Journal of Life Science **2008** Vol. 18. No. 12. 1723~1727 ©JLS / ISSN 1225-9918

클로렐라 균주의 분리 동정 및 열수 추출물의 이화학적 조성

차재영[1] · 김정욱 · 박보경 · 진현진[2] · 김성영[3] · 조영수*

동아대학교 생명공학과, [1]대선주조(주) 기술연구소, [2](주)클만사, [3]안동과학대학 식품계열

Received October 13, 2008 / Accepted November 24, 2008

Isolation and Identification of *Chlorella* sp. CMS-1 and the Chemical Composition of Its Hot Water Extract. Jae-Young Cha[1], Jung-Wook Kim, Bo-Kyung Park, Hyun-Jin Jin[2], Sung-Young Kim[3] and Young-Su Cho*. *Department of Biotechnology, Dong-A University, [1]Alcoholic Beverage Research Institute, Daesun Distilling Co. Ltd. and [2]Chlmansa Co. Ltd, [3]Dep. of Food Science, Andong Science College* - *Chlorella* sp. CMS-1 strain was isolated from the outdoors cultivation pools in Culmansa Co., Ltd. This strain was found to be a rounded type of 3 μm. Phylogenetic analysis by the 18S rRNA sequencing using isolated strain is most similar to *Chlorella* sp. IFRPD 1018 gene at the level of nucleotide sequence identity at 99%. Accordingly, the isolated *Chlorella* strain was named as *Chlorella* sp. CMS-1 based on its morphological and phylogenetic properties. The concentrations of crude protein and fat were 59% and 0.01%, respectively. Major compositional amino acids (mg%) were glutamic acid 6.21, alanine 5.76, aspartic acid 5.44%, glycine 4.29%, and threonine 3.09% and major free amino acids (mg%) were γ-aminobutyric acid (GABA) 7.13%, L-alanine 1.44%, L-glutamic acid 0.90, L-leucine 0.26% and L-glycine 0.20%. The concentrations of major minerals were P 2.25%, K 2.25%, Na 1.09%, Mg 0.63%, and Ca 0.28%.

Key words : *Chlorella* sp. CMS-1, amino acid, minerals, γ-aminobutyric acid (GABA)

서 론

기능성 생물소재로 각광받고 있는 미세조류는 전체 종의 약 0.1% 만이 알려져 있고, 이중 한 종류인 클로렐라(*Chlorella*)는 담수 녹조 단세포생물로 크기는 0.002~0.01 mm 이지만 알칼리도가 가장 높고, 필수 아미노산, 미네랄, 비타민 및 식이섬유소 등 인체 필수 영양소를 균형 있게 함유하여 미래 식품 또는 꿈의 식품으로 불리기도 한다[2,9,18]. 미세조류는 고 농도의 단백질과 지질 축적능으로 인해 식이 보조제(supplement food)나 biomass로 인식되어 미래 식량자원의 유력한 후보로 평가되어 왔다[3,13].

담수 녹조 미세조류인 클로렐라는 간 기능 개선[21], 생체 내의 중금속 축척억제 및 배설[21], 면역기능 향상[5], 항암작용[6], 항산화 작용[10,19,22], 혈압강하 작용[12], 혈당강하 작용[4,17] 및 콜레스테롤 저하[15,20]와 같은 다양한 생리활성기능을 가지고 있기 때문에 클로렐라를 이용한 제품들과 식품첨가물, 화장품 원료 등이 다양하게 출시되고 있는 실정이다. 또한 클로렐라 열수 추출물에도 동식물 성장촉진, 면역력 증강[7,16], 간 기능 개선 작용 및 지질 저하 작용[8]도 잘 알려져 있다.

이와 같이 클로렐라 열수 추출물에도 다양한 생리활성 작용이 알려져 있지만 영양학적 측면의 기초 연구라 할 수 있는 이화학적 분석은 거의 이루어져 있지 않다. 따라서 본 실험에서는 이러한 영양학적 기초 자료를 얻을 목적으로 클로렐라 생육이 빠른 균주를 분리하여 동정하고, 그 균주의 열수 추출물의 이화학적 특성을 조사하였다.

