

기능성 생물 소재로서의 클로렐라

¹강민숙 · ²심상준 · ^{3*}채희정

¹호서대학교 식품영양학과, ²성균관대학교 화학공학과,

³호서대학교 식품생물공학과 및 벤처전문대학원 첨단산업기술전공

(접수 : 2003. 12. 27., 게재승인 : 2004. 2. 26.)

Chlorella as a Functional Biomaterial

Min-Sook Kang¹, Sang-Jun Sim², and Hee Jeong Chae^{3*}

¹Department of Food and Nutrition, Hoseo University, Asan 336-795, Korea

²Department of Chemical Engineering, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

³Department of Food and Biotechnology and Department of Innovative Industrial Technology, Hoseo University, Asan 336-795, Korea

(Received : 2003, 12. 27., Accepted : 2004. 2. 26.)

Chlorella contains a rich source of biochemical products with applications in the feed, food, nutritional, cosmetic, pharmaceutical and even fuels industries. Chlorella is one of unicellular green algae and is mostly grown in fresh water such as pond and lake. It grows in a manner of nonsexual reproduction so that it multiplies 4~16 times overnight. Large-scale culture is conducted by open pond culture or pure culture using fermenter. Chlorella has various efficacies such as heavy metal removal, degradation of toxic materials, control of arteriosclerosis, immunoprotective effects, anticancer activity and growth-stimulating activity of intestinal bacteria. Chlorella can be used as a taste enhancer and foodstuff, as it has a plenty of essential amino acids, polyunsaturated fatty acids, sterols and chlorella growth factor (CGF). Chlorella is a potential organism which can be utilized for CO₂ removal and H₂ production in environmental area and energy production.

Key Words : Chlorella, chlorella extract, functional biomaterial

서론

다양한 산물을 분비해 내는 생물체들은 생물산업의 근간이 되는 많은 기능성 물질들을 생산할 수 있다. 기능성 생물소재의 이용은 생명공학의 발전과 발맞춰 점점 증가하고 있다. 지구 표면의 대부분을 차지하고 있는 호수나 해양에는 풍부하고 다양한 생물자원과 광물자원이 아직도 대부분 미개발 상태로 남아 있다. 따라서 현재 이들 자원에 대한 연구개발은 세계 각국에서 활발하게 수행되고 있다(1). 이 중 대표적인 것이 미세조류 (microalgae)이다. 미세조류는 전체 종의 약 0.1%가 알려져 있고, 세계적으로 수천 종이 수집되어 있으며, 수백 종의 화학적 조성이 조사되었고, 소량만이 산업적인 규모로 배양되고 있다(2).

미세조류의 산업적 이용에 대한 연구는 1940년대 2차 세계 대전 중 독일에서 식물성 지방을 생산하기 위하여 본격적으로 시작되었으며, 그 후 녹조류인 클로렐라로부터 지방과 단백질 생산하기 위한 연구가 활발하게 이루어졌다(3). 최근 미세조류는 다양한 생리활성 물질들의 보고로서 주목 받고 있다(4, 5). 미세조류의 산업적 이용은 대체 에너지 자원(6) 및 건강보조식품(7, 8), 수산 양식용 사료(9), 의약품 분야의 원료물질(10-12), 생화학 물질 등으로 범위가 넓어지고 있다(13). 클로렐라와 스피루리나 (spirulina)와 같은 미세조류는 식이 보조제 (supplemental food) 또는 바이오매스 (biomass)로서 간주되어 왔는데(14, 15), 그 이유는 무엇보다도 고단백질 함량과 지질의 축적능력으로 인해 미래의 식량자원의 유력한 한 후보로 평가되었기 때문이다(16).

클로렐라는 1890년에 네덜란드의 Beyerink이 구형의 미세담수 녹조를 그리스어로 녹색을 의미하는 클로로스 (chloros)와 라틴어로 작은 것을 의미하는 엘라 (ella)를 조합하여 명명되었다(17). 담수 식물이자 미세 녹조류인 클로렐라는 현재 사료첨가제, 양어사료(18), 식품첨가물, 화장품 원료, 유산균

* Corresponding Author : Department of Food and Biotechnology, Hoseo University, Asan 336-795, Korea

Tel : +82-41-540-5642, Fax : +82-2-6280-6346

E-mail : hjchae@office.hoseo.ac.kr

발효촉진제, 수처리제 등으로 널리 사용되며 영양학적 우수성이 확인되었다(19, 20). 이 외에도 환경 호르몬인 다이옥신의 체외 배출(21), 체내 중금속의 축적억제 및 배설(22, 23), 환경독성 물질의 생물학적 분해(24), 폐수에 존재하는 수은의 축적(25), 동맥경화 및 간장 장애의 억제(26), 항암 활성(27), 면역기능 강화(28, 29), 세포의 부활작용(30)과 식품의 풍미향상 및 보습효과(20) 등의 기능성이 있다.

클로렐라의 열수 추출물인 클로렐라 추출물 (chlorella extract)은 동식물의 성장촉진, 유아 및 성장기 어린이의 성장을 촉진하고 면역증강, 항균, 항암효과, 세포부활 등의 효과가 있는 것으로 밝혀졌다. 그 밖에 혈압강하, 간의 지방질 감소 및 기능 회복 등의 효과가 있는 것으로 보고 되고 있다(30).

본 총설에서는 다양한 성분을 함유하며 유용한 생리활성을 갖는 기능성 소재로서 클로렐라의 성분, 대량생산 방법, 생리활성과 응용의 예를 보고하고자 한다.

클로렐라의 특성, 제법과 응용

클로렐라의 생물학적 특성

클로렐라는 단세포 생물로 분류학상 *Chlorophyceae* 강, *Chlorococcum* 목, *Chlorella* 속으로 종 (species)으로는 *vulgaris*, *pyrenoidosa*와 *ellipsoidea*가 널리 알려져 있다. 이들은 보통 연못이나 호수 등의 담수에서 생육하며, 직경 2~10 μm의 구형 단세포 (single cell) 조류로 하나의 세포는 현미경을 통해 관찰할 수 있다. 세포는 엽록소 (chlorophyll a와 b)를 다량 함유하고 있으며, 세포 표면은 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스의 세포막으로 이루어져 있다.

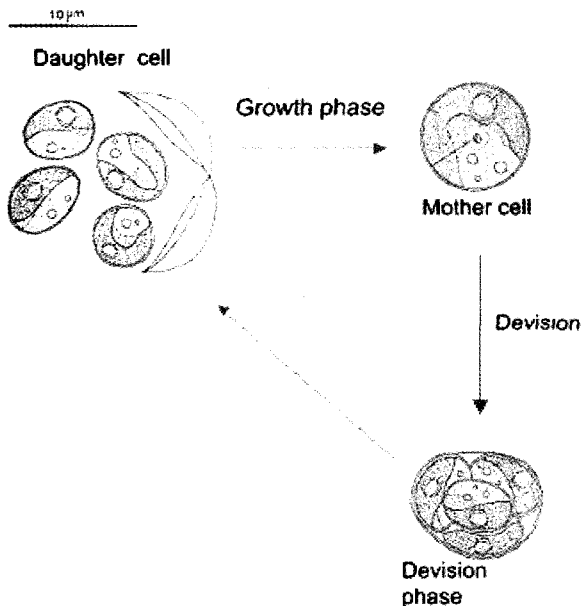


Figure 1. Growth of chlorella.

생식은 무성생식으로 증식하고 Fig. 1에서 보는 바와 같이 클로렐라의 모세포 (mother cell)가 성장하면 체내에 2개 이

상의 낭세포 (daughter cell)가 생성된다. 이것이 성숙되면서 모세포막이 파괴되어 낭세포가 하나의 개체로 새로운 생활을 시작한다. 통상 클로렐라는 10~30시간에 1회씩 4개의 낭세포로 분열하여 증식을 계속하므로 하루에 4~16배로 증식한다. 물, 공기, 질소와 인산 등의 성장 인자가 있으면 빛과 이산화탄소를 이용하여 성장 증식을 하는 독립영양생물이라는 점이 생물학적으로 가장 큰 특징이기도 하며 산업적 대량배양 공정에서 가장 중요하게 고려해야 할 사항이다. 클로렐라 옥외 배양 (open pond culture)에서는 공기 중의 이산화탄소가 부족하므로 탄소원으로 초산을 이용하는 반독립영양 방식으로 증식한다. 또 탄소원으로 유기 탄소원 (포도당)을 사용하면 빛이 없는 경우에도 종속 영양적 성장을 하는데(31, 32), 이를 암소 발효조 순수배양 (pure fermenter culture)이라 한다. 따라서 클로렐라는 독립영양, 반독립영양, 종속영양 등 다양한 방식으로 생육이 가능하다. 또한 강한 대사력, 불안정한 세포조직 등 일반적인 고등 생물계에서 관찰할 수 없는 특성을 가지고 있으며, 주위 환경에 밀접하게 적응하면서 성장·분열한다.

