

전복(*Haliotis discus hannai*) 내장에 함유된 지질 단백질 결합 카로티노이드

이태영 · 이대형 · 박수남

서울대학교 사범대학 화학교육과
(1984년 2월 5일 수리)

Lipoprotein Bound Carotenoids Occurred in the Viscera of Abalone (*Haliotis discus hannai*)

Tae-Young Lee, Dae-Hyung Lee and Soo-Nam Park

Department of Chemistry Education
College of Education, Seoul National University

Abstract

The lipoprotein-bound carotenoids occurred in the viscera of abalone (*Haliotis discus hannai*) were separated and characterized to be the mixture of fatty acid esters of lutein and free lutein.

The main fatty acid components of the esters were lauric (68%) and myristic acid (17%), and indicated the characteristic pattern compared with that of triglycerides and cholesterol esters in abalone. Patterns of carotenoids from the lipoproteins were simple and this suggested selected metabolisms of various feed-originated carotenoids found in the whole acetone extract of abalone.

서 론

패류의 내장(viscera)에 함유된 카로티노이드는 대부분 먹이에서 유래되므로,¹⁾ 그 분포는 조류, 프랑크톤, 규조종 패류가 선호하는 먹이의 양상과 패류에 있어서의 카로티노이드 대사에 관한 정보를 줄수 있다. 그럼에도 불구하고 패류 내장의 성분 카로티노이드에 관한 연구¹⁻⁹⁾는 비교적 드물다.

앞서 저자의 연구실에서는 야생굴 및 양식굴에 siphonein, siphonaxanthin, hydroxyechineone, lutein dianoxanthin 유사물, zeaxanthin 유사물, α -cryptoxanthin 등이 함유되어 있음을 밝힌 바

있고,⁶⁾ 홍합(*Mytilus edulis*)에서 mytiloxanthin 이외에 fucoxanthin, siphonaxanthin과 그 유사물,⁷⁾ 조개(*Saxidomus purpuratus*) 내장중의 주 색소는 fucoxanthin 유사물임을 분리⁸⁾한 바 있으며 전복(*Haliotis discus hannai*) 내장중에서 β -carotene, lutein, fucoxanthin, siphonein을 비롯한 총 11종류의 카로티노이드를 분리 확인⁹⁾한 바 있다. 본 연구에서는 전복내장을 완충염류용액으로 추출한 수용성의 단백질과 결합(또는 회합)한 카로티노이드(carotenoprotein)를 분리하고, 이것을 이루고 있는 그 카로티노이드 색소 및 에스테르를 이루고 있는 카로티노이드 에스테르의 지방산 성분의 분포를 살펴보고자 시도하였다.

실 험 방 법

1. 실험재료

실험에 사용한 시료는 1982년 8월 중순경 서울 남대문시장에서 구입한 여수 근해산의 생전복이다.

2. 시약 및 사용기기

추출 또는 전개용매로 사용한 아세톤, 에틸에틸, 메탄올, 에틸아세테이트, n-헥산, 디클로로메탄은 모두 실험실에서 분별종류를 통하여 재정제하였으며, 기타 특별히 언급하지 않은 한 모든 시약은 시판 일급 시약을 그대로 사용하였다. TLC에 사용한 silica gel은 Merck제 silica gel G 60과 0.2mm 두께로 precoat된 알루미늄판(Merck제, silica gel 60 F254)이며, 자외부 흡수 스펙트럼은 Varian Techtron Model 635로, 적외부 흡수 스펙트럼은 Unicam SP 100 IR spectrometer를 사용하였다. GC 장치는 Varian aerograph series 3200이었으며 column은 15% OV-275, 지지물은 W. AW. 80/100 mesh, 검출은 FID로 하였다.

