

## 국내 식품산업 다빈도 사용 효소제 7종의 사용량 기반 세포독성 연구

김예현 · 윤수민 · 유나경 · 최수진\*

서울여자대학교 식품응용시스템학부 식품공학전공

### Cytotoxicity Evaluation of Frequently Used 7 Food Enzymes in South Korea at Their Maximum Usage Levels

Ye-Hyun Kim, Su-Min Youn, Na-Kyung Yoo, and Soo-Jin Choi\*

Major of Food Science & Technology, Division of Applied Food System, Seoul Women's University

#### Abstract

Food enzymes have been widely applied to diverse foods as processing aids to catalyze specific biochemical reactions and they are generally inactivated during the manufacturing process. However, metabolic and fermentation products in the process of enzyme production by microorganisms can cause toxicological responses. In this study, the cytotoxicity of seven food enzymes most frequently applied to processed foods in South Korea was evaluated in terms of cell viability inhibition, lactate dehydrogenase (LDH) release, reactive oxygen species (ROS) generation, and  $\beta$ -hexosaminidase release at their maximum usage levels. The results demonstrate that all food enzymes tested did not inhibit cell proliferation and viability nor affect membrane integrity. Some native food enzymes induced reactive oxygen species and  $\beta$ -hexosaminidase release, which was not found by inactivated food enzymes, suggesting that inactivated food enzymes that remained in processed foods do not exhibit cytotoxicity. These findings will provide basic information about the potential toxicity of food enzymes and be useful for further in vivo toxicity studies.

**Key words:** natural food enzymes, cytotoxicity, maximum usage levels

## 서 론

식품첨가물(food additive)은 현행 식품위생법상 식품을 제조·가공·조리 또는 보존하는 과정에서 감미, 착색, 표백 또는 산화방지 등을 목적으로 식품에 사용되는 물질을 말하며, 이 경우 기구·용기·포장을 살균·소독하는 데에 사용되어 간접적으로 식품으로 옮겨갈 수 있는 물질을 포함한다(MFDS, 2021a). 국내에서 식품첨가물은 2018년 이전까지는 합성 및 천연 등 제조방법에 따라 분류하였으나, 2018년 ‘식품첨가물의 기준 및 규격’에 관한 개정고시에 따라 31개 용도 중심으로 분류체계를 개편하였다(MFDS, 2021b). 즉, 감미료, 고결방지제, 발색제, 보존료, 산화방지제, 영양강화제, 착색료, 효소제 등 31개 용도로 분류하고, 국내 지정된 613 품목에 대해서 주용도를 명시하여 식품첨가물 사용 목적을 쉽게 확인할 수 있도록 하였다(MFDS, 2021b). 식품첨가물로 지정이 되려면 안전성, 효과, 제조방법, 시험법

및 독성자료가 구비되어 있어야 하므로 가공식품에 첨가되는 수준에서 식품첨가물은 안전하다고 할 수 있다.

가공보조제는 식품의 제조 과정에서 기술적 목적을 달성하기 위하여 의도적으로 사용되고 최종 제품 완성 전 분해, 제거되어 잔류하지 않거나 비의도적으로 미량 잔류할 수 있는 식품첨가물로 정의되고, 살균제, 여과보조제, 이형제, 제조용제, 청관제, 추출용제, 효소제가 이에 해당된다(MFDS, 2021b). 효소제는 특정한 생화학 반응을 촉매하기 위한 용도로 첨가되며, 식품첨가물로 허가 받기 위해서는 반복투여독성시험, 유전독성시험 및 면역독성시험(알레르기 원성) 자료를 제출해야 한다(MFDS, 2021c). 특히 효소제와 같이 미생물을 이용하여 제조된 식품첨가물은 식품첨가물 생산규주에 대한 자료를 제출해야 하는데, 생산규주의 진위를 확인할 수 있는 자료, 최종산물에 규주의 사멸 또는 잔류를 확인할 수 있는 자료, 식품으로서의 섭취 경험에 관한 자료, 식품 등의 제조에 이용된 사례에 관한 자료, 그리고 인체 또는 동식물에 병원성 발현 여부를 확인할 수 있는 자료를 제출해야 한다(MFDS, 2021c).

효소는 위장 조건에서 작은 펩타이드와 아미노산으로 분해되어 대사되기 때문에 가공식품에 사용된 효소제의 경우 경구 섭취를 통해 독성학적으로 유의미한 양만큼 체내 흡

\*Corresponding author: Soo-Jin Choi, Division of Applied Food System, Major of Food Science & Technology, Seoul Women's University, Seoul 01797, Republic of Korea  
Tel: +82-2-970-5634; Fax: +82-2-970-5977  
E-mail: sjchoi@swu.ac.kr  
Received 30 June 2021; accepted 4 August 2021

수되지 않을 것으로 간주된다(Sewalt et al., 2016; Ladics & Sewalt, 2018). 대부분의 효소제들은 미생물로부터 생산되는데, 자연종 미생물 뿐만 아니라 돌연변이 유발에 의한 선택 균주 또는 유전공학적인 기법을 이용한 재조합 균주 등에서 생산될 수 있다(Sewalt et al., 2016; Deckers et al., 2020). 효소제는 빵, 장류, 소스, 곡류 가공품, 과자, 맥주, 탁주 및 약주 등 다양한 가공식품의 제조에 중요한 역할을 하며, 동물용 사료에 있어서는 영양성분 공급원으로 활용될 수 있다(Ojha et al., 2019). 가공식품에 첨가되는 효소제의 경우 열처리나 가공공정에서 불활성화되는 경우가 대부분이라서 안전성에 대한 우려는 낮은 편이라 할 수 있다. 그러나 유럽식품안전청(European Food Safety Authority; EFSA)에 따르면 효소제로 사용되고 있는 글루코아밀라아제와  $\alpha$ -아밀라아제의 아미노산 서열이 알레르겐 한 종류와 유사성이 있음을 보고한 바 있다(EFSA, 2018; EFSA, 2020). 또한 효소제 자체에 의한 독성뿐만 아니라 효소제 생산과정 중 생성 및 잔류할 수 있는 대사 또는 발효산물에 의한 독성 영향은 배제할 수 없으며, 이와 같은 부산물의 고려한 독성 평가의 필요성이 제기되고 있다(Pariza & Johnson, 2001; Sivamaruthi et al., 2018).

