

## 대하(*P. orientalis*)로부터 분리정제한 Carotenoprotein의 특성에 관한 연구

李瑞九 · 金在雄<sup>†</sup>

국립공업기술원

<sup>†</sup>유한전문대학

(1994. 5. 5 접수)

### Purification and Characterization of a Carotenoprotein from *Penaeus orientalis*

Sur-Koo Lee and Jae-Woong Kim<sup>†</sup>

Natural Industrial Technology Institute, Ewacheon 427-010, Korea

<sup>†</sup>Department of Food and Nutrition, Yuhan Junior College, Bucheon 442-749, Korea

(Received May 5, 1994)

**요 약.** 양식산 새우(*P. orientalis*)로부터 0.05 M 인산염 완충용액(pH 7.0)으로 carotenoprotein을 추출하고 DEAE-셀룰로오스, 반포화 황산암모늄 친전 및 GPC로  $\alpha$ -form과  $\beta$ -form 두 종류의 carotenoprotein을 분리정제하였다. 최대 흡수파장은  $\lambda_{max}$  480, 409, 318 및 280 nm였다. SEM과 XRD로 분자구조를 관찰하였으며, GPC와 PAGE로 측정된 분자량은  $\alpha$ -form이 170 KDa으로 oligomeric 구조이며,  $\beta$ -form은 42 KDa인데 이것은 다시 22와 19 KDa으로 분리되는 불균일한 이합체 구조였다. Carotenoprotein 복합체의 아미노산, 중성지질, 인지질 및 유리지방산 조성을 분석하였고, 여러 가지 유기화학 반응과 UV/Vis, IR, <sup>1</sup>H-NMR, MS 등으로 carotenoids의 분자구조를 결정한 결과 lipid-protein의 보호그룹으로는 astaxanthin과 그 ester임이 확인되었다.

**ABSTRACT.** The isolation, purification and characterization of a carotenoprotein from the carapace of *Penaeus orientalis* were investigated. The carotenoprotein was purple with broad  $\lambda_{max}$  between 480, 409, 318 and 280 nm. Apparent structures were estimated by using X-ray diffractometry and scanning electron microscope, respectively. The molecular weight of the carotenoprotein complex had been determined by GPC and PAGE. The heavier complex, designated the  $\alpha$ -form (M.W=170 KDa), was dissociated to a major subunit,  $\beta$ -form (M.W=42 KDa). SDS-PAGE of  $\alpha$ -form showed apparently oligomeric pattern, and also  $\beta$ -form gave two polypeptides corresponding to 22 KDa and 19 KDa, respectively. The amino acid of the two proteins ( $\alpha$ - and  $\beta$ -form), lipid and free fatty acid compositions were described. The prosthetic groups of the carotenoprotein were confirmed by TLC, IR, <sup>1</sup>H-NMR, MS and various organic reactions as astaxanthin, astaxanthin monoester and astaxanthin diester.

### 서 론

Carotenoids에 대한 연구역사는 오래이고 일찍부터 유기화학이나 생화학 분야에서는 그들의 분자구조와 특성을 밝히려는 연구들이 많이 수행되어 왔다. 현재까지의 연구결과에 따르면<sup>1</sup> 광화학 입체 이성질체를 포함하여 약 600종류의 carotenoids가 자연

계에서 분리 확인되었고, 이들은 광합성 작용에서 필수적인 보조색소이며, 비타민 A의 전구체이면서 항산화 기능이 있고, 임상 의약품으로 이용되고 있으며, 면역촉진 효과 뿐만 아니라 생물학적인 계에 큰 영향을 준다는 것이다. 즉 central 및 excentric 절단에 의한 retinol 생성이나 retinoids로의 대사화

상호전환 능력, 생체내 자유라디칼의 소거작용, 여 기된 증감제와  $O_2$ 의 소광효과로 인한 세포기능의 정상유지, 또한 유전자독성, 돌연변이 유발, 악성 형질전환, 그리고 각종 암의 발생에 대하여 탁월한 보호기능이 있어서 의학적인 측면에서 그 중요성이 널리 인정되고 있다<sup>2</sup>. Carotenoids는 *in vivo* 상태에서 지질 및 단백질과 복합함으로써 carotenoprotein의 복합체를 형성하여 존재하는 것이 발견되고 있는데 복합체가 동물의 착색반응에 관여하는 대사 기구라던가, 결합의 본성, 체내의 순환, 생리적인 조절기능과 작용 메카니즘은 아직도 확실히 모르고 있다. 그러나 carotenoids가 단백질과 결합되어 안정한 구조를 이룰 때 분광학적 특성에 영향을 주는 인자로서 polarization enolization 및 펩티드 사슬의 비틀림 등 몇 가지 이론은 제시되고 있으며, Zagalsky 등은 carotenoprotein에 대한 단계적인 연구결과를 정리하여 총설로 발표한 바 있다<sup>3-5</sup>. 본 연구에서는 우리나라 양식산 새우(*P. orientalis*)로부터 carotenoprotein을 GPC로 분리정제한 후 분자구조와 특성을 연구검토하였기에 그 결과를 보고코저 한다.

