해조류 그리고 동물플랑크톤을 대상으로 방오물질의 급성독성 (4일) 검사를 실시하였다. 그 결과 식물 플랑크톤인 *I. galbana*와 *T. suecica*에 대한 LC_{50} 값은 각각 0.3 mM, 0.5 mM이었고, 해조류인 *P. tenuis*와 *E. linza*의 포자에 대한 LC_{50} 값은 각각 0.3 mM, 1 mM로 나타났다. 또한 동물 플랑크톤인 *A. salina* 경우는 5 mM로 확인되었다.

Table 2-1. Property identification of the fractions separated by procedure for extracting and fractionating into different classes according to property

Fraction	Elute color	Relative rate of spore settlement
I	brown	1.61
II	dark blue	0.29
III	dark brown	0.20
IV	dark blue	0.44
V	light brown	0.4

Table 2-2. Solubility of the methanol extract from *Ishige sinicola* by TLC. Rf value was expressed by active spot on the developed TLC plate

Solvent	Rf values
Petrolem ether	0
Heptane	0
Hexane	0
Carborn tetrachloride	0
Ethyl ether	0.25
Chloroform	0.45
Ethylacetate	0.85> 0.4
Acetonitrile	0.9> 0.5
Buthanol	0.7> 0.3
Iso-propanol	0.75
Ethanol	0.7> 0.5
Methanol	0.9
DMSO	0.8
Water	0

Table 2-3. Silica gel chromatography of the Chloroform extract (fraction Ⅲ)

Fraction	Eluting solvents	Elute color	Relative rate of spore settlement
1	Chloroform	brown	0.82
2	Chloroform:Etylacetate = 8:2	brown	0.85
3	Chloroform:Etylacetate = 6:4	brown	0.88
4	Chloroform:Etylacetate = 5:5	dark brown	0.56
5	Chloroform:Etylacetate: = 4:6	dark brown	0.23
6	Chloroform:Etylacetate = 3:7	brown	0.28
7	Chloroform:Etylacetate = 2:8	brown	0.77
8	Etylacetate	brown	0.84
9	Etylacetate:Methanol = 8:2	dark brown	0.9
10	Etylacetate:Methanol = 6:4	brown	0.78
11	Etylacetate:Methanol = 4:6	brown	0.74
12	Etylacetate:Methanol = 2:8	brown	0.81
13	Methanol	brown	0.80

Table 2-4. Condition of gas chromatography-mass spectrometry used for determination of the isolated compound

Parameter	Condition
Column	HP-5 column (30m×0.25mm×0.25㎛)
Injector temperature	230℃
Detector temperature	230℃
Initial temperature	50℃
Programing rate	4℃/min to 150℃ 7℃/min to 250℃
Final temperature	250℃ for 6min
Carrier gas flow-rate	Helium at 0.6 ml/min
Split ratio	1:50

Table 2-5. Stability of the antifouling substance isolated from the seaweed *I. sinicola*. The purified substance was pretreated with physico-chemical agents, and then assayed the remained activity. A "++" symbol indicates inhibiton spore settlement less than 25% and a "+" symbol indiciates inhibition less than 60% inhibition

Pretreatments	Antifouling activity of Di-2-ethylhexylphtalate
Boiling 1 hr	++
Fluorescent light (40μmol m^{-2} s^{-1}) for 1h	++
Sun light (200μmol $m^{-2}s^{-1}$) for 1h	++
UVA light (4 Kjoule) for 1h	++
1N HCl for 1d	+
1N NaOH for 1d	++
2-fold seawater for 1d	++
No pretreatment	++

Table 2-6. LC50 Values of antifouling substance against phyto plankton. *I. galbana* and *T. suecica* and against macroalgae *P. tenuis* and *E. linza,* against zooplankton *A. salina*

Species	LC50 Values of Di-2-ethylhexylphtalate (mM)
Isochrysis galbana	0.3
Tetraselmis suecica	0.5
Pterocladia tenuis	0.3
Enteromorpha linza	1
Artemia salina	5

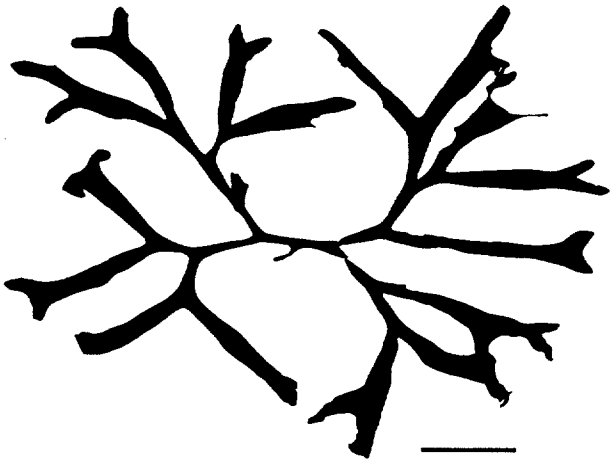


Fig. 2-1. Typical habit of the seaweed *Ishige sinicola* Chihara. Bar, 1 cm

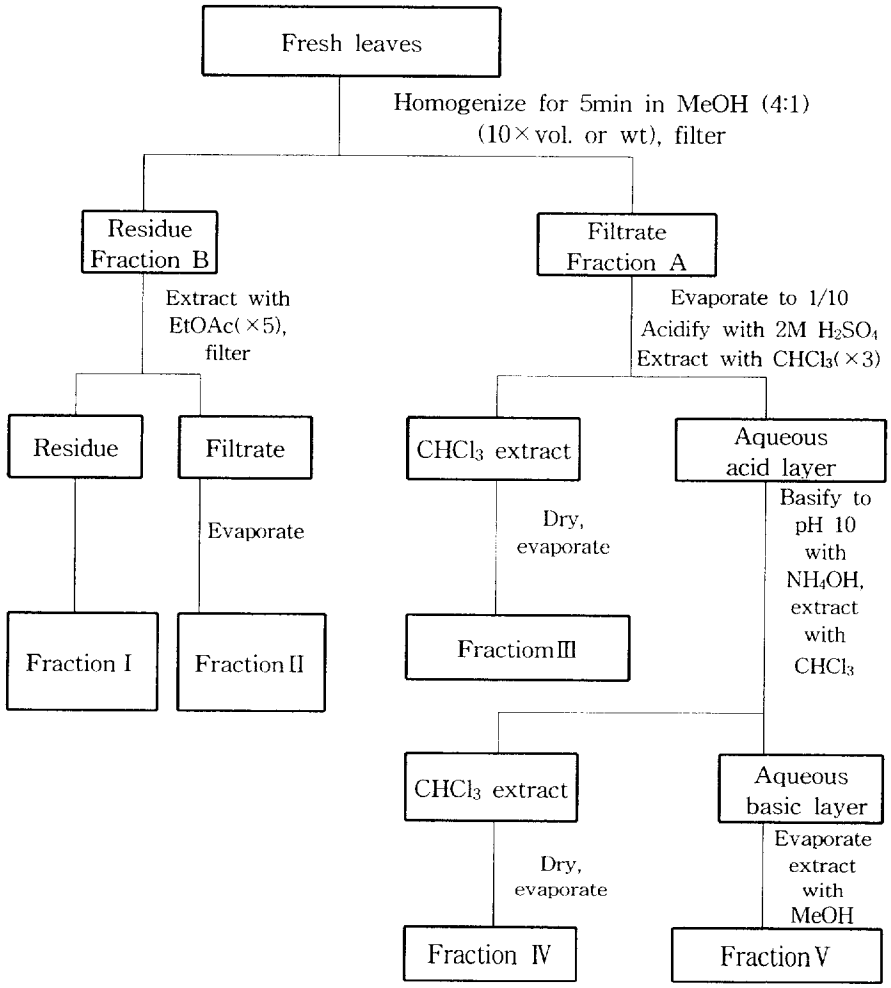


Fig. 2-2. A general procedure for extracting fresh plant tissues and fractionating into different classes according to polarity.

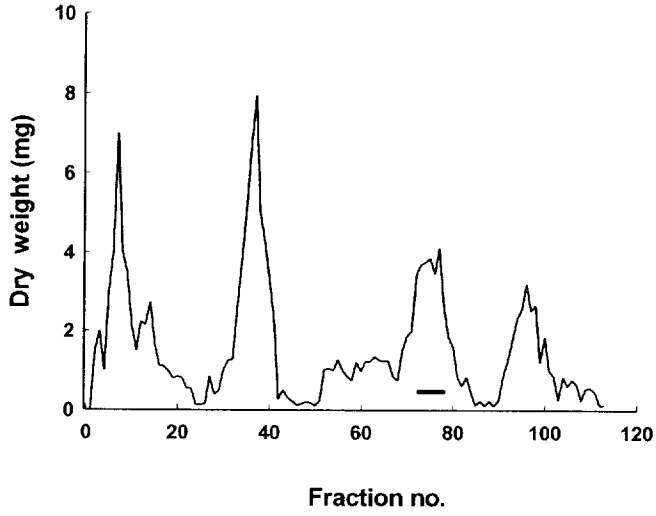


Fig. 2-3. Sephadex profile for isoaltion of antifouling substance against sopre settlement of *Enteromorpha prolifera,* using 100% methanol as eluant. Two mL fraction was collected at a flow rate of 0.5 mL min^{-1}. Bar indicate means active part.

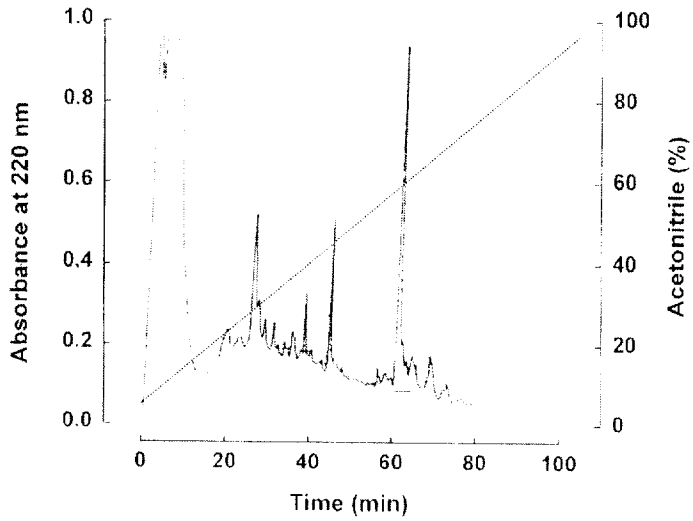


Fig. 2-4. First HPLC profile for the isolation of antifouling substance.The fraction collected from Sephadex LH-20 gel cloumn chromatography was subjected to the reverse phase HPLC (μBondapak C18 reversed-phase column (Waters, 3.9× 300mm). It was eluted with a linear gradient of 0-100% acetonitrile over 100min at a flow rate 1 mL min^{-1} (dot line). The absorbance was monitored at 220 nm (solid line). Bar indicated antifouling activity against spore settlement of *Enteromorpha prolifera*.

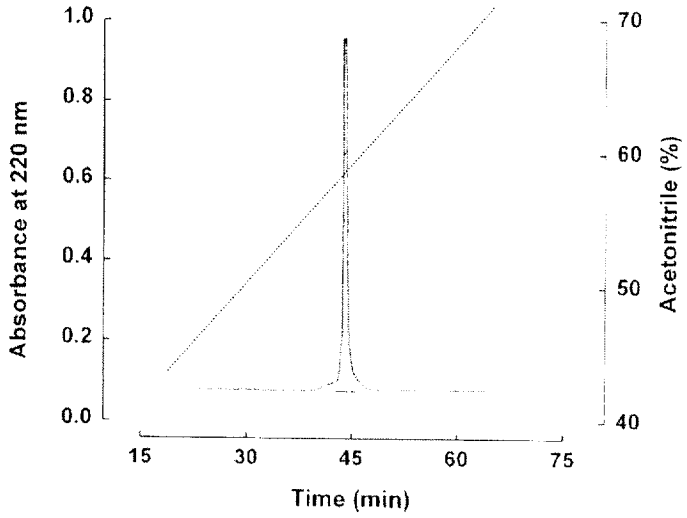


Fig. 2-5. Second HPLC profile for the isolation of antifouling substance. The fraction collected from μBondapak C18 reversed-phase cloumn chromatography was subjected to the reverse phase HPLC Nava-pak C8 reversed-phase column (Waters, 3.9×150mm). It was eluted with a linear gradient of 40-70% acetonitrile over 60min at a flow rate 1 mL min^{-1}. After 40% acetonitrile elution, the absorbance was monitored at 220 nm. Bar indicated antifouling activity against spore settlement of *Enteromorpha prolifera* .

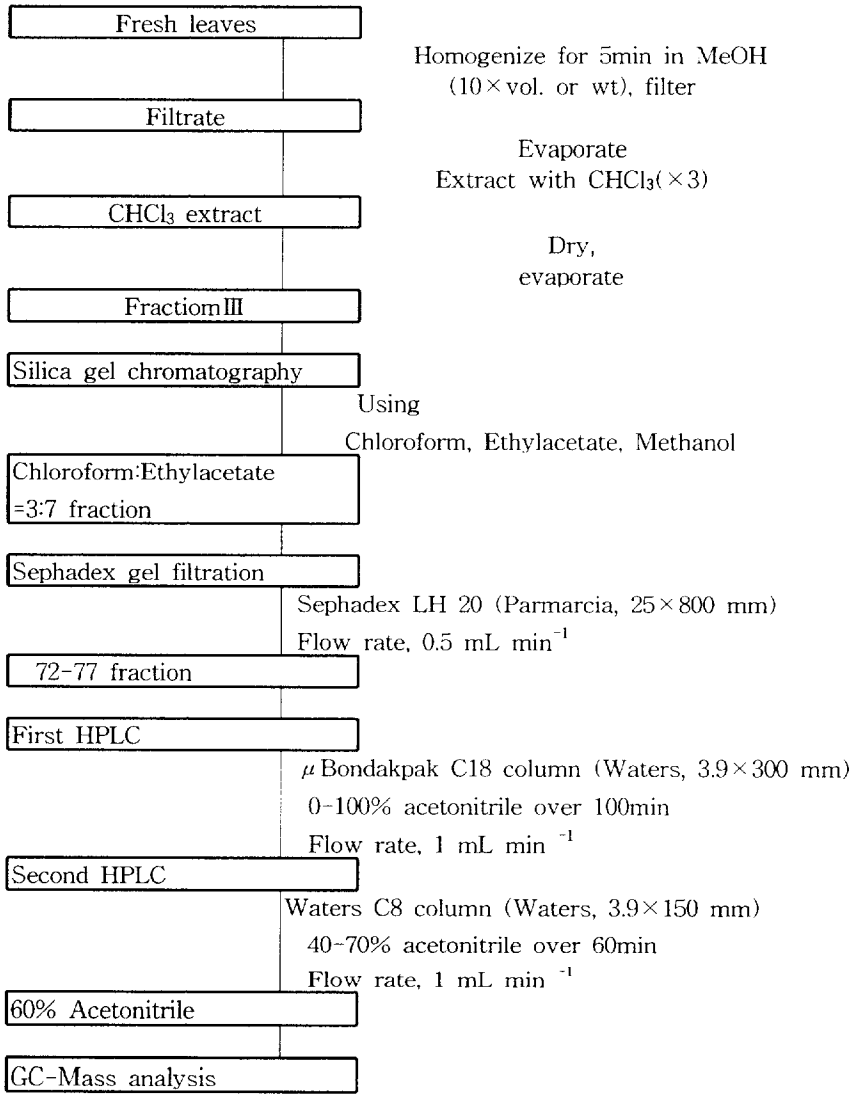


Fig. 2-6. Procedure of antifouling substance against sopre settlement of *Enteromorpha prolifera* from the seaweed *Ishige sinicola*.

