J. Fd Hyg. Safety 11(3), 235 - 241(1996)

홀파래에서 추출한 Rhamnan sulfate의 Macrophage에 의한 면역조절효과에 관한 연구

빈재훈* · 김희숙 · 류병호†
*부산광역시 보건환경연구원 · 경성대학교 식품공학과

Immunomodulating Effects on Macrophage of Rhamnan Sulfate Extracted from *Monostroma nitidum*

Jae Hun Bin*, Hee Sook Kim and Beung Ho Ryu†
*Public Health and Environment Institute of Pusan
Department of Food Science and Biotechnogy, Pusan 608-736, Korea

ABSTRACT : The rhamnan sulfate extracted from green algae seaweed, *Monostroma nitidum* was characterized as activity *in vitro* culture assay with macrophages from mice. Rhamnan sulfate indicated that F-4-3 fraction enhanced glucose consumption, as well as the production of nitrogen dioxide and tumor necrosis factor(TNF). F-4-3 fraction was also augmented IL-1 secretion from those macrophages. Effects of the pretreatment of peritoneal macrophages with rhamnan sulfate F-4-3 fraction and several polysaccharides as relative standard on the production of H_2O_2 induced with unopsonized zymosan A were examined. Pretreatment with polysaccharides inhibited the zymosan A mediated H_2O_2 production by macrophages. The phorbol myristate acetate (PMA) mediated H_2O_2 production was not affected by the pretreament. These result suggested that pretreatment of rhamnan sulfate interfered with the interaction of macrophages zymosan A. Rhamnan sulfate inhibited zymosan A mediated production of H_2O_2 by macrophages and F-4-3 fraction was also activator of macrophages.

Key words □ Rhaman sulfate, *Monostroma nitidum*, Immunomodulating effects

서 론

Biomass 자원으로서 유용 해조류중에는 남조류 2속 2종, 녹조류 6속 35종, 갈조류 46속 106종, 홍조류 61속 254종 등 합계 115속 397종이 있다.[1] 해조류는 그 용도가 다양하여 김, 다시마, 곰피, 미역등은 직접 또는 가공하여 식용으로 이용되고 있고, 가축의 사료나 농작물의 비료로 이용되기도 하고, 공업용 원료로서 알긴산, 한천 및 카라기난의 생산에 이용된다.[2] 구미 제국을 중심으로 하는 marine benchure business는 해조류에서 생리활성 물질을 추출하여 정밀 화학약품(fine chemical)으로 판매하는 기업이 고부가가치 성장 산업으로 부상되고 있다.[3]

해조류는 우리나라에서 일부분만 식용이나 공업용원료로 이용하고 있는 실정이며 이용자원이 그대로 방치되고 있는 실정이다. 그러나 해조류중 갈조류에서 추출되는 알긴산과 홍조류에서 추출되는 carageenan 등은 구조와 물리적 성질 등에 대한 많은 연구가 보고되고 있으며, 식품 첨가물로서 광범위하게 사용되고 있다.[4] *Ascophyllum*속 및 *Cessonia*속의 갈조에서 알긴산의 생산은 28,000ton 으로서 그 용도는 50%가 직물의 호료, 30%가 식품, 나머지 약 20%가 기타 의약품등에 이용되고 있으며[5] 홍조류로부터 한천이 7,500톤, carageenan이 13,000톤이 만들어지고 있다.[6] 이들 생산물은 식품 이외에 비료, 사료, 공업용 원료, 화학약품 및 의약품등의 원료로 이용하기 위하여 이에 대한 많은 관심과 연구가 진행되고 있다.[5~7] 지금까지의 해양생물을 포함한 이 분야의 연구는 육상생물 연구에 가리워져 어류나 조류등에서의 식량공급과 약간의 의약품 개발에 관한 부분적인 연구가 진행되고 있으나,[5~8] 최근 외국에서는 많은 연구자들이 해양생물의 특이성에 착안하여 새로운 생리활성 물질을 탐색하기 위한 목적으로 활발한 연구를 수행하고

† Author to whom correspondence should be addressed.

