

## 미더덕(*Styela clava*)으로부터 분리·정제한 carotenoprotein의 특성에 관한 연구

이안종 · 김용태\* · 김세권†

부경대학교 자연과학대학 화학과  
\*日本 青山學園大學 化學科

## Purification and Characterization of a Carotenoprotein from *Styela clava*

An-Jong Lee, Yong-Tae Kim\* and Se-Kwon Kim†

*Department of Chemistry, Pukyong National University, Nam-Ku, Pusan 608-737, Korea*

*\*Department of Chemistry, College of Science & Engineering, Aoyama Gakuin University, Setagaya-ku, Tokyo 157, Japan*

### Abstract

In this study carotenoprotein from *Styela clava* were extracted, and purified by ammonium sulfate fraction, Sephadex G-200 gel chromatography and DEAE-cellulose ion exchange chromatography.

The purified carotenoprotein from *styela clava* had absorption maxima of 487nm, 463nm and 280nm, and the carotenoid liberated from carotenoprotein had 478nm and 452nm with inflexion. One miligram of carotenoprotein contained 0.35µg of carotenoid. The carotenoprotein had an approximate molecular weight of 398 kDa (gel filtration). SDS-PAGE showed only a single polypeptide chain with a molecular weight of 62.4 kDa. The amino acid composition of the carotenoprotein were mainly glutamic acid(11.48%), valine(10.75%), leucine (10.45%), aspartic acid(9.94%), while cysteine and tryptophan were not found. The carotenoprotein contained lipid as structure units. In the carotenoprotein, the major fatty acids were oleic acid, palmitoleic acid and palmitic acid. The percentages of monosaturated fatty acids(47.7%) were higher compared to other fatty acids(polyunsaturated fatty acids 33.6%, saturated fatty acids 18.6%). In addition, the levels of higher unsaturated fatty acids were high as much as 30.8% of the total fatty acids. Carotenoid was extracted from the carotenoprotein by acetone. Thin layer chromatography showed only one carotenoid to be present. Its chemical reactivities and spectroscopic properties were studied and elucidated as astaxanthin.

*Key words : Carotenoprotein purification, characterization, carotenoid, styela clava*

---

† Corresponding author

## 서 론

천연 색소로써 중요한 carotenoid는 동·식물 및 미생물 등의 생체내에 여러형태로 폭넓게 존재하는 물질로 약 600여 종류가 자연계에서 분리·동정되었다<sup>1)</sup>. Carotenoid는 물리화학적 성상의 차이에 따라 carotenoprotein과 carotenolipoprotein 복합체로 분류할 수 있다.

Carotenoprotein은 carotenoid와 단백질 또는 당단백질과 결합한 것으로 어피나 갑각류의 껍질에 존재하며, carotenolipoprotein은 lipoprotein과 결합된 것으로 난(卵), 난소 및 혈액 등에 분포되어 있다<sup>2)</sup>. Carotenoid-protein 복합체는 수용성이며, 단백질이나 carotenoid가 단독으로 존재할 때 보다 훨씬 더 안정하다. 이들은 흔히 식물의 광합성 해조류, 박테리아, 어류 및 패류 등에서 발견되는데 단백질과 회합하고 있기 때문에 분홍색, 자주색, 청색, 적색 또는 녹색을 띠며 UV 흡수스펙트럼이 유리상태의 carotenoid보다는 장파장 쪽으로 크게 이동되고, 이들 복합체의 분자량은 35~1000 KDa에 이르기까지 폭넓게 분포되어 있다<sup>3)</sup>. 이들 carotenoprotein은 해양 동물인 게, 새우, 불가사리 및 산호 등에 많이 존재하며, 어류 및 패류에도 존재하기 때문에 이에 관한 많은 연구가 이루어지고 있다<sup>4~8)</sup>.

Carotenoid는 사람의 혈액이나 젖에서 발견되며 동물체내에서  $\beta$ -carotene이 비타민 A로 전환될 때는 carotenoid 분자의 두  $\beta$ -ionone 고리 사이에 있는 짝지은 이중 결합의 중심부분이 절단됨으로써 두 분자의 비타민 A로 전환된다는 것은 널리 알려진 사실이다<sup>9~10)</sup>. 이와 같이 carotenoid 색소는 비타민 A의 식이원으로서 중요성 외에도 단백질 섭취의 영향인자, 식이성 지방질의 분산 그리고 다른 provitamin의 체내 이용이나 대사에 크게 영향을 미친다<sup>11)</sup>. 또한, 체내에서의 생리활성 작용으로써 각종 발암제나 돌연변이 유발성 물질들이 체내에서 자발적 또는 체외에서 빛의 작용에 의한 산소라디칼 생성이나 지질 과산화물 생성반응으로부터 생체막의 보호기능<sup>12~13)</sup>과 항산화작용<sup>14)</sup>에 의한 생체의 노화억제, protoporphyria 유전병 치료<sup>15)</sup> 등의 의학적인 측면에서 carotenoid의 중요성이 강조되고 있다. 이와 같이 carotenoid는 빛의 유해작용에 대한 보호기능이 있으므로 여러가지 피부질환 환자에게 유용하게 이용되며, 또 비타민 A 및 그 유도체들은 악성종양에 활성을 갖는 것이 알려져 있고<sup>16~17)</sup>, 빛에 의한 피부암의 발생을 억제하는 기능도 있다는 것이 동물실험으로 확인되었다<sup>18)</sup>.

본 연구에서는 미더덕에 존재하는 carotenoprotein을 분리·동정하였으며, 여러가지 화학반응( $\text{NaBH}_4$ 에 의한 환원 반응, 아세틸화반응, 에폭시기 확인, 알릴히드록시기 확인 등)과 UV/Vis, IR 측정 등으로 단백질과 회합하고 있는 carotenoid를 분리·동정하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 사용한 미더덕(*Styela clava*)은 부산 충무동 공동어시장에서 구입한 경남 한산도산으로 평균중량 7.9g, 평균각장 6.3cm, 평균각고 2.3cm인 시료를 구입하여 실험실로 운반한 후, 육과 껍질을 분리하여  $-40^\circ\text{C}$  냉동고에 저장하여 두고 실험에 사용하였다.

Sephadex G-200, DEAE-cellulose, Folin-ciocalteu 시약, sodium dodecyl sulfate(SDS), bovine serum albumin, 전기이동용 protein molecular weight standards 및 지방산 methyl ester의 표준품은 미국의 Sigma사 제품을, TLC판은 독일의 Merck사부터 구입하여 사용하였으며, 그 외 다른 모든 시약은 분석용 특급을 사용하였다.

### Carotenoprotein의 분리·정제

육 200g을 잘게 다진 후 2% (v/v) Triton X-100을 함유하는 50mM Na-phosphate buffer (pH 7.0)를 4배량 (w/v)을 가하여 균질기로 2분간 균질화 시켰다. 이 용액을  $4^\circ\text{C}$  냉암소에서 24시간 교반하여 추출한 후에, 원심분리 (15,000 $\times$ g, 20min)하여 pellet의 색깔이 완전히 무색이 될 때까지 3회 반복 추출하여 전 추출액을  $-20^\circ\text{C}$ 에 보관하여 두고 실험에 사용하였다.

