

청각추출물의 항산화 및 일산화질소 합성 저해 연구

김유정 · 정일선 · 최인순¹ · 갈상완² · 최영주*

신라대학교 의생명과학대학 식품영양학과, ¹생명과학과, ²진주산업대학교 미생물공학과

Received June 3, 2006 / Accepted August 21, 2006

Studies on Antioxidant Activity and Inhibition of Nitric Oxide Synthesis from *Codium fragile*. Yu Jung Kim, Il Sun Jung, In Soon Choi¹, Sang Wan Gal² and Young Ju Choi*. *Department of Food and Nutrition, ¹Department of Life Science, Silla University, Busan 617-736, ²Department of Microbiological Engineering, Jinju National University Jinju 660-758, Korea* - This study was carried out to investigate the biological effects from *Codium fragile*. Methanol extract of *Codium fragile* increased two times at 2500 µg/ml the growth of *Lactobacillus plantarum* that associated with probiotic properties of lactic acid bacteria of Kimchi. Ethyl acetate extract of *Codium fragile* inhibited the cellulase activity up to approximately 60% at 2500 µg/ml. Methanol extract of *Codium fragile* was fractionated into several sub-fractions and their antioxidant activities were measured by using DPPH radical scavenging and SOD-like activity. Especially the antioxidative activity of ethyl acetate fraction was shown higher than that of other fractions and its fraction showed higher contents of total phenolic compounds, indicating the positive relationship between DPPH radical scavenging effect and total polyphenol content. Stimulation of the macrophages RAW264.7 cells with lipopolysaccharide (LPS) resulted in increased production of nitric oxide (NO) in the medium. However, the methanol extract of *Codium fragile* showed marked inhibition of NO synthesis in a dose-dependent manner. This result suggest that *Codium fragile* plays significant role for activation of immune system in the pathogenesis of inflammatory diseases.

Key words – *Codium fragile*, phenolic compound, antioxidant, nitric oxide

해조류는 고대로부터 해산물로 식용되어 왔으며, 해조류는 갈조류, 녹조류, 홍조류로 나누어지며 우리나라 해안에 자생하는 해조류의 종류는 약 400여종이 서식하고 있는 것으로 보고되고 있다[2]. 해조류는 영양소로서의 기능은 약하지만 풍미가 뛰어나고 무기질, 비타민 등 미량원소 및 식이섬유소의 공급원으로서 식용가치가 매우 높아지고 있다. 최근 해조류에서 생리활성물질을 이용한 새로운 nutraceuticals 및 의약품 소재로 사용하기 위한 연구가 집중되고 있다.

청각(*Codium fragile*)은 청각과에 속하는 녹조류로, 엽록소를 갖는 단세포 녹조류로서 우리나라와 중국 일본은 물론 필리핀과 하와이, 아프리카 등지에서 식용으로 널리 이용되고 있으며[29], 오래전부터 민간요법의 구충제로서 이용되거나 신장 기능을 튼튼하게 하는 효과가 있다고 알려져 있으며 한때는 풀의 원료로 사용되었다[11]. 청각의 향기는 젓갈이나 생선의 비린내를 가시게 하고 마늘냄새를 중화시키며 김치 맛을 개운하게 하는 김치의 부재료로 많이 이용되고 있고, 생으로 먹거나 살짝 데쳐서 무치거나 국 등에 넣고 하고 염장하거나 건조하여 보존하며 식이섬유가 풍부하여 바다의 채소라 불리며 세계적 건강식품으로 주목되고 있다. 청각에는 탄수화물과 단백질 함량이 비교적 높으며 필수아미노산

중에서도 황함유 아미노산인 cysteine 함량이 높으며 lysine 과 arginine 함량도 높다. 주요 미네랄로는 Ca, P, Mg, K 등이 매우 높게 함유되어 있으며 지방 함량은 낮은 것으로 보고되고 있다[2,13]. 청각 추출물에는 항생작용이 있는 acrylic acid, 항 응고 활성물질, 응집소 등이 함유 되어있을 뿐만 아니라 항암 및 항 돌연변이 효과와 면역 활성 등이 있는 것으로 밝혀져, 약학·생화학·의학 분야에서도 응용 될 수 있는 유용 해조류이다[4,9,34,35].