클로렐라의 성분과 가치

단백질과 아미노산 조성

클로렐라와 시금치, 우유, 달걀의 성분을 비교하면 Table 1과 같다(17). Table 1에서 보는 바와 같이 대표적인 고 영양가 식품인 우유와 달걀에 비해서 단백질, 비타민, 무기질 함량이 매우 높다(17). 클로렐라는 단백질, 지질, 식이섬유, 비타민류와 무기질 함량면에서 균형 잡힌 식품이다.

Table 1. Comparison of biochemical properties and composition of chlorella, spinach, milk, and chicken egg (per 100 g)

Component	Chlorella*	Spinach	Milk	Chicken egg
Protein	60.6 g	3.3 g	2.9 g	12.3 g
Carbohydrate	3.7 g	3.6 g	4.5 g	0.9 g
Fat	12.8 g	0.2 g	3.2 g	11.2 g
Ash	4.5 g	1.7 g	0.7 g	0.9 g
Fiber	13.0 g	3.5 g	-	-
Vitamin A	58,900 IU	2,900 IU	1,100 IU	640 IU
Vitamin B1	1.29 mg	0.13 mg	0.03 mg	0.08 mg
Vitamin B2	4.55 mg	0.23 mg	0.15 mg	0.48 mg
Nicine	32.1 mg	0.6 mg	0.1 mg	0.1 mg
Vitamin C	74 mg	65 mg	0 mg	0 mg
Vitamin E	22.8 mg	2.1 mg	0.1 mg	1.1 mg
Energy	372 kcal	25 kcal	59 kcal	162 kcal

*Chlorella made by pure culture using a fermenter

클로렐라는 특히 단백질 함량이 60%에 이르며 필수 아미노산 조성이 좋은 고단백질 식품으로 총 아미노산 함량은 Table 2에서 보는 바와 같이 쇠고기에 비하여 월등히 높다(17). 필수 아미노산인 isoleucine, leucine, lysine, phenylalanine, tyrosine 및 valine은 전체 아미노산의 36% 정도 함유되어 있다. 클로렐라의 필수 아미노산의 균형은 특히 잘 잡혀 있어 클로렐라를 매일 6~12 g씩 복용하는 것은 시금치 100 g, 우유 100 g, 달걀 50 g에 해당하는 아미노산을 보충 받는 것과 유사하다. 클로렐라에 함유된 아미노산의 종류와 함량은 methionine과 tyrosine을 제외하고 계란과 거의 유사하며, FDA/WHO에서 추천하는 아미노산 권장기준에 근접한다.

Table 2. Comparison of amino acid composition of chlorella and beef (per 100 g)

Amino acids	Chlorella ** [A]	Beef (Fat free)*** [B]	Relative Content (%) [A/B×100]
Arginine	3.51 g	1.20 g	292.5
Lysine*	4.88 g	1.70 g	287.1
Histidine	1.16 g	0.75 g	155.0
Phenylalanine*	2.48 g	0.77 g	322.1
Tyrosine	1.64 g	0.63 g	260.3
Leucine*	4.52 g	1.60 g	282.5
Isoleucine*	1.04 g	0.88 g	118.2
Methionine	1.20 g	0.22 g	545.5
Valine*	3.14 g	0.92 g	341.3
Alanine	4.38 g	1.10 g	398.2
Treonine*	1.38 g	0.89 g	155.1
Tryptophan	1.01 g	0.21 g	481.0
Cysteine*	0.71 g	0.76 g	93.4
Glutamic acid	6.60 g	2.90 g	227.6
Aspartic acid	4.86 g	1.80 g	270.0

*Essential amino acid

** Chlorella made by pure culture using a fermenter

지방산 조성

지방산은 생체 에너지의 원천이며 생체에서 여러 가지 생리학적 기능을 발휘하고 있는 중요한 구성 성분이다. 클로렐라 중의 지방산 함량의 변화는 온도, 태양광선, 영양원 중의 질소 함량 등에 의하여 증감된다. 옥외 배양된 클로렐라 중의 중요한 지방산으로는 palmitic acid, tridecyclic acid 및 carpic acid 등과 같은 포화지방산 함량이 전체 지방산 함량의 71%를 차지하며, 이에 비하여 암소 발효조 순수배양에 의해 제조된 유기배양 클로렐라에서는 불포화지방산이 전체 지방산의 67%를 차지한다(33).

유기배양 클로렐라의 불포화지방산 중에서도 eicosapentaenoic acid (EPA)는 옥외배양에서는 전혀 검출되지 않는데 비하여 유기배양 클로렐라에서는 30%가 검출되었다(33). EPA는 docosahexaenoic acid (DHA)와 함께 ω -3 지방산으로 알려져 있으며, 인간은 주로 생선의 지방산을 통하여 섭취하고 있다. 생체 내에서 혈중 콜레스테롤 농도 저하, 트리글리세라이드 농도 저하, 혈압 강하, 뇌 기능 활성화 및 항산화활성 증가 등과 같은 여러 가지 유익한 작용이 알려져 있다(33). 현재 어유로부터 DHA와 EPA가 정제되고 있으나 불쾌한 어취로 인하여 미세조류나 미생물을 이용한 DHA와 EPA의 생산에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다. DHA는 신생아들의 신경 시스템과 관련이 있으며, EPA는 염증을 가라앉히고 시각적 인지도의 정확성에 중요하며 우울증과도 관련이 있다(34). *Chlorella minutissima*의 경우 EPA 함량이 전체 지방산의 45%에 달한다(33).

스테롤 조성

최근 미세조류로부터 분리, 합성된 testosterone, estradiol 및 cortisol과 같은 스테로이드 제품은 강한 생리활성 작용을 가지고 있음이 밝혀졌고 이들을 이용한 의약품으로의 사용이 증가하고 있다. 클로렐라와 같은 미세조류 중에 존재하는 천연 스테로이드로서는 ergosterol, chondrillasterol, dehydro-

cholesterol 등이 있으며 스테로이드 호르몬의 합성 원료로 이용될 수 있다. 옥외 배양된 클로렐라에서는 C-5에 한 개의 불포화도를 지닌 스테롤이 95.5%를 차지한 반면 유기배양 클로렐라에서는 식물에서 주로 발견되는 β -sitosterol과 이것과 epimer 관계에 있는 clinoasterol이 54.5%를 차지한다(33). 클로렐라에 포함된 풍부한 스테롤의 함유로 인해 의약품 제조용 스테롤 화합물의 생물전환공정에서 전세포 (whole cell)로서 이용 가능성이 기대된다(35, 36).

클로렐라 성장 촉진 인자 (chlorella growth factor, CGF)

클로렐라에는 유산균 성장 촉진 물질로서 chlorella growth factor (CGF)라는 물질이 포함되어 있으며, 이것은 클로렐라 추출물 안에 포함되어 있는 핵산 관련 물질이다. 분자량 5,000~10,000의 황을 함유한 클레오펙타이드 (cleopeptide)로서 260 nm의 파장에서 최대 흡수치를 갖는 물질로 정의된다. CGF는 클로렐라 추출물의 일군을 의미하는 것으로 단일물질은 아니다.

클로렐라 추출물은 클로렐라 열수 추출물로, 클로렐라 원말을 열수 (90℃ 이상)에서 가열하여 유효 성분을 추출한 후 원심분리 등의 방법으로 클로렐라 균체의 불용성 물질 (cell debris)을 제거하고, 이를 농축 또는 분말 건조한 것이다. 클로렐라 추출물은 아미노산, 단백질, 펩타이드, 당류, 비타민, 미네랄 및 CGF 등을 함유하고 있다.

CGF는 유통되고 있는 클로렐라 품질의 중요한 지표 중 하나로 수용성의 S-nucleotide adenosyl peptide complex로 세포의 단백질 합성 장소인 리보솜과 에너지를 생산하는 미토콘드리아의 구조를 유지 복원함으로써 세포를 재생하는 성분이다. 이는 동식물의 성장 촉진, 뇌졸중 개선 및 예방, 면역 및 항균력 증강, 세포 재생 등의 효과가 있다. 그 예로 백주 효모를 연구하던 중 식염첨가에 의해 성장이 억제된 효모에 클로렐라 열수 추출물을 첨가하여 성장이 다시 촉진되었다고 한다(30). 클로렐라 열수 추출물을 에탄올로 분획하여 이온교환, 젤 여과, 실리카겔 크로마토그래피를 통해 분리 정제한 결과, 분자량 642.9인 효모성장 촉진물질 (growth promoting factor)을 확인하였고, 그 물질이 alanine, glutamic acid와 threonine을 함유한 글루코펩타이드의 일종임이 밝혀졌다(37). 클로렐라 추출물을 생후 1~8개월의 유아에 투여했을 때, 투여하지 않은 유아에 비해 63%의 체중증가 현상이 있다고 보고되었으며, 초등학생의 투여군에서도 대조군에 비하여 모두 증가율이 큰 것으로 조사되었다(30).

