

## 진주담치 근육중의 적색 Carotenoprotein의 정제 및 특성

양현필 · 이안종\* · 김용태\*\* · 김세권\*  
청도제약주식회사 · \*부산수산대학교 화학과 ·  
\*\*동경대학교 생화학과

## Purification and Characterization of the Red Carotenoprotein from the Muscle of Blue Mussel, *Mytilus edulis*

Hyun-Pil YANG, An-Jong LEE\*, Yong-Tae KIM\*\*  
and Se-Kwon KIM\*

Chung-Do Pharmaceutical Co., Ltd. Jinhae 645-500, Korea

\*Department of Chemistry, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

\*\*Department of Biophysics and Biochemistry, Faculty of Science, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

Most of carotenoprotein complexes have been extracted by using buffered solutions. However, in this study carotenoprotein from the muscle of Blue mussel(*Mytilus edulis*) was extracted by a detergent such as Triton X-100. It was purified and characterized by 20% (w/v)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , DEAE-cellulose ion exchange and Sephacryl S-300 gel filtration.

The carotenoprotein ( $\lambda_{\text{max}} = 462\text{nm}$ ) had an approximate M. W. of 372KDa (gel filtration). SDS-PAGE analysis of the carotenoprotein indicated the presence of four polypeptides of 60KDa (23.70%), 46.9KDa (9.14%), 26KDa (49.14%) and 13KDa (18.02%). Carotenoprotein denaturated by treatment with SDS to a final concentration of 0.2% (w/v) caused a hypsochromic shift of  $\lambda_{\text{max}}$  from 462nm to 456nm. The carotenoprotein contained lipids as structure units. The amino acid composition of the carotenoprotein contained large essential amino acid amounts of 62.8%, and the content of threonine (35.9%) was higher than other amino acids, but histidine, methionine and proline were not present. In the carotenoprotein, the major fatty acids were C<sub>16:4</sub>, C<sub>16:0</sub>, C<sub>20:5</sub> and C<sub>22:6</sub>. The percentages of polyunsaturated fatty acids (62.4%) were higher compared to other fatty acids (saturated fatty acids 19.6%, monounsaturated fatty acids 18.0%).

Carotenoid was extracted from the carotenoprotein by acetone and it was separated into five different components by preparative TLC (benzene:petroleum ether:acetone = 69:17:14). The major components of carotenoid were mytiloxanthin (74.79%) and 3,4,3'-trihydroxy-7',8'-didehydro- $\beta$ -carotene (18.26%), and they were at least presented as prosthetic groups of carotenoprotein.

## 서 론

Carotenoid-protein 복합체는 물리화학적 성상의 차이에 따라 carotenoprotein과 carotenolipoprotein 복합체로 분류되며, 전자는 carotenoid가 단순단백질 또는 glycoprotein과 화학양론적으로 결합한 것이고, 후자는 carotenoid 이외의 지질을 함유한 lipoprotein과 결합한 것이다(Zagalsky, 1985). Carotenoprotein은 대부분 carotenoid가 단백질과 결합함으로써 carotenoid UV 흡수 spectrum의 장파장이동이 관찰되는 것이 특징이다. Carotenoprotein은 free carotenoid의 오렌지색과는 달리 분홍색, 자주색, 청색, 적색 또는 녹색을 띠고 있으며, 이들 분자량은 35,000~100만 dalton에 이르기까지 폭 넓게 분포되어 있다(김 등, 1990).

Carotenoprotein의 구성성분인 carotenoid는 천연 착색제 등 첨가물로 이용되고 있으며, 영양 생리면에서는 비타민 A의 전구물질로 시각회로에 관여한다는 것은 널리 알려져 있다. 특히,  $\beta$ -carotene과 비타민 A 유도체들의 발암 억제작용에 대한 임상적인 연구들이 진행되고 있으며, 그 결과 의약적인 측면에서 carotenoid의 중요성이 강조되고 있다(Fabian and Shvartzmayer, 1986; Olson, 1989; Kazuo, 1991).

Carotenoprotein은 어피나 갑각류의 껍질 등에, carotenolipoprotein은 알(卵), 난소, 혈액 등에 널리 존재한다(Britton and Goodwin, 1981). Cheesman *et al.*(1967)은 무척추동물로부터 약 75종의 carotenoprotein을 정제한 결과, 그 중에서 약 50%가 청색 carotenoprotein이었다고 보고한 후 Zagalsky 등(1970) 및 Zagalsky와 Herring(1972)은 십각류(十脚類) 껍질에서 많은 청색 carotenoprotein이 존재한다고 하였고, Garate *et al.*(1986)과 Milicua *et al.*(1985)은 가재(*Procambarus clarkii*) 껍질에 각각 청색 및 적색 carotenoprotein이 존재한다고 보고하였으며, 이 외에 갑각류의 가공폐기물 중 carotenoprotein의 이용에 관한 보고가 있다(김 등, 1990; Simpson and Haard, 1985; Cano-Lopez *et al.*, 1987).

패류의 carotenoid에 관한 연구로서는 바지락(*Venus japonica*), 백합(*Meretrix lusoria*), 가막조개(*Corbicula japonica*), 피조개(*Anadara broughtonii*) 및 국자가라비(*Pecten albicans*)가 있고(Shimizu *et al.*, 1968a~e), 진주담치(*Mytilus edulis*) 등에 관한 보고(Campbell, 1970; 이와김, 1971)가 있으나, 단백질이 carotenoid와 회합하여 복합체를 이루는 carotenoprotein의 특성에 관한 보고는 찾아 볼 수 없

다.

본 연구에서는 우리나라에서 대량 생산되고 있는 진주담치 근육으로부터 carotenoprotein을 Triton X-100과 같은 세정제를 이용하여 추출한 후, 정제하여 그 특성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

실험에 사용한 진주담치(암컷)는 1993년 3월에 부산 충무동 공동어시장에서 구입한 평균중량 27.91 g, 평균각장 7.03cm, 평균각고 3.74cm인 시료를 수도물로 씻고 탈각한 다음, 내장을 제거하고 육을 증류수로 5회 세척하여 cheesecloth로 여과하고 균질기(Ace homogenizer AM-7, Tokoyo, Japan)로 분쇄(5,000rpm, 2min)시킨 후 시료로 사용하였다.

### 2. Carotenoprotein의 추출

시료 400g에 추출액[5%(v/v), Triton X-100/50 mM Na-phosphate buffer, pH 7.0] 1,600ml를 가하여 약 12시간 교반하여 추출한 다음 원심분리(15,000×g, 20min)하여 pellet의 색깔이 완전히 무색이 될 때까지 3회 추출하여, 전 추출액을 0.45  $\mu$ m membrane filter(Whatman, England)로 여과하여 -20℃에 보관하여 두고 실험에 사용하였다.