### 실험재료 및 방법

**실험재료.** 본 실험에 사용된 시료는 우리나라 근해안에서 양식한 새우 대하(*Penaeus orientalis*)의 껍질을 사용하였다. 시약 중 DEAE-cellulose, CM-cellulose, Sephadex G-25, acrylamide, methylene-bisacrylamide, Folin-ciocalteu, *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine, bovine serum albumin 및 lipid standards는 Sigma사 제품을, 지방산 methyl ester의 표준품은 Sigma사, Alltech사 및 Supelco사 제품을, potassium hydrogen phosphate, sodium hydrogen phosphate, sodium potassium tartarate, bromophenol blue, 2-ME(2-mercaptoethanol) 및 TLC판은 Merck사 제품을, ethylenediaminetetraacetic acid, trichloroacetic acid, tris(hydroxymethyl) aminoethane, glycerol, ammoniumpersulfate 및 silver nitrate는 Wako사 제품을, 분자량 측정용 표준 단백질은 BRL-GIBCO로부터 구입하였고, 모든 용매는 Merck사 특급을 사용하였다.

**사용기기.** 본 실험에 사용된 기기는 Waring ble-

nder(Nissei, AM-77), Ultracentrifuge(Dupont Sorvall, DTD-75B), UV/Vis spectrophotometer(Perkin Elmer, 554), FT-IR spectrophotometer(Bruker, IFS-120 HR), NMR(Bruker, AM-200), GC/MS(Hewlett Packard, 5890 II/VG Analytical Tribid), GC (Shimadzu, GC-9AG), GPC 및 HPLC(Waters Associates, 244), SEM(Akashi Co., ISI-DS 130), Ion coater(Eiko Co., IB-3), X-ray diffractometer(Rigaku Denki Co., Geiger Flex M-3A), Electrophoresis kit(Pharmacia), Rotary vacuum evaporator(Tokyo Rikakikal Co., EYELA N-1) 및 TLC scanner (Shimadzu, Dual Wave Length CS-910) 등을 사용하였다.

**실험방법.** Carotenoprotein의 분리정제는 전보<sup>6,7</sup>에서와 같이 Zagalsky 등의 방법을 변형하여 수행하였다. 즉 우리나라 근해안에서 양식한 새우 대하(*P. orientalis*)의 껍질을 0.05 M 인산염 완충용액(pH 7.0)으로 냉압소에서 처리하여 carotenoprotein을 추출한 다음 600×g에서 30분간 원심분리하였다. 이온교환수지인 DEAE-셀룰로오스와 CM-셀룰로오스를 사용하여 상정액 중의 자외선을 흡수하여 불순물들을 제거한 후 반포화 황산암모늄으로 단백질을 분별침전시켰다. 12,000×g로 30분간 원심분리하여 얻은 침전물은 sephadex G-25 컬럼으로 탈염한 다음 protein pak 125W 컬럼을 장착한 GPC로 분리정제하였다. 단백질의 정량은 Lowry 방법<sup>8</sup>을 인용하였고, 전기이동은 Laemmli의 방법<sup>9</sup>에 따라 실시하고 silver stain법으로 염색하였다. Carotenoids의 추출과 분리정제<sup>10</sup>, 정량, carotenoids의 유기화학 반응성<sup>11</sup>(환원반응, 이성질화 반응, 아세틸화 반응, 에폭시 그룹 실험, 알릴릭 히드록실기 확인, 비누화 반응, 분배계수 측정 등)이 연구되었으며, 아미노산, 지질 및 유리 지방산의 분석은 HPLC와 GC를 각각 이용하였다<sup>12</sup>.

### 결과 및 고찰

**Carotenoprotein의 분리정제.** 새우 대하(*P. orientalis*)로부터 0.05 M 인산염 완충용액(pH 7.0), DEAE-셀룰로오스, CM-셀룰로오스, 반포화 황산암모늄 침전의 순서로 부분 정제된 carotenoprotein의

$\lambda_{\max}$ 은 480, 409, 318 및 280 nm에서 최대 흡수를 가지며, acetone/ethyl acetate(1 : 1, v/v)로 처리하여 단백질로부터 유리시킨 carotenoid의 최대 흡수파장  $\lambda_{\max}$ 은 448 nm와 472 nm에서 뚜렷한 굴곡현상이 나타났다. 새우껍질과 부분 정제된 carotenoprotein 속의 총 carotenoids 양을 각각 정량해 본 결과 껍질 1g당 총 carotenoids의 함량은 21.3 mg이었고, carotenoprotein에는 1g당 1.98 mg의 carotenoid가 각각 함유되어 있었다. UV/Vis 분광기를 사용하여 정제 단계별로 480 nm/280 nm의 흡광도 비를 각각 측정하여 산출한 정제도는 균질액에 비하여 54.6배 정제되었으며 단백질의 회수율은 49%였다.

Milicua 등<sup>13</sup>에 따르면 *P. clarkii*로부터 Triton X-100을 사용하여 얻은 붉은색의 carotenoprotein은 최대 흡수파장이  $\lambda_{\max}$  482 nm이며, 보호그룹으로는 astaxanthin과 그 ester가 포함되었다고 하였다. 겔 여과하였을 때 분자량은 140 kDa이었고, 또한 SDS로 전기이동하면 38,200 Da의 apoprotein으로 분리되며, carotenoprotein 1mg당 0.833 mg의 지질과 0.178  $\mu$ g의 astaxanthin 및 lutein ester가 포함되었다고 하였다.

