

멍게 껍질로부터 분리정제한 적색 Carotenoprotein의 특성

1. Carotenoprotein의 정제 및 특성

강옥주* · 서명자** · 이안종 · 김세권†

부산수산대학교 화학과
동주여자전문대학 식품영양과*
부산대학교 식품영양학과**

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

1. Purification and Characterization of the Carotenoprotein

Ok-Ju Kang*, Myung-Ja Suh**, An-Jong Lee and Se-Kwon Kim†

Dept. of Chemistry, Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea
Dept. of Food Science and Nutrition, Dong-Ju Women's Junior College, Pusan 604-080, Korea*
Dept. of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Pusan 608-735, Korea**

Abstract

A carotenoprotein from the skin of Ascidian(*Halocynthia roretzi*) was extracted by Triton X-100 and purified by ammonium sulfate fraction, Sephadex G-200 chromatography and DEAE-cellulose ion exchange chromatography. The carotenoprotein was red with broad λ_{max} between 495, 467 and 318nm. The red carotenoprotein had an approximate molecular weight of 326KDa(gel filtration). SDS-PAGE indicated the presence of two polypeptides of 84.1 KDa and 74.4KDa, with different mobility in polyacrylamide gel electrophoresis. In the presence of denaturing agents such as organic solvent and extreme pH, the red complex readily dissociates to liberate the yellow carotenoid(λ_{max} 452nm) and a colourless apoprotein. The amino acid composition of carotenoprotein were mainly threonine(15.2%), aspartic acid(12.2%), glutamic acid(11.9%) and serine(9.6%), while proline was not found. The carotenoprotein consisted of lipids as structure units. Its major fatty acids composition were $C_{18:1}$, $C_{16:1}$ and $C_{16:0}$. The monounsaturated fatty acids(41.5%) contained abundant content compared to other fatty acids(polyunsaturated fatty acids 37.4%, saturated fatty acids 20.6%).

Key words : carotenoprotein, fatty acid, apoprotein

서 론

Carotenoids는 식물, 동물 그리고 미생물 등에 여러형태로 분포되어 있고 450nm 근방의 빛을 흡수하는 지용성 색소로써 현재까지 광화학 이성질체를 포함하여 약 600여

종류가 알려졌으며¹⁾, 일반적으로 carotene류(α -, β -, γ -carotene, lycopene)와 xanthophyll류(lutein, zeaxanthin, astaxanthin, taraxanthin, violaxanthin 등)로 분류할 수 있다. Carotenoids는 천연의 착색제 등 첨가물로 이용되고 있으며, 각종 발암제나 돌연변이 유발성 물질들이 체내에서

† Corresponding author

자발적 또는 광역화적인 작용으로 산소라디칼 생성이나 지질 과산화물 생성반응으로부터 생체막의 보호기능²⁾과 항산화작용³⁾에 의한 생체의 노화방지 기능을 갖는 것으로 밝혀졌고, 또한 protophyrias 유전병 치료⁴⁾, β -carotene과 비타민 A 유도체들의 발암 억제작용에 대한 임상적인 연구⁵⁾들이 진행되고 있으며, 그 결과 의학적인 측면에서 carotenoid의 중요성이 강조되고 있다.

한편 이들 carotenoids는 생체내에서 단백질과 복합체를 형성하고 있는 경우가 많고 이 복합체는 물리화학적 성상의 차이에 따라 carotenoprotein과 carotenolipoprotein 복합체로 분류되며, 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 존재한다⁶⁾.

이 carotenoid-protein 복합체는 수용성이며 단백질이나 carotenoid가 단독으로 존재할 때보다 훨씬 더 안정하고, 식물의 광합성 장치나, 해조류, 박테리아, 어류 등에서 발견되는데 유리 carotenoid의 오렌지색과는 달리 분홍색, 자주색, 청색, 적색 또는 녹색을 띠고 있으며, 이들 분자량은 35,000~100만 dalton에 이르기까지 폭 넓게 분포되어 있다. 이에 관한 연구로는 Garate 등의 가재껍질의 청색 carotenoprotein에 관한 연구⁷⁾, Millicua 등의 가재껍질의 적색 carotenoprotein에 관한 연구⁸⁾ 및 Zagalsky와 Herring의 십각류 껍질의 청색 carotenoprotein에 관한 연구⁹⁾가 있고, 무지개 송어, 연어 등의 어육의 착색을 위한 갑각류의 가공 폐기물 중 carotenoprotein의 이용에 관한 보고¹⁰⁾가 있다.

최근에는 carotenoprotein의 1차 및 4차 구조에 관한 연구, apoprotein의 구조와 안정성 및 분광학적인 연구, 단백질과 선택된 carotenoid로부터 복합체의 재구성 연구 등을 통하여 그 생리적인 의의를 밝히고자 하는 연구가 이루어지고 있다¹¹⁾.

본 연구는 우리나라 근해에서 대량 생산되고 있는 멍게 껍질에 존재하는 carotenoprotein을 분리정제하여 이화학적 특성을 검토하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 멍게는 부산 충무동 공동어시장에서

구입하여(평균중량 205g, 평균각장11.5cm, 평균각고 6.2cm) 빙장상태로 저온실(0±4°C)에 운반 후 수도물로 씻고, 육과 껍질을 분리하여 껍질만을 채취하여 시료로 사용하였다.

