



식품첨가물 고결방지제 이산화규소의 세포독성 및 유전독성

남한나 · 이채윤 · 최수진*

서울여자대학교 식품생명공학과

Cytotoxicity and genotoxicity of silicon dioxide as a food additive anti-caking agent

Han-Na Nam, Chae-Yoon Lee and Soo-Jin Choi*

Department of Food Science and Technology, Seoul Women's University, Seoul 01797, Korea

Abstract

Amorphous silicon dioxide (silica, SiO_2) is widely used as an anti-caking agent in products such as chocolate and powdered foods. Although SiO_2 is generally considered safe at standard usage levels, concerns regarding its safety persist because research suggests that it may induce inflammation, intestinal dysfunction, and neurotoxicity at the cellular level. In this study, the potential cytotoxicity and genotoxicity of SiO_2 as a food additive anti-caking agent were investigated in an intestinal epithelial cell line at practical intake levels, with a focus on differences based on the manufacturing method (fumed and precipitated). The results showed that neither type of SiO_2 induces cytotoxicity in terms of cell growth inhibition, cell death via membrane damage, or reactive oxygen species generation. Furthermore, neither type of SiO_2 caused DNA damage, chromosomal aberrations, or micronucleus formation. These findings provide fundamental evidence that supports the safety of SiO_2 as an anti-caking food additive.

Keywords: Silicon dioxide, Anti-caking agent, Cytotoxicity, Genotoxicity

서론

무정형 이산화규소(silicon dioxide, silica, SiO_2)는 우리나라에서 고결방지제, 거품제거제 및 여과보조제 목적으로 식품첨가물로 등록되어 있으며, 여과보조제로 사용하는 경우 최종식품 완성 전에 제거해야 한다(MFDS, 2025). 고결방지제 또는 거품제거제 용도로 사용할 경우 가공유크림 및 분유류에 1% 이하, 식염에 2% 이하, 그리고 기타 식품에 2% 이하로 사용량을 규정하고 있다(MFDS 2025). 무정형 SiO_2 는 고결방지제(anti-caking agent)로서 미국에서는 21 CFR 172.480으로 식품첨가물로 승인되었으며(CFR, 2026), 분말 단백질, 조미료, 믹스 커피, 분말 스프, 초콜릿 및 분말제품 등에 널리 사용되고 있다(Dekkers et al., 2011). 유럽연합(European Union, EU)에서

SiO_2 는 1960년대부터 식품첨가물로 사용되었으며, 2012년에 합성 무정형 실리카(synthetic amorphous silica, E551)로서 EU 위원회 규정(Commission Regulation) NO 231/2012에 등록되었다(EUR-Lex, 1995; EUR-Lex, 2012; Fruijtter-Polloth et al., 2016).

일반적으로 식품첨가물 SiO_2 는 사용수준에서는 안전한 것으로 간주되고 있다. 특히 SiO_2 는 식물성 식품에 천연적으로 존재하는 성분으로 천연 식품원으로부터 일일섭취량이 1인당 20~50 mg에 이르는 것으로 알려지고 있다(EFSA Panel on NDA, 2004; Sadowska & Świdorski, 2020). 미국 식품의약국(Food and Drug Administration)에서는 고결방지제로서 SiO_2 는 최종 제품에 2%를 초과하지 않는 수준에서 Generally Recognized as Safe (GRAS) 물질로 간주하고 있다(CFR, 2026). 또한 국제식량농업기구(FAO)/세계보건기구(WHO)

Received: May 04, 2026 / Revised: Jun 8, 2026 / Accepted: Jun 15, 2026 / Published: Jul 21, 2026

Corresponding author: Soo-Jin Choi, Department of Food Science and Technology, Seoul Women's University, Seoul 01797, Korea

E-mail: sjchoi@swu.ac.kr

Copyright © 2026 Korean Society for Food Engineering.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

합동 식품첨가물전문가위원회(Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)에서는 고결방지제 SiO₂의 1일섭취허용량을 “not specified”로 설정하고 있어 실질적 섭취량 수준에서는 위해성이 없는 것으로 간주하고 있다(JECFA, 2017). 2024년 유럽식품안전청(European Food Safety Authority, EFSA)은 생후 16주 미만 영아용 식품 및 모든 인구집단에서 고결방지제 E551의 안전성을 재평가하였으며, 그 결과 E551은 모든 인구 집단에서 안전성에 대한 우려가 없으며, 현재 노출 수준에서 생후 16주 미만 영아용 식품에 사용하는 것 또한 안전하다고 결론지었다(EFSA Panel on FAF et al., 2024).

한편, 고결방지제 SiO₂는 제조방법에 따라서 발열성(fumed, pyrogenic)과 침전형(precipitated)으로 구분된다. 발열성 SiO₂는 사염화규소(silicon tetrachloride)를 화염 열분해하거나 또는 3,000℃의 전기 아크에서 석영사(quartz sand)를 기화시켜서 제조한다(Schulze Isfort & Rochnia, 2009; Maharana et al., 2020). 침전형 SiO₂는 규산염 수화물(silicate hydrate)라고도 불리며, 염기성 규산염 용액에 무기산을 가하여 침전 반응을 통해 제조한다(Flörke et al., 2008). 이 두 가지 방식에 의해 제조되는 SiO₂는 화학식은 같지만 제조방법에 따른 물리화학적 특성 및 생물학적 반응성은 달라질 수 있다(Yoo et al., 2021; Yoo et al., 2022). 식품첨가물로서는 무정형 SiO₂만 사용하도록 승인되었지만, 결정형 SiO₂ 미세 분진을 장기간 흡입 시 규폐증 및 폐암을 유발할 수 있는 것으로 보고되고 있다(IARC, 2012; EFSA Panel on ANS et al., 2018; IARC, 2026). 또한 최근에는 세포수준에서 SiO₂가 염증, 장 기능 이상 및 신경독성을 유발한다는 연구가 보고된 바 있고, 나노 크기(1~100 nm)에 의해 생체 내 반응성이 달라질 수 있어서 안전성에 대한 우려는 잠식되고 있지 않는 실정이다(Buzea et al., 2007; Khan et al., 2017; Guo et al., 2018; Du et al., 2019; Tada-Oikawa et al., 2020).

