

Butylated hydroxyanisole(BHA) 및 butylated hydroxytoluene(BHT)의 미생물 성장 억제 효과

임 춘 미 · 경 규 항 * · 유 양 자

세종대학 식품공학과, *세종대학 가정학과

Antimicrobial Effects of Butylated Hydroxyanisole (BHA) and Butylated Hydroxytoluene (BHT)

Chun Mi Lim*, Kyu Hang Kyung and Yang Ja Yoo*

Department of Home Economics and * Department of Food Science,
King Sejong University, Seoul

Abstract

Butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) were tested for their effectiveness in inhibiting the growth of microorganisms. Among the test microorganisms, the growth of three yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera apiculata*, *Cryptococcus hungaricus*), three bacteria (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus casei*, *Escherichia coli*) and two molds (*Aspergillus oryzae*, *Penicillium* sp.) was progressively decreased as concentrations of BHA were increased. *A. oryzae* was completely inhibited with 100ppm of BHA and a majority of the test microorganisms (*S. cerevisiae*, *K. apiculata*, *C. hungaricus*, *B. subtilis*, *A. oryzae*) were completely inhibited by 150 ppm of BHA. The growths of *L. casei*, *E. coli* and *Penicillium* sp. were not affected as much as those of other microorganisms by BHA. Final cell yields were becoming lower as the concentration of BHA increased. The growth of *C. hungaricus* and *L. casei* was slightly inhibited by BHT. Other microorganisms were not effected by the test concentrations of BHT.

서 론

항산화제(antioxidants)는 공기중의 산소에 의한 유
지의 변질을 억제해 주기 위하여 식품 가공시에 첨가
되는. 식품 첨가물의 일종으로서 합성 항산화제 중 식
용유지 또는 지방질 식품에 첨가되는 것은 주로 페놀
계 항산화제이며 아민계 및 유황계 항산화제는 그 독
성때문에 식용 항산화제(food antioxidants)로서 그 사
용이 허용되지 않고 있다.⁽¹⁾

대표적인 페놀계 항산화제로는 butylated
hydroxyanisole(BHA), butylated
hydroxytoluene(BHT), monotertiary butylhydro-
quinone 그리고 propylgallate 등을 들 수 있는데 이중
BHA와 BHT는 비교적 독성이 약하고 첨가된 제품에
냄새나 맛을 주지 않으므로⁽¹⁾ 유지, 버터, 잼 등의 여
러가지 식품에 쓰도록 허가되어 있다. 페놀계 항산화
제의 항균작용은 1967년 *Salmonella senftenberg*에 대
한 BHT의 성장 억제 효과가 처음으로 보고된⁽²⁾ 이후
현재까지 활발한 연구가 이루어지고 있다. Chang 과
Branen⁽³⁾은 *Aspergillus parasiticus*, *Staphylococcus*

aureus 그리고 *Escherichia coli*가 BHA에 의해서 증
식이 억제된다고 하였으며 BHA와 BHT가 *S.aureus*
의 enterotoxin 형성 및 성장 억제 효과를 가지며⁽⁴⁾
BHA는 또한 *Clostridium botulinum*의 성장 및 독소
생성을 억제하고⁽⁵⁾ *Saccharomyces cerevisiae*의 성장과
포자형성을 저해한다고 보고되었다.⁽⁶⁾ BHA나 BHT
가 미생물 성장 저해 효과를 갖는 이유는 이들 소수성
물질들이 세포의 원형질막을 파괴시키거나 세포의 지
방층(lipid layer)에 끼어 들어가서 지방층의 상태를 변
화시키기 때문(disrupt the ordered state of the alkyl
chains)이라고 보고 있으나 현재까지는 추측일 따름이
다.⁽⁷⁻⁹⁾

최근 식품의 제조·가공기술이 발달되고 식생활이
고도로 다양화 됨으로서 저장식품·가공식품 및 인스
탄트식품 등의 이용도가 현저히 증가하면서 많은 새로
운 식품이 대량으로 생산되기에 이르러 식품의 저장기
간을 연장하고 상품가치를 높이기 위한 항산화제의 사
용이 증가되고 있다. 그러므로 본 연구에서는 BHA와
BHT의 함량에 따르는 미생물의 성장 억제 효과를 조
사하였다.

