

클로렐라 가수분해물로부터 항암 및 혈액 응고 저해 활성을 가진 단백질의 부분 정제

강민숙 · 심상준* · 채희정**

호서대학교 식품영양학과, *성균관대학교 화학공학과
**호서대학교 식품생물공학과 및 벤처전문대학원 첨단산업기술전공

Partial Purification of Anticancer and Anticoagulant Proteins from Chlorella Hydrolysate

Min-Sook Kang, Sang-Jun Sim* and Hee Jeong Chae**

Department of Food and Nutrition, Hoseo University

*Department of Chemical Engineering, Sungkyunkwan University

**Department of Food and Biotechnology, Hoseo University

Abstract

Partial purification of proteins that have anticancer and anticoagulant activities from *Chlorella* hydrolysate was carried out. *Chlorella* hydrolysate was prepared by hydrolysis using trypsin. Among the fractions obtained by Sephacryl S-200 gel permeation chromatography (GPC), a fraction of 1.3 CV (column volume) had the highest anticoagulant and anticancer activities. An unbound fraction by QSPF anion exchange chromatography with the highly active GPC fraction showed the highest anticancer and anticoagulant activities. Consequently, purification of anticoagulant protein from *Chlorella* hydrolysate was carried out by a consecutive three-step procedure consisting of GPC, IEC and C₄ reversed phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC). The molecular weight of high anticoagulant activity band on SDS-PAGE gel was determined as 40~57 kDa.

Key words: *Chlorella* hydrolysate, anticancer, anticoagulant proteins, purification

서 론

클로렐라는 녹조류로 담수 중에 증식하는 단세포 식물로, 분류학상 *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(Kang *et al.*, 2004).

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(Park *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003), 항암 활성(Morimoto *et al.*, 1995) 외의 3차적 식품으로서 기능성의 탐색이 활발히 진행

Corresponding author: Hee Jeong Chae, Department of Food and Biotechnology, Hoseo University, Asan 336-795, Republic of Korea.

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

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

중에 있다. 그 예로 환경 호르몬인 다이옥신의 체내 배출(Pore, 1984), 체내 중금속의 축적억제 및 배설(Nagano *et al.*, 1978), 환경독성 물질의 생물학적 분해(Tsang *et al.*, 1999), 동맥경화 및 간장 장애의 억제(Singh *et al.*, 1998), 항암 활성(Takahashi *et al.*, 1989), 면역기능 강화(Hasegawa *et al.*, 1997; Hasegawa *et al.*, 1999), 세포의 부활작용(Han *et al.*, 2002), 식품의 풍미향상 및 보습효과(Park *et al.*, 2002) 등의 기능성이 보고된 바 있으며, 식품학적 이용 이외에 *Chlorella*를 수산 양식용 사료로 사용하거나(Becker, 1980), 폐수에 존재하는 수은의 축적을 위한 기능소재로 활용하기 위한 연구가 보고된 바 있다(Wilkinson *et al.*, 1990).

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 대두되면서 발암인인 물질의 검색과 함께 일상에서 섭취하는 식품 중에서 항암제로 이용할 수 있는 물질이 활발히 연구되고 있다(Bardifield와 Bjeldanes, 1984; Morita *et al.*, 1987; Wall *et al.*, 1989; Seo *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 2000). 클로렐라도 항암 및 면역기능 활성화에 기여한다는 보고(Konishi *et al.*, 1990; Hasegawa *et al.*, 1999)가 있다. 클로렐라로부터 분리된 glyceroglycolipid인 monogalactosyl diacylglycerol의 일종이 종양을 억제한다고 한다(Morimoto *et al.*, 1995). 클로렐라의 제암 효과는 암의 면역 성립에 주요한 역할을 하는 helper-T 세포를 강하게 활성화하는 실험결과가 보고된 바 있다(Konishi *et al.*, 1996; Noda *et al.*, 1996). 위의 결과들로 미루어 클로렐라는 면역계를 활성화하여 암전이 억제효과를 나타내므로 항암보조제로 중요한 역할을 할 것으로 기대된다(Hasegawa *et al.*, 1989; Hasegawa *et al.*, 1990; Ibusuki와 Minamishima, 1990; Konishi *et al.*, 1990). 또한 클로렐라 추출물은 마크로파지의 interleukin과 interferon mRNA 발현 수준을 올리고 *L. monocytogenes* 감염 후 MAIDS (murine retrovirus induced acquired immunodeficiency syndrome)를 갖는 쥐와 정상 쥐의 비장 기능을 향상시킨다고 보고되어 있다(Hasegawa *et al.*, 1997).