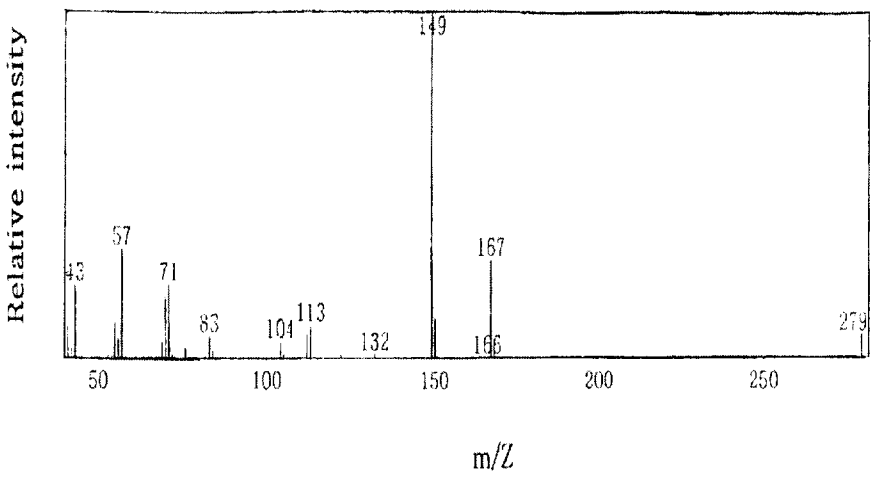


Fig. 2-7. Profile of GC-MASS spectrum from the isolated compound.

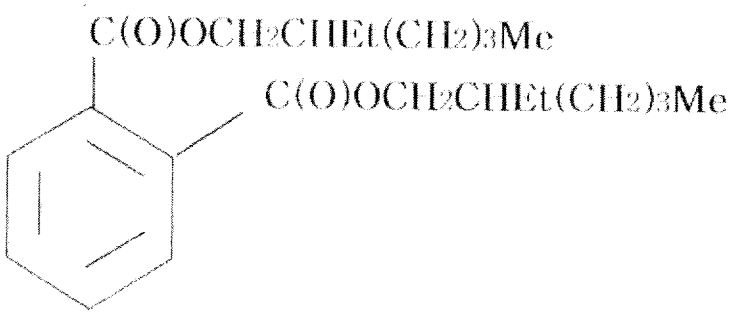


Fig. 2-8. Structure of antifouling agent against spore settlement *E. prolifera* from the seaweed *I. sinicola*.

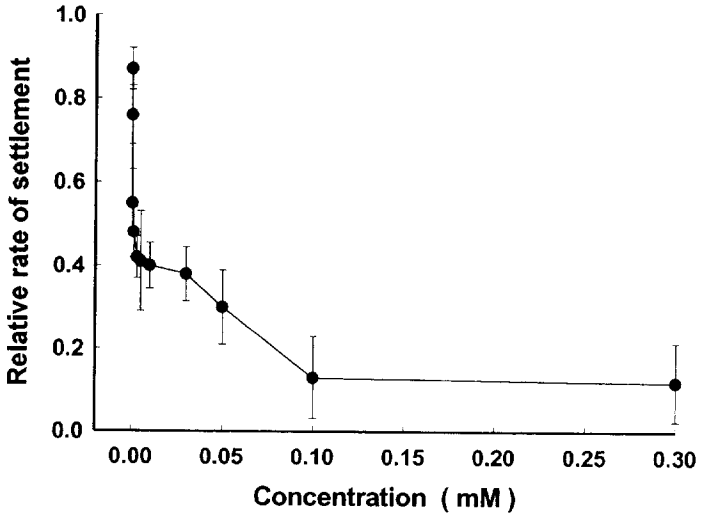


Fig. 2-9. Effect of di-2-ethylhexylphtalate on settlement of *Enteromorpha prolifera* spores. After 6h in dark at 20℃, numbers of settled spores were counted and expressed as a relative rate.

제 3 장 넓패 추출물로부터 진주담치에 대한 방오물질의 분리 및 특성

Abstract

I have isolated an antifouling substance against *Mytilus edulis* from *I. sinicola*. The substance was purified by silica gel chromatography, gel filtration and HPLC. We obtained one fraction from silica gel chromatography using ethylacetate: methanol=6:4 elution. This was loaded on sephadex LH-25 gel filtration column using 100% methanol as eluant. Two mL fraction was collected at a flow rate of 0.5 mL min^{-1}. Fractions 82-88 were collected for future purification. It was injected into reverse phase C8 column using HPLC. Chromatography show a single peak of antifouling agent with 45% acetonitrile. Structure of this antifoulant was analysed by GC-Mass spectrum. From the result, it was revealed as butylcarboxylmethyl 2-butylphtalate. Repulsive activity of mussel foot was completely inhibited by the butylcarboxylmethyl 2-butylphtalate at each concentration 2.5 mM.

To measure the stability of antifouling substance, the purified substance was pretreated with various phsico-chemical agents, and the remained activity was measured. Antifouling activity was decreased when the substance was pretreated in acidic condition, while the other treatments of heat, light, alkali and salt did not effect the antifouling activity. To measure toxicity of antifouling

substance, the purified substance was assayed against phyto-plankton *I. galbana* and *T. suecica*, macroalgae *P. tenuis* and *E. linza* spores and zooplankton *A. salina*. LC_{50} values butyl-carboxyl methyl 2-butylphtalate against *I. galbana* and *T. suecica* were 0.5 mM and LC_{50} against *P. tenuis* and *E. linza* spore 0.3 mM and 1 mM respectively. LC_{50} values of this against *A. salina* was 5 mM.

서 론

현재 방오제로 사용되고 있는 TBT (tributyltin)는 사용이 규제되고 있어 그 대체 물질 개발이 시급한 실정이다 (성, 1998). 본 연구에 앞서 한국연안의 해조류를 채집하여 추출물을 제조하였고 담치를 대상으로 하여 방오제 가능 물질들을 탐색하였다 (Cho et al., 1999). 담치의 부착여부를 확인하는 방법으로는 foot-stimulating method를 사용하였다. 담치는 부착에 앞서 발 부분을 이용하여 부착 기질을 선택하고 선택한 기질에 족사를 생성하여 부착한다. Foot-stimulating method는 담치의 이러한 성질을 이용한 실험방법으로 foot을 수축 시킬 수 있다면 담치의 족사 생성도 억제 시킬 수 있다는 관점에서 고안된 실험방법이다 (Hayashi and Miki, 1996). 27종류의 해조류를 물 추출물과 메탄올 추출물로 제조하여 foot-stimulating method를 통해 확인한 결과 넓패의 methanol 추출물과 고리매의 methanol 추출물이 부착 억제효과를 가지는 것으로 확인되었다. 따라서 본 연구에서는 담치의 부착저해 물질을 넓패로부터 분리 정제하여 GC-Mass 분석을 통해 1차 구조를 확인하였고, 분리 되어진 물질들의 온도, pH, 빛 그리고 염에 대한 안정성과 기타의 생물에 대한 독성 검사를 실시 하였다.

재료 및 방법

넓패 채집

경상남도 남해군 남면 홍현리에서 넓패를 채취하여 담수로 깨끗이 씻어 실온에서 완전히 건조시킨 후 분쇄하여 사용하였다.

추출물 조제

넓패 분말 0.02 g 당 methanol 1 mL 비율로 첨가하여 실온의 암실에서 하루동안 추출하여 상등액만을 모았다. 이를 3회 반복하여 모두 합친후 37℃에서 methanol을 증발시켜 제거하였다. 이 해조류 추출물들의 40 ㎎ 당 methanol 1 mL 씩 비율로 가하여 녹인 후 0.22 ㎛ filter로 여과하여 -20℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다 (Fig. 1-1).

담치에 대한 foot-stimulating method

패류에 대한 부착저해 효과를 실험하기 위해 대표적인 부착패류인 진주담치 (*Mytilus edulis*)를 선택하여 실험하였고, foot-stimulating method (Hayashi and Miki, 1996)를 이용하였다. Foot-stimulating method 결과, 수축 반응을 하는 개체 수를 전체 개체수로 나눈 백분율로 그 수축 활력을 나타내었다.

극성에 의한 분리

넓패로부터 담치 부착 억제 물질을 분리하기 위하여 우선 유기용매를 사용하여 극성에 따른 분획을 만들었다. 이때 해조류의 분말에 메탄올과 물을 4:1의 비율로 넣어 추출하였고, 이것을 여과하여 여과된 것 (fraction A)과 되지 않은 것 (fraction B)으로 구분하고 fraction B는 ethylacetate로 추출하였다. Ethylacetate 추출물은 여과하여 잔사 (fraction Ⅰ)와 여과액 (fraction Ⅱ)로 나누었다. Fraction A는 처음 부피의 1/10부피로 증발시키고 2 M H_2SO_4를 이용하여 산성화시켰으며 chloroform으로 3회 추출하였다. chloroform 층은 증발시켜 fraction Ⅲ으로 하고, aqueous acid층은 NH_4OH로 pH를 10으로 적정하여 $CHCl_3$:MeOH = 3:1의 용매로 추출하였다. $CHCl_3$-MeOH층은 증발시켜

fraction Ⅳ로 하였고, aqueous basic 층은 증발시켜 MeOH로 추출하여 fraction Ⅴ로 하여 각각의 활성을 확인하였다 (Fig. 2-2).

유기용매에 따른 용해도

활성이 나타난 fraction 을 유기용매 즉, petrolem ether, hexane, carbon tetrachloride, ethylether, chloroform, methylene chloride, ethylacetate, acetonitrile, butanol, iso-propanol, ethanol, methanol, DMSO, water에 대한 용해도를 TLC를 이용하여 알아보았다. TLC plate에 메탄올 추출물 원액 10 μL 씩 찍어 14종류의 유기용매를 각각 사용하여 8 ㎝까지 전개시킨 후 spot 부분과 2 ㎝ 간격으로 나누어 총 5 fraction으로 나누었다. 각각의 부분들은 칼을 사용하여 eppendorf tube에 모은 후 1 mL의 메탄올을 첨가하여 녹였다. 원심분리 하여 새로운 eppendorf tube에 상층 액만 모아 건조시킨 후 활성을 확인하였다.

Silica gel column chromatography

추출물을 silica gel chromatography을 이용하여 분리하였다. Silica gel (70-230 mesh)을 hexane 하에서 packing하였다. 용매는 TLC 결과를 바탕으로 chloroform, ethylacetate, methanol을 사용하였으며, $CHCl_3$:EtOAc = 10:0, $CHCl_3$:EtOAc = 8:2, $CHCl_3$:EtOAc = 6:4, $CHCl_3$:EtOAc = 4:6, $CHCl_3$:EtOAc = 2:8, $CHCl_3$:EtOAc = 0:10을 순차적으로 분리하였고, EtOAc:MeOH = 8:2, EtOAc:MeOH = 6:4, EtOAc:MeOH = 4:6, EtOAc:MeOH = 2:8, MeOH 을 순차적으로 용출 분리하였다. 각각의 fraction으로부터 용매를 건조시킨 후 활성을 확인하였다.

Sephadex LH-20 gel filtration

Silica gel column chromatography 후 활성이 가장 좋은 fraction (EtOAc:MeOH =6:4)을 다음 단계에서 sephadex LH-20 gel filtration에 의해 분리하였다. 용매로는 100% methanol을 이용하였고, flow rate는 0.5 mL min^{-1}로 행하였으며 fraction당 2 mL씩 분리하였다.

HPLC

Sephadex LH-20 gel filtration을 실시한 후 활성 부분 (fraction 82-88)을 HPLC C18 reversed phase μBondapak column (Waters, 3.9 ×300 mm)에 적용하여 linear gradient로 0-100% acetonitrile을 50분 동안 유속 1 mL min^{-1}로 용출 시키면서 220 nm에서 그 흡광도를 우선 측정하였다. 그 중 활성 부분만을 두 번째 단계로서 HPLC C8 reversed-phase column (Nova-Pak, 3.9×150 ㎜)에 30% acetonitrile로 15분 동안 세척한 후에 적용하여 linear gradient 로 30-70% acetonitrile을 80분 동안 실시하였다. Flow rate는 1 mL min^{-1}로 하였으며 220 ㎚에서 흡광도를 측정하여 최종적으로 분리하였다.

GC-MASS 분석

HPLC에서 활성부분 (acetonitrile 농도 45%)만을 회수하여 건조시킨 후 methanol에 녹인 다음, 1 ㎎을 GC-Mass 분석에 사용하였다. 기체 크로마토그래피에 사용된 칼럼은 모세관 칼럼으로 HP-5 (Hewlett-Packard, 30 m×0.25 mm×0.25 ㎛)를 사용하였으며 이동상 기체는 헬륨을 사용하였고 flow rate는 0.6 mL min^{1} 으로 분할

주입법 (1:50)을 사용하였다. 주입구의 온도는 230℃이며 칼림의 초기 온도는 100℃였으며 이 온도에서 2분간 유지한 후 4℃ min^{-1}의 속도로 150℃까지 상온시키고 다시 7℃ min^{-1}의 속도로 250℃까지 승온시켜서 6분간 유지시켰다. Ion source는 electron ionization mode로써 280℃에서 70 eV를 사용하였다 (Table 2-4).

Butylcarboxylmethyl 2-butylphtalate의 담치에 대한 농도별 영향

담치의 폐각근을 제거하고 5-10분간 해수에 넣어 둔다. 패각을 벌린 다음 담치의 발에 10 μL의 해수를 떨어뜨려 해수에 수축반응을 나타내는 개체는 제외시켰다. 방오물질을 농도별로 10 μL 씩 발에 떨어뜨려 수축여부를 확인하였다. 그 결과 수축 반응을 하는 개체 수를 전체 개체수로 나눈 백분율로 그 수축 활력을 나타내었다.

