

클로렐라 가수분해물의 생리활성 분석

강민숙* · 채희정**

Biological Efficacy Assay of *Chlorella* hydrolysate

Min-Sook Kang* and Hee Jeong Chae**

요 약 클로렐라 추출물을 trypsin으로 가수분해하여 얻은 가수분해물을 이용하여 항균, 미백과 항암 활성을 분석하였다. Tyrosinase inhibition assay를 이용하여 미백활성을 측정한 결과 클로렐라 가수분해물의 효소활성에 대한 IC₅₀(50% inhibitory concentration)은 12%로 나타났다. *In vitro*에서 인체 폐암세포인 A-549에 대한 클로렐라 가수분해물의 항암 활성을 분석한 결과 클로렐라 가수분해물 0.15%에서 88.2%의 높은 암세포 억제율을 보였다.

Abstract Biological efficacy assays, including antimicrobial, tyrosinase inhibition and anticancer activities of *Chlorella* hydrolysate, were carried out. In tyrosinase inhibition assay of *Chlorella* hydrolysate, IC₅₀(inhibitory concentration) was measured as 12%. *Chlorella* hydrolysate showed high anti-lung cancer activity of 88.2% at a concentration of 0.15%.

Key Words : *Chlorella* hydrolysate, biological efficacy assay

1. 서 론

여러 가지 기능성으로 주목받고 있는 생물 중 하나로 클로렐라를 꼽을 수 있다. 클로렐라는 녹조류로 담수 중에 증식하는 단세포 식물로, 분류학적 *Chlorophyceae*강, *Chlorococcum*목, *Chlorella*속으로 종(species)으로는 *C. vulgaris*, *C. pyrenoidosa*와 *C. ellipsoidea*가 널리 알려져 있다. 이들은 보통 연못이나 호수 등 담수에서 생육하며, 직경 2~10 μm의 구형 단세포 조류로 하나의 세포는 현미경으로만 볼 수 있는 정도이다. 생식은 무성생식으로 증식하고 물, 공기, 질소와 인산 등의 식물 성장 요소가 있으면 빛과 이산화탄소를 이용한 독립 영양적 성장 증식을 한다는 점이 생물학적으로 가장 큰 특징으로 산업적 대량 배양 공정에서 가장 중요하게 고려해야 할 사항이다. 클로렐라는 독립영양, 반독립영양, 종속영양 등으로 생육이 가능하다[1].

클로렐라는 필수 아미노산 조성이 좋은 고 단백질 식품으로 총 아미노산 함량은 쇠고기에 비하여 월등히 높으며 단백질, 지질, 식이섬유, 비타민류와 무기질에 관하여 다른 식품과 비교할 수 없을 만큼 영양적으로도 균형 잡힌 식품이다. 클로렐라는 현재 사료와 식품의 1,

2차적 목적으로 사용되어 영양학적 우수성이 확인되었고[2,3], 항암 활성[4] 외의 3차적 식품으로서 기능성의 탐색이 활발히 진행 중에 있다. 그 예로 환경 호르몬인 다이옥신의 체내 배출[5], 체내 중금속의 축적억제 및 배설[6], 환경독성 물질의 생물학적 분해[7], 동맥경화 및 간장 장애의 억제[8], 항암 활성[9], 면역기능 강화[10,11], 세포의 부활작용[12]과 식품의 풍미향상 및 보습효과[3] 등의 기능성이 보고된 바 있으며, 식품용 이외에 클로렐라를 수산 양식용 사료로 사용하거나[13], 폐수에 존재하는 수은의 제거를 위한 기능소재로 활용하기 위한 연구가 보고된 바 있다[14].

개인 소득의 증가로 삶의 질을 추구하는 쪽으로 사람들의 관심을 유도함으로써 야외 활동량이 급속도로 증가하게 되어, 기미, 주근깨, melanin 색소의 피부침착에 기인한 흑화현상이 증가하는 추세에 따라 현재 세계적으로 화장품 업계에서는 미백에 대한 연구가 활발히 진행 중에 있다[15]. 미백제로 사용되는 화학약품의 부작용 유발로 인해 천연물을 이용한 미백제를 개발하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 연구에서는 클로렐라 가수분해물의 미백기능을 tyrosinase 활성법에 기반하여 정량적인 분석을 수행하였다.

