한국생물공학회지 제18권 제1호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 18, No. 1, 19-24(2003)

해수 미세조류인 *Chlorella capsulata*의 면역활성증진

이 현 수 · 이 서 호 · 문 형 철 · † 이 현 용
강원대학교 바이오산업공학부
(접수 : 2002. 11. 11., 게재승인 : 2003. 2. 20.)

Screening of the Immuno-stimulatory Activity of the Marine Alga *Chlorella capsulata*

Hyun Soo Lee, Seo Ho Lee, Hyung Chul Mun, and Hyeon Yong Lee†
School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea
(Received : 2002. 11. 11., Accepted : 2003. 2. 20.)

A purified substance was separated from marine alga, *Chlorella capsulata*. Immuno-stimulatory activity was measured by observing the growth of human immune T and B cells. The growth of human T and B cells was enhanced by up to about 1.4 times by adding the fraction from *C. capsulata*, compared with commercially available CGF extracts from the fresh water alga, *C. vulgaris*. The secretion of TNF-α and IL-6 was also enhanced up to about 1.5 times by adding the separated fraction. Adding 0.4 g/L of the extract increased the production of nitric oxide from macrophages by 1.6 fold. 50% of the AGS cell growth was inhibited by adding 0.4 g/L of the water extracted sample.

Key Words : *Chlorella capsulata*, human T and B cells, macrophage, immuno-stimulatory activity

서 론

*Chlorella*는 약 30억년 전에 지구상에 나타난 담수녹조류로 *Chloropyceae* 강 *Chlorococcum* 목 *Chlorella* 과에 속한다. 보통 직경이 2~10 μm인 구형 단세포 (single cell) 구조를 가지고 있으며, 세포분열능력이 매우 뛰어난 특성을 가지고 있다. 여러 종류의 *Chlorella* 중 *Chlorella ellipsoidea*, *C. pyrenoidosa* 및 *C. vulgaris*가 널리 알려져 있다. 조류는 여러 형태로 인간의 일상생활에 사용되어졌다. 그 이후 현대에 이르러서는 조류선발에서부터 대량배양을 통한 기능성식품으로서의 가능성을 부여받고 있다(1). 여러 연구에서 *Chlorella* 성분 중 sterol(2)과 glycoprotein(3), glycolipid(4)의 잠재적 항암효과가 제시되었는데, 발암 억제 작용 또는 중금속 해독 작용의 기전이 밝혀지면서 그 기능성이 명확해지고 있다. 또한, *Chlorella* 추출물의 섭취로 인해 화학적 치료시 부작용 감소와 면역체계강화 등 생체방어능력을 증가시키는 것을 확인하였고, 다이옥신과 카드늄 체외배출, 알레르기성 질환 치료, 고지혈증 방지, 혈압상승 및 심장마비 방지 등의 효과를 나타내는 것을 실험을 통해 확인할 수 있었다(5-11). 그밖에, *Chlorella*는 간의 대사 작용을 돕고, 철분 부족으로 인한 빈혈을 방지한다(12)는 것이 밝혀졌다.

이같이 현재 연구가 이루어진 대부분의 미세조류를 이용한 생리활성실험의 대상은 담수조류로 제한되어져 있다. 또한 해수 미세조류에 대한 연구에는 Cadmium(II)의 체외배출(13), sporochnols의 합성(14) 그리고 해수 *Chlorella*에 대한 배양시 최적화 연구(15) 등으로 이들을 이용한 생리활성과 관련한 연구는 거의 이루어지고 있지 않는 실정이다. 이에 본 연구에서는 아직 개발이 미진한 해수 미세 조류를 선발해 기능성 물질을 분리하여 생리활성실험을 수행하였으며, 생체조절 기능을 가진 기능성 식품소재로서 가능성을 검증하기 위해 가장 활용도가 높은 면역 활성을 측정하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양

본 실험에 사용한 균주는 *Chlorella capsulata*(LB 2074, UTEX, USA)로서 Artificial Seawater Medium(16)을 사용하여 배양하였으며, 배지의 조성은 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 24.4, KCl 6.0, $NaNO_3$ 10.0, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 3.0, KH_2PO_4 0.5, Tris buffer (Sigma Co. USA) 10.0, NH_4Cl 2.67, Vitamin B_{12} 15.0 x 10^{-6} g/100 ml

† Corresponding Author : School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea
Tel. +82-33-250-6455, Fax. +82-33-256-4819
E-mail: hyeonl@kangwon.ac.kr