우리나라 전통발효 식품의 일종인 김치는 숙성이 진행됨에 따라 독특한 맛과 향이 생성된다. 김치의 숙성에는 젖산균의 번식과 효소의 작용이 지속적으로 이루어져서 일어나는데[18], 김치에 청각을 넣어먹는 점에 착안하여 청각 추출물이 김치의 숙성과 관련된 주요 젖산균의 생육과 김치의 가식기간 연장과 관계가 깊은 cellulase 효소 활성에 미치는 영향과, 청각 추출물의 항산화 및 면역 기능을 연구하였다.

재료 및 방법

재료 및 시료의 추출

청각은 가덕도산으로 동결건조기로 건조하여 50mesh 이하로 분쇄한 것을 -20℃에서 냉동보관하면서 분석을 위한 시료로 사용하였다. 시료의 메탄올 추출물을 얻기 위하여 건조 시료 일정량에 20배의 methanol (Hayman, England)을 가하

*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5459, Fax : +82-51-999-5176

E-mail : yjchoi@silla.ac.kr

여 65°C에서 2회 반복 추출하여 Whatman 여과지로 여과한 후 여과액을 rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan)로 감압 농축하여 사용하였다. 추출물 5 g 을 80%의 methanol 에 녹여 hexane, ether, ethyl acetate, n-butanol을 이용하여 순차적으로 분획 하였으며 각 분획물의 항산화 실험결과 ethyl acetate에서 가장 높은 활성을 나타내어 모든 항산화 실험은 ethyl acetate추출물로 하였다.

청각추출물의 젖산균 생육 측정

청각추출물의 젖산균에 대한 생육 측정은 *Lactobacillus plantarum* KCTC3105 의 젖산균을 사용하였으며, MRS broth (peptone 10.0 g, beef extract 10.0 g, yeast extract 5.0 g, glucose 20.0 g, tween 80 1.0 ml, K₂HPO₄ 2.0 g, sodium acetate 5.0 g, triammonium citrate 2.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, MnSO₄·4H₂O 0.2 g, distilled water 1.0 L)에 DMSO에 녹인 청각 MeOH 추출물을 농도별로(μg/ml) 첨가하고 젖산균을 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

청각추출물의 cellulase 활성 저해 측정

Cellulase 활성은 CMC를 기질로 하여 효소 반응 후에 유리된 환원당을 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 방법[24]으로 측정하였다. 증류수에 현탁시킨 1.0% (w/v) CMC 용액 0.5 ml과 200 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) 0.25 ml, 효소용액 0.25 ml과 청각 ethyl acetate추출물을 농도별로 10 μl씩 혼합하여 50°C에서 15분 동안 반응시켰다. DNS 시약 1 ml을 첨가하여 반응을 정지시키고 끓는 물에서 5분 동안 방치하여 발색시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하고 추출물 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

전자공여능(Electron donation ability : EDA) 측정

전자공여능 측정은 Blois의 방법[7]에 따라서 각 추출물의 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 대한 수소공여 효과로 측정 하였다. 추출시료를 DMSO에 녹여 농도별로 희석하여 시료 40 μl와 1.5 × 10⁻⁴ M DPPH용액 160 μl를 섞은 후, 37°C에서 30분 동안 반응시킨 다음 ELISA reader를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능(Electron donating ability, EDA)은 EDA(%) = (대조구흡광도-시료첨가구흡광도)/대조구흡광도 × 100으로 계산하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조그룹과 흡광도차를 비교하여 프리라디칼의 제거활성을 백분율로 나타내었다.

SOD 유사활성(Superoxide dismutase-like activity : SODA) 측정

추출물의 SOD 유사활성은 Marklund 와 Marklund의 방

법[22]에 따라 과산화수소(H₂O₂)로 전환시키는 반응을 촉매하는 pyrogallol의 생성량을 측정하여 SOD 유사활성으로 나타내었다. 각 추출시료를 DMSO에 녹여 농도별로 희석하여, 시료 10 μl에 pH 8.5로 보정한 Tris-HCl buffer (50 mM tris [hydroxymethyl] aminomethane, 10 mM EDTA, pH 8.5) 150 μl와 7.2 mM pyrogallol 10 μl를 첨가하여 25°C에서 10분 간 반응 후 1 N HCl 50 μl를 가하여 반응을 정지 시켰다. 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양은 ELISA reader를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성은 추출물 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

$$\text{SODA}(\%) = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

A : 추출물 첨가구의 흡광도, B : 추출물 무첨가구의 흡광도

총 폴리페놀의 함량측정

총 폴리페놀의 함량(total polyphenol content)은 분석방법으로 널리 사용되고 있는 Folin-Denis 방법[3]으로 측정하였다. Ethyl acetate 추출물을 DMSO에 농도별로 녹여, 10 배로 희석한 액 50 μl에 Folin reagent 50 μl을 가하고 3분간 정지한 다음 50 μl의 10% Na₂CO₃용액을 가하였다. 이 혼합액을 1시간동안 정지한 후 ELISA reader를 이용하여 730 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준용액으로는 galic acid를 사용하였다.

