

연어알에서 분리한 Carotenoprotein의 구조적 특성

*金在雄 · 閔泰鎮 · 李泰寧**

*柳韓工業專門大學 東國大學校 化學科

**서울大學校 化學教育科

(1988. 2. 19 접수)

Subunits and Composition of Carotenoprotein from Salmo Salar Eggs

Jae-Woong Kim, Tae-Jin Min*, and Tae-Young Lee**

Department of Food and Nutrition, Yuhan Technical college, Seoul 150-71, Korea

*Department of Chemistry, Dongguk University, Seoul 100-717, Korea

**Department of Chemistry, College of

Education, Seoul 151-742, Korea

(Received February 19, 1988)

요 약. 연어알(Salmo Salar)에서 carotenoprotein을 CM-셀룰로스, 50% 황산암모늄 침전, DE-AE-셀룰로스 및 세파덱스 G-75 겔을 사용하여 충분히 정제하였다. 인산염 완충용액(pH 7.0)에서 자외선 흡수극대는 λ_{max} 409, 540 그리고 580nm이었다. 세파덱스 G-200 겔 여과법으로 측정된 분자량은 50,200과 26,000 달톤으로 heterogeneous한 두가지 형태였다. 전자는 적자색으로 SDS-PAGE 전기영동 결과 분자량이 12,500 달톤인 4개의 동일한 subunit로 구성되어있고 상당량의 지질과 탄수화물, 갈락토스와 글루코사민을 함유하고 있음을 밝혔다. carotenoprotein의 색소를 추출하여 tlc로 정제한 다음 분배비 시험, 요오드 시험, 에폭시 그룹 시험, 알릴릭 시험, 환원 시험 그리고 아세틸화 시험등의 유기반응과 uv/vis, ir 및 nmr 데이터를 얻어 구조를 결정한 결과 carotenoid는 astaxanthin ester임을 확인하였으며 그 ester는 스테아르산(47.9%)과 팔미트산(21.4%)이 대부분이었다.

ABSTRACT. Carotenoprotein from *Salmo Salar* eggs was purified and characterized by CM-cellulose, 50% $(NH_4)_2SO_4$, DEAE-cellulose and sephadex G-75 column. The chromoprotein had a spectrum with λ_{max} 409, 540 and 580nm in *p*-buffer (pH 7.0) at initial step. Molecular weights by sephadex G-200 gel filtration were 50,200 and 26,000 daltons. SDS-PAGE analysis showed a structure with four identical subunits (12,500 daltons). Its sample retained a small amount of carbohydrates and lipids. Amino acids were analyzed, and mannose, galactose and glucosamine also were identified. Carotenoid extracted with acetone was found to be astaxanthin ester by partition test, epoxy test, iodine test, allylic test, reduction, acetylation, uv/vis, ir and nmr datas. Stearate (47.9%) and palmitate (21.4%) were predominant fatty acids in the astaxanthin ester.

서 론

Carotenoids는 다양한 분포와 형태로 자연계에 존재한다. 이 분야 연구는 일찍부터 이루어

져서 현재 많은 종류가 밝혀졌다. 따라서 식품 산업에서는 그들이 천연 colorants 등 첨가물로 이용되고 있으며, 영양 생리면에서는 비타민 A의 전구물질로 visual process에 관여 한다는 것

은 널리 알려진 사실이다. 최근의 연구 동향은 천연의 발암제와 돌연변이 유발성 물질들이 체내에서 자발적 또는 photodynamic 손상¹에 의한 oxygen radical 생성이나 lipid peroxydation으로 부터 free-radical trap 작용으로 인한 생체막의 보호기능^{2,3}과 항산화 효과⁴에 따른 생체의 노화방지, protoporphyrias 유전병 치료⁵, 특히 β -carotene 과 비타민 A 유도체들의 항암효과와 발암 억제작용에 대한 임상적인 연구가⁶⁻¹¹ 진행되어 의약적인 측면에서도 그 중요성이 강조되고 있다. 또한 생리적인 의의를 밝히고져 수용성 단백질과 결합된 carotenoprotein 들이 marine invertebrates¹²⁻¹⁴ A. rubens¹⁵, lobster shell 과 ovoidin¹⁶⁻¹⁷, 그리고 S. obliquus D₃¹⁸ 등 여러가지 조식들로 부터 분리 되었으며 식물이나 광합성하는 미생물에서도 carotenoid 역할에 대한 연구들이 많이 수행되어 왔으나 아직도 그 생화학적 기능들이 확실히 밝혀지지 못한 실정이다. 본 연구에서는 어란 부화와 관련하여 carotenoid 및 단백질의 본성을 규명 하고져 야생 연어알을 시료로 carotenoprotein 을 추출 정제하여 subunits 와 그 조성, 그리고 carotenoid 의 구조적 특성을 우선 밝혔다.