Carotenoprotein는 Fig. 1과 같은 방법으로 정제하였다. 즉, 추출한 용액에 30% (w/v)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 염석시켜 냉암소( $4^\circ\text{C}$ )에서 12시간 방치한 다음, 원심분리(15,000 $\times$ g, 20min)하여 상층액을 50mM Na-phosphate 완충액(pH 7.0)으로 투석하였다. 이 투석액을 원심분리(15,000 $\times$ g, 20min)하여 얻어진 상층액을 미리 같은 완충액으로 평형화시킨 Sephadex G-200 겔 크로마토그래피 컬럼( $\Phi 2.5 \times 80\text{cm}$ )에 주입하고, 동일 완충액으로 용출(유속, 9ml/hr; 분획량, 2ml)하였다. 여기서 얻어진 희분을 질소압력 농축기(Sartorius Co. ultra-membrane filtrator, mol-cut 10,000)로 농축하여 50mM Na-phosphate 완충액(pH

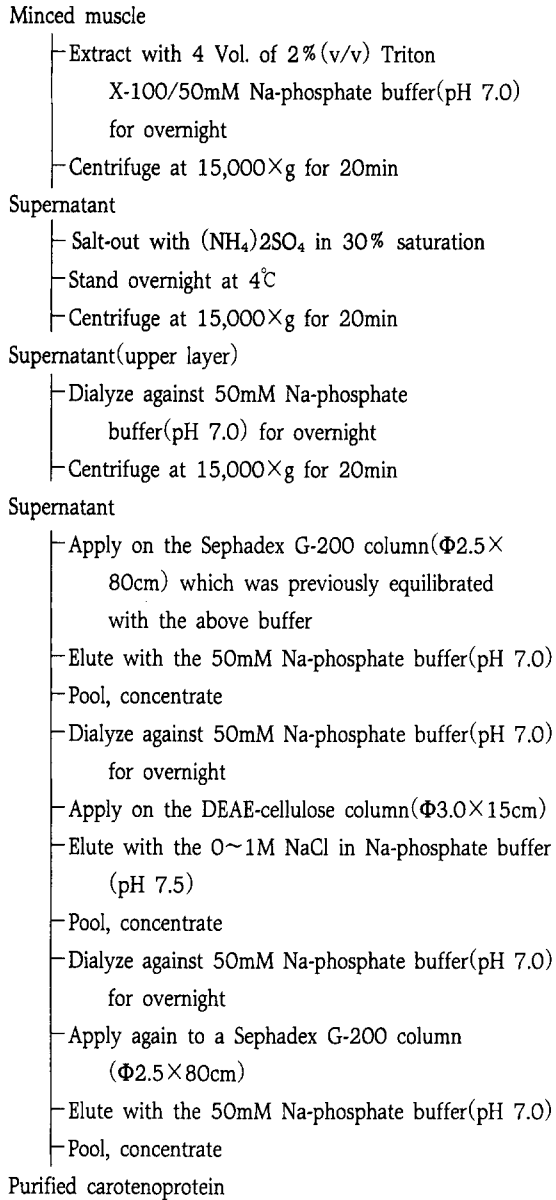


Fig. 1. Scheme of purification procedure for the carotenoprotein from *Styela clava*.

7.5)으로 24시간 투석하였다. 다음 단계로 이 투석액을 같은 완충액으로 평형화시킨 DEAE-cellulose 컬럼(Φ3.0×15cm)에 통과시킨 후, 0~1M NaCl/50mM Na-phos-

phate 완충액(pH 7.5)으로 농도구배법으로 분별용출(유속, 24ml/hr; 분획량, 2ml)하여 얻어진 획분을 질소압력 농축기로 농축하고, 50mM Na-phosphate 완충액(pH 7.0)으로 24시간 투석하였다. 이 투석액을 미리 50mM Na-phosphate 완충액(pH 7.0)으로 평형화시킨 Sephadex G-200 컬럼(Φ2.5 80cm)에 주입하고 같은 완충액으로 용출(유속, 9ml/hr; 분획량, 2ml)시켜 정제하였다.

#### 단백질의 정량

Bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 Lowry 등<sup>19)</sup>의 방법에 따라 미리 구한 검량선으로부터 단백질농도를 구하였다. 즉, 단백질용액 0.1ml에 0.1N NaOH에 녹인 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>용액과 1% sodium potassium tartarate에 녹인 0.5% CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O용액을 50:1(v/v)로 혼합한 용액 1ml를 가하고 10분 후 1N Folin-ciocalteu 시약 0.1ml를 가하여 30분간 발색시킨 다음 660nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### Carotenoprotein의 동정

##### 전기이동 분석

순도검정을 위한 분석은 Davis<sup>20)</sup>의 disc-PAGE(5.0% polyacrylamide gel)법에 따라 최종 정제 단계된 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 Laemmli<sup>21)</sup>의 방법에 따라 실행하였다. 즉 Subunit를 측정하기 위하여 SDS-PAG(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-0.129M glycine 완충액(pH 8.3)을 사용해서 각 well당 2mA의 전류로 전기이동하였다. 전기이동 후 disc와 SDS-gel의 단백질 band는 5% TCA로 고정화시킨 다음, 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 단백질의 전기이동 이동도를 비

교하여, 단백질의 구성 subunit의 분자량 측정 및 순도를 판정하였다.

#### 겔여과에 의한 분석

Andrews 등<sup>22)</sup>의 방법에 따라 분자량을 측정하였다. 즉, Sephadex G-200 컬럼(Φ2.2×98cm)에 정제된 carotenoprotein과 겔 여과용 분자량 표준단백질(thyroglobulin : M.W.=669 kDa, apoferritin : M.W.=443 kDa, β-amylase : M.W.=200 kDa, alcohol dehydrogenase : M.W.=150 kDa, bovine serum albumin : M.W.=66 kDa)을 20mM KCl을 함유하는 50mM Na-phosphate 완충액(pH 7.5)을 사용하여 교대로 용출(유속 : 6ml/hr, 분획량 : 1 ml)시킨 후에 용출부피(Ve)와 blue dextran의 용출부피(Vo)의 비로써 분자량을 측정하였다.

#### 아미노산 분석

정제 carotenoprotein에 6N HCl을 동량 혼합하여 cap tube에 넣고 감압상태로 밀봉한 다음 110℃에서 24시간 분해시킨 후, 감압하에 농축 정용(sodium citrate, pH 2.2)한 것을 아미노산 자동분석기(LKB 사제, 4150 type)로 분석하였다.

#### 지방산 분석

Bligh와 Dyer<sup>23)</sup>의 방법에 따라 정제된 carotenoprotein 으로부터 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)용액 20ml를 넣고, 다시 1분간 교반한 후 여과하여 분액깔때기에서 하룻밤 방치하였다. 분리된 하층을 취하여 탈수시킨 다음 회전진공농축기(EYELA N-1N, Tokyo, Japan)로 용매를 제거하여 총지질을 추출하였다.

지방산 조성을 알아보기 위하여 총지질 100mg을 정평하여 1N KOH-95% ethanol용액으로 비누화(85℃, 1시간)한 다음 10% BF<sub>3</sub>-MeOH 3ml를 가하여 95℃에서 15분간 환류가열하여 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.

#### Carotenoid의 분리·정제

Khare 등<sup>24)</sup>의 방법을 변형하여 carotenoprotein으로부터 carotenoid를 추출하였다. 즉 정제된 carotenoprotein의 인산염 완충용액에 3배량의 acetone을 가하고 균질기로 교반하여 단백질로부터 carotenoid를 이탈시켰다. 모든 실험은 광선을 피하여 4℃냉암소의 어두운 적색등 밑에서 수행하였다. 단백질이 색깔을 띠지 않을 때까지 위의 조작을 반복한 다음 carotenoid의 추출액을 모두 회수하였다.

