

식품첨가물 E171이 수생물에 미치는 독성 평가

송인규^{1,†}, 김강희^{1,2,†}, 윤학원¹, 박준우^{1,2,*}

¹안전성평가연구소 환경독성영향연구센터, ²과학기술연합대학원대학교 인체 및 환경독성학

Toxicity assessment of food additive (E171) in aquatic environments

In-Gyu Song^{1,†}, Kanghee Kim^{1,2,†}, Hakwon Yoon¹ and June-Woo Park^{1,2,*}

¹Environmental Biology Research Group, Korea Institute of Toxicology, Jinju 52834, Republic of Korea

²Human and Environmental Toxicology Program, University of Science and Technology, Daejeon 34113, Republic of Korea

Contribution to Environmental Biology

- E171, a food additive of emerging concern, is a potential environmental contaminant that causes unexpected environmental harm.
- This study confirms the ecotoxicological effects of E171 on aquatic organisms and provides insight into its potential risk to the environment.

*Corresponding author

June-Woo Park
Tel. 055-750-3833
E-mail. jwpark@kitox.re.kr

† These authors contributed equally to this work.

Received: 12 January 2023

First revised: 21 February 2023

Second revised: 27 February 2023

Revision accepted: 9 March 2023

Abstract: E171, a mixture of titanium dioxide, has been widely used as a food additive due to its whitening effect and low toxicity. However, it has been proven that E171 is no longer safe for public health. So far, there are insufficient studies on the toxic effects of E171 on organisms especially using standardized test methods. In this study, toxicity assessments of E171 to two aquatic species, water flea (*Daphnia magna*) and zebrafish (*Danio rerio*), were performed using modified standardized test methods based on the physicochemical properties of E171. The hydrodynamic diameter, polydispersity index, and turbiscan stability index (TSI) were measured to ensure the dispersion stability of E171 in exposure media during the test period. The EC₅₀ for immobilization of water flea was 141.7 mg L⁻¹ while zebrafish was not affected until 100 mg L⁻¹ of E171. Measurements of reactive oxygen species (ROS) and antioxidant enzyme activities confirmed that E171 induced oxidative stress, leading to the activation of superoxide dismutase and catalase in both water flea and zebrafish, although the expression of antioxidant enzyme genes differed between species. These results suggested the potential risk of E171 to aquatic organisms and provided toxicological insights into the impacts of E171 on the environment.

Keywords: E171, titanium dioxide, aquatic toxicity, water flea, zebrafish

1. 서 론

나노기술(NT)은 IT, BT, ET와 함께 21세기를 주도할 핵심 기술로서 화학, 의료, 식품 등 다양한 산업 분야에서 주

목받고 있다(Baetke *et al.* 2015; Hong *et al.* 2016). 물질을 분자 또는 원자 수준으로 조작하는 나노기술을 통해 원재료와 전혀 다른 물리화학적 성질을 발현시킬 수 있으며, 이를 활용하여 다양한 기능을 가진 물질과 첨단제품의 생

산이 가능하다(Barber and Freestone 1990; Joudeh and Linke 2022). 그뿐만 아니라 나노물질은 벌크물질보다 훨씬 더 큰 비표면적을 가지고 있어(Joudeh and Linke 2022), 물질의 표면에서 발생하는 화학적, 생물학적 반응을 훨씬 더 효과적으로 촉진할 수 있다. 이러한 성질을 이용하여 치료약제, 환경정화 및 에너지소재, 센서 등 첨단 기술 응용 분야에 활용되고 있다(Su *et al.* 2012; Ong *et al.* 2021).