Carotenoprotein의 추출

껍질 200g을 잘게 자른 다음 3% (v/v) Triton X-100을 함유하는 50mM sodium phosphate 완충액(pH 7.0) 800 ml를 가하고 균질기(Ace Homogenizer AM-7, Tokyo, Japan)로 2분간 균질화 시켰다. 이 용액을 4°C 냉암소에서 12시간 교반하여 추출한 다음 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

추출한 용액에 20% (w/v) (NH₄)₂SO₄로 염석시켜 냉암소(4°C)에서 12시간 방치한 다음 원심분리(15,000×g, 20min)하여 상층액을 50mM sodium phosphate 완충액(pH 8.0)으로 투석하였다. 이 투석액을 원심분리(15,000×g, 20min)하여 얻어진 상층액을 미리 같은 완충액으로 평형화시킨 Sephadex G-200 겔 크로마토그래피 컬럼(φ2.5×60cm)에 주입하고, 동일 완충액으로 용출(유속, 30ml/hr; 분획량, 3ml)하였다. 여기서 얻어진 희분을 질소압력 농축기(SATORIUS Co. ultra-membrane filtrator, molecular weight cut off 10kDa)로 농축하여 50mM sodium phosphate 완충액(pH 7.5)으로 20시간 투석한 후에 원심분리(15,000×g, 20min)하였다. 다음 단계로 원심분리한 상층액을 같은 완충액으로 평형화시킨 DEAE-cellulose 컬럼(φ1.5×35cm)에 통과시킨 후, 1M NaCl/50mM sodium phosphate 완충액(pH 7.5)으로 농도구배법으로 분별용출(유속; 24ml/hr; 분획량, 3ml)하여 얻어진 희분을 농축한 후, 48hr시간 투석, 원심분리(15,000g×20min)하였다. 이상의 과정에서 정제한 carotenoprotein을 -20°C이하에 보관하여 정제 carotenoprotein의 특성 실험에 사용하였다.

단백질의 정량

단백질 정량은 Lowry 등¹²⁾의 방법을 이용하였다. 즉 단백질용액 0.1ml에 0.1N NaOH에 녹인 2% Na₂CO₃용액과

1% Na, K-tartrate에 녹인 0.5% CuSO₄ · 5H₂O 용액을 50:1(v/v)로 혼합한 용액 1ml를 가하고 10분 후 1N Folin-ciocalteu 시약 0.1ml를 가하여 30분간 발색시킨 다음 500nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질의 양은 bovine serum albumin(M.W.=66,000)을 표준물질로 하여 작성된 검량선에 의하여 산출하였다.

총 Carotenoid의 정량

Carotenoprotein으로부터 carotenoid의 추출은 Khare 등¹³⁾의 방법을 변형하여 이용하였다. 즉 정제된 carotenoprotein의 인산염 완충용액에 3배량의 acetone을 가하고 균질기로 교반하여 단백질로부터 carotenoid를 유리시켰다. 단백질이 색깔을 띠지 않을 때까지 위의 조작을 반복한 다음 carotenoid의 추출액을 모두 합쳤다. 이 추출액을 분액여두로 옮긴 다음 여기에 석유에테르를 추출액과 1:2(v/v) 비로 가하여 천천히 흔들어 주고 30분간 방치시켜 carotenoid를 분리하였으며, 하층액을 2차 분액여두로 옮겨 석유에테르로 전용하는 과정을 3회 반복하여 얻어진 상층액과 합친 후, 탈이온수로 여러번 세척하여 carotenoid를 석유에테르 층으로 옮긴 다음, 이 용액에 Na₂SO₄(30g)를 처리하여 여과하고, 그 여액을 질소기류하에서 회전진공농축기로 감압농축하여 총 carotenoid를 얻었다. 총 carotenoid의 함량은 McBeth¹⁴⁾의 방법에 따라 흡광계수 E_{1%^{1cm}}=2,500으로 하여 451nm에서 석유에테르를 용매로 흡광도를 측정하여 계산하였다.

Carotenoprotein의 동정

(1) 전기이동 분석

순도검정을 위한 분석은 Davis¹⁵⁾의 disc-PAG(5.0% polyacrylamide gel) 전기이동법에 따라 최종 정제된 전기이동용 시료를 조제하여 측정하였다. 즉, 전기이동 시료를 slab gel(6×8cm)에 주입하고 0.25M Tris-0.192M glycine 완충액(pH 8.3)을 사용하여 각 well당 2mA의 전류를 통전시켜 전기이동하였다. 최종 정제된 carotenoprotein의 subunit 양상 및 분자량은 Laemmli¹⁶⁾의 방법에 따라 실행하였다. 즉, SDS-PAGE(0.1% SDS를 함유하는 9.5% polyacrylamide gel)를 사용하여 2% SDS로 처리된 carotenoprotein 시료와 SDS-marker protein을 농도별로 slab gel(6×8cm)에 주입하고 0.1% SDS를 함유한 0.25M Tris-O.

129M glycine 완충액(pH 8.3)을 사용해서 각 well당 2mA의 전류로 전기이동하였다. 전기이동 후 disc와 SDS-gel의 단백질 band는 5% TCA로 고정화시키고, 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. 또한 SDS-marker protein의 전기이동 이동도와 SDS화한 carotenoprotein의 전기이동 이동도를 비교하여, carotenoprotein의 구성 subunit의 분자량 측정 및 순도를 판정하였다.

(2) 겔여과에 의한 분석

Andrews 등¹⁷⁾의 방법에 따라 분자량을 측정하였다. 즉, Sephadex G-200 컬럼(φ2.2×98cm)에 정제된 carotenoprotein과 겔 여과용 분자량 표준단백질을 20mM KCl을 함유하는 50mM sodium phosphate 완충액(pH 7.5)을 사용하여 고대로 용출(유속: 6ml, 분획량: 1ml)시킨 후에 용출부피(V_e)와 blue dextran의 용출부피(V_o)의 비로써 분자량을 측정하였다.

Carotenoprotein의 특성

pH안정성

Carotenoprotein 용액을 1M 완충용액 [citric acid-sodium citrate(pH 3.0), Na₂HPO₄-NaH₂PO₄(pH 7.0) 및 1M Na₂HPO₄-NaOH(pH 11)] 3ml가 들어있는 cap tube에 각각 0.2ml씩 넣고 20°C의 항온조에서 4시간 동안 incubation시킨 후 carotenoprotein의 최대파장의 변화를 자외선 분광광도계(Shimadzu U-3210, Tokyo, Japan)로 측정하였다.