등으로 구성되어 있으며 균주의 생육조건에 맞도록 조제되었다. 조제된 배지는 고압멸균기(한국기기 제작 HK-AC120, Korea)에서 121℃, 15분간 가압 살균하여 접종하였으며 pH는 10% HCl을 사용하여 8.08로 조정하였다. 본 배양에서 먼저 250 ml 삼각 플라스크에 배지와 균체의 농도가 0.03 g / 150 ml의 농도로 접종한 다음 27℃, 90 rpm, 7 Klux로 shaking incubator가 부착된 growth chamber(San Cheon Bio-tech, Korea)에서 7일간 배양하고, 이를 회분배양을 위해 8개의 flask에 분주하여 균체의 농도가 0.6 g/L일 때, 초 원심분리기를 이용하여 5,000 rpm으로 원심분리 후 균체를 모아 7 L Jar fermentor(Kobiotech, KF series, Korea)로 옮긴 다음, 균체가 포함한 배양액의 부피가 5 L가 되게 하여 27℃, 95 rpm, 7 Klux로 21일간 배양하였다.

활성 물질 분리

배양한 균체를 초 원심분리기를 이용하여 5,000 rpm으로 원심분리 후, 건조하여 그 건조된 분말을 물, 에탄올 그리고 물과 에탄올의 1 : 1 (v/v)의 혼합용매를 이용해 환류 냉각기가 부착된 추출기에서 100℃, 12시간씩 2회에 걸쳐 추출하였다. 추출 후 여과하였으며, 여과액은 농축 후 동결 건조하였다. 동결 건조된 분말을 PBS를 용매로 하여 분당 1 ml/min의 유속으로 Sephadex G-75 column을 이용해 분리하였으며, 분리된 물질은 UV spectrophotometer를 이용해 scanning하여 260 nm에서 최대 흡광도를 가지는 1개의 단일 peak를 가진 물질을 분리하였다. 대조구로 사용된 Chlorella Growth Factor (CGF; (주)대상 시판제품)로 *C. vulgaris*로부터 분리한 액상추출물을 건조한 powder형태를 실험에 사용하였다.

면역증진활성측정

면역 증강 효과는 인간 면역세포인 T cell(Jurkat)과 B cell(Raji)을 이용하여 검증하였다. 세포의 생육은 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640배지에서 5% CO_2, 37℃에서 배양하였으며, 면역 기능 증강효과는 24 well plate에 세포를 1.0×10^4 cells/ml의 농도로 접종한 후 0.45 μm의 filter로 여과되어진 시료들을 세포 접종 후 24시간 후 투여하였다. 그 후 24시간 후부터 매일 총 8일간 세포의 생육도와 cytokine 분비량을 측정하였다. 대조구와 비교하여 세포의 생육과 세포 수에 따른 cytokine 분비량을 비교하였다. 세포의 생육도는 hemacytometer로 측정하였고, 면역세포들이 배지 내에 분비하는 cytokine인 Tumor Necrosis Factor-α와 Interleukin-6의 양은 ELISA kit(Chemicon, USA)를 이용하여 측정하였다(17). 또한, 시료의 대식세포에 대한 NO^-생성능을 확인하기 위해 사용된 세포주는 J774.1 macrophage이며, 세포는 10% heat-inactivated bovine serum과 RPMI 1640 medium을 이용하여 24-well plate에 4.5×10^4 cells/well의 농도로 넣은 다음, 시료를 첨가하거나 첨가하지 않고 5% CO_2 incubator안에서 37℃에서 48시간 동안 배양하여 실험에 사용하였다. Macrophage에서 발생되는 nitric oxide의 양은 활성화된 대식세포 배양액에 축적되어 있는 nitrite의 양을 microplate assay(18)를 이용하여 정량함으로써 측정하였다. 먼저 시료를 처리하고 48시간 동안 세포를 배양하고 상등액 50 μℓ를 취하여 동일부피의 Griess 시약(1% sulfanilamide/0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride/2.5% H_3PO_4)을 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 ELISA reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 540nm의 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 표준물질로는 sodium nitrite를 사용하였으며 농도는 32 μM에서부터 0.25 μM까지 RPMI 1640 medium으로 2배씩 희석하여 얻은 표준곡선과 비교하여 계산하였다. NO^- 생성능의 양성대조구 물질로는 Lipopolysaccharides(LPS)를 사용하였다.