따라서 본 연구에서는 제조형태(발열성, 침전형)에 따른 두 가지 식품첨가물 SiO₂의 안전성을 섭취량 수준에서 유전독성에 초점을 두고 연구하였다. 유전독성은 발암성과 직접적으로 연계되므로 식품독성에서 가장 중요하게 고려되는 평가항목인데, 경구섭취 시 직접적으로 다량 노출되는 장관상피세포주를 이용하여 SiO₂에 의한 DNA 손상, 염색체 이상 및 소핵 형성여부를 종합하여 유전독성을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

SiO₂ 재료

식품첨가물용 발열성(AEROSIL® 200F) 및 침전형(SIPERNAT® 22S) SiO₂는 Evonik Industries AG (Essen, NRW, Germany)에서 구

입하여 사용하였다. 실험 직전에 SiO₂를 증류수(distilled water, DW)에 1 mg/mL 농도로 제조한 후, 30분 동안 교반하고 15분 동안 초음파 처리(160 Watts, Branson 580, Branson Ultrasonics, Danbury, CT, USA)하여 준비하였고, 모든 실험 직전에 적절한 농도로 희석하여 사용하였다.

물리화학적 특성 분석

SiO₂ 입자의 구성 입자 크기 및 형태는 전계방출형 주사전자현미경(field emission-scanning electron microscopy, FE-SEM; JSM-7100F, JEOL, Tokyo, Japan) 및 고해상도 투과전자현미경(high resolution-transmission electron microscopy, TEM; JEM-2100F, JEOL)으로 측정하였다. FE-SEM 분석을 위해 카본 테이프(5 mm×5 mm, E-SONG EMC, Seoul, Korea)가 부착된 마운트(Specimen Mount, JEOL) 위에 20 mL의 SiO₂ 현탁액(0.1 mg/mL)을 떨어뜨리고 실온에서 건조하였다. 그 후, 스퍼터링 공정(sputtering process)을 통해 샘플 표면을 30초 동안 Pt/Pd로 코팅하였고, FE-SEM 이미지는 15 kV의 가속 전압에서 획득하였다.

TEM 분석의 경우, 에탄올에 SiO₂ 입자 현탁액(0.1 mg/mL)을 제조하고 15분 동안 초음파 처리한 후, 현탁액 5 mL를 200 메쉬 카본 코팅 구리 그리드(PELCO® TEM Grids, Ted Pella Inc., Redding, CA, USA)에 떨어뜨리고 실온에서 건조하였다. TEM 이미지는 200 kV의 가속 전압에서 획득하였다. FE-SEM 및 TEM 이미지 상의 SiO₂ 입자 평균 크기와 입도 분포는 ImageJ 소프트웨어(version 1.53a, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 분석하였다.

SiO₂ 입자의 유체역학적 직경(hydrodynamic diameters)과 제타 전위(zeta potentials)는 Zetasizer Nano 시스템(Malvern Instruments, Worcestershire, UK)을 사용하여 각각 동적 광산란법(dynamic light scattering)과 전기영동 광산란법(electrophoretic light scattering)으로 측정하였다. 이를 위해 1 mL의 SiO₂ 현탁액(0.1 mg/mL)을 일회용 플라스틱 큐벳(cuvette)에 넣고 실온에서 측정하였다.

비표면적(specific surface area)은 -196℃에서의 입자의 질소 N₂ 가스 흡착-탈착 등온선을 이용한 Brunauer-Emmett-Teller 방법으로 측정하였는데, 분석 전 입자 내 수분은 100℃에서 2시간 동안 건조하여 제거하였으며, 이후 비표면적 분석기(TriStar II 3020, Micromeritics, Norcross, GA, USA)로 측정하였다.

세포배양

장관상피세포인 Caco-2 세포주를 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양 받아 minimum essential medium (Welgene Inc., Gyeongsan, Korea)에 10% 열 불활성화 소태아혈청(heat inactivated fetal bovine serum), 페니실린(100 units/mL) 및 스

트렙토마이신(100 µg/mL)을 첨가하여 5% CO₂, 37°C 조건의 세포배양기에서 배양하였다.

세포독성

Caco-2 세포에 대한 독성지표로서 water-soluble tetrazolium salt-1 (WST-1; Roche, Basel, Switzerland)을 이용하여 세포성장 저해 효과를 평가하였다. Caco-2 세포(1×10^4 세포/100 µL)에 SiO₂를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. SiO₂ 농도는 품목제조보고서 기반 최대 사용량 (2%)×일일섭취량 (g)/장관 부피 (100 mL)를 고려하여 최고 농도를 1,000 µg/mL로 설정하였다(Mudie et al., 2014; KHIDI, 2017; Yu et al., 2020). WST-1 시약 10 µL을 각각 첨가하고 4시간 동안 배양한 후, 440 nm에서 흡광도를 microplate reader (Infinite® M Plex, Tecan, Männedorf, Switzerland)를 이용하여 측정하였다. 세포막 손상에 의한 세포사멸은 CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity assay (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 세포 배양액으로 유출된 젖산탈수소효소(lactate dehydrogenase, LDH)를 분석하여 평가하였다. Caco-2 세포(2×10^4 세포/mL)에 SiO₂를 24시간 처리하고 세포 배양액을 원심 분리하여 상등액을 분석에 이용하였다. 제조사의 프로토콜에 따라 상등액 50 µL에 substrate mixture 50 µL을 첨가하고 30분간 반응시킨 뒤, stop solution 50 µL을 첨가하여 490 nm에서의 흡광도를 측정하였다(Infinite® M Plex, Tecan).

활성산소종

세포 내 활성산소종(reactive oxygen species; ROS) 생성은 산화 스트레스와 직접적으로 연결되어 유전독성을 나타낼 수 있기에 세포막 투과성 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCFDA; Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA)를 이용하여 ROS 발생량을 분석하였다. Caco-2 세포(1×10^4 세포/100 µL)에 SiO₂를 처리하여 24시간 배양한 후, 20 µM H₂DCFDA 100 µL을 첨가하여 30분간 암소에서 반응시켰다. Phosphate buffered saline (PBS)로 세척 후, 세포 내 dichlorofluorescein (DCF) 형광을 excitation 파장 485 nm와 emission 파장 535 nm에서 측정하였다(Infinite® M Plex, Tecan).

