

## 해수클로렐라 (*Chlorella elliposidea* C020) 에탄올 추출물에 대한 생리 활성

<sup>1</sup>김 현 진 · <sup>1</sup>김 인 혜 · † <sup>1,2</sup>이 재 화  
<sup>1</sup>신라대학교 의생명과학대학 제약공학과 <sup>2</sup>신라대학교 공과대학 생명공학과  
(접수 : 2008. 2. 14., 게재승인 : 2008. 4. 14.)

## Biological activities of ethanol extract from the seawater algae, *Chlorella elliposidea* C020

Hyun-Jin Kim<sup>1</sup>, In Hae Kim<sup>1</sup>, and Jae-Hwa Lee<sup>1,2†</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Engineering, Collage of Medial Life Science, Silla University,  
Kwebondong Sasanggu, Busan Korea, 617-736

<sup>2</sup>Department of Bioscience and Biotechnology, Collage of Engineering, Silla University,  
Kwebondong Sasanggu, Busan Korea, 617-736

(Received : 2008. 2. 14., Accepted : 2008. 4. 14.)

We investigated the biological activities of ethanol extract from the seawater algae, *Chlorella elliposidea* C020 such as antibacterial activity, anti-oxidant activity, tyrosinase inhibitory activity and hemolytic activity against human erythrocytes. Extract was obtained from various solvent, methanol, ethanol, acetone and ethanol + acetone (1:1, v/v%), 95% ethanol proved to be best extraction solvents. The contents of ethanol extract were higher in freeze-dried sample than that in frozen-thawing. Antibacterial activities of ethanol extract showed strong inhibitory effect against *Bacillus subtilis* PM125, *Bacillus licheniformis* and fish pathogenic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus* KCTC2471 and *Edward tarda* NUF251. However, this extract didn't worked against antifungal activity against *Candida albicans* KCTC1940. And, ethanol extract was without hemolytic activity against human erythrocytes. The ethanol extract showed 75% of free radical scavanging effect on 2.0 mg/mL using DPPH method. In tyrosinase inhibition assay of ethanol extract, IC<sub>50</sub> (Inhibition Concentration) was measured as 10.87 mg/mL. Conclusionally, ethanol extract of *Chlorella elliposidea* C020 has good candidate for bioactive materials.

**Key Words** : *Chlorella elliposidea* C020, antibacterial activity, antioxidant activity, DPPH, tyrosinase inhibitory activity

### 서 론

최근 건강과 well-being에 대한 관심이 증가함에 따라 기능성 생물소재에 대한 관심도 점점 증가하고 있다. 이러한 기능성 생물소재는 대부분 미생물을 대상으로 연구가 수행되었으나, 최근 국내외적으로 미세조류에서 다양한 생리활성물질이 발견

되어, 이를 자원으로 이용하려는 연구가 활발히 진행되면서 미세조류가 생산하는 고부가가치 생리활성물질에 관심이 매우 증대되고 있다(1-3). 이러한 미세조류의 산업적 이용에 대한 연구는 1940년대 2차 세계대전 중 독일에서 식물성 지방을 생산하기 위하여 본격적으로 시작되었으며, 그 후 녹조류인 클로렐라로부터 지방과 단백질을 생산하기 위한 연구가 활발하게 이루어졌다(4-6). 최근 미세조류는 새로운 기능성 생물 소재로 연구되고 있으며, 미세조류의 산업적 이용은 대체에너지원(7) 및 건강보조식품(8, 9), 수산양식용 사료(10) 및 의약 원료 물질(11-13)과 더불어 생화학 물질 등의 응용분야에 이용되고 있는 실정이다(14).

특히, 미세조류 중 대표종인 클로렐라는 녹조류 (Chlophytae) 로 식물 성장요소가 있으면 빛과 이산화탄소를 이용한 독립 영양적 성장 증식(1, 15)을 하며, 현재 사료와 식품의 1, 2차적

† Corresponding Author : Department of Pharmaceutical Engineering, Collage of Medial Life Science, Silla University, Kwebondong Sasanggu, Busan Korea, 617-736, Department of Bioscience and Biotechnology, Collage of Engineering, Silla University, Kwebondong Sasanggu, Busan Korea, 617-736

Tel : +82-51-999-5831, Fax : +82-51-999-5636

E-mail : jhalee@silla.ac.kr

목적으로 사용되어 영양학적 우수성이 확인되었으며(16, 17), 또한 항암활성(18) 외의 3차적 식품으로서 기능성 탐색이 활발히 진행 중에 있다. 그 예를 살펴보면, 환경 호르몬인 다이옥신의 체내 배출(19), 체내 중금속의 축적억제 및 배설, 환경 독성 물질의 생물학적 분해(20), 동맥경화 및 간장 장애의 억제(21), 항암활성(18, 22), 면역기능 강화(23), 세포의 부활작용(24)등과 함께 식품의 풍미향상 및 보습효과(17)등의 기능이 보고된 바 있다. 또한, 이외에 클로렐라를 수산 양식용 사료로 사용하거나(25), 폐수에 존재하는 수은의 제거를 위한 기능소재로 활용하기 위한 연구가 보고된 바 있다(15). 클로렐라 열수 추출물은 동식물의 성장 촉진 및 유아와 성장기 어린이의 성장을 촉진함과 더불어 면역증강, 항균, 항암효과, 세포부활 등의 효과가 검증되어 보고되어 왔다(15).

