

나노리포솜을 이용한 astaxanthin의 안정화

유지민³ · 김소영^{1,2} · 조은아¹ · 조은혜¹ · 최선주¹ · 정윤주³ · 하병집³ · 채희정^{1,2*}

¹호서대학교 식품생물공학과, 식품기능안전연구센터, ²내추럴초이스(주), ³(주)롯데 기업부설연구소

Stabilization of Astaxanthin Using Nanoliposome

Jimin Yoo³, Soyoung Kim^{1,2}, Eun-ah Cho¹, Eunhye Cho¹, Sunju Choi¹,
Yoonjoo Jeong³, Byungjhip Ha³, and Hee Jeong Chae^{1,2*}

¹Department of Food and Biotechnology, Center for Food Function and Safety, Hoseo University, Asan 336-795, Korea

²Natural Choice Co., Ltd, Asan 336-795, Korea

³R&D Center, Cotde Co., Ltd, Cheonan 330-858, Korea

Abstract Astaxanthin is an unsaturated compound with a double bond. So it is easily decayed by heat and oxidation (light) during its storage and processing of it. Nanoliposome formulation technology was utilized to improve the stability of astaxanthin. Nanoliposome preparation conditions were established and the stability of astaxanthin encapsulated nanoliposome and free astaxanthin was investigated. Thermal stability and UV-stability of astaxanthin encapsulated nanoliposome increased up to two times and tree times, respectively. Astaxanthin encapsulated nanoliposome could be used as a stable functional material for industrial purposes.

Keywords: astaxanthin, stabilization, liposome, nanoliposome

서 론

아스타잔틴 (astaxanthin, 3,3'-dihydroxy- β,β' -carotene-4,4'-dione, C₄₀H₅₂O₄, FW 596.9)은 자연계에 널리 존재하는 케토-카로티노이드 (keto-carotenoid)로서 polyisoprenoid와 oxygen quenching 기능을 가진 benzenoid ring의 결합 구조로, 베타카로틴 (β -carotene)과 매우 유사한 구조를 지니고 있다. 아스타잔틴은 주황색 또는 붉은색의 색소 물질로 갑각류 등 다른 해양생물과 조류에 존재하고, 비타민 E인 알파-토코페롤 (α -tocopherol)에 비하여 550배에 해당하는 효과가 입증되어 있는 강력한 항산화 물질이다 [1]. 아스타잔틴의 강력한 항산화활성은 구조의 C-4, C-4'에 위치한 oxo-group 때문이라고 보고되어 있고 [2], 아스타잔틴의 항산화 기작은 일중항 산소 (singlet oxygen)를 제거하거나 [3] 자유라디칼 소거능 [4,5], 과산화물 연쇄반응 (peroxide chain reaction)을 정지시키는 것으로 알려져 있다 [6,7]. 아스타잔틴의 항산화 작용은 일중항 산소의 제거에 의해 항암에도

효과가 있는 것으로 알려져 있다. 그 예로 아스타잔틴의 활성산소 (oxygen radical) 제거에 의한 개시 (cancer initiation)와 진행 (propagation)의 과정을 감소시켜 난소암, 간암에 대한 예방효과 등이 보고된 바 있다 [8-10]. 이 외에도 아스타잔틴의 항암효과에 대한 많은 연구결과가 보고되었다 [11-15]. 또한 아스타잔틴은 면역기능에 활성이 있는 것으로 알려져 있고 [16-21], 심장질환에 대한 치료효과도 보고되었다 [22,23]. 이 외에도 항염증 효과 [24], 자외선 차단 효과 [25], 눈 기능과 관련된 효과 [26-29], 간기능에 대한 영향 [30]이 보고된 바 있다. 또한, 아스타잔틴의 미백활성이 미백제로 알려진 kojic acid와 비슷한 활성을 지니는 것으로 보고된 바 있다 [31].

현재까지의 연구결과들이 아스타잔틴의 높은 생리활성을 입증하고 있고, 여러 천연자원에서 아스타잔틴의 추출법 등의 연구가 활발히 이루어지고 있지만, 아스타잔틴은 이중결합을 가진 불포화화합물로 제조나 저장 시 열과 산화(빛)에 의해 쉽게 파괴되어 활성이 감소하여 응용범위에 한계가 있는 실정이다 [32].

