

고사리의 Thiamine 분해에 미치는 反應條件의 영향

尹在英 · 李瑞來

이화여자대학교 식품영양학과

Effect of Reaction Conditions on the Thiamine Decomposition by Bracken

Jae-Young Yoon and Su-Rae Lee

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

Abstract

Antithiamine activity of raw and cooked brackens(*Pteridium aquilinum*) was evaluated under various reaction conditions by means of the thiochrome fluorescence method. The effects of caffeic acid and cysteine on the thiamine decomposition were also determined by thiochrome fluorescence and *Lactobacillus viridescens* bioassay methods. A water extract of raw bracken exhibited a high antithiamine activity which was increased with higher pH, temperature, incubation time and concentration of bracken. The influence of reaction conditions was less apparent in cooked bracken than in raw bracken. Caffeic acid stimulated the thiamine decomposition whereas cysteine showed a suppressive effect. The effect of cysteine was lower in the decomposition of thiamine by bracken extract.

Key words: bracken, antithiamine activity, cysteine effect

서 론

식품에 함유되어 있는 thiamine의 효능은 다른 食餌 성분에 의하여 변화될 수 있다⁽¹⁾. 예컨대 발효된 茶葉을 일상적으로 씹는 태국 사람들은 thiamine을 매일 요구량 만큼 섭취하는데도 비타민 缺乏症이 나타나고 있다⁽²⁾. Thiamine 분해 인자에 대한 연구는 조개, 생선, 발효된 차, 세균 및 betel nut의 thiamine 분해 능력이 발견되면서 시작되었다⁽³⁻⁵⁾. 東醫寶鑑에 의하면 "고사리를 오래 먹으면 양기가 부족하여지고 다리가 약해져서 보행하지 못하고 눈이 어두어지며"라고 기록되어 있다. 이러한 언급은 인간이 고사리를 장기간 섭취할 경우 발생할 수 있는 각기병 증세에 대한 해석이라고 볼 수 있다. 그러나 우리나라에서 고사리종 thiamine 분해 인자에 대한 연구 보고는 찾아볼 수 없다.

Thiamine 분해 인자에는 열에 안정한 것과 불안정한 것이 있는데 불안정한 것으로는 민물 생선의 내장, 조개, *Bacillus thiaminolyticus*, *Clostridium thiamin-*

*olyticus*에서 발견되는 thiaminase I과 *Bacillus aneurinolyticus*, *Candida aneurinolytica* 등에 존재하는 thiaminase II로 구분할 수 있다^(1,6). 이들 thiamine 분해 효소는 가열에 의하여 제거될 수 있으나 열에 안정한 thiamine 분해 인자가 발견되면서부터 여기에 많은 관심이 모아졌다. 식물에서 발견된 thiamine 분해 인자로는 caffeic acid, tannic acid가 알려져 있고^(4,7) 동물 조직에서는 myoglobin, hemoglobin, hemin이 관련되어 있다는 것이 알려지게 되었다^(1,6). Berüter와 Somogyi⁽⁸⁾는 고사리에서 caffeic acid를 분리하여 이것이 열에 안정한 thiamine 분해 인자라고 발표한 이후 페놀 화합물이 thiamine 분해에 미치는 영향을 집중적으로 연구하게 되었으나 그 결과는 相反되어 아직 논란의 여지가 있다. 즉 o-diphenol이 thiamine을 산화시켜 thiamine disulfide를 형성하며 이는 cysteine 첨가에 의하여 막을 수 있다는 견해도 있으나^(9,10) caffeic acid와 chlorogenic acid는 thiamine 분해 요인으로 작용하지 않는다는 주장도 있다^(11,12).

