

Astaxanthin 함유 기능성 식품소재의 유전독성 및 항산화능 검사

김준성^{1,†} · 박진홍^{1,†} · 김화¹ · 조현선¹ · 황순경¹ · 나운성¹ · 강환구² · 안길환^{3,*} · 조명행^{1,*}

¹서울대학교 수의과대학 독성학실험실, ²국립수의과학검역원, ³충남대학교 농업생명과학대학 식품공학과 미생물분자유전학실험실

Genotoxicity and Anti-Oxidative Effectiveness Study of Functional Food Additive Containing Astaxanthin

Jun-Sung Kim^{1,†}, Jin Hong Park^{1,†}, Hua Jin¹, Hyun Sun Cho¹, Soon Kyung Hwang¹,
Woon Seong Nah¹, Hwan Goo Kang², Gil-Hwan An^{3,*} and Myung-Haing Cho^{1,*}

¹Laboratory of Toxicology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742

²National Veterinary Research and Quarantine Service, Ministry of Agriculture and Forestry

³Department of Food Science and Technology, College of Agriculture,
Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

Received June 8, 2006; Accepted November 23, 2006

ABSTRACT. Astaxanthine is a pigment that belongs to the family of the xanthophylls, the oxygenated derivatives of carotenoids whose synthesis in plants derives from lycopene. Astaxanthine is also a carotenoid widely used in salmonid and crustacean aquaculture to provide the pink color characteristic of that. Recent study reported that astaxanthine has the role as a detoxicant against the free radicals. In our study, we estimated the genotoxicity in ICR mice and possibility as antioxidant reagents of mutant *Phaffia rhodozyma* strain over expressing the astaxanthine by gamma-ly and carophyll pink including astaxanthine in apoE knock out mice, respectively. In our study, we administered *Phaffia rhodozyma* (2 mg and 3 mg) and carophyll pink for 4 and 8 week. The clinical sign and mortality were not detected compared with control groups. In the mutant frequency of hprt gene and chromosome aberration in splenic cells, there was not detected abnormality. There was not critical change in hematological and serum biochemical test compared to control. In expression level of repair enzyme, increase of catalase were detected and increase of expression level of Nrf-2 was detected in *Phaffia rhodozyma* (3 mg) and carophyll pink in 8 week treated group. In GSH level, the group of treated with *Phaffia rhodozyma* (3 mg) showed the increase of the GSH. In conclusion, mutant *Phaffia rhodozyma* and caphyll pink may be applied to the effective food additives to reduce the free radical.

Keywords: Astaxanthine, Anti-oxidative, Genotoxicity.

서 론

Carotenoid는 동·식물계와 fungi, bacteria에 널리 분

포하는 지용성 색소로서 화학적으로는 polyene이라 불리는 긴 구조를 가지며, 말단의 환식 또는 비환식의 ring 구조의 차이에 따라 약 650여종의 다양한 carotenoids로 구분된다. Carotenoid는 분자 내에 산소를 함유하지 않은 카로틴류와 산소를 함유하는 카로틴류로 구분되는데 전자의 대표적인 것은 β -carotene과 lycopene이고 후자로는 lutein, zeaxanthin 등이 존재한다. 이들 중 식품의 착색제와 가금류, 어류의 사료 첨가제로 허용된 주요 Carotenoid류에는 β -carotene, lycopene, lutein, cathaxanthin, astaxanthin 등이 있다. 이러한 carotenoid계 색소는 tocopherol과 함께 광선에 의해서 형성된 활성산소에 대한

[†]These authors contributed equally to this work.

*Correspondence to: Myung Haing Cho, Laboratory of Toxicology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Shilim-dong, Kwanak-gu, Seoul 151-742, Korea
E-mail: mchotox@snu.ac.kr 혹은

Gil-Hwan An, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Chungnam National University, #220, Gung-dong, Yusong-gu, Taejon 305-764, Korea
E-mail: ghahn@cnu.ac.kr

강력한 소거제로서 작용하며 지용성으로서 위장에서 흡수되어 조직이나 세포 속으로 쉽게 이동할 수 있어 많이 사용되고 있다. 그 중에서 trans-astaxanthin(3,3'-dihydroxy- β , β -carotene-4,4'-dione)은 β -carotene의 유도체로 해양 환경에 풍부하게 존재하는 화합물로서 algae, fungi, 그리고 새우, 게 등의 갑각류로부터 생합성되어 먹이사슬에 의해 연어, 갑각류, 또는 조류 등으로 이동, 축적되어 착색을 일으킨다. 또한 astaxanthin은 퇴행성 질병을 지연하거나 예방하며, 불안정 산소를 안정화하거나 free radical을 제거하는 등의 기능이 매우 뛰어나다(Krinsky, 1989). Astaxanthin의 항산화 능력은 β -carotene을 포함한 여러 carotenoid보다 10배 이상, α -tocopherol보다는 100~500배 이상 높으며 활성 산소에 의해 전개되는 지질의 산화를 억제하는 효과도 β -carotene보다 우수하다고 알려져 있다.

Astaxanthin은 현재 우리나라를 포함하여 미국, 유럽, 일본 등에서 착색물질 및 사료용으로 승인되었고 건강보조식품, 화장품, 사료 등으로 이용되고 있으며, 이에 대한 연구도 계속 진행 중이다. 한편, 상업적 생산에 대한 수요 증가로 F. Hoffman-LaRoche Co.(Switzerland)에 의해 trans-astaxanthin이 화학적 방법으로 생산되어 연어 사료 첨가제로서 FDA에 의해 승인되어 판매되고 있으나 인공 첨가제에 대한 소비자와 정부의 기피현상과 천연 색소와 형태가 다르며 안정성과 항산화력이 낮은 단점으로 천연 색소 생성을 위한 생물학적 system의 연구가 중요하다. 따라서 본 실험에서는 astaxanthin의 안전성, 기능성 측정 및 신 기능성 탐색, 항산화능 함유 등 고부가가치 식품 첨가물 소재인 astaxanthin을 이용한 기능성 식품을 개발하고 활용하는데 필요한 astaxanthin첨가물의 효능과 독성을 실험동물을 이용하여 검증하여 안전하고 효과가 뛰어난 식품으로의 개발 가능성을 입증하는데 근거자료를 확보하기 위하여 수행하였다.

재료 및 방법

동물 급여에 따르는 독성검사

시험 물질. 충남대에서 제작한 *Phaffia rhodozyma*(2 mg), *Phaffia rhodozyma*(3 mg), Carophyl pink를 사료와 섞어 실험동물에 1달간 투여했다. 주정알콜(95% ethanol)에 분쇄된 효모를 첨가 추출하고 이것을 농축하였음. 최종적으로 4l의 추출물을 이용하였고 이를 사료에 첨가하고 가열하여 실험에 사용하였음.

시험 동물. 실험동물은 6주령 ICR mice와 80주령 ICR mice를 1주일 순화시킨 뒤 실험에 사용했고, 각군당 암수 20마리 이상을 설정하여 연구를 수행하였다. 사육실

온도는 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $50\pm 20\%$ 를 유지했으며, light/dark 주기를 12시간으로 하였다. 실험군은 대조군(control), *Phaffia rhodozyma*(2 mg), *Phaffia rhodozyma*(3 mg), Carophyl pink(2 mg) 설정하여 연구를 수행하였다.