지금까지의 클로렐라 관련 연구는 클로렐라 열수추출물 또는 가수 분해물(15)을 이용하였으나, 본 연구에서는 용매 추출법을 이용한 해수클로렐라 추출물의 여러 가지 생리활성 중 항균 및 항곰팡이 활성, 항산화 활성, 미백과 용혈 활성을 검토하여 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 클로렐라 배양 및 추출물 제조

해수클로렐라 (*Chlorella ellipsoidea* C020)은 한국해양조류은행에서 분양받아 사용했으며, 배양 후 원심분리 한 균체를 95% 에탄올로 2회 세척 한 후 사용할 때까지 -20℃에서 보관하였다. *Chlorella ellipsoidea* C020은 f/2 배지 (Table 1)에서 광 3500 lux, 14시간:10시간 (light : dark) 광주기 조건으로 25℃에서 10일 동안 배양하였다.

Table 1. Composition of Medium for Chlorella (1L seawater 기준)

Stock	Stock solution	mL/L
NaNO <sub>3</sub>	75.0g/L	1.0 mL
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	5.0g/L	1.0 mL
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O	30.0g/L	1.0 mL
* f/2 Trace Metal Solution	( 1 L dH <sub>2</sub> O 기준)	1.0 mL
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O		3.15 g
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O		4.36 g
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	9.8g/L	1.0 mL
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	6.3g/L	1.0 mL
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	22.0g/L	1.0 mL
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	10.0g/L	1.0 mL
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	180.0g/L	1.0 mL
** f/2 Vitamin Solution	( 1 L dH <sub>2</sub> O 기준)	0.5 mL
Vitamin B12 (Cyanocobalamin)	1.0g/L dH <sub>2</sub> O	1.0 mL
Biotin	0.1g/L dH <sub>2</sub> O	10.0 mL
Thiamine HCl		200.0 mg

동결건조 시료의 제조는 세척한 균체를 -70℃에서 동결 후 실시하였으며, 분말은 상온에서 그늘진 곳에서 보관하였다. 동결-해동의 시료는 세척한 균체를 -20℃에서 보관 후 실온에서 해동한 후 각 용매별로 추출하였다. 초음파

파쇄를 이용한 시료 제조는 -20℃에서 보관 후 실온에서 해동한 균체에 각각의 용매를 넣어서 추출하였다. 효율적인 추출을 위하여 메탄올, 에탄올, 아세톤과 에탄올+아세톤 (1:1, V/V%)을 이용하여 4℃, 2시간동안 3회 추출을 반복 실시하였다.

#### 시약 및 재료

Tryptic Soy Broth (TSB)와 Lactose-Boullion (LB), Potato Dextrose Agar (PDA) 및 Muller-Hinton Broth (MHB)는 Merck사 (Darmstadt, Germany)에서 구입하여 실험에 사용하였다. Trifluoroacetic acid (TFA), ascorbic acid 및 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), mushroom tyrosinase 및 tyrosine 는 Sigma사 (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, 그 이외의 모든 시약은 특급을 사용하였다.

#### 항균활성

해수클로렐라 추출물의 최소저해농도 (minimal inhibitory concentration, MIC)와 최소살균농도 (minimal bacteriocidal concentration, MBC)를 조사하기 위해 gram-positive bacteria로서 *Bacillus subtilis* PM125, *Bacillus licheniformis*, *Micrococcus luteus* KCTC1056 및 *Staphylococcus aureus* KCTC1916 등을 사용하였고, gram-negative bacteria로는 *Escherichia coli* D31, *Escherichia coli* KCTC1184, *Enterobacter aerogenes* KCTC2190, *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2208, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC2004 및 *Salmonella typhimurium* KCTC 1925를 사용하였으며, 어병 세균으로는 *Vibrio parahaemolyticus* KCTC2471 과 *Edward tarda* NUF251을 사용하였다.

#### 항곰팡이 활성

항곰팡이의 활성 측정은 liquid growth assay method로 측정하였다(26). *Candida albicans* KCTC1940는 potato dextrose broth (PDB) 배지를 사용하여 30℃에서 48시간 배양하였다. 곰팡이의 농도는 1 × 10<sup>6</sup> CFU/mL이 되도록 희석하여 96 well plate에 곰팡이 배양액과 연속적으로 희석한 해수클로렐라 추출액을 혼합하였다. 이들은 30℃에서 48시간 동안 배양한 후 microplate multi-detection reader (Synergy HT, Biotek, USA)을 이용하여 630 nm에서 측정하였다.

#### 용혈활성

용혈활성을 측정하기 위해서 신선한 적혈구를 150 mM NaCl을 포함한 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)로 세척하여 최종 적혈구의 농도를 5% (v/v%)가 되도록 조정하였다(27). 적혈구 용액과 연속적으로 희석한 해수클로렐라 추출물을 넣어 37℃에서 1시간 배양 후, 원심분리 (8,000 g × 10 min, 4℃)를 행하였다. 그 상층액을 microplate multi-detection reader (Synergy HT, Biotek, USA)을 이용하여 450 nm에서 측정하였다. 적혈구에 시료액이 포함되지 않은 것을 0% (C)로 하고, 1.0% Triton X-100을 넣었을 때의 흡광도를 100% (B)로 정의하여, 시료용액을 첨가했을 때 나타나는 상대적인 흡광도 (S)로부터 용혈활성 %를 계산하였다. 표준시료로는 강력한 벌독 유래의 mastoparan이라는 물질을 사용하였다.

$$\text{Hemolysis activity (\%)} = (S-C/B-C) \times 100$$

S : 시료용액을 첨가했을 때 나타나는 상대적인 흡광도  
 B : 1.0% Triton X-100을 넣었을 때의 흡광도  
 C : 적혈구에 시료액이 포함되지 않은 경우의 흡광도

