애기거머리말의 항산화 활성

곽명국¹, 김다슬², 오광석³, 서영완^{1,2*}

Antioxidant Activity of the Seagrass *Zostera japonica*

Myoung Kuk Kwak¹, Da Seul Kim², Kwang-suk Oh³, and Youngwan Seo^{1,2*}

접수: 2014년 7월 12일 / 게재승인: 2014년 8월 20일
© 2014 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: In this study, crude extract of the seagrass *Zostera japonica*, and its solvent-partitioned fractions were evaluated for their antioxidant activity. The crude extract was successively fractionated into *n*-hexane, 85% aqueous methanol (85% aq.MeOH), *n*-butanol (*n*-BuOH), and water fractions by liquid-liquid partition. These include DPPH radical scavenging, hydroxyl radical scavenging in HT-1080 cells, peroxynitrite scavenging, and protective effect on DNA damage caused by hydroxyl radicals generated. In all assays, except for DPPH radical, 85% aq.MeOH and *n*-BuOH fraction showed the strong antioxidant activity. These results suggest that *Z. japonica* may be used as a potential source of natural antioxidants for the development of cosmetic product or functional food in the future.

Keywords: *Zostera japonica*, Reactive oxygen species (ROS), Peroxynitrite, DNA oxidation

1. INTRODUCTION

해양 현화식물 (seagrass)은 외떡잎 식물 아강에 속하는 다계통 발생군으로서 단일목 (Alismatales)하에 60 여 종이 포함되어 있는 4개의 과 (Posidoniaceae, Zosteraceae, Hydrocharitaceae, Cymodoceaceae)로 나뉘어 진다. 일반적으로 해양 현화식물은 벼과 (Poaceae)에 속하는 육상식물의 특징을 많이 닮았으며 발견되는 화석이나 분자생물학적인 연대측정법에 의하면 약 1.3억년 전에 육지에서 서식하던 식물에서 유래된 것으로 여겨지고 있다. 이 식물들은 오랫동안 수중 환경에 적응하다 보니 수술과 꽃부리가 감소되어 있으며, 또한 수중이라고 하는 특수한 환경에서 수분이 일어나게 하기 위하여 육상식물보다 더 오랜 기간 꽃가루를 생산한다. 해양 현화식물은 군집을 이루어 자라는 모습이 육지의 초원처럼 보이기 때문에 해조류와 구별하여 바다에서 자라는 풀 즉 해초 (seagrass)라 불리며 해초에 의해 형성된 넓은 해중림은 해안 생태계의 주요 구성 성분으로서 해양생물들에게 먹이를 공급하는 좋은 서식처가 된다 [1-4].

애기거머리말 (*Z. japonica*)은 동아시아 고유종으로서 대략 수심 1 m 깊이의 모래밭과 진흙밭에서 자라며 일본 북쪽에서 필리핀과 베트남까지 북태평양 연안을 따라 온대지역에서 아열대지역까지 분포되어 있으며 최근에는 북아메리카의 북태평양 연안에도 발견되고 있다 [5,6]. 이 뿐만 아니라 애기거머리말은 일차 생산력과 해수정화 그리고 물고기와 조개들의 중요한 서식처를 제공하는 거머리말과 현화식물이 만드는 해중림의 주요 구성 성분중 하나이다. 애기거머리말은 다년생 식물이며 무성 및 유성생식에 의해서 번식할 수 있으나 일반적으로 영양번식에 의해서 자란다 [2,5].

지금까지 우리 나라에 서식하는 잘피에 대한 천연물화학적 연구는 거의 이루어지지 않았으며 특히 애기거머리말

¹한국해양대학교 해양환경 · 생명과학부
¹Division of Marine Environment & Bioscience, Korea Maritime & Ocean University, Busan 606-791, Korea
Tel: +82-51-410-4328, Fax: +82-51-404-4750
e-mail: ywseo@kmou.ac.kr

²한국해양대학교 해양과학기술융합학과
²Ocean Science & Technology School, Korea Maritime & Ocean University, Busan 606-791, Korea

³한국해양대학교 해양공간건축학과
³Department of Architecture and Ocean Space, Korea Maritime & Ocean University, Busan 606-791, Korea

