

해양오염의 진단을 위한 생화학적 오염지표에 관한 연구

X. 남해산 홍합 (*Mytilus coruscus*)의 산소 라디칼 및 제거효소의 변화

최진호[†] · 김대익 · 박수현 · 김동우* · 박청길** · 양동범***

부경대학교 식품생명공학부 생화학교실

*부경대학교 해양식량자원개발 특성화사업단

**부경대학교 공과대학 환경공학과

***한국해양연구소 해양화학연구부

Study on Biochemical Pollutant Markers for Diagnosis of Marine Pollution X. Changes in Oxygen Radicals and Their Scavenger Enzymes of the Mussel (*Mytilus coruscus*) in the South Sea

Jin-Ho Choi[†], Dae-ik Kim, Soo-Hyun Park, Dong-Woo Kim*, Chung-Kil Park** and Dong Beom Yang***

Faculty of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University,

**Seafood and Marine Bioresources Development Center*

***Department of Environmental Engineering, Pukyong National University*

****Korea Ocean Research and Development Institute*

Abstract

This study was designed as a part of efforts to investigate the biochemical pollutant markers for diagnosis of marine pollutions by changes in oxygen radicals and their scavenger enzymes of the mussel (*Mytilus coruscus*) in South Sea of Korea. Protein contents in muscle of cultured mussel in South Sea were remarkably lower (4-14%, respectively) than those of wild mussel in Pohang of East Sea. Superoxide radical activities in muscle of cultured in South Sea were significantly higher 82~138% than those of wild mussel in Pohang. Hydroxyl radical formations in muscle of cultured mussels in South Sea were significantly 9~25% higher than those of wild mussels in Pohang. Superoxide dismutase (SOD) activities in muscle of cultured mussels in South Sea were significantly 16~28% lower than those of wild mussels in Pohang. It is believed that significantly decrease of protein contents in muscle, remarkable increases of superoxide radical and hydroxyl radical in muscle of cultured mussels of South Sea may be used as a biochemical pollutant markers for diagnosis of marine pollutions. These results suggest that near-coastal water as well as neritic water of the south sea might be affected by pollutant.

Key words – Mussel (*Mytilus coruscus*), South Sea, Reactive oxygen species (ROS), Superoxide radical($O_2^{\cdot-}$), Hydroxyl radical($\cdot OH$), Superoxide dismutase (SOD),

[†] Corresponding author

서 론

지금까지 우리나라를 비롯한 연안국들은 해양의 오염이 생태계와 수산자원에 어떠한 직접적인 영향을 주는가를 파악하기 위해 생화학적 오염지표의 연구가 활발히 진행되고 있다 (Kramer, 1994). 해양오염에 의한 해양 생태계의 파괴는 인간의 생존과 직결되는 심각한 문제가 아닐 수 없다. 지금까지는 공장폐수나 가정용 오수, 그리고 농약 등 육상의 오염에 대해서만 우려를 보였지만, 이들 오염물질들이 정화되지 않고 바다에 유입되면서부터 해양생태계의 심각한 파괴가 현실로 다가오고 있다. 그 중에서도 어패류나 해조류 등 수산식품의 오염은 정말 심각하다. 사실 우리 국민의 동물성 단백질의 거의 50%를 해산물에 의존하고 있기 때문에 삼면이 바다인 우리나라의 해양오염은 매우 심각하게 받아들여져야 한다.

해양의 오염은 해수 및 해저 퇴적물중의 오염물질의 농도로 정량화하고 있지만, 이는 확실한 오염의 지표라고는 볼 수 없다. 실제로 중요한 것은 오염물질들이 어떻게, 얼마나 해양 생태계에 영향을 주는가를 밝혀내는 일이다. 해양의 수많은 생물종들이 다양한 오염물질에 의해 어떠한 피해를 받는가를 모두 조사한다는 것은 거의 불가능하기 때문에 오염물질에 민감하게 반응하는 생물들을 중심으로 생화학적, 생리학적 지표를 개발하는 연구가 많이 진전되고 있을 뿐만 아니라 해양환경의 영향평가에 실제 적용되기 시작하고 있다 (Ellman et al., 1991; Holland et al., 1967; Grzebyk and Galgani, 1991; Galgani et al., 1992; Bocquéné and Galgani, 1991; Collier et al., 1992; McCain et al., 1996).