따라서 본 연구에서는 국내에서 다빈도로 사용되는 천연 기원 첨가물 효소제 7종을 선정하여 세포수준에서 독성을 연구하였는데, 실제 가공식품에서 사용량 및 일일섭취량을 기반으로 세포실험 최고 농도를 설정 후 단기간 세포성장/사멸, 세포막 손상 및 활성산소종 유발을 평가하였다. 또한 식품첨가물 효소제의 경우 ‘식품첨가물의 기준 및 규격’에 관한 개정고시(MFDS, 2021c)에 따라 면역독성시험으로 알레르기원성 자료가 요구되므로 면역세포에서의 탈과립화 정도를 분석하여 효소제 안전성에 대한 기반자료를 마련하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 효소제

본 연구에서는 일일섭취허용량(acceptable daily intake)이 설정되어 있지 않고 품목제조보고서(1960년-2019년)와 수입신고서(2017년-2019년) 기반 국내에서 다빈도로 사용되는 효소제를 선정하였다. 이를 바탕으로 중국(백국, 황국, 흑국), 프로테아제(곰팡이성, 세균성, 식물성), 국(국내산 분말 1종/난알 1종, 미국산 난알 1종),  $\alpha$ -아밀라아제, 트랜스글루타미나아제, 셀룰라아제, 글루코아밀라아제 등 7종의 효소제를 세포독성시험 대상으로 선정하였다. 각 효소제의 생산 균주 및 기원은 Table 1과 같다.

### 가공식품에서 사용량 및 일일섭취량 기반 세포독성시험 농도 설정

세포독성시험을 위한 최고 농도는 품목제조보고서(2017

년-2019년), 국민영양통(KHIDI, 2017) 및 소장액 부피를 고려하여 설정하였다. 즉, 품목제조보고서 신고대상에서 천연 기원 효소제 7종이 다빈도로 사용되는 가공식품 품목을 검토하고 최대사용량을 확인하였다. 일일섭취량은 품목제조보고서 기반 효소제 7종이 다빈도로 사용되는 품목에 해당하는 식품군(대분류) 또는 식품(소분류)을 국민영양통계 분류체계에 근거하여 조사하였다. 또한 체내 환경을 반영하기 위해 실제 소장액 부피(100 mL)를 고려하여(Mudie et al., 2014) 다음과 같이 세포독성시험 최고 농도를 설정하였다.

$$\begin{aligned} & \text{The highest concentration for cytotoxicity evaluation } (\mu\text{g/mL}) \\ & = \text{maximum usage level } (\%) \times \text{daily intake } (\text{g}) / \\ & \quad \text{volume of the intestinal fluid } (100 \text{ mL}) \end{aligned}$$

각 효소제별로 설정된 세포시험 최고 농도에서부터 2배씩 희석하여 세포성장 저해 및 사멸 시험은 6개 농도에서, 젓산탈수소효소 분석 시험은 5개 농도에서, 세포 내 활성산소종 생성 분석 시험은 6개 농도에서 수행하였다. 각 효소제의 경우 열처리하지 않은 활성화(native) 형태와 121°C, 15분 열처리에 의한 불활성화(inactivated) 두 형태를 모두 세포실험에 사용하였다. 세포 처리 시간은 소장내 체류시간(Römmele et al., 2016)을 고려하여 6시간으로 설정하였다. 각 효소제는 세포배양액에서 pH 및 세포독성 분석 과정에서 자체 흡광도를 확인 후 세포실험을 진행하였다.

### 세포배양

본 연구에서 사용한 장관상피세포인 Caco-2 세포와 흰쥐 호흡기성 백혈병 RBL-2H3 세포는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, South Korea)에서 분양 받아 사용하였고, 10% heat inactivated fetal bovine serum, 페니실린(100 units/mL) 및 스트렙토마이신(100  $\mu\text{g/mL}$ )이 첨가된 minimum essential medium (Welgene Inc., Gyeongsan, South Korea)과 Dulbecco's modified eagle medium (Welgene Inc.)에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 세포배양기(MCO-230AIC, PHCbi, Tokyo, Japan)를 이용하여 각각 배양하였다.

### 세포성장 저해 및 사멸 시험

세포성장 및 사멸 시험은 water-soluble tetrazolium salt-1 (WST-1; Roche, Basel, Switzerland)을 이용하여 평가하였는데, 각 효소제 자체의 흡광도가 440 nm에서 세포배양액과 동일한 배경 수준으로 측정되었기 때문이다. Caco-2 세포를  $1 \times 10^4$  cells/100  $\mu\text{L}$ 로 배양한 후 효소제를 농도별로 첨가하여 6시간 동안 배양하였다. WST-1 시약 10  $\mu\text{L}$ 를 각각 첨가하고 4시간 동안 배양한 후 440 nm에서 흡광도를 microplate reader (SpectraMax<sup>®</sup> M3, Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

