

Astaxanthin 처리 산란계로부터 생산된 난황이 Mouse Liver Microsome의 산화에 미치는 영향

김홍출* · 박숙자 · 김정곤 · 박철우 · 조용운* · 조현중** · 하영래†

경상대학교 응용생명과학부
*진주산업대학교 미생물공학과
**농협중앙회 식품연구소

Effect of Egg Yolks from Laying Hens Intubated Astaxanthin on the Oxidation of Liver Microsome of Mouse

Hong Chul Kim*, Sook Jahr Park, Jung Kon Kim, Cherl Woo Park,
Yong Un Cho*, Hyeon Jong Cho** and Yeong Lae Ha†

Division of Applied Life Sciences, and Institute of Agriculture and Life Sciences,
Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

*Dept. of Microbiological Engineering, Chinju National University, Chinju 660-758, Korea

**Food Research Institute, National Agricultural Cooperative Federation, Goyang 412-707, Korea

Abstract

Effect of the egg yolks from laying hens intubated, p.o., astaxanthin (designated AEY) on the oxidation of mouse liver microsome was investigated using female ICR mouse (6~7 weeks of age). Mice were adapted in a temperature- and humidity-controlled house for one week and randomly divided into 7 treatment groups (10 mice/cage/treatment). Mice were intubated p.o., AEY (50, 100 and 150 mg) or control egg yolk (CEY, 150 mg) every week for 3 weeks. BHT (5 mg) and α -tocopherol (50 mg) were fed to mice as positive control. At week 4, the liver microsome was prepared from sacrificed mice. Protein content of mouse liver microsome with AEY treatment was relatively higher than that with CEY treatment. AEY treatment remarkably lowered the content of unsaturated fatty acids including oleic acid and linoleic acid, but raised that of the saturated fatty acids including stearic acid. AEY group showed relatively higher antioxidative activity than CEY, when used Asc/Fe⁺² or NADPH/Fe⁺² as oxidant. Antioxidative activity of AEY was more effective than α -tocopherol, but less effective than BHT.

Key words: astaxanthin, egg yolk, mouse liver microsome, antioxidative activity

서 론

Astaxanthin은 vitamine A의 전구체이고 isoprene unit가 8개 결합하여 형성된 tetraterpene류로서 분자내에 13개의 공역이중결합을 가지는 구조적인 특성을 가지고 있다. 최근에는 항암작용(1), 면역강화작용(2) 외에, 세포내에서 생성되는 유해한 산화적 반응을 개시하는 과산화물 또는 자유 라디칼 소거제(3,4) 등의 활성을 가지기 때문에 의약 및 식품산업에서 이용 가능성이 증대되고 있을 뿐 아니라 항산화제로서 주목을 받고 있다.

Astaxanthin의 항산화성에 관한 연구로 대두유에서 chlorophyll-sensitized photooxidation을 유도한 다음 total singlet oxygen quencher rate를 측정하여 astaxanthin의 항산화 효과를 보고한 바가 있다(5-8). 이러한 astaxanthin의 항

산화성은 β -carotene과 vitamine E보다 뛰어나다고 알려져 있는데(7-11), 그 작용여부 및 효과는 주위 환경과 여러 가지 요인에 의하여 크게 영향을 받는다. Oshima 등(12)의 연구 결과에 따르면 liposome을 수용성 photosensitizer인 methylene blue 또는 지용성 photosensitizer인 12-(1-pyrene)-dodecanoate의 존재하에 photoirradiation한 다음 astaxanthin의 항산화 효과를 측정된 결과, singlet oxygen이 생성되는 부위의 특성, 산소 분압의 차이, 다른 항산화제의 존재여부 그리고 세포막의 구조와 구성성분에 따라 astaxanthin의 항산화 효과가 크게 달랐다. 그리고 Christiansen 등(13)도 astaxanthin을 처리했을 때, 항산화성을 가진 vitamine E(retinol, α -tocopherol)가 비처리구에 비해 2~20배 가량 높게 근육과 간에 축적되었다고 보고한 바 있다.