### 3. Carotenoprotein의 정제

Carotenoprotein의 정제 과정은 Fig. 1에 나타난 바와같이 20%(w/v)(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 염석시켜 저온실에서 12시간 방치한 다음, 원심분리(15,000×g, 20min)하여 상층액을 투석(M.W. 6,000~8,000)한 후 투석액을 원심분리(15,000×g, 20min)하여, 그 상층액을 DEAE-cellulose가 충전된 컬럼에 농도구배법으로 용출시켜 얻어진 획분을 Sephacryl S-300 수지를 이용한 gel filtration 방법에 의해 정제하였다.

### 4. 전기이동 분석

정제확인에는 Davis(1964)의 방법에 따라 disc-polyacrylamide gel(Disc-PAG) 전기이동분석을 실시하였다.

### 5. 분자량 측정

Laemmli(1970)의 방법에 따라 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel(SDS-PAG) 전기이동분석을 실시하였으며, 표준단백질로는 aprotinin(M.W.

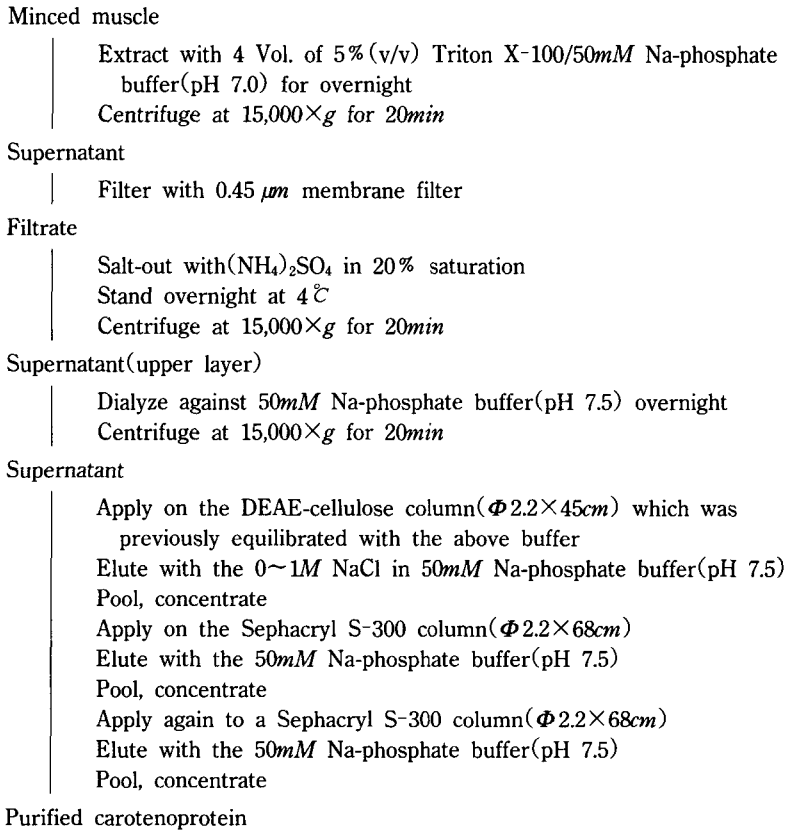


Fig. 1. Scheme of purification procedure for the carotenoprotein from the muscle of blue mussel.

=6.5KDa), cytochrome c(M.W.=12.4KDa), carbonic anhydrase(M.W.=29KDa) 및 bovine serum albumin(BSA, M.W.=66KDa)의 혼합물을 사용하였다. 단백질의 이동거리를 측정하여 표준단백질과 비교하여 subunit의 수를 계산하였다. Carotenoprotein의 분자량을 Sephacryl S-300 gel filtration column을 사용하여 측정하였다. 표준단백질로는 bovine serum albumin(BSA, M.W.=66KDa), alcohol dehydrogenase(M.W.=150KDa), apoferritin(M.W.=443KDa) 및 thyroglobulin(M.W.=667KDa)을 사용하였으며, 용출된 분획을 분광광도계(PYE unicam, UV/VIS 8610, U.K.)로 280nm에서 흡광도를 측정하여 각 단백질의 용출부피( $V_e$ )를 결정하였다. 측정된  $V_e$ 로부터 계산된 분배계수에 따라 표준곡선을 그리고 이 곡선에 따라 carotenoprotein 분자량을 결정하였다.

## 6. 아미노산 분석

Carotenoprotein의 아미노산 조성은 시료 10mg을 ampoule에 넣고 6N HCl 2.5ml를 가한 후 밀봉하여 110 °C에서 24시간 동안 산가수분해하여 진공회전농축기(EYELA N-1N, Tokyo, Japan)에서 염산을 제거시킨 후, citrate buffer(pH 2.2)로 정용(25ml)하여 아미노산 자동분석기(Hitachi, Tokyo, Japan)로 분석하였다.

## 7. pH 안정성

Carotenoprotein 용액을 pH 3~11까지의 1M 완충용액[citric acid-sodium citrate(pH 3~6), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH 7~8), glycine-NaOH(pH 9~10), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaOH(pH 11)] 3ml가 각각 들어있는 시험관에 0.2ml씩 넣고 20 °C의 waterbath에서 4시간 동안 incubation시킨 후 carotenoprotein의 최대파장( $\lambda_{max}$ =462nm)에서 흡광도를 측정하여 pH 안정성을 검토하였다.

8. 변성제의 영향

시험관에 carotenoprotein 용액 3ml를 넣고 변성제로서 sodium dodecyl sulfate(SDS)를 0.2% (w/v) 되게 가하여 녹인 후, 가시부 영역(400~600nm)에서 최대파장의 변화를 자외선 분광광도계(Shimadzu U-3210, Tokyo, Japan)로 측정하였다.

9. 지방산 분석

Bligh and Dyer(1959)의 방법에 따라 먼저 정제된 carotenoprotein로부터 총지질을 추출한 후, 지방산 조성을 알아보기 위하여 총지질 100mg을 정량하여 1N KOH-95% ethanol용액으로 검화한 다음, 검화물을 14% BF<sub>3</sub>-methanol을 3ml 가하여 95℃에서 30분간 환류가열하여 지방산 methyl ester를 조제하였다. 이것을 capillary column(HP-20M fused silica column, 25m×0.2mm i.d., Hewlett Packard, PA, USA)이 장착된 GC(Shimadzu GC-14A, Tokyo, Japan)로써 분석하였다. 지방산조성의 분석조건은 injector 및 detector(FID) 온도는 각각 230℃, 250℃, column 온도는 205℃로 하였고, carrier gas는 수소(25ml/min)를 사용하였으며, split ratio는 1:100으로 하였다. 각 지방산의 동정은 표준 지방산 methyl ester의 retention time과의 비교 및 지방산의 이중결합수와 retention time과의 상관그래프를 이용하였다.

10. Carotenoid의 분리

Khare *et al.*(1973)의 방법을 변형하여 carotenoprotein으로부터 carotenoid를 추출하였다. 즉, 정제된 carotenoprotein의 인산염 완충용액에 3배량의 acetone을 가하고 균질기(Ace homogenizer AM-7, Tokyo, Japan)로 교반(3,000rpm, 2min)하여 단백질을 변성시켜 여과(Whatman No. 2)하였으며, 이 과정을 3회 반복하여 추출하였다. 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 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(25g)를 처리하여 여과하고, 그 여액에 질소를 충전한 후, 40℃ 이하에서 회전진공농축기로 감압농축하여 총 carotenoid를 얻었다. 총 carotenoid의 함량은 McBeth(1972)의 방법에 따라 흡광계수 E<sub>1%<sup>1cm</sup></sub>=2,500으로 하여 451nm에서 석유에테르를 용매로 흡광도를 측정하여

계산하였다.