In vitro 코멧 분석(comet assay)

Caco-2 세포(1×10^6 세포/2 mL)에 SiO₂를 처리하여 24시간 동안 배양한 후, PBS에 제조한 5 mM ethylene-diamine-tetraacetic acid 용액 1 mL로 40초 동안 처리하여 스크래퍼를 이용해 세포를 회수하였다. 또한 대사활성제 S9 mix (+S9 mix) 영향을 비교 연구하기 위하여 SiO₂와 S9 mix를 함께 4시간 처리 후, 이를 제거하고 세포배양액에서 20 h 회복기를 두어 수행하였다(Lee et al., 2019; Kim et al., 2021).

이때, S9 mix는 S9 fraction (rat liver S9 homogenate in KCl, MP Biomedicals, CA, USA)과 cofactor (Cofactor III, Genogen Co. Ltd, Cheongju, Korea)를 2:4.7의 비율로 하여 최종 농도 1.5%로 제조하여 사용하였다. 유전독성 양성대조군으로 100 µM 과산화수소(H₂O₂)를 이용하였다. 회수한 세포를 원심 분리하여 차가운 PBS 용액에 다시 현탁(1×10^5 세포/1 mL)한 후, R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) kit를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 comet 분석을 수행하였다. 즉, 세포 현탁액을 저용점 한천과 1:10 (v/v) 비율로 혼합한 후 75 µL를 comet 슬라이드에 즉시 적재하여 4°C의 어두운 환경에서 30분 동안 방치하여 겔화(gelation)시켰다. 4°C의 차가운 lysis 용액에 1시간 처리한 후 lysis 용액을 제거하고, comet 슬라이드를 알칼리 용액(pH>13)에 실은, 30분간 암실에서 처리하였다. 알칼리 용액을 제거한 후, comet 슬라이드를 4°C의 암실에서 20 V, 300 mA에서 40분 동안 전기영동하였다. 슬라이드를 3차 증류수로 세척하고, 70% 에탄올에 5분간 처리한 후 공기 건조시켜 4°C의 암실에서 100 µL의 Cygreen으로 30분 동안 염색하였다. 마지막으로, 슬라이드를 Axioskop 2 plus 형광현미경과 Cometscore 2.0 이미지 분석 소프트웨어(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)를 이용하여 분석하였다. 디지털 방식으로 comet tail의 길이를 분석하고, tail 내 DNA의 백분율(%)을 계산하였다: (tail 내 DNA 양/총 DNA 양) × 100.

In vitro 염색체 이상시험(chromosomal aberration assay)

Caco-2 세포(1.5×10^5 cells/2 mL)에 S9 mix 없이 SiO₂ (1,000 µg/mL)를 처리하여 24시간 동안 배양하였고, 양성 대조군으로 0.2 µg/mL mitomycin C (MMC)를 사용하였다. 또한 SiO₂를 대사활성제 S9 mix와 함께 4시간 처리 후(양성대조군 10 µg/mL cyclophosphamide, CPA), 이를 제거하고 세포배양액에서 20 h 회복기를 두고 대사활성제 유무에 따른 영향을 비교 연구하였다. 상등액을 제거하고 PBS로 3회 세척한 후, 세포를 배양액에서 30시간(1.5 세포 주기) 동안 추가 배양하였다. 추가 배양이 끝나기 직전, 체세포 분열의 중기(metaphase) 단계에서 세포 분열이 일어나지 않도록 2시간 동안 colcemid 용액에 처리하였다. PBS 세척 및 원심분리(365×g, 5분)를 통해 세포 침전물(cell pellet)을 얻은 후, 이를 3 mL의 0.075 M KCl 용액에 부유시켜서 37°C에서 30분간 배양하였다. 그 후, 2 mL의 고정액(메탄올:아세트산=3:1, 4°C)을 세포 현탁액에 첨가하고 원심분리(365×g, 5분)하였다. 상등액 제거 후 5 mL의 고정액을 추가하여 재부유시킨 뒤 다시 원심분리(730×g, 5분)하였으며, 이 과정을 2회 반복하였다. 세포 침전물을 1 mL의 고정액에 재부유시킨 후, 세포 현탁액 100 µL를 슬라이드 위에 떨어뜨려 공기 건조하였다. 슬라이드는 5% Giemsa 용액으로 20분간 염색한 뒤, 증류수로 세척하고 건조하여 현미경(Axioskop 2 plus, Carl Zeiss)으로 관찰하였다. 고르게 분산된

중기 세포를 최소 200개 이상 관찰하였으며, 수직 이상(이배체, 다배체) 및 구조적 이상(절단, 결실, 단편, 교환) 여부를 기록하였다.

In vitro 소핵 시험(micronucleus assay)

Caco-2 세포(1.5×10^5 cells/2 mL)에 S9 mix 없이 SiO_2 (1,000 $\mu\text{g/mL}$)를 처리하여 24시간 동안 배양하였고, 양성대조군으로 25 $\mu\text{g/mL}$ methyl methanesulfonate (MMS)를 이용하였다. 또한 SiO_2 를 대사활성제 S9 mix와 함께 4시간 처리 후(양성대조군 10 $\mu\text{g/mL}$ CPA), 이를 제거하고 세포배양액에서 20 h 회복기를 두고 대사활성제 유무에 따른 영향을 비교 연구하였다. 상등액을 제거한 후, 핵분열을 유지하되 세포질 분열을 방지하기 위해 4.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 cytochalasin B를 30시간 동안 처리하고, PBS로 세척한 후 세포를 배양액에서 1.5시간 동안 회복시킨 뒤 회수하였다. 세포 침전물(cell pellet)을 37°C의 0.075 M KCl 1 mL에 다시 부유시켜 2분간 빠르게 저삼투압 충격(hypotonic shock)을 유도하였고, 메탄올-아세트산(3:1) 고정액으로 각각 5분과 15분 동안 고정 한 뒤 원심분리(135×g, 5분)하는 과정을 반복하였다. 세포 침전물을 1 mL의 고정액에 재부유시킨 다음, 세포 현탁액 100 μL 를 차갑게 식힌 슬라이드 위에 떨어뜨려 공기 건조하였다. 마지막으로 슬라이드를 5% Giemsa 용액으로 20분간 염색한 후, 현미경(Axioskop 2 plus, Carl Zeiss)으로 최소 200개 이상의 세포를 관찰하였으며, 단핵, 이핵 및 다핵 세포의 수를 기록하였다.