***Corresponding author**
Tel : +82-51-200-7586, Fax : +82-51-200-7505
E-mail : choys@dau.ac.kr

재료 및 방법

실험 재료

본 연구에 사용된 클로렐라 균주는 경남 김해시에 위치한 (주)클만사의 클로렐라 옥외 배양장에서 분리하였다. 클로렐라 배양액을 1 ml 취하여 희석한 후에 배양장 배지에 1.5% agar를 첨가한 고체배지에 도말하고 25°C에서 colony가 육안으로 보일 때까지 배양한 후, 형태가 우수하고 생육이 빠른 단일 colony를 순수 분리하여 클로렐라 종균으로 사용하였다.

클로렐라 균주의 동정

순수 분리한 클로렐라 colony의 genomic DNA를 추출하여 18S rRNA sequencing은 한양대학교 자연과학대학 식물공학연구실에 의뢰하여 동정하였다.

클로렐라 균주의 전자 현미경 사진 검경

순수 분리한 클로렐라 균주를 액체 배양한 후 전자현미경으로 클로렐라 균주의 형태를 관찰하였다. 이때 전처리 방법은 배양액을 원심분리 한 후, 상징액을 제거하고 2.0% glutaraldehyde를 4°C에서 30분간 처리하여 pre-fixation하였다. Pre-fixation한 용액을 제거한 후에 1% (v/v) osmiun tetr-

oxide를 4°C에서 2시간 처리하여 fixation하였다. Fixation 용액을 제거한 후, 각각 50, 70, 90, 95 및 100% 에탄올을 사용하여 탈수하였다. 탈수할 때의 온도는 4°C이며, 10분간 2회 처리하였다. 탈수한 클로렐라를 hexadiemthyl disilazane을 사용하여 건조하였다. 클로렐라의 형태를 관찰하기 위하여 전자현미경의 확대 비율을 각각 3,500배 및 20,000배로 하였다[11].

클로렐라 배양액의 농축 및 열수 추출

옥외 배양장에서 생육속도가 빠른 클로렐라 균주를 순수 분리하여 최적 배지 조성과 배양조건에서 대량배양 한 후 M/F농축기(Membrain Filter System, PHILOSEP RCM 60, PHILOSE Co., Ltd., Korea) 및 PHILOSEP RCM 60 내에 장착된 membrane filter를 통과시키면서 농축하였다. 클로렐라 농축액을 고압 멸균기(Autoclave)로 121°C에서 30분간 열처리한 후 규조토를 혼합하여 Filter Press (Korea Filter Co., Ltd., Korea)로 여과하였다. 여과된 추출물에 클로렐라 세포 파쇄물의 잔존여부를 확인한 후, 완전히 여과된 상태의 최종 클로렐라 열수 추출물을 100 kg 용량의 동결건조기(Freeze Dryer, Ilshin Lab, Korea)를 이용하여 열수추출물 건조 분말을 얻어 실험 재료로 사용하였다.

클로렐라 추출물의 이화학적 분석

클로렐라 추출물 분말 시료의 조단백질 및 조지방 분석은 AOAC (1995) 방법에 따라 단백질분석기(Tecator, Kjeltec 1030 Analyzer, Sweden) 및 조지방분석기(Tecator, Soxtec System 1046, Sweden)를 이용하여 각각 함량을 측정하였다. 클로렐라 추출물의 무기질은 ICP (Inductively Coupled Plasma Spectrometer, Perkin Elmer Optima 4300V ICP-OE, USA)를 이용하여 Ca, P, K, Na, Mg, Fe의 무기물을 분석하였다. 클로렐라 추출물의 구성 및 유리 아미노산은 아미노산 전용분석기(Sykam, amino acid analyzer S433, Germany)를 이용하여 분석하였다.

통계 처리

실험으로부터 얻어진 결과치는 one-way ANOVA에 의한 평균치와 표준오차(mean±SE)로 표시하였다.