사망률 1위인 심혈관계 질환의 원인으로 혈전의 형성을 들 수 있다. 혈관의 손상 등과 같은 요인으로 인하여 혈액이 응고되는 현상으로 혈전이 혈관

에 침착될 경우 정맥 및 동맥에서 혈액순환을 방해하여 조직으로의 영양공급 및 산소공급을 차단함으로써 뇌출혈, 뇌혈전, 심부전, 심근경색, 동맥경화 등 순환기계의 성인병의 원인이 된다(Kim, 1994). 이러한 혈전증을 치료하기 위한 목적으로 다양한 치료제들이 개발되어 있으나 대부분 고가이거나 체내에서의 흡수, 내산성 등의 문제로 urokinase를 제외하고는 경구 투여가 불가능한 것으로 알려져 새로운 제재 개발의 필요성이 대두되고 있다. 혈액 응고 저해제에 대한 연구로는 Fenton *et al.*(1991)이 thrombin의 구조와 기능에 대하여 연구하였고, Binnie *et al.*(1990)이 hirudin 펩타이드 합성에 의한 thrombin의 활성저해에 대하여 발표하였으며, Carpiello *et al.*(1996)은 사람의 thrombin에 대한 2가지 hirunorm 펩타이드의 저해활성에 대하여 연구하였다. 혈액 응고 저해 물질로 기대할 수 있는 물질은 혈전 생성에 작용하는 thrombin을 저해하는 thrombin inhibitor 또는 fibrin clotting inhibitor로서 혈액 응고 저해 펩타이드가 있다(Kim *et al.*, 2004). 혈액응고 저해활성은 클로렐라를 대상으로 보고된 바는 없다.

지금까지의 클로렐라와 관련된 연구는 클로렐라의 열수추출물(hot water extract of *Chlorella*)을 이용하였으나, 본 연구에서는 클로렐라 가수분해물을 이용하여 인체 내에서의 효소적 가수분해물 이용하였다. 기능성 식품소재 및 각종 응용제품에 대한 탐색연구로서 클로렐라의 여러 가지 생리활성 중에 항암 활성과 혈액응고 저해활성을 조사하였다. 이들 생리활성이 높은 단백질 성분을 부분정제하여 클로렐라를 이용한 각종 기능성 소재로의 개발 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

실험재료로 사용한 클로렐라(*Chlorella* sp.) 원말 분말은 대상(주) 군산공장(한국)으로부터 제공받았으며 trypsin은 Novo Nordisk사(Denmark) 제품을 사용하였다. Ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), trifluoroacetic acid(TFA), coomassie brilliant blue R-250와 heparin은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 다른 시약들은 일급 시약을 사용했으며, 크로마토그래피용 유기용매는 HPLC급을 사용하였다.

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 파쇄하여 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 시작물질로써 사용하였으며, 고형분 농도는 굴절계(Tokyo Co., Japan)를 이용하여 측정하였다.

분리정제 실험

젤여과크로마토그래피(gel permeation chromatography, GPC)

클로렐라 가수분해물(CH)을 50 mM Tris-HCl(pH 7.5)로 평형이 유지된 컬럼(Φ1.7×42 cm)에 통과시켰다. GPC용 수지로 Sephacryl S-200(Amersham Biosciences, Sweden) 70 mL를 유리컬럼에 충전하였고, 이 때 유속은 18 mL/hr로 20분에 6 mL씩 분획하였다. 각 분획들은 UV 검출기 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

이온 교환 크로마토그래피(ion exchange chromatography, IEC)

이온교환크로마토그래피는 fast protein liquid chromatography(FPLC) 장비인 AKTA Prime(Amersham Pharmacia Biotech, England)을 이용하였다. 음이온 교환수지인 Q Sepharose Fast Flow 컬럼(QSFF, Amersham Biosciences, Sweden)을 유리컬럼에 11 mL 충전하여 사용하였다. 용매 A는 20 mM Tris-HCl(pH 6.0)를 사용하였고, 용매 B는 1 M NaCl을 사용하였다. 용매 A(100%)로 1 column volume(CV)정도 평형화한 후, 50 CV가 될 때 용매 B(100%)로 linear gradient로 통액하였다. 이 때 유속은 30 mL/hr로 12분당 6 mL을 한 분획씩 수집하였다. 각 분획들은 UV검출기 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