Thiamine을 정량하는 화학적 방법으로서 가장 잘 알려진 것은 thiochrome법인데 thiamine의 알칼리 산화시 thiochrome이 형성되면서 발생하는 형광성을 정

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

량한다. 한편 미생물적 방법에서는 여러 균주가 이용되는데 이 중에서 *Lactobacillus viridescens*는 변이가 적고 다른 미생물에 비하여 민감하게 반응하므로 thiamine 정량에 널리 사용되고 있다⁽¹³⁾. 이 두가지 정량방법을 병행하면 분석결과를 補完해주는 효과가 있다.

따라서 본 연구는 여러가지 반응조건이 고사리 추출액에 의한 thiamine 분해에 어떠한 영향을 미치는지, 그리고 페놀화합물인 caffeic acid와 환원제인 cysteine의 영향을 살펴보고자 착수되었다.

재료 및 방법

고사리 시료의 준비

고사리(*Pteridium aquilinum*)는 전북 고창 지방에서 5월초에 채취하여 可食部만을 사용하였다. 생고사리(raw bracken)는 생것을 그대로 바람이 잘 통하는 곳에서 건조시켰고 가열조리한 고사리(cooked bracken)는 2분 데쳐 말린 후 끓는 물에서 한 시간 끓여 하룻밤 동안 담구었다가 깨끗이 씻어 10분간 다시 끓이고 물기를 뺀 다음 바람이 잘 통하는 곳에서 건조시킨 시료이다.

고사리 성분의 추출

건조한 고사리의 분말 시료는 2g씩 50ml의 증류수에 넣고 약 20시간 동안 진탕기로 흔들어 추출한 후 여과, 세척하여 여과액의 최종 부피가 50ml가 되게 하였다. 각 시료의 증류수 추출액은 실험시까지 -20°C의 냉동고에 보관하였다.

Thiamine의 정량

화학적 방법으로는 AOAC의 thiochrome 형광법⁽⁴⁾에 의하여 측정, 계산하였다. 미생물적 방법으로는 *Lactobacillus viridescens* S 38A를 한국중균협회를 통하여 일본에서 구입한 후 Diebel 등의 방법⁽¹³⁾에 따라 수행하였다.

반응조건에 따른 고사리 추출액의 thiamine 분해율 측정

생고사리와 가열조리한 고사리의 추출액을 각각 농도별, 온도별, pH 별, 시간별로 반응시켜 thiamine 분해율을 측정하였다. 각 실험에서의 thiamine 분해율은 thiochrome 형광법으로 측정하여 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Thiamine 분해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{thiamine의 잔존량}}{\text{thiamine의 첨가량}}\right) \times 100$$

pH에 따른 변화: pH가 6.0, 7.0, 7.5, 8.0, 9.0인 인산완충액(0.1M) 3.8ml에 thiamine 용액(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ alcohol) 1ml와 추출액 시료 0.2ml(고사리 乾物重 20 mg/ml 에 해당)를 첨가하고 37°C에서 3시간 동안 반응시킨 후 thiamine 분해율을 측정하였다.

온도에 따른 변화: pH 6.0, 7.5인 인산완충액 3.8ml에 시료 0.2ml, thiamine 용액 1ml를 넣고 잘 섞은 후 20°C, 30°C, 37°C, 50°C, 60°C에서 각각 3시간씩 반응시킨 후 thiamine 분해율을 측정하였다.

반응시간에 따른 변화: pH 6.0, 7.5인 인산완충액 3.8ml에 시료 2ml, thiamine 용액 10ml를 넣어 잘 섞은 후 37°C에서 반응시키되 0분, 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간, 24시간 후에 각각 5ml씩 채취하여 thiamine 분해율을 측정하였다.

고사리 추출액의 농도에 따른 변화: 용액 1ml 당 고사리를 0mg, 10mg, 20mg, 40mg, 100mg(건물중) 함유한 추출액을 만들어 이들 시료 0.2ml에 pH 6.0, 7.5인 인산완충액 3.8ml와 thiamine 용액 1ml를 잘 섞어준 후 37°C에서 3시간 동안 반응시킨 다음 thiamine 분해율을 측정하였다.