변성제 효과

Cap tube에 carotenoprotein 용액 3ml를 넣고 변성제로서 sodium dodecyl sulfate(SDS)를 0.2% (w/v)되게 가하여 녹인 다음, 20°C의 항온조에서 4시간 동안 incubation시킨 후 carotenoprotein의 최대파장의 변화를 자외선 분광광도계로 측정하였다.

아미노산 분석

정제 carotenoprotein과 6N HCl을 동량 혼합하여 cap tube에 넣고 감압상태로 밀봉한 다음 110°C에서 24시간

분해시킨 후, 감압하에 농축 정용(sodium citrate, pH 2.2)한 것을 아미노산 자동분석기(Hitachi Co, Japan)로 분석하였다.

지방산 분석

Bligh와 Dyer⁽¹⁰⁾의 방법에 따라 정제된 carotenoprotein으로 부터 총지질을 추출하였다. 즉, carotenoprotein 용액 5ml에 MeOH : chloroform(1 : 2, v/v)용액 30ml를 넣어 약 4시간 추출한 다음, 균질기(Ace homogenizer AM-7, Tokyo, Japan)로 5000~7000 rpm에서 2분간 균질화하여 chloroform 20ml와 0.88% KCl(Saline)용액을 20ml를 넣고, 다시 1분간 교반한 후 여과하여 분액갈때기에서 하룻밤 방치하였다. 분리된 하층액을 취하여 탈수시킨 다음 회전진공농축기로 용매를 제거하여 총지질을 추출하였다.

지방산 조성을 알아보기 위하여 총지질 100mg을 정평하여 1N KOH-95% ethanol용액으로 검화(85°C, 1시간)한 다음 10% BF₃-MeOH 3ml를 가하여 95°C에서 15분간 자비 환류하여 지방산 methyl ester를 조제한 후 gas chromatography(Shimadzu GC-14A, Tokyo, Japan)로 분석하였다. 그리고 각 지방산의 동정은 표준 지방산 methyl ester의 retention time과의 비교 및 지방산의 이중 결합수와 retention time과의 상관그래프를 이용하였다.

결과 및 고찰

Carotenoprotein의 분리정제

Triton X-100으로 추출한 carotenoprotein액에 대해 20% 포화황산암모늄 염석 획분을 모았고, 그 투석액을 50mM sodium phosphate 완충액(pH 8.0)으로 평형화된 Sephadex G-200 칼럼(φ2.5×60cm)에 주입하여, 용리(유속, 30 ml/hr; 분획량, 3ml)시킨 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 이 단계에서 과량의 Triton X-100이 제거되었고, Fig. 1에 나타난 바와 같이 carotenoprotein이 완전히 용출(fraction No. 30~60)되었으며, 이 때의 carotenoprotein은 조추출액에 비해 정제도가 3.4배 증가되었다. 이 획분을 모아 질소압력농축기로 농축하고 투석하였다. 이 투석액을 50mM sodium phosphate 완충액(pH 7.5)으로 평형화된 DEAE-cellulose 칼럼(φ1.5×35cm)에 주입하여, 동일 완충액으로 비흡착 부분을 우선 분획한 후, 0~1M NaCl을 함유하는 동일 완충액을 사용하여 선형상농도구배법으로 용리(유속,

24ml/hr; 분획량, 3ml)시킨 결과 비흡착 부분에서 carotenoprotein이 완전히 용출(fraction No. 30~45)되었다. 이렇게 정제된 carotenoprotein은 disc-PAG 전기이동법으로 순도를 검정하였다.

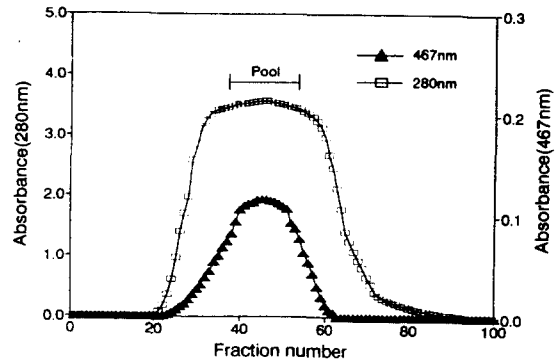


Fig. 1. Elution profile of the carotenoprotein extract (absorbance at 467 and 280nm) from the skin of *Halocynthia roretzi* in Triton X-100 obtained by gel filtration on Sephadex G-200 column(φ2.5×60cm).

Elution condition : Buffer ; 50mM sodium phosphate buffer(pH 8.0).

Flow rate and fraction volume ; 30ml/hr and 3ml.

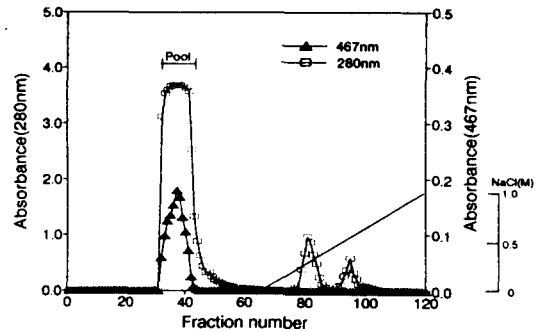


Fig. 2. Elution profile of the carotenoprotein from the skin of *Halocynthia roretzi* on DEAE-cellulose column(φ1.5×35cm) by gradient with 1M NaCl in 50mM sodium phosphate buffer.

Elution condition : Buffer ; 50mM sodium phosphate buffer(pH 7.5).

Flow rate and fraction volume ; 24ml/hr and 3ml.

