

## 해수 미세조류인 *Chlorella capsulata*의 열 수 추출물의 신경세포 분화촉진에 관한 연구

이현수 · 이서호 · 김대호 · 박진홍 · 이현용\*  
강원대학교 바이오 산업공학부

**Effect of Neuronal Differentiation Activity of Hot Water Extracts of Marine Alga, *Chlorella capsulata*.**  
**Lee Hyun-Soo, Lee Seo-Ho, Kim Dae-Ho, and Lee Hyeon-Yong.** School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea – Hot water extracts of *Chlorella capsulata* (CCE) is a biological response modifier (BRM) which exhibits neuronal differentiation activity. The effect of CCE on the growth of nerve cells, PC12 was observed as follows: The viable cell density in adding CCE was increased up to 2.5 times, compare to that in no addition. The neurite of the cells was also lengthened up to 40  $\mu$ m longer than 5  $\mu$ m in no addition. The number of neurite-bearing cells were about four times higher than that in no addition.

**Key words:** Marine alga, *Chlorella capsulata*, neuronal differentiation activity, PC12 nerve cell.

신경계에 대한 질병으로 알려진 Alzheimer 병은 서구사회에서 심장질환, 암, 심장마비에 이어서 네 번째로 높은 사망률을 보이고 있는 질병이다. 그 이외에도 신경계에 관련된 질병으로 근위축성 측삭 경화증(Lou Gehrig's disease, Amyotrophic lateral sclerosis, ALS), Parkinson 병 등이 있는 것으로 알려졌다. 이에 대해 최근 활발히 연구되고 있는 것이 Brain-Derived Neurotrophic Factor(BDNF)[7]와 Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor(GDNF)[11-12] 등의 신경세포활성물질로서 활발히 연구되고 있다. 이 중 BDNF는 신경활성물질로서, 신경의 분화촉진, 신경세포의 생존 및 증식능력의 향상 그리고 세포들 간의 정보전달을 위한 신경돌기의 연장등의 여러 가지 기능을 포함하고 있다[25, 15]. 또한 BDNF가 속한 Neurotrophins군에는 Nerve Growth Factor(NGF), Neurotrophin-3(NT-3) 그리고 Neurotrophin-4/5(NT-4/5)와 상당한 구조적 동일성을 가지고 있다[14, 9]. 이들은 먼저 tyrosine kinase 활성을 이끌어 신호전달 단백질의 활성화를 야기 시켜 결국 p21 Ras나 MAP kinase등을 활성화시키게 된다. 결국 신경의 생존, 신경돌기의 연장과 같은 신경활성물질로서의 기능을 하게된다. 그러나 고비용 때문에 동물 세포배양을 통해 얻는 NGF의 생산은 한계가 있고, 보다 저렴한 비용의 NGF생산이 필요하게 되었다.

따라서 본 연구에서는 아직 개척단계에 있는 해양자원의 대한 연구를 통해 대량 배양이 가능한 미세 조류를 선발하여 이중 아직 그 생체 조절기능성이 밝혀지지 않은 조류중

을 선발해 앞서 밝힌 고비용의 신경활성물질을 대체할 신경활성물질을 분리하고자 하였다. 이를 위해 해수 *Chlorella*중 *Chlorella capsulata*를 선발하여 신경활성실험을 실시하였다. 최근 다수의 연구에서 미세조류인 *Chlorella*에 대한 생리활성연구가 활발히 이루어지고 있는데, 특히 *Chlorella*로부터 분리한 60~100 KDa의 glycoprotein이나 polysaccharides가 항암 및 면역기능에 대한 많은 활성을 갖고 있다는 것이 밝혀졌다[1, 4, 8, 16, 17, 19-23, 26]. 그러나 대부분의 연구가 담수 *Chlorella*에 국한되어있으며, 또한 신경활성에 관한 연구는 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다. 이에 본 연구에서는 해수 미세조류인 *Chlorella capsulata*를 선발하여 이의 물추출물로부터 기능성물질을 분리하여 신경세포인 PC12세포를 통해 고비용의 동물세포로부터 분리한 신경활성인자를 대체할 새로운 신경활성 물질의 탐색을 해수 미세조류인 *C. capsulata*를 통해 확인하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 균주의 배양

