KOREAN J. FOOD & NUTR.
Vol. 9, No. 4, 490~495(1996)

홑파래로부터 추출한 Rhamnan Sulfate의 항보체 활성

빈재훈* · 김현대** · 류병호***

* 부산시 보건환경연구원, ** 동부산전문대학, ***경성대학교 식품공학과

Anticomplementary Activities of Rhamnan Sulfate extracted from *Monostroma nitidum*

Jae-Hun Bin*, Hyun-Dae Kim and Beung-Ho Ryu+**

* *Public Health & Environment Institute of Pusan Korea*

** *Dept. of Food Science and Nutrition Dong pusan junior college, Pusan 612-715, Korea*

*** *Dept. of Food Science and Technology, Kyung Sung University, Pusan, 608-736, Korea*

Abstract

The anti-compliment activity of hemolytic complementary assay(TCH_{50}) of rhamnan sulfate fraction obtained from water extracts of *Monostroma nitidum* was investigated Rhamnan sulfate Fraction, F-4-3 fraction appeared relatively strong anti-complementary activity which decreased TCH_{50} over 60% than that comparison with control, and F-4-3 considerably inhibited ACH50. F-4-3 inhibited formation of the classical pathway C3 convertase or C4 cleavage. The results also indicate the mode of complement activation by F-4-3 fraction shows not only the classical pathway but also the alternative pathway.

Key words : rhamnan sulfate, *Monostroma nitidum*, anticompliment activity.

서 론

해조류는 육상생물에 비하여 비타민과 무기물 함량이 높다. 그중 마그네슘, 칼슘, 요오드, 철 및 아연등 필수 미량원소가 다량 함유되어 있기 때문에 건강식품으로 각광받고 있다. 해조류의 다당류는 성질이 독특하여 생리활성이 강한 것으로 알려지고 있다[1]. 미역, 다시마, 파래 등의 당류는 항암 및 면역활성[2,3] 과 고혈압 예방 및 항종양 활성이 있으며, 김은 콜레스테롤 강하작용 및 항궤양성 작용을 하는 것으로 알려져 있다[4]. 식용 해조류는 영양학적 효과 뿐만 아니라 면역, 신경 및 내분비계에 생리적 효과가 있다[5]. 해조류는 다당체를 다양하게 함유하고 있다. 이들 중 alginate, fucoidan, carrageenan 및 agarose등이 식품첨가물로 많이 이용되고 있다[6,7]. Ffucoidan은 항혈액응고 효과가 우수한 것으로 밝혀져 있다[8,9] 또한 *Sargassum fulvellum*으로부터 추출된 알긴산과 *Sargassum kjellmanianum*으로부터 추출된 sulfated galactofucan은 이식한 murine tumor에 대해 숙주매개형 항암작용이 알려져 있다[10]. 최근 몇 종류의 해조류 다당체, 포스포리피드 및 글리코리피드에서 쥐에 대한 항암효과가 있다고 보고된 바 있다[10,11]. 식용 해조류인 *phorphyra*는 Ehrlich 및 Meth A fibrinosarcoma에 대하여 항암활성이 있으며,[12] *Laminaria angustata* von *longissima*는 열수로서 추출한 sulfated 다당이 쥐의 sarcoma-180 및 leukemia에 대하여 항암효과가 있다고 보고된 바 있다[13]. Sulfated 다당은 구조와 조성비율에 따라 세포간, 세포와 간질 접착, 세포생장 및 유전자 발현등의 생물학적 기능을 갖는다[13].

면역계 중에서 보체계의 역할은 미생물 감염으로부터 숙주를 방어하는 기능 이외에도 염증, 과민반응, 화학주성(chemotaxis)등에 중요한 역할을 하며, 현재 C1-C9까지 9개의 기능단위를 보이는 11개의 단백성분과 조절인자 등 약 20여종의 단백질로 구성되어 있는 것으로 밝혀졌다. 또한 보체계는 기능단위의 작용방식에 따라 classical pathway와 alternative pathway로 구분할 수 있다. 이 중 alternative pathway는 효모나 세균의 세포벽에 존재하는 다당류등의 activator에 의해 C3b

Corresponding author : Beung-Ho Ryu

가 특이적으로 활성화되어 membrane attack complex를 형성하고 결국 병원체의 lipid bilayer에 손상을 주어 살균작용을 나타낸다[13,14,15].

