

고사리의 突然變異 誘發性

尹在英·李瑞來

이화여자대학교 식품영양학과

Mutagenic Activity by Ames Test of Bracken Grown in Korea

Jae-Young Yoon and Su-Rae Lee

Department of Food & Nutrition, Ewha Woman's University, Seoul

Abstract

The ethanol- and water-extracts of curled tops and stalks of young bracken (*Pteridium aquilinum*) fronds in raw and cooked states were examined for their mutagenicity by Ames test using *Salmonella typhimurium* mutants. Even a small amount of water extract from raw bracken was mutagenic to TA 1538 strain without addition of S₉ mix whereas a strong toxicity appeared at higher levels of the extractive. With S₉ mix, the water-extract from raw bracken was not mutagenic at all and not toxic to all strains tested. The amount of water-extract from cooked bracken was one-tenth of the amount from raw bracken and the water-extract showed no mutagenic effect to all strains tested. Ethanol-extract of bracken showed no mutagenicity in any case.

Key words: bracken, mutagenicity by Ames test

서 론

고사리(*Pteridium aquilinum*)는 우리나라에서 오랫동안 山菜로서 널리 이용되고 있으며 일본, 캐나다 등지에서도 상당량 소비되고 있다. 유럽을 비롯하여 캐나다, 일본 등지에서 수집된 고사리는 모두 발암성이 있는 것으로 밝혀졌으므로⁽¹⁻⁴⁾, 우리나라 야산에 自生하고 있는 고사리도 독성을 가질 것으로 추정할 수 있다. 東醫寶鑑에 의하면 「人多採取煮食之味甚好 然不可久食 消陽氣 令脚弱 不能行 眼暗 膨脹」(삶아서 먹으면 맛이 좋으나 오래 먹지 말라, 오래 먹으면 양기가 부족하여지고 다리가 약해져서 보행하지 못하게 되고 눈이 어두어 지며 복수가 찬다)라고 기록되어 있다. 이러한 전통적인 漢醫書의 언급은 인간이 고사리를 장기간 섭취할 경우 발생할 수 있는 암과 thiamine 결핍증인 각기병 증세에 대한 해석이라고 볼 수 있다. 그러나, 우리나라에서 고사리의 유해성분에 대한 과학적인 연구는 매우 제한되어 있다⁽⁵⁾.

우리나라에서 주로 쓰이는 고사리의 섭취방법은 생고사리를 데쳐서 3, 4일간 흐르는 물에 담근 후 조리하여 먹

거나 생고사리를 데쳐 말려 두고 필요 할 때 끓여서 흐르는 물에 담그어 불린후 조리하여 먹는다. 고사리 가공시 죽처럼 갈아서 열풍에 건조시키거나 증기로 찌고 그 발암성이 제거되지 않아 고사리의 발암 물질은 열에 안정한 것으로 볼 수 있다⁽⁶⁾. 그러나, 고사리의 발암 성분은 수용성이며 알칼리에 약한 성질을 가지므로⁽⁷⁾ 우리나라의 전통적인 고사리 조리 방법을 사용할 경우 이러한 독성 물질이 많이 제거될 수 있을 것이다.

현재까지 알려진 발암성 물질의 85% 이상은 돌연변이 원이며 비발암성으로 알려진 물질의 10% 이하가 돌연변이 원으로 작용하고 있어 발암성과 돌연변이성 간에는 고도의 상관관계가 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 상관관계를 바탕으로 개발된 Ames 시험법^(8,9)은 突然變異原이나 發癌原을 찾아내는데 가장 실질적이며 유용한 방법으로 인정받고 있다.

본 연구는 Ames 시험법을 사용하여 국내에서 생육된 고사리의 돌연변이 활성을 측정하고 그 활성이 在來 방식으로 고사리를 調理하였을 경우 얼마나 除去되는 지를 알아보고자 수행되었다.

Corresponding author: Su-Rae Lee, Department of Food & Nutrition, Ewha Woman's University, Seodaemun-gu, Seoul 120-750

재료 및 방법

고사리의 채취 및 전처리

잎이 나오기 전 끝이 말려 있는 어린 고사리를 전북 고창 지방에서 5월 초순에 채취 하였다. 생고사리를 끝말린 부분(끝에서 2cm 가량)과 줄기 부분으로 분리하여 햇볕에 건조시킨 후 멧돌 믹서로 잘게 갈아 가루로 만들어 추출에 사용할 때까지 실온에서 desiccator에 보관하였다.