이와 같이 astaxanthin의 항산화성에 관한 연구는 많이

†Corresponding author. E-mail: ylha@nongae.gsnu.ac.kr
Phone: 82-55-751-5471. Fax: 82-55-757-0178

수행되었지만 아직까지 확실한 기작은 밝혀져 있지 않고 astaxanthin을 처리한 산란계로부터 생산된 난황(AEY)이 mouse liver의 항산화에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 mouse에 AEY를 경구 투여한 다음 mouse liver microsome을 분리하고, 분리된 microsome에 대하여 항산화 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

부화 후 85일 경과한 산란계인 하이라인 브라운에 매일 1회씩 7일 동안 astaxanthin(Sigma, USA) 4 mg씩을 경구 투여하여 7일째에 얻은 난황을 acetone(g/10 mL)으로 추출하고 용매제거 후 AEY로 사용하였다. 일반 산란계의 난황은 acetone(g/10 mL)으로 추출하고 용매제거 후 control egg yolk (CEY)로 사용하였다. 실험에 사용한 AEY 중의 총 carotenoid함량은 2.88 mg%이었고 그 조성은 총 carotenoid 함량을 100%로 봤을 때, lutein 32.8%, zeaxanthin 24.5%, β -carotene 10.7%, β -cryptoxanthin 8.3%, α -cryptoxanthin 7.6%, cynthiaxanthin 4.1%, canthaxanthin 2.8%, astaxanthin 2.7%, triol 2.6% 및 unidentified carotenoid 3.9%였다(14). CEY의 총 carotenoid함량은 2.58 mg%이었고 그 조성은 lutein 41.3%, zeaxanthin 31.3%, β -cryptoxanthin 12.3%, β -carotene 10.6%, astaxanthin 2.2% 및 unidentified carotenoid 2.3%였다(14). Female ICR mouse(6~7 주령), chow사료, β -chip은 효창 Science사(Daegu, Korea)로부터 구입하였다. Butylated hydroxytoluene(BHT), 1,1,3,3-tetramethoxypropane(malonaldehyde bis[dimethyl acetal]; TMP=MA) Tris[hydroxymethyl]aminomethane(Tris-HCl), β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH), ascorbate sodium salt (Asc-Na), 2,2'-azobis[isobutyronitrile](ABIN), cumine hydroperoxide(CuOOH), α -tocopherol(TC), ferrous ammonium sulfate(FAS)는 Sigma(USA)에서 구입하였다. 그 외 사용된 일반시약은 특급 내지 1급 이상이였다.

Mouse 처리

Female ICR mouse를 7개의 처리구(10 mice/cage/ treatment, cage당 mice의 평균무게가 동일)로 나누었다. 온도($20 \pm 2^\circ\text{C}$)와 습도(60%)가 조절되는 시설에서 물과 사료를 자유롭게 먹도록 하면서 1주일간 사육하여 적응시켰다. PBS 200 μL (control), 5 mg BHT+195 μL soybean oil(BHT처리), 50 mg TC+150 μL soybean oil(TC처리), 150 mg CEY+50 μL PBS(CEY 150처리), 150 mg AEY+50 μL PBS(AEY 150처리), 100 mg AEY+100 μL PBS(AEY 100처리), 50 mg AEY+150 μL PBS(AEY 50처리)로 조제된 시료를 1주일에 3번씩 3주에 걸쳐 mouse의 경구로 투여하였다. 처음 시료를 처리한 뒤 4주 후에 mouse를 희생시켰다.

