

*Pachymeniopsis elliptica*의 열수 추출물로부터 분리한 합황 다당류의 정제 및 특성

이선희 · 전우진* · 유광원* · 전 혁* · 신동훈* · 홍범식* · 조홍연* · 양한철*
고려대학교 자연자원대학원, *고려대학교 생명공학원

Purification and Characterization of Sulfated Polysaccharide Isolated from Hot Water Extract of *Pachymeniopsis elliptica*

Sun-Hee Lee, Woo-Jin Jun*, Kwang-Won Yu*, Hyug Chun*, Dong-Hoon Shin*,
Bum-Shik Hong* Hong-Yon Cho* and Han-Chul Yang*

Graduate school of Natural Resources, Korea University
*Graduate school of Biotechnology, Korea University

Abstract

In the preliminary study, we investigated the anti-complementary activities of 62 extracts from Korean edible seaweeds. Of those, *Pachymeniopsis elliptica* showed the highest anti-complementary activity. Therefore, it was purified as follows; i) PE-1 by ethanol precipitation, ii) PE-1-C by ultrafiltration, iii) PE-1-CIV by DEAE-Toyopearl 650C, and iv) PE-1-CIV-ii by Sepharose CL-6B. The purified compound, PE-1-CIV-ii, was the complexed homogeneous polysaccharide (molecular mass: 780 kDa) with 82.9% of anti-complementary activity. Also, it contained a significant amount of sulfate group (30.5%), which indicated it as a sulfated algal polysaccharide. Its structural monosaccharides were galactose (44.3%), 3,6-anhydrogalactose (34.0%), glucose (8.2%), fucose (5.4%), xylose (5.2%) and rhamnose (2.9%). After the treatment of periodate on a sample, a significant decrease in anti-complementary activity was found, which was a characteristic of bioactive polysaccharides. Anti-tumor activity of PE-1-A, B and C was tested in the sarcoma-180 solid tumor model. The PE-1-C with the largest molecular mass (more than 300 kDa) showed 81% of inhibition on the solid tumors, suggesting that the anti-complementary activity was, at least in part, related to anti-tumor activity. Based upon these results, the purified polysaccharides could be an immunopotentiator *in vivo*.

Key words : *Pachymeniopsis elliptica*, anti-complementary activity, sulfated algal polysaccharide, sarcoma-180, anti-tumor activity

서 론

최근 해양생물의 생화학적 약리효과가 입증되고 있고 생리활성 물질을 이용한 제약화 등에 많은 관심과 연구가 집중되고 있다. 특히 동맥경화, 심근경색, 고혈압, 협심증, 뇌졸중 등의 성인병 예방에 대한 효과⁽¹⁾와 alginic acid의 노화억제 작용⁽²⁾, 중금속인 카드뮴의 장내 흡수 억제, 미역, 다시마, 파래 등의 항암효과^(3,4) 등이 보고되고 있다. 또한 김에서 추출한 porphyran⁽⁵⁾의 콜레스테롤 강하작용, 항균효과, 항암효과⁽⁶⁾, fucoidan

의 항응고 효과와 항암효과⁽⁷⁾, 참도박의 항응고 효과와 항산화 효과^(8,9) 등 다양한 생리적 기능이 밝혀지고 있다. 홍조류에서 발견되는 다당류는 porphyran⁽⁵⁾, carrageenan^(10,11) 등이 대표적이며 갈조류에서는 fucan sulfate⁽¹²⁾와 fucoidan⁽¹³⁾ 등의 생리효과가 보고되고 있다.

본 연구에서는 해조 다당류의 보체계에서의 활성과 sarcoma-180 고형암 모델에서의 저지효과를 비교하였다. 일반적으로 보체계는 체액성 인자에 속하며 B cell에서 생성되는 항체에 의한 혈액 내 반응으로 여기에 보체계 활성화의 고전경로(classical pathway)가 관여하며, 항원 침입시 항체와 달리 비특이적으로 활성화되어 포적세포의 분해, 대식세포와 림프구의 활성화, 항원에 흡착하여 탐식작용을 유도(opsonization)하여 이물질을 제거하는 중요한 역할을 담당한다⁽¹⁴⁾. 최근 천연 물질에서의 보체계 활성화 물질들에 대한 연구는 주

Corresponding author : Hong-Yon Cho, Graduate school of Biotechnology, Korea University, 5-1 Anam-dong, Sungbuk-gu, Seoul 136-701, Korea
Tel : 82-2-923-8731
Fax : 82-2-923-8733
E-mail : hycho@mail.korea.ac.kr

로 다당류로써 당귀(*Angelica acutiloba*)⁽¹⁵⁾의 pectic arabinogalactan, 시호(*Bupleurum falcatum*)⁽¹⁶⁾ 등이 있으며 이들은 항암효과(anti-tumor activity), 식세포 강화작용(phagocytes potentiating activity)⁽¹⁷⁾, 항염증 효과(anti-inflammatory activity)⁽¹⁸⁾ 등의 면역강화 및 조절효과들을 갖는 것으로 보고되어 있다. 그러나 해조류를 대상으로 하여 보체계 활성화 물질을 연구한 예는 미미한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 우리 나라 해안에서 자생하는 식용 홍조류로써 점질성이 강하여 효료와 떡에 이용되며 항산화 효과가 보고된 참도박의 열수 추출물로부터 보체계 활성화 다당류를 분리 정제하였고 보체계에서의 활성화와 항암효과에 대하여 연구하였다.