현재 국내외적으로 아스타잔틴의 안정성과 용해도 개선을 위한 제형화 연구는 미비한 실정이다. 국내에서는 아스타잔틴을 수용화하기 위한 방법으로 키토산 등 수용성 고분자

*Corresponding author

Tel: +82-41-540-5642, Fax: +82-41-532-5640

e-mail: hjchae@hoseo.edu

를 이용한 연구를 진행하였으나, 현재 실용화되지 않은 상태이고, 그 안정성이나 효능 또한 입증되지 않았다 [33]. 또한 안정성 향상의 측면에서 아스타잔틴 유액제조에 의한 안정성 향상이 보고된 바 있고 [34], chitosan matrix를 이용하여 아스타잔틴을 캡슐화하여 온도에 대한 저장성 개선 [35], 키토산을 이용하여 헤마토코커스로부터 추출한 아스타잔틴을 캡슐화하여 산화안정성 개선과 저장에 따른 항산화활성이 보고된 바 있다 [36]. 현재까지 국내외적으로 아스타잔틴 제형화 연구는 초기 상태이고 안정성과 용해도를 동시에 높일 수 있는 기술은 보고된 바 없다. 아스타잔틴을 식품 및 화장품으로 용도개발하고 이와 관련된 기술적인 문제를 해결하기 위해서는 제조 및 유통과정에서 변질되지 않고 본래의 활성이 유지될 수 있도록 하는 안정화 기술 즉, 화장품의 제형기술이 요구된다.

최근에는 화장품의 유효성분을 유지하면서 안정하게 피부에 흡수시킬 수 있는 피부 경피흡수시스템으로써 리포솜 제형에 대한 관심이 높아지고 있다. 리포솜은 자기 스스로 회합하는 콜로이드 입자들의 구형 인지질 베지클로 정의되는데 1960년대 초 Alec Bangham은 물 속에서 인지질 베지클 구조로 형성되는 것을 처음으로 발견하였다 [37]. 리포솜은 인지질로 구성된 구형의 소포체 (vesicle)로서 친수성 및 친유성 성분을 동시에 포집할 수 있어 vitamin, 약품 등과 같은 활성성분에 대한 전달체 (delivery system)로 많은 연구가 진행되고 있다 [38]. 인지질은 생체막의 주요 구성성분이기 때문에 리포솜의 인지질막 또한 생체막과 유사한 생리학적 기능 및 특성을 나타낸다. 따라서 리포솜은 피부 친화적이며 안전성이 우수하기 때문에 제약 및 화장품산업 분야 등에서 효과적인 약물전달체로서 응용되고 있다 [39]. 주름을 개선하거나 미백작용을 높이는데 특수한 효과를 얻기 위해서 활성물질들을 피부에 투과시킬 목적으로 리포솜 전달체계 시스템을 사용해 왔으며 [38], 활성 물질 중 다양한 생리학적 기능을 가진 ascorbic acid는 피부의 미백작용과 주름 개선에 우수한 효능을 갖고 있지만 화학적으로 불안정하여 물이나 공기와의 접촉하게 되면 산화되어 그 활성이 감소하는 단점이 있다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 리포솜내에 ascorbic acid를 포집시켜 안정성 향상이 보고된 바 있다 [40].

리포솜 제형에 나노기술을 적용하게 되면 특정 성분을 피부 속에 전달하는 역할을 하는 나노구조체의 크기가 피부를 구성하는 세포보다 작기 때문에 나노입자가 포함된 기능성 화장품을 바르면 약효 성분이 피부 깊숙이 잘 스며든다고 알려져 있다.

본 연구에서는 이중결합을 가진 불포화화합물로 제조나 저장 시 열과 산화 (빛)에 의해 쉽게 파괴되어 활성이 감소하여 응용범위에 한계가 있는 아스타잔틴을 안정성이 우수한 기능성 원료로써 산업적으로 용도를 넓히고 부가가치를 향상시키는 것을 목적으로 나노리포솜 제형기술을 이용하여 접목하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

리포솜 제조를 위하여 사용한 인지질은 대두 (soy bean)에서 추출한 lecithin으로 포스파티딜콜린성분이 75%인 Lipoid S 75-3N (Lipoid, Germany)를 사용하였고, cholesterol은 Solvay사 (Duphaer, France), 중쇄트리글리세라이드 (medium chain triglyceride, MCT)는 Paester 9307 (Patech사, 대만)를 사용하였고, ethanol (한국알콜산업, 한국)은 일반적으로 화장품에서 사용하는 원료를 사용하였으며 물은 3차 증류수를 사용하였다.

Astaxanthin은 Sigma사 (MO, USA)의 제품으로서 순도가 92% 이상인 것을 사용하였고 아스타잔틴 함량 분석을 위한 HPLC 용매로 사용한 메탄올, 증류수, 아세토나이트릴 (acetonitrile)은 Burdick & Jackson사 (MI, USA) 제품으로 모두 HPLC급을 사용하였다.

나노리포솜 제조

나노리포솜을 제조하기 위하여 lecithin를 포함하는 cholesterol, MCT (medium chain triglyceride), ethanol로 구성되는 유상 (oil phase)과 수상 (water phase)을 각각 60-80°C로 가온하여 용해시킨 후 수상에 유상을 넣고 호모믹서 (TK Auto Homomixer Mark II, Tokushukikakogyo, Japan)를 사용하여 3,000 rpm의 속도로 10분간 유회시켜 리포솜을 제조하였다. 제조된 리포솜을 700 bar, 3회 microfluidizer (M-110Y, Microfluidics, MA, USA)를 통과시켜 나노리포솜을 제조하였다 (Table 1).