**항산화 활성**

Free radical scavenging activity를 측정하기 위하여 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 방법을 사용하였다(27). DPPH 16 mg을 100 mL 에탄올에 녹여 준비하고 시료 50 µL 에 DPPH stock 용액을 500 µL 넣은 다음 total volume이 1.0 mL 되도록 에탄올을 첨가하여 실온에서 30분간 반응시킨 후, spectrophotometer (Mecacys, Co. Ltd, Korea) 517 nm 에서 측정한다. 표준시료로는 ascorbic acid를 사용하였다. 시료의 흡광도를 (As)로 표준시료의 흡광도를 (Ao)로 하여 항산화 효과를 측정하였다.

$$\text{Radical Scavenging Activity (RSA, \%)} = [(A_o - A_s)/A_o] \times 100$$

Ao : 표준시료의 흡광도  
 As : 시료의 흡광도

**Tyrosinase 효소활성 저해 측정**

Tyrosine을 기질로 이용한 tyrosinase 효소활성의 저해는 Ishihara(28)등의 방법을 변형하여 실시하였다. 0.1 M 인산염완충액 (pH 6.5) 220 µL, 1.5 mM Tyrosine 40 µL, 시료 20 µL의 혼합용액에 mushroom tyrosinase (1500 U/mL~2000 U/mL)를 20 µL를 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 96 well plate에 반응액 200 µL를 넣고, 그 상층액을 microplate multi-detection reader (Synergy HT, Biotek, USA) 을 이용하여 490 nm에서 측정하였다. 표준시료로는 albutin 을 사용하였다.

$$\text{Tyrosinase inhibition activity} = 100[1-(S-B)/C]$$

S : Tyrosinase 및 시료액 첨가 시 흡광도 변화값  
 B : Tyrosinase 대신 0.1M 인산염완충액 (pH 6.5) 첨가시의 흡광도 변화값  
 C : 시료용액 대신 시료를 녹인 용매 첨가시의 흡광도 변화값

**결과 및 고찰**

**추출 방법에 따른 추출물 함량**

해수클로렐라로부터 효율적인 추출을 위해 동결해동 (freeze-thawing), 동결건조 (lyophilization), 초음파 파쇄 (ultrasonication)를 실시하였다. 동결해동인 경우 95% 에탄올 추출물이 가장 추출 효율이 좋았으며(Fig. 1A), 동결건조인 경우 역시 95% 에탄올 추출물이 가장 추출 효율이 좋았으며(Fig. 1B), 다음으로 초음파 분쇄인 경우에는 3분일 때가 추출효과가 가장 높은 것으로 나타났다(Fig. 1C). 각 시료를 용매별로 추출한 결과, 시료에 따른 추출용매의 차이는

있었지만, 95% 에탄올이 가장 좋은 추출 용매임을 알 수 있었다(Fig. 1). 동결건조 한 시료는 1회의 추출로 대부분 추출되는 반면, 동결-해동한 시료의 경우에는 효율적인 추출을 위해서 2회 추출까지 필요함을 알 수 있었다. 동결-해동 시료 추출에서 함량이 가장 높은 경우는 95% 에탄올로 2회 추출한 경우로 75.6 mg/L이었으며, 동결 건조한 시료의 경우에는 95% 에탄올로 1회 추출한 경우로 185.5 mg/L이었다. 또 다른 방법으로, 초음파 파쇄기를 이용하여 추출한 경우에는 3분, 145.12 mg/L로 가장 높은 함량이 추출되었다. 효율적인 추출을 위해서 동결건조 후 95% 에탄올로 2시간 추출하는 것이 가장 좋다는 것을 알 수 있었다.