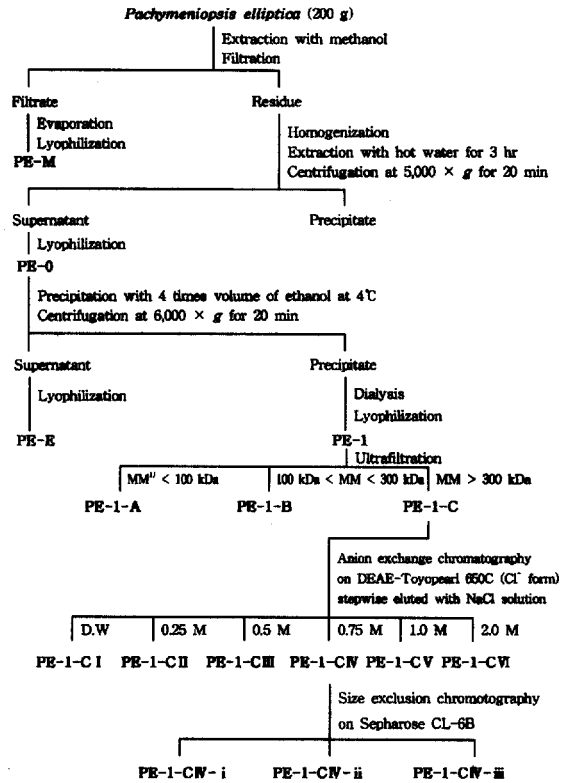
재료 및 방법

실험재료 및 시약

본 실험에 사용한 참도박은 강릉에서 직접 채취하였으며 탈염, 건조하여 사용하였다. 항보체 활성 측정 시약인 양의 감작적혈구(IgM hemolysin sensitized sheep erythrocyte, EA cell)는 일본 Bio test Co.로부터 구입하였고 정상 성인의 혈청(normal human serum, NHS)은 직접 혈액 채취 후 제조하였다. Resin으로 DEAE-Toyopearl 650C는 Tosoh Co.(Japan) 제품을, Sepharose CL-6B는 Pharmacia Co.(Sweden) 제품을 구입하여 사용하였다. 그 외의 시약은 일급 이상의 분석용 시약을 사용하였다.

일반 성분 분석

전당 함량은 α-D-glucose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid법⁽¹⁹⁾으로, 산성당 함량은 β-D-galacturonic acid를 표준물질로 하여 m-hydroxydiphenyl법⁽²⁰⁾으로, 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준물질로 사용하여 Lowry법⁽²¹⁾으로 정량하였고 황산기 함량은 K₂SO₄를 표준물질로 하여 Dodgson의 방법⁽²²⁾을 이용하여 측정하였다. 구성 다당류의 분석은 Jones 등의 방법⁽²³⁾에 따라 시료를 alditol acetate 유도체로 전환시킨 후 SP-2380(Supelco Co. Bellefonte, PA) column이 장착된 Yong Lin MD600(Yon Lin Co., Korea, FID detector) 기종을 사용하여 gas liquid chromatography를 실시하였다. Oven 온도는 230°C(10 min) → 250°C(2.5°C/min) → 250°C(10 min)으로 하였고 이동상은 N₂ gas(1.0 mL/min)를 이용하였다. 표준 다당류의 alditol acetate 유도체의 retention time과 비교하여 시료 중의 mol %를 각 peak의 면적비와 다당류의 alditol acetate 유도체의



¹⁾ molecular mass

Fig. 1. Extraction and purification scheme of anti-complementary polysaccharide from *Pachymeniopsis elliptica*.

분자량으로부터 계산하였다. 3,6-anhydrogalactose의 정량은 Yaphe 등의 방법⁽²⁴⁾에 준하여 분석하여 전체 구성당 mol %에 적용하였다.

항보체 활성 측정

항보체 활성은 Mayer법⁽²⁵⁾을 이용하여 시료에 의한 보체 활성화능을 대조군의 총보체용혈(50% total complement hemolysis, TCH₅₀(%))에 대한 시료의 용혈 저지율(inhibition of 50% total complement hemolysis, ITCH₅₀(%))로서 나타내었다.