Table 1. Formula for nanoliposome preparation with different oil phase composition

Component	Sample	A-1 (wt%)	B-1 (wt%)	C-1 (wt%)	D-1 (wt%)
Oil phase	Lecithin	5	5	5	5
	MCT	-	5	-	5
	Cholesterol	-	-	0.5	0.5
	Ethanol	10	10	10	10
Water phase	Water	Total 100	Total 100	Total 100	Total 100

포접나노리포솜 제조

포접나노리포솜을 제조하기 위하여 lecithin를 포함하는 cholesterol, Medium chain triglyceride (MCT), ethanol로 구성되는 유상 (oil phase)과 수상 (water phase)을 각각 60-80°C로 가온하여 용해시킨 후 수상에 유상을 넣고 호모믹서 (TK Auto Homomixer Mark II, Tokushukikakogyo, Japan)를 사용하여 3,000 rpm의 속도로 10분간 유회시켜 리

포솜을 제조하였다. 제조된 리포솜의 온도를 40°C로 조정하고 다음 영양성분인 astaxanthin을 첨가하여 3000 rpm의 속도로 5분간 유회시켜 포접리포솜을 제조하였다. 포접리포솜을 700 bar, 3회 microfluidizer (M-110Y, Microfluidics, MA, USA)를 통과시켜 포접나노리포솜을 제조하였다 (Table 2).

Table 2. Formula for astaxanthin encapsulated nanoliposome preparation with different oil phase composition

Component	Sample				
	A (wt%)	B (wt%)	C (wt%)	D (wt%)	
Oil phase	Lecithin	5	5	5	5
	MCT	-	5	-	5
	cholesterol	-	-	0.5	0.5
	Ethanol	10	10	10	10
Water phase	Water	Total	Total	Total	Total
	Astaxanthin	100	100	100	100
		1	1	1	1

제형 안정성 평가

Table 1에서와 같이 유상성분의 중량비 (wt%)를 변화시키면서 증류수로 최종 부피를 맞춰서 아스타잔틴을 포함하는 포접리포솜과 포접나노리포솜을 제조하여 45°C의 온도로 셋팅 된 인큐베이터 (대한과학)를 이용하여 암소 (dark site)의 조건에서 보관하였다. 이 시료들을 28일간 방치하면서 7일 간격으로 샘플링하여 Zeta-Potential Analyzer (ELS-8000, Otasuka Electronics CO, Japan)를 이용하여 동적광산란법 (dynamic light scattering)의 원리로 분산상태의 입자 크기를 측정하였다.

Astaxanthin의 안정성 평가

합성 아스타잔틴을 메탄올 (2 mL)에 3.125 µg/mL의 농도를 용해한 것과 아스타잔틴을 함유한 포접나노리포솜 제조한 것을 28일간 보관하면서 온도 및 자외선의 영향을 검토하였다. 온도의 영향을 확인하기 위해 시료를 인큐베이터 (대한과학)를 이용하여 암소 (dark site)의 조건에서 25°C 및 45°C로 보관하였고, 자외선 영향을 확인하기 위한 광원으로는 UV lamp (253.7 nm, 19.8 watt, Sankyo Denki Co., Japan)을 사용하였고 62 cm 떨어진 거리에서 조사하였다. UV를 차단한 대조군의 경우 조건에서 시료를 호일로 싸서 보관하였다. 각각의 시료들은 28일간 방치하면서 7일 간격으로 샘플링하여 HPLC 시스템 (Agilent 1100, Agilent Technologies Inc., CA, USA)으로 분석하여 아스타잔틴의 잔존 함량을 계산하였다.

HPLC 분석조건

HPLC system (Agilent 1100, Agilent Technologies Inc.,

CA, USA)을 이용하여 컬럼은 Apollo C18 (5 µm, 4.6 × 250 mm, Alltech Associates, IL, USA), 검출기는 UV 검출기 (474 nm)를 사용하여 유속 0.7 mL/min로 하고 오븐온도는 40°C에서, 이동상으로는 메탄올과 증류수를 95 : 5의 비율로 혼합한 용매를 사용하여 분석하였다 [41].

결과 및 고찰

제형 안정성 평가

나노리포솜 조성비에 따라 lecithin 5%, cholesterol 0.5%, MCT 5%, MCT 5% + cholesterol 0.5% 등의 4가지 군을 선별하여 (Table 1, 2) 리포솜, 나노리포솜, 포접리포솜, 포접나노리포솜으로 시료를 구분하여 특성을 검토하였다. Table 3에서 보는 바와 같이 나노리포솜 제조 시 150 nm 이하로 입자 크기가 작아졌으며, lecithin 5%와 cholesterol 0.5% 함유한 리포솜은 100 nm 이하의 입자 크기를 확인하였다.

