



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



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

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#)

2023년 8월

석사학위 논문

CyanoHABs 제어를 위한
1,4-naphthoquinone 유도체 합성 및
구조-활성 상관관계 분석

조선대학교 대학원

화학공학과

김 경 은

CyanoHABs 제어를 위한 1,4-naphthoquinone 유도체 합성 및 구조-활성 상관관계 분석

Synthesis and structure-activity relationship(SAR) analysis of
1,4-naphthoquinone derivatives as algicides against cyanobacterial
harmful algal blooms

2023년 8월 25일

조선대학교 대학원

화학공학과

김 경 은

CyanoHABs 제어를 위한
1,4-naphthoquinone 유도체 합성 및
구조-활성 상관관계 분석

지도교수 조 훈

이 논문을 공학석사학위 신청 논문으로 제출함

2023년 4월

조선대학교 대학원

화학공학과

김 경 은

김경은의 석사학위논문을 인준함

위원장	조선대학교	교수	<u>김 준 섭</u> (인)
위 원	조선대학교	교수	<u>안 성 훈</u> (인)
위 원	조선대학교	교수	<u>조 훈</u> (인)

2023년 5월

조선대학교 대학원

Table of Contents

List of Tables	III
List of Figures	IV
Abstract	VI
1. Introduction	1
1.1. 연구의 배경	1
1.2. Harmful Algal Bloom (HABs) and Cyanobacterial Bloom	3
1.3. Cyanobacteria toxin	7
1.4. 연구 동향 및 연구 방향	13
2. Experimental procedures	15
2.1. Reagents and analysis apparatuses	15
2.2. 시험종 및 배양조건	15
2.2.1. 조류 (Algae)	15
2.2.2. 물벼룩 (<i>Daphnia magna</i>)	18
2.2.2. 제브라피쉬 (Zebrafish : <i>Danio rerio</i>)	21
2.3. <i>Microcystis aeruginosa</i> 활성측정	22
2.4. 선택적인 살조활성 측정	24
2.5. Naphthoquinone compounds 시간별 활성측정	25
2.6. Chlorophyll-a 측정	26
2.7. 세포관찰	27
2.7.1. 광학현미경을 통한 세포분포 관찰	27
2.7.2. SEM (Scanning Electron Microscope)	28

2.8. 물벼룩 급성 독성 시험	29
2.9. 제브라피쉬 급성 독성 시험	30
2.10. Naphthoquinone 유도체 합성	31
2.10.1. Synthesis of compounds 1-16, 31-36, 47-53	31
2.10.2. Synthesis of compounds 17-30	33
2.10.3. Synthesis of compounds 37-46	34
3. Results and discussion	35
3.1. <i>Microcystis aeruginosa</i> 활성	35
3.2. 선택적 살조활성	44
3.3. 시간별 살조활성 변화	45
3.3.1. Cell counting	45
3.3.2. Microplate reader	49
3.4. Chlorophyll 측정	51
3.5. 세포관찰	52
3.5.1. 광학현미경 (LM) 세포분포 관찰	52
3.5.2. 주사전자현미경 (SEM) 세포 형태 변화 관찰	58
3.6. 물벼룩 (<i>Daphnia magna</i>) 급성 독성평가	63
3.7. 제브라피쉬 (<i>Danio rerio</i>) 급성 독성평가	65
4. Conclusion	67
¹H NMR Spectra	80
[Reference]	108

List of Tables

Table. 1. Algae related to the green tide	5
Table. 2. Guideline values for cyanotoxins relevant to human health	7
Table. 3. Abbreviations for microcystin	10
Table. 4. Harmful Algae incubation condition	16
Table. 5. Freshwater algae blue-green medium	16
Table. 6. Freshwater algae blue-green medium	17
Table. 7. <i>Daphnia magna</i> incubation condition	18
Table. 8. Combined stock solution	19
Table. 9. M4 culture medium stock solution	20
Table. 10. <i>Danio rerio</i> incubation condition	21
Table. 11. Typical type of algae	24
Table. 12. An alkyl group of compounds 1-16	32
Table. 13. An alkyl pyridine group of compounds 31-36	32
Table. 14. An alkoxy alkyl group of compounds 47-53	32
Table. 15. An aniline group of compounds 17-30	33
Table. 16. An alkyl group of compounds 37-46	34
Table. 17. Algicidal activity comparison of compounds 1~16 against harmful cyanobacteria	36
Table. 18. Algicidal activity comparison of compounds 17~20 against harmful cyanobacteria	38
Table. 19. Algicidal activity comparison of compounds 21~30 against harmful cyanobacteria	39
Table. 20. Algicidal activity comparison of compounds 31~36 against harmful cyanobacteria	41
Table. 21. Algicidal activity comparison of compounds 37~46 against harmful cyanobacteria	42
Table. 22. Algicidal activity comparison of compounds 47~53 against harmful cyanobacteria	43
Table. 23. Algicidal activity comparison for microcystis aeruginosa, Anabaena Sp. Selenastrum gracile, Chlorella vulgaris	44
Table. 24. <i>Daphnia magna</i> EC ₅₀ values for lead compound	63
Table. 25. <i>Danio rerio</i> (Zebrafish) EC ₅₀ values for lead compound	65

List of Figure

Figure. 1. Aqueduct water risk Atlas of the World resources institute(WRI)	1
Figure. 2. Lake Erie photographed by NASA	2
Figure. 3. Various causes of male bacteria bloom	3
Figure. 4. Microalgal and cyanobacteria classification	4
Figure. 5. Microcystis form	5
Figure. 6. Annual cycle of microcystis	6
Figure. 7. Cyanobacteria toxin structure and gene cluster	9
Figure. 8. Structure microcystin.	10
Figure. 9. Bonding between protein phosphatase and microcystin	12
Figure. 10. Microcystis toxicity mechanism	12
Figure. 11. Chemical structure of quinone	14
Figure. 12. Chemical structure of vitamin K1 and K2	14
Figure. 13. <i>Microcystis aeruginosa</i> cell count and algicidal activity of lead compound over time.	45
Figure. 14. <i>Anabaena</i> Sp. cell count and algicidal activity of lead compound over time. ..	46
Figure. 15. <i>Selena Strum</i> cell count and algicidal activity of lead compound over time.	47
Figure. 16. <i>Chlorella Vulgaris</i> cell count and algicidal activity of lead compound over time.	47
Figure. 17. <i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>Anabaena</i> Sp., <i>Selena Strum Gracile</i> and <i>Chlorella Vulgaris</i> absorbance of lead compound over time.	49
Figure. 18. <i>Microcystis aeruginosa</i> chlorophyll of lead compound over time.	51
Figure. 19. Timely cell distribution of control	52
Figure. 20. Changes in algicidal activity in compound 11 over time. distribution of <i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>Anabaena</i> Sp., <i>Selena Strum Gracile</i> , <i>Chlorella Vulgaris</i>	53
Figure. 21. Changes in algicidal activity in compound 31 over time. distribution of <i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>Anabaena</i> Sp., <i>Selena Strum Gracile</i> , <i>Chlorella Vulgaris</i>	54
Figure. 22. Changes in algicidal activity in compound 37 over time. distribution of <i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>Anabaena</i> Sp., <i>Selena Strum Gracile</i> , <i>Chlorella Vulgaris</i>	55

Figure. 23. Changes in algicidal activity in compound 47 over time. distribution of *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena* Sp., *Selena Strum Gracile*, *Chlorella Vulgaris*. 56
Figure. 24. SEM (Scanning Electron Microscope) image of *Microcystis aeruginosa* at 120 h after the treatment with compound 47 at concentration of 2 μ M 58
Figure. 25. SEM (Scanning Electron Microscope) image of *Anabaena* Sp. at 120 h after the treatment with compound 47 at concentration of 2 μ M 59
Figure. 26. SEM (Scanning Electron Microscope) image of *Selena strum* at 120 h after the treatment with compound 47 at concentration of 2 μ M 60
Figure. 27. SEM (Scanning Electron Microscope) image of *Chlorella Vulgaris* at 120 h after the treatment with compound 47 at concentration of 2 μ M 61
Figure. 28. *Daphnia magna* EC₅ graph of lead compounds. 64
Figure. 29. *Danio rerio* Survival rate of Compound 11 65
Figure. 30. *Danio rerio* Survival rate of Compound 37 66
Figure. 31. *Danio rerio* Survival rate of Compound 47, 48 66

ABSTRACT

Synthesis and structure-activity relationship(SAR) analysis of 1,4-naphthoquinone derivatives as algicides against cyanobacterial harmful algal blooms

Kyung eun Kim

Advisor : Prof. Cho Hoon, Ph. D.

Department of Chemical Engineering

Graduate School of Chosun University

Harmful Algal Blooms (HABs) are a phenomenon that occurs when certain types of algae become dominant, resulting in greenish water and the formation of "dead zones" due to the emission of a foul odor and a decrease in dissolved oxygen. HABs can cause damage to aquatic life and ecosystems, and also have economic and ecological impacts, affecting the availability of agricultural and drinking water. The causes of HABs are known to be rapid climate change caused by global warming, excessive organic matter inflow, and the construction of reservoirs and dams for water resources, which have led to annual range expansion and increased frequency. CyanoHABs occurring in eutrophic freshwater worldwide secrete a toxin, microcystin-LR, which inhibits PP1 protein (IC_{50} 1.7 nM) and PP2A protein (IC_{50} 40 pM) at low concentrations. This leads to toxic effects on the liver and nervous system, and may cause liver cancer and neurological diseases. The development of effective technologies to control HABs is needed, as the known technologies have limitations in terms of target range, efficiency, and economic feasibility.

In this study, an organic algicide that can selectively control HABs using eco-friendly material, a derivative of vitamin K, was developed. 53 compounds were synthesized based on the core structure of vitamin K, 1,4-Naphthoquinone derivatives, and structure-activity

relationships were analyzed. The algicidal activity and selectivity for two harmful cyanobacteria species (*Microcystis aeruginosa*, *Anabaena* Sp.) and two harmless green algae species (*Selenastrum Gracile*, *Chlorella Vulgaris*) were evaluated, resulting in the identification of lead compounds (compounds 11, 13, 31, 33, 37, 38, 47, 48) with LC_{50} values of 1M or less. For the highly active compounds, acute toxicity experiments were conducted using *Daphnia magna* and Zebrafish (*Danio rerio*), and low toxicity compounds 47 and 48 were finally selected. In addition, morphological analysis using an electron microscope was conducted to examine the interaction between the compounds and cyanobacteria. Although the mechanism could not be determined, based on the cellular condition, it was observed that the compounds were associated with cell membrane disruption.

1. Introduction

1.1. 연구의 배경

UN에서는 세계 물 보고서를 통해 우리나라를 물 스트레스 국가로 분류하고 있으며, 세계자원연구소(World resources institute, WRI)에서는 ‘물 자원 리스크지도(Aqueduct Water Risk Atlas)’ 를 통해 한국은 Water Stress 등급이 medium-high 수준이라고 공개하였다. (Fig. 1) 유엔 환경계획(UNEP)에서 전 세계 인구 중 3억 2천 300만 명이 오염된 식수를 마시며 해마다 340만 명이 수인성 질병으로 숨진다고 밝혀 물 부족 사태와 함께 수질 개선 및 안전하고 지속 가능한 식수공급에 대한 필요성이 증대되고 있다.

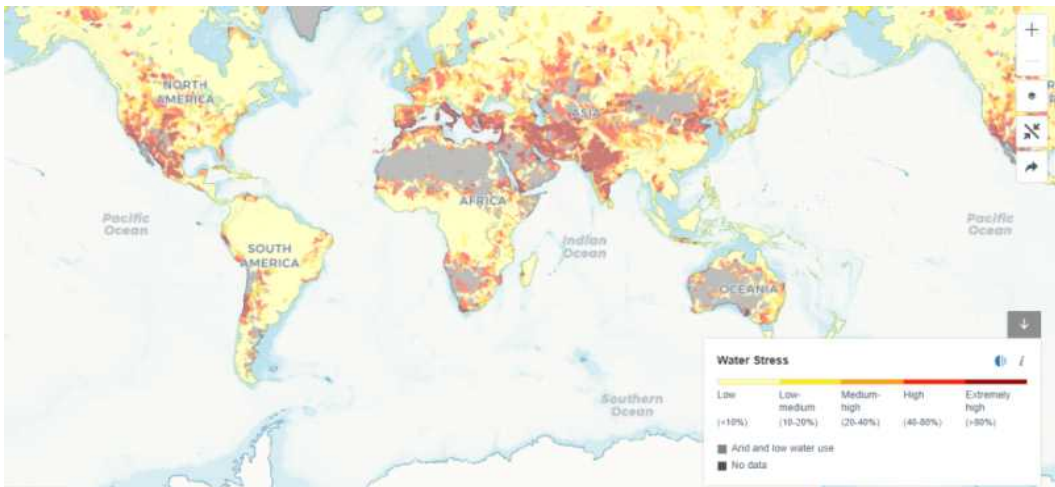


Figure. 1 Aqueduct Water Risk Atlas of the World Resources Institute(WRI). Water stress occurs when demand for water exceeds capacity or is limited in use due to poor quality over a period of time, and causes deterioration of freshwater resources in terms of quantity (over-exploitation of aquifer, dry Rivers, etc). In Korea, the water stress index is classified as a water stress country between Medium High(20~40%) and High(40~ 80%).

전 세계적으로 지구온난화로 인한 수생 생태계가 변화됨에 따라 댐 및 저수지와 같은 담수에서 식물성 플랑크톤이 급속도로 성장하는 조류대발생(Algal bloom)이 나타나 식수를 포함하여 수자원확보에 치명적인 문제점이 발생하고 있다[1-3]. 33개국에 위치한 71개 대형 호수의 68%는 30년간 녹조의 증가를 일으키고 있으며, 2015년 세계 담수의 5분의 1을 포함하는 미국의 Lake Erie의 경우 200km로 이루어진 기록적인 Harmful algal bloom(HABs)띠를 이루었다[4]. 우리나라도 마찬가지로 가뭄 현상이 나타나면서 해마다 녹조 발생 일수와 발생량이 급증하고 있다[5].

Harmful Algal Bloom(HABs)으로 인해 미국에서는 대략 매년 40억 달러 이상의 손실을 겪고 있고, 일본은 물고기 떼죽음을 통해서 매년 수천만 달러의 비용이 소모되고 있다. 2015년 EPA 보고서에 의하면 단 한 번의 Algae bloom은 경제적인 큰 손실을 가져오며 Ohio 주에 있는 호수(2009-2010)의 녹조 발생은 4,700달러의 손실을 가져왔다 [6].



Figure. 2. Lake Erie photographed by NASA. (a) 2011 worst algae bloom in decades, Lake Erie. (b) The Maximum extent of the bloom on 6 September 2015 shown as a true color image. The bloom was less concentrated at this time than in August.

1.2. Harmful Algal Bloom(HABs) and Cyanobacterial Bloom

Algae(조류)는 엽록소를 가진 물속 식물로 광합성 작용을 하며 algae의 군체가 통제할 수 없을 정도로 자라는 것을 Harmful algal bloom(HABs)라고 한다. 일반적으로 algae에 의한 bloom과 cyanobacteria(남세균) bloom을 포함하여 녹조현상이라고 부른다[7].

유해 조류에 의한 HABs의 경우 보통 따뜻한 여름이나 초가을에 높은 수온, 햇빛, 과도한 유기물 유입, 순환되지 않고 느린 유속을 가진 물, 질소, 인 등의 영양성분농도 증가로 인한 부영양화에 의해 발생한다[8,9]. HABs는 악취뿐만 아니라 밀폐된 공간에서 algal bloom 상태의 cyanobacteria가 죽고 부패하는 상태에서 산소를 소모하면서 미생물 분해로 산소가 고갈되어 “Dead zones”을 형성하고[10,11], hypoxia 또는 anoxia 상태를 만들어 해양생물들에 산소결핍증, 어류의 사망을 초래한다. 이 경우 무독성 종에서도 저 산소증을 일으켜 물고기와 식물의 생존환경을 변화시키고, 빛의 투과가 감소하여 phytoplankton의 성장과 번식을 억제하는 결과를 가져온다[12-14].

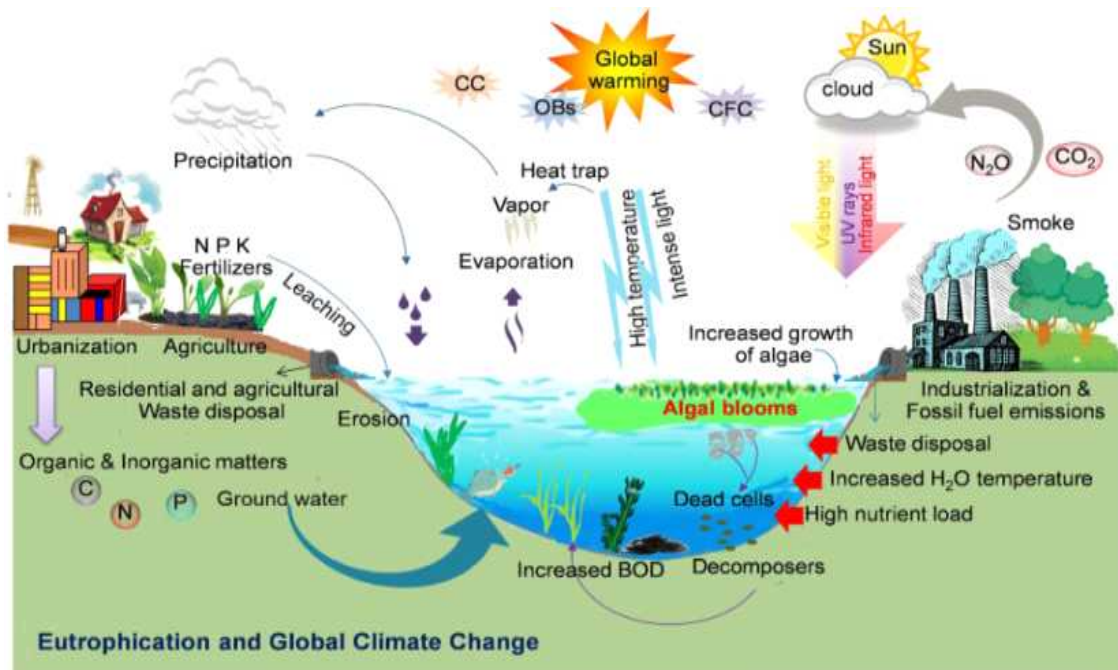


Figure 3. Various causes of male bacteria bloom. (Fig. R. P. Rastogi).

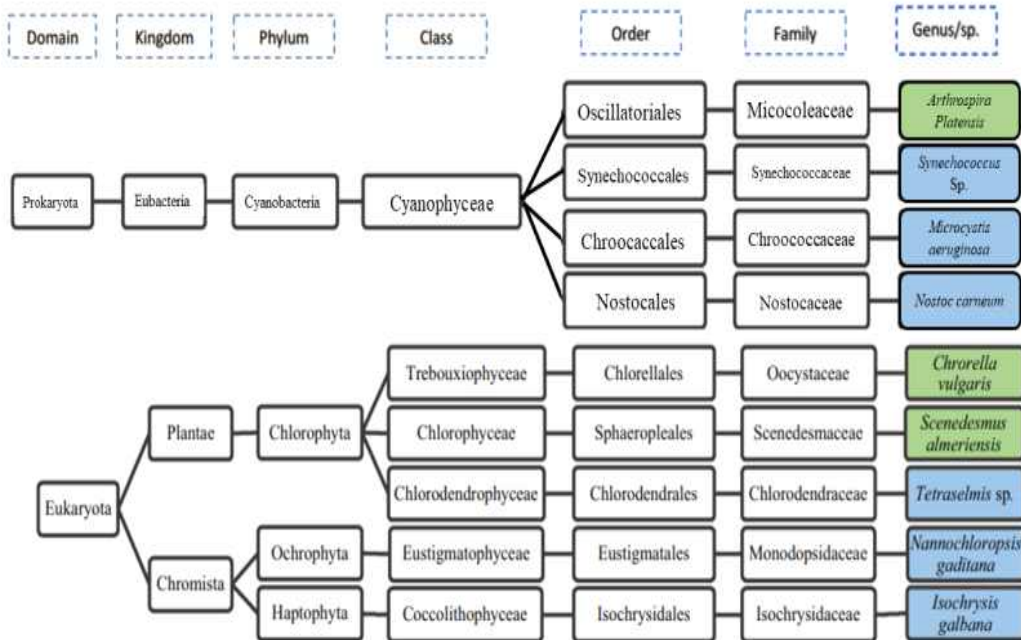


Figure 4. Microalgal and cyanobacteria classification. (Moran, L., et al. (2022))

microalgal와 cyanobacteria를 phylogenetic에 의해 분류한 것을 보면 이전에는 cyanobacteria를 Blue-green algae로 표현하였으나 현재는 prokaryota로 분류하고 있다(fig. 4)[15,16]. 대표적인 HABs의 원인은 chrophyta와 cyanobacteria에 의해 발생하며, Table 1.은 Green Tide와 연관된 Algae를 나타냈다. 겨울에서 봄 사이 서식하여 갈색빛을 띠는 규조류(diatom)와 봄 ~ 초여름에 열린 녹색을 띠는 녹조류(Chlorophyta), 여름에 진한 녹색을 띠는 남조류(Cyanobacteria)의 종류이다[17,18].

이 중 M. Aeruginosa(Fig 5.)의 경우 taxonomic rank로 Chroococcales 목에 속하는 전세계적으로 부영양화된 담수에서 가장 흔한 독성 cyanobacteria의 일종이다. gas vesicles를 가진 구형의 부유성 군체로 수온과 pH에 대한 적응력이 높으며 영양분이 부족한 시기에도 생육을 유지할 수 있어 여름에 부영양화된 수계에 쉽게 수화를 일으키는 종이다[19].

Cyanobacteria	Chlorophyta	Diatoms
<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>M.wesenbergii</i> <i>M.viridis</i> <i>M.ichithioblabe</i> <i>Anabaenamacrospora</i> <i>A.apiroides</i> <i>Aphanizomenon</i> Sp. <i>Oscillatoria</i> Sp. <i>Phormidium</i> Sp.	<i>Clostridium</i> Sp. <i>Chlamydomonas</i> Sp. <i>Scenedesmus</i> Sp.	<i>Fragilaria</i> Sp. <i>Melosira</i> Sp. <i>Synedra</i> Sp.

Table. 1. Algae Related to the Green tide

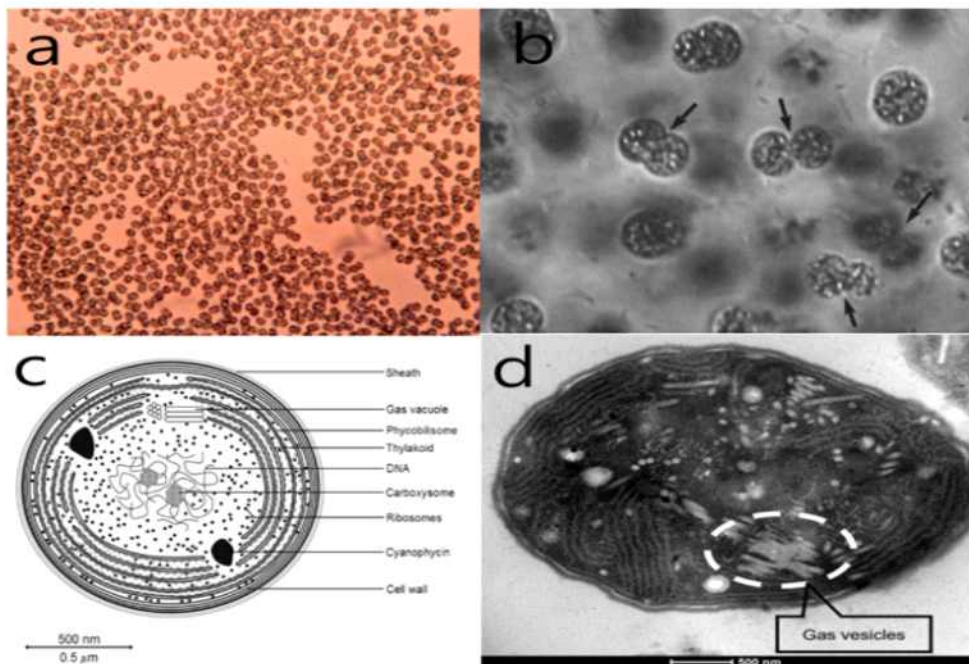


Figure 5. Microcystis form. (a) *Microcystis Aeruginosa*. (Vincent, W. (2009).) (b) Microcystis species at 640x magnification. (Tsukii, 2001) (c) TEM image of *Microcystis aeruginosa*, highlighting some of the gas vesicles. (d) Arrows indicate microscopic observation of benthic cells with an obvious cell wall constriction ($\times 600$).

Reynolds et al.(1981)에 제시된 microcystis의 life cycle에서는 가을에 수온의 감소와 태양 복사 에너지의 감소, 축적된 대사산물의 증가로 cyanobacteria 세포가 저수지 바닥으로 가라앉아 heterotrophy로 전환된 후, 다음 봄 동안 세포가 상류로 상승해 autotrophic 단계가 될 때까지 겨울 간 퇴적물에서 생활하여 heterotrophy와 autotrophic 두 가지의 식물단계가 교대되어 존재하는 것으로 밝혀졌다. 이후 Jan Šmarda(2009)가 Brno 저수지에서 채취된 microcystis의 초미세 구조적 변화를 관찰한 결과 봄과 가을에 각각 Pelagic, Benthic 형태로 전환되면서 aerotope의 부피가 변화하는 것이 확인되었다. 수온이 높고, 빛의 양이 증가하는 초여름에 microcystis 내부의 gas vesicles의 부피가 변화하게 되고 빠르게 세포분열을 하여 성장과 증식을 반복하면서 수화를 일으키게 된다 [20-22].

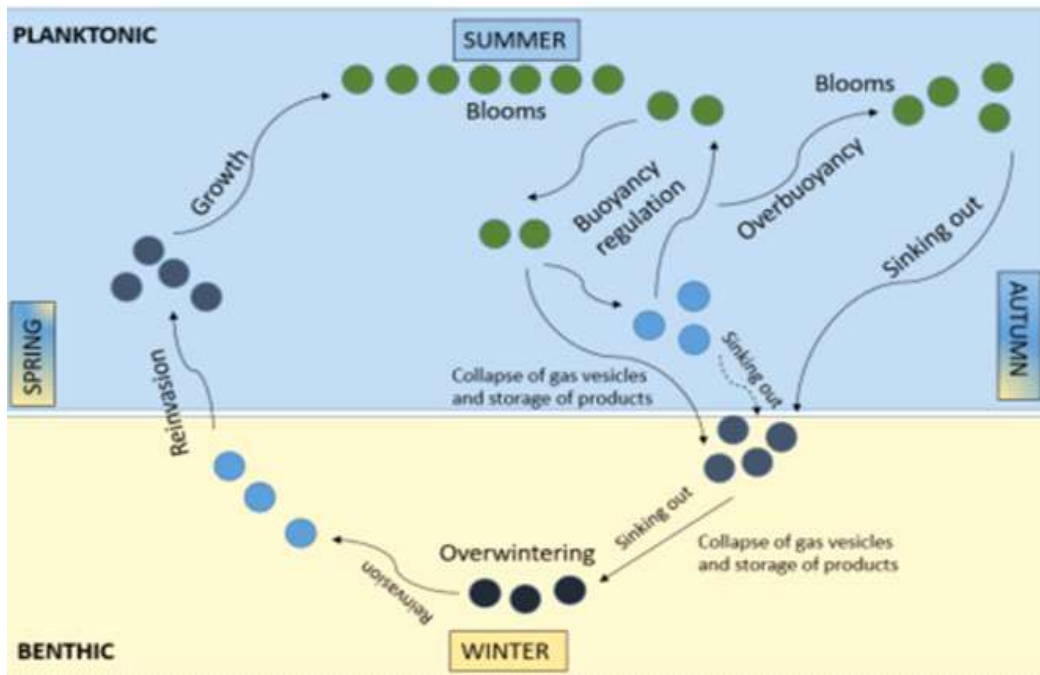


Figure 6. Annual cycle of microcystis(Hartnell, D. M. (2019))

1.3. Cyanobacteria toxin

Cyanobacteria는 HABs를 일으키는 주원인으로 알려져 있으며, cyanobacteria의 일부 종에서는 생태계에서 primary producers로 중요한 역할을 하지만 일부의 종에서는 microcystin, cylindrospermopsins, anatoxin-a, saxitoxins 과 같은 독성물질을 생산한다. toxin에 따라 간독소, 신경독소, 피부독소로 분류되며 각 toxin을 일으키는 cyanobacteria 의 종과 특징을 나타내었다[23,24]. (Table. 2)

Toxin	Mechanism of toxicity Act	value (WHO Guideline)	species	comments
Microcystins	Inhibit protein phosphatases ; predominantly on the liver	24 ug/L	Microcystis Planktothrix Anabaena Nostoc	The cyanotoxins most frequently found at hazardous concentrations. Numerous animal deaths. Occur largely cell bound, thus accumulating in scums; concentrations dissolved in water are usually low. Occur widely in fresh water and sometimes in brackish areas.
Nodularins	Inhibit protein phosphatases ; predominantly on the liver	no	Nodularia Nostoc	Like MCs, but occur predominantly in brackish water (Nodularia extensively in the Baltic Sea) and sometimes on surfaces.
CYNs	Cytotoxic; predominantly on the liver, kidneys, erythrocytes	6 ug/L	Raphidiopsis Anabaena Aphanizomenon Chrysochloris Oscillatoria Umezakia	Frequent in some regions. Concentrations of dissolved CYN are often as high as, or higher than, those of cell-bound CYNs and can persist for weeks even after the producing organism is no longer present. CYNs : Cylindrospermopsins

Anatoxin-a (ATXs)	Neurotoxic, preand post-synaptic depolarization	60 ug/L	Anabaena Aphanizomenon Raphidiopsis Oscillatoria Planktothrix Phormidium Tychonema Lyngbya	Scum ingestion has caused numerous deaths of dogs, livestock and waterfowl; animal deaths can also be due to ingestion of detached lumps of benthic cyanobacteria or submerged vegetation with attached cyanobacteria beached on shorelines.
Anatoxin-a (S)	Neurotoxic, inhibits acetylcholinesterase	no	Anabaena	Occurrence sparsely documented.
Saxitoxins (STXs)	Neurotoxic; block Na ⁺ channels in neuronal cells, and Ca ⁺⁺ , K ⁺ channels in cardiac cells	30 ug/L	Anabaena Planktothrix Aphanizomenon Raphidiopsis Lyngbya Oxynema	Animal deaths have been attributed to STX in planktonic freshwater cyanobacteria. Known from paralytic shellfish poisoning but also produced by some freshwater cyanobacteria. Freshwater mussels and crustaceans can contain STXs.

Table. 2. Guideline values for cyanotoxins relevant to human health. Cyclic heptapeptides with specific amino acid(ADDA), Alkaloids with tricyclic guanidino moiety and uracyl, amine alkaloid, alkaloids, Organophosphate

구조는 크게 cyclic peptides, alkaloids, lipopolysaccharides 3그룹으로 나눌 수 있다. 가장 일반적으로 발견되는 cyclic peptide는 간독소를 일으키는 것으로 알려져 있으며, alkaloids는 anatosin, saxitoxin, cylindrospermopsin 등 가장 많은 종류를 포함한다[25,26]. anatosin-a의 경우 fast death factor(FDFs)라고 하는 치명적인 속효성 신경독을 가지고 있으며, lipopolysaccharides group은 internal Acylatedglycolipid(lipid-A), core domain(an oligosaccharide), outer polysaccharide(O-antigen) chain 구조로 일반적으로 자극 및 알레르기 반응을 일으킨다[27].

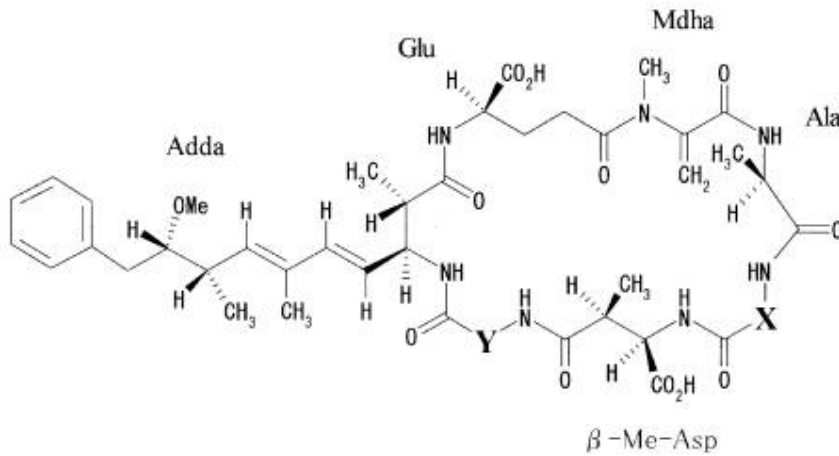


Figure 8. Structure microcystin. (Kondo et al., 1992)

Microcystin Congeners	Amino Acid in X	Amino Acid in Y
Microcystin-LR	Leucine	Arginine
Microcystin-RR	Arginine	Arginine
Microcystin-YR	Tyrosine	Arginine
Microcystin-LA	Leucine	Alanine
Microcystin-LY	Leucine	Tyrosine
Microcystin-LF	Leucine	Phenylalanine
Microcystin-LW	Leucine	Tryptophan

Table 3. Abbreviations form microcystins. Adda(3S-amino-9S-methoxy-2,6,8S,-trimethyl - 10-phenyldeca-4,6-dienoic acid), Mdha(methyldehydroalanine)

Cyanobacteria Toxin(Fig 7.) 중 cyclic peptide 구조는 HABs의 주원인인 microcystis 중

에서 나타나는 microcystin 유도체이며 독성학적으로 microcystin-LR(MC-LR)은 가장 치명적인 간독소로 알려져있어 심각한 문제를 가져온다. 미국 공공 보건학의 보고에 의하면 microcystin의 독성에 의한 건강을 위협하는 사례는 1998년 브라질에서는 microcystin 오염으로 인해 2,000건의 중증의 위장염과 88명의 사망자를 발생하였고, 2004년 Nebraska 주에서 3마리의 개가 녹조가 핀 호수의 물을 섭취한 직후 사망하였다.

Microcystin은 100여 종의 변이체가 발견되었으며(Table 3) 일반적인 구조는 cyclo-(D-Ala¹)-X²-(D-MeAsp³)-Z⁴-Adda⁵-(D-Glu⁶)-Mdha⁷, X 및 Z는 가변 L-아미노산이며 식별 문자는 단백질에서 아미노산 표준 단일 약어로 microcystin의 구조는 L-가변 아미노산 2개, 일반적인 D-아미노산 3개, adda(3S-amino-9S-methoxy-2,6,8S,-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid)와 mdha(methyldehydroalanine) 2개의 새로운 D-아미노산으로 이루어진 단환형 헵타펩타이드이로 X, Y 위치에 들어간 아미노산의 종류에 따라 구분된다(Fig. 8)[28,29].

Microcystin의 동물실험을 통한 생물학적 독성차이는 microcystin congeners(-LR, -LA, -LY, -RR)에서 복강 내 출혈량은 각각 36 ng/g-bw, 39 ng/g-bw, 91 ng/g-bw, 111 ng/g-bw의 50% 치사량(LD₅₀)로 소수성이 높은 L-아미노산의 독성이 강했고, microcystin-LR를 처리한 간 내부 관찰한 결과 심각한 간세포 분리와 괴사가 발생하였다[30-32].