결과 및 고찰

클로렐라 균주의 분리 및 동정

본 연구에 사용된 클로렐라 균주를 동정하기 위하여 배양된 클로렐라로부터 genomic DNA를 추출하여 18S rRNA primer로 PCR을 실시하였다. 예상 사이즈인 1.8 kb를 확인 한 후 gel elution을 통해 필요한 부분의 DNA를 얻어 sequencing하였다(Fig. 1). Sequnecing 결과 *Chlorella* sp. IFRPD 1018 gene과 99%의 높은 상동성이 확인되어 분리균주를 *Chlorella* sp. CMS-1으로 명명하였다(Fig. 2).

클로렐라 균주의 형태학적 관찰

순수 분리한 클로렐라 균주를 액체 배양한 후, osmium tetroxide로 고정화시켜 전자현미경의 확대 비율을 각각 3,500배 및 20,000배로 관찰한 결과 직경 약 3 μm의 구형의 형태를 유지하고 있었다(Fig. 3).

클로렐라 추출물의 조단백질 및 조지방 조성

클로렐라가 건강에 도움을 주는 식품으로 널리 알려진 바와 같이[9,18] 열수 추출물에 조단백질 함량이 59.21±0.62%로 많이 함유되어 있었다(Table 1). 조지방 함량은 0.01±0.02%로 아주 미량으로 함유되어 있었다(Table 1). 클로렐라 추출물에 함유된 풍부한 단백질 성분은 체내에서 단백질 분해 효소인 pancreatin과 trypsin의 가수분해에 의해 다양한 아미노산으로 분해되어 인체 내 구성 성분뿐만 아니라 효소 및 호르몬 등의 생리활성 기능을 증대시키는 것으로 알려져 있다[13]. *Chlorella pyrenoidosa* 분말에서 조단백질 함량은 58%로 본 실험 결과와 유사하였으나, 조지방 함량은 13%로 본 실험 결과보다 많이 함유한 것으로 나타났다[3]. 또한 *Chlorella vulgaris*

```
TTAGCCATGCATGTCTAAGTATAAACTGCTTTATACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGA
TGGTACCTACTACTCGGATACCCGTAGTAAATCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGACGTATT
TATTAGATAAAAGGCCGACCGGGCTCTGCCCGACTCGCGGTGAATCATGATAACTTCACGAATCGCATGGCCTTGCGC
CGGCGATGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGTAACGGGTGAC
GGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAA
ATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACTGGGCCTTTTCAGGTCTGGTAATTGGAATGAG
TACAATCTAAACCCCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATA
GCGTATATTTAAGTTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCGGGTGGGGCCTGCCGGTCCGCCGTTTCGGTGT
GCACTGGCAGGGCCCACCTTGTTGCCGGGGACGGGCTCCTGGGCTTCACTGTCCGGGACTCGGAGTCGGCGCTGTT
ACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCTACGCTCTGAATACATTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGC
CTATCCTGTTGGTCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCGTATTTCATTGTCAGAGGTG
AAATTCTTGGATTTATGAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTGG
GGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATCGGCGGATGTTTCTTCGA
TGACTCCGCCGGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAG
GAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTCCA
GACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGG
TTGCCTTGTCAGGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAAATAGTCACGGTTGGCTCGCCAGCCGGCG
GACTTCTTAGAGGGACTATTGGCGACTAGCCAATGGAAGCATGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCT
GGGCCGCACGCGCGCTACACTGATGCATTCAACGAGCCTAGCCTTGGCCGAGAGGCCCGGGTAATCTTTGAAACTGC
ATCGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTCAACGAGGAATGCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCGTT
GATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCCTACCGATTGGGTGTGCTGGTGAAGTGTTCGGATTGGCG
ACCGGGGGCGGTCTCCGCTCTCGGCCGCCGAGAAGTTCATTAAACCCTCCCACCTAGAGAAGAGAAGTCGAGCAG
```

Fig. 1. *Chlorella* sp. CMS-1 genomic DNA 18S rRNA sequencing.