추출된 carotenoid를 preparative TLC(silica gel 60F, benzene:petroleum ether:acetone=69:17:14)로 분리하였다. 분리 정제된 carotenoid의 구조적 특성을 알기 위하여 분배비, acetyl화 반응, allylic-OH 활성시험, TMS화 반응, NaBH<sub>4</sub>에 의한 환원 반응, I<sub>2</sub>에 의한 이성화 반응 및 염산 epoxide 시험 등 유기 반응을 통하여 작용기를 확인하였으며 UV (Shimadzu U-3210, Tokyo, Japan) 및 IR(Shimadzu IR-408, Tokyo, Japan) 등에 의하여 carotenoid 구조를 동정하였다.

결과 및 고찰

1. Carotenoprotein의 분리 및 정제

Carotenoprotein의 정제는 Fig. 2에서와 같이 fraction number 36~57 사이에서 carotenoprotein이 완전히 용출되었다. 이 획분을 Sephacryl S-300 column을 통과시킨 결과 Fig. 3과 같이 fraction number 21~31사이에서 carotenoprotein이 존재하였고 이것을 2차 겔 여과에 의해 정제한 결과 Fig. 4와 같이 24~26 fractions사이에서 carotenoprotein을 얻었다.

정제확인인 Disc-PAGE 방법에 따라 전기영동한 결과, 단일한 band를 확인할 수 있었다(Fig. 5). 이 carotenoprotein을 분광광도계로 최대파장을 측정한 결과 462nm였으며, 정제도 및 수율은 각각 5.0 배 및 1.9%였다(Table 1).

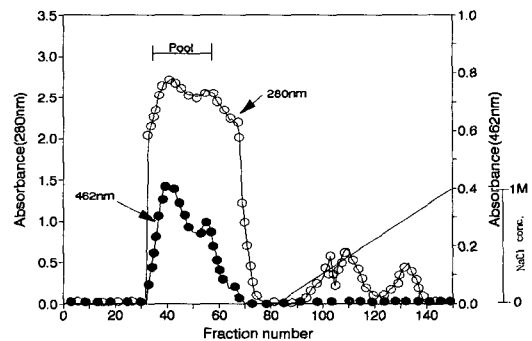


Fig. 2. Elution profile of the carotenoprotein from DEAE-cellulose column(Φ 2.2×45cm) by gradient with 1M NaCl in 50mM buffer. Elution condition: Buffer; 50mM Na-phosphate buffer(pH 7.5). Flow rate and fraction volume; 24ml/hr and 6ml.

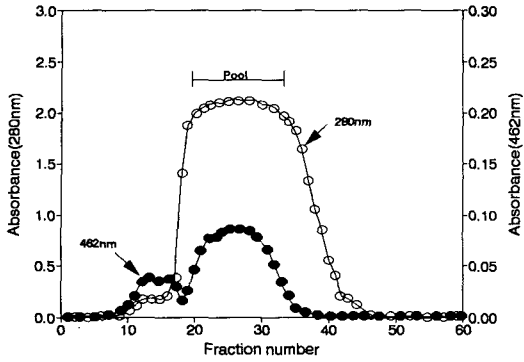


Fig. 3. Sephacryl S-300 column chromatogram ( $\Phi$  2.2  $\times$  68cm) of the carotenoprotein obtained from DEAE-cellulose column chromatography. Elution condition: Buffer; 50mM Na-phosphate buffer(pH 7.5). Flow rate and fraction volume; 6ml/hr and 2ml.

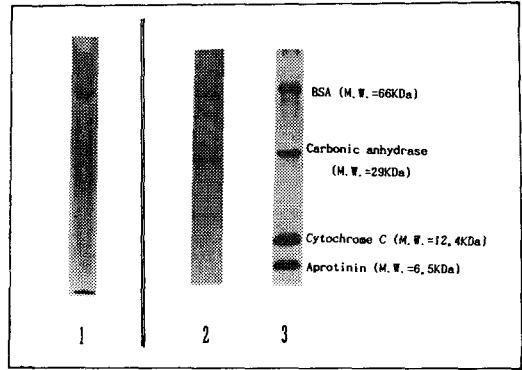


Fig. 5. Disc- and SDS- PAGE electrophoretic patterns of the carotenoprotein. 1; Carotenoprotein. 2; Subunits of the carotenoprotein. 3; Mark protein.

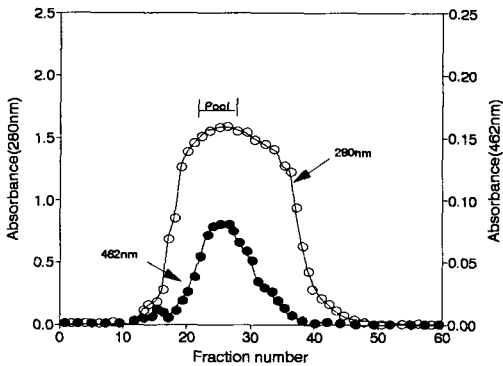


Fig. 4. Sephacryl S-300 column chromatogram ( $\Phi$  2.2  $\times$  68cm) of the carotenoprotein obtained from 1<sup>st</sup> the Sephacryl S-300 column chromatography. Elution condition: Buffer; 50mM Na-phosphate buffer(pH 7.5). Flow rate and fraction volume; 3.5ml/hr and 2ml.

Milicua *et al.*(1985)이 가재(*Procambarus clarkii*) 껍질로부터 추출한 적색 carotenoprotein의 최대파장은 482nm였으나, 가재(*Astacus leptodactylus*) 껍질에서 추출한 노란색 carotenoprotein의 최대파장은 385nm였다고 보고하였으며(Milicua *et al.*, 1986), Santoro *et al.*(1990)은 해면동물(*Axinella verrucosa*)에서 추출한 오렌지색 carotenoprotein은 481nm에서 최대파장이 나타났다고 하였다. 한편, Garate *et al.*(1984)이 게(*Carcinus maenas*) 껍질로부터 추출한 청색 carotenoprotein의 최대파장은 625nm였다. 그리고 가재(*Procambarus clarkii*) 껍질로부터 추출한 청색 carotenoprotein은 635nm에서 최대파장이 나타났으며(Garate *et al.*, 1986), Gomez *et al.*(1986)이 가재(*Astacus leptodactylus*) 껍질로부터 추출한 청색 carotenoprotein의 최대파장은 634nm였다고 하였다. 이와 같이 carotenoprotein의 색깔에 따라 최대파장이 다른 것은 carotenoid와 단백질사이의 상호작용 즉, 편광화(Salares *et al.*, 1979), enol화(Kuhn

Table 1. Purification of the carotenoprotein from the muscle of blue mussel

Procedure	Volume(ml)	*Total protein (mg)	+Carotenoprotein (mg)	Purification (C/T)	Yield (%)
1. Crude extract	1,000	6,462.6	607	1	100
2. 20% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	485	1,764.4	355.5	2.2	58.6
3. DEAE-cellulose	99	542.9	184	3.6	30.3
4. Sephacryl S-300 gel filtration	38	99.9	41	4.4	6.8
5. Sephacryl S-300 gel filtration	25	38	18	5	1.9

\* Total protein measured by biuret assay

+ The amount of red carotenoprotein is calculated by the equation : Absorbance at 462nm  $\times$  Volume of solution ml.

and Sorensen, 1938) 및 polyene 사슬의 비틀림 (Buchwald and Jencks, 1968)과 같은 결합방식의 차이에 기인된다.