3. 카로티노이드 색소의 분리

신선한 전복에서 절취한 내장을 즉시 pH 7, 0.05M 인산염 완충용액에 넣어 막자사발에서 분쇄한 다음, 원심분리기로 75×g에서 5분간 처리하여 육질부를 제거하였다. 이 상층액을 황산암모늄으로 50% 포화시켜 침전된 단백질을 분리하였다. 이것을 다시 pH 7.0의 인산염 완충용액에 녹인 다음 1,000×g에서 5분간 원심분리하여 용액의 상층에 든 부분(lipoprotein)과 하층에 침전된 부분을 분리하고, 기름층과 수용액층을 에틸에틸+아세톤(1:1) 혼합용매로 각각 3회씩 추출한 것을 모았다.

추출한 용액을 증류수로 씻고 무수 황산나트륨으로 탈수시킨 후 감압농축하였다. 이 농축액중의 색소들을 TLC로 분리하였으며 모든 조작은 광선을 피하여 암실의 어두운 적색 전등밑에서 행하였다. 사용한 전개용매제는 a) n-hexane, b) methylene chloride: ethyl acetate (85:15), c) n-hexane: ethyl ether: acetic acid (90:10:1), d) ethyl ether: n-hexane (1:4), e) methylene chloride: ethyl acetate: n-hexane (85:15:50)

등이다.

4. 색소의 분리 및 확인

전복 내장으로 부터 추출한 색소들을 CH₂Cl₂: ethyl acetate (85:15) 전개용매제 (나)를 사용하여 TLC로 분리하였다. 주색소들의 용출액은 다시 용매제 (다) n-hexane: ethyl ether: acetic acid (90:10:1)로 재전개하여 혼존하는 triglyceride를 제거시키고, 카로티노이드와 약간의 sterol가 섞인 획분을 얻었다. 이것을 다시 용매제 가) n-hexane으로 전개하여 sterol을 제거하고, 주색소인 순수한 카로티노이드를 얻었다.

5. 검출시험

각 색소는 같은 부피의 n-hexane과 85% 메탄올 사이에 분배시킨 것을 spectrometry 법으로 분배계수를 측정하여 친수성기의 다과를 추정¹⁰⁾ 하였으며, karrer의 방법^{11,12)}에 따라 epoxy기의 존재 여부를 염화수소에 녹인 에틸에틸과의 정색반응으로 조사하였다. 그리고 분리한 각 색소를 NaBH₄로 환원시킨 후 가시부 흡수 스펙트럼에서 최대흡수파장의 이동 여부를 검토하였다.¹²⁾

6. 지방산의 분석

분리한 각 카로티노이드 에스테르, triglyceride, sterol ester 들의 용출액을 각 2ml씩 취하여 10% alcoholic KOH를 1ml씩 넣고 30°C에서 24시간 어두운 곳에 방치하여 가수분해하였다. 증류수를 30ml씩 가하고 15ml씩의 에틸에틸로 추출하여 free 카로티노이드, sterol 등의 추출액을 얻었다. 한편 물층의 지방산의 염은 6N 염산으로 산성화한 후 15ml씩의 에틸에틸로 3회 추출한 것을 합쳐 농축하였다. 이것을 황산/메탄올 6% 용액에서 4시간동안 끓여 지방산 에스테르를 얻은 다음 GC로 triglyceride, sterol ester, 카로티노이드 에스테르중의 지방산 조성을 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 전복내장 지질 단백질 분획에서 분리된 색소

전복의 내장으로 부터 분리한 지질 단백질에서 추출한 색소들의 크로마토그램은 Fig. 1과 같다. 이중 색소 주성분인 각 색소의 가시부 흡수 스펙트럼은 Fig. 2, 3과 같으며, 각 색소의 R_f 값 및 최대흡수파장은 Table 1과 같다.