정제된 carotenoprotein의 λ_{max} 은 495, 467 및 438nm에서 최대흡수를 가지며 acetone/diethyl ether(1 : 1, v/v)로 처리하여 단백질로부터 색소를 유리시키고 diethyl ether 용액에서 측정된 free carotenoid의 최대 흡수파장 λ_{max} 은 478nm와 452nm에서 뚜렷한 굴곡현상이 나타났다(Fig. 3). 이와 같이 acetone 같은 유기용매로 처리하면 파장변화가 나타났는데 이것은 carotenoids 분자의 β -ionone 고리속에 4-와 4'-위치의 keto group과 apoprotein의 amino group간에는 Schiff's 염기나 sulfhydryl group을 포함한 견고한 결합이 아니고 비공유결합으로 속박되어 있기 때문에 아세톤 같은 유기용매로 처리할 때 단백질로부터 carotenoids가 쉽게 유리된다. 따라서 apoproteins과 carotenoids의 keto group들 사이에 특이적인 배열변화를 일으키기 때문에 분광학적인 파장변동에 영향을 주는 것으로 판단된다¹⁹⁾.

Carotenoprotein중의 총 carotenoid 양과 지질의 양을 각각 정량해 본 결과 carotenoprotein 1mg당 0.31 μ g의 carotenoid와 0.523mg의 지질이 함유되어 있으며, carotenoprotein의 정제도 및 수율은 각각 6.2배 및 7.4%였다(Table 1).

Millicua 등⁸⁾에 따르면 가재(*P. clarkii*)껍질로부터 Triton X-100을 사용하여 얻은 적색 carotenoprotein은 최대 흡수파장이 λ_{max} 482nm이며, 보조그룹으로는 astaxanthin과 그 ester가 함유되어 있으며, carotenoprotein 1mg당 0.833mg의 지질과 0.178 μ g의 astaxanthin 및 astaxanthin ester가 포함되었다고 하였고, 가재(*A. leptodactylus*)껍질에서 분리한 청색 carotenoprotein의 특성연구에서 Millicua 등²⁰⁾은 이온교환수지와 Sephadex S-300 SF 칼럼을 이용

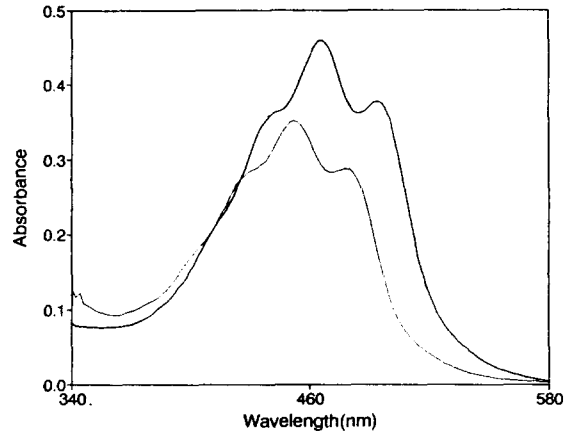


Fig. 3. Comparative visible absorption spectrum of the purified carotenoprotein from the skin of *Halocynthia roretzi*(—) and its free carotenoid component in ethereal solution(.....) after extraction.

하여 정제한 carotenoprotein은 λ_{max} 385nm에서 최대흡수를 가지며, 보조그룹으로는 astaxanthin과 zeaxanthin이 1 : 1 비로 함유되어 있다고 하였으며, 단백질 1분자당 12 carotenoid가 복합체를 이루어져 있다고 보고한 바 있다.

Cheesman 등²¹⁾은 hermit carb의 알과 난소에서 최대 흡수파장이 280nm, 465nm, 495nm인 carotenoprotein을 분리하였는데 단백질의 보조그룹으로 작용하는 물질이 astaxanthin이라고 하였고, 연어알에서 분리한 carotenoprotein의 구조적인 특성연구에서 Kim 등²²⁾은 이온교환수지와 Sephadex G-25 칼럼을 이용하여 정제한 carotenoprotein

Table 1. Purification of the carotenoprotein from the skin of *Halocynthia roretzi*

Procedure	Volume(ml)	*Total protein (mg)	+Carotenoprotein (mg)	Purification (C/T)	Yield (%)
1. Crude extract	1,800	7,884	765	1	100
2. 20% (NH ₄) ₂ SO ₄	578	1,306	304	2.4	39.7
3. Sephadex G-200	96	311	102	3.4	13.3
4. DEAE-cellulose	44	95	57	6.2	7.4

*Total protein measured by Lowry assay

+The amount of red carotenoprotein is calculated by the equation : Absorbance at 467nm × Volume of solution ml.

은 최대파장 λ_{max} 589, 540 및 580nm에서 가시부 흡수 극대를 가지며 단백질과 회합하여 상호 보호그룹으로 작용하는 carotenoid 성분은 astaxanthin ester이었다고 보고하였고, 미생물에서의 carotenoprotein에 관한 연구²³⁾로는, cyanobacteria에서 최대 흡수파장이 495nm와 465nm를 나타내는 적색 carotenoprotein이 발견되었다.

Cheesman 등¹⁹⁾은 carotenoid 분자의 β -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 하였다. 또한 β -ionone 고리속에 4-와 4' -keto group을 가진 acetylenic carotenoid도 apoprotein unit와 쉽게 회합할 수 있으며 astaxanthin과 그의 dehydro 형태인 acetylenic carotenoid(7,8-and/or 7', 8' - 위치) 유도체들은 푸른색 또는 자색인 carotenoprotein의 복합체를 이루며 서로 공존하는 것으로 확인되었다²⁴⁾.

이와 같이 carotenoid-protein 복합체는 대부분 생체자극 물질의 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 carotenoids와 apoprotein, 지질, 당 등이 회합되어 복합체를 이룰 때 흡수 스펙트럼이 강하게 장파장 쪽으로 이동되는 것이 있는가 하면, 단파장 쪽으로 이동되는 것도 있고, 약하고 좁게 장파장 쪽으로 이동되는 것, 미세구조 또는 multibound 형태를 갖는 것 등 여러 가지가 있다.