Garate *et al.*(1986)은 가재(*Procambarus clarkii*) 껍질로부터 추출한 청색 carotenoprotein의 정제도는 2.6배였다고 하였고, Shone *et al.*(1979)은 불가사리(*Asterias rubens*)에서 보라색 carotenoprotein의 정제도는 5.6~6.5배였다고 보고하였다. 이 밖에도 Carriello and Zanetti(1981)는 겔 여과법을 사용하여 해면동물(*Suberites domuncula*)로부터 청색 carotenoprotein을 정제한 결과, 정제도는 1.05배였다고 보고한 바 있다.

## 2. Carotenoprotein의 특성

### 1) 분자량

Carotenoprotein의 분자량은 Sephacryl S-300 겔 여과로 용리하여 void volume( $V_0$ )과 elution volume( $V_e$ )의 비를 구하고, 표준단백질 분자량의  $V_e$ 와 비교하여 나타낸 결과는 Fig. 6과 같다. Fig. 6에서와 같이 분자량이 약 372KDa이었고, subunit는 SDS-PAGE로 분석한 결과, 분자량이 60KDa, 46.9KDa, 26KDa 및 13KDa의 4개의 polypeptide로 이루어져 있었으며, 이들 각각의 함량을 알아보기 위해 scanning 한 결과 Fig. 7에 나타낸 바와 같이 60KDa(23.70%), 46.9KDa(9.14%), 26KDa(49.14%) 및 13KDa(18.02%)였다.

Milicua *et al.*(1985)은 가재(*Procambarus clarkii*) 껍질로부터 추출한 적색 carotenoprotein의 분자량은 140KDa이었고, 이것을 구성하고 있는 subunit는

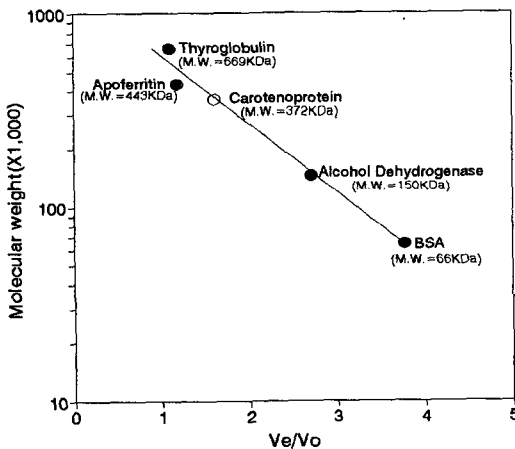


Fig. 6. Estimation of molecular weight of the carotenoprotein by Sephacryl S-300 gel filtration.

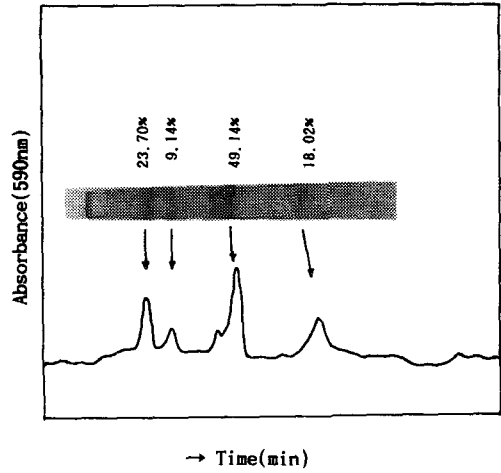


Fig. 7. Photometric scan of the SDS-gel after staining with Coomassie brilliant blue R-250 showing the proportions of apoprotein subunits in carotenoprotein.

8.6KDa의 single polypeptide를 형성하고 있다고 하였다. 해면동물(*Axinella verrucosa*)로부터 추출한 오렌지색 carotenoprotein의 분자량은 640KDa이었고, 이것은 50KDa의 single polypeptide로 단일 subunit로 구성되었으며(Santoro *et al.*, 1990), 또한 가재(*Astacus leptodactylus*)껍질에서 추출한 노란색 carotenoprotein의 분자량은 563.7KDa이었고, 이것은 4개의 polypeptide, 즉 분자량이 각각 195KDa, 151KDa, 126KDa 및 95KDa인 subunit로 구성되었다(Milicua *et al.*, 1986). Garate *et al.*(1984)이 게(*Carcinus maenas*)껍질로부터 추출한 청색 carotenoprotein의 전체 분자량은 365KDa이고, 그 subunit는 single polypeptide인 38.2KDa의 분자량이었다고 보고하였다. 이처럼 자연계에 존재하는 carotenoprotein의 분자량은 35,000~100만 dalton에 이르기까지 광범위하게 분포되어 있음을 알 수 있었다.

### 2) 아미노산 조성

Carotenoprotein의 구성아미노산 조성을 측정 한 결과는 Table 2에서 나타낸 바와 같이 threonine (35.9%) 함량이 다른 아미노산 보다 월등히 높았으며, 그 다음은 cysteine(8.6%) 및 valine(6.1%) 순이었다. 필수아미노산 함량은 전체아미노산의 62.8%를 차지하였고, methionine, histidine 및 proline은 존재하지 않았다. Carotenoprotein의  $\beta$ -구조 안정화에 영향을 미치는 threonine(35.9%), valine(6.1%), glycine(5.3%) 및 isoleucine(3.6%) 함량은

Table 2. Amino acid composition of the carotenoprotein (mol %)

Amino acid	Red carotenoprotein	Yellowish-red carotenoprotein* <sup>1)</sup>	Orange carotenoprotein* <sup>2)</sup>	Blue carotenoprotein* <sup>3)</sup>
Aspartic acid	4.1	8.4	5.5	9.0
Glutamic acid	5.9	11.2	10.1	7.8
Lysine	4.9	7.6	5.5	7.7
Arginine	2.5	-	3.3	4.8
Threonine	35.9	4.7	2.5	6.2
Valine	6.1	11.2	6.2	9.1
Isoleucine	3.6	4.1	4.9	5.2
Leucine	4.5	5.5	7.1	6.3
Phenylalanine	5.3	-	2.1	8.0
Alanine	5.5	19.3	7.0	9.3
Serine	3.7	12.4	17.9	5.7
Cysteine	8.6	-	1.2	-
Glycine	5.3	14.1	23.4	7.3
Tyrosine	4.1	-	1.4	7.0
Methionine	-	trace	-	0.6
Histidine	-	1.4	1.4	2.5
Proline	-	-	-	3.3
A	19.5	20.8	20.3	29.2
P	57.0	45.7	46.2	43.7
E	62.8	34.5	33.0	50.4

A=apolar residues: Val, Ile, Leu, Phe, Met.