부착저해 물질의 물리·화학적 처리

산과 알카리에 대한 안정성을 알아보기 위하여 분리된 부착저해 물질에 1N HCl과 1N NaOH를 첨가 하여 하루동안 실온에서 보관한 후 pH 7.0으로 중화시킨 후 활성을 알아보았다. 열에 대한 안정성을 보기 위하여 1시간 동안 boilling 하였고, 빛에 대한 안정성을 알아보기 위해서 형광등 빛 (40 μmol m^{-2} s^{-1})과 자연광 (200 μmol m^{-2} s^{-1}), UVA (4 Kjoule)에 각각 1시간 동안 노출시켰다. 또한 염에 대한 안정성을 확인하기 위하여 2배 농도의 인공해수를 첨가하여 하루동안 실온에서 보관한 후 염을 제거하고 활성을 확인하였다.

방오물질의 독성 검사

유독성 검사는 식물플랑크톤과 동물플랑크톤 그리고 해조류의 포자

를 대상으로 실시하였다. 식물플랑크톤은 먹이 생물로 가장 흔히 사용되는 *I. galbana*와 *T. suecica*를 사용하여 실시하였고 F/2 배지에 각각을 2.5×10^5 cell mL^{-1}, 1.2×10^5 cell mL^{-1}농도로 96 well plate의 well 당 200 μL씩 분주하고 분리된 물질을 농도별로 첨가하여 18℃에서 4일간 배양한 후 각각의 cell 수를 계측하여 LC_{50} 값을 구하였다. 해조류 중에는 홍조류인 개우무 (*Pterocladia tenuis*)와 녹조류인 잎파래 (*Enteromorpha linza*)의 포자를 사용하였다. PES 배지에 각각을 96 well plate의 well 당 100개씩 분주하고 분리된 물질을 농도별로 첨가하여 18℃에서 4일간 배양한 후 각각의 cell수를 계측하였다. 또한 동물플랑크톤에 대한 독성실험은 *Artemia salina* 유생을 대상으로 실시 하였다. *Artemia salina* 유생을 해수에 넣어 well 당 30-40 개체 씩 분주하고 분리된 물질을 농도별로 첨가하여 25℃에서 4일간 배양한 후 부화한 개체 수를 계측하였다.

결 과

극성에 의한 분리

극성 정도를 조사한 결과 Fig. 1-1의 fraction Ⅲ과 Ⅳ에서 효과를 나타내었고, 이는 moderately polar extract와 basic extract이며 특히 fraction Ⅳ에서 주된 활성을 나타내었다 (Table 3-1).

유기용매에 따른 용해도

용해도 측정 결과 petrolem ether, heptane, hexane, carbone tetrachloride에는 녹지 않으며 DMSO 에는 잘 녹음을 알수 있었다. 그리고 ethylether, ethylacetate, acetonitrile, buthanol 에서는 잘 녹는 물질과 녹지 않는 물질

두 가지가 구분되었고 methanol에서는 중간 정도의 용해도를 나타냄을 확인하였다 (Table 3-2).

Silica-gel chromatography

Ethylacetate에 녹는 물질과 녹지 않는 물질로 구분하기 위해 silica gel chromatography를 사용하였고 그 결과 ethylacetate:methanol = 6:4에서 활성을 나타내었다.

Sephadex gel filtration

Silica gel column chromatography를 행한 후 활성이 가장 좋은 fraction (EtOAc:MeOH = 6:4)을 다음 단계에서 sephadex LH-20 (Parmarcia, 25×800 mm) gel filtration을 행하였다. 용출 용매는 methanol을 사용하였으며 flow rate 1 mL min^{1}, 각 fraction에 2 mL씩 분획하였다. 82~88 fraction에서 활성이 나타났다 (Fig. 3-1).

HPLC

Sephadex gel filtration에서 활성이 있는 82-88 fraction 을 HPLC 상에서 C18 reversed phase μBondapak column (Waters, 3.9×300 mm)에 적용하여 linear gradient로 0-100% acetonitrile을 50분 동안 유속 1mL min^{-1}로 용출시키면서 220 nm에서 그 흡광도를 우선 측정하였다. 그 중 활성 부분만을 두 번째 단계로서 C8 reversed-phase column (Nova-Pak, 3.9×150 ㎜)에 적용하여 linear gradient로 0-30% acetonitrile을 15분 동안, 30-70% acetonitrile을 80분 동안, 70-100% acetonitrile을 15분 동안 실시하였다. Flow rate는 1 min mL^{-1}로 하였으며 220 ㎚에서 최종적으로 분리하였다. 그 결과 45%

acetonitrile에서 활성을 나타내었다 (Fig. 3-2, 3-3). 넓패로부터 진주담치의 부착 저해물질의 분리과정은 Fig. 3-4와 같다.

GC-MASS 분석

GC-Mass 분석결과 넓패에서 분리된 진주담치의 부착저해 물질은 Fig. 3-4와 같은 spectrum을 보여주며, 분자량 336MW으로 확인되었다. 이 물질은 buthylcarboxylmethyl 2-butylphtalate로 (Fig. 3-5), 가시파래의 부착저해에도 효과를 나타내었다.

농도별 영향

넓패로부터 분리한 butylcarboxylmethyl 2-butylphtalate는 0.5 mM의 경우 30%의 repulsive activity를 나타내며 2.5 mM의 경우 100%의 효과를 나타내었다.

물리·화학적 처리

방오물질의 물리·화학적 안정성를 확인하기 위하여 pH, 열, 빛, 염 등을 처리하여 안정성을 확인하였다. 그 결과, 이 물질은 산의 조건에서 불안정하며 알칼리 상태 및 열, 빛 그리고 염에 대해 안정한 것으로 보인다.

방오물질의 독성검사

식물플랑크톤, 해조류 그리고 동물플랑크톤을 대상으로 방오물질의 급성 독성검사 (4일)를 실시하였다. 그 결과 식물플랑크톤인 *I. galbana*와 *T. suecica*에 대한 LC_{50} 값은 0.5 mM이었고, 해조류인 *P. tenuis*와 *E. linza*의 포자에 대한 LC_{50} 값은 각각 0.3 mM, 1

mM로 나타났다. 또한 *A. salina* 경우는 5 mM로 확인 되었다.

Table 3-1. Property identification of the methanol extract using chloroform and ethylacetate from a general procedure for extracting and fractionating into different classes according to property

Fraction	Color	Repulsive activity(%)
I	brown	0
II	dark blue	10±5
III	dark brown	60±10
IV	dark blue	100
V	light brown	0

Table 3-2. Solubility of the methanol extract from *Ishige sinicola* by TLC. Rf value was expres by active spot on the developed TLC plate

Solvent	Rf values
Petrolem ether	0
Heptane	0
Hexane	0
Carborn tetrachloride	0
Ethyl ether	0.6〉 0.95〉 0.2
Chloroform	0〉 0.3
Ethylacetate	0.95〉 0.54〉 0.25
Acetonitrile	0.9〉 0.6
Buthanol	0.85〉 0.4
Iso-propanol	0.85〉 0.45
Ethanol	0.9〉 0.4
Methanol	0.55
DMSO	0.95
Water	0

Table 3-3. Silica gel chromatography of the chloroform extract (fraction Ⅳ)

Fraction	Eluting solvents	Elute color	Repulsive activity(%)
1	Chloroform	dark brown	0
2	Chloroform:Etylacetate = 8:2	brown	0
3	Chloroform:Etylacetate = 6:4	brown	0
4	Chloroform:Etylacetate = 4:6	brown	0
5	Chloroform:Etylacetate = 2:8	brown	0
6	Etylacetate	brown	0
7	Etylacetate:Methanol = 8:2	brown	10
8	Etylacetate:Methanol = 7:3	light brown	100
9	Etylacetate:Methanol = 6:4	brown	100
10	Etylacetate:Methanol = 5:5	brown	50±5
11	Etylacetate:Methanol = 4:6	blue	20±10
12	Etylacetate:Methanol = 2:8	blue	0
13	Methanol	blue	0

Table 3-3. Stability of the antifouling substance isolated from the seaweed *I. sinicola*. The purified substance was pretreated with physico-chemical agents, and then assayed the remained activity. A "++" symbol indicates repulsive activity more than 90% and "-" symbol indicates no activity

Pretreatments	Antifouling activity of Butylcarbonylmethyl 2-butylphtalate
Boiling 1 hr	++
Fluorescent light ($40\,\mu$mol m^{-2} s^{-1}) for 1h	++
Sun light ($200\,\mu$mol $m^{-2}s^{-1}$) for 1h	++
UVA light (4 Kjoule) for 1h	++
1N HCl for 1d	-
1N NaOH for 1d	++
2-fold seawater for 1d	++
No pretreatment	++

Table 3-4. LC50 Values of antifouling substance against phytoplankton. *I. galbana* and *T. suecica* and against macroalgae *P. tenuis* and *E. linza,* against zooplankton *A. salina*

Species	LC50 Values of Butylcarbonylmethyl 2-butylphtalate
Isochrysis galbana	0.5
Tetraselmis suecica	0.5
Pterocladia tenuis	0.3
Enteromorpha linza	1
Artemia salina	5

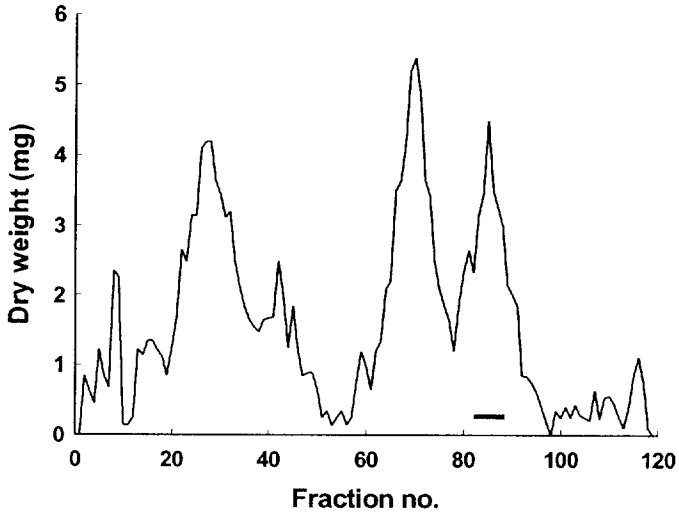


Fig. 3-1. Sephadex profile for isoaltion of antifouling substance against mussel *Mytilus edulis,* using 100% methanol as eluant. Two mL fraction was collected at a flow rate of 0.5 mL min^{-1}. Bar indicate means active part.

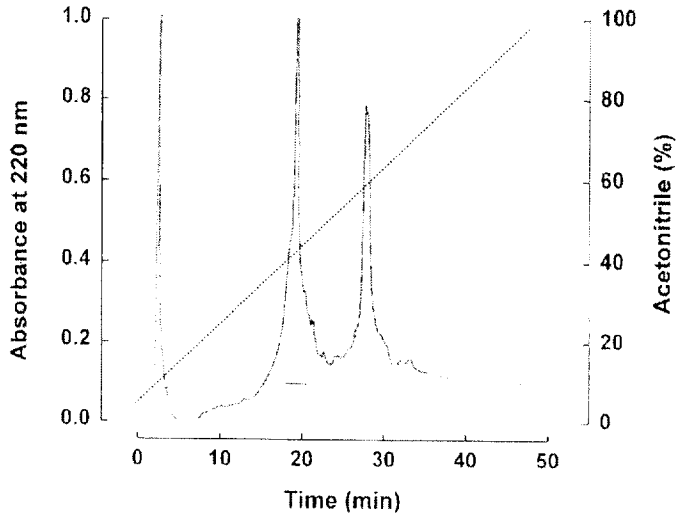


Fig. 3-2. First HPLC profile for the isolation of antifouling substance. The fraction collected from Sephadex LH-20 gel cloumn chromatography was subjected to the reverse phase HPLC μBondapak C18 reversed-phase column (Waters, 3.9× 300 mm). It was eluted with a linear gradient of 0-100% acetonitrile over 50min at a flow rate 1 mL min^{-1} (dot line). The absorbance was monitored at 220 nm (sloid line). Bar indicated antifouling activity against *Mytilus edulis*.

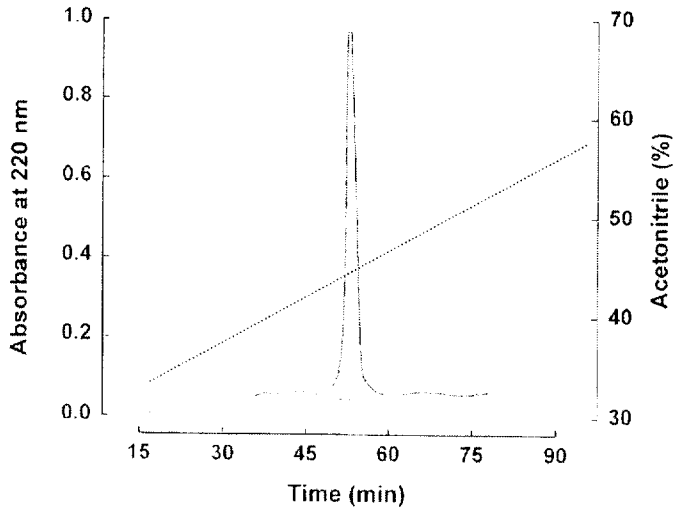


Fig. 3-3. Second HPLC profile for the isolation of antifouling substance. The fraction collected from μBondapak C18 reversed-phase cloumn chromatography was subjected to the reverse phase HPLC Nava-pak C8 reversed-phase column (Waters, 3.9×150 mm). It was eluted with a linear gradient of 30-70% acetonitrile over 80min at a flow rate 1 mL min^{-1}. After 30% acetonitrile elution, the absorbance was monitored at 220 ㎚. Bar indicated antifouling activity against *Mytilus edulis*.