에 대한 연구는 생태나 환경적인 영향에 대한 연구가 대부분으로 [4-9], 애기거머리말의 생리활성에 대한 연구는 항염증과 암세포 증식 억제 효과에 대한 것이 유일하다 [10,11]. 조간대에 서식하는 해초류로부터 항산화 물질을 탐색하는 중에 해양 현화식물인 애기거머리말의 조추출물이 좋은 항산화 활성을 가짐을 확인하였다. 따라서 본 연구에서는 애기거머리말의 추출물 및 용매 분획물을 제조하여 peroxynitrite 소거능, 세포내 ROS의 소거효과, DNA 산화 억제 등을 측정함으로써 애기거머리말의 항산화 활성을 확인하여 항산화제 개발의 새로운 원천으로의 활용 가능성을 탐색하고자 하였다.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. 실험재료

실험에 사용한 애기거머리말 (*Zostera japonica*)는 2007년 7월 경상남도 창원시 진동면 다구리에서 직접 채집하였으며 응달에서 건조한 후 추출하기 전까지 -25°C에서 냉동 보관하였다.

2.2. 사용시약

사용된 모든 유기 용매는 사용하기 전 정제하여 실험에 사용하였으며, 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH), L-ascorbic acid, DL-2-amino-3-mercapto-3-methyl-butanoic acid (DL-penicillamine), dihydrorhodamine 123 (DHR 123), 3-morpholino- sydnonimine (SIN-1)는 Sigma사 (St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 그리고 peroxynitrite (ONOO⁻)는 Cayman (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하였다. 세포 배양에 필요한 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)은 Hyclone사 (Logan, UT, USA)에서 구입하였으며, Fetal Bovine Serum (FBS), Penicillin-Streptomycin과 phosphate buffered saline (PBS) 등은 GIBCO사 (Grand Island, NY, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 세포내 ROS 측정에 사용된 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)는 Molecular Probes inc. (Eugene, OR, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2.3. 시료의 추출 및 순차분획

애기거머리말 (*Zostera japonica*)를 -25°C의 냉동고에 보관하였다가 해빙하여 잘게 자른 후, acetone과 methylene chloride (1:1)의 혼합 용매를 사용하여 24시간 동안 추출한 후 여과하였다. 이 과정을 2번 반복하였으며, 얻어진 추출액을 40°C 수욕 상에서 rotary vacuum evaporator (EYELA JAPAN, N-N series)로 농축하여 acetone/methylene chloride (A+M) 조추출물을 얻었다. 남은 잔사에는 동량의 methanol을 부어 위와 동일한 과정을 통해 methanol 추출물을 얻었다. 이 두 추출물을 합하여 조추출물 209.7 g을 얻어 활성측정 시료로 사용하였으며 다시 이 조추출물을 용매 극성에 따라 순차적으로 분획하고 각 분획층을 감압농축 후 건조한 분말로 만들어 시료로 사용하였다. 이 때 얻어진 *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH,

water 분획물은 각각 13.3 g, 7.7 g, 22.5 g, 141.7 g이었다.

2.4. 총 폴리페놀 함량 측정

애기거머리말로부터 얻은 추출물과 용매 분획물에 포함된 폴리페놀의 함량은 Folin-Denis 법으로 측정하였다 [12]. 추출물 및 용매분획물을 1 mg/mL의 농도로 희석시킨 후, 희석액 20 µL에 Folin-Ciocalteu's reagent solution을 500 µL를 가하고 3분간 정치시킨 뒤 10% Na₂CO₃용액을 500 µL 가하여 혼합하여 20분간 정치시킨 뒤 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 증류수에 녹여 농도를 1250 µg/mL로 조제하고, 이를 2배씩 연속적으로 희석하여 얻어진 용액들을 이용하여 위와 동일한 방법으로 분석한 후 얻어진 표준 검량선으로부터 각 추출물과 용매분획물의 총 폴리페놀 함량을 산출하였다.