조리한 고사리는 일상적으로 식용하는 고사리의 조리 방법에 따라 생고사리를 2분간 데쳐서 말린 후 끓는 물에 1시간 삶아 하룻밤 물에 담구어 두었다가 깨끗이 씻어 10분간 다시 가열 조리한 후 멧돌 믹서로 갈아 직접 추출에 사용하였다.

고사리의 에탄올 추출

Leach 등의 방법에 의하여 수행하였다⁽⁷⁾. 즉 끓는 70% 에탄올 5l에 말린 고사리 분말 100g를 넣어 1시간 동안 역류시킨 후 추출액을 여과하여 불용성 물질을 제거하였다. 이와 같이 얻어진 여과액을 100ml 가량 되게 30°C 이하에서 flash evaporator로 농축한 후 더이상 침전이 생기지 않을때 까지 찬물을 부어 생성되는 침전을 제거시키고 감압하에서 다시 농축시킨 후 charcoal column을 통과 시켰다. 그리고 column을 메탄올로 elute하여 그대로 통과한 여과액과 합하여 완전히 농축시킨 후 최소량의 메탄올에 녹이고 과량의 ethylacetate를 첨가하여 생긴 침전물을 제거한 후에 ethylacetate 상정액을 다시 농축 건조 시켰다. 이를 최소량의 메탄올에 녹여 실험에 사용시까지 -20°C 냉장고에 보관하였다.

고사리의 증류수 추출

Evans의 방법에 의하여 수행하였다⁽¹⁰⁾. 즉, 말린 고사리 100g을 약 1l의 증류수에 넣어 계속 흔들어 주면서 매일 증류수를 새로 바꾸어 추출, 여과하는 조작을 5번 되풀이 하였다. 이때, 부패 방지를 위하여 toluene과 chloroform을 각 1ml씩 넣어 주었다. 이와 같이 얻은 여과액을 flash evaporator로 감압 농축하여 약 500ml가 되게 한 후 10,000rpm에서 원심분리하여 침전을 제거하였다. 상정액에 6N HCl을 첨가하여 pH 3으로 만든 후 peroxide를 함유하지 않은 30ml씩의 diethyl ether로 6회 반복하여 추출하였다.

물층내의 ether를 모두 증발시킨 후 다시 pH 3으로 맞추고 NaCl로 포화시켰다. 이 용액을 300ml의

methylacetate로 6회 추출, methylacetate 층을 모아 flash evaporator로 농축시켰다. 이것을 최소량의 메탄올에 녹여 약 400ml의 ethylacetate를 가한 후 하룻밤 방치하여 생성되는 침전을 여과에 의하여 제거하고 여과액을 감압 농축하였다. 이와 같이 분리한 ethylacetate 가용성 획분과 불용성 획분은 건조시킨 후 그 무게를 재었고 실험시까지 -20°C에 보관하였다.

돌연변이 유발능 시험(Ames test)

Ames 등의 방법^(8,9)에 따라 수행하였다. 즉 Sprague-Dawley 종 흰쥐에서 얻은 S₉획분, 0.1ml/ml를 함유하는 S₉ mix를 넣은 것과 넣지 않은 것에 고사리 추출물을 가하고 고려대학교 농대 생화학연구실에서 분양 받은 *Salmonella typhimurium* 균주 TA 98, TA 100, TA 1535 및 TA 1538을 사용하여 복귀변이주(revertant)의 colony 수를 계수하였다. 모든 실험은 3회 과정을 3회 반복하였고 자연복귀 변이주의 수치(보통 plate 당 50~100개 콜로니)를 공제하여 평균치 ± 표준편차로 표현하였다.

돌연변이유발 표준 물질로서는 sodium azide, 2-nitrofluorene, benzo(α)pyrene, 2-anthramine (2-aminoanthracene)을 사용하여 시험균주 및 시험방법의 유효성을 확인하였다.

결과 및 고찰

고사리의 추출물 함량 비교

고사리를 증류수로 추출한 다음 ethylacetate를 가하여 얻어진 침전물(불용성 획분)과 상정액(가용성 획분)의 收率은 Table 1과 같다.

고사리를 생체로 말려서 추출한 경우 ethylacetate 불용성분은 가용성분의 3배나 되었고 끝말린 부분(curled)과 줄기부분(stalk)의 획분별 무게 비는 비슷하였다. 고사리를 조리함에 따라 ethylacetate 불용성분의 무게는 변화가 없었으나 가용성분은 생것의 1/10로 크게 낮아졌다.