본 실험에 사용된 균주는 *Chlorella capsulata*(LB 2074)로 UTEX(University of Texas, USA)에서 분양 받았고, 사용된 배지는 Artificial Seawater Medium[27]으로 조성은  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  24.4 g/100 ml, KCl 6.0 g/100 ml,  $NaNO_3$  10.0 g/100 ml,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  3.0 g/100 ml,  $KH_2PO_4$  0.5 g/100 ml, Tris(Sigma Co. USA) 10.0 g/100 ml,  $NH_4Cl$  2.67 g/100 ml, Vitamin B12  $15.0 \times 10^{-6}$  g/100 ml 등으로 구성되었다. 본 배양에서 먼저 250 ml 삼각 플라스크에 배지와 균체의 농도가 0.2 g/L의 농도로 접종한 다음 27°C에서 90

\*Corresponding author

Tel: 82-33-250-6455, Fax: 82-33-256-4819

E-mail: hyeonl@kangwon.ac.kr

rpm의 교반속도로 7 Klux의 조도로 조정된 growth chamber (San Cheon Bio-tech, Korea)에서 7일간 배양하고, 이를 다시 8개의 50 ml flask에 배양한 후, 균체를 모아 원심분리 후 균체를 모아 부유시킨 다음 7 L Jar fermentor(Kobiotech, KF series, Korea)로 옮겨 다시 27°C, 95 rpm, 7 Klux의 조건으로 21일간 연속 배양하여 건조 균체의 농도가 1.2 g/L까지 실험을 실시하였다.

### 신경 활성 물질 분리

본 실험에서 사용된 활성 물질 분리를 위해 배양한 *C. capsulata*의 균체를 5000 rpm에서 초 원심분리 후, 탈 염 과정을 거쳐, 이를 건조한 뒤 건조분말을 이용해 100°C에서 물과 에탄올, 그리고 50% 에탄올을 이용하여 각각 24시간 동안 2회 반복 추출하였다. 물 추출물내의 신경 활성 물질을 분리하기 위해 물 추출물의 동결건조분말을 PBS를 용매로 분당 1 ml/min의 유속으로 Sephadex G-75 column을 이용해 단일 피크를 가지는 물질을 분리하였으며, 이후 *C. capsulata*로부터 분리한 분획물에 대해 hot water extracts of marine alga, *C. capsulata*(CCE)로 명기하였습니다. 이 물질에 대해 최대 흡광도를 확인하기 위해 UV spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하였으며, HPLC를 이용해 peak를 확인하였다. 정량 실험으로 단백질 분석을 위해 Lowry [10]법, 환원당 정량은 DNS[14]법, 그리고 총당 정량을 위해 Phenolic-sulfate[2]법을 사용하였다. 대조군으로 사용된 Chlorella Growth Factor(CGF; (주) 대상 시판제품)는 담수 미세조류인 *C. vulgaris*로부터 분리한 액상추출물을 사용하였다.

### 신경 세포주 및 배양

본 실험에 사용된 세포주는 신경 세포주인 rat adrenal pheochromocytoma cell line(ATCC CRL1721, PC12, USA)를 사용하였고, 기본배지로는 RPMI1640(GIBCO, USA.) 10.4 g/L, NaHCO<sub>3</sub> 2 g/L, HEPES(Gibco Inc.) 2 g/L 그리고 Gentamycin Sulfate(Sigma, USA) 57.47 mg/L를 혼합한 기본배지에 FBS(GIBCO, USA.) 10%를 첨가하여 이용하였고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> Incubator에서 배양하였다.

### 세포 생육활성 측정

시료첨가에 따른 세포 생육활성은 T-flask상에서 10%의 혈청배지에 생육시킨 PC12 신경 세포주를 0.25% trypsin-EDTA로 처리하여 세포를 떨어뜨린 후 PBS(Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-free)로 두 번 세척하였다. 그리고 24 well plate에 7.5×10<sup>2</sup> cells/ml의 농도로 접종하여 10% 혈청배지를 이용하여 최종 부피를 900 μl로 하였다. 배지 첨가 후 24시간 뒤 시료가 희석된 배지를 100 μl씩 첨가하였으며, 대조군은 배지만을 100 μl첨가하였다. 그 후 매 24시간마다 총 5일간 총 생 세포수를 측정하였으며 trypan blue dye exclusion 방법으로 생 세

포수를 측정하였다[13].