저자 등은 이미 황해안의 자연 및 양식산 넙치 (Choi et al., 1997a; Moon et al., 1997; Choi et al., 1997b), 도다리 (Choi et al., 1997c,d,e) 및 남해안의 자연 및 양식산 넙치 (Choi et al., 1998f,g,h)를 시료로 한 해양오염의 진단을 위한 생화학적 오염지표 연구를 실시하여 도다리 혈액의 생화학분석을 이용한 오염의 측정법 (최와 양, 1997a), 넙치의 생화학적 분석기법을 이용한 해양오염의 측정법 (최와 양, 1997b) 및 넙치의 효소분석에 의한 해양오염 진단용 생화학지표의 개발법 (최등, 1998c)을 특허출원한 바 있다. 본 연구에서는 우리나라 남해안의 오염지표 설정을 위한 기초연구의 일환으로서, 홍합과에 속하는 어패류인 홍

합을 사용하여 활성산소 (oxygen free radical)로 알려진 히드록시 라디칼 (hydroxyl radical), 수퍼옥시드 라디칼 (superoxide radical) 등의 활성산소 (oxygen radicals)의 생성을 평가하고, 아울러 이들 활성산소의 제거효소 (scavenger enzyme)로서 수퍼옥시드 디스무타아제 (superoxide dismutase: SOD) 등의 활성을 분석 비교하여 생화학적 오염지표의 설정 가능성을 평가하고자 한다.

재료 및 방법

조직의 분획 및 단백질의 측정

홍합 시료 (*Mytilus coruscus*)는 실험군으로서 남해안의 사천 (Sachon), 진해 (Chinhae), 통영 (Tongyong), 여수 (Yosu)에서 채집한 양식산 홍합을, 그리고 대조군으로는 오염도가 비교적 적은 동해안의 포항 (Pohang)에서 채집한 자연산 홍합을 각각 1998년 9월~10월 사이에 300마리씩 구입하여 사용하였다.

근육의 조직획분은 Galgani et al. (1992)의 방법에 따라 분획하였으며, 단백질 함량은 Lowry et al. (1951)의 방법에 따라 표준 단백질로서 BSA (bovine serum albumin)를 사용하여 분광광도계로 525 nm에서 흡광도를 측정하여 표준검량선에 의하여 단백질의 함량을 정량하였다.

히드록시 라디칼의 측정

활성산소 (oxygen radicals)중에서 가장 활성이 강한 히드록시 라디칼 (hydroxyl radical)은 저자 등(1998g)의 방법에 따라 분광광도계를 사용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하여 표준검량선에 의해 실험군과 대조군의 흡광도의 차이를 이용하여 생성량 (nmole/mg protein/min)을 정량하였다.

수퍼옥시드 라디칼의 함량 측정

수퍼옥시드 라디칼 (superoxide radical)의 생성은 Ma-Cord et al. (1969)과 Chan et al. (1974)의 방법에 따라 superoxide dismutase를 억제할 수 있는 ferricytochrome C의 환원속도를 측정하였다. 즉 0.1mM EDTA를 함유한 인산완충용액(pH 7.8) 420 μ l에 cyanide의 농도가 50 μ M이 되도록 20mM cyanide 용액을 가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 가온하였다. 이 용액에 근육조직 300 μ l와 0.1mM

cytochrome C 50 μ l를 넣어 분광광도계를 사용하여 550 nm에서 흡광도를 시간에 따라 측정하였다. 이 때 cytochrome C의 양은 분자흡광계수 $19,500M^{-1}cm^{-1}$ 로 계산하였다.