Carotenoprotein의 동정 및 분자량

각 정제단계별 정제도와 구성 subunit의 확인은 SDS-PAG 전기이동법으로, 순도의 검정은 disc-PAG 전기이동법으로, 분자량 측정은 SDS-PAG 전기이동법과 Sephadex G-200 겔여과법으로 실행하였다. Fig. 4는 정제된 carotenoprotein의 disc-PAG 전기이동한 결과로서 단일 band로 나타나 균질한 상태의 carotenoprotein임을 확인할 수 있다. 이 단백질 band를 9.5% SDS-PAG 전기이동법으로 분자량을 측정된 결과, 분자량이 84.1kDa와 74.4kDa의 2개의 polypeptide로 이루어져 있었다. 이때 marker protein으로는 β -galactosidase(M.W. ; 116kDa), fructose-6-phosphate kinase(M.W. ; 96.4kDa), pyruvate kinase(M.W. ;

80.4kDa), ovalbumin(M.W. ; 55.7kDa), lactic dehydrogenase(M.W. ; 43.7kDa), triosephosphate isomerase(M.W. ; 38.8kDa)를 사용하였다.

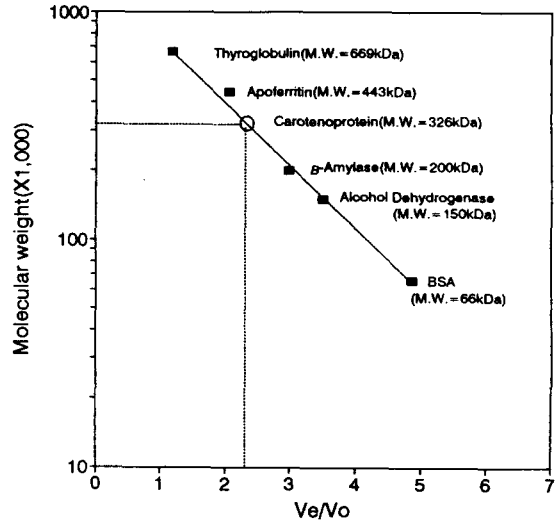


Fig. 4. Estimation of molecular weight of the purified carotenoprotein from the skin of *Halocynthia roretzi* by gel filtration with Sephadex G-200.

겔여과에 의해 carotenoprotein의 분자량을 측정하기 위해 Sephadex G-200을 사용한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 겔여과법에서는 marker protein으로는 thyroglobulin(M.W. ; 669kDa), apoferritin(M.W. ; 443kDa), β -amylase(M.W. ; 200kDa), alcohol dehydrogenase(M.W. ; 150kDa), bovine serum albumin(BSA, M.W. ; 66kDa)을 사용하였으며, 분자량은 326kDa이었다.

Garate 등²⁵⁾은 crab인 *C. maenas*로부터 Sephacryl S-300 SF 칼럼을 이용하여 octameric form 종류의 carotenoprotein을 분리하였다. 이 octameric form의 분자량은 365kDa인데 이것을 다시 SDS로 처리할 때 38.2kDa의 single polypeptide로 분리되었다고 하였다. 또한 lobster carapace의 노란색 carotenoprotein은 astaxanthin을 기준해서 최소 분자량이 4.4kDa이고 409nm에서 최대 흡수를 가지며 SDS-PAG 전기이동할 때 분자량이 큰 형태로서는 49kDa, 55kDa, 66kDa 및 79kDa의 4개의 polypeptide 외에 분자량이 적은 형태로서 22kDa와 19kDa인 불균일

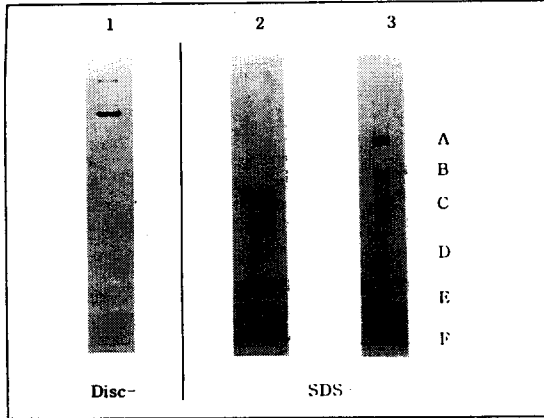


Fig. 5. 5% Disc-and 9.5% SDS-PAGE of purified carotenoprotein from the skin of *Halocynthia roretzi*. Lane 1 : Carotenoprotein. Lane 2 : Subunits of the carotenoprotein. Lane 3 : Marker protein [A ; β -Galactosidase(116 kDa), B ; Fructose-6-phosphate kinase(96.4kDa), C ; Pyruvate kinase(80.4kDa), D ;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

한 apoprotein으로 분리되었다고 하였다²⁰⁾.

Zagalsky²⁶⁾에 의하면 여러종류의 해양 무척추 동물에서 분리된 carotenoprotein들은 형태적으로 α -form과 β -form이 존재하는데, α -form은 분자량이 50kDa~1000kDa이며 낮은 이온 강도의 용액에서 해리되어 자색의 유도체를 생성하고, 반면 β -form은 주로 40kDa~50kDa의 분자량을 갖는다고 하였다. 이들은 아세톤으로 처리된 apoprotein을 전기이동하면 불균일하고, 그들의 분자량은 8~26kDa이 된다고 하였다. 이와 같이 생체의 조직과 종류에 따라서 astaxanthin(acetylenic 구조를 포함) 등 keto group을 가진 carotenoid는 여러종류의 불균일한 단백질과 소수성 결합 또는 수소결합을 하게 되면 분자량이 수만에서 백만달톤으로 다양하게 거대 분자인 carotenoprotein을 이루어 생체내에서의 보호그룹으로 작용한다고 판단된다.