### 신경돌기의 연장길이 및 신경돌기를 지나는 세포수의 측정

신경돌기의 연장길이 및 신경돌기를 지나는 세포수의 측정은 T-flask 상에서 10% 혈청배지로 생육시킨 신경세포를 0.25% trypsin-EDTA 처리하여 flask바닥에서 떨어뜨린 후 PBS를 이용하여 세척하였다. 그리고 24 well plate에 7.5×10<sup>2</sup> cells/ml의 농도로 접종한 후 시료가 희석된 배지를 각각 100 μl씩 첨가하여 매 24시간마다 총 5일간 100의 배율로 현미경으로 관찰하였다. 이 현미경 사진을 이용하여 신경돌기의 길이를 측정하여 본래의 길이로 환산하여 신경돌기의 길이로 하였다. 각각의 사진에서 신경돌기의 길이가 가장 길게 연장된 세포를 기점으로 하여 본 실험에 사용하였다. 신경돌기를 지나는 세포는 현미경상에서 측정하였다. 신경돌기가 세포동체와 같거나 보다 큰 세포를 신경돌기를 지나는 세포로 하였다. 본 실험에서는 100개 이상의 세포를 측정하였다[3].

## 결과 및 고찰

### 신경세포 활성물질(CCE) 분리 및 동정

신경세포에 대한 활성을 지닌 물질을 분리하기 위해 *C. capsulata*의 물 추출물로부터 Sephadex G-75 Column을 사용하여 1개의 분획물(Fig. 1)을 얻었다. 이 분획물(CCE)에 대한 UV scanning을 통해 흡광도를 관찰(Fig. 2)한 결과, 260 nm에서 최대 흡광도를 나타내었다. 앞서 여러 논문[1, 4, 8, 16, 17, 19-23, 25]에서 밝혔듯이 *Chlorella*의 열 수 추출물로부터 얻어진 물질이 polysaccharide와 glycoprotein이라고 주장하고 있다. 그리고 Takashi[24]의 연구 결과에서 실제 *Chlorella*의 열 수 추출물로부터 얻어진 분획물의 흡광도 측정 결과 280 nm에서 최대 흡광도를 나타내었기 때문에 본 실험에서 추출된 물질에 대해 좀더 세심한 분석이 요구되었다. 먼저 추출시간이 많은 차이를 보였는데, 그의 논문에서

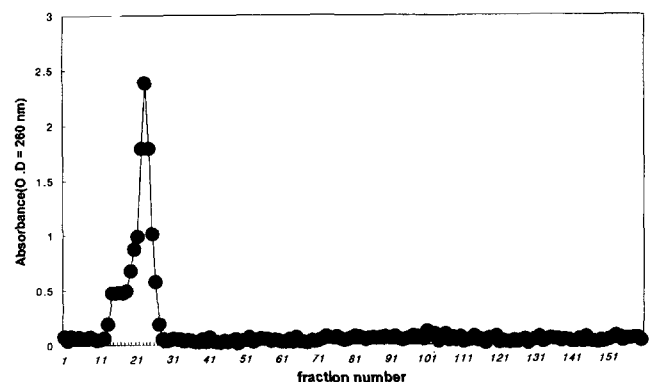


Fig. 1. Water Extract from *Chlorella capsulata* (CCE) were applied to Sephadex G-75 column equilibrated in 0.083 M/L PBS. Elution was carried out at a constant flow rate of 1 ml/min.