2.5. DPPH 라디칼 소거 활성 측정

2 mg DPPH를 15 mL ethanol에 녹인 용액과 ethanol, DMSO를 각각 1.2 : 3.0 : 0.5의 비율로 혼합하여 DPPH radical 용액을 만든다. 각각 농도별로 준비한 시료 100 µL와 제조한 DPPH radical 용액 900 µL를 혼합하여 10분간 상온에서 반응시킨 후 518 nm에서 흡광도를 측정한다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 유리 라디칼 소거 활성을 백분율로 나타내었으며, 대조군의 UV-VIS 흡광도는 0.94~0.97이 되도록 조정하였다 [13]. 그리고 3회 반복 실험하여 얻은 결과를 평균한 값으로 나타내었다.

EDA (electron donating ability) (%) =

$$\frac{\text{대조군 흡광도} - \text{실험군 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

2.6. Peroxynitrite 소거 활성

ONOO⁻ 소거 활성은 dihydrorhodamine 123 (DHR 123)의 산화되는 정도를 측정하여 분석하였다. DHR 123을 dimethyl-formamide로 녹여서 5 mM stock 용액을 만들고, 질소로 purge하여 -80°C에 보관하였다. 50 mM sodium phosphate, 90 mM sodium chloride, 5 mM potassium chloride를 혼합한 pH 7.4의 buffer와 100 µM DTPA (diethylenetriamine pentaacetic acid)를 혼합하여 DHR 123을 5 µM로 희석하여 사용하였다. 이 buffer 용액에 시료와 peroxynitrite를 첨가하고 실온에서 5분간 방치한 후 multi-detection microplate fluorescence spectrophotometer Synergy HT를 사용하여 excitation 485 nm, emission 530 nm에서 측정하였다. Authentic peroxynitrite 대신에 SIN-1을 첨가하는 경우는 SIN-1에 의한 산화가 DHR 123에 의한 산화와는 달리 점진적으로 일어나기 때문에 동일한 방법으로 실시하되 실온에서 방치하는 시간만 1시간으로 조절하여 측정하였다. 실험은 triplicate로 행하였으며, 결과는 blank를 차감한 값을 평균하여 대조군에 대한 백분율로 계산하였다 [14].

2.7. 세포배양

본 실험에 사용한 섬유육종세포인 HT-1080 (human fibrosarcoma cell) 세포는 한국 세포주 은행 (KCLB, Korean cell line Bank)에서 분양받아 실험에 사용하였다. 100 unit/mL의 penicillin-streptomycin과 10% FBS가 함유된 DMEM을 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator (Forma scientific, Japan)에서 배양하였다. 배양된 각각의 세포는 일주일에 2~3회 refeeding하고 6~7일 만에 PBS buffer로 세척한 후 0.05% Trypsin - 0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리하여 원심분리한 후 침전된 세포에 배지를 넣고 피펫으로 세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 75 mL cell culture flask에 10 mL씩 일정 수 분할하여 주입하고 6~7일마다 반복 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

2.8. 세포 생존율 측정

HT-1080 세포들의 생존율은 MTT assay를 이용하여 확인하였다. 배양된 세포는 well당 1×10^5 cells/mL가 되도록 96-well plate에 분주하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후, 실험에 사용하였다. 시료를 농도별로 제조하여 세포주에 처리하였으며, 대조군에는 시료 대신 PBS를 처리하여 24시간 동안 배양한 후 100 μ L의 MTT 용액 (1 mg/mL)을 첨가하여 동일한 배양 조건에서 4시간 동안 더 배양하였다. 생성된 formazan crystal은 100 μ L의 DMSO에 녹여서 ELISA reader (Bio-Tek instruments, Winooski, VT)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 생존율 (%)을 구하였다 [15].

2.9. 세포내 ROS (reactive oxygen species) 소거능 측정

세포의 free radical의 생성은 DCFH-DA assay로 측정하였다. DCFH-DA는 세포내 활성산소와 반응하여 형광물질을 만들어 내는 시약이며 이 시약을 배양한 세포에 처리하여 발생하는 형광의 정도를 측정함으로써 세포내의 활성 산소 농도를 측정할 수 있다. HT-1080 세포를 fluorescence microtiter 96-well plate에 well 당 1×10^7 cell/mL가 되도록 분주하여 24시간 배양하고, Hank's balanced salt solution (HBSS)으로 희석한 20 μ M의 DCFH-DA를 각 well에 주입하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 20분간 pre-incubation하였다. 다시 각 well에 농도별로 시료를 처리하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 배양한 후, DCFH-DA를 투여한 배지를 제거하고 PBS buffer로 3회 씻은 후 500 μ M H₂O₂로 처리하여 0, 30, 60, 90, 120분 간격으로 DCF fluorescence를 excitation 485 nm, emission 528 nm에서 형광 분석기로 측정하였으며 실험은 triplicate로 행하였다 [16].

