

산화방지제 BHT, BHA가 간세포내 Mixed Function Oxygenase 활성에 미치는 영향*

이화여자대학교 의과대학 생화학교실
성 낙 응

= Abstract =

The Effect of BHA and BHT on Mixed Function Oxygenase of Liver Tissue

Nak Eung Sung

Department of Biochemistry, College of Medicine, Ewha Womans University

To evaluate the effect of BHA and BHT on liver tissue, BHA and BHT, 100mg and 200mg/kg B.W. respectively, were given to experimental animals for 4 months.

Microsomal cytochrome P-450, cytochrome b₅, cytochrome C reductase activity and lipid peroxidation of liver tissue of experimental animal were measured.

The results were as follow :

1) Cytochrome P-450 increased significantly in experimental group given BHA but cytochrome b₅ did not.

2) Cytochrome oxidase activity increased moderately in BHA group but decreased in BHT group.

From these finding, it can be assumed, that BHA and BHT has no great effect on human tissue.

서 론

산화방지제는 공기중의 산소에 의한 유지류의 산화를 억제하기 위하여 식품 또는 식품가공 때 이용되는 유지류에 첨가되는 것들로서 자연물질로는 흔히 사용되는 것이 비타민C와 비타민E 등이 있고 합성품으로는 주로 페놀계 항산화제로서 기타 아민계 및 유황계화합물은 그 독성이 문제가 되어 식용으로서는 사용되지 않고 있다.

페놀계 산화방지제의 대표적인 것으로는 2(3)-

tert-butyl-4-hydroxyanisole(BHA)과 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxytoluene(BHT)의 두가지를 들 수 있다. 기타 monotertiary butylhydroquinone 및 propylgallate 가 있으나 BHA, BHT 두가지가 그들중 가장 인체에 대한 독성이 약하다고 되어 있어 그 사용범위가 넓다. 또한 이두가지 화합물은 냄새와 맛이 없고 고온(135℃ 이상)에서 쉽게 파괴되는 것으로 되어 있어 식품가공, 유지보관, 기타 버터, 껌등 제조에 이용되고 있다¹⁾. 그러나 이두가지 화합물에 대한 독성실험도 많은 학자에 의하여 연구보고 되고 있다. 그중 각종 미생물의 성장억제에 대한 보고가 주류를

* 1986년도 문교부학술진흥연구비에 의해 이루어 졌음.

이루고 있다²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾. 최근 임등⁷⁾도 이 두 화합물의 각종 미생물 성장억제에 대하여 보고 한 바 있다. 이 두 화합물이 미생물 성장억제에 영향을 미치는 이유로서는 이들 소수성물질들이 세포의 원형질막을 파괴시키거나 세포막의 지방층에 끼어들어가서 지방층의 상태를 변경시키기 때문이라고 보고 되고 있다⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾.

한편 Jhee¹¹⁾는 BHA가 간조직내의 aflatoxin B₁과 DNA의 결합에 대한 영향을 연구보고 한 바 있으며 이 과정에서 cytochrome P-450의 간세포내 함량의 변동에 큰 변화가 없다고 지적한 바 있다.

위에서 지적된바 BHA, BHT는 현재 항산화제로서 가장 널리 사용되고 있는 화합물로 식품첨가제로 인정 받고 있으나 일부학자들은 BHA, BHT의 각종 독성을 강조하며 그 사용을 중지할 것을 요구되고 있다. 그 결과 일부국가에서는 이들 두화합물중 일부 또는 모두의 사용을 금지하고 있다. 저자는 BHA, BHT의 간조직에 대한 영향을 알아보기 위하여 우선 간조직내 mixed function oxygenase계의 각종 효소 활성에 대한 영향을 관찰 한 바 의의 있는 결과를 얻었기에 보고 하는 바이다.

실 험

실험동물 :

실험동물은 150g 정도의 splague dowley종 백서를 사용하였다. 동물은 구입후 2주간 실험실식이에 순화시켜 사용하였고 실험동물을 대조군, BHA 100mg/kg b.w. 및 200mg/kg b.w. 투여군과 BHT 100mg/kg b.w. 및 200mg/kg b.w. 의 5군으로 구분 하여 매일 사료에 BHA 및 BHT를 첨가하여 4개월간 사육하였다.