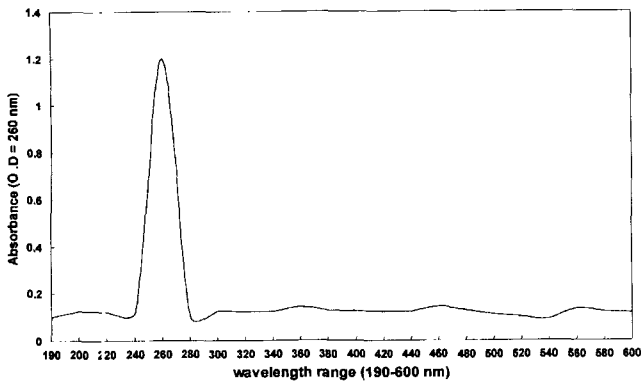


Fig. 2. Wavelength scanning of the water extract of *Chlorella capsulata*.

는 열 수 추출물의 주성분이 glycoprotein이라고 주장하고 있으며, 추출 시간은 100°C에서 20분 정도로 본 실험에서 실시한 24시간과는 많은 차이를 보였다. 이는 열에 의해 변성된 단백질이 추출물 내에 존재하는 탄수화물과 결합한 glycoprotein에 의해 나타난 결과로 추측되었다. 그러나 본 실험에서는 장시간 추출로 인해 glycoprotein과는 다른 좀더 변성된 단백질의 형태가 물 추출물 내에 다량 존재한다고 생각하였다. 이에 보다 자세한 정량 분석을 위해 실시한 실험을 통해 물 추출물의 경우 단백질이 29.60, 환원당 7.54 그리고 총당은 15.53(% of dry matter)로 나타났다(Table 1). 단백질의 비율이 상대적으로 높게 나타나 일단 물 추출물내의 주성분이 단백질을 간접적으로 확인하였다. 물 추출물

Table 1. The result of analyzing protein, reducing sugar and total sugar in CCE.

samples	Protein*	Reducing sugar	Total sugar
Crude water extract	29.60±0.22**	7.54±0.43	15.53±0.32
CCE	48.93±0.5	0.91±0.01	0.88±0.02

\*(wt. %), \*\*Means±S.D.

과 동일한 실험 방법으로 분획물(CCE)에 대한 정량 분석 결과 유일하게 단백질만이 48.93%로 나타났다. 해수 미세조류인 *C. capsulata*의 물 추출물은 환원당과 총당은 거의 존재하지 않는 것을 볼 수 있었다. 이는 Hasegawa[5]의 연구결과에서 밝힌 물 추출물의 단백질 44.4%, 탄수화물 39.5(그중 다당류 13.8% 포함)%, 그리고 핵산이 15.4%로 나타나 단백질 함량에서 두 추출물간의 차이가 있는 것으로 나타났다. 이를 토대로 *C. capsulata*의 물 추출물로부터 분리한 분획물(CCE)의 정성분석 결과 단백질이 주성분으로 나타났지만 실제로 280 nm에서 최대 흡광도를 보이지 않고, 260 nm에서 나타난 것으로 볼 때 glycoprotein과는 차이가 있는 좀더 변성된 형태로 존재하는 새로운 물질이라 사료된다. Fig. 3은 HPLC를 이용한 물 추출물과 분획물(CCE)의 피크를 확인한 것으로 분획물(CCE)이 같은 시간대에 1개의 피크를 보임으로서 단일물질임을 추측케 하였다.