Mouse liver microsome 분리

Mouse를 희생시키기 12시간 전에 물을 제외한 사료 공급을 중단하고 mouse를 희생시켜 간을 적출하였다. 0.25 M sucrose+10 mM Tris-HCl+1 mM EDTA 혼합액을 조제하고 이 혼합액과 mouse 간 무게의 농도가 3:1의 비가 되게 혼합하여 homogenizer로 완전히 마쇄시켰다. 이것을 10,000 $\times g$ 로 30분간 원심분리하여 얻은 상등액을 다시 105,000 $\times g$ 로 60분간 2회 원심분리하고 침전시켜 microsome을 분리하였다. Microsome은 10 mg/mL 50 mM Tris-HCl 농도로 희석한 다음, 액체 질소로 급냉하여 -70°C 에 보관하였다.

단백질 함량 측정

Microsome에 함유된 단백질 함량은 Bradford 방법(15)으로 분석하였다. 염색시약(Bio-Rad사에서 구입)과 50 mM Tris-HCl buffer를 1:4 (v/v)의 비율로 섞어 희석시키고, 여과지(Whatman #1)로 여과하였다. 표준용액은 bovine serum albumin(BSA)을 100 μL 당 10, 20, 40, 60, 80, 100 μg 이 되도록 50 mM Tris-HCl buffer로 희석하였다. 각각의 표준용액과 시료용액 100 μL 씩에 5.0 mL의 희석된 염색시약을 첨가하고 그 혼합액을 1분간 혼합시켜 5분간 실온에 방치한 후 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구로는 50 mM Tris-HCl과 염색시약만을 사용하였다.

전기영동

전기영동은 12% SDS-PAGE로 Laemmli의 방법(16)에 따라 행하였으며 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하여 단백질 band를 확인하였다. 각 시료(20 μg)는 sample buffer(62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8+10% glycerol+2% SDS+5% β -mercaptoethanol)와 1:4 (v/v)로 희석하고 95°C 에서 4분간 가열하여 gel에 loading 하였다. Marker로서 phosphorylase B(106,000), BSA(80,000), ovalbumin(49,500), carbonic anhydrase(32,500), soybean trypsin inhibitor(27,500), lysozyme(18,500)을 사용하였다.

지방산 함량 측정

각 시료의 지방산 조성을 조사하기 위하여 시료를 hexane/isopropanol(3/2, v/v) 5 mL에 균질화시킨 후 4,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 하층은 제거하고 상층은 0.47 M Na_2SO_4 (60 mL \times 3)을 첨가하여 여과하였다. 용매층은 진공 농축기에서 농축시키고 N_2 gas하에서 남은 용매를 제거하여 지질을 추출한 다음 GC로 분석하였다. 이때 사용한 GC는 Supelcowax 10(60 m \times 0.32 mm, i.d., 25 μm film thickness) column과 FID가 장착된 Hewlett Packard 5890(USA)였다. Oven temperature는 200°C (30 min) \rightarrow 240°C (3 $^\circ\text{C}/\text{min}$)로 프로그램하였다.

Mouse liver microsome을 이용한 항산화성 측정

-70°C 냉동고에 보관중인 microsome을 ice bath 위에서 서서히 녹였다. 산화유도물질은 FAS(Fe^{2+} , 1 μM), NADPH

(0.2 mM), Asc-Na(0.5 mM), ABIN(40 mM), CuOOH(0.1 mM)와 buffer로 PBS, Tris-HCl(pH 7.4, 50 mM)를 사용하였다. Microsome 현탁액은 Table 1과 같은 비율로 혼합하여 수조(37°C)에서 15분간 반응시켰다. 반응의 종결은 ice bath 위에 시료를 냉각시킴으로써 끝냈다. 위의 시료에 의해 생성된 malonaldehyde(MA)의 정량은 TBA test방법(17,18)으로 측정하였다.