BHA, BHT의 사용량에 대하여는 체중 kg당 1mg, 5mg, 10mg, 20mg, 50mg 및 100mg를 투여하여 전치실험을 한 바, 50mg 투여까지는 4개월로는 의의 있는 변화를 발견 할 수가 없었다. 단 50mg 투여군에서 4개월만이 약간의 변화가 발견됨에 따라 100mg, 200mg 투여군으로 결정하였다.

시약 및 기준 :

BHA, BHT는 Sigma 회사제품을 사용하였으며 기타 시약도 특 1급을 사용하였다.

시험재료 :

위에서 말한 바와 같이 실험동물을 대조군, BHA 100mg, 200mg 투여군, BHT 100mg, 200mg 투여군등 5군으로 구분하여 4개월간 사육한 후 12시간 금식시킨다. 다음 ether로 가볍게 마취시키고 개복하여 간을 채취하였다. 간조직은 ice-cold 0.25M sucrose 용액으로 세척 표면의 혈액을 제거한 뒤 냉동 보관하였다가 실험에 제공하였다.

Microsome분리는 간조직 1g를 채취하여 ice-cold 0.25M sucrose 용액으로 균질화하여 microsome을 분리 하였다¹²⁾

Cytochrome P-450 함량측정법 : Omura, Sato¹³⁾ 및 Smuckler¹⁴⁾으로 측정하였다.

단백질 측정법 : Lowry¹⁵⁾ 등에 의하여 측정하였다.

Lipid peroxidation 측정은 malondialdehyde량을 thiobarbituric acid¹⁶⁾으로 측정 하였다.

NADPH-Cytochrome C reductase 활성측정법 :

NADPH-Cytochrome C reductase 활성도는 Omura¹⁶⁾의 방법을 사용하여 NADPH에 의하여 Cytochrome C의 환원되는 정도를 측정하였다. UV-Vis spechrophotometer를 사용하였으며 550mm에서의 흡광도를 측정하였다. 이때의 molar extinction coefficient는 21.1mM⁻¹ Cm¹로 되어 있다.

실 험 성 적

1. 간조직내 Cytochrome P-450 함량의 변동

표 1에서 보는바와 같이 대조군에 있어서는 2.61±0.05mmoles/mg protein이었다. BHA 100mg/kg B.W.에서는 5.55±1.25 nmoles/mg protein으로 증가 되었고 대조군과 의의있는 증가를 보였다(p<0.1). BHA 200mg/kg B.W. 투여군에 있어서는 11.51±4.37 nmoles/mg protein으로서 대조군과 100mg 투여군에 비하여 현저한 증가가 있음을 알게 되었다(p<0.05). BHA투여군에 비하여도 증가율이 높았다. 그러나 BHT 200mg/kg B.W. 투여군에 있어서는 100mg투여군과 큰 변화가 없었으며 BHA 200mg투여군에 비하여도 그 증가율은 낮은 바 있음을 알게 되었다.

Table 1. The level of cytochrom P-450 in rat liver microsome treated with BHA, BHT

Group	Cytochrome P-450(nmoles/mg protein)
Control	2.61± 0.05
BHA(100mg/kg of B.W)	5.55± 1.25**
BHA(200mg/kg of B.W)	11.51± 4.37*
BHT(100mg/kg of B.W)	7.54± 1.11*
BHT(200mg/kg of B.W)	7.78± 3.25***

Each value represents mean± S.D.

* Significantly different from control value $p < 0.001$

** Significantly different from control value $p < 0.01$

*** Significantly different from control value $p < 0.05$

Table 2. The level of cytochrom b_5 in rat liver microsome treated with BHA & BHT

Group	Cytochrome b_5 (nmoles/mg protom)
Control	0.066± 0.007
BHA(100mg/kg of B.W)	0.073± 0.009
BHA(200mg/kg of B.W)	0.082± 0.010*
BHT(100mg/kg of B.W)	0.066± 0.012
BHT(200mg/kg of B.W)	0.075± 0.009

Each value represents mean± S.D.