#### 신경세포의 활성 측정

*Chlorella capsulata*의 물 추출물로부터 분리한 분획물

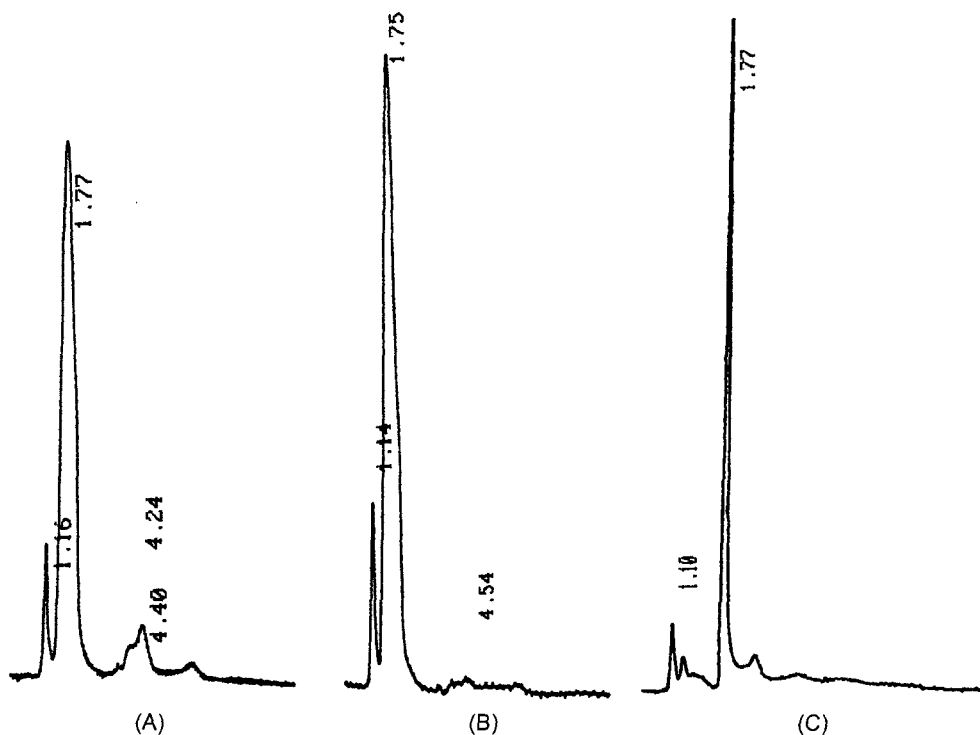


Fig. 3. HPLC patterns of crude water extract from *C. capsulata* (A) commercially edible CGF from *C. vulgaris* (B) and CCE(C).

(CCE)의 신경세포에 대한 분획능 확인을 위해 PC12 nerve cell을 사용하였다. 실험에 사용된 PC12 세포의 초기 접종 농도는  $7.5 \times 10^2$  cells/ml로 접종하여 시료 투여 후, 총 5일간 세포를 관찰하였다. 시료의 투여 농도는 0.5, 1.0 mg/ml 각각 2가지로 하여 첨가하였다. 먼저 시료 첨가에 따른 신경세포의 생육도를 나타낸 Fig. 4에서 시료 첨가 후 4일째까지는 생육도가 증가하는 것을 보여주었다. 그러나 이후 무첨가군, 50% 에탄올을 그리고 에탄올추출물의 경우 유기 용매 사용에 의한 추출로 인해 세포독성으로 인한 세포사멸 일어나 생육도가 급속히 감소하는 것으로 생각되어졌다. 높은 생육도를 나타낸 것은 물 추출물로부터 분리한 분획물(CCE)로서 배양이후 지속적인 증가를 보여 5일째 최고  $3.5 \times 10^3$  cells/ml로 대조구로 사용된 CGF의  $3.0 \times 10^3$  cells/ml보다 높은 생육도를 보여주었다. 분획물(CCE)의 최종 세포농도는 초기  $7.5 \times 10^2$  cells/ml에서  $3.5 \times 10^3$  cells/ml로 약 20% 정도 세포농도가 증가한 것을 확인하였다. 앞의 결과를 통해 시료 추출시 에탄올을 이용한 추출물에서 물 추출물에 비해 낮은 생육도를 보임으로서 시료 추출시 사용된 유기 용매의 적절한 사용이 재고되어야 한다고 생각되었다. Fig. 5는 시료 첨가에 따른 신경돌기 연장능과 신경돌기 포함세포의 생육도를 나타낸 그림이다. 신경돌기 연장능의 경우 물 추출물과 CGF가 높은 활성을 보여주었다. 신경돌기 연장에 있어 분획물(CCE)의 경우에 단일물질의 효과보다는 *Chlorella*에 존재하는 다양한 수용성 물질에 의한 복합적인 효과로 인해 신경돌기가 연장됨을 추측케 하였다. 그리고 나머지 무첨가군, 50% 에탄올, 에탄올 추출물의 경우에는 시료 첨가 후 3일째부터 연장능이 감소하여 5일째는 신경돌기가 거의 나타나지 않아 결국 세포사멸로 연결되었다. 이는 이전에 지적한 유기 용매의 사용으로 인한 세포독성으로 인해 발생하는 결과로 사료된다. 물 추출물과 CGF의 경우 각각 85, 115  $\mu$ m의 돌기 연장능을 보여주었고, 분획물(CCE)의 경우 40  $\mu$ m로 대조구보다도 낮은 돌기 연장능을 보여주었다.