**Carotenoprotein의 형태학적 관찰.** 정제된 carotenoprotein 분자의 미세구조를 주사전자 현미경(Scanning Electron Microscope)으로 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다. 단백질은  $\alpha$ -form과  $\beta$ -form으로 구분이 되어 있고, carotenoids 색소들은 주로 구성단

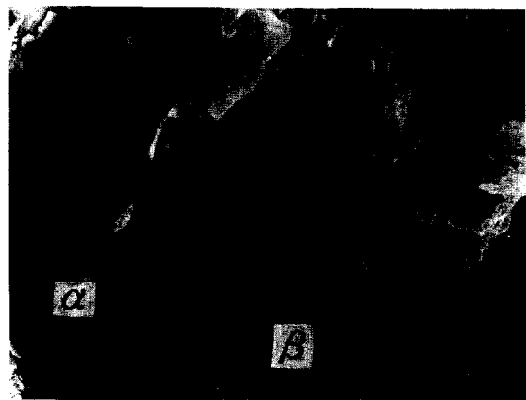


Fig. 1. SEM scanning electron microscope) photograph of carotenoprotein from *P. orientalis*. Gold coating was done at 4 mA for 5 min by using ion coater, and microscopied with polaroid No. 665 film at 19 kV, 2,000 $\times$ .

백질의 표면을 따라서 지질과 함께 속박된 상태로 존재하면서 평면외로 노출되어 있는 것이 확인되었다. 또한 이 색소분자의 말단에 존재하는 4- 및 4'-케토그룹이 불균일한 단백질들의 표면에서 회합되어 있고, polyene chain 상의 메틸그룹들은 평면내로 고정되어 있으며,  $\beta$ -ionone 고리는 평면 외로 뒤틀린 구조를 취하고 있기 때문에 전체적인 단백질의 접힘구조를 안정화시키는 것으로 판단된다<sup>3-5</sup>. 따라서 carotenoids와 그 ester는 복합체의 형성에서 lipid-protein의 구조를 보호하게 되어 방사선이나 활성 산소( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$  및  $^1O_2$ ), lectins, phorbol esters, 단백질 펩티드, 저분자 세포성분, 광증감 물질 등 여러가지 퇴행성 질병을 유발할 수 있는 생체 자극물질들에 대한 생체막 손상이나 단백질의 변성을 효과적으로 억제하기 때문에 생리적인 활성을 유지토록 하며, 입체배열을 보존하는 이상적인 물질로서 지질 및 단백질의 보호그룹으로 작용할 수 있을 것으로 생각된다. Carotenoids 분자의  $\beta$ -ionone 고리속에 4-와 4'-위치에 케토그룹이 존재하면 apoprotein에 대하여 친화성을 갖게 되는데<sup>4</sup> 이것은 apoproteins이 케토그룹들과 이합체를 형성하게 되어 특이적인 배열변화를 일으키기 때문에 분광학적인 파장변동에 영향을 주는 것으로 짐작된다. 이와 같이 carotenoids는 그들이 결합하는 단백질의 안정성이나 입체배열을 조절하는 보호그룹으로 작용하기 때문에 carotenoproteins는 착색반응, 광합성 과정, 전자전달, 항산화제로서의 기능, 그리고 생체내의 효소반응 등에 폭넓게 참여하게 될 것으로 믿어진다<sup>3</sup>.

**X-ray diffractometry(XRD) 측정.** XRD로 carotenoprotein의 전체 분자구조를 관측한 결과는 Fig. 2에 나타난 것과 같이 이 carotenoprotein은  $\alpha$ -form 구역과  $\beta$ -form 구역으로 각기 구성되어서 거대한 분자를 이루고 있음이 확인되었다.  $\alpha$ -form과  $\beta$ -form의 몰비는  $\alpha/\beta=3.61$ 이었고(Fig. 2A), 아세톤으로 처리하여 얻은 apoprotein의 몰비는  $\alpha/\beta=1.1$ 이었다(Fig. 2B). 이러한 결과는 carotenoids가 lipid-protein에 결합되어 복합체를 이루고 상호간에 보호그룹으로 작용한다는 증거라던가, carotenoid를 기준으로 한 분자량의 산출과 불균일한 단백질들의 구조, 결합-해리의 능력, 체내의 순환-저장 및  $^1O_2$ 의 소광효과,  $\cdot OH$ 의 소거효과, 항산화성 등 생리적인

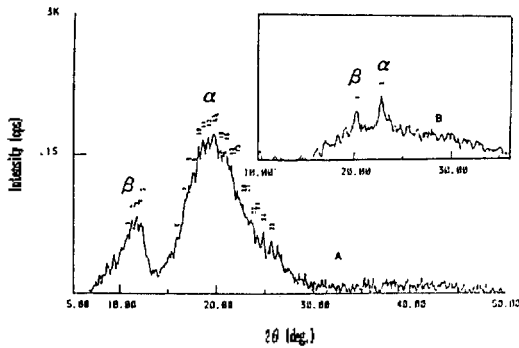


Fig. 2. XRD X-ray diffractometry) spectra of carotenoprotein from *P. orientalis*. A: Native carotenoprotein, B: Apoprotein, Analytical conditions: Target, Cu; Filter, Ni; Power, 30 kV - 15 mA; Scan speed, 3°/min; Full scale range, 0.3 Kcps; Angle, 2θ=5~50°.