2.10. Genomic DNA 추출 및 산화생성물 측정

HT-1080에서 추출한 genomic DNA는 AccuPrep Genomic DNA Extraction kit (USA Bioneer, Inc.)를 이용하여 순차적인 방법에 따라 추출하였다. 추출된 genomic DNA의 산화정도는 Milne 등 [17]의 방법을 이용하여 측정하였다. 일정 농도의

시료, genomic DNA, FeSO₄ 및 H₂O₂를 물에 녹여 100 μ L의 혼합물을 만들고 각각의 최종농도가 genomic DNA, FeSO₄ 및 H₂O₂의 최종농도가 200, 100, 50 μ g/mL가 되도록 준비하였다. 이 혼합물을 30분간 실온에서 반응시키고 10 mM의 EDTA를 첨가하여 반응을 중지시켰으며 반응물은 1% agarose gel을 이용하여 100 V에서 30분 동안 전기영동 하였다. 전기영동한 gel은 1 mg/mL ethidium bromide로 염색하고 Alpha Ease gel image analysis software (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA)를 이용하여 UV로 관찰하였으며 결과는 blank에 대한 백분율로 나타내었다.

2.11. 통계처리

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 결과들의 유의성을 검정하기 위하여 분산분석 (ANOVA)을 행한 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였으며, 그 결과는 평균 (Mean) $\pm$ 표준편차 (Standard deviation, SD)로 표시하였다. 모든 통계 분석은 Statistic Analysis System (v8.2 SAS Institute Inc., NC, USA) 통계프로그램을 이용하여 처리하였다.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. 총 폴리페놀 함량

애기거머리말의 조추출물과 용매분획물을 1 mg/mL로 희석하여 총 폴리페놀 함량을 측정하였다 [12]. 그 결과, 조추출물은 총 폴리페놀 함량이 652.0 μ g/mg로 측정이 되었다. 그리고 조추출물을 용매극성도에 따라 H₂O, *n*-BuOH, 85% aq. MeOH, *n*-hexane 순서로 얻은 각 용매분획물을 1 mg/mL로 희석하여 동일한 방법으로 총 폴리페놀 함량을 측정하였다. 그 결과, water, *n*-BuOH, 85% aq. MeOH, *n*-hexane 분획물에서 488.6, 550.5, 772.5, 268.4 μ g/mg의 폴리페놀을 포함하고 있음을 확인하였다. 어떤 종류의 폴리페놀이 존재하는지는 명확하지 않으나 같은 거머리말과에 속하는 거머리말 (*Zostera marina*)로부터 flavonoid들이 분리된 바 있어 이런 계열의 물질이 존재할 것으로 추측된다 [18].

3.2. DPPH radical 소거 활성

*Zostera japonica*의 조추출물 (Crude extract)과 그것을 용매분획하여 얻어진 *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, water 분획물들을 200, 100, 50, 10, 1 μ g/mL의 농도에서 DPPH 라디칼 소거효과를 측정하였다. 그 결과 소거효과는 농도별로 유의적인 증가를 보였으나 그렇게 높은 소거활성을 나타내지는 못하였다. 200 μ g/mL 농도에서 CE, *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, H₂O 분획층은 각각 9.6%, 8.0%, 9.2%, 23.7%, 6.5%의 소거활성을 보였다 (Fig. 1). 이 중에서 *n*-BuOH 분획층이 가장 좋은 활성을 보였으나 대조군인 Vitamin C와 비교하였을 때 Vitamin C의 1/4정도의 소거활성을 나타내었다. 이러한 용매분획의 DPPH 라디칼 소거효과는 이미 보고된 거머리말 (*Z. marina*)의 항산화활성과 유사하게 폴리페놀

Fig. 1. DPPH radical scavenging effect of crude extract and its solvent fractions from *Zostera japonica*. 85% aq.MeOH: 85% aqueous methanol, *n*-BuOH: *n*-butanol, BHA: butylated hydroxyanisole.