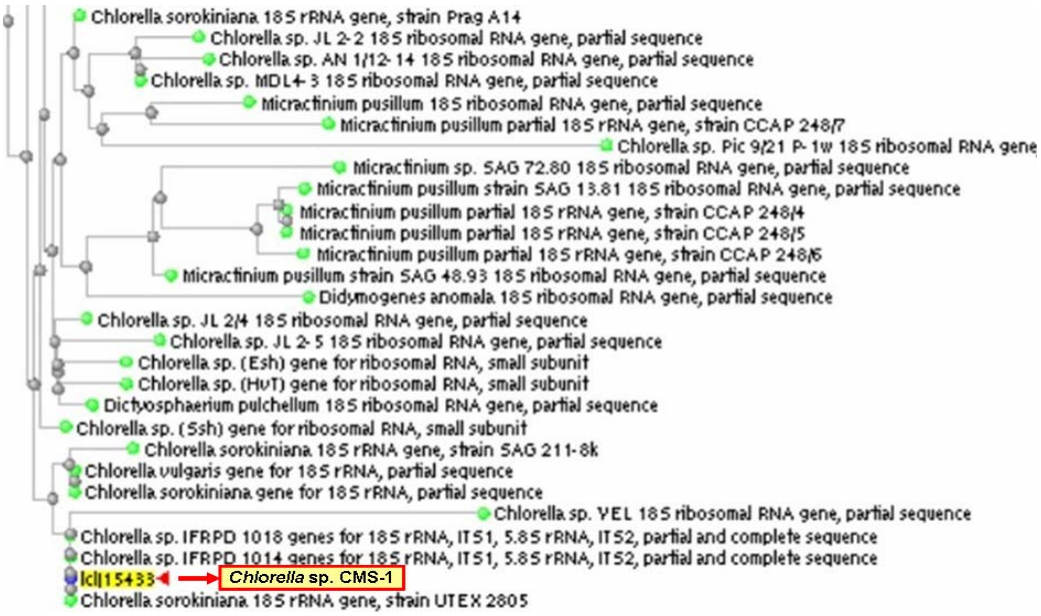

Fig. 2. Blast tree based on 18S rRNA primer sequences.

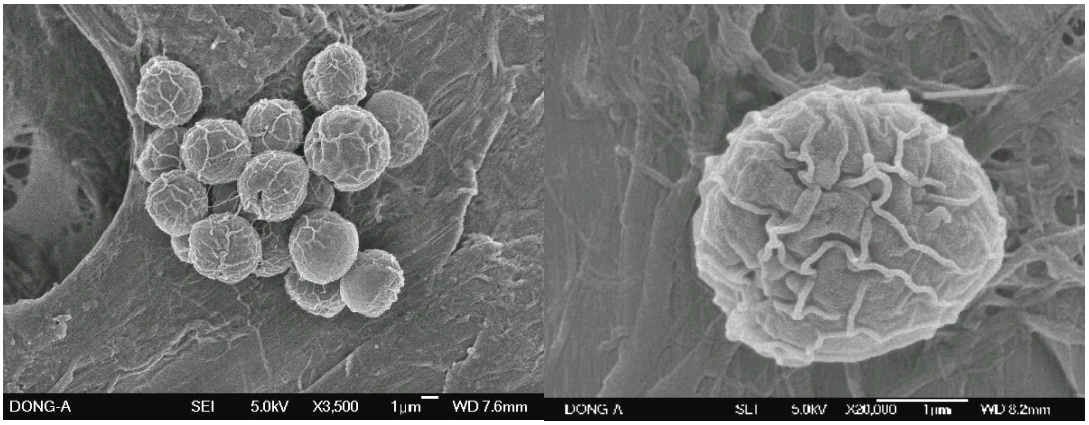

Fig. 3. Scanning electron microscopic observation of *Chlorella* sp. CMS-1. Scale bar: 1 μm.

87/1 분말 및 에탄올 추출물에서 조단백질 함량은 50.5% 및 45%로 각각 함유되어 있었고, 조지방은 7% 및 0.3%함유되어 본 실험 결과와 유사함을 보였다[5]. 특히 조지방 함량의 이러한 차이는 지방이 주로 세포벽을 구성하는 성분으로써 클로렐라 열수 추출물에는 세포벽을 제거시킨 상태로 지방 함량이 상대적으로 낮은 것으로 사료된다.