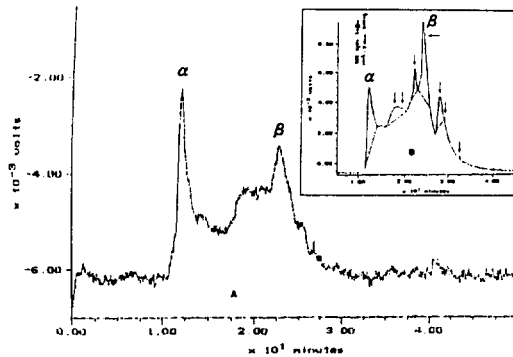


Fig. 3. GPC chromatograms of carotenoprotein from *P. orientalis*. A: Native carotenoprotein, B: Carotenoprotein of α-form treated with 0.1% SDS, Analytical conditions: Column, protein pak 125 W; Mobile phase, 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0); Flow rate, 1 ml/min; Chart speed, 0.5 cm/min; Wave length, 280 nm, Calibration data: BDX (M.W=200,000), bovine serum albumin (M.W=66,000), ovalbumin (M.W=43,000), ribonuc. A (M.W=13,700).

가능을 연구하는데 중요한 자료가 될 것으로 믿어진다.

**GPC와 SDS-PAGE 전기이동에 의한 분자량 결정.**

분리된 carotenoprotein은 반포화 황산암모늄 침전 후 공기중에서 묽은 완충용액으로 투석하면 색깔이 점차로 퇴색, 소실되는 현상이 관찰되며, 탈염에 따른 불용성 물질을 생성하게 되어 이온교환수지나 젤 여과법으로 더 이상 정제하기가 힘들게 된다. 따라서 단백질의 침전물을 소량의 인산염 완충용액에 분산시키고, sephadex G-25 컬럼에 신속히 통과시킨 다음 GPC로 분리한 결과를 Fig. 3에 보였다. Fig. 3(A) 부분은 native carotenoprotein의 GPC 정제 과정인데 α-form과 β-form으로 분리되었다. Fig. 3(B) 부분은 GPC로 분리한 α-form을 다시 0.1% SDS로 처리한 후의 결과인데 α-form이 주로 β-form으로 해리되는 것을 확인할 수 있었다. GPC로 carotenoprotein의 subunits 분자량을 산출한 결과 62,800, 54,700, 44,300, 41,500 및 32,200 Da의 5성분 외에도 23,800, 20,200, 16,700 그리고 10,900 Da 등 불균일한 단백질들이 확인되었다.

또한 이 carotenoprotein은 7.5% slab gel로 전기이동한 결과는 Fig. 4와 같다. Lane A는 native carotenoprotein을 loading한 것이고, lane B는 GPC에서 분리한 α-form의 단백질을 SDS가 포함된 2x sample buffer로 처리한 것이다. 분자량은 표준 단백질의 분자량에 대하여 이동도를 역대수 좌표로 환산시켜

서 산출하였다. Lane A에서는 170 KDa(α-form)과 42 KDa(β-form)인 두 종류의 단백질 띠가 선명하게 분리되었다. Lane B에서는 α-form이 SDS 처리로 해리되어 62, 53, 44, 42 및 35 KDa의 진한 5개의 띠와 약하지만 22, 19, 15 및 12 KDa의 단백질 띠가 관찰되고 있다. GPC와 전기이동한 결과를 종합하면, α-form이라 믿어지는 170 KDa은 oligomeric protein으로써 SDS로 처리되면 주로 42 KDa의 단백질로 해리되며 그 외 62, 53, 44 및 35 KDa의 단백질은 거의 같은 양으로 생성되는 것을 알았다. 또한 β-form으로 생각되는 42 KDa의 단백질은 10% SDS-PAGE로 전기이동하면 해리되어 다시 22 KDa와 19 KDa으로 분리되었는데, 이러한 결과는 β-form이 불균일한 이합체형이란 사실을 뒷받침한다.

Garate 등<sup>14</sup>은 crayfish인 *P. clarkii*로부터 DEAE-cellulose 컬럼을 이용하여 α-form과 β-form 두 종류의 carotenoprotein을 분리하였다. α-form의 분자량은 246 KDa인데 이것은 자색의 이합체인 β-form으로 쉽게 해리되고 이들의 분자량은 41,600 Da이며, 다시 SDS로 처리할 때 21,400과 19,200 Da의 두 가지 단백질로 분리되었다고 보고하였다. Clarke 등<sup>15</sup>에 따르면 lobster carapace로부터 얻은 carotenoprotein은 oligomeric protein인데 이것은 두 가지 형태

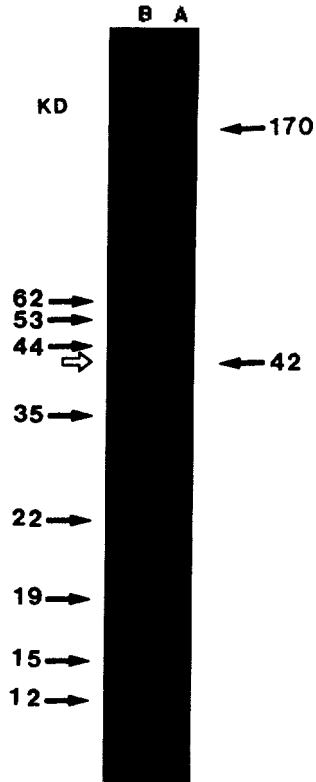


Fig. 4. Native- and SDS-PAGE (7.5% slab gel) analysis of carotenoprotein from *P. orientalis*. A: Native carotenoprotein, B: Carotenoprotein of  $\alpha$ -form treated with 0.1% SDS, Protein standards: myosin (M.W=200,000), phosphorylase B (M.W=97,400), bovine serum albumin (M.W=66,000), ovalbumin (M.W=43,000), carbonic anhydrase (M.W=29,000),  $\beta$ -lactoglobulin (M.W=18,400), lysozyme (M.W=14,300).

