부착성 사상세균 *Leucothrix mucor* 배양액에서 분리된 Giffinisterone B와 Oleamide의 해조류 *Ulva pertusa* 부착방지 효과

조 지 영

순천향대학교 해양생명공학과

Antifouling Activity of Giffinisterone B and Oleamide Isolated from a Filamentous Bacterium *Leucothrix mucor* Culture against *Ulva pertusa*

Ji Young Cho

Department of Marine Biotechnology, Soonchunhyang University, Asan 336-900, Korea

The filamentous bacterium *Leucothrix mucor*, an epiphyte of seaweed, showed antifouling activity against *Ulva pertusa* spore settlement and germling development. The chemical constituents representing the antifouling activity were identified as giffinisterone B and oleamide based on nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and mass spectroscopy (MS). Approximately 3.6 mg of giffinisterone B and 2.8 mg of oleamide were isolated from 1.6 g of *Leucothrix mucor* crude extract. Giffinisterone B fully inhibited spore settlement and germling development at 100 µg/mL. Oleamide inhibited spore settlement at 10 µg/mL and germling development at 100 µg/mL.

Key words: *Leucothrix mucor*, Giffinisterone B, Oleamide, *Ulva pertusa*, Antifouling activity

서 론

따개비, 담치류 및 해조류와 같은 생물은 해양구조물 및 양식시설에 부착하여 시설물의 기능을 저하, 내구성 감소, 주변 환경 및 생태계의 변화 등 다양한 문제를 야기시킨다(Callow and Edyvean, 1990). 특히 부착현상에 의한 양식시설의 경제적인 손실은 전 세계적으로 보고되어 있다(Enright 1993). 일례로 이러한 생물이 양식시설의 그물에 생물이 부착하게 되면 그물이 손상되거나 망목 크기를 줄여(Beveridge, 2004) 조류 소통을 방해하게 된다(Eckman et al., 2001). 이로 인해 노폐물 배출과 영양염 공급이 원활하지 못하게 되며(Ahlgren, 1998; Eckman et al., 2001), 결국 부영양화 현상을 발생시킨다(Folke et al., 1994). 또한 선박의 밑면에 부착생물들이 붙게 되면 선체 표면이 거칠어져 자주 보수를 해줘야 하며, 속도저하로 인한 연료소비 증가 등의 문제점이 발생한다(Voulvoulis et al. 1999). 선박과 그물 그리고 해양 구조물의 부착을 방지하기 위해 기존에 사용해 온 TBTO (tributyltin oxide)는 강한 독성을 지닌 화학물질로서 어패류 등에 농축되며 농도에 따라 수정억제, 발생억제, 운동성저하 등의 문제를 일으키고 오염이 매우 심화되면 굴의 패각이 기형화되고 성장도 더디게 된다(Voulvoulis et al., 1999). 따라서 TBTO의 대체물질로 최근에는 Irgarol, dichlofluanid, diuron (Voulvoulis et al., 2000) 등을 사용하고 있지만 넓은 지역의 해수와 해양저질에서 이들 물질들이 검출이 보고되고 있고(Voulvoulis, 2006; Dafforn et al., 2011)

Irgarol과 diuron은 조류의 광합성을 억제하고 dichlofluanid는 발암성 물질로 어패류의 돌연변이를 유도하는 것으로 보고되었다(Fernández-Alba et al. 2002).

따라서 해양 생태계에 해로운 영향을 미치지 않는 새로운 방오물질의 개발을 목표로 본 연구는 해조류의 성장을 저해하는 부착성 사상세균 *Leucothrix mucor*에 주목하여 그 배양액에서 해조류 부착방지물질을 분리하고자 하였다. *L. mucor*는 해조류에서 처음으로 분리된 착생세균으로 주로 미역과 김 업체에 부착하여 녹반병의 원인이 되는 종이다(Harold and Stanier 1955; Brock 1966). 녹반병은 해조류 업체에 녹색원형의 병변 부가 발생하는 것으로 가장자리부터 허물어지다가 업체 전체가 쪼그라드는 증상을 나타낸다(Park et al, 2009). 즉 해조류에 부착하여 질병을 일으키는 부착성 사상세균 *L. mucor*는 해조류 성장 및 부착 억제 물질의 생산원으로 적합할 것으로 사료되어 *L. mucor*의 배양액에서 방오물질을 분리, 효과를 시험하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