실험 방법

실험재료. 12월 초 동해안에서 생포한 산란 직전의 연어알을 시료로 하였다. 사용 시약 중 CM-cellulose, DEAE-cellulose, sephadex G-75, sephadex G-200, blue dextrane, bovine serum albumin, egg albumin, cytochrome C, myoglobin, mannose, galactose, glucosamine, Dowex 1×8 및 Dowex 50W 등은 Sigma Co 제품을, N, N, N', N'-tetramethylethylene diamine, N, N-methylene-bis acrylamide 및 acrylamide 등은 Wako Co 제품을, 그 외의 다른 시약도 분석용 특급을 사용하였다.

Carotenoprotein 의 분리와 정제. Zagalsky 등의 방법¹³을 변형하여 carotenoprotein 을 분리한 다음, 여러가지 컬럼을 이용하여 전보¹⁹에서와 같이 정제하였다. 모든 조작은 4°C 냉암소에서 실시하였다. 단백질 정량은 bovine serum albumin

을 표준으로 하여 Lowry법²⁰으로, 총 carotenoid 는 carotenoprotein 의 단백질을 변성시키고 carotenoid 를 추출하여 McLaren법²¹으로 정량하였다.

Sephadex G-200 gel filtration. 분자의 크기를 결정하는 데는 침강원심분리법, 농도 기울기 원심분리법 및 전기영동법 등도 있으나, 여기서는 sephadex G-200 겔 여과법을 이용하였다. 공격체적(V₀)은 blue dextrane 으로 측정하였고 표준 단백질로는 cytochrome C, myoglobin, egg albumin 및 bovine serum albumin 을 사용하였다.

Disc-및 SDS-PAG 전기영동. Lugtenberg 방법²²에 따라 분리용 gel 을 각각 제조하였다. 표준 단백질은 myoglobin, egg albumin 과 bovine serum albumin 을 사용하였고, 전기영동 방법 및 densitometer 측정 조건도 전보와 같다.

결합당의 분석. Peterson 방법²³을 변형하여 2 N 염산으로 6 시간 동안 가수분해, 여과한 다음, 미리 활성화 시켜 둔 Dowex 1×8 (200 mesh)와 Dowex 50W (400mesh) 컬럼으로 정제하였다. 중성당의 함량은 anthrone 법으로 620nm 에서, 아미노당은 Ludowbieg 법²⁴으로 550nm 에서, 그리고 개별 당의 함량은 Shimadzu 액체 크로마토그래피 (LC)로 각각 정량하였다.

아미노산 분석. 일반적인 아미노산 분석조건에 따라 carotenoprotein 을 20시간 동안 가수분해시킨 다음, 염산을 감압 제거하고 OPA 를 사용하여 HPLC(Waters 244)로 분석 정량하였다.

carotenoid 구조 결정. Khare 등 방법²⁵에 따라 정제된 carotenoprotein 에 3 배량의 아세톤을 가하여 단백질을 변성시키고 carotenoid 를 추출하였다. 다시 잔사가 무색이 될 때까지 석유 에틸로 충분히 추출하여 합치고 용매를 제거 농축하였다. 전개 용매로 *n*-hexane-acetone(7 : 3)²⁶, benzene-ethylether-methanol(17 : 2 : 1)²⁷⁻²⁸ 그리고 petroleum ether-acetone(7 : 3)²⁹을 각각 사용하여 마이크로 t.l.c. 판으로 분리하였다. 분리 정제된 carotenoid 의 구조적 특성을 알기 위하여 분배비, NaBH₄ 환원, acetylation, photoisomerization, allylic hydroxy group, acetonide

및 epoxy 시험 등 유기 반응을 통하여 functional group을 확인³⁰ 하였으며 UV(Shimadzu 240), IR(Nicolet FT-IR) 그리고 NMR(Varian-EM 360) data를 얻어 최종 구조를 결정하였다.

지방산 분석, 단백질과 결합되었던 esterified carotenoid를 t.l.c.로 순수하게 분리하여 질화시킨 다음, 유리된 지방산을 메틸화하고 OV-275 컬럼을 장착한 GC(Shimadzu GC-4B)로 분석하였다.