Carotenoprotein의 특성

pH 안정성

Carotenoprotein은 pH 변화에 따른 안정성을 측정한 결

과는 Fig. 6에 나타내었다. Fig. 6에서와 같이 중성 영역인 pH 7.0에서는 정제된 carotenoprotein의 최대파장(467 nm)의 변화가 없었지만, 강산성 영역인 pH 3에서는 최대 파장에서 약 11nm 이동한 456nm에서 최대흡수가 나타났고 강알칼리 영역인 pH 11.0에서는 최대파장이 467nm에서 462nm로 단파장영역으로 약 5nm이동하였다. 이와 같은 현상은 carotenoid의 β -ionone 고리속에 keto group과 회합된 apoprotein의 amino group간에는 Schiff's 염기나 sulfhydryl group이 비공유결합으로 속박되어 있기 때문에 극단적인 pH 변화에 의해서 apoprotein과 carotenoids 사이에 배열변화가 일어나며 carotenoid가 단백질로부터 쉽게 이탈됨으로써 이와 같은 분광학적 특성이 나타나게 되는 것으로 판단된다²⁷⁾.

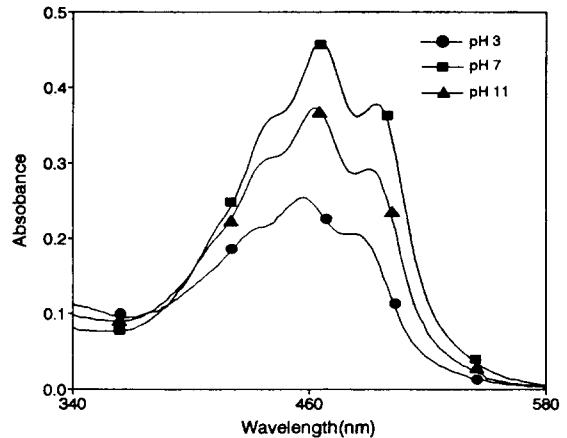


Fig. 6. Comparative visible absorption spectrum of the purified carotenoprotein from the skin of *Halocynthia roretzi* pH 3.0, 7.0 and 11.0.

*P. clarkii*에서 분리한 청색 carotenoprotein의 화학적 성질 및 변성에 관한 연구에서 Garate⁷⁾ 등은 pH 4.0~10.0 범위에서 carotenoprotein의 안정성을 실험한 결과 pH 5.5~pH 8.0 사이에서는 흡광도 변화가 없었으나, pH 5 이하 및 pH 8.5 이상에서 carotenoprotein의 최대파장이 635 nm에서 484nm로 이동하였는데 이것은 pH 변화에 따른 단백질과 carotenoid 사이의 상호작용이 변화하기 때문이라고 하였다. 또한 Yang 등²⁸⁾은 진주담치(*M. edulis*)에서 분리한 적색 carotenoprotein은 pH 7.0~pH 10.0 범위에서는 흡광도의 변화가 없었으나 pH 4.0 이하의 강산에서는

흡광도가 감소하였고, 반면 pH 10.0 이상의 강알칼리에서는 흡광도가 증가하였다. 또한 carotenoprotein의 등전점 영역인 pH 4.5~6.0 부근에서는 흡광도가 높아졌는데 이것은 pH 4.0 이하의 강산이나 pH 10.0 이상의 강알칼리에서는 단백질의 변성에 의해 carotenoid와의 상호작용이 변함으로써 흡광도가 변하고, pH 4.5~6.0 부근에서는 단백질과 회합된 carotenoid가 유리되어 응집함으로써 흡광도가 증가된다고 보고한 바 있다.

변성제의 영향

Carotenoprotein의 변성제에 대한 영향을 알아보기 위해 SDS를 0.3% (w/v) 되게 가하여 가시부 영역(340~580 nm)에서 carotenoprotein의 연속파장을 측정된 결과를 Fig. 7에 나타내었다. Fig. 7에서와 같이 최대파장(467nm)에서 약 6nm 이동한 461nm에서 최대파장이 나타났는데, 진주담치(*M. edulis*)²⁸⁾에서의 적색 carotenoprotein이나 가재(*P. clarkii*)¹²⁾껍질의 적색 carotenoprotein과 유사한 경향을 보였다. 한편 Gomez 등²⁹⁾은 가재(*A. leptodactylus*)껍질에서 분리한 청색 carotenoprotein에 SDS를 0.05% (w/v) 되게 가하였더니 최대파장이 634nm에서 490nm로 단파장으로 이동하였는데 이것은 carotenoid가 단백질과의 상

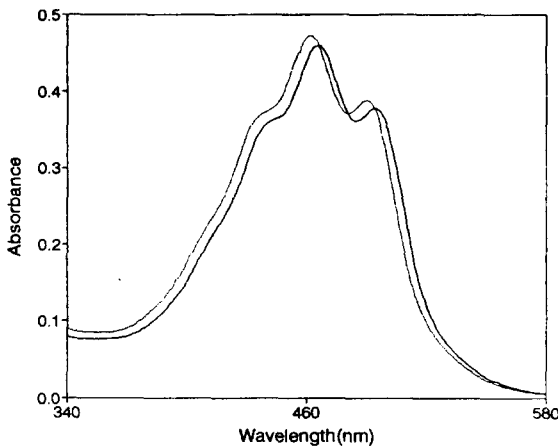


Fig. 7. Visible absorption spectrum of the purified carotenoprotein from the skin of *Halocynthia roretzi* in buffer(—) and after denaturing by addition of SDS to a final concentration of 0.3% (w/v)(.....).