그러므로 alternative pathway는 항체에 의한 특이적 면역 반응이 일어나기 이전에 활성화하기 때문에 항원에 의해 감작되지 않은 숙주에 있어서 중요한 방어메카니즘이라 할 수 있다. 해조류의 다당체 및 heparin과 그 유사 화합물인 덱스트란 황산 및 프로타민 황산은 항접착 및 항염증 활성이 있다[16~19].

이와 같이 해조류에 함유되어 있는 천연 다당체 중에는 생체의 기능을 조절할 수 있는 다양한 물질들이 함유되어 있으며, 헤파린도 역시 보체규칙 단백질인 C1 INH와 factor H 및 I의 기능과 유사한 기능을 하는 것으로 알려져 있다[20~26]. 또 fucans은 갈색 해조류의 세포벽에 위치한 sulfated polysaccharide로서 이는 3-branch (1~2) 혹은 (1~3) 결합한 α-L-fucose-4-sulfate units[12,27]로 구성되어 있어 높은 전하를 가진 polyanion으로서 antithrombin Ⅲ 및 heparin cofactor Ⅱ에 의한 thrombin활성의 억제를 촉진한다[26, 27]. 헤파린과 fucan의 구조적 특성, 항응고작용 및 보체계 활성에 있어서 이와 같은 polyanion 화합물의 효과가 있으며 해조류 다당체중 5탄당의 함량이 높은 pentose sulfated polysaccharide는 그 생리활성이 매우 높은 것으로 알려져 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[28, 29].

본 연구는 홑파래로부터 항혈액응고 작용이 있다고 알려져 있는 rhamnan sulfate를 분리 정제하여 그 구조적 특성을 규명하고 면역 및 항 보체계 활성에 대한 효과를 연구한 결과이다.

재료 및 방법

1. 재 료

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

2. Rhamnan sulfate의 분리

西澤一俊의 방법[7]에 따라 분리하였다. 건조시킨 홑파래에 20 배의 증류수를 가하여 100℃에서 30분간 2회 반복하여 추출한 후 여과하여 감압 농축한 다음 4배 용량의 에탄올을 가하여 고분자 물질을 침전시켰다. 침전물은 10,000×g에서 30분간 원심분리시킨 후 다시 에탄올로서 2회 세척하고 원심분리후 건조하여 crude rhamnan sulfate를 얻었다.

3. 당조성의 분석

시료 약 60mg을 7%의 황산에 약 30분간 가용화한 후 약 4% 농도의 황산용액이 되도록 증류수를 가하고 고압솥에서 100℃로 2시간 동안 산가수분해하여 내부표준물질로서 메틸 β-D-글루코시드를 가하고 탄산바륨으로 중화한 후 알티톨초산을 만들어 가스크로마토그래피법으로 분석하였다[30].

4. 황산이온의 정량

시료 약 5mg을 1N-HCl에 용해시켜 밀봉한 후 105~110℃에서 4~5시간 가수분해하였다. 방냉시킨 후 이 용액 0.2ml에 4% trichloroacetic acid(TCA)용액 3.8ml를 가한 후 젤라틴용액(gelatin 0.5g을 60~70℃에서 사용직전에 염화바륨 0.5g을 넣어 용해시킨 것) 1ml를 가하고 15~20분간 방치한 후 360nm에서 흡광도를 측정하였다. 별도로 표준용액(Na_2SO_4, Merck 특급) 및 정제수를 동일하게 조작하여 비교하였다[32].