활성산소의 제거효소의 활성 측정

활성산소의 제거효소로서 가장 중요한 생체방어효소인 SOD활성은 Oyanagui et al. (1984)의 방법을 응용한 저자 등(1998)의 방법에 따라 분광광도계를 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하여 표준검량선에 의거 활성을 정량하였다.

분석결과의 통계처리

모든 실험결과는 통계 처리하여 평균치와 표준편차를 계산하였고, 각 군간의 유의성 검정은 Student's t-test (Steel and Torrie, 1960)로 실시하였다.

결과 및 고찰

단백질 함량 비교

실험군으로서 남해안의 사천, 진해, 통영, 여수의 양식산 홍합의 근육중의 단백질의 함량을 측정·평가하기 위하여 오염이 비교적 적은 동해안 포항의 자연산 홍합의 근육중의 단백질의 함량을 대조군으로 하여 측정하여 비교하여 보면 Fig. 1과 같다.

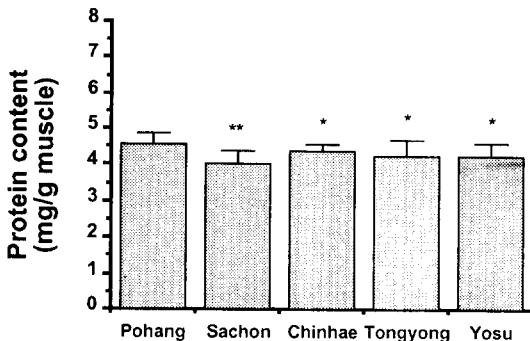


Fig. 1. Comparisons of protein contents in muscle of cultured mussel (*Mytilus coruscus*) in September-October 1998.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ compared with wild mussel in Pohang.

이들 홍합의 근육중에서의 단백질의 함량은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 남해안의 양식산 홍합의 근육에서의 단백질의 함량($4.00 \pm 0.38 \sim 4.39 \pm 0.18$ mg/g muscle)이 대조군으로 사용한 동해안 포항의 자연산 홍합의 근육중의 단백질 함량(4.56 ± 0.29 mg/g muscle: 100%) 대비 4~14%나 현저히 감소되고 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 저자 등(Moon et al., 1997; Choi et al., 1997d; Choi et al., 1998)이 발표한 황해안 및 남해안의 넙치 및 도다리의 단백질 함량이 동해안의 단백질 함량보다 상당히 낮은 경향을 나타내고 있는 결과와 유사함을 보여주었다.

이들 홍합의 근육중의 단백질 함량을 비교하여 볼 때 양식산의 단백질 함량이 자연산의 단백질 함량에 비해 현저히 감소한다는 사실은 매우 흥미있는 사실로서, 서식환경의 오염에 의하여 단백질의 함량이 감소하고 있음을 알 수 있었다. 이러한 사실은 이미 Galgani et al. (1992)의 보고에서 오염에 따라 AChE 활성의 감소와 함께 단백질의 함량도 감소하고 있다는 사실을 지적한 바 있다. 양식산의 단백질의 감소는 해양오염 등 서식환경이 가장 문제가 되겠지만, 그밖에도 성장지의 운동량에 따른 어체(魚體) 밀도의 차이도 일부 관계할 것으로 판단된다. 따라서 자연산 홍합의 육질이 단단하다는 것을 의미한다.