Table 3. Zeta potential and particle size of liposomes and nanoliposomes prepared by different formula

Formulation	Zeta potential (mV)	Particle size (nm)	
A-1	Liposome	-52.27	368.3
	Nanoliposome	-52.93	89.5
B-1	Liposome	-56.32	265.1
	Nanoliposome	-59.83	127.3
C-1	Liposome	-60.00	360.3
	Nanoliposome	-69.50	77.3
D-1	Liposome	-54.94	261.7
	Nanoliposome	-61.79	120.3

Table 4. Zeta potential and particle size of astaxanthin encapsulated liposomes and nanoliposomes prepared by different formula

Formulation	Zeta potential (mV)	Particle size (nm)	
A	Liposome	-52.40	473.9
	Nanoliposome	-63.58	118
B	Liposome	-52.40	473.9
	Nanoliposome	-63.58	82.3
C	Liposome	-59.18	326.9
	Nanoliposome	-63.75	140.9
D	Liposome	-61.21	344.1
	Nanoliposome	-66.92	

또한, 포접나노리포솜의 경우 (Table 4) 150 nm 이하로 입자 크기가 작아졌으며, cholesterol 0.5% 함유한 리포솜은 100 nm 이하의 입자 크기를 확인하였다. 포접하지 않은 리포솜보다 입자 크기가 크게 나타났으며 이것은 리포솜 유상 내에 아스타잔틴을 포접함으로써 크기가 커진 것으로 판단되었다. 제타전위 값은 모든 시료에 대해서 음의 값을 나타내었으며, 그 값이 -50 mV에서 -70 mV 사이로 안정한 상태

를 확인하였다. 측정된 제타전위의 값은 분산상태의 척력을 말해주는데, 이것을 통해서 나노리포좀의 안정도를 측정하는데 이용할 수 있다 [42]. 순수한 phosphatidyl choline (PC) 로 구성되어 있는 lecithin은 양쪽성 계면활성제이므로 PC 로 형성된 리포좀은 -10 mV내외의 값을 가지는 것으로 알려져 있으며 [42] 제타전위의 절대값이 크면 클수록 콜로이드 입자의 반발력은 커지며, 콜로이드 상태는 안정한 것으로 보고되어 있다 [43].

45°C 보관온도에 따른 제형 안정성을 확인한 결과, 리포좀의 경우 제조 직후 368.3 nm (A-1), 265.1 nm (B-1), 360.3 nm (C-1), 261.7 nm (D-1)으로 입자 크기를 나타내었으며 21일 후 426.7 nm (A-1), 444.5 nm (B-1), 572.0 nm (C-1), 442.8 nm (D-1)으로 입자 크기가 커진 것을 확인할 수 있었으며 28일 후에는 416.6 nm (A-1), 386.7 nm (B-1), 300.1 nm (C-1), 349.1 nm (D-1)으로 입자 크기가 다시 줄어드는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 14(a)). 이것은 시간이 지남에 따라 온도가 증가할수록 리포좀 분자운동이 활발해져 입자의 막을 구성하고 있는 lecithin의 인지질이 활성화되어 표면적을 작게 하여 안정해지려는 입자의 회합으로 판단되며 리포좀이 불안정하다는 것을 확인할 수 있었다 [44].

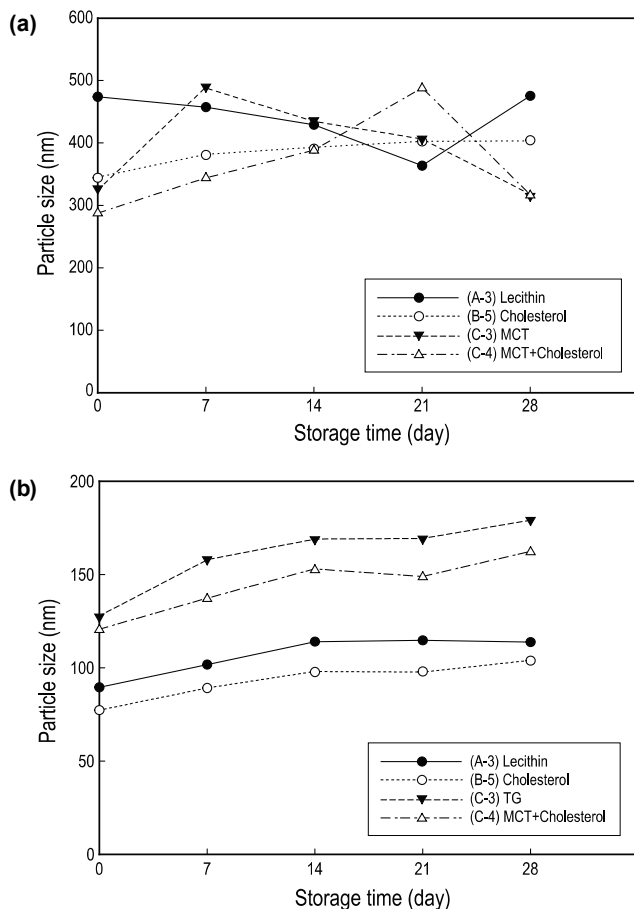


Fig. 1. Effect of various lipids on the long-term stability of (a) liposomes and (b) nanoliposomes.