암세포의 성장저해 및 독성실험

본 실험에 사용된 암세포주는 인간 유래의 유방암세포(MCF7), 위암세포(AGS)를 정상세포로는 인간 폐세포(HEL 299)를 이용하였다. 세포배양에 사용된 기본배지는 MCF7는 DMEM F12(Gibco, USA)를 AGS와 HEL 299는 RPMI1640 (Gibco, USA)를 사용하여 FBS(Gibco, USA) 10%를 첨가하여 배양하였다. 실험에 사용된 세포의 초기농도는 4×10^4 cells/ml의 농도로 조절하여 96 well plate에 900 μℓ/well 씩 접종하여 사용하였다. 암세포의 생육저해와 정상세포의 세포독성은 SRB법을 이용하였다. 세포의 선택적 사멸도를 나타내는 selectivity의 측정은 각 암세포주의 생육억제 활성을 측정한 후 각 농도에서 세포독성에 대한 암세포 생육 억제 활성의 비로 계산하였다(19).

결과 및 고찰

균주의 배양

먼저, 본 실험은 *C. capsulata*의 배양최적화 조건을 찾기보다는 소규모배양을 통해 활성물질을 분리하여 기능성을 탐색하려는 것이 목적이었다. 그래서 대량배양을 위한 continuous culture를 실시하지 않았다. Fig. 1은 *C. capsulata*에 대한 batch culture와 fed-batch culture를 행하여 균체생육도를 검토한 결과이다. 먼저 batch culture(A)에서 균주는 접종 2일 후에 대수 증식기에 들어갔으며, 접종 후 7일째 0.6 g/L로 최대 균체량을 나타내었다. pH의 변화는 8.08에서 시작하여 서서히 증가하다가 최대 균체량을 보인 6일 이후 pH가 9에서 변화가 없었으나 사멸기에 들어가서, Lee(20)의 결과와 비슷한 경향을 보였다. 이는 배양액내의 영양분의 고갈보다는 균체량의 농축에 의한 광원의 self-shading 및 생육 분비물의 독성성분에 의한 사멸과 광합성에 의한 산소 분압의 상승으로 추정되었으나, Casadevall 등(21)은 이 단계에서는 배지 내의 점도가 증가함으로서 세포의 성장속도가 감소한다고 보고하였다. 따라서 이 균주의 고농도 배양을 위하여 유가식 배양을 실시하는 것이 바람직하다가 판단하였다. 유가식 배양(B)에서 초기 접종 후 7일과 14일째에 각각 batch culture를 실시한 균체를 신선한 배지와 함께 각각 1 L를 첨가하였다. 그 결과 접종 후, 초기에는 균체 생육이 미미한 감소를 보였지만 접종 후 2일째 증식속도가 서서히 증가하는 것을 확인할 수가 있었다. 최대 균체량이 1.2 g/L인 16일 이후 서서히 균체가 사멸하는 것으로 판단하여 배양 20일째 균체농도가 1.22 g/L에서 균체를 모아 5,000 rpm에서 원심분리 후, 건조한 균체를 추출하여 실험에 사용하였다.

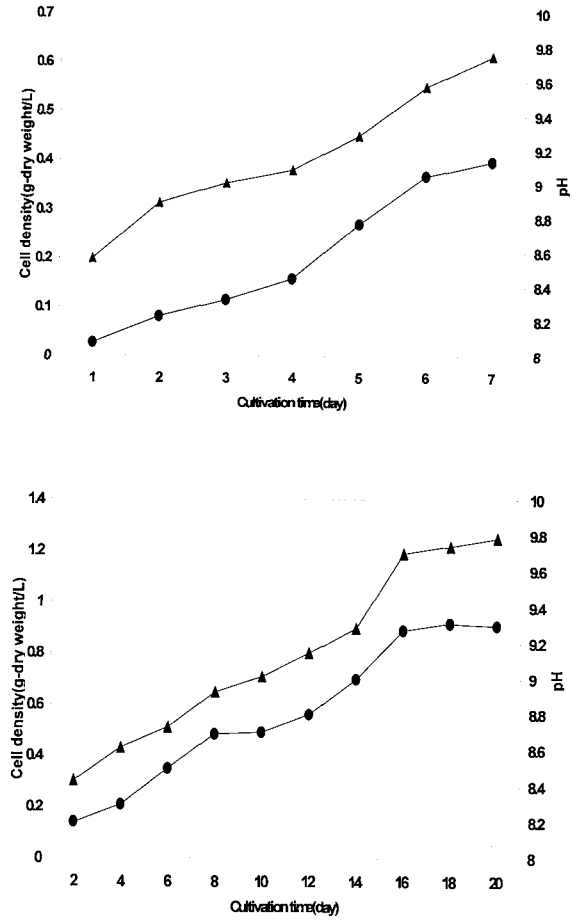

Figure 1. Kinetics of growing *C. capsulata* in a flask (A) and a fermentor (B) at 7 Klux of continuous light intensity.
▲ Cell density(g-dry wet/L) ● pH