Fig. 2. Scavenging effects of crude extract and its solvent fractions from *Zostera japonica* on authentic peroxynitrite. 85% aq.MeOH: 85% aqueous methanol, *n*-BuOH: *n*-butanol.

Fig. 3. Scavenging effects of crude extract and its solvent fractions from *Zostera japonica* on peroxynitrite induced from the decomposition of SIN-1. 85% aq.MeOH: 85% aqueous methanol, *n*-BuOH: *n*-butanol.

함량이 높은 용매분획 더 좋은 라디칼 소거효과를 나타내는 경향을 보였다 [19].

3.3. Peroxynitrite 소거 활성

*Zostera japonica*의 조추출물과 각 분획물들의 authentic

ONOO⁻의 소거 효과는 Fig. 2에 나타나 있다. 양성 대조군으로 Vitamin C와 Penicillamine을 사용하였다. 모든 시료에서 authentic ONOO⁻가 유의적으로 소거되는 것이 보여졌다. *n*-hexane을 제외한 모든 시료가 200 µg/mL 농도에서 70% 이상의 소거율을 보였으며, 50 µg/mL 농도에서 crude extract, *n*-

Fig. 4. Scavenging effects of crude extract and its solvent fractions from *Zostera japonica* on intracellular ROS induced by hydrogen peroxide. After preincubation of the HT-1080 cells in 20 µM DCFH-DA, cells were treated with sample for 2 h. DCF fluorescence was measured following addition of 500 µM H₂O₂ at $\lambda_{\text{excitation}} = 485 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{emission}} = 528 \text{ nm}$: (a) Crude extract; (b) *n*-Hexane; (c) 85% aq.MeOH; (d) *n*-BuOH; (e) Water.

hexane, 85% aq.MeOH, *n*-BuOH, water층에 대해 각각 68.9%, 16.9%, 79.7%, 90.1%, 45.0%의 소거율을 보였다. *n*-BuOH층이 가장 높은 소거율을 보였으며 대조군인 P.A에 비교할 만한 소거율을 보였다.

SIN-1 분해에 의해 생성되는 ONOO⁻의 소거활성 측정결과에서도, 200 µg/mL 농도에서 *n*-hexane을 제외한 모든 시료에서 80% 이상의 소거활성을 보였으며 50 µg/mL 농도에서도 CE, *n*-hexane, 85% aq.MeOH, *n*-BuOH, water층에 대해 각각 82.7%, 44.7%, 83.2%, 86.6%, 68.9%의 소거율을 보였다. 85% aq.MeOH층과 *n*-BuOH 층이 가장 좋은 소거율을 보였다 (Fig. 3).

3.4. Intracellular ROS 소거 활성

2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)가 세포 내 활성 산소와 반응해 형광물질인 DCF로 산화되는 원리를 이용하여 세포내에 존재하는 활성 산소종을 측정하였다 (Fig.

4). 세포 내 자유라디칼 생성은 H₂O₂를 이용하여 유도하였으며, 30분 간격으로 120분 동안 형광 정도를 측정하여 나타내었다. 대조군은 시료를 제외하고 500 µM H₂O₂만 처리한 control과 시료와 H₂O₂ 모두 다 처리하지 않은 blank를 사용하였다. Control은 시간에 따라 DCF fluorescence 값이 계속 증가하는 반면에, blank의 경우 시간에 따른 DCF fluorescence 값의 변화가 거의 없었다. Fig. 4에서 보여진 것과 같이 조추출물과 용매 분획물의 ROS 소거능은 시료를 처리하지 않고 H₂O₂만을 처리한 control과 비교하여 모두 농도 의존적으로 ROS를 소거하는 것으로 확인되었다. 용매분획층중에서 85% aq.MeOH층과 *n*-BuOH층은 2시간 후에 200 µg/mL 농도에서 각각 약 84%와 74%의 높은 ROS 소거율을 보였으며 100 µg/mL에서도 약 60% 이상의 소거율을 나타내었다. *n*-Hexane 분획층과 water층 또한 85% aq.MeOH과 *n*-BuOH 분획층 보다는 못하지만 ROS를 상당히 감소시키는 것으로 나타났다. 이와 같이 애기거머리말 추출물의 항산화 물질이

