

Effect of *Porphyridium cruentum* polysaccharides on the activity of murine macrophage cell line RAW 264.7

Efecto de los polisacáridos de *Porphyridium cruentum* sobre la actividad de la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7

RT Abdala-Díaz¹, M Chabrillón², A Cabello-Pasini³, B López-Soler², FL Figueroa¹

¹ Department of Ecology, Faculty of Sciences, University of Málaga, 29071 Málaga, Spain.

² Centro Mediterráneo de Fotobiología, c/Prosper Merimeé 7, 29007 Málaga, Spain.

³ Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California, Km 107 Carretera Tijuana-Ensenada, Ensenada, 22860, Baja California, México. E-mail: acabello@uabc.edu.com

ABSTRACT. Red algae are considered an important source of polysaccharides with potential immunomodulatory properties. Polysaccharides from the cell wall of the red alga *Porphyridium cruentum* can compose more than 50% of its biomass; however, little is known regarding its biochemical composition and phage-modulatory properties. Consequently, this study aimed to evaluate the effect of *P. cruentum* polysaccharides on tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and nitric oxide (NO) production. Polysaccharides from *P. cruentum* were extracted and purified by N-cetylpyridinium bromide precipitation and characterized by Fourier transform infrared spectroscopy. The effect on the activity of murine macrophage cell line RAW 264.7 was examined by quantification of TNF- α , IL-6, and NO production using enzyme-linked immunosorbent assays. The results showed that the polysaccharides from *P. cruentum* induced TNF- α and IL-6 cytokine accumulation. The production of TNF- α was significantly higher than that in the control (bacterial lipopolysaccharide, LPS) when the concentration of polysaccharides was higher than 6.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The addition of polysaccharide levels above 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ produced IL-6 levels ranging from 3.4 to 4 ng mL⁻¹, which were comparable to the production of IL-6 induced by 50 ng mL⁻¹ of LPS (3.3 \pm 0.3). In contrast to IL-6 and TNF- α , NO production was only detected when polysaccharide concentrations were higher than 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. These results indicate for the first time that polysaccharides from *P. cruentum* are strong cytokine inducers.

Key words: red microalga, *Porphyridium cruentum*, immunomodulator, macrophages, FTIR spectroscopy.

RESUMEN. Las algas rojas se han considerado como una fuente importante de polisacáridos con propiedades inmunomodulatorias potenciales. Los polisacáridos de la pared celular del alga roja *Porphyridium cruentum* pueden componer más de 50% de su biomasa; sin embargo, poco se sabe sobre su composición bioquímica y sus propiedades inmunomoduladoras. Consecuentemente, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de los polisacáridos de *P. cruentum* sobre la producción del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), de interleucina-6 (IL-6) y de óxido nítrico (NO). Los polisacáridos de *P. cruentum* se extrajeron y purificaron mediante una precipitación con bromuro de N-cetilpiridinio, y se caracterizaron por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier. El efecto de la actividad de la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 fue examinada mediante una cuantificación de la producción de TNF- α , IL-6 y NO utilizando un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas. Los resultados mostraron que los polisacáridos de *P. cruentum* indujeron la acumulación de TNF- α e IL-6. La producción de TNF- α fue significativamente más alta que la observada en el control (lipopolisacárido bacteriano, LPS) cuando la concentración de polisacáridos fue mayor a 6.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. El añadir niveles de polisacáridos arriba de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ produjo niveles de IL-6 que fluctuaron entre 3.4 y 4 ng mL⁻¹, lo cual fue similar a la producción de IL-6 inducida con 50 ng mL⁻¹ de LPS (3.3 \pm 0.3). En contraste a IL-6 y TNF- α , la producción de NO sólo fue detectada cuando las concentraciones de polisacáridos fueron mayores que 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Estos resultados indican por primera vez que los polisacáridos de *P. cruentum* inducen activamente la producción de citoquinas.

Palabras clave: microalga roja, *Porphyridium cruentum*, inmunomodulador, macrófago, espectroscopía FTIR.

INTRODUCTION

The red unicellular microalga *Porphyridium cruentum* (Porphyridiaceae) is encapsulated within a sulfated polysaccharide cell wall. This microalga has been shown to have multiple applications in the biotechnological industry, such as for the production of arachidonic acid, pigments (phycoerythrin, phycocyanin), and extracellular polysaccharides (Pulz and Gross 2004). The cell-wall polysaccharides of *P. cruentum* (molecular mass 5–7 $\times 10^6$ Da) constitute up to

INTRODUCCIÓN

La microalga roja *Porphyridium cruentum* unicelular (Porphyridiaceae) está encapsulada por una pared celular con polisacáridos sulfatados. Esta microalga ha demostrado tener múltiples aplicaciones en la industria biotecnológica, tal como la producción de ácido araquidónico, pigmentos (ficoeritrina, ficoeritrina) y polisacáridos extracelulares (Pulz y Gross 2004). Los polisacáridos de la pared celular de *P. cruentum* (peso molecular 5–7 $\times 10^6$ Da) constituyen hasta el

50–70% of the algal dry matter. The characterization of these polysaccharides by size-exclusion chromatography and nuclear magnetic resonance (NMR) has revealed that the sugar moiety is composed of neutral monosaccharides. The cell-wall polysaccharides of *P. cruentum* are mainly composed of xylose (38%), glucose (24%), galactose (22%), and glucuronic acid (10%); however, arabinose, rhamnose, and mannose can also be found in minor concentrations (Geresh and Geresh 1991, Gloaguen *et al.* 2004, Geresh *et al.* 2009).

Algal cell-wall sugars have been shown to promote biochemical and physiological responses in a number of vertebrates. Polysaccharides from *P. cruentum*, for example, inhibit viral replication and are a potent hypocholesterolaemic agent in rats and chickens (Fábregas *et al.* 1999, Dvir *et al.* 2000, Ginzberg *et al.* 2000, Huheihel *et al.* 2002, Talyshinsky *et al.* 2002). In addition, these polysaccharides promote anti-oxidant activity suggesting a cell-protecting mechanism against reactive oxygen species (Tannin-Spitz *et al.* 2005). Furthermore, the *in vivo* administration of the exocellular polysaccharide of *P. cruentum* to mice has resulted in an increase of the macrophage population as well as in an increase of the acid phosphatase enzyme (Werner and Jolles 1996, Morris-Quevedo *et al.* 2000).