결과 및 고찰

Carotenoprotein의 분리와 정제. 실험방법에서와 같이 CM-cellulose, 반포화(NH₄)₂SO₄ 침전, DEAE-cellulose, sephadex G-75 겔 순서로 컬럼 크로마토그래피하여 carotenoprotein이 정제되었다. Fig. 1은 0.05M 인산염 완충용액으로 평형시킨 DEAE-cellulose 컬럼 상에서 용출된 carot-

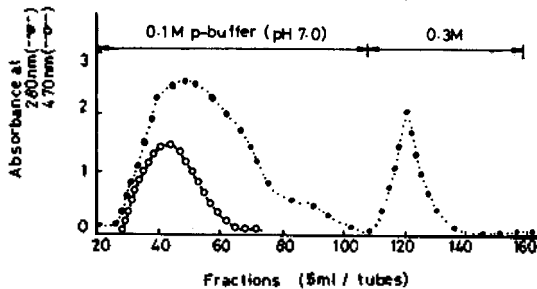


Fig. 1. Elution profile of carotenoprotein from DEAE-cellulose column (2.7×40cm) by stepwise gradient with 0.1M and 0.3M phosphate buffer (pH 7.0).

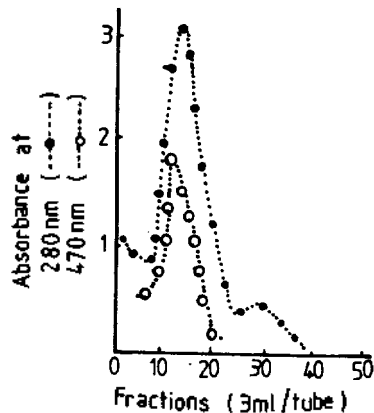


Fig. 2. Sephadex G-75 column chromatography of carotenoprotein.

Table 1. Purification of Carotenoprotein from *Salmo Salar* Eggs

Procedure	Volume (ml)	Total protein (mg)	Carotenoprotein (mg)	Purification (C/T)	Yield (%)
Homogenate	1,360	8,300	8.4	1	100
50% (NH ₄) ₂ SO ₄	477	345.5	3.8	11	45.2
DEAE-cellulose	145	44.8	2.6	58	30.9
Sephadex G-75	32	18.7	1.7	91	20.2

enoprotein의 elution profile이다. 0.1M과 0.3M 인산염 완충용액 (pH 7.0)으로 다단 용출시킨 결과 30~60 fractions 사이에서 carotenoprotein이 완전히 용출되었다. Fig. 2는 sephadex G-75 겔 컬럼 상에서 최종 정제된 것이며, 확인 monitor는 spectrophotometer로서 흡수 파장은 각각 280nm와 470nm였다. Table 1은 정제 단백질과 총 carotenoid량을 각각 정량하여 정제도를 산출한 결과인데 carotenoprotein 1g당 carotenoid 함량은 0.18 μ g이었고, homogenate에 비해 91배 정제되었으며 회수도는 20.2%이었다. 이 carotenoprotein을 5% preparative Disc-PAG로 전기영동한 결과 heterogeneous한 두 가지 형태의 단백질로 분리되었다. 이것을 densitometer (Toyo DMU-33C)로 측정된 결과는 Fig. 3-A와 같다.

Sephadex G-200 gel filtration 및 SDS-PAG. Carotenoprotein의 전체 분자량을 결정하기 위하여, 0.05M 인산염 완충용액 (pH 7.0)으로 평형시킨 sephadex G-200 겔 컬럼 chromatography하여 void volume (V₀)과 elution volume (V_e)들의 비를 구하고 표준 단백질의 분자량에 대하여 도시한 결과는 Fig. 4와 같다. 두 종류 (α , β -form)로 분리된 carotenoprotein들의 V_e/V₀비는 1.75 및 1.60이며 분자량이 각각 26,000과 50,200 daltons이었다. 분자량이 적은 것은 비 당질성 monomeric form이었고, 분자량이 큰 적자색 β -form은 당류와 지질을 함유하고 있으며 이것을 0.2% SDS-PAG 전기 영동한 결과 BPB를 기준한 이동도 0.8에서 단일 밴드로 나타났다. 이 subunit를 620nm에서 densitometer로 scanning한 것이 Fig. 3-B이다.