통계분석

모든 실험결과는 평균값±표준편차로 나타내었으며, Statistical Analysis System 프로그램(Version 9.4, SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 one-way ANOVA 분석 후 Tukey's test를 이용하여 시험군과 대조군과의 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

SiO_2 의 물리화학적 특성

두 가지 제조방법에 따른 발열성 및 침전형 SiO_2 의 구성입자 및 모양을 FE-SEM과 TEM을 이용하여 각각 분석하였다. 그 결과, 두 물질 모두 불규칙적인 구형의 모양으로 관찰되었고, 구성입자의 평균 크기는 발열성 14.8 ± 4.6 nm, 침전형 16.1 ± 4.4 nm로 모두 100 nm 미만의 작은 입자로 구성되어 있음을 확인하였으며, 두 물질 입자크기 간 통계학적 유의적 차이는 나타나지 않았다($p > 0.05$)(Fig. 1). 유체역학적 직경은 발열성 178.8 ± 2.8 nm, 침전형 361.3 ± 14.4 nm로 측정되어 발열성이 침전형 대비 더 작은 유체역학적 직경을 보유하고 있는 것으로 나타났다(Table 1). FE-SEM과 TEM에 의한 구성입자 크기와 비교해 보면, 유체역학적 직경이 크게 증가하여 수용액 상태에서는

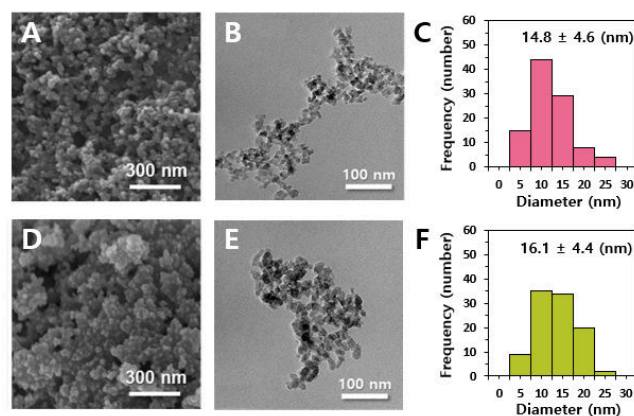


Fig. 1. (A, D) Field emission scanning electron microscopy (FE-SEM), (B, E) transmission electron microscopy (TEM) images, and (C, F) size distribution of (A-C) fumed SiO_2 and (D-F) precipitated SiO_2 . Size distribution was evaluated by measuring randomly selected 100 particles from TEM micrographs.

두 가지 SiO_2 모두 응집된 상태로 존재하고 있음을 알 수 있다. 제타 전위는 발열성 -23.5 ± 0.6 mV, 침전형 -21.9 ± 1.2 mV로 모두 음전하를 보유하고 있었다(Table 1). 비표면적은 발열성 176.7 ± 1.1 m^2/g , 침전형 148.8 ± 1.0 m^2/g 으로 측정되어(Table 1) 작은 입자크기를 보유한 발열성이 침전형보다 비표면적이 더 큰 것을 알 수 있다(Khan et al., 2017; Yoo et al., 2021). 즉, 발열성 및 침전형 SiO_2 는 구성입자 크기에 있어서는 1~100 nm 사이의 나노물질 크기에 해당하나 수용액상에서는 응집체로 존재하며, 이는 실질적으로 식품이나 생체내에서는 나노 크기로 존재하지 않음을 의미하므로 나노 크기에 의한 독성 영향은 미비할 것으로 보인다.

세포독성

두 가지 제조방법에 따른 SiO_2 의 세포독성은 세포성장 저해, 세포막 손상에 의한 세포사멸 및 ROS 유발 관점에서 연구하였다. 식품첨가물로서 경구섭취 시 노출량이 많은 부위가 장관계인 것을 고려하여 장관상피세포주 Caco-2를 이용하였다. 세포독성을 위한 최고 농도는 실질적 섭취량 조건에서 평가하고자 품목제조보고서 기반 최

Table 1. Hydrodynamic diameters, zeta potentials, and specific surface areas of fumed or precipitated SiO_2 particles

SiO_2	Z-average diameter (nm)	Zeta potential (mV)	BET (m^2/g)
Fumed	178.8 ± 2.8^a	-23.5 ± 0.6	176.7 ± 1.1
Precipitated	361.3 ± 14.4^b	-21.9 ± 1.2	148.8 ± 1.0

Different lowercase letters (^{a,b}) indicate significant differences between fumed SiO_2 and precipitated SiO_2 ($\alpha < 0.05$).

대 사용량인 2%, 다빈도 사용 제품군의 일일섭취량 및 소장 부피 (100 mL)을 고려하여 세포배양시 조건으로 환산한 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 을 최고 농도로 설정하였다(Mudie et al., 2014; KHIDI, 2017; Yu et al., 2020). 그 결과, 발열성 및 침전형 SiO_2 에 의한 세포성장 저해는 관찰되지 않았고, 세포막 손상으로 나타나는 LDH 유출도 검출되지 않아 세포사멸을 유발하지 않았으며, ROS 또한 유발하지 않는 것으로 나타났다(Fig. 2). 즉, 제조방법이 다른 두 가지 SiO_2 에 의한 세포독성 영향은 미미한 것으로 보인다.