Leucothrix mucor 분양 및 배양

*L. mucor*는 한국생명자원센터에서 분양받았고 배양은 1L 증류수에 NaCl 11.7 g, MgCl₂·6H₂O 5.35 g, Na₂SO₄ 2.0 g, CaCl₂·2H₂O 0.75 g, KCl 0.35 g, Tris-base 0.5 g, NaHPO₄ 0.05 g, Na-glutamate (MSG) 10.0 g를 혼합하여 pH 7.6로 조절된 배지에 접종하여 20℃, 150 rpm에서 7일간 진탕 배양하

*Corresponding author: jycho@sch.ac.kr

였다. *L. mucor*는 1.5% agar 배지에 도말하여 4℃에 보관하며 사용하였다.

추출물 제조

*L. mucor*의 배양액에 20 g/L의 Amberite XAD-7 resin을 첨가하여 6시간 동안 다시 진탕시켜 대수물질을 흡착 시켰다. 흡착된 resin은 거즈를 이용하여 회수하였고 증류수를 사용하여 배지 성분을 제거하고 1 L의 아세톤으로 추출하였다. 추출액은 40℃에서 진공 농축하여 40 mg/mL의 농도가 되도록 메탄올에 녹여 -20℃에 보관하여 사용하였다.

부착방지 효능 검증

추출물의 부착 방지 효과는 대표적인 부착성 해조류인 파래(*Ulva pertusa*)를 대상으로 포자부착 방지 효능과 발아억제 효능을 조사 하였다. 파래는 2010년도 8월에 충청남도 태안군 방포해수욕장 암반에서 채집하였고 실험실로 운반하여 초음파 처리를 1분 동안 3회 반복한 후 멸균된 해수로 깨끗하게 씻었다. 반 건조된 파래를 멸균해수에 넣고 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 빛의 조건으로 20℃에서 포자방출을 유도하였다(Cho et al., 2001). 포자부착방지 실험에서는 방출된 포자를 PES배지에 현탁시키고 추출물 5 μL (40 mg/mL)를 넣어 총 1 mL이 되도록 24 well plate에 접종하였다. Well plate에 slide glass (1×2.5 cm)를 세워서 넣고 암기로 6시간 동안 20℃에서 배양하였다. Glass (1×0.5 cm)에 부착한 포자수는 추출물을 넣지 않은 well에 부착한 포자수(C)에 대해 추출물을 접종한 well에 부착한 포자수(S)로 $S/C \times 100$ 의 상대 값으로 표시하였다. 발아억제 검증 실험에서는 포자(1×10^5 cells)가 부착된 slide glass (4×2.5 cm)를 petri-dishes (90×1.5 mm)에 넣고 PES배지 20 mL와 추출물을 50 μL (40 mg/mL) 접종하였다. Petri-dish는 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 20℃ 배양기에 넣어 1주일 후 발아되는 포자를 확인하였고 발아된 포자수는 추출물을 넣지 않은 petri-dish의 slide glass에서 발아한 포자수(C)에 대해 발아한 포자수(G)로 $G/C \times 100$ 의 상대 값으로 표시하였다(Bhattacharai et al., 2007). 실험은 각 3회 반복하였다.

부착방지물질 분리

추출물은 celite에 흡착시켜 silica-gel flash column (100 g; 70-230 mesh) chromatography를 통하여 헥산(n-Hexane), 에틸아세테이트(EtOAc)메탄올(MeOH)을 이용하여 step-gradient로 분리하였다. 용매 n-Hexane:EtOAc=10:0(분획구 1), n-Hexane:EtOAc=8:2(분획구 2), n-Hexane:EtOAc=5.5(분획구 3), n-Hexane:EtOAc=2:8(분획구 4), n-Hexane:EtOAc=0:10(분획구 5), EtOAc:MeOH=8:2(분획구 6), EtOAc:MeOH=5:5(분획구 7), EtOAc:MeOH=2:8(분획구 8), EtOAc:MeOH=0:10(분획구 9)을 이용하여 순차적으

로 분리하였다. Silica gel chromatography에서 분리된 분획 중 생물 방오능 검증 후 방오 활성이 있는 분획구를 HPLC (Agilent 1200series; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 분리하였다. 컬럼은 $\mu\text{bondapak C8 reversed-phase column}$ (Phenomenex, 10×250 mm, 10 μm)을 사용하고 acetonitrile과 water (HPLC grade)을 이동상으로 이용하여, isocratic acetonitrile:water (25 : 75)와 acetonitrile:water (28 : 72)로 60분 동안, 220 nm 파장에서 유속 2 mL/min 으로 분리하였다.