이 추출액을 분액여두로 옮긴 다음 여기에 석유에테르를 추출액과 1 : 2(v/v)의 비로 가하여 천천히 흔들어 주고 30분간 방치시켜 carotenoid를 분리하였으며, 하층액을 2차 분액여두로 옮겨 석유에테르로 이 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>(30g)를 처리하여 여과하고, 그 여액을 질소기류하에서 회전진공농축기로 감압농축하여 총 carotenoid를 얻었다.

총 carotenoid의 정량은 McBeth<sup>25)</sup>의 방법에 따라 다 음식에 의하여 계산하였고, optical density 측정은 석유에테르를 용매로 사용하였다.

$$\text{mg\%} = \frac{\text{mg(carotenoid)}}{100\text{g(tissue)}} = \frac{\text{O.D}(\lambda_{\text{max}}) \times \text{Vol.} \times 10^3}{E^1 \times 1\text{cm.}(2,500) \times \text{weight of tissue(g)}}$$

$$\% = \frac{100 \times \text{Vol. O.D.}(\lambda_{\text{max}}) \text{ (for each band)}}{\Sigma [\text{Vol.} \times \text{O.D.}(\lambda_{\text{max}}) \text{ (each band)}]}$$

Carotenoid들은 다음과 같이 TLC법으로 분리 정제하였다. 다량의 시료 분취용으로 silica gel G가 2mm 두께로 코팅된 Merck사 제품의 유리 TLC판(20×20cm)을 사용하였고 화학반응의 확인용으로는 0.25mm의 알루미늄 TLC판(20×20cm)을 각각 사용하였다. 상법에 따라 TLC 판은 110±5℃의 전기오븐 속에서 활성화시켜서 사용하였고 1차 전개용매로서는 acetone/petroleum ether(3 : 7, v/v)용매, 2차는 benzene/diethyl ether/methanol(17 : 2 : 1)용매를 각각 사용하였다. TLC상에 1차로 분리된 carotenoid를 유리섬유를 단단히 낀 감압분취장치로 긁어낸 다음 methanol로 carotenoid를 용출하였다. 용출된 carotenoid들은 40℃이하에서 감압농축시킨 다음 질소충진하에 초저온 냉동고(-80℃)에 보관해 두고 실험에 사용하였다.

**Carotenoid의 화학 반응성**

NaBH<sub>4</sub>에 의한 환원반응 : Walton 등<sup>26)</sup>의 방법에 따라서 carotenoid의 ethanol용액을 NaBH<sub>4</sub>로 1시간 동안 환원반응시켰다. 색깔의 변화로 반응의 진행을 확인한 다음에 소량의 증류수를 가하고 diethyl ether로 색소를 추출한 다음 농축하였다.

환원생성물은 ethanol에 용해하여 앞서와 같은 TLC법으로 반응 전후의 TLC거동과 최대 흡수파장(350nm~600nm)의 영향을 관찰하였다.

아세틸화반응 : 분자내 1차 또는 2차 hydroxyl group이 존재하는지를 확인하기 위하여 Schiedt 등<sup>27)</sup>의 방법에 따라서 아세틸화반응을 시행하였다. 즉 pyridine에 녹인 carotenoid용액 1ml에 acetic anhydride 1ml를 넣고 실온에서 4시간 동안 반응시켰다. 차가운 증류수를 가하여 반응을 정지시킨 다음 diethyl ether로 색소를 추출하여 앞서와 같은 TLC법으로 에스테르반응을 확인하였으며, pyridine 용액에서 흡광도(350nm~600nm)를 측정하였다.

에폭시기 확인 : Carotenoid 분자들이 β-ionone 고리의 5,6- 또는 7,8- 위치에 epoxy group을 갖고 있는지의 여부를 조사하기 위하여 Karrer<sup>28)</sup>의 방법에 따라서 실험하였다. 즉 일정한 carotenoid을 녹인 diethyl ether용액을 진한 염산과 반응시킬 때 청색으로 변화하는지를 관찰하였다.

알릴히드록시기 확인 : Carotenoid 분자속에 있는 allylic hydroxyl group의 확인은 Liaaen- Jensen 등<sup>29)</sup>의 방법을 이용하였다. 즉, carotenoid의 diethyl ether용액에서 용매를 날려 보내고 실온에서 0.01N HCl/methanol로 2시간 동안 반응시킨 다음 앞서와 같은 TLC법으로 TLC상에서 R<sub>f</sub>값의 차이를 비교하였다.

**UV/Vis 및 IR 분석**

Carotenoprotein을 구성하고 있는 carotenoid의 구조를 결정하기 위하여 UV/Vis spectrophotometer는 Shimadzu U-3210 (Tokyo, Japan)을, 적외선 흡수 spectrophotometer는 Bruker IFS-120 HR (Germany)을 사용하여 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**Carotenoprotein의 분리 · 정제**

Carotenoprotein을 Fig.1에 나타난 공정에 따라 분리 정제하였다. 즉, Triton X-100으로 추출한 carotenoprotein

액에 대해 30% 포화황산암모늄 염색 분획을 투석하고, 그 액을 50mM Na-phosphate 완충액(pH 7.0)으로 평형화된 Sephadex G-200 칼럼(Φ2.5×80cm)에 주입하여 용리(유속, 9ml/hr; 분획량, 2ml)시킨 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 이 단계에서 과량의 Triton X-100이 제거되었고, Fig. 2에 나타난 바와 같이 carotenoprotein이 완전히 용출(fraction No. 64~124)되었으며, 이 때의 carotenoprotein은 조추출액에 비해 정제도가 3.3배 증가되었다. 이 분획을 모아 질소 압력농축기로 농축하고 투석하였다. 이 투석액을 50mM Na-phosphate 완충액(pH 7.5)으로 평형화된 DEAE-cellulose 칼럼(Φ3.0×15cm)에 주입하여, 동일 완충액으로 비흡착 부분을 받은 후, 0~1M NaCl을 함유하는 동일 완충액을 사용하여 선형상농도구배법으로 용리(유속, 24ml/hr; 분획량, 2ml)시킨 결과 비흡착 부분에서 carotenoprotein이 완전히 용출되었다(Fig. 3). 따라서 비흡착 부분의 분획(fraction No. 31~43)을 모아 질소압력 농축기로 농축하고 투석하였다. 이 투석액을 50mM Na-phosphate 완충액(pH 7.0)으로 평형화된 Sephadex G-200 칼럼(Φ2.5×80cm)에 주입하여 분별 용출(유속, 9ml/hr; 분획량, 2ml)하였다(Fig. 4). 이 단계에서 정제된 carotenoprotein의 분획(fraction No. 70~85)은 disc-와 SDS-전기이동상에서 순도가 검정되었으며 질소압력 농축기로 농축하였다.

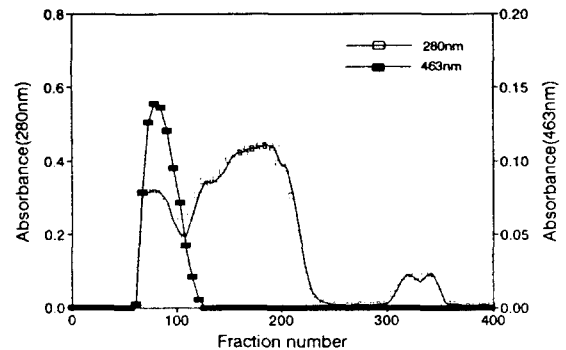


Fig. 2. Elution profile of the carotenoprotein extract(absorbance at 463 and 280nm) from *Styela clava* in Triton X-100 obtained by gel filtration on Sephadex G-200 column(Φ2.5×80cm). Elution condition : Buffer, 50mM Na-phosphate buffer(pH 7.0). Flow rate and fraction volume ; 9 ml/hr and 2ml.