표준물질에 의한 Ames test의 검정

돌연변이 유발 물질로 널리 알려져 있는 sodium azide, 2-nitrofluorene, benzo(α)pyrene, 2-anthramine 등이 본 실험에서 사용하려는 Ames test에서 정상적으로 작용하는 지를 확인한 결과는 Fig. 1과 같다. Sodium azide는 농도가 증가됨에 따라 균주 TA

Table 1. Amount of ethylacetate soluble and insoluble fractions in water extracts of raw and cooked brackens

Bracken	g dry weight/100g dry bracken	
	Soluble fraction	Insoluble fraction
Raw bracken		
Curled part	1.72	5.78
Stalk part	1.49	3.37
Cooked bracken	0.15	3.01

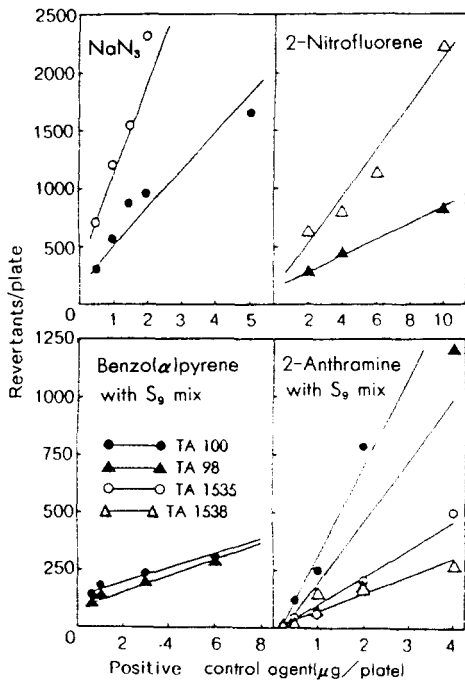


Fig. 1. Mutagenic responses of *Salmonella typhimurium* strains to different positive control agents in histidine reversion assay.

100, TA 1535에서, 2-nitrofluorene은 TA 98, TA 1538에 대하여 돌연변이 유발능이 있었다. S₉ mix를 첨가시켰을 경우에만 돌연변이 유발능을 보이는 benzo(α)pyrene은 TA 98, TA 100에 대하여, 2-anthramine은 사용한 모든 균주에 대하여 돌연변이를 일으켰다.

위의 실험결과를 토대로 Ames test에 의한 고사리의

돌연변이 유발 가능성을 조사하기 위한 실험에서 S₉ mix를 첨가하지 않고 *Salmonella typhimurium* TA 100과 TA 1535를 사용할 때에는 sodium azide 1µg/plate를, TA 98과 TA 1538을 사용할 때는 2-nitrofluorene 5µg/plate를, S₉ mix를 첨가하여 검정할 때는 2-anthramine 4µg/plate를 각 검정때 마다 positive control로서 고사리 추출물과 함께 병행 사용하였다.

Ames test에 의한 고사리의 돌연변이 유발능

생것 그대로 말린 고사리를 끝 말린 부분(curl)과 줄기(stalk)로 나누고 가열, 조리한 고사리와 함께 각각을 증류수로 추출한 후 유기용매 분별 과정을 거쳐 얻어진 획분을 각 농도별로 회석하여 Ames test를 수행한 결과는 Table 2와 같다.

고사리 증류수 추출물의 ethylacetate 가용성 획분과 불용성 획분을 S₉ mix 존재하에 실험한 결과 모든 *Salmonella typhimurium* 균주에 대하여 돌연변이 유발능이 없는 것으로 나타났다. 그러나 S₉ mix를 첨가하지 않은 경우 생체로 말린 고사리의 ethylacetate 가용성 획분에서만 돌연변이 유발능이 나타났다. 이때 고사리의 추출물 50~100mg(건물중 당량) 수준에서 TA 1538 균주에 돌연변이를 유발시킬 수 있었으며 100mg 이상에서는 독성을 나타내었다. 여기에서 고사리의 독성은 처리된 plate에서 background lawn이 투명해지는 것으로 알 수 있었다. 따라서 추출물의 농도를 50-100mg 범위에서 여러 농도로 다시 나누어 실험한 결과 Table 3에서와 같이 70mg 수준에서 돌연변이 유발능이 나타나기 시작하여 건물중 농도가 80mg에 도달할 때까지 그 능력이 계속 증가하였다.

고사리의 끝말린 부분, 줄기부분, 조리된 고사리 등, 고사리의 에탄올 추출물을 사용하여 증류수 추출물 처럼 Ames test를 수행한 결과 돌연변이 유발능은 전혀 찾아볼 수 없었다. 이는 에탄올을 추출시 초기 에탄올을 끓여줌(reflux)으로써 활성이 감소할 수 있었고 활성탄에 흡착시키는 과정에서 활성 물질이 여기에 흡착, 제대로 용리(elution)되어 나오지 않았기 때문으로 생각되어 증류수 추출의 경우 활성탄 흡착 단계를 생략하였다.