일반증상 및 사망관찰. 투여기간 동안 1일 1회 실시하며, 일반상태의 변화, 운동성, 외관, 자율신경 등의 일반증상 및 사망동물의 유무를 관찰하였다.

체중변화. 체중은 균분리시, 시험물질투여개시 직전, 투여 개시 후 주 1회 측정하였다.

사료 및 음수섭취량 측정. 시험계의 사료 및 음수섭취량 측정은 시험물질투여개시 전일, 투여 개시 후 주 1회 측정하였다.

혈액학적 검사. 부검 전 1일간 절식시킨 후, 안와 정맥 총에서 채혈한다. 채혈한 혈액은 항응고제로 EDTA가 함유된 채혈병에 넣어 자동혈액검사기기를 이용하여 혈액학적 헤마토 크리트치(hematocrit, HCT), 적혈구수(red blood cell, RBC), 백혈구수(white blood cell, WBC), 백혈구백분율[Neutrophil(NE), Lymphocyte(LY), Monocyte(MO), Eosinophil(EO), Basophil(BA)] 혈액응고시간 [Prothrombin time(PT), Partial Thromboplastin Time (PTT)], 혈소판수(blood platelet, PLT) 등을 측정하였다.

혈액생화학적 검사. 복부대동맥에서 채혈한 혈액 중 일부를 혈액학적 검사로 이용하고, 나머지 혈액은 4°C 냉장 보관한 후 원심분리(3000 rpm, 10 min)하여 자동생화학검사기(PRIME)를 이용하여 혈청단백(total protein, TPROT), 알부민(albumin, ALB), 빌리루빈(total bilirubin, TBILI), 트랜스아미나제[aspartate aminotransferase, AST), (alanine amino transferase, ALT), 혈당(glucose, GLU), 크레아티닌(creatinine, CREAT), 요소질소(blood urea nitrogen, BUN), 칼슘(calcium, CA), 인(phosphorus, P)을 측정한다. ALT, ALP 등은 반응온도에 따라 검사결과가 달라질 수 있으므로 30°C 를 기준으로 하여 측정하였다.

부검. 시험 종료시 생존동물은 ether로 마취시켜 외관 검사를 실시한 후, 복대동맥(abdominal artery)으로부터 채혈한 후 방혈 및 치사 시켜 체내 외 장기조직을 육안적으로 검사하였다.

장기중량측정. 부검 시 개체 별로 뇌, 간, 흉선, 폐, 심장, 고환, 신장, 난소, 자궁의 중량을 측정하였다.

조직병리학적 검사. 투여 후 발생한 사망동물에 대한 부검 시 육안적으로 이상소견이 관찰된 장기 조직에 대하여 조직병리학적 검사를 실시하였다.

돌연 변이 시험. ICR mice로부터 채취한 splenic cell를 갈아서 PBS와 섞고, 미리 준비된 histopaque -1077 (Sigma, USA)가 담겨 있는 tube에 이를 동량으로 넣어 $400\times G$ 에서 30분간 원심분리 후, 층이 생기면 lymphocyte

가 포함된 mononuclear cell층 부분을 조심스럽게 뽑아낸다. 1차 배양은 세포수가 1×10^5 cell/ml 되게 하고 각, 실험군당 50 ml용 culture flask를 사용하여 직립배양을 하였다. 배양조건은 RPMI 완전배지에 36~40시간 동안 incubator(5% CO₂, 포화습도 100%, 37°C)에서 배양하였다. 1차 배양이 완료된 후 cell을 원심분리기로 수거하고, RPMI 완전배지에 부유시켰다. 이 세포들 중 hprt-negative mutant를 선별 하기 위해 6-thioguanine(6-TG)을 사용한 선택배양을 수행하였다. 세포수가 1×10^5 cell/ml를 기준으로 하여 96 well plate의 1 well에 2×10^4 cell/0.2 ml 되게 하였다. 배양조건은 6-TG 첨가 RPMI 완전배지에 10~15일 동안 incubator(5% CO₂, 포화습도 100%, 37°C)에서 배양하였다(Albertini *et al.*, 1985).

염색체 이상 시험. 실험 방법은 요약하면 다음과 같다(Moore *et al.*, 1996) ICR mice로부터 splenic cell를 갈아서 멸균된 PBS와 섞고, 미리 준비된 histopaque -1077 (sigma, USA)가 담겨 있는 tube에 이를 동량으로 넣어 400×G에서 30분간 원심분리 후, 층이 생기면 lymphocyte가 포함된 mononuclear cell층 부분을 조심스럽게 뽑아낸다. Washing 과정을 위해 10 ml의 PBS와 섞고 250×G에서 10분간 원심분리하는 과정을 2번 반복한 후 0.5 ml의 PBS에 resuspend하여 10% fetal bovine serum이 포함된 RPMI 완전배지에 48~72시간 동안 incubator (5% CO₂, 포화습도, 37°C)에서 배양하였다. 48~72시간 배양 후 colcemid(Gibco, 120-0574)를 최종농도 0.2 µg/ml가 되도록 각 dish에 처리하였다. Colcemid 처리 후 2시간 더 배양한 다음 분열중기세포를 수거, 1,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하고, 저장액(0.075 M KCl)을 가하여 37°C 수욕상에서 15분간 처리하였다. 이를 다시 원심분리하여 상층액을 제거한 후 냉각된 고정액 (MeOH : Acetic acid = 3 : 1 v/v)을 가하여 5분, 다시 원심분리하여 30분간 전고정을 행한 뒤 원심분리하여 고정액을 2회 더 교환하였다. 공기건조법으로 염색체 표본을 만들고 5% Giemsa액으로 염색하였다. 결과의 판정은 실험군당 100개의 잘 퍼진 분열중기상을 관찰한 다음 구조 이상의 총 출현 빈도를 구하고 $p < 0.05$ 및 $p < 0.01$ 수준으로 chi-square test에 의해 통계처리 하였다. 염색체 이상 판정 criteria에서는 gap의 크기가 염색체 두께보다 작은 chromatid gap과 chromosome gap은 포함시키지 않았다.

초생체 소핵시험. ICR mice로부터 5~10 µl의 혈액을 뽑아 먼저 70°C로 데워진 슬라이더에 acridine orange (AO, 1 mg/ml, Sigma)를 30~50 µl 잘퍼서 그 위에 5~10 µl의 혈액을 도말하여 슬라이드를 4°C에 2시간 동안 말린다. 현미경 1,000배의 배율 하에서 2,000개의 망상

적혈구(reticulocyte)에서 비정상적인 염색체 성분인 소핵을 형광 염색하여 관찰하였다(Proudlock and Statham, 1997; Shmid, 1975). 비율은 $p < 0.05$, 0.01 수준으로 chi-square test에 의하여 대조군과의 통계적 유의성을 검정하였다.