5. 음이온 교환 크로마토그라피에 의한 rhamnan sulfate의 정제

앞의 방법에 따라 추출한 rhamnan sulfate 약 500mg을 50ml의 증류수에 용해시키고 황산나트륨 100mg을 가한 후 cetylpyridinium chloride (CPC) 1.5g을 가하여 rhamnan sulfate와의 복합체를 침전시켰다. 이를 증류수에 녹인 다음 음이온 교환수지(DEAE Toyopearl 650M) 컬럼(3.2×50cm)에 흡착시킨 후 0~2.0M NaCl/0.01N HCl 단계별 기울기로서 1ml/min씩 용출시켰다. 용출액 중의 총당 함량은 L-rhamnose을 표준품으로 한 페놀 황산법으로 측정하였으며, 당조성은 가스크로마토그래피 법으로 분석하였다[31].

6. 항보체 활성의 측정 시약의 조제

Heparin M108(sodium salt, from hog intestine mucosa, specific anticoagulant activity, 173 IU/mg, Sanofi, Suresnes France)은 항보체활성을 위한 sulfated polysaccharide의 표준품으로서 사용하였다. Dextran 200T(M.W 4.3000), normal human serum(NHS) 및 토끼 적혈구(rabbit red blood cell, RRBC)는 실험실에서 직접 신선한 상태로 조제하여 사용하였다. Human C3[33] Factor B[34] 및 Factor D[35]는 NHS에서 분리하였다. Guinea pig C1(C1gp)는 Nelson등[36]의 방법에 따라 부분적으로 정제하였고 Guinea pig C2, 및 human C5, C6, C7, C8 및 C9는 Cor-

dis Laboratories Inc(Miami, FL)로부터 구입하였다. 125I는 Anersham(Les. Ulis, France)에서 구입하였다. 0.1% gelatin veronal 완충액(GVB)을 함유하는 veronal buffer saline (VBS), 2.5% dextrose, 0.15mM CaCl2, 또는 0.5mM $MgCl_2$(DGVB$^+$) 또는 0.05mM $NiCl_2$(DGVB-Ni) 함유 half-isotonic 2mM Mg^{2+}(GVB-MG) 함유GVB, 2mM Mg^{2+}, 8mM EGTA (GVB-Mg-EGTA)함유 GVB등의 시액은 Nelson등의 방법[36]에 따라 조제하였다.

EA는 sheep erythrocytes(E^S)와 rabbit anti-sheep erythrocyte antibodies(Cordis Laboratory, Miami, FL)를 사용하여 제조하였다. EAC4b, 3b는 antrypol의 존재하에서 NHS를 zymosan으로 처리한 후 상호반응한 EA로 조제하였다. EAC1은 EA와 C1gp를 사용하여 조제하였으며, EAC4b는 C4를 citrated human plasma를 사용하여 전환시켰고, 용혈성 활성이 있는 EAC1, 4b는 C1gp로써 반응하여 유도하였다. E^C를 가진 C3b는 정제한 C3, B 및 D를 사용하여 액상과 세포결합을 강화시키는 convertases에 의하여 연속적으로 침강시켜 제조하였다[37].

7. Classical anticomplementary activity의 측정

항보체 활성은 Kabat등의 방법[38]으로 측정하였다. NHS, GVB^{2+}(gelatin veronal buffered saline, pH 7.5)와 시료용액을 각각 50μl씩 혼합하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후 EA cell(1×10^8cells/ml)을 이용하여 잔존 용혈활성을 측정하였다. 대조구는 동일 조건에서 측정하였다. 항보체 활성은 대조군 대비 총 보체용혈(TCH_{50}, 50% of total complement hemolysis)의 저지율(ITCH50, inhibition of 50% of total complement hemolysis)로서 나타내었다.

$$ITCH50(\%) = 100\times \frac{TCH_{50}\text{ of control}-TCH_{50}\text{ treated with sample}}{TCH_{50}\text{ of control}}$$