NO assay 및 cell viability 측정

NO의 생성은 비색법으로 세포 상등액에 축적되는 nitrite 양을 측정하였다. 대식세포를 세포 배양판에 5 × 10⁵ cells/ml의 세포가 되도록 재부유하여 LPS의 자극하에 24시간 배양하고 그 배양 상층액 내의 NO를 Griess 시약과 반응시켜 측정하였다[21]. 100 μl의 세포배양 상층액을 취하여 동량의 Griess 시약 [1% sulfanilamide (30% acetic acid)와 0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (60% acetic acid) 혼합액] 을 가하여 상온에서 20분간 반응시켰다. NO의 활성 정도는 ELISA 판독기를 사용하여 800 μg/ml 농도 범위에서 540 nm 흡광도를 측정하였다.

세포활성은 MTT assay에 의하여 측정하였다[21]. 96-well microtiter plate (Nunc, Vangaard, Neptune, NJ)에 RAW 264.7 macrophage를 1 × 10⁵ cells/well의 농도로 분주하였다. 분주 24시간 후 각 추출물이 함유되어 있는 배지를 100 μl씩 넣어 48시간 도안 배양하였다. Plate에 MTT 2 mg/ml 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyl -tetrazolium bromide (MTT, Sigma) 용액을 20 μl 씩 첨가하여 4시간 동안 배양시키고 formazan을 형성시키 후 조심스럽게 상등액을 제거하였다. DMSO 150 μl를 첨가하여 formazan을 녹인 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출물의 농도는 10, 20,

50, 100, 200 µl/well로 하였다.

결과 및 고찰

청각추출물의 젖산균 생육 측정

김치의 부재료로 사용되는 청각추출물이 젖산균의 생육에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 1). Fig. 1에 나타난 바와 같이 김치숙성의 중기단계에 중요한 역할을 하는 *Lactobacillus plantarum* KCTC3105의 생육은 촉진되었다. 김치발효의 초기 젖산균인 *Leuconostoc*의 생육은 호기성 부패균과 유해균의 생육을 저해하고 중기 이후는 *Lactobacillus*가 우점종이 되면서 김치에 기능성을 부여한다. 김치의 발효는 수십 종의 미생물에 의하여 이루어지며 각 미생물 상은 김치의 종류뿐만 아니라 발효온도, 재료, 양념의 종류 등에 따라 영향을 받는다. 그런데 김치 발효시 양념으로 사용되는 마늘 등은 젖산균의 생육을 저해하는 것으로 알려져 있다[8]. 김치의 숙성에 대한 연구는 김치의 저장성을 증가시키기 위하여 김치발효관련 유산균의 생육을 억제하는 천연물소재에 대한 연구를 주로 수행되어 왔다[14,15,19,25]. 김치의 젖산균 수는 김치의 기능성과 관계가 있으므로 유산균의 생육에 영향이 없으면서 김치의 기호성과 저장성을 증가시킬 수 있는 소재를 개발하는 방향으로 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다. 이러한 관점에서 김치의 부재료로 직접 사용되는 청각을 활용하여 김치의 기능성 및 저장성에 대한 더욱 많은 연구가 요구된다.

청각추출물의 cellulase 활성 저해 측정

Cellulase 활성에 대한 청각 추출물의 저해효과는 농도 의존적으로 증가하였고, 0.05%에서 약 42%, 0.25%에서는 약 60%의 cellulase 효소활성을 저해하였다(Fig. 2). 이러한 결과는 청각추출물이 과숙김치의 경도 유지에 효과가 있는 것으로 기대된다. 김치의 저장성을 증가시키기 위한 연구는 주로 젖산균의 생육을 억제하는 소재 개발[14,15]과 효소학적인 연구로 cellulase 및 polygalacturonase 활성을 저해하는 천연

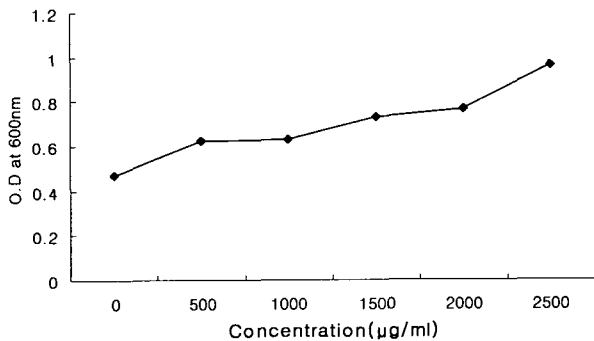


Fig. 1. Effect of *Codium fragile* methanol extracts on the growth of *Lactobacillus plantarum* KCTC3105.