현재 사망률이 높은 질병 중 하나로 대두되는 암에 대한 WHO의 보고에 의하면 직업병, 대기오염, 방사능 등의 환경성 요인으로 인한 발생률이 85%를 차지하는데, 암 발생률과 관련하여 식이 요인의 중요성이 대두

*호서대학교 식품영양학과

**호서대학교 식품생물공학과 및 벤처전문대학원 첨단산업기술전공

되면서 발암원인 물질의 검색과 함께 일상에서 섭취하는 식품 중에서 항암제로 이용할 수 있는 물질이 활발히 연구되고 있다[16-20]. 클로렐라도 항암 및 면역기능 활성화에 기여한다는 보고[11,21]가 있으며 본 연구에서는 클로렐라 추출물의 효소적 가수분해물이 항암 활성을 갖고 있는지에 대하여 조사하였다.

지금까지의 클로렐라와 관련된 연구는 클로렐라의 열수추출물(hot water extract)을 이용하였으나, 본 연구에서는 클로렐라 가수분해물을 이용하여 클로렐라의 여러 가지 생리활성 중 항균, 미백, 항암 활성을 검토하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 재료

실험재료로 사용한 클로렐라(*Chlorella sp.*) 원말 분말은 대상(주) 군산공장(한국)으로부터 제공받았으며 trypsin은 Novo Nordisk사(Denmark) 제품을 사용하였다. Ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, USA)로부터 구입하였고, L-3,4-dihydroxy-phenylalanine(L-dopa)은 Across Organics (Japan)에서 구입하여 사용하였다. 다른 시약들은 일급 시약을 사용했으며, *B. subtilis* ATCC 6633과 *E. coli* K112는 한국미생물보존센터(KCCM)에서 분양받아 사용하였다.

2.2 가수분해 및 전처리

건조 분말상태의 클로렐라를 3차 증류수와 혼합하여 10%(w/v)의 현탁액(200 ml)을 조제하고 0.5%(w/v)의 EDTA를 첨가하였다. 클로렐라 현탁액을 충분히 교반한 후, 얼음에 담그어 15초간 1분 간격으로 초음파 처리를 3회 반복하여 막을 파쇄하였고, 4°C에서 24시간 진탕교반한 후, 30분간 원심분리(4°C, 3,000 × g)하여 상등액을 얻었다. 상등액인 클로렐라 추출물(*Chlorella extract*, CE)에 체내 단백질분해효소인 pancreas trypsin (6.0 S saltfree, Novo Nordisk, Denmark)을 0.2%(w/v) 첨가하여 항온수조에서 38°C로 12시간 진탕하였다. 가수분해 후 90°C에서 3분간 열처리하여 효소반응을 정지시켰다. 이 클로렐라 가수분해물(*Chlorella hydrolysate*, CH)을 생리활성분석 및 분리정제 실험의 시약물질로서 사용하였으며, 고히분 농도는 굴절계(Tokyo Co., Japan)를 이용하여 측정하였다.

2.3 생리활성 분석

모든 활성 분석 실험에서는 각 시료별로 3회 반복 실험하였고, 이를 평균 ± 표준오차(mean ± standard error)로

그래프에 표시하였다.

가. 항균 활성(antimicrobial assay)

Gram (+)균과 Gram (-)균으로 각각 *B. subtilis* ATCC6633과 *E. coli* K112를 항균 시험균주로 사용하였다. 우선 NA배지(nutrient agar: enzymatic digest of gelatin 5 g, beef extract 3 g, agar 15 g, per liter, pH 6.8)를 한천(agar)을 제외한 액체배지와 한천을 포함하는 고체배지로 만들어 액체배지 200 ml에 두 가지 균을 각각 1 ml씩 첨가한 후 37°C에서 24시간 동안 진탕배양하였다. 배양된 균을 미리 준비해 둔 고체배지에 200 μl씩 도말하였다. 그 위에 시료 30 μl를 멸균된 paper disc에 점적하고 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. Paper disc 주위의 투명환(clear zone) 크기에 따라 항균 활성을 확인하였다.