P=polar residues: Asp, Thr, Ser, Glu, Lys, His, Arg.

E=essential A.A.: Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Val, His, Arg.

\*1) From the American crayfish, *Orconetes limosus*(Czczuga and Krywuta, 1981)

\*2) From the Marine sponge, *Axinella Verrucosa*(O. Schmidt)(Santoro et al, 1990)

\*3) From the carapace of the crayfish, *Astacus leptodactylus*(Rivas et al, 1988)

높았으나, α-나선구조의 안정화에 영향을 주는 glutamic acid(5.9%), alanine(5.5%) 및 leucine(4.5%) 함량이 비교적 낮은 것으로 보아 carotenoprotein의 구조는 높은 β-구조를 이루고 있다는 것을 짐작할 수 있었다(Chou et al., 1973). Czczuga and Krywuta(1981)는 미국산 가재(*Orconetes limosus*)로부터 추출한 황적색 carotenoprotein의 아미노산 조성에서 α-나선구조 안정화 아미노산(36.1%)이 β-구조 안정화 아미노산(34.0%)보다 함량이 높다고 하였고, Santoro et al.(1990)은 해면동물(*Axinella verrucosa*)에서 추출한 오렌지색 carotenoprotein의 아미노산 조성 중 β-구조 안정화 아미노산 함량(36.6%)이 α-나선구조 안정화 아미노산 함량(24.2%)에 비해 훨씬 높았다고 보고한 바 있다. 이와 같이 각각의 carotenoprotein간의 아미노산 조성의 차이에 의해 그 구조적 특성이 현저한 차이가 있는 것으로 생각된다.

Rivas et al.(1988)은 가재(*Astacus leptodactylus*)껍질로부터 추출한 청색 carotenoprotein에서 비극성 아미노산(Ala 9.3%, Val 9.1%, Leu 6.3%, Ile 5.2%)의 함량이 다른 아미노산에 비해 높았는데 이것이 단백질의 안정성에 관여한다고 보고하였는데, 본 실험에서는 비극성 아미노산(Val 6.1%, Ala 5.5%, Phe 5.3%, Leu 4.5%, Ile 3.6%)이 청색 carotenoprotein에 비해 낮으므로 단백질의 안정성이 다소 떨어진다고 볼 수 있다.

### 3) pH 안정성

Carotenoprotein을 pH 변화에 따른 안정성을 측정 한 결과는 Fig. 8에 나타내었다. Fig. 8에서와 같이 pH 7.0~10.0 범위에서는 흡광도 수치의 변화는 없었으나 pH 4.0 이하의 강산 및 pH 10.0 이상의 강알칼리에서는 흡광도 수치가 감소 또는 증가하였다. 그러나 carotenoprotein의 등전점 영역인 pH 4.5~6.0 부근에서는 흡광도 수치가 높아졌다. 이

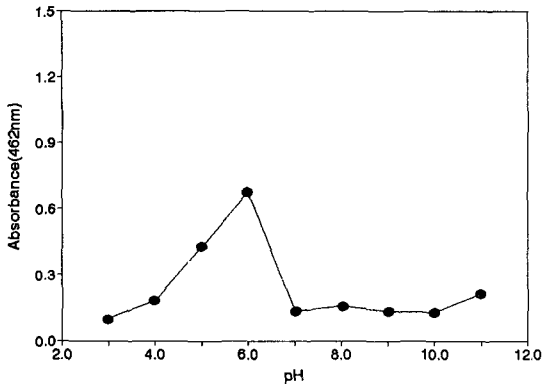


Fig. 8. Effect of various pH on the carotenoprotein.

와 같은 현상은 pH 4.0 이하의 강산이나 pH 10.0 이상의 강알칼리에서는 단백질의 변성에 의해 carotenoid와의 상호작용이 변함으로서 흡광도 수치가 변하고, pH 4.5~6.0 부근에서 단백질과 회합된 carotenoid가 유리되어 응집함으로서 흡광도 수치가 증가한 것으로 생각된다(Salares *et al.*, 1977).

Gomez *et al.*(1986)은 가재(*Astacus leptodactylus*) 껍질로부터 추출한 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 최대파장이 634nm에서 622nm로 이동하였고, pH 3.0 이하 및 pH 11.0 이상에서는 carotenoprotein이 변성하였다고 하였고, Eliot(1981)은 불가사리(*Marthasterias glacialis*)에서 추출한 자주색 carotenoprotein은 pH 3.8 이하에서는 불안정하였으며, pH 10.5 이상에서는 수초내에 분홍색으로 변화되고, 여기에 산을 가하면 색깔은 부분적으로 가역적 현상을 나타내었지만 pH가 아주 높은 경우는 오렌지 색으로 비가역적인 변화가 일어났다고 하였다.

#### 4) 변성제의 영향

Carotenoprotein의 변성제에 대한 영향을 알아보기 위해 SDS를 0.2%(w/v)되게 가하여 가시부 영역(400~600nm)에서 carotenoprotein의 연속파장을 측정된 결과를 Fig. 9에 나타내었다. Fig. 9에서와 같이 최대파장(462nm)에서 약 6nm 이동한 468nm에서 최대파장이 나타났고, 이것은 Milicua *et al.*(1985)이 가재(*Procambarus clarkii*)껍질로부터 추출한 적색 carotenoprotein에서 carotenoid를 분리하여 최대파장을 측정된 결과, carotenoprotein의 최대파장(482nm)에서 약 8nm 이동한 최대파장을 나

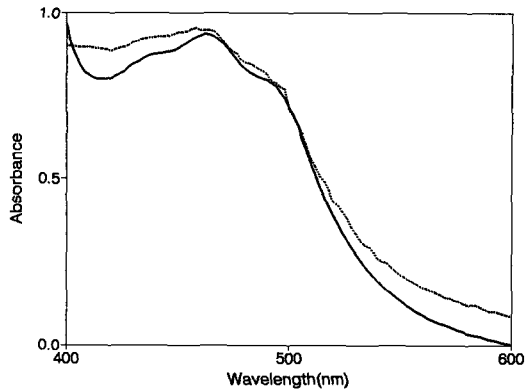


Fig. 9. Visible absorption spectra of the native carotenoprotein(—), and after treatment with 0.2%(w/v) SDS(---).