나노리포좀의 경우 제조 직후 89.5 nm (A-1), 127.3 nm (B-1), 77.3 nm (C-1), 120.3 nm (D-1)의 입자 크기를 나타내었으며 28일 후에 113.8 nm (A-1), 179.2 nm (B-1), 103.8 nm (C-1), 162.0 nm (D-1)으로 제조 직후보다 입자 크기가 다소 커지는 경향을 보였으나 입자가 줄어드는 입자의 회합은 나타나지 않았으며 cholesterol 0.5% 첨가한 제형에서 가장 안정함을 확인할 수 있었다 (Fig. 14(b)).

Fig. 15(a)에서 보는 바와 같이 포접리포좀 역시 입자 크기가 커지다가 28일 후 입자 크기가 작아졌으며, 제형이 불안정하다는 것을 확인할 수 있었다.

포접나노리포좀에서는 28일 후 lecithin 5% 함유한 조건에서 90.0 nm, MCT (medium chain triglyceride) 5% 함유한 조건에서 167.7 nm, cholesterol 0.5% 함유한 조건에서 117.2 nm, cholesterol 0.5%와 MCT (medium chain triglyceride) 5% 함유한 조건에서 175.4 nm의 크기를 나타내었다. Lecithin 5% 조건에서 제조 직후보다 크기가 다소 줄어들어 불안정한 제형을 보였으며, cholesterol 0.5% 함유한 제형이 가장 안정함을 확인할 수 있었다 (Fig. 15(b)).

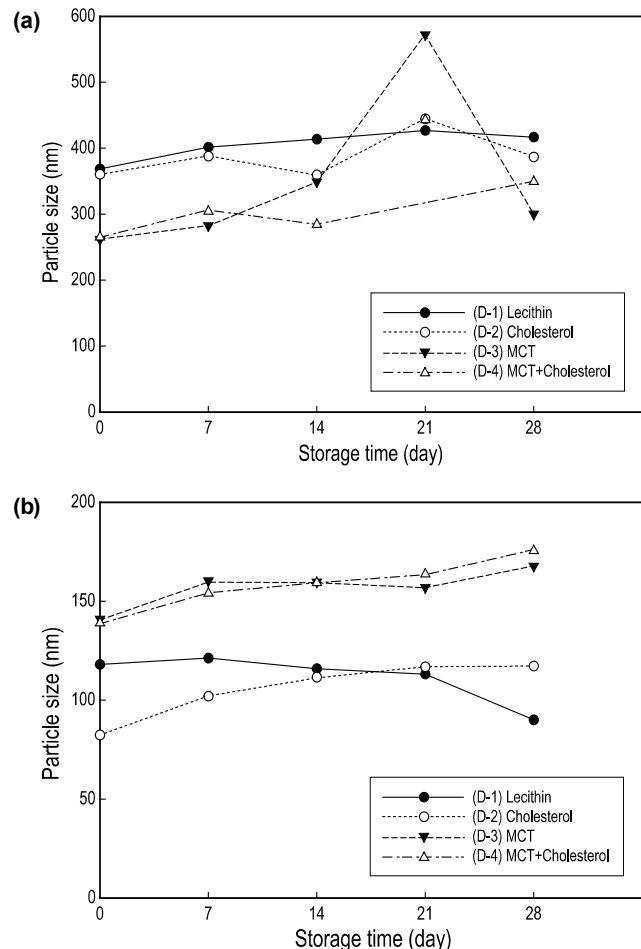


Fig. 2. Effect of various lipids on the long-term stability of (a) astaxanthin encapsulated liposomes and (b) astaxanthin encapsulated nanoliposomes.

이상과 같은 안정성 결과들을 종합적으로 평가해볼 때, 리포솜보다 나노리포솜이 더 안정한 것을 알 수 있었으며, cholesterol 0.5% 함유한 제형이 가장 안정한 것을 확인할 수 있었다. 이것으로 cholesterol이 리포솜 이중막에서 반발력을 유발시키고 막의 견고성을 강화시킴으로써 이중막의 구조적 안정성을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다 [45,46].