8. Alternative complement hemolytic activity (ACH_{50})의 측정

ACH_{50}은 Platts등의 방법[39]을 변형하여 측정하였다. 4mM $MgCl_2$와 10mM ethyleneglycol-bis(β-aminoethylether) *N,N,N',N'*-tetra acetic acid (EGTA)를 함유한 Ca^{2+} free GVB^{2-} buffer (Mg^{2+}−EGTA-GVB^{2-}), NHS 및 시료 300μl를 각각 혼합하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후 Mg^{2+}-EGTA-GVB^{2-}를 3.6ml 가하여 적절히 연속 희석하고, 5×10^7 cell/ml의 감작화되지 않은 신선한 토끼 적혈구를 200μl 가하여 37℃ 에서 60분간 반응한 후 원심분리하여 상징액의 흡광도를 414nm에서 측정하였다. Alternative pathway에 의한 보체 용혈활성능은 대조군의 ACH_{50}에 대한 저지율(Inhibition of ACH_{50}, %)로 표시하였다.

9. C4a와 C3a의 분비에 따른 fucan의 효과

C4a와 C3a의 분비의 최적조건은 응집된 human IgG (classical path-way) 및 crushed Sephadex beads(alternative pathway)를 사용하여 실험하였다[40,41]. Classical pathway 활성은 fucan을 함유하는 100μl VBS^{2+}에 가열 응집시킨 IgG 200μg을 함유한 PBS 12μl와 희석하지 않은 NHS 100μl을 넣은 후 37℃에서 45분간 배양하였다. C4a 항원의 농도는 radioimmuno-assay(Amersham)로 측정하였다.

Alternative pathway의 activation은 시료를 함유한 VBS2+ 100μl에 분쇄한 Sephadex G-25 15mg함유하는 희석하지 않은 NHS 100μl에 넣어 조용히 흔들면서 37℃에서 30분간 반응시켰다. C3a 항원의 농도는 반응용액을 원심분리한 후 상등액을 radioimmuno-assay법으로 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 당 및 Sulfate 조성

홀파래의 rhamnan sμlfate를 음이온 교환 크로마토그래피로 정하여 F-4-1, F-4-2 및 F-4-3를 얻었다. 이들 F-4-1, F-4-2 및 F-4-3의 획분 구성당은 rhamnose의 양은 각각 33.7%, 35.0% 및 36.8%로, sulfate의 함량은 F-4-1, F-4-2 및 F-4-3에서 각각 26.0%, 28.2% 및 30.8%로 나타났다.

2. 항보체 활성물질의 검색

Rhamnan sulfate를 항보체 활성물질의 검색 대상으로 선택한 것은 음식물중에 들어있는 다당체인 arabinogalactan,[41] heteroglycan,[40] fucan[43]등이 식품으로 섭취되고 있기 때문에 생체에 대하여 항보체 활성이 다양할 것으로 기대되고, 독성이 없기 때문이다. 보체계의 활성경로의 classical pathway는 Ca^{2+} 및 Mg^{2+}에 의하여 활성화되고 alternative pathway는 Mg^{2+}만이 작용하여 활성화된다[43,44]. 그러므로 다당체인 F-4-3가 두 경로중 어느 경로를 통하여 보체계를 활성화시키는지 알아보기 위하여 VBS^{2+} 기본 반응계와