Thiamine 분해율과 caffeic acid 및 cysteine의 영향 측정

페놀화합물인 caffeic acid의 thiamine 분해력을 측정하기 위하여 pH 7.5인 인산완충액(0.1M) 3.8ml에 1ml의 thiamine 용액(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 섞어 주고 caffeic acid/thiamine의 물비를 0, 0.02, 0.04, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.5로 변화시킨 caffeic acid 용액 0.2ml를 첨가하여 잘 섞은 후 50°C에서 3시간 동안 반응시켰다. 이것을 thiochrome 형광법과 미생물법으로 thiamine 분해율을 측정하였다. Caffeic acid와 고사리 추출액의 thiamine 분해작용에 대한 cysteine의 억제효과를 알아보기 위하여 thiamine 용액(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 1ml에 caffeic acid(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 또는 데친 고사리의 증류수 추출물 0.2ml(건물중 20 mg/ml 에 해당), 인산완충액(pH 7.5, 0.1M) 3.7ml와 thiamine에 대한 cysteine의 물비가 0, 0.5, 1, 2, 4, 10, 20, 40이 되게 조제한 cysteine 용액 0.1ml를 잘 섞어 각각 50°C에서 3시간 동안 반응시킨 후 thiochrome 형광법과 미생물법으로 thiamine 분해율을 측정하였다.

결과 및 고찰

고사리 추출액의 thiamine 분해율에 미치는 반응조건의 영향

pH, 온도, 시간 등의 반응 조건이 고사리 추출액에 의한 thiamine 분해에 어떠한 영향을 미치는지 thiochrome 형광법을 이용하여 실험하였다. 반응시 사용한 완충액의 pH가 점차 증가함에 따라 생고사리나 가열조리한 고사리의 추출액은 pH 5-7 범위에서 thiamine 분해율이 비슷하였으나 이보다 높은 pH 영역에서는 thiamine 분해율이 급속히 증가하여 생고사리 추출액은 pH 9에서 thiamine 함량의 80%까지 분해시켰다(Fig. 1). 시험된 모든 pH에서 가열조리한 고사리 추출액보다 생고사리 추출액의 thiamine 분해 능력이 뚜렷하게 컸다.

위의 실험결과로부터 thiamine 분해에 안정성을 보이는 pH 6.0과 가열조리의 영향이 잘 나타내는 pH 7.5를 선택하여 thiamine 분해에 미치는 온도효과를 조사하였다. 반응액의 온도를 20°C에서 60°C까지 높임에 따라 생고사리 추출액은 thiamine을 빨리 분해시켰고 pH 7.5일 때 분해효과가 뚜렷하였다(Fig. 2). 이에 반하여 가열조리한 고사리의 추출액은 pH 6.0, 7.5에서 온도가 높아짐에 따라 thiamine 분해 속도가 완만히 증가하였다. 고

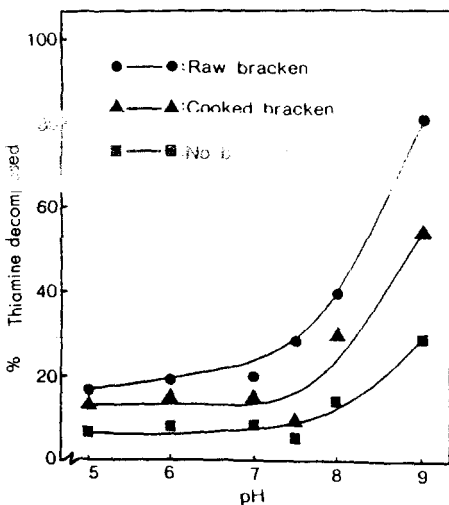


Fig. 1. Effect of pH on the thiamine decomposition by extracts of raw and cooked bracken, as measured by thiochrome method.

사리를 넣지 않았을 때 50°C까지는 thiamine이 비교적 안정하였으나 60°C에서는 6-19%까지 자체 분해되었다.