무기질 조성

클로렐라가 기능성 식품 소재로 인기가 많은 이유 중 하나가 풍부한 단백질 함유량 못지않게 단일 식품으로서 무기질과 비타민이 골고루 함유되어 있어 영양학적으로 우수하기 때문일 것이다[3,9]. 이는 체내 흡수되었을 경우 부족해지기 쉬운 무기질을 보충하여 균형을 유지하는데 도움을 주기 때문이다. 배양된 클로렐라의 열수 추출물에 무기질 성분을 분석한 결과, K 2.52%, P 2.25%, Na 1.09%, Mg 0.63%, Ca 0.28%, Fe 0.03% 순으로 함유되어 있었다(Table 2). *Chlorella pyrenoidosa* 건조분말에서 Ca과 Fe가 각각 0.244% 및 0.08%씩 함유되어 있어 본 실험 결과와 거의 유사하였다[4]. 클로렐라는 생체 내 중금속 축적을 억제하고 배설하는 기능이 있는데, 실험용 쥐에서 중금속과 클로렐라를 투여한 결과 뇨를 통해 13.3~40% 정도 배설이 증가되었고 보고하였다[14]. 이는 클로렐라에 함유된 아연, 칼슘, 마그네슘, 단백질 등의 영

Table 1. Concentrations of crude protein and lipid of *Chlorella* sp. CMS-1 hot water extract

Compositions	% per 100g dry weight (n=3)
Crude protein	59.21±0.62
Crude lipid	0.01±0.02

Table 2. Concentrations of mineral of *Chlorella* sp. CMS-1 hot water extract

Minerals	% per 100g dry weight (n=3)
Ca	0.28±0.00
P	2.25±0.01
K	2.52±0.01
Na	1.09±0.03
Mg	0.63±0.01
Fe	0.03±0.00

향으로 소장에서 체내 흡수가 억제되고, 주요 저장 장기인 간과 신장에서도 독성을 중화시키는 작용이 강해 조직의 손상을 완화시킨다고 하였다.

구성 및 유리 아미노산 조성

클로렐라 열수 추출물의 구성 아미노산을 분석한 결과 glutamic acid 6.21%, alanine 5.76%, aspartic acid 5.44% 순으로 많이 함유되어 있었다(Table 3). *Chlorella vulgaris* 에도 구성 아미노산이 46.9% 함유되어 있었고, 아미노산 조성은 glutamic acid 14.35%, alanine 11.47%, aspartic acid 10.14%, leucine 9.8% 순으로 많이 함유되어 있었다[13]. 또한 *Chlorella vulgaris* 에탄올 추출물의 구성 아미노산은 45.3% 함유되어 있었고, glutamic acid 14.30%, alanine 11.43%, aspartic acid 10.40%, leucine 10.08% 순으로 함유되어 있어 본 실험 결과와 유사한 결과를 보였으며, 클로렐라가 단백질 보급원으로 매우 유용하다고 하였다[13]. 또한 클로렐라에는 필수 아미노산인 isoleucine, leucine, lysine, phenylalanine, tyrosine, valine이 전체 아미노산 조성의 36%를 함유하고 있어 소고기 아미노산 조성보다 많이 함유되어 있으며, methionine과 tyrosine을 제외한 아미노산 조성이 계란과 거의 유사한 것으로 보고되었다[1]. 한편, 유리아미노산 중 항우울증 개선, 학습효과 향상, 숙취 해소 등에 도움을 주는 것으로 알려진 γ-aminobutyric acid (GABA)의 함유량이 전체 유리 아미노산의 63.8% 비율을 차지하는 것으로 확인되어(Table 4), 클로렐라 추출물에 함유된 고농도의 γ-aminobutyric acid의 임상학적 연구도 향후에 필요할 것으로 여겨진다.