동물 급여에 의한 항산화성 효소의 level 측정

시험 동물. 실험동물은 중앙실험동물에서 구입한 6주령 Apoprotein E(apoE) knock out mice(in C57BL/6 background)를 1주일 순화시킨 뒤 실험에 사용했고, 수컷 10마리씩을 설정하여 연구를 수행하였다. 실험군은 대조군(control), *Phaffia rhodozyma*(2 mg), *Phaffia rhodozyma*(3 mg), Carophyl pink 설정하여 사료로 제작하여 자유 급식하였으며 8주간 투여하여 연구를 수행하였다.

RT-PCR. Apoprotein E(apoE) knock out mice 조직(Liver) 100 mg 당 TRI reagent(Sigma, T-9424) 1 ml 을 넣어서 homogenization 하여 RNA를 추출하였다. RT-PCR은 iNtRON의 ONE-STEP RT-PCR Premix kit를 이용하여 측정하였고, 증폭기는 예비실험을 통해 40 cycle 을 실행하였다. PCR에서 사용된 primer는 발표된 sequence를 바이오니아에서 합성하여 사용하였으며, 그 염기서열은 Cu-Zn SOD(487 bp) sense 5'-CTA ACT CAA GCA TGG CGA TGA AA -3', antisense 5'-ACA CAG GGA ATG TTT ACT GCG C-3', GPX 5(502 bp) sense 5'-GCT CGT CAT TGA GAA TGT CGC-3', antisense 5'-AAT CAG GTG TTT CTC CGT GCA A-3', Mn SOD(782 bp) sense 5'-GAT G TG TGG AGC ACG CTT ACT-3', antisense 5'-CAC AAT GTC AC TCC TCT CCG AAT TA-3', Catalase(247 bp) sense 5'-AGG CTC TTC TGG ACA AGT ACA ACG-3', antisense 5'-CAC TCT AGA AGC CCG GAT TAT CG-3' 이었고, β-actin (541 bp)은 sense 5'-CCT GAC CCT GAA GTA CCC CA-3', antisense 5'-CGT CAT GCA GCT CAT AGC TC-3'이었다.

Nrf-2(NF-E2-related factor 2)의 western blotting. Apoprotein E(apoE) knock out mice 조직(Liver)을 lysis buffer로[pH 8의 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.02% sodium azide, 1% sodium dodesyl sulfate (SDS), 100 ug/ml phenylmethy lsulfonylfluoride (PMSF), aprotinin 1 ul/ml, 1% igapel 630(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 0.5% deoxychoate] 추출하여 30분 동안 14,000 g에서 원심분리 하였다. 단백질 농도는 Bradford analysis kit(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 정량 하였다. 50 µg의 단백질을 12%-SDS polyacrylamide gel에서 분리하여 nitrocellulose membrane

(Hybond ECL; Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ)에 옮겼다. Blocking buffer(0.1% Tween 20을 포함한 TTBS buffer에 10% nonfat milk)로 실온에서 2시간 동안 blocking했다. Membrane은 1시간 동안 실온에서 특정한 항체들로 incubation하였다. Nrf-2와 actin(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA)에 대한 마우스 단일항체를 이 연구에서 사용하였다. 항체들은 제조사에 기입된 희석으로 사용되었다. TTBS로 세척한후에 membrane을 sheep 항-마우스 horseradish peroxidase(HRP)-labeled 이차 항체로 다시 incubation 하였다. 그리고 electrochemiluminescence (ECL) detection kit(Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ)를 사용하여 LAS-3000(FUJII, Japan)으로 검출하였다.

Measurement of GSH levels. Apoprotein E(apoE) knock out mice 조직(Liver)을 떼어내어 적당량의 0.1 M pH 8.0 phosphate buffer를 가한 후 homogenizer로 균질화 하였다. 적량의 균질액을 같은 양의 4% sulfosalicylic acid와 섞어서 즉시 vortex 하여 단백질이 침

전된 균질액을 3500 rpm, 30분, 30°C의 조건에서 원심 분리 하였다. 상층액을 적당량 뽑아내어 DTNB working solution과 1 : 9의 부피비로 섞어서 ELISA reader(Bio-Rad 680, USA)로 412 nm 파장으로 흡광도를 측정하였다.

혈청내 level 조사를 통한 새로운 기능성 탐색

Apoprotein E(apoE) knock out mice의 안와 정맥총 및 복부대동맥에서 채혈한 혈액에서 혈청단백(total protein, TPROT), 알부민(albumin, ALB), 트랜스아미나제(aspartate aminotransferase, AST), (alanine amino transferase, ALT), Total cholesterol, 중성지질(Triacylglycerols)을 측정하였다.

결 과

동물 급여에 따르는 독성검사

일반증상 및 사망관찰. 시험물질 투여기간동안 대조군 및 시험물질투여군에서 특이한 일반증상은 관찰되지 않았다.

Table 1. Mutant frequency of hprt gene in splenic cells from test materials treated ICR mice for 4 weeks in young mice (6 week-old)

Sex	Group	Positive wells/total wells in 6-thioguanine plates	Po	CE	Mf	MF
Male	Control	25/700	0.96	0.27	3.64×10^{-7}	1.35×10^{-6}
	<i>Phaffia rhodozyma</i> (2 mg)	21/700	0.97	0.30	3.19×10^{-7}	1.05×10^{-6}
	<i>Phaffia rhodozyma</i> (3 mg)	22/700	0.97	0.29	3.49×10^{-7}	1.18×10^{-6}
	Carophyll pink (2 mg)	24/700	0.96	0.28	4.23×10^{-7}	1.53×10^{-6}
Female	Control	28/700	0.96	0.25	4.08×10^{-7}	1.66×10^{-6}
	<i>Phaffia rhodozyma</i> (2 mg)	22/365	0.97	0.29	3.19×10^{-7}	1.08×10^{-6}
	<i>Phaffia rhodozyma</i> (3 mg)	26/358	0.96	0.26	3.79×10^{-7}	1.45×10^{-6}
	Carophyll pink (2 mg)	25/306	0.97	0.27	3.64×10^{-7}	1.35×10^{-6}

1×10^4 cells/well used for selective medium containing $1 \mu\text{g/ml}$ 6-thioguanine.

$P_o = P(o) = \text{Number of negative wells/total number of wells}$.

Mutant Fraction = $(-\ln P_o \text{ in TG-plates}) / (1 \times 10^5 \text{ cells/well})$. CE(Clonal Efficiency) = $(-\ln P_o \text{ in CE-plates}) / (3 \text{ cells/well})$.

Mutation frequency (MF) = Mutation Fraction/CE.