Polysaccharides isolated from algae have been reported to modify macrophage activity by inducing the production of cytokines and nitric oxide (NO) (Schepetkin and Quinn 2006). Macrophages represent an essential part of the natural anti-tumor defense system. Modulation of the macrophage function by polysaccharides can help increase phagocytosis, microbicidal activity, chemotaxis, and antigen presentation to T cells, thus helping in preventive and therapeutic strategies against diseases (Desai *et al.* 2007). Macrophage defense against pathogens includes cytokine secretions like interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and inflammation mediators such as NO. The release of TNF- α and the transforming growth factor- β (TGF- β) represent one aspect of macrophage anti-tumor action. The primary role of TNF- α is the regulation of immune cells, and it causes cell death by inflammation and viral replication; TNF- α is a cytokine involved in systemic inflammation and it is a member of the group of cytokines that stimulate the acute phase reaction. Similarly, IL-6 is a multifunctional cytokine that regulates several immune responses, including acute phase reactions, and participates as a mediator in the inflammatory response. Its production is induced by several factors including TNF- α , IL-1 β , and the bacterial endotoxin lipopolysaccharide (LPS) (Martínez *et al.* 1998). While some algal sugars have been shown to enhance cytokine synthesis, little is known about the immunomodulatory properties of polysaccharides obtained from *P. cruentum*.

The release of NO by macrophages is also known to be involved in anti-tumor defense. Recent evidence indicates that NO may interact with transformed, cell-derived superoxide anions and thereby generates the apoptosis inducer peroxynitrite. Nitric oxide is an endogenous free radical

50–70% de la materia seca del alga. La caracterización de estos polisacáridos mediante cromatografía de exclusión de tamaño y resonancia magnética nuclear (NMR) ha revelado que el grupo funcional de estos azúcares está compuesto por monosacáridos neutros. Los polisacáridos de la pared celular de *P. cruentum* están compuestos principalmente por xilosa (38%), glucosa (24%), galactosa (22%) y ácido glucurónico (10%); sin embargo, también pueden encontrarse la arabinosa, la ramnosa y la manosa en concentraciones menores (Geresh y Geresh 1991, Gloaguen *et al.* 2004, Geresh *et al.* 2009).

Se ha demostrado que los azúcares de la pared celular de las algas generan respuestas bioquímicas y fisiológicas en un gran número de vertebrados. Los polisacáridos de *P. cruentum*, por ejemplo, inhiben la replicación viral y son un potente agente hipocolesterómico en ratas y gallinas (Fábregas *et al.* 1999, Dvir *et al.* 2000, Ginzberg *et al.* 2000, Huheihel *et al.* 2002, Talyshinsky *et al.* 2002). Además, estos polisacáridos promueven la actividad antioxidante, lo que sugiere un mecanismo de protección celular contra especies reactivas de oxígeno (Tannin-Spitz *et al.* 2005). Aunado a lo anterior, la administración *in vivo* de polisacáridos exocelulares de *P. cruentum* a ratones ha resultado en un incremento de la población de macrófagos así como un incremento de la enzima ácido fosfatasa (Werner y Jolles 1996, Morris-Quevedo *et al.* 2000).

Se ha reportado que los polisacáridos aislados de algas tienen la capacidad de modificar la actividad de macrófagos al inducir la producción de citoquinas y óxido nítrico (NO) (Schepetkin y Quinn 2006). Los macrófagos representan una parte esencial del sistema natural de defensa antitumoral. La modulación de la función de los macrófagos puede ayudar a incrementar la fagocitosis, la actividad antimicrobiana, la quimiotaxis y la presentación antigénica a células T, por tanto sirve como estrategia preventiva y terapéutica contra algunas enfermedades (Desai *et al.* 2007). La defensa de macrófagos contra patógenos lleva en sí la secreción de citoquinas como la interleucina-6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y los mediadores antiinflamatorios como el NO. La liberación de TNF- α y el factor de transformación de crecimiento (TGF- β) representan un aspecto de la acción antitumoral de los macrófagos. La función primaria del TNF- α es la regulación de los leucocitos y causa la muerte celular por inflamación y replicación viral. El TNF- α es una citoquina involucrada en la inflamación sistémica y es un miembro del grupo de citoquinas que estimulan la fase de reacción aguda. De igual manera, la IL-6 es una citoquina multifuncional que regula diversas respuestas inmunes, incluyendo la fase de reacción aguda, y funciona como mediador en la respuesta inflamatoria. Su producción es inducida por varios factores incluyendo el TNF- α , la IL-1 β , así como la endotoxina bacteriana lipopolisacárido (LPS) (Martínez *et al.* 1998). Mientras que se ha demostrado que los azúcares de algas aumentan la síntesis de citoquinas, poco se sabe sobre las propiedades inmunomoduladoras de los polisacáridos de *P. cruentum*.

species that is produced from L-arginine by nitric oxide synthase (NOS), a family of ubiquitous enzymes (Fang *et al.* 2005). It conveys a variety of messages between cells, including signals for vasorelaxation, neurotransmission, and cytotoxicity. The activity of NOS is known to be induced by exposure of the cells to cytokines and bacterial products (Xie *et al.* 1992). Consequently, the objective of this study was to characterize the polysaccharides extracted from *P. cruentum* and to evaluate their effect on the production of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α , IL-6, and NO, in order to establish their potential role as immunomodulators.

MATERIAL AND METHODS

Polysaccharide extraction

Porphyridium cruentum cells were grown in batch cultures at 25°C in *Porphyridium* medium (Vonshak 1988), with a 12:12 L:D photoperiod (daylight fluorescent bulb) for 7 d. Cultures were inoculated at a cell density of 5×10^5 cells mL⁻¹ and the culture pH was maintained at 7.5. Once the cultures reached the stationary phase they were centrifuged (10,000 $\times g$ for 10 min) and the supernatant was used for polysaccharide extraction. The polysaccharides were extracted by selective precipitation with N-cetylpyridinium bromide (Cetavlon) 2% (w/v). The precipitated acidic polysaccharide was purified with 4 M NaCl, and the polysaccharide was flocculated again with ethanol (96%), centrifuged (10,000 $\times g$ for 10 min), dialyzed against 2 M NaCl, and finally lyophilized (Lyophilizer Cryodos, Telstar).

Stock solutions of polysaccharide (10 mg mL⁻¹) were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) and stored at -20°C. The stock solution was diluted in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) just before use. The final concentration of DMSO was less than 0.1% and had no effect on cell proliferation; DMSO at a concentration of 0.1% was used as control.