나. 미백 기능 분석(tyrosinase inhibition assay)

Sodium phosphate buffer(0.5 M, pH 6.0)에 녹인 1 mg/ml l-dopa (1 ml)에 시료용액 0.1 ml와 0.8 ml의 완충액을 가하고 예열된 항온수조에서 37°C로 유지시켰다. 이 반응액에 0.9 ml의 tyrosinase 용액(57.4 unit/ml)을 넣어 섞어준 후 475 nm에서 5분간 흡광도 변화를 측정하여 다음 식(1)과 같이 저해활성을 측정하였다 [22].

$$Tyrosinase\ inhibition\ rate = \left(1 - \frac{A_{control}}{A_{sample}}\right) \times 100(\%) \quad (1)$$

여기서, $A_{control}$: 대조군의 흡광도

A_{sample} : 시료의 흡광도

다. 항암 활성 측정

한국세포주은행에서 분양받은 폐암세포 A-549를 이용하여 96-well plate에서 항암 물질로 알려진 indole-3-carbinol[23]을 대조구를 사용하고 trypsin 가수분해물 및 여러 가지 크로마토그래피 분획을 이용하여 항암 활성을 정량적으로 분석하였다. 암세포의 생존율은 MTT(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetra-zolium bromide)을 이용하여 570 nm에서 흡광도로 분석[24]하였으며, MTT 용액은 phosphate buffered saline(PBS) 0.1%에 2 mg/ml의 농도로 MTT를 용해한 것을 사용하였다.

$$Anticancer\ activity\ rate = \left(1 - \frac{A_{sample}}{A_{buffer}}\right) \times 100(\%)$$

(2)
 여기서, A_{sample} : 시료의 흡광도
 A_{buffer} : PBS 완충용액(0.1%, pH 7.5)의 흡광도

3. 결과 및 고찰

본 연구에서 사용한 원료인 클로렐라는 단백질 함량이 약 60%로 생리활성을 나타낼 수 있는 여러 성분 중에서도 단백질 계열의 물질에 주목하였다. 단백질계 생리활성소제는 *in vitro*에서 생리활성을 보일지라도 체내의 단백질 분해효소에 의해 그 활성을 잃을 수 있으므로 체내의 효소에 의해 미리 가수분해를 한 다음 얻어지는 가수분해물에서 생리활성 물질을 탐색하는 것이 바람직하다. 따라서, 클로렐라의 세포 내에 있는 여러 가지 생리활성 물질을 수집하기 위하여 EDTA와 증류수를 이용하여 세포막을 느슨하게 하였으며, 세포 밖으로 유도된 활성 물질을 인체 내의 단백질 분해효소인 trypsin으로 분해하여 클로렐라의 가수분해물을 생리활성 분석과 분리정제의 출발물질로 이용하였다. *In vitro* 항균 실험에서 클로렐라 농도에 따라 장내 유해균의 발육저해 경향이 높아짐이 보고[12,25]된 바 있음에 먼저 항균활성을 분석하였다. 본 연구에서는 이와 유사한 효과가 클로렐라 가수분해물에도 있는 지를 검토하기 위하여 G(+)균으로는 *B. subtilis* ATCC6633을, G(-)균으로는 *E. coli* K112를 시험 균주로 하여 항균력을 테스트하였다. 실험 방법으로는 paper disc assay를 사용하였다. 실험 결과, *B. subtilis*와 *E. coli*에서 1~2 mm의 투명환이 확인되었다(Fig. 1). 비교적 높지 않은 항균력을 보이는 것으로 확인되었다.