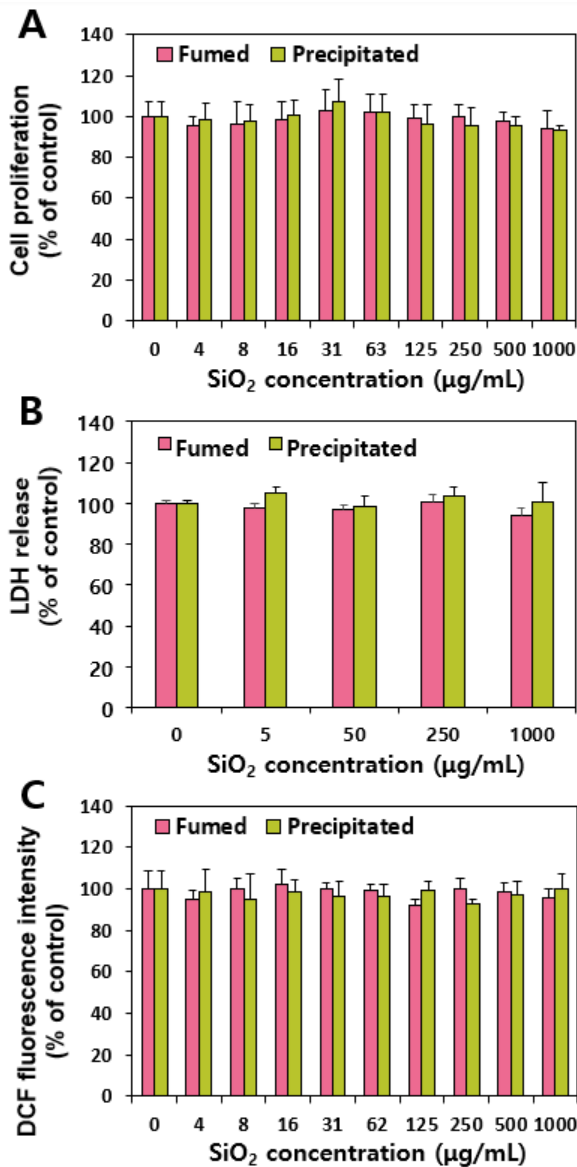


Fig. 2. (A) Cell proliferation inhibition, (B) lactate dehydrogenase (LDH) release, and (C) reactive oxygen species (ROS) generation in Caco-2 cells following exposure to fumed or precipitated SiO_2 particles for 24 h. No significant differences were found between non-treated control cells and SiO_2 -treated cells ($p > 0.05$). DCF, dichlorofluorescein.

In vitro DNA 손상

SiO_2 에 의한 DNA 손상여부를 평가하기 위하여 comet 분석을 통해 DNA tail이 형성되는지 확인하였는데, 이는 단세포 겔 전기영동법(single cell gel electrophoresis)으로 개별 세포 내 DNA 단편의 이동 거리를 분석하여 DNA 손상 정도를 정량화하는 기법이다. 즉, comet 분석은 전기영동 시 손상된 DNA가 정상 DNA보다 빠르게 이동한다는 원리에 기반한다(Cordelli et al., 2021). 변성 및 절단된 DNA 조각들은 전기장 안에서 세포 밖으로 이탈하여 comet tail 형태를 형성하는 반면, 손상되지 않은 DNA는 핵 구조 내에 머물며 head를 형성하는 시각적 특성을 보인다. Fig. 3에서 보듯이 발열성과 침전형 SiO_2 모두 DNA tail을 형성하지 않는 것으로 나타났으며, 이는 무정형 나노 크기 SiO_2 가 comet 분석에 의해 유전독성을 나타내지 않는 선행 문헌과 일치하는 결과이다(Barnes et al., 2008). 특히 간 추출물인 S9 mix에 의한 대사활성화에 의해서도 DNA tail이 관찰되지 않아, 간에서 대사과정에 의해 유전독성 산물을 생성하지 않는 것으로 판단된다. 양성대조군으로 사용한 H_2O_2 의 경우, 대사활성화에 의해 DNA 손상 정도가 감소하는 것으로 나타났는데, 이

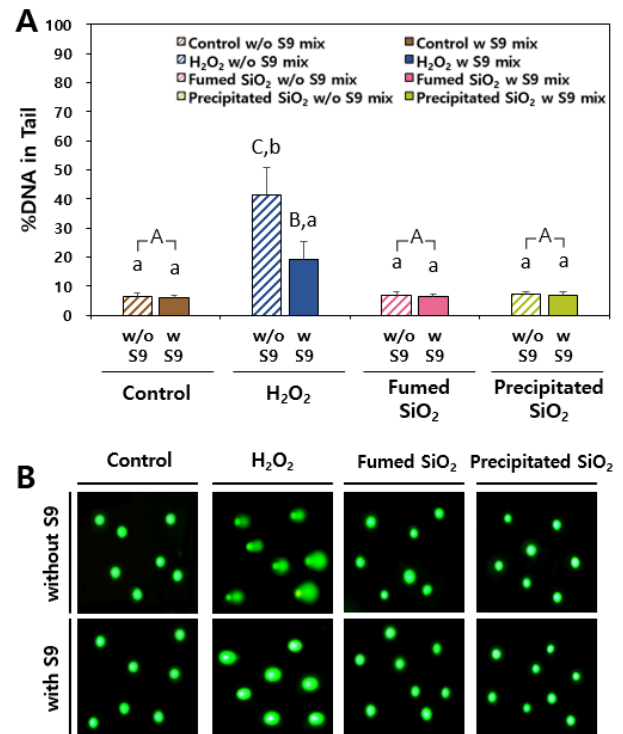


Fig. 3. (A) DNA damage induced by fumed or precipitated SiO_2 particles in Caco-2 cells, as assessed by comet assay with (w) or without (w/o) an S9 mix. (B) Representative images obtained at a magnification of 20 $\times$. Different uppercase letters (A-C) indicate significant differences among non-treated control, H_2O_2 -treated, and 1,000 $\mu\text{g/mL}$ SiO_2 -treated groups ($p < 0.05$). Different lowercase letters (a, b) indicate significant differences between groups with (w) and without (w/o) the S9 mix ($p < 0.05$).

는 간에서 대사과정을 거치면서 H_2O_2 의 유전독성이 낮아질 수 있음을 의미한다(Hochstein & Utley, 1968; Soares et al., 2006). 즉, 식품 첨가물 SiO_2 는 실질적 최대 섭취량인 1,000 $\mu g/mL$ 농도에서 DNA 손상을 유발하지 않는 것으로 판단된다.