연소재를 개발하기 위한 연구가 이루어지고 있으며[19,25], 김치의 직접적인 연화방지 효소인 polygalacturonase 저해제로서 청각 추출물이 작용하는 것인지에 대한 연구는 앞으로 수행되어야 하겠다.

DPPH법에 의한 항산화활성 측정

전자공여능이 시료의 flavonoid 및 polyphenol성 물질 등에 대한 항산화 작용의 지표로 알려져 있으며[36], 이러한 물질들이 free radical을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 높다. 이러한 항산화물질은 활성 산소를 비롯한 다른 라디칼에 대한 소거 활성을 기대할 수 있으며 인체 내에서 free radical에 의한 노화를 억제 하는 척도로 이용할 수 있다[1]. 청각으로부터 얻은 ethyl acetate 추출물과 hexane, ether 추출물의 DPPH 라디칼 소거효과를 나타내었다(Fig. 3). 각 추출물의 농도가 증가할수록 전자공여능이 증가하였고, ethyl acetate 추출물이 가장 높은 항산화 효과를 나타내었는데, 50 µg/ml 농도에서 약 17%, 2500 µg/ml 농도에서는 약 30%의 항산화 효과를 나타내었다. Hexane, ether 추출물에서도 항산화 효과를 측정할 수 있었는데, 500 µg/ml에서 hexane추출물은 약

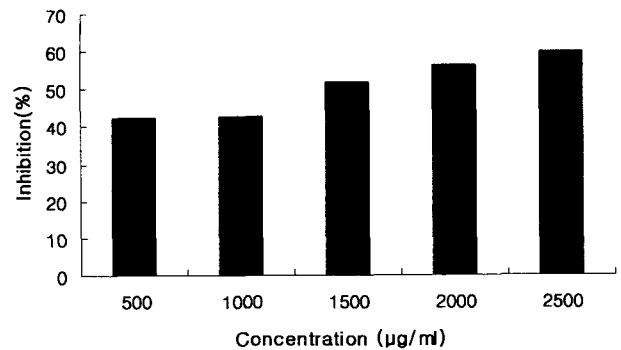


Fig. 2. Inhibitory effect of ethyl acetate extract of *Codium fragile* on cellulase activity. The enzyme assay for the CMCase was carried out by DNS method.

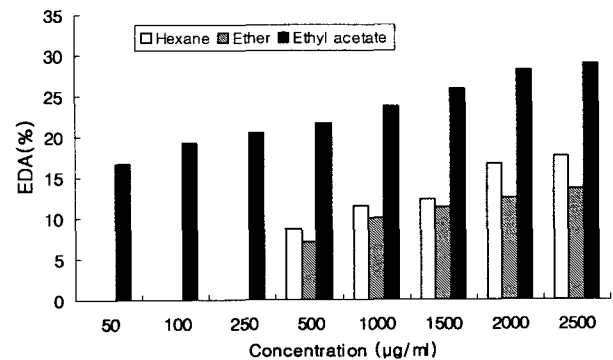


Fig. 3. DPPH radical scavenging activity (%) of *Codium fragile* extracts with various solvents on the concentration in the range of 50 - 2,500 µg/ml.

9%, ether 추출물은 7%의 항산화효과를 보였고, 2500 µg/ml 농도에서는 hexane추출물에 약 18%, ether 추출물이 14%를 보였다. Ethyl acetate 추출물에서 가장 높은 항산화 효과를 나타내어 이후 다른 항산화 실험에서는 ethyl acetate 추출물로만 하였다.