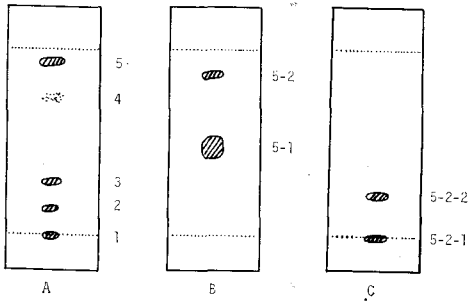


Fig. 1. Thin-layer chromatograms of the pigment extracts of the viscera of abalone (*Haliotis discus hannai*)

*Developing solvent A) CH₂Cl₂ : ethyl acetate=85 : 15
 B) n-Hexane : ethyl ether : acetic acid=90 : 10 : 1
 C) n-Hexane

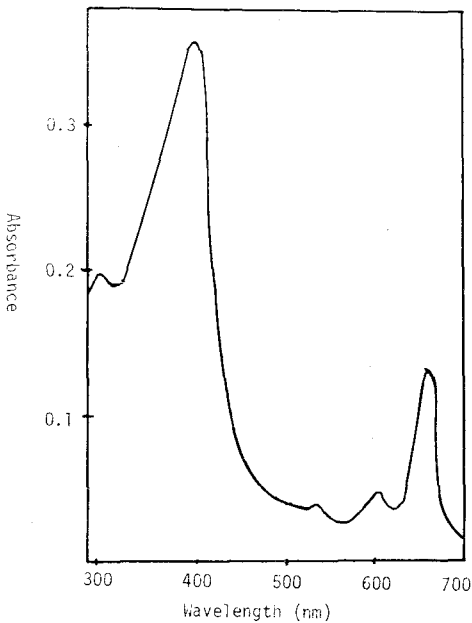


Fig. 2. Visible absorption spectrum of the pigment 1 in methanol.

Phaeophytin a: 색소머 1은 Fig. 2의 가시부 흡수 스펙트럼에서 λ_{max} 가 314, 413, 542, 603 및 659nm로 나타났다. 이것을 녹엽에서 분리한 phaeophytin a의 표준물질과 비교한 결과, phaeophytin a로 추정되었다.

Lutein: 색소머 3은 가시부 흡수 스펙트럼에서

λ_{max} 가 423, 424, 476nm로 나타났다. 이 색소머의 카로티노이드는 epoxy 시험결과 아무런 정색반응이 일어나지 않는 것으로 미루어 epoxy group은 없는 것으로 판명되었으며, NaBH₄로 환원시킨 후의 가시부 흡수 스펙트럼에서 흡수 극대의 파장 이동이 없으므로 ionone 고리나 직선 사슬위에 carbonyl기, 혹은 conjugated carbonyl기가 없다는 것을 알수 있다.¹³⁾ 적외부 흡수 스펙트럼에서도 carbonyl기의 특징적인 1650~1750cm⁻¹의 흡수를 관찰할 수 없었다. 또한 n-hexane과 85% 메탄올 간의 분배시험에서

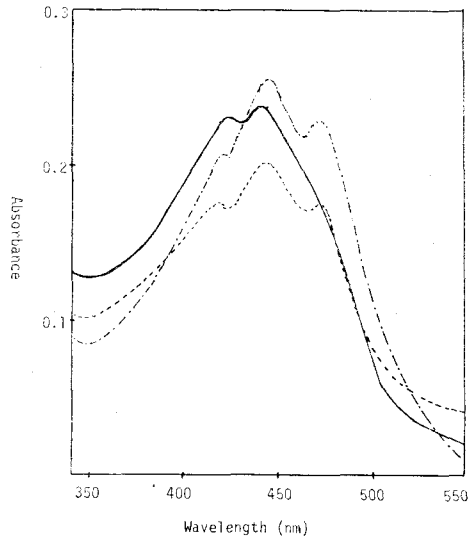


Fig. 3. Visible absorption spectra of the pigments in methanol
 — 2, 3, - · - · - 5,

Table 1. Rf values and absorption maxima of the pigments.