역상 HPLC (reversed phase-high performance liquid chromatography, RP-HPLC)

IEC에서 활성이 있는 분획을 원심 농축기(Speed Vac, Bioneer, Korea)로 농축하였다. 농축된 분획들은 HPLC system(Gilson 512, Gilson, USA)에 C4 reversed phase column(Φ 4.6×250 mm, Vydac Co., USA)을 이용하여 용출시켰다. 용매 A는 0.1% TFA를 첨가한 초순수를 사용하였고, 용매 B는 0.1% TFA를 첨가한 acetonitrile를 사용하였다. 용매 A(95%)와 용매 B(5%)의 혼합용매로 10분간 평형을 유지한 후 0.5 mL/min의 유속으로 용매 B를 5-65%로 60분간 linear gradient로 통액하였다. 용출되는 분획들은 UV 검출기 214 nm에서 흡광도가 측정되었으며, 1분에 한 분획씩 수집되었다.

SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)

전기영동 gel은 5%의 stacking gel과 15%의 separating gel이 사용되었다. 전류는 30 mA로 전기영동하였으며, gel은 coomassie brilliant blue R-250으로 staining, destaining하여 확인하였다.

생리활성 분석

모든 활성 분석 실험에서는 각 시료별로 3회 반복 실험하였고, 이를 평균±표준오차로 그래프에 표시하였다.

항암 활성 측정

한국세포주은행에서 분양받은 폐암세포 A-549를 이용하여 96-well plate에서 항암 물질로 알려진 indole-3-carbinol(Slominski와 Campbell, 1988)을 대조구로 사용하여 trypsin 가수분해물 및 여러 가지 크로마토그래피 분획을 이용하여 항암 활성의 유무를 정량적으로 분석하였다. 암세포의 생존율을 MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetra-zolium bromide)을 이용하여 570 nm에서 흡광도로 분석(Denizot와 Lanf, 1986)하였으며, MTT 용액은 phosphate buffer saline(PBS) 0.1%에 2 mg/mL의 농도로 MTT를 용해한 것을 사용하였다.

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

여기서, A_{sample} : 시료의 흡광도

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

혈액응고 저해활성 측정

혈액응고 저해 활성은 blood coagulation analyzer 인 coagulometer(Coatron M1, TECO, Germany)를 이용하여 fibrin clotting assay에 의하여 thrombin time(TT)을 측정하는 방법을 사용하였다. 혈액응고 활성 중 thrombin time을 측정하기 위하여, thrombin을 10 mM Tris buffer (6 mL)에 0.125 unit이 용해되도록 칭량하여 사용하였다. Fibrinogen은 10 mM Tris buffer(10 mL)에 0.150%(w/v)의 농도로 용해하여 사용하였다. 시료(12 μ L)와 fibrinogen 용액(238 μ L)를 마이크로튜브에 넣고 vortex를 이용하여 혼합하였으며, 시료-fibrinogen 혼합시료(25 μ L)를 큐벳에 첨가한 후 coagulometer에서 3분간 37°C으로 예열하였다. 예열된 큐벳에 thrombin(50 μ L)를 첨가한 후 fibrin clotting time을 coagulometer를 이용하여 측정하였다. 즉 TT가 큰 값을 보이는 경우 thrombin에 의한 혈액응고가 지연됨을 의미한다. 즉, 본 연구에서는 이러한 TT를 혈액응고 저해 활성으로 하여 분석하였다. TT를 정량적 수치로 환산하기 위하여 TT 시약(Diagnostica Stago, France)을 농도별로 회석하여 표준곡선을 작성하였다. 표준곡선의 기울기와 절편을 이용하여 혈액응고 저해율(fibrinogen clotting inhibition, FCI)을 식(2)와 같이 환산하여 계산하였다.

$$FCI = \left(1 - \frac{TU_{\text{sample}}}{TU_{\text{DW}}}\right) \times 100\% \quad (2)$$

여기서 TU_{sample} : 시료의 thrombin unit

TU_{DW} : 증류수의 thrombin unit

혈액응고저해 활성 분석의 양성 대조구로 천연 혈액응고 저해물질인 heparin(1%)을 이용하였다. 활성 측정은 각 정제 단계마다 수행하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서 사용한 실험재료인 클로렐라는 단백질을 다량(약 60%) 함유하고 있다. 따라서 생리활성을 나타낼 수 있는 여러 성분 중에서도 단백질 계열의 물질에 주목하였다. 단백질계 생리활성소체는 *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 trypsin을 사용하여 가수분해하였다. 이렇게 얻은 클로렐라의 가수분해물을 생리활성 분석과 분리정제의 출발물질로 이용하였다.