Table 3. Concentrations of compositional amino acid of *Chlorella* sp. CMS-1 hot water extract

Compositional amino acids	% per 100g dry weight
Aspartic acid	5.44
Threonine	3.09
Serine	2.43
Glutamic acid	6.21
Proline	2.28
Glycine	4.09
Alanine	5.76
Valine	3.04
Isoleucine	1.87
Leucine	3.07
Tyrosine	2.05
Phenylalanine	2.18
Histidine	1.17
Lysine	2.42
Arginine	2.28

Table 4. Concentrations of free amino acid of *Chlorella* sp. CMS-1 hot water extract

Free amino acids	% per 100g dry weight
L-Aspartic acid	0.084
L-Threonine	0.180
L-Serine	0.097
L-Glutamic acid	0.895
L-Glycine	0.195
L-Alanine	1.436
L-Valine	0.193
L-Methionine	0.054
L-Isoleucine	0.127
L-Leucine	0.262
L-Tyrosine	0.141
L-Phenylalanine	0.157
γ-Aminobutyric acid	7.134
L-Lysine	0.160
1-Methyl-L-Histidine	0.059

이상과 같이 클로렐라 열수 추출물에도 고단백질과 함께 균형 잡힌 아미노산 조성 및 풍부한 무기질 성분이 함유되어 있어 영양학적으로도 우수성이 확인되었으며, 특히 유리 아미노산 조성 중 γ-aminobutyric acid (GABA) 성분의 생리활성 작용을 이용할 수 있는 기능성식품 개발을 기대해 볼만하다.

요 약

클로렐라의 생리활성 물질을 활용하여 기능성 식품을 개발하기 위한 기초 자료를 얻기 위하여 클로렐라 배양장에서 생육이 빠른 클로렐라를 분리하여 동정하고 이화학적 특성을 조사하였다. 분리된 클로렐라는 전형적인 둥근 모양과 3 μm 크기로 주름진 형태를 취하고 있었다. 분리된 클로렐라의 동정을 위하여 18S rRNA sequences를 실시한 결과 *Chlorella* sp. IFRPD 1018와 99%의 높은 상동성을 보여 *Chlorella* sp.와 거의 일치하여 *Chlorella* sp. CMS-1로 명명하였다. 클로렐라 열수 추출물에 조단백질 함량이 59.21%로 많이 함유되어 있었고, 조지방 함량은 0.01%로 미량 함유되어 있었다. 클로렐라 CMS-1의 무기질 농도는 K 2.52%, P 2.25%, Mg 0.63%, Ca 0.63% 순으로 함유되어 있었다. 클로렐라 CMS-1의 주요 구성 아미노산은 glutamic acid 6.21%, alanine 5.76%, aspartic acid 5.44% 순이였으며, 특히 유리아

미노산 중 γ-aminobutyric acid (GABA)의 함량은 7.13%로 전체 유리아미노산의 63.8% 비율로 차지하였고 그 다음으로 L-alanine 1.44%, L-glutamic acid 0.90%, L-leucine 0.26%, L-glycine 0.20% 순으로 함유되어 있었다.

감사의 글

본 연구는 동아대학교 교내학술연구비 지원으로 진행되었으며, 이에 감사드립니다.