2가 금속이온을 모두 제거한 EDTA-GVB 반응계 및 Ca^{2+}을 선택적으로 제거한 Mg^{2+}-EGTA-VBS- 반응계로 나누어 항보체 활성을 측정하였다. 정상인의 혈청을 면역복합체로서 양의 감작적혈구(EA cell)와 반응시켰을 때를 항보체 활성(anticomplementary activity)이라 하며 보체계의 활성은 보체계를 활성화 혹은 저해하는 활성을 의미한다[45]. Fig. 1 (a)와 (b)에서 나타난 바와 같이 획분 F-4-3은 VBS^{2+}에서 희석한 NHS 반응계 EA와 GVB-Mg-EGTA로 희석한 NHS의 반응계에서 E^R은 F-4-3 획분의 용량 의존형으로 억제하는 것을 볼 수 있다. 별도로 F-4-3 획분의 항보체 활성을 비교하기 위하여 heparin H-180 과 unsμlfated dextran T40으로 실험하였다. F-4-3 획분의 총 보체용혈(TCH_{50}, 50% of total complement lysis)은 50% TCH50 unit로 활성을 관찰할 수 있었으며, alternative complement hemolytic activity(ACH_{50})에 있어서 ER의 용혈은 상당한 활성을 유지하였다. 본 실험에서 사용한 rhamnan sμlfate는 *in vitro*에서 사람 보체계 활성에 강력한 억제제로 나타났다. 그러나 황산기를 함유하지 않은 dextran T40에서는 활성이 나타나지 않았다. Rhamnan sulfate는 음이온의 다당체로서 용량 의존형으로 classical 및 alternative pathways에서 NHS에서 erythrocyte의 보체 매개 용혈을 억제하였다. NHS의 10mg/ml의 F-4-3는 TCH_{50}로 측정하여 혈청의 70~80% 정도의 용혈활성을 충분히 억제할 수 있었고, 이의 대조구 시료로 사용된 heparin H108은 F-4-3에 비하여 약 2/3 정도로 약하였으나 ACH_{50}은 F-4-3의 농도가 3.0mg/ml에서도 heparin H-180과 유사한 억제농도로 항보체 활성이 있었다.

3. C4a와 C3a의 활성화에 대한 rhamnan sulfate의 효과

Classical 및 alternative pathway C convertases의 형성과 기능에 대한 F-4-3의 효과를 알아보기 위하여 응집 IgG와 Sephadex에 의한 alternative pathway 및 classical pathway의 활성에 따르는 혈청에서의 C4a 및 C3a의 분비에 대하여 분석한 결과 Fig. 2와 같이 F-4-3의 농도가 증가할 수록 용량의존형으로 C4a 및 C3a의 생성을 억제하였다. 이와 같은 결과는 polysaccharide alternative C3 convertase 복합체의 형성과 기능의 역할에서 classical C3 convertase 형성으로 방해하는 작용을 나타내는 것이다. 그리고 F-4-3는 C1의 활성화를 방해하고 응집되는 IgG로서 C1의 결합을 방해한다. 한편으로는 C1에 의하여 C4의 전달을 억제하였다.

요 약

홑파래로부터 황산기를 함유한 다당체를 크로마토그

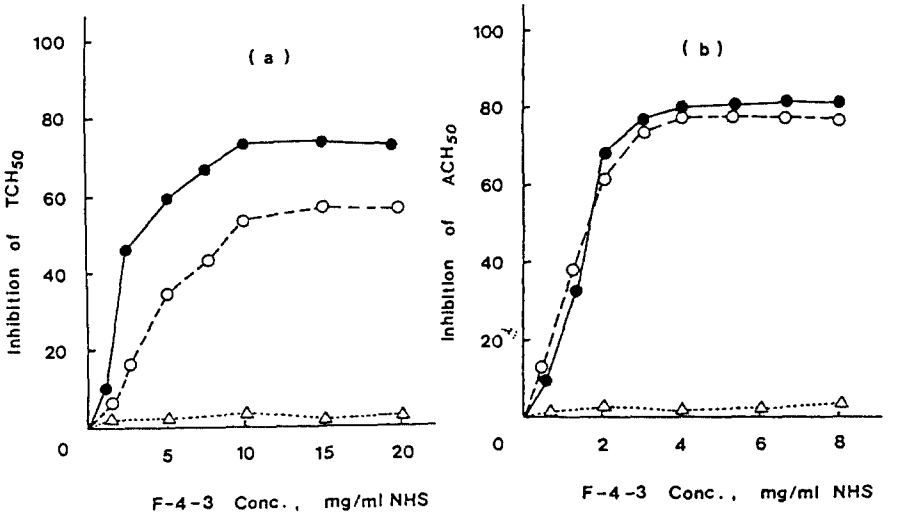

Fig. 1. Anticomplementary activities of rhamnan sulfate for classical and alternative pathway mediated lysis of EA(a) and ER(b) in normal whole serum(NHS). ●---● : F-4-3, ○---○ : heparin H-180, △---△ : dextran T40.