Fig. 5. Protective effects of crude extract and its solvent fractions from *Zostera japonica* on genomic DNA oxidation from HT-1080 cells. 85% aq.MeOH: 85% aqueous methanol, *n*-BuOH: *n*-butanol.

극성에 따라 용매 분획으로 이동된 것으로 여겨지며 85% aq. MeOH와 *n*-BuOH 분획층이 항산화 활성이 높으므로 항산화 물질은 중간 정도의 극성을 가진 물질일 것으로 추측된다.

3.5. Genomic DNA 산화 생성물 측정

HT-1080 세포로부터 genomic DNA를 추출하여 0.1 mM H₂O₂와 0.1 M FeSO₄를 이용하여 10분간 Fenton 반응을 시켰을 때 시료가 DNA 산화를 억제시키는 정도를 측정하였다. 대조군으로는 시료로 처리하지 않고 산화시킨 control과 시료, H₂O₂, FeSO₄ 모두 처리하지 않은 blank를 사용하였다. 산화정도는 시료, H₂O₂, FeSO₄를 첨가하지 않은 blank를 기준 (100%)으로 비교하여 백분율 (%)로 나타내었다. 모든 시료에서 농도의존적인 산화 억제가 나타났으며 200 µg/mL의 농도에서 control과 비교하였을 때 조추출물 (Crude extract), *n*-hexane, 85% aq.MeOH, *n*-BuOH, water층 분획물은 각각 18.5%, 28.6%, 39.9%, 43.4%, 16.1%의 산화 억제율을 보였다 (Fig. 5).

4. CONCLUSION

이상의 결과들로부터 애기거머리말은 생체 내 산화 스트레스로 인해 생성된 라디칼의 활발한 소거를 통해서 세포의 산화적 손상을 억제하는 효과가 있는 것으로 나타났다. 조추출물의 용매분획들중에 85% aq.MeOH 분획층과 *n*-BuOH 분획층이 가장 우수한 항산화 활성을 나타내어 이 분획들중에 항산화 활성이 높은 물질이 존재할 것으로 추측된다.

또한 애기거머리말 추출물의 주 구성성분을 확인하기 위하여 조추출물 및 용매분획의 총 폴리페놀 함량을 분석한 결과 높은 항산화 활성을 나타낸 85% aq.MeOH과 *n*-BuOH 분획층의 폴리페놀 함량이 높아 항산화효과와 폴리페놀 함량이 깊은 상관관계가 있음을 보여 주었다. 잘피는 해양에서 식하는 식물임에도 불구하고 육상식물과 매우 유사하게 꽃이 피는 현화식물이며 뿌리는 식용으로 사용되기도 한다. 따라서 잘피는 육상 현화식물과는 매우 다른 이차 대사물질을 함유할 가능성이 높다고 할 수 있다. 그러나 지금까지 잘피의 항산화활성에 대해서는 거의 보고되지 않았으며 보고된 내용도 거머리말 (*Z. marina*)에 대한 것이다 [18-20]. 현재 본 연구팀에서는 애기거머리말로부터 항산화물질을 분리하기 위한 연구가 진행 중에 있다.

Acknowledgements

본 연구는 2012년 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업 (No. 2012R1A1A2002851)이며 해양수산부의 지원으로 수행한 해양에너지 전문인력 양성사업의 연구결과입니다.