In vitro 염색체 이상

염색체 이상은 염색체 DNA의 구조나 수에 생기는 모든 변화를 의미하는 것으로, 이배수성(염색체 수가 비정상적인 상태)과 다배수성(염색체가 두 세트 이상으로 존재하는 상태)을 포함하는 수적 이상과, 단절(break), 결실(deletion), 파편화(fragment), 교환(exchange) 등을 포함하는 구조적 이상으로 분류된다. 앞에서 수행한 comet 분석과 비교하면, comet 분석은 개별 세포 내의 DNA 파편화를 측정하는 것으로 DNA 단일 가닥 및 이중 가닥 절단을 직접 측정하여 미세한 수준의 손상 정도를 확인하는 것이다. 반면, 염색체 이상 시험은 전체 염색체 또는 염색분체의 대규모 수적 및 구조적 변화를 측정하는 것으로, 결실, 재배열 등 거시적 변화를 감지하여 DNA 손상의 결과로 나타나는 가시적이고 거시적인 결과를 검출하는 것이다. 발열성 및 침전형 SiO_2 에 의한 염색체 이상은 S9 mix 유무와 상관없이 단절, 교환, 파편 및 간격(gap)이 일부 세포에서 관찰되었으나 2~2.5% 수준으로 대조군(2%)과 유사한 수준으로 나타났다(Fig. 4, Table 2). 반면, 양성대조군 MMC 처리에 의해서는 15~16%의 높은 염색체 이상 빈도가 관찰되었는데, 이는 기 보고된 문헌과 일치하는 수준이다(Kim & Park, 2023; Kim et al., 2023). OECD 가이드라인 473에 따라 간격은 염색체 이상 빈도에 포함하지 않고 개수하였다(OECD, 2016). 즉, 발열성 및 침전형 SiO_2 는 염색체의

수적 또는 구조적 이상을 유발하지 않는 것으로 관찰되었으며, 대사 활성계 S9 mix 존재 유무에 따른 유전독성 영향이 없는 것으로 나타났다. 발열성 E551에 대해서는 세포주와 실험조건이 다르긴 하지만 구조적 염색체 이상을 초래하지 않음이 보고된 바 있다(EFSA Panel on FAF et al., 2024). 본 연구결과에서는 두 가지 제조방법이 다른 발열성 및 침전형 SiO_2 가 DNA 손상을 유발하지 않으며, 따라서 염색체 수준에서도 유전독성 영향을 미치지 않음을 제시하였다.

In vitro 소핵 형성

소핵은 세포 분열과정에서 염색체나 그 파편들이 딸핵(daughter nuclei)으로 통합되지 못할 때 생성되는 작은 핵 구조체로, 이는 유전독성에 의한 손상과 염색체 불안정성을 반영한다. Comet 분석에서 관찰되는 DNA tail이 단절된 DNA 가닥들에 의해 형성된 독특한 구조인 것과 대조적으로, 핵 바깥에 존재하는 소핵은 염색체 이상이

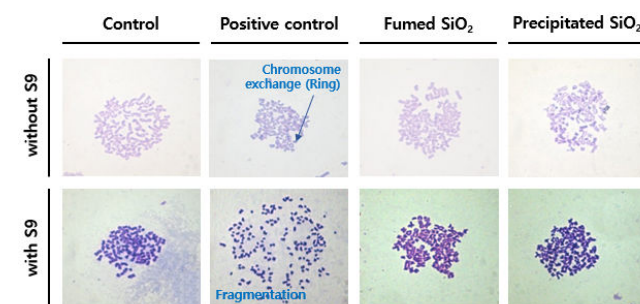


Fig. 4. Representative images of chromosomal aberrations in Caco-2 cells following exposure to fumed or precipitated SiO_2 particles (1,000 $\mu g/mL$). The images were obtained at 100 $\times$ magnification.

Table 2. Chromosomal aberration frequency in Caco-2 cells following exposure to fumed or precipitated SiO_2 particles

Treatment	Conc. (µg/mL)	S9 mix	Number of structural aberrations					Gap	Total aberration cells (Excl Gaps)	Total aberration frequency (%)
			Chromatid type		Chromosome type		Fragmentation			
			Break	Exchange	Break	Exchange				
Control	0	–	0	0	0	1	3	0	4	2.0
Positive control (MMC)	0.2		1	0	0	4	25	2	30	15.0
Fumed SiO ₂	1,000		0	0	0	1	3	1	4	2.0
Precipitated SiO ₂	1,000		0	0	0	1	4	2	5	2.5
Control	0	+	0	0	0	1	3	1	4	2.0
Positive control (CPA)	10		2	0	0	2	28	2	32	16.0
Fumed SiO ₂	1,000		0	0	0	3	2	0	5	2.5
Precipitated SiO ₂	1,000		1	0	0	2	2	0	5	2.5

Conc, concentration; Excl, excluding; MMC, mitomycin C; CPA, cyclophosphamide; –, without; +, with.

나 DNA 손상으로 인해 발생한 염색체 조각 또는 전체 염색체를 포함하고 있는 작은 개체이다. 실제로 comet 분석에서 관찰된 DNA 손상은 염색체 파편 형성에 기여할 수 있고, 본 연구에서 사용된 SiO₂가 염색체 이상을 초래하지 않았음을 재확인하기 위해 소핵 형성 시험을 추가적으로 수행하였다. 그 결과, 발열성 및 침전형 SiO₂에 의해 대사활성제 S9 mix 존재 유무와 상관없이 1.0~2.5% 수준의 소핵 형성이 관찰되었는데, 이는 대조군(1.5~2.0%)과 유사한 수준이며, 양성대조군이 6.5~7.0%의 소핵을 형성하는 것에 비교하면 현저히 낮은 수준이다(Fig. 5, Table 3). 즉, 식품첨가물 발열성 및 침전형 SiO₂는 섭취량 수준에서 염색체 이상을 유발하지 않으며, 따라서 *in vitro* 유전독성을 유발하지 않는 것으로 판단된다. *In vitro* 세포수준 및 *in vivo* 생체수준에서 SiO₂에 의한 소핵 형성 결과는 시험물질 종류, 세포주 및 투여 경로에 따라 상반된 결과(음성 또는 양성)들이 보고되고 있어, 식품첨가물 SiO₂별 다양한 세포주 및 동물수준에서의 지속적 확대 연구가 필요하다(Tarantini et al., 2015; Zhou et al., 2019; Zijno et al., 2020; Villani et al., 2022).

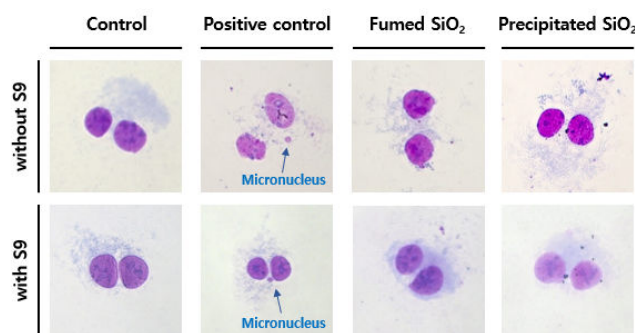


Fig. 5. Representative images of micronucleus formation in Caco-2 cells following exposure to fumed or precipitated SiO₂ particles (1,000 µg/mL). The images were obtained at 40× magnification.