활성산소종의 생성량 비교

Superoxide radical($O_2^{\cdot-}$)는 강력한 활성산소로서 다음 반응에 의해 생성된다. 즉 삼중항산소(triplet oxygen)가 전자를 받아($3O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$) 수퍼옥시드 라디칼이 생성되는데, 이것이 hydroperoxide radical($\cdot OOH$), hydrogen peroxide 및 hydroxyl radical($\cdot OH$)이나 일중항산소(singlet oxygen)를 생성하는 것으로 되어 있기 때문에 free radical damage중 초기단계에서 가장 강력한 활성산소로 보고되어 있다. 따라서 체내 superoxide radical이 생성되고 이 radical는 다시 H_2O_2 로 전환된다. 이렇게 생성된 H_2O_2 는 근육조직 중에 존재하는 Fe^{2+} 와 반응하여 즉 $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow \cdot OH + OH + Fe^{3+}$ 의 Fenton 반응을 일으켜 hydroxyl radical($\cdot OH$)을 생성하고 이렇게 생성된 hydroxyl radical이 근육 단백질의 여러 아미노산 잔기에 작용하여 carbonyl기를 생성하는 것으로 알려져 있다.

따라서 생체내의 과산화지질의 생성에 직접 관계하고 있는 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)으로 알려

진 산소 라디칼(oxygen free radical)중에서 수퍼옥시드 라디칼(superoxide radical)과 가장 강력한 활성산소종인 히드록시 라디칼(hydroxyl radical)의 생성량을 비교하기 위하여 남해안의 양식산 홍합의 활성산소종의 생성량을 동해안의 포항의 자연산 홍합의 활성산소종의 생성량을 대조군으로 하여 측정하여 보면 Fig. 2와 같다.

남해안의 양식산 홍합의 근육중의 수퍼옥시드 라디칼의 생성량은 $96.65 \pm 5.27 \sim 126.78 \pm 4.46$ nmol/mg protein으로서 대조군으로 사용한 동해안 포항의 자연산 홍합의 근육중의 수퍼옥시드 라디칼의 생성량(53.24 ± 2.87 nmol/mg protein; 100%) 대비 82~138%정도나 높았다. 또한 남해안의 양식산 홍합의 근육중의 히드록시 라디칼의 생성량은 $19.39 \pm 0.88 \sim 22.33 \pm 0.88$ nmol/mg protein으로서 대

조군으로 사용한 동해안 포항의 자연산 홍합의 근육중의 히드록시 라디칼의 생성량(17.84 ± 0.83 nmol/mg protein; 100%) 대비 9~25%정도나 높았다. 이러한 결과는 전보에서 저자 등(Moon et al., 1997; Choi et al., 1997d; Choi et al., 1998g)이 지적했듯이 해양오염이 심할수록 SOD 등의 제거효소의 활성이 감소되어 활성산소의 생성량을 증가하였을 가능성을 배제할 수 없다. 따라서 이러한 활성산소종의 생성반응은 해양오염과 밀접한 관련이 있을 것으로 판단된다.

활성산소종에 대한 제거효소의 활성 비교

활성산소종(reactive oxygen species: ROS)으로 알려진 수퍼옥시드라디칼(superoxide radical), 히드록시 라디칼(hydroxyl radical) 및 과산화수소(hydrogen peroxide) 등의 활성산소에 대한 제거효소(scavenger enzyme)중에서 가장 강력한 수퍼옥시드 디스무타아제(superoxide dismutase: SOD)의 활성을 동해안 포항의 자연산 홍합을 대조군으로 하고 남해안 양식산 홍합을 시료로 하여 측정하여 본 결과는 Fig. 3과 같다.

남해안의 양식산 홍합의 근육중의 SOD의 활성은 $22.65 \pm 0.21 \sim 26.60 \pm 2.20$ unit/mg protein으로서 대조군으로 사용한 동해안 포항의 자연산 홍합의 근육중의 SOD의 활성(31.61 ± 2.59 unit/mg protein; 100%) 대비 16~28%정도나 오히려 낮았다.