위에서와 같이 대부분의 실험 균주에 대하여 고사리의 돌연변이 유발능을 발견치 못한 것은 고사리와 같은 천연산물의 추출 과정에서 돌연변이 유발성 물질만을 순수 분리하기가 매우 어려웠고 여러가지 생리활성 물질이 함께 함유되어 있어 돌연변이 유발능이 잘 나타나지 못하였기 때문이라 생각된다⁽¹¹⁾. 그러나, 일정 수준에서 고사리 농

Table 2. Mutagenic activity of raw and cooked brackens in histidine reversion assay with *Salmonella typhimurium* strains

*Fraction	Bracken (mg dry wt. eq./plate)	S ₉ mix tree				S ₉ mix added	
		TA 1538		TA 98, 100, 1535		TA 98, 100, 1535, 1538	
		Raw bracken	Cooked bracken	Raw bracken	Cooked bracken	Raw bracken	Cooked bracken
Ethylacetate soluble	0- 50	-	-	-	-	-	-
	50-100	++	-	-	-	-	-
	100-150	t	-	t	-	-	-
	150-	t	-	t	-	-	-
Ethylacetate insoluble	0- 50	-	-	-	-	-	-
	50-100	-	-	-	-	-	-
	100-150	-	-	-	-	-	-
	150-	-	-	-	-	-	-

-, non-mutagenic(<20 revertants/plate); ++, strongly mutagenic(>500 revertants/plate); +, toxic to kill bacterial cells by clearing background lawn.

Table 3. Mutagenic responses of *Salmonella typhimurium* TA 1538 to water-extract of raw bracken

Amount of bracken (mg dry wt.eq./plate)	Revertants/plate	
	Curled	Stalk
70	5 ± 2*	210 ± 8
72	186 ± 11	736 ± 201
75	316 ± 123	617 ± 119
77	2466 ± 556	1650 ± 471
80	3217 ± 717	toxic

* Mean ± standard deviation of triplicate runs.

도의 증가에 따라 *Salmonella typhimurium* TA 1538에서 돌연변이 유발능이 비례적으로 증가된다는 것이 발견되었으므로 이미 동물의 종양 발생 실험을 통하여 고사리에 발암성이 있다는 사실을 간접적으로 뒷받침해 주고 있다(3,4).

말린 생고사리의 추출액이 S₉ mix를 첨가하지 않고서도 TA 1538에 돌연변이를 유발한 사실로 미루어 보아 고사리의 증류수 추출물 중 어떤 성분이 위장에서 흡수된 다음 간에서 활성화되기 이전에 발암성을 나타내리라 생각된다. 본 실험 과정에서 고사리 80mg 이상에 해당하는 추출물을 plate에 첨가하면 사용한 모든 균주에서 background lawn이 죽어 없어지는 毒性을 보이는 것으로 보아 생고사리에는 상당한 양의 독성 물질이 있음을

알 수 있다(12). 이 독성은 S₉ mix를 첨가하면 없어졌는데 이는 肝内の microsomal enzyme에 의하여 독성 물질이 불활성화 되어 독성이 감소되기 때문인 것 같다.

증류수 추출후 ethylacetate를 가하여 얻어진 침전물의 양은 조리 여부 또는 고사리의 부위에 관계없이 비슷한 반면 가용성 획분의 무게는 고사리 부위에 따라서는 큰 차이가 없으나 조리에 의하여 1/10로 크게 감소하는 것으로 나타났다. 증류수 추출시 ethylacetate 가용성분은 소에게 발암성을 나타내나 불용성분은 매우 약한 발암성을 보인다는 보고(4,10)로 미루어 보아 고사리의 조리에 따라 돌연변이 유발성이 1/10 이하로 감소될 것으로 예상된다. 이러한 생각은 고사리를 조리할 경우 Ames test의 모든 실험 균주에 대하여 돌연변이가 전혀 유발되지 않은 본 실험결과로 뒷받침 된다고 할 수 있다.