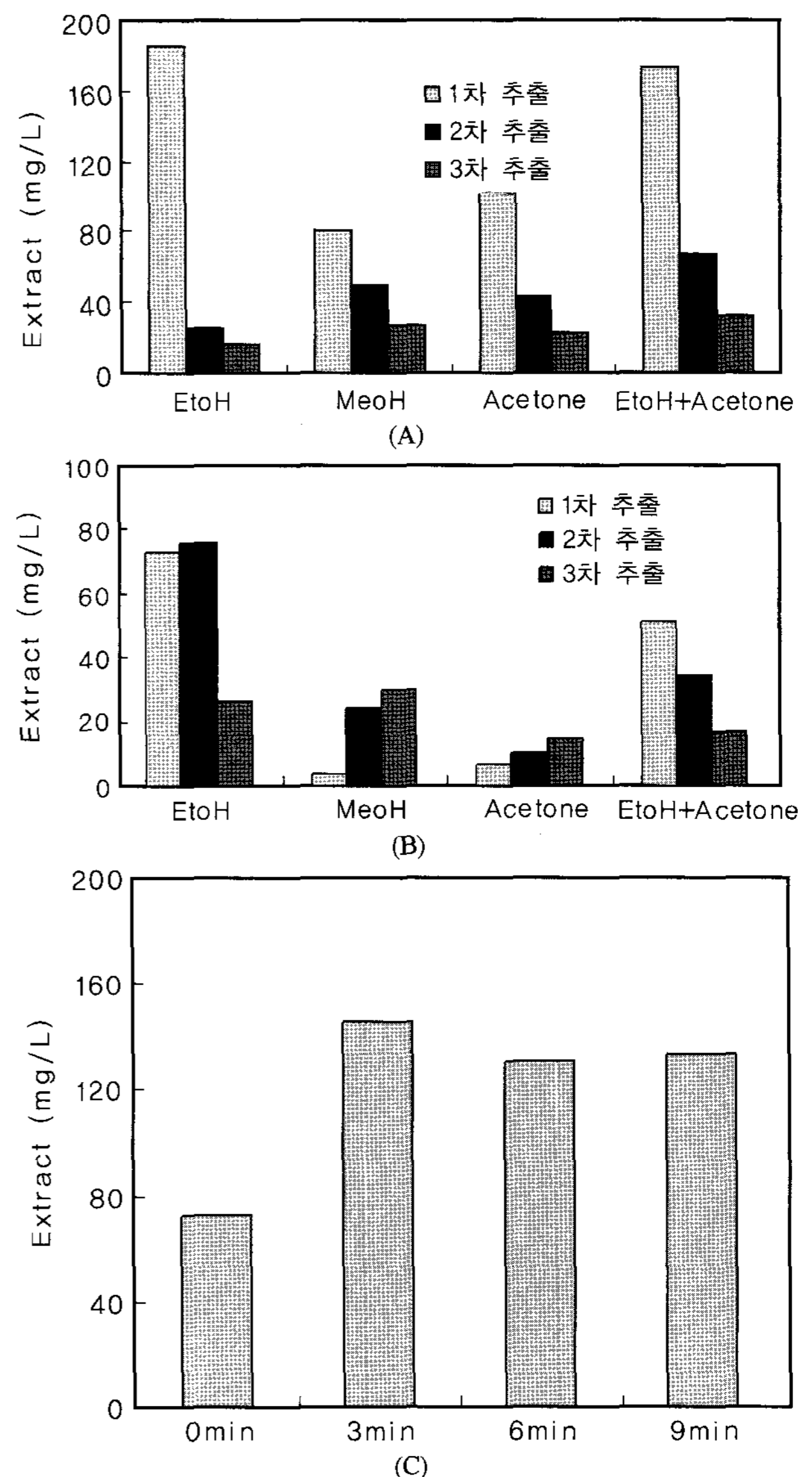


Figure 1. Extract contents from the seawater algae, *Chlorella ellipsoidea* C020. (A) lyophilization sample (B) freeze-dried sample and (C) ultrasonication sample.

**항균활성 및 항곰팡이 활성**

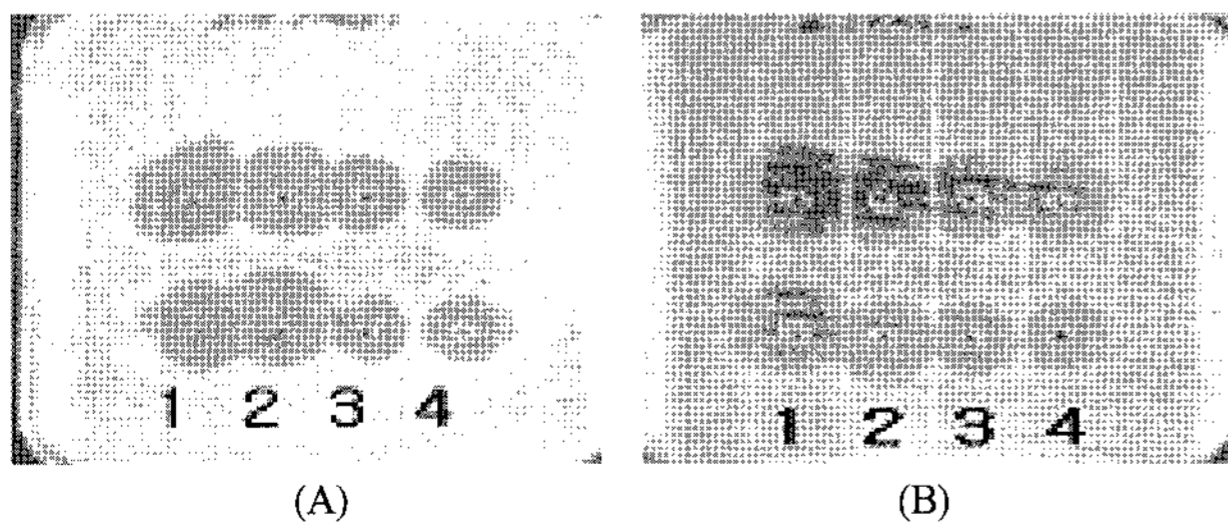
해수클로렐라 에탄올 추출물의 항균 및 항곰팡이에 대한 활성을 최소저해농도 (minimal inhibitory concentration, MIC)와 최소살균농도 (minimal bacteriocidal concentration,

MBC)로 측정하였다. Table 2의 결과를 보면, gram-positive bacteria인 *B. subtilis* PM125와 *B. licheniformis*에 대해서만 최소저해농도와 최소살균농도로 125 µg/mL에서 활성을 나타내었다. 특히, gram-positive bacteria인 *Bacillus* sp.에 강한 활성을 나타내었다(Fig. 2). Gram-negative bacteria에서는 어류 병원성 세균인 *V. parahemolyticus*와 *E. tarda* NUF251에서 각각 125 µg/mL, 250 µg/mL에서 활성을 나타내었다. 해수클로렐라 추출물이 어류 병원성 세균에 대해 항균 활성을 나타내므로, 고부가가치 어류 사료로 개발이 가능하다고 판단된다. 반면에, 곰팡이인 *C. albicans*에 대하여서는 활성을 나타내지 않았다.

**Table 2.** Antimicrobial activity of ethanol extract from the seawater algae, *Chlorella ellipsoidea* C020

Microorganisms	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)
Gram positive bacteria		
<i>Bacillus subtilis</i> PM125	125	125
<i>Bacillus licheniformis</i>	125	125
<i>Micrococcus leutus</i> KCTC1056	>500	NA**
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC1916	>500	NA
MRSA* CCARM3115	>500	NA
MRSA* CCARM3089	>500	NA
MRSA* CCARM3061	>500	NA
Gram-negative bacteria		
<i>Escherichia coli</i> D31	>500	NA
<i>Escherichia coli</i> 1184	>500	NA
<i>Enterobacter aerogenes</i> KCTC2190	>500	NA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC2004	>500	NA
<i>Salmonella typhimurium</i> KCTC1925	>500	NA
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KCTC2208	>500	NA
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> KCTC2471	125	NA
<i>Edward tarda</i> NUF251	250	NA
Fungus		
<i>Candida albicans</i> KCTC1940	NA	NA

\* : MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*).  
 \*\* : Not activity.