Table 2. Mutant frequency of hprt gene in splenic cells from test materials treated ICR mice for 4 weeks in old mice (80 week-old)

Sex	Group	Positive wells/total wells in 6-thioguanine plates	Po	CE	Mf	MF
Male	Control	24/700	0.97	0.28	3.49×10^{-7}	1.26×10^{-6}
	<i>Phaffia rhodozyma</i> (2 mg)	25/700	0.96	0.27	3.64×10^{-7}	1.35×10^{-6}
	<i>Phaffia rhodozyma</i> (3 mg)	24/700	0.97	0.28	3.49×10^{-7}	1.26×10^{-6}
	Carophyll pink (2 mg)	26/700	0.96	0.26	3.79×10^{-7}	1.45×10^{-6}
Female	Control	29/700	0.96	0.24	4.23×10^{-7}	1.77×10^{-6}
	<i>Phaffia rhodozyma</i> (2 mg)	31/365	0.96	0.23	4.53×10^{-7}	2.00×10^{-6}
	<i>Phaffia rhodozyma</i> (3 mg)	28/358	0.96	0.25	4.08×10^{-7}	1.66×10^{-6}
	Carophyll pink (2 mg)	27/306	0.96	0.25	3.93×10^{-7}	1.55×10^{-6}

1×10^4 cells/well used for selective medium containing $1 \mu\text{g/ml}$ 6-thioguanine.

$P_o = P(o) = \text{Number of negative wells/total number of wells}$.

Mutant Fraction = $(-\ln P_o \text{ in TG-plates}) / (1 \times 10^5 \text{ cells/well})$. CE(Clonal Efficiency) = $(-\ln P_o \text{ in CE-plates}) / (3 \text{ cells/well})$.

Mutation frequency (MF) = Mutation Fraction/CE.

체중변화. 시험물질 투여기간 중 암·수 시험물질투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았다.

사료 및 음수섭취량 측정. 시험물질 투여기간 중 암·수 시험물질투여군에서 대조군과 비교시 사료섭취량 및

음수량의 변화는 관찰되지 않았다.

혈액학적 검사. 부검시의 혈액학적 검사소견에서는 모든 항목에서 대조군과 비교하여 유의할만한 변화를 관찰하지 못하였다(Table 4, 5).

혈액생화학적 검사. 부검시의 혈액생화학적 검사소견

Table 3. Hematological values from test materials treated ICR mice (male) for 4 weeks in young mice (6 week-old)

Group	Control	<i>Phaffia rhodozyma</i> (3 mg)	<i>Phaffia rhodozyma</i> (2 mg)	Carophyll Pink (2 mg)
PLT (K/ μ l)	758.80 \pm 90.40	721.00 \pm 53.46	761.00 \pm 96.73	788.00 \pm 78.25
WBC (K/ μ l)	6.14 \pm 3.40	6.05 \pm 0.53	6.92 \pm 3.75	6.53 \pm 2.13
RBC (M/ μ l)	8.90 \pm 3.32	8.45 \pm 1.93	8.22 \pm 4.31	8.74 \pm 2.23
Hb (g/dl)	11.22 \pm 3.55	11.12 \pm 1.92	11.28 \pm 4.87	11.48 \pm 2.70
HCT (%)	71.68 \pm 19.46	75.30 \pm 18.78	72.70 \pm 22.26	75.82 \pm 13.70
MCV (fl)	54.06 \pm 3.43	55.08 \pm 6.77	54.18 \pm 14.99	56.30 \pm 6.71
MCH (pg)	11.42 \pm 1.86	11.76 \pm 1.62	11.52 \pm 1.71	11.48 \pm 1.70
MCHC (g/dl)	26.58 \pm 3.17	25.16 \pm 3.98	24.70 \pm 4.44	27.20 \pm 2.44

Data are means \pm SD, n = 10.

Table 4. Hematological values from test materials treated ICR mice (female) for 4 weeks in young mice (6 week-old)

Group	Control	<i>Phaffia rhodozyma</i> (3 mg)	<i>Phaffia rhodozyma</i> (2 mg)	Carophyll Pink (2 mg)
PLT (K/ μ l)	719.40 \pm 69.39	735.60 \pm 72.28	732.14 \pm 64.10	710.80 \pm 37.56
WBC (K/ μ l)	5.19 \pm 4.11	5.18 \pm 3.41	4.94 \pm 1.91	5.09 \pm 1.19
RBC (M/ μ l)	8.55 \pm 2.16	8.64 \pm 3.94	8.66 \pm 3.14	8.36 \pm 2.42
Hb (g/dl)	11.02 \pm 2.51	10.60 \pm 2.38	11.50 \pm 2.74	11.60 \pm 1.92
HCT (%)	63.02 \pm 18.24	64.40 \pm 15.85	67.02 \pm 17.29	64.14 \pm 18.88
MCV (fl)	55.70 \pm 6.45	55.08 \pm 5.66	57.96 \pm 4.00	55.44 \pm 2.35
MCH (pg)	11.14 \pm 1.58	10.96 \pm 1.76	10.84 \pm 1.82	11.36 \pm 1.71
MCHC (g/dl)	21.64 \pm 3.55	21.72 \pm 2.33	22.96 \pm 2.02	22.06 \pm 2.16

Data are means \pm SD, n = 10.

Table 5. Hematological values from test materials treated ICR mice (male) for 4 weeks in old mice (80 week-old)

Group	Control	<i>Phaffia rhodozyma</i> (3 mg)	<i>Phaffia rhodozyma</i> (2 mg)	Carophyll Pink (2 mg)
PLT (K/ μ l)	735.40 \pm 98.57	711.60 \pm 73.08	707.20 \pm 60.89	697.80 \pm 136.67
WBC (K/ μ l)	7.25 \pm 2.42	8.11 \pm 1.21	7.72 \pm 2.75	7.96 \pm 1.55
RBC (M/ μ l)	7.30 \pm 3.49	8.00 \pm 1.22	7.22 \pm 1.11	7.53 \pm 1.13
Hb (g/dl)	8.00 \pm 3.25	8.88 \pm 1.71	7.72 \pm 1.49	7.70 \pm 1.48
HCT (%)	41.06 \pm 17.91	48.26 \pm 6.15	50.98 \pm 6.66	41.56 \pm 9.71
MCV (fl)	59.12 \pm 3.74	58.96 \pm 7.45	61.12 \pm 12.10	60.06 \pm 6.89
MCH (pg)	11.54 \pm 2.78	11.12 \pm 1.76	10.02 \pm 2.41	12.34 \pm 1.36
MCHC (g/dl)	20.06 \pm 3.96	18.34 \pm 2.21	16.02 \pm 8.04	18.96 \pm 3.44

Data are means \pm SD, n = 10.

Table 6. Hematological values from test materials treated ICR mice (female) for 4 weeks in old mice (80 week-old)

Group	Control	<i>Phaffia rhodozyma</i> (3 mg)	<i>Phaffia rhodozyma</i> (2 mg)	Carophyll Pink (2 mg)
PLT (K/ μ l)	577.20 \pm 172.92	562.40 \pm 106.93	547.60 \pm 107.99	567.40 \pm 82.17
WBC (K/ μ l)	6.41 \pm 2.00	6.31 \pm 2.32	5.80 \pm 2.63	6.46 \pm 1.61
RBC (M/ μ l)	8.06 \pm 1.15	7.95 \pm 2.47	7.84 \pm 1.74	7.94 \pm 1.13
Hb (g/dl)	9.78 \pm 1.40	10.12 \pm 2.92	9.56 \pm 1.27	10.38 \pm 2.57
HCT (%)	75.52 \pm 9.65	69.52 \pm 11.91	73.36 \pm 11.38	77.70 \pm 8.78
MCV (fl)	55.70 \pm 6.45	55.08 \pm 5.66	57.96 \pm 4.00	55.44 \pm 2.35
MCH (pg)	12.18 \pm 0.86	12.94 \pm 1.72	12.32 \pm 1.00	12.74 \pm 1.05
MCHC (g/dl)	15.56 \pm 4.53	17.84 \pm 2.00	17.66 \pm 1.21	15.76 \pm 2.05

Data are means \pm SD, n = 10.