이러한 macrocyclic 화합물의 일종인 microcystin-LR의 독성 메커니즘의 가장 유력한 경로는 체내단백질의 catalytic subunits과의 상호작용으로 serine/threonine protein PP1 및 PP2A와 같은 단백질 가수분해효소 (protein phosphatase(PPs))의 inhibitor로 작용을 하여 [33-35] micro filament의 재구성으로 인한 간세포 변형을 일으키는 것이다. 또한, *in vitro*, *in vivo*에서 ROS(Reactive oxygen species) 과생산과 glutathione 결핍으로 인해 oxidative stress 발생시켜 종양을 촉진하는 것도 hepatotoxin mechanism의 일종을 연구되고 있다[36-38]. PPs는 배아 발달, 대사 항상성, 스트레스 반응, 세포 주기 전환 및 많은 다른 필수 생물학적 메커니즘에 관여하여 필수적인 역할을 하며 PP2는 중요한 종양 억제제로 microcystin-LR에 의해 억제될 경우 세포 골격파괴, 종양 등을 일으키는 것으로 밝혀져 있다[39-40]. microcystin이 PP1 and PP2A를 억제하게 되면 발현조절제인 transcriptional trans-activator P53이 증가 되어 발암촉진되며 미토콘드리아에서 Bcl-2와 같은 anti apoptotic proteins가 생성돼 암세포의 사멸을 막게 된다[41-43].(fig. 10)

따라서 많은 나라에서 microcystin의 guideline value를 수질 환경기준을 포함하고 규제하고 있다. 식수에서 microcystin-LR 검출기준은 WHO 지침 값 1 µg/L이며 Australia에서는 1.3 µg/L Canada에서는 1.5 µg/L로 국가 상황에 따라 표준을 정하기도 하지만 1.0 ~ 1.5 µg/L 범위이다[44,45].

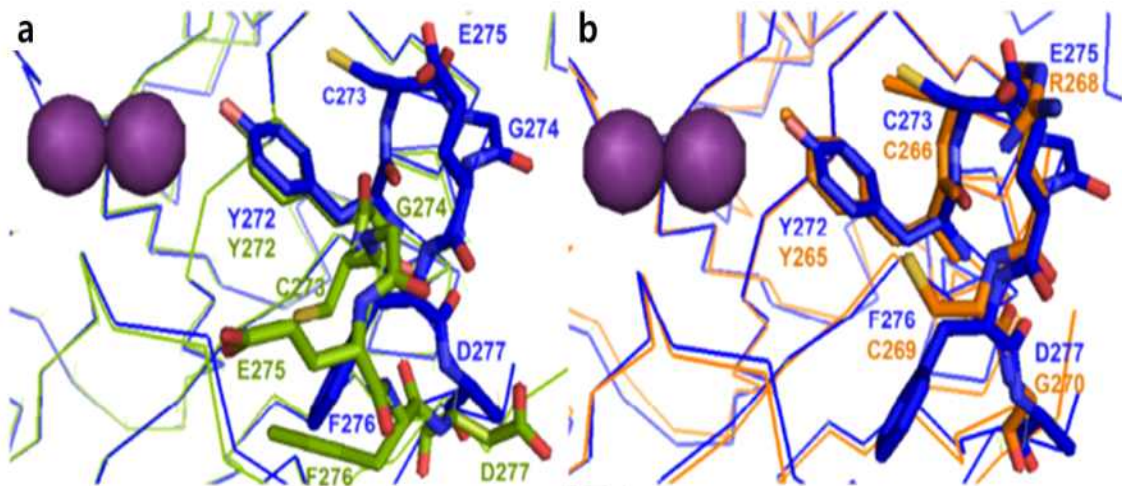


Figure 9. Bonding between protein phosphatase and microcystin(Fontanillo, M. and M. Köhn (2018)).

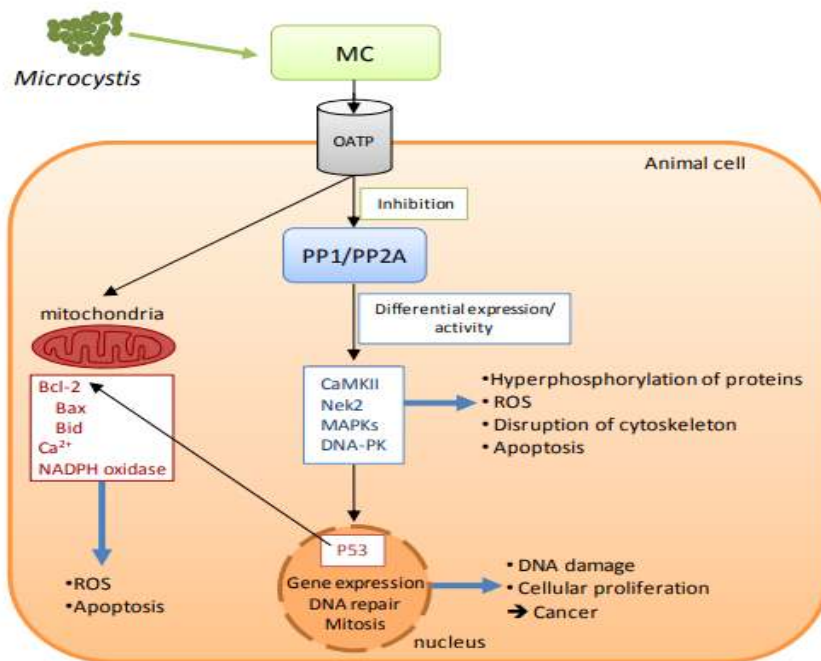


Figure 10. Microcystin toxicity mechanism. OATP(organic anion transporting polypeptide system)

1.4. 연구 동향 및 연구 방향

현재 급격한 HABs로 인해 모니터링과 살조제 개발 연구의 필요성이 강조되고 있다. IOC에서는 종 식별, 독성 테스트, 모니터링 및 관리를 통해 녹조의 원인 발견 및 발생 예측, 영향을 완화하는데 필요한 연구프로그램을 진행하고 있으며 EPA, NASA, NOAA (National Oceanic and Atmospheric Agency), USGS(U.S. Geological Survey)에서 실시간 위성데이터를 수집, 분석, 배포하기 위해 CyAN(Cyanobacteria Assessment Network)을 구성하여 신속하게 정보를 제공하고 있다[46]. 그러나 일부 주에서 한정된 계절에 보고된 정보이기에 아직 더 많은 기술적 연구가 필요한 실정이다. 우리나라의 경우에는 녹조에 대한 피해를 줄이기 위해 1998년부터 대청호를 시작으로 “조류경보제”를 실시하고 하며 유해 남조류의 발생에 따라 관심, 경계, 조류대발생 경보를 발령, 관리하고 있다 [47,48].

HABs를 제거, 제어하기 위한 기술에는 호수에 유입되는 영양염류를 차단하는 외부 부하차단법과 이미 유입된 영양염류를 제거, 유입된 영양염류를 조류가 이용할 수 없도록 차단하는 내부부하 차단법 등으로 나눌 수 있다. 가장 오래되고 많이 사용하는 방법은 물리, 화학적 처리방법으로 응집제, 살조제 처리, 초음파, 오존 처리법이 있다. 응집제의 경우 콜로이드입자가 녹조 생물, 영양염류를 응집, 흡착하여 제거하는 방법이다. 그러나 이 같은 방법은 근본적으로 녹조를 제거할 수 없고, 저서생물의 호흡을 방해하며 유해조류뿐만이 아닌 수계 다른 생물을 같이 침전시켜 생태계 교란을 일으키기도 한다. 살조제로 사용되는 제초제와 diuron 및 copper sulfate는 활성이 좋고 지속성이 있지만, 비용이 고가이며 수질악화 및 후속적으로 어류 사망으로 이어질 수 있는 광범위한 독성을 포함한다는 단점이 있다. 따라서 현재 국내에서 사용되는 녹조 제어방법의 문제점을 개선하는 새로운 물질 개발이 필요하다[49-51].

본 연구에서는 이전 연구에서 다양한 저분자 유기합성 화합물을 스크리닝으로 얻어진 결과를 토대로 HABs을 효율적으로 억제할 수 있는 살조제 약물로 비타민 K 유도체인 naphthoquinone을 선정하였다. 자연적으로 발생하는 quinone의 일부로 구성된 Doxorubicin, Mitomycin, Lapachol, Alkannin, Shikonin 등은 항암제(antitumor), 항염증제(anti-inflammatory), 항균성(antibacterial)의 항생물질로 사용되어 생물학적 물질로 유효한 효능을 나타내는 물질이며, naphthoquinone은 quinone의 일종으로 식물에서 추출되거나 미생

물에서 생산되는 생물 유래물질로 상대적으로 생태계에서 자연분해가 되기 쉽다 (Fig. 11)[52].

1,4-Naphthoquinone의 2번 탄소 위치에 치환기 종류를 변경해가며 합성을 진행하였다. 합성된 화합물은 *Microcystis Aeruginosa*에 대한 SAR(Structure Activity Relationship)평가를 진행한 후, 시간에 따른 살조율을 측정하였고, 현미경을 통해 세포의 분포 및 형태 변화를 관찰하였다. 활성이 우수한 화합물에 대해 물벼룩 급성독성 및 제브라피쉬 급성독성을 진행해 생태독성을 측정하여 안전성이 높은 물질을 최종 화합물로 선정하였다.

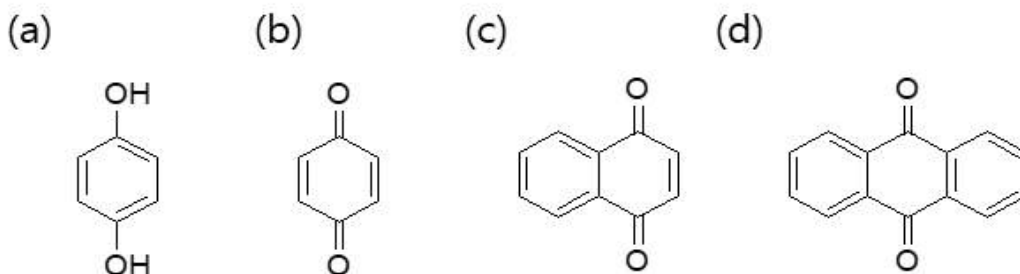


Figure 11. Chemical structure of (a) hydroquinone, (b) 1,4-benzoquinone, (c) 1,4-naphthoquinone, (d) 9,10-anthraquinone

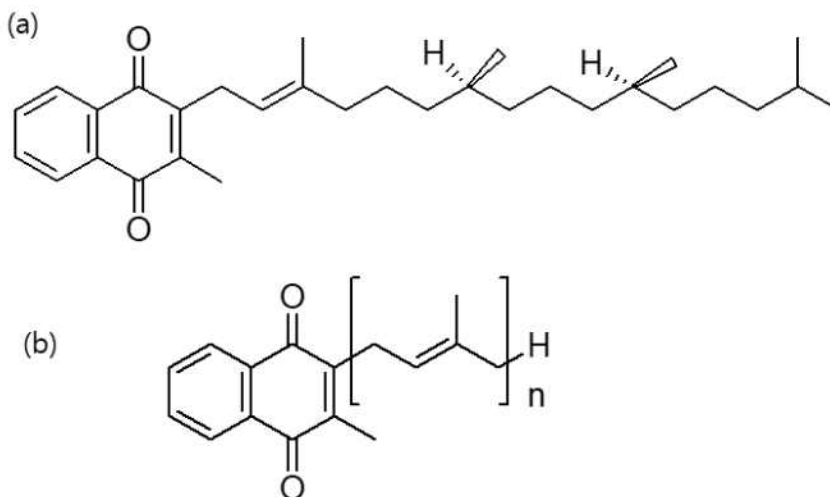


Figure 12. Chemical structure of (a) Vitamin K1 (b) Vitamin K2

2. Experimental procedures

2.1. Reagents and analysis apparatuses

실험에 사용된 모든 시약과 용매는 TCI (Japan), Merck (Germany), Junsei (Japan), Thermo Scientific (USA), Samchun (Korea) 사의 순도 98% 이상의 시약을 사용하였다. 수분에 민감한 화합물들은 N₂ 분위기에서 반응하였다. 합성한 화합물은 TLC (Thin Layer chromatography)와 발색시약 (Phosphomolybdic acid), UV 검출기를 통해 1차 분석을 진행하였고, 합성 후 정제를 마친 유도체는 JEOL JNM-LA 300MHz ¹H NMR (¹H Nuclear magnetic resonance), spectrometer (JEOL, Tokyo, Japan)에서 기록되었다. ¹H MNR의 Chemical shift(δ 등급)는 parts per million (ppm, 백만 분율)으로 표시하였으며, *J*-coupling 결합상수는 Hz (Hertz) 단위로 측정하였다. ¹H NMR 분석에 이용된 표준시료는 CDCl₃ (Chloroform-d)와 DMSO-*d*₆ (Dimethyl Sulfoxide)를 사용하였다.

합성된 순도 80% 이상인 화합물 50여 종에 대해 한국화학물은행에 보관하였다.

2.2. 시험종 및 배양조건

2.2.1. 조류(Algae)

본 실험에 사용된 남조류(Cyanobacteria)인 *Microcystis aeruginosa*(FBCC-A59), *Anabaena* SP. (AG10063)와 녹조류(Cyanophyta)인 *Chlorella Vulgaris*(AG20696), *Selenastrum Gracile*(AG10009)는 국립낙동강생물자원관 담수생물자원은행(Freshwater Bioresources Culture Collection, FBCC)과 한국생명공학연구원 미생물자원센터(Korea Collection for Type cultures, KCTC)에서 분양받아 사용하였다. 실험 중 사용된 녹조는 Table. 6과 같은 조성표를 이용해 제조한 BG -11 Medium을 고온고압 멸균기(15 min, 121°C)로 멸균한 후 냉장 또는 상온에서 완전히 식힌 후 SPL 사의 polystyrene으로 된 cell culture flask 75cm³, 200cm³에 14일에 1번씩 계대배양(Subculture) 하여 사용하였다. 계대배양의 모든 과정은 오염을 방지하기 위해 클린벤치 내에서 진행하였다. 녹조의 배양조건은 table. 4와 같이 16:8 cycle(Light : Dark), 2300~2700 Lux, 20~25°C 조건으로

Lab House 배양기에서 배양하였다[53,54].

배양조건		
Algae	light : dark	16H : 8H
	Temperature	20~25°C
	pH	7~8
	Medium	BG -11

Table. 4. Harmful algae incubation condition

BG -11 (Blue-Green Medium)			
	Stocks Compound		Medium(per liter)
1	$NaNO_3$	15.0 g/L	100.0 mL
2	K_2HPO_4	2.0 g/0.5L	
3	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3.75 g/0.5L	
4	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1.80 g/0.5L	
5	Citric acid	0.30 g/0.5L	10.0 mL each
6	Ammonium ferric citrate green	0.30 g/0.5L	
7	$EDTANa_2$	0.05 g/0.5L	
8		1.00 g/0.5L	
	H_3BO_3	2.86 g/L	
9	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1.81 g/L	
(Trace metal solution)	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.22 g/L	1.0 mL
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.39 g/L	
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.08 g/L	
	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0.05 g/L	

Make distilled water. Adjust pH to 7.1 with 1M NaOH or HCl.
For afar add 15.0 g per liter of Vacteriological Agar(Oxoid L11).
autoclave for 15 minutes.

Table. 5. Freshwater algae blue-green medium

BG -11 (Blue-Green Medium)

	Stocks Compound		Medium(per liter)
1	<i>NaNO₃</i>	15.0 g/L	100.0 mL
2	<i>K₂HPO₄</i>	2.0 g/0.5L	
3	<i>MgSO₄·7H₂O</i>	3.75 g/0.5L	
4	<i>CaCl₂·2H₂O</i>	1.80 g/0.5L	
5	Citric acid	0.30 g/0.5L	10.0 mL each
6	Ammonium ferric citrate green	0.30 g/0.5L	
7	<i>EDTANa₂</i>	0.05 g/0.5L	
8	<i>Na₂NO₃</i>	1.00 g/0.5L	
	<i>H₃BO₃</i>	2.86 g/L	
	<i>MnCl₂·4H₂O</i>	1.81 g/L	
9	<i>ZnSO₄·7H₂O</i>	0.22 g/L	
(Trace	<i>Na₂MoO₄·2H₂O</i>	0.39 g/L	1.0 mL
metal	<i>CuSO₄·5H₂O</i>	0.08 g/L	
solution)	<i>Co(NO₃)₂·6H₂O</i>	0.05 g/L	

Make up to liter with deionized water. Adjust pH to 7.1 with 1M NaOH or HCl.

For afar add 15.0 g per liter of Vacteriological Agar(Oxoid L11).

Autoclave at 15 psi for 15 minutes.

Table. 6. Freshwater algae blue-green medium

2.2.2. 물벼룩(*Daphnia magna*)

배양 및 실험에 사용된 물벼룩은 한국화학융합시험연구원(KTR)에서 분양받아 사용하였다. 제조한 M4 배양액은 고온고압 멸균기(15 min, 121°C)로 멸균한 후 사용하였고, 조제한 배양액은 상온에서 24시간 식힌 후 사용하였다(Table 7,8.). 물벼룩 배양조건은 M4 배양액에서 온도 20±2 °C, 광도 500~1000 Lux, 광 조건과 암 조건은 16시간 8시간으로 유지하였다. 물벼룩 먹이로는 한국생명공학연구원 미생물자원센터(Korea Collection for Type cultures, KCTC)에서 분양받은 *Chlorella Vulgaris*(AG20696)를 1 mL/1 L(1L에 성체 8~10마리 기준) 주 3번 공급하였고, 조류의 오염으로 물벼룩의 변화가 있을 수 있기에 클린벤치 내에서 진행하였다. 연속배양을 진행할 때에는 어린 개체 약 100마리를 2L 비커에 넣어 군집 배양하고, 개체 과밀도로 인한 생산률 저하를 막기 위해 성체의 경우 1L 비커에 8~10마리 옮겨 계대 배양하였다.

배양조건		
<i>Daphnia magna</i>	light : dark	16H : 8H
	Temperature	20~25°C
	pH	7~8
	Medium	M4

Table. 7. *Daphnia magna* incubation condition

Combined trace elements stock solution (1)			
	Compound	trace element stock Concentration (g/200mL)	
1	H ₃ BO ₃	11.438 g	
2	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.442 g	
3	LiCl	1.224 g	
4	RbCl	0.284 g	
5	SrCl ₂ ·6H ₂ O	0.608 g	
6	NaBr	0.064 g	
7	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.252 g	
8	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.067 g	
9	ZnCl ₂	0.052 g	
10	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.040 g	
11	KI	0.013 g	
12	Na ₂ SeO ₃	0.00876 g	
13	NH ₄ VO ₃	0.0023 g	
14	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	5.000 g/L	12가지 농축액을 1:1로 혼합하여 평균해 Fe-EDTA 용액 제조
(Fe-EDTA)	FeSO ₄ ·7H ₂ O	1.991 g/L	

M4 Culture medium을 조제를 위한 Combined trace elements stock solution (1)

Stock solution 1 ~ 13 Stock 1mL each /L

Stock solution 14 Stock 20mL/L

Stock Solution Vitamin mix(2)

	Compound	Concentration (g/L)	
1	Cyanocobalamine(B12)	0.75 g	세 가지 Vitamin을 하나의 증류수에 용해해 “Vitamin 농축액”을 제조
2	Thiamine HCl	0.01 g	
3	Biotin	0.075 g	

Table. 8. Combined stock solution

M4 Culture medium Stock solution

	Compound	Concentration(g/200mL)	M4 Medium(ml/L)
1	Combined trace elements stock solution (1)		50.0 mL
2	Stock Solution Vitamin mix(2)		0.1 mL
3	CaCl ₂ ·2H ₂ O	58.76 g	1.0 mL
4	MgSO ₄ ·7H ₂ O	49.32 g	0.5 mL
5	KCl	11.60 g	0.1 mL
6	NaHCO ₃	12.96 g	1.0 mL
7	Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	10.00 g	0.2 mL
8	NaNO ₃	0.548 g	0.1 mL
9	KH ₂ PO ₄	0.286 g	0.1 mL
10	K ₂ HPO ₄	0.368 g	0.1 mL

Combined trace elements stock solution (1), Stock Solution Vitamin mix(2), Stock
 제조 후 멸균하여 4°C에서 보관하였고, M4 Culture medium 제조 시 증류수는 멸균
 증류수를 사용하였다.

Table. 9. M4 Culture medium stock solution

2.2.3. 제브라피쉬(Zebrafish : *Danio rerio*)

사육 및 실험에 사용된 제브라피쉬는 수족관에서 분양받았으며 환경에 적응하기 위해 2주 동안 실험실 수족관에서 안정기를 거친 후 실험에 사용하였다. 열대어 종으로 table. 10 과 같은 조건으로 자동 온조 수조 히터, 산소 발생장치, 여과기를 두어 사육환경을 일정하게 유지하였다. 먹이는 TABIA[®] 및 알테미아 1회 /1일 공급하였고, 권장되는 사육개체수인 성어 10ea/1.5L cage 이하로 200L 수조에서 사육하였다.

사육조건		
	light : dark	16H : 8H
Zebrafish : <i>Danio rerio</i>	Temperature	26±1 °C
	pH	7~8
	Medium	Water

Table. 10. *Danio rerio* incubation condition

2.3. *Microcystis aeruginosa* activity measurement

*Microcystis aeruginosa*는 국내 저수지의 우세 남세균으로 국내의 환경부에서 지정하고 관리하는 남세균 중 하나이다. 가장 보편적인 녹조현상을 일으키는 남조류로 알려져 있으며 *Microcystis aeruginosa*는 녹조 발생 시 대량으로 *Microcystin* 및 cyanopeptolin과 같은 신경독과 간 독을 생산하는 독소를 발생시켜 식수 안전성을 떨어뜨리고 관개용수 공급에 위협을 준다. 이러한 이유로 *Microcystis aeruginosa*를 통해 일차적으로 스크리닝을 진행하여 lead compound를 선정하였다.

실험에 사용되는 *Microcystis aeruginosa*는 실험 전 현미경을 통해 상태를 확인하였고, BG - 11으로 희석하여 $600\sim 800 \times 10^4$ cell/mL 농도가 되도록 준비하였다. 화합물 농도에 따른 살조능력을 확인하기 위해 준비된 96-well-plate에 최종농도가 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 μ M이 되도록 화합물을 처리한다. *Microcystis aeruginosa* 100 μ L($600\sim 800 \times 10^4$ cell/mL), BG - 11으로 희석한 화합물 100 μ L 총 200 μ L를 96-well-plate에 투여하여 일정한 배양 조건 하에 5일 동안 방치하였다. 약물에 의한 활성을 평가하기 위해 대조군과 보정을 위한 화합물(Green TD[®])을 동일한 plate에 배양하여 활성을 확인하였다.

120h 이후 각 농도에 따른 *Microcystis aeruginosa* 10 μ L 이상 분취하여 neubauer hemocytometer(Superior, Germany)에 올리고 전자현미경(Nikon, ECLI-PSE E100, 0.3A, 50~60 Hz)를 이용하여 400배율로 온전한 형태의 조류 세포수를 확인하였다. 각 농도에 대한 세포의 개체수와 대조군의 세포수를 식(1)에 대입하여 세포의 감소율을 확인하였다.

$$\text{Algicidal activity (\%)} = \left(1 - \frac{Tt}{Tc}\right) \times 100 \quad \text{식 (1)}$$

T : 처리구 세포 수
C : 대조구 세포 수
t : 접종 후 일(day)수

화합물 접종 후 120h 경과 후 대조군 대비 세포 수를 50% 제어할 수 있는 농도(LC₅₀ - 120h)를 sigmaplot version 12.5 software를 이용하여 Standard curve인 sigmoid, for parameter logistic curve 식(2)을 사용해 계산하였다. 이후 식(2)을 사용해 얻어진 접종농

도별 살조 활성의 LC₅₀값을 Green TD[®]의 살조 활성 값으로 보정을 해 오차를 줄여주었다.

$$Y = D + \frac{(A - D)}{\left(1 + \left(\frac{X}{C}\right)^B\right)} \quad \text{식(2)}$$

Y : 화합물 접종농도에 따른 살조 활성(%)

A : 접종농도에 따른 최대 활성(%)

B : 접종농도에 따른 최소 살조 활성(%)

C : 접종농도 범위 내의 LC₅₀-120h

D : - Hillspope

본 실험은 3회 반복하여 수행되었으며, 결과의 평균값을 구해 살조 활성이 가장 좋은 상위 9개의 화합물을 1차 선발하였다.

2.4. Selective algicidal activity measurement

Microcystis aeruginosa 살조 활성에서 상위 9개의 화합물을 lead Compound로 선정하여 유해 남조류 2종(*Microcystis aeruginosa*, *Anabaena* Sp.)과 무해 녹조류 2종(*Selena Strum Gracile*, *Chlorella Vulgaris*)에 대한 살조 활성을 진행하였다. 활성평가는 위의 실험과 같게 진행되었다. 96-well-plate에 최종농도가 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 μ M이 되도록 화합물을 처리한 후 5일 동안 방치하였고, 식(1)을 사용하여 살조 활성 및 LC₅₀ - 120h를 구하였다. Table. 11은 각 조류의 특징을 정리하였으며 실험을 통해 조류의 종류에 따라 살조 활성의 차이를 확인할 수 있었다.

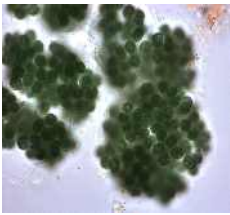
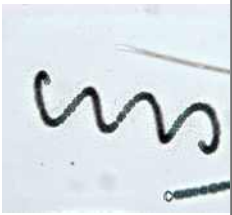

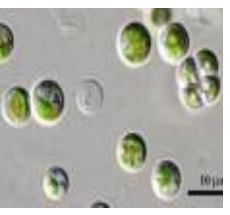
구분	Microcystis	Anabaena	Selena strum	Chlorella Vulgaris
현미경사진				
단위세포 형태	길이 4~8 μ m 구형 혹은 타원형	길이 7~15 μ m 구형 혹은 타원형	길이 16~38 μ m 폭 5~8 μ m 초승달 모양	직경 1~10 μ m, 타원형
군체 형태	수백~천여 개의 단위세포가 모여 군체를 형성	세포가 염주 형태로 직선, 혹은 나선형으로 연결	4개 또는 8개 규칙적으로 2단 배열	단독 또는 작은 군체 형성
종	Cyanobacteria	Cyanobacteria	Chlorophyta	Chlorophyta
최적 성장온도	25 $^{\circ}$ C~35 $^{\circ}$ C (고온성)	20 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C	25 \pm 1 $^{\circ}$ C	25 $^{\circ}$ C~30 $^{\circ}$ C

Table. 11. Typical type of algae

2.5. Measurement of algicidal activity of naphthoquinone compounds over time

유해 남조류 2종(*Microcystis aeruginosa*, *Anabaena* Sp.)과 무해 녹조류 2종(*Selenastrum Gracile*, *Chlorella Vulgaris*)에 대한 시간별 살조활성을 진행하였다. 활성평가는 위의 실험과 동일하게 진행되었으며 모든 화합물의 LC₅₀ - 120h값 이상인 2 μ M이 되도록 화합물을 처리한 후 24, 48, 72, 96, 120h 경과 후 살조율을 확인했다. 전자현미경 (Nikon, ECLI-PSE E100, 0.3A, 50~60 Hz)를 이용하여 온전한 형태를 가진 세포를 Cell counting 하였고, 식(1)에 대입하여 세포의 감소율을 확인하였다. 또한, Microplate reader를 이용하여 25°C 조건에서 680nm의 흡광도를 스크리닝하여 control group 대비 살조능력에 따른 흡광도 변화를 확인하였다.

2.6. Chlorophyll-a measurement

엽록소는 광합성을 수행하는 모든 조류(Algae), 고등 식물 및 cyanobacteria에서 발견되는 녹색의 색소로 chlorophyll-A를 측정하여 algae, cyanobacteria의 생물량을 확인할 수 있다[55,56]. 실험은 cyanobacteria의 일종인 *Microcystis aeruginosa*에 화합물을 처리하고 24, 48, 72, 94, 120 h 후 chlorophyll-A와 세포 개체 수를 측정하였다. 식(3)에 흡광도를 대입하여 시간 변화에 따른 chlorophyll양을 측정하였다.

*Microcystis aeruginosa*를 BG - 11으로 희석하여 1000×10^4 cell/mL 이상으로 준비하고 cell culture flask 75 cm³(Polystyrene)에 200mL를 취하였다. 24, 48, 72, 94, 120h 후 *Microcystis aeruginosa* 20 mL를 vacuum filtration equipment로 GF/C (Glass Microfiber Filter, 47mm) 여과지에 필터하였고, 여과한 GF/C 여과지와 90% acetone 10mL를 PTFE(Polytetrafluoroethylene) 재질인 grinder Tube에 넣어 마쇄기(Tissue grinder)로 같이 마쇄하였다. 마쇄한 시료는 conical Tube에 넣어 4 °C냉장고에서 암 조건에서 하룻밤 방치한다. 하루 방치된 용액을 Eppendorf사의 centrifuge 5702R로 20분간 원심 분리하였고, 이때 상등액의 양을 측정하여 기록하였다. 총장 10 mm 흡수 셀에 시료를 옮겨 UV-VIS spectroscopy² 파장별(663 nm, 645 nm, 630 nm, 750nm) 흡광도(Optical density)를 측정한다. 아래 계산식(3)을 이용하여 엽록소(Chlorophyll) 양을 계산하였다.

$$\text{Chlorophyll-a (mg/mL)} = \frac{(11.64X_1 - 2.16X_2 + 0.10X_3) \times V_1}{V_2} \quad \text{식(3)}$$

X_1 : OD663 - OD750

X_2 : OD645 - OD750

X_3 : OD630 - OD750

OD : 흡광도 (Optical density)

V_1 : 상층액의 양 (mL)

V_2 : 여과한 시료의 양 (L)

2.7. 세포관찰

2.7.1. 광학현미경(Light micro, LM)을 통한 세포분포 관찰

120 h 동안의 *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena* Sp., *Selena Strum Gracile*, *Chlorella Vulgaris*의 세포를 관찰하였다. Cell을 10 μ L 이상 분취하여 Neubauer hemocytometer(Superior, Germany)에 올리고 전자현미경(Nikon, ECLI-PSE E100, 0.3A, 50~60 Hz)를 이용하여 400배율로 세포를 확인하였다. control group과 비교하여 2 μ M로 처리한 시험군을 0, 1, 2, 3, 4, 5 day 시간 경과 후 세포분포 차이를 확인하였다. 높은 살조활성을 지닌 9종의 화합물을 amine, pyridine, hydroxy alkyl amine group과 altoxy group으로 총 4그룹으로 나누어 세포를 스크리닝하였다. 세포분포는 동일한 면적 내에서 온전한 세포의 수로 확인하였다.

2.7.2. SEM(Scanning Electron Microscope) Cell Observation

주사전사 현미경(SEM)은 시료에 전자선을 주사해 시료 표면에서 발생하는 신호를 검출기로 검출해 3차원적 영상으로 표시해주는 전자현미경이다. 전자가 방사되어 시료 표면과 충돌하면서 상호작용할 수 있어 대상물을 확대해 미세 구조를 관찰할 수 있게 한다. 생물 시료의 형태를 관찰하기 위해서는 일반적으로 현미경을 사용하지만, 광학현미경(Light micro, LM)은 마이크로미터 단위(10^{-6} m)의 낮은 분해능으로 미세시료를 관찰하는 데 한계가 있으므로 나노미터 단위(10^{-9} m)로 관찰이 가능한 전자현미경(Electron micro, EM)을 사용하여 세포의 형태를 관찰하였다[57,58].

시료의 분석은 10^{-3} Pa 이상의 고진공 중에서 측정되므로 수분이나 용매 및 기화에 의한 신호간섭은 분석에 문제를 일으킬 수 있으므로 전처리 과정이 필요하다. 일반적으로 고체 시료에 백금(Pt) 코팅을 진행하며 HITACHI-E1030 백금(Pt) 10 mA 조건으로 코팅을 진행하였다. 생물 시료에 수분이 남아있을 경우 전자빔이 시료에 주사될 때 시료가 탈 수 있기에 탈수 과정을 추가로 진행해 주었다. 15 mL conical Tube에 시료를 넣고 20분간 원심분리한 후, ethanol을 농도를 점진적으로(50%, 60%, 70%, 80%, 99%) 늘려가며 탈수시켜준다. ethanol 농도에 따라 1~2번 반복하였고, 불순물이 섞여 들어가는 것을 방지하기 위해 덮개를 덮어 24 h 동안 상온 또는 Freeze Drying에서 건조 시켜 주었다. 실험은 녹조 4종을 주사전자현미경(HITACHI-s4800) 가속전압 15 kv 하에서 관찰하였다.

2.8. *Daphnia magna* Acute Toxicity Test

물벼룩은 수 생태계의 1차 소비자로 수중의 세균과 조류를 먹이로 살아가는 약 0.3 mm ~ 6 mm 정도로 매우 작은 무척추동물이다. 물벼룩은 다른 생물에 비해 번식이 쉽고, 실험이 간단하여 그동안의 연구로 축적된 생태 독성 자료가 풍부해 전 세계적으로 널리 사용되는 생태 독성 시험종이다. 물벼룩 급성시험 생물 종으로는 OECD(Organization for Economic Cooperation and Development) 공식 추천 종이자 국내 생태 독성 배출 관리 제도에서 선정된 시험 종으로 담수산 물벼룩 *Daphnia magna* 을 사용하였고, 시험은 <OECD Guideline for testing of Chemicals 202, ‘Daphnia sp., Acute Immobilisation Test’>에 준하여 실시하였다[59-61].

실험에 사용될 *Daphnia magna* 는 KTR에서 분양받아 M4 medium에서 사육된 물벼룩 중 알을 가진 물벼룩 암컷을 시험 전날 준비한 용기에 옮긴 후 다음날까지 생산된 24 시간 미만의 어린 개체를 사용하였다. control과 실험군 각각에 물벼룩을 5마리씩 넣어 48시간 동안 노출 시켰고, 시험 기간 동안 시험액을 교환하지 않는 지수식 방법(Satic nonrenewal test)으로 실험을 진행하였다. 실험 24, 48시간 후 50mL conical tube를 가볍게 움직여 15초 후에 물벼룩의 움직임을 관찰하였으며 48h - EC₅₀ (50% Effective Concentration, 반수 영향농도) 값으로 화합물의 물벼룩 급성 독성영향을 확인하였다. 농도의 범위는 살조활성 투여농도의 5배이며, dmsO 함량은 0.1% 이하로 제조한다.

시험조건은 온도 20±2 °C, 광도 500~1000 Lux, 광 조과 암 조건은 16시간 8시간으로 배양조건과 동일하게 진행되었다. 노출 기간 동안 물벼룩에서 먹이는 공급하지 않았다.

2.9. *Danio rerio*(Zebrafish) Acute Toxicity Test

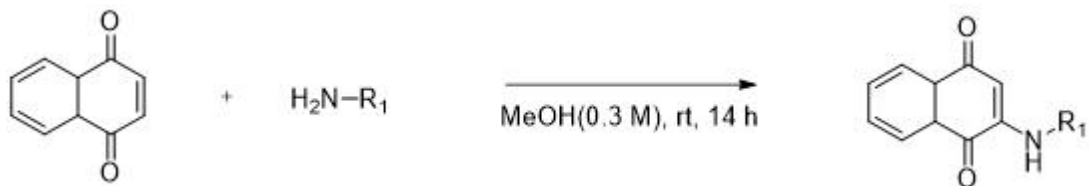
Daphnia magna Acute Toxicity Test 48 h - EC₅₀값으로 안전성이 좋은 제품을 선별하여 어류 독성시험을 진행하였다. <OECD Guideline for testing of Chemicals 203, “Fish, Acute Toxicity Test”> 및 <국립환경과학원고지 제2021-87호 화학물질의 시험방법에 관한 규정에 준하는 시험 종과 시험방법>에 근거하여 실시하였다. 시험으로는 *Danio rerio*를 선택하였다. 제브라피쉬(Zebrafish, *Danio rerio*)는 열대지방에서 흔히 볼 수 있는 작은 물고기로 인체의 유전자와 크기와 수가 유사하고, 유전자 상동성이 매우 높으며 일정 시간 동안 유전 및 화학적 스크리닝이 유용하기 때문에 생체 내 테스트 및 독성 분석을 수행하기 위한 독성학 모델로 많이 사용된다[62,63].