Thiamine과 고사리 추출액과의 반응시간을 증가시키면 따라 thiamine의 분해율은 증가하였으며 초기 6시간 동안에는 thiamine 분해가 급속히 일어났으나 그 후 시간이 경과함에 따라 분해율이 둔화되었다(Fig. 3). 본 실험에서도 생고사리가 가열조리한 고사리보다 thiamine 분해능력이 훨씬 높았으며 고사리 첨가없이도 시간이 경과함에 따라 thiamine은 어느정도 자체 분해되었다. Thiamine의 분해율은 pH 6.0, 7.5에서 고사리 추출액의 농도를 증가시켰을 때 점차 증가하였다(Fig. 4). 본 실험에서도 생고사리가 가열조리한 고사리 추출액보다 thiamine을 더 빠른 속도로 분해시켰고 pH 6.0일 때보다 pH 7.5일 때 고사리 추출액의 농도에 따른 분해율이

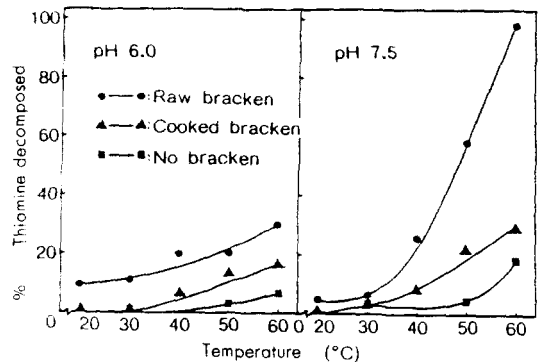


Fig. 2. Effect of temperature on the thiamine decomposition by extracts of raw and cooked bracken at pH 6 and 7.5, as measured by thiochrome method.

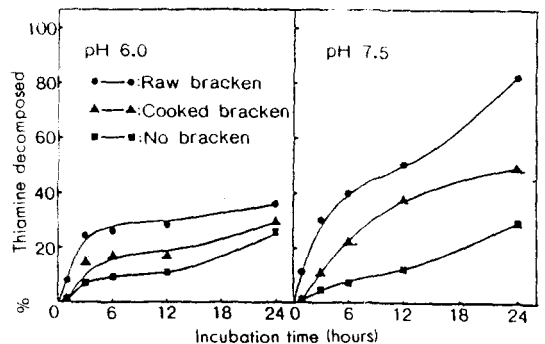


Fig. 3. Time courses of thiamine decomposition by extracts of raw and cooked bracken at different pH, as measured by thiochrome method.

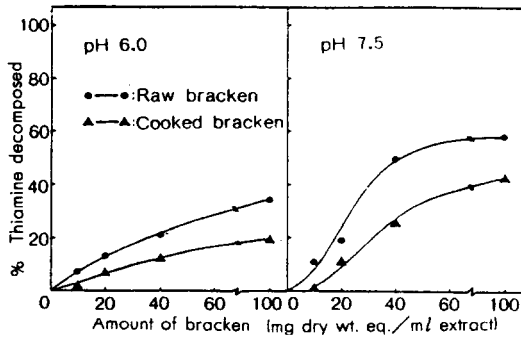


Fig. 4. Effect of the amount of bracken on the thiamine decomposition by extracts of raw and cooked brackens at different pH, as measured by thiochrome method.

더 컸다.

생고사리 추출액의 경우 pH 9에서 thiamine을 절반 이상 파괴하는 것을 볼 때 생고사리는 thiamine 분해물질을 다량 함유하며 이 물질은 특히 알칼리성에서 그 분해를 촉진시키는 성질을 가진 것으로 추측할 수 있다. Thiamine 분해물질을 함유하고 있는 식품으로 betel nut, 생선, 발효된 차, 고사리 등이 알려져 있으며 고사리내 thiamine 분해인자는 수용성이고 열에 안정한 저분자 물질이라고 보고되어 있다⁽⁷⁾. 이러한 특성 때문에 조리시 빠져 나가기 쉽고 열에 의하여 변화되므로 가열조리한 고사리에서는 그 분해능력이 생고사리에 비하여 많이 감소되었을 것으로 생각된다.