Fourier transform infrared spectroscopy

Fourier transform infrared (FTIR) spectra were obtained using self-supporting pressed discs of the mixture of *P. cruentum* polysaccharide and KBr (1% w/w), and pressing the mixture into a 16-mm-diameter mold with a hydrostatic pressure at a force of 15.0 t cm² for 2 min. The FTIR spectra were collected on a Thermo Nicolet Avatar 360 spectrometer (Thermo Electron Inc., San Jose, California) with a resolution of 4 cm⁻¹, a DTGS detector, and OMNIC 7.2 software (bandwidth 50 cm⁻¹, enhancement factor 2.6). Spectra were obtained in the 4000–400 cm⁻¹ region. Baseline adjustment was performed using the Thermo Nicolet OMNIC software to flatten the baseline on each spectrum. The OMNIC correlation algorithm was used to compare sample spectra with the spectral library (Thermo Fisher Scientific).

Se sabe también que la liberación de NO por macrófagos está relacionada con la defensa antitumoral. Existen evidencias recientes que indican que el NO puede interactuar con aniones superóxidos, producidos y transformados por las células, y, consecuentemente, generar el inductor de apoptosis, el peroxinitrito. El NO es un radical libre endógeno que se produce a partir de L-arginina por la óxido nítrico sintasa (NOS), una familia de enzimas ubicuas (Fang *et al.* 2005). El óxido nítrico sincroniza una variedad de mensajes entre células, incluyendo señales de vaso-relajación, neurotransmisión y citotoxicidad. Se sabe que la actividad de NOS es inducida por la exposición de las células a citoquinas y productos bacterianos (Xie *et al.* 1992). En consecuencia, el objetivo de este estudio fue caracterizar los polisacáridos extraídos de *P. cruentum* y evaluar su efecto sobre la producción de citoquinas, tales como el TNF- α , la IL-6 y el NO, para establecer su rol potencial como inmunomoduladores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de polisacáridos

Se cultivaron células de *P. cruentum* en un medio de *Porphyridium* (Vonshak 1988) a 25°C, con un fotoperiodo de 12:12 L:O por 7 d (tubo fluorescente). Los cultivos fueron inoculados a una densidad celular de 5×10^5 cél mL⁻¹ y el pH del cultivo se mantuvo a 7.5. Cuando los cultivos alcanzaron la fase estacionaria se centrifugaron (10,000 $\times g$, 10 min) y el sobrenadante se utilizó para la extracción de polisacáridos. Los polisacáridos se extrajeron mediante una precipitación selectiva con bromuro de N-cetilpiridinio (Cetavlon) 2% (w/v). El polisacárido ácido precipitado se purificó con 4 M NaCl, y posteriormente los polisacáridos se floccularon con etanol (96%), centrifugaron (10,000 $\times g$, 10 min), dializaron contra 2 M NaCl y finalmente se liofilizaron (Lyophilizer Cryodos, Telstar).

Se prepararon soluciones stock de polisacáridos (10 mg mL⁻¹) en dimetilsulfóxido (DMSO) y se almacenaron a -20°C. Justo antes de ser usada, la solución stock se diluyó en un medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). La concentración final de DMSO fue menor que 0.1% y no afectó la proliferación de células. Una solución de DMSO al 0.1% fue utilizada como control.

Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

Se obtuvieron espectros infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) utilizando discos prensados de la mezcla de polisacáridos y KBr (1% w/w), y generando discos de 16 mm de diámetro con una presión hidrostática de 15.0 t cm² por 2 min. Los espectros FTIR se determinaron con un espectrofotómetro infrarrojo (Thermo Nicolet Avatar 360, Thermo Electron Inc., San Jose, California, EUA) con una resolución de 4 cm⁻¹, un detector DTGS y el programa OMNIC 7.2 (ancho de banda 50 cm⁻¹, factor de enriquecimiento 2.6). Los

Macrophage cell culture

Murine macrophage cell line RAW 264.7 (ATCC, USA) was routinely cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 units mL⁻¹ penicillin sodium, 0.1 mg mL⁻¹ of streptomycin sulfate, and 0.25 µg mL⁻¹ of amphotericin B. Cells were maintained sub-confluent at 37°C in humidified air containing 5% CO₂. Cultured cells were harvested by gentle scraping. Cells were used when confluence had reached 75%.

Macrophage proliferation assay

RAW 264.7 cells (5×10^3 cells well⁻¹) were incubated with different polysaccharide concentrations (0–75 µg mL⁻¹) for 48 h at 37°C and 5% CO₂. Macrophage proliferation was estimated by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay. Briefly, a volume of 10 µL of the MTT solution (5 mg mL⁻¹ in phosphate-buffered saline, PBS) was added to each well and plates were incubated at 37°C for 4 h. The yellow tetrazolium salt of MTT is reduced by mitochondrial dehydrogenases in metabolically active cells to form insoluble purple formazan crystals, which are dissolved by the addition of acid-isopropanol (100 µL of 0.04N HCl in isopropanol). The absorbance at 550 nm was determined using a microplate reader (2001 Whittaker, Bioproducts) and the relative cell viability was expressed as the mean percentage of viable cells compared with untreated cells.

Determination of cytokines

RAW cells were cultured in the presence of different concentrations of polysaccharides (0–75 µg mL⁻¹) in a 24-well microtiter plate (5×10^5 cells well⁻¹) in a total volume of 1 mL. Bacterial LPS (50 ng mL⁻¹) was used as positive control for macrophage activation. The supernatant was collected after 48 h incubation and used to determine cytokine production following stimulation by the polysaccharides. The production of TNF-α and IL-6 was measured by sandwich enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) as described by Martínez *et al.* (1998). Briefly, a purified rat anti-mouse monoclonal TNF-α or IL-6 antibody (0.5 mg, BD Pharmingen) was used for coating at 2 µg mL⁻¹ at 4°C for 16 h. After washing and blocking with PBS containing 3% bovine serum albumin, culture supernatants were added to each well for 12 h at 4°C. Unbound material was washed off and a biotinylated monoclonal anti-mouse TNF-α or IL-6 antibody (0.5 mg, BD Pharmingen) was added at 2 µg mL⁻¹ for 2 h. Bound antibody was detected by addition of avidin peroxidase (Sigma) for 30 min followed by addition of the ABTS substrate solution. Absorbances at 405 nm were taken 10 min after the addition of the substrate. A standard curve was constructed using various dilutions of recombinant murine TNF-α or IL-6 in PBS containing 10% fetal calf

espectros se obtuvieron en la región 4000–400 cm⁻¹. El ajuste de línea base se generó utilizando el programa del espectrofotómetro (Thermo Nicolet OMNIC) para aplanar la línea base en cada espectro. El algoritmo de correlación del programa OMNIC se utilizó para comparar los espectros de las muestras contra los espectros de una biblioteca (Thermo Fisher Scientific).