재료 및 방법

균 주

세종대학 식품공학과 미생물 실험실에서 보관중인 균주 중 식품의 발효나 부패에 관여하는 효모 3종 (*Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera apiculata*, *Cryptococcus hungaricus*), 세균 3종 (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus casei*, *Escherichia coli*), 곰팡이 2종 (*Aspergillus oryzae*, *Penicillium sp.*)을 이용하였다.

항산화제 stock solution의 조제

BHA(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo)와 BHT(Sigma)를 95%의 ethanol(Fluka)에 녹여 1%의 용액을 만든 후 가압살균된 membrane filter(0.2μm pore size, 25mm diameter:Gelman Sciences, Ann Arbor, MI)로 여과 제균하고 갈색 시약병에 넣어 4°C에 보관하면서 사용하였다.

증식용 배지

모든 효모는 yeast extract (BBL Microbiology Systems, Bedford, MD) 0.3%, malt extract (Difco Laboratories, Detroit, MI) 0.3%, peptone (BBL) 0.5%, glucose (Difco) 1%의 조성이 되도록 증류수로 용해시킨 액체배지(YMPGB) 100ml 씩을 500ml 삼각 flask에 분주하여 BHA와 BHT는 각각 stock solution을 함량에 따라 50ppm, 100ppm, 150ppm이 되도록 첨가하였다. Control의 알콜의 함량은 항산화제 첨가구와 같게 하였다.

세균중 *B.subtilis*와 *E.coli*는 nutrient broth(NB)를, *L.casei*는 MRS 배지⁽¹⁰⁾를 사용하였으며 항산화제 첨가 및 control은 효모의 경우와 같다.

곰팡이는 진열살균한 petri dish(직경, 9cm)에 고압살균한 YMPGA 배지를 부어 사용하였으며 항산화제 첨가 및 control은 효모용 배지 조제와 같다.

성장 측정

효모와 세균은 미리 준비해 둔 각 배지에 종균배양액 1ml 씩을 접종하여 30°C에서 진탕(150rpm)된 shaker incubator (선진과학기)에서 24~48시간 동안 배양하면서 흡광도를 측정하였다. 배양배지에 균주가 접종되어 진탕배양기에서 배양되는 0시간째부터 2시간 간격으로 일정량을 취해서 spectrophotometer (Model 340·Sequoia-Turner Corporation, CA)로 파장 620nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도를 측정할때의 blank 및 회색액으로 효모는 YMPG 액체배지를, *L.*

casei(MRS 배지 이용)를 제외한 다른 세균은 NB 배지를 이용하였다.

곰팡이는 미리 준비해 둔 YMPGA의 중앙에 곰팡이 1백금선량을 접종하여 30°C에 배양하면서 성장한 곰팡이의 직경을 1일 간격으로 측정하였다.

결과 및 고찰

항산화제에 의한 효모의 증식 억제 효과

항산화제가 함유된 YMPG 액체배지에서 *S.cerevisiae*, *K.apiculata*, *C.hungaricus*를 진탕배양하면서 흡광도로 균체 증식량을 조사한 결과는 Fig. 1~3과 같이 나타났다. 이들 세 효모에 대한 BHA의 성장 억제 효과는 매우 커서 BHA의 함량이 높을수록 균체의 성장속도가 느려졌으며 BHA 150ppm을 첨가했을 때는 세 효모의 성장이 완전히 억제되었다. 150ppm의 BHA를 함유한 액체배지의 최종탁도는 모두 control 배지에서 보다 낮았다. Eubanks와 Beuchat⁽⁶⁾가 *S.cerevisiae*의 성장과 포자형성, 위균사체형성에 대한 BHA의 억제 효과를 관찰했을 때도 BHA의 함량이 증가할수록 억제효과가 증가함을 관찰하였다. BHT는 *S.cerevisiae*나 *K.apiculata*에 대해 본 연구에서 이용한 농도 범위 내에서는 성장 억제 효과가 없었으며 *C.hungaricus*에 대해서는 100ppm과 150ppm에서 약간의 성장 억제 효과가 나타났을 뿐이다.