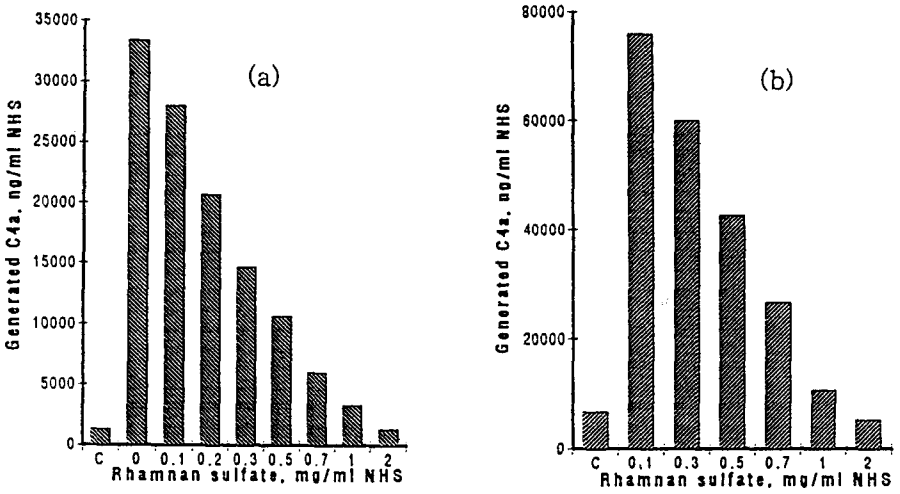

Fig. 2. Inhibition by rhamnan sulfate of the generation of C4a and C3a on the activation of the classical and alternative pathway in whole serum. The classical pathway was activated with aggregated IgG(a) and the alternative pathway was activated with Sephadex(b). C : The amount of C4a and C3a generated in serum incubated in the absence of activator and inhibitor.