있는 추세이다.[2~9] 근년에는 해조류에 관한 연구로서 호르몬의 일종인 prostaglandin이 바다생물로부터 발견되었고,[3] 항종양성 작용[10~12] 및 항 virus성 작용[12]에 대한 연구가 있다. 해조류중에서도 미역, 다시마, 파래 등의 당류는 항암 및 면역활성[10]과 고혈압 예방 및 항종양 활성이 있으며, 특히 김은 콜레스테롤 강하작용 및 항궤양성 작용을 하는 것으로 알려져 있다.[11] 최근 몇종류의 해조류 다당체, phospholipid 및 glycolipid 획분에서 숙주에 대한 면역기능은 밝혀지고 쥐에 대한 항암효과가 있다고 보고된 바 있다.[12~14] 따라서 본 연구는 황산을 함유한 다당체를 이용하여 macrophages에서 면역 활성을 알아 보기위하여 홑파래로부터 추출한 rhaman sulfate로서 실험한 결과를 보고 하고자 한다.

재료 및 실험방법

재 료

본 실험에 공시한 홑파래(*Monostroma nitidum*)는 전라남도 진도에서 구입하여 실험에 사용하였다.

실험방법

Rhamnan sulfate의 추출 및 정제—홑파래를 구입하여 열수추출법으로 Rhamnan sulfate는 추출 및 정제하였다.[15]

실험 동물—본 실험에 사용된 동물은 C57B1/6의 mouse(8~12주 사육)를 구입하 여 사용하였다.

Macrophage의 분리

쥐의 peritoneal macrophages는 1% 불활성 fetal calf serum (FCS), 5mM HEPES(Sigma Co.) 100 μg/m*l* penicillin, 100 μg/m*l* streptomycin 함유 Hank′s balanced salt solution(HBSS) 10 m*l*를 절개한 복부에 넣어 세척하여 복강부위로 부터 분리하였다. 이를 원심분리(3.000×g)한 후 상등액을 버리고 이와 같은 방법으로 HBSS를 사용하여 2회 세척하고, 1%불활성 FCS, 100 μg/ml penicillin, 100 μg/m*l* streptomycin(RPMI-FCS 함유 RPMI)으로 다시 현탁시켰다. 분리한 cells을 96 well plates에 100 μ*l*당 4.0×10^5으로 조절하고 또 24 well plates에는 100 μ*l*당 2.0×10^6이 되도록 조절한 후 monolayer를 형성시키기 위하여 2시간동안 배양한 다음 신선한 HBSS(100 μ*l*/well)로서 3회 세척하였다.

Macrophage의 배양

Macrophage의 분리의 방법으로 얻은 macrophages monolayer cells은 5% FCS, 5 mM HEPES, 100 μg/m*l* penicilin 및 100 μg/m*l* streptomycin을 함유한 RPMI-1640 배지(RPMI-FCS배지)에 각종 농도별 rhamnan sulfate를 첨가하여 37°C에서 5% CO_2 배양기에서 1~2시간 동안 배양하였다. 대조 실험으로 RPMI-FCS 배지에 lipopolysaccharide (LPS), zymozan A 및 laminarin (Sigma Co.)을 각각 200 μ*l* 넣어 비교하였다.

H_2O_2의 정량

H_2O_2의 생산은 Harp e등의 방법[16]에 따라 scopoletin의 미량 분석법으로 37°C에서 연속적으로 측정하였다. 배양액에 5.5 mM glucose을 보충한 Krebs-Ringer phosphate buffer(KRPB) 50 μ*l*로서 3회 세척하였다. 반응 혼합 용액은 30 uM scopoletin, 1 mM NaN_3, pruogallin, 1 unit/m*l* horse radish peroxidase(HPO), 100 ng/m*l* phorbol myristate acetate(PMA), 또는 50 μg/m*l* zymosan 함유 KRPG를 각각 well에 넣어 이를 직접적으로 filter fluorometer(microplate reader MTP-32, Corona electric Co., ToKyo)에 놓고 450 nm(Ex) 과 365 nm(Em)에서 각각 측정한 후 이를 37°C에서 30, 60, 90 및 120분간 배양한 후 각 well의 형광을 다시 microplate reader를 이용하여 측정하였다. Macrophages에 의하여 생성되는 H_2O_2의 양은 표준품의 H_2O_2시액으로 측정하여 계산하였다.