GPC/IEC를 통한 생리활성 물질의 분획

Fig. 1은 클로렐라 가수분해물을 GPC로 분리하여 얻어지는 분획을 column volume(CV)별로 항암활성 및 혈액응고저해 활성을 분석한 결과이다. 280 nm에서 높은 흡광도를 나타낸 GPC 분획(1.3~1.7 CV)을 혼합물의 농도별 항암 활성의 유무를 분석하였다. Fig. 1(a)에서 보는 바와 같이 GPC 분획 초기에 흡광도가 높은 피크를 얻을 수 있었으며, 분획 초기에 용출된 것으로 보아 분자량의 크기가 작지 않음을 판단할 수 있었다. 이와같이 얻은 GPC 분획을 농축하여 항암 활성을 측정한 결과 GPC의 1.3 CV에서 가장 우수한 항암 활성을 나타내었다(Fig. 1(b)). 항암활성 물질이 GPC 초기 분획에서 높은 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

클로렐라의 기능성 중 동맥경화에 대한 효과(Singh *et al.*, 1998)가 보고된 바 있어 본 연구에서는 혈액응고 저해에 대한 활성을 확인해 보았다. 용출된 GPC 분획들을 원심농축기로 농축시켜 thrombin time(TT)을 측정하여 혈액응고 저해활성을 분석하였다(Fig. 1(c)). GPC 분획 중 1.3 CV의 분획이 혈액응고 저해활성이 가장 높음을 확인하였다. 천연 혈액응고 저해물질인 heparin(1%)의 경우 80초의 TT를 보인 반면 1.3 CV는 1200초의 높은 TT를 보였다. 고 활성을 보인 분획은 280 nm의 파장에서 높은 수치를 나타낸 분획이었다. 항암 및 혈액응고 저해활성을 가진 물질이 단백질 계열임을 확인하기 위하여 biconchonic acid(BCA) assay(Jang *et al.*, 2002)를 이용해 단백질을 정량하였다. 1.3, 1.5, 1.7, 3.8 CV는 각각 대략 1090, 1807, 1233, 15 μ g/mL의 단백질을 포함하고 있어 단백질 함량은 흡광도와 비례함을 확인할 수 있었다. 즉, 280 nm에서 흡광도가 높은 분획에서 TT 값이 높게 나오는 것로부터 항암, 혈액응고 저해활성 물질이 단백질 계열임을 알 수 있었다.