항산화제에 의한 세균의 증식 억제 효과

항산화제가 함유된 NB 배지에서 *B.subtilis* 및 *E.coli*를, 그리고 MRS 배지에서 *L.casei*를 배양하면서 균체 증식을 조사한 결과는 Fig. 4~6과 같이 나타났다. *B.subtilis*는 BHA에 매우 민감하여 BHA의 함량이 많을수록 억제효과가 높아졌으며 BHA 50ppm과 100ppm에서는 성장속도가 느려졌고 BHA 150ppm에서는 균체의 성장이 완전히 억제되었음은 물론 오히려 초기탁도보다 최종탁도가 낮아 균체가 사멸·용해되었음을 나타내었다. *L.casei*에 대해서는 위의 균주보다는 약하지만 BHA를 함유한 배지에서 성장 억제 효과를 나타냈고 *E.coli*에 대해서는 BHA 150ppm에서 약간의 성장 억제 효과가 있었다. NB 배지에서 *Bacillus sp.*의 성장이 BHA 50ppm에서 부분적으로 억제되고 100ppm은 세포수의 증가를 억제하였으며 BHA 100ppm 이상의 농도에서는 생존수가 감소하였다는 Shelef와 Liang⁽¹¹⁾의 보고와 *S.aureus*는 BHA에 민감하여 100~200ppm에서 성장이 저해되었으나 *E.coli*와 *S.typhimurium*을 억제하는데는 더 높은 양의 BHA가

필요하다는 Chang 과 Branen⁽³⁾의 보고는 본 연구의 결과와 잘 일치되고 있다. BHT는 *L. casei*에 대해서 성장 억제 효과를 나타내어 BHT의 농도가 증가함에 따라 성장속도가 느려졌으며 *B.subtilis*와 *E.coli*는 BHT에 의해 영향을 받지 않았다.

항산화제에 의한 곰팡이의 증식 억제 효과

항산화제가 함유된 YMPGA 배지에서 *A.oryzae*와 *Penicillium* sp.를 배양하면서 항산화제의 성장 억제 효과를 살펴본 결과는 Fig.7~8과 같다. BHA에 의한 두종류의 곰팡이의 성장 억제 효과는 매우 커서 BHA

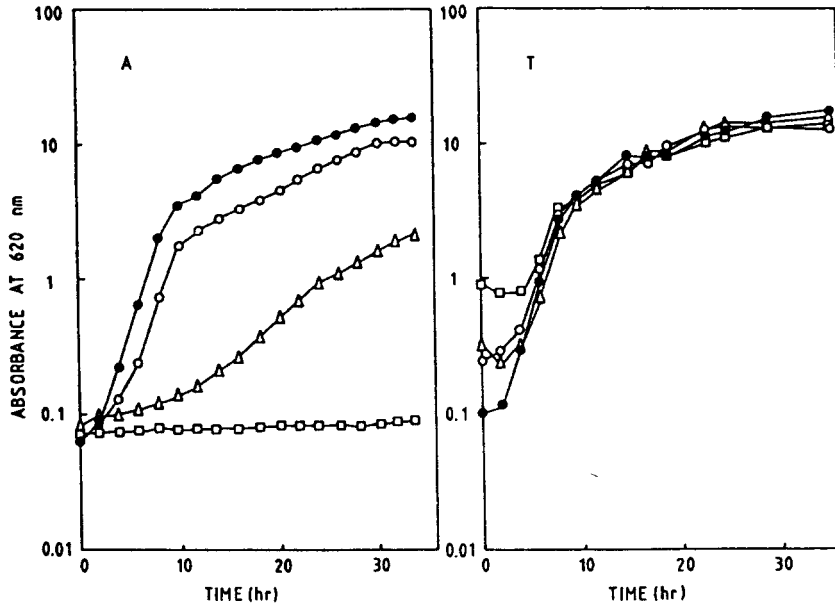


Fig. 1. Growth inhibition of *S. cerevisiae* by BHA (A) and BHT (T) in YMPG broth