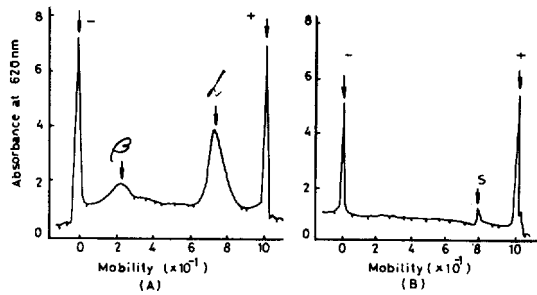


Fig. 3. Scanning densitograms on Disc- and SDS-PAGE of carotenoprotein. (A) Disc-PAGE, (B) 0.2% SDE-PAGE, slit, 0.2x2mm; intensity, 30.

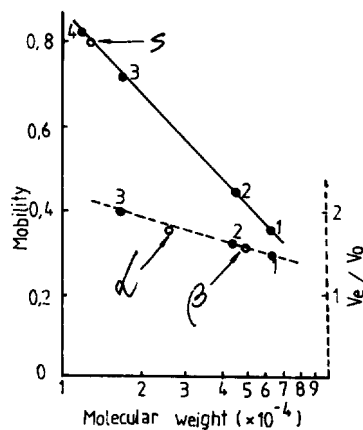


Fig. 4. Molecular weight estimation of carotenoprotein. ---○---; sephadex G-200 gel filtration. —●—; SDS-PAGE. V_e/V_o and mobility were plotted against molecular weight ($\times 10^{-4}$), respectively. (1) bovine serum albumin (mol. wt. 66,000), (2) egg albumin (mol. wt. 45,000), (3) myoglobin (mol. wt. 17,200), (4) cytochrome C (mol. wt. 11,700).

이것을 반 대수 좌표로 환산하여 얻은 분자량은 12,500 daltons에 해당하였다(Fig. 4). Ceccaldi 등³¹은 *A. antennatus*의 위벽에서 α -form과 β -form인 자색의 carotenoprotein을 정제하였으며 astaxanthin 함량을 기준하여 분자량이 각각 3.1×10^4 과 3.6×10^4 daltons라 보고하였다. 이들은 α -crustacyanin 및 β -crustacyanin 것과 유사한 것으로 polymeric 구조로 되어 6.5×10^5 daltons의 거대한 분자를 이룬다고 시론했었다. Zagal'sky^{13,14}에 의하면, 수 종류의 marine products 조직에서 분리된 carotenoprotein 들은 형태적으로

α -form과 β -form이 존재하며, native 혹은 α -form은 분자량이 보통 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ 이고 낮은 이온강도에서는 분해되어 자색으로 되며, β -form은 주로 $4 \sim 5 \times 10^4$ 의 분자량을 갖는다고 하였다. 이들은 아세톤 처리로 간단히 apoprotein이 되며 전기영동 하면 heterogeneous하고 분자량이 $1.8 \sim 2.6 \times 10^4$ 정도로 종류와 조직에 따라서는 $0.8 \sim 1 \times 10^4$ 이 된다고 하였다. 또 lobster carapace로부터 분리된 것은 astaxanthin 기준으로 4.4×10^4 이며 λ_{max} 409nm에서 최대흡수를 갖는다고 하였다. 이와같이 조직에 따라 astaxanthin이 여러분자의 heterogeneous한 단백질과 강한 hydrophobic binding 및 수소결합을 하여 분자량이 불과 수 만에서 100만 daltons로 다양하게 거대분자인 carotenoprotein을 이루어 생체조직의 보호그룹으로 작용한다고 해석되고 있다. 또한 Elgsaester 등¹⁵은 star fish인 *A. rubens*에서 분리한 carotenoprotein의 한 성분은 554nm에서 최대흡수를 가지며, 5~17%의 당류와 지질을 포함한 glycoprotein으로서 분자량은 $0.8 \sim 1 \times 10^5$ 이고 동일한 subunit($M_w = 12,800$ daltons)을 갖는다고 하였다. Britton 등³²은 *M. glacialis*에서 자색과 청색 두 종류의 carotenoprotein을 추출하였는데, 하나는 555nm에서, 또 하나는 463, 489 그리고 600nm에서 최대 흡광도를 가지며, 겔 여과하면 분자량이 각각 4.3×10^4 과 7.2×10^4 이고 SDS-PAG 전기영동 결과 각각 10,750과 16,000 daltons인 4개의 subunit로 구성되었고, 당류는 포함되지 않았다고 하였다. 산호의 carotenoprotein(alloporin)도 분자량이 6.8×10^4 이며 4개의 subunit로 구성되었다고 한다. 본 실험에서 preparative Disc-PAG 전기영동 및 겔 여과법으로 얻어진 연어알의 carotenoprotein도 heterogeneous한 두 종류의 단백질로 분리되었다. 분자량이 각각 50,200과 26,000 daltons이며, 그 중 하나는 상당량의 지질과 당을 함유한 lipoglycoprotein이었다. 이와 같은 사실은 위에 소개된 보고들과도 일치하는 점이 많고 0.2% SDS-PAG 전기영동 결과 등으로 미루어 4개의 subunit를 가진 것으로 판단하였다. gel filtration이나 SDS-PAG 전기영동에서 고려될수 있는 단