Hirono 등(3)과 우·한(5)은 동물 실험에서 조리한 고사리의 발암성이 생고사리의 발암성 보다 감소하였으며 특히 나뭇재, 소금, NaHCO₃ 등을 첨가할 경우 크게 감소하나 소량은 남아 있었다고 보고하였다. 그러나 본 실험에서 조리한 고사리에서는 돌연변이 능력을 검출할 수 없었다. 고사리의 발암성 물질은 수용성이고 불안정하여(7) 조리시 많이 제거될 수 있으나 Hirono 등의 실험에서는 식이의 33% 까지를 고사리로 대치하였으므로 그 섭취량이 일정 수준을 넘어 발암성을 나타낸 것이 아닌가 생각된다.

식물체 내의 천연성분은 순수한 합성 물질과는 달리 분 석, 추출 과정에서 그 활성 성분이 유실되거나 활성이 소

실되고 또한 그 활성을 촉진 또는 억제하는 물질이 공존하여 있으므로 고사리에서 발암성 물질을 분리 정제하여 생물 검정하기가 어려운 일이다. 고사리 중의 배당체인 ptaquiloside 와 quercetin 이 발암물질의 前驅體라는 보고가 있으나 본 실험에서는 그 성분 규명에 미치지 못하였다. 특히 우리 나라에서는 고사리를 즐겨 먹는 식습관을 가지고 있으므로 고사리의 발암원 물질에 대한 성분 연구와 더불어 타 식품과의 상호관계를 고려하여 이러한 독성 물질을 제거시키기 위한 조리 연구가 뒤따라야 할 것이다.

요 약

우리나라에서 오랫동안 食用하여 온 고사리에 대하여 *Salmonella typhimurium* 을 이용한 Ames test 에 의하여 돌연변이 誘發性을 조사하였다.

그 결과 生고사리의 증류수 추출물은 낮은 농도에서 TA 1538 菌株에 대하여 逆突然變異를 일으켰으며 높은 농도에서는 毒性을 강하게 나타냈다. 그러나 S₉ mix 첨가시 모든 시험균주에 대하여 돌연변이를 유발시키지 않았고 독성도 나타내지 않았다. 調理한 고사리의 경우 증류수 추출물의 양은 생고사리의 1/10로 감소하였고 돌연변이 유발능도 검출되지 않았다. 고사리의 70% 에탄올 추출물은 어느 경우에도 돌연변이 유발능을 나타내지 않았다.

감사의 글

본 연구는 韓國科學財團 박사과정 논문 연구비에 의하여 이룩된 연구의 일부로 한국과학재단에 깊은 감사를 드리는 바입니다. 또한 관심을 가지고 관련문헌을 제공해주신 한국식품개발연구원장 權泰完 박사님과 시험균주를 분양해 주신 고려대학교 李世永 교수님께 깊은 감사드립니다.

문 헌

1. Evans, I.A. and Mason, J. : Carcinogenic activity of

- bracken. *Nature*, **208**, 213(1965)
2. Price, J.M. and Pamukcu, A.M. : Urinary bladder neoplasms induced by feeding bracken fern to cow. *Cancer Res.*, **28**, 2247(1968)
3. Hirono, I., Shibuya, C., Fushimi, K. and Haga, M. : Studies on carcinogenic properties of bracken. *J. Nat'l Cancer Inst.*, **45**, 179(1970)
4. Evans, I.A. : Bracken carcinogenicity. *Veter. Sci.*, **26**, 339(1979)
5. 우원식·한영봉 : 고사리 식품의 발암성, 서울대학교 생약연구소 업적집, **14**, 1(1975)
6. Mori, H., Kato, K. Ushimaru, Y., Kato, T. and Hirono, I. : Effect of drying with hot forced draft and of mincing bracken fern on its carcinogenic activity. *Gann*, **68**, 517(1977)
7. Leach, H., Barber, G.D., Evans, I.A. and Evans, W.C. : Isolation of an active principle from the bracken fern that is mutagenic, carcinogenic and lethal to mice on intraperitoneal injection, *Biochem. J.*, **124**, 13(1971)
8. Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. : Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mut. Res.*, **31**, 347(1975)
9. Maron, D.M. and Ames, B.N. : Revised method for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mut. Res.*, **113**, 173(1983)
10. Evans, I.A., Al-Samarrai, A.M.H. and Smith, R. M.M. : Bracken toxicology; identification of some water soluble compounds from crozier and rhizome. *Veter. Sci.*, **37**, 261(1984)
11. Bjørseth, A., Eidsa, G., Gether, J., Landmark, L. and Møller, M. : Detection of mutagens in complex samples by the *Salmonella* assay applied directly on TLC plates. *Science*, **215**, 87(1982)
12. Serres, F.J. and Shelby, M.D. : Recommendations on data production and analysis using the *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mut. Res.*, **64**, 159(1979)

(1988년 4월 21일 접수)