Melanin은 자연계에 널리 분포하는 페놀류의 생물고분자 물질로 검은 색소와 단백질의 복합체이다. 이 색소의 생합성 경로는 모두 tyrosine을 출발물질로 하여 축매되는 dopaquinone을 거쳐 합성이 이루어지며 이후 아미노산 혹은 단백질과의 중합반응에 의해 최종적으로 melanin이 합성된다[26]. 기미, 주근깨 등 피부에 생

는 색소 침착은 표피에서의 melanin 색소의 증가에 기인한다. Melanin 생합성 과정에는 한 가지 효소만이 유일하게 관여하므로 melanin 합성을 억제하는 방법으로 화장품 업계에서는 tyrosinase 저해제를 탐색하고 응용해 왔다[22, 27, 28]. 클로렐라의 기능성 중 클로렐라 성장촉진인자(CGF, *Chlorella* growth factor)의 주성분은 DNA와 RNA 등의 풍부한 핵산관련 물질로 미토콘드리아 작용과 에너지(ATP)생산을 회복시키고, 세포내의 대사를 촉진시킴으로써 손상된 세포의 재생과 세포부활작용을 촉진시킨다. 이러한 클로렐라 추출물의 세포부활작용으로 클로렐라 추출물이 화장품 원료로 많이 사용된다[12]. 화장품의 원료로 세포부활기능 외에 미백의 활성을 알아보려 하였다. 본 연구에서는 melanin 색소의 생합성 과정에서 tyrosinase가 dopa를 기질로 하여 초기 반응의 주요 과정을 촉매한다는 점에서 그 효소활성의 저해도를 측정하는 검사법을 사용하였다. 현재 화장품 시장에서 가장 두드러진 성장을 보이는 미백 화장품의 원료로 arbutin, korgic acid 및 cysteine이 가장 많이 사용되고 있다. 본 연구에서는 양성 대조군으로 이 3가지 정제된 미백활성 물질을 갖고 tyrosinase 활성 저해율을 측정하였다. 실험결과 정제된 korgic acid와 cysteine은 농도가 0.2 mg/ml 정도만 되어도 100%에 가까운 저해율을 보였다(데이터 제시 생략). 클로렐라 가수분해 추출물의 농도에 따른 tyrosinase 저해활성을 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 클로렐라의 tyrosinase 활성 IC_{50} (50% inhibitory concentration)은 약 12%로 나타났다. Kim 등[28]의 연구에서 얻은 녹차 추출물의 IC_{50} 값은 2000 mg/ml에 비하여 높은 활성을 보였지만, Lee 등[29]의 연구에서 박태기나무 잎 추출물의 IC_{50} 값이 20-50 mg/ml인 것에 비하면 낮은 활성을 보

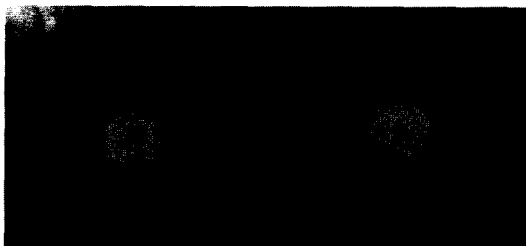


Fig. 1. Antimicrobial assay of *Chlorella hydrolysate*. (A) *E. coli* K112, (B) *B. subtilis* ATCC6633

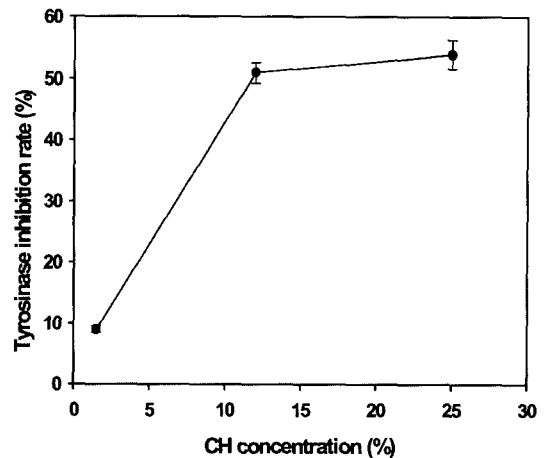


Fig. 2. Tyrosinase inhibition assay of *Chlorella hydrolysate*.