최근 항산화에 대한 관심이 증대 되면서 인공합성 항산화제를 대체할 천연항산화제의 개발에 많은 연구가 집중되고 있다. 대부분의 항산화연구가 약초를 중심으로 수행되어 왔지만 새로운 항산화제의 개발에도 많은 연구를 집중하고 있다. 최근 해양생물에 대한 관심이 고조되면서 주로 주식으로 이용되고 있는 해조류 즉 김, 미역, 다시마, 툫 및 파래 등에 대한 항산화 및 면역기능에 대한 많은 연구가 수행되고 있다. 해조류의 항산화물질에 대해서 많은 연구가 보고되었으며, 특히 우리나라에서 많이 섭취하는 국내산 5종 해조류의 항산화효과는 2500 µg/ml농도에서 다시마 26.80%, 김 26.45% 등으로 청각과 유사한 활성을 나타내었다[17].

청각의 주요 항산화 물질을 확인하기 위하여 ethyl acetate 추출물을 TLC로 분리하였다(data not shown). 청각에 존재하는 polyphenol계 화합물은 극성이 비교적 높은 것으로 나타났다.

SOD 유사활성(Superoxide dismutase -likeactivity : SODA) 측정

Superoxide dismutase (SOD)는 항산화 효소로서 세포에 유해한 oxygen radical를 과산화수소 전환시키고 다시 catalase에 의하여 무해한 물분자와 산소분자로 전환시켜 활성산소로부터 생체를 보호하는 기능으로 알려져 있다[5]. SOD는 분자량이 비교적 큰 단백질로서 열이나 알칼리에 약하여 이러한 단점을 보완할 수 있는 저분자물질로 체내에서 역할이 유사한 SOD 유사활성 물질에 대한 연구가 진행되어 있다 [5,32]. Nice 등은 SOD 정제시 열안정성이 높고 SOD와 유사한 활성을 나타내는 물질을 함께 정제하였는데 이것은 SOD와 결합된 phenol 계 물질인 것으로 보고하였다[28]. 따라서 항산화 및 항노화와 밀접한 관계가 있는 것으로 알려진 SOD 유사활성 측정을 pyrogallol의 자동산화 반응을 이용하여 분석하였다. 청각 ethyl acetate 추출물의 SOD 유사활성 측정 결과를 Fig. 4에 나타냈으며, SODA 측정 결과 추출물 농도가 증가할수록 항산화효과가 증가하였고, 2500 µg/ml농도에서 약 24%의 항산화 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 비교적 항산화력이 높은 과일로 알려진 키위 착즙액의 SOD 유사활성(27.6%) 과 비슷한 SOD 유사활성을 나타내었다.

총 폴리페놀의 함량측정

Polyphenol계 물질들은 식물체에 특수한 색깔을 부여하고 산화-환원 반응시 기질로 작용하며[30] 한분자내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl기를 가진 방향족 화합물을 가리킨다

[26]. 청각 ethyl acetate 추출물의 총 폴리페놀의 함량의 흡광도 값을 나타낸 것으로(Fig.5) 농도가 증가함에 따라 총 폴리페놀 함량이 증가 한 것을 알 수 있었고, 2500 µg/ml 에서는 control 보다 2배정도 높은 함량을 나타내었다. 페놀 화합물들은 수소공여 작용에 따른 환원 활성에 의하여 지질의 산화를 억제시키거나 지연시키는 것으로 밝혀져 있다[6]. Fig. 5에 나타난바와 같이 DPPH 라디칼 소거능이 높으면 높을수록 페놀성물질의 함량도 증가하는 것으로 나타났으며 항산화 활성을 나타내는 물질은 총 phenol 함량이 크게 기여함을 알 수 있다. 이와 같이 DPPH 라디칼 소거능과 총 polyphenol 함량과는 높은 상관관계를 가지는 것으로 많은 연구가 수행되어 왔다[16,20,31,33].

NO assay 및 cell viability

치주질환의 주요 병원균주인 *Prevotella intermedia*에 의하여 생성된 Bacterial lipopolysaccharise (LPS)를 대식세포에 처리하여 NO를 유도시킨 다음 청각추출물을 대식세포에 처리하여 NO 활성 및 iNOS합성에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 6 [A], [B]에 나타난바와 같이 LPS에 의하여 유도된 NO 활성은 청각추출물을 첨가함으로써 NO 활성이 현저히 감소하였다. 이러한 결과는 청각추출물이 면역기능과 관계가 있음을 나타내는 것이다. 일반적으로 암에 걸린 세포는 NO 활성이 증가하는데 항암제 등을 투여하면 NO 활성이 감소하는 것으로 나타난다.