Glucose의 소비

96-well plates의 macrophages 배양 상등액에 남아 있는 glucose는 glucose B-test Wako assay kit(Wako chemical Co.)로서 측정하였다. Glucose의 함량은 배양한 배지의 상등액에 있는 양을 제외한 후 glucose가 소비된 양으로서 나타내었다.

NO_2의 생성

96-well plates의 macrophage 배양 상등액에 생성된 NO_2의 농도는 Griess reagent(1% sulfanilamide, 5.0% HCl/0.12% N-1-naphthylenediamine. 2HCl) 와 반응시켜 514nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.[17]

Interukin-I(IL-1)의 생성

24-well plates의 macrophages 배양 상등액 중의 IL-1의 활성은 IL-1 의존 cell line인 D10, G4.1(ATCC, Rockville, MD, USA)의 분화에 의하여 측정하였다. 상층액의 시료는 96-well microplate에 2.5 μg/m*l* concanavalin A(Sigma Co.)를 함유한 RPMI-FCS을 넣고 그중 200 μ*l*를 D10, G4.1 cell을 2.0×10^4 cells/m*l*로 희석하여 54시간 동안 배양하였다. 이때 형성된 [3H]-Thymidine(1uCi/well)를 6시간 후에

측정하였다. IL-1의 활성은 rIL-1(Genzyme, Carbridge, MA, USA)로서 동시에 실험하였다.[18]

Tumor Necrosis Factor(TNF)의 분석

24-well plates의 배양 상등액으로부터 TNF의 활성은 mouse TNF Test Kit(Factor test mTNF-α, Genzyme)로서 multiple antibody sandwich 분석법을 이용하여 solid-phase enzyme immunoassay로서 측정하였다.[19]

결과 및 고찰

Glucose의 소비 및 NO_2의 생성

홑파래에서 추출한 Rhamnan sulfate의 구성당은 Rhamnose, Arabinose, Xylose, Mannose, Galactose 및 Glucose로 구성되어 있었고 황산은 24.8%로 매우 높은 함량이었다.[15] Rhamnan sulfate을 더욱 분리 정제하기 위하여 용출조건으로 염화나트륨 용액을 0~1.5 M로 변화시키면서 음이온 교환 크로마토 그라피를 실시하여 정제과정에서 나타난 peak를 F-4-1, F-4-2 및 F-4-3 등으로 명명하고 이후 실험을 하였다. 따라서 rhamnan sulfate 획분인 F-4-1, F-4-2 및 F-4-3 등 3개의 획분에 대하여 면역조절 활성(immunomodulating activity)을 조사하였다. C57B1/6에서 분리한 peritoneal macrophages에 F-4-1, F-4-2 및 F-4-3 획분을 각각 50 및 500 μg/ml씩 넣어 배양한 후 macrophages에 대한 rhaman sulfate의 활성을 확인하기 위하여 배양액에서의 glucose 소비량과 NO_2 생성량을 측정하였으며, 별도로 macrophages의 활성화 물질로 알려진 해조류 유래의 laminarin과 세균의 세포벽에서 유래된 lipopolysaccharide(LPS)를 본 실험의 대조군으로 비교 실험하였다.

Glucose의 소비는 Fig. 1에서와 같이 macrophage에 rhamnan sulfate의 획분인 F-4-1, F-4-2 및 F-4-3과 대조군으로 LPS 와 Zymosan A 및 laminarin과 실험을 비교한 결과이다. Rhaman sulfate의 획분 중 F-4-3은 F-4-1 및 F-4-2 보다 macrophages에 대한 glucose의 소비촉진의 활성이 강하였다. 본 실험에서 rhamnan sulfate에 대한 glucose 소비량은 대조구로 사용된 면역조절 활성물질로 알려진 LPS, laminarin 및 zymosan A에 비하여 다소 높은 활성을 보여주고 있다. Rhamnan sulfate의 분획인 F-4-1, F-4-2 및 F-4-3은 모두 높은 활성을 나타내었으나 특히 rhamnan sulfate의 분획 중 F-4-3의 획분이 가장 높은 활성을 나타내었다. Yoshizawa 등[20]은 해조류인 *Porpyra yezoensis*로부터 정제한 polysaccharide 획분의 면역조절 활성에 관한 보고에서 polysaccharide 획분중 열수추출 획분의 활성이 가장 높다고 하였으며, 이 획분은 산성으로 추출한 획분에 비하여 황산기의 함량이 높았다고 하였다. 본 연구에서의 F-4-3 획분이 F-4-1 및 F-4-2 획분보다 황산기의 함량이 많아 면역조절 활성은 황산기의 역할에 의하여 polyanion의 하전으로 면역활성을 촉진하는 것으로 판단된다.