래피로 분리정제하여 rhamnan sulfate가 항보체 활성화에 미치는 영향을 조사하였다. 항보체 활성능력은 F-4-3 획분을 비교군으로 Heparin H-180, Dextran과 비교해 결과 비교군보다 높았고, C4a와 C3a의 C convertase의 형성과 기능을 F-4-3 획분이 억제하였다. 이러한 보체 활성화 양식은 classical pathway 및 alternative pathway로도 경유함을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Aleem, A. A. : Potential bioassay of natural seawaters and influence of certain trace elements on the growth of phytoplankton organisms. He lgolander wiss. *Meeresunters.*, **20**, 229(1970).
2. 이영숙, 김동석, 류병호, 이성호, 파래와 곰피에서 추출한 당단백질의 Sarcoma-180 cell에 대한 항암효과 및 면역활성, *한국영양식량학회지*, **21**(5), 544(1992).
3. 조경자, 이영숙, 류병호 : 청각과 김에서 추출한 당 단백질의 Sarcoma-180에 대한 항암효과 및 면역활성. *한국수산학회지*, **23**(5), 345(1990).
4. 岡見吉郎, 海洋生物から, 醫藥品ナッセ-ジ, *化學と工業*, 620(1988).
5. 北天勳編, 海洋天然物化學, 化學同人, (1989).
6. 西澤一俊, 海藻多糖の 生理作用. *生化學*, **61**(7), 605 (1989).
7. 西澤一俊, 藻類の 酸性多糖類とその生理活性, *食品開發*, **8**(11), 28(1979).
8. Hurch, F. C., Meade, J. B., Treanor R. E. and Whinna, H. C. : Antithrombotic activity of fucoidan with heparin cofactor Ⅱ, antithrombin Ⅲ and thrombin. *J. Biol. Chem.*, **6**, 3618(1989).
9. Llier. S., Fischer, A. M., Tapon-Bretaudiere J., Boisson-Vidal C., Durand, P. and Jozefonvicz, J. : Anticoagμlant properties of a fucoidan fraction. *Thromb. Res.*, **64**, 143(1991).
10. Yoshizawa, Y., Enomoto, A., Todoh, H., Anetani, A. and Kaminogawa, S., Activation of marine macrophages by polysaccharide fraction from marine algae, Biosci. *Biotech. Biochem.*, **57**(1), 1862(1993).
11. 大東肇, 小清水弘一 : 食品植物および 海藻類の發癌プロモシヨン 抑制と活性物質. *Nippon Nogeikagaku Kaishi.*, **67**(1), 31(1993).
12. Noda, H., Amano, H., Arashima, K., Hashimoto, S. and Nisizawa, K. : *Nippon Suisan Gakkaishi.*, **55**, 1259 (1989).
13. Pillemer, L., Blum, L., Lepow, I. H., Poss, O. A., Todd, E. W. and Wardlaw, A. C. : The properdin system and immunity. I. Demonst- ration and isolation of a new serum protein, properidin, and its role in immune phenomena. *Science.*, **120**, 279(1954).
14. Morrisson, D. C. and Kline, L. F. : Activation of the classical and properidin pathways of complement by bacterial lipopolysacchari- des (LPS). *J. Immunol.*, **118**, 362(1977).
15. Schuitx, D. R., Arnold, P. I., Wu, M. C., Lo, T. M., Volanakis, J. E. and Loos, M. : Isolation and partial characterization of a polysaccharide in ant venom (*Peudomynnex* sp.) that activates the classical complement pathway. *Mol. Immunol.*, **16**, 253(1979).
16. Wight T. N., Kinsella M. G. and Qwarnstrom, E. : The role of proteoglycans in cell adhesion, migration and proliferation. *Curr. Op. Cell Biol.*, **4**, 793(1992).
17. Kazatchkine, M. D., Fearon, D. T., Metealf, D. D.,