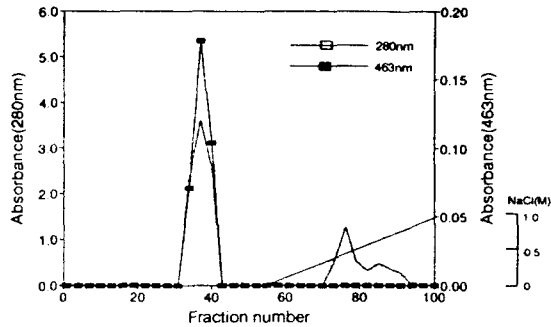


Fig. 3. Elution profile of the carotenoprotein from *Styela clava* on DEAE-cellulose column( $\Phi 3.0 \times 15$ cm) by gradient with 0~1M NaCl in 50mM Na-phosphate buffer.  
Elution condition : Buffer ; 50mM Na-phosphate buffer(pH 7.5). Flow rate and fraction volume ; 24ml/hr and 2ml.

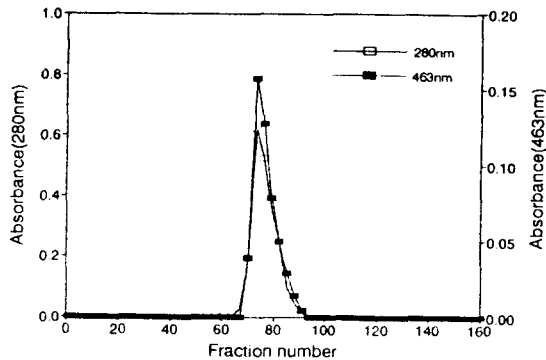


Fig. 4. Sephadex G-200 column chromatogram( $\Phi 2.5 \times 80$ cm) of the carotenoprotein from *Styela clava* obtained from DEAE-cellulose column chromatography.  
Elution condition : Buffer ; 50mM Na-phosphate buffer(pH 7.0). Flow rate and fraction volume ; 9ml/hr and 2ml.

이 carotenoprotein의  $\lambda_{max}$ 은 487, 463 및 280nm에서 최대흡수를 가지며, acetone/diethyl ether(1 : 1, v/v)로 처리하여 단백질로부터 색소를 유리시키고 diethyl ether 용액에서 측정된 free carotenoid의 최대 흡수파장  $\lambda_{max}$ 은 478 nm와 452nm에서 뚜렷한 굴곡현상이 나타났다(Fig. 5).

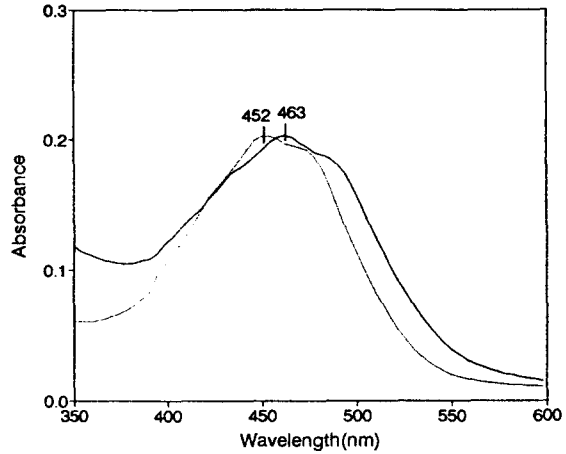


Fig. 5. Comparative visible absorption spectrum of the purified carotenoprotein from *Styela clava* (—) and its free carotenoid component in ethereal solution (·····) after extraction.

이와 같이 아세톤으로 처리하면 과장변화가 나타나는데 이것은 carotenoid 분자의  $\beta$ -ionone 고리속에 4-와 4'-위치의 keto group과 apoprotein의 amino group간에는 schiff's 염기나 sulfhydryl group을 포함한 견고한 결합이 아니고 비공유결합으로 속박되어 있기 때문에 아세톤으로 처리할 때 단백질로부터 carotenoid가 쉽게 이탈된다. 따라서 apoprotein과 carotenoid의 keto group들 사이에 특이적인 배열 변화를 일으키기 때문에 분광학적인 과장변동에 영향을 주는 것으로 짐작된다<sup>30)</sup>.

Carotenoprotein중의 단백질, 지질 및 총 carotenoid 양을 각각 정량해 본 결과 carotenoprotein 100mg당 단백질, 지질 및 carotenoid 함량은 각각 61.5, 38.1 및 0.035mg이었으며, carotenoprotein의 정제도 조추출액에 비하여 7.8배 정제되었고 단백질의 수율은 5.8%였다(Table 1).

Milicua 등<sup>8)</sup>은 가재(*P. clarkii*)껍질로부터 Triton X-100을 사용하여 얻은 적색 carotenoprotein은 최대 흡수파장이  $\lambda_{max}$  482nm이고, 보호그룹으로서 astaxanthin과 그 ester가 함유되었고, carotenoprotein 1mg당 0.833mg의 지질과 0.178 $\mu$ g의 astaxanthin 및 astaxanthin ester가 함유되었다고 보고하였는데 이 결과는 본 연구 결과와 현저한 차이가 있었다.

Table 1. Purification of the carotenoprotein from *Styela clava*

Procedure	Volume(ml)	*Total protein (mg)	+Carotenoprotein (mg)	Purification (C/T)*	Yield (%)
1. Crude extract	1,500	6,543	643	1	100
2. 20% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	495	1,286	298	2.4	46.3
3. Sephadex G-200 gel filtration	89	296	96	3.3	14.9
4. DEAE-cellulose	40	86	49	5.8	7.6
5. Sephadex G-200 gel filtration	29	48	37	7.8	5.8

\*Total protein measured by Lowry assay.

+The amount of carotenoprotein is calculated by the equation : Absorbance at 463nm×Volume of solution ml.

\*C/T : carotenoprotein/total protein.

Kim 등<sup>31)</sup>은 연어알에서 정제한 carotenoprotein은 최대 파장 λ<sub>max</sub> 589, 540 및 580nm에서 가시부 흡수극대를 가지며 단백질과 회합하여 상호 보호그룹으로 작용하는 carotenoid 성분은 astaxanthin ester이었다고 보고하였다.

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 carotenoid와 apoprotein, 지질, 당 등이 회합되어 복합체를 이룰 때 흡수 스펙트럼이 강하게 장파장으로 이동되는 것이 있는가 하면, 단파장으로 이동되는 것도 있고, 약하고 좁게 장파장 이동되는 것 등 여러가지가 있다<sup>32)</sup>.

Carotenoprotein의 동정 및 분자량

각 정제단계별 정제도와 구성 subunit의 확인은 SDS-PAGE법으로, 순도검정은 disc-PAGE법으로, 분자량 측정은 Sephadex G-200 겔 여과법으로 실행하였다. Fig. 6은 겔 질에서 분리 정제된 적색 carotenoprotein의 disc-PAGE 한 결과로서 단일 band로 나타나 균질한 상태의 carotenoprotein임을 확인할 수 있다. 이 단백질 band를 9.5% SDS-PAGE법으로 구성 subunit 분자량을 측정된 결과, subunit 분자량이 62.4 kDa의 single polypeptide로 이루어져 있었다. 또한 겔 여과에 의해 carotenoprotein의 분자량을 측정하기 위해 Sephadex G-200을 사용한 결과를 Fig. 7에 나타내었는데 이때의 분자량은 398 kDa이었다. 이 결과는 apoprotein(62.4 kDa, 62.7%) unit에 과량의 지질(38.1

%)과 보호그룹인 carotenoid(0.035%)가 회합하여 carotenoprotein 복합체를 구성하고 있다는 것을 확인하였다.