한편 Fig. 2는 rhamnan sulfate의 획분인 F-4-1, F-4-2 및 F-4-3이 NO_2의 생성에 어떠한 영향이 있는가를 알기 위하

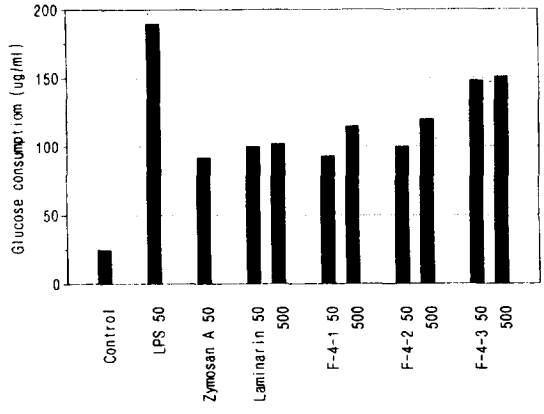

Fig. 1. Macrophages immunomodutaling activity according to glucose consumption *in vitro*.
Macrophages monolayers obtained from C57B1/6 mice were incubated with or without activator for 72 h.

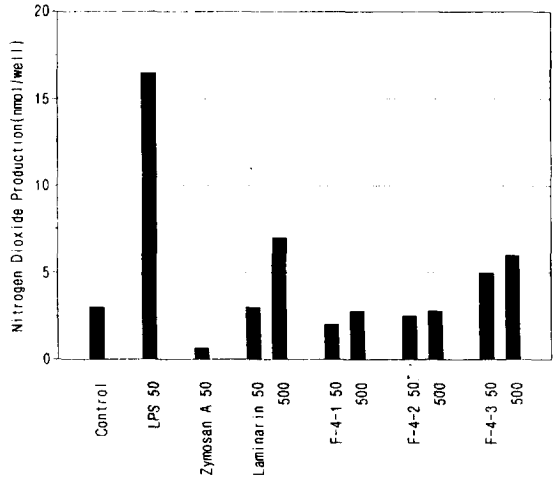

Fig. 2. Macrophages immunomodutaling activity according to nitrogen dioxide production *in vitro*.
Macrophages monolayers obtained from C57B1/6 mice were incubated with or without activator for 72 h.

여 면역활성 물질로 알려진 LPS, laminarin 및 zymosan A와 비교한 결과이다. Rhamnan sulfate 획분인 F-4-1, F-4-2 및 F-4-3의 macrophage 활성은 비슷하였으나 그 중에서도 F-4-3는 해조류에서 분리한 다당체인 laminarin과 비슷한 경향을 나타내었다. LPS는 50 μg/ml으로 배양하였을 때 16.7 nmol/well으로 NO_2의 생성이 가장 높았고, laminarin을 500 μg/ml 첨가하였을 때도 F-4-3의 획분보다 NO_2 생성이 다소 높은 경향이였다.