* Significantly different from control value $p < 0.01$

2. 간조직내 cytochrome b_5 함량의 변동

표 2에서 보는바와 같이 대조군에 있어서는 0.066± 0.007 nmoles/mg protein 이든 것이 BHA 100mg/kg B.W. 투여군에 있어서는 0.073± 0.009였으며 200 mg/kg B.W. 투여군은 0.082± 0.010 nmoles/mg protein 이었다. 200mg 투여군에서 약간의 증가가 있었으나 큰 변동은 없었다. BHA 투여군에서 100mg 투여군은 0.066± 0.012 nmoles/mg protein 이로서 대조군과 차이가 없었고 200mg/kg B.W. 투여군에서는 0.075± 0.009 nmoles/mg protein 이로서 약간 증가 되는 추세에 있었으나 의의 있는 증가는 없었다.

3. 간조직내 NADPH-Cytochrome C reductase 활성도 변화

표 3에서 보는바와 같이 대조군에 있어서는 32.47± 5.09 nmoles/mg protein/min 이든 것이 BHA 100 mg/kg B.W. 투여군에서는 46.45± 9.37 nmoles/mg protein/min로서 의의 있는 증가가 있었고($p < 0.05$)

Table 3. The activity of NADPH-cytochrom reductase in rat liver microsome treated with BHA & BHT

Group	NADPH-Cyt.C reductase (nmoles/mg protom/min)
Control	32.47± 5.09
BHA(100mg/kg of B.W)	46.45± 9.37*
BHA(200mg/kg of B.W)	46.78± 13.05*
BHT(100mg/kg of B.W)	21.03± 4.66**
BHT(200mg/kg of B.W)	24.57± 5.69

Each value represents mean± S.D.

* Significantly different from control value $p < 0.05$

** Significantly different from control value $p < 0.01$

Table 4. The effect of BHA & BHT on lipid peroxidation in rat liver microsomes

Group	lipid peroxide(nmoles of malondialdehyde mg protein/30min)
Control	33.87± 2.34
BHA(100mg/kg of B.W)	34.02± 13.02
BHA(200mg/kg of B.W)	35.32± 5.04
BHT(100mg/kg of B.W)	35.86± 5.22
BHT(200mg/kg of B.W)	42.56± 4.55

Each value represents mean± S.D.

* Significantly different from control value $p < 0.01$

200mg/kg B.W. 투여군에서는 46.78± 13.05 nmoles/mg protein/min로 대조군에 비하여는 의의 있는 증가가 있었으나($p < 0.05$) 100mg 투여군과의 사이에는 큰 변화가 없었다.

한편 BHT 투여군에서는 100mg 투여군을 21.03± 4.66 nmoles/mg protein/min로 대조군에 비하여 현저히 감소되었다($p < 0.01$). 그리고 200mg 투여군에서는 24.57± 5.69 nmoles/mg protein/min로서 대조군에 비하면 역시 현저히 감소되었으나 100mg 투여군과의 사이에는 큰 변화가 없었다.

4. 간조직내 Lipid peroxidation에 대하여

표 4에서 보는바와 같이 간조직내 lipid peroxidation 결과 생기는 lipid peroxide 함량의 변동은 대조군에 있어서는 33.87± 2.34 nmoles/mg protein/min 이든 것이 BHA 100mg/kg B.W. 200mg/kg B.W. 를 투여한 결과 각 34.01± 3.02 nmoles/mg protein

/min 및 35.32 ± 5.04 nmoles/mg protein/min로서 대조군과의 사이에 큰 변화가 없었다. 한편 BHT 투여군에 있어 100mg/kg B.W 투여군은 35.86 ± 5.22 nmoles/mg protein/min로서 대조군과의 사이에 변화가 없었으며 200mg 투여군에 있어서는 42.56 ± 4.55 nmoles/mg protein/min로서 대조군에 비하여 유의있는 증가율을 보였고($p < 0.01$) 100mg 투여군과 200mg 투여군사이에도 증가되는 경향이였다.