Cultivo de células macrófagos

La línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 (ATCC, USA) se cultivó rutinariamente en un medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal de bovino, 2 mM L-glutamina, 100 unidades mL⁻¹ de penicilina sódica, 0.1 mg mL⁻¹ de estreptomina sulfatada y 0.25 µg mL⁻¹ de anfotericina B. Las células se cultivaron a 37°C con aire humedecido que contenía 5% CO₂. Las células cultivadas se cosecharon mediante un raspado ligero. Se utilizaron las células cuando la confluencia había alcanzado un 75%.

Ensayo de proliferación de macrófagos

Las células RAW 264.7 (5×10^3 cél celda⁻¹) se incubaron con diferentes concentraciones de polisacáridos (0–75 µg mL⁻¹) por 48 h a 37°C y 5% CO₂. La proliferación de macrófagos se estimó mediante el ensayo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolio). Después, se añadió un volumen de 10 µL de la solución MTT (5 mg mL⁻¹ en solución tampón fosfato salino, PBS) a cada celda y las placas fueron incubadas a 37°C por 4 h. La sal amarilla de tetrazolium es reducida por deshidrogenasas mitocondriales en células metabólicamente activas para formar cristales púrpuras insolubles, los cuales se disuelven mediante la adición de isopropanol acidificado (100 µL de 0.04N HCl en isopropanol). La absorbancia se determinó a 550 nm utilizando un lector de microplacas (2001 Whittaker, Bioproducts) y la viabilidad relativa de las células se expresó como el porcentaje medio de células viables comparado con células no tratadas.

Determinación de citoquinas

Las células RAW se cultivaron en presencia de diferentes concentraciones de polisacáridos (0–75 µg mL⁻¹) en microplacas de 24 celdas (5×10^5 cél celda⁻¹), en un volumen total de 1 mL. Se utilizó el LPS bacteriano (50 ng mL⁻¹) como un control positivo para la activación de los macrófagos. El sobrenadante se recolectó después de una incubación de 48 h y se utilizó para determinar la producción de citoquinas después de la estimulación por polisacáridos. La producción de TNF-α e IL-6 se determinó mediante un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) de acuerdo con el protocolo descrito por Martínez *et al.* (1998). Posteriormente, se utilizaron los anticuerpos purificados TNF-α o IL-6 monoclonales de rata antiratón (0.5 mg, BD Pharmingen)

serum (FCS). The amount of each cytokine in the culture supernatants was determined by extrapolation of absorbances to the standard curve.

Nitrite assay production

The accumulation of nitrite (NO_2) in cells treated with *Porphyridium* polysaccharides was used as an indicator of NO production in the medium. The cell-free supernatant (90 μL) was incubated with the same volume of Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylenediamine dihydrochloride, 0.5% H_3PO_4) at room temperature for 5 min, and the absorbance at 550 nm was determined in a microplate reader (2001 Whittacker, Bioproducts). After 48 h the concentration of NO_2 was determined by least squares linear regression analysis using NaNO_2 to generate a standard curve.

Statistical analysis

Data were presented as means \pm standard deviations (SD) of three experiments ($n = 3$). The statistical evaluation was performed using Student's *t*-test for paired samples, and differences at $P < 0.05$ were considered to be statistically significant.

RESULTS

FTIR spectroscopy

The FTIR spectroscopy of the polysaccharide obtained from *P. cruentum* cultures revealed the presence of several bands (fig. 1). Maximum absorbance was observed on a broad peak at approximately 3384 cm^{-1} . Strong bands were

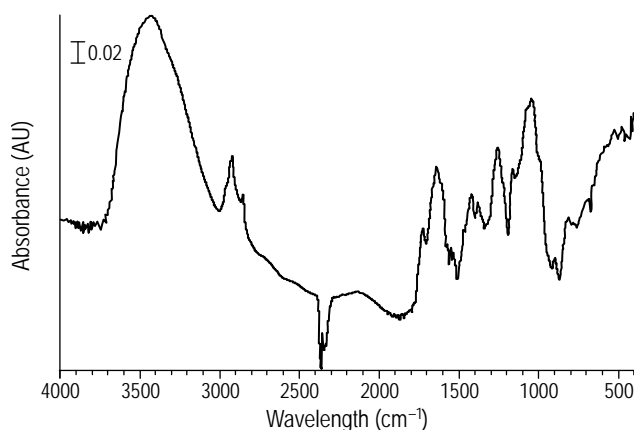


Figure 1. Infrared spectrum of the soluble polysaccharide fraction isolated from *Porphyridium cruentum*.

Figura 1. Espectro infrarrojo de la fracción soluble de polisacáridos aislados de *Porphyridium cruentum*.

para cubrir las celdas a una concentración de $2\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ a 4°C por 16 h. Después de lavar y bloquear con tampón fosfato salino (PBS) conteniendo 3% de albúmina de suero bovino, se añadieron los sobrenadantes de los cultivos a cada una de las celdas por 12 h a 4°C . El material no fijado se lavó y se añadieron los anticuerpos monoclonales biotinizados antiratón de TNF- α o IL-6 (0.5 mg, BD Pharmingen) a una concentración de $2\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ por 2 h. Los anticuerpos fijos se detectaron mediante la adición de avidina peroxidasa (Sigma) por 30 min y la adición posterior de una solución sustrato de ABTS. La absorbancia a 405 nm se monitoreó después de 10 min de la adición del sustrato. Se construyó una curva estándar usando varias diluciones de murina recombinante de TNF- α o IL-6 en PBS que contenían 10% (suero fetal de ternera) FCS. La cantidad de cada citoquina en los sobrenadantes de los cultivos se determinó por la extrapolación de las absorbancias a la curva estándar.

Ensayo de producción de nitrito

La acumulación de nitrito (NO_2) en las celdas tratadas con polisacáridos de *Porphyridium* se utilizó como un indicador de la producción de NO en el medio. El sobrenadante sin células (90 μL) fue incubado con el mismo volumen de reactivo de Griess (1% sulfanilamida, 0.1% diclorhidrato de naftilendiamina, 0.5% H_3PO_4) a temperatura ambiente por 5 min, y la absorbancia se determinó en un lector de microplacas (2001 Whittacker, Bioproducts) a 550 nm. La concentración de NO_2 se determinó a partir de una regresión lineal usando NaNO_2 para generar una curva estándar.