아스타잔틴의 안정성 평가

빛과 열에 민감하여 산화되기 쉬운 물질임이 확인된 [2] 아스타잔틴을 함유한 포접나노리포솜과 합성 아스타잔틴을 메탄올 (2 mL)에 3.125 µg/mL의 농도를 용해하여 시료를 제조하였다. UV와 저장온도에 대한 안정성 평가를 28일 동안 진행하되, HPLC 분석을 통한 아스타잔틴의 잔존 함량을 계산하여 안정성을 평가하였다.

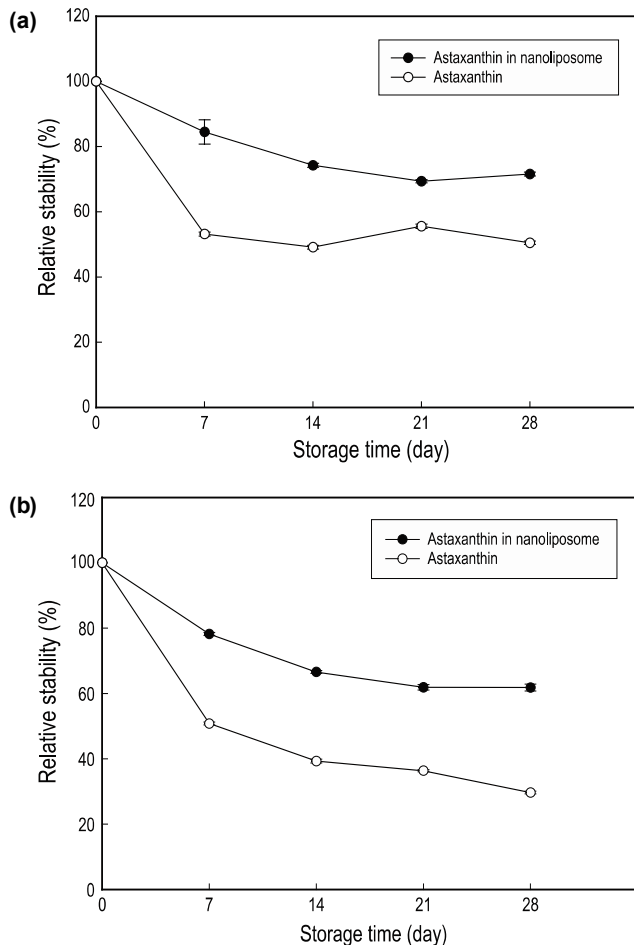


Fig. 3. Effect of temperature on the long-term stability of astaxanthin and astaxanthin in nanoliposomes; (a) 25°C, (b) 45°C.

실험결과, 25°C에서 보관시 아스타잔틴 함량이 28일째 50% 수준으로 감소된 반면 포접나노리포솜은 70%가 잔존하여 포접리포솜 형성 전 아스타잔틴과 비교했을 경우

20%의 안정성이 향상된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3(a)). 45°C 보관 시 아스타잔틴 함량이 28일째 30% 수준으로 현저히 감소되어 온도에 대하여 민감한 물질이라는 것을 확인할 수 있었으며 포접나노리포솜의 경우 아스타잔틴 함량이 28일째 60%가 잔존하여 포접리포솜 형성 전 아스타잔틴과 비교했을 경우 2배 정도 안정성이 높아진 것을 알 수 있었다 (Fig. 3(b)).

또한, UV 조사환경에서 Fig. 4에서 보는 바와 같이 포접전의 아스타잔틴은 7일 경과 후 50%가 분해되었고 28일째 15%의 잔존율을 나타내었다. 반면 포접리포솜의 경우 28일째에도 70%이상 잔존하는 것으로 나타나 안정성이 향상된 것을 확인할 수 있었다.

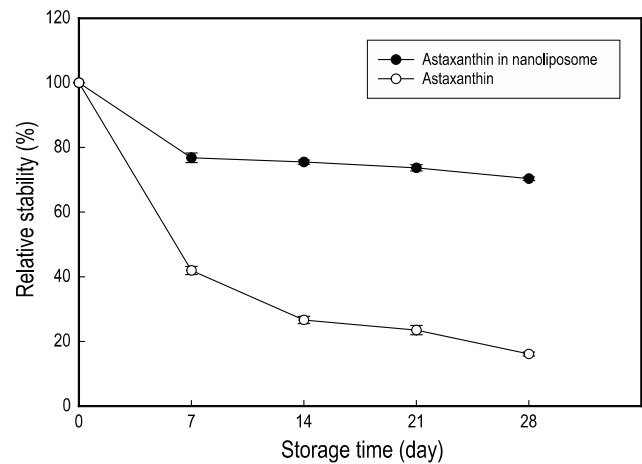


Fig. 4. Effect of UV irradiation on the long-term stability of astaxanthin and astaxanthin in nanoliposomes at room temperature.