클로렐라의 안전성과 소화성

클로렐라 원말은 엽록소 함유량이 매우 높은 식물이다. 따라서 클로렐라 현탁액 중의 세포가 죽으면 급속히 엽록소의 분해가 진행되어 pheophorbide (클로로필 분해물, pyropheophorbide를 포함)가 생성되어 엽록소는 감소한다(Fig. 2). 엽록소 분자 중 마그네슘은 산성 조건에서 탈락되어 녹색을 잃고 chlorophyllase (엽록소 분해효소)의 작용으로 급속히 pheophorbide가 된다. Pheophorbide는 광과민증 (photosensitivity) 발현의 원인이 되므로 현재 일본시장의 클로렐라는 일본건강영양식품협회의 건강식품 규격기준에 준해 pheophorbide 함량 기준 (160 mg/ 100 g 이하)이 정해져 있다(38).

Phaeophorbide의 생성을 억제하는 방법은 냉각과 무균 통기에 의하여 클로렐라 세포를 사멸시키지 않고 탈수 건조하는 것이다. 또한 100℃, 3분 이상의 심한 가열 조건하에서 엽록소 분해효소를 불활성화 시키는 것이다. 한편 심한 가열은 클로렐라 변색의 원인이 된다. 따라서 고 엽록소, 저 phaeophorbide 클로렐라 원말은 클로렐라 크립의 저온보존 → 순간가열 → 최단시간의 고온보존 → 순간냉각 → 저온보존의 공정에 의해 얻어질 수 있다. 또한 이렇게 심한 온도변화 처리에 의하여 세포막이 수축과 팽창을 반복하므로 세포막의 물질 투과성이 높게 되어 소화성이 개선된다(38).

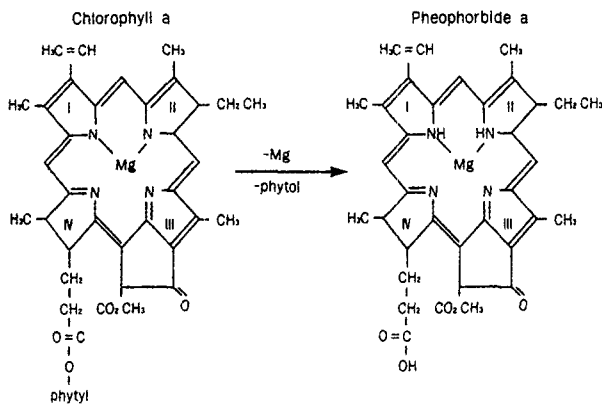


Figure 2. Chlorophyll and pheophorbide.

클로렐라 배양의 역사와 대량생산 기술

클로렐라는 단백질을 포함한 여러 영양소를 포함하고 있으며 증식속도가 다른 식물에 비하여 매우 빠르므로 미래의 단백질 공급원 및 고 영양식으로서의 가능성이 기대되어 왔다. 제1차 세계대전 때 독일에서 시작된 클로렐라 식량화의 연구는 그 후 미국 카네기연구소를 통하여, 1951년 일본 도쿠가와 생물학 연구소의 Tamiya 등(39)에 의해 클로렐라의 대량 배양법으로 발전하였다. 1957년 일본 클로렐라연구소가 설립되어 직경 20 m의 원형 주 배양지를 이용한 클로렐라 대량 배양 연구가 본격적으로 시작되었다.

종주의 유지 및 개량

클로렐라 생산용 종주는 고 엽록소, 고 단백질, 고 CGF의 특성을 갖는 것을 자연적으로 분리 선발하지만 이 특성은 퇴화하기 쉬운 경향이 있다. 따라서 보통 순수 colony 분리 후 배양실험에 의한 특성 확인과 개량을 통하여 특성을 안정화할 필요가 있다. 따라서 클로렐라의 종주 개량은 아미노산, 항생물질과 같이 물질 생산 능력만을 높이기 위한 개량처럼 단순한 것이 아니다. 식품, 화장품, 의약품으로의 안전성 확보 측면에서 우량주 개발을 위한 순수 colony 선발, 선발주의 특성 안정화와 개량이 필요하다(40).

탄소원

초산이 미세조류의 성장을 촉진하지만 고농도로 존재할 경우 (예를 들어 *Chlamydomonas reinhardtii*에서는 0.4 g/L 이상일 경우) 조류의 생육을 억제한다. Glade와 Maxey(40)는 57개의 heterotrophic 미세조류를 스크린 한 바 있으며 이 중

52종이 탄소원으로 포도당을 이용할 수 있었다. 초산과 포도당은 heterotrophic 또는 mixotrophic 배양을 위한 일반적인 탄소원으로 산업적인 생산에 널리 이용되고 있다. 일본과 대만에서 생산되는 클로렐라의 대부분은 초산이나 포도당의 공급 하에 mixotrophic culture로 생산된다(41-43).

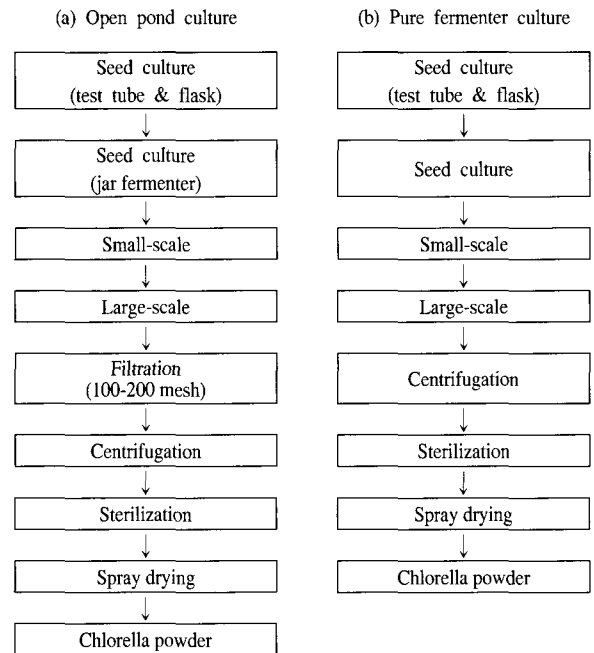


Figure 3. Schematic diagram of (a) open pond culture and (b) pure fermenter culture of chlorella.

옥외배양법과 암소 발효조 배양법

클로렐라 대량생산은 옥외배양 (open pond culture)과 암소 발효조 순수배양 (pure fermenter culture)의 인공배양에 의해 제조되고 있다. 암소 발효조 배양법이 1964년부터 실용화되었지만 현재 국내와 일본의 일부 업체를 제외하고 대부분 옥외배양으로 생산된다. 1967년 이래 주생산지는 일본 이외에 옥외배양이 적당한 대만, 인도네시아 등으로 이동하였으며 종균의 개량, 분무건조기의 도입, 클로렐라 세포의 급냉과 순간고열가열 후 급냉 등을 포함하는 신공정 기술개발에 의해 클로렐라의 품질이 향상되었다. 클로렐라 대량생산을 위한 방법은 다음과 같다.

옥외배양법의 경우 옥외 원형 풀 (pool)의 초산 배지에서 2~3주간 증식, 배양되므로 이때 대기나 풀 주변으로부터 클로렐라 이외의 미생물, 곤충류, 동물류, 이물의 오염이 계속된다. 이들 잡물질은 원심분리 공정 전에 100~200 mesh로 여과되어 제거되지만 0.1 mm 이하의 미세 이물질을 제거하는 것은 거의 불가능하다(Fig. 3(a)). 옥외배양법의 경우 온도, 일광, 강수량의 조건을 인위적으로 조절하는 것이 불가능하다는 것이 아직 해결되지 않은 문제로 남아 있다. 이 때문에 클로렐라 옥외 대량생산 방식은 아열대 지역에서 널리 이용된다(44-46).

한편 암소 발효조 순수배양법은 일반 발효 미생물과 같이 무균 발효조에서 순수 배양하므로 배양 중 이물질의 오염을 배제할 수 있다(Fig. 3(b)). 클로렐라 배양액의 성분으로는 요

소, 인산 제1칼륨, 황산 마그네슘, 황산 제1철, 붕산, 염화 망간, 황산 아연, 황산 동과 EDTA 등이 포함된다. 발효조 순수 배양은 잘 조절된 배양조건에서 위생적으로 연속 생산이 가능하다. 옥외배양의 경우 환경조건이 클로렐라 성장에 영향을 미치기 쉬운 반면, 발효조 순수배양법은 연중 온도에 크게 영향을 받지 않으므로 계절 변화와 환경에 의한 품질의 변화가 적다.

정제 건조

배양 종료 후 클로렐라 현탁액의 농축 및 세척 공정에서 세포부패에 의한 이취 발생, 미생물 오염, 변색, 기존 phosphoride의 증가를 방지해야 한다. 이를 위해서 클로렐라 현탁액을 급냉하여 10°C 이하로 보존하는 것과 동시에 무균 공기에 의한 교반과 통기가 필요하다. 이러한 관리하에서 고속원심분리에 의한 분리농축 → 물세척 → 농축을 실시하여 클로렐라 냉각크림이 형성되고 이를 분무건조 (spray drying) 하여 클로렐라 분말제품이 제조된다.