백질의 변성, 지질의 유리, 폴리펩티드 사슬의 용고 및 효소작용 등 그 밖의 영향 인자들은 추후 논의되겠으나 다만 *A. rubens*¹⁵와 *Lobster*¹⁷에서 분리된 carotenoprotein과 비교할 때 단백질 구조가 다소 불안정하고 함량이 적은 형태라고 짐작되었다.

결합당의 조성. 가수분해된 당을 활성화 시킨 양이온과 음이온교환수지 컬럼으로 정제하였다. anthrone 법으로 이 중성당을 정량한 결과 3.75%이었고, LC로 측정된 개별당의 함량은 Fig. 5 및 Table 2와 같다.

Carotenoprotein과 결합한 중성당은 mannose와 소량의 galactose였으며 그함량은 각각 3.6%와 0.15%이었다. 양이온수지에 흡착된 아미노당을 다사 2N 염산으로 용출, LC로 분석한 결과 glucosamine 만이 확인되었고 함량은 1.46%이었다.

아미노산 조성. HPLC로 아미노산을 분석한 결과는 Fig. 6 및 Table 3과 같다. Glu, Ala 및 Gly의 함량이 많았으며 Met은 흔적량이 검출되었다. Hydrophobic 그룹은 41%, helix promoting 그룹은 40%, charged 그룹은 22.7%, hydrogen bonding 그룹은 19.7%, helix breaking 그룹은 17.7%, apolar residues는 24% 그리고 polarity index는 40.4%이었다.

Carotenoid 구조 결정. Carotenoprotein을 저온에서 아세톤으로 처리하여 단백질을 변성시키고 유리된 carotenoid는 t.l.c.로 정제하였다. 두 가지 전개용매 *n*-hexane-acetone(7:3)과 benzene-ethylether-methanol(17:2:1)을 사용하여 실리카겔 G를 입힌 마이크로 t.l.c. 판에 전개시킨 결과 Rf 0.52와 0.75에서 각각 단일 성분으로 나타났으며 석유에틸 용매에서 흡광도는 λ_{max} 471nm였다. 90% methanol-*n*-hexane 포화 용매계에서 분배실험 결과 88:12로 epiphasic하였다. 알칼성 KOH로 검화시킨 반응물은 완전히 hypophasic하게 되며 *n*-hexane층 사이에서 interfacial salt를 형성하였다. 따라서 *H. crab*³³에서 분리된 것과 비교하여 esterified carotenoid임을 추정하고 더욱 실험을 진행시켰다. 반응 생성물을 추출, 농축하여 전개용매

Table 2. Compositions of carbohydrates

Carbohydrates	Relative Wt. %	mg/protein (100mg)
Neutral sugars		
mannose	96.4	3.6
galactose	3.6	0.15
Amino sugars		
glucosamine		1.46

Table 3. Amino acid composition of carotenoprotein

Amino acids	Wt. %	mol. %	Amino acids	Wt. %	mol. %
ASP	6.5	5.7	MET	trace	
THR	9.1	8.9	ILE	5.7	5.0
SER	7.1	7.8	LEU	8.0	7.0
GLU	13.7	10.6	TYR	1.6	1.0
PRO	1.0	1.0	PHE	4.2	2.8
GLY	10.1	15.6	HIS	1.3	1.0
ALA	13.1	17.0	LYS	5.6	4.4
VAL	9.3	9.2	ARG	3.0	2.0

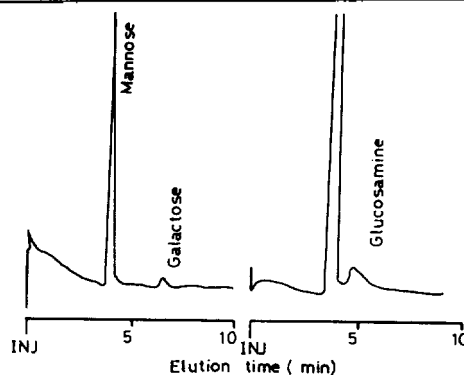


Fig. 5. Separation of sugars in carotenoprotein by LC. column, μ -Bonda PAK C₁₈; solvent, H₂O-CH₃CN (18:85); flow rate, 2ml/min.