실험 기간 동안 사용되는 어류는 동일한 시간에 분양받은 동일 연령의 치어를 사용하였고, 실험실 수족관에서 1~2주 이상의 적응 기간을 가진 후 순화 기간인 7일 동안 치사율이 0% 조건이 만족 되는 실험군에 대해 실험을 진행하였다. 배양 수는 수돗물을 여과기로 필터 하여 사용하며, 실험 중 환경에 의한 영향을 줄이기 위해 실험 수는 사육에 사용된 용수를 사용하였다. 실험 기간 동안 시험액은 교환하지 않으며(지수식 방법, Static test) *Danio rerio*에 먹이를 공급하지 않았다. 투명한 사각 플라스틱 수조에 10, 20, 40, 60, 80, 100 μM이 되도록 화합물을 배양수로 희석하여 제조한 후 *Danio rerio* 5마리를 넣어준다. 대조군과 같이 24 h 간격으로 총 120 h 동안 치사 개체와 독성증상을 기록하고, 120 h - EC₅₀값을 구해 제브라피쉬 급성 독성영향을 확인하였다. 시험조건은 온도 26±1 °C, 광 조건과 암 조건 16 : 8 으로 배양조건과 동일하게 진행되었다.

Daphnia magna 사육 및 동물실험은 동물실험계획서를 조선대학교 동물실험윤리위원회에 제출하여 승인(CIACUC2022-S0012)을 받아 진행하였다.

2.10. Synthesis of naphthoquinone derivatives

2.10.1. General procedures for the synthesis of compounds 1-16, 31-36, 47-53



Scheme 1. Synthesis of compounds and conditions; methanol, r.t, 16 h. R₁= Alkyl group (a), Alkyl Pyridine Group (b), Alkoxy alkyl group (c)

Methanol (0.3 M)에 1,4-naphthoquinone(1 eq), alkylamine(1.2 eq)을 넣어 실온에서 14시간 동안 교반시켰다. 반응의 진행 정도는 TLC로 관찰하며, 반응이 더는 진행되지 않으면 회전식 감압증류기로 감압 농축하여 용매를 제거한다. 반응물을 실리카가 충전된 column chromatography를 통해 n-Hexane과 ethyl acetate, methanol의 혼합용매로 분리해 정제하면 고형물을 얻는다. 그렇게 얻은 생성물은 ethyl acetate와 차가운 n-Hexane으로 재결정하여 순수한 붉은색 결정을 얻었다.















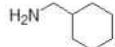

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
					
(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)
					
(13)	(14)	(15)	(16)		
					

Table. 12. An alkyl group of compounds 1-16.

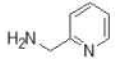
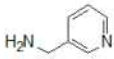
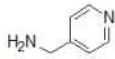
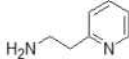
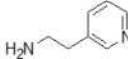
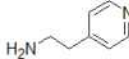
(31)	(32)	(33)	(34)	(35)	(36)
					

Table. 13. An alkyl pyridine group of compounds 31-36.







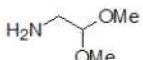
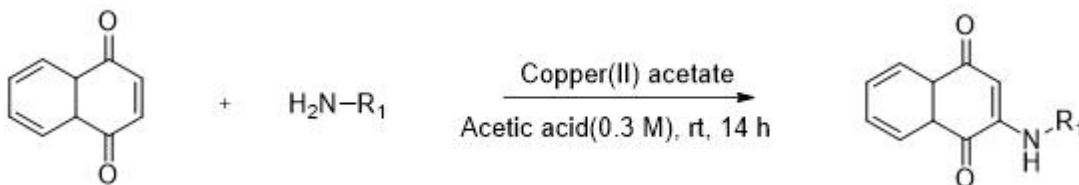
(47)	(48)	(49)	(50)	(51)
				
(52)	(53)			
				

Table. 14. An alkoxy alkyl group of compounds 47-53.

2.10.2. General procedures for the synthesis of compounds 17-30



Scheme 2. Synthesis of compounds 17-30 reagents and conditions; R₁= Aniline groups

1,4-naphthoquinone(1 eq)을 acetic acid (0.3 M)에 녹인 용액에 aniline (1.2 eq), copper acetate (0.1 eq)을 넣고 실온에서 18시간 교반시켰다. 반응의 진행 정도는 TLC로 관찰하였으며, 반응이 더 진행되지 않으면 회전식 감압증류기로 감압 농축하고, vacuum 상태로 만들어주어 용매를 제거하였다. dichloromethane과 0.5 M HCl 수용액, 포화 NaHCO₃ 수용액을 이용하여 산, 염기 추출을 진행하여 pH가 중성이 되도록 여러 번 반복하였다. anhydrous MgSO₄로 탈수시킨 후 회전식 감압증류기로 감압 농축하여 용매를 제거하였다. 반응물을 실리카가 충전된 column chromatography를 통해 n-Hexane과 ethyl acetate, methanol의 혼합용매로 분리해 정제하면 고형물을 얻는다. 그렇게 얻은 생성물은 dichloroethane에 완전히 녹여 유리 필터로 여과시켜 순수한 붉은색 결정을 얻었다.


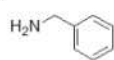
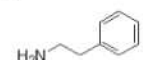



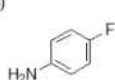


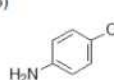


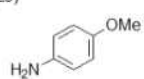
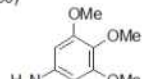
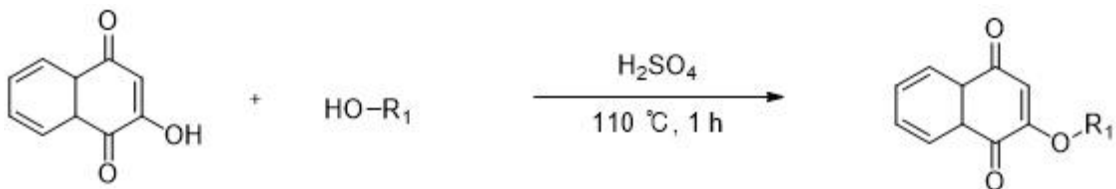
(17)	(18)	(19)	(20)	(21)	(22)
					
(23)	(24)	(25)	(26)	(27)	(28)
					
(29)	(30)				
					

Table. 15. An aniline group of compounds 17-30.

2.10.3. General procedures for the synthesis of compounds 37-46



Scheme 3. Synthesis of compounds 37-46 reagents and conditions; R₁= Alkyl groups

2-Hydroxy -1,4-natphthoquinone (1 eq)과 alkoxy (3 eq), 90 % H₂SO₄ (1.5 eq)을 넣고 1 시간 동안 oil bath에서 끓이듯이 교반시킨다. b.p가 90 °C 이하인 경우 기화되는 것을 방지하기 위해 계속하여 한 방울씩 첨가해준다. 반응의 진행 정도는 TLC로 관찰하였으며, 출발물질이 완전히 제거되면 vacuum 상태로 만들어주어 용매를 제거하였다. 혼합물을 separatory funnel로 이동시켜 toluene과 water, 0.5 M HCl 수용액, 포화 NaHCO₃ 수용액을 이용하여 산, 염기 추출을 진행하여 pH가 중성이 되도록 여러 번 반복하였다. anhydrous MgSO₄로 탈수시킨 후 회전식 감압증류기로 감압 농축하여 용매를 제거하였다. 반응물을 실리카가 충전된 column chromatography를 통해 dichloromethane으로 분리시켜 정제하면 순수한 노란색의 고형물을 얻는다.

(37) 	(38) 	(39) 	(40) 	(41) 	(42)
(43) 	(44) 	(45) 	(46) 		

Table. 16. An alkyl group of compounds 37-46.

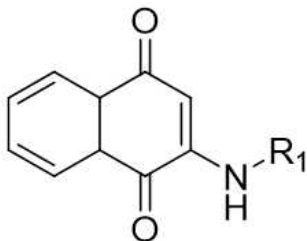
3. Results and Discussion

3.1. Naphthoquinone 화합물의 *Microcystis aeruginosa* 활성

compound 1-36, 47-53은 1,4-Naphthoquinone에 Amine을 친핵체로 사용하여 amination 합성을 하였고, compound 37-46은 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (Lawsone)에 hydroxy기를 친핵체로 사용하여 ether 화합물을 합성하였다.

합성을 마친 compound 1-53은 유해 남세균인 *Microcystis aeruginosa*에 활성평가를 진행하였다. 우리나라에서 cyanobacteria bloom의 우세종 중 하나인 *Microcystis aeruginosa*에 대한 살조 능력을 확인하기 위해 compound 처리 120 h 후의 세포 수를 분석하였다. 각각의 활성은 50% 억제하는 농도를 구하였고, 대조군(Green TD[®])을 두어 logistic curve에 대입하여 얻은 LC₅₀값을 보정하였다. 아래의 Table 17 ~ 22은 compound 1- 53의 *Microcystis aeruginosa*에 대한 LC₅₀값이다.

Table 17. Algicidal activity comparison of compounds 1~16 against harmful cyanobacteria

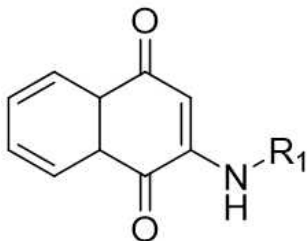


LC ₅₀ (120 h) (μM)		
Compounds	Substitution	<i>Microcystis Aeruginosa</i>
No.	R	
1	Ethyl	2.6 ± 0.2
2	Propyl	2.2 ± 0.6
3	Isopropyl	3.0 ± 0.2
4	Butyl	4.0 ± 1.0
5	Isobutyl	3.5 ± 0.6
6	Secbutyl	2.9 ± 0.5
7	Tertbutyl	1.6 ± 0.8
8	Pentyl	5<
9	Hexyl	5<
10	Heptyl	5<
11	Cyclopropyl	1.1 ± 0.4
12	Cyclobutyl	1.7 ± 0.4
13	Cyclopentyl	1.3 ± 0.5
14	Cyclohexyl	2.4 ± 1.7
15	Cyclohexylmethyl	5<
16	Cycloheptyl	5<

먼저, 지방족 화합물의 치환기의 사슬 개수와 고리 구조의 개수를 늘려가며 *Microcystis Aeruginosa* 활성을 진행하였다. 지방족 사슬의 길이는 propyl > ethyl > butyl

순으로 활성효능이 높았고, butyl기 이상으로 사슬의 길이가 늘어나면 5 μ M 농도 이하에서 활성이 없음을 확인할 수 있었다. 가장 활성이 높은 propyl 기의 이성질체인 isopropyl은 큰 차이 없이 활성이 높은 편에 속하였다. 반면, 비교적 활성이 낮았던 butyl기를 이성질체인 isobutyl, secbutyl, tertbutyl로 치환되었을 때는 활성이 높아지는 양상을 보였다. tertbutyl > secbutyl > isobutyl기 순으로 *Microcystis Aeruginosa*에 대한 살조 능력에 차이를 가졌는데 이를 통해 구조적인 이성질체에 의한 입체 차이는 살조 능력에 영향을 미침을 확인할 수 있었다. Cyclo 치환기는 고리가 작은 경우 대체적으로 효능이 더 높았으며 cyclopropyl > cyclopentyl > cyclobutyl > cyclohexyl 순으로 LC₅₀값이 낮았다. 특히 cyclopropyl과 cyclopentyl의 경우 높은 활성을 나타내었다. 또한, Cyclo 화합물에서 사슬의 개수에 변화를 주면 compound 12와 13의 결과와 같이 LC₅₀ 값이 확연히 높아짐을 알 수 있다.

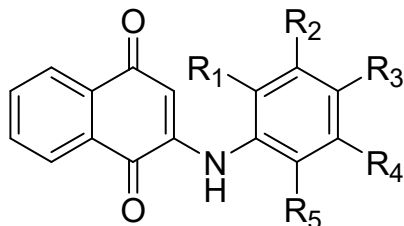
Table 18. Algicidal activity comparison of compounds 17~20 against harmful cyanobacteria



LC ₅₀ (120 h) (μM)		
Compounds No.	Substitution R	<i>Microcystis Aeruginosa</i>
17	phenyl	3.2 ± 0.6
18	phenylmethyl	5<
19	2-phenylethyl	5<
20	3-phenylpropyl	5<

Table 18.은 방향족 사슬을 도입하였을 때 사슬의 개수에 따른 LC₅₀ 값을 확인하였다. phenyl기의 LC₅₀ 값은 3.2였으며, 그 이상으로 탄소의 개수가 늘어나면 살조 활성이 매우 낮음을 확인하였다. table 17과 비교하였을 때 지방족 alkyl amino group이 방향족 aniline group보다 높은 활성을 가짐을 알 수 있다.

Table 19. Algicidal activity comparison of compounds 21~30 against harmful cyanobacteria



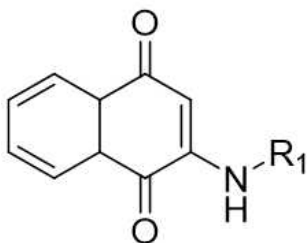
LC ₅₀ (120 h) (μM)						
Compounds						<i>Microcystis Aeruginosa</i>
NO.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	
21	F	H	H	H	H	5<
22	H	F	H	H	H	2.6 ± 0.8
23	H	H	F	H	H	1.8 ± 0.8
24	Cl	H	H	H	H	5<
25	H	Cl	H	H	H	3.3 ± 0.1
26	H	H	Cl	H	H	5<
27	OMe	H	H	H	H	5<
28	H	OMe	H	H	H	3.0 ± 0.4
29	H	H	OMe	H	H	2.6 ± 0.1
30	H	OMe	OMe	OMe	H	1.8 ± 0.6

Compound 21-30은 Table 18. 에서 활성이 낮았던 aniline group에 fluorine, chlorine과 methoxy group이 치환시킨 형태로 치환기의 종류와 *ortho*, *meta*, *para* 탄소 위치에 따른 활성을 확인해보았다. fluorine이 붙은 화합물의 경우 화합물 17번과 비교하였을 때 *ortho* 위치를 제외하곤 활성이 더 높았으며 *para* > *meta* > *ortho* 순으로 높은 활성을 지녔다. chlorine이 치환되었을 경우 *meta* 위치에서 화합물 17번과 유사한 활성을 가졌고,

fluorine 화합물보다 효과가 낮았다. methoxy group으로 치환시킨 화합물은 -OCH₃가 para 위치에 1개 치환된 형태보다 -OCH₃가 3개 치환된 경우 활성이 높았다.

대체로 화합물 18번의 LC₅₀값과 비교하였을 때 meta 위치로 치환된 화합물일 경우 더 효과를 보인 것으로 보아 위치에 따른 활성 차이가 있음을 확인하였고, 치환기의 종류에 따라 fluorine > methoxy > chlorine 순으로 높은 활성을 보여주었다.

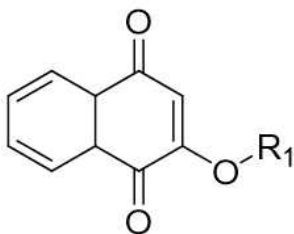
Table 20. Algicidal activity comparison of compounds 31~36 against harmful cyanobacteria



LC ₅₀ (120 h) (μM)		
Compounds	Substitution	<i>Microcystis Aeruginosa</i>
No.	R	
31	2-Methylpyridine	1.4 ± 0.3
32	3-Methylpyridine	1.6 ± 0.2
33	4-Methylpyridine	0.6 ± 0.1
34	2-Ethylpyridine	2.0 ± 0.7
35	3-Ethylpyridine	2.6 ± 0.4
36	4-Ethylpyridine	1.7 ± 0.3

Table 20 에서는 aniline 구조에 염기성을 나타내는 헤테로 방향족인 pyridine 구조를 이용해 N의 위치와 탄소 개수에 변화를 주어 활성 변화를 확인하였다. 탄소의 위치가 4, 3, 2번 순으로 높은 활성을 지녔고, 위치와 관계없이 탄소 체인 길이가 늘어나면 활성이 감소하는 경향을 보였다. pyridine 구조를 지닌 화합물 31-36 모두 활성이 높았으며 그중에서 compound 33번은 LC₅₀값이 0.607로 매우 좋은 *Microcystis Aeruginosa*에 대한 살조 능력을 가짐을 확인할 수 있었다.

Table 21. Algicidal activity comparison of compounds 37~46 against harmful cyanobacteria



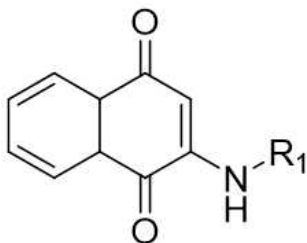
LC ₅₀ (120 h) (μM)		
Compounds	Substitution	<i>Microcystis Aeruginosa</i>
No.	R	
37	Ethyl	1.0 ± 0.2
38	Propyl	1.2 ± 0.8
39	Butyl	1.3 ± 0.6
40	Pentyl	2.5 ± 0.7
41	Hexyl	4.0 ± 1.6
42	Heptyl	5<
43	Cyclobutyl	1.2 ± 0.4
44	Cyclopentyl	1.8 ± 0.5
45	Cyclohexyl	2.0 ± 0.3
46	Cycloheptyl	5<

compound 37-46은 Lawsone을 출발물질로 하여 결합한 Ether 화합물로 Amine과 Al

Table 21 에서는 Table 17 의 amine group과 비교하여 alkoxy group에서의 활성 변화와 사슬 길이의 경향성을 확인할 수 있었다. compound 37-46의 경우에도 사슬의 길이가 늘어나고, 고리의 크기가 커질수록 활성이 감소하였다. 이는 사슬의 길이는 살조능력에 영향을 주며, 특정한 탄소 개수를 지닐 때 높은 활성을 지님을 알 수 있다. 또한, 상대적으로 amine Group에 알킬기가 결합한 형태보다 alkoxy group의 활성이 높게 나

옴을 확인하였다. 치환기를 첨가하지 않거나 pyridine의 형태를 띠지 않는 한 개의 질소만 포함된 화합물의 경우 산소가 포함된 ether 화합물보다 낮은 활성 경향을 보여주었다.

Table 22. Algicidal activity comparison of compounds 47~53 against harmful cyanobacteria



LC ₅₀ (120 h) (μM)		
Compounds No.	Substitution	<i>Microcystis Aeruginosa</i>
	R	
47	2-hydroxyethyl	1.5 ± 0.3
48	3-hydroxypropyl	1.4 ± 0.2
49	4-hydroxybutyl	1.7 ± 0.2
50	2-hydroxybutyl	1.5 ± 1.0
51	2-methoxyethyl	2.5 ± 0.1
52	3-methoxypropyl	2.8 ± 1.1
53	2,2-dimethoxyethyl	2.5 ± 1.5

위의 실험에서 높은 활성을 가진 탄소 사슬(n=2, 3, 4)에 amine group, hydroxy group, methoxy group이 포함된 화합물에 대한 활성을 확인하였다. 전체적으로 amine만 포함된 group보다 높은 활성을 가졌고, alkoxy group보다는 낮은 활성을 가졌다. hydroxy group이 methoxy group보다는 더 높은 활성을 지닌 치환기였으며, hydroxy와 methoxy의 개수가 증가해도 활성이 유사함을 확인할 수 있다.

3.2. 선택적 살조활성

합성한 53개의 compound 중 *microcystis aeruginosa*에 대한 활성이 높은 compound 9개를 lead compound로 선정하였고, 추가로 유해 남조류 2종(*Microcystis aeruginosa*, *Anabaena Sp.*)과 무해 녹조류 2종(*Selena Strum Gracile*, *Chlorella Vulgaris*)에 대한 살조능력을 확인하였다. *Microcystis aeruginosa* 활성평가와 동일한 방법으로 compound 처리 120시간 후 세포 수를 분석하였고, 각각의 LC₅₀값을 구하였다.

Compounds	LC ₅₀ (120 h) (μM)			
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	<i>Anabaena Sp.</i>	<i>Selena Strum Gracile</i>	<i>Chlorella Vulgaris</i>
11	1.1 ± 0.4	1.5 ± 0.2	2.7 ± 1.6	3.4 ± 0.5
13	1.3 ± 0.5	1.6 ± 0.5	5<	5<
31	1.4 ± 0.3	1.2 ± 0.3	1.9 ± 0.2	3.5 ± 0.4
33	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.6	2.5 ± 1.2	2.3 ± 0.3
37	1.0 ± 0.2	5<	5<	5<
38	1.2 ± 0.8	5<	5<	5<
43	1.3 ± 0.6	5<	5<	5<
47	1.5 ± 0.3	1.8 ± 0.5	3.0 ± 0.6	2.3 ± 0.5
48	1.4 ± 0.2	2.0 ± 0.7	3.7 ± 0.4	3.0 ± 0.5

Table 23. Algicidal activity comparison for *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena Sp.*, *Selena Strum Gracile*, *Chlorella Vulgaris*

Amine group의 경우 4종 모두 활성을 지녔으나 남세균(*Microcystis aeruginosa*, *Anabaena Sp.*) 2종에 대해 더 높은 활성을 보였고, 13번 화합물은 선택적으로 남세균에게서만 높은 활성을 보여주었다. pyridine 화합물은 남세균과 무해조류 모든 종에서 높은 살조율을 가졌고, compound 47, 48번은 남세균에 대한 살조율이 무해조류보다 2배 가량 높은 활성을 가짐을 확인하였다. 반면 alkoxy group 화합물의 경우 선택적으로 *Microcystis aeruginosa*에게만 살조능력 보여주었다.

3.3 시간별 살조활성 변화

3.3.1 Cell counting

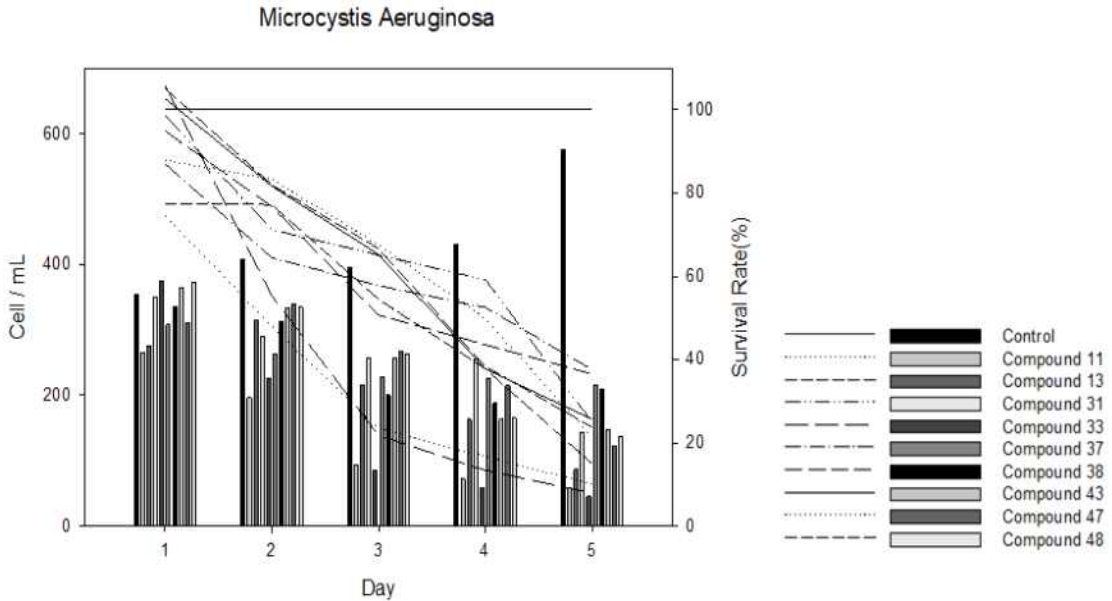


Figure 13. *Microcystis aeruginosa* cell count and algicidal activity of lead compound over time.

1일 후 compound 11, 13의 경우 25%, 22%로 가장 큰 살조율을 보였고, 나머지는 control group과 유사하였다. 3일 경과 후 각각 대조군 대비 76, 45, 34, 78, 34, 32, 33, 42, 49%의 세포 사멸을 보였고, 5일 경과 후 각각 90, 85, 75, 92, 74, 78, 76, 63, 63%의 살조율을 보였다. compound 33번의 가장 세포활성이 높았고, 일반적으로 점차적인 살조활성을 보인 반면, alkoxy group compound 37, 38, 43은 4일차부터 급격한 살조활성이 확인되었다.

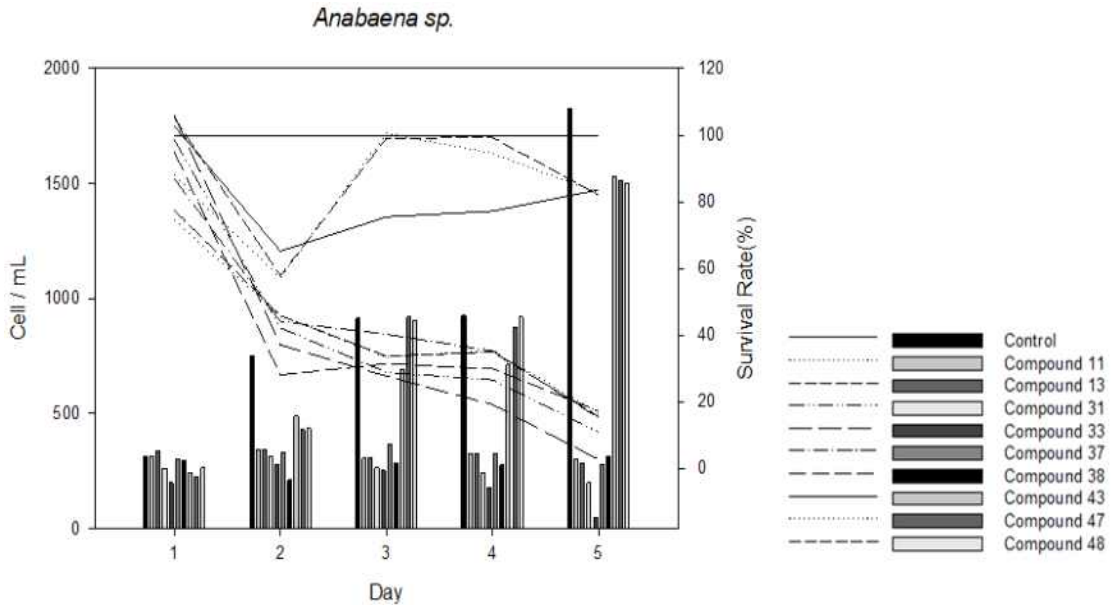


Figure 14. *Anabaena Sp.* cell count and algicidal activity of lead compound over time.

*Anabaena Sp.*는 다른 조류와 비교하여 가장 높은 성장률을 보여주었다. compound 11, 13은 2일 차에 50% 이상 살조활성을 가졌고, 점차 증가하여 5일 차에 80% 이상 살조를 보여주었다. compound 31, 33은 1일 차부터 높은 활성(17, 36%)을 가졌고, 5일 차에 약 90% 이상의 살조를 보여주었다. compound 37, 38, 43은 2일 차까진 살조능력을 가지는 듯하였으나 3일 차부터 세포수가 점차 증가하여 control과 유사한 세포수를 가졌다. compound 47, 48은 위의 결과와 동일하게 5일차에서 높은 살조능력을 보였다.

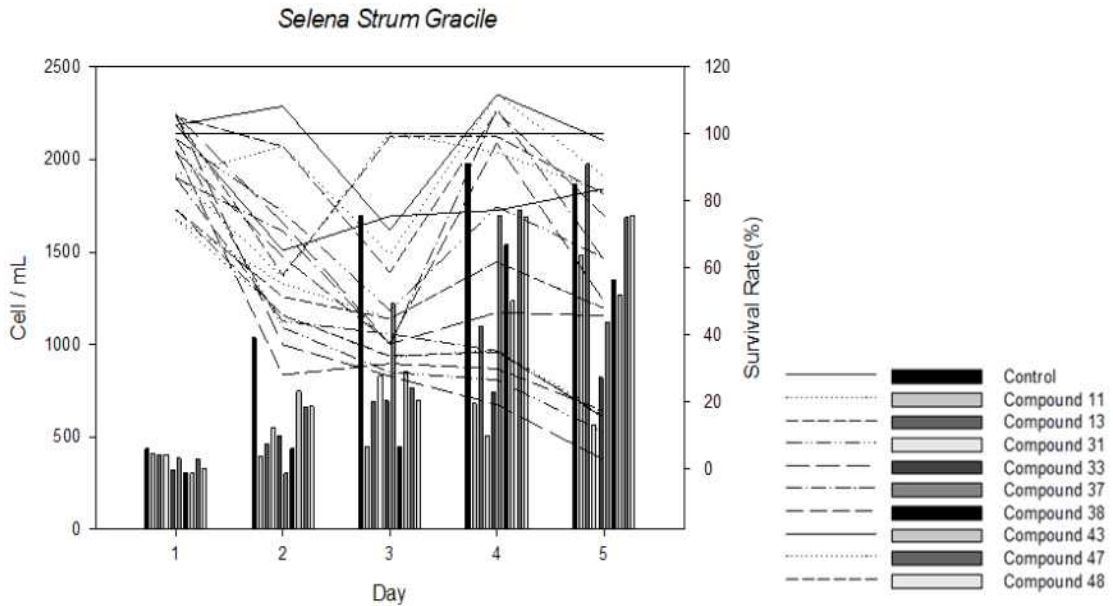


Figure 15. *Selena Strum* cell count and algicidal activity of lead compound over time.

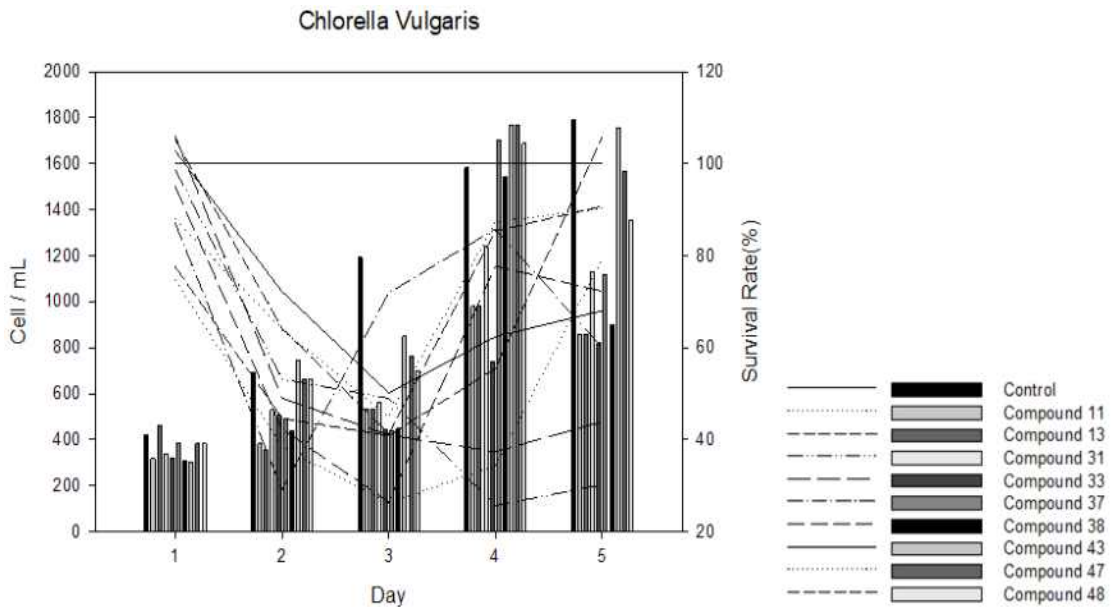


Figure 16. *Chlorella Vulgaris* cell count and algicidal activity of lead compound over time.

*Selena strum gracile*의 경우 전체적으로 4일 차에 세포 수가 매우 증가하여 세포 활성이 3일 차부터 낮아지다가 5일 경과 후 compound 11, 31, 33, 48을 제외하고 낮은 활

성을 보여주었다. *Chlorella vulgaris*는 Compound 31, 33을 제외하고 살조활성을 가지지 않았다. Compound 11, 13이 4일 차까진 높은 활성을 지녔으나 5일 차에 살조율이 급격히 떨어졌고, 나머지 화합물의 경우 시간에 따라 불규칙적인 변화를 보여주었다.

3.3.2 Microplate reader

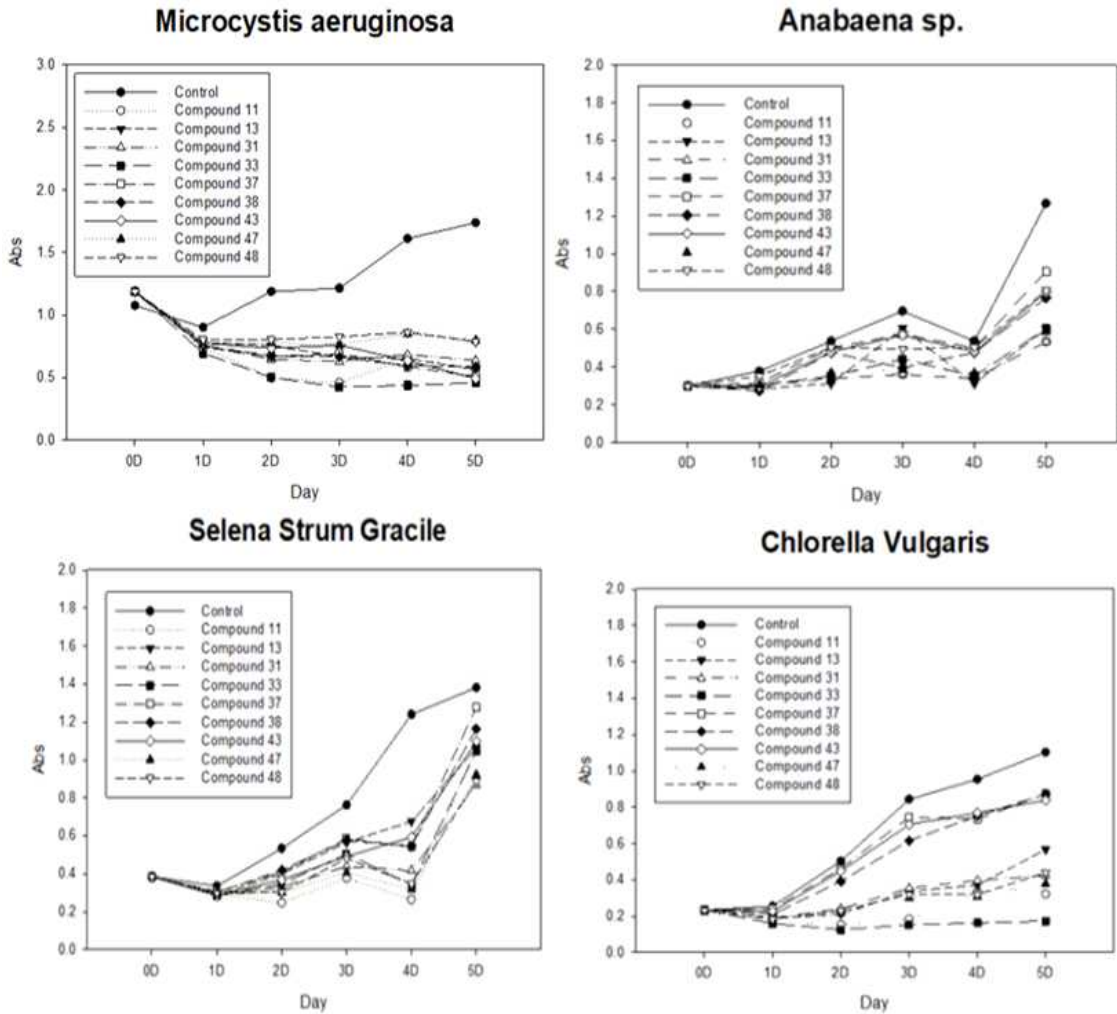


Figure 17. *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena Sp.*, *Selena strum gracile* and *Chlorella vulgaris* absorbance of lead compound over time.