Table 7. Serum biochemical values from test materials treated ICR mice (male) for 4 weeks in young mice (6 week-old)

Group	Control	<i>Phaffia rhodozyma</i> (3 mg)	<i>Phaffia rhodozyma</i> (2 mg)	Carophyll Pink (2 mg)
TProt (g/dl)	7.83 ± 1.57	7.59 ± 1.88	7.66 ± 1.42	7.18 ± 2.94
ALB (g/dl)	3.45 ± 0.98	3.64 ± 0.89	3.73 ± 1.53	3.54 ± 1.03
TBILI (mg/dl)	0.75 ± 0.32	0.67 ± 0.48	0.61 ± 0.15	0.64 ± 0.28
ALT (u/l)	38.9 ± 5.67	36.41 ± 3.83	37.3 ± 7.12	37.37 ± 5.29
AST (u/l)	77.76 ± 7.32	78.17 ± 2.37	78.39 ± 8.76	80.80 ± 9.52
GLU (mg/dl)	84.67 ± 16.43	89.21 ± 22.83	86.56 ± 15.86	85.30 ± 16.34
CREAT (mg/dl)	0.77 ± 0.33	0.60 ± 0.47	0.64 ± 0.55	0.59 ± 0.39
BUN (mg/dl)	0.35 ± 0.10	0.40 ± 0.10	1.08 ± 1.82	0.38 ± 0.10
Ca (mg/dl)	9.41 ± 2.92	9.60 ± 3.21	9.31 ± 2.5	9.22 ± 2.24
P (mg/dl)	6.20 ± 3.30	6.34 ± 2.65	6.12 ± 1.55	5.90 ± 2.7

Data are means ± SD, n = 10.

에서는 모든 항목에서 대조군과 비교하여 유의할만한 변화를 관찰하지 못하였다(Table 6, 7).

부검. 시험물질에 의한 소견으로 판단되는 특이소견은 관찰되지 않았다.

장기중량측정. 암·수 시험물질투여군에서 절대장기중량 및 상대장기중량비에 있어서 대조군에 비하여 유의성이 관찰되지 않았다.

조직병리학적 검사. 암·수 대조군 및 투여군에서 특이한 소견이 관찰되지 않았다.

돌연변이시험. ICR mice에서 Hypoxanthine(guanine) phosphoribosyl transferase gene(hprt)의 mutation frequency는 Table 1, 2에서 나타내었다. 6주령의 마우스의 경우 hprt gene의 mutation frequency는 수컷마우스에서 대조군은 1.35×10^{-6} , *Phaffia rhodozyma*(2 mg)은 1.05×10^{-6} , *Phaffia rhodozyma*(3 mg)은 1.18×10^{-6} , carophyll pink는 1.53×10^{-6} 였고, 암컷마우스에서는 control이 1.66×10^{-6} , *Phaffia rhodozyma*(2 mg)이 1.08×10^{-6} , *Phaffia rhodozyma*(3 mg)이 1.45×10^{-6} , carophyll pink가 1.35×10^{-6} 로 나타났으며 대조군에 비하여 유의한 변화를 보이지 않았다(Table 1). 또한 Old mice(80주령)의 경우 수컷마우스에서 control은 1.26×10^{-6} , *Phaffia rhodozyma*(2 mg)은 1.35×10^{-6} , *Phaffia rhodozyma*(3 mg)은 1.26×10^{-6} , carophyll pink는 1.45×10^{-6} 였고, 암컷마우스에서는 대조군이 1.77×10^{-6} , *Phaffia rhodozyma*(2 mg)이 2.00×10^{-6} , *Phaffia rhodozyma*(3 mg)이 1.66×10^{-6} , carophyll pink가 1.55×10^{-6} 으로 나타났으며 역시 대조군에 비하여 유의한 변화를 보이지 않았다(Table 2).

염색체이상시험. Young mice(6주령)의 경우 각 시험용량군의 염색체이상세포의 출현빈도는(%) 수컷마우스에서 control은 1.4 ± 0.89 , *Phaffia rhodozyma*(3 mg)은 1.6 ± 0.55 , *Phaffia rhodozyma*(2 mg)은 1.4 ± 0.89 carophyll pink는 1.2 ± 0.84 였고, 암컷마우스에서는 control

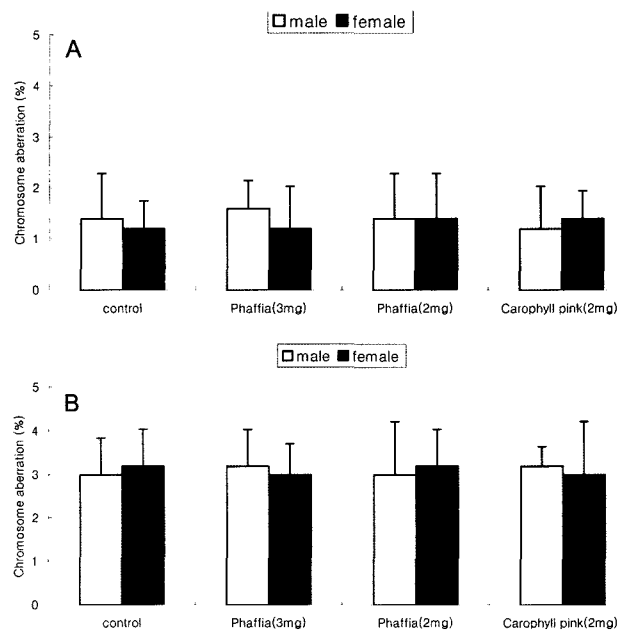


Fig. 1. Effect on chromosome aberration induced in ICR mice lymphocytes treated with test materials for 4 week in young mice (6 week-old) and old mice (80 week-old). Values represent mean ± SD in 10 mice.

