

## 우렁쉥이 육으로부터 Carotenoprotein의 분리·정제 및 특성

김세권\* · 강옥주<sup>1</sup> · 변희국 · 전유진 · 김종배<sup>2</sup>

부경대학교 화학과, <sup>1</sup>동주여자전문대학 식품영양과, <sup>2</sup>군산대학교 수산가공학과

**초 록** : 우렁쉥이의 육에 존재하는 carotenoprotein을 추출하여 이온교환수지 및 겔크로마토그래피를 이용하여 정제하였으며, 정제된 carotenoprotein의 분자량, pH 안정성, 열안정성, 변성제의 영향, 아미노산 조성 및 지방산 조성을 분석하였다. Carotenoprotein의 정제도는 5배, 수율은 2.9%였으며, 1 mg당 0.15 µg carotenoid가 함유되어 있었다. Carotenoprotein의 최대 흡수파장은 UV/Vis 스펙트럼에서 463 nm 및 439 nm였으며, 분자량은 64.4 kDa으로 단일 polypeptide로 이루어져 있었다. Carotenoprotein은 pH 7.0부근의 중성영역에서 안정하였고, 열안정성은 65°C에서 2시간 이내에 90%이상 유지하였으며, SDS 변성제에 의해 5 nm 단파장 영역으로 이동하였다. Carotenoprotein의 아미노산 조성은 Gly, Asn, Gln 및 Ser의 함량이 전체 아미노산의 35.3%로 전체적으로 산성의 성질을 보였으며, 구성지방산 조성의 함량은 monoene산이 45.2%로 가장 많았고, 다음으로 포화지방산 및 polyene산이 각각 38.1% 및 11.7%였다.(1997년 11월 24일 접수, 1997년 12월 12일 수리)

### 서 론

Carotenoid는 천연에 존재하는 매우 중요한 색소들로서 식물, 동물 및 미생물 등에 여러 형태로 폭넓게 분포되어 있으며, 현재까지 광화학적 입체이성질체를 포함하여 약 600여 종류의 carotenoid가 자연계에서 분리·확인되었다.<sup>1)</sup>

Carotenoid는 생체내에서 단백질과 복합체를 형성하고 있는 경우가 많고, 이 복합체는 물리화학적 성상의 차이에 따라 carotenoprotein과 carotenolipoprotein 복합체로 분류된다. 전자는 carotenoid가 단순단백질 또는 glycoprotein과 화학양론적으로 결합한 것으로 어피나 갑각류의 껍질 등에 주로 존재하고, 후자는 carotenoid 이외의 지질을 함유한 lipoprotein과 결합된 것으로 주로 알(卵), 난소, 혈액 등에 존재한다.<sup>2)</sup> 일반적으로 이들 복합체들을 carotenoprotein이라고 한다.

이 carotenoprotein 복합체는 수용성으로 단백질이나 carotenoid가 단독으로 존재할 때보다 훨씬 더 안정하다. 이들은 흔히 식물의 광합성 장치나, 해조류, 박테리아, 어류, 패류 등에서 발견되는데 단백질과 회합하고 있기 때문에 분홍색, 자주색, 청색, 적색 또는 녹색을 띠며, UV 흡수스펙트럼이 유리된 상태의 carotenoid 보다는 장파장 쪽으로 크게 이동되고, 이들 복합체의 분자량은 35~1000 kDa에 이르기까지 넓게 분포되어 있다.<sup>3)</sup>

Carotenoid는 식품의 착색제, 의약품 및 화장품 등의 이용 분야가 다양하며, 식품에 이용되는 carotenoid는 β-carotene, lycopene, bixin, crocetin, zeaxanthin, capsanthin, astaxanthin, fucoxanthin, lutein, violaxanthin 및 neoxanthin 등이 주로 이용된다.<sup>4)</sup> 가공식품에 이용되는 합성 착색제인 대부분의 아조염료들은 빛이나 ascorbic acid에 아주 약하고

pH 변화에 불안정한 반면, carotenoid는 안정하기 때문에 당-시럽이나 드링크류 및 음료수에 응용될 수 있는데, 이것은 비수용성인 carotenoid를 물분산 형태로 쉽게 바꿀 수 있기 때문이다.<sup>5)</sup> 또한 의약품의 착색에도 물분산 형태의 carotenoid로 착색시킨 것이 인체에 가장 안전하다고 보고되어 있으며,<sup>6)</sup> 젤라틴 캡슐, carotenoid 에멀전 주사액 등 각종 의약품 특허품이 생산되고 있다.

Carotenoprotein은 해양 동물인 게, 새우, 불가사리, 산호 등에 많이 존재하며, 연어와 같은 어류와 홍합, 굴, 대합조개와 같은 패류에도 함유되어 있기 때문에 이에 관한 많은 연구가 이루어지고 있다. Cheesman 등<sup>7)</sup>은 무척추동물에서 carotenoprotein을 정제한 결과, 약 50%가 청색 carotenoprotein이었다고 보고하였고, Zagalsky 등<sup>8)</sup> 및 Zagalsky와 Herring 등<sup>9)</sup>은 십각류(十脚類)껍질에서 청색 carotenoprotein이 많이 존재한다고 하였으며, Garate 등<sup>10)</sup>과 Milicua 등<sup>11)</sup>은 가재(*P. clarkii*)껍질에 각각 청색 및 적색 carotenoprotein이 존재한다고 보고하였다. 또한 불가사리(*A. rubena*)<sup>12)</sup>에서는 자색의 carotenoprotein, 가재의 등딱지(*A. leptodactylus*)<sup>13)</sup>에는 황색 carotenoprotein이 존재하는 것으로 알려져 있다.

해양동물의 carotenoid에 관한 일련의 비교생리학적 연구 결과, Matsuno와 Ookubo<sup>14)</sup>는 halocynthiaxanthin 및 mytiloxanthinone을 우렁쉥이(*Halocynthia roretzi*)로부터 분리·동정하였다. 또한, 일본산 우렁쉥이(*Amaroucium pliciferum*)로부터 2종류의 독특한 carotenoid인 amarouciaxanthin A 및 B가 동정되었다.<sup>15)</sup> 그러나 아직 우렁쉥이 육의 carotenoprotein에 관한 연구는 찾아 볼 수 없었다.

본 연구는 우리나라 근해안에서 대량으로 생산되는 우렁쉥이의 육에 존재하는 carotenoprotein을 세정제인 Triton

찾는말 : 카로테노프로테인, 우렁쉥이, 특성, 아미노산, 지방산  
\*연락처

X-100으로 추출하여  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 염색한 다음, DEAE-cellulose 이온교환수지 및 Sephadex G-200 겔 크로마토그래피를 이용하여 정제한 후, 전기이동, 열 안정성, pH 안정성, 변성제 영향 등으로 carotenoprotein의 특성을 구명하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 사용한 우렁쟁이(*Halocynthia roretzi*)는 1993년 8월에 부산 충무동 공동어시장에서 구입한 경남 한산도산으로 평균중량 205 g, 평균각장 11.5 cm, 평균각고 6.2 cm인 시료를 구입하여 실험실로 운반한 후, 육만을 채취하여 시료로 사용하였다.

### Carotenoprotein의 추출

육 200 g을 잘게 다진 후, 2%(v/v) Triton X-100을 함유하는 50 mM K-phosphate buffer (pH 7.0)를 4배량(w/v) 가하여 균질기로 2분간 균질화시켰다. 이 용액을 4°C 냉암소에서 12시간 교반하여 추출한 후, 원심분리(15,000×g, 20 min)하여 pellet의 색깔이 완전히 무색이 될 때까지 3회 반복 추출하여 전 추출액을 -20°C에 보관하여 두고 실험에 사용하였다.

### Carotenoprotein의 정제

육 중의 carotenoprotein을 정제하기 위하여 추출한 용액에 30%(w/v)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 염색시켜 냉암소(4°C)에서 12시간 방치한 다음, 원심분리(15,000×g, 20 min)하여 상층액을 50 mM K-phosphate 완충액(pH 7.5)으로 투석하였다. 이 투석액을 원심분리(15,000×g, 20 min)하여 얻어진 상층액을 미리 같은 완충액으로 평형화시킨 DEAE-cellulose 칼럼( $\phi 2.5 \times 60$  cm)에 통과시킨 후, 1M NaCl/50 mM K-phosphate (pH 7.5)완충액으로 농도구배법으로 분별용출(유속: 24 ml/hr, 분획량: 6 ml)하여 얻어진 분획을 질소압력농축기로 농축하고, 50 mM K-phosphate 완충액(pH 8.0)으로 투석한 다음, 원심분리(15,000×g, 20 min)하였다. 원심분리한 상층액을 미리 50 mM K-phosphate 완충액(pH 8.0)으로 평형화시킨 Sephadex G-200 칼럼( $\phi 2.5 \times 60$  cm)에 주입하고, 동일한 완충액으로 용출(유속: 24 ml/hr, 분획량: 6 ml)하였다. 여기서 얻어진 carotenoprotein분획을 모아 농축시킨 후, 위에서와 같은 방법으로 평형화시킨 Sephadex G-200 칼럼( $\phi 2.5 \times 60$  cm)에 다시 주입하고, 동일한 완충액으로 용출(유속: 24 ml/hr, 분획량: 4 ml)시켜 정제하였다(Fig. 1).