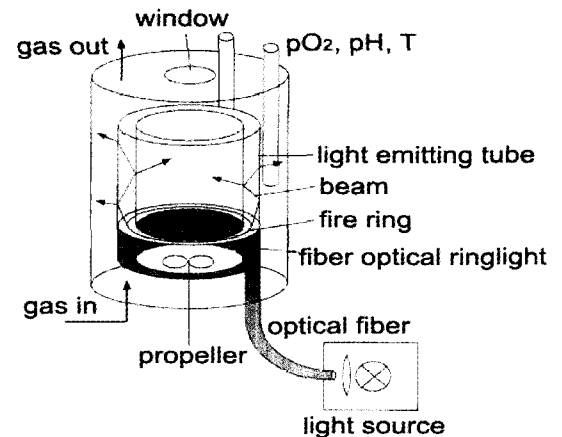
클로렐라 배양 및 생물반응기

조류의 배양을 위해서는 탄소원으로 이용되는 CO₂를 적정량 공급하는 것이 중요하며 효율적인 광합성 작용을 극대화하기 위해 광량 및 광도의 최적화, 온도 조절, 혼합 그리고 영양 염류의 균형있는 공급이 수반되어야 한다(47).

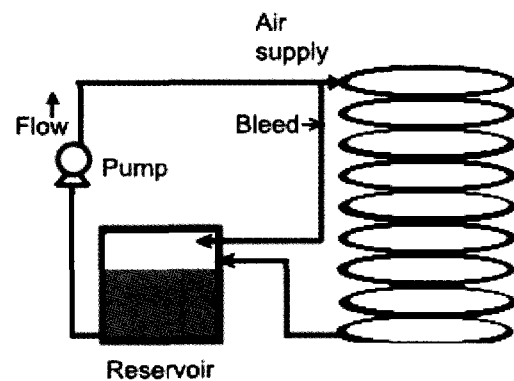
조류의 배양을 위한 생물반응기의 형태로는 밀폐형 반응기와 옥외 반응기로 나뉜다. 배양 시스템 중에서 옥외 배양 장치는 옥외 연못 (open pond)이나 수로 (raceway)를 이용하는 방법이며 밀폐형 생물반응기는 패널 또는 튜브로 구성되어 있다(43). 옥외 배양기로 Matumoto 등(48)은 미세조류를 화력 발전소의 배출가스를 이용하여 수로배양 (raceway culture)하여 생산된 바이오매스를 고체 연료로 사용하였다. Laws와 Berning(49)은 옥외수로에서 해양 규조인 *Cyclotella cryptica*를 발전소 배출가스를 이용하여 대량 배양하였다. 밀폐형 배양장치는 나선형 또는 평판형 관형 디자인으로(51) 일반적인 교반형 생물반응기 (stirred tank reactor)를 변형한 형태라고 할 수 있다(43, 51).

밀폐형 반응기로 Takano 등(52)은 광섬유를 장착한 광반응기(Fig. 4(a))로 미세조류를 배양하였다. 이 반응기는 광섬유 (optical fiber)를 사용한 내부조명 (internal illumination) 방식을 채택함으로써 자연광에 비해 광도 조절이 용이한 장점이 있다(53). Fig. 4(b)는 관형 광반응기 (tubular photobioreactor)를 나타낸 것으로 미세조류의 밀폐형 배양장치 중 가장 많이 사용되는 방법이다(54). 그 이유는 효과적인 멸균이 가능하며, 기체 전달이 용이하고, 설치가 용이한 점을 들 수 있다(55). 이 외에 판형 광반응기 (thin-panel photobioreactor)와 수직관형 반응기 등이 사용되고 있다(48). 클로렐라 배양에는 일반적으로 빛과 CO₂의 공급이 미세조류의 증식에 제한인자가 된다. 두 배양기 방식이 공통적으로 광 (light)을 효과적으로 이용하도록 하는 것이 매우 중요한 점(56)으로, 배양 시에는 충분한 빛을 공급하기 위해서 옥외 배양용 못의 깊이는 20 cm 이하로 하며 수로의 넓이도 제한된 크기를 가져야 한다. 충분한 탄소원의 공급을 위해 공기 중의 CO₂ 외에 추가적인 CO₂가 공급되기도 한다(57).

조류배양 중 오염의 문제는 대규모 상업 공정에서 큰 문제로 나타난다. 오염원으로는 다른 식물성 조류나 동물성 플랑크톤 등이 있으며, 낮은 농도에서 유입되지만 배양하고자 하는 조류의 성장을 방해하여 조류의 상품적 가치를 떨어뜨린다. 옥외 배양 방식은 밀폐형 배양방식에 비해 환경 변화와 오염원의 유입으로 반응기 내의 경쟁을 유발하고 정상적인 조업을 방해할 가능성이 크다.



(a)



(b)

Figure 4. Schematic diagram of bioreactor (a) photobioreactor with optical fiber and (b) tubular photobioreactor.

현재 미세조류의 배양법은 회분식 배양 (batch culture)에 의존하고 있는데 수요가 증가하면서 반회분식 배양 (semi-continuous culture)과 연속식 배양 (continuous culture)이 늘고 있다. 대부분 연속 배양은 공기 중에서 유입되는 오염을 막기 위한 폐쇄형 반응 시스템을 활용하고 다양한 공정 기술과 접목하여 이용하고 있다. Rusch와 Christensen(58)은 연속 배양법의 단점인 오염 문제를 최소화한 hydraulically integrated serial turbidostat algal reactor (HISTAR)를 소개한 바 있다. 이 반응기는 밀봉 터비도스탯 (sealed turbidostats)과 여러 개의 개방형 반응기의 연결된 구조로 이루어져 있다. 밀봉된 반응기에서 배양된 순수한 미세조류는 개방형 반응기로 넘어 오면서 신선한 배지를 계속적으로 공급받아 정치하지 않고 유동인 상태로 성장한다. 이와 같이 HISTAR은 개방형 반응기의 연결과 유동액 흐름을 조절하여 오염원의 성장을 배제

하는 방식이다.

클로렐라의 기능성과 응용

현대인들의 식단은 고 단백질, 고 칼로리, 고 지방의 서구 식 패턴으로 변화되고 있다. 이로 인해 미량원소, 비타민 등이 결핍되기 쉬워 결국 성인병을 초래하게 된다. 따라서, 영양적으로 균형이 잡힌 식생활이 매우 중요하다. 또한 질병의 예방과 치료를 위해 화학적 합성으로 생산된 의약품에 의존하기 보다는 인구가 오랜 기간 섭취해 안정성이 입증된 천연물에서 해결책을 찾으려는 노력이 다각도에서 시행되고 있다. 이러한 대표적 소재의 예로 클로렐라는 미네랄, 비타민, 필수 아미노산을 다량 함유하고 있다는 점과 다양한 생리활성을 갖고 있다는 점에서 새롭게 관심을 일으키고 있다. 클로렐라는 식품으로의 용도뿐만 아니라 화장품, 의약품, 환경관련 소재로서 다음과 같은 다양한 기능성을 갖고 있다.

환경 호르몬 다이옥신 체내 배출

인구의 도시집중, 플라스틱류의 사용증가 등에 의해 최근 다이옥신류에 의한 환경오염, 식품오염이 주목되고 있다. 다이옥신류의 소화관 흡수억제와 인체로부터의 배설에 관한 클로렐라, 스피루리나, 녹황색 야채의 효과가 조사 연구되어 있다. 클로렐라의 세포벽 성분 중 일부는 다이옥신과 흡착하여 다이옥신을 체외로 배출시키는 작용을 한다(21). 쥐에서 다이옥신류의 재흡수 억제와 생물학적 반감기에 미치는 미강섬유, 클로렐라, 녹황색 야채를 비교한 실험에서, 보통의 사료를 섭취한 쥐에 비하여 클로렐라를 10%를 함유한 사료를 섭취한 쥐가 2.3~3.5배 더 높은 다이옥신류 배출 속도를 보였다(17). 이것은 식이섬유에 비하여 높은 배출 성능을 보이는 결과이다.