Garate 등<sup>33)</sup>은 게(*C. maenas*)로부터 Sephacryl S-300 SF 칼럼을 이용하여 octameric form의 carotenoprotein을

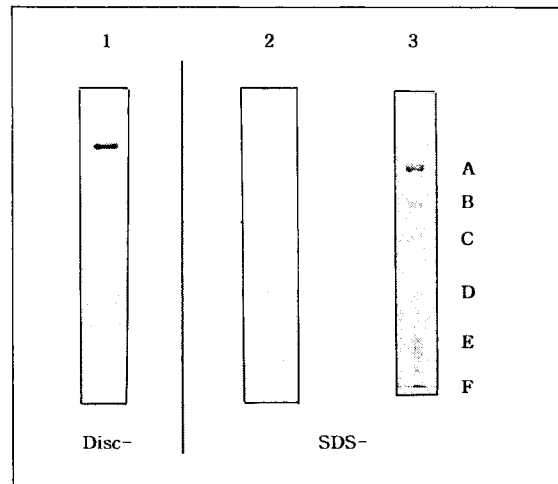


Fig. 6. 5% Disc- and 9.5% SDS-PAGE of purified carotenoprotein from *Styela clava*.

Lane 1 : Carotenoprotein. Lane 2 : Subunits of the carotenoprotein. Lane 3 : Marker protein [A ; β-Galactosidase(116kDa), 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)].

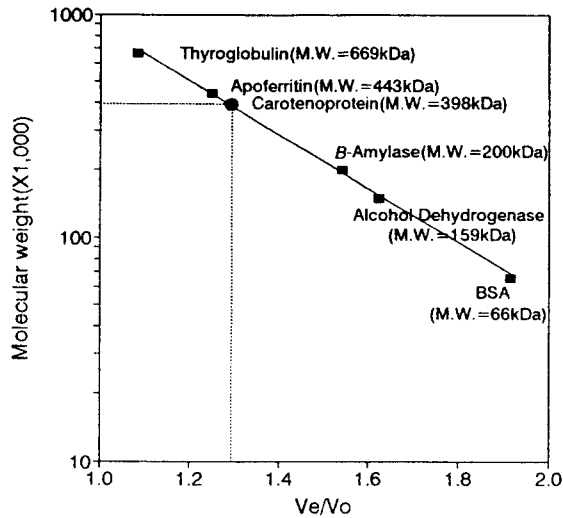


Fig. 7. Estimation of molecular weight of the purified carotenoprotein from *Styela clava* by gel filtration with Sephadex G-200.

분리하였다. 이 octameric form의 분자량은 365 kDa인데 이것을 다시 SDS로 처리하면 38.2 kDa의 single polypeptide로 분리되었다고 하였다.

Elgsaeter 등<sup>34)</sup>은 불가사리(*Asterias rubens*)로부터 이온교환수지 및 겔 여과법으로 carotenoprotein을 분리 정제하였는데 단백질과 회합한 carotenoid 성분으로는 astaxanthin과 그 acetylenic carotenoid인 7,8-dihydroastaxanthin 및 7,8,7',8'-tetrahydroastaxanthin 등 3종류를 확인하였으며, 이 carotenoprotein은 acetylenic bond에 관계없이 모두  $\lambda_{max}$  554nm에서 최대 흡광도를 가지며 5~17%의 당류와 지질을 포함하는 glycoprotein으로써 분자량은 80~100 kDa이고 동일한 subunit를 갖는다고 보고 하였는데 이 결과는 본 실험에서 carotenoprotein에 비교 할 때 subunit의 분자량이 유사함을 보였다.

이와 같이 생체의 조직과 종류에 따라서 astaxanthin (acetylenic 구조 또는 방향족 유도체 포함) 등 keto group을 가진 carotenoid는 여러 종류의 불균일한 단백질들과 소수성 결합 또는 수소결합을 하게 되면 분자량이 수만에서 백만달톤으로 다양한 크기의 carotenoprotein을 이루어 생체내의 보호그룹으로 작용한다고 볼 수 있다. 즉 carotenoprotein에서 carotenoid가 lipid-protein의 구조를 안정

화시키게 되어 지질의 생체내 산화를 방지하게 되고, 또한 단백질의 3차 및 4차 구조를 안정화 시킴으로서 변성을 억제하여 생리적인 활성을 유지하게 되는 것으로 판단된다<sup>35)</sup>.

#### 아미노산 조성

정제된 carotenoprotein의 아미노산 분석 결과는 Table 2에 나타낸 바와 같이 carotenoprotein의 아미노산 조성 중 glutamic acid와 aspartic acid의 함량이 전체의 21.4% 차지하고 있어 산성 아미노산이 비교적 높은 함량이었으며, 수소결합에 관여하는 아미노산은 전체의 26.37%이었고 소수성 아미노산은 36.82%, 작은 아미노산은 10.49%, 헬릭스 파괴성 아미노산은 6.68%, 그리고  $\beta$ -구조에 영향을 주는 아미노산은 18.00%이었다. 소수성의 값은 특별히 높지는 않았으나 glutamic acid, valine과 leucine의 함량이 비교적 높았고, proline과 tryptophan은 존재하지 않았다. 수소결합 아미노산(26.37%)보다 소수성 아미노산(36.82%)의 함량이 높는데 이것은 carotenoprotein이 소수성 결합으로 복합체를 이루고 있다는 것으로 생각된다.

$\alpha$ -helices의 내부구조에서 안정화에 영향을 주고 helices 구조 형성을 촉진시키는 아미노산(Glu, Ala, Leu)의 함량(22.28%)이  $\beta$ -구조 안정성을 촉진하는 아미노산(Met, Val, Ile)의 함량(18.00%)보다 높은 것으로 보아 carotenoprotein은 높은 helical 구조를 갖고 있음을 짐작하게 한다. 따라서 미더덕에서 분리한 carotenoprotein은 낮은  $\beta$ -conformation과 높은  $\alpha$ -helices 구조로 구성되어 있는 것으로 판단된다. 이것은 껍질에서 분리한 carotenoprotein과 해면동물(*A. verrucosa*)<sup>36)</sup>과 대하(*P. orientalis*)<sup>37)</sup> 그리고 산호(*A. sulcata*)<sup>38)</sup> 등에서의 carotenoprotein과 유사한 경향이었다.

Czczuga와 Krywuta<sup>38)</sup>는 미국산 가재(*O. limosus*)에서 분리한 황적색 carotenoprotein의 아미노산 조성에서  $\alpha$ -나선구조 안정화 아미노산(36.1%)이  $\beta$ -구조 안정화 아미노산(34.0%)보다 함량이 높다고 하였고, Santoro 등<sup>37)</sup>은 해면동물(*A. verrucosa*)로부터 분리한 오렌지색 carotenoprotein의 아미노산 조성 중  $\beta$ -구조 안정화 아미노산 함량(36.6%)이  $\alpha$ -나선구조 안정화 아미노산 함량(24.2%)에 비해 훨씬 높았다고 보고한 바 있다. 이와 같이 생체조직이나 분포에 따라서 carotenoprotein의 아미노산 조성의 차이를 볼 수 있는데 이것으로 인하여 carotenoprotein의 구조적 특성이 나타나는 것으로 생각된다.