### 단백질의 정량

단백질 정량은 Lowry 등<sup>16)</sup>의 방법을 이용하였다. 즉, 단백질용액 0.1 ml에 0.1 N NaOH에 녹인 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 용액과 1% sodium potassium tartarate에 녹인 0.5%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  용액을 50:1(v/v)로 혼합한 용액 1 ml를 가하고 10분 후, 1 N Folin-ciocalteu 시약 0.1 ml를 가하여 30분간 발색시켜 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질의 양은 bovine

### Minced muscle

Extract with 4 Vol. of 2%(v/v) Triton X-100/50 mM K-phosphate buffer(pH 7.0) for overnight  
Centrifuge at 15,000×g for 20 min

### Supernatant

Salt-out with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  in 30% saturation  
Stand overnight at 4°C  
Centrifuge at 15,000×g for 20 min

### Supernatant (upper layer)

Dialyze against 50 mM K-phosphate buffer (pH 7.5) for overnight  
Centrifuge at 15,000×g for 20 min

### Supernatant

Apply on the DEAE-cellulose column ( $\phi 2.5 \times 60$  cm) which was previously equilibrated with the above buffer  
Elute with the 0~1 M NaCl in 50 mM K-phosphate buffer (pH 7.5)  
Pool, concentrate  
Apply on the Sephadex G-200 column ( $\phi 2.5 \times 60$  cm)  
Elute with the 50 mM K-phosphate buffer (pH 8.0)  
Pool, concentrate  
Apply again to a Sephadex G-200 column( $\phi 2.5 \times 60$  cm)  
Elute with the 50 mM K-phosphate buffer (pH 8.0)  
Pool, concentrate

### Purified carotenoprotein

Fig. 1. Scheme of purification procedure for the carotenoprotein from the muscle of *Halocynthia roretzi*.

serum albumin(M.W. 66 kDa)을 표준물질로 하여 작성된 검량선에 의하여 산출하였다.

## Carotenoprotein의 동정

### 전기이동 분석

순도검정을 위한 분석은 Davis<sup>17)</sup>의 disc-PAGE(5.0% polyacrylamide gel)법에 따라 최종 정제단계에서 전기이동용 시료를 조제하여 측정하였다. 즉, 전기이동 시료를 slab gel(6 × 8 cm)에 주입하고, 0.25 M Tris-0.192M glycine 완충액(pH 8.3)을 사용하여 각 well당 2 mA의 전류를 통전시켜 전기이동하였다.

최종 정제된 carotenoprotein의 subunit 양상 및 분자량은 Laemmli<sup>18)</sup>의 방법 따라 실행하였다. Subunit를 측정하기 위하여 sodium dodecyl sulfate(SDS)-PAGE(0.1% SDS를 함유하는 9.5% polyacrylamide gel)를 사용하여 2% SDS로 처리된 carotenoprotein 시료와 SDS-marker protein을 농도별로 slab gel(6 × 8 cm)에 주입하고 0.1% SDS를 함유한 0.25M Tris-0.129M glycine 완충액(pH 8.3)을 사용해서 각 well당 2 mA의 전류로 전기이동하였다. 전기이동 후 disc-와 SDS-gel의 단백질 band는 5% TCA로 고정화시킨 다음, 0.04% Coomassie blue G-250/3.5% perchloric acid를 사용하여 염색하였다. 염색이 끝난 겔은 5% acetic acid로 탈색시킨 후 0.005% Coomassie blue G-250/6% perchloric acid로 보존하였다.

표준단백질은  $\beta$ -galactosidase (M.W. 116 kDa), fructose-6-phosphate kinase (M.W. 96.4 kDa), pyruvate kinase (M.W. 80.4 kDa), ovalbumin (M.W. 55.7 kDa), lactic dehy-

drogenase (M.W. 43.7 kDa), triosephosphate isomerase (M.W. 38.8 kDa)를 사용하였다.

#### 겔여과에 의한 분석

Andrews 등<sup>19)</sup>의 방법에 따라 분자량을 측정하였다. 즉, Sephadex G-200 컬럼( $\phi 2.2 \times 98$  cm)에 정제된 carotenoprotein과 겔 여과용 분자량 표준단백질(thyroglobulin : M.W. 669 kDa, apoferritin : M.W. 443 kDa,  $\beta$ -amylase : M.W. 200 kDa, alcohol dehydrogenase : M.W. 150 kDa, bovine serum albumin : M.W. 66 kDa)을 20 mM KCl을 함유하는 50 mM Na-phosphate 완충액(pH 7.5)을 사용하여 교대로 용출(유속 : 6 ml/hr, 분획량 : 1 ml)시킨 후에 용출부피(Ve)와 blue dextran의 용출부피(Vo)의 비로써 분자량을 측정하였다.

### Carotenoprotein의 특성

#### pH 안정성

Carotenoprotein용액을 1 M 완충용액[*citric acid-sodium citrate* (pH 3.0), *Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>* (pH 7.0) 및 1 M *Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaOH* (pH 11.0)] 3 ml가 들어 있는 cap tube에 각각 0.2 ml씩 넣고, 20°C의 항온조에서 4시간 동안 incubation시킨 후, carotenoprotein의 최대파장의 변화를 자외선 분광광도계(Shimadzu U-3210, Tokyo, Japan)로 측정하였다.

#### 열 안정성

정제된 carotenoprotein용액을 65°C에서 시간별(10 min, 30 min, 1 hr, 2 hr, 4 hr, 7 hr, 11 hr)로 가온한 후, carotenoprotein의 최대파장에서 흡광도를 측정하여 열 안정성을 검토하였다.

#### 변성제 효과

Cap tube에 carotenoprotein용액 3 ml를 넣고 변성제로서 SDS를 0.3%(w/v)되게 가하여 녹인 다음, 20°C의 항온조에서 4시간 동안 incubation시킨 후, carotenoprotein의 최대파장의 변화를 자외선 분광광도계로 측정하였다.

#### 아미노산 조성 분석

정제 carotenoprotein과 6 N HCl을 동량 혼합하여 cap tube에 넣고 감압상태로 밀봉한 다음, 110°C에서 24시간 가수분해하였다. 이 가수분해액을 glass filter로 여과하고 감압건조하여 HCl를 제거한 후, sodium citrate buffer(pH 2.2)로 정용하여 아미노산 자동분석기(Hitachi사 일본)로 분석하였다.

#### 지방산 분석

Bligh와 Dyer<sup>20)</sup>의 방법에 따라 정제된 carotenoprotein으로부터 총지질을 추출하였다. 즉, carotenoprotein용액 5 ml에 MeOH:chloroform(1:2, v/v)용액 30 ml를 넣어 약 4시간 추출한 다음, 균질기(Ace homogenizer AM-7, Tokyo,

**Table 1. Operation conditions of gas chromatography for analysing the fatty acid composition of lipid in carotenoproteins of muscle from *Halocynthia roretzi***

Item	Conditions
Instrument	Shimadzu GC-14A, Japan
Column	Capillary column(Supelcowax-10 fused silica WCOT column, 30 m $\times$ 0.25 mm i.d., Supelco Japan Ltd., Japan)
Column temp.	Held at 190°C for 3 min., then temperature programmed at 4°C/min to 205°C, and held at this point for further 30 min
Carrier gas	He (25 ml/min, split ratio 1:100)
Injection temp.	230°C
Detector temp.	250°C
Detector	FID(flame ionization detector)

Japan)로 5000~7000 rpm에서 2분간 균질화하여 chloroform 20 ml와 0.88% KCl(Saline)용액을 20 ml를 넣고, 다시 1분간 교반한 후, 여과하여 분액갈때기에서 하룻밤 방치하였다. 분리된 하층을 취하여 탈수시킨 다음, 회전진공농축기(EYELA N-1N, Tokyo, Japan)로 용매를 제거하여 총지질을 추출하였다.

지방산 조성을 알아보기 위하여 총지질 100 mg을 정평하여 1 N KOH-95% ethanol용액으로 비누화(85°C, 1시간)한 다음, 10% BF<sub>3</sub>-MeOH 3 ml를 가하여 95°C에서 15분간 환류가열하여 지방산 methyl ester를 조제한 후, gas chromatography (Shimadzu GC-14A, Tokyo, Japan)로 분석하였다. 지방산 분석 조건은 Table 1과 같다. 그리고 각 지방산의 동정은 표준 지방산 methyl ester의 retention time과의 비교 및 지방산의 이중 결합수와 retention time과의 상관그래프를 이용하였다.