Table 3. Micronucleated binucleated cells (MNBs) frequency in Caco-2 cells following exposure to fumed or precipitated SiO₂ particles

Treatment	Concentration (µg/mL)	S9 mix	MNBN (%)
Control	0		2.0
Positive control (MMS)	25		6.5
Fumed SiO ₂	1,000	-	2.0
Precipitated SiO ₂	1,000		2.5
Control	0		1.5
Positive control (CPA)	10		7.0
Fumed SiO ₂	1,000	+	1.5
Precipitated SiO ₂	1,000		1.0

MMS, methyl methanesulfonate; CPA, cyclophosphamide; -, without; +, with.

요약

본 연구에서는 식품첨가물 고결방지제로 사용되고 있는 SiO₂에 대한 세포독성 및 유전독성을 제조방법(발열성, 침전형)에 따라 장관상피세포주에서 최고 사용량 및 실질적 섭취량 기반으로 연구하였다. 그 결과, 제조방법에 따른 두 가지 SiO₂ 모두 구성 입자크기는 나노 크기(1~100 nm)에 해당하나, 유체역학적 직경은 응집체를 형성하고 있는 것으로 나타났다. 두 가지 SiO₂는 세포성장 저해, 세포막 손상에 의한 세포사멸 및 ROS 발생 측면에서 세포독성을 유발하지 않았다. 또한, DNA 손상, 염색체 이상 및 소핵시험 결과를 종합하면 두 가지 SiO₂는 실질적 섭취수준에서 유전독성을 유발하지 않는 것으로 나타났다. 이와 같은 연구결과는 식품첨가물 고결방지제 SiO₂의 안전성에 대한 정보로 활용될 수 있을 것이다.

ORCID

Han-Na Nam <https://orcid.org/0009-0002-9123-2765>

Chae-Yoon Lee <https://orcid.org/0009-0001-1274-1557>

Soo-Jin Choi <https://orcid.org/0000-0001-5131-8156>

Conflict of interests

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Acknowledgements

This research was supported by a National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korean government (MSIT) (RS-2024-00343763), and partly by a research grant from Seoul Women's University (2026-0079).

Data availability

Upon reasonable request, the datasets of this study can be available from the corresponding author.

Authorship contribution statement

Conceptualization: Choi SJ.

Data curation: Nam HN, Lee CY.

Formal analysis: Nam HN, Lee CY.

Methodology: Nam HN.

Software: Nam HN.

Validation: Nam HN, Lee CY.

Investigation: Nam HN, Lee CY.

Writing - original draft: Choi SJ.

Writing - review & editing: Nam HN, Lee CY, Choi SJ.

Ethics approval

Not applicable.

References

- Barnes CA, Elsaesser A, Arkusz J, Smok A, Palus J, Lesniak A, Salvati A, Hanrahan JP, Jong WH, Dziubałtowska E, Stepnik M, Rydzyski K, McKerr G, Lynch I, Dawson KA, Howard CV. 2008. Reproducible comet assay of amorphous silica nanoparticles detects no genotoxicity. *Nano Lett.* 8: 3069-3074.
- Buzea C, Pacheco II, Robbie K. 2007. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases* 2: MR17-71.
- Code of Federal Regulations (CFR). 21 CFR Part 172 Sec. 172.480 Silicon dioxide. Available from: <https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-I/subchapter-B/part-172/subpart-E/section-172.480>. Accessed on Apr. 26, 2026.
- Cordelli E, Bignami M, Pacchierotti F. 2021. Comet assay: a versatile but complex tool in genotoxicity testing. *Toxicol. Res.* 10: 68-78.
- Dekkers S, Krystek P, Peters RJ, Lankveld DP, Bokkers BG, van Hoeven-Arentzen PH, Bouwmeester H, Oomen AG. 2011. Presence and risks of nanosilica in food products. *Nanotoxicology* 5: 393-405.
- Du Q, Ge D, Mirshafiee V, Chen C, Li M, Xue C, Ma X, Sun B. 2019. Assessment of neurotoxicity induced by different-sized Stober silica nanoparticles: induction of pyroptosis in microglia. *Nanoscale*. 11: 12965-12972.
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). 2004. Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies [NDA] related to the tolerable upper intake level of silicon. *EFSA J.* 60: 1-11.
- EFSA Panel on Food Additives and flavourings (FAF), Younes M, Aquilina G, Castle L, Degen G, Engel KH, Fowler P, Frutos Fernandez MJ, Fürst P, Gürtler R, Husøy T, Manco M, Mennes W, Moldeus P, Passamonti S, Shah R, Waalkens-Berendsen I, Wright M, Andreoli C, Gundert-Remy U. 2024. Re-evaluation of silicon dioxide (E 551) as a food additive in foods for infants below 16 weeks of age and follow-up of its re-evaluation as a food additive for uses in foods for all population groups. *EFSA J.* 22: e8880.
- EFSA Panel on Food Additives and nutrient Sources added to Food (ANS), Younes M, Aggett P, Aguilar F, Crebelli R, Dusemund B, Filipič M, Frutos MJ, Galtier P, Gott D, Gundert-Remy U, Kuhnle GG, Leblanc JC, Lillegaard IT, Moldeus P, Mortensen A, Oskarsson A, Stankovic I, Waalkens-Berendsen I, Woutersen RA, Wright M, Boon P, Chrysafidis D, Gürtler R, Mosesso P, Parent-Massin D, Tobback P, Kovalkovicova N, Rincon AM, Tard A, Lambré C. 2018. Scientific opinion on the re-evaluation of silicon dioxide (E 551) as a food additive. *EFSA J.* 16: e5088.
- EUR-Lex. 1995. European Parliament and Council Directive No 95/2/EC of 20 February 1995. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/1995/2/oj/eng>. Accessed on Jun. 05, 2026.
- EUR-Lex. 2012. Commission Regulation (EU) No 231/2012 of 9 March 2012. Available from: <http://data.europa.eu/eli/reg/2012/231/oj>. Accessed on Apr. 26, 2026.
- Flörke OW, Graetsch HA, Brunk F, Benda L, Paschen S, Bergna HE, Roberts WO, Welsh WA, Libanati C, Ettlinger M, Kerner D, Maier M, Meon W, Schmoll R, Gies H, Schiffmann D. 2008. Silica. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 7th ed., Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 32: 421-507.
- Fruijtier-Polloth C. 2016. The safety of nanostructured synthetic amorphous silica (SAS) as a food additive (E 551). *Arch. Toxicol.* 90: 2885-2916.
- Guo Z, Martucci NJ, Liu Y, Yoo E, Tako E, Mahler GJ. 2018. Silicon dioxide nanoparticle exposure affects small intestine function in an *in vitro* model. *Nanotoxicology*. 12: 485-508.
- Hochstein P, Utley H. 1968. Hydrogen peroxide detoxication by glutathione peroxidase and catalase in rat liver homogenates. *Mol. Pharmacol.* 4: 574-579.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). 2012. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans 100C. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans. Available from: <https://monographs.iarc.who.int/list-of-classifications>. Accessed on Apr. 26, 2026.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Residue monograph prepared by the meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 84th meeting 2017. Silicon Dioxide, Amorphous. Available from: <https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/bu296en>. Accessed on Apr. 26, 2026.
- Khan I, Saeed K, Khan I. 2017. Nanoparticles: properties, applications and toxicities. *Arab. J. Chem.* 12: 908-931.
- Kim YE, Park HJ. 2023. Mutagenicity and genotoxicity of calcium from Jeju lava seawater. *Food Eng. Prog.* 27: 303-311.