Rhaman sulfate의 획분인 F-4-1, F-4-2 및 F-4-3의 구성성분을 보면 F-4-3은 단당류 중 rhamnose가 36.8%로 가장 많고, 그 외 arabinose, xylose, mannose, galactose 및 glucose 등을 함유하고 있으며 황산기의 함유량은 30.8%인 반면, F-4-1 및 F-4-2의 rhamnose 함량은 각각 33.7% 및 35.0% 이였고 황산기의 함량은 각각 26.0% 및 28.2% 이였다. 이와같이 polysaccharide는 면역력을 증강시키는 것으로 보고되고 있으며,[21~23] β-glucan, chitin 등의 다당체도 숙주로부터 macrophage의 활성을 높혀 항종양 활성을 유도한다고 하였다.[24]

Macrophages의 활성 증강제로 알려진 porphyran으로부터 추출한 수용성 다당체인 porphyran은 3-0-(3.6-anhydro-L-fructopyranosyl) β-D-fructopyranose의 기본 2당류의 구조를 가지고 있으며 C6의 위치에 황산기가 결합되어 있다.[20] 본 실험에 사용된 다당체인 rhamnan sulfate는 6종류의 단당류로 구성되어 있으며 sulfate는 30.8%로 그 함량이 매우 높아 macrophage의 활성 조절을 하는 것으로 생각된다.

Interleukin-I의 생성

Fig. 3은 macrophages에 의한 Interleukin-I의 생성에 있어서 rhamnan sulfate의 획분인 F-4-1, F-4-2 및 F-4-3의 효과에 대하여 조사하였다. Rhamnan sulfate 획분중 F-4-1 및 F-4-2 에서도 Interleukin-I은 소량이 분비되었으나, F-4-3 획분에서 50 μg/ml 첨가하여 배양했을 때 7.0±2.13 μ/well이었고, 500 μg/ml 첨가하여 배양하였을 때는 13.0±1.60 μ/well 이였다. 대조구로 실험에 사용된 LPS를 5 μg/ml를 넣어 배양하였을 때 Interleukin-I은 51.6±0.21 μ/well 이였으나 laminarin은 50 및 500 μg/ml에서는 Interleukin-I의 분비는 극소량 이였다. 따라서 본실험에서 사용한 F-4-3 획분을 50 μg/ml 농도로 macrophage 배양에 첨가하였을 때 생산된 Interleukin-I은 IL-1의 활성화 물질로 알려진 5 μg/ml의 LPS를 첨가한 배양액에서 보다는 분비율이 낮았으나, 극소량의 IL-1을 생산한 해조류 유래의 다당체인 laminarin과 비교하여 볼때 F-4-3에서는 상당량의 Interleukin-I이 생산됨을 볼 수 있었다.

Tumor Necrosis Factor(TNF)의 분비

Fig. 4는 macrophage에 activator로 알려진 LPS 및 laminarin과 시료로 서 rhamnan sulfate M의 획분인 F-4-1, F-4-2 및 F-4-3를 첨가하여 tumor necrosis factor(TNF)의 생성에 대하여 실험한 결과로서 5 μg/ml의 LPS 인 경우 0.39±0.11 ng/well였고, laminarin을 500 μg/ml 첨가 한 경우 0.38±0.12 ng/well이였다. Rhamnan sulfate M의 획분 F-4-1 과 F-4-2를 500 μg/ml 첨가한 경우 F-4-1은 0.28±0.12

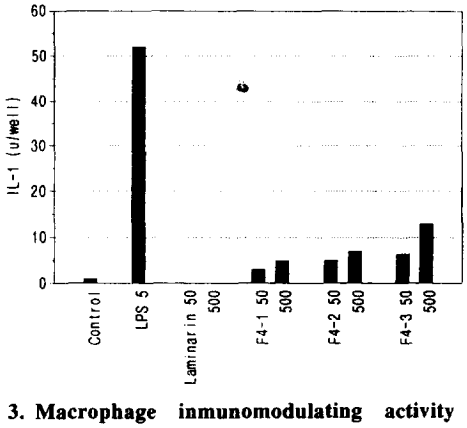

Fig. 3. Macrophage inmunomodulating activity according to Interleukin-1(IL-1) production *in vitro*. Macrophage monlayers obtained from C57B1/6 mice were incubated with activator or without activator for 72 h.