체내 중금속 축적 억제 및 배설

조류, 곰팡이와 세균의 바이오매스에 의한 중금속들의 생물흡착이 오염된 환경의 비독성화 (detoxification)와 오염 물질로부터 유용한 금속을 회수하는 폐수처리공정에 이용될 수 있는 가능성과 관련하여 주목되고 있다. 이러한 연구의 한 예로 iron(III)과 chromium(VI)이 클로렐라에 흡착되며, 이 흡착현상이 다성분 Langmuir 흡착 isotherm에 의해 잘 표현된다는 보고가 있다(59). 클로렐라는 생체 내에 중금속 축적을 억제하고 배설하는 기능이 있다. 실험용 흰쥐에 중금속을 투여하고 클로렐라 식이를 처방한 결과, 노를 통하여 13.3~40%의 배설이 증가되었다(22, 23). 클로렐라에 함유된 칼슘, 아연, 마그네슘, 단백질 등의 영양으로 소장에서 체내 흡수가 억제되고, 주요 저장 장기인 간장과 신장에서도 중금속의 독성을 중화시켜 조직의 손상을 완화시킨다(60). Baek 등(61)은 납(Pb)과 함께 클로렐라를 흰쥐에게 투여한 결과, 체내 축적된 납의 비율이 납만을 투여한 대조군에 비해 약 20% 정도로 낮았으며, 납에 노출될 경우 독성 완화를 위한 클로렐라의 섭취량은 2~5% 수준이 바람직하다고 보고하였다.

녹차와 활성탄 등과 함께 수도물 속의 염소 (Cl) 제거에 미치는 영향을 조사한 결과, 클로렐라의 염소제거에 있어서 녹차와 활성탄보다 약 2배 수준의 높은 효능을 나타냈다는 보고도 있다(62).

환경독성 물질의 생물학적 분해와 폐수중의 중금속 제거

Antifouling용 페인트와 방부제 및 biocide에 널리 사용되는 물질인 tributyltin (TBT)은 *Chlorella vulgaris*에 의해 독성이 더 낮은 dibutyltin과 monobutyltin으로 27~41%의 생분해율로 저 독성화된다고 보고되었다(24). Tam 등(63)은 클로렐라의 살아있는 세포뿐만 아니라 죽어있는 세포에서도 TBT를 85~90% 이상 제거하였다고 보고하였다. 비슷한 예로 benzaldehyde, monochlorobenzaldehyde와 dichlorobenzaldehyde와 같은 방향족 알데히드가 *Chlorella minutissima* 등의 미세조류에 의해 primary alcohol로 환원되는 반응이 보고된 바 있다(64).

미세조류는 다가 이온에 대한 강한 친화력을 가지고 있으며 성장에 필요한 유기물로 폐수 중의 유기물을 이용할 수 있다. 그래서 음료수나 폐수중의 중금속을 제거하기 위한 생물반응기 시스템이 개발된 바 있다(57). Travieso 등(65)은 중금속의 제거를 위하여 폴리우레탄에 미세조류를 부착하여 코발트 등의 중금속을 10일 동안 94.5% 정도 제거하는 pilot 규모의 생물반응기 시스템인 biofilm reactor for algae immobilization (BIOALGA)을 제안한 바 있으며, Bashan 등(66)은 alginate bead에 고정화된 *C. vulgaris*를 이용하여 폐수에 존재하는 암모늄 이온과 수용성 인산 이온을 효율적으로 제거하였다고 보고하였다.

동맥경화 및 간장 장애의 억제

알코올이 간장에서 분해되어 체외로 배출되는 기전에는 비타민이 관여한다. 클로렐라에는 각종 비타민이 충분히 함유되어 있어 음주 약 4시간 전에 섭취하면 알코올 분해에 도움이 되며, 지방간의 단계부터 악화된 간장병 환자에 대해 클로렐라는 유효한 작용을 하는 것으로 입증되었다(26).

면역기능 강화 및 항암 활성

반 치사량 (sublethal dose) 수준의 *Listeria monocytogenes* (1×10^4 /animal)에 의해 감염된 쥐에 클로렐라 추출물을 투여했을 때 매우 높은 수준으로 저항성이 향상되었다. 그 이유는 클로렐라 추출물이 *L. monocytogenes*에 감염된 동물의 골수에서 granulocyte macrophage colony forming unit (CFU-GM)의 향상에 부분적으로 기여하기 때문이다(67). Konish 등(68)은 cyclophosphamide의 투여로 면역 억제된 흰쥐에 클로렐라 추출물을 투여함으로써 혈액 내 백혈구의 숫자가 클로렐라 추출물을 투여하지 않은 대조군에 비하여 2배 이상 빠르게 회복되는 것을 보고하였고(30), 클로렐라 열수 추출물은 *L. monocytogenes*와 *Escherichia coli*에 의한 감염과 쥐의 여러 종양에 대하여 숙주의 방어 메커니즘을 높이는 기능이 있다(69, 70). 클로렐라 추출물은 마크로파지의 interleukin-12 (IL-12)와 γ -interferon (γ IFN) mRNA 발현수준을 올리고 *L. monocytogenes* 감염 후 murine retrovirus induced acquired immunodeficiency syndrome (MAIDS)를 갖는 쥐와 정상 쥐의 비장 (spleen) 기능을 향상시킨다고 보고되어 있다(28). 또한 클로렐라의 섭취로 과민반응의 원인이 되는 immunoglobulin E (IgE) 반응이 억제되었으며 알레르기성 질환의 치료에 응용될 수 있다고 보고된 바 있다(71).

클로렐라로부터 분리된 glyceroglycolipid인 monogalactosyl diacylglycerol의 일종이 종양을 억제한다고 보고된 바 있다

(27). 클로렐라의 항암 효과는 암의 면역 성립에 주요한 역할을 하는 helper-T 세포를 강하게 활성화하는 실험결과가 보고된 바 있으며(72, 73), 클로렐라 중 이러한 활성물질은 분자량 60,000~70,000의 당단백질로 당 부분은 갈락토오스가 90%를 차지하고 있다. 이 당단백질의 특징 중 하나는 산과 알칼리, 열처리에 활성이 안정하다. 위의 결과들로 미루어 클로렐라는 면역계를 활성화하여 암 전이 억제효과를 나타내므로 항암 보조제로 중요한 역할을 할 것으로 기대된다(68, 74-76).

장내 세균 분포에 미치는 영향 및 세포의 부활작용

클로렐라를 흰쥐에게 4주 동안 투여한 후 장내 세균 총 수는 0.5% 첨가시 74.3%가 감소하였고, 1.0% 첨가시 81%가 감소하였으며, 시험관에서 수행한 *in vitro* 항균 실험에서도 클로렐라 농도에 따라 미생물의 생육 저해 경향이 높아졌다(30). 적절한 농도의 클로렐라 투여는 숙주에게 유해한 세균의 현저한 감소와 종창을 제거하며 유용한 세균의 장내 정착을 비례적으로 증가, 유지시키는 것으로 확인 할 수 있었다. CGF의 주성분인 핵산관련 물질은 미토콘드리아 작용과 에너지(ATP) 생산을 회복시키고, 세포 내의 대사를 촉진시킴으로써 손상된 세포의 재생을 촉진시킨다. 이러한 클로렐라 추출물의 세포 부활작용으로 클로렐라 추출물은 화장품 원료로 사용되기도 한다(30).

식품의 풍미 향상 및 보습효과

식품의 조리에 사용하고 있는 조미료는 식품의 맛을 풍미에 맞게 조절하는데 사용되고 있다. 클로렐라를 첨가하여 각종 떡류를 제조한 경우 수분 보유량이 증가하며 경도, 파괴성 등이 감소하였다(20).

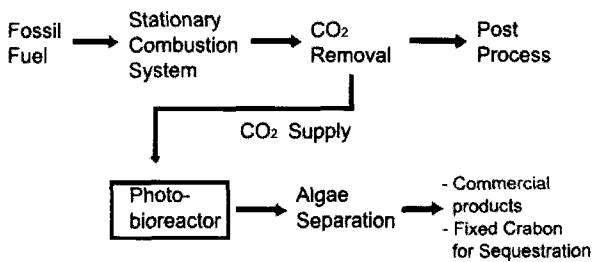


Figure 5. Concept for microalgal-based CO₂ capture and sequestration scheme.

이산화탄소 고정화

산업화의 발전과 더불어 과도하게 방출되는 CO₂는 지구 온난화 문제를 야기한다. 이 지구 온난화의 생물학적 해법으로 미세조류의 대량배양을 꼽을 수 있다. 화석 연료로부터 발생된 이산화탄소의 저감을 위해 미세조류를 이용하는 공정에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Fig. 5). 미세조류는 일반 생물체보다 효율적인 광합성을 하므로 효과적인 CO₂ 저감의 수단이 될 수 있다(77). Oh 등(56)은 미세조류의 대량배양을 통하여 대기 중의 CO₂ 농도를 감소시키고, 축산 폐수 중의 질소와 인과 같은 영양염류의 농도를 크게 감소시킴으로써 호소 부영양화 문제를 해결할 수 있다고 보고하였다. Yun 등(78)은 클로렐라를 이용하여 CO₂를 저감할 수 있다고

보고하였으며, Sung 등(79)은 수직 기포탑 반응기 (직경 2 cm)에서 클로렐라를 이용한 CO₂ 고정화 실험시 1.097 g/L-day의 높은 바이오매스 생산성을 확인한 바 있다.