이 1.2 ± 0.55 , *Phaffia rhodozyma*(3 mg)이 1.2 ± 0.84 , *Phaffia rhodozyma*(2 mg)이 1.4 ± 0.89 , carophyll pink가 1.4 ± 0.55 로 나타났으며 대조군에 비하여 시험군의 염색체이상세포의 출현빈도는 유의한 변화를 보이지 않았다(Fig. 1). 또한 80주령의 경우 수컷마우스에서 control은 3.04 ± 0.84 , *Phaffia rhodozyma*(3 mg)은 3.2 ± 0.84 , *Phaffia rhodozyma*(2 mg)은 3.0 ± 1.22 carophyll pink는 3.2 ± 0.45 였고, 암컷마우스에서는 control이 3.2 ± 0.84 , *Phaffia rhodozyma*(3 mg)이 3.0 ± 0.71 , *Phaffia rhodozyma*(2 mg)이 3.2 ± 0.84 , carophyll pink가 3.0 ± 1.22 로 나타났으며 역시 대조군에 비하여 시험군의 염색체이상세포의 출현빈도는 유의한 변화를 보이지 않았다

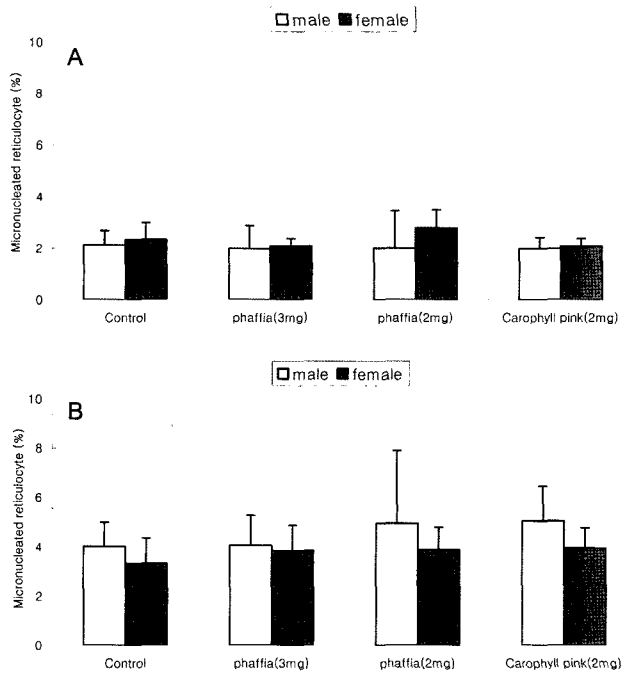


Fig. 2. Peripheral blood supravital micronucleus test in ICR mice treated with test materials for 4 week in young mice (6 week-old, A) and old mice (80 week-old, B). Values represent mean \pm SD in 10 mice.

(Fig. 1).

초생체 소핵시험. Young mice(6주령)와 Old mice(80주령)의 말초혈액내의 망상적혈구(reticulocyte)에서 비정상적인 염색체 성분인 소핵을 형광 염색하여 관찰한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 망상적혈구 2000개당 소핵의 출현빈도를(%) 관찰 한 결과 Young mice(6주령)의 경우 수컷마우스에서 control은 2.12 ± 0.55 , *Phaffia rhodozyma* (3 mg)은 1.98 ± 0.89 , *Phaffia rhodozyma*(2 mg)은 2.0 ± 1.44 carophyll pink는 1.98 ± 0.44 였고, 암컷마우스에서는 control이 2.34 ± 0.64 , *Phaffia rhodozyma*(3 mg)이 2.08 ± 0.30 , *Phaffia rhodozyma*(2 mg)이 2.78 ± 0.71 , carophyll pink가 2.08 ± 0.30 로 나타났으며 대조군에 비하여 유의한 변화를 보이지 않았다(Fig. 2). 또한 Old mice(80주령)의 경우 수컷마우스에서 control은 4.02 ± 0.96 , *Phaffia rhodozyma*(3 mg)은 4.06 ± 1.21 , *Phaffia rhodozyma*(2 mg)은 4.94 ± 2.95 , carophyll pink는 5.04 ± 1.40 였고, 암컷마우스에서는 control이 3.32 ± 1.02 , *Phaffia rhodozyma*(3 mg)이 3.84 ± 1.03 , *Phaffia rhodozyma*(2 mg)이 3.88 ± 0.91 , carophyll pink가 3.94 ± 0.83 으로 나타났으며 역시 대조군에 비하여 유의한 변화를 보이지 않았다(Fig. 2).

Table 8. Serum biochemical values from test materials treated ICR mice (female) for 4 weeks in young mice (6 week-old)

Group	Control	<i>Phaffia rhodozyma</i> (3 mg)	<i>Phaffia rhodozyma</i> (2 mg)	Carophyll Pink (2 mg)
TProt (g/dl)	5.92 ± 3.17	5.89 ± 0.88	6.12 ± 1.42	6.18 ± 2.94
ALB (g/dl)	3.99 ± 0.84	3.78 ± 0.89	4.03 ± 1.53	3.85 ± 1.03
TBILI (mg/dl)	0.64 ± 0.34	0.65 ± 0.48	0.58 ± 0.25	0.57 ± 0.28
ALT (u/l)	38.9 ± 5.67	36.41 ± 3.83	37.3 ± 7.12	37.37 ± 5.29
AST (u/l)	81.76 ± 7.32	83.17 ± 2.37	82.39 ± 8.76	80.80 ± 9.52
GLU (mg/dl)	88.67 ± 16.43	89.21 ± 12.83	86.56 ± 15.86	85.30 ± 16.34
CREAT (mg/dl)	0.67 ± 0.33	0.63 ± 0.47	0.64 ± 0.55	0.65 ± 0.39
BUN (mg/dl)	0.42 ± 0.08	0.42 ± 0.08	0.32 ± 0.13	0.34 ± 0.09
Ca (mg/dl)	9.01 ± 2.92	9.11 ± 3.21	8.78 ± 2.5	8.82 ± 2.24
P (mg/dl)	6.20 ± 3.30	5.84 ± 2.65	6.12 ± 0.55	5.90 ± 2.7

Data are means \pm SD, n = 10.

Table 9. Serum biochemical values from test materials treated ICR mice (male) for 4 weeks in old mice (80 week-old)

Group	Control	<i>Phaffia rhodozyma</i> (3 mg)	<i>Phaffia rhodozyma</i> (2 mg)	Carophyll Pink (2 mg)
TProt (g/dl)	7.23 ± 1.08	7.03 ± 0.24	7.30 ± 1.36	7.24 ± 1.37
ALB (g/dl)	4.33 ± 0.32	4.35 ± 0.66	4.08 ± 1.65	4.36 ± 0.23
TBILI (mg/dl)	0.84 ± 0.76	1.04 ± 0.59	0.84 ± 0.33	0.92 ± 0.10
ALT (u/l)	57.53 ± 6.94	57.48 ± 2.87	58.30 ± 6.01	58.23 ± 8.25
AST (u/l)	72.30 ± 4.84	72.80 ± 5.54	73.55 ± 11.94	75.38 ± 12.71
GLU (mg/dl)	85.50 ± 28.63	91.75 ± 10.53	89.25 ± 19.99	86.25 ± 15.65
CREAT (mg/dl)	0.55 ± 0.06	0.55 ± 0.17	0.64 ± 0.31	0.68 ± 0.36
BUN (mg/dl)	0.73 ± 0.32	0.88 ± 1.18	0.85 ± 0.95	0.95 ± 0.39
Ca (mg/dl)	7.55 ± 3.17	7.30 ± 1.15	7.65 ± 1.57	7.90 ± 1.54
P (mg/dl)	7.80 ± 1.60	7.23 ± 1.45	7.98 ± 1.24	7.78 ± 2.16

Data are means \pm SD, n = 10.