**Table 1. Establishment of the highest concentration of seven kinds of food enzyme for cytotoxicity study**

| Natural food additives | Origin (form and country)                                       | Numbers of food products <sup>1)</sup> | Frequently added food products <sup>1)</sup> | Maximum usage levels (%) <sup>1)</sup> | Frequently added food groups <sup>2)</sup> | Daily intakes (g/day) <sup>3)</sup> | The highest concentrations (µg/mL) |
|------------------------|---|--|--|--|--|-------------------------------------|------------------------------------|
| Seed malt (SM-1–SM-3)  | SM-1: <i>Aspergillus kawachii</i> (white koji, flour, domestic) | 2,745                                  | Pastes                                       | 5.0                                    | Seasonings                                 | 27.0                                | 1,000.0                            |
|                        | SM-2: <i>Aspergillus oryzae</i> (yellow koji, flour, domestic)  |  |  |  |  |                                     |                                    |
|                        | SM-3: <i>Aspergillus awamori</i> (black koji, flour, domestic)  |  |  |  |  |                                     |                                    |
| Protease (P-1–P-3)     | P-1: <i>Aspergillus oryzae</i> (flour, foreign)                 | 925                                    | Sources                                      | 0.5                                    | Seasonings                                 | 2.4                                 | 121.0                              |
|                        | P-2: <i>Bacillus licheniformis</i> (liquid, foreign)            |  |  |  |  |                                     |                                    |
|                        | P-3: Papain (flour, domestic)                                   |  |  |  |  |                                     |                                    |
| Koji (K-1–K-3)         | K-1: <i>Aspergillus oryzae</i> (flour, domestic)                | 783                                    | Traditional liquors                          | 9.0                                    | Liquor products                            | 116.6                               | 1,000.0                            |
|                        | K-2: <i>Aspergillus oryzae</i> (grain, domestic)                |  |  |  |  |                                     |                                    |
|                        | K-3: <i>Aspergillus</i> spp. (grain, foreign)                   |  |  |  |  |                                     |                                    |
| $\alpha$ -amylase      | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (liquid, foreign)             | 775                                    | Breads, Grains-processed                     | 1.0                                    | Grains and products thereof                | 66.4                                | 1,000.0                            |
| Trans-glutaminase      | <i>Streptoverticillium mobaraense</i> (flour, foreign)          | 309                                    | Fish cakes                                   | 0.4                                    | Marine products                            | 5.3                                 | 229.6                              |
| Cellulase              | <i>Trichoderma reesei</i> (liquid, foreign)                     | 160                                    | Beer, Grains-processed                       | 0.2                                    | Grains and products thereof                | 18.6                                | 371.4                              |
| Glucoamylase           | <i>Aspergillus niger</i> (liquid, foreign)                      | 81                                     | Grains-processed, Liquors                    | 18                                     | Grains and products thereof                | 18.6                                | 1,000.0                            |

<sup>1)</sup>Investigation based on Items Manufacturing Report (1960-2019) and Import Declaration (2017-2019)

<sup>2)</sup>Classification according to the Korea National Health and Nutrition Examination Survey (2017)

<sup>3)</sup>Daily intakes were based on an average body weight of 60.73 kg according to the Korea National Health and Nutrition Examination Survey (2017)

**젖산탈수소효소 분석**

효소제에 의한 세포막 손상은 CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity assay (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 세포막 손상에 따라 배양액으로 유출된 젖산탈수소효소(lactate dehydrogenase; LDH) 양을 측정하여 확인하였다. Caco-2 세포를  $2 \times 10^4$  cells/mL로 배양한 후 각 효소제를 농도별로 6시간 동안 처리한 뒤 원심분리하여 세포 배양액 상층액을 분석에 이용하였다. 즉, 상층액 50 µL에 substrate mixture 50 µL을 첨가하고 30분간 반응시킨 뒤 stop solution 50 µL로 반응을 종료시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다(SpectraMax® M3, Molecular Devices).

**세포 내 활성산소종 생성 측정**

효소제에 의한 세포 내 활성산소종(reactive oxygen species; ROS) 생성 정도는 세포막 투과성 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA; Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA)를 이용하여 분석하였다. Caco-2 세포를  $1 \times 10^4$  cells/100 µL로 배양한 뒤, 각 효소제를 농도별로 6시간 동안 처리하였다. 이 후, 20 µM H<sub>2</sub>DCFDA 용액 100 µL을 첨가하여 30분간 암소에서 반응시킨 뒤

phosphate buffered saline로 2회 세척한 후 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) 형광을 excitation 485 nm와 emission 535 nm에서 측정하였다(SpectraMax® M3, Molecular Devices).

**면역세포 탈과립화 분석**

면역세포 탈과립화는 RBL-2H3 세포에서 히스타민 탈과립 시 함께 용출되는 β-hexosaminidase의 양을 배양액에서 분석하여 확인하였다. RBL-2H3 세포를  $3 \times 10^4$  cells/100 µL로 24시간 배양한 뒤, 배양액을 modified-Tyrodé's buffer (pH 7.3)로 교체하여 1시간 동안 배양하였다. Modified-Tyrodé's buffer 조성은 119 mM NaCl (Sigma-Aldrich Co. Ltd., St. Louis, MO, USA), 4.74 mM KCl (Ducksan Pure Chemical Co., Ltd, Ansan, Korea), 2.54 mM CaCl<sub>2</sub> (Ducksan Pure Chemical Co. Ltd.), 1.19 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich Co. Ltd.), 10 mM HEPES (N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid), 4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid, Sigma-Aldrich, Co. Ltd.), 5 mM glucose (Sigma-Aldrich, Co. Ltd.), 0.1% (w/v) bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, Co. Ltd.)이다. 다양한 농도의 효소제 또는 양성 대조군으로서 compound 48/80 (C48/80, 1 mg/mL, Sigma-Aldrich, Co. Ltd.)을 처리한 후 30분간 배양하였다.

반응을 멈추기 위해 10분간 얼음위에 방치한 후, 50  $\mu$ L의 상층액과 동량의 modified-Tyrode's buffer에 제조된 기질 용액(1 mM  $p$ -nitrophenyl- $\beta$ -acetyl-glucosaminide, pH 4.5, Sigma-Aldrich Co. Ltd.)을 혼합하여 1시간 동안 37°C에서 반응시켰다. 효소-기질 반응을 멈추기 위해 100  $\mu$ L의 sodium bicarbonate (pH 10)을 첨가하고 415 nm에서 microplate reader (SpectraMax<sup>®</sup> M3, Molecular Devices)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 한편, 총 효소양을 측정하기 위해 100  $\mu$ L의 1% (v/v) Triton X-100 (Sigma-Aldrich Co. Ltd.)을 첨가하여 얼음위에서 30분간 반응시켜 남아있는 세포를 lysis시킨 후, 동일한 방법으로 효소-기질 반응시켜 다음과 같은 식에 의해 용출된  $\beta$ -hexosaminidase의 양을 계산하였다.

$$\begin{aligned} & \text{용출된 } \beta\text{-hexosaminidase (\%)} \\ & = \text{상층액의 흡광도} / (\text{상층액} + \text{세포 용해물}) \text{ 흡광도} \end{aligned}$$