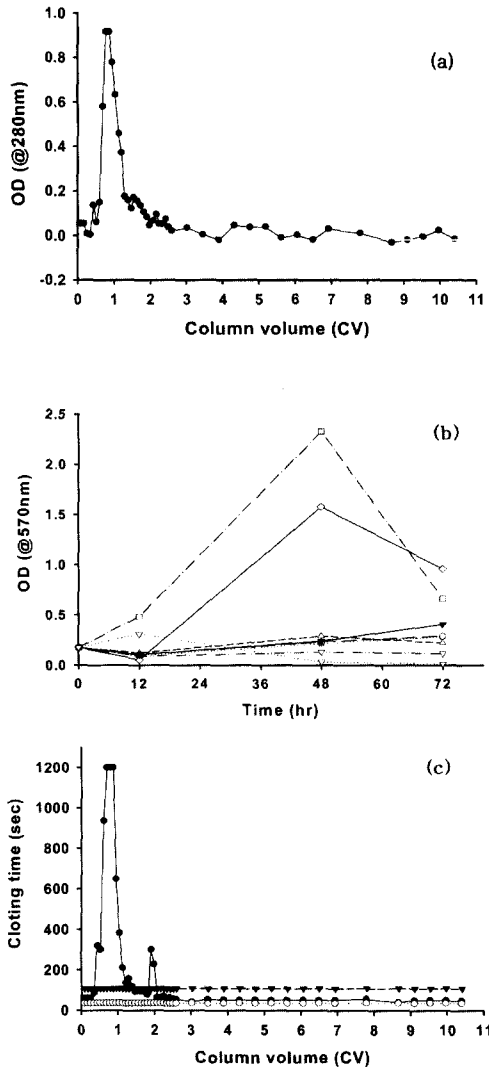


Fig. 1. (a) GPC chromatogram of *Chlorella hydrolysate*, (b) anticancer activity of GPC fractions of *Chlorella hydrolysate* and (c) anticoagulant activity measured by clotting time of GPC fractions of *Chlorella hydrolysate*.
 Symbol for (b): (· ○ ·) GPC fraction of 0.87 CV, (— ▽ —) GPC fraction of 1.3 CV, (— □ —) GPC fraction of 1.73 CV, (— ◇ —) GPC fraction of 2.1 CV, (· △ ·) GPC fraction of 3.8 CV, (— ▽ —) Tris-HCl buffer, (— ▽ —) 0.001% indole-3-carbinol.

백독과 거머리에서 분리된 단백질 계열의 혈액응고 저해활성 물질이 음이온성 물질임이 보고된 바 있다(Hong와 Kang, 1999; Koh et al., 2001). 따라서 GPC 분획들의 CT측정 시 heparin(1%)과 비교하여 활성이 우수한 1.3 CV를 음이온 교환 컬럼인 QSFF 컬럼을 이용하여 분획하였고(Fig. 2), 각각의

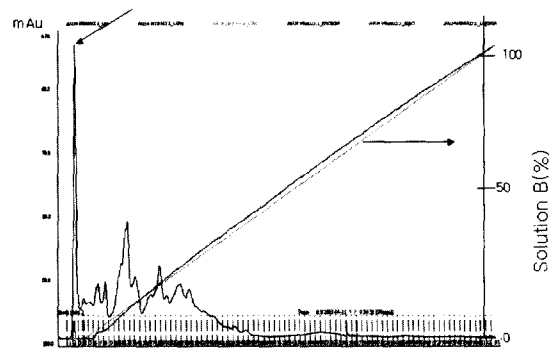


Fig. 2. Chromatogram of anion exchange chromatography using the GPC fraction(1.3 CV in Fig. 1(a))
 A: distilled water, B: 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, C: heparin (1%)

분획에 대하여 혈전제를 이용하여 TT를 측정하였다. 대조군으로 IEC 완충액(20 mM Tris-HCl)을 이용하여 작성한 표준곡선을 이용하여 각 분획별 CT에 따른 FCI를 계산한 결과, GPC 1.3 CV 분획을 IEC하였을 때 unbound되어 용매 B의 gradient 전에 용출된 1.2 CV(Fig. 2에서 화살표로 표시된 분획)에서 가장 높은 혈액응고 저해활성(CT=2400초)을 나타냈다. 항혈전 관련 선행연구에서 혈액응고 저해활성 물질의 분리에 음이온 교환 컬럼을 이용한 경우가 대부분이었으나(Wilkinson et al., 1990; Hong와 Kang, 1999; Koh et al., 2001), 클로렐라의 혈액응고 저해활성 물질의 경우 음이온교환컬럼에서 unbound된 것으로 음이온성 물질이 아닌 것을 추정할 수 있었다.

RP-HPLC에 의한 혈액응고 저해활성 물질의 분리정제

상기 IEC에서 unbound된 1.2 CV 분획이 높은 FCI 값을 보였으며, 이 분획을 이용하여 추가적인 정제 방법으로 RP-HPLC를 실행하였다. IEC의 고활성 분획을 농축하여 0.5 mL/min 속도로 5-65%까지 60분간 용매 B로 linear gradient를 흘려 C₄ reversed-phase 컬럼을 이용하여 HPLC를 실시하였으며, RP-HPLC 분획으로부터 혈액응고 저해활성이 높은 분획을 선별하였다. 각 분획의 FCI를 환산한 결과, Fig. 3에서 보는 바와 같이 초기의 큰 유기용매분획의 용출 후 분획 36번(retention time=36분)에서 heparin (1%)과 유사한 수준의 가장 높은 혈액응고 저해활성(TT=78.7초)을 보였다. 이 때 HPLC 상의 피크는 상대적으로 높지 않으며 피크가 완전 분리되지 않은 것으로 보아 완전히 정제되지 않은 저 농도의