배양된 균체로부터 물질분리

*Chlorella capsulata*로부터 기능성 물질의 분리를 위해 물 추출물의 동결 건조된 분말을 이용해 Sephadex G-75 (Pharmacia, USA) column을 통과시켜 얻은 물질을 모아 UV scannig을 실시하였다. 그 결과 column을 통해 1개의 물질을 얻었는데(Fig. 2), 이의 최대 흡광도를 확인하기 위해 UV spectrophotometer를 이용하여 190-600 nm까지 scanning(Fig. 3)을 하였고, 그 결과 260 nm에서 단일 최대 흡광도를 나타내었다. 이는 대부분의 아미노기를 포함한 단백질의 최대 흡광도와 같은 파장대에서 형성되는 것을 보아 분리된 단일의 물질이 단백질임을 간접적으로 증명해주고 있다.

면역활성증진 기능 측정

각 추출물과 분획물을 가지고 대조구인 CGF와 함께 총 8일간 인간 T 세포와 B 세포의 생육도(data not shown)와 cytokine 분비량(Table 1)을 확인하였다. 우선 T 세포의 생육도는 시료 투여 후 전체적으로 6일을 최고점으로 증가하다가 그 이후 감소하는 것을 알 수가 있다. 그 중 가장 높은 활성을 나타낸 분획물의 경우 6일에 1.25×10^5 cells/ml으로 대조구인 CGF가 1.0×10^5 cells/ml보다 대략 20%정도 T세포의 생육을 더 증가시키는 것으로 나타났다. Table 1은 T세포와 B

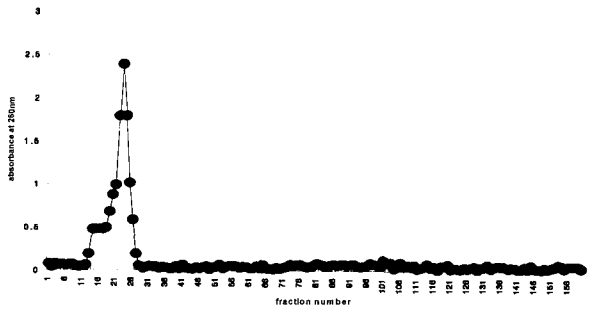

Figure 2. Hot water extract from C. *capsulata* were applied to Sephadex G-75 column equilibarated in 0.083 m/L PBS. Elution was carried out at a constant flow rate of 1 ml/min.

세포의 시료 첨가에 따른 cytokine 분비량 측정실험결과이다. 우선 T 세포의 TNF-α 의 분비량은 분획물이 177 pg/ml/day로 무첨가군과 대조군인 CGF의 각각 100, 135 pg/ml/day보다 높은 분비량을 보여주었다. 그리고 가장 낮은 분비량을 보여준 것은 에탄올추출물로서 146 pg/ml/day으로 나타났다. IL-6분비량은 대조군인 CGF가 96 pg/ml/day로 다른 시료에 비해 50-80% 정도 높은 분비량을 보였다. 또한 여기서도 가장 낮은 분비량을 보인 것은 에탄올 추출물로서 실제로 실험 시작 후 4일째부터 세포 사멸에 들어가 유기용매 추출물의 독성으로 인한 사멸로 생각되었다. B 세포의 cytokine 분비량의 경우에는 분획물이 TNF-α에서, 물추출물은 IL-6분비량이 각각 157, 59 pg/ml/day로 다른 시료들에 비해 높은 분비량을 나타내었다. B세포의 cytokine 분비능 측정 실험에서는 50% 에탄올 추출물이 가장 낮은 분비능을 보였다. 모든 cytokine 분비능에서 우수할 것으로 기대했던 분획물의 실험결과 T 세포의 IL-6 분비능에서는 대조구인 CGF가 높게 나타나 T 세포의 IL-6 분비능은 대조군이 좀 더 특이적으로 분비능을 증가시키는 것을 확인하였다. 이로서 T세포와 B세포의 TNF-α 분비능 측정 실험에서 분획물이 다른 시료들에 비해 대체적으로 높은 분비능을 보여주었다. 이는 Nirmal(22) 등이 발표한 *C. pyrenoidosa*로부터 분리한 100 KDa의 다당류가 면역자극활성실험에서 TNF-α의 분비능을 촉진시키는 것과 같은 결과를 보여주고 있다. 본 연구에서는 그보다 낮은 약 45 KDa(data not shown)에서 분리된 분획물이 TNF-α의 분비능을 촉진시키는 것을 볼 때 이전에 발표된 물질과는 해양 미세조류에 들어있는 다른 특정한 물질에 의한 면역세포에 대한 높은 활성이 확인된 것이다. 앞으로 이에 대한 심층적인 연구가 선행되어져야 한다고 생각된다. 이를 통해 분획물의 체내 면역 체계의 강화를 통해 외부 항원에 대한 강한 면역력을 증가시킨다는 것을 증명하여 주었으며, 이후 실시된 항암 실험에서도 높은 항암성을 보여주었다.