### 통계분석

모든 실험결과는 3회 이상 반복 수행하여 평균과 표준편차를 구하였으며, SAS 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

### 효소제 선정과 사용량 및 일일섭취량 기반 세포독성시험 농도 설정

품목제조보고서를 기반으로 효소제들이 첨가되는 품목을 확인한 결과, 중국, 프로테아제, 국,  $\alpha$ -아밀라아제, 트랜스글루타미나제, 셀룰라아제, 글루코아밀라아제 순으로 가공식품에 다수 첨가되는 것으로 조사되어 이들 7종류 효소제를 시험물질로 선정했다. 이들 효소는 각각 장류, 소스, 탁주/약주, 빵/곡류가공품, 어묵/어묵소시지, 맥주/곡류가공, 곡류가공/주류에 다빈도로 사용되고 있는 것으로 확인되었고 최대 사용량은 Table 1과 같다. 이는 국민영양통계분류상 조미료, 주류, 곡류 및 그 제품, 어패류 등의 식품군(대분류)에 해당되어 이를 기반으로 일일섭취량을 조사하였다. 국민영양통계분류 대분류 식품군 중 본 시험대상 효소제가 첨가되지 않는 식품 항목도 다수 포함되어, 효소제가 실질적으로 첨가되는 대분류 내 세부 식품항목의 총합으로써 일일섭취량을 도출하였다(Table 1). 이와 같이 최대 사용량과 일일섭취량 기반 도출된 양을 장내 부피 100 mL을 고려하여 설정한 세포시험 최고 농도는 Table 1과 같다. 단, 설정된 세포시험 최고 농도가 1,000  $\mu$ g/mL을 초과할 경우, 고농도 자체에 의한 false positive 효과를 초래할 수 있고 일반적으로 세포시험에

사용되는 농도를 고려하여 1,000  $\mu$ g/mL를 최고 농도로 설정하였다(Böhmert et al., 2018).

효소제의 생산 균주나 원산지 등 기원이 다르거나 분말 및 난알 등 형태가 다른 경우 모두 시험대상으로 선정하였고, 효소제가 일반적으로 가공과정에서 열처리나 가공공정에 의해 불활성화되는 점을 감안하여 native와 inactivated 두 가지 형태의 효소제를 모두 시험대상에 포함하였다.

### 세포성장 저해 및 사멸 영향

다빈도로 사용되는 효소제 7종이 세포 성장 및 사멸에 미치는 효과를 확인하기 전에 WST-1 시약이 최고 흡광도를 나타내는 440 nm에서 모든 효소제가 세포배양액 수준의 낮은 흡광도(0.04-0.06)를 나타내고 있음을 확인하였고, 세포배양액에 Table 1과 같이 설정된 최고 농도로 준비 시 급격한 pH 변화(7.6-8.4)를 유발하지 않는 것을 확인하였다. 효소제에 의한 세포성장 저해 및 사멸에 미치는 영향을 WST-1 분석법을 이용하여 평가한 결과, 모든 효소제가 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다( $p < 0.05$ , Fig. 1). 이는 native나 inactivated 효소제, 다른 제조기원 및 형태의 효소제 모두 세포성장 저해 및 사멸을 유발하는 않음을 제시한다. 또한 세포시험에 사용된 최고 농도는 효소제의 가공식품에서의 최고사용량, 일일섭취량, 소장액 부피 및 소장 체류시간 등을 모두 고려하여 설정한 것임으로 실질적 노출 조건에서 세포독성이 낮음을 의미한다 할 수 있다.

### 세포막 손상 영향

다빈도로 사용되는 효소제 7종에 의한 세포막 손상 유발 여부는 세포 내 존재하는 젖산탈수소효소(LDH)가 세포막 손상에 따라 배양액으로 유출되는 정도를 측정하여 확인하였다(Bae et al., 2018). 또한 젖산탈수소효소 용출은 세포막 손상에 의해 세포가 사멸되었음을 의미하는 분석 지표로 이용되기도 한다(Chan et al., 2013). 그 결과, native나 inactivated 효소제 모두 젖산탈수소효소를 세포 배양액으로 유의미하게 용출시키지 않는 것으로 나타났다( $p < 0.05$ , Fig. 2). 즉, WST-1 결과(Fig. 1)와 젖산탈수소효소 분석 결과(Fig. 2)를 종합하면, native와 inactivated 효소제 모두 세포 성장 저해 및 세포막 손상에 의한 세포사멸을 유발하지 않는 것으로 보여지며 이러한 결과는 세포독성이 낮음을 제시한다.

### 세포 내 활성산소종 유발 영향

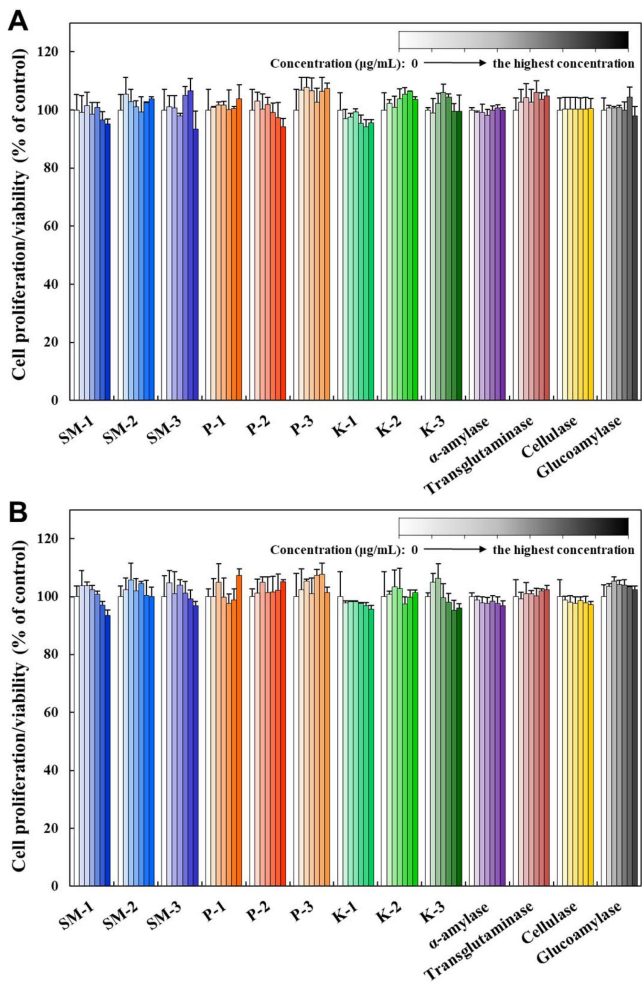
세포 내 활성산소종(ROS) 생성은 산화스트레스 유발의 지표로 이용되며, 이는 세포막 투과성 비형광 물질인 H<sub>2</sub>DCFDA가 세포 내 esterase에 의해 탈아세틸화된 후 ROS와 반응하여 생성되는 DCF의 형광을 측정하여 분석할 수 있다(Zhao et al., 2010). Fig. 3A에서 보듯이 native 효소제 중 중국 3종(SM-1, SM-2, SM-3)에 의한 ROS 생