MA의 측정

표준곡선을 작성하기 위하여 2, 4, 6, 8, 10 nM TMP/0.5 mL 50 mM Tris-HCl(pH 7.4)로 5개의 standard를 준비하였고, blank는 50 mM Tris-HCl buffer 0.5 mL만을 사용하였다. 16 mL screw-capped test tube에 0.5 mL씩의 산화 유도 물질을 처리한 microsome 또는 standard액을 넣었다(전 과정을 ice bath 위에서 실시하였다). 3 mL의 1% phosphoric acid와 1 mL 0.6% TBA 용액을 넣고 10초간 2번 vortex시켰다. 이 혼합액을 수조(100°C, 45 min)에서 반응시키고 실온에서 충분히 식혔다. 4 mL n-butanol을 가하고 약 1분간 강하게 흔들고 원심분리기(2,000 rpm, 10 min)로 원심분리하여 물층과 butanol층(상층)을 완전히 분리시켰다. 수용액(하층)을 완전히 제거하고 butanol층은 531 nm에서 흡광도를 측정하였다. n-butanol을 blank로 사용하였다.

결과 및 고찰

Microsome의 단백질 함량

Microsome에 함유된 단백질 함량을 측정한 결과는 Table 2와 같다. AEY 처리 microsome은 CEY 처리구에 비해 단백질 함량이 상대적으로 약 7~48%가 높았다. AEY의 처리함량별로 보면 50 mg의 처리구에서 216.7 mg/g microsome으로 다른 처리구(100, 150 mg)에 비해 단백질 함량이 높게 나타났다.

Microsome의 전기영동 pattern

Microsome에서 추출한 단백질의 농도(20 µg/lane)를 동

Table 2. Effect of AEY on the protein concentration of mouse liver microsome

Treatment ¹⁾ (mg/mouse)	Concentration ²⁾ (mg/g microsome)
Control	157.6
BHT 5	160.2
TC 50	139.1
CEY 150	145.7
AEY 50	216.7
AEY 100	167.3
AEY 150	155.8

¹⁾Control, PBS 200 µL; BHT 5, 5 mg BHT+195 µL Soybean oil; TC 50, 50 mg TC+150 µL Soybean oil; CEY 150, 150 mg CEY+50 µL PBS; AEY 50, 50 mg AEY+150 µL PBS; AEY 100, 100 mg AEY+100 µL PBS; and AEY 150, 150 mg AEY+50 µL PBS.

²⁾Determined by Bradford method (15).

일하게 하여 전기영동한 결과 단백질 band의 pattern은 Fig. 1과 같았다. AEY 처리구는 control, CEY와 유사한 전기영동 패턴을 나타내었다. 그러나 BHT나 TC 처리구에서 다른 처리구에 비해 40 kDa 및 50 kDa에 존재하는 단백질의 함량이 높게 나타났다.

이들 band는 세포나 조직의 산화반응에 대한 carotenoid의 직접적인 항산화 작용과 더불어 carotenoid에 의한 세포의 항산화 물질 수준을 조절하는 기작과 관계가 있는 조절자 역할을 하는 것으로 예상되었다. 하지만 BHT는 전 처리구에서 강력한 항산화 효과가 있었으나, TC는 전 처리구에서 CEY 처리구나 AEY 처리구와 유사하거나 오히려 높았다. 따라서 40과 50 kDa에서 확인된 단백질 band는 항산화 효과와는 무관 하다고 생각된다.

Microsome의 지방산 함량

Microsome에서 분리한 지방산의 GC 분석 결과는 Table 3과 같다. 시료 150 mg을 처리했을 때, control과 CEY, AEY의 지방산조성비(불포화지방산/포화지방산)는 각각 1.62, 1.64, 1.23였다. 즉, AEY 처리구는 CEY 처리구에 비해 stearic acid을 포함하는 포화지방산의 함량비가 상대적으로 높았고 oleic

Table 1. Composition of the medium for the lipid peroxidation of mouse liver microsome induced by various chemical reagents (unit: mL)

Treatment	Microsome ¹⁾	Tris-HCl ²⁾	Asc Na ³⁾	NADPH ⁴⁾	Fe ¹⁺⁵⁾	ABIN ⁶⁾	CuOOH ⁷⁾
Control	1	0.5					
Asc-Na/Fe ²⁾	1		0.25		0.25		
NADPH/Fe ²⁾	1	0.1		0.15	0.25		
ABIN	1					0.5	
CuOOH	1						0.5

¹⁾Protein concentration: 10 mg/mL.