구조분석

분리된 물질은 GC-MS-QP5050A (Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 분석하였으며, FID 검출기에 모세관 컬럼(30 m×0.32 mm ID, 0.25 μm film)을 사용하였다. 250℃에서 35분간 유지한 후, 5℃/min으로 300℃까지 온도를 상승시킨 다음 10분간 유지 시켰다. 헬륨을 이동상으로 하여 사용하였으며 분당 1 mL/min 유속으로, split ratio는 50:1 이었다. 분자량은 ESI-IT-TOFMS (Shimadzu, Kyoto, Japan)에서 검출하였고, NMR(^1H 와 ^{13}C)은 JMN-ECP 600 NMR spectrometer (JEOL, Tokyo, Japan)을 이용하였고 용매는 methanol-*d* (CD_3OD)를 사용하였다. GC-MS를 통해 물질군을 확인하였고 NMR data와 문헌을 통해 그 구조를 규명하였다.

결과 및 고찰

해조류의 부착방지 물질을 분리하기 위해 *L. mucor*를 10 L 배양하여 1.6 g의 추출물을 얻었다. 추출물을 silica-gel chromatography에서 분리한 결과, 9개의 분획구를 얻었고 그 중 부착방지 활성을 나타내는 4개의 분획구를 확인하였다. 분획구 2에서 분획물 140 mg, 부착방지효능은 73%, 분획구 3은 190 mg을 얻었고 분획구 중 가장 좋은 효능인 43%를 나타냈다. 분획구 4는 170 mg을 얻었고 56%의 부착방지 효능을 나타냈다. 분획구 6은 가장 많은 양인 240 mg을 얻었지만 효능은 86%로 낮게 나타났다. 이 중 가장 높은 부착방지 효능을 보이는 분획구 3과 4를 각각 HPLC로 분리하였다. 분획구 3을 용매 acetonitrile:water (25:75)로 2 mL/min의 조건으로 분리한 결과 4개의 main peak를 나타내었으며 부착방지 효능을 보이는 물질 (1)은 40분에 나타났고 물질의 양은 3.6 mg이었다. 분획구 4는 용매 acetonitrile:water (28:72)로 분리하였으므로 부착방지 효능을 보이는 물질 (2)는 35분에 나타났고 물질의 양은 2.8 mg이었다.

L. mucor 배양액의 분획구 3에서 분리된 물질 (1)과 분획구 4에서 분리된 물질 (2)는 GC-MS data 분석을 통해 각각 steroid 성 물질과 지방산 계열 물질로 확인되었다. 물질 (1)은 EIMS 분석결과 분자량이 414로 나타났으며 NMR (^1H , ^{13}C)과 MS를 통해 분자식은 $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_3$ 으로 확인되었다. ^{13}C -NMR을 통해

27개의 carbon이 확인 되었고 4개의 methyl carbon과 9개의 methylene carbon, 10개의 methine carbon과 4개의 quaternary carbon을 나타냈다. 4개의 quaternary carbon 중 197.6 ppm은 ketone을 나타낸다. $^1\text{H-NMR}$ 에서는 $^{13}\text{C-NMR}$ 에 상보되는 4개의 methyl proton과 9개의 methylene proton, 10개의 methine proton을 나타냈으며 분자량을 통해 2개의 hydroxyl proton을 확인하였다. 물질 (1)의 NMR data 분석결과 steroid 유도체 물질로 확인되었으며 Chao et al. (2008)가 보고한 문헌의 자료와 비교한 결과 Giffinisterone B로 확인되었다. 물질 (2)는 EIMS 분석결과 분자량은 281로 나타났으며 NMR(^1H , ^{13}C)과 MS를 확인한 결과 분자식은 $\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{NO}$ 였다. $^{13}\text{C-NMR}$ 을 통해 18개의 carbon이 확인 되었고 1개의 methyl carbon과 14개의 methylene carbon, 2개의 methine carbon과 1개의 quaternary carbon을 나타냈다. Quaternary carbon의 168.3 ppm은 ketone을 나타낸다. $^1\text{H-NMR}$ 에서는 $^{13}\text{C-NMR}$ 에 상보되는 1개의 methyl proton과 14개의 methylene proton, 2개의 methine proton을 나타냈으며 분자량을 통해 1개의 NH proton을 확인하였다. 물질 (2)의 NMR data를 분석한 결과 amide를 포함한 fatty acid로 확인되었고 Myllymäki (2009)의 자료와 비교한 결과 9-octadeceneamide인 oleamide로 확인되었다 (Fig 1, Table 1).