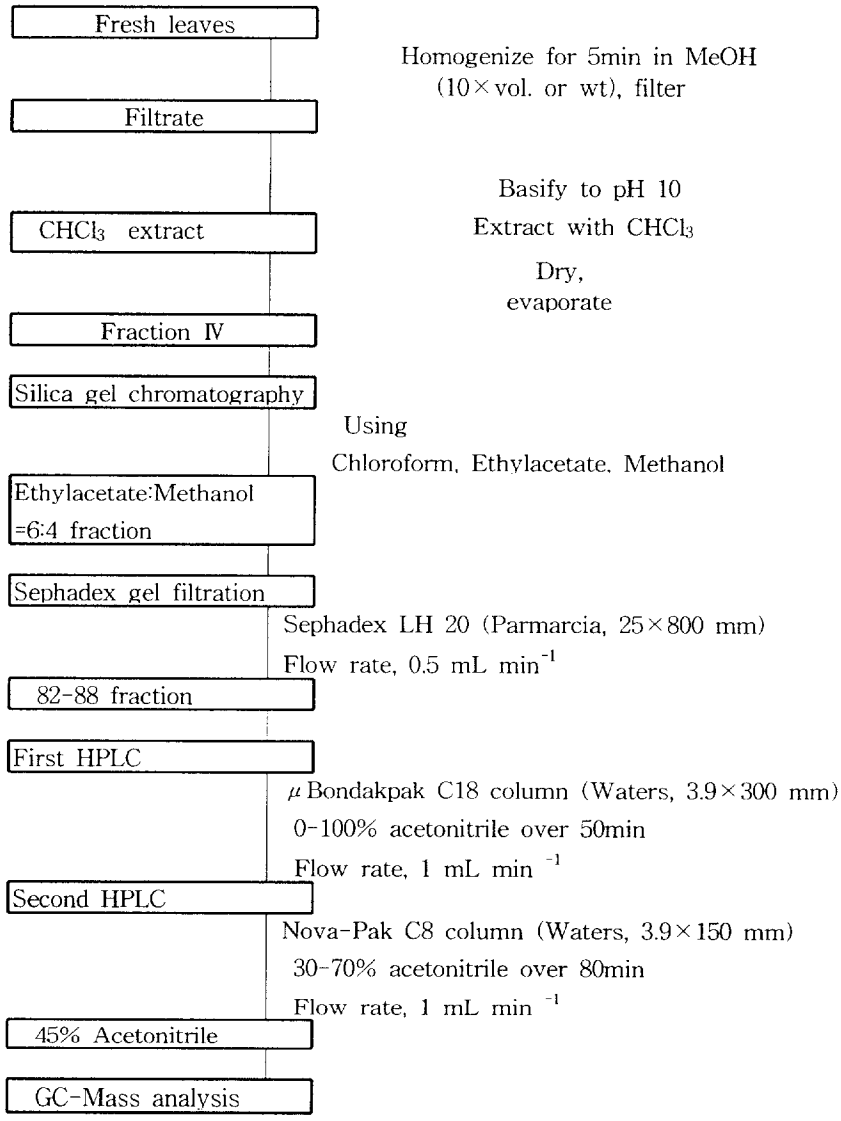


Fig. 3-4. Procedure of antifouling substance against *Mytilus edulis* from the seaweed *Ishige sinicola*.

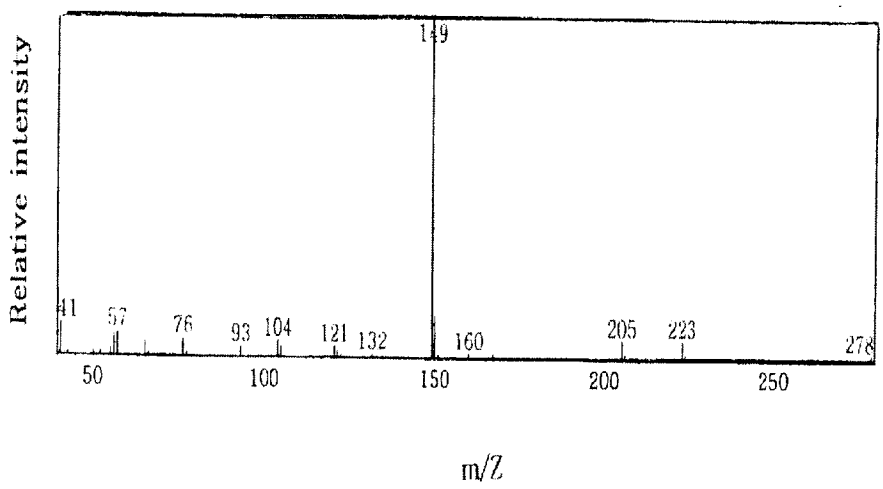


Fig. 3-5. Profile of GC-MASS spectrum from the isolated compound.

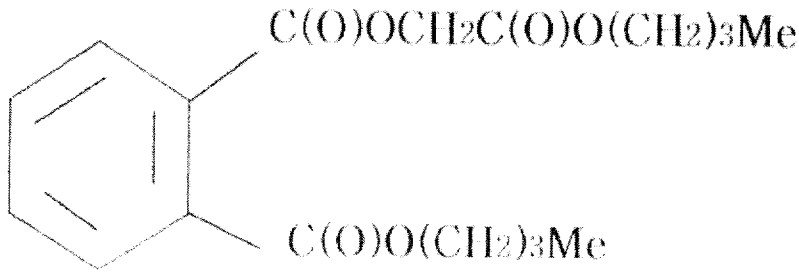


Fig. 3-6. The structure of antifouling agent against *Mytilus deulis* from the seaweed *I. sinicola*.

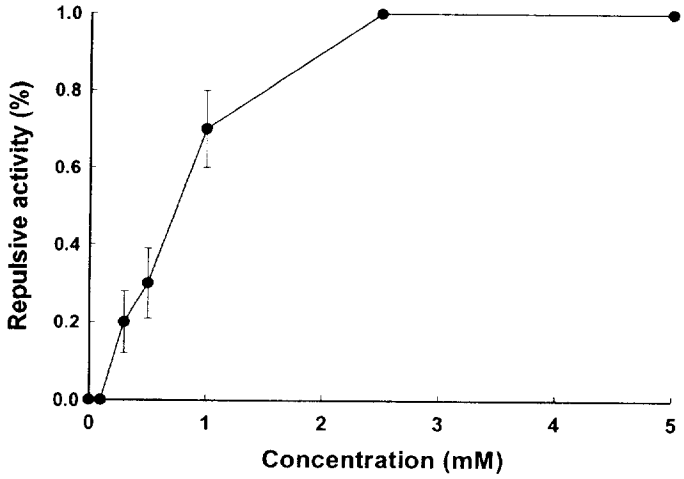


Fig. 3-7. Effect of Butylcarbonylmethyl 2-butylphtalate on foot repulsive reaction of *Mytilus edulis*. Repulsive activity was measured with a 10$\mu\ell$ drop to the mussel foot, and expressed as a rate of contracted mussels against mussels tested.

제 4 장 고리매 추출물로부터 담치에 대한 방오물질의 분리 및 특성

Abstract

I have isolated an antifouling substance against *Mytilus edulis* from *S. lomentaria*. The substance was purified by silica gel chromatography, gel filtration and HPLC. We obtained one fraction from silica gel chromatography using ethylacetate: methanol = 4:6 elution. This was loaded on sephadex LH-25 gel filtration column using 100% methanol as eluant. Two mL fraction was collected at a flow rate of 0.5 mL min^{-1}. Fractions 91-97 were collected for future purification. It was injected into reverse phase C8 column using HPLC. Chromatography show a single peak of antifouling agent with 25% acetonitrile. Structure of this antifoulant was analysed by GC-Mass spectrum. From the result, it was revealed as dimethylcyclohexane ethanamine. Repulsive activity of mussel foot was completely inhibited by dimethylcyclohexane ethanamine at a concentration 0.25 mM.

To measure the stability of antifouling substance, the purified substance was pretreated with various phsico-chemical agents, and the remained activity was measured. Antifouling activity was decreased when the substance was pretreated in acidic condition, while the other treatments of heat, light, alkali and salt did not effect the antifouling activity. To measure toxicity of antifouling

substance, the purified substance was assayed against phytoplankton *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis suecica*, macroalgae *Pterocladia tenuis* and *Enteromorpha linza* spore and zooplankton *Artemia salina*. LC_{50} values of dimethylcyclohexane ethanamine against *I. galbana* and *T. suecica* were 3 mM and LC_{50} against *P. tenuis* and *E. linza* spores were 3 mM and 5 mM. LC_{50} values of this against *A. salina* was 10 mM.

서 론

본 연구에 앞서 한국연안의 해조류를 채집하여 추출물을 제조하였고 담치를 대상으로 하여 방오제의 가능성이 있는 물질들을 탐색하였다 (Cho et al., 1999). 27종류의 해조류를 물 추출물과 메탄올 추출물로 제조하여 확인한 결과 넓패와 고리매의 methanol 추출물이 부착 저해 효과를 가지는 것으로 확인되었다 (Cho et al., 1999). 고리매는 갈조류의 고리매과에 속하는 식물로 몸은 뭉쳐서 나고 원주상이며 어린개체는 가는 실 모양이며 큰 개체는 군데 군데 잘록해진다. 조간대 상부에 군락을 이루어 분포하며 간혹 식용으로 사용하지만 거의 이용가치가 없는 것으로 알려져 있다 (한국동식물 도감, 1968). 본 연구에서는 또 다른 부착저해 물질을 고리매로부터 분리 정제하여 GC-Mass 분석을 통해 1차 구조를 확인하였고, 분리되어진 물질들의 온도, pH, 빛 그리고 염에 대한 안정성과 기타의 생물에 대한 독성 검사를 실시하였다.

재료 및 방법

고리매 채집

부산 청사포에서 고리매를 채취하여 담수로 깨끗이 씻어 실온에서 완전히 건조시킨 다음 분쇄하여 사용하였다.

추출물 조제

고리매 분말 0.02 g 당 methanol 1 mL 비율로 첨가하여 실온의 암실에서 하루동안 추출하여 상등액 만을 모았다 이를 3회 반복하여 모두

합친 후 37℃에서 methanol을 증발시켜 제거하였다. 이 해조류 추출물들의 40 ㎎ 당 methanol 1 mL 씩 비율로 가하여 녹인 후 0.22 ㎛ filter로 여과하여 다음 -20℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다 (Fig. 1-1).

Foot-stimulating method을 이용한 진주담치의 부착저해효과

패류에 대한 부착저해 효과를 실험하기 위해 대표적인 부착성 패류인 진주담치 (*Mytilus edulis*)를 선택하여 실험하였고, foot-stimulating method (Hayashi and Miki, 1996)를 이용하였다.

극성에 의한 분리

넓패로부터 담치 부착 억제 물질을 분리하기 위하여 우선 유기용매를 사용하여 극성에 따른 분획을 만들었다. 이때 해조류의 분말에 메탄올과 물을 4:1의 비율로 넣어 추출하였고, 이것을 여과하여 여과된 것 (fraction A)과 되지 않은 것 (fraction B)으로 구분하고 fraction B는 ethylacetate로 추출하였다. Ethylacetate 추출물은 여과하여 잔사 (fraction Ⅰ)와 여과액 (fraction Ⅱ)로 나누었다. Fraction A는 처음 부피의 1/10부피로 증발시키고 2M H_2SO_4를 이용하여 산성화시켰으며 chloroform으로 3회 추출하였다. Chloroform 층은 증발시켜 fraction Ⅲ으로 하고, aqueous acid층은 NH_4OH로 pH를 10으로 적정하여 $CHCl_3$:MeOH = 3:1의 용매로 추출하였다. $CHCl_3$-MeOH층은 증발시켜 fraction Ⅳ로 하였고, aqueous basic 층은 증발시켜 MeOH로 추출하여 fraction Ⅴ로 하여 각각의 활성을 확인하였다 (Fig. 2-2).

유기용매에 따른 용해도

활성이 나타난 fraction 을 유기용매 즉, petrolem ether, hexane,

carbon tetrachloride, ethylether, chloroform, methylene chloride, ethylacetate, acetonitrile, butanol, iso-propanol, ethanol, methanol, DMSO, water에 대한 용해도를 TLC를 이용하여 알아보았다. TLC plate에 메탄올 추출물 원액 10 μL 씩 찍어 14종류의 유기용매를 각각 사용하여 8 ㎝까지 전개시킨 후 spot 부분과 2 ㎝ 간격으로 나누어 총 5 fraction으로 나누었다. 각각의 부분들은 칼을 사용하여 eppendorf tube에 모은 후 1 mL의 메탄올을 첨가하여 녹였다. 원심분리 하여 새로운 eppendorf tube에 상층 액만 모아 건조시킨 후 활성을 확인하였다.

Silica gel column chromatography

극성 분리 실험에서 확인된 fraction Ⅲ 분획 만을 Silica gel chromatography를 이용하여 분리하였다. Silica gel (70-230 mesh)을 hexane을 용매로 하여 packing하였다. 용매는 TLC 결과를 바탕으로 chloroform, ethylacetate, methanol을 사용하였으며, $CHCl_3$:EtOAc = 10:0, $CHCl_3$:EtOAc = 8:2, $CHCl_3$:EtOAc = 6:4, $CHCl_3$:EtOAc = 4:6, $CHCl_3$:EtOAc = 3:7, $CHCl_3$:EtOAc = 2:8, $CHCl_3$:EtOAc = 0:10을 순차적으로 분리하여 활성을 확인하였다. 또한 EtOAc: MeOH= 8:2, EtOAc:MeOH = 6:4, EtOAc:MeOH = 4:6, EtOAc:MeOH = 2:8, MeOH 을 순차적으로 흘려보내면서 분리하였다. 각각의 fraction에서 용매를 건조시킨 후 활성을 확인하였다.

Sephadex LH-20 gel filtration

Silica gel column chromatography 후 활성이 가장 좋은 fraction (EtOAc:MeOH = 4:6)을 다음 단계에서 sephadex LH-20

(Parmarcia, 25×800 mm) gel filtration에 의해 분리하였다. 용매로는 100% methanol을 이용하였고, flow rate는 0.5 mL min^{-1}로 행하였으며 각 fraction당 2 mL씩 분리하였다.

HPLC

Sephadex LH-20 gel filtration을 행한 후 활성 부분 (fraction 91-97)을 HPLC C18 reversed phase μBondapak column (Waters, 3.9×300 mm)에 적용하여 linear gradient로 0-100% acetonitrile을 50분 동안 유속 1 mL min^{-1}로 용출 시키면서 220 nm에서 그 흡광도를 우선 측정하였다. 그 중 활성 부분만을 두 번째 단계로서 HPLC C8 reversed-phase Nova-Pak column (Waters, 3.9×150 ㎜)에 linear gradient 로 0-50% acetonitrile을 100분 동안 실시하였다. Flow rate는 1 mL min^{-1}로 하였으며 220 ㎚에서 흡광도를 측정하여 최종적으로 분리하였다.