보체계 활성화 다당류의 추출 및 정제

참도박으로부터 보체계 활성화 다당류의 추출 및 정제는 Fig. 1과 같이 염분을 제거한 참도박 100 g을 가열(100°C, 5 min)후 동결건조하여 마쇄한 후 분말을 적당량의 증류수에 넣어 Ultra-Turrax T50 homogenizer (7,000 rpm, 20 min, Janke and Kunkel IKA®-Labortechnik Co., German)로 추출한 후 추출물을 동

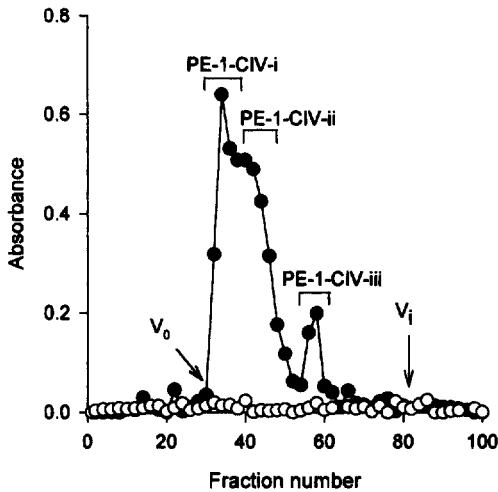


Fig. 2. Purification of anti-complementary polysaccharide from *Pachymeniopsis elliptica* by Sepharose CL-6B. The column (2.5×95 cm) was eluted with 25 mM citrate buffer (pH5.0). The flow rate of column was 0.2 mL/min and fraction of 4 mL was collected. ○: A_{280nm} , ●: A_{490nm} , V_0 : Void volume, V_i : Inner volume.

결건조하여 methanol(60°C, 1 hr, 4 회)로 색소를 제거하고 잔사에 4배 부피의 증류수를 가해 100°C에서 3 시간동안 추출하였다. 열수 추출물은 원심분리(5,000×g, 20 min)한 후 그 상등액을 농축하여 PE-0을 얻은 후 여기에 4배 부피의 ethanol을 가하여 침전시켰다. 침전물은 원심분리(6,000×g, 30 min)하여 증류수에 녹여 3 일간 투석한 다음 농축, 동결건조하여 조다당(PE-1)을 얻었다. 조다당(PE-1)을 증류수에 용해시킨 후 Masterflex와 prep/scale-tff(Millipore Co. Bedford, MA)를 이용하여 분자크기 100 kDa 이하의 물질(PE-1-A), 100 kDa에서 300 kDa의 물질(PE-1-B), 300 kDa 이상의 물질(PE-1-C)로 한외여과하여 분리하였다. 이들 중 우수한 항보체 활성을 보인 분자크기가 300 kDa 이상인 PE-1-C를 증류수에 용해한 다음 증류수로 평형화된 DEAE-Toyopearl 650C column(CI-form, 3.5×28.5 cm)에 흡착시킨 후 증류수 및 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.0 M NaCl 용액으로 차례로 용출시켜 6개의획분을 얻었다. DEAE-Toyopearl 650C에서 분리된 PE-1-CIV를 0.2 M NaCl로 평형화시킨 Sepharose CL-6B column(2.2×95 cm)에서 0.2 mL/min의 유속으로 4°C에서 size exclusion chromatography를 행하여 Fig. 2와 같이 3개의 획분(PE-1-CIV-i, PE-1-CIV-ii, PE-1-CIV-iii)으로 분리하였다. Gel filtration을 통해서 분리된 PE-1-CIV-ii는 Shodex OHPak KB-805(Waters Co., Milford, MA) column을 사용하여 HPLC를 행하여 정제도와 분자크

기를 확인하였다.

활성 본체의 규명

Yamada 등의 방법⁽²⁶⁾에 따라 조다당 PE-1-C을 pronase로 처리하여 단백질 부분을 소화시킨 pronase 소화물과 시료에 $NaIO_4$ 를 가하여 다당류 부분을 산화시킨 periodate 산화물을 각각 조제하여 항보체 활성을 측정하였다.

보체계 활성화 경로 측정

항보체 활성 다당류 PE-1-CIV-ii의 보체계 활성화 경로를 확인하기 위하여 Yamada 등의 방법⁽²⁶⁾에 따라 시료와 NHS, GVB²⁺를 혼합하여 37°C에서 30분간 1차 반응시키는 단계에서 GVB²⁺대신 Ca^{2+} 을 선택적 제거한 Mg^{2+} -EGTA-GVB²⁺와 Ca^{2+} 이온과 Mg^{2+} 이온을 모두 제거한 10 mM EDTA-GVB²⁺를 사용한 경우의 항보체 활성을 비교하였다.