호작용에서 유리되어 일어난다고 하였다. 또한 게(*C. maenas*)껍질로부터 분리한 청색 carotenoprotein에 관한 연구에서는 carotenoprotein에 SDS를 0.2% (w/v) 되게 가하였더니 carotenoprotein의 최대파장(625nm)이 단파장 영역으로 125nm 이동하였다고 보고하였다²⁵⁾.

이와같은 결과는 청색 carotenoprotein의 경우는 변성제인 SDS에 의해 단백질이 변성되어 회합된 carotenoid가 유리됨으로서 최대파장이 단파장쪽으로 크게 이동하는 반면, 본 실험에서와 같이 적색 carotenoprotein의 경우는 carotenoid가 단백질과의 상호작용보다는 변성제의 영향을 적게 받는 지질과의 상호작용을 함으로써 최대파장이 단파장 영역으로 약간 이동하는 분광학적 특성을 나타내는 것으로 판단된다²⁷⁾.

아미노산 조성 및 지방산 조성

Carotenoprotein의 아미노산 조성을 Table 2에 나타내었는데, 특히 threonine, aspartic acid, glutamic acid 및 serine의 함량이 매우 높아 전체적으로 산성의 성질을 띠는 것으로 판단되었으며, 이것은 해면동물(*A. verrucosa*)³⁰⁾과 대하(*P. orientalis*)³¹⁾ 그리고 산호(*A. sulcata*)³²⁾ 등에서의 carotenoprotein과 동일한 경향이였다. Carotenoprotein의 β -구조 안정화에 영향을 미치는 threonine, valine, glycine 및 isoleucine 함량은 높았으나, α -나선구조의 안정화에 영향을 주는 glutamic acid, alanine 및 leucine 함량이 비교적 낮은 것으로 보아 carotenoprotein의 구조는 β -구조를 이루고 있다는 것을 짐작할 수 있었다.

또한 carotenoprotein 1g 당 총지질의 함량은 523mg였으며, 총지질이 구성지방산을 분석한 결과(Table 3), 전체 지방산 중 monoene산이 41.5%로 가장 많았고 다음으로 polyene산(37.4%) 및 포화산(20.6%) 순이였다. 특히 혈청지방질의 개선, 혈소판응집저해 및 혈액점도의 저하 등 생리적으로 효과가 있다는 EPA 및 DHA를 각각 10.5%, 8.9%씩 함유하고 있어, 대하(*P. orientalis*)³¹⁾의 적색 carotenoprotein에서는 EPA 및 DHA의 함량이 각각 8.4%, 2.7%였으며, 진주담치(*M. edulis*)²⁸⁾의 carotenoprotein의 경우는 각각 9.5%, 7.9%에 비해 다소 높은 함량을 보였다.

Table 2. Amino acid composition of the carotenoprotein from the skin of *Halocynthia roretzi*

Amino acid	mol %
Aspartic acid	12.21
Glutamic acid	11.95
Lysine	2.52
Arginine	2.41
Threpmome	15.22
Valine	7.43
Isoleucine	5.12
Leucine	3.65
Phenylalanine	9.22
Alanine	6.68
Serine	9.63
Cysteine	2.14
Glycine	5.38
Tyrosine	1.53
Methionine	3.30
Histidine	1.60
Proline	—

Table 3. Fatty acid composition of the carotenoprotein from the skin of *Halocynthia roretzi*

Fatty		Composition(%)
Myristic	C _{14:0}	6.8
Palmitic	C _{16:0}	10.8
Aracgudic	C _{20:0}	3.8
Σ Satyrates		20.6
Myristoleic	C _{14:1}	8.1
Palmitoleic	C _{16:1}	11.4
Oleic	C _{18:1}	16.1
Gadoleic	C _{20:1}	2.9
Erucic	C _{22:1}	3.0
Σ Monoenes		41.5
γ-Linolenic	C _{16:3}	1.7
Linoleic	C _{18:2}	1.1
Linolenic	C _{18:3}	8.4
Arachidonic	C _{20:4}	3.9
Eucisaoeptaenoic	C _{20:5}	10.5
Docosapentaenoic	C _{22:5}	2.9
Docosahezaenoic	C _{22:6}	8.9
Σ Polyenes		37.4

요 약

우리나라 근해에서 대량 생산되고 있는 멍게껍질에서 Triton X-100을 사용하여 carotenoprotein을 추출하고, 20% (w/v) (NH₄)₂SO₄, Sephadex G-200 겔 크로마토그래피 그리고 DEAE-cellulose 이온교환수지로 정제하여 그 특성을 알아본 결과는 다음과 같다.

정제된 carotenoprotein의 정제도는 조추출물에 비해 6.2배 증가하였고, 수율은 7.4%였다. Carotenoprotein의 최대 흡수파장은 λ_{max} 495, 467 및 463nm였으며, 분자량은 약 326kDa (gel filtration) 이었고, SDS-PAG 전기이동으로 단백질의 subunit를 확인한 결과 84.1kDa와 74.4kDa으로 2개의 polypeptide로 이루어져 있었다. Carotenoprotein의 안정성은 pH 3.0 이하의 강산 및 pH 11.0 이상의 강알칼리에서는 단백질이 불안정하였고, SDS 변성제를 0.3% (w/v) 되게 첨가하여 녹인 후 가시부영역(340~580nm)에서 최대파장 변화를 보면 467nm에서 461nm로 약 6nm 단파장 영역으로 이동하는 분광학적 특성이 나타났다. Carotenoprotein의 아미노산 조성은 threonine, aspartic acid, glutamic acid 및 serine 등 산성 아미노산의 함량이 매우 높았으나, proline은 존재하지 않았다. Carotenoprotein 1g 당 총지질의 함량은 523mg이었고, 그 구성지방산의 조성은 monoene산이 41.5%로 가장 많았고 다음으로 polyene산(37.4%) 및 포화산(20.6%) 순이었다. 특히 EPA와 DHA의 조성비가 각각 10.5%, 8.9%씩 높게 나타났다.