GC-MASS 분석

HPLC에서 활성부분 (acetonitrile 농도 25%)만을 회수하여 건조시킨 후 methanol에 녹인 다음 1㎎을 GC-Mass 분석에 사용하였다. 기체 크로마토그래피에 사용된 칼럼은 모세관 칼럼으로 HP-5 (Hewlett-Packard, 30 m×0.25 mm×0.25 ㎛)를 사용하였으며 이동상 기체는 헬륨을 사용하였고 flow rate는 0.6 mL min^{-1}으로 분할주입법 (1:50)을 사용하였다. 주입구의 온도는 230℃이며 칼럼의 초기 온도는 100℃였으며 이 온도에서 2분간 유지한 후 4℃ min^{-1}의 속도로 150℃까지 상온시키고 다시 7℃ min^{-1}의 속도로 250℃까지 상온시켜서 6분간 유지시켰다. Ion source는 electron ionization

mode로써 280℃에서 70 eV를 사용하였다 (Table 2-4).

Dimethylcyclohexane ethanamine 의 진주담치에 대한 농도별 영향

담치의 폐각근 제거하고 5-10분간 해수에 넣어 둔다. 패각을 벌린 다음 담치의 발에 10 μL의 해수를 떨어뜨려 해수에 수축반응을 나타내는 개체는 제외시켰다. 방오물질을 농도별로 10 μL 씩 발에 떨어뜨려 수축여부를 확인하였다. 그 결과 수축 반응을 하는 개체 수를 전체 개체 수로 나눈 백분율로 그 수축 활력을 나타내었다.

부착저해 물질의 물리 · 화학적 처리

산과 알카리에 대한 안정성을 알아보기 위하여 분리된 부착저해 물질에 1N HCl과 1N NaOH를 첨가하여 하루동안 실온에서 보관한 후 pH 7.0으로 중화시킨 후 활성을 알아보았다. 열에 대한 안정성을 조사하기 위하여 1시간 동안 boilling 하였고, 빛에 대한 안정성을 알아보기 위해서 형광등 빛 (40 μ㏖ m^{-2} s^{1})과 자연광 (200 μ㏖ m^{-2} s^{-1}), UVA (4 Kjoule)에 각각 1시간 동안 노출시켰다. 또한 염에 대한 안정성을 확인하기 위하여 2배 농도의 인공해수를 첨가하여 하루동안 실온에서 보관한 후 염을 제거하고 활성을 확인하였다.

방오물질의 독성 검사

유독성 검사는 식물플랑크톤과 동물플랑크톤 그리고 해조류의 포자를 대상으로 실시하였다. 식물플랑크톤은 먹이 생물로 가장 흔히 사용되는 *I. galbana*와 *T. suecica*를 사용하여 실시하였고 F/2 배지에 각각을 2.5×10^{5} cell mL^{1}, 1.2×10^{5} cell mL^{1} 농도로 96 well plate

의 well 당 200 μL씩 분주하고 분리된 물질을 농도별로 첨가하여 18℃에서 4일간 배양한 후 각각의 cell 수를 계측하여 LC_{50} 값을 구하였다. 해조류 중에는 홍조류인 개우무 (*P. tenuis*)와 녹조류인 잎파래 (*E. linza*)의 포자를 사용하였다. PES 배지에 각각을 96 well plate의 well 당 100개씩 분주하고 분리된 물질을 농도별로 첨가하여 18℃에서 4일간 배양한 후 각각의 cell수를 계측하였다. 또한 동물플랑크톤에 대한 독성실험은 *A. salina* 유생을 대상으로 실시 하였다. *A. salina* 유생을 해수에 넣어 well 당 30-40 개체 씩 분주하고 분리된 물질을 농도별로 첨가하여 25℃에서 4일간 배양한 후 부화한 개체 수를 계측하였다.

결 과

극성확인

극성정도를 조사한 결과 Fig. 2-2의 fraction Ⅲ과 Ⅳ에서 효과를 나타내었고 특히 chloroform으로 추출한 fraction Ⅲ에서 주된 활성을 나타내었다 (Table 4-1).

유기 용매에 따른 용해도

용해도 측정 결과 petrolem ether, heptane, hexane, carborn tetrachloride에는 녹지 않으며 methanol, DMSO 등에는 잘 녹음을 알수 있었다. 그리고 ethylether, ethyl acetate, acetonitrile, buthanol 에서는 잘 녹는 물질과 녹지 않는 물질 두 가지가 구분되었다. 다음으로 silica gel chromatography 상에서 chloroform, ethylacetate, methanol을 사용하여 물질을 분리하였다.

Silica-gel chromatography

Chloroform, ethylacetate, methanol을 사용하여 silica-gel chromatography를 사용하였고. 그 결과 etylacetate:methanol = 4:6 fraction 에서 활성을 나타내었다.

Sephadex gel filtration

Silica gel column chromatography를 행한 후 활성이 가장 좋은 fraction (ethylacetate:methanol = 4:6)을 다음 단계에서 sephadex LH-20 gel filtration을 행하였다. 용출 용매는 methanol을 사용하였으며 flow rate 1 mL min ^{1}, 각 fraction에 2 mL 씩 분획하였다. 91~97 fraction에서 활성이 나타났다 (Fig. 4-2).

HPLC

Sephadex gel filtration에서 활성이 있는 91- 97 fraction 을 HPLC 상에서 C18 reversed phase μBondapak column (Waters, 3.9×300 mm)에 적용하여 linear gradient로 0-100% acetonitrile을 50분 동안 유속 1 mL min ^{1}로 용출 시키면서 220 nm에서 그 흡광도를 우선 측정하였다. 그 중 활성 부분만을 두 번째 단계로서 C8 reversed-phase Nova-Pak column (Waters, 3.9×150 ㎜)에 적용하여 0-50% acetonitrile을 100분 동안, 70-100% acetonitrile을 15분 동안 실시하였다. Flow rate는 1 min mL ^{1} 로 하였으며 220 ㎚에서 최종적으로 분리하였다. 그 결과, 25% acetonitrile에서 활성을 나타내었다 (Fig. 4-3, 4-4). 고리매로부터 담치의 부착억제물질의 분리과정은 Fig. 4-5와 같다.

GC-Mass 분석

GC-Mass 분석결과 넓패에서 분리된 담치의 부착저해 물질은 Fig. 4-5와 같은 spectrum을 보여준다. 이 물질은 분자량 155MW이고 dimethylcyclohexane ethanamine로 확인되었다 (Fig. 4-7).

농도별 영향

고리매로부터 분리한 dimethylcyclohexane ethanamine는 0.5 mM의 경우 20%의 repulsive activity를 나타내며 2.5 mM의 경우 100%의 효과를 나타내었다.

물리 · 화학적 처리

방오물질의 물리 화학적 안정성를 확인하기 위하여 pH, 열, 빛, 염 등을 처리하여 안정성을 확인하였다. 그 결과 이 물질은 산의 조건에서 불안정하고 알칼리 상태 및 열, 빛 그리고 염에 대해 안정한 것으로 보인다.

방오물질의 독성검사

식물플랑크톤, 해조류 그리고 동물플랑크톤을 대상으로 방오물질의 급성 독성검사 (4일)를 실시하였다. 그 결과 식물플랑크톤인 *I. galbana*와 *T. suecica*에 대한 LC_{50} 값은 3 mM 이었고, 해조류인 *P. tenuis*와 *E. linza*의 포자에 대한 LC_{50} 값은 각각 3 mM, 5 mM로 나타났다. 또한 *A. salina* 경우는 10 mM로 확인되었다.

Table 4-1. Property identification of the methanol extract using chloroform and ethylacetate from a general procedure for extracting and fractionating into different classes according to property

Fraction	Color	Activity % (repulsive activity)
I	brown	0
II	dark blue	10±5
III	dark brown	95±5
IV	brown	50±10
V	dark brown	15±0

Table 4-2. Solubility of the methanol extract from *Scytosiphon lomentaria* by TLC. Rf value was expressed by active spot on the developed TLC plate

Solvent	Rf values
Petrolem ether	0
Heptane	0
Hexane	0
Carborn tetrachloride	0
Ethyl ether	0.95> 0
Chloroform	0> 0.25
Ethylacetate	0.95> 0
Acetonitrile	0.93> 0
Buthanol	0.87> 0
Iso-propanol	0.9> 0
Ethanol	0.89> 0
Methanol	0.95
DMSO	0.95
Water	0.9> 0

Table 4-3. Silica gel chromatography of the chloroform extract (fraction Ⅳ)

Fraction	Eluting solvents	Elute color	Repulsive activity (%)
1	Chloroform	dark brown	0
2	Chloroform:Etylacetate = 8:2	dark brown	0
3	Chloroform:Etylacetate = 6:4	brown	0
4	Chloroform:Etylacetate = 4:6	brown	0
5	Chloroform:Etylacetate = 2:8	brown	0
6	Etylacetate	brown	0
7	Etylacetate:Methanol = 8:2	dark brown	30±10
8	Etylacetate:Methanol = 6:4	dark brown	100
9	Etylacetate:Methanol = 5:5	dark blue	95±7
10	Etylacetate:Methanol = 4:6	brown	85±5
11	Etylacetate:Methanol = 2:8	brown	10
12	Methanol	brown	20±10

Table 4-4. Stability of the antifouling substance isolated from the seaweed *S. lomentaria*. The purified substance was pretreated with physico-chemical agents, and then assayed the remained activity. A "++" symbol indicates repulsive activity more than 90% and "-" symbol indicates no activity

Pretreatments	Antifouling activity of Dimethylcyclohexane ethanamine
Boiling 1 hr	++
Fluorescent light (40μmol m^{-2} s^{1}) for 1h	++
Sun light (200μmol $m^{2}s^{1}$) for 1h	++
UVA light (4 Kjoule) for 1h	++
1N HCl for 1d	-
1N NaOH for 1d	++
2-fold seawater for 1d	++
No pretreatment	++

Table 4-5. LC50 Values of antifouling substance against phytoplankton. *I. galbana* and *T. suecica* and agains macro algae *P. tenuis* and *E. linza,* against zooplankton *A. salina*

Species	LC50 Values of Dimethylcyclohexane ethanamine
Isochrysis galbana	3
Tetraselmis suecica	3
Pterocladia tenuis	3
Enteromorpha linza	5
Artemia salina	10

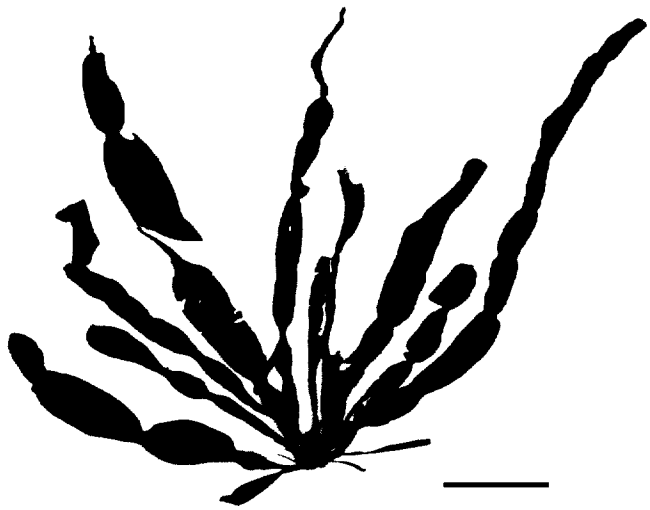


Fig. 4-1. Typical habit of the seaweed *Scytosimphon lomentaria* Link. Bar, 1 cm

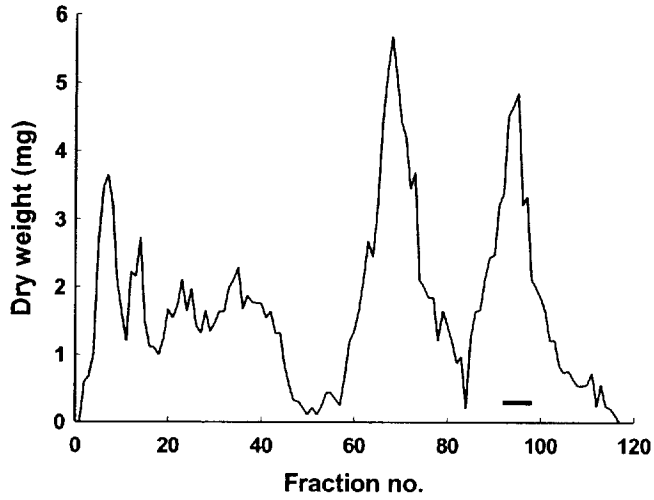


Fig. 4-2. Sephadex profile for isoaltion of antifouling substance against mussel *Mytilus edulis*, using 100% methanol as eluant. Two mL fraction was collected at a flow rate of 0.5 mL min^{-1}. Bar indicate means active part.

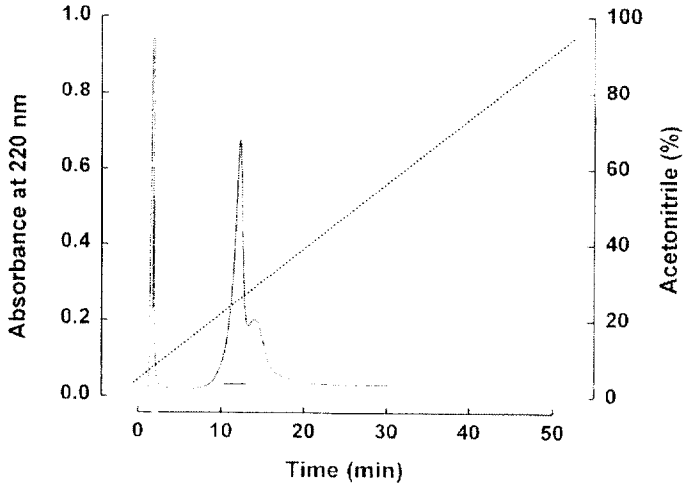


Fig. 4-3. First HPLC profile for the isolation of antifouling substance. The fraction collected from Sephadex LH-20 gel cloumn chromatography was subjected to the reverse phase HPLC μBondapak C18 reversed-phase column (Waters, 3.9× 300 mm). It was eluted with a linear gradient of 0-100% acetonitrile over 50min at a flow rate 1 mL min^{-1} (dot line). The absorbance was monitored at 220 nm (sloid line). Bar indicated antifouling activity against *Mytilus edulis*.