Symbols: ●, 1.5% ethanol and 0 ppm antioxidants (control); ○, 50 ppm antioxidants; △, 100 ppm antioxidants; □, 150 ppm antioxidants.

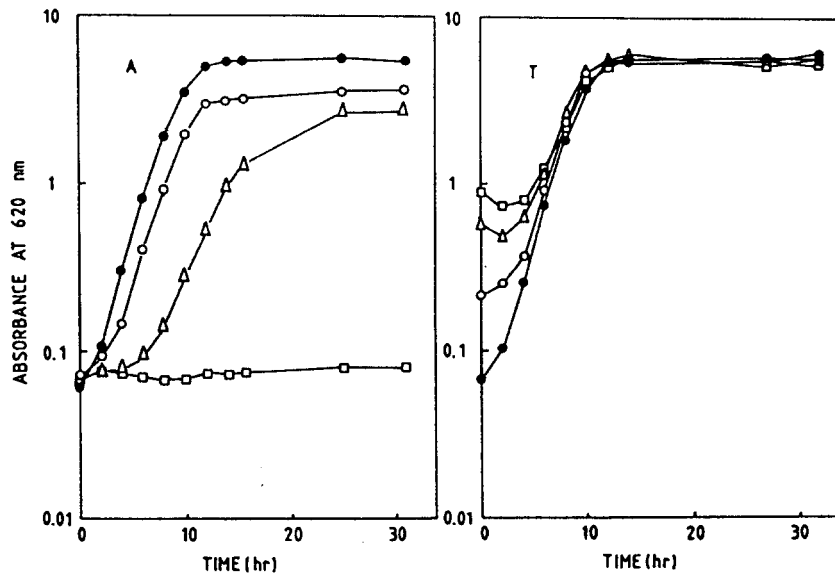


Fig. 2. Growth inhibition of *K. apiculata* by BHA (A) and BHT (T) in YMPG broth

Symbols used are the same as in Fig. 1.

를 함유한 배지에서 균체의 성장속도는 BHA의 함량이 증가할수록 느려졌다. *A.oryzae*는 BHA 50ppm을 함유한 배지에서 성장속도가 느려졌고 100 및 150ppm에서는 성장이 완전히 억제되었으며 *Penicillium* sp.는

control과 BHA 50ppm을 함유한 배지에서는 접종후부터 균사가 성장하기 시작했으나 BHA 100ppm은 1일후부터, BHA 150ppm은 2일후부터 성장하기 시작하여 BHA의 농도가 클수록 성장속도 또한 느려졌음이