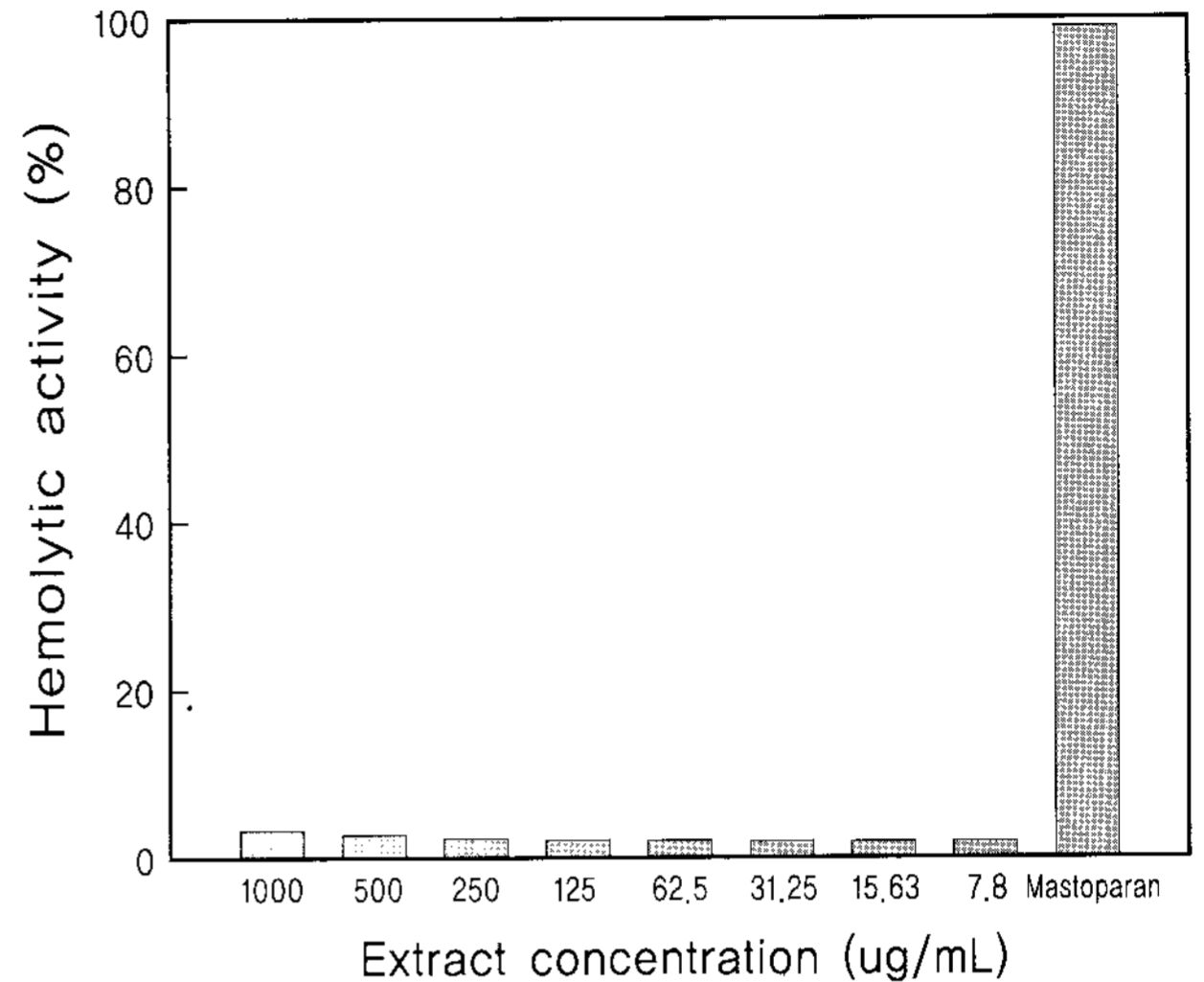


**Figure 2.** Antimicrobial activities of ethanol extract from the seawater algae, *Chlorella ellipsoidea* C020. (A) *B. licheniformis*, (B) *B. subtilis* PM125. Extract concentration; 1 (100 mg/mL), 2 (50 mg/mL), 3 (25 mg/mL), 4 (12.5 mg/mL).