Análisis estadístico

Los datos se presentaron como promedios \pm desviación estándar (DE) de tres experimentos ($n = 3$). La evaluación estadística se realizó utilizando la prueba *t* de Student para muestras pareadas y la significancia estadística de las diferencias se consideró en $P < 0.05$.

RESULTADOS

Espectroscopía FTIR

La espectroscopía FTIR de los polisacáridos obtenidos de los cultivos de *P. cruentum* reveló la presencia de varias bandas (fig. 1). La máxima absorbancia se observó en un pico ancho a aproximadamente 3384 cm^{-1} . También se observaron bandas intensas a aproximadamente 2930, 2069, 1642, 1013–1153 y 1240 cm^{-1} .

Viabilidad celular

Los resultados del ensayo MTT indicaron que los polisacáridos obtenidos de *P. cruentum* no son tóxicos cuando los macrófagos están en contacto con ellos.

also observed at approximately 2930, 2069, 1642, 1013–1153 and 1240 cm^{-1} .

Cell viability

The results from the MTT assay indicated that the polysaccharides obtained from *P. cruentum* are non-toxic when the macrophages are in contact with them.

Cytokine and nitrite production

The synthesis and accumulation of cytokines increased as a response to increasing levels of *Porphyridium* polysaccharides (figs. 2, 3). There was a linear five-fold increase of TNF- α as polysaccharide concentrations increased from 0 to 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (fig. 2). The production of TNF- α was significantly higher than the control when the concentration of polysaccharides was higher than 6.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Similar to TNF- α , the levels of IL-6 increased linearly from 0 to ~ 3.5 ng mL^{-1} when polysaccharide concentrations increased from 0 to 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$; however, IL levels saturated when polysaccharide concentrations increased above 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (fig. 3). The treatment of RAW cells with LPS (50 ng mL^{-1}) caused a significant increase in the production of TNF- α , reaching a value of 23.6 ± 3.8 ng mL^{-1} . In contrast, the NO concentration increased significantly (75%, $P < 0.05$) when RAW cells were incubated with polysaccharide levels higher than 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (fig. 4); however, when LPS was added, the level of NO reached a value of 16.3 μM .

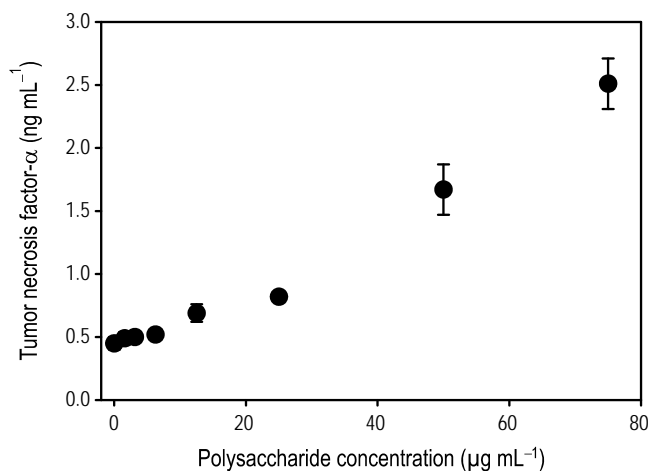


Figure 2. Concentration of tumor necrosis factor- α by RAW macrophages exposed to different concentrations of polysaccharides from *Porphyridium cruentum*. Data points represent the average of three samples \pm SD. Error bars not shown are smaller than symbol size.

Figura 2. Concentración del factor de necrosis tumoral- α sintetizada por los macrófagos RAW expuestos a diferentes concentraciones de polisacáridos de *Porphyridium cruentum*. Los símbolos representan el promedio de tres muestras \pm DE. Las barras de error no mostradas son más pequeñas que los símbolos.

Producción de citoquina y NO

La síntesis y acumulación de citoquinas se incrementó como una respuesta al incremento de los niveles de polisacáridos de *Porphyridium* (figs. 2, 3). Se observó un incremento lineal de cinco veces más de TNF- α a medida que la concentración de polisacáridos incrementó de 0 a 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (fig. 2). La producción de TNF- α fue significativamente más alta que la del control cuando la concentración de polisacáridos fue mayor que 6.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. De manera similar a la tendencia del TNF- α , los niveles de IL-6 se incrementaron linealmente de 0 a ~ 3.5 ng mL^{-1} cuando la concentración de polisacáridos se incrementó de 0 a 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$; sin embargo, los niveles de IL se saturaron cuando la concentración de polisacáridos se incrementó a niveles mayores que 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (fig. 3). El tratamiento de células RAW con LPS (50 ng mL^{-1}) causó un incremento significativo en la producción de TNF- α alcanzando valores de 23.6 ± 3.8 ng mL^{-1} . En contraste, la concentración de NO se incrementó significativamente (75%, $P < 0.05$) cuando las células RAW se incubaron con niveles de polisacáridos mayores que 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (fig. 4); sin embargo, cuando se añadió el LPS, el nivel de NO alcanzó 16.3 μM .

DISCUSIÓN

La espectroscopía FTIR reveló la presencia de grupos OH, C-H, C-O y S = O en los polisacáridos solubles de *P. cruentum*. El pico ancho e intenso a aproximadamente

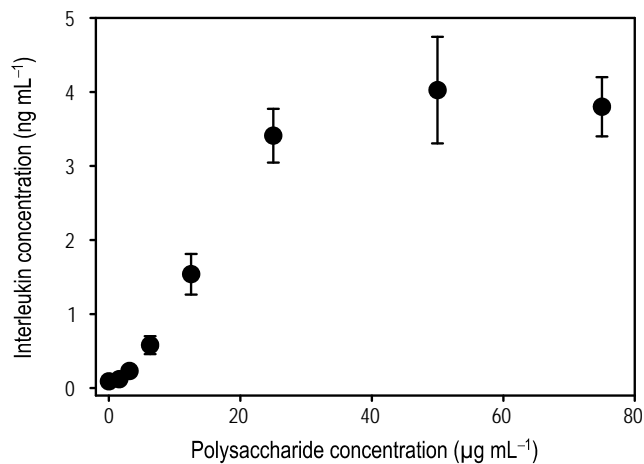


Figure 3. Production of interleukin-6 by RAW macrophages exposed to different concentrations of polysaccharides from *Porphyridium cruentum*. Data points represent the average of three samples \pm SD. Error bars not shown are smaller than symbol size.