기존의 원재료와 전혀 다른 나노물질의 물리화학적 특성은 현대 기술 발전에 새로운 가능성을 이끌 수 있는 동시에, 지금까지 예기치 못한 인체 및 환경 독성을 유발할 수 있다는 문제가 존재한다(Manier *et al.* 2013; Pakrashi *et al.* 2013). 독성이 검증되지 않은 나노물질이 생산, 보관, 운반, 사용, 폐기 등 전 과정에서 환경 중에 노출되면 먹이사슬을 통해 최종적으로 인체에 유입될 것으로 추정된다. 따라서 나노물질의 정확한 독성을 검증하기 위한 노력이 필요한 상황이다(Lee and Lee 2021; Fiordaliso *et al.* 2022). 하지만 나노물질의 독성 판별을 위해 기존의 용해성 화학물질의 생태독성시험 방법을 그대로 적용하기에는 나노물질의 콜로이드적 특성으로 인해 어려운 실정이다. 일반적인 화학물질의 경우, 서로 다른 환경 매체 내에서 평형에 도달하려는 경향이 있어 열역학적 인자가 환경 중 오염물질의 분포를 결정하는 주요한 척도이다(Praetorius *et al.* 2017). 그러나 나노물질의 경우 열역학적으로 불안정한 콜로이드 분산을 형성하며, 엉김(agglomeration) 및 침전(sedimentation)과 같은 비가역적 반응에 의해 시험배지 내 노출 수준의 변화가 발생하는 등의 시험상의 오류가 존재한다(Hund-Rinke *et al.* 2017). 이러한 문제를 해결하기 위해 유럽화학물질청(ECHA)은 시료를 준비하는 방법, 침전 및 용해되지 않는 나노물질의 특성을 반영하는 방법 등 나노물질의 독성을 정확하게 평가하기 위한 구체적인 방안을 논의하였다(ECHA 2017). OECD에서도 나노물질의 물리화학적 특성을 고려한 기존 시험법 조정의 필요성이 명시된 '나노물질의 용해 및 분산 안정성 시험과 환경 시험 및 평가를 위한 데이터사용에 대한 권장사항'을 발표하였다(OECD 2020). 특히 2021년에 발간된 OECD 지침문서 317 '나노물질의 수생 및 퇴적물 내 생물독성시험'은 기존 화학물질의 독성을 검증하던 OECD 시험지침에 나노물질의 물리화학적 특성 및 성질을 고려한 내용을 추가하고, 나노물질 분산액의 준비방법 등을 보완하였다(OECD 2021). 지금까지 다양한 나노물질에 대한 독성 평가가 수

행되었지만, 사용된 시험조건, 시험방법 등이 일원화되지 않아 시험 결과 간 비교가 어려운 실정이다. 이를 해결하기 위해 표준화된 시험방법을 사용하여 나노물질의 독성을 체계적으로 확인할 필요가 있다.

이산화타이타늄(TiO_2)은 저렴한 가격, 화학적 안정성, 효율적인 광촉매 반응 등의 장점으로 전 세계적으로 널리 소비되고 있는 나노물질 중 하나이다(Skocaj *et al.* 2011). 2021년 이산화타이타늄 시장경향 분석 보고서에 따르면 2020년도에 약 170억 달러 규모의 다양한 응용 분야에 TiO_2 가 사용되었으며, 2021년부터 2028년까지 그 규모는 연평균 6.0%씩 빠르게 성장할 것으로 예상된다(Grand View Research 2021). TiO_2 는 페인트와 코팅, 플라스틱 제품, 종이 제조에 주로 사용되며 높은 산화·환원력을 지닌 광촉매로서 염료 기반 전지, 환경정화 촉매 등 다양한 분야에서 사용되고 있다(Schneider *et al.* 2014). 이렇게 TiO_2 가 산업 각 분야에서 사용되고 있지만, 그중 공중보건에 가장 밀접하게 관련 있는 분야는 식품첨가물로 사용되는 이산화타이타늄 혼합물인 E171이다. E171은 식품에서 흰색 착색제로 매우 흔하게 사용되며, 우리의 실생활에 밀접하게 연관된 페인트, 코팅, 의약품, 화장품, 치약 등에 포함된다(Dudefoi *et al.* 2017). 선행 연구에 따르면 2020년도에 약 122개의 제품에 E171이 포함되어 있으며, 과자, 음료, 농수산가공물 등 여러 식품에 사용되는 것으로 보고되었다(Blaznik *et al.* 2021). 그러나 최근 유럽식품안전청(EFSA)은 E171을 식품첨가물로 사용하는 것이 안전하지 않다고 발표했으며, 이를 뒷받침하는 증거가 여러 연구를 통해 보고되었다(Musial *et al.* 2020; EFSA 2021). 예를 들어, 나노 수준의 E171은 경구, 피부, 호흡기 등 여러 경로를 통해 유입되어 간, 폐, 또는 소화기관 등 다양한 조직 및 기관의 보호장벽을 뚫고 독성을 일으킬 수 있다(EFSA 2021; Fiordaliso *et al.* 2022). 특히 독성을 유발하는 주요한 기전 중 하나인 산화스트레스는, E171 나노 입자의 체내 농도가 증가함에 따라 Catalase (CAT)와 Superoxide Dismutase (SOD)의 항산화 능력을 감소시키며, DNA 손상으로도 이어질 수 있다는 보고가 있었다(Fiordaliso *et al.* 2022). 또한, E171은 인체뿐만 아니라 생태계에도 부정적인 영향을 미치는 오염물질로 작용한다는 연구가 보고된 바 있다(Chavan *et al.* 2020). E171에 노출된 호기성, 혐기성 미생물과 방선균 모두 E171의 크기 및 빛 노출의 정도에 따라 종 특이적으로 성장이 감소하는 것이 확인되었다(Hou *et*