(type I 및 II)의 apoprotein으로 구성되어 있으며 오직 한 지점에 높은 전하성 결합부위를 갖는다고 하였다. Type I의 apoprotein은 C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, A<sub>1</sub>으로 구성되었으며, Type II의 것은 A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>인데 이들은 모두 동일한 아미노산 조성을 갖는다고 하였다. C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> 및 A<sub>1</sub>의 분자량은  $2.2 \times 10^4$  Da 정도이고, A<sub>2</sub> 및 A<sub>3</sub>의 것은  $1.9 \times 10^4$  Da이라고 보고하였다. 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 이루므로써 거대한 분자를 이룬다고 하였다. 또한 lobster carapace의 노랑색 carotenoprotein은 astaxanthin을 기준해서 최소 분자량이  $4.4 \times 10^5$  Da이고 409 nm에서 최대 흡수를 가지며 SDD-PAGE 전기

이동할 때 분자량이 큰 형태로서는 4.9, 5.5, 6.6 그리고  $7.9 \times 10^4$  Da의 4성분 외에 분자량이 적은 형태로서  $2.2 \times 10^4$ (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> 및 A<sub>1</sub>) Da,  $1.9 \times 10^4$ (A<sub>2</sub> 및 A<sub>3</sub>) Da인 불균일한 apoprotein으로 분리된다고 하였다<sup>16</sup>. 여러 종류의 해양 무척추 동물<sup>4</sup>에서 얻어진 native 혹은  $\alpha$ -form의 carotenoprotein은 분자량이  $5.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^6$  Da이고, 낮은 이온 강도의 용액에서는 해리되어 자색의 유도체를 생성하게 되는데, 이들  $\beta$ -form의 분자량은  $4.0 \sim 5.0 \times 10^4$  Da 범위이며, 아세톤으로 처리된 apoprotein을 전기이동하면 불균일하고, 그들의 분자량은  $0.8 \sim 2.6 \times 10^4$  Da이 된다고 하였다. Carotenoids 색소가 apoprotein과 혼합되어 복합체를 이룰 때 흡수 스펙트럼이 강하게 장파장 이동되는 것이 있는가 하면, 단파장 이동되는 것도 있고, 약하고 좁게 장파장 이동되는 것, 미세구조 또는 multibound 형태를 갖는 것 등 여러 가지가 있다<sup>5</sup>. 이와 같이 생체내에서 carotenoids와 apoprotein들과의 상호작용에 대한 연구는 분광학적인 파장변동의 메카니즘을 이해하는데 중요하며, 또한 광보호, 지질과산화 반응, 의약적인 응용, 시각기능, 비타민 A와 그 유도체들의 polyene system이 단백질과 결합하여 체내를 순환하는 메카니즘이나 항산화성 등 생리적인 기능을 이해하는데 있어 중요한 것으로 생각된다. Zagalsky에 따르면 참새우인 *A. antennatus*는 분자량이  $>10^6$ 이고, 용매처리된 carotenoid가 제거된 apoprotein의 분자량은 보통  $2.0 \times 10^4$  Da 정도인데 예외적으로 *C. mae-nas*의 것은  $3.8 \times 10^4$  Da도 있다는 것이다. 연어알에서 분리한 carotenoprotein의 구조적인 특성연구에서 Kim 등<sup>6</sup>은 이온교환수지와 sephadex G-75 컬럼을 이용하여 정제한 carotenoprotein은  $\lambda_{max}$  589, 540 및 409 nm에서 최대 흡수를 가지며 보호그룹은 오직 astaxanthin ester이고,  $\beta$ -form의 적자색 단백질은 분자량이 12.5 kDa인 4개의 동일한 subunits로 구성되었음을 밝혔다. 이와 같이 생체의 조직과 종류에 따라서 astaxanthin(아세틸렌 구조 또는 방향족 유도체 포함) 등 케토그룹을 가진 carotenoids는 여러 분자의 불균일한 단백질들과 결합할 수 있는데<sup>5</sup>, 소수성 또는 수소결합을 하게 되면 분자량이 수만에서 100만달톤으로 다양하게 거대분자인 carotenoprotein을 이루어 생체내의 보호그룹으로 작용한다고