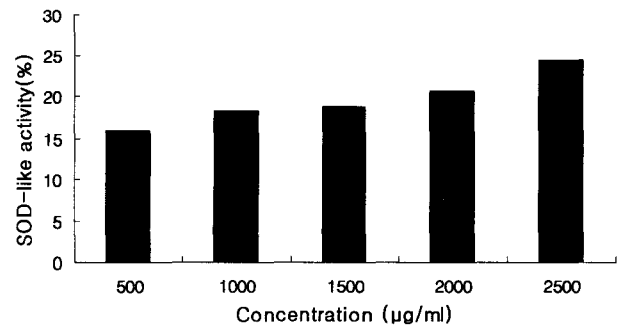


Fig. 4. Superoxide dismutase(SOD)-like activity of ethyl acetate extract from *Codium fragile*.

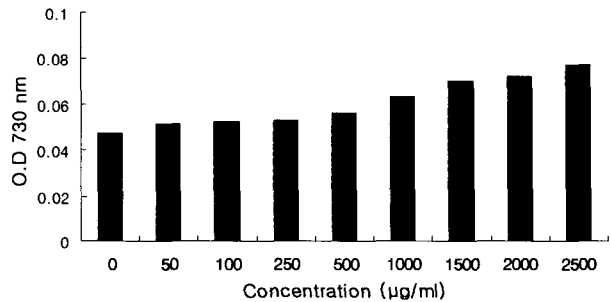


Fig. 5. Total polyphenol content of ethyl acetate extract from *Codium fragile*.

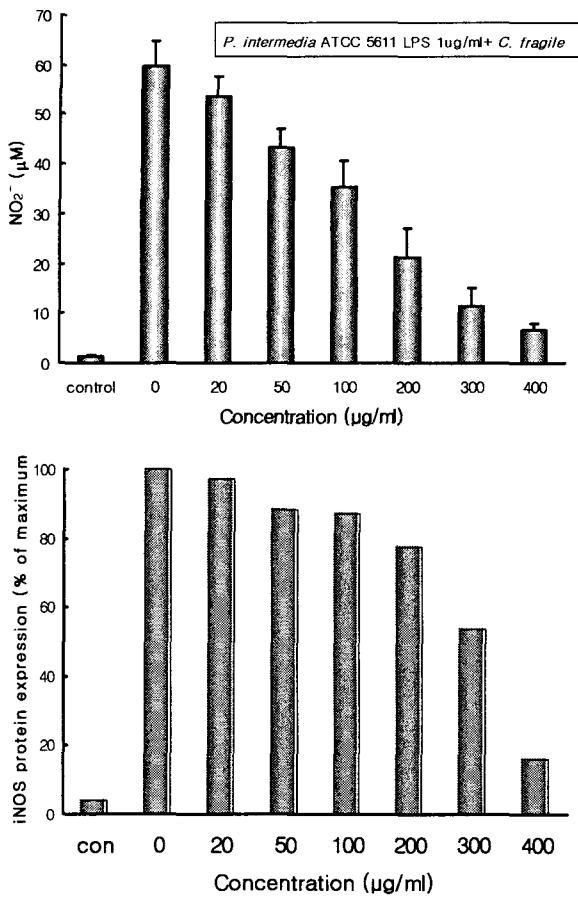


Fig. 6. Effects of the *Codium fragile* extract on NO [A] and iNOS [B] synthesis in RAW264.7 cells stimulated with LPS. RAW264.7 cells were cultured for 24 h with various concentration in the presence of LPS. NO release was measured using the method of Griess (nitrite). Results are expressed as means±S.E. of three independent experiments.

세포활성은 MTT 분석을 통해서 측정하였으며 LPS로 처리된 대식세포는 약 50%정도의 세포감소를 나타냈지만 청각추출물을 첨가하면 정상수준으로 회복되는 것이 관찰되었다 (data not shown).

NO는 면역학적 방어에서 중요한 역할을 수행하고, 분비 조직과 세포의 기능에 영향을 미치며, 세포성 면역계의 주된 역할의 하나로 NO는 세포 독성이나 성장 억제 활성을 나타낸다[10]. NO는 L-arginine의 guanidino nitrogen으로부터 nitric oxide synthase(NOS)에 의하여 생성된다[12].