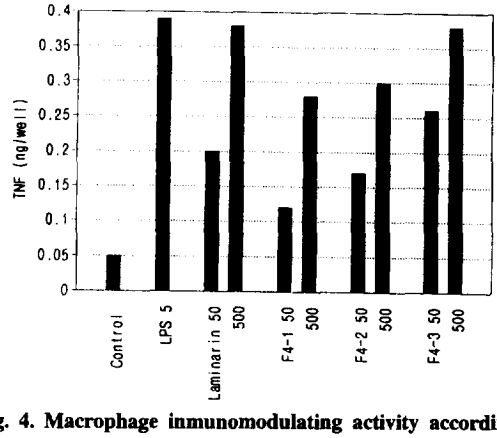

Fig. 4. Macrophage inmunomodulating activity according to tumor necrosis factor(TNF) production *in vitro*. Macrophage monlayers obtained from C57B1/6 mice were incubated with activator or without activator for 72 h.

ng/well이였고 F-4-2는 0.30±0.13 ng/well이였다. 그러나 F-4-3을 500 μg/ml 첨가하였을 때는 0.38±0.12 ng/well로 F-4-1 및 F-4-2 보다는 TNF의 분비가 다소 높았고 laminarin과 비교해 보면 거의 비슷한 경향을 나타내고 있다. 이러한 결과로 부터 rhamnan sulfate M의 획분에서 F-4-1, F-4-2는 Interleukin-I은 거의 생성되지 않았으나 F-4-3에서는 상당량의 Interleukin-I이 생성되었다. 그리고 TNF의 분비도 F-4-1 및 F-4-2는 거의 비슷한 량이 생성되었으나 F-4-3에서 다소 많은 량이 생성되었다. 그러므로 rhamnan sulfate M의 획분중 macrophage의 활성을 증강시켜 주는 효과는 F-4-1 및 F-4-2 보다 F-4-3이 높은 결과를 나타내었으며, laminarin과 비슷한 결과를 보여주었다.

본 실험 결과로는 rhamnan sulfate M의 획분 중 F-4-1, F-4-2 및 F-4-3가 macrophage의 활성을 자극하는 mechanism은 확실하게 알 수 없지만 이들 단당류의 구성비율과 함량, 황산기의 함량 및 분자량 등에의하여 이루어 지는 것으로 추정된다.[13]

Rhamnan sulfate에 의한 H_2O_2의 생성

50~250 μg/ml의 농도에서 37°C에서 4시간 배양한 후 수세한 다음 120분 동안 H_2O_2의 생성을 조사하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 250 μg/ml의 F-4-3로서 예비처리한 결과 unopsonized zymosan A의 50 μg/ml으로서 유도되는 H_2O_2의 량은 감소됨을 알 수 있다. 반대로 phorbol myristate acetate(PMA) 유도 H_2O_2는 동일한 방법으로 예비처리시 효과가 없었으나 예비처리한 macrophage에 의한 H_2O_2의 자발적인 생성은 각종 농도의 F-4-3에서는 변화가 없었다. 이의 결과로서 rhamnan sulfate를 넣어 4시간 동안 전배양 하였을때 PMA로 야기시킨 H_2O_2의 유도에서는 macrophage의 영향을 받지 못하였다. H_2O_2의 생성에 kinetics을 결정하기 위하여 macrophage를 250 μg/ml의 F-4-3 및 laminarin으로 37°C에서 6시간 동안 배양한 후 수세하고 50 μg/ml zymosan A를 넣어 2시간 배양하는 동안 H_2O_2의 생성을 검토하였다. Fig. 6에서 보는 바와같이 F-4-3 및 laminarin을 사용한 macrophage의 전처리는 6시간 예비처리 하여 각각 16°C 및 37°C로서 용량의존형으로서 unoposonized zymosan에 의하여 결과적으로 H_2O_2의 생성이 감소되었다. 이와 같은 결과는 (1-3)-β-D-glucan이 특이적으로 zymosan A에 의한 H_2O_2 생성을 억제하고 있으며 이러한 현상은 β-glucan receptor와 상관관계가 있는 것으로 판단된다. 본 실험에 사용된 zymosan A는 yeast의 세포벽의 구성성분이며 β-D-glucan으로 구성되어