미국 에너지성 (Department of Energy, DOE)은 화력발전소로부터 발생하는 가스의 이산화탄소의 제거에 CO₂ 1 ton 당 대략 \$35-264의 비용을 추산하였다. 미세조류의 생산 단가는 바이오매스 1 ton 당 \$10 이상이지만, 미세조류에 의한 가치 있는 물질들의 생산으로 추가적인 경제성을 확보한다면 이산화탄소의 제거비용을 \$10 이하로 낮출 수 있다고 전망한다(2).

수소 또는 메탄가스 생산과 환경정화

미세조류는 몇 가지 방법을 통하여 연료를 생산할 수 있다(80, 81). 미세조류는 혐기적인 조건에서 메탄가스를 생산하고(82), 광합성을 통해 수소가스를 생산한다(83). 미세조류가 디젤유를 대체하기 위해서 생산되는 지질은 높은 칼로리 값을 가져야 하는데 일반적인 배양 조건하에 생산되는 지질은 18~21 kJ/g의 칼로리 값을 갖는다. 이는 디젤의 42 kJ/g에 비해 낮은 값이다. 그러나 미세조류의 배양시 질소원이 낮은 상태에서 높은 칼로리의 지질을 축적할 수 있다(14, 84). 클로렐라의 배양에서도 질소원이 낮은 경우 58%까지 지질을 축적한 바 있다(85).

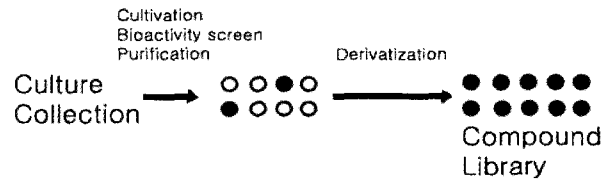


Figure 6. Compound library using microalgae culture collection.

바이오소재 생산

천연물질은 합성물질에 비해 물에 대한 용해성과 세포 투과성, 생물학적 이용성 등의 장점들을 가지고 있어 신약 개발에 유용한 자원으로 널리 사용되고 있다. 미세조류처럼 연구개발이 잘 되어있지 않은 생명체를 이용한 연구의 가장 큰 장점은 연구개발이 활발히 진행된 생명체를 연구 대상으로 사용하였을 때보다 신물질 개발 가능성이 높다는 점이다(86). 예를 들어 미국의 제약 회사인 Mera Pharmaceutical als는 하와이 주립대학 (University of Hawaii, UH)에 보존 중인 2000종의 *Cynobacteria* (남조류) 균주로부터 새로운 의약품을 개발하는 연구를 진행 중에 있다. UH의 수집종으로부터 이미 100개 이상의 생리활성 물질들이 스크리닝되었고, 여기에 효소적 생물전환기술을 이용하여 선도 물질을 수백 배에서 수천 종까지 수를 증가시켜 고 활성, 저 독성의 바람직한 특성을 지닌 신약으로 개발하기 위한 라이브러리로 활용하고 있다(2). Fig. 6은 이 개념을 설명하고 있다.

클로렐라는 다른 미세조류와 함께 생물소재 생산 시스템으로 활용이 크게 기대된다. 그 한 예로 carotenoid는 vitamin A의 전구체로 식물체에 함유되어 있는 천연 색소이며 항산화제로서 관심이 증대되고 있는데, 이 carotenoid의 대량생산을 위한 여러 생체 시스템 중 하나가 *C. vulgaris*이다. *C.*

*vulgaris*의 정기적인 섭취로 유방암, 폐암 등의 항암 작용과 동맥경화, 백내장 등을 예방할 수 있다(87).

클로렐라에서 공급되는 다른 항산화제로 astaxanthin은 β -carotene, lutein, zeaxanthin, cantaxanthin 등의 항산화제보다 대략 10배, α -tocopherol보다 500배 강한 항산화력을 보이며, 'super vitamin E'라 불리는 nutraceutical 등급의 물질이다(88).

클로렐라 추출물 (Chlorella extract) 및 CGF의 용도

클로렐라의 용도는 클로렐라 세포를 건조 분말화한 원말을 정제 또는 과립으로 가공한 것과 CGF를 함유하는 클로렐라 열수 추출물이 건강식품으로서 이용되고 있고 최근 일반식품, 화장품, 사료 등으로 이용이 확대되고 있는 추세이다(Table 3). 클로렐라 추출물은 화장품에 첨가되어 보습과 피부의 활성을 촉진시키기도 한다. 배양 미생물의 재배, 버섯류의 생육 촉진, 관상식물의 활성화제 및 고급 과실재배의 표면 산포제로도 이용되고 있다.

Table 3. Uses of chlorella and chlorella extract

Application area	Specific uses	
Nutritional supplement	Food additive	Drink
		Created Valueadded
		Colorful Bread, Cookie, Ice-cream, Chinese noodle, Can, Alcohol, Rice, Soybean paste
Fertilizer, Feed	Promote growth	
Other application	Cosmetics	Cell revival
		Microbial promotion
	Environment application	Water purification

CGF는 생리기능을 기대하는 식품과 식품재료로서 식품의 맛, 이취, 식감 개선제, 화장품 첨가용, 미생물 (유산균, 효모, 나토균 등)과 재배버섯 배양 시 생육 촉진용, 식물표면 산포용 등에 이용되고 있다. 건강보조식품 또는 식품첨가물로서의 클로렐라 건조 분말 및 클로렐라 추출물 용도를 좀더 살펴보면 Table 4와 같이 면, 빵, 음료, 스프, 껌, 파스타 등에 응용될 수 있으며, 차후 고 기능성 식품소재로 널리 활용될 것으로 예상되고 있다. 그 한 예로서, 클로렐라를 두부제조에 첨가하여 두부제조 수율, 견고성, 텍스처 (texture)가 증가하면서도 미생물의 생육이 효과적으로 지연되었다는 보고가 있다(19).

CGF는 과당, 구연산, 비타민, 미네랄 등과 함께 드링크제 보강, 또는 비타민제의 보강 등의 건강기능식품으로 이용되고 있으며, 백반, 면류, 빵 등의 식감 개량을 위해 첨가하기도 한다.

클로렐라의 시장 현황

1990년부터 클로렐라의 수요가 급속히 확대되어 대만, 인

도네시아, 중국에 생산설비가 설치되었고 여기에 1996년 말부터 국내에서는 1,000 ton/year의 생산 능력으로 시장 진입하여 세계의 총 생산 능력은 2000년 현재 연간 약 5,000 ton에 이른다.

향후 전망

세계적으로 기능성 소재의 시장은 향후 연간 10%이상의 고 성장율을 보일 것으로 전문가들은 전망하고 있다. 그러나, 기능성 소재의 3가지 조건으로 기능성, 안전성과 유효성을 만족하는 소재를 찾기는 쉽지 않다. 반면 클로렐라는 성장속진 인자인 CGF를 비롯하여 아미노산, 당단백질, 비타민 등 많은 기능성 물질을 함유하고 있으며, 성장촉진, 면역강화, 세포부활 등의 유효성과 안정성이 확인되었다. 클로렐라는 높은 증식율과 오래 전부터 식품으로 사용된 천연물인 점을 감안할 때, 향후 기능성 소재로의 시장 전망은 매우 밝다. 클로렐라 추출물의 CGF도 클로렐라와 마찬가지로 성장속진 뿐만 아니라 면역증강, 노화억제, 세포부활, 중금속과 환경 호르몬 축적 억제와 체내 배출 등의 기능성을 충족하고 있어 유용한 기능성 소재라고 할 수 있다(30).

국내에서도 클로렐라의 기능성에 대한 연구 및 클로렐라를 이용한 이유식, 어린이 영양제, 식품첨가물, 기능성 음료, 기능성 화장품 등의 상품개발이 진행되고 있지만, 향후 아직 밝혀지지 않은 클로렐라의 기능성에 대한 연구가 지속적으로 필요하다고 판단된다. 현재 본 연구팀은 이제까지 알려져 있지 않던 생리활성으로 미백 활성, 혈액응고 저해활성 등의 신규 생리활성에 대하여 보고한 바 있다(89, 90). 클로렐라 배양에 의해 생산된 바이오매스는 그 자체로서 기능성 소재의 보고이기도 하지만 세포의 생합성 능력을 이용하여 여러 가지 화합물의 생물전환 (biotransformation)을 위한 생물반응기 (bioreactor)로 이용될 수 있다(35, 36). 향후 이 분야에 대한 연구가 활발해질 것으로 전망된다.