Microplate reader를 이용하여 25°C 조건에서 680nm의 흡광도를 스크리닝하였다. *Microcystis aeruginosa*에서 control group은 5일 이후 4배 이상 흡광도가 증가하였고, 모든 화합물이 살조율이 올라감에 따라 낮은 흡광도를 나타내었다. *Anabaena Sp.*는 Cell counting 결과와 동일하게 compound 37, 38, 43을 제외하고 높은 살조활성을 보여주었

고, compound 37, 38, 43은 2일 차까진 대조군 대비 낮은 흡광도를 보이는 듯하였지만, 점차 유사하게 증가하였다. *Selena Strum Gracile*의 경우 cell counting 결과와 달리 compound 31 에서만 대조군 흡광도와 뚜렷한 차이를 보였고, 전체적으로 대조군으로 포함하여 4일 차에서 5일 차에 큰 차이를 보였다. *Chlorella Vulgaris* 는 control group 이 3일 차에 가장 큰 변화를 보였고, cell counting 결과와 달리 compound 11, 13, 48 에서도 대조군 대비 유의한 흡광도 차이가 나타났다.

3.4. Chlorophyll 측정

모든 photosynthetic organisms는 기본적으로 색소인 Chlorophyll-A를 가지고 광합성을 하기에 Chl-a의 양을 측정하여 Cell의 양을 정량화해 살조능력(Algicidal activity)을 확인하였다. 유해조류종인 *Microcystis aeruginosa*에 compound 11, 13, 31, 33, 37, 38, 43, 47, 48을 2 μ M로 처리한 후 5일간의 Chl-a양을 측정하였다.

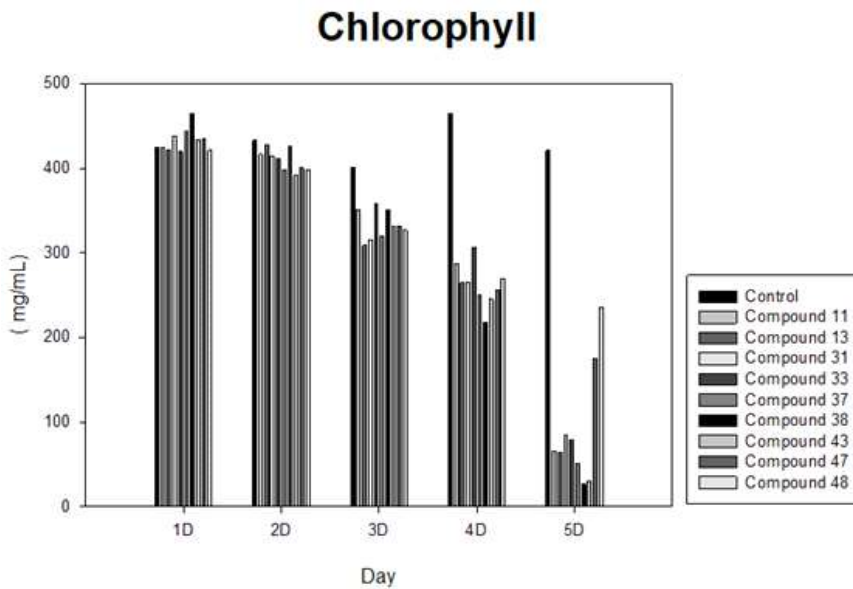


Figure 18. *Microcystis aeruginosa* chlorophyll of lead compound over time.

Control에서의 chlorophyll양은 3D에서 4D 사이에 가장 큰 변화를 보였으나 큰 차이는 보이지 않았다. 4D경과 후 대부분 화합물에서 40% 이상의 살조능력을 보여주었고, 5D에 Compound 11-48 각각 Control 대비 84%, 84%, 79%, 81%, 87%, 93%, 92%, 58%, 43%로 Chlorophyll 차이를 보여주었다.

3.5. 세포관찰

3.5.1 광학현미경(Light micro, LM)을 통한 세포분포 관찰

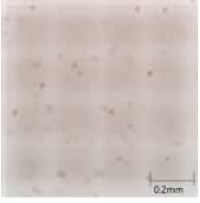
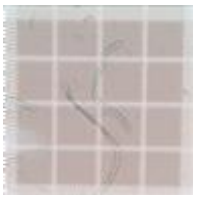
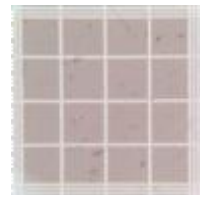
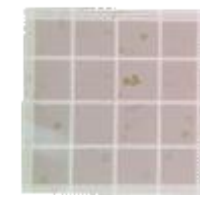





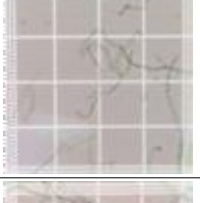

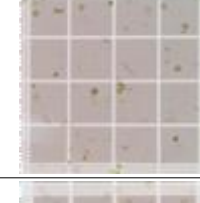
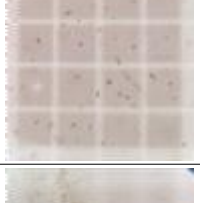
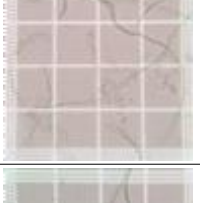
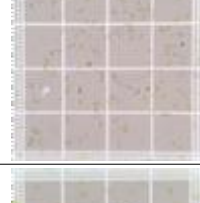


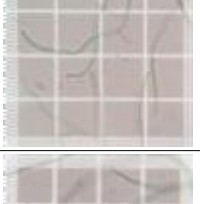
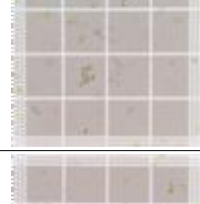
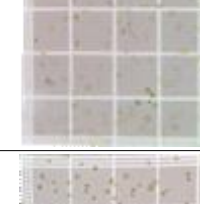
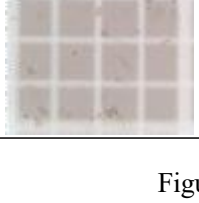
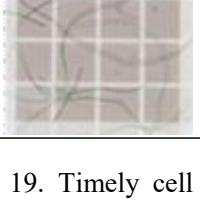
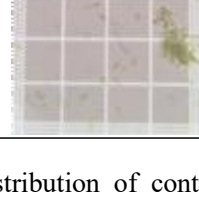
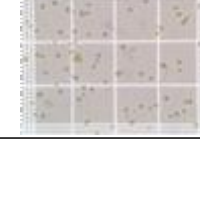
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	<i>Anabaena</i> Sp.	<i>Selena Strum Gracile</i>	<i>Chlorella Vulgaris</i>
0D				
1D				
2D				
3D				
4D				
5D				

Figure 19. Timely cell distribution of control


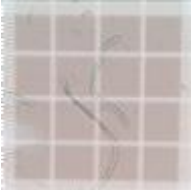

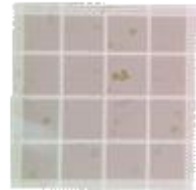

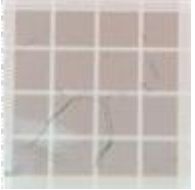

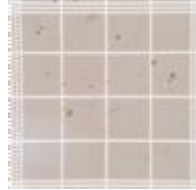


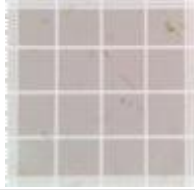





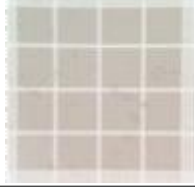
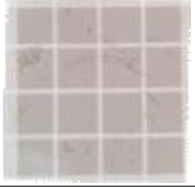
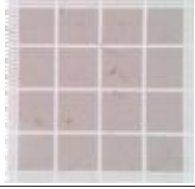
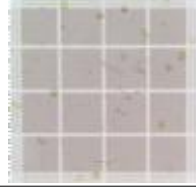


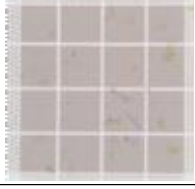

	<i>Microcystis aeruginosa</i>	<i>Anabaena Sp.</i>	<i>Selena Strum Gracile</i>	<i>Chlorella Vulgaris</i>
0D				
1D				
2D				
3D				
4D				
5D				

Figure 20. Changes in algicidal activity in compound 11 over time. Distribution of *microcystis aeruginosa*, *anabaena Sp.*, *selena strum gracile*, *chlorella vulgaris*.


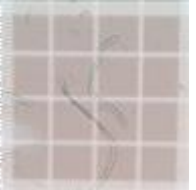

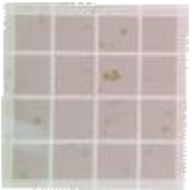






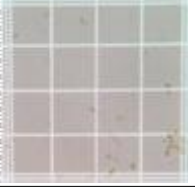
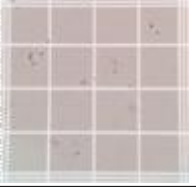












	<i>Microcystis aeruginosa</i>	<i>Anabaena Sp.</i>	<i>Selena Strum Gracile</i>	<i>Chlorella Vulgaris</i>
0D				
1D				
2D				
3D				
4D				
5D				

Figure 21. Changes in algicidal activity in compound 31 over time. Distribution of *microcystis aeruginosa*, *anabaena Sp.*, *selena strum gracile*, *chlorella vulgaris*.




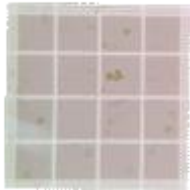



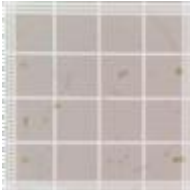



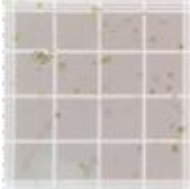



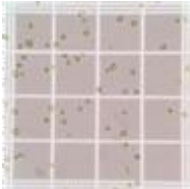
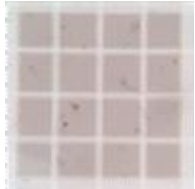

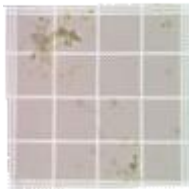
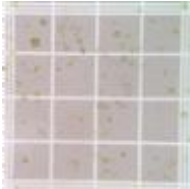

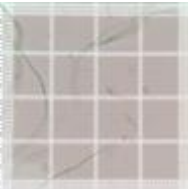
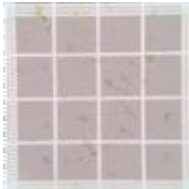
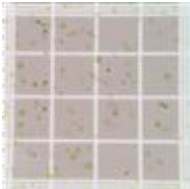
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	<i>Anabaena Sp.</i>	<i>Selena Strum Gracile</i>	<i>Chlorella Vulgaris</i>
0D				
1D				
2D				
3D				
4D				
5D				

Figure 22. Changes in algicidal activity in compound 37 over time. Distribution of *microcystis aeruginosa*, *anabaena Sp.*, *selena strum gracile*, *chlorella vulgaris*.




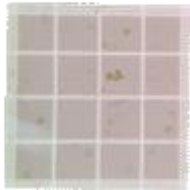



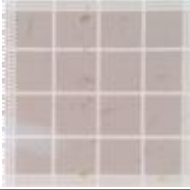


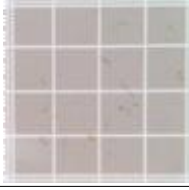
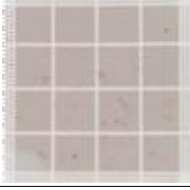







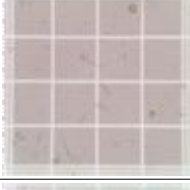



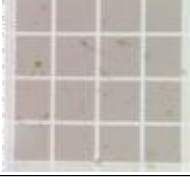
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	<i>Anabaena Sp.</i>	<i>Selena Strum Gracile</i>	<i>Chlorella Vulgaris</i>
0D				
1D				
2D				
3D				
4D				
5D				

Figure 23. Changes in algicidal activity in compound 47 over time. Distribution of *microcystis aeruginosa*, *anabaena Sp.*, *selena strum gracile*, *chlorella vulgaris*.

Figure 19-23은 각각 *microcystis aeruginosa*, *anabaena Sp.*, *selena strum gracile*,

chlorella vulgaris 4종의 시간에 따른 현미경 관찰 사진으로, control group, compound 11, 31, 37, 47 group이다. 전자현미경(Nikon, ECLI-PSE E100, 0.3A, 50~60 Hz)를 이용하여 400배율로 세포를 확인하였고, 각각의 figure는 hemocytometer기준 정중앙을 촬영한 것이다. control group의 경우 시간 경과에 따른 세포 모양의 변화가 없었고, 점차 군집을 이루며 세포의 수가 매우 증가하였다. 일반적으로 *microcystis aeruginosa*에 대해서 LC₅₀ 이상의 값을 처리하였기에 3일 차에 군집이 깨지고, 세포 수가 대조군 대비 매우 적었으며 대부분 세포막이 파괴됨을 확인하였다. *anabaena* Sp. 의 경우 control group의 세포분포가 가장 많이 증가하였으며 군집의 세포의 길이가 길어졌다. compound 11, 33번은 2일 차부터 큰 차이를 보여주었고, 3일 차부터 대부분 화합물에서 대조군과 차이를 보였으며, 세포의 길이가 짧아진 후 막 파괴도 관찰되었다. *selenastrum gracile*의 경우 control group에서 3일 이후 세포분포 차이는 크게 변화하지 않았으나 군집을 이루는 경향을 보였고, compound 11, 31번에서 높은 살조 능력이 확인되었다. *chlorella vulgaris*는 LC₅₀ 값과 달리 compound 37번을 제외하고 control group 대비 높은 세포 수 감소와 세포막 파괴가 관찰되었으나 5일 후에도 세포가 많이 현존함을 확인하였다.

3.5.2 주사전자현미경(SEM)을 통한 세포 형태 관찰

화합물을 처리하기 전·후의 세포 형태의 변화를 살펴보기 위해 조류 4종에 모두 효과를 보인 화합물 중 하나인 compound 48번을 선택하여 SEM을 통해 세포를 관찰하였다. 4종의 조류(Algae)를 각각 cell culture flask에 넣어 compound 47이 2 μM 이 되도록 준비한 뒤 light : dark(12:12) 조건으로 120h 노출하였다. 아래의 figure. 24 – 27은 대조군과 실험군의 FE-SEM으로 촬영한 세포사진이다.

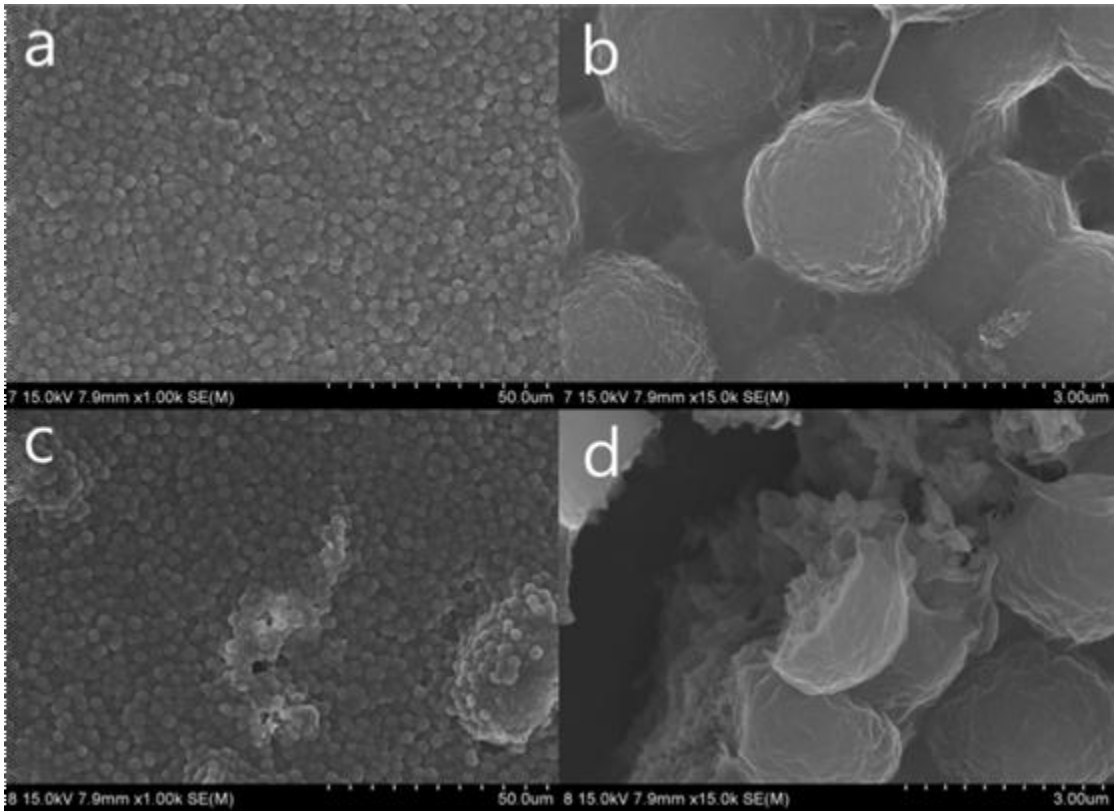


Figure. 24. SEM(Scanning Electron Microscope) image of *microcystis aeruginosa* at 120 h after the treatment with compound 47 at concentration of 2 μM (a) 1K magnification SEM images of control group. The shape of the cells before drug treatment was round. (b) High-magnification SEM images of Control group. (c) 1K magnification SEM images of an experimental group. The cell is partially broken. (d) High-magnification SEM images of an experimental group. The shape of the enlarged cell is distorted by peeling off the surrounding cell membrane.

Microcystis aeruginosa 대조군에서는 전체적으로 온전한 구의 형태로 밀집되어있다. 그러나 figure 24. (c)-(d)는 2 μ M 로 약물을 처리한 것으로 부분적으로 세포들이 뭉개져 형태를 알아볼 수 없었고, 15 K로 확대한 단일 세포를 보면 감싸는 막들이 파괴되어 세포의 형태를 띠지 않음을 확인할 수 있었다.

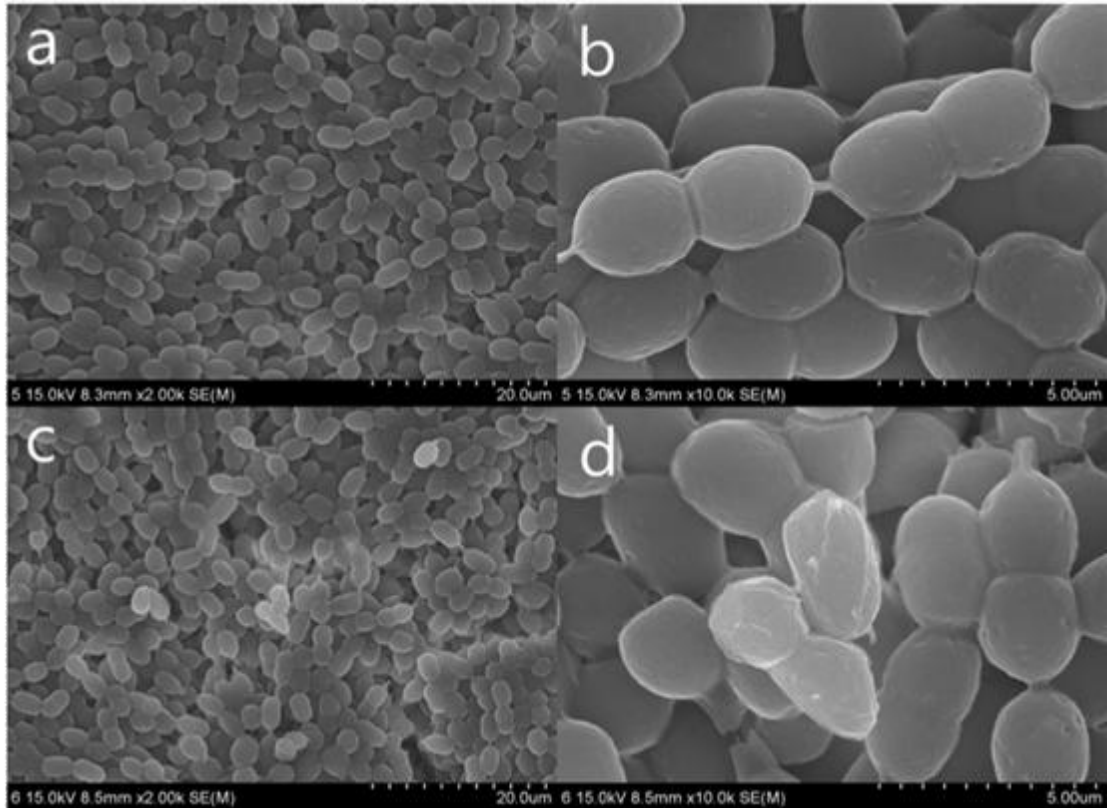


Figure. 25. SEM(Scanning Electron Microscope) image of *anabaena* Sp. at 120 h after the treatment with compound 47 at concentration of 2 μ M (a) 1K magnification SEM images of control group. The cells are connected long in a straight line or spiral. (b) High-magnification SEM images of control group. The cell is fully spherical or elliptical in shape and forms a colony. (c) 1K magnification SEM images of an experimental group. Partial destruction of the colony. (d) High-magnification SEM images of an experimental group. The membraned of a single cell is destroyed.

Figure 25. (a) - (b) *anabaena* Sp.에 약물을 처리하지 않은 대조군의 120h 후의 세포의 모습이며, (c) - (d)는 compound 48을 2 μ M 약물 처리하여 120 h 이 지난 후 세포의 모습이다. 대조군 세포는 직선이나 나선형으로 길게 연결되어 군집형태를 이루고

있었고, 10K 확대하여 보아도 세포막 파괴 없이 완전한 구형 또는 타원형이었다. 그러나 약물을 처리한 후의 모습은 전체적으로는 대조군과 유사한 밀집도를 가지는 듯하였지만 높은 배율로 확대하여 살펴보니 세포의 군집이 깨지고 있었고, 단일 세포들의 막이 깨져 세포의 형태가 온전하지 못하였다.

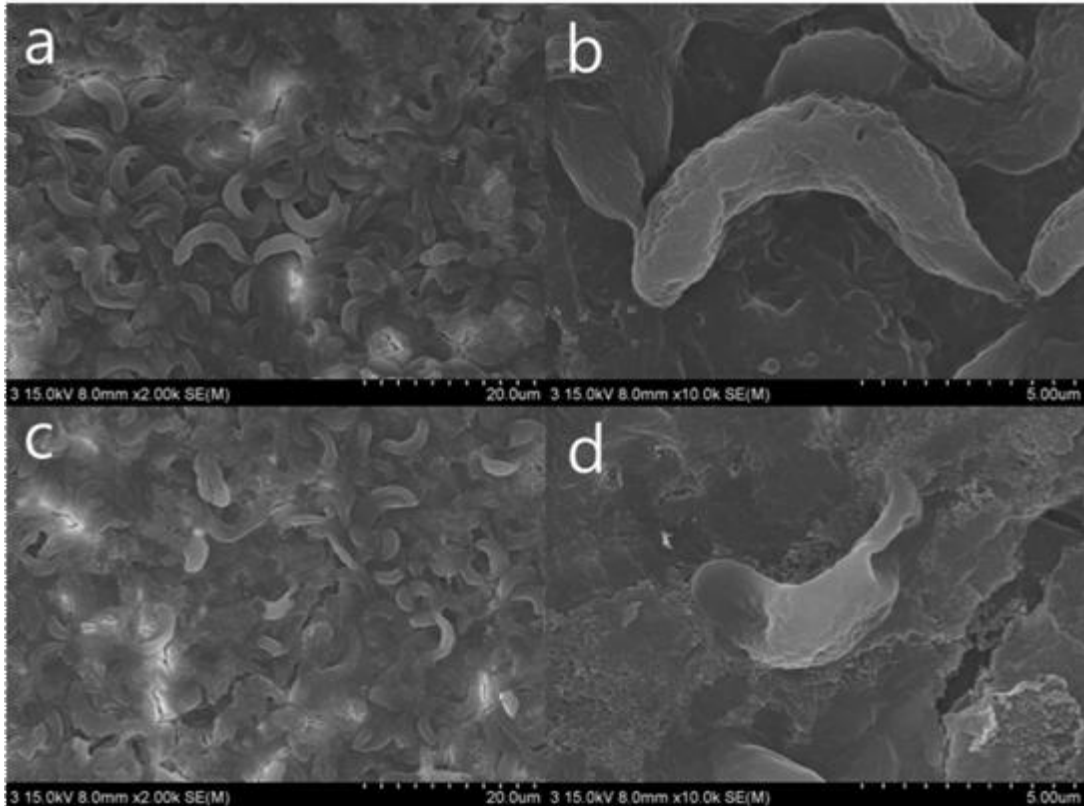


Figure. 26. SEM(Scanning Electron Microscope) image of *selen astrum* at 120 h after the treatment with Compound 47 at concentration of 2 μ M (a) 1K magnification SEM images of control group. Cells are arranged regularly. (b) High-magnification SEM images of Control group. The cells are crescent-shaped. (c) 1K magnification SEM images of an experimental group. (d) High-magnification SEM images of an experimental group. The shape of the cell is destroyed.

Figure 26. (a) - (b) *Selenastrum Gracile*에 약물을 처리하지 않은 대조군의 120h 후의 세포 모습이며, (c) - (d)는 compound 48을 2 μ M 약물 처리하여 120 h 이 지난 후 세포의 모습이다. 대조군의 *Selenastrum Gracile*는 세포분열을 활발히 하며 규칙적으로 배열되어있다. 단일세포를 확대하면 초승달 모양을 지니고 있었다. Figure 24 - 25과 달리

Figure 26. (c)는 (a) 대조군과 큰 차이가 발견되지 않았다. 이는 compound 49의 *Selenastrum Gracile*에 대한 LC50 값 3.713보다 더 낮은 농도로 처리하였기 때문으로 보인다. 그러나 Figure 23. (d)에서와 같이 높은 배율로 확대 시 부분적으로 단일세포에서 세포막 파괴를 발견할 수 있다.

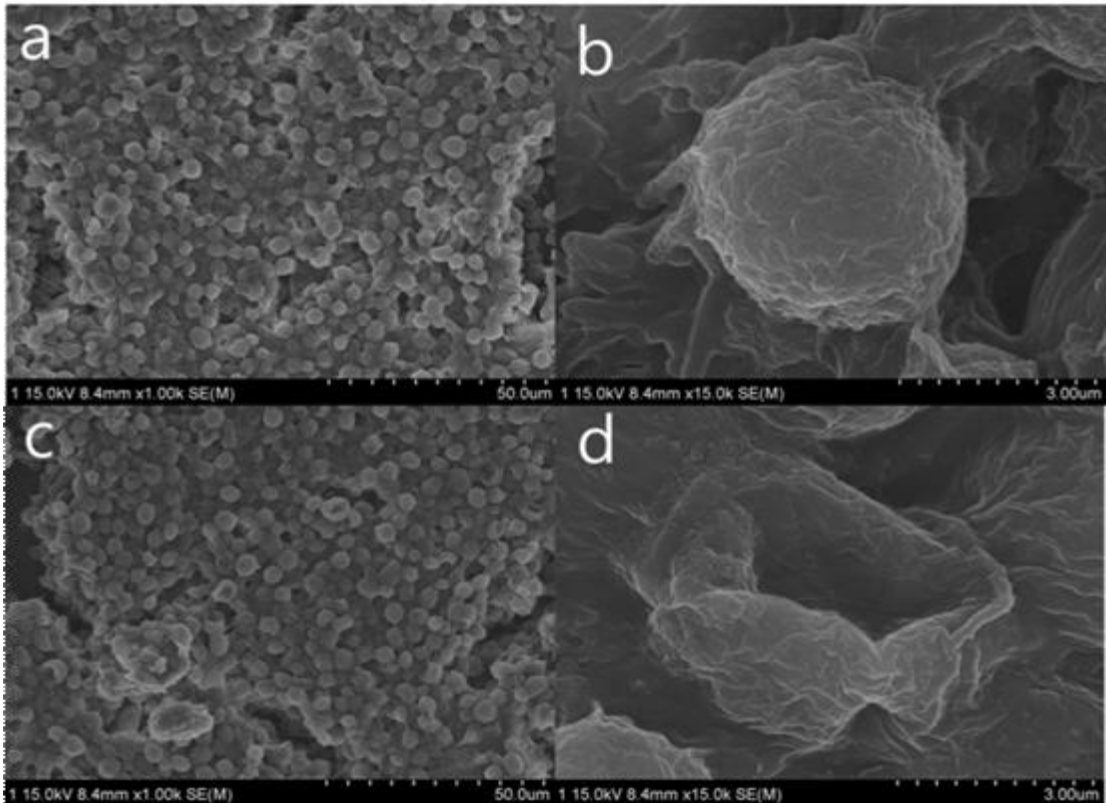


Figure 27. SEM(Scanning Electron Microscope) image of *Chlorella Vulgaris* at 120 h after the treatment with compound 47 at concentration of 2 μ M (a) 1K magnification SEM images of control group. It forms a single or small group. (b) High-magnification SEM images of Control group. round shape. (c) 1K magnification SEM images of an experimental group. Some cells look destroyed. (d) High-magnification SEM images of an experimental group. cell destruction.

Figure 27. (a) - (b) *Chlorella Vulgaris*에 약물을 처리하지 않은 대조군의 120 h 후의 세포의 모습이며, (c) - (d)는 compound 48을 2 μ M 약물 처리하여 120 h 이 지난 후 세포의 모습이다. 대조군은 동그란 구형 또는 타원형으로 군체를 작은 군체를 이루고 있고, 화합물 처리 후에는 *selena strum gracile*와 같이 부분적 세포의 파괴만을 보여주

었다.

같은 농도로 조류(Algae)에 화합물을 처리하였을 때 *microcystis aeruginosa*에서 가장 큰 차이가 보여주었고, 전체적으로 무해조류로 분류되는 *selena strum gracile*, *chlorella vulgaris*에서는 부분적 세포 파괴를 보여주었다.

3.6. 물벼룩(*Daphnia magna*) 급성 독성평가

Lead compound로 선정된 화합물 9종에 대해 물벼룩 급성 독성 시험을 진행하였다. control과 실험군 각각에 물벼룩을 5마리씩 넣어 48시간 동안 지수식 시험조건에서 물벼룩의 치사율과 유영저해와 같은 독성증상을 살펴보았다. 아래의 Table 24는 물벼룩의 50%가 유영저해를 일으키는 농도인 EC₅₀값으로 figure. 31은 각각의 compound의 EC₅₀값을 도식화한 것이다.

Compound	EC ₅₀ (μM)
11	25<
13	11.1
31	17.4
33	8.8
37	25<
38	22.7
43	20.6
47	25<
48	25<

Table 24. *Daphnia magna* EC₅₀ values for lead compound

Compound 33번은 가장 높은 살조율을 가졌지만, EC₅₀값이 8.8로 독성이 높았다. compound 13, 31번 또한 11.1, 17.4로 8.8보다는 높지만, compound 11번에 비하여 높은 독성을 가짐을 알 수 있다. 전체적으로 Ether 화합물의 경우 amine 화합물보다 더 높은 안전성을 가졌고, compound 11, 37, 47, 48에서 *Daphnia magna* 에 대한 독성이 낮았다.

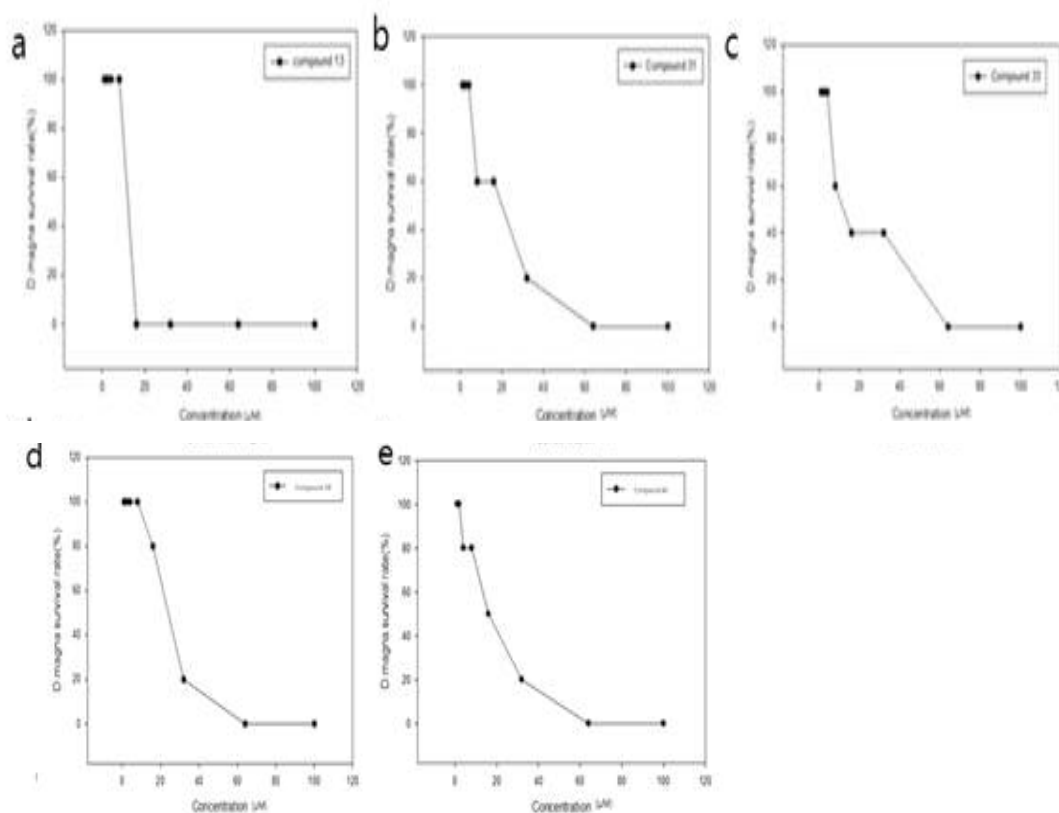


Figure. 28. *Daphnia magna* EC₅₀ graph of lead compounds. (a) 11.14 µM EC₅₀ value of *Daphnia magna* in compound 13. (b) 117.47 µM EC₅₀ value of *Daphnia magna* in compound 31. (c) 8.81 µM EC₅₀ value of *Daphnia magna* in compound 33. (d) 22.71 µM EC₅₀ value of *Daphnia magna* in compound 38. (e) 20.69 µM EC₅₀ value of *Daphnia magna* in compound 43.

3.7. Zebra fish(*Danio rerio*) 급성 독성평가

물벼룩 급성 독성 시험결과 낮은 독성을 가진 화합물을 선정하여 제브라피쉬 급성 독성을 진행하였다. control과 실험군 각각에 제브라피쉬를 각각 5마리씩 넣어 120 시간 동안 제브라피쉬의 치사율과 유영저해와 같은 독성증상을 살펴보았다. 아래의 table 25는 50% 제브라피쉬가 사망 일으키는 농도인 EC₅₀값으로 figure. 32 - 34는 각각의 compound의 EC₅₀값과 EC₅₀에서 시간에 따른 사망률을 도식화한 것이다.