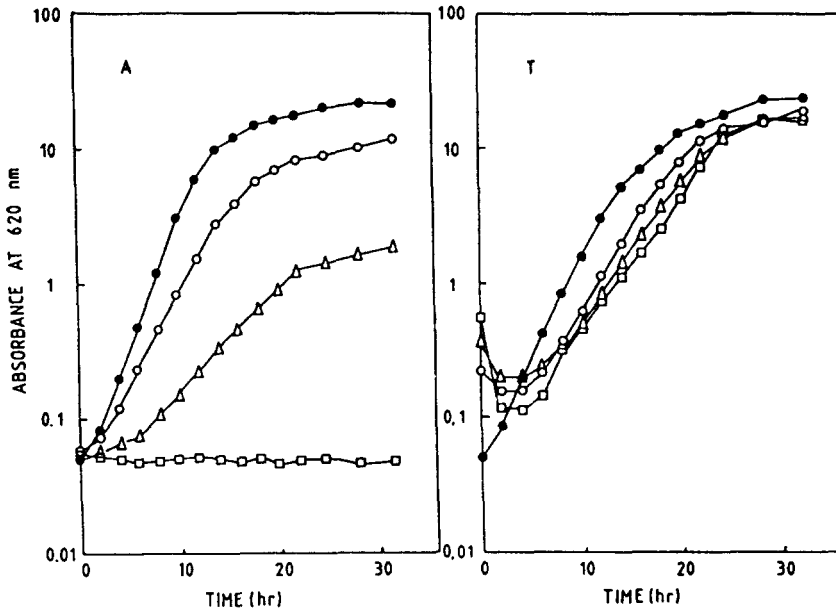


Fig. 3. Growth inhibition of *C. hungaricus* by BHA (A) and BHT (T) in YMPG broth
Symbols used are the same as in Fig. 1.

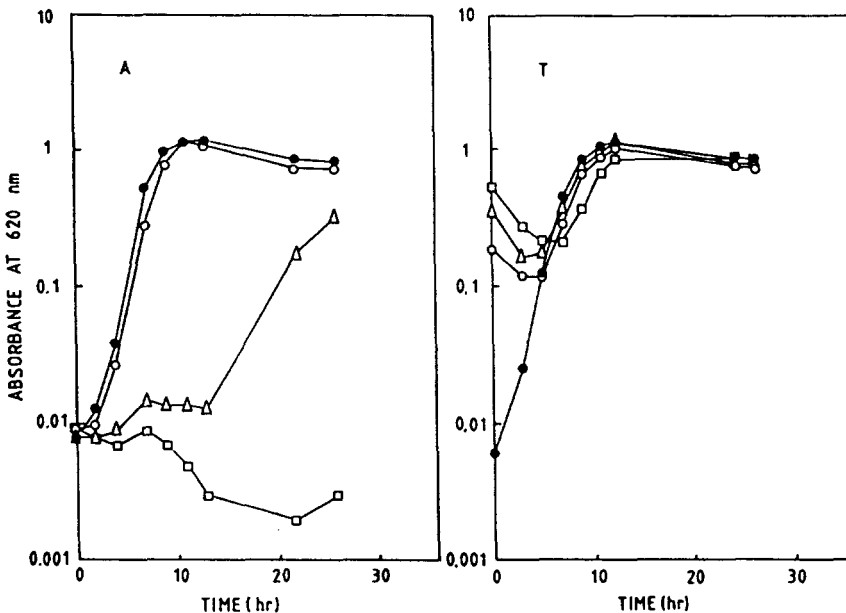


Fig. 4. Growth inhibition of *B. subtilis* by BHA (A) and BHT (T) in nutrient broth
Symbols used are the same as in Fig. 1.

확인되었다. Ahmad와 Branen⁽¹²⁾은 여러종류의 곰팡이에 대한 BHA의 성장 억제 효과를 관찰하여 *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Geotrichum* sp.가 BHA 50~200ppm으로 억제됨을 관찰하였던 사실과 잘 부합됨을 알 수 있다. BHT의 첨가로는 *A.oryzae*와 *Penicillium* sp.는 영향을 받지 않았다.

페놀성 항산화제의 항균적 메카니즘은 항산화제가

세포막과 반응해서 세포막의 기능과 성질에 영향을 주어서 세포내 물질을 유출시키거나 또는 항산화제가 세포의 효소작용이나 원형질의 유전물질에 영향을 미침으로서 일어나는 것으로 알려져 있다.^(7, 8, 13) 이와같은 페놀성 항산화제의 항균작용 메카니즘은 단지 생화학적 반응뿐 아니라 물리적·물리화학적 메카니즘도 포함된다. 그러므로 미생물에 대한 페놀성 항산화제의