요 약

클로렐라는 생물화학적 성분들을 풍부하게 함유하고 있어서 영양학적으로 사료나 식품으로 이용되며 화장품, 의약품, 심지어 연료로도 이용되고 있다. 클로렐라는 보통 연못이나 호수 등 담수에서 생육하며, 구형 단세포이다. 생식은 무성생식으로 하루에 4~16배로 증식한다. 클로렐라의 대량생산을 위한 배양은 크게 옥외배양법과 발효조 배양법으로 나뉜다. 클로렐라는 필수 아미노산과 생체에 여러 가지 생리적 기능을 수행하는 지방산과 스테롤, 유산균 성장 촉진 원인 물질인 chlorella growth factor (CGF)의 함유되어 있으며, 생체 내에서 중금속 배출기능, 독성물질의 분해, 동맥경화 및 간장 장애의 억제, 면역기능 강화, 항암 활성, 장내 유효세균의 증식 촉진, 식품의 풍미 향상 및 보습효과 등의 기능성을 가지고 있어 기능성 생물소재로 주목되고 있다. 클로렐라는 건강 기능식품, 화장품, 의약품 소재로서 응용될 수 있을 뿐만 아니라 이산화탄소의 고정화와 수소가스의 생성 등 환경 및 에너지의 생산을 위한 수단으로서의 역할이 전망된다.

REFERENCES

- Kim, S. J. (2002), Marine bioindustry development, *J. Microbiol. Biotechnol.* **15**, 16-18.
- Miguel, O. (2003), Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace, *Biomol. Eng.* **20**, 459-466.
- Bajguz, A. (2000), Effect of brassinosteroids on nucleic acids and protein content in cultured cells of *Chlorella vulgaris*, *Plant Physiol. Biochem.* **38**, 209-215.
- 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.
- Metting, B. and J. W. Pyne (1986), Biologically active compounds from microalgae, *Enzyme Microbial. Technol.* **8**, 386-394.
- Golueke, C. G. and W. J. Oswald (1963), Power from solar energy-via algae-produced methane, *Solar Energy* **7**, 86-92.
- Brown, M. R. and S. W. Jeffrey (1992), Biochemical composition of microalgae from the green algal classes *Chlorophyceae* and *Prasinophyceae*, *J. Exp. Marine Bio. Eco.* **161**, 91-113.
- 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 a tubular photobioreactor: quantitative analysis of the daily cyclic variation of culture parameters, *J. Biotechnol.* **70**, 271-288.
- Mustafa, M. G. and H. Nakagawa (1985), A review: Dietary benefits of algae as an additive in fish feed, *Isr. J. Aquacult.* **54**, 155-162.
- 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.
- 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.
- 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.
- Kim, Y. H., M. K. Park, B. D. Yun, H. S. Kim, H. H. Seo, H. M. Oh, and S. J. Lee (1998), Advanced treatment of swine wastewater by a green alga, *Scenedesmus quadricauda*, *Algae* **13**, 227-233.
- Piorreck, M., K.-H. Baasch, and P. Pohl (1984), Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimens, *Phytochem.* **23**, 207-216.
- Costa, J. A. V., L. M. Colla, and P. F. D. Filho (2003), Improving *Spirulina platensis* biomass yield using a fed-batch process, *Bioresource Technol.* 328-333.
- Karuss, R. W. (1962), Mass culture of algae for food and other organic compounds, *Am. J. Botany* **49**, 425-435.
- Atsushi, M. (1999), What is *Chlorella*, *Food Ind.* **9**, 122-138.
- Becker, E. W. (1994), Microalgae-biotechnology and microbiology, In *Cambridge Studies in Biotechnology Vol. 10*, J. Baddiley, N. H. Carey, I. J. Higgins and W. G. Potter, Eds., p293, Cambridge University Press, Cambridge.
- 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 (Tofu), *Kor. J. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **46**, 12-15.
- Park, M. -K., J. -M. Lee, C. -H. Park, and M. -J. In (2002), Quality characteristics of *Sulgidduk* containing *Chlorella* powder, *Kor. J. Soc. Food Sci. Nutr.* **31**, 225-229.
- Pore, R. S. (1984), Detoxification chlordecone poisoned rats with *Chlorella* and *Chlorella* derived sporopollenin, *Drug Chem. Toxicol.* **7**, 57-71.
- Nagano, T., Y. Watanabe, T. Honma, Y. Suketa, and T. Yamamoto (1978), Adsorption and excretion of cadmium by the rat administered cadmium-containing *Chlorella*, *Eisei Kagaku* **24**, 7182-7186.
- Hagino, N. (1975), Effect of *Chlorella* on fecal and urinary cadmium excretion in "Itai-Itai", *Jap. J. Hyg.* **30**, 77-83.
- Tsang, C. K., P. S. Lau, N. F. Y. Tam, and Y. S. Wong (1999), Biodegradation capacity of tributyltin by two *Chlorella* species, *Environ. Pollut.* **105**, 289-297.
- 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.
- 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.
- Morimoto, T., A. Nagatsu, N. Murkami, J. Sakakibara, H. Tokuda, H. Nishino, and A. Iwashima (1995), Anti-tumour-promoting glyceroglycolipids from the green alga, *Chlorella vulgaris*, *Phytochem.* **40**, 1433-1437.
- 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*, *Immunopharmacol.* **35**, 273-282.
- 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.
- Han, J. G., G. G. Kang, J. K. Kim, and S. H. Kim (2002), The present status and future of *Chlorella*, *Food Sci. Ind.* **6**, 64-69.
- Barclay, W. R., K. M. Meager, and J. R. Abril (1994), Heterotrophic production of long chain omega-3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganisms, *J. Appl. Phycol.* **6**, 123-129.
- Day, J. G. and A. J. Tsavalos (1996), An investigation of the heterotrophic culture of the green alga *Tetraselmis*, *J. Appl. Phycol.* **8**, 73-77.
- Kim, Y. H. (1999), The effect on bioactivities of *Chlorella*, *Food Ind.* **10**, 122-128.
- Kores, R., E. J. Schaefer, R. A. Squire, and G. M. Williams (2003), A review of the safety of DHA 45-oil, *Food Chem. Toxicol.* 1433-1446.
- Pollio, A., G. Pinto, M. D. Greca, A. Fiorentino, and L. Previtara (1996), Biotransformations of progesterone by *Chlorella* spp., *Phytochem.* **42**, 685-688.
- Greca, M. D., A. Fiorentino, G. Pinto, A. Pollio, and L. Previtara (1996), Biotransformation of progesterone by the green algal *Chlorella emersonii* C211-8H, *Phytochem.* **41**, 1527-1529.
- Kanno, T., K. Shinpo, M. Masada, and G. Tamura (1996), Growth-promoting factor for an extract of *Chlorella vulgaris* CK-5, *J. Ferment. Bioeng.* **81**, 159-162.
- Atsushi, M. (1999), Technology on quality control in *Chlorella* production, *Food J.* **9**, 82-97.
- Tamiya, H., T. Iwamura, K. Shibata, E. Hase, and T. Nihei (1953), Correlation between photosynthesis and light-independent metabolism in the growth of *Chlorella*, *Biochim. Biophys. Acta.* **12**, 23-40.
- Gladue, R. G. and J. E. Maxey (1994), Microalgal feeds for aquaculture, *J. Appl. Phycol.* **6**, 131-141.
- Tasukada, O. and T. Kawahara (1997), Mass culture of chlorella