이러한 결과는 전보에서 저자 등(Moon et al., 1997;

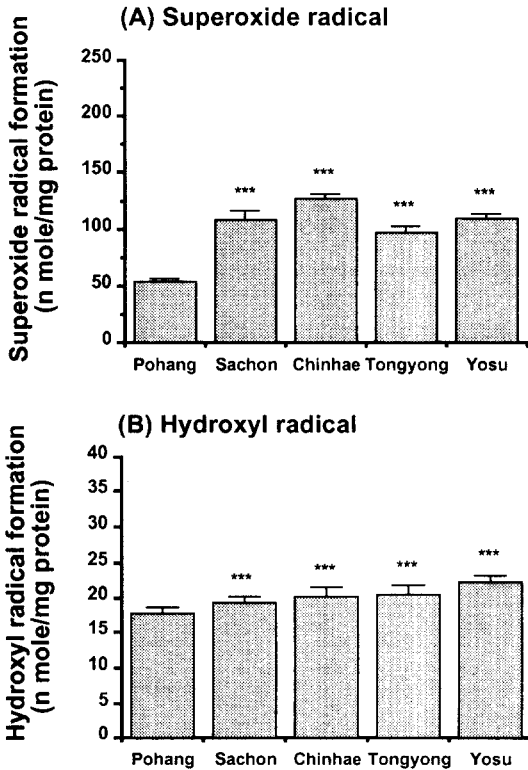


Fig. 2. Comparisons of superoxide radical(A) and hydroxyl radical(B) activities in muscle of cultured mussel (*Mytilus coruscus*) in September-October 1998.

***p<0.001 compared with wild mussel in Pohang.

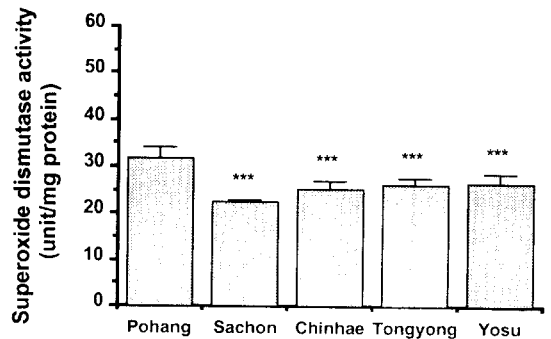


Fig. 3. Comparisons of superoxide dismutase (SOD) activity in muscle of cultured mussel (*Mytilus coruscus*) in September-October 1998.

***p<0.001 compared with wild mussel in Pohang.

Choi et al., 1997d; Choi et al., 1998g)이 지적했듯이 오염이 심할수록 SOD 등 제거효소의 활성이 감소된다는 사실은 활성산소종과 더불어 깊은 관련이 있을 것으로 판단되며, 이는 남해안 시료채취해역이 동해안 시료채취해역보다 오염도가 비교적 높다는 사실을 나타낸다.

지금까지 황해안 및 남해안의 양식장의 수질환경은 육상오수의 유입, 농약 등의 오염원에 노출되어 있기 때문에 양식장의 환경이 갈수록 위협을 받고 있다. 이제는 정화되지 않는 육상오수의 유입 방지, 수질의 여과방법의 개발 등을 포함한 양식장의 서식환경 개선에 적극 나서야 할 때라고 본다.

요 약

해양오염의 진단을 위한 생화학적 오염지표 설정의 기초연구의 일환으로, 오염이 심각한 남해산 홍합(*Mytilus coruscus*)의 근육중의 활성산소종 및 그들의 제거효소의 활성을 분석·평가하였다. 이들 홍합의 근육중의 단백질의 함량은 남해안 양식산 홍합의 근육중의 단백질 함량이 동해안의 포항의 자연산 홍합(대조군)의 단백질 함량에 비해 4~14%나 유의적으로 감소하였다($p < 0.05-0.01$).