성이 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타났고( $p < 0.05$ ), 그 외 6종 효소제에 의한 ROS 증가는 유의적으로 나타나지 않았다( $p > 0.05$ ). 이러한 결과는 일부 native 효소제가 식품에 그대로 잔존 시 ROS 유발 가능성을 제시한다 할 수 있으며, 연구에 사용한 중국 3종에서 모두 ROS가 유발된 점을 감안하면 효소 자체에 의한 영향이거나 중국 생산 과정에서의 대사 및 발효산물 등 부산물과 관련이 있을 것으로 보인다(Lee et al., 2014). 중국으로 사용되는 균주인 *Aspergillus* 속은 다양한 대사산물을 생성하는 것으로 알려졌다(Frisvad et al., 2018), 2차 대사산물 중 kojic acid는 ROS를 유발하는 것으로 보고된 바 있다(Rodrigues et al., 2011). 그러나, *Aspergillus* 속 생산 효소제인 P-1, K-1과 K-2에 의한 ROS는 유의적으로 증가하지 않아 효소 자체에 의한 영향도 있는 것으로 보이며, inactivated 효소제는 모두 ROS를 유발하지 않는 것으로 나타나(Fig. 3B) 실질

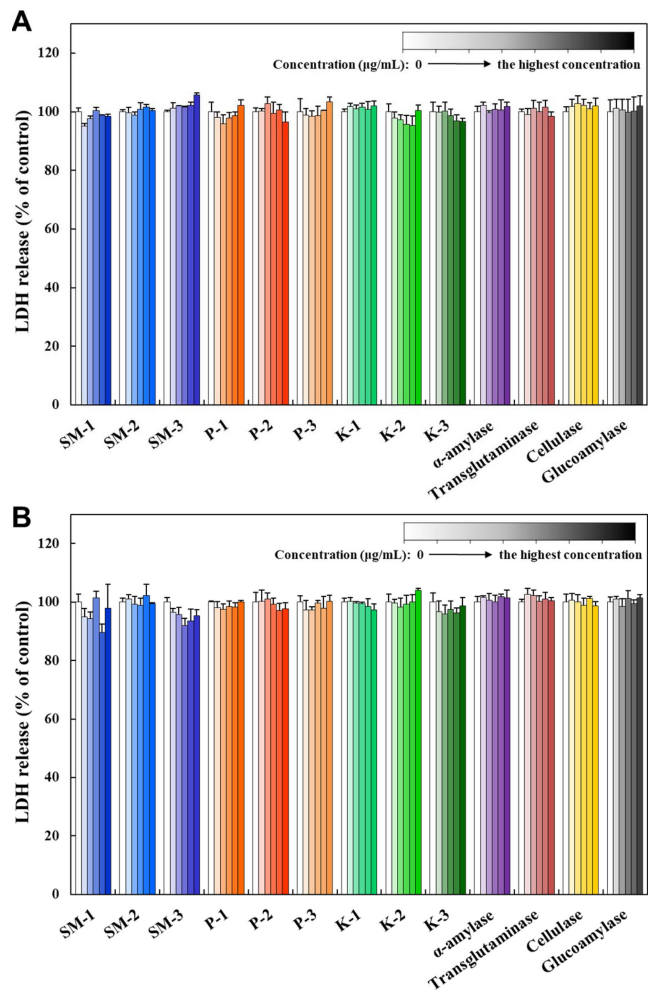
적으로 가공제품에 잔존하는 불활성화된 효소제에 의한 ROS 생성 가능성은 낮을 것으로 보여진다.

탈 과립화 영향

2018년 식품첨가물의 기준 및 규격 일부개정고시에 따라 식품첨가물 가공보조제로 효소제의 사용허가를 위해서는 독성자료로서 면역독성시험(알레르기원성) 자료가 요구된다(MFDS, 2021c). 본 연구에서는 세포수준에서 알레르기원성 평가방법으로 RBL-2H3 세포에서  $\beta$ -hexosaminidase의 용출 정도를 확인하였다. RBL-2H3 세포는 흰쥐의 호염기성 백혈병 세포로서 알레르기 반응을 측정하기 위해 가장 일반적으로 사용되는 세포이다(Chung et al., 2011). 면역 반응에 의해 분비되는 히스타민은 세포에서 농도가 매우 낮기 때문에 분석 결과에서의 편차가 큰 단점이 있는 반면,  $\beta$ -hexosaminidase는 세포 내 높은 농도로 존재할 뿐