Rosenberg, R. D. and Austen, K. F. : Structural determinants of the capacity of heparin to inhibit the formation of the human amplification C3 convertase. *J. Clin. Invest.*, **67**, 223(1981).
18. Weiler, J. M., Yurt, R. W., Fearon, D. T. and Austen, K. F. : Modulation of the formation of the amplification convertase of complement, C3b Bb, by native and commercial heparin. *J. exp. Med.*, **147**, 409(1978).
19. Lindhardt, R. H., Rico, K. G., Kim, Y. S., Engelken, J. D. and Weiler, J. M. : Homogenous structurally defined heparin-oligosaccarides with low anticoagulant activity inhibit the generation of the amplification pathway C3 convertase *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **263**, 13,090(1988).
20. Raepple, E., Hill, H. U. and Loos, M. : Mode of interaction of different polyanions with the first(C1, C1), the second (C2) and the fourth (C4) component of complement--- I. Effect on fluid phase C1 and on C1 bound to EA or to EAC4. *Immunochem.*, **13**, 251(1976).
21. Loos, M., volonakes, J. E. and Stroud, R. M. : Mode of interaction of different polyanions with the first(C1, C1), the second (C2) and the fourth (C4) component of complement--- II. Effect of polyanions on the binding of C2 to EAC4b. *Immunochem.*, **13**, 257(1976).
22. Kazatchkine, K. D., Fearon, D. T., Silbert, J. E. and Austen, K. F. : Surface associated heparin inhibits zymosan-induced activation of the human alternative complement pathway by augmenting the regulatory action of the control proteins on particle-bound C3b. *J. Expl. Med.*, **130**, 1202(1979).
23. Loos, M., volonakes, J. E. and Stroud, R. M. : Mode of interaction of different polyanions with the first(C1, C1), the second (C2) and the fourth (C4) component of complement---III. Inhibition of C4 and C2 binding sith(s) on C1s by polyanions. *Immunochem.*, **13**, 789(1976b).
24. Meri, S. and Pangburn, M. K. : Discrimination between activators and nonactivators of the alternative pathway of complement : regulation via a sialic acid/polyanion binding site on factor H. *Proc. nam. Acad. Sci., U.S.A.*, **87**, 3982(1990).
25. Pangburn, M. K. : Analysis of recognition in the alternative pathway of complement. Effect of polysaccharide size. *J. Immun.*, **142**, 2766(1989).
26. Kloareg, B. and Quatrano, P. S. : Structure of the cell wall in marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanogr. Macr. Biol. Ann. Rev.*, **26**, 259(1988).
27. Mabeau. S., Kloareg, S. and josefeau, J. P. : Fractionation and analysis of fucans from brown algea. *Phytochemistry.*, **29**(8), 2441(1990).
28. Watanabe, I. : Current to topics in marine biotechnology, *Tech. press*, 11(1989).
29. Fujihara, M., Iizima, N., Yamanoto, I. and Nagumo, T. : Purification and chemical and physical characterization of an antitumor polysaccharide from the brown seaweed, *Sargassum fulvellum*, *Carbohydrate Research*, **125**, 97(1984).
30. Anastassiades, T., Puzic, R. and Puzic, O. : Modification of the simultaneous determination of alditol acetate of neutral and amino sugar by gas-chromatography. *J. Chromatogr.*, **225**, 309(1981).
31. Sloneker, J. H., Gas-liquid chromatography of alditol-acetates, Methods in Carbohy drate Chemistry. *Academic press(New York, U.S.A).*, Vol. VI, 20(1972).
32. 日本分析化學會 北海道支部編, 水の分析, 化學同人, 178~183(1981).
33. Tack, B. B. and Prahl, J. W. : Third component of human complement, purification from plasma and physiological characterization. *Biochem.*, **15**, 45123 (1976).
34. Hunsicker, K. G., Ruddy, S. and Austen, K. K. : Alternate complement pathway : factors involved in cobra venom factor(CVF) activation of the third component of complement(C3). *J. Immun.*, **110**, 128 (1973).
35. Rearon, D. T. and Austen, K. F. : Properdin : Bining to C3b and Stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *J. Exp. Med.*, **142**, 248(1975).
36. Nelson, R. A., Jensen, J., Gigli, I. and Tamura, N. : Methods for the separation, purification and measurement of the nine compon-ents of hemolytic complement of guinea pig serum. *Immunochem.*, **3**, 111 (1966).
37. Fischer, E. and Kazatchkine, M. D., Surface-dependent modulation by H of C5 cleavage by the cell-bound alternative pathway C5 convertase of human complement. *J. Immun.*, **130**, 2821(1983).
38. Kabat, E. E. and Meyer, M. M., Complement and complement fixation. In Esperimental Immunology, Charles C, Thomas, IIinonois., p.133(1964).
39. Platt, M. T. and Ishizaka, K., Activation of the alternative pathway of human complement by rabbit cells. *J. Immunol.*, **113**, 348(1974).
40. Yamada, H., Cyong, J. C. and Otsuka, Y. : Purification and characterization of complement activation acidic polysaccarides from the roots of lithospermum enchromum royale. *International J. Immunopharm.*, **8**. 71(1986).
41. 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(1987).
42. 빈재훈, 류병호. 홑파래에서 분리정제한 rhamnan sulfate의 특성, *한국식품과학회지*. **28**(5) 859(1996).
43. Yamada, H., Ohtani, K., Kiyohara, H., Cyong, J. C., Otsuka, Y., Ueno, Y. and Omura, S., Purification and chemical properties of anti-complementary polysaccharide from the leaves of *Artemisia princeps*. *Planta Med.*, **51**, 121(1985).
44. Bellanti, T. A., The complement system. In Immunology III *Saunders, Philadelphia.*, p.106(1985).
45. Bezamini, E. and Leskowitz, S. : Complement. In Immunology. *Alan R. Liss, New York.*, p.121(1988).

(1996년 11월 29일 접수)