남해안의 양식산 홍합의 근육중의 수퍼옥사이드 라디칼의 생성량은 대조군으로 사용한 동해안 포항의 자연산 홍합의 근육중의 수퍼옥사이드 라디칼의 생성량 대비 82~138%정도나 높았다. 또한 남해안의 양식산 홍합의 근육중의 히드록시 라디칼의 생성량은 대조군으로 사용한 동해안 포항의 자연산 홍합의 근육중의 히드록시 라디칼의 생성량 대비 9~25%정도나 높았다. 남해안의 양식산 홍합의 근육중의 SOD의 활성은 동해안 포항의 자연산 홍합의 근육중의 SOD의 활성대비 16~28%정도나 낮았다. 이상의 연구 결과에서 볼 때 남해안 홍합의 오염 지표로서는 단백질 함량의 감소, 활성산소종의 증가 및 활성산소의 제거효소로서 SOD의 활성감소로 평가가 가능하다는 사실을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 환경부 과학기술처의 선도기술개발사업인 "해양환경 감시 및 평가기술(9-4-1)"의 연구비 지원과 일

부 부경대학교 해양식량자원개발 특성화사업단 연구원 연구지원에 의해 수행되었음.

참 고 문 헌

1. Bocquéné, G. and F. Galgani. 1991. Acetylcholinesterase activity in the common prawn (*Palaemon serratus*) contaminated by carbarly and phosalone: Choice of a method for detection of effects. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **22**, 337-345.
2. Chan, P. C. and Bielski, B. H. J. 1974. Enzyme catalyzed free radical reactions with nicotinamide adenine nucleotide. *J. B. Chem.*, **249**(4), 1317-1319.
3. Choi, J. H., Kim, D. W., Moon, Y. S., Park, C. K., Kim, J. I. and Yang, D. B. 1997a. Study on biochemical pollutant marker for diagnosis of marine pollution I. Changes in lipid components of flounder (*Paralichthys olivaceus*) in the Yellow Sea. *Korean J. Life Science*, **7**(1), 1-9.
4. Choi, J. H., Kim, D. W., Kim, J. I., Park, C. K. and Yang, D. B. 1997b. Study on biochemical pollutant marker for diagnosis of marine pollution III. Changes in cholinesterase activity of flounder (*Paralichthys olivaceus*) in the Yellow Sea. *Korean J. Life Science*, **7**(1), 17-23.
5. Choi, J. H., Kim, D. W., Park, C. K., Kim, J. I. and Yang, D. B. 1997c. Study on biochemical pollutant index for diagnosis of marine pollution IV. Changes in lipid components of flounder (*Pleuronichthys cornutus*) in the Yellow Sea. *J. Korean Fish. Soc.*, **30**(4), 601-607.
6. Choi, J. H., Kim, D. W., Moon, Y. S., Park, C. K. and Yang, D. B. 1997d. Study on biochemical pollutant index for diagnosis of marine pollution V. Changes in oxygen radicals and their scavenger enzymes of flounder (*Pleuronichthys cornutus*) in the Yellow Sea. *J. Korean Fish. Soc.*, **30**(4), 608-613.
7. Choi, J. H., Kim, D. W., Moon, Y. S., Park, C. K. and Yang, D. B. 1997e. Study on biochemical pollutant index for diagnosis of marine pollution VI. Changes in cholinesterase activity of flounder (*Pleuronichthys cornutus*) in the Yellow Sea. *J. Korean Fish. Soc.*, **30**(4), 614-619.
8. Choi, J. H., Kim, D. W., Kim, J. H., Kim, K. S., Park, C. K. and Yang, D. B. 1998f. Study on biochemical pollutant marker for diagnosis of marine pollution VII. Changes in lipid components of flounder (*Par-*