돌기 보유세포의 생육도 측정 결과에서는 분획물(CCE)이  $2.3 \times 10^3$  cells/ml로 CGF 그리고 물 추출물의 2.0,  $1.8 \times 10^3$  cells/ml보다 높은 생육도를 보여주었다. 나머지 시료에서는 시료첨가 후 3일째까지 서서히 증가하나 이후 감소하는 결과를 보여주었다. 앞의 결과를 통해서 물 추출물과 그로부터 분리한 분획물(CCE)의 신경활성이 대체로 높은 것을 볼 수가 있었고, 반면 에탄올을 사용한 추출물의 경우에는 신경세포에 대한 독성으로 인해 시료 첨가 후 3일째 서서히 세포 생육이 점차 감소하는 것을 확인할 수가 있었다. Hong 과 Lee[6]의 신경아세포종 세포(human neuroblastoma cells, IMR32)로부터 분리한 BDNF의 신경활성실험과 비교한 결과(data not shown)에서 *C. capsulata*로부터 분리한 분획물(CCE)의 활성이 대략 1/1000 정도로 나타났다. 이 결과는 비록 주목할 만한 수치는 아니지만, 고비용의 동물세포배양을 통해 얻은 것이 아닌 해수 미세조류의 배양을 통해 분리한 단일물질의 신경활성임을 감안한다면 이의 대량 배양기술확립과 고순도의 활성물질 분리기술이 수반된다면 이보다 저렴하고 대량으로 신경활성물질을 분리 정제할 수 있음을 짐작케 한다.

요 약

본 실험은 해수 미세 조류인 *Chlorella capsulata*로부터 신경세포에 대한 활성을 증가시키는 기능성물질을 분리하여 해수자원의 생체 조절자원으로서의 가능성을 제시하고자 실시하였다. 선별된 해수 *Chlorella*를 이용하여 활성물질을 분리한 뒤, 그 물질의 신경활성을 탐색하였다. *C. capsulata*의 물 추출물로부터 분리된 분획물(CCE)의 분자량은 약 45 KDa(data not shown)으로 기존에 연구된 60~100 KDa보다 더 낮은 범위에서 물질이 분리되었으며, 이는 현재 발표된 많은 연구결과에서 주장하는 물질들과는 다른 종류의 물질

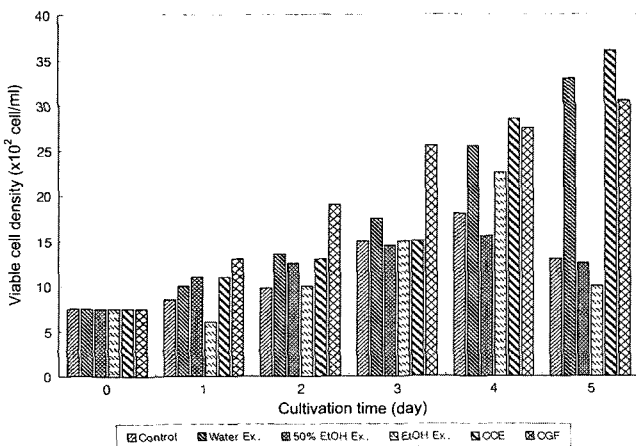


Fig. 4. The growth of viable cell density of PC12 nerve cells in no adding or adding the samples.