²⁾Tris[hydroxymethyl]aminomethane (Tris-HCl, pH 7.4): 50 mM.

³⁾Ascorbate sodium salt (Asc-Na): 0.5 mM.

⁴⁾β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH): 0.2 mM.

⁵⁾Ferrous ammonium sulfate (FAS, Fe²⁺): 1 µM.

⁶⁾2,2'-Azobis[isobutyronitrile] (ABIN): 40 mM.

⁷⁾Cumene hydroperoxide (CuOOH): 0.1 mM.

Table 3. Effect of AEY on the fatty acid composition of mouse liver microsome

Treatment ¹⁾	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	γ -LA	C _{18:3}	C _{19:0}	C _{20:4}	Unsaturated fatty acid	Saturated fatty acid	Total
Control	25.0 ²⁾	12.6	35.5	18.8	1.1	0.6	0.6	5.8	61.8	38.2	100
BHT 5	23.3	17.7	19.3	19.3	2.9	0.8	1.9	14.8	57.1	42.9	100
TC 50	25.0	17.7	17.3	18.4	3.0	1.6	1.7	15.3	55.6	44.4	100
CEY 150	24.3	12.2	22.4	26.4	2.0	0.9	1.4	10.4	62.1	37.9	100
AEY 50	24.4	16.1	16.5	23.6	2.3	0.6	1.5	14.9	58.0	42.0	100
AEY 100	23.9	17.0	16.5	20.0	3.3	2.3	1.7	15.3	57.4	42.6	100
AEY 150	25.1	18.4	13.8	21.6	2.5	1.4	1.3	15.9	55.2	44.8	100

¹⁾Control, PBS 200 μ L; BHT 5, 5 mg BHT+195 μ L soybean oil; TC 50, 50 mg TC+150 μ L soybean oil; CEY 150, 150 mg CEY +50 μ L PBS; AEY 50, 50 mg AEY+150 μ L PBS; AEY 100, 100 mg AEY+100 μ L PBS; and AEY 150, 150 mg AEY+50 μ L PBS.

²⁾Area percentage of each fatty acid against total area of interesting fatty acids and average of three measurements.

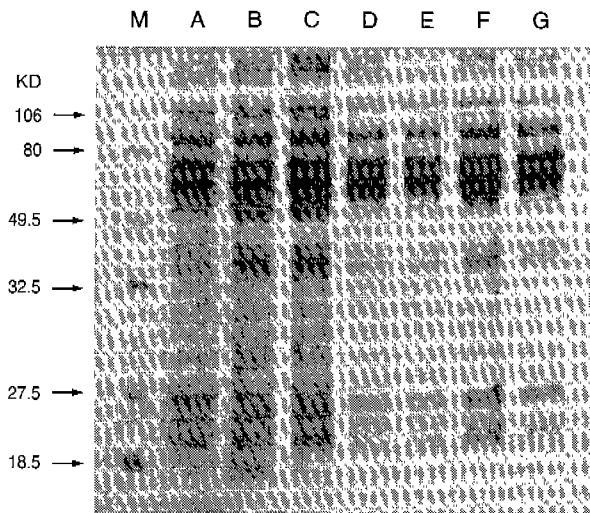


Fig. 1. Protein patterns of mouse microsome by SDS-PAGE. Lane identification: M, molecular weight marker; A, Control; B, BHT 5 mg; C, TC 50 mg; D, CEY 150 mg; E, AEY 50 mg; F, AEY 100 mg; and G, AEY 150 mg. Standard markers are phosphrylase B (106.0 KD), BAS (80.0 KD), ovalbumin (49.5 KD), carbonic anhydrase (32.5 KD), soybean trypsin inhibitor (27.5 KD), and lysozyme (18.5 KD).

acid, linoleic acid 등을 함유하는 불포화지방산의 함량비는 control이나 CEY 처리구보다 약 6~10%가 감소하였다. 그러나 불포화지방산 중에서 산화가 쉬운 linolenic acid나 arachidonic acid의 비율은 AEY 처리로 인하여 증가하는 경향을 나타내었다. 따라서 AEY처리에 의한 이들 불포화지방산의 증가 및 감소현상에 관한 연구는 더 진행되어야 할 것이다.