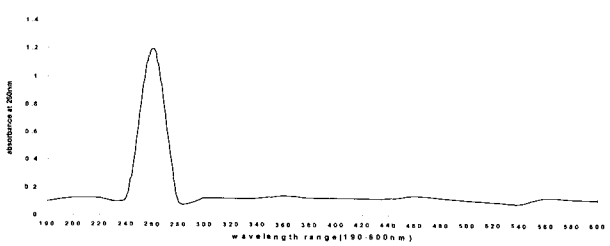

Figure 3. Scanning of Wavelength for the *C. capsulata*.

반응 질소 대사산물은 소위 흡입폭발이라고 불리는 산소대사에 의하여 L-arginine이 L-citrulline으로 전환되면서 nitric synthetase에 의해서 생성되는 무기물질의 하나로 NO_2, NO_3 등이 있고 이들은 대식세포, 비만세포, 호중구 및 내피세포 등에서 분비된다. 대식세포에서 유래하는 반응 질소는 매우 정교한 면역기능의 조절 하에서 생성되는 물질로서 특히 체세포 특유의 효소 생성을 매개하며 이물질의 침입 또는 종양의 발생시, 항종양 면역과 항 미생물 퇴치작용을 나타내어 생체방어 기전에 매우 중요한 조절자로서 역할을 한다(18). 본 실험 결과는 대식세포를 이용하여 NO^-생성능을 확인한 결과인데, 결과에서도 보여지듯이 LPS와 시료를 대식세포주인 J774.1 세포주에 처리하여 이틀 간 배양한 후 배양액 중에 NO^-농도를 측정한 결과, 아무처리도 하지 않은 대조군과 비교했을 때 각 시료의 NO^-생산량에는 큰 변화를 관찰할 수가 없었으나, 분획물의 단독투여에서는 18.5 μM로서 다른 시료들의 생산량인 10~12 μM보다 높은 생성능을 보여 주었다. LPS를 함께 투여한 NO^- 생성능 측정에서도 역시 다른 시료의 12~15 μM보다 많은 21.5 μM로서 보다 많은 NO^-의 생성능을 보여주었다. 그리고 LPS 단독 투여 시에는 시료의 단독 투여시보다는 생성능이 떨어지는 것으로 보아 시료의 NO^- 생성능이 LPS 의 단독 투여보다 NO^- 생성능보다 높은 것을 볼 수가 있었다(Fig. 4).

Table 1. Comparison of the secretion of cytokines from human T and B cells in adding the extracts from *Chlorella capsulata* and CGF

Cell line	Cytokines	No addition	Water extracts	50% Ethanol extracts	Ethanol extracts	Purified substance	CGF
T cell	TNF-α	100*	155	157	146	177	135
	IL-6	47	59	59	55	67	96
B cell	TNF-α	100	157	135	141	157	124
	IL-6	26	59	38	43	41	47

* pg/ml/day

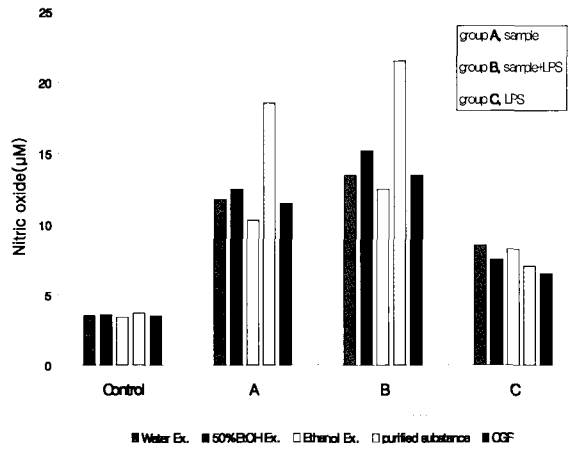

Figure 4. Stimulation of nitric oxide production by crude extracts, purified substance from water extracts and CGF on J 774.1 cell lines.