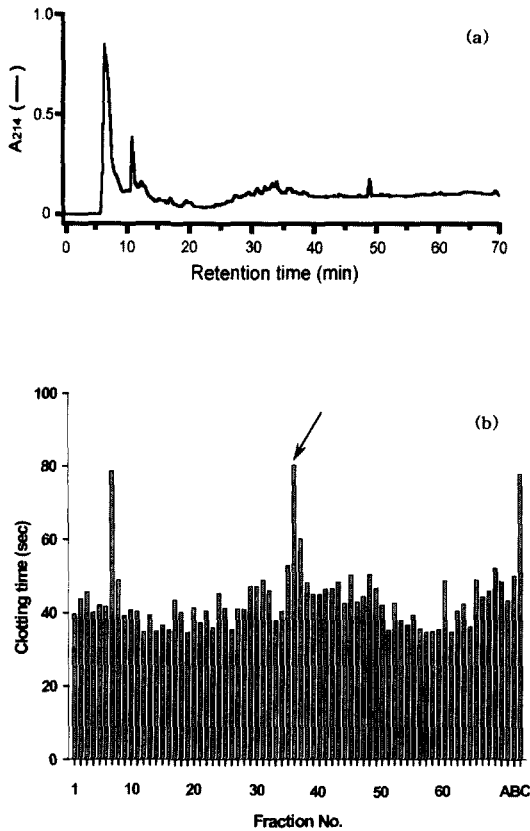


Fig. 3. (a) RP-HPLC chromatogram using the IEC fraction(1.2 CV in Fig. 2) and (b) anticoagulant activity of RP-HPLC fraction.

A: distilled water, B: 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, C: heparin (1%)

단백질 물질이 높은 혈액응고 저해활성을 보인 것으로 판단할 수 있다.

RP-HPLC 분획 중 혈액응고 저해활성이 우수한 분획(36번 분획)을 선별하여 12% SDS-PAGE로 분자량을 확인한 결과, 분자량의 범위는 40~57 kDa에서 나타났다.

이상으로 클로렐라의 알려진 생리활성 이외에도 혈액응고 활성저해나 폐암 등의 생리활성을 검토하였다. 향후 HPLC 분리조건 최적화와 단백질 동정 실험을 통하여 혈액응고 저해, 항암 활성의 기능성 소재로서 개발 가능할 것으로 기대된다.

요 약

클로렐라 가수분해물로부터 항암 및 혈액 응고

저해 활성이 있는 단백질을 부분정제하였다. 클로렐라 추출물을 trypsin으로 가수분해하여 항암 활성과 혈액응고 저해활성을 확인하였다. 가수분해물을 출발물질로 하여 얻은 Sephacryl S-200 겔여과크로마토그래피(gel permeation chromatography, GPC)의 분획 중 1.3 CV(column volume)의 분획이 가장 높은 항암 활성과 혈액응고 저해활성을 나타내었다. GPC 고효성 분획을 음이온교환수지인 QSFF겔럼을 이용하여 분획한 결과 unbound되어 용출된 분획에서 가장 높은 항암 활성과 혈액응고 저해활성을 확인할 수 있었다. 결과적으로, GPC, 이온교환크로마토그래피, C₄ 역상 고성능액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography, RP-HPLC)를 거쳐 클로렐라 가수분해물을 부분정제하고 SDS-PAGE로 전기영동한 결과 혈액응고 저해활성이 있는 물질의 분자량이 대략 40~57 kDa임을 확인할 수 있었다.

참고문헌

Bardfield, C. and L. Bjeldanes. 1984. Effect of dietary indole-3-carbinol on intestinal and hepatic monooxygenase, glutathione S-transferase and epoxide hydrolase activities in the rat. *Food Chem.* **22**: 977-982

Becker, E.W. 1980. Comparative toxicological studies with algae in India, Thailand and Peru. In: Shelef and Soeder (Eds.). *Algae Biomass*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, North-Holland. pp. 767 -786

Binnine, C.G., B.W. Erickson and J. Hermans. 1990. Inhibition of thrombin by synthetic hirudin peptides. *FEBS Lett* **270**: 85-89