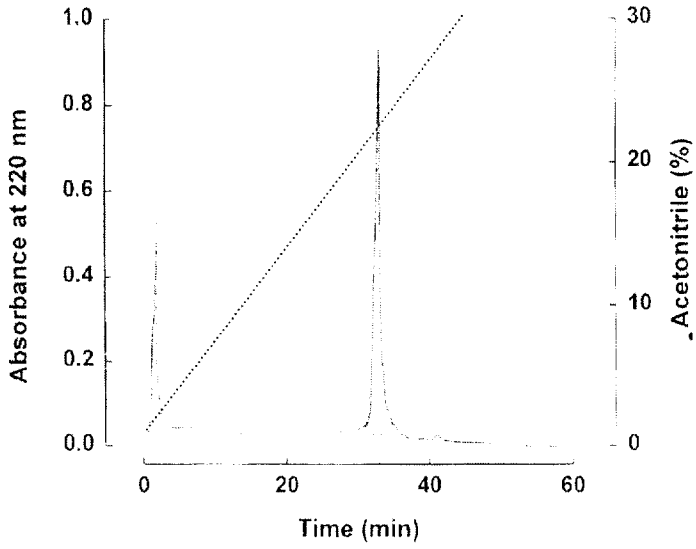


Fig. 4-4 Second HPLC profile for the isolation of antifouling substance. The fraction collected from μBondapak C18 reversed-phase cloumn chromatography was subjected to the reverse phase HPLC Nava-pak C8 reversed-phase column (Waters, 3.9×150 mm). It was eluted with a linear gradient of 0-50% acetonitrile over 100min at a flow rate 1 mL min^{-1}. The absorbance was monitored at 220 ㎚. Bar indicated antifouling activity against *Mytilus edulis*.

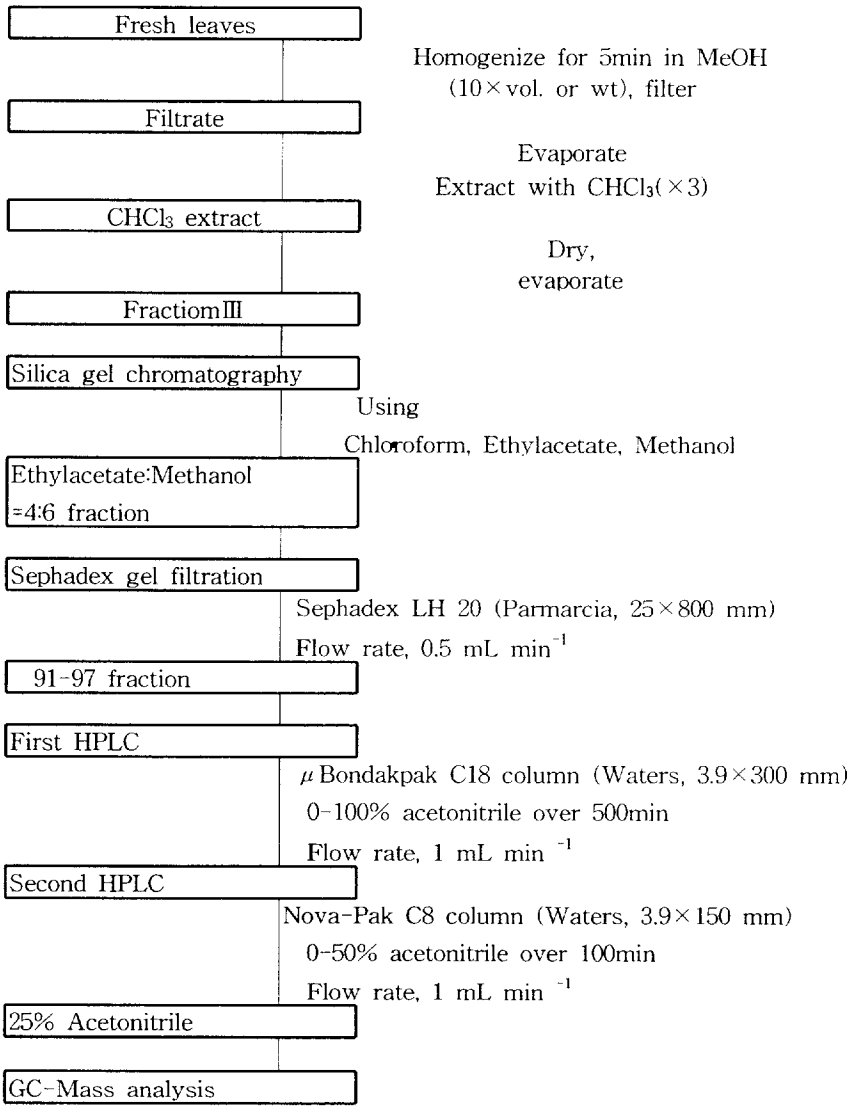


Fig. 4-5. Isolation procedure of antifouling substance against *Mytilus edulis* from the seaweed *Scytosiphon lomentaria*.

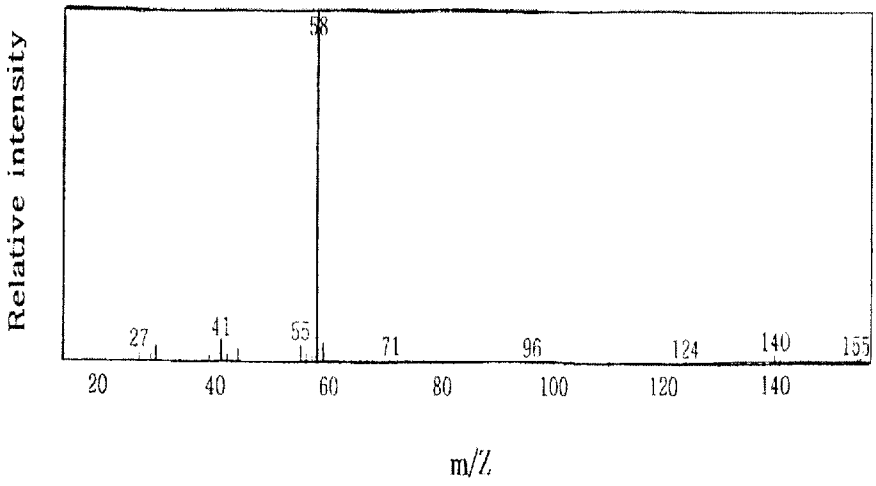


Fig. 4-6. Profile of GC-MASS spectrum from the isolated compound.

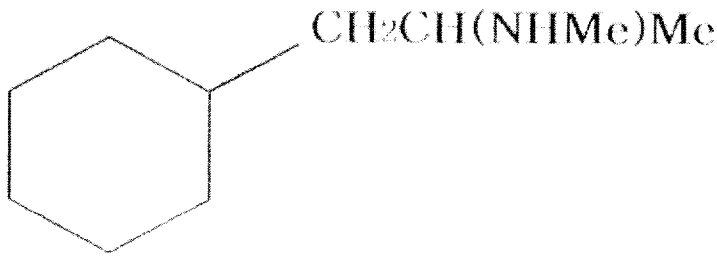


Fig. 4-7. The structure of antifouling agent against *Mytilus deulis* from the seaweed *S. lomentaria*.

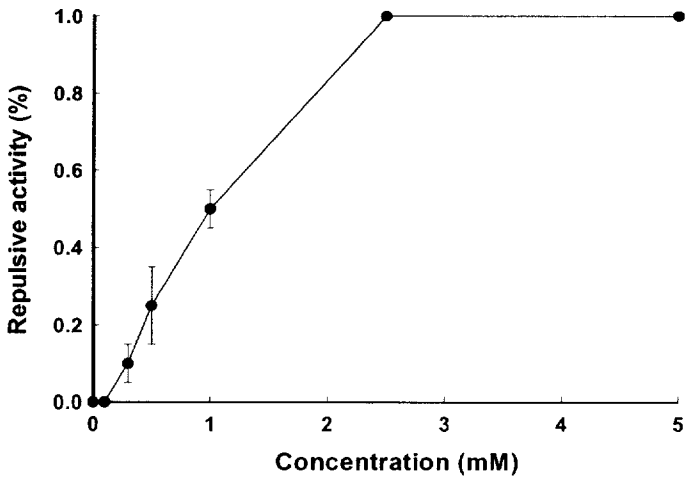


Fig. 4-8. Effect of dimethylcyclohexane ethanamine on foot repulsive reaction of *Mytilus edulis*. Repulsive activity was measured with a 10 $\mu\ell$ drop to the mussel foot, and expressed as a rate of contracted mussels against mussels tested.

고 찰

최근에 수산업, 해운업 등 연안과 해양에서 이루어지는 일들이 증가하고 있으나 여러 구조물에 해조류와 부착성 패류의 부착으로 인한 문제는 방치되고 있어 구조물의 기능저하에 관한 문제는 심각한 실정이다. 해양 인공시설물, 선박표면, 잠수함 표면 원자력 발전소의 냉각장치, 교각, 양식장의 가두리 망 등에 부착하여 이들의 기능을 저하시키는 문제를 발생시키고, 화물선과 유조선 등과 같은 대형선박에 특히 많이 부착하여 마찰력의 증가를 야기시키고 이것에 의한 속력 감소와 연료소모와 같은 문제점을 야기시킨다. 부착생물의 제거를 위해 물리적 방법으로 주로 인위적인 세척을 사용하고 있지만 번거로운 문제로 인해 최근에는 부착을 방지하기 위해 방오제를 첨가한 방오 페인트를 사용하고 있다. 방오제로는 주로 구리와 주석종류의 물질을 사용하고 있고, 종래에는 산화 제1구리가 주로 쓰였으나 1970년대 이후 TBT의 뛰어난 방오효과로 TBT가 많이 사용되어 왔다. 그러나 이들 물질은 비표적 생물 (non-target organism)들에게도 영향을 미치어 수정억제, 발생억제, 운동성저하 등의 문제를 일으키고 오염이 매우 심화되면 굴의 패각이 기형화되고 성장도 더디게 된다 (Voulvoulis et al., 1999). 특히 고둥, 대수리, 소라 등 복족류에서는 암컷에 수컷의 생식기가 생김으로써 불임을 유발하는 imposex 현상을 일으킬 뿐만아니라 (Schulte-Oehlmann et al., 1997) 주석은 퇴적물에 축적되어 미세조류 뿐만아니라 대형조류에도 오랜 시간 동안 영향을 미치어 먹이사슬과 연안의 생태계에 영향을 끼치게 된다 (Shin, 1995).

현재 개발되어진 방오 후보물질로는 chlorathalonil, irgarol, dichlo-

furanoid (Volvoulis et al., 1999) 등이 대표적이라 할 수 있으며 sponge에서 분리한 kalihinene과 ceratinamides와 산호에서 분리되어진 13-acetoxylpukalide trigonelline 등도 보고되어 있다 (Miki, 1996). 그리고 해조류들로부터도 많은 생리 활성물질들을 가지고 있다는 사실이 많은 연구자들에 의해 알려져 왔고, 그 중 *Sargassum natans*로 부터는 tannins (Sieburth &Conover, 1965) 이 *Rhodomela larix* 부터는 bromophenol (Phillips & Towers, 1982)이, *Dictyota menstrulais*로부터는 diterpens (Schmitt et al., 1995)이, *Delisea pulchra*로 부터는 halogenated furanone (de Nys et al., 1995)가 분리되어 부착 저해 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 이러한 개발에도 불구하고 천연 방오제의 다양한 개발 및 실용화 성과는 생물의 부착에 대한 이해 부족으로 아직 미진한 상태이다.

본 실험에 사용된 넓패는, 조간대 중부의 암상에 군락을 이루고 파도가 조용한 곳에 많이 서식하며 간조시 건조되어 흑색을 나타내고 엽면의 넓이는 1-2 cm 정도이며 높이는 8-10 cm 정도로 우리나라 남부 해안 각지에 분포한다. 또한 고리매는 우리나라 전 연안에 분포하는 것으로 알려져있고 끈 모양이고 속은 비어 있으며 거의 일정한 간격으로 좁아지며 엽면의 넓이는 0.5-1 cm, 길이는 15-30 cm 가량의 형태를 하고 있고 겨울부터 봄까지 조간대 위와 중부의 바위에 자라고 여름에는 없어진다 (한국동식물도감 1968). 하지만 두 종 모두 이용가치는 그다지 없는 것으로 알려져 있으며 해조류에서 몇몇 종 만을 식용으로 사용하거나 가공품으로 이용할 뿐, 많은 양의 해조류가 미 이용자원으로 방치되어 있는 상태이다. 따라서 해조류를 이용한 생리활성 물질의 개발과 생활성 물질 개발과 관련

된 분야의 연구에 주목해야 할 필요가 있으며 계속적인 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 부작용 없는 환경 친화적인 방제 수단으로 해조류 유래의 천연 부착방지물질을 개발하고자 하였다. 한국 연안에서 서식하는 27종의 해조류의 추출물로부터 가시파래와 홍합의 부착방지 효과를 탐색하였다. 그 결과, 넓패의 메탄올 추출물의 경우 가시파래와 진주담치의 부착저해에 큰 효과를 보이는 반면 고리매는 메탄올 추출물은 진주담치의 부착저해에 물 추출물은 가시파래의 부착저해 효과를 나타내었다. 이전의 연구에 의하면 넓패 추출물을 microalgae인 *I. galbana* 배양액에 200 μg mL^{-1}의 농도로 첨가한 경우 성장을 억제시키는 것으로 확인되었고 (Cho et al., 1999), 적조생물인 *Cochlodinium polykrikoides*의 배양액에 100 μg mL^{-1}의 농도로 첨가한 경우 성장을 억제시키는 것으로 확인되어 (Jeong et al., 2000) 넓패는 계속적인 연구에 이용가치를 가지는 것으로 보여진다. 부착방지 효과를 나타내는 넓패와 고리매로부터 각 물질을 분리 정제하여 구조를 분석하였다. 넓패로부터 분리한 가시파래의 부착저해 물질은 di-2-ethylhexyl phtalate (Fig. 2-8)이며, 넓패로부터 분리한 진주담치의 부착저해 물질은 butylcarboxylmethyl 2-bytylphtalate (Fig. 3-6)이고, 또한 고리매로부터 분리한 홍합의 부착저해 물질은 dimethylcyclohexane ethanamine (Fig. 4-7)으로 확인되었다. Di-2-ethylhexylphtalate는 담치의 부착저해에도 효과를 나타내었고, butyl carboxylmethyl 2-butylphtalate 역시 가시파래 부착에도 효과를 나타냈지만 dimethylcyclohexane ethanamine의 경우는 담치에만 부착저해 효과를 나타내었다. 세 물질 모두 환형의

탄소고리를 가지며 dimethylclohexane ethanamine는 nitrogen을 함유한 식물아민계로 확인되었고 Di-2-ethylhexylphtalate와 butyl-carboxylmethyl 2-butylphtalate는 유사한 구조를 나타내고 있으며 각 물질들을 1:1 비율로 혼합하여 부착저해 효과를 확인한 결과 상승효과 혹은 저해효과는 나타나지 않았다. 분리된 물질의 독성을 확인하기 위해서 microalgae인 *I. galbana*와 *T. suecica*를 사용하였으며 해조류 중에는 홍조류인 개우무 (*Pterocladia tenuis*)의 포자를 사용하였으며 또한 동물성 플랑크톤인 *Artemia salina*에 대한 독성실험을 실시하였다. 그 결과, 넓패에서 분리된 di-2-ethylhexyl-phtalate이 가장 높은 LC_{50} 값을 나타내었다. 현재 TBT의 대체 물질로 irgarol이 많이 사용되고 있어 irgarol의 독성검사에 대한 연구결과도 많이 보고되고 있으며 (Okamura et al., 2001; Lewis, 2001) 연구 결과에 따라 차이가 있지만 녹조류인 잎파래 (*Enteromorpha* sp.)와 동물플랑크톤인 *Artemia salina*에 대한 LC_{50} 값은 각각 1.25 $\mu g\ L^{-1}$, 40 $mg\ L^{-1}$로 나타난 반면, 본 실험에서 가장 높은 LC_{50}값을 나타내는 di-2-ethylhexylphtalate의 경우는 107 $mg\ L^{-1}$와 1.72 $g\ L^{-1}$로 irgarol에 비해 42배에서 10만배 가량 높은 값이다. 따라서 본 물질은 환경 친화적인 방오 후보물질로서의 가능성을 가지는 것으로 사료되고, 본 물질의 방오 도료제로써의 사용가능성을 확인하기 위해 현장에서의 실험을 통한 계속적인 연구가 필요할 것이며, 아울러 부착저해의 mechanism에 관한 연구 또한 이루어져야 할 것으로 사료된다.