Fig. 5은 인간 정상 폐 세포인 HEL 299에 대한 세포독성 효과를 나타낸 것이다. 이 실험은 앞서의 면역활성 측정실험에서 나타난 시료의 면역 활성능에 대해 실제로 정상세포나 암세포에 시료를 투여하였을 때 각각의 세포들에게 있어서 어떠한 영향을 끼치는가에 대해 알아본 실험이다. 대부분의 시료에서 농도 의존적으로 정상세포에 대한 독성이 증가하는 것을 확인하였고, 각각 10~25%의 세포독성을 나타내었다.

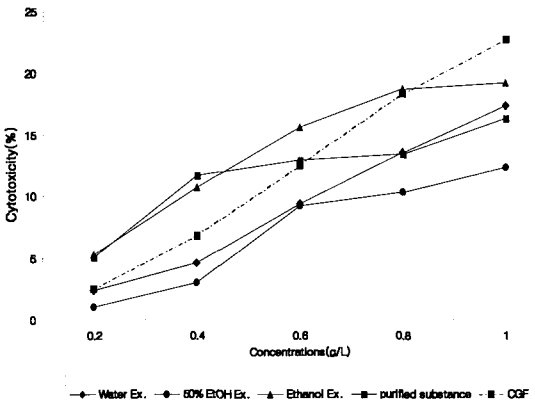

Figure 5. Cytotoxicity of the crude extracts and purified substance from *C. capsulata* on nomal cell lines(HEL 299).

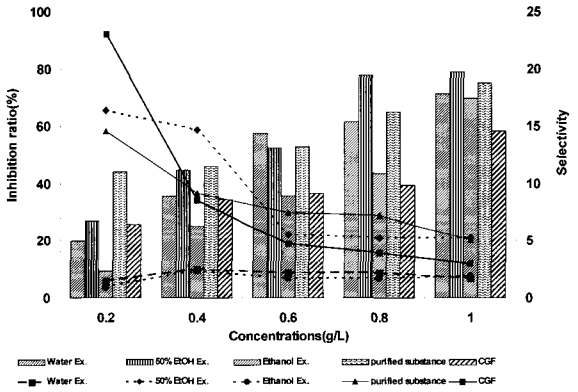

Figure 6. Inhibition ratio of growth of AGS(bar charts, %) and selectivity(lines) in adding the crude extracts from *C. capsulata* and CGF.

Fig. 6은 인간 위암세포인 AGS의 생육 저해능을 나타낸 것이다. 모든 시료에서 농도 의존적으로 생육 저해능이 증가하는 것을 볼 수 있으며, 저농도인 0.2~0.4 g/L의 농도에서는 분획물의 저해율이 40%로 다른 시료에 비해 높은 활성을 보여주었으며, 고농도로 갈수록 50% 에탄올 추출물이 다른 시료에 비해 높게 나타나 80% 정도의 저해율을 나타내었다. 가장 낮은 저해율을 보인 것은 에탄올 추출물로서 1.0 g/L의 농도에서 70%의 저해율을 보인 것을 제외하고 0.2~0.8 g/L의 농도에 걸쳐 낮은 10~40%의 낮은 저해율을 보여주었다. Selectivity의 경우에는 0.6 g/L의 농도에서 CGF가 8이상으로 다른 시료들에 비해 높은 선택적 사멸도를 나타내었다. 대체적으로 CGF가 높은 선택적 사멸도를 보였으며 물추출물과 에탄올 추출물의 경우에는 2~3 정도의 선택적 사멸도를 보임으로서 다른 시료들에 비해 낮은 선택적 사멸도를 보인 것을 볼 수가 있다.

인간 유방암세포인 MCF7의 암세포에 대한 저해능(Fig. 7)에서는 물 추출물이 0.2~1.0 g/L의 모든 농도범위에서 다른 시료들에 비해 높은 약 70~95%로 높은 활성을 나타냈으며, 에탄올추출물과 분획물의 저해율이 높은 것으로 나타났다. 대조구로 사용된 CGF의 경우에는 0.2~1.0 g/L의 모든 농도에 걸쳐서 10~60% 내외의 저해율을 보임으로서 가장 낮은 저해율을 나타내었다. selectivity는 분획물이 0.2 g/L의 농도에서 15로 가장 좋은 선택도를 나타냈고 농도 의존적으로 선택적 사멸도가 감소하는 것을 확인하였다. *C. capsulata*로부터 분리한 추출물과 그 중 물 추출물로부터 분리한 분획물의 항암 활성을 확인한 결과 위암 세포에 대해서는 50% 에탄올 추출물과 분획물이, 유방암 세포의 경우에는 물 추출물과 역시 분획물의 높은 항암 활성을 확인할 수 있었다.