Carpiello, M., P.G. Vilado, A. Lippi, M.A. Criscuoli and U. Mura. 1996. Kinetics of human thrombin inhibition by two novel peptide inhibitors (Hirunorm IV and Hirunorm V). *Biochem. Pharmacol.* **52**: 1141-1146

Denizot, F. and H. Lanf. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensivity and reliability. *J. Immun. Methods* **89**: 271-277

Fenton II, J.W., F.A. Ofosu, D.G. Moon and J.M. Maraganore. 1991. Thrombin struture and function: why thrombin is the primary target for antithrombotics. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **2**: 69-75

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

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. *Int. J. Immunopharmacol.* **11**: 971-976
- Hasegawa, T., Y. Yoshikai, M. Okuda and K. Nomoto. 1990. Accelerated restoration of the leukocyte number and augmented resistance against *Escherichia* in cyclophosphamide-treated rats orally administered with a hot water extract of *Chlorella vulgaris*. *Int. J. Immunopharmacol.* **12**: 883-891
- 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
- Hong, S.J. and K.W. Kang. 1999. Purification of granulink-like polypeptide from the blood sucking leech, *Hirudo nipponia*. *Protein Exp. Purif.* **16**: 340-346
- Ibusuki, K. and Y. Minamishima. 1990. Effect of *Chlorella vulgaris* extracts on murine cytomegalovirus infections. *Nat. Immun. Cell Growth Regul.* **9**: 121-128
- Jang, W.S., K.N. Kim, Y.S. Lee, M.H. Nam and I.H. Lee. 2002. Halocidin: a new antimicrobial peptide from hemocyte of the solitary Tunicate, *Halocynthia aurantium*. *FEBS Letters* **521**: 81-86
- Kang, M.-S., S.-J. Sim and H.J. Chae. 2004. *Chlorella* as a functional biomaterial. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* (in press).
- Kim, D.C., H.J. Chae and M.-J. In. 2004. Existence of stable fibrin clotting inhibitor in salt-fermented anchovy sauce. *J. Food Compos. Anal.* (in press)
- Kim, S., M. Park, N. Oh, D. Kim, M. Han and M.J. In. 2003. Studies on quality characteristics and shelf-life of chlorella soybean(Tofu). *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **46**: 12-15
- Kim, Y. 1994. Identification of the fibrinolytic bacterial strain from chungkook-jang. *PhD Thesis*. Sejong University
- Koh, Y., K., Chung and D. Kim. 2001. Biochemical characterization of a thrombin-like enzyme and a fibrinolytic serine protease from snake. *Toxicon.* **39**: 555-560
- Konishi, F., K. Tanaka, S. Kumamoto, T. Hasegawa, M. Okuda, I. Yano, Y. YoshiKai and K. Monoto. 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
- 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. Immunol.* **42**: 268-274
- Lee, H., J. Lee, D.C. Kim, M.-J. In and W.I. Hwang. 2000. The inhibitory effects of propolis on *in vitro* proliferation of human cancer cell. *Korean Nutr. Soc.* **33**: 80-85
- 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
- Morita, K., M. Hara and T. Kada. 1987. Studies on natural desmutagens: screening for vegetable and fruit factors active in inactivation of mutagenic pyrolysis products from amino acid. *Agric. Biol. Chem.* **42**: 1235-1241
- Nagano, 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
- 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
- Park, M., J. Lee, C. Park and M.J. In. 2002. Quality characteristics of *Sulgidduk* containing chlorella powder. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **31**: 225-229
- Pore, R.S. 1984. Detoxification Chlordecone poisoned rats with *Chlorella* and *Chlorella* derived sporopollenin. *Drug Chemical Toxicol.* **7**: 57-71
- Seo, J., Y. Lee, N. Suh and I. Chang. 1990. Assay of antimutagenic activities of vegetable plants. *J. Korean Pharm.* **21**: 88-97
- 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
- Slominski, B.A. and L.D. Campbell. 1988. Gas chromatographic determination of indoleacetonitriles in rapeseed and brassica vegetables. *J. Chromatogr.* **454**: 285-291
- Takahashi, 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
- 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
- Wall, M., M. Wani, G. Manikumar, H. Taylor, T. Hughese and K. Gaetono 1989. Plant antimutagenic agents: structure and antimutagenic properties of cymobarbatol and 4-isocymobarbatol, new cymopols from green alga (*Cymopolia barbata*). *J. Nutr. Prod.* **52**: 1092-1099
- 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