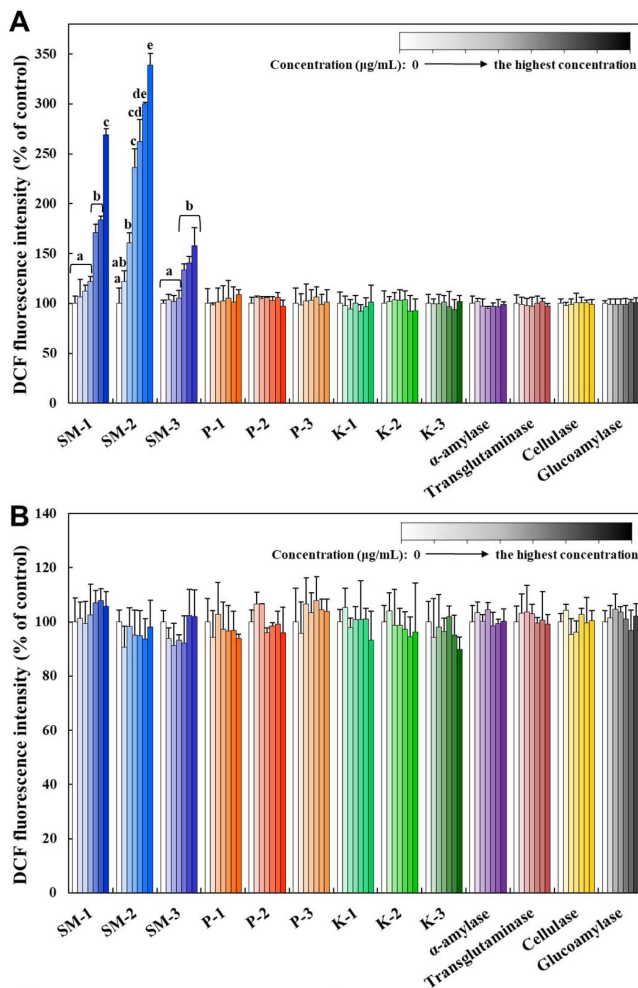
**Fig. 1.** Effect of 7 kinds of food additive enzymes in (A) native and (B) inactivated forms on cell proliferation of Caco-2 cells. Two-fold serial dilutions from the highest concentrations were carried out for each enzyme. The highest concentrations of natural food additive enzymes were presented in Table 1. No significant differences were found among enzymes-treated samples and untreated control cells ( $p > 0.05$ ).



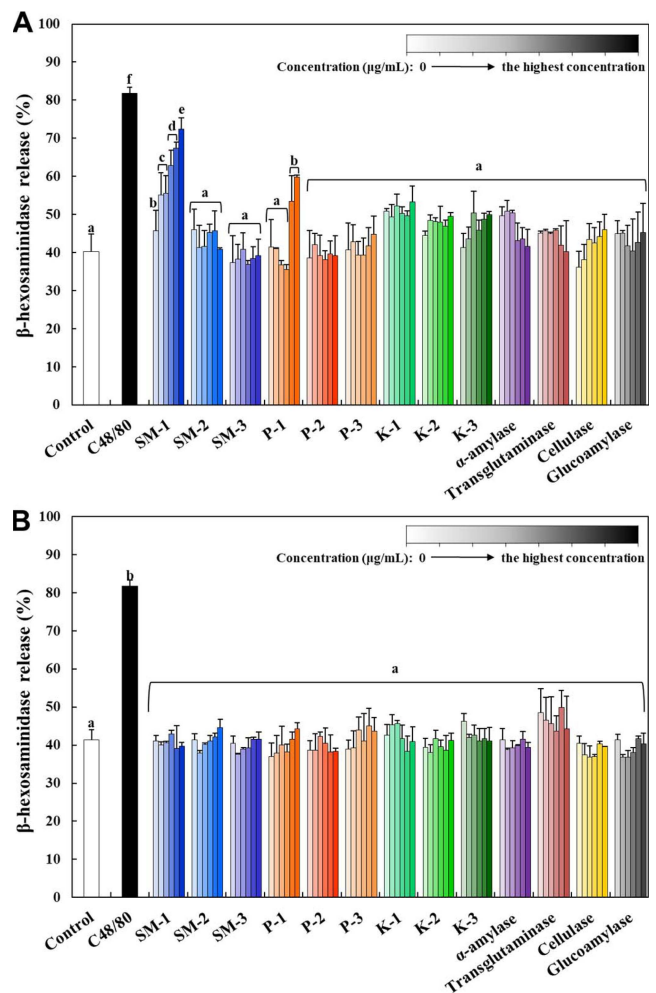
**Fig. 2.** Effect of 7 kinds of food additive enzymes in (A) native and (B) inactivated forms on LDH release from Caco-2 cells. LDH release was performed at 5 concentrations by two-fold serial dilutions from the highest concentration as shown in Table 1. No significant differences were found among enzymes-treated samples and untreated control cells ( $p > 0.05$ ).

만 아니라 히스타민 탈 과립 시 함께 세포 밖으로 용출되는 물질로서 배양액에서  $\beta$ -hexosaminidase 활성 측정은 탈 과립의 지표로 이용될 수 있다(Choi., 2002). 양성대조군으로서 C48/80을 사용하였는데, 이는 N-methyl-p-methoxyphenethylamine과 formaldehyde의 축합에 의해 생성된 중합체로서, 히스타민 방출을 촉진하고 비만세포 및 호염기성 세포에서의 탈 과립을 촉진하는 물질로 사용된다(Shipstone et al., 1999). 그 결과, 중국 1종(백국)과 프로테아제 1종(곰팡이성)의 native 효소제가  $\beta$ -hexosaminidase 농도 의존적으로 세포 밖으로 용출시키는 것으로 분석되었다(Fig. 4A). *Aspergillus* 속 기원의 곰팡이성 효소제가 알레르기원으로 작용하며, 면역 반응을 유발할 수 있는 것으로 보고된 바 있다(Shen et al., 2007; Balenga et al., 2015; Onami et al., 2019). 그러나 *Aspergillus* 속 기원의

다른 효소제나 다른 미생물에서 유래된 효소제에 의한  $\beta$ -hexosaminidase 용출이 나타나지 않은 결과는 같은 효소제의 경우에도 기원에 따라서 탈과립화에 의한 알레르기원성 영향이 달라질 수 있음을 제시한다. 이는 효소제 자체에 의한 영향보다는 미생물 기원에 따른 효소제 생성과정에서 미량 잔류하는 대사 및 발효산물에 의한 영향으로 보여지며, 이를 뒷받침하기 위한 연구가 추후 요구된다. 그러나, 열처리에 의한 모든 inactivated 효소제들의 경우  $\beta$ -hexosaminidase를 용출시키지 않는 것으로 나타났다(Fig. 4B). 이는 양성대조군으로 사용한 C48/80에 의한  $\beta$ -hexosaminidase의 용출이 확연히 나타난 것과 대조되는 결과이다. 일반적으로 단백질이나 효소의 경우 면역반응에 의한 독성을 나타낼 수 있는 것으로 알려져 있으나(Merget et al., 1993; Bannon, 2004), 식품첨가물 가공보조제로 사