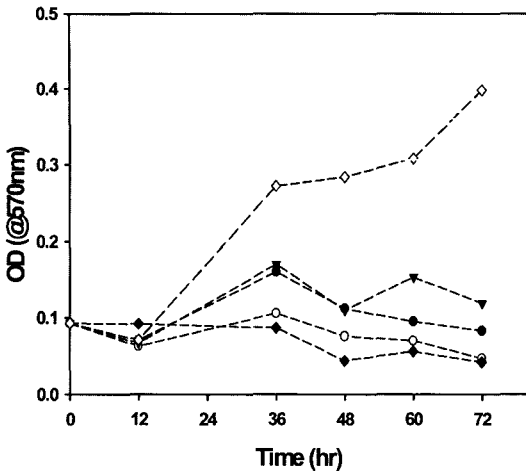


Fig. 3. Anticancer activity of *Chlorella* hydrolysate (CH). (-▼-) 0.1% of CH, (·○·) 0.15% of CH, (-●-) 0.2 % of CH, (-◆-) 0.001% indole-3-carbinol, (-◇-) Tris-HCl Buffer(pH 7.5).

이고 있다. 분리되지 않은 물질인 것을 감안한다면 향후 추가 분리 정제 공정을 통하여 우수한 미백 기능성 소재의 발굴이 가능할 것으로 판단된다.

Fig. 3은 클로렐라 가수분해물(CH)의 고형분 농도별 항암 활성을 MTT법으로 분석한 결과이다. Fig. 3에서 보는 바와 같이, Tris-HCl 완충액의 72 시간에서의 OD 값을 기준으로 백분율로 환산한 결과 0.15%의 클로렐라 가수분해물(CH)은 88.2%의 높은 억제율을 보였으며 클로렐라 가수분해물이 *in vitro*에서 인체 폐암세포인 A-549의 증식을 억제시키는 작용이 있는 것으로 나타났다. 보고에 의하면 클로렐라로부터 분리된 glyceroglycolipid인 monogalactosyl diacylglycerol의 일종이 종양을 억제한다고 한다[4]. 클로렐라의 제암 효과로서 암의 면역 성립에 주요한 역할을 하는 helper-T 세포를 강하게 활성화하는 실험결과가 보고된 바 있다[30, 31]. 위의 결과들로 미루어 클로렐라는 면역계를 활성화하여 암전이 억제효과를 나타내므로 항암보조제로 중요한 역할을 할 것으로 기대된다[21, 32-34]. 또한 클로렐라 추출물은 마크로파아의 interleukin과 interferon mRNA 발현수준을 올리고 *L. monocytogenes* 감염 후 MAIDS (murine retrovirus induced acquired immunodeficiency syndrome)를 갖는 쥐와 정상 쥐의 비장 기능을 향상시킨다고 보고되어 있다[10]. 보고된 결과와 유사하며 본 연구에서도 클로렐라 가수분해물의 *in vitro* 항암 활성이 확인되었다.

4. 결 론

본 연구에서는 클로렐라의 폐암에 대한 항암 생리활성과 미백 기능성을 확인하였다. 클로렐라 추출물을 trypsin으로 가수분해하여 얻은 *Chlorella* hydrolysate는 *B. subtilis* ATCC6633와 *E. coli* K112에 대하여 항균 활성을 보이지 않았으나 tyrosinase inhibition assay를 이용한 미백활성 분석 결과 IC₅₀(50% inhibitory concentration)이 12%이었고 인체 폐암세포인 A-549에 대한 항암활성 분석에서는 0.15%의 농도에서 88.2%의 높은 폐암세포 증식 저지율을 보였다.