타내었다는 보고와 유사하였다. 그러나 Garate *et al.*(1986)은 가재(*Procambarus clarkii*)껍질로부터 추출한 청색 carotenoprotein을 50mM phosphate buffer(pH 7.5)에 녹여 SDS를 최종 농도 5%(w/v)까지 첨가한 결과, carotenoprotein의 최대파장이 635nm에서 carotenoid의 흡수극대치인 475nm로 160nm 정도 단파장 영역으로 이동하였고, Gomez *et al.*(1986)도 가재(*Astacus leptodactylus*)껍질에서 추출한 청색 astaxanthin protein에 SDS를 0.05%(w/v)되게 가하였더니 최대파장이 634nm에서 490nm로 carotenoid가 단백질과의 상호작용에서 유리되어 단파장 영역으로 이동하였다고 하였고, Garate 등(1984)은 게(*Carcinus maenas*)껍질로부터 추출한 청색 carotenoprotein에 SDS를 0.2%(w/v)되게 가하였더니 carotenoprotein의 최대파장(625nm)이 단파장 영역으로 125nm 이동하였다고 보고하였다.

이와 같이 청색 carotenoprotein류에 변성제를 가하면 100nm 이상 단파장으로 이동하였지만, 본 실험에서와 같이 적색 carotenoprotein의 경우는 최대파장이 단파장 영역으로 약 6~8nm 이동이 일어났다. 이것은 청색 carotenoprotein류는 단백질과 회합된 carotenoid가 SDS에 의해 단백질로부터 해리됨으로서 최대파장이 단파장 쪽으로 크게 이동하는 반면, 적색 carotenoprotein류는 carotenoid가 단백질과의 회합력보다 지질과의 회합력이 크게 작용하므로서 최대파장이 단파장 영역으로 약간 이동하는 분광학적 특성이 나타난다(Milicua *et al.*, 1985).

#### 5) 지방산 조성

Carotenoprotein 1g당 총지질의 함량은 256mg였



으며, 총지질의 구성지방산을 분석한 결과는 Table 3에 나타내었다. Table 3에서와 같이 polyene산이 전체지방산 함량 중 62.4%로 가장 많았고 다음으로 포화산(19.6%) 및 monoene산(18.0%) 순이었다. 양적으로 많은 지방산은 포화산 중에는 palmitic acid(C<sub>16:0</sub>), arachidic acid(C<sub>20:0</sub>), stearic acid(C<sub>18:0</sub>), monoene산 중에서는 palmitoleic acid(C<sub>16:1</sub>), polyene산 중에서는 hexadecatetraenoic acid(C<sub>16:4</sub>), eicosapentaenoic acid(C<sub>20:5</sub>), docosahexaenoic acid(C<sub>22:6</sub>) 등이 함량이 많았다. 이와 같이 polyene산 비율이 62.4%였으며, 특히, 16:4n-3의 조성비가 33.9%로 상당히 높게 나타났고, 혈청지방질의 개선, 혈소판응집능저하 및 혈액점도의 저하 등 생리적으로 효과가 있다는 EPA, DHA 등 ω3 계의 장쇄(長鎖)고도불포화지방산의 조성비가 22.1%로 높게 차지하였다(竹内 片平, 1983; 鴻巢, 1984).

Table 3. Fatty acids composition of the carotenoprotein

Fatty acid	Composition (%)	Fatty acid	Composition (%)
C <sub>14:0</sub>	0.1	C <sub>18:1(n-9)</sub> +C <sub>18:1(n-7)</sub>	4.7
C <sub>15:0</sub>	0.8	C <sub>18:2(n-6)</sub>	2.6
C <sub>16:0</sub>	12.2	C <sub>18:3(n-3)</sub>	1.1
C <sub>16:1(n-7)</sub>	3.5	C <sub>18:4(n-3)</sub>	1.8
C <sub>16:1(n-5)</sub>	4.1	C <sub>20:0</sub>	3.3
C <sub>16:2(n-4)</sub>	2.4	C <sub>20:1(n-11)</sub> +C <sub>20:1(n-9)</sub>	1.9
C <sub>16:3(n-3)</sub>	0.7	C <sub>20:4(n-6)</sub>	1.4
C <sub>16:4(n-3)</sub>	33.9	C <sub>20:5(n-3)</sub>	9.5
C <sub>17:1(n-9)</sub>	3.8	C <sub>22:5(n-3)</sub>	1.1
C <sub>18:0</sub>	3.2	C <sub>22:6(n-3)</sub>	7.9
Total Sat.*			19.6
Total Mono.*			18.0
Total PUFA*			62.4

\* Sat., Saturated fatty acids; Mono., Monounsaturated fatty acids; PUFA., Polyunsaturated fatty acids.

김 등(1988)은 연어알에서 분리한 carotenoprotein에서 지방산은 주로 stearic acid(47.9%)와 palmitic acid(21.4%)로 구성되어 있고 불포화 지방산으로는 oleic acid(15.2%)와 소량의 linoleic acid가 존재한다고 보고한 바 있다.

6) Carotenoid의 분리 및 동정

정제된 carotenoprotein을 저온(4℃)에서 acetone

으로 처리하여 단백질을 변성시키고 유리된 carotenoid를 TLC(benzene:petroleum ether:acetone=69:17:14)상에서 분리한 결과는 Fig. 10에 나타내었다. Fig. 10에서와 같이 carotenoid는 5개 band로 분리되었으며 주 band 3은 전체 함량 중에서 74.79% (band 1: 1.19%, band 2: 4.62%, band 4: 18.26%와 band 5: 1.14%)를 차지하였으며, 총 carotenoid의 양을 계산한 결과는 8.80mg%였다. 분리된 각 band는 여러가지 유기용매에서 가시부 흡수 spectrum의 측정, 표품과의 co-TLC 및 여러가지 유기반응을 통하여 작용기를 확인하여 동정하였다(Table 4).

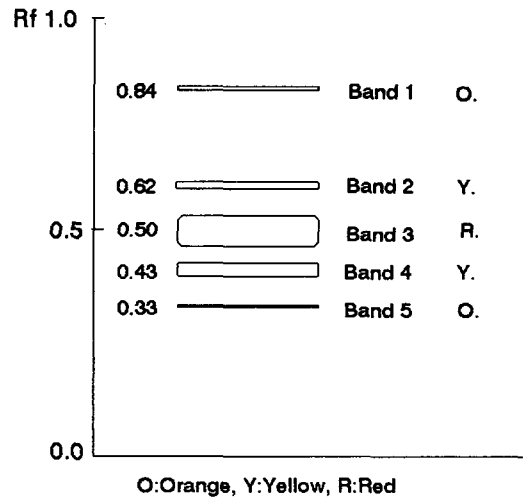


Fig. 10. Preparative thin-layer chromatogram of carotenoids in the muscle of blue mussel. Absorbent; Silica gel 60F Developer; benzene:petroleum ether:acetone (69:17:14).

Band 1, Band 2 및 Band 5는 가시부 흡수 spectrum의 측정결과, 흡수극대치가 각각 416, 446.8 및 449.2nm(in petroleum ether) 단일 band로 나타나 keto carotenoid류임을 확인할 수 있었다.