해석되고 있다. 즉 carotenoprotein에서 carotenoids가 lipid-protein의 구조를 안정화시키게 되어 지질의 생체내 산화를 방지하게 되고, 또한 단백질의 3차 및 4차 구조를 안정화시켜서 변성을 억제하게 되므로 생리적인 활성을 유지하게 되는 것으로 이해된다. 그러나  $\beta$ -ionone 고리속에 케토그룹과 결합된 apoprotein의 아미노 그룹간에는 schiff's 염기나 sulfhydryl 그룹을 포함한 견고한 결합이 아니고 비공유결합으로 속박되어 있기 때문에 아세톤 같은 유기용매로 처리할 때 단백질로부터 쉽게 carotenoids를 이탈시킬 수 있으며, 또한 carotenoid-운반 단백질과는 자유롭게 결합-해리를 수반하면서 체내를 순환할 것으로 믿어진다. 역학적인 연구결과 사람에게서 carotenoids는 항암성 물질로서의 기능이 발견되었고, 특히 혈액중 carotenoids의 함량이 낮은 수준에서의 각종 암(폐암, 위암, 구강암, 피부암, 결장암, 식도암, 후두암, 소장암 등) 발생의 위험이 증가된다는 것이며, carotenoids의 투여로 면역촉진 효과를 높이고,  $^1O_2$ 의 소광,  $\cdot OH$ 의 소거 등 활성산소들에 기인된 생체막의 지질과산화, 효소 단백질의 수식, DNA 사슬의 전달 등 표적분자들의 손상억제로 암 발생을 줄이거나 진행을 크게 늦추었다는 보고들이 많이 있으나<sup>2</sup> 아직 논란의 여지가 남아 있고, 그들의 작용메카니즘도 분명히 제시되지 못한 실정이다. 지금까지 문헌으로 소개한 carotenoprotein의 연구결과들과<sup>4-6,13-16</sup> 본 연구에서 밝혀진 carotenoprotein의 구조적인 특성, 분광학적 성질, 분자량, 전기이동 패턴, 구성 carotenoids의 성분 등을 서로 비교하여 볼 때 유사성이 많이 발견되었다.

**Carotenoprotein의 아미노산, 지질 및 유리 지방산 조성.** GPC로 정제된 carotenoprotein의  $\alpha$ -form과  $\beta$ -form의 아미노산 분석 결과는 Table 1과 같다. 아미노산의 조성은  $\alpha$ -form과  $\beta$ -form이 서로 비슷하였다. 이 carotenoprotein은 높은 함량의 산성 아미노산을 포함하는데 특히 Glu과 Asp의 함량이 전체의 21%를 차지하고 있었다. 수소결합에 관여하는 아미노산은 23.8%이었고, 소수성 아미노산은 25.6%, 작은 아미노산은 35%, 헬릭스 파괴성 아미노산은 34.9%, 그리고  $\beta$ -구조에 영향을 주는 아미노산은 32.2%였다. 이러한 결과들은 Zagalsky 및 Garate 등의 연구결과와 일치하고 있다<sup>14</sup>. Leu과 헬릭스 파괴성

Table 1. Amino acid compositions of carotenoprotein occurring in *P. orientalis*

Amino acid	mol ( $\mu$ mol/mg)	
	$\alpha$ -form	$\beta$ -form
Asp	0.47	0.33
Glu	0.57	0.40
Ser	0.23	0.19
Gly	0.45	0.34
His	0.09	0.02
Arg	0.27	0.19
Thr	0.25	0.16
Ala	0.41	0.29
Pro	0.31	0.23
Tyr	0.17	0.13
Val	0.34	0.24
Met	0.11	0.02
Cys	0.03	-
Ileu	0.28	0.19
Leu	0.42	0.31
Phe	0.22	0.15
Lys	0.28	0.23

아미노산의 함량이 높은 점으로 보아 이 carotenoprotein은 낮은  $\alpha$ -헬릭스 구조를 취하고 있는 것으로 짐작된다.  $\beta$ -구조에서는 Gly, Ileu, Val 및 Thr의 함량이 높고, 역평행성  $\beta$ -pleated sheet의 형성은 Asp, Ser, Thr 및 Pro의 함량이 높기 때문인데 이들의 함량이 높은 점으로 보아 carotenoid의 C-6과 C-7의 단일결합에서 polyene의 평면 외에 꼬인  $\beta$ -ionone 고리는 C-1 위치에 있는 메틸그룹을 통하여 apoprotein과 소수성으로 결합되어 있고 그것은  $\beta$ -구조에 유연성을 주는 잔기인 Ileu과 상호작용을 함으로써 C-5와 C-5'의 메틸그룹은 이웃한 소수성 잔기인 Ileu과 결합하여 베타드의 사슬을 안정시킬 것으로 판단된다<sup>4</sup>. 전보에서와 같은 용매조건<sup>12</sup> 하에서 TLC를 이용하여 carotenoprotein의 중성지질과 인지질을 각각 분리한 다음, 표준지질과 함께 2차원 cochromatography를 행하여 지질의 성분을 확인한 후 TLC scanner로 정량한 결과, 중성지질 성분으로는 triacylglycerol이 38.9%, 구성 fatty acid가 30.4%, cholesterol이 30.7%이었고 그들의 조성비는 대체로 비슷하였다. 인지질 성분은 phosphatidyl choline이 81.3%로 가장 많았고, phosphatidyl ethanolamine이 18.5%, 그리고 소량의 phosphatidyl ino-

Table 2. Fatty acid compositions of total lipid, neutral lipid and phospholipid from carotenoprotein occurring in *P. orientalis*