포자부착 방지 효능 검증에서 giffinisterone B는 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 46.3%의 부착방지 효능을 보이며 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 100%의 효능을 보였다. Oleamide의 경우 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서 100%의 부착방지 효능을 보여 giffinisterone B 보다는 강한 효능을 나타내었다(Fig 2-a). 포자 발아 억제 효능 검증에서는 giffinisterone B는 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 50%의 발아억제 효능을 보이며 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 100%의 효능을 보이고 oleamide의 경우에도 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 100%의 발아억제 효능을 나타내었다(Fig. 2-b).

Oleamide는 지방산 amide로 대추나무 *Zizyphus jujuba*에서 분리되어 보고되었고(Heo et al. 2003) 동물실험에서 수면이 부족한 mouse의 뇌척수액 분비를 증대시키는 신경약물학적 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(Akanmu et al. 2007). 지방산 계열의 방오물질로는 해양세균 *Shewanella oneidensis*에서 분리한 hydroxymyristic acid가 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 파래포자의 부착을 억제하는 것으로(review-53) 보고되었지만 지방산 amide는 보고된 바 없으며 본 연구에서 처음으로 방오효능을 검증하였다. Giffinisterone B는 steroid성 물질로 대부분의 steroid성 물질은 무척추동물에서 분리되었다(Lafont and Mathieu, 2007). 현재까지 보고된 대표적인 예로는 절지동물에서 분리된 ecdysteroids, 거머리에서 분리된 cholesta-4,7-diene-3B,6,15-triol (Zipser et al. 1998), 산호에서 분리된 polyhydroxy-steroid (Yoshikawa et al. 2000), 해조류 깃꼴서실 (*Laurencia pinnata*)에서 분리된 pinnasterol (Fukuzawa et al., 1981) 등을 들 수 있다. 특히 본 연구에서 분리된 giffinisterone

Table 1. ^{13}C , ^1H -nuclear magnetic resonance (NMR) spectral data for giffinisterone B and oleamide

Position	Giffinisterone B		Oleamide	
	δC	δH	δC	δH
1	154.3	5.98 (CH, d)	168.3 (qC)	
2	131.2	5.61 (CH, d)	42.1	2.34 (CH_2)
3	197.6 (qC)		26.1	1.58 (CH_2)
4	40.3	3.21, 2.94 (CH_2 , t)	22.8	1.32 (CH_2)
5	42.6	1.72 (CH)	22.6	1.32 (CH_2)
6	26.9	1.36 (CH_2)	22.5	1.32 (CH_2)
7	25.4	1.35 (CH_2)	22.6	1.33 (CH_2)
8	37.1	1.49 (CH)	22.4	1.26 (CH_2)
9	52.3	1.52 (CH)	131.4	5.62 (CH)
10	50.1 (qC)		131.4	5.62 (CH)
11	22.6	1.34 (CH_2)	28.2	2.01 (CH_2)
12	30.6	1.36 (CH_2)	31.4	1.44 (CH_2)
13	52.6 (qC)		29.1	1.32 (CH_2)
14	52.4	1.41 (CH)	29.1	1.32 (CH_2)
15	22.8	1.36 (CH_2)	23.4	1.32 (CH_2)
16	33.1	1.64 (CH_2)	31.4	1.32 (CH_2)
17	86.1 (qC)		29.1	1.29 (CH_2)
18	16.7	1.72 (CH_3)	15.6	0.98 (CH_3)
19	19.4	1.29 (CH_3)		
20	48.3	2.46 (CH, m)		
21	60.7	3.45 (CH_2 , t)		
22	132.7	5.52 (CH)		
23	126.8	5.51 (CH)		
24	44.2	2.01 (CH_2)		
25	32.1	1.94 (CH)		
26	24.6	0.97 (CH_3 , d)		
27	24.6	0.97 (CH_3 , d)		