NO는 대부분의 포유류 동물의 세포내에서 생성되고 신경계에서는 화학적 신호 전달 물질로서, 혈관계에서는 혈압 조절과 혈소판의 응집 및 호중성구의 집합 작용을, 골격근에서는 대사와 근 수축 조절 등 생리학적으로 중요한 역할을 한다. 최근 NO가 신경계의 생리학적인 전달자로서 뿐만 아니라, 염증 반응, 면역계 및 세포 독성 외에도 세포의 분화나 세포

내 신호 전달 등의 중요한 조절 물질로 알려지고 있다. 또한 면역 세포에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 다량으로 외부의 자극에 의해 유전자 수준에서 발현되고 주로 침입한 미생물이나 종양 세포에 대해 독성을 갖는 방어 물질로서 작용하는 것으로 보고되고 있다[23,27]. 최근에 NO가 세포 활성화 물질 및 reactive oxygen intermediates(ROI)에 의해 유발된 세포 독성을 최소화시키는 역할이 밝혀짐으로 이 분야에 대해서 활발히 연구되고 있다.

요 약

청각은 녹조류로서 김치의 부재료로 널리 사용되는 것으로 청각추출물이 젖산균의 생육 및 cellulase 활성에 미치는 영향과 항산화 및 면역기능에 미치는 영향을 조사하였다.

청각추출물이 젖산균의 생육에 미치는 영향은 김치의 중기 이후 젖산 생성에 중요한 *Lactobacillus plantarum* KCTC 3105의 생육을 2배정도 촉진하였으며 과숙 김치의 경도유지에 중요한 cellulase의 활성을 약 60% 정도 저해하는 효과를 보였다.

청각추출물의 항산화력은 DPPH 방법이나 SOD 유사활성 등에서 비슷한 항산화력을 나타내고 있으며 특히 ethyl acetate 층에서 높은 항산화력을 나타내었는데 이러한 결과는 청각에 존재한 phenolic compound가 관여하는 것으로 생각된다.

청각추출물의 항염증효과는 RAW264.7 세포에서 조사되었는데 특히 치주질환균에서 유도된 LPS를 처리하여 유도된 NO 활성을 현저히 감소시킴으로서 높은 항염증 효과를 나타내었으며 이러한 결과는 iNOS 활성에서도 유사한 결과를 나타내었다.

참 고 문 헌

1. An, B. J., J. T. Lee, J. H. Kwak, J. M. Park, J. Y. Lee and J. H. Son. 2004. Antioxidant effects and application as natural ingredients of Korean *Sanguisorbae officinalis*. L. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 47, 244-250.
2. An, Jeung Hee. 2001. Studies on complement activating and nitric oxide generation inhibitory phytochemicals from *Codium fragile Curcuma heyneana*. PhD Dissertation. Korea University.
3. AOAC. 1984. Official Methods of Analysis. 14th ed. Method 9. 110. Association of Official Analytical Communities, Arlington, VA. U.S.A.
4. Arasaki, S. and T. Arasaki. 1983. Vegetables from the Sea. Japan Pub. Tokyo, p. 169-189.
5. Bannister, J. V., W. H. Bannister and G. Rotilio. 1987. Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase. CRC Crit. Rev. Biochem. 22, 111-180.
6. Belitz, H. D. and W. Grosch, 1987. Food Chemistry. p.175,