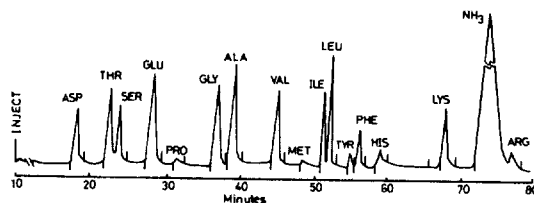


Fig. 6. Amino acids analysis in carotenoprotein by HPLC. column, μ -Bonda PAK C₁₈ (0.4mm×30cm); mobile phase, 10mM Na₂HPO₄ (pH 7.2); flow rate, 2ml/min; detector, fluorescence with OPA.

petroleum ether-acetone(7 : 3)으로 분리한 결과, 원점(red)과 Rf 0.53 지점에 흡착강도가 서로 다른 두 가지 성분으로만 분리되었다. 벤젠 용매에서 그들의 흡광도는 각각 λ_{max} 495nm와 λ_{max} 488nm이었다.

이 사실은, 적자색의 원점 성분은 알카리 처리 과정 중에 astaxanthin이 부분적으로 산화되어 생성된 astacene이며 따라서 흡착성이 커지고 흡수 스펙트럼이 7nm bathochromic shift한 것으로 생각되었다. 또한 methanol 용매속에서 NaBH₄로 환원시킨 생성물은 λ_{max} 450nm에서 최대 흡광도를, λ_{inf} 422nm에 inflexion, λ_{sub} 479nm에 subsidiary를 가지고 있었다. 결국 최대 흡수 파장에서 21nm hypsochromic shift하였다. 이것은 고리내의 carbonyl group이 hydroxyl group으로 바뀐 것으로 판단되었다. photoisomerization에서 blue shift가 없었던 점으로 보아 분자내에 acetylenic bond는 없으며 epoxide group도 확인되지 않았다. 그러나 allylic hydroxy group, acetonide 그리고 acetylation 반응은 t. l. c. 상에서 확인되었다. Acetylation 반응³⁵ 생성물은 최대흡광 파장이 5nm hypsochromic shift하였다.

이 사실로 UV 스펙트럼 해석상 -OH 그룹이 acetyl group으로 전환 되었음을 추측할 수 있었다. 실험결과는 Fig. 7과 Table 4에 요약되었다. 전개용매 petroleum ether-acetone(7 : 3)으로 분리 정제된 carotenoid의 IR 스펙트럼 특성은 Fig. 8과 같다. δ_{max} 3500cm⁻¹ (O-H stretching), 3010, 2970, 2930 및 2870cm⁻¹ (C-H stretching), 1740cm⁻¹ (ester bonded C=O), 1662cm⁻¹ (conjugated C=O), 1605, 1575, 1550cm⁻¹ (conjugated C=C), 1440cm⁻¹ (CH₂ stretching), 1358 및 1370cm⁻¹ (gem. dimethyl), 1310, 1280, 990, 970cm⁻¹ (trans CH=CH). D₂O와 CDCl₃ 용매를 이용하여 얻은 NMR spectrum은 Fig. 9와 같다. δ ppm(CDCl₃) 1.20(6H), 1.31(6H) (methyls at C-1 and C-1'), 1.63(12H) (methyls on C=C), 1.92(6H), 5.15(2H) (OH; removed by deuteration), 3.56 (proton on C=C), 그리고 6.5 (aromatic protons). 이

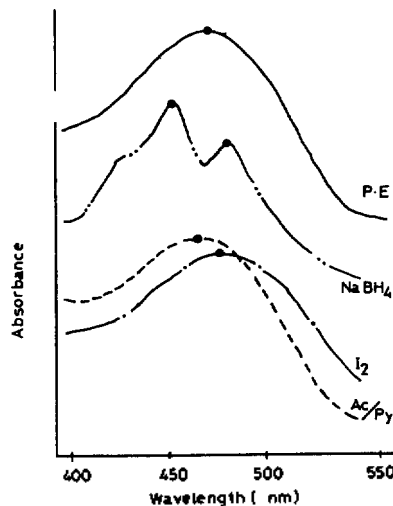


Fig. 7. UV absorption spectra of astaxanthin from salmo salar eggs.