- in asian countries, In *Biological Solar Energy Conversion*, A. Mitsui, S. Miyachi, A. SanPietro and H. Tamija, Eds., pp363-366, Academic Press, New York.
42. Soong, P. (1980), Production and development of *Chlorella* and *Spirulina* in taiwan. In *Algae Biomass*, G. Shelef and J. Soeder, Eds., pp97-113, Elsevier, Amsterdam.
 43. Richmond, A. (1990), Large scale microalgal culture and applications, In *Phycology Research for 1990*, Proc. Phycology Research Conference 1990, pp1-62.
 44. Richmond, A. (1987), The challenge confronting industrial microalgal culture: high photosynthetic efficiency in large-scale reactors, *Hydrobiol.* **151**, 117-121.
 45. Weissman, J. C., R. P. Geobel, and J. R. Benemann (1988), Photobioreactor design: mixing, carbon utilization and oxygen accumulation, *Biotechnol. Bioeng.* **31**, 336-344.
 46. Richmond, A. and A. Vonshak (1991), Preface of the special issue, *Bioresource Technol.* **38**, 83-84.
 47. Oh, H. M., J. S. Kim, and S. J. Lee (1998), Biological fixation for global warming gas of microalgae, *Kor. J. Environ. Biol.* **16**, 291-297.
 48. Matumoto, H., N. Shioji, A. Hamasaki, Y. Ikuta, Y. Fukuta, M. Sato, N. Endo, and T. Tsukamoto (1995), Carbon dioxide fixation by microalgae photosynthesis using actual flue gas discharged from a boiler, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **51**, 681-692.
 49. Laws, E. A. and J. L. Berning (1991), A study of the energetics and economics of microalgal mass culture with the marine chlorophyte *Tetraselmis suecica*: implications for use of powerplant stackgases, *Biotechnol. Bioeng.* **37**, 936-947.
 50. Watanabe, Y., D. L. J. Noue, and H. Do (1995), Photosynthetic performance of a helical tubular photobioreactor incorporating the cyanobacterium *Spirulina platensis*, *Biotechnol. Bioeng.* 269-330.
 51. Pirt, S. J., Y. K. Lee, M. R. Walach, M. W. Pirt, H. H. Balyuzi, and M. J. Barzin (1983), A tubular bioreactor for photosynthetic production of biomass from carbon dioxide: design and performance, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 35-58.
 52. Takano, H., H. Furu-Une, J. C. Burgess, E. Manabe, M. Hirano, M. Okazaki, and T. Matsunaga (1993), Production of ultra fine calcite particles by *Coccolithophorid* algae grown in a biosolar reactor supplied with sunlight, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **39**, 159-167.
 53. Csögör, Z., M. Herrenbauer, I. Perner, K. Schmidt, and C. Posten (1999), Design of a photo-bioreactor for modelling purposes, *Chem. Engin. Proc.* **38**, 517-523.
 54. Miron, A. S., A. C. Gomez, F. G. Camacho, E. M. Grima, and Y. Chisti (1999), Comparative evaluation of compact photobioreactors for large scale monoculture of microalgae, *J. Biotechnol.* **70**, 249-270.
 55. Lee, C. G. (1999), Large-culture of microalgae, *Mirobiol. Ind.* **12**, 22-29.
 56. Oh, H. M., J. S. Kim, and S. J. Lee (1998), Biological fixation of CO₂ by microalgae, *Kor. J. Environ. Biol.* **16**, 291-297.
 57. Scragg, A. H., A. M. Illman, A. Carden, and S. W. Shales (2002), Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor, *Biomass Bioenergy* **23**, 67-73.
 58. Rusch, K. A. and J. M. Christensen (2003), The hydraulically intergrated serial turbidostat algal reactor (HISTAR) for microalgal production, *Aquacult. Eng.* **27**, 249-264.
 59. Aksu, Z. and A. Unsal (2000), Modelling of a single-staged bioseparation process for simultaneous removal of iron (III) and chromium (VI) by using *Chlorella vulgaris*, *J. Biochem. Eng.* **4**, 229-238.
 60. Singh, A., S. P. Singh, and R. Bamezai (1999), Inhibitory potential of *Chlorella vulgaris* (E-25) on mouse skin papillomagenesis and xenobiotic detoxication system, *Anticancer Res.* **19**, 1887-1892.
 61. Baek, S. H., S. J. Kim, J. H. Han, and J. W. Heo (2001), Detoxification of lead poisoned rats with *Chlorella*, *Proc. The 3rd International Symposium on Chlorella*, pp65-77, Korea.
 62. Cho, I.-K., S.-H. Kim, D.-C. Kim, H. J. Chae, N.-S. Oh, D.-H. Kim, and M.-J. In (2001), Comparison on chlorine removal characteristics of *Chlorella vulgaris* and green tea in aqueous solution, *Kor. J. Soc. Food Sci. Nutr.* **30**, 344-349.
 63. Tam, N, F. Y., A. M. Y. Chong, and Y. S. Wong (2002), Removal of tributyltin (TBT) by live and dead microalgal cells, *Marine Pollut. Bull.* **45**, 362-371.
 64. Hook, I. L., S. Ryan, and H. Sheridan (1999), Biotransformation of aromatic aldehydes by five species of marine microalgae, *Phytochem.* **51**, 621-627.
 65. Travieso, L., A. Pellon, F. Benitez, E. Sanchez, R. Borja, N. O'Farrill, and P. Weiland (2002), BIOALGA reactor: preliminary studies for heavy metals removal, *J. Biochem. Bioeng.* **33**, 87-91.
 66. Bashan, L. E. D., M. Moreno, J.-P. Hernandez, and Y. Bashan (2002), Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*, *Water Res.* **36**, 2941-2948.
 67. Queiroz, M. L. S., A. P. O. Rodrigues, C. B. C. A. V. Figueiredo, and S. Malacrida (2003), Protective effects of *Chlorella vulgaris* in lead-exposed mice infected with *Listeria monocytogenes*, *Immunopharmacol.* **3**, 889-900.
 68. Konishi, F., K. Tanaka, S. Kumamoto, T. Hasegawa, M. Okuda, I. Yano, Y. Yoshikai, and K. Nomoto (1990), 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**, 1-7.
 69. Konishi, F., K. Tanaka, K. Himeno, K. Taniguchi, and K. Nomoto (1985), Antitumor effect induced by a hot water extract of *Chlorella vulgaris* (CE): resistance to meth a tumor growth mediated by CE-induced polymorphonuclear leukocytes, *Cancer Immu. Immunother* **19**, 73-78.
 70. Tanaka, K., T. Koga, F. Konishi, M. Nakamura, K. Mitsuyama, and K. Nomoto (1986), Agumentatin of host defense by a unicellular green alga, *Chlorella vulgaris*, to *Escherichia coli* infection, *Inf. Immun.* **53**, 267-271.
 71. 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, *Immunopharmacol.* **21**, 311-323.
 72. Noda, K., N. Ohno, K. Tanaka, N. Kamiya, M. Okuda, T. Yadomae, K. Nomoto, and Y. Shoyama (1996), A water soluble antitumor glycoprotein from *Chlorella vulgaris*, *Plant Med.* **62**, 423-426.
 73. Konishi, F., M. Misuyama, 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-fluouracil, *Cancer Immunol Immun.* **42**, 268-274.
 74. Hasegawa, T., Y. Yoshikai, M. Okuda, and K. Nomoto (1990), 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*, *Immunopharmacol.* **12**, 883-891.
 75. Ibusuki, K. and Y. Minamishima (1990), Effect of *Chlorella vulgaris* extracts on murine cytomegalovirus infections, *Nat. Immun. Cell Growth Regul.* **9**, 121-128.
 76. Hasegawa, T., K. Tanaka, K. Ueno, S. Ueno, M. Okuda, Y. Yoshikai, and K. Nomoto (1989), Agumentation of the resistance against *Escherichia coli* by oral administration of a hot water extract of *Chlorella vulgaris* in rat, *Immunopham.* **11**, 971-976.

77. Brown, L. M. and K. G. Zeiler (1993), Aquatic biomass and carbon dioxide trapping, *Energy Conv. Manag.* **34**, 1005-1013.
78. Yun, Y. -S., J. M. Park, and J. -W. Yang (1996), Enhancement CO₂ of tolerance of *Chlorella vulgaris* by gradual increase of CO₂ concentration, *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **10**, 713-716.
79. Sung, G. D., J. S. Lee, C. S. Shin, M. S. Kim, S. C. Park, and S. W. Kim (1998), CO₂ fixation by *Chlorella* HA-1 cultured in bubble columns, *Biotechnol. Bioeng.* **10**, 401-405.
80. Calvin, M. and S. E. Taylor (1989), Fuels for algae, In *Algal and Cyanobacterial Biotechnology*, R. C. Cressell, T. A. V. Rees and N. Shah, Eds., pp138-160, Harlow: Longman Scientific and Technical Publishers, England.
81. Kosaric, N. and J. Velikonja (1995), Liquid and gaseous fuels from biotechnology: challenge and opportunities, *FEMS Microbiol. Rev.* **16**, 111-142.
82. Kang, C. M. and B. T. Kim (1996), Degradation characteristics and microbial behavior of microalgae in methane fermentation, *J. Kor. Solid Wastes Eng. Soc.* **13**, 138-144.
83. Melis, A., L. Zhang, M. Forestier, M. L. Ghirardi, and M. Siebert (2000), Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible of oxygen evolution in the green alga, *Chlamydomona reinhardtii*, *Plant Physiol.* **122**, 127-135.
84. Ratledge, C. (1989), Biotechnology of oils and fats, In *Microbial Lipids 2*, C. Ratledge, S. G. Wilkinson, Eds., pp567-688, Academic Press, London.
85. Borowitzka, M. A. (1988), Fats, oils and hydrocarbons. In *Micro-algal Biotechnology*, M. A. Borowitzka and L. J. Borowitzka, Eds., pp257-287, Cambridge University Press, Cambridge.
86. Zahner, H. and H. P. Fiedler (1995), Fifty years of antimicrobials, In *Past Perspectives and Future Trends*, P. A. Hunter, G. K. Darby, and N. J. Russell, Eds., Cambridge University Press, Cambridge.
87. Gouveia, L. and J. Empis (2003), Relative stabilities of microalgal carotenoids in microalgal extracts, biomass and fish feed: effect of storage conditions, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **4**, 227-233.
88. Miki, W. (1991), Biological functions and activities of carotenoids, *Pure Appl. Chem.* **23**, 141-146.
89. Kang, M. S., S. J. Sim, and H. J. Chae (2004), Partial purification of bioactive proteins from *Chlorella* hydrolysate, *Kor. Soc. Food Eng. (in press)*.
90. Kang, M. S. and H. J. Chae (2004), Biological efficacy assay of *Chlorella* hydrolysate, *Kor. Ins. Indus. Technol. (in press)*.