- Springer-Verlag, Berlin.
7. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable radical. *Nature* **26**, 1199-1200.
 8. Chung, K. S., S.-Y. Kang and J. Y. Kim. 2003. The antibacterial activity of garlic juice against pathogenic bacteria and lactic acid bacteria. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 32-35.
 9. Cho, K. J., Y. S. Lee and B. H. Ryu. 1990. Antitumor effect and immunology activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Bull. Kor. Fish. Soc.* **23**, 345-351.
 10. Farias-Eisner, R., M. P. Sherman, E. Aeberhard and G. Chaudhuri 1994. Nitric oxide is an important mediator for tumoricidal activity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 9407-9411.
 11. Hwang, E. K., J. M. Baek and C. S. Park. 2005. Artificial seed production using the reproduction methods in *Codium fragile* (Chlorophyta). *J. Korean Fish. Soc.* **38**, 164-171.
 12. Ignarro, L. J., J. M. Fukutto, J. M. Griscavage, N. E. Rogers and R. E. Byrns. 1993. Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: Comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 8103-8107.
 13. Jung, K.-J., C. H. Jung, J.-H. Pyeon and Y. J. Choi. 2005. Changes of food components in mesangi (*Capsosiphon fulvecense*), gashiparae (*Enteromorpha prolifera*), and cheonggak (*Codium fragile*) depending on harvest times. *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr.* **34**, 687-693.
 14. Kim S.-D., M.-H. Kim and D.-H. Kim. 2000. Effect of dandelion (*Traxanacum Platycarpum* D.) extracts on the growth of lactic acid bacteria and gas formation from kimchi. *Korean J. Postharvest Sc. Technol.* **7**, 321-325.
 15. Kim, K.-H. 2002. Effect of addition methods of green tea on fermentation characteristics of kimchi. *Korean J. Food Preservation* **9**, 406-410.
 16. Kim, Y. C. and S. K. Chung. 2002. Reactive oxygen radical species scavenging effects of Korean medical plant leaves. *Food Sci. Biotechnol.* **11**, 407-411.
 17. Kwak, C. S., S. A. Kim and M. S. Lee. 2005. The correlation of antioxidative effects of 5 Korean common edible seaweeds and total polyphenol content. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **34**, 1143-1150.
 18. Lee, C. W., C. Y. Ko and D. M. Ha, 1992. Microfloral changes of lactic acid bacteria during kimchi fermentation and identification of the isolates. *Korean J. Appl. Microbiol.* **20**, 102-238.
 19. Lee, S.-H., J.-S. Choi, K.-N. Park, Y.-S. Im and W.J. Choi. 2002. Effects of *Prunus mume* sie. extract on growth of lactic acid bacteria isolated from kimchi and preservation of kimchi. *Korean J. Food Preservation.* **9**, 292-297
 20. Lu, Y. and L. Y. Foo. 2000. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chem.* **68**, 81-85.
 21. Lin, H.-Y., S.-H. Juan, S.-C. Shen, F. L. Hsu and Y. C. Chen. 2003. Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by flavonoids in RAW264.7 macrophages involves heme oxygenase-1. *Biochemical Pharmacology* **66**, 1821-1832.
 22. Marklund, S. and G. Marklund, 1975. Involvement of superoxide aminoradical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**, 468-474.
 23. Marletta, M. A. 1993. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* **268**, 12231-12234.
 23. Miller, G. L., R. Blum, W. E. Glennon and A. L. Burton. 1960. Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Anal. Biochem.* **2**, 127-132.
 25. Moon, Y.-J., S. Park and C.-K. Sung. 2003. Effect of ethanolic extract of *Schizandra chinensis* for the delayed ripening kimchi preparation. *Korean J. Food & Nutr.* **16**, 7-14.
 26. Na, G. M., H. S. Han, S. H. Ye and H. K. Kim. 2004. Extraction characteristics and antioxidative activity of *Cassia tora* L. extracts. *Korean J. Food Culture* **19**, 499-505.
 27. Nathan, C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**, 3051-3064.
 28. Nice D. J., D. S. Robinson and M. A. Jolden. 1995. Characterization of a heat-stable antioxidant co-purified with the superoxide dismutase activity from dried peas. *Food Chem.* **52**, 393-397.
 29. Oh, Y. S., I. K. Lee and S. M. Boo, 1990. An annotated account of Korean economic seaweeds for food, medical and industrial uses. *Kor. J. Phycol.* **5**, 17-71.
 30. Park, N. A., H. B. Jo, I. S. Cho, H. J. Kim, S. J. Cho and D. I. Kim, 2001. The analysis of phenolic compounds and vitamin C content in brewed green tea and determination of EDA in catechins(II). *Report of S.I.H.E.* **37**, 98-104.
 31. Park, Y. K., W. Y. Lee, S. Y. Park, J. K. Ahn and M. S. Han. 2005. Antioxidant activity and total phenolic content of *Callistemon citrinus* extracts. *Food Sci. Biotechnol.* **14**, 212-215.
 32. Pryor, W. A. 1986. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. *Ann. Rev. Physiol.* **48**, 657-667.
 33. Pyo, Y. H., T. C. Lee, L. Logendra and R. T. Rogen. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cycla*) extracts. *Food Chem.* **85**, 19-26.
 34. Rogers, D. J., K. M. Jurd, G. Blunden, S. Paoletti and F. Zanetti. 1990. Anticoagulant activity of a proteoglycan in extracts of *Codium fragile* sp. *atlanticum*. *J. Appl. phycol.* **2**, 357-361.
 35. Rogers, D. J. and R. W. Loveless. 1991. Electron microscopy of human erythrocytes agglutinated by lectin from *Codium fragile* sp. *tomentosoides* and pseudohaemagglutinin from *Ascophyllum nodosum*. *J. Appl. Phycol.* **3**, 83-86
 36. Torel, J., J. Gillard and P. Gillard. 1986. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry* **25**, 383-385.