**Fig. 3.** Effect of 7 kinds of food additive enzymes in (A) native and (B) inactivated forms on intracellular ROS generation in Caco-2 cells. Two-fold serial dilutions from the highest concentrations were carried out for each enzyme. The highest concentrations of natural food additive enzymes were presented in Table 1. Different lowercase letters (a, b, c, d, and e) indicate significant differences among enzymes-treated samples and untreated control cells ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 4.** Effect of 7 kinds of food additive enzymes in (A) native and (B) inactivated forms on  $\beta$ -hexosaminidase release from RBL-2H3 cells.  $\beta$ -hexosaminidase release was performed at 6 concentrations by two-fold serial dilutions from the highest concentration as shown in Table 1. Different lowercase letters (a, b, c, d, e, and f) indicate significant differences among enzymes-treated samples and untreated control cells ( $p < 0.05$ ).

용되는 효소제의 경우 가공과정에서 사용된 후 최종제품에 불활성화되거나 제거되는 경우가 많으며, 특히 가공과정에서 대부분 불활성화되기 때문에 알레르기원성으로의 독성이 낮은 것으로 보고된 바 있다(Paschke, 2009; FSCJ, 2017). 본 연구 결과는 일부 native 효소제의 경우 탈 과립화를 유발할 수 있는 것으로 보여지나, 최종 제품에서 불활성화된 형태의 효소제에 의한 알레르기원성 독성이 낮음을 제시하고 있다(Sewalt et al., 2018). 또한, 본 실험은 국민영양통계분류 기준 효소제가 첨가되는 대분류 내 세부 식품항목의 총합으로 일일섭취량을 도출하여 세포독성시험 최고 농도를 설정하였는데, 이와 같이 효소제들이 첨가된 세부 식품항목을 하루 동안 모두 섭취할 가능성은 극히 낮으므로 실질적 독성영향은 더욱 낮을 것으로 판단된다.

## 요 약

본 연구에서는 국내 다빈도로 사용되고 있는 가공보조제 효소제 7종에 대한 최대 사용량 기반 세포독성을 연구하였다. 기원이나 원산지 및 제조형태가 다른 효소제가 시판되고 있는 경우 모두 시험대상에 포함하였고, 효소제의 경우 가공과정에 사용 후 최종제품에서 잔존하지 않거나 불활성화되기 때문에 native 및 inactivated 두 형태에 대한 세포독성을 확인하였다. 세포처리 최고 농도는 품목 제조보고서를 기반으로 다빈도 첨가 식품품목 및 그 최대 사용량과 국민영양통계 일일섭취량을 기반으로 설정하였다. 그 결과, native 및 inactivated 효소제 모두 세포성장 및 세포막 손상에 의한 세포사멸을 유발하지 않는 것으로 나타났다. Native 효소제의 경우 중국 3종 모두에서 ROS 유발이 확인되었으나, inactivated 중국에서 ROS의 유의적 증가는 나타나지 않았다. 일부 native 형태의 중국 및 프로테아제에서  $\beta$ -hexosaminidase 용출에 의한 탈 과립화가 유발될 수 있는 것으로 분석되었으나, 모든 inactivated 효소제에서 탈 과립화는 유의적으로 나타나지 않았다. 이러한 결과는 효소제의 기원에 따라서 native 형태의 경우 ROS 유발에 의한 산화스트레스 및 탈 과립화와 같은 알레르기원성 세포독성을 나타낼 수 있으나, 실제 가공제품에 잔존하는 불활성화된 효소제에 의한 세포독성 영향은 낮음을 제시한다 할 수 있다. 이와 같은 연구결과는 안전성 정보가 미흡한 가공보조제 효소제에 대한 구체적인 독성자료 및 향후 *in vivo* 독성연구를 위한 기초자료로 활용될 수 있을 것이다.

## 감사의 글

본 연구는 2021년도 식품의약품안전처의 연구개발비(19162식위생012) 및 서울여자대학교 교내연구비(2021-

0179) 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## References

- Bae SH, Yu J, Lee TG, Choi SJ. 2018. Protein Food matrix-ZnO nanoparticle interactions affect protein conformation, but may not be biological responses. *Int. J. Mol. Sci.* 19: 3926.
- Balenga NA, Klichinsky M, Xie Z, Cahn EC, Zhao M, Jude J, Laviolette M, Panettieri Jr RA, Druey KM. 2015. A fungal protease allergen provokes airway hyper-responsiveness in asthma. *Nat. Commun.* 6: 6763.
- Bannon GA. 2004. What makes a food protein an allergen?. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 4: 43-46.
- Böhmert L, König L, Sieg H, Lichtenstein D, Paul N, Braeuning A, Voigt A, Lampen A. 2018. In vitro nanoparticle dosimetry for adherent growing cell monolayers covering bottom and lateral walls. *Part. Fibre Toxicol.* 15: 42.
- Chan FKM, Moriwaki K, Rose MJD. 2013. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. In: *Immune Homeostasis*. Snow AL, Lenardo MJ. (eds). Humana Press, Inc., Totowa, NJ, USA, pp. 65-70.
- Choi OB. 2002. Anti-allergic effects of *Petasites japonicum*. *Korean J. Food & Nutr.* 15: 382-385.
- Chung MJ, Ha TJ, Choi HN, Lee JS, Park YI. 2011. Inhibitory effects of anthocyanins isolated from black soybean (*Glycine max* L.) seed coat on degranulation and cytokine generation in RBL-2H3 cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 40: 1662-1667.
- Deckers M, Deforce D, Fraiture MA, Roosens NHC. 2020. Genetically modified micro-organisms for industrial food enzyme production: an overview. *Foods* 9: 326.
- EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes and Processing Aids (CEP), Silano V, Barat Baviera JM, Bolognesi C, Brüscheweiler BJ, Cocconcelli PS, Crebelli R, Gott DM, Grob K, Lampi E, Mortensen A, Riviere G, Steffensen I-L, Tlustos C, van Loveren H, Vernis L, Zorn H, Jany K-D, Kärenlampi S, Penninks A, Želježić D, Aguilera-Gómez M, Andryszkiewicz M, Arcella D, Gomes A, Kovalkovičová N, Liu Y, Rossi A, Engel K-H, Chesson A. 2018. Safety of the food enzyme glucoamylase from a genetically modified *Aspergillus niger* (strain NZYM-BF). *EFSA J.* 16: 5450.
- EFSA CEP Panel (EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes and Processing Aids), Silano V, Barat Baviera JM, Bolognesi C, Cocconcelli PS, Crebelli R, Gott DM, Grob K, Lampi E, Mortensen A, Riviere G, Steffensen I-L, Tlustos C, van Loveren H, Vernis L, Zorn H, Glandorf B, Herman L, Andryszkiewicz M, Arcella D, Gomes A, Liu Y and Chesson A. 2020. Safety evaluation of the food enzyme  $\alpha$ -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* strain BANSC. *EFSA J.* 18: 5976.
- Frisvad JC, Møller LL, Larsen TO, Kumar R, Arnau J. 2018. Safety of the fungal workhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102: 9481-9515.
- FSCJ (Food Safety Commission of Japan). 2017. Guidelines for the risk assessment of additives (enzymes) in foods. Available from: <https://www.fsc.go.jp/english/index.html>. Accessed June 16, 2021.