Fatty acid		Composition (%)		
		Total lipid	Neutral lipid	Phospho lipid
Capric	C <sub>10:0</sub>	—	0.5	0.3
Lauric	C <sub>12:0</sub>	—	1.5	1.7
Myristic	C <sub>14:0</sub>	1.0	—	2.6
Myristoleic	C <sub>14:1</sub>	—	8.8	—
Palmitic	C <sub>16:0</sub>	19.6	20.5	30.3
Palmitoleic	C <sub>16:1</sub>	14.4	8.9	6.0
Margaroleic	C <sub>17:1</sub>	2.0	1.8	1.4
Stearic	C <sub>18:0</sub>	8.8	7.2	11.2
Oleic	C <sub>18:1</sub>	22.5	19.1	30.8
Linoleic	C <sub>18:2</sub>	2.4	6.6	5.7
Linolenic	C <sub>18:3</sub>	3.4	1.9	1.5
Arachidic	C <sub>20:0</sub>	0.3	—	—
Gadoleic	C <sub>20:1</sub>	0.4	—	—
Eicosapentaenoic	C <sub>20:5</sub>	8.4	5.4	4.6
Erucic	C <sub>22:1</sub>	3.6	2.4	2.0
Docosapentaenoic	C <sub>22:5</sub>	0.6	—	—
Docosahexaenoic	C <sub>22:6</sub>	2.7	2.9	1.3
Nervonic	C <sub>24:1</sub>	0.8	—	—

sitol(0.2%)이 존재하였다. 또한 carotenoprotein으로부터 분리 정제된 총지질, 중성지질 및 인지질을 각각 비누화시킨 다음, 메틸화하여 GC로 유리지방산을 분석한 결과는 Table 2와 같다. 유리지방산 중에는 oleic acid, palmitic acid, palmitoleic acid, EPA 및 DHA의 함량이 높았다. 이러한 결과는 언어(O. keta)의 혈청으로부터 분리한 carotenoid-carrying lipoprotein<sup>17</sup>과 brine shrimp<sup>18</sup>의 것과 비슷하였다.

**Carotenoid의 구조결정.** 정제된 carotenoprotein을 아세톤으로 처리하여 carotenoids를 추출한 다음 진공농축하고, 알코올성 0.1 M KOH로 2시간 비누화시킨 후 TLC판 위에서 acetone/petroleum ether (3 : 7, v/v)로 전개하였을 때 색소띠는 R<sub>f</sub>=0.38 위치에 나타났다. 이 색소의 UV/Vis, IR, <sup>1</sup>H-NMR 및 Mass spectroscopic 특성은 다음과 같다.

UV/Vis. λ<sub>max</sub>(ethanol), 472 nm; λ<sub>max</sub>(n-hexane) 466 nm; λ<sub>max</sub>(petroleum ether) 464 nm; λ<sub>max</sub>(benzene) 478 nm; λ<sub>max</sub>(chloroform) 482~488 nm; λ<sub>max</sub>(CS<sub>2</sub>) 503 nm; λ<sub>max</sub>(pyridine) 466, 498 그리고 518

nm. NaBH<sub>4</sub> 환원생성물은 λ<sub>max</sub>(ethanol) 418, 448 그리고 472 nm. 아세틸화 반응 후 λ<sub>max</sub>(Pyr.) 466, 498, 518(S)nm. 알코올성 KOH로 처리 후 반응생성물의 λ<sub>max</sub>(benzene) 492 nm.

IR(CHCl<sub>3</sub>) ν<sub>max</sub> cm<sup>-1</sup>: 3,500(OH), 2970, 2930 및 2849(C-H), 1643(conjugated C=O), 1605, 1595 및 1559(conjugated C=C), 1463과 1436(CH<sub>2</sub>), 1377과 1370(gem. dimethyl), 1305, 1280, 1255, 1233, 1130, 990 및 959(trans CH=CH).

NMR(CDCl<sub>3</sub>): 1.21(6H), 1.32(6H)(C-1과 C-1'의 methyls), 1.95(6H)(C-5과 C-5', C-13과 C-13'의 methyls), 2.05(12H)(C-9와 C-9'의 methyls)

MS=608, m/e M<sup>+</sup>(M-18, M-57, M-92, M-154, M-167, M-206, M-221 그리고 M-233). 이 색소는 작용기에 따르는 여러 가지 유기화학 반응성과 분광학적인 특성들을 종합하여 화학구조를 결정한 결과, carotenoid 성분은 astaxanthin으로 확인되었다<sup>6, 10, 11, 19, 20</sup>.