| No. of pigment | Rf value | Absorption maxima (nm) |
|----------------|----------|-------------------------|
| 1 | 0.00 | 314, 413, 542, 603, 659 |
| 2 | 0.15 | 444, 428 |
| 3 | 0.30 | 423, 446, 476 |
| 4 | 0.78 | |
| 5 | 0.97 | |
| 5-1 | 0.50 | |
| 5-2 | 0.88 | |
| 5-2-1 | 0.00 | |
| 5-2-2 | 0.25 | 421, 444, 474 |

Table 2. The properties of abalone carotenoids.

| Properties | Pigment | | | |
|---|--------------------------------|-----------------------|----------------------------|----------------------------|
| | Lutein (Authentic) | 2 | 3 | 5 |
| Absorption maxima | 422, 444, 474 (in n-Hexane) | 444, 428 (in MeOH) | 423, 446, 476 (in MeOH) | 421, 444, 474 (in MeOH) |
| Epoxy text | Negative | Negative | Negative | Negative |
| Partition ratio in n-hexane-85% MeOH | 30.2 : 69.8 | 0 : 100 | 30 : 70 | 100 : 0 |
| Rf value | 0.27 | 0.15 | 0.30 | 0.97 |
| NaBH ₄ Reduction | Not reacted | — | Not reacted | Not reacted |

*Developing solvent CH₂Cl₂ : ethyl acetate=85 : 15

30 : 70 으로 분배한 것으로 미루어 이 카로티노이드에는 hydroxy기가 최소 2개 있다는 것을 추측할 수 있다. 이 hydroxy기는 적외부 흡수 스펙트럼에서 3300cm⁻¹ 근방의 흡수로 확인할 수 있었다. 이러한 사실들을 시금치에서 추출 분리한 표준 lutein 과 비교하여 본 결과는 Table 2 와 같다. 표로부터 Rf 값, 가시부 스펙트럼의 λ_{max}와 더불어 모든 면에서 표준 lutein 과 일치하였다.

Lutein-fatty acid ester: 5 번째 색소의 가시부 흡수 스펙트럼의 λ_{max}, Rf 값, 그리고 epoxy 시험, 분배시험, 환원시험의 결과는 Table 2 에 요약된 바와 같다. λ_{max}는 발색단 부분이 lutein 과 같기 때문에 lutein과 동일한 값으로 나타났다. 분배시험에서 완전히 n-hexane 층으로 분배되었다는 사실로 보아서 hydroxy기는 없다는 것을 알 수 있으며, lutein의 두 hydroxy기가 다른 지방산과 에스테르를 이루고 있으리라는 추측을 가능케 한다. 이 색소를 가수분해한 후 추출해서 얻은 카로티노이드는 lutein과 완전히 일치하였다. 가수 분해시킨 것의 적외부 흡수 스펙트럼에서 OH기의 흡수가 나타나고 카르보닐기의 흡수가 없어진 것을 확인할 수 있었다. 기타 성분들 : 색소 2의 가시부 흡수 스펙트럼은 λ_{max}가 428, 444nm에 나타났다. Epoxy 시험의 결과는 음성이었고 분배시험에서는 거의 완전히 85% 메탄올층으로 분배한 것으로 미루어 hydroxy기 같은 친수기가 3개, 혹은 그 이상 있는 것으로 추측된다.¹⁰⁾ NaBH₄로 환원시켰을 때 가시부 흡수 스펙트럼의 λ_{max}는 407, 422, 448nm로 22nm blue shift 하였다. 이러한 결과만으로 구조를 단정하기는 어려우나 ionone 고리가 아닌 사슬에 carbonyl기를 포함한 카로

티노이드로 아마도 fucoxanthin의 유사물로 추정된다.