항산화 효과

Microsome에 서로 다른 종류의 산화유도물질(Asc/Fe²⁺, NADPH/Fe²⁺, ABIN, CuOOH)을 처리하여 항산화 효과를 측정된 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 전체적인 결과로 볼 때, Fe²⁺가 관여하는 Asc/Fe²⁺, NADPH/Fe²⁺를 처리한 산화유도 조건에서는 AEY가 항산화 효과가 있었고, ABIN이나 CuOOH가 산화유도물질로 작용할 시에는 AEY의 항산화 효과가 없었다. Asc/Fe²⁺를 처리한 경우의 AEY 50 mg 처리구에서는 항산화 효과가 없었고, 100 mg 처리구에서는 산화가 감소되

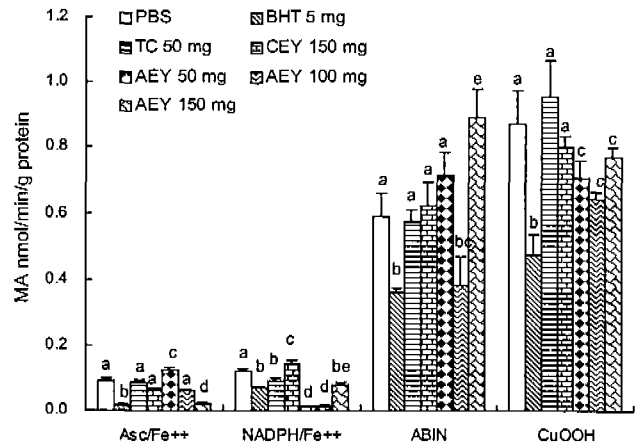


Fig. 2. Effect of AEY on the oxidation of the mouse liver microsome initiated by various oxidation inducers.

Same letter on the bars of each treatment is not significantly different at p<0.05 by Tukey's test.

었으나 유의성은 없었고, 150 mg 처리구에서는 유의성있게 감소되었다. NADPH/Fe²⁺인 경우에는 AEY 농도에 관계없이 항산화 효과가 있었고 TC보다 항산화 효과가 좋았다. 이것은 Miki(3)에 의해 astaxanthin이 TC와 다른 carotenoid에 비해 가장 효과적인 free radical scavenger라고 보고된 바와 같이 astaxanthin 대사산물인 α -cryptoxanthin, canthaxanthin, triol 등이 활성산소 소거능력, 특히 Asc/Fe²⁺나 NADPH/Fe²⁺에서 유도된 활성산소를 소거하는 능력이 크기 때문인 것으로 추측된다. 즉, AEY 처리에 의한 microsome에서의 산화억제는 기질인 지방산의 조성변화와 관계되는 것이 아니라(Table 3), Asc/Fe²⁺ 및 NADPH/Fe²⁺에 관련된 효소반응과 관계가 있는 것으로 생각된다. 그러나 Table 2에서 보는 바와 같이 total protein 함량은 AEY 처리로 다소 증가하였지만 전기영동에 의한 protein 분리 패턴 (Fig. 1)에는 큰 차이를 보이지 않았다. 따라서 이에 대한 구체적인 연구가 더 수행되어야 할 것이다.