참고문헌

- [1] M. Kang, S. Sim and H. J. Chae, "Chlorella as a functional biomaterial", *J. Korean Biotechnol. Bioeng.* (in press), 2004.
- [2] S. Kim, M. Park, N. Oh, D. Kim, M. Han and M. In, "Studies on quality characteristics and shelf-life of chlorella soybean(Tofu)", *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.*, 46, pp. 12-15, 2003.
- [3] M. Park, J. Lee, C. Park and M. In, "Quality characteristics of *Sulgidduk* containing chlorella powder", *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 31, pp. 225-229, 2002.
- [4] T. Morimoto, A. Nagatsu, N. Murkami, J. Sakakibara, H. Tokuda, H. Nishino and A. Iwashima, "Antitumour-promoting glyceroglycolipids from the green alga, *Chlorella vulgaris*", *Phytochem.*, 40, pp. 1433-1437, 1995.
- [5] R. S. Pore, "Detoxification Chlordecone poisoned rats with *Chlorella* and *Chlorella* derived sporopollenin", *Drug Chemical Toxicology*, 7, pp. 57-71, 1984.
- [6] T. Nagano, Y. Watanabe, T. Honma, Y. Suketa and T. Yamamoto, "Asorption and excretion of cadmium by the rat administered cadmium-containing *Chlorella*", *Eisei Kagaku*, 24, pp. 7182-7186, 1978.
- [7] C. K. Tsang, P. S. Lau, N. F. Y. Tam and Y. S. Wong, "Biodegradation capacity of tributyltin by two *Chlorella* species", *Environ. Poll.*, 105, pp. 289-297, 1999.
- [8] A. Singh, S. P. Singh and R. Bamezai, "Perinatal influence of *Chlorella vulgaris*(E-25) on hepatic drug metabolizing enzymes and lipid peroxidation", *Anti-cancer Res.*, 18, pp. 1509-1514, 1998.
- [9] A. Takahashi, D. Ikeda, H. Nakamura, S. Nakanawa, Y. Okami and T. Takeuchi, "Altemicidine, a new acaricidal and antitumor substance. II. structure determination", *J. Antibiot.*, 42, pp. 1562-1566, 1989.
- [10] T. Hasegawa, Y. Kimura, K. Hiromatsu, N. Koba-