Compound	EC ₅₀ (μM)
11	40.2
37	10>
47	100<
48	95

Table 25. *Danio rerio*(Zebrafish) EC₅₀ values for lead compound

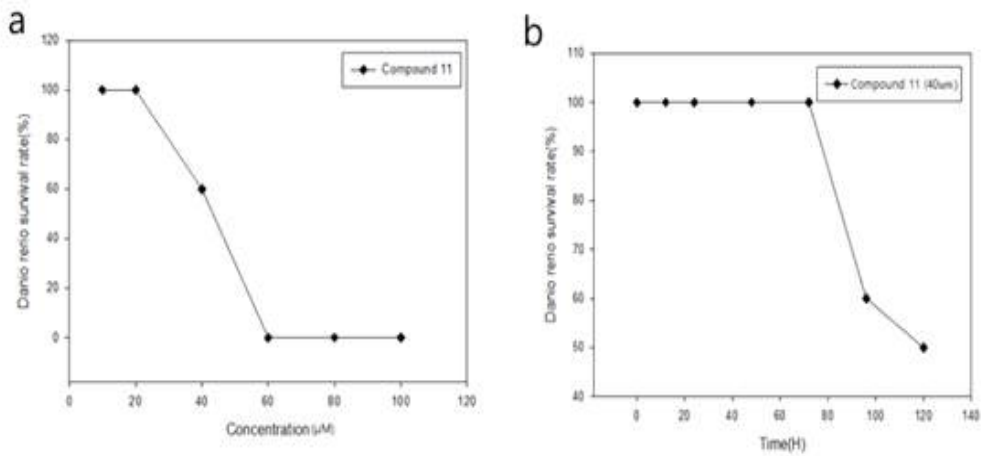


Figure. 29. *Danio rerio* Survival rate of Compound 11. (a) Survival rate of time variation by concentration. (b) Survival rate over time of Compound 11 at 40 μM

compound 11의 EC₅₀값은 40.27 μM로 물벼룩 독성 값과 큰 차이를 보이지 않았고, 4 일 차 이후 50%의 사망이 발견되었다.

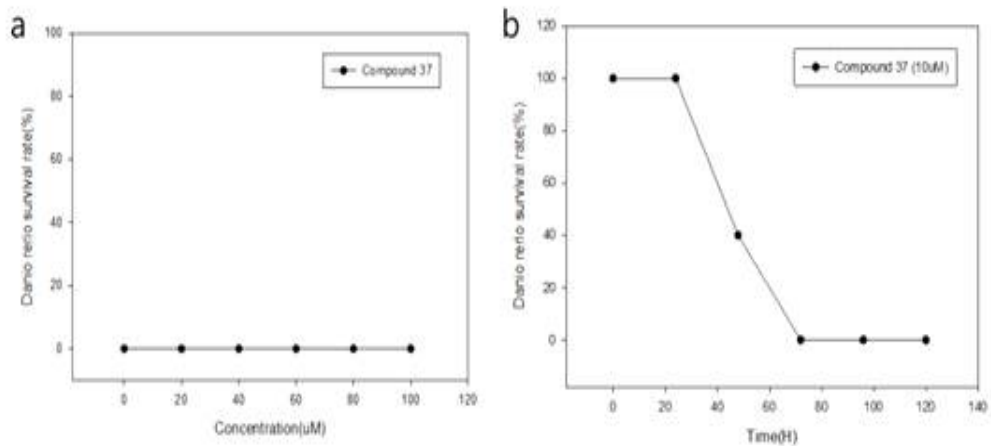


Figure. 30. *Danio rerio* Survival rate of Compound 37 (a) Survival rate of time variation by concentration. (b) Survival rate over time of Compound 37 at 10 μM

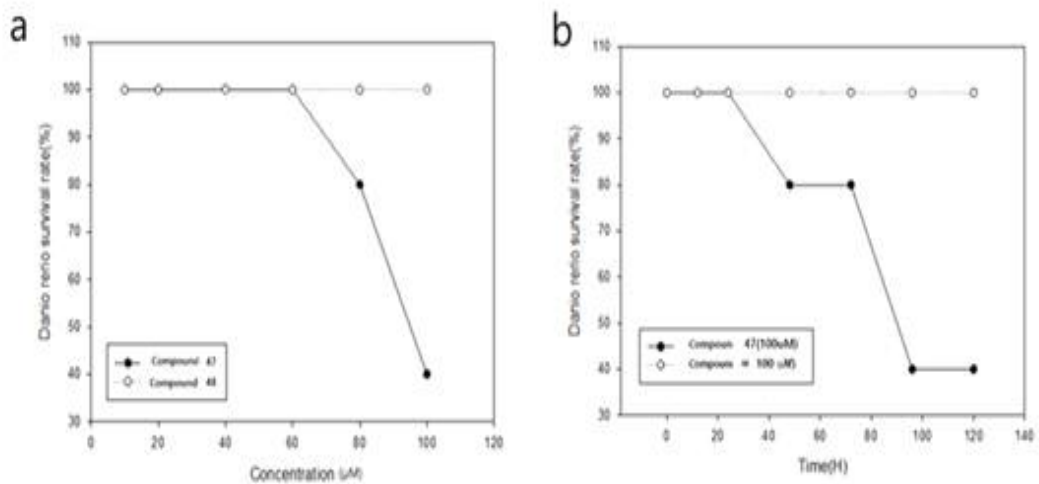


Figure. 31. *Danio rerio* Survival rate of Compound 47, 48. (a) Survival rate of time variation by concentration. (b) Survival rate over time of Compound 47, 48 at 100 μM

compound 12는 물벼룩 급성시험 결과와 달리 제브라피쉬 독성시험결과 매우 높은 독성을 지녔으며 2일 차에 실험 최소농도인 10 μM에서 100% 사망을 보여주었다. compound 47, 48은 낮은 독성을 보여주었고, compound 47은 실험 최고농도인 100 μM에서 3일 차까지 100% 생존하였고 5일 차에 40% 생존율을 보였다. compound 48은 실험 최고농도인 100 μM에서 100% 생존하여 EC₅₀값을 도출할 수 없었다.

4. Conclusion

*Microcystis aeruginosa*와 같은 cyanobacteria의 경우 cyanoHABs를 일으켜 악취뿐만 아니라 수 생태계를 파괴하고, 농수로로 흘러 들어가 농작물에 축적되거나 식수를 오염시켜 독소에 의한 질병을 일으키고 수자원 확보에 문제를 야기하고 있다. 현재 monitoring과 살조제 개발이 진행되고 있으나 외부부하차단법과 응집제를 통한 물리적 처리, diuron 과 같은 살조물질은 서론에서의 고찰로 보아 생물을 침전시켜 생태계 교란을 일으키거나 분해물질이 어류 사망을 일으키는 2차 피해를 발생시키는 문제를 발생시킨다. 따라서 이러한 문제점을 개선하기 위해 cyanoHABs를 효율적으로 제어하기 위한 물질을 개발해야한다.

본 연구에서는 이전의 연구에서 대표적인 약물을 스크리닝하여 HABs를 효율적으로 억제하는 비타민 K 유도체인 1,4-naphthoquinone을 Coro로 하여 53개의 유도체를 합성하였다. 1,4-naphthoquinone은 생물학적제약물질로 유효한 효능이 입증되었고, 생물 유래 물질로 상대적으로 생태계에서 자연분해가 되기 쉬워 화학적 처리방법을 통한 2차 피해가 발생하지 않을 것으로 판단된다.

Cyanobacteria를 제어효율을 판단하기 위해 *microcystis aeruginosa*에 살조율을 측정하였다. 사슬길이가 2, 3, 4개이며, 고리가 작을수록 LC₅₀ 값이 낮았으며 구조적 입체장애와 치환기의 종류에 따라 활성에 차이를 보였고, pryidine > althoxy > alkoxyalkyl > alkyl amine group이 도입된 화합물이 높은 살조 능력을 보였다.

Compound 53개 중 1.5 μM 이하에서 LC₅₀를 가지는 9종의 lead compound를 선정하였고, 유해 남조류 2종(*Microcystis aeruginosa*, *Anabaena* Sp.)과 무해 녹조류 2종(*Selena Strum Gracile*, *Chlorella Vulgaris*)에 대한 살조능력과 시간에 따른 살조활성의 변화를 관찰하였다. chlorohyll을 측정하여 결과를 비교해 보았고, microplate reader를 이용해 흡광도를 측정한 결과 cell counting법과 경향성은 일치하나 일부 동일한 양상을 보이지 않았다. 이는 완전한 사멸이 되지 않는 세포의 흡광도 값이 기인한 것으로 생각된다. 따라서 짧은 시간에 LC₅₀ 값을 도출하여 시간에 대한 오차를 줄인다는 장점이 있으나 microplate reader를 이용한 측정법에는 한계점이 존재하는 것으로 생각되며, cell counting 방법과는 동일한 경향성이 확인되기에 1차적인 후보물질을 선정하는데 효과적인 분석방법이라고 판단된다.

Cyanobacteria와의 작용을 전자현미경을 통한 형태학적 분석을 진행하였다. 그 결과

cyacnobacteria에 화합물을 처리한 후 시간이 경과함에 따라 군집이 작아지거나 단일적으로 존재하며, 세포막이 파괴됨을 확인할 수 있었다. 따라서 메커니즘은 규명할 수 없었으나 해당 화합물의 살조능력은 세포 막 파괴와 연관되었을 것으로 생각된다.

수 생태 독성실험을 위해 물벼룩(*Daphnia magna*)과 제브라피쉬(Zebrafish : *Danio rerio*)를 이용해 급성 독성 시험을 진행하였다. 물벼룩의 유영저해를 판단하여 급성 평가한 결과 compound 33, 31, 13에서 높은 독성을 나타내었고, compound 11, 37, 48은 25 uM 이상으로 저독성을 보여주었다. 물벼룩 급성 독성평가에서 저독성을 보인 compound에 대하여 추가로 제브라피쉬 급성 독성평가를 진행하였고, compound 37은 물벼룩 독성이 낮음에도 불구하고 최소농도인 10 uM 노출 시 2일 차에 100% 사멸하였다. compound 47은 처리 농도에서 100% 생존하여 EC₅₀값을 도출할 수 없었고, 추가 실험은 진행하지 않고 low toxicity로 분류하였다. 본 실험에서는 최대 14일까지 독성실험은 확인하였으나 추가로 수 생태계에서 분해되어 2차 독성을 일으키지 않는지에 대한 검증이 필요할 것으로 생각된다.

살조능력이 높은 화합물의 경우 독성 값 (EC₅₀ 8.8 μM)이 높았고, 물벼룩과 제브라피쉬 종 모두에 낮은 독성을 가진 compound 47, 48의 경우 compound 33과 비교하여 3배 이상의 살조능력 차이를 가졌다. 그러므로 1,4-Naphthoquinone을 기반으로 신규 유도체를 발하여 안전성과 효능 모두 높은 화합물에 관한 연구가 더욱 필요하다고 생각된다.

(1) 2-(ethylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 51 %

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.06(dd, *J*=6.96, 0.75 Hz, 1H), δ 8.00(dd, *J*=7.71, 1.47 Hz, 1H), δ 7.68(td, *J*=7.32, 1.44 Hz, 1H), δ 7.57 (td, *J*=7.68, 1.44 Hz, 1H), δ 5.79 (s, 1H), δ 5.69(s, 1H), δ 3.18(m, 3H), δ 1.30 (t, *J*=7.32 Hz, 2H)

(2) 2-(propylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 45.7 %

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.11(dd, *J*=6.60, 1.08 Hz, 1H), δ 8.05(dd, *J*=6.21, 1.08 Hz, 1H), δ 7.72(td, *J*=1.47, 0.62 Hz, 1H), δ 7.63 (td, *J*=1.47, 0.62 Hz, 1H), δ 5.90(s, 1H), δ 5.73(s, 1H), δ 3.16(sext, *J*=7.32 Hz, 2H), δ 1.04(t, *J*=7.32 Hz, 3H)

(3) 2-(isopropylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 63 %

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.08(dd, *J*=8.61, 1.08 Hz, 1H), δ 8.02(dd, *J*=8.61, 1.08 Hz, 1H), δ 7.72(td, *J*=8.79, 1.11 Hz, 1H), δ 7.60(td, *J*=8.79, 1.11 Hz, 1H), δ 5.78(s, 1H), δ 5.73(s, 1H), δ 3.64(m, 1H), δ 1.30(d, *J*=6.57 Hz, 2H)

(4) 2-(butylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 43.5%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.06(dd, *J*=8.05, 1.08 Hz, 1H), δ 8.01(dd, *J*=8.05, 1.08 Hz, 1H), δ 7.70(td, *J*=1.11, 0.62 Hz, 1H), δ 7.59(td, *J*=1.11, 0.62 Hz, 1H), δ 5.86(s, 1H), δ 5.71(s, 1H), δ 3.16(q, *J*=6.96 Hz, 2H), δ 1.71(m, 2H), δ 1.48 (sext, *J*=10.02, 2H), δ 0.97(t, *J*=7.32 Hz, 3H)

(5) 2-(isobutylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 54.2 %

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.06(dd, *J*=7.69, 1.08 Hz, 1H), δ 8.03(dd, *J*=7.69, 1.08 Hz, 1H), δ 7.72(td, *J*=8.60, 1.44 Hz, 1H), δ 7.61(td, *J*=8.60, 1.44 Hz, 1H), δ 5.98(s, 1H), δ 5.73(s, 1H), δ 3.02(q, *J*=6.6 Hz, 2H), δ 2.04(m, 1H), δ 1.32 (m, 2H), δ 1.05(d, *J*=6.57 Hz, 6H)

(6) 2-(sec-butylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 53.2 %

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.06(dd, $J=7.69$, 1.08 Hz, 1H), δ 8.03(dd, $J=7.69$, 1.08 Hz, 1H), δ 7.72(td, $J=8.60$, 1.44 Hz, 1H), δ 7.61(td, $J=8.60$, 1.44 Hz, 1H), δ 5.98(s, 1H), δ 5.73(s, 1H), δ 3.02(q, $J=6.6$ Hz, 2H), δ 2.04(m, 1H), δ 1.32 (m, 2H), δ 1.05(d, $J=6.57$ Hz, 6H)

(7) 2-(tert-butylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 38 %

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.07(dd, $J=7.87$, 1.11 Hz, 1H), δ 8.02(dd, $J=7.87$, 1.11 Hz, 1H), δ 7.72(td, $J=8.78$, 1.47 Hz, 1H), δ 7.60(td, $J=8.78$, 1.47 Hz, 1H), δ 5.97(s, 1H), δ 1.65(m, 9H)

(8) 2-(pentylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 47.3%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.10(dd, $J=8.79$, 1.11 Hz, 1H), δ 8.01(dd, $J=8.79$, 0.75 Hz, 1H), δ 7.74(td, $J=7.68$, 1.47 Hz, 1H), δ 7.65(td, $J=7.68$, 1.11 Hz, 1H), δ 5.90(s, 1H), δ 5.74(s, 1H), δ 3.22(q, $J=6.96$ Hz, 2H), δ 1.73(m, 2H), δ 1.42(m, 4H), δ 0.96(t, $J=6.6$ Hz, 3H)

(9) 2-(hexylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 59.2%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.10(dd, $J=6.57$, 1.11 Hz, 1H), δ 8.04(dd, $J=6.60$, 1.11 Hz, 1H), δ 7.74(td, $J=7.68$, 1.44 Hz, 1H), δ 7.62(td, $J=7.32$, 1.11 Hz, 1H), δ 5.88(s, 1H), δ 5.72(s, 1H), δ 3.19(q, $J=6.96$ Hz, 2H), δ 1.72(m, 2H), δ 1.38(m, 4H), δ 0.91(t, $J=6.57$ Hz, 3H)

(10) 2-(heptylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 42.1%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.06(dd, $J=6.6$, 1.11 Hz, 1H), δ 8.03(dd, $J=7.71$, 1.11 Hz, 1H), δ 7.70(td, $J=7.35$, 1.47 Hz, 1H), δ 7.59(td, $J=7.68$, 1.44 Hz, 1H), δ 5.86(s, 1H), δ

5.70(s, 1H), δ 3.18(q, $J=6.96$ Hz, 2H), δ 1.71(m, 2H), δ 1.32(m, 4H), δ 0.89(t, $J=6.96$ Hz, 3H)

(11) 2-(cyclopropylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 62.0%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.09(dd, $J=7.68$, 1.44 Hz, 1H), δ 8.01(dd, $J=7.71$, 1.11 Hz, 1H), δ 7.72(td, $J=7.71$, 1.47 Hz, 1H), δ 7.61(td, $J=7.71$, 1.47 Hz, 1H), δ 6.08(s, 1H), δ 5.97(s, 1H), δ 3.18(sext, $J=2.55$ Hz, 1H), δ 0.91(m, 2H), δ 0.66(m, 2H)

(12) 2-(cyclobutylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 43.8 %

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.08(dd, $J=7.68$, 1.11 Hz, 1H), δ 8.01(dd, $J=7.68$, 1.08 Hz, 1H), δ 7.72(td, $J=7.68$, 1.47 Hz, 1H), δ 7.61(td, $J=7.32$, 1.47 Hz, 1H), δ 5.97(s, 1H), δ 5.62(s, 1H), δ 3.96(sext, $J=6.96$ Hz, 1H), δ 2.47(m, 2H), δ 2.03(m, 4H)

(13) 2-(cyclopentylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 68 %

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.08(dd, $J=7.68$, 1.44 Hz, 1H), δ 8.02(dd, $J=7.71$, 1.11 Hz, 1H), δ 7.71(td, $J=7.71$, 1.47 Hz, 1H), δ 7.60(td, $J=7.71$, 1.47 Hz, 1H), δ 5.85(s, 1H), δ 5.75(s, 1H), δ 3.80(sext, $J=4.74$ Hz, 1H), δ 2.09(m, 8H)

(14) 2-(cyclohexylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 57 %

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.06(dd, $J=8.23$, 1.44 Hz, 1H), δ 8.00(dd, $J=8.23$, 1.11 Hz, 1H), δ 7.72(td, $J=8.51$, 1.47 Hz, 1H), δ 7.61(td, $J=8.51$, 1.47 Hz, 1H), δ 5.81(s, 1H), δ 5.73(s, 1H), δ 3.28(sext, $J=4.03$ Hz, 1H), δ 2.04(m, 2H), δ 1.81(m, 2H), δ 1.67(m, 2H), δ 1.43(m, 4H)

(15) 2-(cyclohexylmethylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 68 %

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.09(dd, $J=8.05$, 0.75 Hz, 1H), δ 8.08(dd, $J=8.05$, 0.75 Hz,

1H), δ 7.72(td, $J=8.42$, 1.11 Hz, 1H), δ 7.61(td, $J=8.42$, 1.11 Hz, 1H), δ 6.00(s, 1H), δ 5.77(s, 1H), δ 3.05(t, $J=6.6$ Hz, 2H), δ 1.81(m, 11H)

(16) 2-(cycloheptylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 41.2 %

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.11(dd, $J=7.71$, 1.44 Hz, 1H), δ 8.05(dd, $J=7.71$, 1.11 Hz, 1H), δ 7.72(td, $J=9.61$, 1.47 Hz, 1H), δ 7.61(td, $J=9.61$, 1.47 Hz, 1H), δ 5.67(s, 1H), δ 5.66(s, 1H), δ 3.46(sext, $J=4.05$ Hz, 1H), δ 2.00(m, 12H)

(17) 2-(phenylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 77.6 %

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.05(dd, $J=9.06$, 1.44 Hz, 1H), δ 7.93(dd, $J=9.06$, 1.11 Hz, 1H), δ 7.88(td, $J=7.23$, 1.47 Hz, 1H), δ 7.84(td, $J=7.23$, 1.44 Hz, 1H), δ 7.47(m, 5H), δ 7.24(m, 1H), δ 6.01(s, 1H)

(18) 2-(benzylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 74.2 %

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.21(t, $J=7.32$ Hz, 1H), δ 8.00(d, $J=7.32$ Hz, 1H), δ 7.90(d, $J=7.71$ Hz, 1H), δ 7.83(t, $J=7.32$ Hz, 1H), δ 7.74(t, $J=7.32$ Hz, 1H), δ 7.34(m, 5H), δ 5.55(s, 1H)

(19) 2-(phenylethylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 75.1 %

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.97(dd, $J=6.6$, 1.2 Hz, 1H), δ 7.88(dd, $J=6.6$, 1.44 Hz, 1H), δ 7.59(td, $J=7.71$, 1.47 Hz, 1H), δ 7.50(td, $J=7.68$, 1.44 Hz, 1H), δ 7.21(m, 5H), δ 5.80(s, 1H), δ 5.64(s, 1H), δ 3.33(q, $J=5.88$ Hz, 2H), δ 2.87(t, $J=7.32$ Hz, 2H)

(20) 2-(3-phenylpropylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 63.4 %

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.26(s, 1H), δ 7.99(dd, $J=7.68$, 1.44 Hz, 1H), δ 7.94(dd, $J=9.06$, 1.11 Hz, 1H), δ 7.84(td, $J=6.24$, 1.11 Hz, 1H), δ 7.74(td, $J=7.68$, 1.47 Hz, 1H), δ

7.69(t, $J=6.24$ Hz, 2H), δ 7.30(m, 5H), δ 5.63(s, 1H), δ 3.20(q, $J=6.96$ Hz, 2H), δ 2.64(t, $J=8.04$ Hz, 2H), δ 1.90(quint, $J=6.96$ Hz, 2H)

(21) 2-(2-fluorophenylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 63.4 %

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.17(s, 1H), δ 8.09(dd, $J=7.32$, 1.11 Hz, 1H), δ 7.96(dd, $J=7.32$, 1.11 Hz, 1H), δ 7.88(td, $J=7.71$, 1.47 Hz, 1H), δ 7.83(td, $J=5.88$, 1.44 Hz, 1H), δ 7.46(m, 5H), δ 7.30(m, 4H), δ 5.56(s, 1H)

(22) 2-(3-fluorophenylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 79.2 %

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.32(s, 1H), δ 8.07(d, $J=7.32$ Hz, 1H), δ 7.97(d, $J=7.32$ Hz, 1H), δ 7.89(t, $J=7.32$ Hz, 1H), δ 7.82(t, $J=7.32$ Hz, 1H), δ 7.50(q, $J=7.32$ Hz, 1H), δ 7.27(m, 2H), δ 7.06(t, $J=8.07$ Hz, 1H), δ 6.21(s, 1H)

(23) 2-(4-fluorophenylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 78.4 %

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.32(s, 1H), δ 8.06(dd, $J=7.68$, 1.08 Hz, 1H), δ 7.95(dd, $J=7.68$, 1.47 Hz, 1H), δ 7.95(td, $J=6.24$, 1.44 Hz, 1H), δ 7.80(td, $J=7.68$, 1.47 Hz, 1H), δ 7.43(m, 2H), δ 7.30(m, 2H), δ 5.98(s, 1H)

(24) 2-(2-chlorophenylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 80.2 %

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.12(dd, $J=6.6$, 1.47 Hz, 1H), δ 8.10(dd, $J=6.6$, 0.72 Hz, 1H), δ 7.78(td, $J=7.68$, 1.47 Hz, 1H), δ 7.70(td, $J=7.32$, 1.08 Hz, 1H), δ 7.49(m, 2H), δ 7.35(td, $J=7.68$, 1.08 Hz, 1H), δ 7.16(td, $J=7.32$, 1.47 Hz, 1H), δ 6.37(s, 1H)

(25) 2-(3-chlorophenylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 82.3 %

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.33(s, 1H), δ 8.08(dd, $J=6.6$, 1.08 Hz, 1H), δ 7.97(dd, $J=7.68$, 1.47 Hz, 1H), δ 7.89(td, $J=7.32$, 1.47 Hz, 1H), δ 7.82(td, $J=7.32$, 1.47 Hz, 1H), δ 7.49(m, 3H), δ 7.28(m, 2H), δ 6.17(s, 1H)

(26) 2-(4-chlorophenylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 79.1 %

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.31(s, 1H), δ 8.08(d, *J*=7.32 Hz, 1H), δ 7.96(d, *J*=6.93 Hz, 1H), δ 7.86(t, *J*=7.32 Hz, 1H), δ 7.79(t, *J*=7.32 Hz, 1H), δ 7.51(m, 4H), δ 6.13(s, 1H)

(27) 2-(2-methoxyphenylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 87.4 %

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.68(s, 1H), δ 8.07(dd, *J*=6.96, 1.08 Hz, 1H), δ 7.96(dd, *J*=7.32, 1.47 Hz, 1H), δ 7.88(td, *J*=6.21, 1.47 Hz, 1H), δ 7.79(td, *J*=6.21, 1.47 Hz, 1H), δ 7.38(d, *J*=7.68 Hz, 1H), δ 7.30(t, *J*=8.07 Hz, 1H), δ 7.18(d, *J*=7.32 Hz, 1H), δ 7.06(t, *J*=7.68 Hz, 1H), δ 5.77(s, 1H), δ 3.84(s, 1H)

(28) 2-(3-methoxyphenylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 88 %

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.20(s, 1H), δ 8.07(dd, *J*=7.32, 1.08 Hz, 1H), δ 7.96(dd, *J*=8.04, 1.47 Hz, 1H), δ 7.89(td, *J*=7.32, 2.58 Hz, 1H), δ 7.81(td, *J*=7.32, 2.58 Hz, 1H), δ 7.37(t, *J*=8.43 Hz, 1H), δ 6.99(m, 2H), δ 6.82(dd, *J*=8.4, 2.55 Hz, 1H), δ 6.15(s, 1H), δ 3.76(s, 3H)

(29) 2-(4-methoxyphenylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 81.9 %

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.18(s, 1H), δ 8.07(dd, *J*=6.57, 1.11 Hz, 1H), δ 7.95(dd, *J*=7.32, 1.11 Hz, 1H), δ 7.88(td, *J*=7.32, 1.47 Hz, 1H), δ 7.80(td, *J*=7.32, 1.47 Hz, 1H), δ 7.31(d, *J*=8.79 Hz, 2H), δ 7.03(d, *J*=8.79 Hz, 2H), δ 5.92(s, 1H), δ 3.78(s, 3H)

(30) 2-(3,4,5-trimethoxyphenylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 73.5 %

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.57(d, *J*=7.47 Hz, 1H), δ 8.14(t, *J*=5.85 Hz, 1H), δ 8.02(dd, *J*=7.68, 1.41 Hz, 1H), δ 7.92(dd, *J*=7.50, 1.11 Hz, 1H), δ 7.84(td, *J*=6.93, 1.47 Hz, 1H), δ 7.80(td, *J*=6.96, 1.47 Hz, 1H), δ 7.38(m, 3H), δ 5.59(s, 1H), δ 4.53(d, *J*=6.21

Hz, 2H)

(31) 2-(pyridin-2-ylmethylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 72.2 %

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.06(dd, *J*=6.96, 0.75 Hz, 1H), δ 8.00(dd, *J*=7.71, 1.47 Hz, 1H), δ 7.68(td, *J*=7.32, 1.44 Hz, 1H), δ 7.57(td, *J*=7.68, 1.44 Hz, 1H), δ 5.79(s, 1H), δ 5.69(s, 1H), δ 3.18(m, 3H), δ 1.30(t, *J*=7.32 Hz, 2H)

(32) 2-(pyridin-3-ylmethylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 72.6 %

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.59(m, 2H), δ 8.08(dd, *J*=7.68, 1.11 Hz, 1H), δ 8.06(dd, *J*=6.6, 1.11 Hz, 1H), δ 7.75(td, *J*=7.32, 1.47 Hz, 1H), δ 7.65(td, *J*=7.35, 1.47 Hz, 1H), δ 7.32(d, *J*=7.32 Hz, 1H), δ 6.18(s, 1H), δ 5.74(s, 1H), δ 4.42(d, *J*=5.85 Hz, 2H)

(33) 2-(pyridin-4-ylmethylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 74.2 %

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.51(m, 2H), δ 8.25(t, *J*=6.24 Hz, 2H), δ 8.02(dd, *J*=7.32, 1.11 Hz, 1H), δ 7.91(dd, *J*=7.68, 1.11 Hz, 1H), δ 7.84(td, *J*=7.32, 1.47 Hz, 1H), δ 7.76(td, *J*=7.32, 1.47 Hz, 1H), δ 7.34(m, 2H), δ 6.18(s, 1H), δ 5.75(s, 1H), δ 4.50(d, *J*=6.57 Hz, 2H)

(34) 2-(2-(pyridin-2-yl)ethylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 68 %

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.60(m, 1H), δ 8.08(dd, *J*=7.71, 1.11 Hz, 1H), δ 8.02(dd, *J*=7.68, 1.11 Hz, 1H), δ 7.71(td, *J*=7.32, 1.11 Hz, 1H), δ 7.63(d, *J*=1.83 Hz, 1H), δ 7.76(td, *J*=7.32, 1.47 Hz, 1H), δ 7.19(m, 2H), δ 5.76(s, 1H), δ 3.63(q, *J*=6.21 Hz, 2H), δ 3.16(t, *J*=6.57 Hz, 2H)

(35) 2-(2-(pyridin-3-yl)ethylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 64.3 %

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.48(s, 1H), δ 8.42(d, *J*=2.19 Hz, 1H), δ 7.98(dd, *J*=7.71,

1.11 Hz, 1H), δ 7.96(dd, $J=7.71$, 1.11 Hz, 1H), δ 7.85(td, $J=7.32$, 1.11 Hz, 1H), δ 7.74(td, $J=7.32$, 1.11 Hz, 1H), δ 7.58(t, $J=6.57$ Hz, 1H), δ 7.33(m, 1H), δ 5.76(s, 1H), δ 3.50(q, $J=6.96$ Hz, 2H), δ 2.94(t, $J=6.96$ Hz, 2H)

(36) 2-(2-(pyridin-4-yl)ethylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 69.7 %

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.46(d, $J=5.13$ Hz, 2H), δ 7.97(dd, $J=7.32$, 1.11 Hz, 1H), δ 7.95(dd, $J=7.32$, 1.11 Hz, 1H), δ 7.84(td, $J=6.24$, 1.11 Hz, 1H), δ 7.73(td, $J=6.24$, 1.11 Hz, 1H), δ 7.31(d, $J=5.49$ Hz, 2H), δ 5.77(s, 1H), δ 3.50(q, $J=6.6$ Hz, 2H), δ 2.94(t, $J=6.96$ Hz, 2H)

(37) 2-ethoxynaphthalene-1,4-dione

Yield : 51.1 %

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.14(dd, $J=7.35$, 1.83 Hz, 1H), δ 8.09(dd, $J=6.6$, 2.19 Hz, 1H), δ 7.76(td, $J=7.32$, 1.44 Hz, 1H), δ 7.72(td, $J=7.32$, 1.44 Hz, 1H), δ 6.15(s, 1H), δ 4.13(q, $J=6.96$ Hz, 2H), δ 1.53(t, $J=6.96$ Hz, 3H)

(38) 2-propoxynaphthalene-1,4-dione

Yield : 69.76 %

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.13(dd, $J=6.96$, 1.83 Hz, 1H), δ 8.09(dd, $J=7.68$, 2.19 Hz, 1H), δ 7.79(td, $J=7.71$, 1.83 Hz, 1H), δ 7.72(td, $J=7.71$, 1.83 Hz, 1H), δ 6.15(s, 1H), δ 3.99(q, $J=6.6$ Hz, 2H), δ 1.98(sext, $J=7.32$ Hz, 2H), δ 1.62(s, 1H), δ 1.09(t, $J=7.32$ Hz, 3H)

(39) 2-butoxynaphthalene-1,4-dione

Yield : 65.3 %

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.15(dd, $J=6.96$, 1.83 Hz, 1H), δ 8.11(dd, $J=6.96$, 1.11 Hz, 1H), δ 7.76(td, $J=5.45$, 1.83 Hz, 1H), δ 7.74(td, $J=5.13$, 1.83 Hz, 1H), δ 6.17(s, 1H), δ 4.05(t, $J=6.6$ Hz, 2H), δ 1.94(quin, $J=6.6$ Hz, 2H), δ 1.61(s, 1H), δ 1.09(sext, $J=7.68$ Hz, 2H), 1.09(t, $J=7.32$ Hz, 3H)

(40) 2-(pentyloxy)naphthalene-1,4-dione

Yield : 62 %

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.13(dd, *J*=6.96, 1.83 Hz, 1H), δ 8.08(dd, *J*=6.6, 2.19 Hz, 1H), δ 7.76(td, *J*=5.49, 1.83 Hz, 1H), δ 7.72(td, *J*=7.32, 1.47 Hz, 1H), δ 6.14(s, 1H), δ 4.02(t, *J*=6.57 Hz, 2H), δ 1.94(quin, *J*=6.57 Hz, 2H), δ 1.60(s, 1H), δ 1.50(m, 2H), δ 0.95(t, *J*=6.96 Hz, 3H)

(41) 2-(hexyloxy)naphthalene-1,4-dione

Yield : 57 %

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.08(dd, *J*=6.96, 1.08 Hz, 1H), δ 8.03(dd, *J*=6.96, 1.83 Hz, 1H), δ 7.71(td, *J*=7.32, 1.47 Hz, 1H), δ 7.66(td, *J*=7.32, 1.44 Hz, 1H), δ 6.13(s, 1H), δ 4.00(t, *J*=6.6 Hz, 2H), δ 2.02(quin, *J*=6.6 Hz, 2H), δ 1.50(m, 6H), δ 0.90(t, *J*=6.96 Hz, 3H)

(42) 2-(heptyloxy)naphthalene-1,4-dione

Yield : 51 %

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.08(dd, *J*=6.96, 1.08 Hz, 1H), δ 8.03(dd, *J*=6.96, 1.83 Hz, 1H), δ 7.71(td, *J*=7.32, 1.47 Hz, 1H), δ 7.66(td, *J*=7.32, 1.44 Hz, 1H), δ 6.15(s, 1H), δ 4.00(t, *J*=6.6 Hz, 2H), δ 2.02(m, 2H), δ 1.50(m, 8H), δ 0.90(t, *J*=6.96 Hz, 3H)

(43) 2-cyclobutoxynaphthalene-1,4-dione

Yield : 55.1 %

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.13(dd, *J*=6.96, 1.47 Hz, 1H), δ 8.08(dd, *J*=6.6, 2.19 Hz, 1H), δ 7.76(td, *J*=5.85, 1.47 Hz, 1H), δ 7.72(td, *J*=5.49, 1.83 Hz, 1H), δ 6.01(s, 1H), δ 4.71(quin, *J*=6.93 Hz, 1H), δ 2.53(m, 2H), δ 2.49(m, 2H), δ 1.99(m, 1H), δ 1.82(m, 1H)

(44) 2-(cyclopentyloxy)naphthalene-1,4-dione

Yield : 52.5 %

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.13(dd, *J*=6.96, 1.47 Hz, 1H), δ 8.08(dd, *J*=7.32, 1.43 Hz, 1H), δ 7.76(td, *J*=7.32, 1.47 Hz, 1H), δ 7.72(td, *J*=7.32, 1.83 Hz, 1H), δ 6.14(s, 1H), δ 4.02(t, *J*=6.6 Hz, 2H), δ 1.92(quin, *J*=6.6 Hz, 2H), δ 1.57(m, 4H)

(45) 2-(cyclohexyloxy)naphthalene-1,4-dione

Yield : 78.2 %

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.09(dd, *J*=6.6, 1.43 Hz, 1H), δ 8.06(dd, *J*=7.32, 1.46 Hz, 1H), δ 7.72(td, *J*=5.13, 1.47 Hz, 1H), δ 7.70(td, *J*=5.49, 1.83 Hz, 1H), δ 6.14(s, 1H), δ 4.28(sept, *J*=4.05 Hz, 1H), δ 2.05(m, 10H)

(46) 2-(cycloheptyloxy)naphthalene-1,4-dione

Yield : 55.7 %

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.99(dd, *J*=7.71, 1.43 Hz, 1H), δ 7.96(dd, *J*=7.71, 1.46 Hz, 1H), δ 7.86(td, *J*=5.49, 1.47 Hz, 1H), δ 7.70(td, *J*=5.49, 1.84 Hz, 1H), δ 6.28(s, 1H), δ 4.66(sept, *J*=4.02 Hz, 1H), δ 2.02(m, 12H)

(47) 2-(2-hydroxyethylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 52.2 %

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.23(s, 1H), δ 8.10(dd, *J*=7.68, 1.92 Hz, 1H), δ 8.06(dd, *J*=7.68, 1.92 Hz, 1H), δ 7.75(td, *J*=7.71, 1.47 Hz, 1H), δ 7.70(td, *J*=7.68, 1.84 Hz, 1H), δ 5.76(s, 1H), δ 3.94(t, *J*=4.77 Hz, 2H), δ 3.51(quart, *J*=5.49 Hz, 2H)