Figura 3. Producción de interleucina-6 por los macrófagos RAW expuestos a diferentes concentraciones de polisacáridos de *Porphyridium cruentum*. Los símbolos representan el promedio de tres muestras \pm DE. Las barras de error no mostradas son más pequeñas que los símbolos.

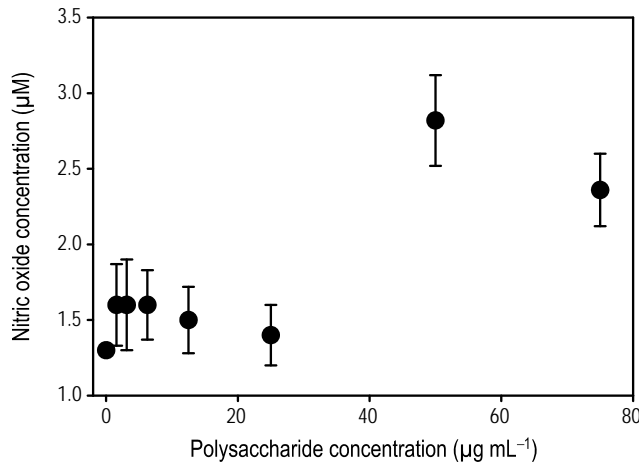


Figure 4. Production of nitric oxide by RAW macrophages exposed to different concentrations of polysaccharides of *Porphyridium cruentum*. Data points represent the average of three samples \pm SD. Error bars not shown are smaller than symbol size.

Figure 4. Producción de óxido nítrico por los macrófagos RAW expuestos a diferentes concentraciones de polisacáridos de *Porphyridium cruentum*. Los símbolos representan el promedio de tres muestras \pm DE. Las barras de error no mostradas son más pequeñas que los símbolos.

DISCUSSION

The FTIR spectroscopy revealed the presence of OH, C-H, C-O, and S = O groups in the soluble polysaccharides obtained from *P. cruentum*. The broad-stretching intense peak at around 3384 cm^{-1} is indicative of hydroxyl groups, while the weak stretching band at 2930 cm^{-1} is characteristic of C-H bonds in red seaweed polysaccharides (Pereira *et al.* 2009). The peak at 2069 cm^{-1} also indicated the presence of aliphatic C-H bonds in the polysaccharides analyzed. The peak at 1642 cm^{-1} and the peaks near 1013–1153 cm^{-1} suggested the presence of C-O groups. On the other hand, the peak of stronger intensity at 1240 cm^{-1} could be attributed to the S = O vibration of sulfate esters, which are associated with the spatial distribution of sulfated groups. Comparison of the spectrum obtained with data from the Thermo Fisher Scientific library, revealed that the polysaccharide from *P. cruentum* presented a 61.6% similarity to β -Escin, a polysaccharide found in seeds of *Aesculus hippocastanum*. This polysaccharide is a glycosidic triterpene compound derived from the aglycone protoaescigenin or barringtogenol C. This triterpene has shown satisfactory evidence of significant clinical activity in chronic venous insufficiency, hemorrhoids, and postoperative edema (Fu *et al.* 2005). The similarities between the polysaccharides from *P. cruentum* and β -Escin suggest that they could have similar modes of action. In addition, the polysaccharides analyzed presented similar peaks as those observed by Geresh *et al.* (2009). Our results demonstrate that the polysaccharide from *P. cruentum*

3384 cm^{-1} es indicativo de grupos hidroxilo, mientras que el pequeño pico a los 2930 cm^{-1} es más característico de enlaces C-H en polisacáridos de algas rojas (Pereira *et al.* 2009). El pico a 2069 cm^{-1} también indica la presencia de enlaces C-H alifáticos en los polisacáridos de *P. cruentum*. El pico a 1642 cm^{-1} y los picos cerca de 1013–1153 cm^{-1} sugieren la presencia de grupos C-O. Por otro lado, el pico de alta intensidad a los 1240 cm^{-1} puede ser atribuido a la vibración de los grupos de ésteres sulfatados (S = O), los cuales están asociados con la distribución espacial de los grupos sulfatados. La comparación de este espectro con los datos de la biblioteca de Thermo Fisher Scientific indicó que el polisacárido de *P. cruentum* tiene una similitud de 61.6% con el de β -Escin, un polisacárido que se encuentra en semillas de *Aesculus hippocastanum*. Este polisacárido es un compuesto terpeno glicosídico derivado de la aglicona protoescigenina o el barringtogenol C. Existe evidencia clínica exitosa de este terpeno en insuficiencia crónica venosa, hemorroides y edema postoperatorio (Fu *et al.* 2005). La similitud entre el polisacárido de *P. cruentum* y β -Escin sugiere que podrían tener modos de acción similares. Además, los polisacáridos de *P. cruentum* analizados en este estudio presentaron picos similares a los observados por Geresh *et al.* (2009). Los resultados del presente trabajo demuestran que el polisacárido de *P. cruentum* tiene características aniónicas (cargada negativamente) debido a la presencia de ácido D-glucorónico (GlcA) y de grupos de sulfatos semiésteres. Además, el polisacárido está constituido por carbohidrato en un 67%, ceniza 10%, ácido urónico 9% y 10% semiéster sulfato.

Este estudio demuestra que los polisacáridos solubles de *P. cruentum* estimularon la producción de ambos TNF- α e IL-6 en macrófagos de la línea celular RAW 264.7. Se ha reportado que los extractos de otras especies de algas incrementan la fagocidad y la actividad de secreción de los macrófagos (Schepetkin y Quinn 2006). Entre éstas, *Porphyra yezoensis* indujo la producción de nitrito y TNF- α *in vitro* e *in vivo* por macrófagos murinos (Yoshizawa *et al.* 1993). De manera similar, Yim *et al.* (1993) demostraron que el exopolisacárido p-KG03 que contiene altos niveles de sulfato, producido por la microalga *Gyrodinium impudicum* cepa KG03, incrementó la producción de citoquinas macrófagos, tales como IL-1 β y IL-6, así como TNF- α . En este estudio se ha demostrado que los polisacáridos de *P. cruentum* también inducen la liberación de citoquinas de una manera comparable en amplitud con la observada en el inductor de citoquinas LPS. Otros estudios también han demostrado que los polisacáridos de *P. cruentum* exhiben efectos antioxidantes y antiinflamatorios, además de una actividad antiproliferativa en varios linajes de células cancerígenas humanas (Bergé *et al.* 2002).