### 결과 및 고찰

#### Carotenoprotein의 분리·정제

우렁쉥이 육 중의 carotenoprotein정제는 30% 포화 황산암모늄 염석, DEAE-cellulose 이온교환 크로마토그래피 및 Sephadex G-200 겔여과 순으로 carotenoprotein을 정제하였다. 즉, 추출액에 대해 30% 포화 황산암모늄 염석 희분을 모았고, 그 투석액을 50 mM K-phosphate 완충액(pH 7.5)으로 평형화된 DEAE-cellulose 칼럼에 주입하고 동일 완충액을 사용하여 선형상 농도구배법으로 용리(유속 : 24 ml/hr 분획량 : 6 ml)시킨 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 비흡착 부분에서 carotenoprotein이 완전히 용출되었으며, 흡착부에서는 비carotenoprotein 만이 분포되어 나타났다. 따라서 비흡착부분의 희분(fraction No. 30~45)을 모두 모아 질소압력농축기로 농축하고 투석하였다. 이 투석액을 50 mM K-phosphate 완충액(pH 8.0)으로 평형화된 Sephadex G-200 칼럼에 주입하고 분별용출(유속 : 24 ml/hr; 분획량 : 6 ml)시킨 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 이 단계에서 불순단백질 부분을 제거하고 carotenoprotein 부분을 분획(fraction No. 31~40)하고 농축하여 50 mM K-phosphate 완충액(pH 8.0

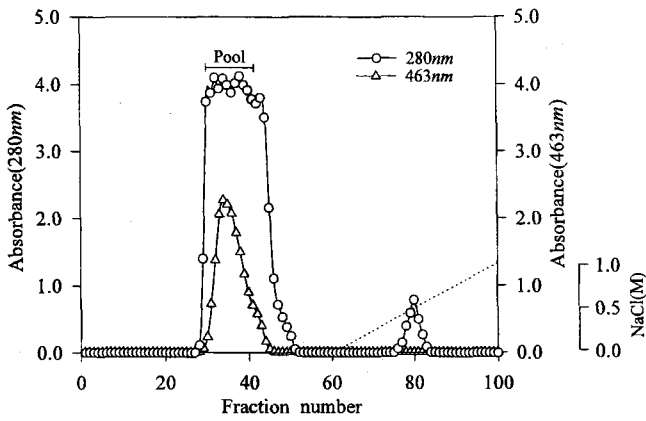


Fig. 2. Elution profile of the carotenoprotein from the muscle of *Haocynthia roretzi* on DEAE-cellulose column by gradient with 1 M NaCl in 50 mM K-phosphate buffer. Elution conditions : buffer, 50 mM K-phosphate buffer (pH 0.8) flow rate and fraction volume, 24 ml/hr and 6 ml.

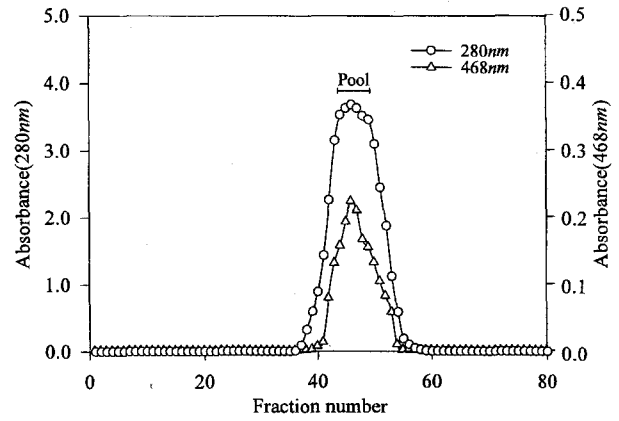


Fig. 4. Sephadex G-200 column chromatogram of the carotenoprotein from the muscle of *Halocynthia roretzi* obtained from the first Sephadex G-200 column chromatography. Elution conditions : buffer, 50 mM K-phosphate buffer (pH 0.8) flow rate and fraction volume, 24 ml/hr and 4 ml.

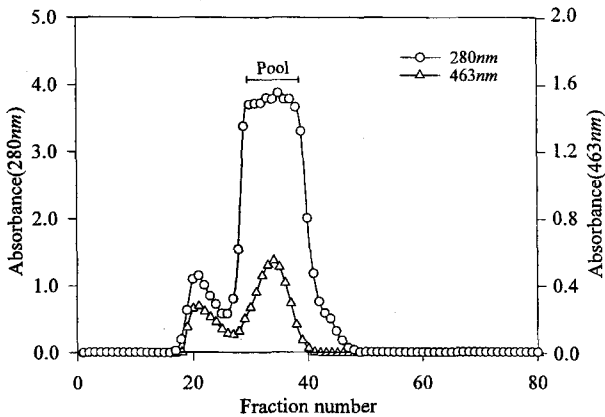


Fig. 3. Sephadex G-200 column of the carotenoprotein from the muscle of *Halocynthia roretzi* obtained from DEAE-cellulose column chromatography. Elution conditions : buffer, 50 mM K-phosphate buffer (pH 0.8), flow rate and fraction volume, 24 ml/hr and 6 ml.

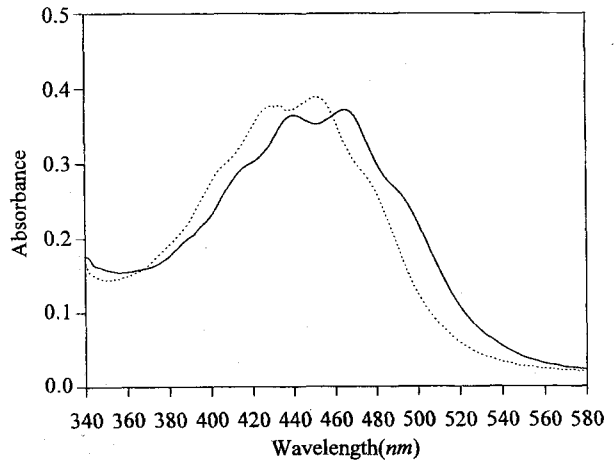


Fig. 5. Comparative visible absorption spectrum of the purified carotenoprotein from the muscle of *Halocynthia roretzi* (—) and its free carotenoid component in ethereal solution (·····) after extraction.

으로 활성화된 Sephadex G-200 칼럼에서 분별용출하였다 (유속 : 24 ml, 분획량 : 4 ml)(Fig. 4). 정제된 carotenoprotein은 disc-PAGE와 SDS-PAGE에서 순도가 검증되었으며, 질소압력 농축기로 농축 투석하였다.

Carotenoprotein의  $\lambda_{max}$ 은 Fig. 5에 나타낸 바와 같이 463 nm와 439 nm에서 최대흡수 파장을 가지며, acetone/diethyl ether(1:1, v/v)로 처리하여 단백질로부터 유리시킨 carotenoid의 최대 흡수파장은 452 nm 및 430 nm에서 뚜렷한 변곡이 나타났다. 이와 같이 acetone과 같은 유기용매로 처리하면 파장변화가 나타나는데 이것은 carotenoid 분자의  $\beta$ -ionone 고리속에 4-와 4'-위치의 keto group과 apoprotein의 amino group간에는 schiff 염기나 sulfhydryl group을 포함한 견고한 결합이 아니고 비공유결합으로 결합되어 있기 때문에 acetone과 같은 유기용매로 처리할 때 단백질로부터 carotenoid가 쉽게 이탈된다. 따라서 apoprotein과 carotenoid의 keto group들 사이에 특이적인 배열변화를 일으키기 때문에 분광학적인 파장변동에 영향을 주는 것으로 짐작된다.<sup>21)</sup>

우렁챙이 육 중의 carotenoprotein 100 mg당 단백질, 지질 및 carotenoid는 각각 45.9 mg, 53.6 mg 및 0.015 mg이 함유되어 있으며 (Table 2), 정제도는 조추출액에 비하여 5배 정제되었고 단백질의 수율은 2.9%였다 (Table 3).

Milicua 등<sup>8)</sup>은 가재(*P. clarkii*)껍질로부터 Triton X-100을 사용하여 얻은 적색 carotenoprotein은 최대 흡수파장이  $\lambda_{max}$  482 nm이고, 보호그룹으로서 astaxanthin과 astaxanthin ester가 함유되어 있으며, carotenoprotein 1 mg당 0.833 mg의 지질과 0.178  $\mu$ g의 astaxanthin 및 astaxanthin ester가 함

Table 2. Composition of the purified carotenoprotein complexes from *Halocynthia roretzi* [mg/carotenoprotein (100 mg)]

Component	Muscle carotenoprotein
Protein	45.9
Lipids	53.6
Carotenoids	0.015

Table 3. Purification of the carotenoprotein from the muscle of *Halocynthia roretzi*

Procedure	Volume (ml)	*Total protein (mg)	*Carotenoprotein (mg)	Purification (C/T)*	Yield (%)
1. Crude extract	1,000	6462	607	1.0	100.0
2. 20% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	485	1764	364	2.2	59.9
3. DEAE-cellulose	99	542	184	3.6	30.3
4. Sephadex G-200 gel filtration	38	99	41	4.4	6.7
5. Sephadex G-200 gel filtration	25	38	18	5.0	2.9

\*Total protein measured by Lowry assay

\*The amount of carotenoprotein is calculated by the equation: Absorbance at 463nm × Volume of solution ml.