## 결 론

양식산 새우(*P. orientalis*)로부터 0.05 M 인산염 완충용액(pH 7.0)으로 carotenoprotein을 추출하고 DEAE-셀룰로오스, CM-셀룰로오스, 반포화 황산암 모늄 침전 및 GPC로 α-form과 β-form 두 종류의 carotenoprotein을 분리정제하였다. 최대 흡수파장은 λ<sub>max</sub> 480, 409, 318 및 280 nm였다. SEM과 XRD로 분자구조를 관찰한 결과 carotenoids 색소는 주로 불균일한 구성 단백질의 표면을 따라서 평면 외로 노출되어 있으며 입체 배열을 보존하는 이상적인 물질로써 지질 및 단백질의 보호그룹으로 작용하는 것으로 확인되었다. GPC와 PAGE로 측정된 분자량은 α-form이 170 KDa으로 oligomeric 구조이며, β-form은 42 KDa인데 이것은 다시 22와 19 KDa으로 분리되는 불균일한 이합체 구조였다. 두 종류(α-form과 β-form)의 carotenoprotein은 아미노산 조성이 서로 비슷하였으며 Glu과 Asp의 함량이 높았다. 중성지질은 TG가 38.9%, 구성 FA가 30.4%, cholesterol은 30.7%였으며, 인지질은 phosphatidyl choline이 81.3%, phosphatidyl ethanolamine이 18.5%, phosphatidyl inositol은 0.2%이고, 유리 지방산의

조성중 oleate는 22.5%, palmitate가 19.6%, palmitoleate는 14.4%, EPA는 8.4% 그리고 DHA는 2.7%였다. 여러 가지 유기화학 반응과 UV/Vis, IR, <sup>1</sup>H-NMR, MS 등으로 carotenoid의 분자구조를 결정할 결과 lipid-protein의 보호그룹은 astaxanthin과 그 ester로 확인되었다.

Carotenoids는 광합성 작용에서 필수적인 약제서리 색소이며, 비타민 A의 전구물질이면서 세포의 면역촉진 효과를 높이고, 돌연변이 유발, 유전자독성, 자매분체교환, 악성종양의 억제 기능이 알려졌다. 또한 혈장의 carotenoids 농도가 낮을 때는 여러가지 암의 발생위험이 높으며, 생체내에서 생성된 활성산소들에 대한 항산화적인 방어기능이 있어서 노화, 백내장, 동맥내막염, 관상동맥의 순환계 질병 그리고 암의 발생 등 퇴행성 질병에 효과가 있다는 보고가 많이 있다<sup>1,2</sup>. 그러나 β-carotene이 암의 발생에 유익한가? 또는 해로운가? 하는 논쟁이 있다. 즉 담배를 많이 피우는 핀란드인의 폐암 환자에게 시판 합성품의 β-carotene을 장기간 투여하였을 때 암 발생이 18%나 증가되었다는 보고가 있다<sup>3</sup>. 그렇지만 미국 NCI의 Taylor는 β-carotene 자체가 독성이 있다는 보고는 믿을 수 없다고 하였으며, 또 다른 연구들이 계속 수행되어 새롭고 흥미있는 결과들이 앞으로 나올 것을 기대하고 있다.

본 연구는 1993년도 유한재단 학술연구비의 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드리는 바이다.

### 인 용 문 헌

1. Olson, J. A. *Ann. NY. Acad. Sci.* **1993**, *691*, 156.
2. Kim, J. W. *Kor. J. Food & Nutr.* **1993**, *6*, 231.
3. Cheesman, D. F.; Lee, W. L.; Zagalsky, P. F. *Biol. Rev.* **1967**, *42*, 132.
4. Zagalsky, P. F. *Pure & Appl. Chem.* **1976**, *47*, 107.
5. Zagalsky, P. F.; Eliopoulos, E. E. and Findlay, J. B. C. *Comp. Biochem. Physiol.* **1990**, *97B*, 1.
6. Kim, J. W.; Min, T. J.; Lee, T. Y. *J. Kor. Chem. Soc.* **1988**, *32*, 377.
7. Zagalsky, P. F.; Cheesman, D. F.; Ceccaldi, H. J. *Comp. Biochem. Physiol.* **1967**, *22*, 851.
8. Lowry, O. H. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265.
9. Laemmli, U. K. *Nature* **1970**, *227*, 680.
10. Khare, A.; Moss, G. P.; Weedon, B. C. L.; Mathews, A. D. *Comp. Biochem. Physiol.* **1973**, *45B*, 971.
11. Davis, B. H. *In Carotenoids*; Acad. Press: London, 1976.
12. Kim, J. W.; Kim, D. H.; Lee, J. B.; Lee, S. K.; Min, T. J. *Anal. Sci. Tech.* **1992**, *5*, 477.
13. Millcua, J. C. G.; Gomez, R.; Garate, A. M.; Macarulla, J. M. *Comp. Biochem. Physiol.* **1985**, *81B*, 1023.
14. Garate, A. M.; Milicua, J. C. G.; Gomez, R.; Macarulla, J. M.; Britton, G. *Biochem. Biophys. Acta* **1989**, *881*, 446.
15. Clarke, J. B.; Eliopoulou, F. E.; Findlay, J. B. C.; Zagalsky, P. F. *Biochem. J.* **1990**, *265*, 919.
16. Zagalsky, P. F. *Comp. Biochem. Physiol.* **1982**, *71B*, 243.
17. Ando, S.; Hatano, M. *J. Lipid. Res.* **1988**, *29*, 1264.
18. Navarro, J. C.; Bell, M. V.; Amat, F.; Sargent, J. R. *Comp. Biochem. Physiol.* **1992**, *103*, 89.
19. Renström, R.; Borch, G. O. M.; Liaaen-Jensen, S. *Comp. Biochem. Physiol.* **1981**, *69B*, 621.
20. Schwieter, U.; Englert, G.; Rigassi, N.; Veter, W. *Pure & Appl. Chem.* **1969**, *20*, 365.
21. Nowak, R. *Science* **1994**, *264*, 500.