Sarcoma-180 고형암 증식 저해

ICR계 mouse(♂, 5주령을 1주간 적응시킨 후) 40마리를 각 군당 8마리씩으로 하여 4 군으로 나누고 Lee 등⁽³⁾과 Cho 등⁽⁴⁾의 방법에 따라 Sarcoma-180 세포를 피하에 이식 후 대조군은 생리식염수를 10일간 복강에 투여하고 시료 처리군은 참도박 추출물(PE-1-A, PE-1-B, PE-1-C)를 30 mg/kg 농도로 생리식염수에 용해하여 동일하게 투여하였다. 중앙세포를 이식한 날로부터 26일 경과 후 고형암을 적출하여 대조군 대비 처리군의 증식저해 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

참도박으로부터 항보체 활성 물질의 추출 및 정제

참도박으로부터 항보체 활성 물질을 추출하고 정제한 결과 각 정제 과정에서의 항보체 활성은 Table 1과 같이 PE-0은 63.5%를 나타냈으며 이를 ethanol을 이용하여 침전한 결과 얻어진 조다당류(PE-1)는 67.0%의 활성을 나타내었다. 물질의 크기에 따른 항보체 활성을 조사하기 위하여 한외여과를 통하여 분리된 분자크기 100 kDa이하, 100 kDa에서 300 kDa, 300 kDa 이상의 3개 획분(PE-1-A, PE-1-B, PE-1-C)으로 분리하고 각각 1,000 μ g/mL의 농도에서 항보체 활성을 측정 한 결과 PE-1-A는 8.2%, PE-1-B는 28.5%, PE-1-C는 71%의 항보체 활성을 나타내어 분자량이 클수록 활성이 높게 나타나는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 항보체 활성이 분자량의 크기에 따라서 증가한다는

Table 1. Anti-complementary activities of fractions extracted from *Pachymeniopsis elliptica* by purification steps

Fraction	Anti-complementary activity ITCH ₅₀ (%) ¹⁾
Hot Water Extraction	
PE-1	67.0
Ultrafiltration	
PE-1-A	8.2
PE-1-B	28.5
PE-1-C	71.0
Anion exchange chromatography	
PE-1-CI	28.5
PE-1-CII	31.2
PE-1-CIII	53.0
PE-1-CIV	71.5
PE-1-CV	35.7
PE-1-CVI	32.1
Size exclusion chromatography	
PE-1-CIV-i	62.0
PE-1-CIV-ii	82.9
PE-1-CIV-iii	43.0

¹⁾All fractions were tested in triplicate at a concentration of 1000 µg/mL.

Kiyohara 등의 보고⁽¹⁵⁾와 일치함을 나타내었다. 한외여과에서 분리된 조단백 다당류 PE-1-C를 anion exchange chromatography를 실시하여 용출액의 NaCl 농도를 0~2.0 M의 농도로 단계적으로 높일 때 0.75 M NaCl 용출획분인 PE-1-CIV 획분이 71.5%로 가장 높은 항보체 활성을 나타내었다. Anion exchange chromatography에서 분리된 PE-1-CIV을 Sepharose CL-6B를 사용하여 size exclusion chromatography를 실시하여 PE-1-CIV-i, -ii, -iii의 3개의 획분을 얻었다. 이들 각 획분의 항보체 활성은 PE-1-CIV-ii(82.9%), PE-1-CIV-i(62%), PE-1-CIV-iii(43%) 순으로 나타났다.

가장 높은 활성을 보인 PE-1-CIV-ii 획분을 HPLC를 통하여 다당류의 동질성과 분자량을 확인한 결과 Fig. 3과 같이 단일 peak를 나타내어 정제 다당류가 상당히 높은 동질성을 가지고 있음을 알 수 있었고 분자 크기는 표준 dextran의 column 내에서의 체류시간과 비교하여 780 kDa를 나타내는 다당류로 확인되었다.

정제에 따른 화학조성의 변화

정제 과정에 따른 항보체 활성 획분의 화학적 조성을 확인한 결과(Table 1) 조다당류인 PE-1(Yield: 37.4%)은 전당 54.9%, 산성당 6.9%, 단백질 8.0%, 황산기 24.9%인 합황 다당류로 확인되었으며 한외여과에 의해서 분리한 PE-1-C(Yield: 80.8%)의 화학적 조성은 전당 55.3%, 산성당 5.4%, 단백질 6.0%, 황산기

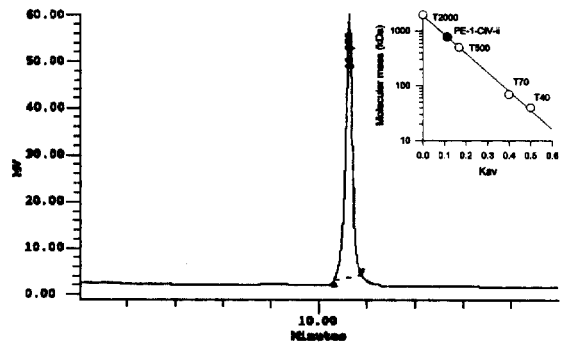


Fig. 3. HPLC profile of purified anti-complementary polysaccharide from *Pachymeniopsis elliptica*.