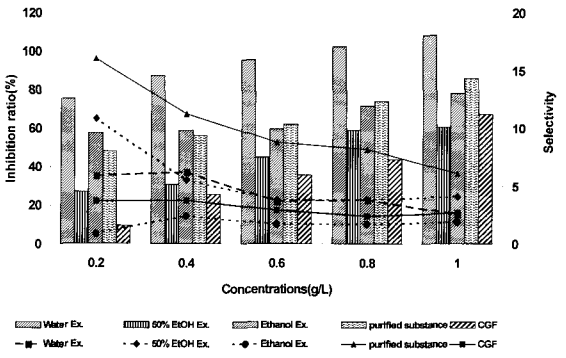

Figure 7. Inhibition ratio of growth of MCF7(bar charts, %) and selectivity(lines) in adding the crude extracts from *C. capsulata* and CGF.

이 실험결과는 앞서 시행된 면역세포의 생육도와 cytokine 분비능 실험에서도 나타난 높은 면역활성에 대한 결과를 반증하는 것으로서 해수 미세조류인 *C. capsulata*로부터 분리한 분획물이 생체조절기능에 있어 특히 면역과 항암활성에 대해 잠재적 가능성을 증명해 주는 것이라 사료된다. 또한 Kiyoshi(3) 등과 Takashi(23) 등의 연구에서 *C. vulgaris*로부터 분리한 분자량 63 KDa의 glycoprotein에 대한 항암활성실험 결과에서 등에서도 나타나듯이 결국 *Chlorella*로부터 분리한 분획물은 면역세포들의 활성을 야기 시키고, 나아가 외부항원에 대한 면역력을 높이게 되어 암세포에 대한 강한 억제활성을 일으키는 것을 확인할 수 있었다.

요 약

해수 미세조류인 Chlorella capsulata를 배양하여 그로부터 기능성물질을 분리하여 면역활성측정 및 항암실험을 실시하였다. C. capsulata를 이용한 면역활성능 측정실험에서 일반적인 담수종의 추출물이나 같은 종의 여러 추출용매를 이용한 추출물보다 물추출물의 분획층에 대한 면역활성이 높은 것으로 나타났다. 인간 T 세포, B 세포와 대식세포에 대해서 높은 면역활성을 나타내었으며, 정상세포에 대한 독성측정 실험에서도 약 10~25%의 독성을 나타났으며, 유방암세포와 위암세포에 대한 성장저해 실험에서도 각각 80% 이상의 높은 저해능을 확인하였다. 앞서의 결과들로부터 *Chlorella capsulata*로부터 분리한 분획물은 면역세포들의 생육을 증강시켜 외부항원에 대한 면역기능을 강화시키는 것을 간접적으로 확인할 수 있었다.

사 사

본 연구는 과기부 지역 기술 개발 용역 사업(2002-2003)의 지원으로 수행된 결과로 이에 심심한 사의를 표합니다.