담치와 해조류의 부착은 phenolic protein에 의한 것으로 보고되어 있다. 담치의 부착에 관련된 족사는 여러 가지 protein을 함유하고 있으며, foot에 가장 인접한 부분에서는 elastic fiber, 그 아래로

rigid fiber, 부착기질에 접해 있는 plaque 그리고 이들 전체를 coating하고 있는 부분 등으로 나눌수 있고 각각은 공통적으로 3,4-dihydroxylphenyl-L-alanine을 함유하고 있지만 이 물질은 부착에는 직접적인 영향을 미치지는 않고 있다. 기질과 인접한 plaque 부분에 phenolic protein이 함유되어 있고 부착에 있어서 phenolic protein은 plaque와 부착기질 사이에서 수소결합, $\pi-\pi$결합 그리고 π-cation 결합 등의 작용으로 기질에 부착하게 된다. 해조류의 포자의 부착에 있어서 수정 후 몇 시간 이내에 phenolic protein의 분비되고 이로 인해 carbohydrate fiber가 생성된다. 이것은 polyphenol과 carbohydrate glue를 형성하여 기질에 부착하게 되는 것이다. 발아 후에 polyphenol의 분비는 부착기질의 방향으로만 분비되어 기질에 더 단단히 부착하는 것으로 보고되어 있다. (Vreeland, 1998). 이렇듯 부착에 관한 mechanism은 알려져 있지만 부착저해에 관한 mechanism은 아직 정확히 밝혀져 있지 않아 이에 관한 연구 또한 이루어져야 할 것이다.

국문초록

본 연구에서는 부작용 없이 환경 친화적인 방오 수단으로 해조류 유래의 천연 부착방지물질을 개발하고자 하였다. 대표적인 착생 종으로 식물로는 가시파래를 선택하였고 동물로는 담치를 선택하여 각종 해조류 추출물들에 의한 이들의 부착저해 효과를 확인하였다. 27종의 해조류 추출물을 대상으로 가시파래 (*Enteromorpha prolifera*) 포자의 부착저해 효과를 실험하였다. 27종의 methanol 추출물을 200 $\mu g\ mL^{-1}$의 농도에서 부착저해 효과를 실험한 결과 구멍갈파래 (*Ulva pertusa*), 넓패 (*Ishige foliacea*), 괭생이모자반 (*Sargassum horneri*), 진두발 (*Chondrus ocellatus*), 작은구슬 산호말 (*Corallina pilulifera*), 도박 (*Pachymeniopsis elliptica*)의 추출물이 대조구에 비해 가시파래의 포자부착을 40% 이하로 저해하는 것으로 나타났으며 그 중 넓패 추출물은 21%로 가장 큰 부착저해 효과를 나타났다. 물 추출물의 경우는 고리매 (*Scytosiphon lomentaria*) 추출물에서만 43%의 저해 효과를 확인 하였다. 포자부착 저해에 가장 효과가 좋은 넓패와 괭생이모자반의 methanol 추출물을 농도별 가시파래 포자 부착에 대한 영향을 비교한 결과, 넓패 추출물은 30 $\mu g\ ml^{-1}$, 괭생이모자반 추출물은 120 $\mu g\ mL^{-1}$ 의 농도에서 최대로 포자 부착을 억제하였으며 각각의 농도에서 대조구에 비해 18%, 39% 억제하는 것으로 나타났다.

해조류 추출물의 담치의 부착방지 효과를 실험하기 위해서 홍합의 foot에 대한 수축 효과를 실험하였다. 실험에 사용한 methanol의 양 즉 1 $\mu\ell$/EA는 근 수축에 영향을 미치지 않음을 확인하였고, 추출물 1 $\mu\ell$(40 $mg\ mL^{-1}$)를 멸균 해수 10 $\mu\ell$에 녹여 농도 4 $mg\ mL^{-1}$ 로

사용하였다. 해조류의 methanol 추출물 경우에는 넓패 (*Ishige sinicola*)와 고리매 (*Scytosiphon lomentaria*)가 40 ㎍/EA의 경우 100%의 효과를 나타내며 감태 (*Ecklonia cava*)와 긴불레기말 (*Colpomenia bullosa*)는 94%의 효과를 나타내었다. 수용성 추출물의 경우 불레기말 (*Colpomenia sinuosa*)과 톳 (*Hizikia fusiformis*)에서 40 ㎍/EA의 경우 각각 60%, 50%의 효과로 methanol 추출물에 비해 낮은 효과를 나타내었다. Foot-stimulating method에서 가장 높은 효과를 보이는 넓패와 고리매의 부착방지 효과를 확인하기 위해서 홍합의 유생을 대상으로 부착에 미치는 영향을 확인하였다. Whatman paper를 부착기질로 사용하였으며, 넓패와 고리매 추출물을 적시고 용매를 증발시켰으며 이것을 petridish (55×12㎜)에 넣었다. 유생을 45- 60마리 씩 분주하였으며 20℃에서 4일 후 부착한 개체수를 확인하였다. 그 결과, 넓패 methanol 추출물의 경우 0.8 ㎎/㎖의 농도에서 100%의 부착저해 효과를 나타내고 고리매의 경우는 0.8 ㎎/㎖의 농도에서 94%의 효과를, 1.6 ㎎/㎖의 농도에서 100%의 부착저해 효과를 나타내었다.

부착저해 효과가 가장 뛰어난 넓패와 고리매 추출물을 대상으로 부착저해 물질을 분리 정제하였다. 넓패로부터 가시파래의 부착저해 물질을 정제하기 위해 극성에 따라 넓패의 추출물질을 분리하여 포자 부착에 대한 효과를 측정하였다. 그 결과, fraction Ⅲ (Fig. 2-2)에서 활성이 강하게 나타났다. 따라서 분리의 첫 단계에서 메탄올 추출물을 농축하여 chloroform으로 추출하였고, 활성이 나타난 넓패의 fraction을 TLC를 이용하여 petrolem ether, hexane, carbon tetrachloride, ethylether, chloroform, methylene chloride, ethylacetate, acetonitrile, butanol, iso-propanol, ethanol, methanol,

DMSO, water에 대한 용해도를 알아보았다. TLC의 결과를 바탕으로 silica gel chromatography의 용매는 chloroform, ethylacetate, methanol을 선택하여 각 용매의 비율을 달리하여 수행하였다. 분리의 첫 단계에서 활성을 나타낸 fraction Ⅲ (Fig. 2-2)을 silica gel column chromatography를 이용하여 다음 단계의 분리를 수행하였으며, $CHCl_3$:EtOAc = 3:7에서 활성이 나타났다. Silica gel column chromatography를 행한 후 활성이 가장 좋은 fraction ($CHCl_3$:EtOAc = 3:7)을 다음 단계에서 sephadex LH-20 gel filtration을 행하였고 72-77 fraction에서 활성이 나타났다. 이 부분을 다음 단계로 HPLC 상에서 uBondapak C18 column (Waters, 3.9×300 mm)과 Nova-Pak C8 column을 사용하여 분리하였다. 이 물질은 acetonitrile 농도 60%에서 얻을수 있었고 GC-Mss 분석결과, 분자량은 390MW 이며 di-2-ethylhexylphtalate 로 확인 되었다.

다음으로는 넓패로부터 담치의 부착저해물질을 정제하였다. 극성 정도를 조사한 결과 fraction Ⅳ (Fig. 2-2)에서 주된 활성을 나타내었다. 용해도 측정 결과를 바탕으로 용매는 chloroform, ethylacetate methanol를 선택하여 silica gel chromatography를 수행하였다. 그 결과 ethylacetate:methanol = 6:4에서 활성을 나타내었고, 다음 단계에서 sephadex LH-20 gel filtration을 행하였다. 용출 용매는 methanol을 사용하였으며 flow rate 1 ㎖ min^{-1}, 각 fraction에 2 ㎖ 씩 분획하였다. 그 결과, 82~88 fraction에서 활성이 나타났다. 이 부분을 HPLC 상에서 C18 reversed-phase column (Waters, 3.9×300 ㎜)과 C8 column (Waters, 3.9×150 ㎜)에 적용하여 45% acetonitrile에서 순수한 물질을 얻을수 있었다. GC-Mass 분석결과 넓패에서 분리된

담치의 부착저해 물질은 분자량 336MW이고 buthylcarboxylmethyl 2-butylphtalate로 확인되었다.

다음으로 고리매로부터 담치의 부착저해 물질을 분리하였다. 극성 확인 결과 chloroform으로 추출한 fraction Ⅲ (Fig. 2-2)에서 주된 활성을 나타내었고, 용해도 측정 결과를 바탕으로 chloroform, ethylacetate, methanol을 선택하여 silica gel chromatography를 실시하였다. 그 결과 ethylacetate:methanol = 4:6 fraction 에서 활성을 나타내었다. Silica gel column chromatography를 행한 후 활성이 가장 좋은 fraction (ethylacetate:methanol = 4:6)을 다음 단계에서 sephadex LH-20 gel filtration을 행한 결과 91~97 fraction에서 활성이 나타났다. 활성이 있는 부분을 HPLC 상에서 C18 column (Waters 3.9×300 ㎜)과 C8 column (Waters 3.9×150 ㎜)에 적용하여 25% acetonitrile에서 활성을 나타내었다. 본 물질은 GC-Mass 분석 결과, 분자량 155MW의 dimethylcyclohexane ethanamine으로 확인 되었다.

가시파래의 경우 di-2-ethylhexylphtalate의 농도별 실험 결과 대조구의 경우 87%의 부착률을 보이는 반면 0.01mM의 농도에서 40%의 부착률을 나타내고 0.1 mM의 경우 13%의 부착률을 나타내었다 (Fig. 2-9). 담치의 경우 넓패로부터 분리한 butylcarboxyl methyl 2-butylphtalate의 경우가 고리매로부터 분리한 dimethyl-cyclohexane ethanamine 보다 높은 효과를 나타내었다. 0.5 mM의 경우 각각 30%와 20%의 repulsive activity를 나타내며 2.5 mM의 경우 100%의 효과를 나타내었다. 안정성 확인을 위해 pH, 온도, 빛

그리고 염에 대한 영향을 확인하였다. 그 결과 1N HCl을 처리한 경우만 불안정하였으며 알칼리 상태 및 열, 빛 그리고 염에 대해 안정한 것으로 보인다. 각 물질의 독성을 검사하기 위하여 식물플랑크톤으로는 먹이 생물로 가장 흔히 사용되는 *Isochrysis galbana*와 *Tetraselmis suecica*를 사용하였다. 해조류 중에는 홍조류인 개우무(*Pterocladia tenuis*)와 녹조인 잎파래 (*Enteromorpha linza*)의 포자를 사용하였으며 또한 동물플랑크톤인 *Artemia salina*를 대상으로 독성 실험을 실시 하였다. Di-2-ethylhexylphtalate위 경우 식물플랑크톤인 *I. galbana*와 *T. suecica*에 대한 LC_{50} 값은 각각 0.3 mM, 0.5 mM이었고, 해조류인 *P. tenuis*와 *E. linza*의 포자에 대한 LC_{50} 값은 각각 0.3 mM, 1 mM로 나타났다. 또한 동물플랑크톤인 *A. salina* 경우는 5 mM로 확인되었다. Butylcarboxylmethyl 2-butylphtalate의 경우는 *I. galbana*와 *T. suecica*에 대한 LC_{50} 값은 0.5 mM 이었고, *P. tenuis*와 *E. linza*의 포자에 대한 LC_{50} 값은 각각 0.3 mM, 1 mM로 나타났다. 또한 *A. salina* 경우는 5 mM로 확인 되었다. Dimethylcyclohexane ethanamine의 경우는 *I. galbana*와 *T. suecica*에 대한 LC_{50} 값은 3 mM 이었고, *P. tenuis*와 *E. linza*의 포자에 대한 LC_{50} 값은 각각 3 mM, 5 mM로 나타났다. 또한 동물성 플랑크톤인 *A. salina* 경우는 10 mM로 확인되었다.

참 고 문 헌

Beaumont AR, Budd MD (1984) High mortality of the larvae of the common mussel at low concentrations of tributyltin. Mar. Pollut. Bull. 15: 402-405.

Callow ME., Callow JA (1997) Primary adhesion of *Enteromorpha* (Chlorophyta, Ulvales) propagules: Quantitative settlement studies and video microscopy. *J. Phycol.* 33: 938-947.

Christie AO, Shaw M. (1968) Settlement experiments with zoospores of *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link. *Br. Phycol. Bull.* 3: 529-534.

Cho JY, Jin HJ, Lim HJ, Whyte JNC, Hong YK (1999) Growth activation of the microalga *Isochrysis galbana* by the aqueous extract of the seaweed *Monostroma nitidum*. J. Appl. Phycol. 10: 561-567.

Clare AS (1998) Towards nontoxic antifouling. J. Mar. Biotechnol. 6:3-6.

Clare AS, Thomas RF and Rittschof D (1995) Evidence for the involvement of cyclic AMP in the phermonal modulation of barnacle settlement. 198: 655-664.

Coll JC, Bowden BF, Tapiolas DM (1982) In situ isolation of allelochmicals released from soft corals (coelenterata: octocorallina): A totally submersible sampling apparatus. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 60: 293-299.