요약

본 연구에서는 이중결합을 가진 불포화화합물로 제조나 저장 시 열과 산화 (빛)에 의해 쉽게 파괴되어 활성이 감소하여 응용범위에 한계가 있는 아스타잔틴의 안정성 향상을 위하여 나노리포솜 제형기술을 이용하였다. 제형안정성 평가를 통하여 리포솜 제조조건 및 조성비를 확립하였고, 포접나노리포솜을 제조하여 포접전의 아스타잔틴과 안정성을 비교 검토하였다. 아스타잔틴을 포접하여 포접나노리포솜 제조 시 포접전의 아스타잔틴에 비해 열에 대한 안정성이 2배 정도 향상되고, UV 안정성 또한 3배 향상된 것을 확인하였다. 이상의 결과로부터 아스타잔틴을 포접한 포접나노리포솜은 안정성이 우수한 기능성 원료로서 산업적으로 용도를 넓히고 부가가치를 더욱 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다.

감사

본 연구는 교육과학기술부와 한국산업기술진흥원의 지역

혁신인력양성사업으로 수행된 연구결과이며, 이에 깊이 감사드립니다.

접수 : 2010년 3월 5일, 게재승인 : 2010년 4월 15일

REFERENCES

- Shimidzu, N., M. Goto, and W. Miki (1996) Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms. *Fish. Sci.* 62: 134-137.
- Hong, S. P., M. H. Kim, and J. K. Hwang (1998) Biological functions and production technology of carotenoids. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 27: 1279-1306.
- During, A., A. Nagao, and J. Terao (1998) β -carotene 15, 15-deoxygenase activity and cellular retinal-binding protein type II level are enhanced by dietary unsaturated triacylglycerols in rat intestines. *J. Nutr.* 128: 1614-1619.
- Jorgensen, K. and L. Skibsted (1993) Carotenoid scavenging radicals. Effect of carotenoid structure and oxygen partial pressure on antioxidative activity. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 196: 423-429.
- Naguib, Y. (2000) Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *J. Agric. Chem.* 48: 1150-1154.
- Lim, B. P., A. Nagao, J. Terao, K. Tanaka, T. Suzuki, and K. Takama (1992) Antioxidant activity of xanthophylls on peroxy radical-mediated phospholipidperoxidation. *Biochim. Biophys. Acta* 1126: 178-184.
- Nakagawa, K., S. Kang, D. Park, G. Handelman, and T. Miyazawa (1997) Inhibition by beta-carotene and astaxanthin of NADPH-dependent microsomal phospholipid peroxidation. *J. Nutr. Sci. Vitamin* 43: 345-355.
- Chew, B. P., J. S. Park, M. W. Wong, and T. S. Wong (1999) A comparison of the anticancer activities of dietary beta-carotene, canthaxanthin and astaxanthin in mice *in vivo*. *Anticancer Res.* 19: 1849-1854.
- Jyonouchi, H., S. Sun, K. Iijima, and M. Gross (2000) Antitumor activity of astaxanthin and its mode of action. *Nutr. Cancer.* 36: 59-65.
- Marnett, L. J. (1987) Peroxy free astaxanthin radicals: potential mediators of tumor initiation and promotion. *Carcinogenesis* 8: 1365-1373.
- Batieha, A. (1993) Serum micronutrients and the subsequent risk of cervical cancer in a population-based nested case-control cancer epidemiology. *Biomarkers Prev.* 2: 335-339.
- Bertram, J. S. (1991) Cancer prevention by retinoids and carotenoids: proposed role of GAP junctional communication. PP. 31-50. In: *Vitamins and Minerals in the Prevention and Treatment of Cancer*. M. M. Jacobs (ed.), CRC Press, Boca Raton, USA.
- Tomita, Y., K. Himeno, K. Nomoto, and H. Endo (1987) Augmentation of tumor immunity against synergistic tumors in mice by beta-carotene. *J. Natl. Cancer Inst.* 78: 679-681.
- Kistler, A. (2002) Metabolism and CYP-inducer properties of astaxanthin in man and primary human hepatocytes. *Arch. Toxicol.* 75: 665-675.
- Kurihara, H. (2002) Contribution of the antioxidative property of astaxanthin to its protective effect on the promotion of cancer metastasis in mice treated with restraint stress. *Life Sci.* 70: 2509-2520.
- Bendich, A. (1991) Non vitamin A activity of carotenoids: immuno enhancement. *Food Sci. Technol. Res.* 2: 127-130.
- Bendich, A. (1989) Carotenoids and the immune response. *J. Nutr.* 119: 112-115.
- Bendich, A. (1990) Carotenoids and the immune system. pp. 323-335. In: N. I. Krinsky (ed.). *Carotenoids Chemistry and Biology*. Plenum Press, New York, USA.
- Tomita, Y., H. Jyonouchi, R. W. Engelman, N. K. Day, and R. A. Good (1993) Preventive action of carotenoids on the development of lymphadenopathy and proteinuria in MRL-lpr/lpr mice. *Autoimmunity* 16: 95-102.
- Breimer, L. H. (1990) Molecular mechanisms of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: the role of DNA base damage. *Mol. Carcinog.* 3: 188-197.
- Jyonouchi, J. (1993) Astaxanthin enhances *in vitro* antibody production to T-dependent antigens without facilitating polyclonal B-cell activation. *Nutr. Cancer* 19: 269-280.
- Kritchevsky, S. B. (1999) β -Carotene, carotenoids and the prevention of coronary heart disease. *J. Nutr.* 129: 5-8.
- Frei, B. (1995) Cardiovascular disease and nutrient antioxidants: role of low-density lipoprotein oxidation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35: 83-98.
- Aghdassi, E. and J. P. Allard (2000) Breath alkanes as a marker of oxidative stress in different clinical conditions. *Free Radic. Biol. Med.* 28: 880-886.
- O'Connor, I. and N. O'Brien (1998) Modulation of UVA light-induced oxidative stress by beta-carotene, lutein and astaxanthin in cultured fibroblasts. *J. Dermatol. Sci.* 16: 226-230.
- Jacques, P. (1999) The potential preventive effects of vitamins for cataract and age-related macular degeneration. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 69: 198-205.
- Lyle, B. J. (1999) Antioxidant intake and risk of incident age-related nuclear cataracts in the beaver dam eye study. *Am. J. Epidemiol.* 149: 801-809.
- Seddon, J. M. (1994) Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E and advanced age-related macular degeneration.