(48) 2-(3-hydroxypropylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 59 %

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.10(dd, *J*=6.72, 1.1 Hz, 1H), δ 8.05(dd, *J*=6.6, 1.1 Hz, 1H), δ 7.75(td, *J*=7.35, 1.44 Hz, 1H), δ 7.63(td, *J*=7.68, 1.08 Hz, 1H), δ 6.33(s, 1H), δ 5.75(s, 1H), δ 3.86(t, *J*=5.49 Hz, 2H), δ 3.38(quart, *J*=6.24 Hz, 2H), δ 1.99(quin, *J*=6.21 Hz, 2H)

(49) 2-(4-hydroxybutylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 59 %

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.11(dd, *J*=7.68, 2.58 Hz, 1H), δ 8.05(dd, *J*=7.68, 2.58 Hz, 1H), δ 7.75(td, *J*=7.35, 1.44 Hz, 1H), δ 7.63(td, *J*=7.71, 1.08 Hz, 1H), δ 6.09(s, 1H), δ 5.73(s, 1H), δ 3.74(t, *J*=6.21 Hz, 2H), δ 3.26(quart, *J*=6.6 Hz, 2H), δ 1.84(m, 4H)

(50) 2-(2-hydroxybutylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 83 %

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.09(dd, $J=6.6$, 1.14 Hz, 1H), δ 8.04(dd, $J=6.57$, 1.14 Hz, 1H), δ 7.72(td, $J=7.35$, 1.44 Hz, 1H), δ 7.64(td, $J=7.71$, 1.08 Hz, 1H), δ 6.09(s, 1H), δ 5.76(s, 1H), δ 3.88(m, 1H), δ 3.34(m, 2H), δ 1.66(m, 2H), δ 1.05(t, $J=7.32$ Hz, 3H)

(51) 2-(2-methoxyethylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 51 %

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.06(dd, $J=5.13$, 1.14 Hz, 1H), δ 8.04(dd, $J=5.13$, 1.14 Hz, 1H), δ 7.70(td, $J=7.68$, 1.44 Hz, 1H), δ 7.62(td, $J=7.68$, 1.14 Hz, 1H), δ 6.16(s, 1H), δ 5.72(s, 1H), δ 3.64(t, $J=4.77$ Hz, 2H), δ 3.39(s, 2H), δ 3.35(m, 3H)

(52) 2-(3-methoxypropylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 43.6 %

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.09(dd, $J=7.32$, 1.11 Hz, 1H), δ 8.06(dd, $J=6.19$, 1.11 Hz, 1H), δ 7.70(td, $J=7.68$, 1.47 Hz, 1H), δ 7.61(td, $J=7.68$, 1.47 Hz, 1H), δ 6.37(s, 1H), δ 5.71(s, 1H), δ 3.52(t, $J=5.49$ Hz, 2H), δ 3.36(m, 5H), δ 1.97(quin, $J=6.24$ Hz, 2H),

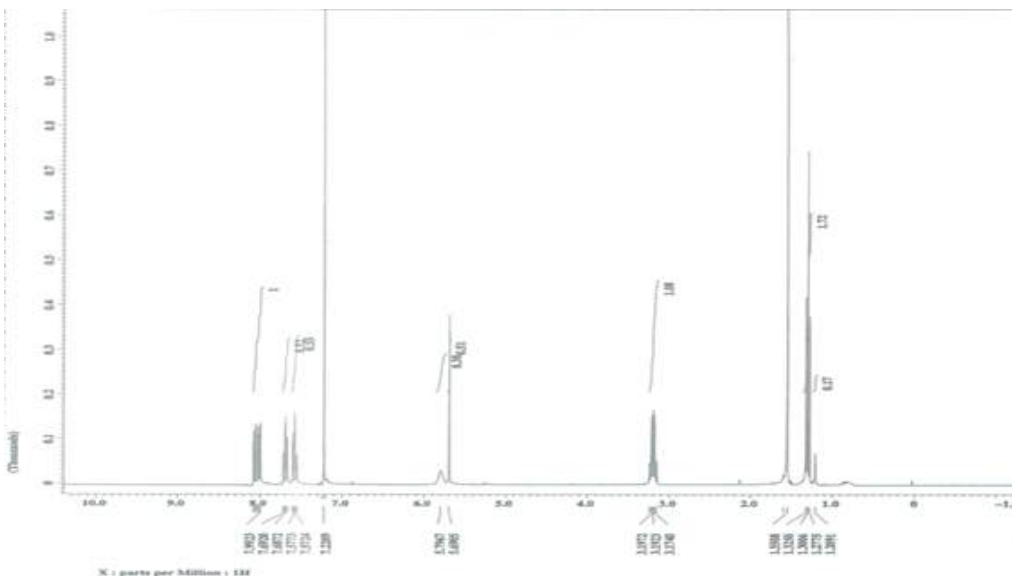
(53) 2-(2,2-dimethoxyethylamino)naphthalene-1,4-dione

Yield : 39.1 %

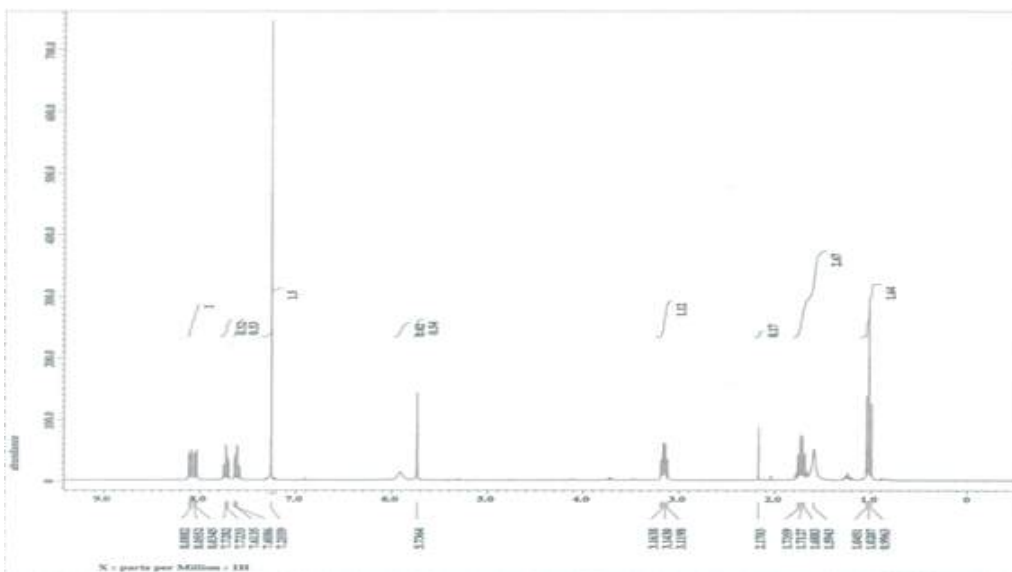
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.09(dd, $J=7.32$, 1.32 Hz, 1H), δ 8.05(dd, $J=6.19$, 1.41 Hz, 1H), δ 7.73(td, $J=7.68$, 1.41 Hz, 1H), δ 7.63(td, $J=7.68$, 1.41 Hz, 1H), δ 6.04(s, 1H), δ 5.77(s, 1H), δ 4.62(t, $J=5.49$ Hz, 1H), δ 3.32(t, $J=5.49$ Hz, 6H)

^1H NMR Spectra

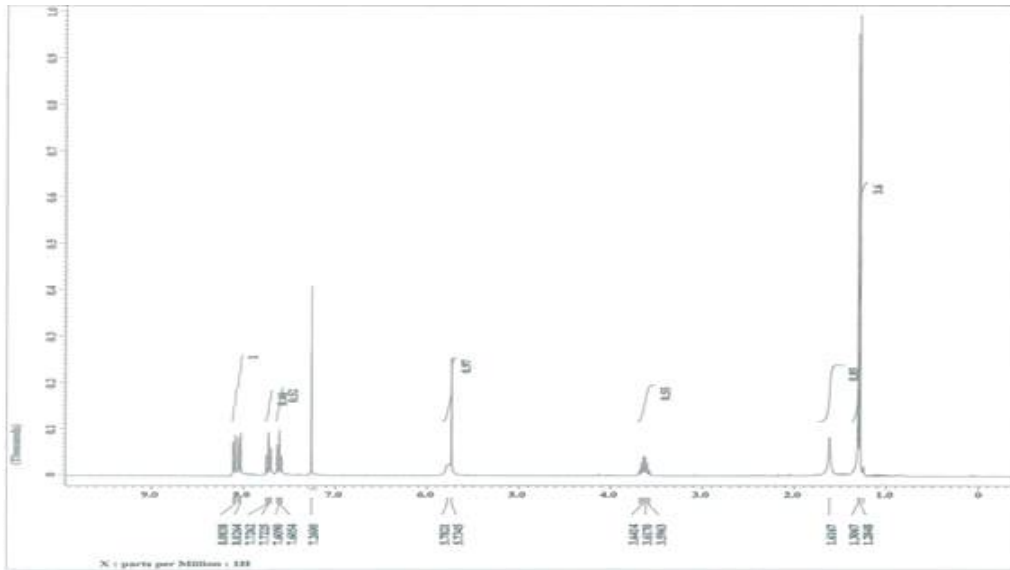
(1) 2-(ethylamino)naphthalene-1,4-dione



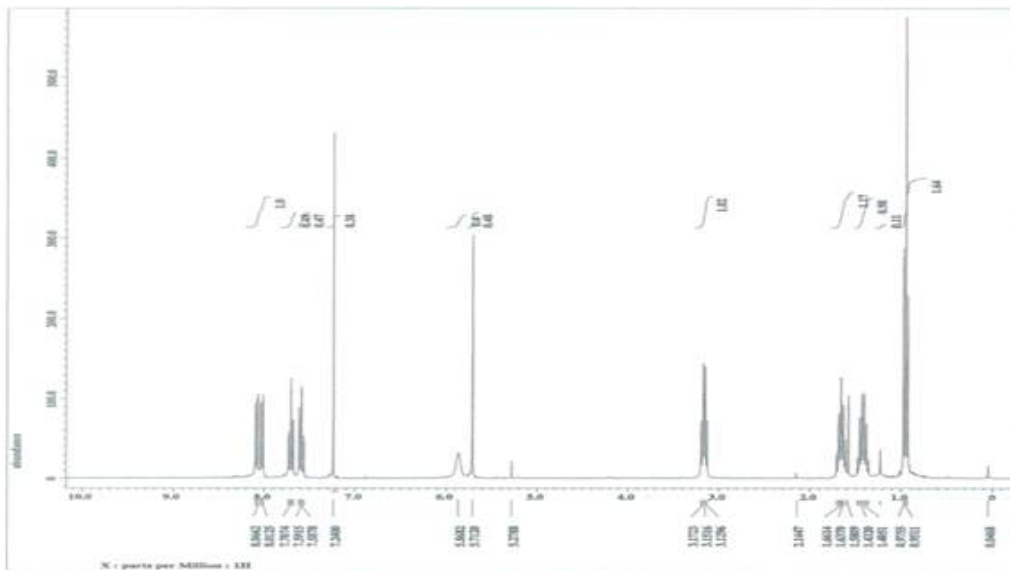
(2) 2-(propylamino)naphthalene-1,4-dione



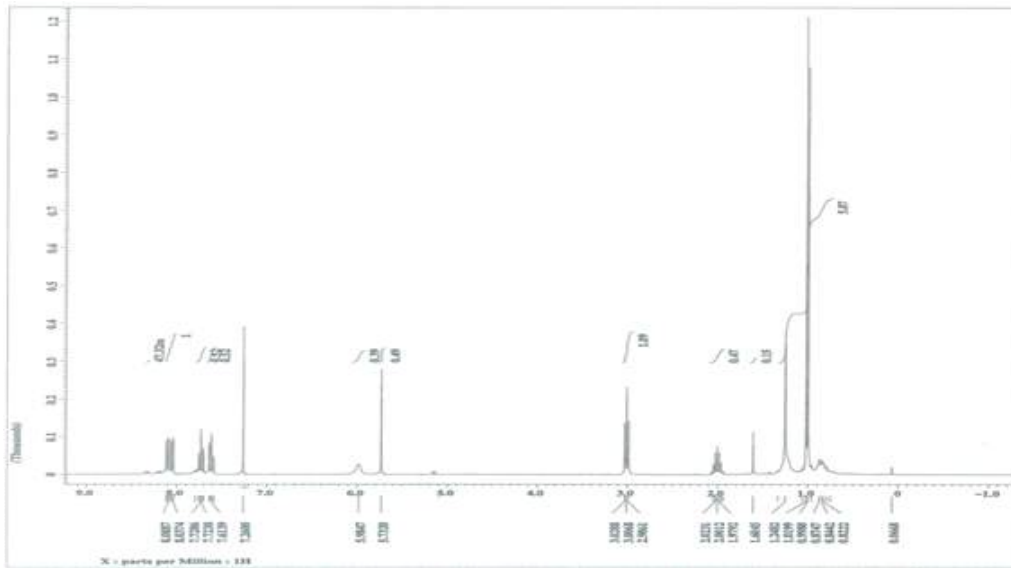
(3) 2-(isopropylamino)naphthalene-1,4-dione



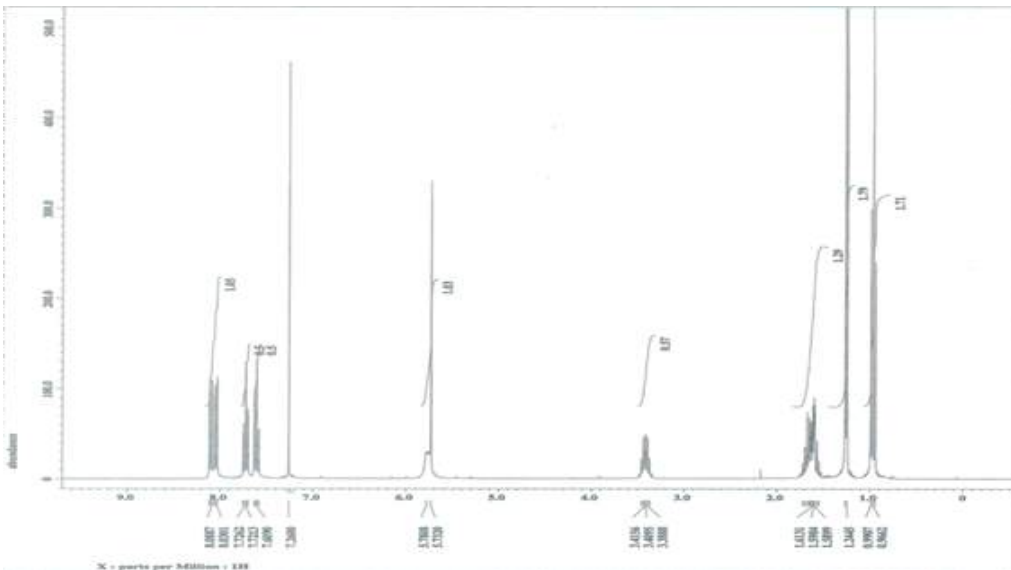
(4) 2-(butylamino)naphthalene-1,4-dione



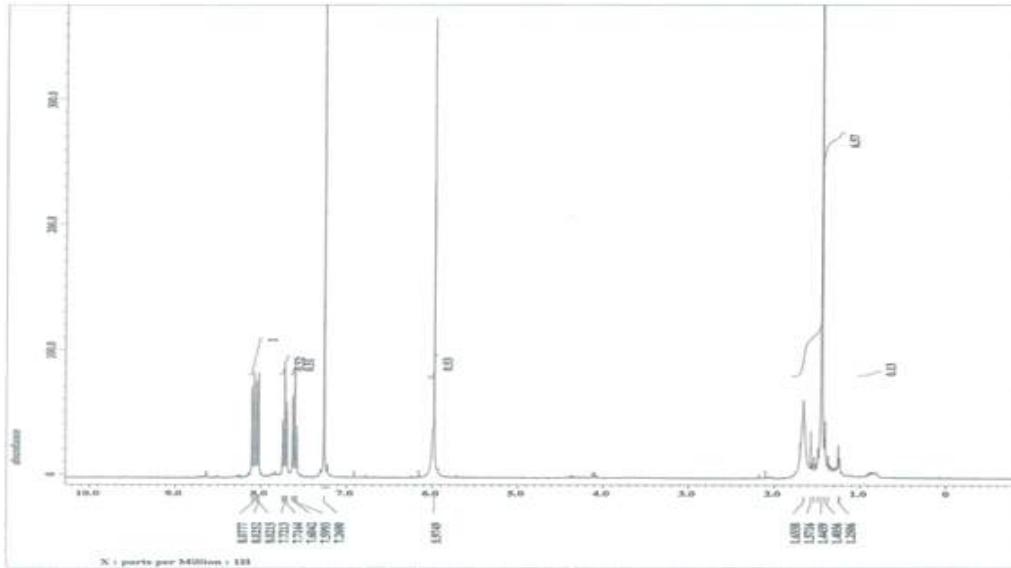
(5) 2-(isobutylamino)naphthalene-1,4-dione



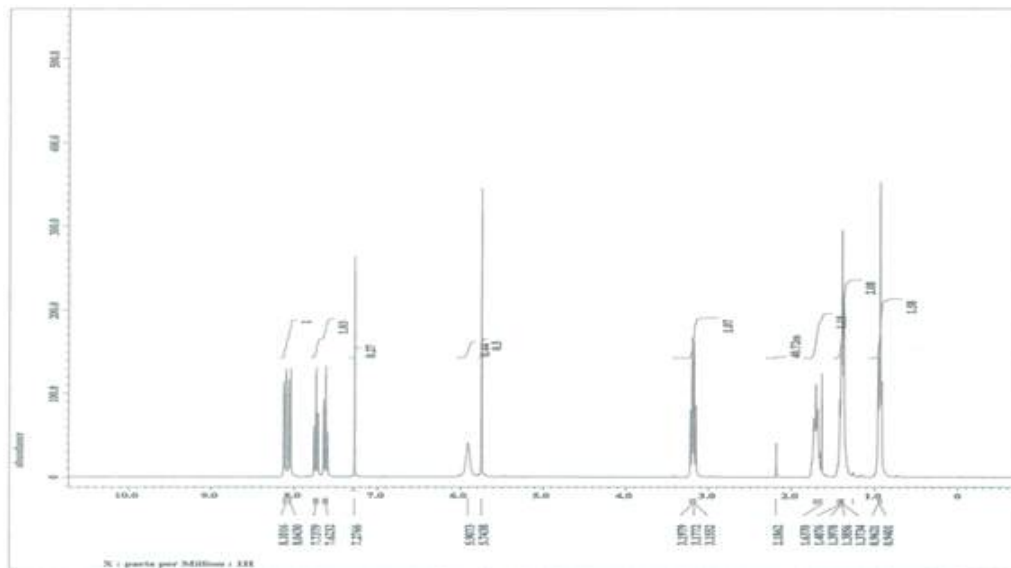
(6) 2-(sec-butylamino)naphthalene-1,4-dione



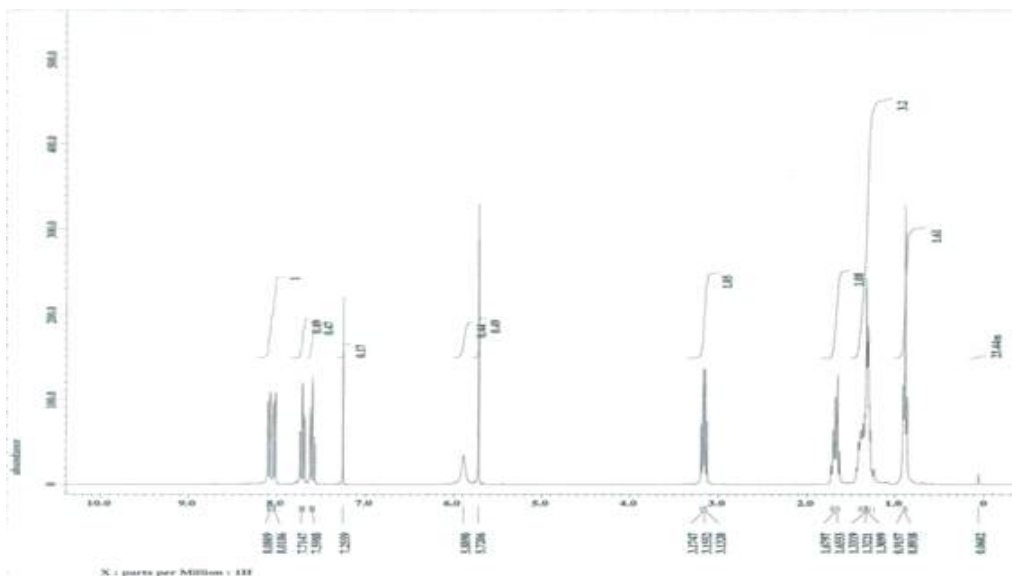
(7) 2-(tert-butylamino)naphthalene-1,4-dione



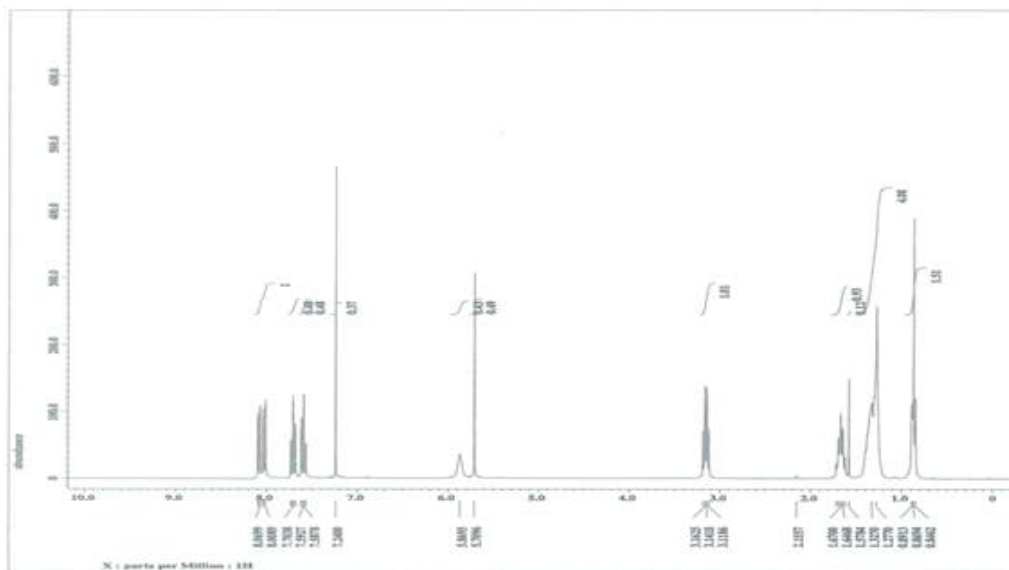
(8) 2-(pentylamino)naphthalene-1,4-dione



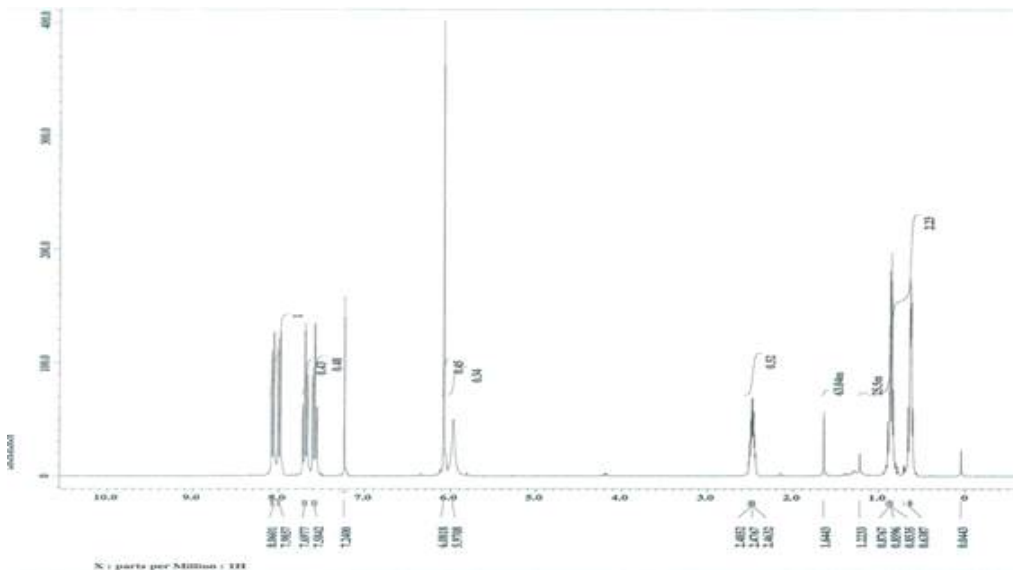
(9) 2-(hexylamino)naphthalene-1,4-dione



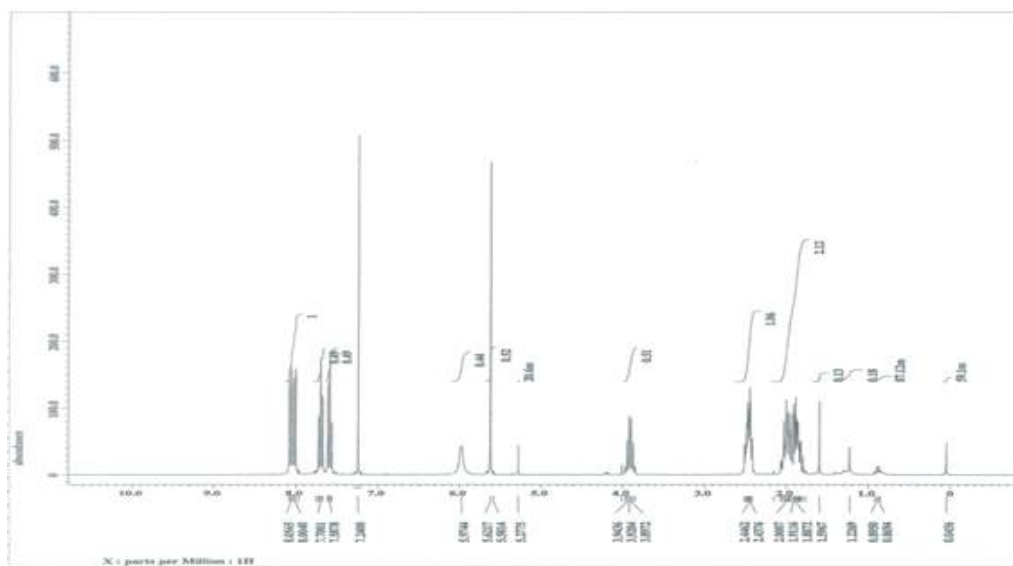
(10) 2-(heptylamino)naphthalene-1,4-dione



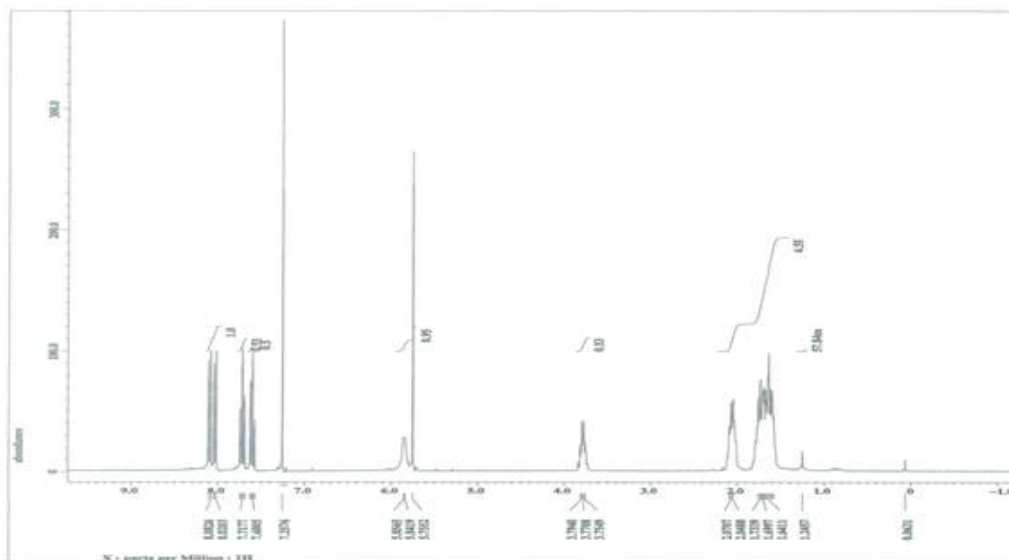
(11) 2-(cyclopropylamino)naphthalene-1,4-dione



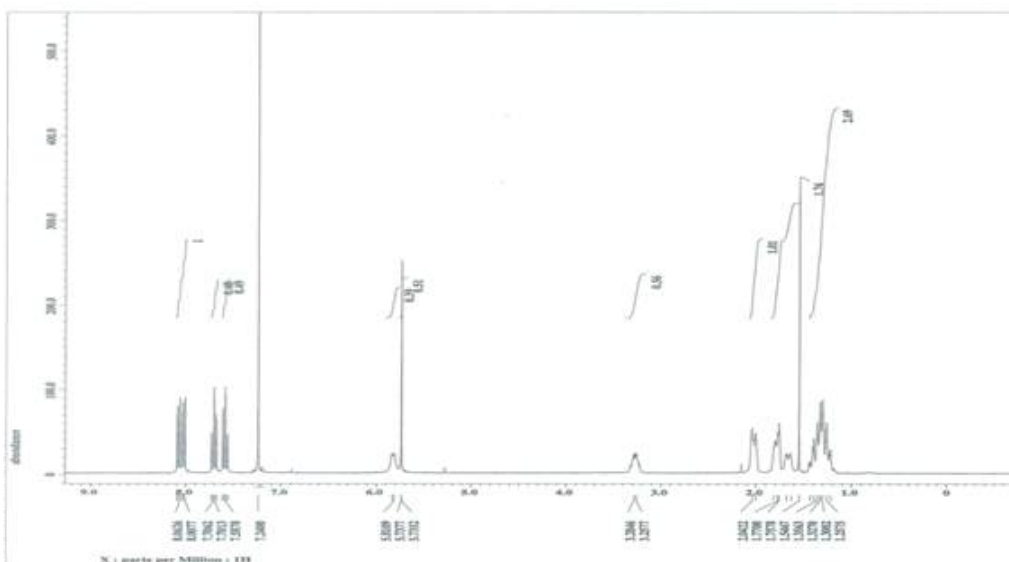
(12) 2-(cyclobutylamino)naphthalene-1,4-dione



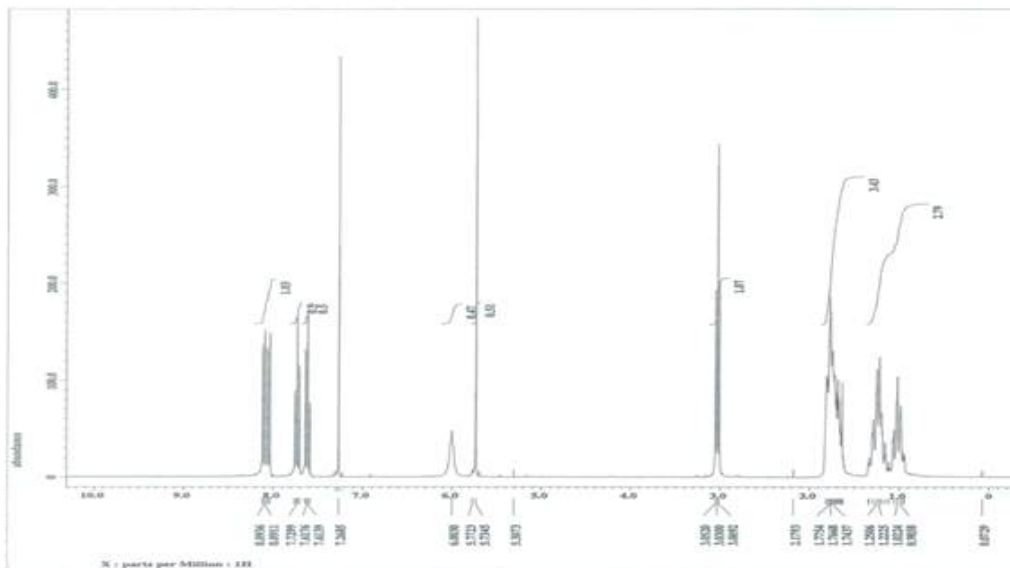
(13) 2-(cyclopentylamino)naphthalene-1,4-dione



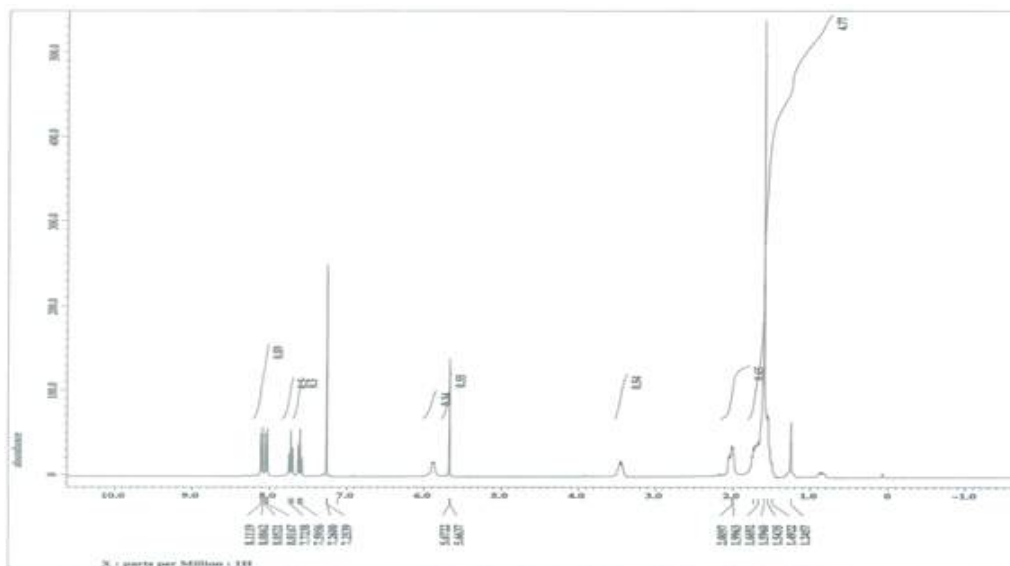
(14) 2-(cyclohexylamino)naphthalene-1,4-dione



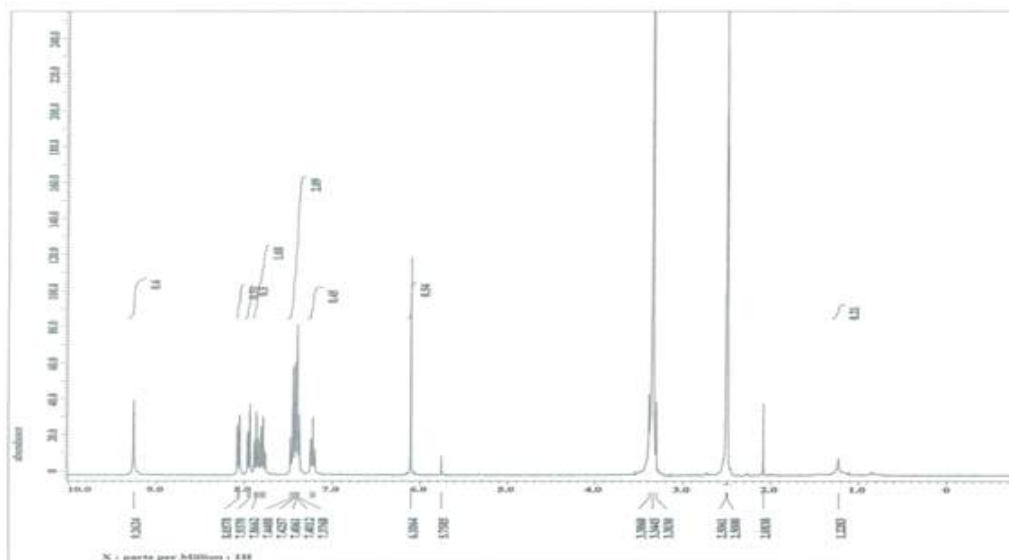
(15) 2-(cyclohexylmethylamino)naphthalene-1,4-dione