HPLC was performed by isocratic buffer system of 0.2 M NaCl at a flow rate of 0.5 mL/min. The molecular mass determination was performed by Sepharose CL-6B column (2.5×95 cm) at a flow rate of 0.2 mL/min. The standards were T2000 (2×10^6), T500 (5×10^5), T70 (7×10^4) and T40 (4×10^4). $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$, V_0 : Void volume, V_t : Total volume, V_e : Elution volume.

28.2%으로 구성되었고 이온교환 수지를 통해서 분리한 PE-1-CIV(Yield: 19.8%)은 전당 62.8%, 산성당 6.5%, 단백질 6.8%, 황산기가 30.1%인 합황 다당류로 구성되었다. Size exclusion chromatography를 통해서 정제한 정제다당류인 PE-1-CIV-ii(Yield: 56.7%)는 전당 72.4%, 산성당 8.3%, 단백질 6.6%, 황산기 30.5%를 함유하였다. 해조류의 경우 황산기의 함량이 높게 나타나는 특징⁽¹⁾을 보이는데 참도박으로부터 정제한 다당류의 경우에도 정제도가 증가됨에 따라서 전당의 함량이 높게 증가하였으며 또한 황산기 함량도 증가되는 결과를 나타내었다. 일반적으로 고전경로의 경우 항원항체 복합체의 형성에 의해서 개시되며 이때 calcium bridge가 형성되면 결합력이 증가된다⁽²⁷⁾. 참도박에서 분리된 다당류는 30.5%의 황산기를 가지고 있으며 pectin이 calcium과 결합하여 gel을 형성한다는 보고⁽²⁸⁾에서와 같이 황산기의 음전하와 calcium 양이온이 결합하여 보체반응을 촉진할 것으로 추정되었다. 한편, 정제에 따른 구성 단당류 함량의 변화는 3,6-anhydrogalactose의 경우 정제도의 증가에 따라 변화가 거의 없었으나 황산기가 치환되어져 발견되는 galactose의 함량은 한외여과에서 활성을 나타낸 PE-1-C의 경우 -A와 -B 획분에 비해서 높게 나타났으며 정제가 진행됨에 따라서 증가하였다. 참도박으로부터 정제된 해조 다당류의 구성당 조성을 분석한 결과, galactose(44.3%), 3,6-anhydrogalactose(34.0%), glucose(8.2%), fucose(5.4%), xylose(5.2%) 및 rhamnose(2.9%)를 함유한 것으로 나타났다.

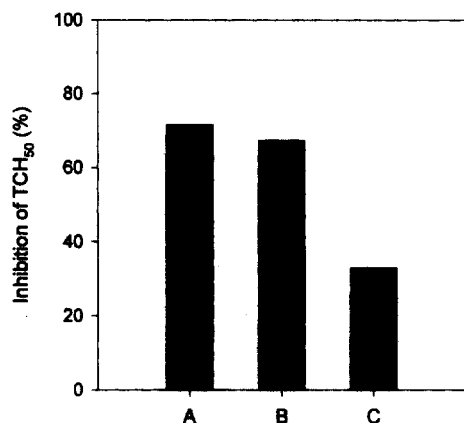


Fig. 4. Anti-complementary activity of crude polysaccharide from *Pachymeniopsis elliptica* treated by pronase digestion or periodate oxidation.

All samples were tested in triplicate at a concentration of 1.0 mg/mL. A: No treatment, B: Pronase digestion, C: Periodate oxidation.

항보체 활성의 본체

PE-1-C는 전당이 35.3%, 산성당이 6.9%, 단백질 함량이 8.0%으로 존재함으로 각 성분의 항보체 활성에 미치는 영향을 측정하기 위하여 pronase에 의한 가수분해와 periodate를 이용하여 다당류의 free hydroxyl기 사이의 탄소고리 산화에 의한 활성의 변화를 관찰하였다. PE-1-C는 periodate산화 상태에서 50.3%의 활성 감소를 나타냈으나 pronase 소화 상태에서는 4.2%의 활성 감소가 일어났다. 이러한 결과는 보체계 활성화

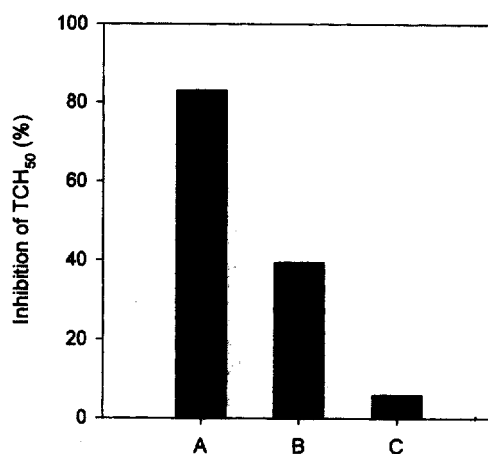


Fig. 5. Changes in anti-complementary activity of purified polysaccharide from *Pachymeniopsis elliptica* by metal ions in the pathway.