\*C/T : carotenoprotein/total protein

유되었다고 보고하였는데, 이 결과는 본 연구 결과와 현저한 차이가 있었다. 가재(*A. leptodactylus*) 껍질에서 분리한 carotenoprotein의 특성연구에서 Milicua 등<sup>10)</sup>은 이온교환수지와 Sephadex S-300 SF 칼럼을 이용하여 정제한 carotenoprotein은 최대 흡수파장  $\lambda_{max}$  385 nm에서 최대흡수가 나타났으며, 보호그룹으로서 astaxanthin과 zeaxanthin이 1:1의 비로 함유되어 있고, 단백질 1분자당 12 carotenoid가 복합체를 이루어져 있다고 보고한 바 있다.

또한, Shone 등<sup>9)</sup>은 불가사리(*A. rubens*)에서 분리한 적자색 carotenoprotein의 최대파장  $\lambda_{max}$  570 nm에서 최대 흡광도를 가지며, 단백질과 회합한 carotenoid 성분으로는 astaxanthin과 acetylenic carotenoid인 7,8-dihydroastaxanthin 및 7,8,7',8'-tetrahydroastaxanthin 등 세 종류를 확인하였고, carotenoprotein을 acetone으로 처리하면 carotenoid가 유리되어 최대 흡수파장은 478 nm로 이동되었으며, 0.5-1.0%의 당류와 소량의 지질을 포함하는 glycoprotein이라고 하였다.

Cheesman 등<sup>20)</sup>은 hermit crab의 알과 난소에서 최대 흡수파장이 280 nm, 465 nm, 495 nm인 carotenoprotein을 분리하였는데, 단백질의 보호그룹으로 작용하는 물질이 astaxanthin이라고 하였고, Kim 등<sup>23)</sup>은 연어알에서 정제한 carotenoprotein은 최대파장  $\lambda_{max}$  589, 540 및 580 nm에서 가시부 흡수극대를 가지며, 단백질과 회합하여 상호 보호그룹으로 작용하는 carotenoid 성분은 astaxanthin ester이었다고 보고하였으나, 미생물인 cyanobacteria에서는 최대파장이 495 nm와 465 nm를 나타내는 적색 carotenoprotein이 발견되었다.<sup>24)</sup>

Lee<sup>25)</sup>는 *Idothea montereyensis*로부터 분리된 carotenoprotein이 0.05 M 인산염 완충액에서 흡수극대는 683 nm에서 나타났으며, 변곡은 630 nm에서 그리고 500 nm와 280 nm사이에서는 거의 1차 함수에 가까운 두꺼운 흡수의 스펙트럼이 나타났는데 이러한 형태의 두꺼운 스펙트럼은 정제할 때 초기단계에서 흔히 관찰되는 흡수곡선이라고 하였다. Cheesman 등<sup>7)</sup>은 carotenoid 분자의  $\beta$ -ionone 고리속에 4-와 4'-위치에 keto group이 존재하면 apoprotein에 대하여 친화성을 갖게 되는데 이것은 apoprotein이 keto group과 이합체화 되어 특이적인 배열의 변화를 일으키기 때문이라고 하였으며, Bernhard 등<sup>26)</sup>은  $\beta$ -ionone 고리속에 4와 4'-keto group을 가진 acetylenic carotenoid도 apoprotein unit와 쉽게 회합할 수 있으며, astaxanthin과 그의 dehydro 형태인 a-

cetylenic carotenoid(7, 8 또는 7', 8'-위치) 유도체들은 청색, 자색인 carotenoprotein의 복합체를 이루며 서로 공존한다고 보고하였다.

이와 같이 carotenoid-protein 복합체는 대부분 생체자극물질의 접촉이 많은 부위 즉, 갑각류의 외피, 극피류의 외피, 알(卵), 위벽, 미생물 등에 분포하고, 생체의 조직과 종류에 따라서 astaxanthin(아세틸렌 구조 또는 방향족 유도체 포함) 등 keto group을 가진 carotenoid와 apoprotein, 지질, 당 등이 회합되어 복합체를 이룰 때 흡수 스펙트럼이 강하게 장파장으로 이동되는 것이 있는가 하면, 단파장으로 이동되는 것도 있고, 약하고 좁게 장파장으로 이동되는 것, 미세구조 또는 다중결합 형태를 갖는 것 등 여러 가지가 있다.<sup>27)</sup>

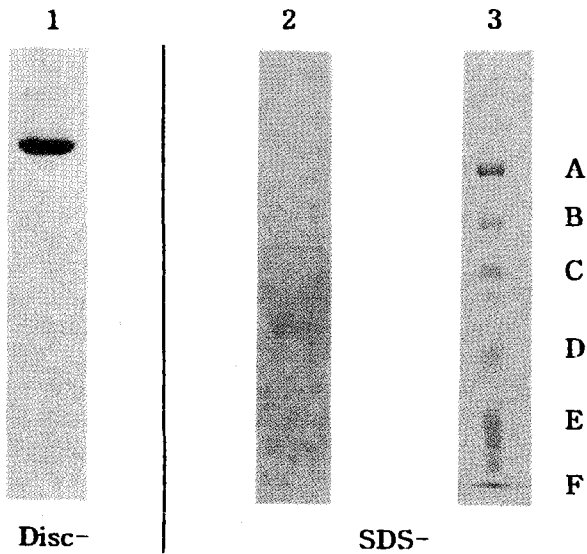
#### Carotenoprotein의 동정 및 분자량

각 정제단계별 정제도와 구성 subunit의 확인은 SDS-PAGE법으로, 순도검정은 disc-PAGE법으로, 분자량 측정은 Sephadex G-200 겔 여과법으로 실행하였다. 이 결과는 apoprotein(158.5 kDa, 42.5%) unit에 과량의 지질(52.3%)과 보호그룹인 carotenoid(0.031%)가 회합하여 carotenoprotein 복합체를 구성하고 있다는 것을 확인하였다.

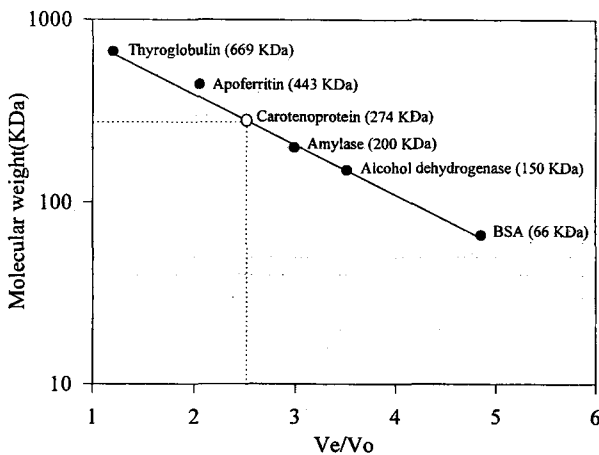
한편 정제된 육 중의 carotenoprotein을 disc-PAGE 한 결과 Fig. 6에 나타낸 바와 같이 균질한 상태임을 확인할 수 있었고, 이 단백질 band를 9.5% SDS-PAGE법으로 subunit 분자량을 측정된 결과, subunit 분자량이 64.4 kDa로 단일 polypeptide로 이루어져 있었다. 겔 여과를 통해 정제된 carotenoprotein의 분자량을 측정된 결과, 분자량은 274 kDa이었다(Fig. 7). 이와 같은 결과는 지질(53.6%)과 carotenoid(0.015%)에 64.4 kDa의 동일한 subunit 2개가 연결된 dimer(47%) apoprotein이 회합되어 있다는 것을 확인하였다.

Garate 등<sup>28)</sup>은 게 (*C. maenas*)로부터 Sephacryl S-300 SF 칼럼을 이용하여 octameric form의 carotenoprotein을 분리하였다. 이 octameric form의 분자량은 365 kDa인데 이것을 다시 SDS로 처리하면 38.2 kDa의 single polypeptide로 분리되었다고 하였다. 또한 가재 (*A. leptodactylus*) 껍질의 노란색 carotenoprotein은 409 nm에서 최대 흡수파장을 나타냈으며, SDS-PAGE 하였을 때 분자량이 49, 55, 66, 및 73 kDa의 4개의 polypeptide 외에 분자량이 작은 22, 19 및 4.4 kDa의 불균일한 apoprotein으로 분리된다고 하였다.<sup>19)</sup>

Salares 등<sup>29)</sup>은 바다가재 (*H. gammarus*)의 알에서 분리한



**Fig. 6.** 5% Disc- and 9.5% SDS-PAGE of purified carotenoprotein from the muscle of *Halocynthia roretzi*. Lane 1: Carotenoprotein, Lane 2: Subunits of the carotenoprotein, Lane 3: Marker protein [A;  $\beta$ -Galactosidase (116 kDa), B; Fructose-6-phosphatase kinase (96.4 kDa), C; Pyruvate kinase (80.4 kDa), D; Ovalbumin (55.7 kDa), E; Lactic dehydrogenase (43.7 kDa), F; Triosephosphate isomerase (38.8 kDa)]



**Fig. 7.** Estimation of molecular weight of the purified carotenoprotein from the muscle of *Halocynthia roretzi* by gel filtration with Sephadex G-200.