Table 10. Serum biochemical values from test materials treated ICR mice (female) for 4 weeks in old mice (80 week-old)

Group	Control	<i>Phaffia rhodozyma</i> (3 mg)	<i>Phaffia rhodozyma</i> (2 mg)	Carophyll Pink (2 mg)
TPROT (g/dl)	7.26 ± 0.65	7.20 ± 1.07	7.29 ± 1.37	7.14 ± 1.06
ALB (g/dl)	4.62 ± 0.38	4.08 ± 0.34	4.32 ± 0.89	4.46 ± 1.09
TBILI (mg/dl)	0.82 ± 1.42	0.73 ± 0.79	0.91 ± 0.73	0.80 ± 0.58
ALT (u/l)	57.94 ± 2.46	59.34 ± 12.50	60.60 ± 13.99	54.98 ± 14.23
AST (u/l)	68.17 ± 3.90	72.63 ± 13.05	72.20 ± 5.64	73.73 ± 14.47
GLU (mg/dl)	65.88 ± 31.96	67.80 ± 9.63	68.00 ± 15.05	72.40 ± 21.03
CREAT (mg/dl)	0.78 ± 0.27	0.72 ± 0.27	0.84 ± 0.18	0.74 ± 0.13
BUN (mg/dl)	0.50 ± 0.31	0.30 ± 0.39	0.64 ± 0.38	0.56 ± 0.36
Ca (mg/dl)	6.70 ± 0.14	6.98 ± 2.40	7.01 ± 3.62	6.99 ± 0.95
P (mg/dl)	4.10 ± 1.32	5.76 ± 1.57	5.70 ± 1.16	5.66 ± 1.19

Data are means ± SD, n = 10.

Table 11. Hematological values from test materials treated Apoe knock out mice (male) for 8 weeks

Group	Control	<i>Phaffia rhodozyma</i> (3 mg)	<i>Phaffia rhodozyma</i> (2 mg)	Carophyll Pink (2 mg)
Total protein (g/dl)	6.09 ± 1.23	6.44 ± 2.11	6.38 ± 1.76	6.32 ± 1.44
Albumin (g/dl)	4.92 ± 0.99	4.21 ± 0.76	4.82 ± 0.53	4.53 ± 0.62
ALT (u/l)	44.29 ± 3.21	40.50 ± 5.03	42.78 ± 5.92	40.26 ± 6.29
AST (u/l)	60.32 ± 6.89	63.10 ± 5.27	66.99 ± 6.76	64.80 ± 8.52
Total cholesterol (mg/dl)	803.7 ± 55.3	609.3 ± 44.6*	642.4 ± 51.0*	614.9 ± 58.4*
Triacylglycerols (mg/dl)	80.34 ± 12.44	79.33 ± 10.32	77.29 ± 13.21	76.48 ± 13.37

Data are means ± standard deviation, n = 5, * Significantly different from control at p < 0.05.

동물 급여에 의한 항산화성 효소의 level 측정

Cu-Zn SOD, Mn SOD, catalase, GPX의 mRNA level의 변화. Apoprotein E(apoE) knock out mice의

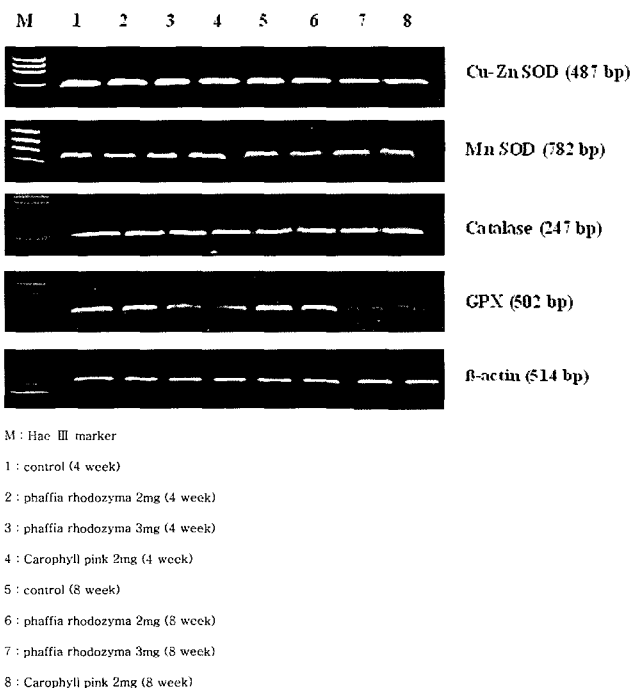


Fig. 3. Alterations of Cu-Zn SOD, Mn SOD, Catalase and GPX mRNA level determined with RT-PCR in test materials treated Apoe knock out mice (male) for 4 week and 8 week.

간에서 Cu-Zn SOD, Mn SOD, Catalase, GPX의 mRNA level의 변화를 관찰 한 결과를 Fig. 3에서 나타내었다. Cu-Zn SOD 투여군에서는 변화를 관찰할 수 없었다. Mn SOD는 4주 투여군에서 carophyll pink의 mRNA level이 증가하였고, 8주 투여군에서 *Phaffia rhodozyma*(3 mg)과 carophyll pink에서 mRNA level이 증가하였다. Catalase는 4주 투여군에서는 변화를 관찰할 수 없었고, 8주 투여군에서는 *Phaffia rhodozyma*(3 mg)과 carophyll pink에서 mRNA level이 증가하였다. GPX는 4주와 8주 투여군에서 *Phaffia rhodozyma*(3 mg)과 carophyll pink에서 mRNA level이 감소하였다.

Nrf-2(NF-E2-related factor 2)의 protein level의 변화. Apoprotein E(apoE) knock out mice의 간에서 Nrf-2의 protein level의 변화를 관찰 한 결과 4주 투여군과 8주투여군 모두 *Phaffia rhodozyma*(3 mg)과 carophyll pink에서 protein level이 증가하였다(Fig. 4).

GSH levels의 변화. Apoprotein E(apoE) knock out mice의 간에서 GSH Levels의 변화를 관찰한 결과 4주 투여군에서는 통계적으로 유의할 만한 변화를 관찰 할 수 없었고, 8주 투여군에서는 *Phaffia rhodozyma*(3 mg)의 GSH Level이 증가하였다(Fig. 5).

혈청내 level 조사를 통한 새로운 기능성 탐색. Apoprotein E(apoE) knock out mice에서 혈청단백(total protein, TPROT), 알부민(albumin, ALB), 트랜스아미나제 [(aspartate aminotransferase, AST), (alanine amino

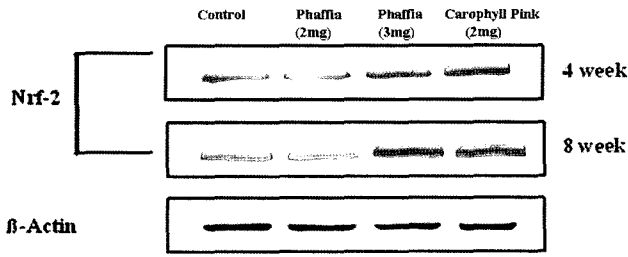


Fig. 4. Alterations of Nrf-2 (NF-E2-related factor 2) protein level determined with Western Blotting in test materials treated Apoe knock out mice (male) for 4 week and 8 week.