The activity via alternative complement pathway was tested with Mg²⁺-EGTA-GVB²⁺. A: GVB²⁺ (containing Ca²⁺ and Mg²⁺), B: Mg²⁺-EGTA-GVB²⁺ (Ca²⁺ free), C: EDTA-GVB²⁺ (metal ion free).

에 주로 관여하는 구성 성분이 다당류 부분임을 시사하였다(Fig 4).

보체계 활성화 경로

정제 다당류 PE-1-CIV-ii의 보체계 활성화 경로를 알아보기 위해서 GVB²⁺ buffer에서 Ca²⁺이온을 선택적으로 제거한 Mg²⁺-EGTA-GVB²⁺ buffer와 Ca²⁺이온과

Table 2. Chemical characterization of crude and purified anti-complementary polysaccharides from *Pachymeniopsis elliptica*

	PE-1	PE-1-A	PE-1-B	PE-1-C	PE-1-CIV	PE-1-CIV-ii
						% (w/w)
Total Sugar ¹⁾	54.9	50.7	55.4	55.3	62.8	72.4
Uronic acid ²⁾	6.9	10.6	10.6	5.4	6.5	8.3
Protein ³⁾	8.0	10.4	8.3	6.0	6.8	6.6
Sulfate ⁴⁾	24.9	26.5	22.7	28.2	30.1	30.5
Yield	37.4	4.8	13.7	80.8	19.8	56.7
Sugar composition						mol %
Rhamnose	5.8	6.9	2.9	3.1	2.0	2.9
Fucose	4.2	5.7	4.8	4.7	6.7	5.4
Arabinose	5.2	4.5	-	1.6	1.0	-
Xylose	7.6	4.8	1.5	4.7	3.7	5.2
Mannose	4.9	4.7	7.5	-	-	-
Galactose	35.7	31.9	30.9	51.4	42.5	44.3
3,6-Anhydro-galactose	31.4	36.0	38.1	30.9	38.7	34.0
Glucose	5.2	5.5	14.5	3.8	5.5	8.2

¹⁾α-D-Glucose as a standard.

²⁾β-D-Galacturonic acid as a standard.

³⁾Bovine serum albumin as a standard.

⁴⁾K₂SO₄ as a standard.

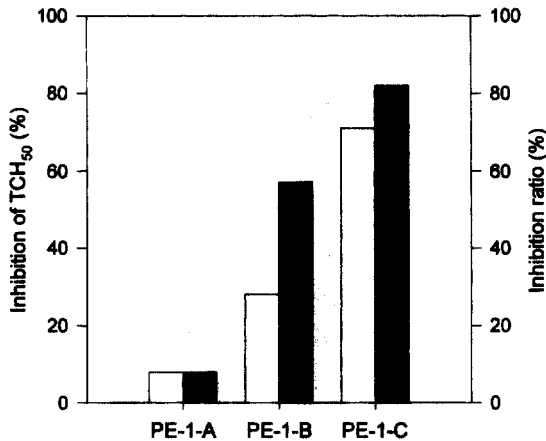


Fig. 6. Comparison of anti-complementary and anti-tumor activities of polysaccharide from *Pachymeniopsis elliptica*.

Anti-tumor activity was measured by Sarcoma-180 solid tumor model. PE-1 subfractions were dissolved in saline and injected into mice with 30 mg/kg/day (i.p.) for 10 days after tumor was transplanted. Anti-complementary activity was determined in triplicate at a concentration of 1.0 mg/mL. □: anti-complementary activity, ■: anti-tumor activity.

Mg²⁺이온을 모두 제거한 buffer에서 항보체 활성을 측정 한 결과(Fig. 5) PE-1-CIV-ii는 GVB²⁺ buffer에서 83%의 활성을 나타내었고 Mg²⁺-EGTA-GVB²⁺ buffer에서는 39.5%의 부경로 활성을 나타내었다. 이것은 부경로 활성화 물질들로 보고된 zymosan⁽²⁹⁾과 pachyman⁽³⁰⁾ 등과 비교하여볼 때 거의 비슷한 활성을 나타내는 것이었다. 이는 정제 다당류가 항원항체 반응에 의하지 않고도 직접 보체계를 활성화시킬 수 있음을 시사하였다.