carotenoprotein인 ovoverdin을 5% SDS-PAGE하여 분자량을 측정된 결과, apoprotein은 각각 105, 95 및 78 kDa인 3종류의 polypeptide로 구성되어있고, disulfide 결합은 존재하지 않았다고 보고하였으며, 또한 ovoverdin의 Raman spectra의 가시부 흡광피크가 460 nm와 640 nm에서 관찰되는 것은 두 분자의 astaxanthin이 단백질의 서로 다른 위치에 회합하고 있기 때문이라고 하였다. Clarke 등<sup>30)</sup>에 따르면 바다가재로부터 얻은 carotenoprotein은 oligomeric protein인데, 이것은 두 가지 형태(Type I 및 II)의 apoprotein으로 구성되어 있으며, 오직 한, 지점에 높은 친화성 결합부위를 갖는다고 하였고, Type I의 apoprotein은 분자량이 22 kDa 정

도인 C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, A<sub>1</sub> 그리고 Type II의 분자량은 19 kDa 정도의 A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>로 구성되어 있으며, 이들의 아미노산 조성은 큰 차이가 없었다고 하였다. 이와 같이 C<sub>1</sub>과 C<sub>2</sub>, A<sub>1</sub> 그리고 A<sub>2</sub> 및 A<sub>3</sub> 단백질들이 적절한 조합을 이룸으로써 거대한 분자를 형성한다고 하였다.

Ceccaldi 등<sup>31)</sup>은 참새우 (*Aristaeus antennatus*)의 위벽으로부터 칼슘 인산염을 이용하여 청색의  $\alpha$ -form과 적자색의  $\beta$ -form을 가진 carotenoprotein을 분리 정제한 결과,  $\alpha$ -form은 632 nm에서 최대 흡수과장을 가지며, astaxanthin을 기준한 최소 분자량이 31 kDa이었으며,  $\beta$ -form은 적자색을 띠고 585 nm에서 흡수극대를 가지고 있으며, subunit의 분자량이 36 kDa이라고 하였다. 이들의 분자량은 각각 lobster에서 분리한  $\alpha$ -crustacyanin과  $\beta$ -crustacyanin의 것과 비슷한 것으로서  $\alpha$ -form과  $\beta$ -form의 단백질들이 polymeric 구조를 형성하여 650 kDa의 거대한 carotenoprotein 분자를 이루고 있다고 보고하였다.

Zagalsky<sup>21)</sup>에 의하면 여러 종류의 해양 무척추 동물에서 분리된 carotenoprotein들은 형태적으로  $\alpha$ -form과 그 구성 단위인  $\beta$ -form이 존재하며,  $\alpha$ -form은 분자량이 50~1000 kDa이고, 낮은 이온 강도의 용액에서 해리되어 자색의 유도체를 생성하고,  $\beta$ -form은 주로 40~50 kDa의 분자량을 갖는다고 하였으며, 이들을 acetone으로 처리하여 지질과 carotenoid를 유리시켜 분리된 apoprotein을 전기이동하면 불균일하고, 그들의 분자량은 8~26 kDa이 된다고 하였다. 또한 Elgsaeter 등<sup>32)</sup>은 불가사리 (*Asterias rubens*)로부터 이온교환수지 및 겔 여과법으로 carotenoprotein을 분리 정제하였는데 단백질과 회합한 carotenoid 성분으로는 astaxanthin과 그 acetylenic carotenoid인 7,8-dihydroastaxanthin 및 7,8,7',8'-tetrahydroastaxanthin 등 3종류를 확인하였으며, 이 carotenoprotein은 acetylenic bond에 관계없이 모두  $\lambda_{max}$  554 nm에서 최대 흡광도를 가지며 5~17%의 당류와 지질을 포함하는 glycoprotein이므로 분자량은 80~100 kDa이고 동일한 subunit를 갖는다고 보고하였는데 이 결과는 본 실험에서 우렁쟁이 육의 carotenoprotein의 단일 subunit로 구성되어 있다는 점에서 일치하였다.

이와 같이 생체의 조직과 종류에 따라서 astaxanthin (acetylenic 구조 또는 방향족 유도체 포함) 등 keto group을 가진 carotenoid는 여러 종류의 불균일한 단백질들과 소수성 결합 또는 수소결합을 하게 되면 분자량이 수만에서 백만달톤으로 다양한 크기의 carotenoprotein을 이루어 생체내의 보호그룹으로 작용한다고 볼 수 있다. 즉 carotenoprotein에서 carotenoid가 lipid-protein의 구조를 안정화시키게 되어 지질의 생체내 산화를 방지하게 되고, 또한 단백질의 3차 및 4차 구조를 안정화 시킴으로써 변성을 억제하여 생리적인 활성을 유지하게 되는 것으로 판단된다.

## Carotenoprotein의 특성

### pH 안정성

우렁쟁이 육 중의 carotenoprotein의 pH 안정성을 측정하

결과는 Fig. 8에 나타낸 바와 같이 중성 영역인 pH 7.0에서 최대 흡수파장의 변화가 나타나지 않았으나, 산성 영역인 pH 3.0에서는 최대 흡수파장의 변곡점이 465 nm에서 437 nm로 변화되는 것을 관찰할 수 있었으며, 알칼리 영역인 pH 11.0에서는 최대 흡수파장이 438 nm로 약 27 nm 정도 단파장으로 이동하였다. 이와 같은 현상은 carotenoid의  $\beta$ -ionone 고리속에 keto group과 회합된 apoprotein의 amino group간에는 Schiff 염기나 sulfhydryl group을 포함한 견고한 결합이 아니고 비공유결합으로 되어 있기 때문에 극단적인 pH 변화에 의해서 apoprotein과 carotenoid 사이에 배열변화가 일어나며, carotenoid가 단백질로부터 쉽게 이탈되므로 이와 같은 분광학적 특성이 나타나게 된다.<sup>33)</sup>

가재 (*P. clarkii*)에서 분리한 청색 carotenoprotein의 화학적 성질 및 변성에 관한 연구에서 Garate 등<sup>34)</sup>은 pH 4.0~10.0 범위에서 carotenoprotein의 안정성을 실험한 결과, pH 5.5~8.0 사이에서는 흡광도 변화가 없었으나, pH 5 이하 및 pH 8.5 이상에서 carotenoprotein의 최대 흡수파장이 635 nm에서 484 nm로 이동하였는데 이것은 pH 변화에 따른 단백질과 carotenoid 사이의 상호작용이 변화하기 때문이라고 하였다. 또한 Gomez 등<sup>34)</sup>은 가재 (*A. leptodactylus*) 껍질에서 분리한 청색 astaxanthin-protein의 특성에 관한 보고에서 pH 3.0~11.0 범위에서 carotenoprotein의 안정성을 실험한 결과 pH 5.0~8.6 사이에서는 흡광도 변화가 없었으나 pH 4.5 및 pH 9.0에서 carotenoprotein의 최대 흡수파장이 634 nm에서 622 nm로 이동하였고, pH 3.0 이하 및 pH 9.0에서 carotenoprotein이 변성된다고 하였다.

Yang 등<sup>35)</sup>은 진주담치 (*M. edulis*)에서 분리한 적색 carotenoprotein은 pH 7.0~10.0 범위에서는 흡광도 수치가 감소 또는 증가하였으나 carotenoprotein의 등전점 영역인 pH 4.5~6.0 부위에서는 흡광도 수치가 높아졌는데, 이것은 pH 4.0 이하의 강산이나 pH 10.0 이상의 강알칼리에서는 단백질의 변성에 의해 carotenoid와의 상호작용이 변화함으로써 흡광도 수치가 변하고, pH 4.5~6.0 부근에서는 단백질과 회합된 carotenoid가 유리되어 응집함으로써 수치가 증가된다고 하

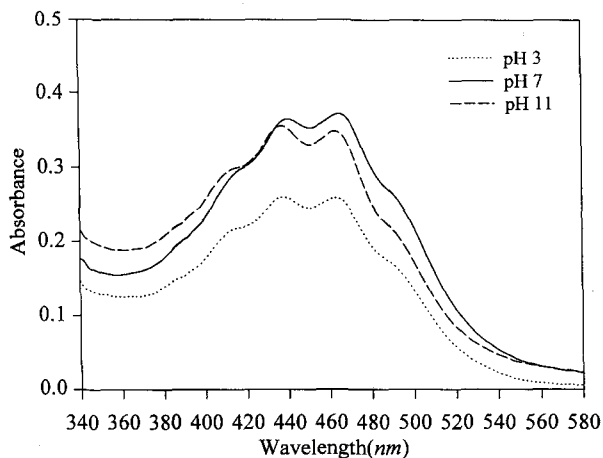


Fig. 8. Comparative visible absorption spectrum of the purified carotenoprotein from the muscle of *Halocynthia roretzi* at pH 3, 7, and 11.

였다. Eliot<sup>36)</sup>은 불가사리 (*M. glacialis*)에서 추출한 자주색 carotenoprotein은 pH 3.8 이하에서 불안정하였으며, pH 10.5 이상에서는 수초내에 분홍색으로 변화되었고, 여기에 산을 가하면 색깔은 부분적으로 가역적 현상을 나타내었지만 pH가 아주 높은 경우, 오렌지 색으로 비가역적인 변화가 일어났다고 보고한 바 있다.