References

1. Atsushi, M. 1999. What is *Chlorella*. *Food Ind.* **9**, 122-138.
2. Borowitzka, M. A. 1988. Vitamins and fine chemicals from micro-algae, pp. 153, *In* Borowitzka, M. A. and L. J. Borowitzka (eds.), *Micro-algal Biotechnology*, Cambridge University Press, New York,
3. Cherng, J. Y. and M. F. Shih. 2005. Preventing dyslipidemia by *Chlorella pyrenoidosa* in rats and hamsters after chronic high fat diet treatment. *Life Sci.* **76**, 3001-3013.
4. Cherng, J. Y. and M. S. Shih. 2006. Improving glycogenesis in Streptozocin (STZ) diabetic mice after administration of green algae *Chlorella*. *Life Sci.* **78**, 1181-1186.
5. Guzman, S., A. Gato, M. Lamela, M. Freire-Garabal and J. M. Calleja. 2003. Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of polysaccharide from *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytother. Res.* **17**, 665-670.
6. Hasegawa, T., T. Matsuguchi, K. Noda, K. Tanaka, S. Kumamoto, Y. Shoyama and Y. Yoshikai. 2002. Toll-like receptor 2 is at least partly involved in the antitumor activity of glycoprotein from *Chlorella vulgaris*. *Int. Immunopharmacol.* **2**, 579-589.
7. Hasegawa, T., Y. Kimura, K. Hiromatsu, N. Kobayashi, A. Yamada, M. Makino, M. Okuda, T. Sano, K. Nomoto and Y. Yoshikai. 1997. Effects of hot water extract of *Chlorella vulgaris* on cytokine expression patterns in mice with murine acquired immunodeficiency syndrome after infection with *Listeria monocytogenes*. *Immunopharmacology* **35**, 273-282.
8. Hidaka, S., Y. Okamoto and M. A. Arita. 2004. Hot water extract of *Chlorella pyrenoidosa* reduces body weight and serum lipids in ovariectomized rats. *Phytother. Res.* **18**, 164-168.
9. Kay, P. A. 1991. Microalgae as food and supplement. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **30**, 555-573.
10. Lee, H. S., C. Y. Choi, C. Cho and Y. Song. 2003. Attenuating effect of *Chlorella* supplementation on oxidative stress and NFkappaB activation in peritoneal macrophages and liver of C57BL/6 mice fed on an atherogenic diet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 2083-2090.
11. Lee, J. S. 1966. Electron microscopic studies on the ultrastructure of pyrenoid and cell wall in *Chlorella* cells. *Kor. J. Microbiol.* **4**, 1-13.
12. Merchant, R. E., C. A. Andre and D. A. Sica. 2002. Nutritional supplementation with *Chlorella pyrenoidosa* for mild to moderate hypertension. *J. Med. Food* **5**, 141-152.
13. Morris, H. J., A. Almarales, O. Carrillo and R. C. Bermudez. 2008. Utilisation of *Chlorella vulgaris* cell biomass for the production of enzymatic protein hydrolysates. *Bioresour Technol.* [Epub ahead of print]
14. Nagao, T., Y. Watanabe, T. Honma, Y. Suketa and T. Yamamoto. 1978. Absorption and excretion of cadmium by the rat administered cadmium-containing *Chlorella*. *Eisei Kagaku* **24**, 7182-7186.
15. Okudo, M., T. Hasegawa, M. Sonoda, T. Okabe and M. Tanaka. 1975. The effects of *Chlorella* on the level of cholesterol in serum and liver. *Jap. J. Nutr.* **33**, 3-8.
16. Queiroz, M. L., C. Bincoletto, M. C. Valadares, D. C. Dantas and L. M. Santos. 2002. Effects of *Chlorella vulgaris* extract on cytokines production in *Listeria monocytogenes* infected mice, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **24**, 483-496.
17. Rodriguez-Lopez, M. and C. Lopez-Quijada. 1971. Plasma glucose and plasma insulin in normal and alloxanized rats treated with *Chlorella*. *Life Sci.* **10**, 557-608.
18. Schubert, L. E. 1988. The use of *Spirulina* (Cyanophycaea) and *Chlorella* (Chlorophyceae) as food resource for animals and humans. pp. 237, In Round F. E. and D. J. Chapman (eds.), *Progressing Physiological Research*, Biopress Ltd.
19. Shibata, S., Y. Natori, T. Nishihara, K. Tomisaka, K. Matsumoto, H. Sansawa and V. C. Nguyen. 2003. Antioxidant and anti-cataract effects of *Chlorella* on rats with streptozotocin-induced diabetes, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **49**, 334-339.
20. Shibata, S., K. Oda, N. Onodera-Masuoka, S. Matsubara, H. Kikuchi-Hayakawa, F. Ishikawa, A. Iwabuchi and H. Sansawa. 2001. Hypocholesterolemic effect of indigestible fraction of *Chlorella vulgaris* in cholesterol-fed rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **47**, 373-377.
21. Shim, J. Y., H. S. Shin, J. G. Han, H. S. Park, B. L. Lim, K. W. Chung and A. S. Om. 2008. Protective effects of *Chlorella vulgaris* on liver toxicity in cadmium-administered rats. *J. Med. Food* **11**, 479-485.
22. Tanaka, K., A. Yamada, K. Nada, Y. Shoyama, C. Kubo and K. Nomoto. 1997. Oral administration of a unicellular green algae, *Chlorella vulgaris*, prevents stress-induced ulcer. *Plant Med.* **63**, 465-466.