**용혈활성 및 항산화 활성**

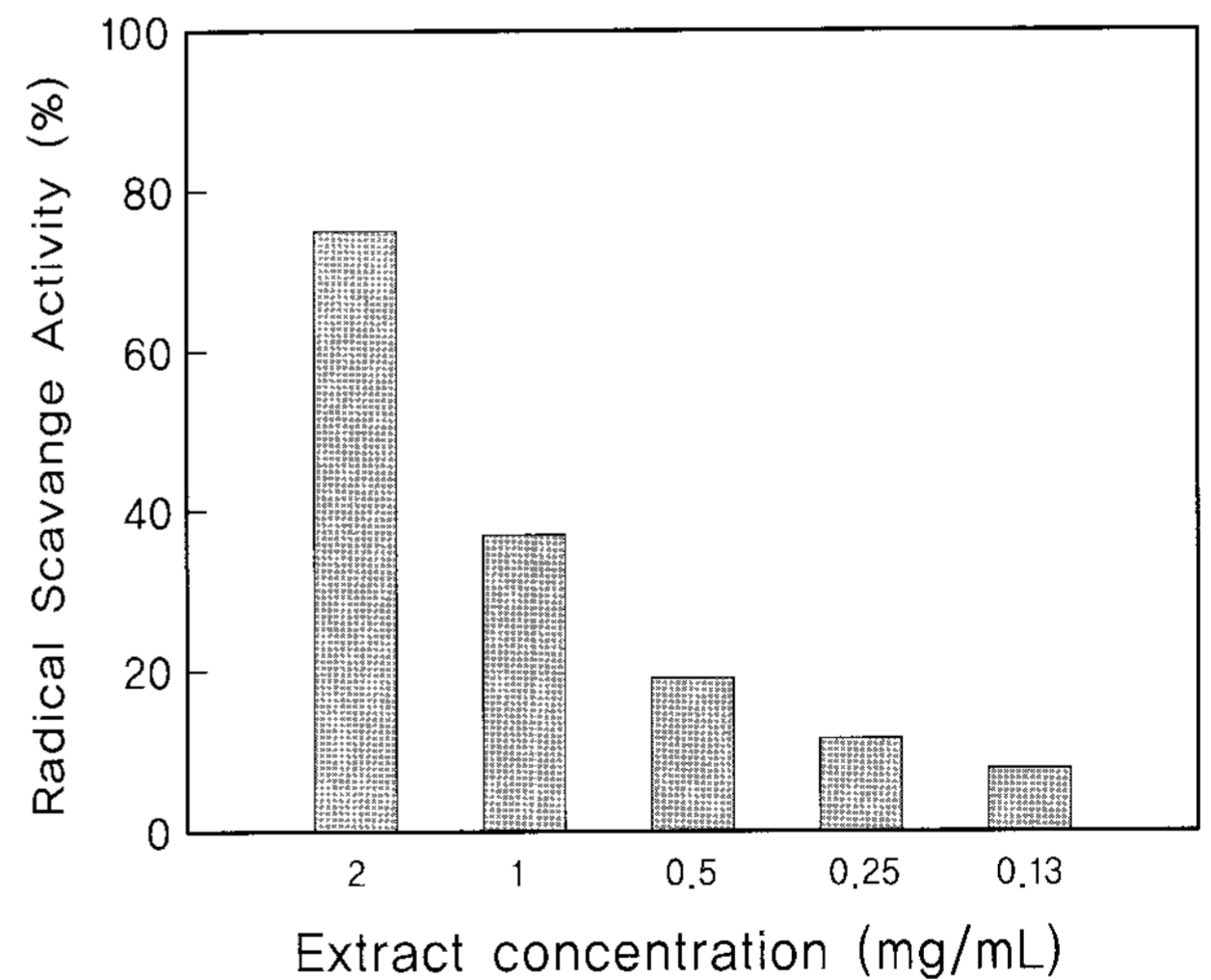
적혈구 막에 대한 해수클로렐라 에탄올 추출물의 용혈활성을 조사하기 위하여 인간의 적혈구를 사용하였다. 인간의

적혈구에 대한 해수클로렐라 에탄올 추출물 중 가장 높은 농도인 1.0 mg/mL에서도 3%라는 아주 낮은 활성을 나타내었다. 이러한 결과로 해수클로렐라 에탄올 추출물이 적혈구에 손상을 주지 않음을 알 수 있었다(Fig. 3).



**Figure 3.** The hemolytic activity of ethanol extract from the seawater algae, *Chlorella ellipsoidea* C020 against human erythrocytes. Positive control used mastoparan. The positive concentration was 125 µg/mL.

다음으로 DPPH 방법을 이용하여 항산화 능력을 측정한 결과, 2.0 mg/mL의 농도에서 75% DPPH 소거능을 보였다. IC<sub>50</sub> (50% Inhibitory Concentration)는 1.35 mg/mL로 이전 해양미세조류에서 연구된 IC<sub>50</sub> 400 µg/mL(29) 보다 현저히 높은 수치로 DPPH 소거능은 약한 것을 알 수 있었다(Fig. 4).