Table 2. Amino acid compositions of the carotenoprotein from *Styela clava*

Amino acid	(mol %)		
	<i>Styela clava</i> Orange carotenoprotein	<i>O. limosus</i> Yellowish-red carotenoprotein <sup>*1)</sup>	<i>A. leptodactylus</i> Blue carotenoprotein <sup>*2)</sup>
Aspartic acid	9.94	8.4	9.0
Glutamic acid	11.48	11.2	7.8
Lysine	6.76	7.6	7.7
Arginine	4.47	—	4.8
Threonine	6.14	4.7	6.2
Valine	10.75	11.2	9.1
Isoleucine	6.41	4.1	5.2
Leucine	10.45	5.5	6.3
Phenylalanine	3.20	—	8.0
Alanine	4.49	19.3	9.3
Serine	9.78	12.4	5.7
Cysteine	—	—	—
Glycine	6.00	14.1	7.3
Tyrosine	5.98	—	7.0
Methionine	0.48	trace	0.6
Histidine	2.63	1.4	2.5
Proline	0.68	—	3.3
Tryptophan	—	—	—
P	51.20	45.7	43.7
S	10.49	33.4	16.6
HX.P.	26.42	36.00	23.4
HX.B.	6.68	14.14	10.6
H.B.	26.37	17.1	23.7
β.S.	18.00	15.3	14.9
HP.G	33.82	40.0	41.8

P=polarity index : Asp, Thr, Ser, Glu, Lys, His, Arg

S=small amino acids : Ala, Gly

HX.P.=helix promoting group : Glu, Ala, Leu

HX.B.=helix breaking group : Pro, Gly

H.B.=hydrogen bonding group : Ser, Thr, Cys, Tyr, Arg

β.G.=β-sheet promoting group : Met, Val, Ile

HP.G.=hydrophobic group : Val, Ala, Leu, Ile, Phe, Pro, Trp, Met

\*1) From the American crayfish, *O. limosus*(Czeczuga and Krywuta, 1981)

\*2) From the carapace of the crayfish, *A. leptodactylus*(Rivas *et al*, 1988)

Table 3. Fatty acid compositions of the carotenoprotein from *Styela clava*

Fatty acid		Content(%)
Myristic	C <sub>14</sub> :0	2.4
Palmitic	C <sub>16</sub> :0	15.2
Arachidic	C <sub>20</sub> :0	1.0
<b>ZSaturates</b>		<b>18.6</b>
Myristoleic	C <sub>14</sub> :1(n-5)	7.2
Palmitoleic	C <sub>16</sub> :1(n-7)	15.4
Oleic	C <sub>18</sub> :1(n-9)	19.8
Gadoleic	C <sub>20</sub> :1(n-11)	2.9
Erucic	C <sub>22</sub> :2(n-9)	2.4
<b>ZMonoenes</b>		<b>47.7</b>
Linoleic	C <sub>18</sub> :2(n-6)	2.8
Linolenic	C <sub>18</sub> :3(n-3)	8.3
Eicosapentaenoic	C <sub>20</sub> :5(n-3)	10.7
Docosapentaenic	C <sub>22</sub> :5(n-3)	3.4
Docosahexaenoic	C <sub>22</sub> :6(n-3)	8.4
<b>ZPolyenes</b>		<b>33.6</b>

지방산 조성

Carotenoprotein 1mg 당 총지질 함량은 0.381mg이었으며, 총지질의 구성지방산 조성을 분석한 결과는 Table 3에서와 같이 껍질에서 분리한 carotenoprotein의 구성지방산 중 monoene산이 전체 지방산 함량의 47.7%로 가장 많았고 다음으로 polyene산 (33.6%) 및 포화산(18.6%) 순이었다. 양적으로 가장 많은 지방산은 oleic acid로 19.8%였으며, 포화지방산 중에는 palmitic acid(15.2%), monoene산 중에서는 palmitoleic acid(15.4%), polyene산에서는 eicosapentaenic acid(10.7%), docosahexaenoic acid(8.4%) 등의 함량이 많았다. 정제된 carotenoprotein의 지방산 중 혈청지방질의 개선, 혈소판응집능 저하 및 혈액점도 저하 등 생리적 효과가 있다는 EPA, DHA 등 ω-3계의 장쇄(長鎖)고도불포화 지방산 조성비가 30.8%로 높게 나타났다<sup>40~41)</sup>.

Kim 등<sup>31)</sup>은 연어알에서 분리한 carotenoprotein에서 지방산은 주로 stearic acid(47.9%)와 palmitic acid(21.4%)로 구성되어 있고 불포화지방산으로는 oleic acid(15.2%)와 소량의 linoleic acid가 존재한다고 하였고, 대하(*P. orientalis*)로부터 분리정제한 carotenoprotein의 지방산 조성 중 oleic acid, palmitic acid, palmitoleic acid, EPA 및

DHA의 함량이 높는데<sup>37)</sup> 이러한 결과는 종류와 먹이, 생체조직의 분포에 따라 다른 것으로 판단된다.

Carotenoid의 분리 정제 및 동정

Carotenoid의 분리 정제

미더덕에서 분리한 carotenoprotein을 저온(4°C)에서 acetone으로 처리하여 단백질을 변성시키고 유리된 carotenoid를 TLC상에서 전개용매 acetone/petroleum ether(3:7, v/v)를 사용하여 분리하였을 때 Fig. 8과 같이 R<sub>f</sub>=0.55 위치에 단일 색소를 얻을 수 있었다. 1차로 분리된 이 반점을 감압 분취장치로 긁어내어서 methanol로 용출시킨 다음 농축하고 다시 전개용매 benzene/diethyl ether/methanol(17:2:1, v/v)로 바꾸어 각각 재 전개하였을 때 triacylglycerol과 인지질은 완전히 제거되었다. 색소의 추출과 분리과정에서 부분 정제되어 다소 지질이 혼재되어 있을 때는 색소들이 어느 정도 안정하였으나 순수하게 분리 정제되면 색깔이 쉽게 소실되는 현상이 관찰되었다. 따라서 이들은 지질과 단백질 사이에서 상호 보호그룹임을 추측할 수 있었으며, 색소 소실을 최소화하기 위해서는 모든 실험 조작들이 희미한 붉은 전등이 켜진 냉암소에서 진행하여야 하고 질소가스 존재하에서 신속히 수행할 필요성이 있었다.

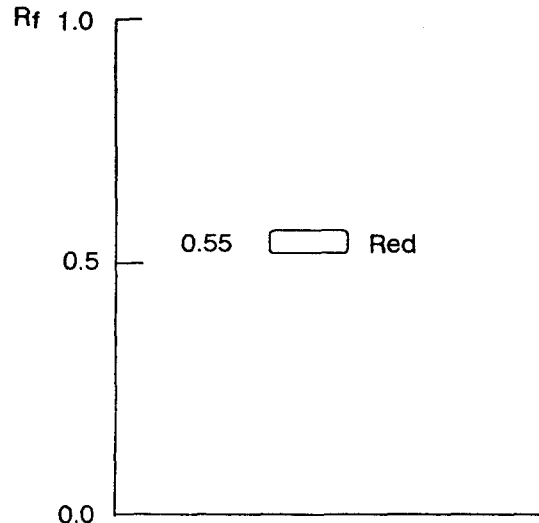


Fig. 8. Thin-layer chromatogram of carotenoid liberated from carotenoprotein in *Styela clava* on silica gel G. Developing solvent : acetone/petroleum ether (3 : 7, v/v).