항보체 활성 물질의 고형암 증식저해 효과

참도박 PE-1-A, PE-1-B, PE-1-C를 ICR mouse에 30 mg/kg의 농도로 복강 주사하여 Sarcoma-180 고형암 증식저해 효과를 측정 한 결과(Fig. 6) 각각 8%, 53%, 81%의 증식 저해를 나타내었다. 이러한 결과로부터 항보체 활성과 항암효과의 상관성을 유추할 수 있었다. 또한 이 결과는 50 mg/kg의 농도에서의 Lee 등⁽³⁾이 보고한 파래에서의 64.6%와 곰피의 43.0%와 Cho 등⁽⁴⁾이 보고한 청각의 49.2%, 김의 15.4% 보다 더욱 뚜렷한 고형암 증식 저지양상을 나타낸 것으로 보체계 활성화 다당류가 숙주 면역체계의 기능을 개선시켜 항암 작용을 하는 것⁽¹⁷⁾으로 추정된다. 이와 같이 참도박으로부터 분리된 함황 다당류가 항보체 활성과 항암효과를 나타낸 바 앞으로 정제된 함황 다당류의 항암효과와 항보체 활성을 나타내는 구조상의 특징에 대해

서 보다 깊은 연구가 이루어져야 할 것이다.

요 약

해조류 추출물을 대상으로 항보체 활성을 검색한 결과 우수한 활성을 나타낸 참도박을 열수 추출하여 활성물질을 정제하였다. 참도박 열수 추출물을 ethanol 침전을 통해 조다당류를 얻었다. 조다당류 PE-1을 한 의외과를 실시하여 분자량에 따라서 100 kDa 이하의 PE-1-A, 100에서 300 kDa 이하의 PE-1-B, 300 kDa 이상의 PE-1-C를 얻었으며 우수한 활성을 보인 PE-1-C(ITCH50(%): 71.5%)를 DEAE-Toyopearl 650C ion exchange column에서 분리하여 0.75 M NaCl(PE-1-CIV) 용출 획분을 이용하여 size exclusion chromatography를 실시하였다. Sepharose CL-6B 통해서 분리된 PE-1-CIV-ii (ITCH₅₀(%), 82.9%)는 분자크기가 780 kDa이었으며 HPLC상에서 동질성을 가진 다당류로 확인되었다. 또한 정제 다당류 PE-1-CIV-ii는 고전 경로 뿐만 아니라 보체 부경로 또한 활성화시켰으며 구성 단당류는 galactose(44.3%), 3,6-anhydrogalactose(34.0%), glucose(8.2%), fucose(5.4%), xylose(5.2%) 및 rhamnose(2.9%)이고 sulfate기가 30.5%인 함황 다당류로 확인되었다. periodate 산화물과 효소 소화물에 대한 활성측정에서 PE-1-C의 pronase 소화물은 활성 감소가 없었으나 periodate 산화물에서는 활성이 감소되는 다당류의 특징을 나타내었다. PE-1-A, B, C의 sarcoma-180 고형암 모델에서 항암효과는 항보체 활성과 유사한 경향을 나타내었고 분자량이 가장 큰 PE-1-C가 대조군에 비해서 81%의 증식저해를 나타내어 항보체 활성과 항암효과가 상관성을 가짐을 시사하였다.

감사의 글

본 연구는 1998년도 해양수산부 수산특정연구개발의 연구비 지원에 의한 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

문 헌

- Kim, D.S., Lee, D.S., Cho, D.M., Kim, H.R. and Pyeun, J.H. Trace components and functional saccharides in marine algae 2. dietary fiber contents and distribution of the algal polysaccharides. Bull. Korean Fish. Soc. 28(3): 270-278 (1995)
- Choi, J.H., Kim, I.S., Kim, J.I. and Yoon, T.H. Studies on anti-aging action of brown algae (*Undaria pinnatifida*) 2. dose effect of alginic acid as a modulator of