- J. Am. Med. Assoc.* 272: 1413-1420.
29. Landrum, J. T. (1999) Analysis of zeaxanthin distribution within individual human retinas. *Meth. Enzymol.* 299: 457-467.
 30. Gradelet, S. (1998) Dietary carotenoids inhibit aflatoxin B1-induced liver preneoplastic foci and DNA damage in the rat: role of the modulation of aflatoxin B1 metabolism. *Carcinogenesis* 19: 403-411.
 31. Jung, S. Y. (2005) Skin Anti-wrinkle ingredients containing astaxanthin. Korea Patent 10, 2005, 0096556.
 32. Chen, X. R., Z. Chen, C. Guo, and P. Li (2007) The preparation and stability of the inclusion complex of astaxanthin with β -cyclodextrin. *Food Chem.* 101: 1-5.
 33. Yun, M. J., J. H. Kim, H. Y. Choi, S. K. Kim, and Y. S. Gu (2003) The method for making astaxanthin water-soluble. Korea Patent 10, 2004, 0098887.
 34. Lee, C. K. (2003) Process development for astaxanthin production by microalgae. Research Report, Ministry of Maritime Affairs & Fisheries, Korea.
 35. Higuera-Ciapara, I., L. Felix-Valenzuela, F. M. Goycoolea, and W. Arguelles-Monal (2004) Microencapsulation of astaxanthin in a chitosan matrix. *Carbohydr. Polymers* 56: 41-45.
 36. Kittikaiwan, P., S. Powthongsook, P. Pavasant, and A. Shotipruk (2007) Encapsulation of *Haematococcus pluvialis* using chitosan for astaxanthin stability enhancement. *Carbohydr. Polymers* 13: 1-8.
 37. Chansiri, G., R. T. Lyons, M. V. Patel, and S. L. Hem (1999) The reversibility of the vitamin c redox system: electrochemical reason and biological aspects. *J. Pharm. Sci.* 88: 454-458.
 38. Meyer, R. (2005) *Delivery System Handbook for Personal and Cosmetic Products*. William Andrew Publishing, NY, USA.
 39. Yeom, E. J. (2003) *Studies on the Using Liposome Cosmetics Formulation Technology and Its Effect on the Transdermal Permeation*. M.S. Thesis. Konkuk University, Seoul, Korea.
 40. Lee, K. Y. (1999) *The Stabilization of Ascorbic Acid Using Liposome*. Soongsil University, Seoul, Korea.
 41. Kim, S. Y., E. A. Cho, J. M. Yoo, M. J. In, and H. J. Chae (2008) Extraction and analysis of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using sonication. *J. Korea Soc. Food Sci. Nutr.* 37: 1363-1368.
 42. Chansiri, G., R. T. Lyons, M. V. Patel, and S. L. Hem (1999) Effect of surface change on the stability of oil/water emulsions during steam sterilization. *J. Pharm. Sci.* 88: 454-458.
 43. Kim, J. D. (2005) *A Study of Nanoceramide and It's Effects*. M.S. Thesis. Sookmyung Women's University, Seoul, Korea.
 44. Snodderly, D. M. (1995) Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *Am. J. Clin. Nutr.* 62: 1448-1461.
 45. Gregoriadis, G. (1988) *Liposome as Drug Carriers, Recent Trends and Progress*. John Wiley and Son, NY, USA.
 46. Gregor, C. (2004) Lipoid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. *Adv. Drug Delivery Rev.* 56: 675-711.