Los resultados del presente trabajo indican que el efecto de los polisacáridos solubles de *P. cruentum* sobre los macrófagos RAW puede deberse a las diferentes fracciones presentes en el extracto como fue revelado por la espectroscopía FTIR; sin embargo, se necesitan otros estudios para probar esta hipótesis.

has anionic characteristics (negatively charged) due to the presence of D-glucuronic acid (GlcA) and half-ester sulfate groups, and is made up of 67% carbohydrate, 10% ash, 9% uronic acid, and 10% half-ester bound sulfate.

This study shows that soluble polysaccharides from *P. cruentum* stimulated the production of both TNF- α and IL-6 in murine RAW 264.7 macrophages. It has been reported that extracts from other algal species enhance phagocytic and secretory activity of macrophages (Schepetkin and Quinn 2006). Among them, *Porphyra yezoensis* induced both *in vitro* and *in vivo* the production of nitrite and TNF- α by murine macrophages (Yoshizawa *et al.* 1993). Similarly, Yim *et al.* (1993) demonstrated that the high-sulfate-containing exopolysaccharide p-KG03 produced by the red-tide microalga *Gyrodinium impudicum* strain KG03 increased the production of macrophage cytokines, such as IL-1 β , IL-6, and TNF- α . Our results showed that polysaccharides from *P. cruentum* also induce cytokine release comparable in amplitude to that observed for the strong cytokine inducer LPS. Other studies have also demonstrated that polysaccharides from *P. cruentum* exhibited anti-oxidant and anti-inflammatory effects, as well as anti-proliferative activity in various human solid cancer cell lines (Bergé *et al.* 2002).

Our findings indicate that the effect of *P. cruentum* soluble polysaccharides on RAW macrophages may also be affected by the different fractions present in the extract, as revealed by the FTIR spectrum; however, further studies would be needed to demonstrate this fact.

It has been reported that the acid polysaccharides of the green seaweed *Ulva rigida* induce a more than two-fold increase in the expression of the following chemokines: chemokine (C motif) ligand 1, chemokine (C-X-C motif) ligand 12, chemokine (C-C motif) ligand 22, and chemokine (C-X-C motif) ligand 14 (CXCL14) (Leiro *et al.* 2007). In addition, they have been shown to increase expression of IL-6 signal transducer and IL-12 receptor beta 1. Furthermore, incubation of RAW macrophages with *U. rigida* polysaccharides also induced an increase in nitrite production, although this effect decreased considerably after desulfation of polysaccharides, suggesting that the sulfate group was important for macrophage activation. On the other hand, constituents of the red macroalgae *Gracillaria verrucosa* have been shown to inhibit the production of pro-inflammatory mediators (NO, IL-6, and TNF- α) (Dang *et al.* 2008).

High molecular weight polysaccharide preparations, isolated from food-grade microalgae, have been described as potent activators of human monocytes/macrophages (i.e., "Immulina" from *Spirulina platensis*, "Immunon" from *Aphanizomenon flos-aquae*, and "Immurella" from *Chlorella pyrenoidosa*; Pugh *et al.* 2001). These polysaccharides substantially increased mRNA levels of IL-1 β and TNF- α and they are between a hundred and thousand times more active for *in vitro* monocyte activation than polysaccharide preparations that are currently used clinically for cancer immunotherapy. According to our results, the increase in

Se ha informado que los polisacáridos ácidos del alga verde *Ulva rigida* inducen más de dos veces la expresión de las siguientes quimioquinas: quimioquina (motivo C) ligando 1, quimioquina (motivo C-X-C) ligando 12, quimioquina (motivo C-C) ligando 22 y quimioquina (motivo C-X-C) ligando 14 (CXCL14) (Leiro *et al.* 2007). Adicionalmente, se ha demostrado que los polisacáridos de *U. rigida* incrementan la expresión de la señal del transductor IL-6 e IL-12 receptor beta 1. Más aún, se ha demostrado que la incubación de macrófagos RAW con polisacáridos de *U. rigida* también inducen un incremento en la producción de nitrito; sin embargo, este efecto decreció considerablemente después de una desulfatación de los polisacáridos, lo que sugiere que el grupo sulfato es importante en la activación de macrófagos. Por otro lado, existen reportes sobre los constituyentes del alga roja *Gracillaria verrucosa* que indican que son inhibidores de la producción de mediadores proinflamatorios (NO, IL-6 y TNF- α) (Dang *et al.* 2008).

Las preparaciones de polisacáridos de alto peso molecular, aislados de microalgas de grado alimenticio, han sido descritas como potentes activadoras de macrófagos/monocitos humanos (i.e., "Immulina" de *Spirulina platensis*, "Immunon" de *Aphanizomenon flos-aquae* e "Immurella" de *Chlorella pyrenoidosa*; Pugh *et al.* 2001). Cada uno de estos polisacáridos incrementa sustancialmente los niveles del mRNA de IL-1 β y TNF- α y son entre cien y mil veces más activos para la activación *in vitro* de monocitos que las preparaciones de polisacáridos que son utilizados clínicamente en la actualidad para la inmunoterapia de cáncer. Según los resultados del presente trabajo, el incremento en las concentraciones de TNF- α , IL-6 y NO cuando las células RAW se incubaron con polisacáridos de *P. cruentum* sugiere que estos azúcares también podrían ser activadores de macrófagos.

Aunque hay una falta de conocimiento sobre los mecanismos moleculares involucrados en la activación de los macrófagos por medio de los polisacáridos de algas, se sugiere que la función inmune podría ser similar a la observada para estructuras de polisacáridos derivadas de plantas y hongos (Schepetkin y Quinn 2006). Más aún, su efecto sobre la inmunomodulación de macrófagos podría ser considerado para desarrollar productos farmacéuticos que se puedan aplicar cuando se requiera una activación de macrófagos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por el Ministerio de Industria, Turismo y Comercio (BIODERMALG PROFIT-010000-2006-122) y el Ministerio de Educación y Ciencia (BIFARO-AGL2005-02655) de España. Se agradece a RM Sánchez (Thermo Electron Fisher), MA Vargas y L Alemany su asistencia técnica en los análisis de espectroscopía FTIR y a N Varela su apoyo técnico.

TNF- α , IL-6, and NO concentrations when RAW cells were incubated with *P. cruentum* polysaccharides suggests that these sugars could also be macrophage activators.