- Kim HY, Lee KY, Kim TH, Kim EJ, Park JY. 2021. Genotoxicity evaluation of extracts from the husks and cobs of purple corn using an *in vitro* chromosome aberration test in Chinese hamster lung cells. *J. Agric. Life Environ. Sci.* 33: 339-346.
- Kim JS, Jeong MH, Seo HS, Park MK, Park HJ, Nah SS. 2023. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the genotoxicity of titanium dioxide, GST. *Environ. Anal. Health Toxicol.* 38: e2023008.
- Korea Health Industry Development Institute (KHIDI). 2017. National food & nutrition statistics. Available from: <https://www.khidi.or.kr/kps/dhraStat/result2?menuId=MENU01653&gubun=&year=2017>. Accessed Apr. 26. 2026.
- Lee JW, Lee SJ, Gye MC, Moon EY. 2019. Genotoxicity and glucose tolerance induction by acetyltriethylcitrate, substitute plasticizer compared to di(2-ethylhexyl) phthalate. *Sci. Rep.* 9: 12237.
- Maharana SM, Pandit MK, Pradhan AK. 2020. Effect of chemical treatment and fumed silica coating on tensile and thermogravimetric properties of jute yarn. *Mater. Today Proc.* 27: 2693-2698.
- Ministry of Food and Drug Safety (MFDS). 2025. Food Additives Code. No. 2025-76. Ministry of Food Drug Safety. Osong, Korea.
- Mudie DM, Murray K, Hoad CL, Pritchard SE, Garnett MC, Amidon GL, Gowland PA, Spiller RC, Amidon GE, Marciani L. 2014. Quantification of gastrointestinal liquid volumes and distribution following a 240 mL dose of water in the fasted state. *Mol. Pharm.* 11: 3039-3047.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2016. Test No. 473: *in vitro* mammalian chromosomal aberration test. In OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris, France.
- Sadowska A, Świdorski F. 2020. Sources, bioavailability, and safety of silicon derived from foods and other sources added for nutritional purposes in food supplements and functional foods. *Appl. Sci.* 10: 6255.
- Schulze Isfort C, Rochnia M. 2009. Production and physico-chemical characterisation of nanoparticles. *Toxicol. Lett.* 186: 148-151.
- Soares VCG, Varanda EA, Raddi MSG. 2006. *In vitro* basal and metabolism-mediated cytotoxicity of flavonoids. *Food Chem. Toxicol.* 44: 835-838.
- Tada-Oikawa S, Eguchi M, Yasuda M, Izuoka K, Ikegami A, Vranic S, Boland S, Tran L, Ichihara G, Ichihara S. 2020. Functionalized surface-charged SiO₂ nanoparticles induce pro-inflammatory responses, but are not lethal to Caco-2 cells. *Chem. Res. Toxicol.* 33: 1226-1236.
- Tarantini A, Huet S, Jarry G, Lancelleur R, Poul M, Tavares A, Vital N, Louro H, João Silva M, Fessard V. 2015. Genotoxicity of synthetic amorphous silica nanoparticles in rats following short-term exposure. Part 1: Oral route. *Environ. Mol. Mutagen.* 56: 218-227.
- Villani P, Eleuteri P, Pacchierotti F, Maranghi F, Tassinari R, Narciso L, Tait S, Lori G, Andreoli C, Huet S, Jarry G. 2022. Pyrogenic synthetic amorphous silica (NM-203): genotoxicity in rats following sub-chronic oral exposure. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 876-877: 503458.
- Yoo NK, Jeon YR, Choi SJ. 2021. Determination of two differently manufactured silicon dioxide nanoparticles by cloud point extraction approach in intestinal cells, intestinal barriers and tissues. *Int. J. Mol. Sci.* 22: 7035.
- Yoo NK, Youn SM, Choi SJ. 2022. Oral toxicokinetics, tissue distribution, and 28-day oral toxicity of two differently manufactured food additive silicon dioxides. *Int. J. Mol. Sci.* 23: 4023.
- Yu J, Kim YH, Choi SJ. 2020. Usage-and daily intake-based cytotoxicity study of frequently used natural food additives in South Korea. *Korean J. Food Sci. Technol.* 52: 546-554.
- Zhou F, Liao F, Chen L, Liu Y, Wang W, Feng S. 2019. The size-dependent genotoxicity and oxidative stress of silica nanoparticles on endothelial cells. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26: 1911-1920.
- Zijno A, Cavallo D, Di Felice G, Ponti J, Barletta B, Butteroni C, Corinti S, De Berardis B, Palamides J, Ursini CL, Fresegna AM. 2020. Use of a common European approach for nanomaterials' testing to support regulation: a case study on titanium and silicon dioxide representative nanomaterials. *J. Appl. Toxicol.* 40: 1511-1525.