고 찰

1. BHA, BHT투여가 간조직 microsomal cytochrome P-450, b_5 함량이 미치는 영향

표 1 및 2에서 보는바와 같이 BHA, BHT를 투여한 실험동물 간조직내 microsomal Cytochrome P-450의 함량변화를 관찰 한 바 BHA 투여군에서는 100mg, 200mg투여군은 대조군에 비하여 현저한 증가를 보였고 100mg투여군에 비하여 200mg투여군도 역시 현저하게 증가 되었다. 한편 BHT는 100mg, 200mg 투여군 모두 동등으로 증가되고 있으며 100mg 투여군과 200mg 투여군사이에는 차이가 없었다. Cytochrome b_5 에 있어서는 BHA, BHT 투여군 모두에 있어서 유의 있는 변화는 관찰되지 않았다. 체내에 도입된 각종 carcinogen은 활성화가 되어 작용하게 되어 있고 이의 활성화를 돕는 것이 cytochrome P-450, b_5 로 되어 있다. 이들 물질은 간조직 microsomal내에 mixed function oxidase의 한 구성요소로 electron transfer로 작용한다¹⁷⁾. 그래서 간조직에 어떤 질환이 있을 때에는 cytochrome P-450을 위시한 이계열의 효소계활성도가 저하되는 것으로 되어 있다. 그래서 각종 약물, steroid 및 지방산의 대사에 지장을 초래 한다는 것이다¹⁸⁾. 흰쥐의 간조직 microsomal내 약물대사에 관여하는 효소의 활성을 변화시키는 요인으로서는 주위환경, 흡몬, 약물, 식이 및 영양상태가 크게 작용 한다고 되어 있다. 본실험 결과에 있어서는 cytochrome P-450 함량이 증가되는 것으로 되어 있다. 임등⁷⁾은 BHA, BHT의 미생물성장억제작용이 있음을 증명한 바 있고 Jhee¹¹⁾는 간조직내에서 aflatoxin B₁과 DNA의 결합과정에서의 BHA의 효과에 대하여 증명한 바 있다. 또한 BHA, BHT의 일정량에 있어서는 간조직내 일부 carci-

noge의 활성화를 제거한다는 보고도 된바 있다. 한편 홍¹²⁾¹⁹⁾은 ADH, morphin, alcohol등의 약제를 실험동물에 투여한 바 cytochrome P-450의 감소를 나타낸다고 보고 하였고 b_5 함량에 있어서는 alcohol투여에서 증가 된다고 보고 한바 있다. 이와 같은 연구보고와 본 실험결과를 대조하여 보건데 cytochrome P-450의 증가와 BHA, BHT의 암유도물질의 제거 작용과는 일련의 관계가 있다고 생각 된다. 이와 같이 하여 표 2에서 보는 바와 같이 NADH-cytochrome C reductase의 활성도에 있어서는 BHA는 100 mg, 200mg투여군 모두 대조군에 비하면 유의 있는 증가율을 보였다. 그러나 BHT 투여군에 있어서는 두군 모두 감소되는 경향으로 나타나고 있었다. Cytochrome C reductase도 microsomal내 electron transfer계로 작용하는 효소계로서 cytochrome P-450, b_5 에서부터 BHA에서는 같은 경향으로 나타나고 있었으나 BHT는 오히려 감소되고 있었다. 이에 대한 과거 문헌은 아직 발견치 못하고 있으나 BHA과 BHT와는 같은 항산화제 이면서 BHT는 toluene 화합물이다. 그래서 alcohol투여 에서 나타나는 경향이 아닌가 생각된다.

2. BHA, BHT투여과 Lipid peroxidation과의 관계

Biomembrane과 subcellular organelle은 lipid peroxidation의 중요한 손상부위가 된다. 표 4에서 보는바와 같이 BHA, BHT 투여군에서 BHA, BHT 모두 대조군에 비하여 큰 변화가 없었으며 BHT 200mg 투여군에 있어서만 약간 증가 되는 경향으로 나타났다($p < 0.01$). 이는 간조직내에서 alcohol을 투여하면 lipid peroxidation이 증가 된다는 사실이 보고된 바 있다²⁰⁾²¹⁾. 그러나 홍¹²⁾등은 alcohol투여에 있어서 microsomal lipid peroxidation에는 큰 변화가 없다고 보고된 바 있다. 임⁷⁾등은 BHA, BHT와 미생물 성장을 억제하는 이유로서 lipid peroxidation이 미생물 세포막에서 나타나게 되어 있어 미생물의 대사에 이상이 일어나 그것으로 성장억제가 된다고 가정하고 있다. 그러나 저자의 실험결과로는 BHA, BHT 투여는 실험동물간조직내 lipid peroxidation에는 지장을 초래하지 않는 것으로 알려지고 있다.

BHA, BHT투여가 간조직내 각종 대사에 어떤 영향을 미치는가에 대하여는 본 실험을 토대로 하여 더욱 많은 관찰이 요구 된다고 생각된다.