Although there is a lack of knowledge regarding the molecular mechanisms involved in macrophage activation by algal polysaccharides, it can be suggested that the immune function of these compounds may be similar to that observed for plant and mushroom-derived polysaccharide structures (Schepetkin and Quinn 2006). Furthermore, their effects on macrophage immunomodulation could be considered to develop pharmaceutical products to be applied when macrophage activation would be required.

ACKNOWLEDGEMENTS

This paper was supported by grants from the Spanish Ministry of Industry, Tourism and Commerce (BIODER-MALG PROFIT-010000-2006-122) and Ministry of Education and Science (BIFARO-AGL2005-02655). We thank RM Sánchez (Thermo Electron Fisher), MA Vargas, and L Alemany for their technical assistance in the FTIR analysis, as well as N Varela for technical support.

REFERENCES

- Bergé JP, Debiton E, Durand P, Barthomeuf C. 2002. *In vitro* anti-inflammatory and anti-proliferative activity of sulfolipids from the red alga *Porphyridium cruentum*. *J. Agric. Food Chem.* 50: 6227–6232.
- Dang HT, Lee HJ, Yoo ES, Shinde PB, Lee YM, Hong J. 2008. Anti-inflammatory constituents of the red alga *Gracilaria verrucosa* and their synthetic analogues. *J. Nat. Prod.* 71: 232–240.
- Desai V, Ramkrishnan R, Chintalwar G, Sainis KB. 2007. G1-4A, an immunomodulatory polysaccharide from *Tinospora cordifolia*, modulates macrophage responses and protects mice against lipopolysaccharide induced endotoxic shock. *Int. Immunopharmacol.* 7: 1375–1386.
- Dvir I, Chayoth R, Sod-Moriah U, Shany S, Nyska A, Stark A. 2000. Soluble polysaccharide and biomass of red microalga *Porphyridium* sp. alter intestinal morphology and reduce serum cholesterol in rats. *Br. J. Nutr.* 84: 469–476.
- Fábregas J, García D, Fernández-Alonso M, Rocha AI, Gómez-Puertas P, Escribano JM. 1999. *In vitro* inhibition of the replication of haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) and African swine fever virus (ASFV) by extracts from marine microalgae. *Antiviral Res.* 44: 67–73.
- Fang SH, Koteswara-Raob Y, Tzengb YM. 2005. Inhibitory effects of flavonol glycosides from *Cinnamomum osmophloeum* on inflammatory mediators in LPS/IFN- γ -activated murine macrophages. *Bioorg. Med. Chem.* 13: 2381–2388.
- Fu F, Hou Y, Jiang W, Wang R, Liu K. 2005. Escin: Inhibiting inflammation and promoting gastrointestinal transit to attenuate formation of postoperative adhesions. *World J. Surg.* 29: 1614–1620.
- Geresh S, Geresh SM. 1991. The extracellular polysaccharides of the red microalgae: Chemistry and rheology. *Bioresource Technol.* 38: 195–201.
- Geresh S, Arad S, Levy-Ontman O, Zhang W, Tekoah Y, Glaser R. 2009. Isolation and characterization of poly- and oligosaccharides from the red microalga *Porphyridium* sp. *Carbohydr. Res.* 344: 343–349.
- Ginzberg A, Cohen M, Sod-Moriah U, Shany S, Rosenshtrauch A, Arad S. 2000. Chickens fed with biomass of the red microalga *Porphyridium* sp. have reduced blood cholesterol level and modified fatty acid composition in egg yolk. *J. Appl. Phycol.* 12: 325–330.
- Gloaguen V, Ruiz G, Morvan H, Mouradi-Givernaud ME, Krausz P, Strecker G. 2004. The extracellular polysaccharide of *Porphyridium* sp.: An NMR study of lithium-resistant oligosaccharidic fragments. *Carbohydr. Res.* 339: 97–103.
- Huheihel M, Ishanu V, Tal J, Arad S. 2002. Activity of *Porphyridium* sp. polysaccharide against herpes simplex viruses *in vitro* and *in vivo*. *J. Biochem. Biophys. Methods* 50: 189–200.
- Leiro JM, Castro R, Arranz JA, Lamas J. 2007. Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. *Int. Immunopharmacol.* 7: 879–888.
- Martínez C, Delgado M, Pozo D, Leceta J, Calvo JR, Ganea D, Gomariz RP. 1998. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide modulate endotoxin-induced IL-6 production by murine peritoneal macrophages. *J. Leukocyte Biol.* 63: 591–601.
- Morris-Quevedo HJ, Martínez-Manrique C, Abdala-Díaz R, Cobas-Pupo G. 2000. Evidencias preliminares de la actividad inmunomoduladora de la fracción polisacárida de origen marino PC-1. *Rev. Cubana Oncol.* 16: 171–176.
- Pereira L, Amado AM, Critchley AT, Velde F van de, Ribeiro-Claro PJA. 2009. Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman). *Food Hydrocolloids.* 23: 1903–1909.
- Pugh N, Ross SA, ElSohly HN, ElSohly MA, Pasco DS. 2001. Isolation of three high molecular weight polysaccharide preparations with potent immunostimulatory activity from *Spirulina platensis*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Planta Med.* 67: 737–742.
- Pulz O, Gross W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65: 635–648.
- Schepetkin I, Quinn M. 2006. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *Int. Immunopharmacol.* 6: 317–333.
- Talyshinsky M, Souprun Y, Huleihel M. 2002. Anti-viral activity of red microalgal polysaccharides against retroviruses. *Cancer Cell Int.* 2: 8–14.
- Tannin-Spitz T, Bergman M, Van-Moppes D, Grossman S, Arad S. 2005. Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp. *J. Appl. Phycol.* 17: 215–222.
- Vonshak A. 1988. *Porphyridium*. In: Borowitzka MA, Borowitzka L (eds.), *Microalgal Biotechnology*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 122–135.
- Werner G, Jolles P. 1996. Immunostimulating agents: What next? A review of their present and potential medical applications. *Eur. J. Biochem.* 242: 1–19.
- Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD. 1992. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 256: 225–228.
- Yim JH, Son E, Pyo S, Lee HK. 1993. Novel sulfated polysaccharide derived from red-tide microalga *Gyrodinium impudicum* strain KG03 with immunostimulating activity *in vivo*. *Mar. Biotechnol.* 7: 331–338.
- Yoshizawa Y, Enomoto A, Todoh H, Ametani A, Kaminogawa S. 1993. Activation of murine macrophages by polysaccharide fractions from marine algae (*Porphyra yezoensis*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57: 1862–1866.

Received March 2010;
accepted August 2010.