REFERENCES

1. Maruyama, I., Y. Ando, T. Maeda, and K. Hirayama (1989), Uptake of vitamin B_{12} by various strains of unicellular algae *Chlorella*. *Nippin Suisan Gakkaishi* **55**, 1785-1790.
2. Yasukawa, K., T. Akigisa, H. Kanno, T. Kaminaga, and M. Izumida (1996), Inhibitory effects of sterols isolated from *Chlorella vulgaris* on 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation and tumor promotion in mouse skin, *Biol. Pharm. Bull.* **19**, 573-576.
3. Noda, K., N. Ohno, K. Tanaka, N. Kamiya, and M. Okuda (1996), A water soluble antitumor glycoprotein from *Chlorella vulgaris*, *Planta Med.* **62**, 423-426.
4. Morimoto, T., A. Nagatsu, N. Murakami, J. Sakakibara, H. Tokuda, and H. Noshino (1995), Antitumor-promoting glyceroglycolipids from the green alga, *Chlorella vulgaris*, *Phytochemistry* **40**, 1433-1447.
5. Konishi, F., M. Mitsuyama, M. Okuda, K. Tanaka, and T. Hasegawa (1996), Protective effect of an acidic glycoprotien obtained from culture of *Chlorelllavulgaris* against myelosuppression by 5-fluorouracil, *Cancer Immunol. Immunother.* **42**, 268-274.
6. Dantas, D. C. and M. L. Queiroz (1999), Effects of *Chlorella vulgaris* on bone marrow progenitor cells of mice infected with *Listeria monocytogenes*, *Int. J. Immunopharmacol.* **21**, 499-508.
7. Hasegawa, T., K. Ito, S. Ueno, S. Kumamoto, Y. Ando, A. Yammada, and K. Nomoto (1999), Oral administration of hot water extracts of *Chlorella vulgais* reduces IgE production against milk casein in mice, *Int. J. Immunopharmacol.* **21**, 311-323.
8. Pore, R. S (1984), Detoxification of Chlordecone Poisoned Rats with *Chlorella* and *Chlorella* Derived Sporopollenin, *Drug and Chemical Toxicology* **7**, 57-71.
9. Nagano, Y., T. Watanabe, Y. Honma, and T. Suketa (1978), Absorption and extcretion of cadmium by the rat administered cadmium-containing *Chlorella*, *Drug and Chemical Toxicology* **24**, 182-186.
10. Sano, T. and Y. Tanaka (1987), Effect of dried, powdered *Chlorella vulgaris* on experimental atherosclerosis and alimentary hyperchloesterolemia in cholesterol fed rabits, *Artery* **14**, 76-84.
11. Okamoto, K., Y. Lizuka, T. Murakami, H. Miyake, and T. Suzuki (1978), Effects of *Chlorella* alkali extracts on blood pressure in SHR, *Japan Heart J.* **19**, 622-623.
12. Singh, A., S. P. Singh, and R. Bamezai (1998), Perinatal influence of *Chlorella vulgris*(E-25) on hepatic drug metabolizing enzymes and lipid peroxidation, *Anticancer Res.* **18**, 1509-1514.
13. Pairat, K. and Y. Qiming (2001), Cadmium(II) removal from aqueous solutions by pre-treated biomass of marine alga *Padina* sp, *Environmental Pollution* **112**(2), 209-213.
14. Susumu, O., K. Atsuhito, H. Taisuke, K. Takato, K. Tatsuhiko, and N. Maki (2002), Total synthesis of sporochnols, fish deterrents from a marine alga, *Tetrahedron Letters* **43**(26), 4641-4644.
15. Jin, Y. L., M. K. Cho, and B. H. Han (1998), Optimal culture conditions for marine *Chlorella* in a vertical tubular photobioreactor system, *J. Korean Fish Soc.* **31**(1), 139-142.
16. Zhi, C., and L. R. Gregory (1996), Photolithotrophic cultivation of *Laminaria saccharina* gametophyte cells in a bubble-column bioreactor. *Enzyme and Microbial Technol.* **18**(4), 291-299.

17. Lee, S. H., H. S. Lee, Y. S. Park, B. Hwang, J. H. Kim, and H. Y. Lee (2002), Screening of immune activation activities in the Leaves of *Dendropanax Morbifera* Lev, *Korea J. Medicinal Crop Sci.* **10**(2), 109-115.
18. Ding, A. H., and C. F. Nathan (1988), Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production, *J. Immunol.* **141**, 2407-2412.
19. Rubinstein, L. V., R. H. Shoemaker, and M. R. Boyd (1990), Comparison of *in vitro* anticancer drug-screenig data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines, *J. Natl. Cancer Inst.* **82,** 1113-1118.
20. Lee, H. Y., and Erickson, L. E (1987), Theoretical and experimental yields for photoautotrophic, mixotrophic, and photoheterotrophic growth, *Biotechnol. Bioeng,* **29**, 476.
21. Largeau, C., and Casadevall. E (1980), The biosynthesis of long-chain hydrocarbons in the green alga *Botryococcus braunii*, *Phytochem.* **19**, 1081
22. Nirmal, P., A. R. Samir, N. E. Hala, A. E. Mahmoud, and S. P. David (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.
23. Takashi, H., M. Tetsuya, N. Kiyoshi, T. Kuniaki, K. Shoichiro, and Y. Yasunobu (2001), Toll-like receptor 2 is at least partly involved in the antitumor activity of glycoprotein from *Chlorella vulgaris*, *Int. Immunopharmacl.* **2**, 579-589.