- anti-aging action in liver membranes. Bull. Korean Fish. Soc. 25(3): 181-188 (1992)
3. Lee, Y.S., Kim, D.S., Ryu, B.H. and Lee, S.H. Anti-tumor and immunomodulating effects of seaweeds toward sarcoma-180 cell. Korean J. Food Nutr. 21: 544-551 (1992)
 4. Cho, K.J., Lee, Y.S. and Ryu, B.H. Anti-tumor effect and immunological activity of seaweeds toward sarcoma-180. Bull. Korean Fish. Soc. 23(5): 345-352 (1990)
 5. Hong, S.P., Koo, J.K., Jo, K.S. and Kim, D.S. Physico-chemical characteristics of water or alcohol soluble extracts from laver, *Porphyra yezoensis*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 26(1): 10-16 (1997)
 6. Koo, J.G., Jo, K.S., Do, J.R., Park, J.H. and Yang, C.B. Chemical properties of fucoidans from *Hizikia fusiformis* and *Sargassum fulvellum*. Bull. Korean Fish. Soc. 28: 659-666 (1995)
 7. Nishino, T., Aizu, Y. and Nagumo, T. Antithrombin activity of a fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia Kurome*. Thromb. Res. 62: 765-773 (1991)
 8. Park, J.C. and Choi, J.W. Screening of marine natural products on inhibitory effect of the formation of lipid peroxidation. Korean J. Pharmacognosy 27(2): 117-122 (1996)
 9. Park, J.H., Kang, K.C., Baek, S.B., Lee, Y.H. and Rhee, K.S. Separation of antioxidant compounds from edible marine algae. Korean. J. Food Sci. Technol. 23(3): 256-261 (1991)
 10. Schwarz, H.J. and Kellenemyer, R.W. Carrageenan and delayed hypersensitivity II. Activation of HAGEMAN factor by carrageenan and its possible significance. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 132: 1021-1024 (1969)
 11. Pintauro, S.J. and Gilbert, S.W. The effects of carrageenan on drug-metabolizing enzyme system activities in the guinea-pig. Food Chem. Toxicol. 28(12): 807-811 (1990)
 12. Takashi, N. and Terukazu, N. The sulfate-content dependence of the anticoagulant activity of a fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. Carbohydr. Res. 214: 193-197 (1991)
 13. Koo, J.G., Chang, S.H., Kim, J.B. and Cho, K.S. Chemical characteristics of fucoidan extracted from the Korean brown seaweed. Food Sci. Indust. 30(3): 157-163 (1997)
 14. Egwang, T.G. and Befus, A.D. The role of complement in the induction and regulation of immune responses. Immunol. 15: 207-213 (1984)
 15. Kiyohara, H., Yamada, H., Cyong, J.C. and Otsuka, Y. Studies on polysaccharide from *Angelica acutiloba*. V. Molecular aggregation and anti-complementary activity of arabinogalactan from *Angelica acutiloba*. J. Pharmacobiol. Dyn. 9: 339-346 (1986)
 16. Yamada, H., Ra, K.S., Kiyohara, H., Cyong, J.C., Yang, H.C. and Otsuka, Y. Characterization of anti-complementary neutral polysaccharide from the roots of *Bupleurum falcatum*. Phytochem. 27: 3163-3168 (1988)
 17. Hamuro, J., Hadding, U. and Suermann, B. Solid Phase activation of alternative pathway of complement by β -1,3-glucans and its possible role for tumor regressing activity. Immunol. 34: 695-705 (1978)
 18. Ch. Latremouille, D., Genevaz, M.C., Hu, O., Schussler, N., Goussef, C., Mandet, P., Bruneval, N., Haefner-Cavaillon, A., Carpentier, D. and Glotz, D. Normal human immunoglobulins for intravenous use(IVIg) delay hyperacute xenograft rejection through F(ab')₂-mediated anti-complement activity. Clin. Exp. Immunol. 110: 122-126 (1997)
 19. Dubios, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal. Chem. 28: 350-356 (1956)
 20. Blumenkranz, N. and Asboe-hansen, G. New method for quantitative determination of uronic acid. Anal. Biochem. 54: 484-489 (1973)
 21. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275 (1951)
 22. Dodgson, K.S. and Price, R.G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. Biochem. J. 84: 106-110 (1962)
 23. Jones, T.M. and Albersheim, P.O. A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharide. Plant Physiol. 49: 926-936 (1972)
 24. Yaphe, W. and Arsenault, G.P. Improved resorcinol reagent for the determination of fructose and 3,6-anhydrogalactose in polysaccharides. Anal. Biochem. 13: 143-148 (1975)
 25. Kabat, E.A. and Mayer, M.M. Complement and complement fixation. p133, In Experimental Immunology, Charles C Thomas Publisher, Illinois, USA (1964)
 26. Kiyohara, H., Cyong J.C. and Yamada, H. Relationship between structure and activity of an anti-complementary arabinogalactan from the roots of *Angelica acutiloba* Kitagawa. Carbohydr. Res. 193: 193-200 (1989)
 27. van Oss C.J., Good R.J. and Chaudhury M.K. Nature of the antigen-antibody interaction. Primary and secondary bonds: optimal conditions for association and dissociation. J. Chromatogr. 376: 111-1199 (1986)
 28. Braccini I., Grasso R.P. and Perez S. Conformational and configurational features of acidic polysaccharides and their interactions with calcium ions: a molecular modeling investigation. Carbohydr. Res. 317(1-4): 119-130 (1999)
 29. Schenkein, H.A. and Ruddy, S. The role of immunoglobulins in alternative complement pathway activation by zymosan 1. Human IgG with specificity for zymosan enhances alternative pathway activation by zymosan. J. Immunol. 126(1): 7-15 (1981)
 30. Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y., Arai, Y. and Fukuok, F. Antitumor polysaccharide derived chemically from natural glucan(Pachyman). Nature 225: 7-12 (1970)