결 론

실험동물에 4개월간 BHA, BHT를 각기 체중 Kg당 100mg, 200mg씩 사료에 혼합투여 한 후 간조직내 microsomal P-450, b₅, cytochrome C reductase activity 및 lipid peroxidation을 관찰하여 간조직에 대한 BHA, BHT의 영향을 조사한 바 아래와 같은 결론을 얻었다.

1) Cytochrome P-450은 BHA, BHT 투여군 모두 현저한 증가가 있었으나 cytochrome b₅에 있어서는 유의있는 변화는 없었다.

2) Cytochrome C reductase activity에 있어서는 BHA에서는 약간 증가되고 있었으나 BHT는 감소되는 경향이었다.

3) Lipid peroxidation에 있어서는 BHA, BHT 모두 변화가 없었다.

이상 결과는 BHA, BHT가 식품가공 저장과정에서 지방의 항산화제로 이용함에 있어 인체에 큰 영향은 없는 것으로 추측할 수가 있다.

References

- 1) 김동훈 : 식품화학. 탐구당 1983 ; 482
- 2) Ward MS, Ward BQ : *Effect of BHT on Salmonella senftenberg*. *Pauly Sci* 1967 ; 46 : 1601
- 3) Chang HC, Branen AL : *Effect of BHA on Aspersirus paraciticus, Staphylococcus aureus and Escherichia coli*. *J Food Sei* 1975 ; 40 : 349
- 4) Ayaz ML, et al : *Effect of BHA and BHT on enterotoxin excretion of S aureus*. *J Food Prot* 1980 ; 43 : 4
- 5) Robach MC, Beuchat, LR : *Effect of BHA on growth and endotoxin excretion of Clostridium botulinism*. *J Food Prot* 1979 ; 42 : 853
- 6) Eubanks VL, Beuchat LR : *Effect of BHA on growth of Saccharomyces cerevisiae*. *J Food Sci* 1982 ; 47 : 1717
- 7) 임춘미등 : BHA 및 BHT의 미생물성장억제. *Korean J Food Sci Technol* 1987 ; 19 : 54
- 8) Degre R, Sylvestre M : *Inhibition effect of BHA, BHT on growth of microorganism*. *J Food Prot* 1983 ; 46 : 206
- 9) Davidson PM, Branen AC : *Effect of BHA and BHT on growth of microorganism*. *J Food Sci* 1980 ; 45 : 1607
- 10) Branen AL, et al : *Inhibitory effect of BHA on growth of microorganism*. *Food Fechnol* 1980 ; 34 : 42
- 11) Jhee EC : *The effect of BHA on hepatic aflatoxin B₁-DNA binding in rats*. *Food Sci* 1985 ; 18 : 40
- 12) 홍영숙등 : 알콜투여한 흰쥐에서 Vitamin E 투여가 lipid peroxidation에 미치는 영향. *이화의대지* 1984 ; 7 : 3
- 13) Omura T, Sato R : *The carbon monoxide binding pigments of liver microsame*. *J Biol Chem* 1954 ; 239 : 2370
- 14) Smucklers EA, et al : *Determination of liver microsomal cytochrme P-450 content*. *Biochem J* 1967 ; 103 : 55
- 15) Lowry DH, et al : *Protein measurement with folin phenol reagents*. *J Biol Chem* 1951 ; 193 : 265
- 16) Buege JA, Aust SD : *Method in Enzymology New York Academic press* 1978 ; 52 : 302-310
- 17) 성낙음 · 홍영숙 : 흰쥐에 Vitamin antioxidant 투여가 lipid peroxidation에 미치는 영향. *이화의대지* 1982 ; 5 : 99
- 18) Omura T, Takesue S : *Relationship between cytochrom P-450, b₅ and steroid and fatty acid liver disease*. *J Biochem* 1970 ; 67 : 249
- 19) 홍영숙외 : Vitamin A,E투여가 흰쥐 간조직내 microsome의 AAF hydroxylation에 미치는 영향. *이화대학교생활과학논총* 1985 ; 35 : 123
- 20) DiLuzino NR : *Inhibition of ethanol and carbon tetrachloride induced fatty liver by antioxidant*. *Am J Physiol* 1958 ; 194 : 453
- 21) Takada A, et al : *Effect of alcohol on the liver of rats*. *Lab Invest* 1970 ; 23 : 421