B는 Chao et al. (2008)가 octocoral *Dendronephythya giffini*에서 분리하여 항염증 효능을 보고한바 있지만 방오효능은 본 연구에서 처음 검증하였다. Steroid 계열의 방오물질로는 산호 *Isis minorgrachyblasta*에서 분리된 gorgosterol (Qi et al., 2010), 해면 *Acanthella cavernosa*에서 분리한 A-nor steroids (Qui et al., 2008) 등을 들 수 있으며 이 물질들은 파개비를 대상으로 한 실험에서 8-200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 부착방지 효능을 나타낸다. 이번 연구에서 분리된 giffinisterone B는 기존에 알려진 방오성 스테로이드의 구조와 비교하였을 때 side chain과 hydroxyl group의 위치 및 개수에 있어 차이를 나타내었다. 지방질 물질은 세포벽에 부착하여 세포벽을 용해시키는 기능을 갖고 있어(Chot et al., 2011) 본 연구에서 분리된 두 물질은

Fig. 1. Structure of antifouling compounds isolated from *Leucothrix mucor* culture (1); Giffinisterone B, (2); Oleamide.

Fig. 2. Antifouling effect of compounds isolated from *L. mucor* extract on *U. pertusa* spore settlement (a) and germling development (b). Data represent mean±SD from three independent assays.

부착성 생물의 세포벽의 항상성 변화와 물질의 생합성에 영향을 주어, 부착 방지 및 발아 억제 효과를 나타내는 것으로 생각된다.

본 연구 결과를 토대로 oleamide와 giffinisterone B를 이용하여 양식 시설의 해수 유통을 저해하는 해조류 부착을 방지할 수 있는 새로운 방법이 제시될 수 있을 것으로 여겨진다. 무척추 동물에서 다양한 유용 해양천연물이 분리되고 있으나 후속 연구를 통하여 이들 물질의 생합성 기원이 무척추동물에 공생하는 미생물인 것으로 밝혀지고 있으므로(Haygood et al., 1999) 본 연구에서 분리된 물질 oleamide와 giffinisterone B 물질의 대량 생산을 위해서는 생합성 기원에 관한 면밀한 연구도 또 다른 흥미 있는 과제가 될 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 순천향대학교 학술연구비 지원으로 수행하였음(과제번호 20080154).

참고문헌

- Ahlgren MO. 1998. Consumption and assimilation of salmon net pen fouling debris by the Red Sea cucumber *Parastichopus clifornicus*: implications for polyculture. *J World Aquac Soc* 29, 133-139.
- Akanmu MA, Adeosun SO and Ilesanmi OR. 2007. Neuropharmacological effects of oleamide in male and female mice. *Behavioural Brain Research* 182, 88-94.
- Beveridge M. 2004. Cage Aquaculture. In: Problems. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, U.K., 251-255
- Bhattarai HD, Ganti VS, Paudel B, Lee YK, Lee HK, Hong YK and Shin HW. 2007. Isolation of antifouling compounds from the marine bacterium, *Shewanella oneidensis* SCH0402, *World J Microbiol Biotechnol* 23, 243-249.
- Brock TD. 1966. The habitat of *Leucothrix mucor*, a widespread marine organism. *Limnol. Oceanogr* 11, 303-307.
- Callow ME and Edyvean RGV. 1990. Algal fouling and corrosion. In: Introduction to applied phycology. Akatsuka I, ed. SPB Academic Publishing, Netherlands, 367-387
- Chao CH, Wen ZH, Chen IM, Su JH, Huang HC, Chiang MY and Sheu JH. 2008. Anti-inflammatory steroids from the octocoral *Dendronephthya griffin*. *Tetrahedron* 64, 3554-3560
- Cho JY, Kwon EH, Choi JS, Hong SY, Shin HW and Hong YK. 2001. Antifouling activity of seaweed extracts on the green alga *Enteromorpha prolifera* and the mussel *Mytilus edulis*, *J App Phycol* 13, 117-125.
- Choi I, Yang YI, Song HD, Lee JS, Kang T, Sung J-J and Yi J. 2011. Lipid molecules induce the cytotoxic aggregation of Cu/Zn superoxide dismutase with structurally disordered regions. *Bioch Bioph Acta* 1812, 41-48.
- Dafforn KA, Lewis JA and Johnston EL. 2011. Antifouling strategies: History and regulation, ecological impacts and