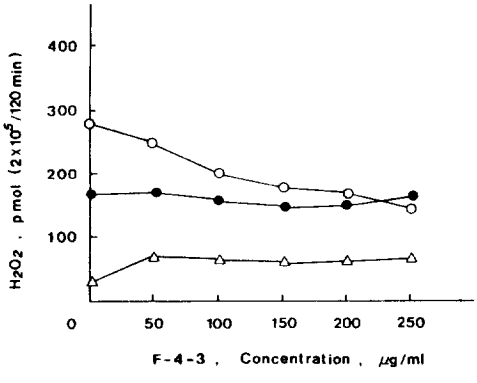

Fig. 5. Effects of pretreatment of macrophage with F-4-3 on their subsequent release of H_2O_2.
Adherent macrophages were preincubated with various concentrations of F-4-3 for 4hr at 37°C, then the cells were washed 3 times and incubated with F-4-3 for 2hr. △—△ : 250 μg/ml F-4-3, ●—● : 100 μg/ml PMA, ○—○ : 50 μg/ml zymosan A, Released H_2O_2 was estimated from the reduction of fluorescence intensity scopolein.

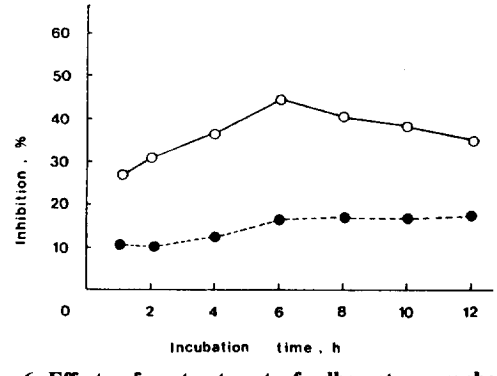

Fig. 6. Effects of pretreatment of adherent macrophages with F-4-3 or laminarin on their subsequent release of H_2O_2 after stimulation with zymosan A in ○—○ : 250 μg/ml laminarin, ●—● : 250 μg/ml F-4-3.
Adherent macrophages were pretreated in 250 μg/ml laminarin or F-4-3 for various times at 37°C, after washing 50 μg/ml zymosan A was added to the culture H_2O_2 was measured for 2hr by reduction of fluorescence intensity of scopoletin. Percentage of inhibition of H2O2 release were calculated by comparing the results obtained with macrophages preincubated with F-4-3 and laminarin to these obtained with macrophages preincubated without F-4-3 or laminarin.

있다. 특히 macrophage에서 sulfated polysaccharide는 어떤 receptor로서 H_2O_2의 분비를 억제하는 것으로 판단되며 rhamnan sulfate도 polyanionic 화합물로서 receptor에 특이적으로 작용하여 H_2O_2의 생성을 방어하는 것으로 생각된다.[25]

감사의 말

이 논문은 1994년도 경성대학교 학술연구조성비에 의하여 연구되었으므로 이에 감사드립니다.

국문요약

흩파래(*Monostroma nitidum*)로 부터 황산기가 함유된 다당체를 분리 정제하여 macrophages 활성에 대하여 실험하였다. Rhamnan sulfate의 peritoneal macrophage을 이용한 glucose 소비량의 영향에서 LPS, Laminarin 및 Zymosan A를 대조군으로 하여 실험한 결과 F-4-3 획분의 활성이 높았으며, rhamnan sulfate의 획분인 F-4-1, F-4-2 및 F-4-3등은 NO_2의 생성을 억제하였고, 또한 Interleukin-1의 분비는 대조군으로 Laminarin과 비교하였을 때 상당량이 생성되는 것을 볼 수 있었으며, F-4-3에서는 Tumor Necrosis Factor의 생성에 영향을 미치는 것으로 나타났다. Peritoneal macrophage에 F-4-3 획분을 첨가하여 실험하였고, 대조군으로서 zymosan A와 H_2O_2의 생성을 비교하여 본 바 F-4-3을 예비처리한 macrophages는 zymosan A 매개 H_2O_2의 생성을 억제하였고, phorbol myristate acetate(PMA) 매개 H_2O_2의 생성에는 효과가 없었다. 이러한 결과로 미루어 보아 rhamnan sulfate의 전처리는 macrophage의 활성 조정하는 역할을 하였다.