Band 3은 가시부 흡수 spectrum의 측정결과, 흡수극대치가 470nm(in petroleum ether), 483nm(in chloroform) 및 471nm(in EtOH)로서 keto group을 갖는 carotenoid 특유의 단일 band가 나타났다. NaBH<sub>4</sub>에 의한 환원반응생성물의 흡수극대치가 (405), 428, 457nm(in petroleum ether)로 42nm blue shift하였는데 이것은 고리내의 carbonyl group이 수산기로 전환된 것으로 판단된다. 염산

Table 4. Absorption maxima of the isolated carotenoids from the carotenoprotein

Band	Absorption maxima(nm)			Identification
	Chloroform	Petroleum ether	Ethanol	
1	420.2	416	-	unidentified ketocarotenoid
2	458.4	446.8	450.6	unidentified ketocarotenoid
3	483	470	471	mytiloxanthin
4	460.6 490	450.5 478.5	452.4 480.4	3,4,3'-trihydroxy-7',8'-didehydro-β-carotene
5	458.2	449.2	447.6	unidentified ketocarotenoid

epoxide 시험에서 음성으로 나타나 epoxide group 이 존재하지 않는다는 것을 확인하였다. IR spectrum에서는  $v_{max}$   $3300cm^{-1}$ (-OH),  $2165cm^{-1}$ (-C≡C-),  $1660cm^{-1}$ (conj. >C=O),  $960cm^{-1}$ (all trans -CH=CH-)였으며, 이 획분을 silica gel G 상에서 acetone:petroleum ether=3:7로 TLC하여 비교한 결과, Matsuno와 Maoka(1981)의 결과와 일치하므로 mytiloxanthin인 것을 알 수 있었다.

Band 4는 가시부 흡수 spectrum의 측정결과, 흡수극대치가 450.5, 478.5nm(in petroleum ether), 452.4, 480.4nm(in EtOH) 및 460.6, 490nm(in chloroform)로서 β-carotene 형태의 흡수 spectrum이 나타났다. I<sub>2</sub>에 의한 이성화 반응에서 흡수극대치는 442.5, 470.5nm(in petroleum ether)로 8nm blue shift 하였으므로 고리내 carbonyl기 1개 또는 3중 결합이 존재하는 것으로 추정할 수 있었으며, 염산 epoxide 시험에서는 음성이었다고, acetyl화 반응, TMS화 반응 및 allylic-OH 활성시험에서는 3개의 1급 또는 2급 수산기를 가지는 것으로 나타났다. IR spectrum에서는  $v_{max}$   $3300cm^{-1}$ (-OH),  $2165cm^{-1}$ (-C≡C-),  $1605$ ,  $1570cm^{-1}$ (conj. >C=C<),  $960cm^{-1}$ (all trans -CH=CH-) 원자단이 존재하였으며, 이 획분을 silica gel G 상에서 acetone:petroleum ether=3:7로 TLC하여 비교한 결과, Matsuno와 Maoka(1981)의 결과와 일치하므로 3,4,3'-trihydroxy-7',8'-didehydro-β-carotene임을 알 수 있었다.

강 과 하(1991)가 진주담치(암컷) 근육으로부터 분리한 주 carotenoid의 성분은 pectenoxanthin 44.7% 및 mytiloxanthin 35.6%였고, 그의 pectenolone 8.7%, diatoxanthin 5.0% 및 3,4,3'-trihydroxy-7',8'-didehydro-β-carotene 3.1% 등이 함유되어 있다고 한 보고와 본 실험에서 정제된 carotenoprotein으로부터 분리한 주 carotenoid의 성분은 mytiloxanthin 74.79%와 3,4,3'-trihydroxy-7',8'-didehydro-β-carotene 18.26%로 함량비 면에서 상당한 차이를 보였다.

또한, Matsuno and Maoka(1981)가 홍합(*Mytilus coruscus*)근육으로부터 분리한 주 carotenoid는 pectenoxanthin 31%, mytiloxanthin 27.5% 및 3,4,3'-trihydroxy-7',8'-didehydro-β-carotene 22.4%, 그의 diatoxanthin 13.8%와 pectenoxanthin 1.2%였다는 보고 및 이와 김(1971)이 진주담치에서 분리한 carotenoid는 β-carotene, lutein, zeaxanthin 및 astaxene로 구성되어 있다는 보고와 함량 및 조성간에 차이를 볼수 있는데 이것은 서식지의 환경, 계절적 변화 및 먹이생물 등에 따라 carotenoid의 조성성분 및 함량이 다소 차이가 있는 것으로 판단된다(Partali *et al.*, 1989).

## 요 약

우리나라에서 대량 생산되고 있는 진주담치 근육에서 Triton X-100를 사용하여 carotenoprotein을 추출, 정제하여 그 특성을 실험한 결과를 요약하면 다음과 같다.

Carotenoprotein( $\lambda_{max}=462nm$ )를 20% (w/v) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, DEAE-cellulose 이온교환수지 그리고 Sephacryl S-300 겔 크로마토그래피를 통해 정제한 결과, 정제도는 5배 증가하였고 수율은 1.85%였으며, carotenoprotein의 분자량은 약 372KDa(gel filtration)이었고, SDS-PAG 전기영동으로 단백질의 subunit를 확인한 결과, 60KDa(23.70%), 46.9KDa(9.14%), 26KDa(49.14%) 및 13KDa(18.02%)로 이루어져 있었다. Carotenoprotein의 안정성은 pH 4.0 이하의 강산 및 pH 10.0 이상의 강알칼리에서는 단백질이 불안정하였고, SDS 변성제를 0.2% (w/v) 되게 첨가하여 녹인 후 가시부 영역(400~600nm)에서 최대파장 변화를 보면 462nm에서 456nm로 약 6nm 단파장 영역으로 이동한 것을 알 수 있었다. Carotenoprotein의 구성아미노산 조성은 threo-

nine이 35.90%로 다른 아미노산에 비해 함량이 높았으며, 필수아미노산과 소수성 아미노산의 함량은 전체아미노산 함량의 각각 62.76%와 25.02%를 차지하였고, methionine, histidine 및 proline은 존재하지 않았다. Carotenoprotein 1g당 총지질의 함량은 256mg였고, 그 구성지방산의 조성은 polyene산이 62.4%로 가장 많았고 다음으로 포화산(19.58%) 및 monoene산(18%) 순이었다. 특히, 16:4n-3의 조성비가 33.90%로 상당히 높게 나타났고, EPA, DHA 등  $\omega 3$  계의 장쇄(長鎖)고도불포화지방산의 조성비가 22.13%로 높게 나타났으며, 양적으로 많은 지방산은 포화산 중에는 palmitic acid(C<sub>16:0</sub>), monoene산 중에서는 palmitoleic acid(C<sub>16:1</sub>), polyene산 중에서는 hexadecatetraenoic acid(C<sub>16:4</sub>), eicosapentaenoic acid(C<sub>20:5</sub>), docosahexaenoic acid(C<sub>22:6</sub>) 등이 함량이 많았다. Carotenoprotein으로부터 분리한 총 carotenoid 함량은 8.80mg%였고, 주 carotenoid는 mytiloxanthin(74.79%), 3,4,3'-trihydroxy-7',8'-didehydro- $\beta$ -carotene(18.26%)였다.