al. 2019; Bhattacharjya et al. 2021). E171에 노출된 해수어 (*Pimephales promelas*)와 담수어 (*Oncorhynchus mykiss*)에 서도 활성산소(Reactive oxygen species, ROS) 증가와 세포막의 지질 과산화로 인한 조직 손상이 발생하였다(Federici et al. 2007; Schneider et al. 2014). 하지만 세포 *in vitro* 시험 등을 이용하여 E171의 인체 위해성은 연구가 많이 진행된 반면, 아직까지 E171의 환경생물에 미치는 독성 연구는 상대적으로 부족한 실정이다.

본 연구에서는 나노물질의 물리화학적 특성을 고려한 수생태독성시험방법인 OECD 지원문서 317과 TiO₂ 나노물질의 환경독성시험을 위해 개발된 NIST 특별간행물 1200-1, 2, 3 등 여러 표준문건을 고려하여 물벼룩과 어류, 2종의 환경생물에 대한 E171의 독성시험(OECD TG No. 202, 203)을 수행하였다. 또한, E171의 독성을 확인하기 위해 생물 내 분자생물학적 산화스트레스의 지표를 분석하였으며, 최종적으로 독성영향평가의 영향농도(Effective concentration, EC) 및 치사농도(Lethal concentration, LC) 값과 비교하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. E171의 물리화학적 특성 및 분산 안정성

시험물질 E171 (HOMBITAN® FG; 순도 ≥99.0%)은 Venator Germany GmbH (Duisburg, Germany)에서 구매하였으며, 제조업체에서 제공한 자료에 따르면 99% 이상의 TiO₂와 약 1%의 비소, 납, 카드뮴, 알루미늄, 안티몬 등의 중금속이 포함되었다(Venator 2013). E171 분산원액의 제조는 NanoEHS의 프로토콜인 'NIST special publication 1200-2,3,4'를 따라 탐침 초음파처리(probe sonication)를 통해 수행하였다(Taurozzi et al. 2012a, b, c). 초음파처리 시 분산원액에 전달되는 에너지를 정확하게 계산하기 위해 프로토콜에 따라 탐침 초음파처리기(probe sonicator)의 교정을 시행하였다. 시간의 경과에 따라 500 mL의 3차 증류수의 수온 변화를 측정하여, 실험에 사용된 탐침의 80% pulse 모드에서 45,000 J에 도달하는 데 필요한 시간을 계산하였다. 초음파처리한 E171 분산원액의 충분한 분산 안정성을 확보하기 위해 생화학적 분산제인 BSA (Bovine serum albumin; Sigma-Aldrich, USA)를 사용하였다. BSA는 소의 혈청 알부민 단백질로서 나노입자의 응집을 방