### 열 안정성

우렁챙이 육 중에서 정제한 carotenoprotein에 대한 열안정성을 검토한 결과, Fig. 9에 나타낸 바와 같이 10시간 이후에 40% 이하로 감소하였다.

Gomez 등<sup>34)</sup>은 가재 (*A. leptodactylus*) 껍질에서 분리한 청색 astaxanthin-protein 특성에 관한 연구에서 청색 carotenoprotein은 30°C 이하에서는 최대 흡수극대치( $\lambda_{max}$ =634 nm)의 변화가 없었고, 30~40°C에서는 최대 파장이 620 nm로 단파장 영역으로 이동하였으며, 45°C 이상의 온도에서는 carotenoprotein의 색깔이 청색에서 적자색으로 변색되었다고 하였다. 또한 60~70°C 사이에서는 최대 흡수파장이 460 nm로 이동하였는데 이것을 다시 20°C에서 72시간 후에 관찰한 결과, 최대 흡광도의 65% 정도로 재생되므로써 부분적으로 가역적 현상이 관찰되었으나, 80°C 이상에서는 비가역적 변성이 일어났다고 보고하였다.

Garate 등<sup>34)</sup>에 따르면 가재 (*P. clarkii*) 껍질에서 분리한 청색 carotenoprotein은 30°C 이상의 온도에서는 불안정하였고, 56°C 이상에서는 비가역적인 현상이 일어난다고 하였다. Santoro 등<sup>37)</sup>은 해면동물 (*A. verrucosa*)로부터 추출한 오렌지색 carotenoprotein을 65°C에서 시간에 따른 열 안정성을 검토한 결과, 5시간 이후에 최대 흡수극대치의 흡광도가 50% 이하로 감소함으로써 열에 대한 안정성이 낮다고 보고한 바 있다. 따라서 carotenoprotein에 대한 열 안정성은 생체조직과 분포에 따라서 다소 차이는 나지만 비교적 열에 대해 불안정하였다.

### 변성제의 영향

우렁챙이 carotenoprotein의 변성제에 대한 영향을 알아보

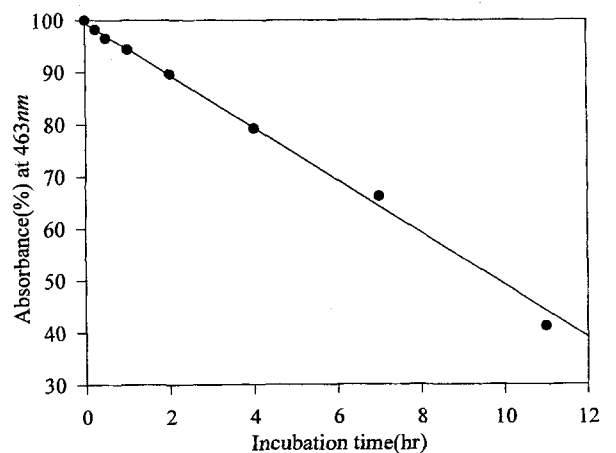


Fig. 9. Effect of incubation time on the purified carotenoprotein from the muscle of *Halocynthia roretzi* at 65°C.

기 위해 육에서 분리한 carotenoprotein에 SDS를 0.3%(w/v) 되게 가하여 가시부 영역(340~580 nm)에서 carotenoprotein의 연속파장을 측정 한 결과는 Fig. 10에 나타내었다. 육에서 분리한 carotenoprotein의 최대 흡수파장( $\lambda_{max}$  463 nm)에서 약 5 nm 이동한 458 nm에서 최대 흡수파장이 나타났는데, 이 결과는 Milicua 등<sup>35)</sup>이 가재 (*P. clarkii*)껍질에서 분리한 적색 carotenoprotein에 SDS를 0.3%(w/v)되게 가하여 carotenoprotein의 최대 흡수파장( $\lambda_{max}$  482 nm)에서 단파장영역으로 약 8 nm 이동된 최대 흡수파장이 나타났었다는 보고와 Yang 등<sup>35)</sup>이 진주담치 (*M. edulis*)에서 분리한 적색 carotenoprotein에 관한 연구에서 carotenoprotein에 SDS를 0.2%(w/v)되게 가하여 carotenoprotein의 최대 흡수파장( $\lambda_{max}$  468 nm)에서 약 6 nm 이동한 462 nm에서 최대 흡수파장이 나타내었다는 보고와 유사한 경향을 보였다.

한편 Gomez 등<sup>34)</sup>은 가재 (*A. leptodactylus*)껍질에서 분리한 청색 carotenoprotein에 SDS를 0.05%(w/v)되게 가하였더니 최대 흡수파장이 634 nm에서 490 nm로 단파장으로 이동하였는데 이것은 carotenoid가 단백질과의 상호작용에서 유리되어 일어난다고 하였다. 또한 Garate 등<sup>33)</sup>은 가재 (*P. clarkii*)껍질로부터 추출한 청색 carotenoprotein을 50 mM phosphate buffer(pH 7.5)에 녹여 SDS를 최종 농도 5%(w/v)까지 첨가한 결과, carotenoprotein의 최대 흡수파장이 635 nm에서 carotenoid의 흡수극대치인 475 nm로 160 nm 정도 단파장 영역으로 이동하였고, 게 (*C. maenas*)껍질에서 분리한 청색 carotenoprotein에 관한 연구<sup>28)</sup>에서는 carotenoprotein에 SDS를 0.2%(w/v)되게 가하였더니 carotenoprotein의 최대 흡수파장( $\lambda_{max}$  625 nm)이 단파장 영역으로 125 nm 이동하였다고 보고하였다.

이와 같은 결과는 청색 carotenoprotein의 경우는 변성제인 SDS에 의해 단백질이 변성되어 회합된 carotenoid가 유리됨으로서 최대 흡수파장이 단파장 영역으로 크게 이동하는 반면, 본 실험에서와 같이 적색 carotenoprotein의 경우는 단백질과의 상호작용보다는 변성제의 영향을 적게 받는 지

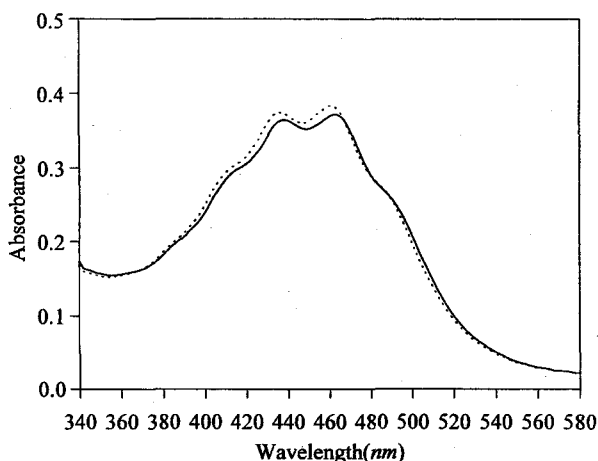


Fig. 10. Visible absorption spectrum of the purified carotenoprotein from the muscle of *Halocynthia roretzi* in buffer (—) and after denaturing by addition of SDS to a final concentration of 0.3% (w/v) (·····).

질과의 상호작용이 더 크게 작용함으로써 최대 흡수파장이 단파장 영역으로 약간 이동하는 분광학적 특성을 나타내고 볼 수 있었다.

#### 아미노산 조성

우렁챙이 육에서 분리한 carotenoprotein의 아미노산 조성은 Table 4에서와 같이 Gly, Asn, Gln 및 Ser의 함량이 전체 아미노산의 35.3%로 전체적으로 산성의 성질을 띠는 것으로 판단되었으며, 이것은 해면동물 (*A. verrucosa*)<sup>37)</sup>과 대하 (*P. orientalis*)<sup>38)</sup> 그리고 산호 (*A. sulcata*)<sup>39)</sup> 등에서의 carotenoprotein과 유사한 경향이였다. 이 carotenoprotein의 아미노산 조성 중 수소결합에 관여하는 아미노산은 23.7%, 소수성 아미노산의 함량이 31.3%로 carotenoprotein은 소수성 결합으로 복합체를 이루고 있는 것으로 판단된다. Polypeptide의 골격과 carotenoid의 polyene 사슬 사이에 짝마춤

Table 4. Amino acid composition of the carotenoprotein from *Halocynthia roretzi* (mol %)

Amino acid	<i>Halocynthia roretzi</i>	<i>O. limosus</i>	<i>A. leptodactylus</i>
	Muscle carotenoprotein	Yellowish-red carotenoprotein* <sup>1)</sup>	Blue carotenoprotein* <sup>2)</sup>
Asn	11.31	8.4	9.0
Gln	10.62	11.2	7.8
Lys	5.25	7.6	7.7
Arg	2.41	-	4.8
Thr	5.22	4.7	6.2
Val	6.43	11.2	9.1
Ile	5.12	4.1	5.2
Leu	6.03	5.5	6.3
Phe	2.79	-	8.0
Ala	7.61	19.3	9.3
Ser	13.35	12.4	5.7
Cys	1.18	-	-
Gly	15.39	14.1	7.3
Tyr	1.51	-	7.0
Met	3.30	trace	0.6
His	2.48	1.4	2.5
Pro	ND	-	3.3
Try	ND	-	-
P	50.64	45.7	43.7
S	23.00	33.4	16.6
HX.P.	24.26	36.00	23.4
HX.B.	15.39	14.14	10.6
H.B.	23.7	17.1	23.7
β.S.	14.9	15.3	14.9
HP.G	31.28	40.0	41.8

ND : none detected.