참 고 문 헌

- Matsuno, T.: Xanthophylls as precursors of retinoids, *Pure Appl. Chem.*, 63, 81(1991)
- Krinsky, N. I. and Deneke, S. M.: Interaction of oxygen and oxyradicals with carotenoids. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 69, 205(1982)
- Krinsky, N. I.: Carotenoid protection against oxidation. *Pure Appl. Chem.*, 51, 649(1979)
- Deleo, V.A., Poh-Fitzpatrick, M., Mathews-Roth, M. and Harber, L.C.: Erythropoietic protoporphyria. *Am. J. Med.*, 60, 8(1976)
- Kligman, L.H. and Mathews-Roth, M.M.: Dietary β-carotene and 13-cis-Retinoic acid are not effective in preventing some features of UVB-induced dermal damage in hairless mice. *Photochem. Photobiol.*, 51, 733(1990)
- Katayama, T., Kunisaki, Y., Shimaya, M., Shimpson, K. L. and Chichester, C. O.: The biosynthesis of astaxanthin. XI V. The conversion of labelled β-carotene-15, 15'-3H₂ into astaxanthin in the crab, *Portunus trituberculatus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 46B, 269(1973)
- Garate, A. M., Milicua, J. C. G., Gomez, R., Macarulla, J. M. and Britton G.: Purification and characterization of the blue carotenoprotein from the carapace of the crayfish, *Procambarus clarkii*(Gurard). *Biochimica Biophysica Acta.*, 881, 446(1986)
- Milicua, J. C. G., Gomez, R., Garate, A. M. and Macarulla, J. M.: A red carotenoprotein from the carapace of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 818(4), 1023(1985)
- Zagalsky, P. F. and Herring, P. J.: 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(1971)
- Chen, H. M., Meyers, S. P., Hardy, R. W. and Biede, S. L.: Color stability of astaxanthin pigmented rainbow trout under various packaging conditions. *J. Food Sic.*, 49, 1337(1984)
- Davies, B. H.: Carotenoid metabolism as a preparation for function. *Pure Appl. Chem.*, 63, 131(1991)
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with The folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265(1951)
- Khare, A., Moss, G. P., Weedon, B. C. L. and Matthews, A.D.: Identification of astaxanthin in Scottish salmon. *Comp. Biochem. Physiol.*, 45B, 971(1973)
- McBeth, J. W.: Carotenoid from nudibranchs. *Comp. Biochem. Physiol.*, 41B, 55(1972)
- Davis, B. J.: Disc-electrophoresis II, method and application to human serum protein, *Ann. New York Acad. Sci.*, 121, 404(1964)
- Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*(London), 227, 680(1970)
- Andrew, P.: Estimation of the molecular weight of proteins by Sephadex gel filtration. *Biochem. J.*, 91, 222(1964)
- Bligh, E. G. and Dyer, W. J.: A rapid method of lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911(1959)
- Cheesman, D. F., Lee, W. L. and Zagalsky, P. F.: Carotenoproteins in invertebrates. *Biol. Rev.*, 42, 131

- (1967)
20. Millicua, J. C. G., Arberas, I., Barbon, P. G., Garate, A. M. and Gomez, R. : A yellow carotenoprotein from the carapace of the crayfish, *Astacus leptodactylus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 85B(3), 615(1986)
 21. Cheesman, D. F., Prebble, J. : Astaxanthin ester as prosthetic group ; A carotenoprotein from the hermit crab. *Comp. Biochem. Physiol.*, 17, 929(1966)
 22. 김재웅, 민태진, 이태영 : 연어알에서 분리한 Carotenoprotein의 구조적 특성. *대한화학회지*, 32, 377(1988)
 23. Thomas, K. H. and David, W. K. : A carotenoid-protein from cyanobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 637, 408(1981)
 24. Bernhard, K., Englert, G., Meister, W., Vecchi, M., Renström, B. and Liaaen-Jensen, S. : Carotenoids of the carotenoprotein asteriarubin. Optical purity of asterinic acid. *Helv. Chimica Acta.*, 65, 2224(1982)
 25. Garate, A. M., Urrechaga, E., Millicua, J. C. G., Gomez, R. and Britton, : A blue carotenoprotein from the carapace of the crab, *Carcinus maenas*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77B(3), 605(1984)
 26. Zagalsky, P. F. : Carotenoid-protein complexes. *Pure Appl. Chem.*, 47, 103(1976)
 27. Garate, A. M., Barbon, P. G., Millicua, J. C. G. and Gomez, R. : Chemical properties and denaturation of the blue carotenoprotein from *Procambarus clarkii*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 84B, 483(1986)
 28. 양현필, 이안종, 김용태, 김세권 : 진주담치 근육층의 적색 Carotenoprotein의 정제 및 특성. *한국수산학회지*, 27(5), 482(1994)
 29. Gomez, R., Rivas, J. D. L., Garate, A. M., Barbon, P. G. and Millicua, J. C. G. : Characterization of a blue astaxanthin protein from the carapace of the crayfish, *Astacua leptodactylus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 83B(4), 855(1986)
 30. Santoro, P., Guerriero, V. and Parisi, G. : An orange carotenoprotein from the marine sponge, *Axinella verrucosa*(O. Schmidt). purification and properties. *Comp. Biochem. Physiol.*, 97B(4), 645(1990)
 31. 이서구, 김재웅 : 대하(*P. orientalis*)로부터 분리정제한 Carotenoprotein의 특성에 관한 연구. *대한화학회지*, 38(8), 608(1994)
 32. Czczuga, B. : Investigations of carotenoprotein complexes in animals-VI. *Anemonia sulcata*, The representative of askeletal corals. *Comp. Biochem. Physiol.*, 75B, 181(1983)