2. 전복내장 지질 단백질층의 카로티노이드 색소의 특징

이상에서 보는 바와 같이 8월에 수집한 여수 근해산 전복내장의 지질 단백질에 함유된 카로티노이드의 조성은 대부분 lutein esters와 lutein 만으로 지극히 단순한 카로티노이드 분포상을 보여 주고 있다. 이것은 같은 시기에 수집한 전복내장에서 아세톤으로 추출할 때 분리되는 다양한 카로티노이드 분포 즉 내장의 전 추출물중에서는 lutein 이외에도 β-carotene, zeaxanthin, fucoxanthin, siphonin 및 siphonaxanthin 등⁹⁾을 볼 수 있는 것과 매우 재미있는 대조를 이루고 있다. 이것은 유기용매에 의한 전 추출물중에는 먹이에서 유래된 각종 카로티노이드와 더불어 대사된 카로티노이드를 함께 보여주는데 대해서, 단백질과 결합한 carotenoprotein은 대사과정에서 선택적으로 lutein을 취하여 지방산의 에스테르를 만들고 있음을 보여주는 것이라 하겠다.

3. 전복내장 지질 단백질에서 분리한 lutein ester, triglyceride 및 sterol ester의 성분 지방산의 조성

이상과 같이 밝혀진 전복 내장내의 주색소인 lutein ester와 triglyceride, sterol ester의 각 지방산을 분석한 결과는 Fig. 4, 5, 6 및 Table 3 과 같다. Lutein ester의 경우 성분지방산은 탄소 12개의 lauric acid와 탄소 14개의 myristic acid가 대부분을 차지함을 알 수 있다. 즉 전복 내장중의 색소는 아래 그림과 같이 lutein 과 lauric acid와 의 에스테르가 전체의 68%를 차지하고 있음을

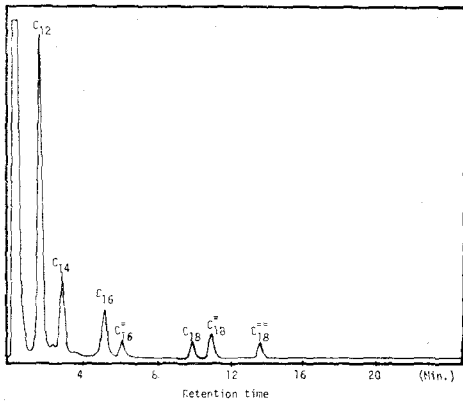


Fig. 4. Gas chromatogram of fatty acids occurred in lutein esters isolated from viscera of abalone.

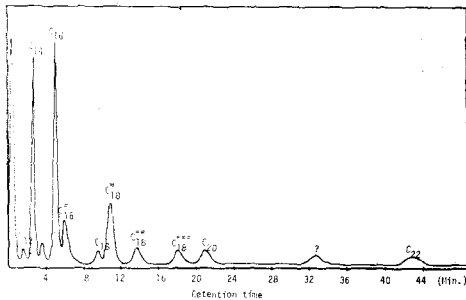


Fig. 5. Gas chromatogram of fatty acids occurred in triglycerides isolated from viscera of abalone.

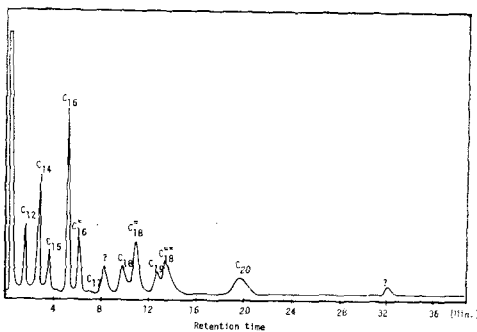


Fig. 6. Gas chromatogram of fatty acids occurred in sterol esters isolated from viscera of abalone.

알 수 있다.