P=polarity index : Asn, Thr, Ser, Gln, Lys, His, Arg

S=small amino acids : Ala, Gly

HX.P.=helix promoting group : Gln, Ala, Leu

HX.B.=helix breaking group : Pro, Gly

H.B.=hydrogen bonding group : Ser, Thr, Cys, Tyr, Arg

β.G.=β-sheet promoting group : Met, Val, Ile

HP.G.=hydrophobic group : Val, Ala, Leu, Ile, Phe, Pro, Trp, Met

\*<sup>1)</sup> From the American crayfish, *O. limosus* (Czeczuga and Krywuta, 1981)

\*<sup>2)</sup> From the carapace of the crayfish, *A. leptodactylus* (Rivas et al., 1988)



을 용이하게 하는 작은 아미노산은 23%로 높은  $\beta$ -conformation을 이루고 있다는 것을 알 수 있다.

Chou 등<sup>40)</sup>에 의하면 carotenoprotein의  $\beta$ -구조에서는 Gly, Ile, Val 및 Thr의 함량이 높고 역평형성  $\beta$ -pleated sheet의 형성은 Asn, Ser, Thr 및 Pro의 함량이 높기 때문이라고 하였다. Carotenoid의 C-6과 C-7의 단일결합에서 polyene의 평면외로 꼬인  $\beta$ -ionone 고리는 C-1 위치에 있는 methyl group을 통하여 apoprotein과 소수성으로 결합되어 있고, 그것은  $\beta$ -pleated sheet에 유연성을 주는 잔기인 Ile과 상호작용을 하고 있다고 하였다.

Czczuga와 Krywuta<sup>41)</sup>는 미국산 가재 (*O. limosus*)에서 분리한 황적색 carotenoprotein의 아미노산 조성에서  $\alpha$ -나선 구조 안정화 아미노산(36.1%)이  $\beta$ -구조 안정화 아미노산(34.0%)보다 함량이 높다고 하였고, Santoro 등<sup>37)</sup>은 해면동물 (*A. verrucosa*)로부터 분리한 오렌지색 carotenoprotein의 아미노산 조성 중  $\beta$ -구조 안정화 아미노산 함량(36.6%)이  $\alpha$ -나선구조 안정화 아미노산 함량(24.2%)에 비해 훨씬 높았다고 보고한 바 있다. 이와 같이 생체조직이나 분포에 따라서 carotenoprotein의 아미노산 조성의 차이를 볼 수 있는데 이것으로 인하여 carotenoprotein의 구조적 특성이 나타나는 것으로 생각된다.

Rivas 등<sup>42)</sup>은 가재 (*A. leptodactylus*)껍질로부터 분리한 청색 carotenoprotein에서 소수성 아미노산의 함량이 다른 아미노산에 비해 높았으며, 이들 아미노산은 단백질의 안정성에 관여한다고 보고하였다.

본 실험에서 육에서 분리한 아미노산 조성 중 carotenoprotein의 소수성 아미노산의 함량은 31.28%였다. 이 결과는 carotenoprotein의 pH 안정성과 열안정성 그리고 변성제 영향 등 실험을 통해 육에 분포하는 carotenoprotein은 비교적 안정하였다.

#### 지방산 조성

우렁챙이 육에서 분리한 carotenoprotein 1 mg 당 총지질 함량은 0.536 mg이었으며, 총지질의 구성지방산 조성을 분석한 결과는 Table 5에 나타내었다. 육에서 분리한 carotenoprotein의 지방산 함량은 monoene산이 전체 지방산 조성 중 45.2%로 가장 높았고, 다음으로 포화 지방산(38.1%), polyene산(11.7%) 순이었다. 포화 지방산 중에는 lignoceric acid(C<sub>24:0</sub>)가 12.8%, monoene산 중에는 palmitoleic acid가 15.4%, erucic acid가 14.5%, polyene산 중에는 linolenic acid가 4.5%로 가장 높았다.

Kim 등<sup>3)</sup>은 연어알에서 분리한 carotenoprotein에서 지방산은 주로 stearic acid(47.9%)와 palmitic acid(21.4%)로 구성되어 있고 불포화지방산으로는 oleic acid(15.2%)와 소량의 linoleic acid가 존재한다고 하였고, 대하 (*P. orientalis*)로부터 분리정제한 carotenoprotein의 지방산 조성 중 oleic acid, palmitic acid, palmitoleic acid, EPA 및 DHA의 함량이 높는데<sup>38)</sup> 이러한 결과는 종류와 먹이, 생체조직의 분포에 따라 다른 것은 당연하다고 믿어진다.

Cheesman 등<sup>7)</sup>은 갑각류의 알(卵)이나 ovary에 존재하는

Table 5. Fatty acid composition of the carotenoprotein from the muscle of *Halocynthia roretzi*

Fatty acid		Content(%)
Myristic	C <sub>14:0</sub>	7.7
Palmitic	C <sub>16:0</sub>	1.5
Stearic	C <sub>18:0</sub>	7.9
Arachidic	C <sub>20:0</sub>	5.3
Behenic	C <sub>22:0</sub>	2.9
Lignoceric	C <sub>24:0</sub>	12.8
$\Sigma$ Saturates		38.1
Myristoleic	C <sub>14:1(n-5)</sub>	2.1
Palmitoleic	C <sub>16:1(n-7)</sub>	15.4
Oleic	C <sub>18:1(n-9)</sub>	1.8
Gadoleic	C <sub>20:1(n-11)</sub>	11.4
Erucic	C <sub>22:1(n-9)</sub>	14.5
$\Sigma$ Monoenes		45.2
Linoleic	C <sub>18:2(n-6)</sub>	1.2
Linolenic	C <sub>18:3(n-3)</sub>	4.5
Homo- $\gamma$ -linolenic	C <sub>20:3(n-6)</sub>	1.7
Arachidonic	C <sub>20:4(n-6)</sub>	1.6
Eicosapentaenoic	C <sub>20:5(n-3)</sub>	2.3
Docosahexaenoic	C <sub>22:6(n-3)</sub>	1.6
$\Sigma$ Polyenes		11.7

carotenoprotein은 high density lipoprotein(HDL)을 많이 함유하고 있는데, 일반적으로 이것을 lipovitellins라 하고, 여기에는 2.7~3.7%의 소량의 당류와 다량의 인지질로 구성되어 있고, cholesterol과 triacylglycerol은 동량으로 존재하며 혼치않는 지방산이 포함된다고 하였다. 이와 같은 사실은 본 실험의 carotenoprotein과도 유사한 분포를 나타내고 있다. 여러 가지 source로부터 분리된 lipovitellins은 SDS 처리로 분해되며, 그들의 아미노산 조성 중 helix 파괴성 아미노산을 다량 함유하고 있다. Low density lipoprotein(LDL)과 HDL은 lipoprotein의 구조에 중요한 영향을 미치게 되는데 LDL의 단백질 성분은 cholesterol ester의 cholesteryl moiety와 상호작용을 하는 반면 HDL 구조에서는 단백질이 amphiphatic helical 구역내에서만 인지질의 지방산과 회합하여 있고, cholesterol ester와는 본질적인 친화성은 없다.<sup>43)</sup>

우렁챙이의 carotenoprotein의 아미노산 조성, 지방산 조성을 분석한 결과, 종류와 조직에 따라 carotenoid와 회합하는 지질-단백질의 성분은 상당한 차이가 있다는 것을 알 수 있었다.