REFERENCES

- Huh, S. H., S. N. Kwak, and K. W. Nam (1998) Seasonal variations of eelgrass (*Zostera marina*) and Epiphytic algae in eelgrass

- beds in Kwangyang Bay. *J. Korean Fish. Soc.* 31: 56-62.
2. Lee, S. M., S. Y. Lee, and C. I. Choi (2005) Reproductive phenology of four Korean seagrasses, *Zostera caespitosa*, *Z. caulescens*, *Z. japonica* and *Z. marina*. *Ocean and Polar Research* 27: 125-133.
3. Kim, J. B., J. I. Park, and K. S. Lee (2009) Seagrass distribution in Deukryang Bay. *Kor. J. Fish. Aquat. Sci.* 42: 509-517.
4. Kim, J. B., J. I. Park, W. J. Choi, J. S. Lee, and K. S. Lee (2010) Spatial distribution and ecological characteristics of *Zostera marina* and *Zostera japonica* in the Seomjin Estuary. *Kor. J. Fish. Aquat. Sci.* 43: 351-361.
5. Lee, S. H., S. M. Ma, Y. S. Lim, H. K. Choi, and H. C. Shin (2004) Genetic diversity and its implications in the conservation of endangered *Zostera japonica* in Korea. *J. Plant Biol.* 47: 275-281.
6. Shafer, D. J., J. E. Kaldy, and J. L. Gaeckle (2014) Science and management of the introduced seagrass *Zostera japonica* in North America. *Environ. Manage.* 53: 147-162.
7. Lee, S. Y., J. H. Oh, and C. I. Choi (2005) Leaf growth and population dynamics of intertidal *Zostera japonica* on the western coast of Korea. *Aquat. Bot.* 83: 263-280.
8. Lee, S. Y., B. J. Kim, and S. M. Lee (2006) Temporal dynamics of subtidal *Zostera marina* and intertidal *Zostera japonica* on the southern coast of Korea. *Mar. Ecol.* 27: 133-144.
9. Park, S. R., Y. K. Kim, J. H. Kim, C. K. Kang, and K. S. Lee (2011) Rapid recovery of the intertidal seagrass *Zostera japonica* following intense Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) harvesting activity in Korea. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 407: 275-283.
10. Hua, K. F., H. Y. Hsu, Y. C. Su, I. F. Lin, S. S. Yang, Y. M. Chen, and L. K. Chao (2006) Study on the antiinflammatory activity of methanol extract from seagrass *Zostera japonica*. *J. Agric. Food Chem.* 54: 306-311.
11. Jung, M. E., J. W. Hong, J. I. Lee, C. S. Kong, J.-S. Chang, and Y. Seo (2012) Inhibitory effect of *Zostera japonica* on growth of human cancer cells. *Ocean and Polar Research* 34: 385-394.
12. Folin, O and W. Denis (1912) On phosphotungstic phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.* 12: 239-249.
13. Blois, M. S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
14. Kooy, N. W., J. A. Royall, H. Ischiropoulos, and J. S. Beckman (1994) Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic. Biol. Med.* 16:149-156.
15. Hansen, M. B., S. E. Nielsen, and K. Berg (1989) Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Meth.* 119: 203-210.
16. Okimoto, Y., A. Watanabe, E. Niki, T. Yamashita, and N. Noguchi (2000) A novel fluorescent probe diphenyl-1-pyrenylphosphine to follow lipid peroxidation in cell membranes. *FEBS Lett.* 474: 137-140.
17. Miline, L., P. Nicotera, S. Orrenius, and M. Burkitt (1993) Effects of glutathione and chelating agents on copper-mediated DNA oxidation: Prooxidant and antioxidant properties of glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.* 304: 102-109.
18. Kim, J. H. Y. H. Cho, S. M. Park, K. E. Lee, J. J. Lee, B. C. Lee, H. B. Pyo, K. S. Song, H. D. Park, and Y. P. Yun (2004) Antioxidants and inhibitor of matrix metalloproteinase-1 expression from leaves of *Zostera marina* L. *Arch. Pharm. Res.* 27: 177-183.
19. Choi, H. G., J. H. Lee, H. H. Park, and F. A. Q. Sayegh (2009) Antioxidant and antimicrobial activity of *Zostera marina* L. extract. *Algae* 24: 179-184.
20. Kolenchenko, E. A., L. N. Sonina, and Y. S. Khotimchenko (2005) Comparative in vitro assessment of antioxidant activities of low-etherified pectin from the eelgrass *Zostera marina* and antioxidative medicines. *Russ. J. Mar. Biol.* 31:331-334.