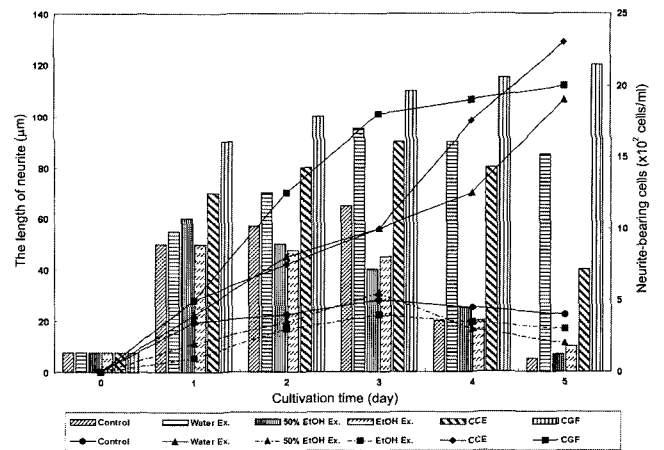


Fig. 5. The neurite's extension (bar charts) and neurite-bearing cells (lines) of PC12 nerve cells in no adding or adding the samples.

임을 제시하고 있어 이에 보다 심층적인 연구가 수행되어야 한다고 생각된다. 실험 결과를 통해 볼 때 활성을 나타낸 주된 물질은 *C. capsulata*의 수용성 성분으로 생각되어지며, 260 nm에서 최대 흡광도를 나타내는 물질로 *C. capsulata*에 존재하는 단백질이 열 변성에 의해 탄수화물과 결합한 glycoprotein의 형태로 존재하는 것으로 추측되지만 일부의 연구결과에서 280 nm에 최대 흡광도를 보이는 활성물질이 glycoprotein이라고 주장하고 있어 이 분획물(CCE)에 대한 좀더 심도 깊은 연구가 수행되어야 한다고 생각된다. 이는 최근에 발표된 *Chlorella*의 기능성과 관련한 논문들에서 언급한 내용들과 유사한 결과를 나타내지만 대부분이 담수 조류에 대한 활성 탐색의 결과임을 감안한다면 본 실험을 통해 해수 미세조류로부터 분리된 물질의 새로운 활성물질로서의 가능성을 제시한 것이라 하겠다. 또한, 다른 유기용매를 통해 활성물질을 분리하는 것과 달리 순수한 물을 통해 *Chlorella*의 수용성 성분을 추출하는 것이 좀더 신경세포의 활성을 증가시킨다는 것을 확인하였다. 앞으로 이 수용성 물질에 대한 면역활성과 *in vivo* 실험을 통해 좀더 깊은 연구가 수행되어지고, 나아가 대량배양기술, 분리정제 기술이 뒷받침된다면, 고비용의 동물세포를 이용한 신경활성물질을 대체할 새로운 신경 활성물질 개발은 물론 다 방면에 걸친 생체 조절기능을 가진 기능성 소재로서 활용 범위가 점차 확대되지 않을까 생각한다.

### 감사의 말

본 연구논문은 2003년도 한국과학재단 지역협력연구센터 사업(한남대 실버생물기술연구센터 R12-2001-047-03001-02)의 지원에 의해 얻은 결과이므로 이에 감사드립니다.