Thiamine은 수용액 중에서 열에 약한데 이때 생고사리 추출액을 첨가하면 온도의 효과가 더욱 뚜렷하였다. 이러한 사실로 미루어 생고사리 내에 존재하는 thiamine 분해인자는 열에 불안정한 효소와 열에 안정한 화학성분으로 구성되었음을 알 수 있다. 익힌 고사리의 추출액 첨가시 thiamine의 파괴에 미치는 영향은 열에 안정한 분해인자와의 상호작용에 의하여 나타날 것이므로 caffeic acid와 cysteine의 영향을 다음에 실험하였다.

Thiamine 분해율에 미치는 caffeic acid 및 cysteine의 영향

페놀화합물에 속하는 caffeic acid가 thiamine 분해에 어떠한 영향을 주는지 알아본 결과 thiamine에 대한 caffeic acid의 상대적농도를 증가시키에 따라 Fig. 5와 같이 thiamine 분해율이 급속도로 증가하였다. 특히 caffeic acid의 저농도에서 thiamine 분해율이 크게 증가하였으며 그 비율이 0.5 이상일 때는 85%를 계속 유

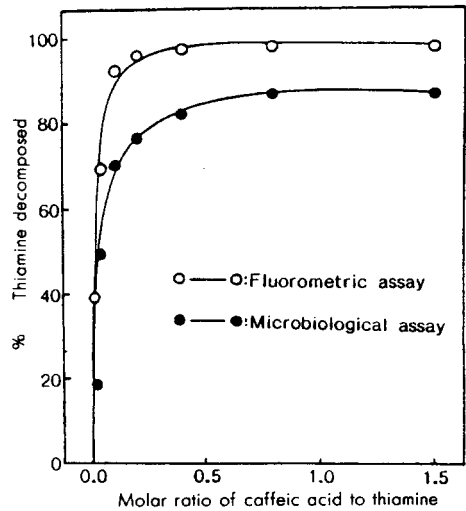


Fig. 5. Effect of caffeic acid on the thiamine decomposition, as measured by thiochrome and *Lactobacillus viridescens* methods.

지하였다.

일정량의 caffeic acid를 첨가한 thiamine 용액에 cysteine을 넣어 반응시켰을 때는 Fig. 6에서와 같이 그 양이 증가함에 따라 caffeic acid의 thiamine 분해효과는 점차 감소하여 thiamine에 대한 cysteine의 물비를

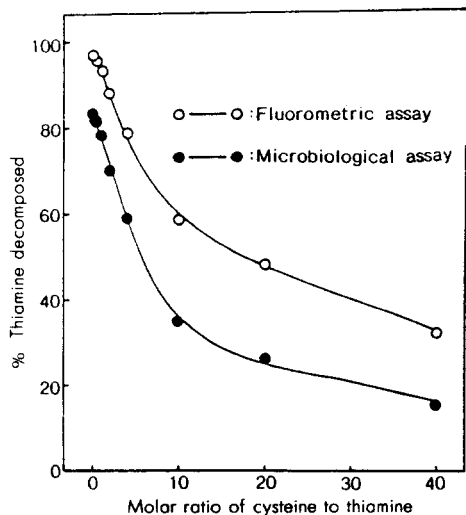


Fig. 6. Effect of cysteine on the thiamine decomposition by caffeic acid, as measured by thiochrome and *Lactobacillus viridescens* methods.

이 20배 이상일 때에는 thiamine의 분해 감소가 완만하여졌다. 일정량의 데친 고사리 추출액을 넣은 후 cysteine을 첨가하여 반응시켰을 경우에는 Fig. 7에서와 같이 cysteine의 양이 증가함에 따라 고사리의 thiamine 분해효과가 점차 감소하였으나 caffeic acid에 의한 감소보다 훨씬 완만하였다.