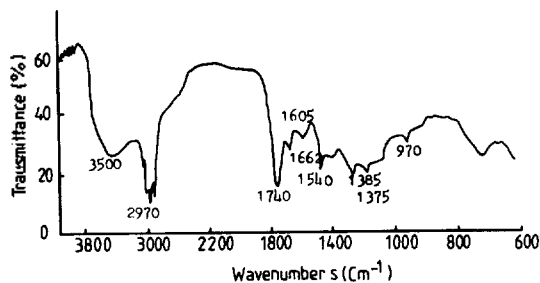


Fig. 8. IR spectrum of astaxanthin from salmo salar eggs.

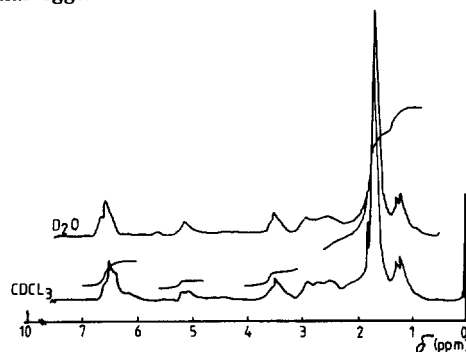


Fig. 9. NMR spectra of astaxanthin in CDCl₃ and D₂O.

상의 유기반응 특성과 UV, IR 및 NMR 스펙트라 data를 종합하여 단백질과 결합된 carotenoid의 구조를 결정된 결과 astaxanthin ester로 추

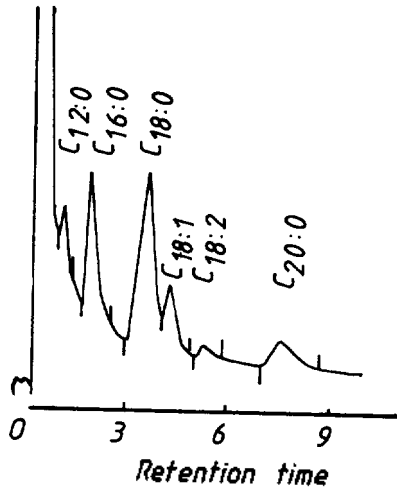


Fig. 10. Fatty acid compositions in astaxanthin ester.

Table 5. Fatty acid Composition in Astaxanthin Ester

Fatty acids	% Composition,	Fatty acids	% Composition,
C _{12:0}	3.5	C _{18:1}	15.2
C _{16:0}	21.4	C _{18:2}	2.2
C _{18:0}	47.9	C _{20:0}	9.6

정하였다^{28~34}.

지방산 조성. 이상에서 밝혀진 astaxanthin ester의 지방산을 GC로 분석한 결과는 Fig. 10 및 Table 5와 같다. 지방산은 주로 stearate(47.9%)와 palmitate(21.4%)로 구성되었으며 불포화 지방산으로는 linoleate(15.2%)와 소량의 linoleate가 확인되었다. 이 결과는 전복 내장³⁴에서 분리한 esters의 지방산 분포와는 다소 차이가 있었다. 이는 종류와 먹이, 조직에 따라 조성이 다른 것은 당연하다고 믿어진다. 결과적으로 동해산 연어알로 부터 추출 정제된 carotenoprotein은 heterogeneous한 두 가지 형태의 단백질이며 분자량이 각각 50,200과 26,000 daltons이었다. Carotenoid 구조는 주로 stearate와 palmitate 그리고 oleate를 가진 astaxanthin ester로서 mannose binding protein으로 판명되었다. 이들 glycoprotein이 어란에서 물질의 수송, 분화 성장의 대사조절 및 생체막을 보호하는 기능들을 깊게 이해하기 위해서는 효소작용과 관련하여 carotenoid 역할이 논의되면 도움이 될 것으로 믿고 있다.

본 연구를 수행함에 있어 유한재단 학술 연구비를 일부보조 받았기에 감사하는 바이다.

Table 4. Absorption maxima and characteristics of carotenoid

Organic Reaction	λ_{max} (nm)	Partition Ratio	Identification
Absorption maxima			
in petroleum ether, n-hexane	470-471		astaxanthin ester
in ethanol, chlorform	476-477		
in benzene	488		
in carbon disulfide	506		
Partitioning behavior (90% methanol-n-hexane)			
before saponification		epiphasic	astaxanthin ester
after saponification		hypophasic	
Allylic test	positive	positive	positive
Acetonide test	positive	positive	positive
Epoxide test	negative	negative	negative
Reduction product(NaBH ₄)	422, 450, 479(in p. e)		
Product by methanolic KOH	495 (in benzene)	hypophasic	astacene
Photoisomerization by iodine	473 (in p. e)		
Acetylation (Ac ₂ O/py)	466 (in p. e)		
Rf values on t. l. c.			0.48~0.75