- KHIDI (Korea Health Industry Development Institute), 2017, National food & nutrition statistics. Available from: <https://www.khidi.or.kr/kps/dhraStat/result1?menuId=MENU01652&gubun=&year=2017>. Accessed June 17, 2021.
- Ladics GS, Sewalt V. 2018. Industrial microbial enzyme safety: What does the weight-of-evidence indicate? *Regul. Toxicol. Pharm.* 98: 151-154.
- Lee JH, Jo EH, Hong EJ, Kim KM, Lee IH. 2014. Safety evaluation of filamentous fungi isolated from industrial Doenjang Koji. *J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 1397-1404.
- Merget R, Stollfuss J, Wiewrodt R, Frühauf H, Koch U, Bolm-Audorff U, Dienfait HG, Hiltl G, Schultze-Werninghaus G. 1993. Diagnostic tests in enzyme allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 92: 264-277.
- MFDS (Ministry of Food and Drug Safety). 2021a. Food Sanitation Act. NO. 17809. Ministry of Food Drug Safety. Osong, Korea.
- MFDS (Ministry of Food and Drug Safety). 2021b. Food Additives Code. Available from: [https://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/04\\_03.jsp?idx=741](https://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/04_03.jsp?idx=741). Accessed June 25, 2021.
- MFDS (Ministry of Food and Drug Safety). 2021c. Food Additives Code. Available from: [https://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/04\\_03.jsp?idx=981](https://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/04_03.jsp?idx=981). Accessed June, 28, 2021.
- 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.
- Ojha BK, Singh RK, Shrivastava N. 2019. Enzymes in the animal feed industry. In: *Enzymes in Food Biotechnology*. Kuddus M. (ed). Academic Press, London, UK, p. 93-109.
- Onami JI, Kobayashi N, Watanabe M, Yamada O, Mizutani O, Yokoyama K, Haruo T, Chibana H, Kamata Y. 2019. An updated data portal for fungal allergens with curated information. *Bioinformatics* 15: 820.
- Pariza MW, Johnson EA. 2001. Evaluating the safety of microbial enzyme preparations used in food processing: update for a new century. *Regul. Toxicol. Pharm.* 33: 173-186.
- Paschke A. 2009. Aspects of food processing and its effect on allergen structure. *Mol. Nutr. Food. Res.* 53: 959-962.
- Rodrigues APD, Carvalho ASC, Santos AS, Alves CN, do Nascimento JLM, Silva EO. 2011. Kojic acid, a secondary metabolite from *Aspergillus* sp., acts as an inducer of macrophage activation. *Cell Biol. Int.* 35: 335-343.
- Römmele C, Brueckner J, Messmann H, Gölder SK. 2016. Clinical experience with the pillcam patency capsule prior to video capsule endoscopy: a real-world experience. *Gastroent. Res. Pract.* 2016: 1-6.
- Sewalt V, Shanahan D, Gregg L, Marta JL, Carrillo R. 2016. The generally recognized as safe (GRAS) process for industrial microbial enzymes. *Ind. Biotechnol.* 12: 295-302.
- Sewalt VJ, Reyes TF, Bui Q. 2018. Safety evaluation of two  $\alpha$ -amylase enzyme preparations derived from *Bacillus licheniformis* expressing an  $\alpha$ -amylase gene from *Cytophaga* species. *Regul. Toxicol. Pharm.* 98: 140-150.
- Shen HD, Tam MF, Tang RB, Chou H. 2007. *Aspergillus* and *Penicillium* allergens: focus on proteases. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 7: 351-356.
- Shipstone M, Mueller R, Bettenay S, Manson G, Friend S. 1999. The use of compound 48/80 as a positive control in equine intradermal allergy testing. *Vet. Dermatol.* 10: 291-295.
- Sivamaruthi BS, Kesika P, Chaiyasut C. 2018. Toxins in fermented foods: prevalence and preventions—a mini review. *Toxins* 11: 4.
- Zhao Y, Bu Q, Zhou Y, LV L, Yan G, Chen B, Wang L, Cen X. 2010. Mechanism study of aconitum-induced neurotoxicity in PC12 cells: involvement of dopamine release and oxidative damage. *Neurotoxicology* 31: 752-757.

## Author Information

- 김예현: 서울여자대학교 식품공학과 대학원생(석사과정)  
 윤수민: 서울여자대학교 식품공학과 대학원생(석사과정)  
 유나경: 서울여자대학교 식품공학과 대학원생(석사과정)  
 최수진: 서울여자대학교 식품응용시스템학부 식품공학전공 교수