Thiamine의 정량에 쓰이는 방법으로는 thiochrome 형광을 이용한 화학적인 방법과 미생물의 성장속도나 산 생성도를 재는 미생물적 방법이 알려져 있는데 *Lactobacillus viridescens*는 성장변이 요인이 적고 thiamine 요구량이 다른 균주에 비하여 10배 이상 많은 것으로 밝혀져 thiamine 정량용으로 많이 사용되고 있다. 미생물법에 의하여 측정했을 때 thiamine의 분해율이 일반적으로 형광법에 의한 것보다 낮은 것은 thiamine이 변화, 분해되어 thiochrome 형광성을 나타내지 않으나 아직 생물적 활성을 지니기 때문에 thiamine이 잔존하는 것으로 정량되어 분해율이 낮게 나타나기 때문이라 생각된다. Thiamine의 생리적 효과는 형광법 보다는 미생물법에 의한 정량결과에 의해서 더 잘 표현될 것으로 생각된다.

Berüter와 Somogyi⁽⁶⁾는 고사리에 함유되어 있는 열에 안정한 thiamine 분해 인자를 분리, 정제하여 이 물질이 caffeic acid라고 주장하였으나 Horman 등^(11,12)은 이에 반대 의견을 제시하여 논란의 대상이 되고 있다. 본 실험에서 caffeic acid는 같은 물 농도에서 thiamine을 90% 가량 분해하는 것으로 나타났으며, 이

분해 작용은 cysteine에 의하여 억제되어 높은 농도의 cysteine 첨가시 그 분해율이 크게 떨어졌다. Caffeic acid는 thiamine의 구조를 변화시키되 이 변화는 가역적이어서 cysteine이나 비타민 C와 같은 환원제에 의하여 thiamine으로 환원되는 것이라 추측할 수 있겠다. 한편 고사리 추출액의 thiamine 분해작용은 caffeic acid의 thiamine 분해작용에 비해 cysteine에 의한 억제효과가 현저히 적었다. 이상과 같은 사실로 미루어 보아 생체 물질인 고사리 추출액에 대한 cysteine의 작용이 순수물질인 caffeic acid에 대한 작용보다 복잡하며 고사리 추출액의 thiamine 분해능과 페놀 화합물의 함량 간에는 비교적 높은 상관도를 보이고 있으므로 고사리에 포함되어 있는 thiamine 분해인자를 단순히 caffeic acid라고 한 Somogyi⁽⁷⁾의 주장에는 다소 무리가 있다고 할 수 있다.

Thiamine을 catechol과 반응시켜 쥐에게 먹었을 때에는 적혈구의 transketolase와 thiamine pyrophosphate value가 낮아졌으나 thiamine과 catechol을 각각 쥐에게 먹었을 때에는 thiamine 부족증을 보이지 않았다⁽¹⁵⁾. 그러나 다른 식품을 고사리와 함께 조리한 후 오랫동안 보존하게 되면 thiamine 부족증을 초래할 수 있으므로 고사리의 가공방법과 보관시간 등에 유의하여야 될 것이다.

요 약

고사리 추출액의 thiamine 분해력에 미치는 반응조건에 영향을 thiochrome 형광법으로 조사하였고 caffeic acid 및 cysteine의 영향을 thiochrome 형광법과 *Lactobacillus viridescens*를 이용한 미생물법으로 측정, 비교하였다. 생체로 말린 고사리 추출액은 상당량의 thiamine 분해력을 지니며 pH, 온도, 고사리 추출액의 농도가 높아지고, 반응시간이 길어질수록 그 분해율이 증가하였다. 가열 조리하여 말린 고사리는 생체로 말린 고사리보다 반응조건에 따른 영향이 적게 나타났다. Thiamine에 caffeic acid를 반응시켰을 때 많은 양의 thiamine이 분해되나 cysteine을 첨가할 경우 그 분해율이 크게 감소하였다. 그러나 고사리 추출액에 의한 thiamine 분해는 cysteine에 의해 억제되는 정도가 적었다.