Table 4. The UV/Vis-spectral property of the carotenoids from carotenoprotein of *Styela clava*

Property	Carotenoid spot( $\lambda_{max}$ , nm)
R <sub>f</sub> value(TLC)*	0.55
Absorption maxima(nm)	
in ethanol	476
n-hexane	465
petroleum ether	471
benzene	488
chloroform	485
carbon disulfide	504
methanol	473

\*Developing solvent : acetone/petroleum ether(3 : 7, v/v)

Table 5. The UV/Vis-spectral property of the carotenoids from carotenoprotein of *Styela clava* by organic reactions

Property	Carotenoid spot( $\lambda_{max}$ , nm)
Reduction(in ethanol)	426, 452(S), 478
Acetylation(in pyridine)	471, 485(S)#
Acetylation(TLC)	R <sub>f</sub> =0.80(positive)
Epoxide test	negative
Allylic test	negative

\*P.E. : petroleum ether

# S : strong

#### Carotenoid의 동정

Ethanol 등 여러가지 용매에 대한 색소반점의 가시부 흡수 스펙트럼 특성은 Table 4 및 Table 5와 같다. 천연색소들의 최대 흡수파장은 용매에 따른 영향을 많이 받기 때문에 carotenoid의 분광학적 연구에도 용매의 특성은 중요하다고 여겨진다. Ethanol 용매에서 색소반점은  $\lambda_{max}$  476 nm이고 NaBH<sub>4</sub>에 의한 환원 생성물은 흡수파장은 Fig. 9에서 볼 수 있는 바와 같이  $\lambda_{inf}$  426nm,  $\lambda_{max}$  452nm 및  $\lambda_{sub}$  478nm였으며 최대파장이 24nm의 단파장영역으로 이동하였다. 이 결과는 연어알에서 분리정제한 astaxanthin을 NaBH<sub>4</sub>로 환원시킬 때 diphenol end group을 가진 crustaxanthin으로 되어 최대 흡수파장이 단파장쪽으로 이동된 것과 같았다<sup>24)</sup>.

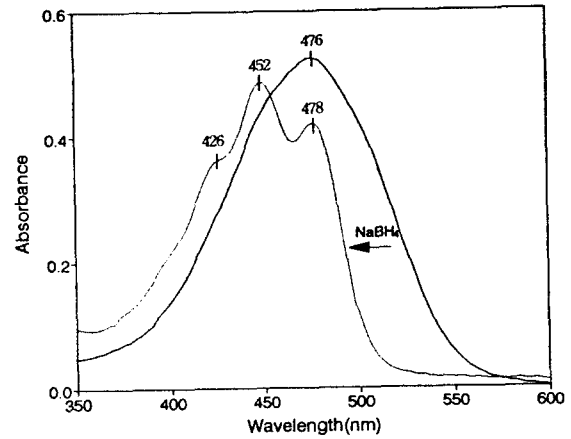


Fig. 9. Visible absorption spectrum of carotenoid (—) and its reduction product (·····) in ethanol.

Carotenoid 색소에서 polyene 사슬상에 짝지어 있는 >C=O 화합물은 >C=O 기가 없는 것에 비하여 장파장쪽으로 spectral shift가 일어나고, 미세구조가 축퇴되어 등골게 나타나게 된다. 그러므로 NaBH<sub>4</sub>로 >C=O 기를 선택적으로 환원하면 본래의 polyene 발색단의 흡수 스펙트럼이 재현되기 때문에 모든 용매속에서 가시부 흡수 스펙트럼의 변화를 관찰할 수 있었고 이 색소는 특히 ethanol에서 용매의 효과를 잘 관찰할 수 있었다. 발색단인 >C=O 기가 cyclic end group의 고리속에 있지 않고 polyene 사슬상에 있는 경우에는 24nm보다 큰 장파장으로 이동이 일어난다. 따라서 >=O기가 cyclic end group의 고리속에 있다는 것을 추정하였다.

분자내에 1차 혹은 2차 hydroxyl group이 존재하는지를 확인하기 위해서 아세틸화 반응 시험 결과 양성으로 나타났다(Fig. 10). 따라서 분자내에는 hydroxyl group이 존재하며 에폭시기는 존재하지 않는 것을 확인하였다. 또한 분자속에 allylic hydroxyl group의 존재를 확인하기 위하여 carotenoid를 methanol에 녹인 다음 여기에 0.01N HCl/methanol용액 2방울을 넣고 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후 색소를 petroleum ether층으로 옮기고 TLC R<sub>f</sub>값의 증가를 관찰한 결과 음성으로 나타나 분자내에 hydroxyl group이 존재하나

allylic hydroxyl group이 아니라는 것을 확인하였다.

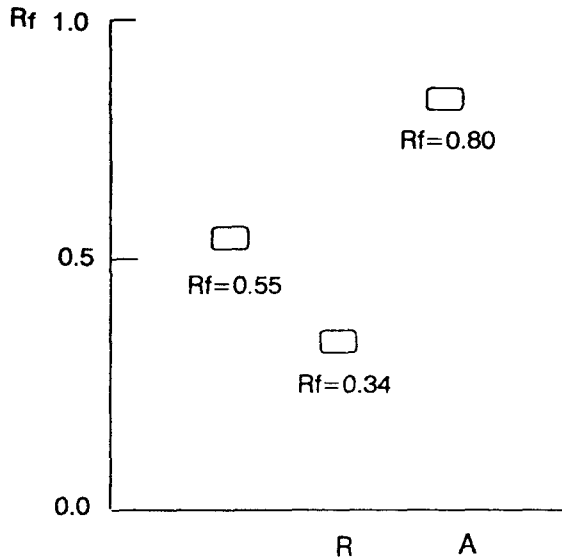


Fig. 10. Thin-layer chromatogram of carotenoid before and after organic reactions on silica gel G. Developing solvent : acetone/petroleum ether (3 : 7, v/v). R : reduction A : acetylation

이 색소반점의 IR 흡수 스펙트럼은  $\nu_{\max}$  ( $\text{CHCl}_3$ ) 3398  $\text{cm}^{-1}$ 에 강한 O-H stretching, 2970, 2930 및 2849  $\text{cm}^{-1}$ 에 C-H stretching, 1643  $\text{cm}^{-1}$ 에 짝지은  $>\text{C}=\text{O}$  기, 1605, 1595  $\text{cm}^{-1}$  및 1559  $\text{cm}^{-1}$ 에 짝지은 C=C 기 1463과 1436  $\text{cm}^{-1}$ 에  $\text{CH}_2$  기, 1377 과 1370  $\text{cm}^{-1}$ 에 gem. dimethyl 기, 1377, 1370, 1280, 1255, 1233, 1130, 990 및 959  $\text{cm}^{-1}$ 에 trans CH=CH 기의 흡수띠가 잘 나타나 있다<sup>24)</sup>.

이 색소는 작용기에 따르는 여러가지 유기화학 반응성과 분광학적인 특성들을 종합한 결과 astaxanthin으로 확인되었다<sup>1),24)</sup>.

## 요 약

미더덕(*Styela clava*)에 존재하는 carotenoprotein을 추출하고 정제과정을 거쳐 carotenoid를 분리하여 여러가지 화

학반응과 UV/Vis, IR 측정 등으로 단백질과 회합하고 있는 carotenoid를 동정하여 특성을 확인한 결과는 다음과 같다.