하여 분산 안정성을 증가시킨다. 또한, 생체분자이기 때문에 독성시험 결과에 큰 영향을 미치지 않아 연구에 많이 사용된다(Richter et al. 2008). BSA가 첨가된 2가지 시험종의 사육 배지 내 E171의 분산 안정성을 확인하기 위하여 Zetasizer (DLS-8000; Malvern Panalytical, USA) 기기를 이용하여 유체역학적 직경(hydrodynamic diameter)과 다분산 지수(Polydispersity Index, PDI)를 측정하였다. 먼저, 0.01% 농도의 BSA를 첨가한 2종류의 노출배지 내에 E171을 첨가한 후 탐침 초음파처리(80 watt, 11분 59초)를 하였으며, 24시간 후 각 노출배지 내 E171의 유체역학적 직경과 다분산 지수를 측정하였다. 또한, 다중광산란법을 이용한 측정법으로 나노물질의 응집과 침전현상에 대한 정성적인 평가가 가능한 Turbiscan™ (Turbiscan LAB, Formulation, USA) 장비를 사용하여 시간의 경과에 따른 노출배지 내 E171의 분산 안정성을 확인하였다. 시험배지 내 E171 분산원액의 첨가방법은 OECD 지침문서 317에서 제시하는 Option 1B를 선택하였으며, 이는 분산원액을 직접 시험배지에 첨가하는 방법이다. 이때, E171의 분산 안정성, 24시간 이내 침강 발생 여부 등의 조건을 고려하였다(OECD 2021).

2.2. 물벼룩/어류 노출시험

E171이 수계환경에 미치는 영향을 확인하기 위해 물벼룩 (*Daphnia magna*), 제브라피쉬 (*Danio rerio*)를 시험종으로 선정하였으며, 모두 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소에서 사육 중인 생물들을 사용하였다. 2종의 수생태독성 시험은 공인 시험기준인 OECD 시험지침(OECD TG 202, 203)과 미국환경청이 제시하는 시험법(EPA 2016a, b)을 토대로 GLP (Good Laboratory Practice) 수준에 준하는 실험으로 진행되었다(OECD 2004, 2019). 물벼룩 급성독성 시험은 OECD 시험지침 202; *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test를 바탕으로 진행하였다. 준비된 시험용액을 비커에 100 mL씩 넣은 후, 부화 후 24시간 이내의 물벼룩을 용기당 5개체씩 넣었다. 48시간의 노출 기간 동안 온도는 20°C, 광주기는 800~1,000 Lux의 일반광에서 16/8시간(명/암)의 조건을 유지하였으며, 먹이는 공급하지 않았다. 노출 종료 시점에서 시험용액을 인위적으로 저어주었을 때, 물의 흐름을 벗어나지 못하거나 유영하지 않는 개체를 유영저해 개체라고 판단하였으며, 이를 독성영향평가의 EC₅₀ 도출을 위한 종말점으로 설정하였다. 위 시험은 모두

Table 1. Test conditions for aquatic toxicity evaluation of E171

	Water flea	Fish
Species	<i>Daphnia magna</i> (<24 h post-hatch)	<i>Danio rerio</i> (adult)
Duration	48 h	96 h
Vessel	100 mL dish	8 L tank
Media volume	50 mL	5 L
Number of animals	5	7
Media	M4	Dechlorinated tap water
Concentrations (mg L ⁻¹)	0, 6.3, 12.5, 25, 50, 100	0, 6.3, 12.5, 25, 50, 100
Replicates	4	3
Temperature	20°C	28°C
Light	16/8 (day/night) (800–1,000 Lux)	16/8 (day/night) (800–1,000 Lux)
Water quality	pH, DO, EC	pH, DO, EC
Endpoint	Immobilization	Lethality
Reference	OECDTG No. 202	OECDTG No. 203