Dalley R (1989) Legislation affecting tributylin antifoulings. Biofouling 1: 363-366.

Devi P, Vennam J, Naik CG, Parameshwaran PS, Raveendran TV, Yeshwant KS (1998) Antifouling activity of Indian marine invertebrates against the green mussel *Perna viridis* L. J. Mar. Biotechnol. 6: 229-232.

Devi P, Solimabi W, D'Souza L, Sonak S, Kamat SY and

Singbal SY (1997) Screening of some marine plants for activity against marine fouling bacteria. Bot. Mar. 40: 87-91.

de Nys R, Steinberg PD, Willemsen P, Dworjanyn SA, Gabelish CL, King RJ (1995) Broad spectrum effects of secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra* in antifouling assays. Biofouling 8: 259-271.

Dillon PS, Maki JS, Mitchell R (1989) Adhesion of *Enteromorpha* swarmers to microbial films. Microbiol. Ecol. 17: 39-47.

Egan S, James S, Holmstron C, Kjelleberg S (2001) Inhibition of algal spore germination by the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata.* Microbiol. Ecol. 35: 67-73.

Etoh H, Hageshita S and Ina K (1997) An improved assay for attachment-promoting substances of the blue mussel, *Mytilus edulis galloprovincialos.* J. Mar. Biotechnol. 5: 24-26.

Ferrer I, Ballesteros B, Marco MP and Barcelo D (1997) Pilot survey for determination of the antifouling agent Irgarol 1051 in enclosed seawater samples by a direct enzyme-linked immunosorbent assay and solid phase extraction follwed by liquid chromatography- diode array detection. Environ. Sci. Technol. 31: 3530-3535.

Fletcher RL, Callow ME (1992) The settlement, attachment and establishment of marine algal spores. Br. Phycol. J. 27: 303-329.

Fletcher RL (1989) A bioassay technique using the marine fouling alga *Enteromorpha.* International Biodeterioration 25: 407-422.

Fletcher RL, Callow ME (1992) The settlement , attatchment and establishment of marine algal spores. Br. Phycol. J. 27: 303-329.

Fuller PM and Gibor A (1996) Tissue culture of seaweeds. In: Bird K, Benser PH (eds), Seaweed Cultivation for Renewable

Resources. GRI, Chicago. pp. 210-239.

Gonzalez-Martinez MA, Maquieira A, Ballesteros B, Marco MP and Barcelo D (1998) An immunosensor for the automatic determination of the antifouling agent Irgarol 1051 in natural waters. Environ. Sci. Technol. 32: 3442-3447.

Harada H, Noro T, Kamei Y (1997) Selective antitumor activity *in vitro* from marine algae from Japan coasts. Biol. Pharm. Bull. 20: 541-546.

Harborne J B (1998) Phytochemical Methods. A guide to modern techniques of plant anlysis. Chanpman & Hall p 1-39.

Hayashi Y, Miki W (1996) A newly developed bioassay system for antifouling subatance using the blue mussel, *Mytilus edulis galloprovincialis*. J. Mar. Biotechnol. 4: 127-130.

Henrikson AA and Pawlik JR (1995) A new antifouling assay method: results from field experiments using extracts of four marine organisms. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 194: 157-165.

Hudson JB, Kim JH, Lee MK, DeWreede RE, Hong YK (1998) Antiviral compounds in extracts of Korean seaweeds: Evidence for multiple activities. J. Appl. Phycol. 10: 427-434.

Shin HW (1995) Biofouling by marine weedy algae. Kor. J. Phycol. 10: 97-108.

Jawecki GN, Sawicki J (1998) Toxicity of inorganic compounds in the spirotox test: a miniaturized version of the *Spirostomum ambiguum* test. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 34: 1-5.

Jeong JH, Jin HJ, Sohn CH, Suh KH, Hong YK (2000) Algicidal activity of the seaweed *Corallina pilulifera* against red tide microalgae. J. Appl. Phycol. 12: 37-43.

Jin HJ, Kim JH, Sohn CH, DeWreede RE, Choi TJ, Tower GHN, Hudson JB, Hong YK (1997a) Inhibition of Taq DNA polymerase by seaweed extracts from British Columbia,

Canada and Korea. J. Appl. Phycol. 9: 383-388.

Jin HJ, Seo GM, Cho YC, Hwang EK, Sohn CH, Hong YK (1997b) Gelling agents for tissue culture of the seaweed *Hizikia fusiformis*. J. Appl. Phycol. 9: 489-493.

Kitamura H, Kitamura S, Koh HB (1993) The induction of larval settlement and metamorphosis of two sea urchins, *Pseudocentrotus depressus* and *Anthocidaris crassispina,* by free fatty acids extracted from the coralline red alga *Corallina pilulifera*. 115: 387-392.

Kitamura H, Kitahara S, and Hirayama K (1992) Lipophilic inducers extracted from *Corallina pilulifera* for larval settlement and metamorphosis of two sea urchin *Pseudocentrotus depressus* and *Anthocidaris crassispina*. Nippon Suisan Gakkaishi, 58: 75-78.

Kim JH, Hudson JB, Huang AM, Bannister K, Jin H, Choi TJ, Towers GHN, Hong YK (1997) Biological activities of seaweed extracts from British Columbia, Canada, and Korea. I. Antiviral activity. Can. J. Bot. 1656-1660.

Konya K, Miki W (1994) All seasonal assay for antifouling using reared barnacle larvae. J. Mar. Biotechnol. 1: 193-195.

Labare ML, Coon SL, Matthias C and Weiner RM (1997) Magnification of tributyltin toxicity to oyster larvae by bioconcentration in biofilms of *Shewanella colwelliana*.

Lawson G, Woodland ED, Jonest T and Wilson (1996) Analysis of organotin compounds via a thermabeam LC-MS interface. App. Organo. Chem. 10: 135-143.

Leibson NL, Fralova LT (1994) Winter-spring essential reorganization of cell proliferation in the digestive tract ephithelia in the mussel *Crenomytilus grayanus*. Mar. Biol. 118: 471-477.

Mastin BJ, Rodgers JH, Jr (2000) Toxicity and bioavailability of

copper Herbicides (clearigate, cutrine-plus and copper sulfate) to freshwater animals. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 39: 445-451.

Miki W, Konya K, Mizobuchi S (1996) Biofouling and marine biotechnology: New antifoulants from marine invertbrates. 4: 117-120.

Moss B, Woodhead P (1975) The effect of two commercial herbicides on the settlement, germination and growth of *Enteromorpha*. Mar. Polut. Bull. 6:189-192.

Nergi AP, Heyward AJ (2001) Inhibition of coral fertilisation and larval metamorphosis by tributyltin and copper. Mar. Environ. Res. 51: 17-27.

Nishimura K, Yasunaga T, Ichikawa S and Wakao Y (1988) Development of a new anifouling method for a marine cooling water system. Mar. Biol. 99: 145-150.

Nipper M, Carr RS, Biedenbach JM, Hooten RL, Miller K, Saepoff S (2001) Development of marine toxicity date for ordnance compounds. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 41: 308-318.

Oehlman US, Oehlman J, Fioroni P, Bauer B (1997) Imposex and reproductive failure in *Hydrobia ulvae* (Gastropoda: Prosobranchia) Mar. Biol. 128: 257-266.

Okamura Y, Koyama J, Takaku H, Satoh H (2001) Influence of organic solvents in the growth of marine macroalgae. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 41: 123-128.

Okino T, Yoshimura E, Hirota H and Fusetani N (1995) Antifouling kalihinenes from the marine sponge *Acathella cavernosa*. Tetra. Let. 36: 8637-8640.

Pandey RS and Ohno M (1985) An ecological study of cultivated *Enteromorpha*. Rep. Usa Mar. Biol. Inst., Kochi Univ., 7: 21-31.

Phillips DW, Towers GHN (1982) Chemical ecology of red algal bromophenols. I. Temporal, interpopulational and within-thallus measurements of lanosol levels in *Rhodomela larix* (Turner) C. Agardh. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 58: 285-293.

Provasoli L (1968) Media and prospects for cultivation of marine algae. In Watanabe A, Hattori A (eds), Cultures and Collections of Algae. Jap. Soc. Plant Physiol.: 63-75.

Ramon M and Amor MJ (2001) Increasing imposex in populations of *Bolinus brandaris* (Gastropoda: Muricidae) in the north-western Mediterrannean. Mar. Environ. Research 52: 463-475.

Ross Ke, Bidwell JR (2001) A 48-h larval development toxicity test using the marine polychaete *Galeolaria caespitosa* Lamarck (Fam. Serpulidae). 40: 489-496.

Sera Y, Iida S, Adachi K and Shizuri Y (2000). Improved plate assay for antifouling substance using blue mussel *Mytilus edulis galloprovincialos*. Mar. Biotechnol. 2: 314-318.

Schmitt TM, Hay ME, Lindquist N (1995) Constraints on chemically mediated coevolution: multiple functions for seaweed secondary metabolites. Ecology 76: 107-123.

Sieburth JM, Conover JT (1965) *Sargassum tannin*, an antibiotic which retards fouling. Nature, 208: 52-53.

Shaw BA, Anderson RJ, Harrison PJ (1997) Feeding deterrent and toxicity effects of apo-fucoxanthinoids and phycotoxins on a marine copepod (*Tigriopus calfornicus*). Mar. Biol. 128: 273-280.

Shin HW (1998) Antifouling action of zosteric acid and copper on spores of *Ulva fasciata* Delile. Algae 13: 271-274.

Shin HW (1995). Biofouling by marine algae. The Kor. J. Phycol. 10: 97-108.

Suzuki Y, Tahabayashi T, Kawaguchi T, Matsunaga K (1998) Isolation of an allelopathic substance from the crustose coralline algae, *Lithphyllum* spp., and its effect on the brown alga, *Laminaria religiosa* Moyabe (Phaeophyta). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 225: 69-77.

Takaba K et al. (2000) Inhibition effects of subcutaneous dexamethasone treatment on rat pulmonary toxicity of KW-2149, a new mitomycin C analogue. Arch. Toxicol. 74: 106-111.

Takasawa R, Ogura C, Watanabe N, Etoh H, Sakata K and Ina K (1992) An efficient laboratory matching and screening mehtod for antifouling substances using the bule mussel, *Mytilus edulis*, and an antimicrobial assay. Biosci. Biotech. Biochem. 56: 12008-1211.

Tsukamoto S, Kato H, Hirota H and Fusctani N (1996) Ceratinamides A and B: new antifouling dibromotyrosine derivatives from the marine sponge *Pseudoceratina purpurea*. Tetra. 52: 8181-8186.

Voulvoulis N, Scrimshaw MD, Lester JN (1999) Alternative antifouling biocides. Appl. Organometal. Chem. 13: 135-143.

Vreeland V, Waite JH, Epstein L (1998) Polyphenols and oxidases in substratum adhesion by marine algae and mussels. J. Phycol. 34: 1-8.

Walters LJ, Hadfield MG and Smith CM (1996) Waterborne chemical compounds in tropical macroalgae: positive and negative cues for larval settlement. Mar. Biol. 126: 383-393.

Wang XH et al. (1999) Polyaniline as marine antifouling and corrosion-prevention agent. Synthetic Metals 102: 1377-1380.

Yamamoto H et al. (1997) Studies on quinone cross-linking adheshion mechanism and preparation of antifouling surfaces toward the blue mussel. J. Mar. Biotechnol. 5: 133-136.

성호진 (1998) Tin 및 Tin-free 방오도료에 대해서. 대한 조선학회지 35: 24-32.

신호상, 서배석, 오육숙, 박성우 (1998) GC-MS에 의한 혈중 5-fluorouracil의 정량법. Analy. Sci. Technol. 11: 36-41.

이수형 (1998) TBT 오염문제 및 생태계 영향. 대한 조선학회지 35: 33-38.

최광훈, 권순자, 정덕상, 엄기동 (1988) 한국에서 자생하는 Saururaceae 의 성분에 대한 연구(1), GC-MS를 이용한 *Houttuynia Cordata*의 휘발성 성분. J. Kor. Soci. Analy. Sci. 1: 57-61.

한국동식물 도감 (1968). 문교부 제8권 식물편 (해조류) p135, 142.

감사의 글

부족한 저를 항상 인자하고 따뜻하게 지도해 주시고 스승님으로 그리고 한 사람으로, 실험 외적인 면에서도 제게 많은 가르침을 주신 교수님께 머리 숙여 감사 드립니다. 교수님께 좀더 알찬 결과와 좀더 성실한 모습으로 보답하지 못한 점이 죄송스러울 따름입니다.

바쁘신 와중에도 논문 심사에 많은 신경을 써 주신 김성구 교수님, 세밀하고 자상하게 논문을 다듬어 주신 장영진 교수님, 언제나 따뜻하게 맞아주셨던 안동현 교수님 그리고 논문 심사를 위해서 멀리서도 와주셨던 신현웅 교수님께 진심으로 감사 드립니다. 또한 오랜 시간 가르침을 주신 공재열 교수님, 이형호 교수님, 공인수 교수님, 김중균 교수님 그리고 박남규 교수님께도 정말 감사 드립니다.

실험실에서 많은 지도와 격려를 해주신 박선미 선생님, 같이 채집 다니며 고생하셨고 제게 해조류 분류의 기초를 잡아주셨던 김명숙 선생님께도 감사 드립니다. 빈번한 출입에도 불구하고 따뜻하게 대해주며 항상 웃게 만들어준 양식학과 창근이 선배, 원준이 선배에게도 감사 드립니다. 실험에 많은 도움을 주었고 작은 의논도 함께 해주었던 수산진흥원 임현정 연구사님과, 실험에 필요한 여러가지들을 구해주시느라 고생하신 김영대 연구사님에게도 감사드립니다.

사소한 문제도 같이 고민했던 재석이 선배, 실험실 생활에 많은 도움을 주고 같이 생활했던 용국이 선배, 형주 선배, 은희, 미정이, 세은이, 승제 그리고 실험실에서 굳은 일도 묵묵히 하는 막내 지늬에게도 고맙다는 말을 전합니다. 간과할 수 있었던 결과도 다시 한번 생각하게 해준 정길이 선배, 그리고 유기화학 실험실원들에게도 감사 드립니다.

마음으로 응원을 아끼지 않았던 정교 내외, 그리고 내게 언제나 믿음직한 버팀목이 되어주고 논문의 시작과 마무리까지 함께 해준 명석이 선배에게도 진심으로 감사 드립니다.

끝으로 언제나 힘이 되어준 사랑하는 나의 가족들, 부모님, 큰오빠 내외와 작은오빠 내외, 귀여운 조카들에게 감사하다는 말과 함께 이 한 권의 책으로 그동안의 결실을 보여 드리고자 합니다.