- yashi, A. Yamada, M. Makino, M. Okuda, T. Sano, K. Nomoto and Y. Yoshikai, "Effect of hot water extract of *Chlorella vulgaris* on cytokine expression patterns in mice with murine acquired immunodeficiency syndrome after infection with *Listeria monocytogenes*", *Immunopham.*, 35, pp. 273-282, 1997.
- [11] T. Hasegawa, K. Ito, S. Kumamoto, Y. Ando, A. Yamada, K. Nomoto and Y. Yasunobu, "Oral administration of a hot water extracts of *Chlorella vulgaris* reduces IgE production against milk casein in mice", *Int. J. Immunopharmacol.*, 21, pp. 311-323, 1999.
- [12] 한재갑, 강기권, 김진국, 김상환, "클로렐라 추출물 현황 및 전망", *식품과학과 산업*, pp. 64-69, 6월, 2002.
- [13] E. W. Becker, "Comparative toxicological studies with algae in India, Thailand and Peru", *Algae Biomass*, In Shelef and Soeder(Eds.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 767-786, 1980.
- [14] S. C. Wilkinson, K. H. Goulding, and P. K. Robinson, "Mercury removal by immobilized algae in batch culture system", *J. Appl. Phycol.*, 2, pp. 223-230, 1990.
- [15] 박영인, "미백작용 물질의 탐색 및 이용기술", *과학기술부*, 1994.
- [16] H. Lee, J. Lee, D. Kim, M. In and W. Hwang, "The inhibitory effects of propolis on *in vitro* proliferation of human cancer cell", *Korean Nutr. Soc.*, 33, pp. 80-85, 2000.
- [17] K. Morita, M. Hara and T. Kada, "Studies on natural desmutagens : screening for vegetable and fruit factors active in inactivation of mutagenic pyrolysis products from amino acid", *Agric. Biol. Chem.*, 42, pp. 1235-1241, 1987.
- [18] J. Seo, Y. Lee, N. Suh and I. Chang, "Assay of anti-mutagenic activities of vegetable plants", *Korean J. Pharm.*, 21, pp. 88-97, 1990.
- [19] M. Wall, M. Wani, G. Manikumar, H. Taylor, T. Hughse and K. Gaetono, "Plant antimutagenic agents : structure and antimutagenic properties of cymobarbatol and 4-isocymobarbatol, new cypols from green alga (*Cymopolia barbata*)", *J. Nutr. Prod.*, 52, pp. 1092-1099, 1989.
- [20] C. Bardifield and L. Bjeldanes, "Effect of dietary indole-3-carbinol on intestinal and hepatic monooxygenase, glutathione S-transferase and epoxide hydrolase activities in the rat", *Food Chem.*, 22, pp. 977-982, 1984.
- [21] F. Konishi, K. Tanaka, S. Kumamoto, T. Hasegawa, M. Okuda, I. Yano, Y. Yoshikai and K. Monoto, "Enhanced resistance against *Escherichia coli* infection by subcutaneous administration of the hot-water extract of *Chlorella vulgaris* in cyclophosphamide-treated mice", *Cancer Immunol. Immunother.*, 32, pp. 1-7, 1990.
- [22] S. Lee, J. S. Park, S. Y. Kim and S. R. Chung, "The screening of the inhibitory compounds on tyrosinase activity from the natural product", *Yakhak Hoeji*, 41, pp. 456-461, 1997.
- [23] B. A. Slominski and L. D. Campbell, "Gas chromatographic determination of indoleacetoneitriles in rape-seed and brassica vegetables", *J. Chromatogr.*, 454, pp. 285-291, 1988.
- [24] F. Denizot and H. Lanf, "Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensivity and reliability", *J. Immuno. Methods*, 89, pp. 271-277, 1986.
- [25] 김용호, "클로렐라가 생리활성에 미치는 영향", *식품산업*, pp. 122-128, 9월, 1999.
- [26] N. Baurin, E. Arnoult, T. Scior, Q. T. Do and P. Bernard, "Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity", *J. Ethnopharm.*, 82, pp. 155-158, 2002.
- [27] S. Jung, N. Lee, S. Kim and D. Han, "Screening of tyrosinase inhibitor from plants", *Korean J. Food Sci. Technol.*, 27, pp. 891-896, 1995.
- [28] J. Kim, W. Cha, J. Park, S. Oh, Y. Cho, S. Chun and C. Choi, "Inhibition effect against tyrosinase of condensed tannins from Korean green tea", *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 29, pp. 173-177, 1997.
- [29] S. H. Lee, J. J. Kim, T. S. Jang and S. R. Chung, "The isolation of the inhibitory constituents on melanin polymer formation from the leaves of *Cercis chinensis*", *Kororean J. Pharmacol.*, 30, pp. 397-403, 1999.
- [30] K. Noda, N. Ohno, K. Tanaka, N. Kamiya, M. Okuda, T. Yadomae, K. Nomoto and Y. Shoyama, "A water soluble antitumor glycoprotein from *Chlorella vulgaris*", *Plant Med.*, 62, pp. 423-426, 1996.
- [31] F. Konishi, M. Misuyama, M. Okuda, K. Tanaka, T. Hasegawa and K. Nomoto, "Protective effect of an acidic glycoprotein obtained from culture of *Chlorella vulgaris* against myelosuppression by 5-fluouracil", *Cancer Immunol. Immuno.*, 42, pp. 268-274, 1996.
- [32] T. Hasegawa, Y. Yoshikai, M. Okuda and K. Nomoto, "Accelerated restoration of the leukocyte number and augmented resistance against *Escherichia coli* in cyclophosphamide-treated rats orally administered with a hot water extract of *Chlorella vulgaris*", *Int. J. Immunopharm.*, 12, pp. 883-891, 1990.

- [33] K. Ibusuki and Y. Minamishima, "Effect of *Chlorella vulgaris* extracts on murine cytomegalovirus infections", *Nat. Immun. Cell Growth Regul.*, 9, pp. 121-128, 1990.
- [34] T. Hasegawa, K. Tanaka, K. Ueno, S. Ueno, M. Okuda, Y. Yoshikai and K. Nomoto, "Augmentation of the resistance against *Escherichia coli* by oral administration of a hot water extract of *Chlorella vulgaris* in rat", *Int. J. Immunopham.*, 11, pp. 971-976, 1989.