요 약

AEY의 acetone추출물이 mouse liver microsome의 산화

에 미치는 영향을 조사하였다. Mouse liver microsome에 함유된 단백질 함량은 AEY 처리구가 CEY 처리구에 비해 상대적으로 7~48%정도가 증가하였다. 지방산 분석 결과, CEY 처리에 비해 AEY 처리구에서 stearic acid를 포함하는 포화 지방산의 함량비가 상대적으로 높았으며, oleic acid, linoleic acid 등을 함유하는 불포화지방산의 함량비가 현저히 감소하였다. AEY 처리구는 Fe^{2+} 가 관여하는 Asc/ Fe^{+2} , NADPH/ Fe^{+2} 를 산화유도물질로 사용한 경우에 TC와 비슷하거나 보다 강력한 항산화 효과를 보였다. ABIN이나 CuOOH가 산화유도물질로 작용할 시에는 AEY 처리에 의해 유의성있는 항산화 효과가 나타나지 않았다.

감사의 글

이 연구는 농림기술연구개발과제(299017-2)와 과기처의 G-7 연구비에 의해 수행되었음을 감사드립니다.

문헌

1. Tanaka, C., Morishita, Y., Suzu, M., Kojima, T., Okwnura, A. and Mori, H. : Chemoprevention of mouse urinary bladder carcinogenesis by the naturally occurring carotenoid astaxanthin. *Carcinogenesis*, **15**, 15-19 (1994)
2. Jyonouchi, H., Zhang, C. and Tomita, Y. : Studies of immunomodulating actions of carotenoids. II. Astaxanthin enhances *in vitro* antibody production to T-dependent antigens without facilitating polyclonal B-cell activation. *Nutr. Cancer*, **19**, 269-278 (1993)
3. Miki, W. : Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl. Chem.*, **63**, 141-146 (1991)
4. Lawlor, S.M. and O'Brein, M.N. : Astaxanthin: Antioxidant effects in chicken embryo fibroblasts. *Nutr. Res.*, **15**, 695-704 (1995)
5. Burton, G.W. and Ingold, K.U. : Beta-carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*, **11**, 569-573 (1984)
6. Patozza, P. and Krinsky, N.I. : Antioxidant effects of carotenoids *in vivo* and *in vitro*: an overview. *Methods Enzymol.*, **213**, 403-420 (1992)
7. Conn, P.F., Schalch, W. and Truscott, T.G. : The singlet oxygen and carotenoid interaction. *J. Photochem. Photobiol.*, **11**, 41-47 (1991)
8. Sundquist, A.R., Briviba, K. and Sies, H. : Singlet oxygen quenching by carotenoids. *Methods Enzymol.*, **234**, 384-388 (1994)
9. Krinsky, N.I. : Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radic. Biol. Med.*, **7**, 617-635 (1989)
10. Palozza, P. and Krinsky, N.I. : Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidant in a membrane model. *Arch. Biochem. Biophys.*, **297**, 291-295 (1992)
11. Terao, J. : Antioxidant activity of β -carotene related carotenoids in solution. *Lipids*, **24**, 659-661 (1989)
12. Oshima, S., Ojima, F., Sakamoto, H., Ishiguro, Y. and Terao, J. : Inhibitory effect of beta-carotene and astaxanthin on photosensitized oxidation of phospholipid bilayers. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **39**, 607-615 (1993)
13. Christiansen, R., Glette, J., Lie, O., Torrissen, O.J. and Wagbo, R. : Antioxidant status and immunity in Atlantic salmon, *Salmon salar* L., fed semi-purified diets with and without astaxanthin supplementation. *J. Fish Diseases*, **18**, 317-328 (1995)
14. Kim, H.C., Park, S.J., Park, C.W., Kim, Y.R., Park, K.A., Choi, E.S., Cho, Y.U. and Ha, Y.L. : Overcome effect of catabolic response in mouse by the egg yolk from hens intubated astaxanthin. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **30**, 1278-1282 (2001)
15. Bradford, M.M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976)
16. Laemmli, R.K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970)
17. Mihara, M. and Uchiyama, M. : Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.*, **86**, 271-278 (1978)
18. Li, X.Y. and Chow, C.K. : An improved method for the measurement of malonaldehyde in biological samples. *Lipids*, **29**, 73-75 (1994)

(2001년 9월 6일 접수; 2001년 11월 30일 채택)