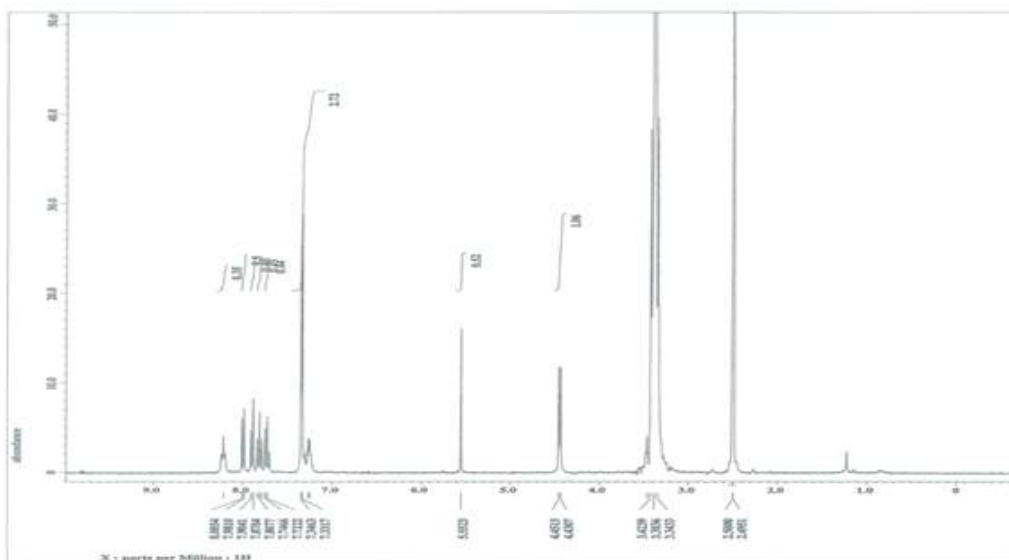
(16) 2-(cycloheptylamino)naphthalene-1,4-dione



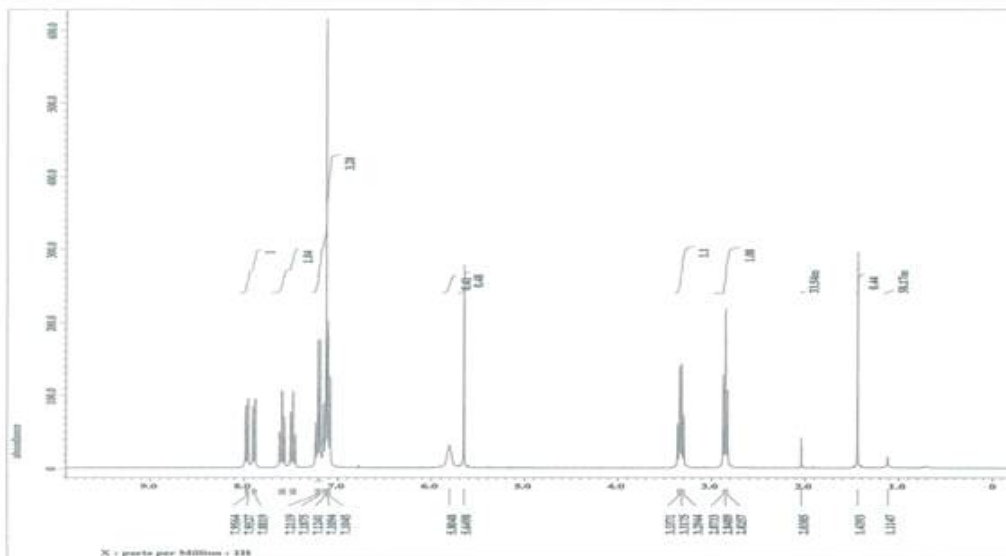
(17) 2-(phenylamino)naphthalene-1,4-dione



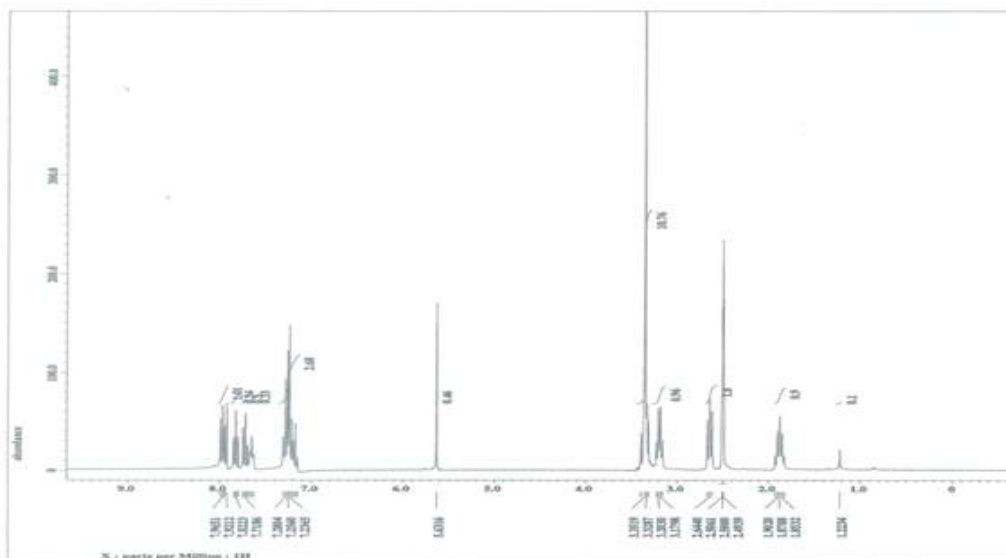
(18) 2-(benzylamino)naphthalene-1,4-dione



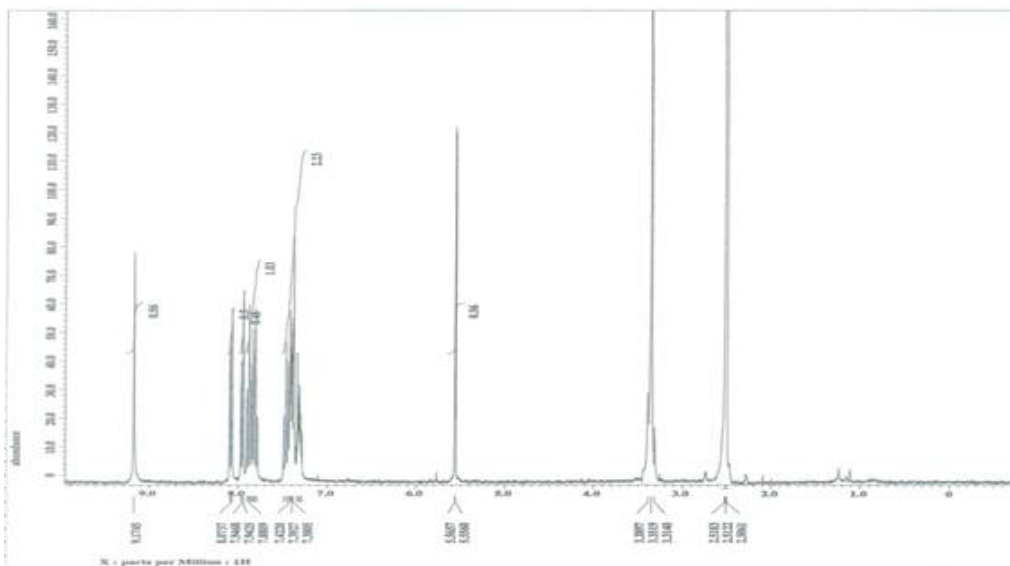
(19) 2-(phenylethylamino)naphthalene-1,4-dione



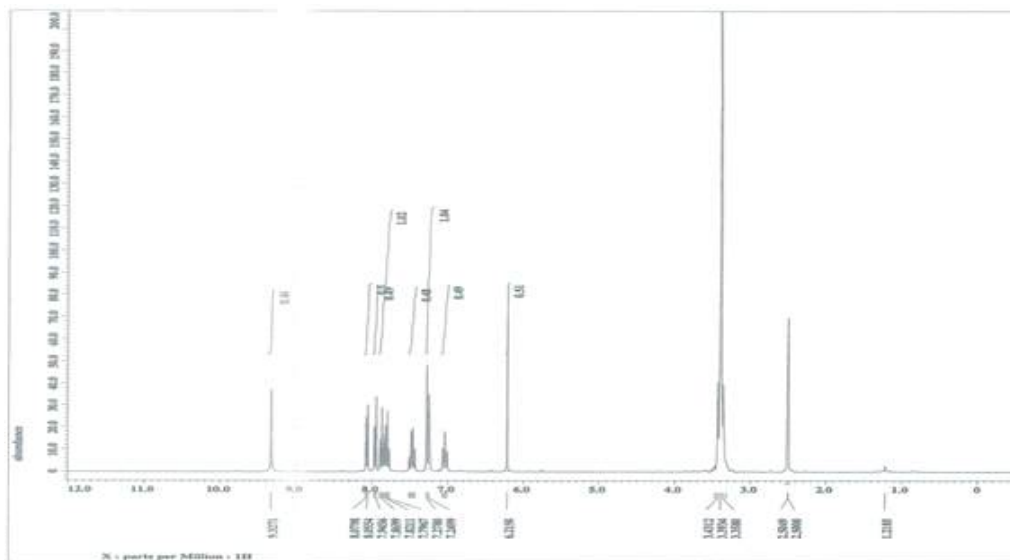
(20) 2-(3-phenylpropylamino)naphthalene-1,4-dione



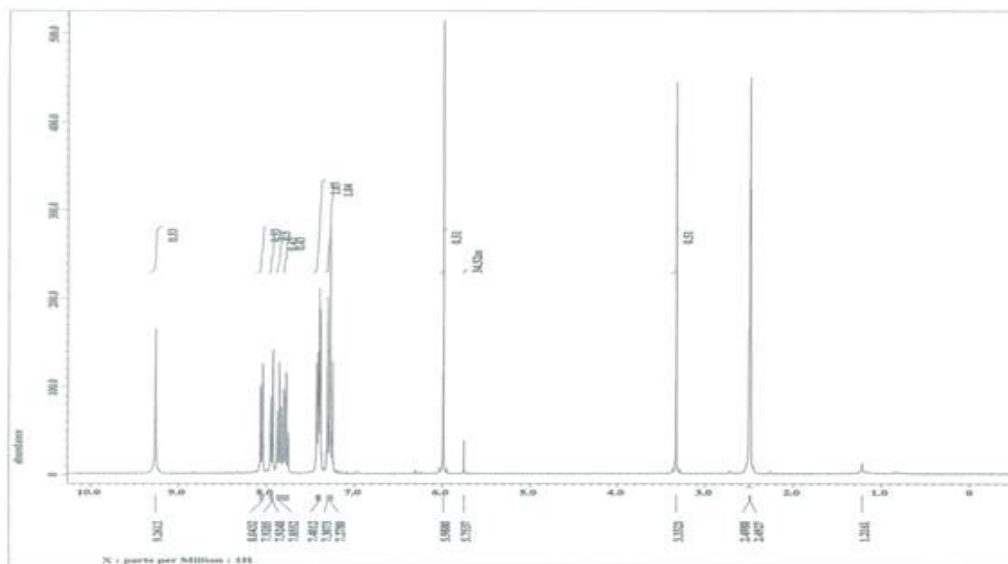
(21) 2-(2-fluorophenylamino)naphthalene-1,4-dione



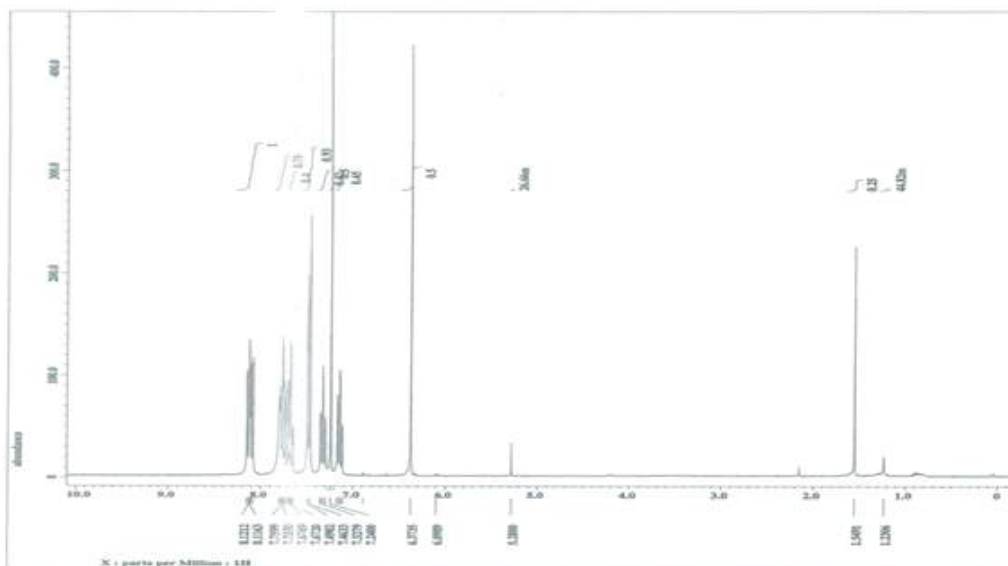
(22) 2-(3-fluorophenylamino)naphthalene-1,4-dione



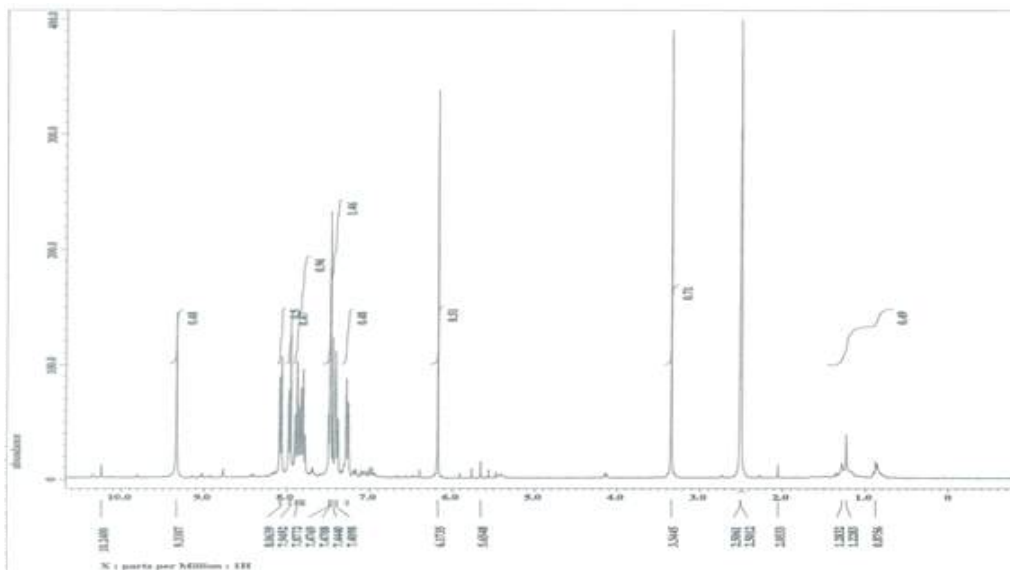
(23) 2-(4-fluorophenylamino)naphthalene-1,4-dione



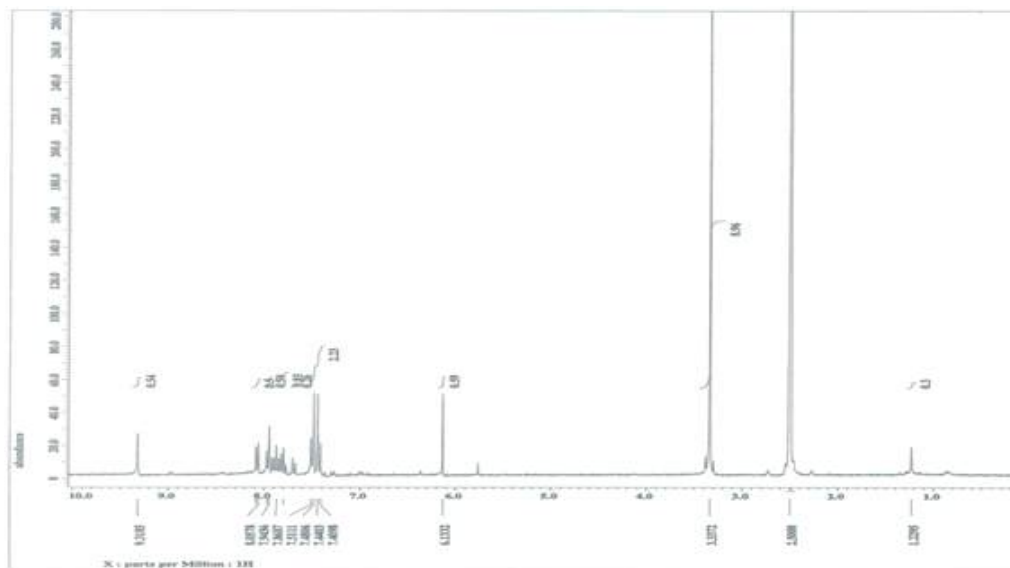
(24) 2-(2-chlorophenylamino)naphthalene-1,4-dione



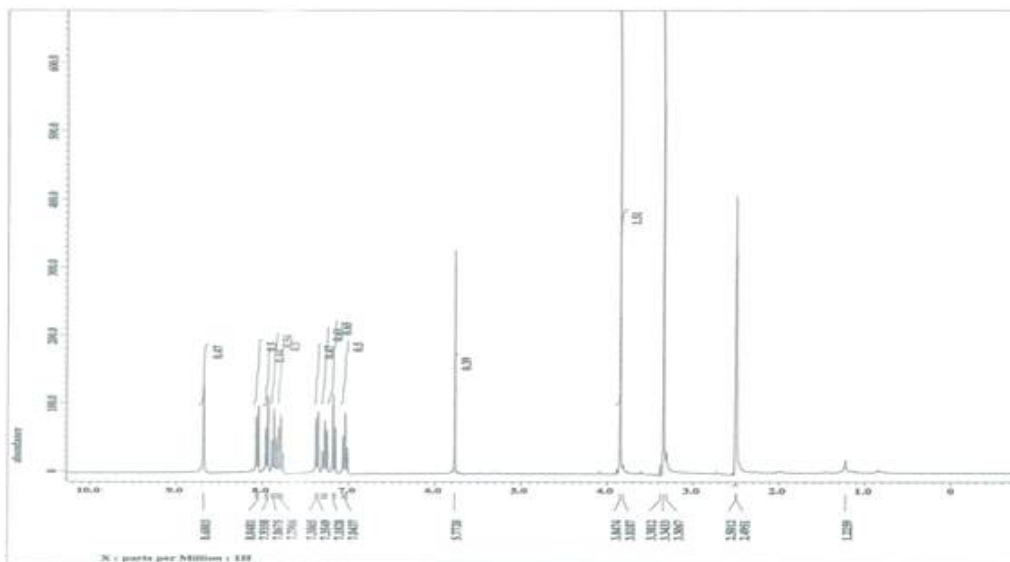
(25) 2-(3-chlorophenylamino)naphthalene-1,4-dione



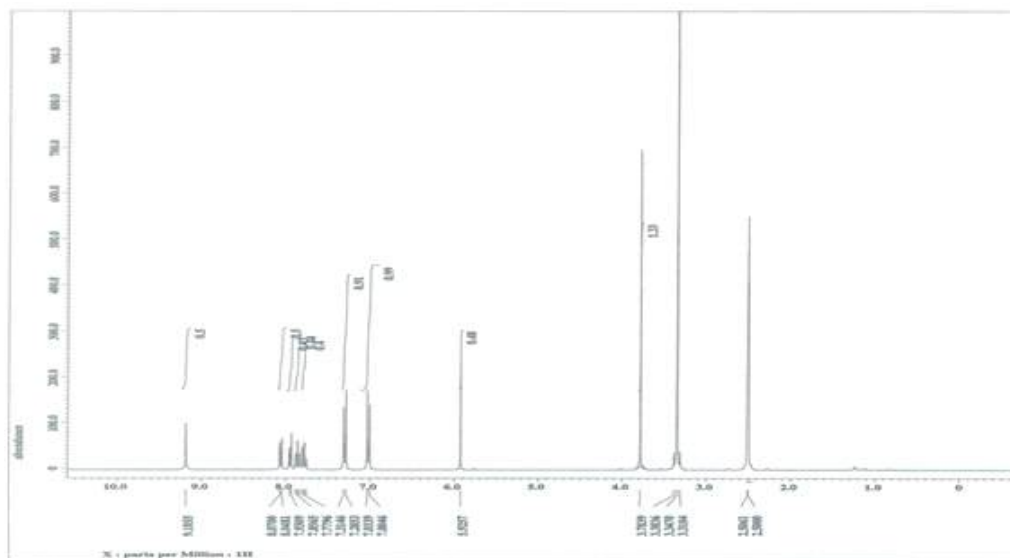
(26) 2-(4-chlorophenylamino)naphthalene-1,4-dione



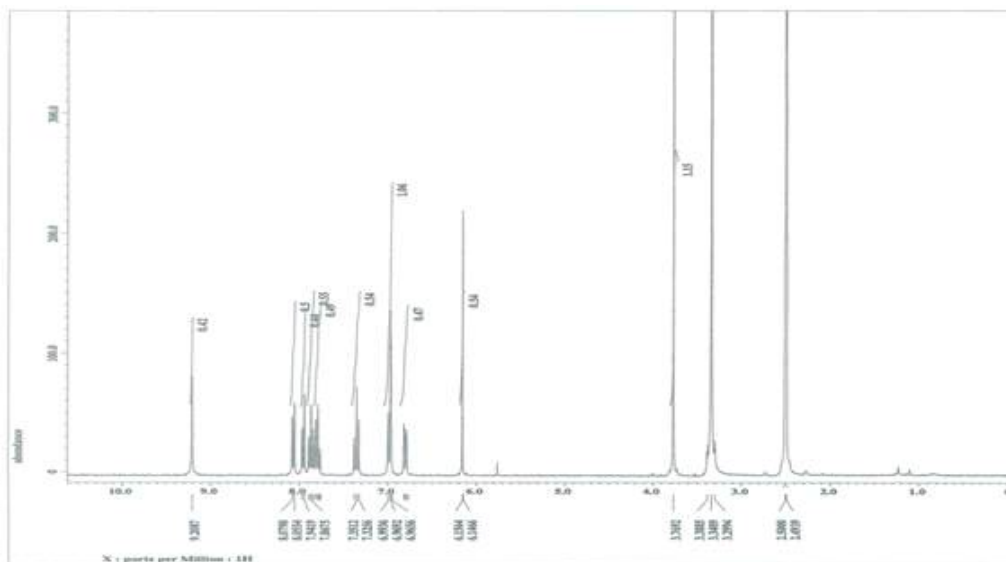
(27) 2-(2-methoxyphenylamino)naphthalene-1,4-dione



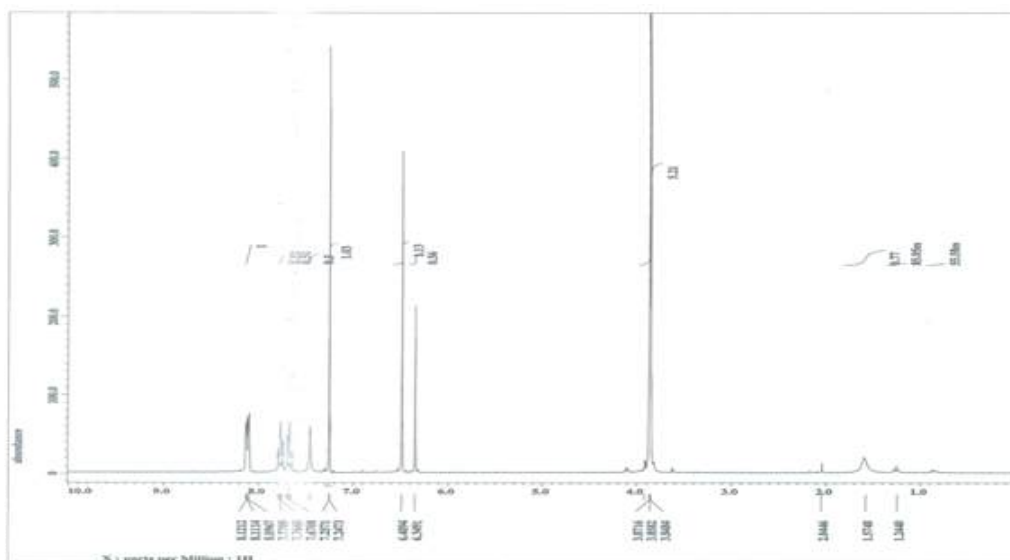
(28) 2-(3-methoxyphenylamino)naphthalene-1,4-dione



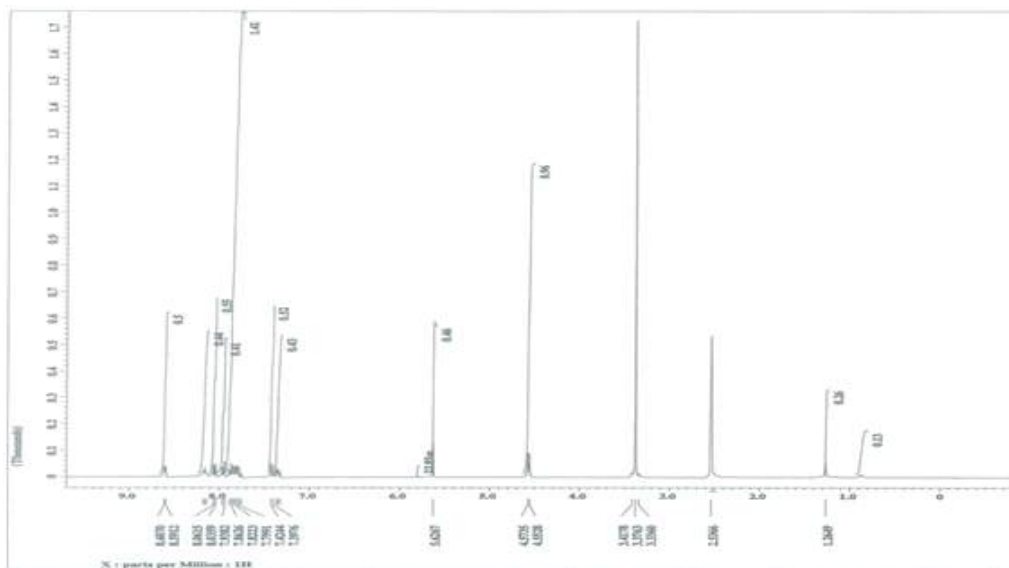
(29) 2-(4-methoxyphenylamino)naphthalene-1,4-dione



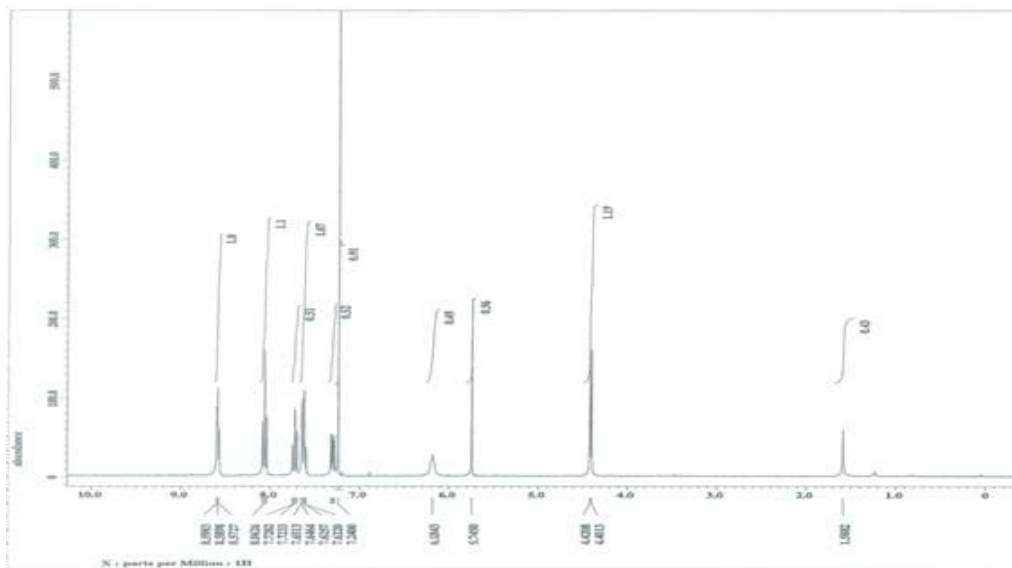
(30) 2-(3,4,5-trimethoxyphenylamino)naphthalene-1,4-dione



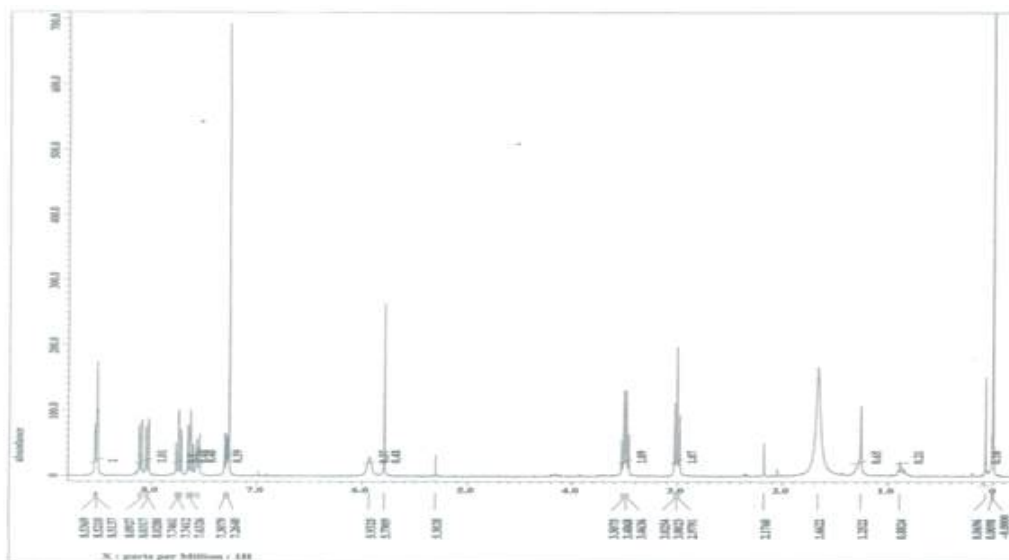
(31) 2-(pyridin-2-ylmethylamino)naphthalene-1,4-dione



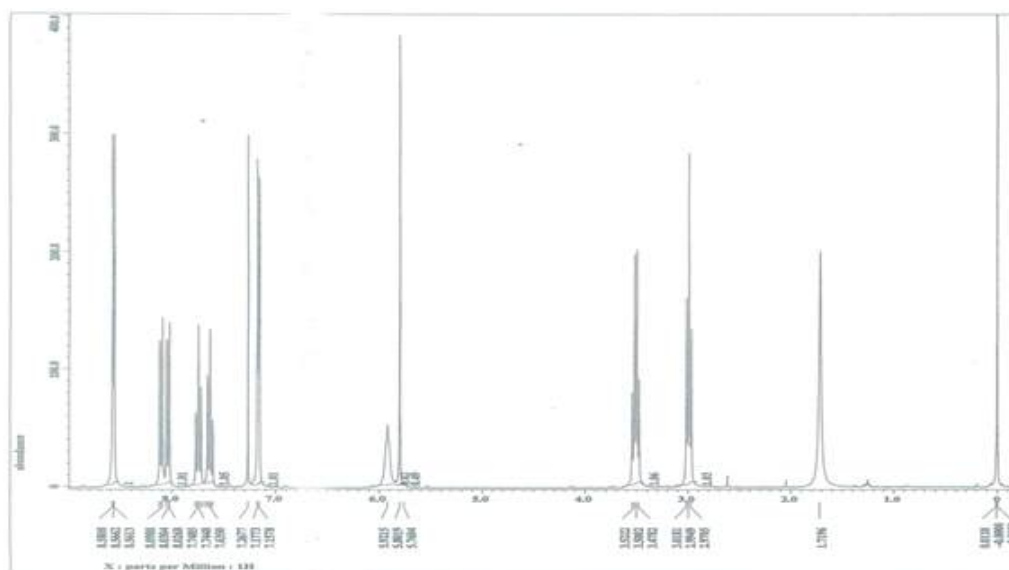
(32) 2-(pyridin-3-ylmethylamino)naphthalene-1,4-dione



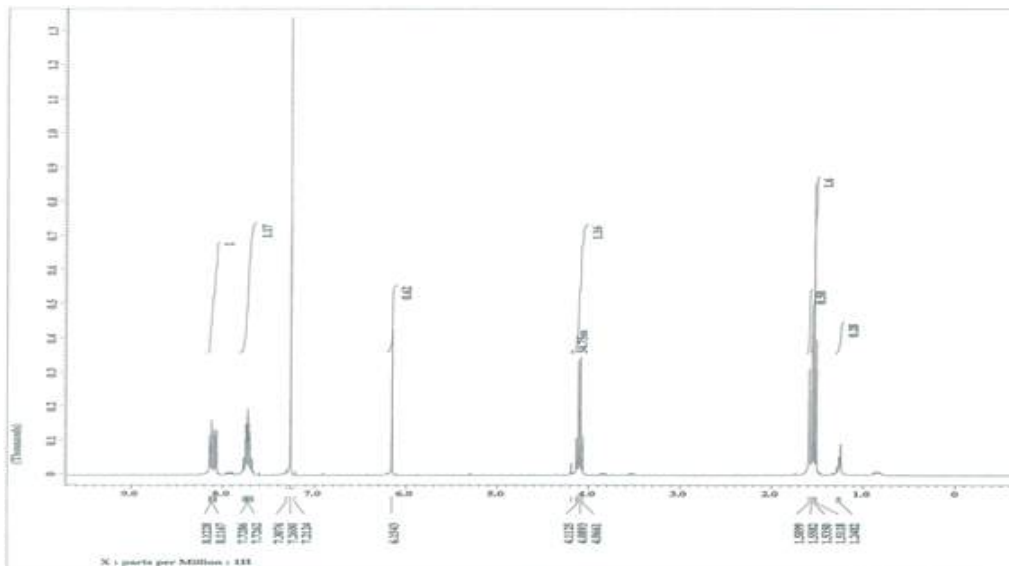
(35) 2-(2-(pyridin-3-yl)ethylamino)naphthalene-1,4-dione



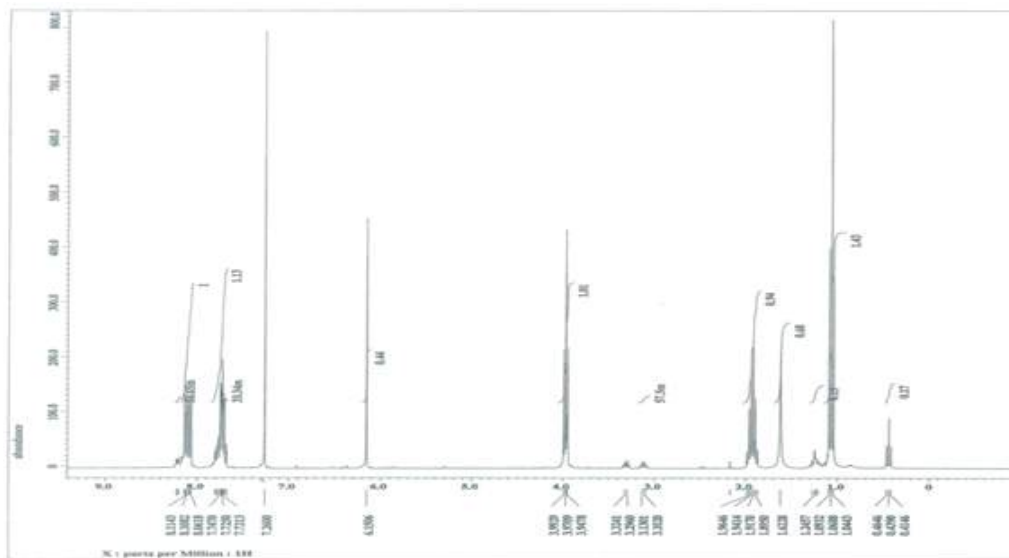
(36) 2-(2-(pyridin-4-yl)ethylamino)naphthalene-1,4-dione