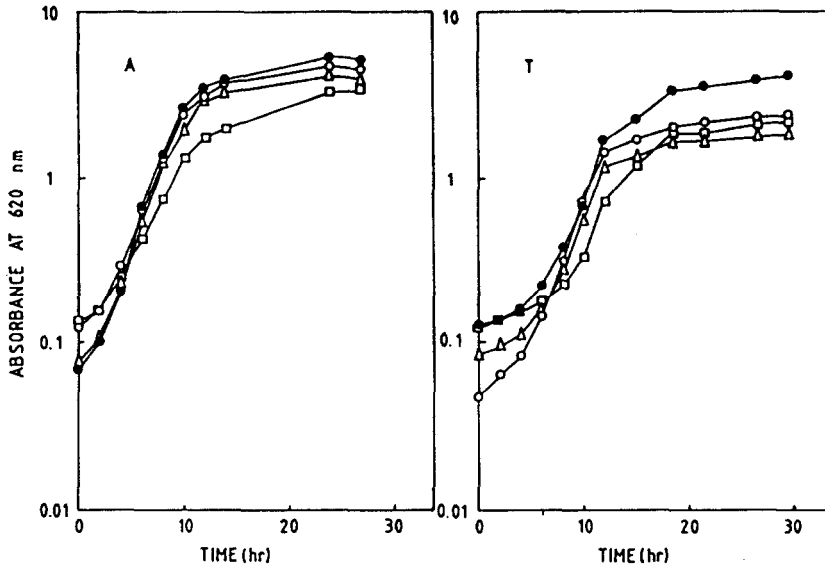


Fig. 5. Growth inhibition of *L. casei* by BHA (A) BHT (T) in MRS medium
Symbols used are the same as in Fig. 1.

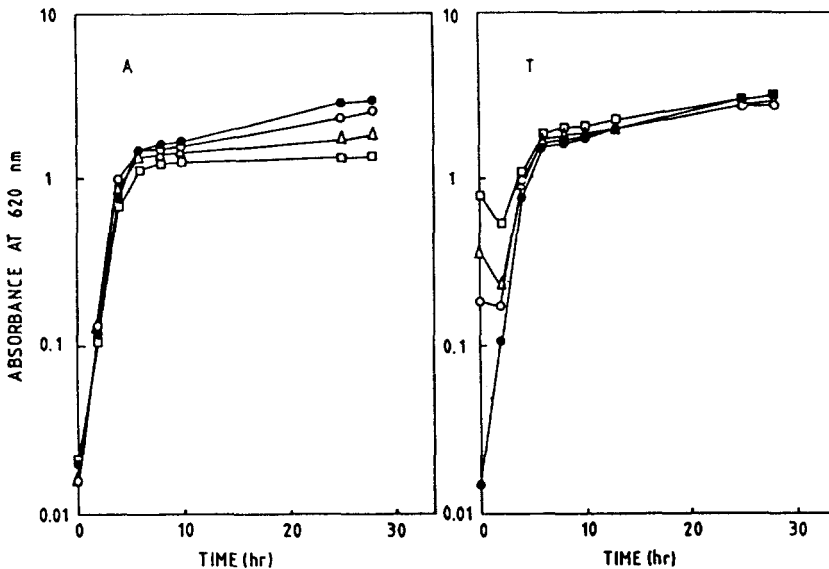


Fig. 6. Growth inhibition of *E. coli* by BHA (A) and BHT (T) in nutrient broth
Symbols used are the same as in Fig. 1.

항균작용은 미생물의 종류, 항산화제의 종류와 농도, 온도 등 여러요인에 의해 영향을 받게 된다. 이들 소수성 항산화제는 특히 원형질막의 지질층에 영향을 준다고 추측되나 지방조성이 다른 미생물이나 또는 Gram 양성이거나 음성세균에 미치는 영향은 일관성이

없음이 보고되었다.⁽¹³⁾

본 연구에서 여러 미생물의 성장에 대한 BHA와 BHT의 억제효과를 비교·관찰하여 보았을때 일반적으로 BHA는 BHT보다 항균작용이 우수하였다. 이와 같은 현상은 다른 여러 보고^(5, 14-16)에서와 같다. 이