#### 참고문헌

1. Matsuno, T. (1991) Xanthophylls as precursors of retinoids. *Pure Appl. Chem.* **63**, 81.
2. Zagalsky, P. F. (1985) Invertebrate carotenoproteins. In *Methods in Enzymology* Law, J. H and H. C. Rilling Eds. Academic Press, Lnd, Vol. III, p.216.
3. Kim, J. W., T. J. Min, and T. Y. Lee (1988) Subunits and composition of carotenoprotein from salmo salar eggs. *J. Kor. Chem. Soc.* **32**, 377.
4. Weedon, B. C. L. (1971) Carotenoids (Ed. Isler, O.), Birkh

- User, Basel, pp. 28-59.
5. Kläui, H. (1982) Carotenoid Chemistry & Biochemistry, Britton *et al.* Eds. 309-328, Pergamon Press, London, U.K.
  6. Kläui, H. and K. M. nzel (1965) Drageef rbungen mit carotinoidstoffen. *Pharm. Acta Helv.* **40**, 153.
  7. Cheesman, D. F., W. L. Lee, and P. F. Zagalsky (1967) Carotenoproteins in invertebrates. *Biol. Rev.* **42**, 131.
  8. Zagalsky, P. F., H. J. Ceccaldi, and R. Daumas (1970) Comparative studies on some decapod crustacean carotenoproteins. *Comp. Biochem. Physiol.* **34B**, 579.
  9. Zagalsky, P. F. and P. J. Herring (1972) Studies on a carotenoprotein isolated from the copepod, *Labidocera acutifrons* and its relationships to the decapod carotenoproteins and other polyene-binding proteins. *Comp. Biochem. Physiol.* **41B**, 397.
  10. Garate, A. M., J. C. G. Milicua, R. Gomez, J. M. Macarulla, and G. Britton (1986) Purification and characterization of the blue carotenoprotein from the carapace of the crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard). *Biochimica Biophysica Acta.* **881**, 446.
  11. Milicua, J. C. G., R. Gomez, A. M. Garate, and J. M. Macarulla (1985) A red carotenoprotein from the carapace of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Comp. Biochem. Physiol.* **81B**, 1023.
  12. Shone, C. C., G. Britton, and T. Goodwin (1979) The violet carotenoprotein of the starfish, *Asterias rubens*. *Comp. Biochem. Physiol.* **62B**, 507.
  13. Milicua, J. C. G., I. Arberas, P. G. Barbon, A. M. Garate, and R. Gomez (1968) A yellow carotenoprotein from the carapace of the crayfish, *Astacus leptodactylus*. *Comp. Biochem. Physiol.* **85B**, 615.
  14. Matsuno, T. and M. Ookubo (1981) A new carotenoid, halocynthiaxanthin from the sea squirt, *Halocynthia roretzi*. *Tetrahedron Lett.* **22**, 4659.
  15. Matsuno, T. (1984) New structures of animal carotenoids in marine animals. *Pure Appl. Chem.* **57**, 659.
  16. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265.
  17. Davis, B. J. (1964) Disc-electrophoresis II. Method and application to human serum protein. *Ann. New York Acad. Sci.* **121**, 404.
  18. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680.
  19. Andrew, P. (1964) Estimation of the molecular weight of proteins by Sephadex gel filtration. *Biochem. J.* **91**, 222.
  20. Bligh, E. G. and W. J. Dyer (1959) A rapid method of lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911.
  21. Zagalsky, P. F. (1976) Carotenoid-protein complexes. *Pure Appl. Chem.* **47**, 103.
  22. Cheesman, D. F. and J. Prebble, (1966) Astaxanthin ester as a prosthetic group : A carotenoprotein from the hermit crab. *Comp. Biochem. Physiol.* **17**, 929.
  23. Kim, J. W., T. J. Min, and T. Y. Lee (1988) Subunits and composition of carotenoprotein from *Salmo salar* eggs. *J. Kor. Chem. Soc.* **32**, 377.
  24. Mathews-Roth, M. M. (1982) Carotenoid Chemistry & Biochemistry. Britton *et al.* Eds. p.297, Pergamon Press, London, U.K.
  25. Lee, W. L. (1966) Pigmentation of the marine isopod *idothea montereyensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* **18**, 17.
  26. Bernhard, K., G. Englet, W. Meister, M. Vecchi, M. B. Renstr, and S. Liaaen-Jensen (1982) Carotenoids of the carotenoprotein asteriarubin. Optical purity of asterinic acid. *Helv. Chimica Acta.* **65**, 2224.
  27. Zagalsky, P. F., R. S. Mummery, E. E. Elopoulos, and J. B. C. Findlay (1990) The quaternary structure of the lobster carapace carotenoprotein, crustanin : studies using cross-linking agents. *Comp. Biochem. Physiol.* **97B**, 837.
  28. Garate, A. M., E. Urrechaga, J. C. G. Milicua, R. Gomez, and G. Britton (1984) A blue carotenoprotein from the carapace of the crab, *Carcinus maenas*. *Comp. Biochem. Physiol.* **77B**, 605.
  29. Salares, V. R., N. M. Young, H. J. Bernstein, and P. R. Carey (1979) Mechanisms of spectral shifts in lobster carotenoproteins. The resonance raman spectra of oververdin and the crustacyanins. *Biochim. Biophys. Acta* **576**, 176.
  30. Clark, R. J. H., G. A. Rodley, A. F. Drake, R. A. Church, and P. F. Zagalsky (1990) The carotenoproteins of the starfish *Linckia laevigata* (Echinodermata: asteroidea): A resonance raman and circular dichroism study. *Comp. Biochem. Physiol.* **95B**, 847.
  31. Ceccaldi, H. J. and P. F. Zagalsky (1968) Studies on the carotenoprotein from the stomach wall of *Aristeus antennatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* **21**, 435.
  32. Elgsaeter, A., J. D. Tauber, and S. Liaaen-Jensen (1978) Animal carotenoids 15. Carotenoid distribution and carotenoprotein of *Asteries rubens*. *Biochem. Biophys. Acta.* **530**, 402.
  33. Garate, A.M., P. G. Barbon, J. C. G. Milicua, and R. Gomez (1986) Chemical properties and denaturation of the blue carotenoprotein from *Procambarus clarkii*. *Comp. Biochem. Physiol.* **84B**, 483.
  34. Gomez, R., J. D. L. Rivas, A. M. Garate, P. G. Barbon, and J. C. G. Milicua (1986) Characterization of a blue astaxanthin protein from the carapace of the crayfish, *Astacus leptodactylus*. *Comp. Biochem. Physiol.* **83B**, 855.
  35. Yang, H. P., A. J. Lee, Y. T. Kim, and S. K. Kim (1994) Purification and characterization of the red carotenoprotein from the muscle of blue mussel, *Mytilus edulis*. *Bull. Korean Fish. Soc.* **27**, 482.
  36. Eliot, T. S. (1981) Studies of invertebrate carotenoprotein. Ph. D. Thesis, University of Liverpool, U.K.
  37. Santoro, P., V. Guerriero, and G. Parisi (1990) An orange carotenoprotein from the marine sponge *Axinella verrucosa* (O. schmidt). Purification and properties. *Comp. Biochem. Physiol.* **97B**, 645.
  38. Lee, S. K. and J. W. Kim (1994) Purification and characterization of a carotenoprotein from *Penaeus orientalis*. *J. Kor. Chem. Soc.* **38**, 608.

39. Czczuga, B. (1983) Investigations of carotenoprotein complexes in animals-VI. *Anemonia sulcata*, the representative of askeletal corals. *Comp. Biochem. Physiol.* **75B**, 181.
40. Chou, P. Y. and G. D. Fasman (1973) Structural and functional role of leucine residues in proteins. *J. Mol. Biol.* **74**, 263.
41. Czczuga, B. and S. Krywuta (1981) Investigations on carotenoprotein complexes in animals-II. The presence of carotenoproteins in the carapace of *Orconectes limosus* (Raf). *Comp. Biochem. Physiol.* **68B**, 339.
42. Rivas, J. D. L., J. C. G. Millicua and G. Gomez (1988) Further studies on the blue carotenoprotein from *Astacus leptodactylus*. *Comp. Biochem. Physiol.* **89B**, 65.
43. Segrest, J. P., R. L. Jackson, J. D. Morrisett, and A. M. Gotto (1974) A molecular theory of lipid-protein interactions in the plasma lipoproteins. *FEBS Letters.* **38**, 274.

---

**Purification and Characterization of Carotenoprotein from the Muscle of Ascidian, *Halocynthia roretzi***

Se-Kwon Kim\*, Ok-Ju Kang,<sup>1</sup> Hee-Guk Byun, You-Jin Jeon and Jong-Bae Kim,<sup>2</sup>(*Dept. of Chemistry, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea; <sup>1</sup>Dept. of Food Science and Nutrition, Dong-Ju Woman's Junior College, Pusan 604-080, Korea; <sup>2</sup>Dept. of Sea-Food Science and Technology, Kunsan National University, Kunsan 573-702, Korea*)

**Abstract** : A carotenoprotein from the muscle of Ascidian (*Halocynthia roretzi*) was purified by ion exchange chromatography and gel filtration chromatography, and analyzed molecular weight, stability of pH and heat, effect of denaturing agents, amino acids and fatty acids composition. The purified carotenoprotein had absorption maxima of 463 nm and 439 nm. The carotenoprotein had an approximate molecular weight of 64.4 kDa in polyacrylamide gel electrophoresis. The amino acid compositions of carotenoprotein were mainly Gly (15.39%), Asn (11.31%), Gln (10.62%) and Ser (13.35%). The major fatty acids composition of carotenoprotein were C<sub>16:1(6-7)</sub> (15.4%), C<sub>22:1(6-9)</sub> (14.5%) and C<sub>20:1(6-11)</sub> (11.4%). The monounsaturated fatty acids (45.2%) contained abundant content compared to other saturated (38.1%) and polyunsaturated (11.7%) fatty acids.

---

Key words : carotenoprotein, Ascidian, characterization, amino acid, fatty acid

\*Corresponding author