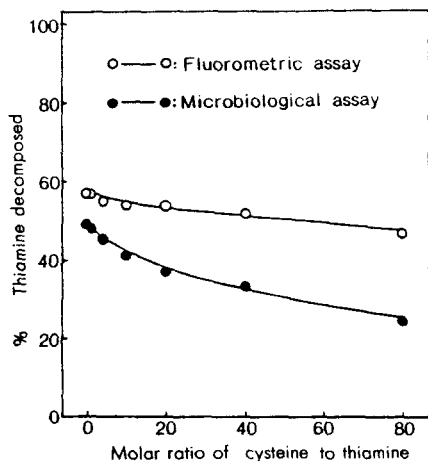


Fig. 7. Effect of cysteine on the thiamine decomposition by blanched bracken, as measured by thiochrome and *Lactobacillus viridescens* methods.

감사의 글

본 연구는 韓國科學財團 박사과정 논문연구비(尹在英)에 의하여 이룩된 연구의 일부로 한국과학재단에 깊은 감사를 드리는 바이다.

문헌

1. Evans, W.C. : Thiaminase and their effects on animals. *Vitamins & Hormones*, **33**, 467(1975)
2. Vimoksdant, S., Nakarnchai, S., Rungruangsak, K., Dhanamitta, S. and Hilker, D.M. : Food habits causing thiamine deficiency in humans. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **22**(Suppl.), 1(1976)
3. Green, R.G., Carlson, W.E. and Evans, C.A. : The inactivation of vitamin B₁ in diets containing whole fish. *J. Nutr.*, **23**, 165(1942)
4. Hilker, D.M., Chan, K.C., Chen, R. and Smith, R.L. : Antithiamine effects of tea I. Temperature and pH dependence. *Nutr. Rept. Internatl.*, **4**, 223(1971)
5. Kuo, J.Y.H. and Hilker, D.M. : A fluorescent thiamine derivative formed by reacting hemin and thiamine. *Nutr. Rept. Internatl.*, **8**, 169(1973)
6. Fujita, A. : Thiaminase. *Advan. Enzymol.*, **15**, 389(1954)
7. Somogyi, J.C. : On antithiamine factors of fern. *J. Vitaminol.*, **17**, 165(1971)
8. Berüter, J. and Somogyi, J.C. : 3,4-Dihydroxycinnamic acid, an antithiamine factor of fern. *Experientia*, **23**, 996(1967)
9. Hayakawa, F. and Murata, K. : Interaction of thiamine and its decomposition products with dihydroxy compound. *Vitamin*, **55**, 293(1981)
10. Murata, K., Tanaka, R. and Yamaoka, M. : Reaction mechanisms of thiamine with thermostable factors. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **20**, 351(1974)
11. Horman, L., Brambilla, E. and Stalder, R. : Evidence against the reported antithiamine effect of caffeic and chlorogenic acids. *Internatl. J. Vit. Nutr. Res.*, **51**, 385(1981)
12. Horman, L. and Brambilla, E. : The alleged antithiamine activity of o-diphenols : an artefact of oxygen in the thiochrome method?. *Internatl. J. Vit. Nutr. Res.*, **52**, 133(1982)
13. Diebel, R.H., Evans, J.B. and Niven Jr., C.F. : Microbiological assay for thiamine using *Lactobacillus viridescens*. *J. Bacteriol.*, **74**, 818(1957)
14. AOAC : *Official Methods of Analysis*, 14th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C. (1984)
15. Hayakawa, F., Urabe, K., Hilker, D.M. and Murata, K. : Can heat stable antithiamine factors inactivate thiamine *in vitro* and/or *in vivo*?. *Internatl. J. Vit. Nutr. Res.*, **56**, 65(1985)

(1988년 5월 19일 접수)