- mitigation. Marine Pollution Bulletin 62, 453-465
- Eckman CJE, Thistle D, Burnett WC, Pattersin GLJ, Robertson CY and Lambshead PJD. 2001. Performance of cages as large animal-exclusion devices in the deep sea. J Mar Res 59, 79-95.
- Enright C. 1993. Control of fouling in bivalve aquaculture. World Aquac 24, 44-46.
- Fernández-Alba AR, Hernando MD, Piedra L and Chisti Y. 2002. Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides measured with acute toxicity bioassays. Anal Chim Acta. 456, 303-312.
- Folke C, Kautsky N and Troell M. 1994. The costs of Eutrophication from salmon farming-implications for policy. J Environ Manag 40, 173-182.
- Fukuzawa A, Kumagai Y, Masamune T, Furusaki A, Katayama C and Matsumoto T. 1981. Acetylpinasterol and pinasterol, ecdysone-like metabolites from the marine red alga *Laurencia pinnata* Yamada. Tetrahedron Lett 22, 4085-4086.
- Harold R, and Stanier RY. 1955. The genera *Leucothrix* and *Thiothrix*. Bacteriol Rev 19, 49-58.
- Haygood MG, Schmidt EW, Davidson SK and Faulkner DJ. 1999. Microbial symbionts of marine invertebrates: opportunities for microbial biotechnology. J Molec Microbiol. Biotechnol 1, 33-43.
- Heo HJ, Park YJ, Suh YM and Choi SJ. 2003. Effects of Oleamide on cholineacetyl transferase and cognitive activities. Biosci Biotechnol Biochem 67, 1284-1291
- Lafont R and Mathieu M. 2007. Steroids in aquatic invertebrates. Ecotoxicology 16, 109-130.
- Myllymäki MJ. 2009. Synthesis of 3-heterocycle phenyl N-alkyl carbamates and their activity as FAAH inhibitors. Ph. D. Thesis, University of Technology, Helsinki, Finland
- Park SW, Lee JH and Park SW. 2009. Seaweed Disease. In: Disease of Laver. Bioscience Ltd, Seoul, Korea. 30-31.
- Qi SH, Miao L, Gao CH, Xu Y, Zhang S and Qian PY. 2010. New steroids and a new alkaloid from the gorgonian *Isis minorbrachyblasta*: structures, cytotoxicity, and antilarval activity. Helv Chim Acta 93, 511-516.
- Qiu Y, Deng ZW, Xu M, Li Q and Lin WH. 2008. New A-nor steroids and their antifouling activity from the Chinese marine sponge *Acanthella cavernosa*. Steroids 73, 1500-1504.
- Voulvoulis N. 2006. Antifouling paint booster biocides: occurrence and partitioning in water and sediments. Env Chem 5, 155-170.
- Voulvoulis N, Scrimshaw MD and Lester JN. 2000. Occurrence of four biocides utilized in antifouling paints, as alternatives to organotin compounds, in waters and sediments of a commercial estuary in the UK. Marine Pollution Bulletin 40, 938-946.
- Voulvoulis N, Scrimshaw MD and Lester JN. 1999. Alternative antifouling biocides. Appl. Organometal Chem 13, 135-143.
- Yamada H. 2007. Behaviour, occurrence, and aquatic toxicity of new antifouling biocides and preliminary assessment of risk to aquatic ecosystems. Bull Fish Res Agen 21, 31-45.
- Yoshikawa K, Kanekuni S, Hanahusa M, Arihara S and Ohta T. 2000. Polyhydroxylated sterols from the octocoral *Dendronephthya gigantea*. J Nat Prod 63, 670-672.
- Zipser B, Bradford JJ and Hollingsworth RI. 1998. Cholesterol and its derivatives, are the principal steroids isolated from the leech species *Hirudo medicinalis*. Comp Biochem Physiol C 120, 269-282.

2011년 12월 23일 접수
 2012년 1월 6일 수정
 2012년 2월 3일 수리