4반복으로 수행되었다. 어류 급성 독성시험법은 OECD 시험지침 203; Fish, acute toxicity test를 준수하여 진행하였다. 제브라피쉬(*Danio rerio*)의 경우 3개월령 성체를 사용하였다. 한 변이 20 cm인 사각 유리수조에 농도별로 준비한 시험용액을 5 L씩 첨가하고 각 수조에 7개체의 *D. rerio*를 노출하였다. 시험물질을 교환하지 않는 지수식 방법을 사용하였다. 96시간 동안 노출하였으며 시험기간 동안 절식하였다. 지속적으로 공기를 주입하였으며, 온도는 28°C, 광주기는 800~1,000 Lux의 일반광에서 16/8시간(명/암)의 조건을 유지하였다. 움직임이 없거나 아가미 개폐가 중단된 경우 치사개체로 간주하였으며, 이를 LC₅₀ 도출을 위한 종말점으로 설정하였다. 위의 2종에 대한 수생태독성시험의 모든 노출배지 내 pH, 용존산소(DO), 전기전도도(EC)를 측정하였다. 시험농도는 OECD 시험지침 203에서 권장하는 화학물질 독성시험의 최대 노출농도인 100 mg L⁻¹을 최고 농도로 공비가 2인 0, 6.3, 12.5, 25, 50, 100 mg L⁻¹으로 설정하였다(Table 1). OECD 시험지침 203은 화학물질 독성 평가의 최대 노출농도를 100 mg L⁻¹으로 제시하였는데, 그 이유는 이 농도 이상의 화학물질이 실제 환경에서 검출될 가능성이 낮기 때문에 이 농도 이상에서 화학물질의 독성을 평가하는 것은 적절하지 않다고 권고하고 있다.

2.3. 생물체 내 ROS 측정

E171에 노출된 물벼룩과 어류의 체내 ROS 생성은

dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA)를 사용하여 측정하였다(Zhao *et al.* 2013). ROS 분석에 사용된 E171의 노출농도는 앞선 노출시험의 결과와 농도의 환경적 현실성 및 OECD 시험지침에서의 최대농도를 고려하여 100 mg L⁻¹으로 설정하였다. ROS 분석뿐만 아니라 산화스트레스 관련 효소 활성 및 유전자 발현과 같은 분자생물학적 시험 또한 동일한 농도에서 평가되었으며, 모두 노출시험과 동일한 시험조건에서 독립적으로 수행되었다. 이때 분석에 필요한 충분한 양의 시료를 얻기 위해 각 용기당 개체 수를 물벼룩은 15개체 어류는 3개체로 설정한 후, 노출시험과 동일한 조건에서 0, 100 mg L⁻¹의 농도로 E171을 재노출하였다. 먼저, 생물체 내 ROS 측정을 위해 물벼룩은 시험구마다 15마리를, 어류는 3마리씩 꺼내 PBS 완충액에서 균질화하였으며, 정량 후 동량의 protein으로 시료를 준비하였다. 균질액을 4°C 조건에서 12,000×g으로 30분간 원심분리하고 상층액을 수집하였다. 20 µL의 균질액을 96-웰 플레이트에 첨가하고 실온에서 5분 동안 정치하였다. 그 다음 100 µL phosphate buffer (PBS)와 8.3 µL의 DCFH-DA 희석 용액을 각 웰에 첨가하였으며, 플레이트를 37°C의 암조건에서 30분 동안 정치하였다. DCFH-DA 희석 용액은 DCFH-DA를 10 mg mL⁻¹의 농도가 되도록 dimethyl sulfoxide (DMSO) 용액에 첨가하여 제조하였다. 흡광도는 microplate reader (Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Reader; BioTek Instruments, VT, USA)를 사용하여

여 excitation 485 nm와 emission 530 nm로 측정하였다. ROS 농도는 대조군을 기준(100%)으로 표시하였다.