인용문헌

1. D. R. Bickers, L. K. Demar and V. A. DeLeo, *Arch. Dermatol.*, **114**, 1193 (1978).
2. J. E. Packer, J. S. Mahood, V. O. Mora-arellano, T. F. Slater, R. L. Willson and B. S. Wolfenden, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **98**, 901 (1981).
3. N. I. Krinsky and S. M. Deneke, *J. Natl. Cancer Inst.* **69**, 205 (1982).
4. N. I. Krinsky, *Pure & Appl. Chem.*, **51**, 649 (1979).
5. V. A. DeLeo, M. Poh-Fitzpatrick, M. Mathews-Roth and L. C. Harber, *Am. J. Med.* **60**, 8 (1976).
6. M. M. Mathews-Roth, M. A. Pathak, T. B. Fitzpatrick, L. C. Harber and E. H. Kass, *J. Am. Med. Assoc.* **228**, 1004 (1974).
7. E. L. Dubois and C. Patterson, *ibid.*, **236**, 138 (1976).
8. M. M. Mathews-Roth, M. A. Pathak, T. B. Fitzpatrick and L. H. Harber, *Arch. Dermatol.* **113**, 1229 (1977).
9. R. Peto, R. Doll, J. D. Buckley and M. B. Sporn, *Nature*, **290**, 201 (1981).
10. I. Fabian and S. Shvartzmayer, *Cancer Res.* **46**, 2413 (1986).
11. H. L. Gensler, D. A. Sim, and G. T. Bowden, *ibid.*, **46**, 2767 (1986).
12. P. F. Zagalsky, D. F. Cheesman and H. J. Ceccaldi, *Comp. Biochem. Physiol.* **22**, 851 (1967).
13. P. F. Zagalsky, H. J. Ceccaldi and R. Daumas, *Comp. Biochem. Physiol.* **34**, 579 (1970).
14. P. F. Zagalsky, *Pure & Appl. Chem.* **47**, 103 (1976).
15. A. Elgsaeter, J. D. Tauber and S. Liaaen-Jensen, *Biochim. Biophys. Acta*, **530**, 402 (1978).
16. M. L. Mackenthum, R. D. Tom and T. A. Moore, *Nature*, **279**, 265 (1979).
17. V. R. Salares, N. M. Young, H. J. Bernstein and P. R. Carey, *Biochim. Biophys. Acta*, **576**, 176 (1979).
18. R. Powls and G. Britton, *Biochim. Biophys. Acta*, **453**, 270 (1976).
19. J. W. Kim and T. J. Min, *J. Kor. Chem. Soc.*, **29**, 295 (1985).
20. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
21. D. S. McLaren, W. W. C. Read, Z. L. Awdeh and M. Tchalian, in "Methods of Biochem. Anal." Vol XV, 1 (1967).
22. B. Lugtenberg, J. Meijers, R. Peters, P. V. A. Hoek and L. V. Alphen, *Feds. letter*, **58**, 254 (1975).
23. D. M. Peterson, *Plant Physiol.* **62**, 506 (1978).
24. J. Ludowieg and J. D. Benmaman, *Anal. Biochem.* **19**, 80 (1967).
25. A. Khare, G. P. Moss, B. C. L. Weedon and A. D. Matthews, *Comp. Biochem Physiol.* **45B**, 971 (1973).
26. B. Renström, G. Borch and S. Liaaen-Jensen, *ibid.*, **69B**, 621 (1981).
27. B. Czeczuga, *Hydrobiologia*, **46**, 223 (1975).
28. B. Czeczuga, *ibid.*, **64**, 251 (1979).
29. T. Matsuno, K. Hiraoka and T. Maoka, *Bull. Japan. Soc. Fish.* **47**(3), 385 (1981).
30. B. H. Davis, in "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments," Academic press, London (1976).
31. H. J. Ceccaldi & P. F. Zagalsky, *Comp. Biochem. Physiol.* **21**, 435 (1967).
32. G. Britton, G. M. Armit, S. Y. M. Lau, A. K. Patel and C. C. Shone, in "Carotenoid chem. & Biochem.," 237, Pergamon press, London (1981).
33. D. F. Cheesman and J. Prebble, *Comp. Biochem. Physiol.* **17**, 929 (1966).
34. T. Y. Lee, a "Dissertation for ar Celebration of 61 st. Birthday," Seoul Natl. University (1984).
35. K. Schiedt, F. J. Leuenberger and M. Vecchi, *Helv. Chim. Acta*, **64**, 449 (1981).