- alichthys olivaceus*) in the South Sea. *J. Korean Fish. Soc.*, **31**(6), 882-888.
9. Choi, J. H., Kim, D. W., Kim, J. H., Kim, D. I., Park, C. K. and Yang, D. B. 1998g. Study on biochemical pollutant marker for diagnosis of marine pollution VIII. Changes in oxygen radicals and their scavenger enzymes of the flounder (*Paralichthys olivaceus*) in the South Sea. *J. Korean Fish. Soc.*, **31**(6), 889-894.
 10. Choi, J. H., Kim, D. W., Park, S. H., Park, C. K. and Yang, D. B. 1999h. Study on biochemical pollutant marker for diagnosis of marine pollution IX. Changes in cholinesterase activity of the flounder (*Paralichthys olivaceus*) in the South Sea. *J. Korean Fish. Soc.*, **32**(1), 37-41.
 11. Choi, J. H., Kim, D. W. and Yang, D. B. 1998i. LDH/AChE and MDA/SOD ratios of flounder (*Paralichthys olivaceus*) as biomarkers of coastal pollution on the western coast of Korea. *Korean J. Life Science*, **8**(1), 57-60.
 12. Choi, J. H., Kim, D. W. and Yang, D. B. 1998j. LDL-Chol/Hb and MDA/GSHPx ratios in serum of flounder (*Pleuronichthys cornutus*) as biomarker of marine pollution. *Korean J. Life Science*, **8**(1), 66-69.
 13. Collier, T. K., Connor, S. D., Eberhardt, B. L., Anulacion, B. F., Goksøyr, A. and Varanas, U. 1992. Using cytochrome P-450 to monitor the aquatic environment. *Mar. Env. Res.*, **34**, 195-199.
 14. Ellman, G. L., Courtney, K. O., Andres, V. and Featherstone, R. M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, **7**, 88-95.
 15. Galgani, F. 1992. Monitoring of pollutant biochemical effects on marine organisms of the French Coasts. *Oceanologica Acta.*, **15**(4), 355-364.
 16. Galgani, F. and Bocquéné, G. 1990. In vitro inhibition of acetylcholinesterase from four marine species by organophosphates and carbamates. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.*, **45**, 243-249.
 17. Galgani, F., Bocquéné, G. and Cadiou, Y. 1992. Evidence of variation of cholinesterase activity in fishes along a pollution gradient in the North Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 19-23.
 18. Grzebyk, D. and Galgani, F. 1991. Measurement of organic pollution on marine organism: rapid determination of EROD induction using plate readers. *Aquat. Liv. Resour.*, **4**, 53-59.
 19. Holland, H. T., Coppage, D. R. and Imada, N. 1967. Use of fish brain acetylcholinesterase to monitor pollution by organophosphorus pesticides. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **2**(3), 156-162.
 20. Kramer, K. J. M. 1994. Biomonitoring of coastal waters and estuaries. pp 325-329. CRC Press London.
 21. Lowry, O. H., Roseborough, N. L., Farr, L. A. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
 22. McCain, B. B., Collier, T. K., Brown, D. W., Stein, J. E., Horn, T., Chan, S. L., Myers, M. S., Pierce, S. M. and Varanas, U. 1996. Chemical contaminant exposure and effects in four fish species from Tampa Bay, Florida. *Estuaries*, **19**(1), 86-104.
 23. McCord, J. M. and Fridovch, I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythro cuprein (hemocuprein). *J. B. Chem.*, **244**(22), 6049-6055.
 24. Moon, Y. S., Kim, D. W., Choi, J. H., Park, C. K. and Yang, D. B. 1997. Study on biochemical pollutant marker for diagnosis of marine pollution II. Changes in oxygen radicals and their scavenger enzymes of flounder (*Paralichthys olivaceus*) in the Yellow Sea. *Korean J. Life Science*, **7**(1), 10-16.
 25. Oyanagui, Y. 1984. Reevaluation of assay methods and establishment of Kit for superoxide dismutase activity. *Anal. Biochem.*, **42**, 290-296.
 26. Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. 1960. Principles and Procedures of Statistics. McGrawhill, New York.
 27. 최진호, 양동범. 1997a. 도다리 혈액의 생화학적 분석을 이용한 해양오염의 측정법. 특허출원 제51849호(1997. 10. 9).
 28. 최진호, 양동범. 1997b. 넙치의 생화학적 분석기법을 이용한 해양오염의 측정법. 특허출원 제51850호(1997. 10. 9).
 29. 최진호, 양동범, 김동우. 1998c. 넙치의 효소분석에 의한 해양오염 진단용 생화학지표의 개발. 특허출원 제 40337호(1998. 9. 28).