2.4. 산화스트레스 관련 유전자 및 효소 측정

2.4.1. *Cat*, *Sod* 유전자 발현 측정

E171의 독성을 평가하기 위해 산화스트레스의 지표가 되는 유전자 *Cat*와 *Sod*의 발현량을 측정하였다. E171의 노출은 앞선 ROS 분석과 동일한 조건에서 수행하였으며, 시험군마다 물벼룩은 15마리, 어류는 3마리씩 물벼룩은 개체 전체를, 어류는 항산화에 활발히 관여하는 간(liver)을 대상으로 균질화하여 시료를 준비하였다. 물벼룩은 Zhao *et al.* (2019)의 연구를 따라 *Cat*와 *Sod*의 프라이머를 제작하였으며, ubiquitin conjugating enzyme (ubc)을 데이터 정규화(data normalization)를 위한 reference gene으로 선정하였다. 어류에서는 Aksakal *et al.* (2021)의 연구를 따라 β -Actin을 reference gene으로 *Cat*와 *Sod*의 프라이머를 제작하였다(Table 2). RNA 추출은 RNeasy Kit를 이용하여 제조사(QIAGEN, LLC, MD, USA)의 프로토콜을 따라 수행하였다. 이후 RNA의 정량을 하였으며 순도(purity)를 나타내는 260/280 값은 1.8에서 2.1 사이로 측정되어 순도가 충분함을 확인하였다. 추출된 RNA를 SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System을 사용하여 cDNA로 합성

하였으며, 제조사(Thermo Fisher Scientific, MA, USA)의 프로토콜을 준수하였다. 합성된 cDNA는 GoTaq® qPCR Master Mix로 제조사(Promega Corporation, WI, USA)의 프로토콜을 따라 Zhao *et al.* (2019)과 Aksakal *et al.* (2021)의 연구에서 사용된 프라이머를 이용하여 Real-time PCR을 진행하였으며, 사용된 장비는 Mx3000P (Agilent Technologies Inc., CA, USA)였고 측정 방식은 SYBR Green이었다. Mx3000P에서 확인한 각 유전자의 해리곡선(dissociation curve)은 하나의 피크(peak)를 보였으며, 증폭된 DNA를 전기영동으로 확인한 결과 프라이머의 알려진 증폭길이와 일치하는 단일 밴드를 확인하였다.

2.4.2. CAT, SOD 효소 활성

물벼룩과 어류에 대하여 E171에 의해 발생하는 산화스트레스의 분자생물학적 증거로 산화스트레스에 대한 두 가지 주요 마커인 CAT와 SOD 효소의 활성을 분석하였다. 먼저, 시료는 *Cat*와 *Sod*의 유전자 발현 분석과 동일한 방법으로 물벼룩은 개체 전체를, 어류는 간(liver)을 대상으로 균질화하여 준비하였다. 이후 ELISA 키트 제조업체(Cell Biolabs, Inc., CA, USA)의 지침에 따라 실험을 수행하였으며, microplate reader를 이용한 광량 측정을 통해 CAT와 SOD 효소의 활성도를 확인하였다.

Table 2. Primer sequences used for amplification of antioxidant response-related genes with the qRT-PCR

Species	Gene	Primer	Sequence (5'-3')	Amplification length (Base pair)	Accession No.
<i>D. rerio</i>	<i>Cat</i>	Forward	TTGAGCATGTTGGAAAGACGAC	139	AF170069.1
		Reverse	TGCCCTCATCGGTGTAGAAC		
	<i>Sod</i>	Forward	CTCCCAGAGGTCAAGCTGTTT	99	FJ807962.1
		Reverse	CTCCTCATCTGCTCCCGTTC		
	β -Actin	Forward	CCTCTCTGCTCCTTCCACC	150	AF057040.1
		Reverse	TACTCCTGCTTGCTGATCCAC		
<i>D. magna</i>	<i>Cat</i>	Forward	TGGTTCGGGTATTGAGGC	133	GQ389639.1
		Reverse	AGCTTTGGCACGGTATGGG		
	<i>Sod</i>	Forward	CTAGCCGTCATCAATTCGTGCG	128	JX456347.1
		Reverse	TTGGTGCTGCCTTCGTTCTC		
	<i>Ubc</i>	Forward	TCACCTGCACTCACCATTTTC	90	WFes0004602
		Reverse	AATCTCCGGAACCAAAGGAT		