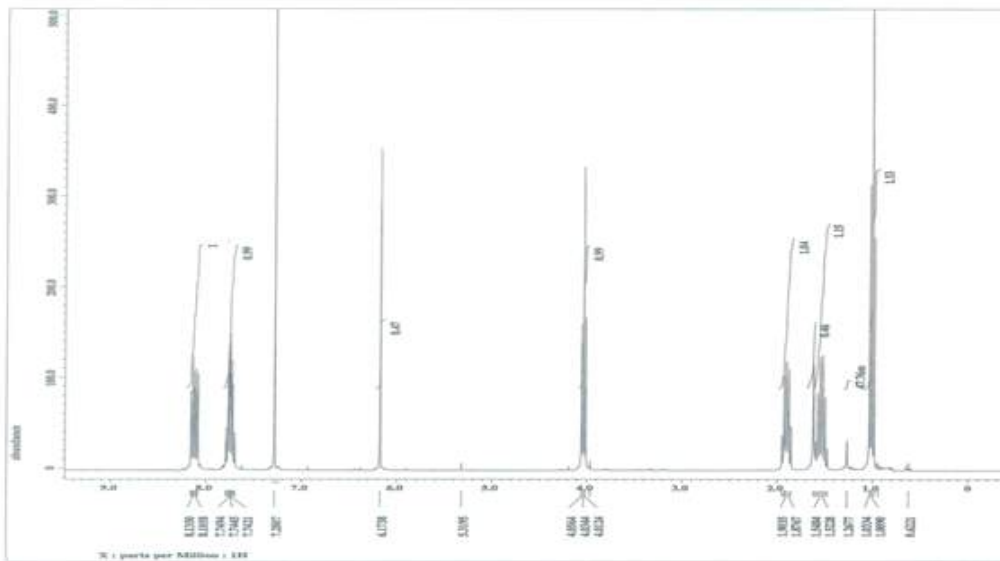
(37) 2-ethoxynaphthalene-1,4-dione



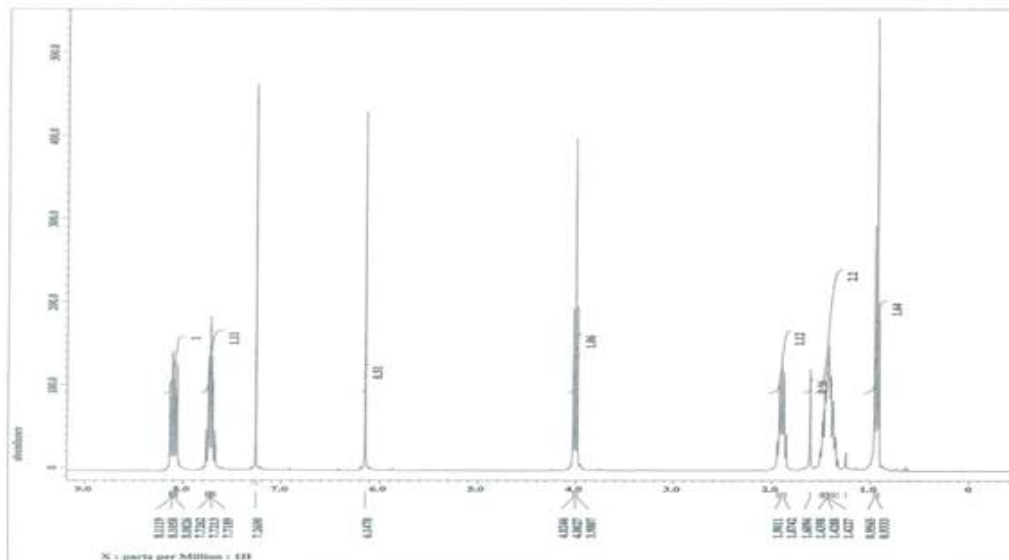
(38) 2-propoxynaphthalene-1,4-dione



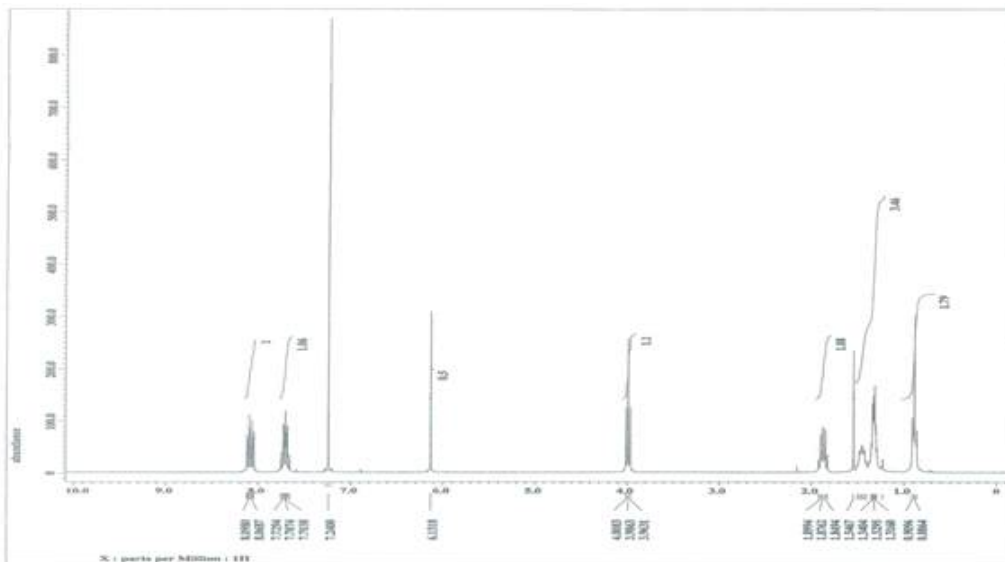
(39) 2-butoxynaphthalene-1,4-dione



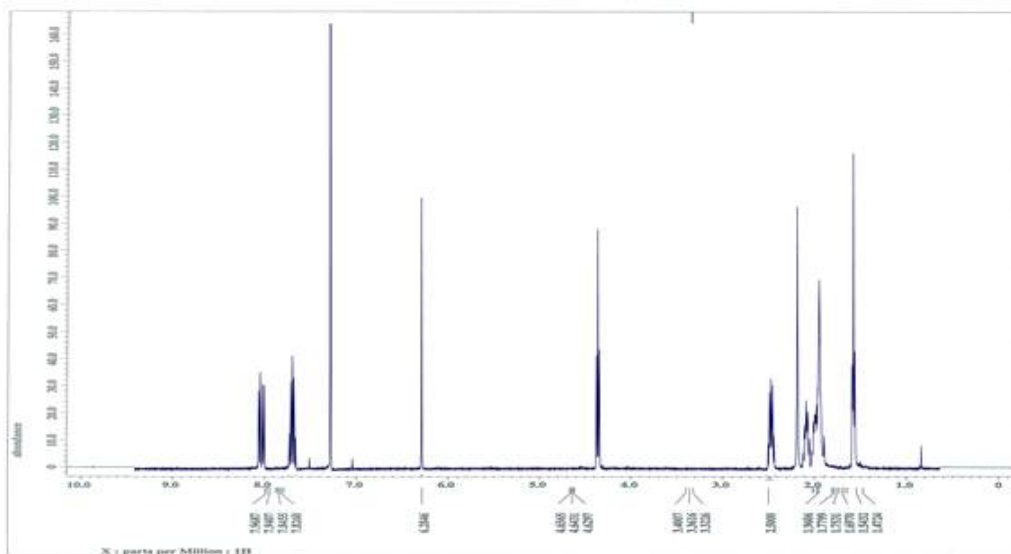
(40) 2-(pentyloxy)naphthalene-1,4-dione



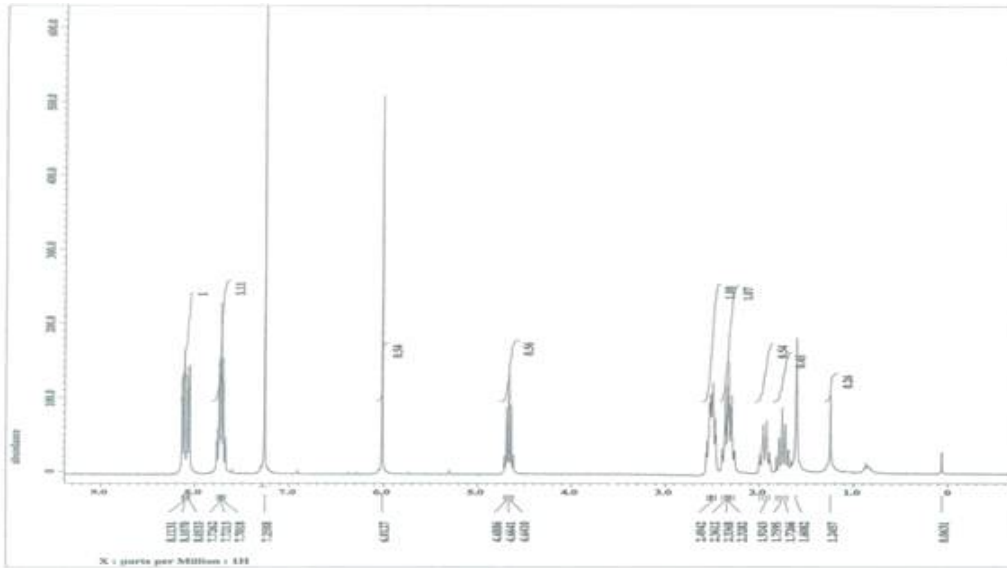
(41) 2-(hexyloxy)naphthalene-1,4-dione



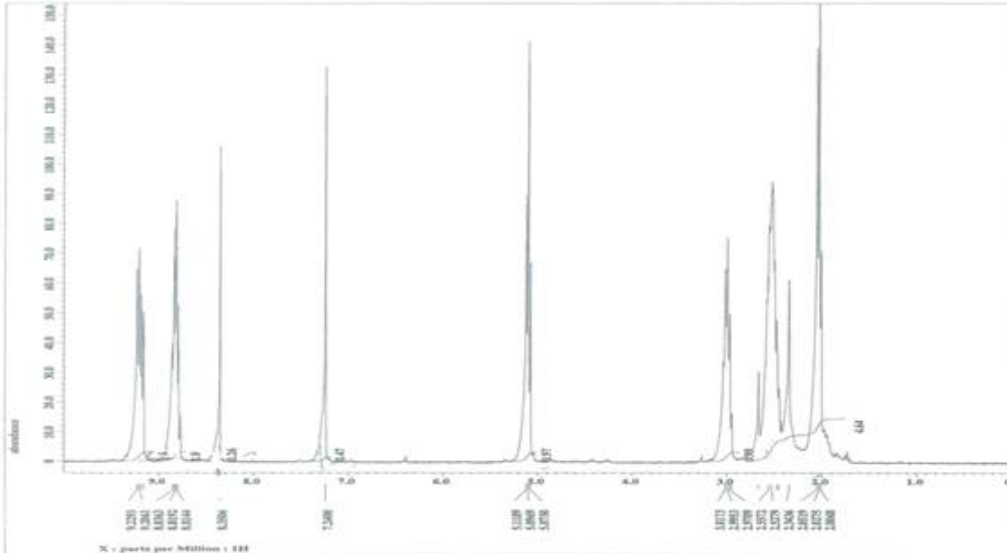
(42) 2-(heptyloxy)naphthalene-1,4-dione



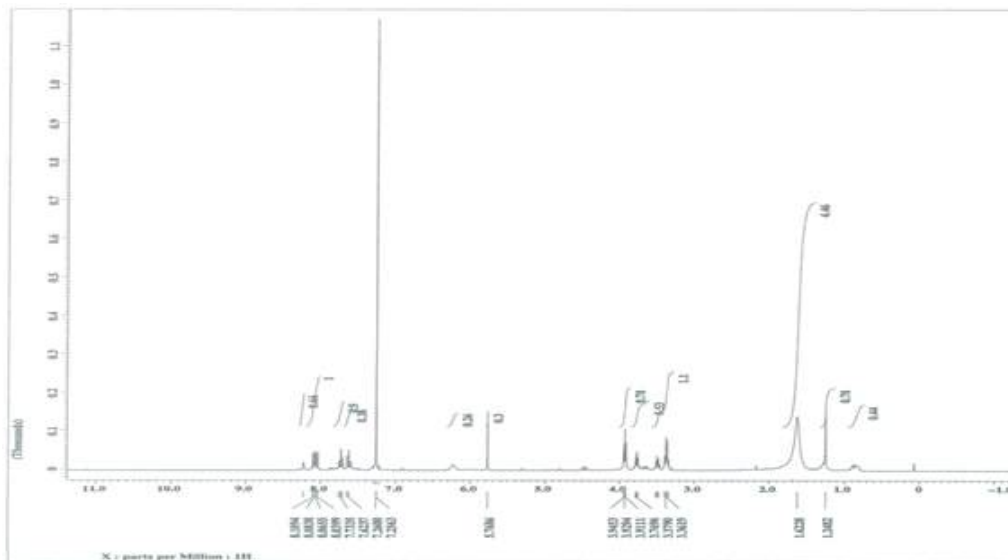
(43) 2-cyclobutoxynaphthalene-1,4-dione



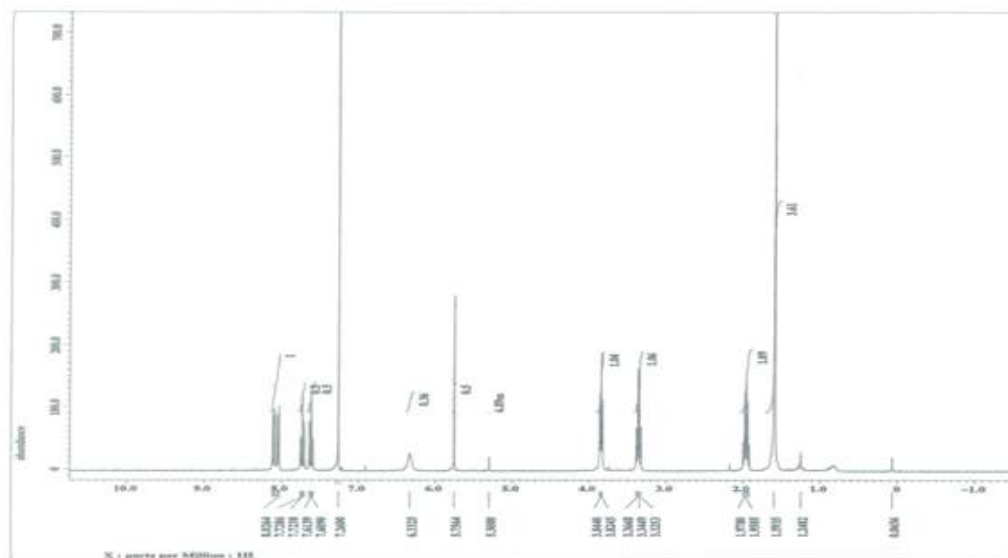
(44) 2-(cyclopentyloxy)naphthalene-1,4-dione



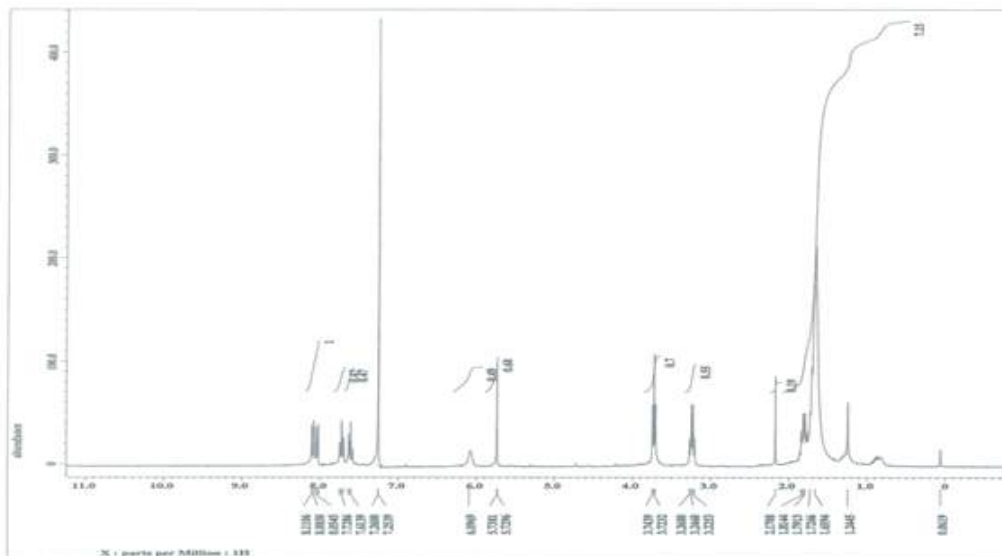
(47) 2-(2-hydroxyethylamino)naphthalene-1,4-dione



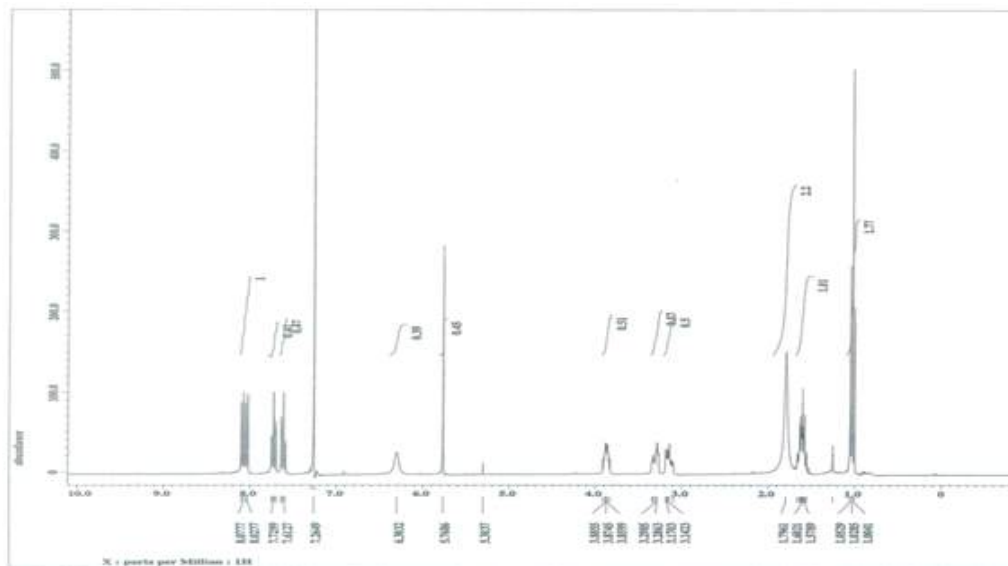
(48) 2-(3-hydroxypropylamino)naphthalene-1,4-dione



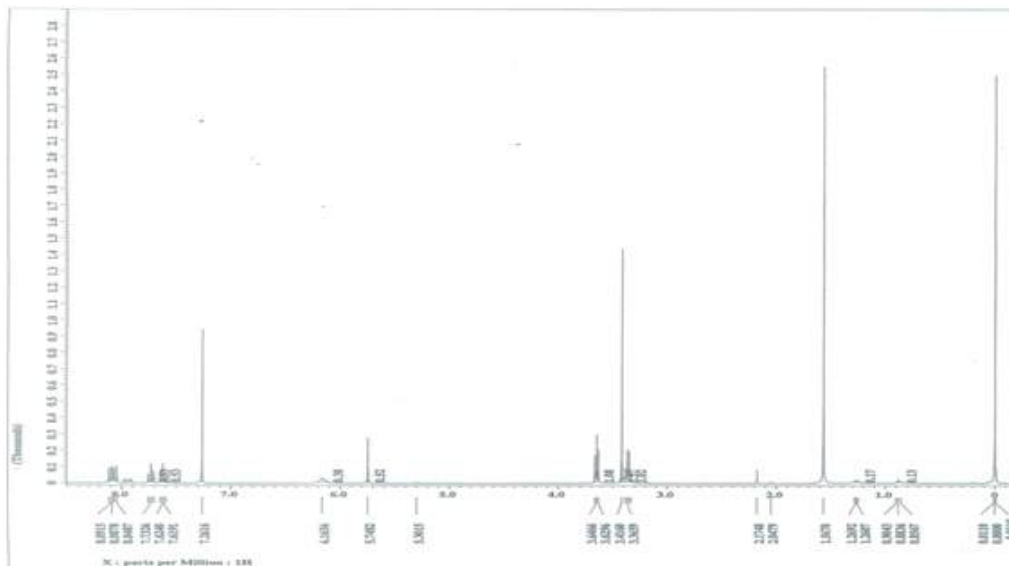
(49) 2-(4-hydroxybutylamino)naphthalene-1,4-dione



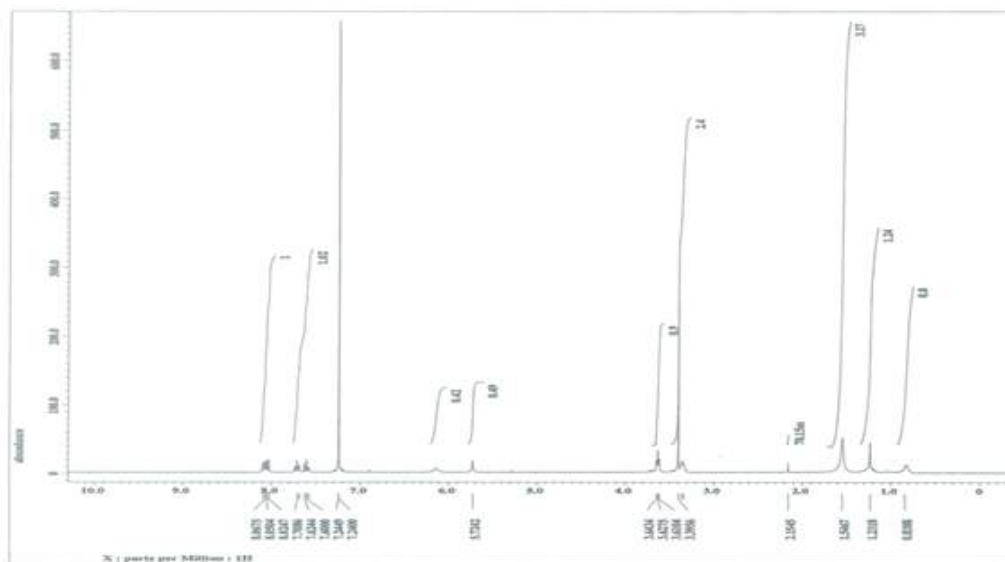
(50) 2-(2-hydroxybutylamino)naphthalene-1,4-dione



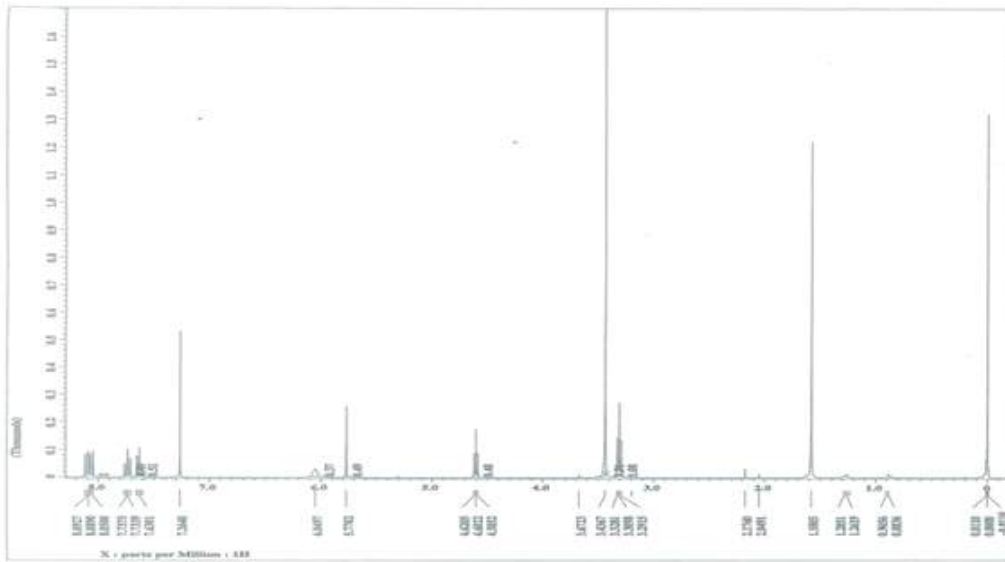
(51) 2-(2-methoxyethylamino)naphthalene-1,4-dione



(52) 2-(3-methoxypropylamino)naphthalene-1,4-dione



(53) 2-(2,2-dimethoxyethylamino)naphthalene-1,4-dione



[Reference]

- [1] Moore, S. K. et al. (2008). Impacts of climate variability and future climate change on harmful algal blooms and human health. *Environmental health*, Springer.
- [2] Michalak, A. M. (2016). "Study role of climate change in extreme threats to water quality." *Nature* 535(7612): 349-350.
- [3] Gobler, C. J. (2020). "Climate change and harmful algal blooms: insights and perspective." *Harmful algae* 91: 101731.
- [4] Smith, D. R., et al. (2015). "What is causing the harmful algal blooms in Lake Erie?" *Journal of Soil and Water Conservation* 70(2): 27A-29A.
- [5] Ho, J. C., et al. (2019). "Widespread global increase in intense lake phytoplankton blooms since the 1980s." *Nature* 574(7780): 667-670.
- [6] Anderson, D. M. (2009). Approaches to monitoring, control and management of harmful algal blooms (HABs). *Ocean & Coastal Management*, 52(7), 342–347.
- [7] Huisman, J., et al. (2018). "Cyanobacterial blooms." *Nature Reviews Microbiology* 16(8): 471-483.
- [8] Hallegraeff, G. (2003). "Harmful algal blooms: a global overview." *Manual on harmful marine microalgae* 33: 1-22.
- [9] O'Neil, J.M., T.W. Davis, M.A. Burford, and C.J. Gobler (2012). "The Rise Of Harmful Cyanobacteria Blooms: The Potential Roles Of Eutrophication And Climate Change". *Harmful Algae* 14.

- [10] Altieri, A. H. and K. B. Gedan (2015). "Climate change and dead zones." *Global change biology* 21(4): 1395-1406.
- [11] Charlebois, G. (2016). *Microcystin and Microcystis Destruction by Ozone in Drinking Water Treatment: Constraints and Effects*, University of Waterloo.
- [12] Nakano, Shin-ichi, Tetsukazu Yahara, and Tohru Nakashizuka (2016). *Aquatic Biodiversity Conservation And Ecosystem Services*. 1st ed
- [13] "Health And Ecological Effects". Epa.Gov.
- [14] Rastogi, R. P., et al. (2015). "Bloom dynamics of cyanobacteria and their toxins: environmental health impacts and mitigation strategies." *Frontiers in microbiology* 6: 1254.
- [15] Moran, L., et al. (2022). "Characterisation of the volatile profile of microalgae and cyanobacteria using solid-phase microextraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry." *Scientific Reports* 12(1): 3661.
- [16] Shoker, R. M. and A. Jawad (2013). "Evaluation of Isolated Compounds Activity from *Convolvulus Arvensis* Against Algae." *Iraqi Journal of Science* 54(1): 62-71.
- [17] 김범철, 사승환, 김문숙, 이윤경, 김재구. 2007, "국내 호수의 제한영양소와 하수 처리장 방류수인 기준 강화의 필요성", *한국물환경학회지*, 23(4), 512-517.
- [18] 박종근. "한국의 조류(Algae): 담수산 남조류 1." *대한민국 생물지*(환경부, 국립생물 자원관) 제 5권 1호(2012)
- [19] Vincent, W. (2009). "Cyanobacteria".

- [20] Microcystis - dominující rod vodních květu: nové poznatky v autekologii. - In: Maršálek, B., Feldmannová, M. & Maršálková, E. (Eds): Cyanobacteria 2006, 7 - 21. Botanický ústav AV ČR, Prahonice.
- [21] Smarda, J. (2009). "Cell ultrastructure changes accompanying the annual life cycle of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*." *Algological Studies*: 27-38.
- [22] Hartnell, D. M. (2019). Factors affecting the growth and toxin content of key cyanobacteria species in a changing world, Bournemouth University.
- [23] WHO guidelines on recreational water quality, 'Harmful algal blooms'
- [24] 이인규, 2001. 한국의 조류 생태와 응용. 아카데미서적, 서울. 20p
- [25] Funari, E. and E. Testai (2008). "Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure." *Critical reviews in toxicology* 38(2): 97-125.
- [26] Méjean, A., et al. (2014). "Biosynthesis of anatoxin-a and analogues (anatoxins) in cyanobacteria." *Toxicon* 91: 15-22.
- [27] Rastogi, R. P., et al. (2015). "Bloom dynamics of cyanobacteria and their toxins: environmental health impacts and mitigation strategies." *Frontiers in microbiology* 6: 1254.
- [28] Rao, P. V. L., Gupta, N., Bhaskar, A. S. B., and Jayaraj, R. (2002). Toxins and bioactive compounds from cyanobacteria and their implications on human health. *Journal of Environmental Biology*, 3: 215-224.
- [29] Fu, W. Y., Chen, J. P., Wang, X. M. and Xu, L. H. (2005). Altered expression of p53, Bcl-2 and Bax induced by microcystin-LR in vivo and in vitro. *Toxicon*, 46(2): 171-177.

- [30] Wolf, H.-U. and Frank, C. (2002). Toxicity assessment of cyanobacterial toxin mixtures. *Environmental Toxicology*, 17(4): 395-399.
- [31] Codd, G. A., Morrison, L. F., & Metcalf, J. S. (2005). Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203(3), 264–272.
- [32] Hooser, S. B., Beasley, V. R., Lovell, R. A., Carmichael, W. W., & Haschek, W. M. (1989). Toxicity of Microcystin LR, a Cyclic Heptapeptide Hepatotoxin from *Microcystis aeruginosa*, to Rats and Mice. *Veterinary Pathology*, 26(3), 246–252.
- [33] Maynes, J. T., et al. (2006). "Crystal structures of protein phosphatase-1 bound to motuporin and dihydromicrocystin-LA: elucidation of the mechanism of enzyme inhibition by cyanobacterial toxins." *Journal of Molecular Biology* 356(1): 111-120.
- [34] Schreidah, C. M., et al. (2020). "Microcystins: Biogenesis, toxicity, analysis, and control." *Chemical Research in Toxicology* 33(9): 2225-2246.
- [35] Campos, A. and V. Vasconcelos (2010). "Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells." *International journal of molecular sciences* 11(1): 268-287.
- [36] Weng, D., et al. (2007). "The role of ROS in microcystin-LR-induced hepatocyte apoptosis and liver injury in mice." *Toxicology* 232(1-2): 15-23.
- [37] Ding, W.-X., Shen, H.-M., Shen, Y., Zhu, H.-G., & Ong, C.-N. (1998). Microcystic Cyanobacteria Causes Mitochondrial Membrane Potential Alteration and Reactive Oxygen Species Formation in Primary Cultured Rat Hepatocytes. *Environmental Health Perspectives*, 106(7), 409
- [38] Papadimitriou, Theodoti, et al. "Differential effect of hydrogen peroxide on toxic

- cyanobacteria of hypertrophic Mediterranean waterbodies." *Sustainability* 14.1 (2022): 123.
- [39] Peng, A., & Maller, J. L. (2010). Serine/threonine phosphatases in the DNA damage response and cancer. *Oncogene*, 29(45), 5977-5988.
- [40] Courtney, T. M. and A. Deiters (2019). "Optical control of protein phosphatase function." *Nature Communications* 10(1): 4384.
- [41] Dana, D., et al. (2022). "Nek2 Kinase Signaling in Malaria, Bone, Immune and Kidney Disorders to Metastatic Cancers and Drug Resistance: Progress on Nek2 Inhibitor Development." *Molecules* 27(2): 347.
- [42] Arman, T. and J. D. Clarke (2021). "Microcystin toxicokinetics, molecular toxicology, and pathophysiology in preclinical rodent models and humans." *Toxins* 13(8): 537.
- [43] Valério, E., Chaves, S., & Tenreiro, R. (2010). Diversity and impact of prokaryotic toxins on aquatic environments: a review. *Toxins*, 2(10), 2359-2410.
- [44] NHMRC, NRMCC. (2011). Australian Drinking Water Guidelines Paper 6 National Water Quality Management Strategy. National Health and Medical Research Council, National Resource Management Ministerial Council, Commonwealth of Australia, Canberra.
- [45] Health Canada. (2015). Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: Guideline technical document for public comment - Cyanobacterial toxins. Water and Air Quality Bureau, Healthy Environments and Consumer Safety Branch, Ottawa, Ontario. Available in 2015.
- [46] Galvin, M., et al. (2018). "Cyanobacteria assessment network (cyan)".

- [47] Schrader, K. K., et al. (2003). "Novel derivatives of 9, 10-anthraquinone are selective algicides against the musty-odor cyanobacterium *Oscillatoria perornata*." *Applied and Environmental Microbiology* 69(9): 5319-5327
- [48] 이재정, et al. (2015). "대청호의 유해남조류 분포 특성." 공동 춘계학술발표회 (2000~) 2015: 603-604.
- [49] 환경부(2016) 물 환경 정보시스템. 「녹조(綠潮), 녹조현상은 무엇인가?
- [50] 이연웅(2016), 유해 녹조 제어를 위한 2,4-thiazolidinedione 유도체 합성 및 활성평가, 석사, 조선대학교.
- [51] 조두리(2016), *Microcystis aeruginosa* 제어를 위한 5-Benzylidenerhodanine 유도체 합성 및 살조 활성 평가, 석사, 조선대학교.
- [52] 변대흥 (2013). 유해 조류 제어를 위한 naphthoquinone 유도체 합성, 조선대학교 대학원.
- [53] Rippka, R., et al. (1979). "Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria." *Microbiology* 111(1): 1-61.
- [54] 이경락, et al. (2010). "Microcystis 3 종 (*M. aeruginosa*, *M. ichthyoblabe*, *M. viridis*) 의 성장과 microcystins 생성에 대한 온도 및 조도의 영향." *한국하천호수학회지* 43(3): 400-408.
- [55] Guedes, A. C., et al. (2019). *Algal spent biomass – A pool of applications*. *Biofuels from algae*, Elsevier: 397-433.
- [56] Björn, L. O., et al. (2009). "A viewpoint: why chlorophyll a?" *Photosynthesis research* 99(2): 85-98.

- [57] 정석균, 전정범. 주사전자현미경의 기본원리와 응용(Part 1). Korean Industrial Chemistry News. 2009. 12(6): 39-46.
- [58] Jackman J. The Microbe: The Basics of Structure, Morphology, and Physiology as They Relate to Microbial Characterization and Attribution. Chemical and Physical Signatures for Microbial Forensics, Infectious Disease. Springer, New York. 2012. 13-34.
- [59] 환경부고시 제2017-102호(2017-05-24)
- [60] OECD Guideline for testing of Chemicals 202, ‘Daphnia sp., Acute Immobilisation Test’
- [61] 국립환경과학원고시 제2017-4호(2017-03-14) 제3장 제2항 물벼룩 급성독성시험 (OECD TG 202)
- [62] 박해철 (2010). "Zebrafish (Danio rerio)." KSMCB Webzine: 1-11.
- [63] Caballero, M. V. and M. Candiracci (2018). "Zebrafish as screening model for detecting toxicity and drugs efficacy." Journal of Unexplored Medical Data 3: 4.