### REFERENCES

- 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.
- Dubios, M. and K. A. Gilles. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**(3): 350-356.
- Hamers, B. D. and D. Richwood. 1990. *Gel electrophoresis of protein*, IRL press, Oxford, England.
- Hasegawa, T., K. Ito, S. Ueno, S. Kumamoto, Y. Ando, and Y. Yasunobu. 1999. Oral administration of hot water extracts of *Chlorella vulgaris* reduces IgE production against milk casein in mice. *Int. J. Immunopharmacol.* **21**: 311-323.
- Hasegawa, T., M. Okuda, M. Makino, K. Hiromatsu, K. Nomoto, and Y. Yoshikai. 1995. Hot water extracts of *Chlorella vulgaris* reduce opportunistic infection with *Listeria monocytogenes* in C57BL/6 mice infected with LP-BM5 murine leukemia viruses. *Int. J. Immunopharmacol.* **17**(6): 505-512.
- Hong, J. S., K. H. Woo, K. Y. Park, and H. Y. Lee. 1997. The secretion of Brain-derived Neurotrophic Factor(BDNF) from the cultures of human neuroblastoma cells. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**(1): 102-105.
- Kazua, M., R. K. Wada, J. M. Yamashiro, D. R. Kaplan, and C. J. Thiele. 1995. Expression of Brain-derived Neurotrophic Factor and p145TrkB Affects Survival, Differentiation and Invasiveness of Human Neuroblastoma cells. *Cancer res.* **55**: 1789-1806.
- Konishi, F., M. Mitsuyama, M. Okuda, K. Tanaka, T. Hasegawa, and K. Nomoto. 1996. Protective effect of an acidic glycoprotein obtained from culture of *Chlorella vulgaris* against myelosuppression by 5-fluorouracil. *Cancer Immunol. Immunother.* **42**: 268-274.
- Lindsay, R. M., S. J. Weigand, C. A. Altar, and P. S. Distanzo. 1994. Neurotrophic factor: From molecule to Man. *Trend in Neuroscience* **17**(5): 182-190.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Martha, C. B. 1999. A Commentary on Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor(GDNF). *Biochem. Pharmacol.* **57**: 135-142.
- Martha, C. B., D. A. Kozlowski, and B. Connor. 2000. Glial cell line-derived neurotrophic factor(GDNF) as a defensive molecule for neurodegenerative disease: a tribute to the studies of Antonia Vernadakis on neuronal-glia interactions. *Int. J. Devl. Neuroscience* **18**: 679-684.
- Mercille, S. and B. Massie. 1994. Induction of apoptosis in nutrient-derived cultures of hybridoma and myeloma cells. *Biotech. Bioengi.* **44**: 1140-1154.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
- Montalcini, R. L. 1987. The nerve growth factor 35 years later. *Science* **237**: 1154-1162.
- Morimoto, T., A. Nagatsu, J. Sakakibara, H. Tokuda, H. Nishino, and A. Iwashima. 1995. Antitumor-promoting glyceroglycolipids from the green alga, *Chlorella vulgaris*. *Phytochemistry* **40**: 1433-1447.
- Nagano, T., Y. Watanabe, Y. Honma, and T. Yamamoto. 1978. Absorption and excretion of cadmium by the rat administered cadmium-containing *Chlorella*. *Eisei Kagaku* **24**: 182-186.
- Nirmal, P., S. A. Ross, H. N. Elsohly, M. A. Elsohly, and D. S. Pasco. 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.
- Noda, K., N. Ohno, K. Takana, N. Kamiya, M. Okuda, and Y. Shoyama. 1996. A water soluble antitumor glycoprotein from *Chlorella vulgaris*. *Planta Med.* **62**: 423-426.
- Okamoto, K., Y. Lizuka, T. Murakami, and T. Suzuki. 1978. Effects of *Chlorella* alkali extracts on blood pressure in SHR. *Jpn. Heart J.* **19**: 622-623.

21. Pore, R. S. 1984. Detoxification of Chlordecone Poisoned Rats with *Chlorella* and *Chlorella* Derived Sporopollenin. *Drug and Chemical Toxicology* **7**: 57-71.
22. Sano, T. and Y. Tanaka. 1987. Effect of dried, powdered *Chlorella vulgaris* on experimental atherosclerosis and alimentary hypercholesterolemia in cholesterol fed rabbits. *Artery* **14**: 76-84.
23. Singh, A., S. P. Singh, and R. Bamezai. 1998. Perinatal influence of *Chlorella vulgaris*(E-25) on hepatic drug metabolizing enzymes and lipid peroxidation. *Anticancer Res.* **18**: 1509-1514.
24. Takashi, T., T. Matsuguchi, K. Noda, K. Tanaka, H. Kumamoto, Y. Shoyama, and Y. Yoshikai. 2002. Toll-like receptor 2 is a least partly involved in the antitumor activity of glycoprotein from *Chlorella vulgaris*. *Int. Immunopharmacol.* **2**: 579-589.
25. Vantini, G. and S. D. Skaper. 1992. Neurotrophic Factors: From physiology to pharmacology?. *Pharmacol. res.* **26**(1): 1-15.
26. Yasukawa, K., T. Akihisa, H. Kanno, T. Izumida, and M. Takido. 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.
27. 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.

(Received Dec. 14, 2002/Accepted Mar. 21, 2003)