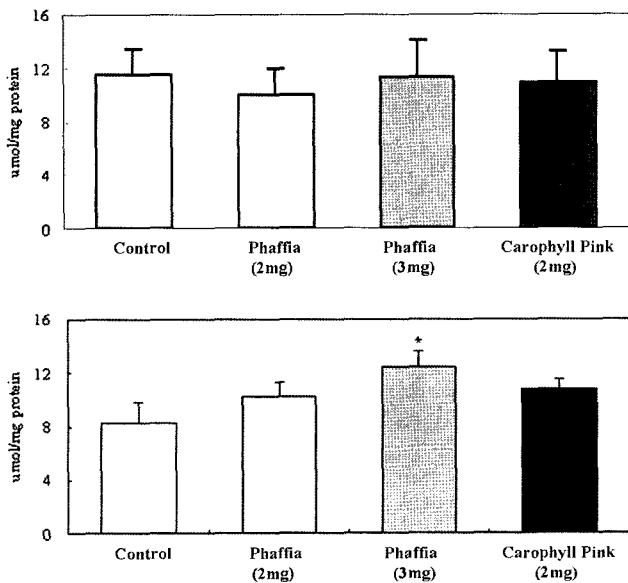


Fig. 5. Alterations of GSH determined in test materials treated Apoe knock out mice (male) after 4 week (A) and 8 week (B). (n = 5). * Significantly different from control at p < 0.05.

transferase, ALT), Total cholesterol, 중성지질(Triacylglycerols)을 측정 한 결과 Total cholesterol이 감소하였고 나머지 항목은 통계적으로 유의할 만한 변화를 관찰할 수 없었다(Table 11).

고찰

본 실험에서는 Astaxanthin 함유 균주 및 식품의 동물 급여에 따르는 독성검사 및 항산화제로의 가능성을 평가하기 위한 실험을 수행하였다. 최근 연구 보고들에 의하면 Astaxanthin은 원래의 착색제로의 기능 이외에도 항산화 기능이 추가로 보고되고 있으며 그 외에도 다양한 효능 즉 세균성 감염에 대한 저항성 면역계에 작용하는 측면 및 혈관계질환을 예방한다는 보고 또한 이루어지고 있다(Ciapara *et al.*, 2006). 이를 위해 다양한 방법으로

식품 첨가물에 활용되기 위해서 이에 대한 안전성에 대한 연구가 필요하다(Lawlor and O'Brien, 1995). 이를 위해 본 실험에서는 astaxanthine 자체 함유량이 적어 경제적 효과가 적은 단점을 극복하기 위해 astaxanthine의 발현량을 증가시키기 위해 개발된 돌연변이 균주를 사용하였다. Astaxanthin을 감마선 조사에 의해 과 발현 하도록 고안된 *Phaffia rhodozyma* 균주를 포함한 사료 및 이를 함유한 기능성 식품첨가물인 carophyll pink에 대한 독성 평가, 항산화 효능을 평가하였다

독성검사결과 시험기간 중 사망동물은 없었으며 전 투여군에서 특이 할 만한 임상증상이 관찰되지 않았다. 체중 변화 및 사료 섭취 변화량 역시 대조군과 비교하여 암·수 전 투여군에서 유의 차가 관찰되지 않았다. 또한 부검시의 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사결과 대조군에 비해 어떠한 변화도 관찰되지 않았다. Hypoxanthine(guanine) phosphoribosyl transferase gene(hprt) gene의 mutation frequency, 염색체이상시험, 말초혈액내의 망상적혈구(reticulocyte)에서 비정상적인 염색체 성분인 소핵을 형광 염색하여 관찰한 결과를 시험 군에서 통계적 유의성이 관찰되지 않았다. 이상의 결과를 종합하면, 본 실험 조건 하에서는 Astaxanthin 함유 식품의 동물 급여는 반복투여독성 및 유전독성을 유도하지 않음을 알 수 있었다. 활성산소는 동식물의 체내 세포들의 대사과정에서 생성되는 산소화합물로 노화나 동맥경화, 암 등의 원인과 관계가 있는 것으로 알려지고 있으며, 생체에서 발생하는 활성산소에 의한 단백질, 핵산 및 생체막손상은 SOD(superoxide dismutase), Catalase, GPX(glutathione peroxidase) 등의 항산화효소에 의해 방어된다. 동물 급여에 의한 항산화성 효소의 level 측정을 위해 Apoe knock out mice를 이용해서 Nrf-2, Cu-Zn SOD, Mn SOD, Catalase, GPX, GSH 등의 항산화 효소 활성에 미치는 효능을 *in vivo* 모델을 이용하여 검정한 결과 Mn SOD, Catalase, GSH, Nrf-2 등이 증가되는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 Apoe knock out mice를 이용해서 중성지질, cholesterol 등의 혈청내 level을 측정 한 결과 cholesterol의 감소를 관찰할 수 있었으며, 통계적으로 유의성 있게 감소하지는 않았지만 중성지질도 감소되는 것이 관찰되었다. 본 실험에서 Astaxanthin 함유 식품첨가물은 Mn SOD, Catalase 등과 같은 항산화효소의 mRNA level을 증가시켰으며, 혈중에 콜레스테롤이나 중성지방이 감소되는 것이 관찰되었다.

감사의 글

본 연구는 보건 의료기술진흥사업(과제번호 A020076)의

지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

참고문헌

- 의약품 등의 안전성 유효성심사에 관한 규정(1999. 12. 12.), 보건복지부, 일반독성과, 식품의약품안전청고시 제 1999-61호.
- Ciapara, H., Valenzuela, F. and Goycoolea, F.M. (2006): Astaxanthine: a review of its chemistry and applications. *Critic. Rev. in Food Sci. and Nurt.*, **46**, 185-196.
- Albertini, R.J., O'Neill, J.P., Nicklas, J.A., Heintz, N.H. and Kelleher, P.C. (1985): Alterations of the *hprt* gene in human *in vivo*-derived 6-thioguanine resistant T lymphocytes. *Nature*, **316**, 369-371.
- Krinsky, N.I. (1989): Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radic. Biol. Med.*, 617-635.
- Moore, F.R., Urda, G.A., Krishna, G. and Theiss, J.C. (1996): Genotoxicity evaluation of selenium sulfide *in vivo* and *in vivo/in vitro* micronucleus and chromosome aberration. *Mutat. Res.*, 33-41.
- Proudlock, R.J. and Statham, J. (1997): Evaluation of the rat bone marrow and peripheral blood micronucleus test using mnoncrotaline. *Mutat. Res.*, 243-249.
- Shmid, W. (1975): The micronucleus test. *Mutat. Res.*, **31**, 9-15.
- Lawlor, S.M. and O'Brien, N.M. (1995): Modulation of oxidative stress by beta-carotene in chicken embryo fibroblasts. *Br. Nutr.*, **73**, 841-850.