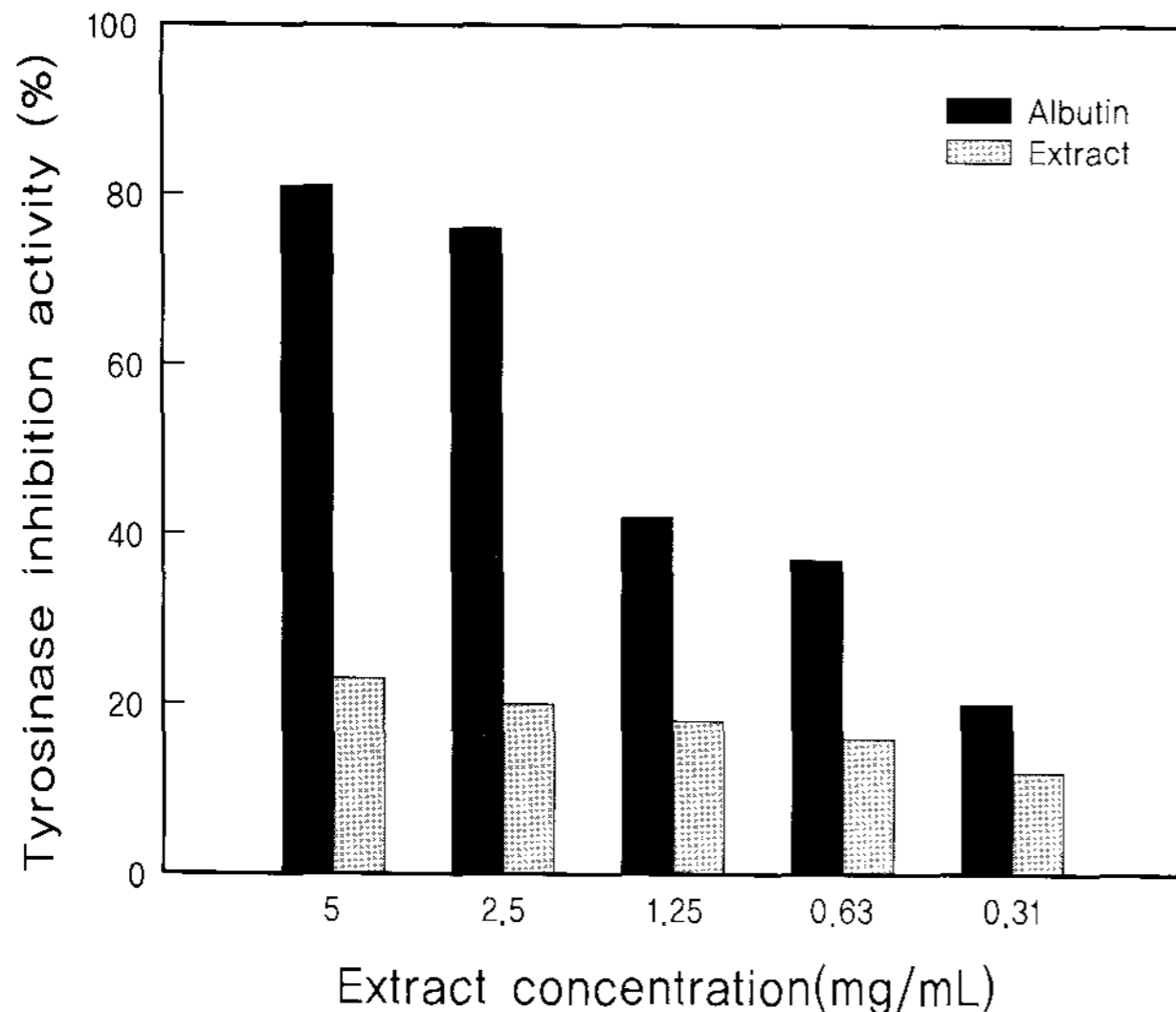


**Figure 4.** DPPH free radical scavenging activity of ethanol extract from the seawater algae, *Chlorella ellipsoidea* C020.

**Tyrosinase 효소활성 저해**

해수클로렐라 에탄올 추출물의 tyrosinase 효소활성 저해는 tyrosine을 기질로 이용하여 측정하였다. 해수클로렐라 에탄올 추출물의 tyrosinase 저해 활성 IC<sub>50</sub>는 10.87 mg/mL로 나타났다(Fig. 5). 이는 녹차 추출물의 IC<sub>50</sub> 값 2000 mg/mL 보다 우수한 활성을 나타내었으며, 박태기 나뭇잎 추출물

의 IC<sub>50</sub> 값이 20~50 mg/mL보다도 높은 활성을 나타내었다 (15). 특히, Kang 등(15)의 연구에서 얻은 클로렐라 가수분해 추출물 IC<sub>50</sub> 값이 120 mg/mL 보다 현저히 높은 활성을 보임을 알 수 있다. 이러한 결과는 해수클로렐라 에탄올 추출물이 우수한 미백 기능성 소재로 사용 가능하며 이를 화장품 원료로 사용하여 고부가가치 제품을 창출할 수 있을 것으로 판단된다(Fig. 5).



**Figure 5.** Tyrosinase inhibitory activity for the ethanol extract from the seawater algae, *Chlorella ellipsoidea* C020. Positive control used albutin.

## 요 약

해수클로렐라 (*Chlorella ellipsoidea* C020) 에탄올 추출물로부터 항균 및 항곰팡이 활성, 항산화활성, tyrosinase inhibitory 활성 (미백효과)과 용혈활성을 실험하였다. 효율적인 추출을 위해서 동결건조 후 95% 에탄올로 2시간 추출하는 것이 가장 좋다는 것을 알 수 있었다.

해수클로렐라 에탄올 추출물의 항균 및 항곰팡이에 대한 활성을 측정한 결과, *B. subtilis* PM125와 *B. licheniformis*, *V. parahemolyticus*와 *E. tarda* NUF251에서 활성을 나타내었다. 그러나, 곰팡이인 *C. albicans*에 대하여서는 활성을 나타내지 않았으며, 인간의 적혈구로 용혈활성 실험한 결과, 아주 낮은 활성을 나타내었다. DPPH방법을 이용하여 항산화능력을 측정한 결과, 2 mg/mL에서 75% 라디칼 소거능력을 나타내었다. 해수클로렐라 에탄올 추출물의 tyrosinase 저해 활성 IC<sub>50</sub>는 10.87 mg/mL로 나타났다. 이러한 결과를 바탕으로 해수클로렐라 에탄올 추출물로부터 다양한 생리활성 물질을 개발하여 고부가가치 제품을 창출할 수 있을 것으로 판단된다.

## REFERENCES

1. Kang, M. S., S. J. Sim, and H. J. Chae (2004), *Chlorella* as a functional biomaterial, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **19**, 1-11.

2. Miguel, O. (2003), Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace, *Biomol. Eng.* **20**, 459-466.

3. Bajguz, A. (2000), Effect of brassinosteroids on nucleic acids and protein content in cultured cells of *Chlorella vulgaris*, *Plant Physiol. Biochem.* **38**, 209-215.

4. Kazumasa, H., Y. Sayaka, D. Susilangsih, I. Osamu, M. Aparat, P. Jirapatch, and M. Kazuhisa (2003), Bioactivities of nostocine produced by a freshwater cyanobacterium *Nostoc spongiaeforme* TISTR 8169, *J. Biosci. Bioeng.* **95**, 512-517.

5. Metting, B. and J. W. Pyne (1986), Biologically active compounds from microalgae, *Enzyme Microbiol. Technol.* **8**, 386-394.