## 참 고 문 헌

- Bligh, E. G. and W. J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911~917.
- Britton, G. and T. W. Goodwin. 1981. *Carotenoid Chemistry and Biochemistry*. Pergamon Press, p. 237.
- Buchwald, M. and W. P. Jencks. 1968. Optical properties of astaxanthin solutions and aggregates. *Biochemistry* 7, 834~843.
- Campbell, S. A. 1970. The carotenoid pigments of *Mytilus edulis* and *Mytilus californianus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 32B, 97~115.
- Cano-lopez, A., B. K. Simpson and N. F. Harrod. 1987. Extraction of carotenoprotein from shrimp process wastes with the aid of trypsin from atlantic cod. *J. Food Sci.*, 52(2), 503~506.
- Cariello, L. and L. Zanetti. 1981. A blue carotenoprotein from the marine sponge, *Suberites domuncula*: Purification and Properties. *Mar. Biol.* 62, 151~155.
- Cheesman, D. F., W. L. Lee and P. F. Zagalsky. 1967. Carotenoproteins in invertebrates. *Biol. Rev.*, 42, 131~160.
- Chou, P. N. and G. D. Fasman. 1973. Structural and functional role of leucine residues in proteins. *J. Mol. Biol.*, 74, 263~281.
- Czeczuga, 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, 339~343.
- Davis, B. J. 1964. Disc-electrophoresis II, method and application to human serum protein, *Ann. New York Acad. Sci.*, 121, 404.
- Eliot, T. S. 1981. Studies of invertebrate carotenoprotein(Ph. D. Thesis). Dept. of Chemistry, University of Liverpool, U.K.
- Fabian, I. and S. Shvartzmayer. 1986. Effect of a new retinoidal benzoic acid derivative on normal human hematopoietic cell growth in *Vitro*. *Cancer Res.*, 46, 2413~2415.
- 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, 446~455.
- 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(3), 605~608.
- 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(4), 855~859.
- Kazuo, S. 1991. Carotenoids metabolism of carotenoids and new physiological function of  $\beta$ -carotene. *Japan oil Chem. Soc.*, 40(10), 121~131.
- Khare, A., G. P. Moss, B. C. L. Weedon and A. D. Matthews. 1973. Identification of astaxanthin in Scottish salmon. *Comp. Biochem. Physiol.*, 45B, 971~973.
- Kuhn, R. and N. A. Sorensen. 1938. Über astaxanthin und overdin. *Ber. Disch. Chem. Ges.* 71, 171~180.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural pro-

- teins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature(London)*, 227, 680.
- Matsuno, T. and T. Maoka. 1981. Isolation of a new carotenoid, 3,4,3'-trihydroxy-7',8'-didehydro- $\beta$ -carotene from Sea mussels. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 47(3), 377~384.
- McBeth, J. W. 1972. Carotenoid from nudibranchs. *Comp. Biochem. Physiol.*, 41B, p. 55.
- Millicua, J. C. G., I. Arberas, P. G. Barbon, A. M. Garate and R. Gomez. 1986. A yellow carotenoprotein from the carapace of the crayfish, *Astacus leptodactylus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 85B(3), 615~619.
- Millicua, 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(4), 1023~1025.
- Olson, J. A. 1989. Provitamin A function of carotenoids: The conversion of  $\beta$ -carotene into vitamin A. *Am. J. Nutr.*, 119, 105~108.
- Partali, V., K. Tangen and S. Liaaen-Jensen. 1989. Carotenoids in food chain studies-III. Resorption and metabolic transformation of carotenoid in *Mytilus edulis*(edible mussel). *Comp. Biochem. Physiol.*, 92B, 239~246.
- Rivas, J. D. L., J. C. G. Millicua and R. Gomez. 1988. Further studies on the blue carotenoprotein from *Astacus leptodactylus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 89B(1), 65~68.
- Salares, W. R., N. M. Young, N. J. Bernstein and P. R. Carey. 1979. Mechanisms of spectral shifts in lobster carotenoproteins. The resonance Raman spectra of oververdin and the crustacyanins. *Biochem. Biophys. Acta.*, 578, 176~191.
- Santorio, 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(4), 645~648.
- Shimizu, T. and K. Uchida. 1968a. Carotenoids in bivalves I. Carotenoids in short-neck clam, *Venus japonica*. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, 34(2), 154~158.
- Shimizu, T. and R. Monma. 1968b. Carotenoids in bivalves II. Carotenoids in hard clam, *Meretrix losoria*. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, 34(2), 159~162.
- Shimizu, T. and Y. Ohta. 1968c. Carotenoids in bivalves III. Carotenoids in corb shell, *Corbicula japonica*. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, 34(3), 210~213.
- Shimizu, T. and T. Narahara. 1968d. Carotenoids in bivalves IV. Carotenoids in ark-shell, *Anadara brotunii*. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, 34(6), 503~506.
- Shimizu, T. and A. Oda. 1968e. Carotenoids in bivalves V. Carotenoids in *pecten*. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, 34(7), 627~632.
- Shone, C. C., G. Britton and T. W. Goodwin. 1979. The violet carotenoprotein of the starfish, *Asterias rubens*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62B, 507~513.
- Simpson, B. K. and N. F. Haard. 1985. The use of proteolytic enzymes to extract carotenoproteins from shrimp wastes. *J. Appl. Biochem.*, 7, 212~222.
- Zagalsky, P. F. 1985. Invertebrate carotenoproteins. *In Methods in Enzymology*, Vol. III, J. H. Law and H. C. Rilling ed. Academic Press, Inc., London, pp. 216~247.
- Zagalsky, P. F. and Herring, P. J. 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, 397~415.
- Zagalsky, P. F., Ceccaldi, H. J. and Daumas, R. 1970. Comparative studies on some decapod crustacean carotenoproteins. *Comp. Biochem. Physiol.*, 34B, 579~607.
- 竹内務・片平亮太. 1983. EPAについて. *New food industry*, 25(4), 5~9.
- 鴻巢章二. 1984. 水産食品と營養, 恒星社厚生閣, pp. 54~69.
- 강동석・하봉석. 1991. 이매패의 Carotenoid 색소성분. 1. 홍합과 진주담치 근육의 Carotenoid 색소성분의 비교. *한국영양식량학회지*, 20(4), 369~375.
- 김세권・김용태・곽동채・조덕제・이응호. 1990.

- 크릴 가공폐기물을 이용한 Carotenoprotein의  
추출조건 및 품질안정성에 관한 연구. 한국수  
산학회지 23(1), 40~50.
- 김재웅 · 민태진 · 이태영. 1988. 연어알에서 분리한  
Carotenoprotein의 구조적 특성. 대한화학회지  
32(4), 377~384.
- 이강호 · 김종배. 1971. 어패류의 색소에 관한 연구.
1. 진주담치의 carotenoid. 부산수산대연보, 11,  
57~67.
- 
- 1994년 8월 6일 접수  
1994년 9월 10일 수리