참고문헌

1. 西澤一俊, 村杉幸子, 海藻の本, 研成社, (1987).
2. 內藤敦, 海洋生物. 資源の探索と利用, CMC, シ-エシ, (1986).
3. 官地 遠, 松永是, マリンハイオテクノロシの 展望, 化學と工業, 604-86, (1988).
4. 홍승용: 2,000년대를 향한 해양개발 장기 종합계획연구, 한국과학재단, (1985).
5. 日本水産學會編, 海洋生物化學の利用, 恒星閣, 1983.
6. 岡見吉郎, 海洋生物から, 醫藥品へソセ-シ", 化學と工業, 620-102 (1988).
7. 北天勳編, 海洋天然物化學, 化學同人, (1989).
8. Scheuer, P. J. Marine natural products, *Academic Press.* (1978).
9. 北天勳編, 海洋天然物化學, 化學 No.111 同人, 53, (1988).
10. 이영숙, 김동석, 류병호, 이성호: 파래와 곰피에서 추출한 당단백질의 Sarcoma-180 cell에 대한 항암효과 및 면역활성, 한국영양식량학회지, **21**, 544-559 (1992).
11. 조경자, 이영숙, 류병호; 청각과 김에서 추출한 당 단백질의 Sarcoma-180에 대한 항암효과 및 면역활성. 한국수산학회지, **23**, 345-352 (1990).
12. Nakashima, H., Kido, Y., Kobayashi, N., Motoki, Y., Neushal, M. and Yamamoto, N., Purification and characterization of an avian myeloblastosis and human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor sulfated polysaccharide extracted from sea algae, *Antimicrobial agents and chemeotherapy.*, **31**, 1524-1538 (1987).
13. Yoshizawa, Y., Enomoto, A., Todoh, H., Anetani, A., Kaminogawa, S., Activation of macrophages by polysaccharide fraction from marine algae, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1862-1866 (1993).
14. 大東肇, 小清水弘一, 食品植物および" 海藻類の發癌フロモシヨン 抑制と活性物質. *Nippon Nogeikagaku Kaishi.*, **67**, 31, 1993.
15. 빈재훈 : 흩파래 중의 rhamnan sulfate의 특성과 생리활성, 경성대학교 대학원 박사학위논문, pp 1-82 (1996).
16. Harpe, J. and Nathan, C. F., *J, Immunol, Method.*, **78**. 323 (1985).
17. Miwa, M., Tsuda, M., Kurashima, Y., Jara, H., Tanaka, Y. and Suinofara, K., *Biochem, Biohys. Res. Commun.*, **159**, 373-378 (1989).
18. Furehauf, J. P., Bonnard, G. D., Herberman, R. B., The effect of lentinan on production of interleukin-1 by human monocytes. *Immunopharmcology.*, **5**, 65-72 (1982).
19. Andrew, J. S., Berger, A. E., Ware, C. F., Characterization of the receptor for tumor necrosis factor(TNF) and lymphotoxin(LT) on human Tlymphocytes. *J. Immunol.*, **144**, 2582-2591, (1990).

20. Yoshizawa, Y., Enomoto, A., Todah, H., Ametani, A., Kaminoga- wa, S., Activation of murine macrophages by polysaccharide fractions from marine algae(*porphyra yezoensis*). *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1862-1866 (1993).
21. Yamada, H., Kiyohara, H., Cyong, J. C. and Otsuka, Y., Structural characterization of an anti-complementary arabinogalactan from the roots of *Angelica acutiloba*. *Carbohydr. Res.*, **159**, 275-283 (1987).
22. Percival, E., Venegasjara, M. F. and Weigel, H., Structural studies of the water soluble fucan from *Lessonia nigresens, Carbohydr. Res.*, **126**, 283-294 (1984).
23. Finch, P., Percival, E., Slaiding, I.R. and Weigel, H., Carbohydrates of the antartic brown seaweed, Ascoseira *Mirabilis, Phytochemistry.*, **25**, 443-452 (1986).
24. Yamada, H. and Kiyohara, H., Bioactive polysaccharide from chinese herbal medicines, *Abstracts of chinese Medicine.*, **3**, 104 (1989).
25. Adachi, Y., Ohno, N., and Yademae, T., Inhibitory effect of β-glucans on zymosan mediated hydrogen peroxide production by murine peritoneal macrophages *in vitro, Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 462-467 (1993).