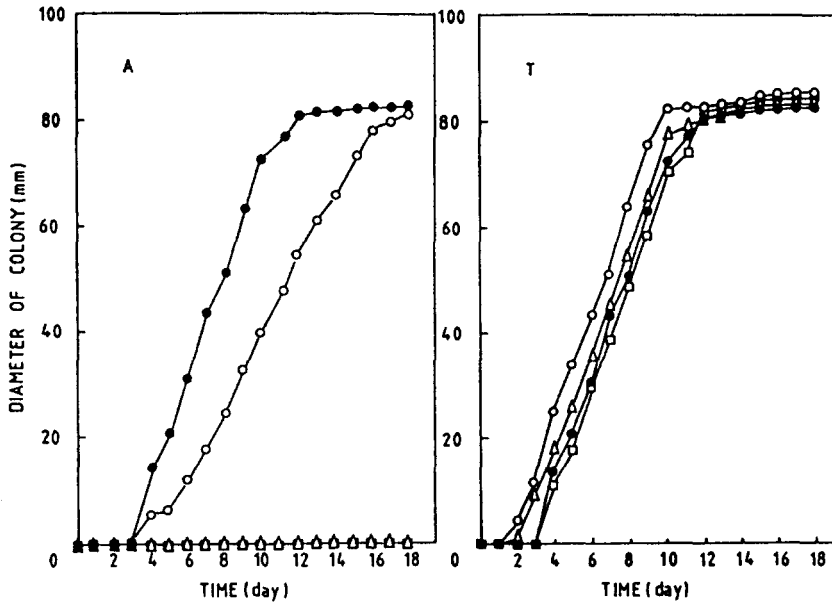


Fig. 7. Growth inhibition of *A. oryzae* by BHA (A) and BHT (T) in YMPGA
Symbols used are the same as in Fig. 1.

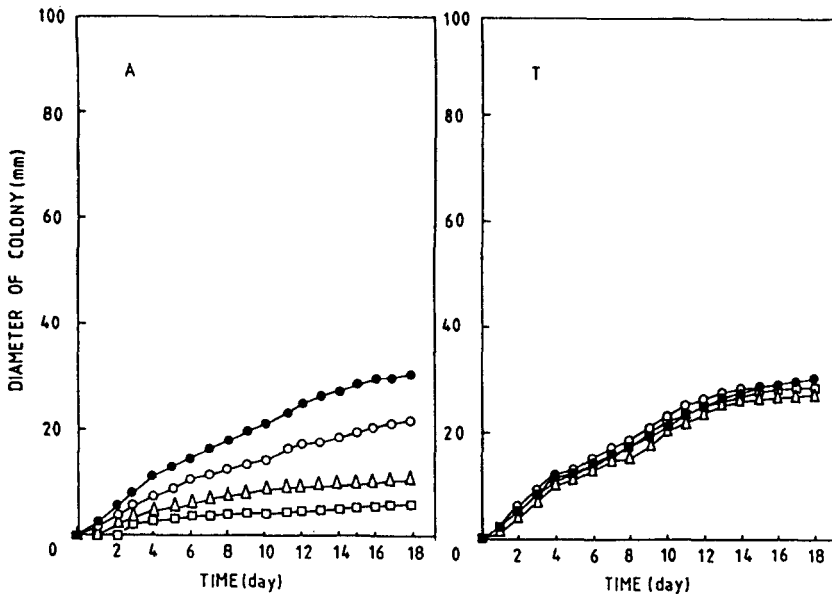


Fig. 8. Growth inhibition of *Penicillium* sp. by BHA (A) and BHT (T) in YMPGA
Symbols used are the same as in Fig. 1.

두 항산화제의 차이점은 그들의 화학적 구조의 차이에
서 발견할 수 있다. 하나의 tertiary butyl group 을 가
진 BHA 는 두개의 tertiary butyl group 을 가진 BHT
보다 물표면에서 더 잘 작용할 수 있으며 이것은 BHA
가 BHT 보다 세포막과의 반응을 쉽게 일으키게 하여
더 높은 항균효과를 나타내는 것으로 사려된다.