미더덕에서 분리한 carotenoprotein의 UV/Vis 스펙트럼은 487, 463 및 280nm에서 흡수극대를 나타냈으며, carotenoprotein으로부터 유리된 carotenoid는 478nm와 452nm에서 흡수극대를 나타냈다. 정제된 carotenoprotein 1mg당 0.35 g의 carotenoid가 함유되었으며, 정제도는 7.8 배 이었고, 수율은 5.8% 이었다. Carotenoprotein의 분자량은 398 kDa(gel filtration)이었고, SDS-PAGE로 단백질의 subunit를 확인한 결과, 62.4 kDa으로 단일 polypeptide로 구성되어 있었다. Carotenoprotein의 아미노산 조성 중 특히 glutamic acid(11.48%), valine(10.75%), leucine(10.45%) 및 aspartic acid(9.94%)가 많이 포함되어 있으며, cysteine과 tryptophan은 존재하지 않았다. Carotenoprotein의 지방산 조성을 분석한 결과, monoene산이 47.7%로 가장 많았고, 다음으로 polyene산(33.6%) 및 포화산(18.6%) 순이었고, 또한  $\omega$ -3계의 장쇄(長鎖)고도불포화지방산의 조성비가 30.8%로 상당히 높게 나타났다. Carotenoprotein에서 분리한 carotenoid는 TLC 상에서 한 종류의 반점이 얻어졌고 이들의 유기화학 반응성과 UV/Vis 및 IR 등 분광학적인 특성을 종합한 결과 astaxanthin으로 확인되었다.

## 참 고 문 헌

1. Matsuno, T. : Xanthophylls as precursors of retinoids. *Pure Appl. Chem.*, 63, 81(1991).
2. Katayama, T., Kunisaki, Y., Shimaya, M., Shimpson, K.L. and Chichester, C.O. : The biosynthesis of astaxanthin. XI V. The conversion of labelled  $\beta$ -carotene-15,15'- $3\text{H}_2$  into astaxanthin in the crab, *Portunus trituberculatus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 46B, 269 (1973).
3. Shone, C. C., Britton, G. and Goodwin, T. : The violet carotenoprotein of the starfish, *Asterias rubens*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62B, 507(1979).
4. Cheesman, D. F., Lee, W. L. and Zagalsky. : Carotenoproteins in invertebrates. *Biol. Rev.*, 42, 131(1967).
5. Zagalsky, P. F., Ceccaldi, H. J. and Daumas, R. : Comparative studies on some decapod crustacean carotenoproteins. *Comp. Biochem. Physiol.*, 34B, 579 (1970)

6. 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(1972).
7. Garate, A. M., Barbon, P. G., Milicua, J. C. G. and Gomez, R. : Chemical properties and denaturation of the blue carotenoprotein from *Procambarus clarkii*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 84B, 483(1986).
8. 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.*, 81B(4), 1023(1985).
9. Dingle, J. T. and Lucy, J. A. : Vitamin A, carotenoid and cell function. *Biol. Rev.*, 40, 422(1965).
10. Goodman, D. S. and Huang, H. S. : Biosynthesis of vitamin A with rat intestinal enzyme. *Science.*, 149, 879(1966).
11. Mathews-Roth, M. M. : Carotenoid Chemistry & Biochemistry. Press, London, pp. 297(1982).
12. Packer, J. E., Mahood, J. S., Mora-Arellano, V. O., Slater, T. F., Willson, R. L. and Wolfenden, B. S. : Free radicals and singlet oxygen scavengers ; Reaction of aj peroxy-radical with  $\beta$ -carotene, diphenyl furan and 1,4-diazobicyclo (2,2,2)-octane. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 98, 901(1981).
13. Krinsky, N. I. and Deneke, S. M. : Interaction of oxygen and oxyradicals with carotenoid. *J. Natl. Cancer Inst.*, 69, 649(1979).
14. Krinsky, N. I. : Carotenoid protection against oxidation. *Pure Appl. Chem.*, 51, 649(1979).
15. Deleo, V. A., Poh-Fitzpatrick, M., Mathews-Roth, M. and Harber, L. C. : Erythropoietic protoporphyria. *Am. J. Med.*, 60, 8(1976)
16. Fabian, I. and Shvartzmayer, S. : Effect of a new retinoidal benzoic acid derivative on normal human hematopoietic progenitor cell growth in vitro. *Cancer Res.*, 46, 2413(1986).
17. Sporn, M. B. and Roberts, A. B. : Role of retinoids in differentiation and carcinogenesis. *Cancer Rev.*, 43, 3034(1983).
18. Peto, R., Doll, R., Buckley, J. D. and Sporn, M. B. : Review article. Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates? *Nature*, 290, 201(1981).
19. 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).
20. Davis, B. J. : Disc-electrophoresis II. Method and application to human serum protein. *Ann. New York Acad. Sci.*, 121, 404(1964).
21. Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680(1970).
22. Andrew, P. : Estimation of the molecular weight of proteins by Sephadex gel filtration. *Biochem. J.*, 91, 222(1964).
23. Bligh, E. G. and Dyer. W. J. : A rapid method of lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911(1959).
24. 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).
25. McBeth, J. W. : Carotenoid from nudibranchs. *Comp. Biochem. Physiol.*, 41B, 55(1972).
26. Walton, T. J., Britton, G., Goodwin, T. W., Diner, B. and Moshier, S. : The structure of siponaxanthin. *Phytochemistry*, 9, 2545(1970).
27. Schiedt, K., Leuenberger, F. J. and Vecchi, M. : Natural occurrence of enantiomeric and meso-astaxanthin 5. Ex wild salmon (*Salmo salar* and *Oncorhynchus*). *Helv. Chimica Acta.*, 64, 449(1981).
28. Karrer, P. : Carotenoid-epoxyde und furanoide oxyde von carotinoidfarbstoffen. *Fortschr. Chem. Org. Naturst.*, 5, 1(1948).
29. Liaaen-Jensen, S. and Hertzberg, S. : Selective preparation of the lutein monomethyl ethers. *Acta Chem. Scand.*, 20, 1703(1966).
31. Kim, J. W., Min, T. J. and Lee, T. Y. : Subunits and composition of carotenoprotein from *Salmo salar* eggs. *J. Kor. Chem. Soc.*, 32, 377(1988).
32. Zagalsky, P. F., Mummery, R. S., Elopoulos, E. E. and Findlay, J.B.C. : The quaternary structure of the lobster carapace carotenoprotein, crustanin : studies using cross-linking agents. *Comp. Biochem. Physiol.*, 97B(4), 837(1990).
33. Garate, A. M., Urrechaga, E., Milicua, J. C. G., Gomez, R. and Britton, G. : A blue carotenoprotein from the carapace of the crab, *Carcinus maenas*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77B(3), 605(1984).
34. Elgsaeter, A., Tauber, J. D. and Liaaen-Jensen, S. : Animal carotenoid 15. Carotenoid distribution and carotenoprotein of *Asteries rubens*. *Biochem. Biophys. Acta.*, 530, 402(1978).
35. Chapman, D. J. : Three new carotenoid isolated from algae. *Phytochemistry*, 5, 1331(1966) .
36. 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).
37. Lee, S. K. and Kim, J. W. : Purification and characterization of a carotenoprotein from *Penaeus orientalis*. *J. Kor. Chem. Soc.*, 38, 608(1994).
38. Czczuga, B. : Investigations of carotenoprotein complexes in animals - VI. *Anemonia sulcata*, the representative of askeletal corals. *Comp. Biochem. Physiol.*, 75B, 181(1983).
39. Czczuga, B. and Krywuta, S. : Investigations on carotenoprotein complexes in animals - II. The presence of carotenoproteins in the carapace of *Orconectes limosus*(Raf). *Comp. Biochem. Physiol.*, 68B, 339(1981).
40. 竹内務・片平亮太 : EPAについて. *New food industry.*, 25, 5(1983).
41. 鴻巢章二 : 水産食品と營養, 恒星社厚生閣, pp. 54~69 (1984).