Triglyceride와 sterol ester의 구성 지방산 조성을 살펴보면 lutein ester의 구성 지방산과는 달리 lauric acid나 myristic acid가 적고 다른 불포화

지방산이 대부분이다. 즉 전복 내장중의 주색소인 lutein ester를 구성하고 있는 지방산 조성은 중성 지방이나 sterol을 구성하고 있는 지방산과는 판이한 양상임을 알 수 있다. 이것은 매우 흥미있는 사실로서 식물체내에서는 과일과, 가을에 단풍이 든 잎에서는 비교적 높은 농도의 palmitic acid의 에스테르 등이 분포되고 있으나,¹⁴⁾ 동물체내 카로티노이드의 지방산 조성에 대한 보고는 별로 많지 않다. 이 lutein ester의 존재는 카로티노이드 대사나, 무척추동물의 생활환경과 관련지어서 어떤 합목적성을 가진 것이 아닌가 하는 합추정도 생각할 수 있다.

요 약

전복 내장중에 지질단백질과 결합한 카로티노이드 색소를 추출하고, 확인하여 본 결과, 주성분은 lutein의 지방산 에스테르와 lutein임이 밝혀졌다. 에스테르를 이루고 있는 성분 지방산은 주로 lauric acid (68%)와 myristic acid (17%)였으며, 이것은 전복내의 triglyceride나 cholesterol ester의 성분 지방산과는 판이한 양상을 보여 주고 있다. 전복의 선택적 대사에 의한 간단한 카로

Table 3. Fatty acid composition of lutein esters, sterol esters and triglyceride occurred in the viscera of abalon.

| Fatty acids | % Composition | | |
|--------------------|---------------|----------------|---------------|
| | Lutein esters | Sterol esters. | Triglycerides |
| Lauric acid | 67.9 | 1.6 | 0.4 |
| Myristic acid | 16.6 | 7.1 | 15.2 |
| Pentadecanoic acid | — | 1.8 | 1.4 |
| Palmitic acid | 7.1 | 20.4 | 27.7 |
| Palmitoleic acid | 1.6 | 6.0 | 7.1 |
| Magaric acid | — | 1.7 | 1.4 |
| ? | — | 5.4 | — |
| Stearic acid | 1.6 | 5.7 | 2.2 |
| Oleic acid | 2.8 | 12.3 | 16.1 |
| Linoleic acid | 1.8 | 5.9 | 4.0 |
| Linolenic acid | — | — | 4.0 |
| Arachidic acid | — | 14.0 | 7.6 |
| ? | — | 6.0 | 5.8 |
| Behenic acid | — | — | 5.0 |

티노이드의 양상은 건복내장의 카로티노이드를 아세톤으로 추출했을 때의 전 추출물이 보여주는, 아마도 먹이에서 유래된 다양한 카로티노이드 분포와는 대조적으로 lutein만 선택적으로 대사됨을 보여주고 있다.

참 고 문 헌

1. Jagima, M., Ikemori, M. and Arasaki, S.: Bull Jap. Soc. Sci. Fisheries, 46 : 445, 517 (1980)
2. Shimizu, T. and Uchida, K.: Nippon Suisan Gakkashi, 34 : 154, 159, 503, 627(1968)
3. Campbell, S.A.: Comp. Biochem. Physiol., 32 : 97 (1970)
4. Goodwin, T.W.: Biochem. et Biophys. Acta, 10 : 114 (1953)
5. Ohta, Y.: Nippon Suisan Gakkaishi, 34 : 210 (1968)
6. Lee, Tae-Young: Unpublished data
7. Choi, K.S.: MED thesis, Seoul National Univ., (1975)
8. Kim, S.O.: MED thesis, Seoul National Univ., (1975)
9. Ahn, Seung-Yo: J. Korean Agr. Chem. Soc., 17 : 257 (1974)
- 10) Peracek, F.J. and Zechemeister, L. Anal. Chem., 28 : 1484 (1956)
11. Karrer, P. and Jucker, E.: 'Carotenoid', Elsevier Pub. Co., (1950)
12. Isler, O.: 'Carotenoid', Birkhauser Verlag, Basel (1971)
13. Walton, T.J., Britton, G. and Goodwin, T. W.: Phytochem., 9:2545 (1970)
14. Kuhn, R., Winster, A. and Lederer, E.: Hoppe-Seyl. Z., 197 : 141 (1931)