또한 본 연구에서 대상으로한 미생물 중 3종의 효모
와 3종의 세균, 2종의 곰팡이에 대한 BHA 의 억제효
과는 대부분 100~150ppm 에서 나타났는데 앞서 실시
된 여러 연구에서도 미생물의 종류나 배지의 종류, 연
구방법 등의 차이가 있기는 하나 일반적으로 BHA 는
50~200ppm 사이에서의 성장 억제 효과가 보
고^(2,3,5,9,12) 되어 있다.

요 약

Butylated hydroxyanisole (BHA)과 butylated
hydroxytoluene (BHT)의 각 농도에 따른 미생물의 성
장 억제 효과에 대한 연구 결과, 본 연구에서 대상으
로한 미생물 중 3종의 효모(*Saccharomyces cerevisiae*,
Kloeckera apiculata, *Cryptococcus hungaricus*), 3종의
세균 (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus casei*, *Escherichia*
coli), 2종의 곰팡이 (*Aspergillus oryzae*, *Penicillium*
sp.)가 BHA 의 농도가 증가함에 따라서 성장이 점차적
으로 억제되어 BHA 50ppm 에서는 성장속도가 약간
느려졌고 BHA 100ppm 에서는 더욱 느려졌으며 (*A.*
oryzae 는 완전 억제) BHA 150ppm 에서는 대부분의
미생물 (*S.cerevisiae*, *K.apiculata*, *C.hungaricus*, *B.*
subtilis, *A.oryzae*)의 성장이 완전하게 억제되었으나 3
종의 미생물 (*L.casei*, *E.coli*, *Penicillium* sp.)의 성장은
약간 억제되었을 뿐이다. BHT 에는 2종의 미생물
(*C.hungaricus*, *L.casei*)만이 성장이 약간 억제되었고
시험 농도 범위에서는 기타 미생물에 대한 성장 억제
작용은 없는 것으로 나타났다.

문 헌

1. 김동훈 : 식품화학, 탐구당, p.482(1983)
2. Ward, M.S. and Ward, B.Q.: *Poultry Sci.*, **46**, 1601
(1967)
3. Chang, H.C. and Branen, A.L.: *J. Food Sci.*, **40**, 349
(1975)
4. Ayaz, M.L., Luedecke, L.O. and Branen, A.L.: *J.*
Food Prot., **43**, 4 (1980)
5. Robach, M.C. and Pierson, M.D.: *J. Food Prot.*, **42**,
853 (1979)
6. Eubanks, V.L. and Beuchat, L.R.: *J. Food Sci.*, **47**,
1717 (1982)
7. Degre', R. and Sylvestre, M.: *J. Food Prot.*, **46**, 206
(1983)
8. Davidson, P.M. and Branen, A.L.: *J. Food Sci.*, **45**,
1607 (1980)
9. Brannen, A.L., Davidson, P.M. and Katz, B.: *Food*
Technol., **34**, 42 (1980)
10. De Man, J.C., Rogosa, M. and Sharpe, M.E.: *J. appl.*
Bacteriol., **23**, 130 (1960)
11. Shelef, L.A. and Liang, P.: *J. Food Sci.*, **47**, 796 (1982)
12. Ahmad, S. and Branen, A.L.: *J. Food Sci.*, **46**, 1059
(1981)
13. Post, L.S. and Davidson, P.M.: *Appl. Environ.*
Microbiol., **52**, 214 (1986)
14. Trelease, R.D. and Tompkin, R.B.: U.S. Patent, 3,
955, 005 (1976)
15. Surak, J.G., Bradly, R.L., Branen, A.L. and Shrago,
E.: *Food Cosmet. Toxicol.*, **14**, 277 (1976)
16. Surak, J.G., Bradly, R.L., Branen, A.L., Shrago, E.
and Ribelin, W.E.: *Food Cosmet. Toxicol.*, **14**, 541
(1976)

(1986년 10월 24일 접수)