6. Golueke, C. G. and W. J. Oswald (1963), Power from solar energy-via algae-produced methane, *Solar Energy* **7**, 86-92.

7. Brown, M. R. and S. W. Jeffrey (1992), Biochemical composition of microalgae from the green algal classes *Chlorophyceae* and *Prasinophyceae*. 1-amino acids, sugars and pigments, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **161**, 91-113.

8. Fuentes, M. M. R., J. L. G. Sánchez, J. M. F. Sevilla, F. G. A. Fernández, J. A. S. Pérez, and E. M. Grima (1999), Outdoor continuous culture of *Porphyridium cruentum* in tubular photobioreactor: quantitative analysis of the daily cyclic variation of culture parameters, *J. Biotechnol.* **70**, 271-288.

9. Kim, K. W., S. C. Bai, J. W. Koo, X. Wang, and S. K. Kim (2002), Effects of dietary *Chlorella ellipsoidea* supplementation on growth, blood characteristics, and whole-body composition in Juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *J. the World Aqua. Soc.* **33**, 425 - 431.

10. Mendes, R. L., B. P. Nobre, M. T. Cardoso, A. P. Pereira, and A. F. Palavra (2003), Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae, *Inorg. Chim. Acta.* **356**, 328-334.

11. Carvalho, A. P. and F. X. Malcata (2000), Effect of culture media on production of polyunsaturated fatty acids by *Pavlova lutheri*, *Cryptogamie Algologie* **21**, 59-71.

12. Nash, G., I. G. Aderson, M. Shariff, and M. N. Shamsudin (1987), Bacteriosis associated with epizootic in the giant sea perch, *Lates calcarifer*, and the estuarine grouper, *Epinephelus tauvina*, cage cultured in Malaysia, *Aquaculture* **67**, 105-111.

13. Park, M. K., S. J. Lee, H. H. Suh, H. S. Kim, Y. H. Kim, B. D. Yoon, and H. M. Oh (1998), Advanced treatment of swine wastewater by a green alga, *Scenedesmus quadricauda*, *Algae* **13**, 227-233.

14. Kang, M. S. and H. J. Chae (2003), Biological efficacy assay *Chlorella* hydrolysate, *Korea Academia-Industrial Cooperation Society* **4**, 366-371.

15. Kim, S. S., M. K. Park, N. S. Oh, D. C. Kim, M. S. Han, and M. J. In (2003), Studies on quality characteristics and shelf-life of *Chlorella* soybean, *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **46**, 12-15.

16. Park, M. K., J. M. Lee, C. H. Park and M. J. In (2002), Quality characteristics of sulgidduk containing *Chlorella* powder, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **31**, 225-229.

17. Morimoto, T., A. Nagatsu, N. Murakami, J. Sakakibara, H. Tokuda, H. Nishino, and A. Iwashima (1995), Anti-tumour promoting glyceroglycolipids from the green alga, *Chlorella vulgaris*, *Phytochemistry* **40**, 1433-1437.

18. Pore, R. S. (1984), Detoxification Chlordecone poisoned rats with *Chlorella* and *Chlorella* derived sporopollenin, *Drug Chem. Toxicol.* **7**, 57-71.

19. Tsang, C. K., P. S. Lau, N. F. Y. Tam, and Y. S. Wong (1999), Biodegradation capacity of tributyltin by two *Chlorella* species, *Environ. Poll.* **105**, 289-297.

20. Singh, A., S. P. Singh, and R. Bamezai (1998), Perinatal influence of *Chlorella vulgaris* (E25) on hepatic drug metabolizing enzymes and lipid peroxidation, *Anticancer Res.* **18**, 1509-1514.

21. Takasaki, A., D. Ikeda, H. Nakamura, S. Nakanawa, Y. Okami, and T. Takeuchi (1989), Altemicidine, a new acaricidal and antitumor substance. II. structure determination, *J. Antibiot.* **42**, 1562-1566.
22. Hasegawa, T., K. Ito, S. Kumamoto, Y. Ando, A. Yamada, K. Nomoto, and Y. Yasunobu (1999) Oral administration of a hot water extracts of *Chlorella vulgaris* reduces IgE production against milk casein in mice, *Int. J. Immunopharmacol.* **21**, 311-323.
23. Hasegawa, T., Y. Kimura, K. Hiromatsu, N. Kobayashi, A. Yamada, M. Makino, M. Okuda, T. Sano, K. Nomoto, and Y. Yoshikai (1997), Effect 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.
24. Wilkinson, S. C., K. H. Goulding, and P. K. Robinson (1990), Mercury removal by immobilized algae in batch culture system, *J. Appl. Phycol.* **2**, 223-230.
25. Gibson, B. W., D. Z. Tang, R. Mandrell, M. Kelly, and E. R. Spindel (1991), Bombinin-like peptides with antimicrobial activity from skin secretions of asian toad, *Bomina orientalis*, *J. Biol. Chem.* **266**, 23103-23111.
26. Kitagaki, H. and Tsugama, M. (1999), 1-1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging ability of sake during storage. *J. Biosci. Bioeng.* **87**, 328-332.
27. Ishihara, K., T. Takemura, Y. Hamada, C. Sakai, S. Kondon, S. Nishiyama, K. Urabe, and J. Hearing (1993), Pigment production in murine melanoma cell is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP1), DOPA chrome tautomerase (TRP2) and a melanogenic inhibitor, *J. Invest. Dermatol.* **100**, 126-131.
28. Kim, S. K., H. C. Baek, H. G. Byun, O. J. Kang and J. B. Kim (2001), Biochemical composition and antioxidative activity of marine microalgae, *J. Korean Fish. Soc.* **34**, 260-267.