2.5. 통계 분석

모든 독성시험 및 분자생물학적 산화스트레스 분석은 물벼룩은 4회, 어류는 3회 반복 수행되었으며, 모든 데이터는 평균±표준편차로 표시하였다. 물벼룩의 반수영향농도(EC₅₀, 50% Effective Concentration)와 어류의 반수치사농도(LC₅₀, 50% Lethal Concentration) 산출을 위한 통계처리는 노출시험 결과로부터 구한 용량-반응곡선을 바탕으로 CETIS™ software의 Linear Regression 방법을 이용하여 산출하였다. ROS 분석, 산화스트레스 관련 효소 및 유전자 발현 분석의 경우, 대조군과의 비교를 위해 Origin Lab software 2021 프로그램을 사용하여 *t*-검정을 하였으며, *p*-값이 0.05, 0.01, 0.005 미만인 경우를 통계적인 유의성이 있는 것으로 판정하고 각각 *, **, ***로 표기하였다.

3. 연구 결과 및 고찰

3.1. E171의 물리화학적 특성 및 분산 안정성

독성시험에 앞서 E171 입자가 물벼룩, 어류의 노출배지에 각각 존재할 때, 시간에 따른 물리화학적 특성의 변화를 확인하기 위해 E171 유체역학적 직경과 다분산 지수를 측정하였다(Table 3). 분석 결과, 물벼룩과 어류노출배지 내 E171 입자의 유체역학적 직경이 24시간 동안 288.8~303.5 nm 범위에서 측정되었다. 본 실험에서 사용된 E171과 동일한 제재를 사용한 선행 연구에 따르면, E171은 단일입자 모드의 유도결합플라즈마 질량분석기(single particle mode inductively coupled plasma mass spectrometry)를 이용한 입자크기분포 분석에서 주요한 입자크기는 약 280 nm였다(Venator 2013; Orтели et al. 2021). 또한, 3차 증류수 내 E171 입자의 유체역학적 직경과 제타 전위는 각각 303.1 nm, -44.2 mV로 보고되었다(Han et al. 2021). 따라서, 본 연구에서의 결과가 선행 연구에서 보고되었던 3차 증류수 내에서의 유체역학적 직경과 유사하며 응집이 발

생하지 않는 것을 확인하였다. 일반적으로 염의 성분이 존재하는 용액 내에 콜로이드 입자가 노출되면, 입자의 표면 전하와 반대되는 이온과 상호작용하여 입자의 표면전하가 중화되게 된다. 이는 콜로이드 입자 사이의 정전기적 반발력을 감소시켜 입자의 응집을 증가시킨다(García-García et al. 2009). 그러나 본 실험에서는 E171 입자의 분산 안정성을 향상하기 위해 분산제로 BSA를 첨가하였기 때문에 입자의 응집이 억제되어 증류수와 노출배지 내 입자의 유체역학적 직경이 유지된 것으로 판단된다.

노출배지 내 E171의 다분산 지수는 배지의 종류와 노출 시간 경과에 관계없이 모두 0.24~0.25 범위의 값으로 측정되었다. 다분산 지수는 입자의 분산 정도를 나타내는 지표로서 0에서 1 사이의 값을 갖는다. 다분산 지수가 0.3 이하에서는 단분산계, 0.3~0.6 범위에서는 중분산계, 0.6 이상의 값은 다분산계 형태의 에멀전(emulsion) 입자가 용액 내에 분산되어 있음을 의미하며, 일반적으로 단분산계에서 나노물질의 분산 안정성이 우수한 것으로 알려져 있다(Yuan et al. 2008). 따라서, E171이 2종의 환경생물배지 내에서 모두 단분산계 형태로 분포하며, 안정적으로 분산이 유지되었음을 확인하였다.

시간의 경과에 따른 E171의 응집과 침전을 확인하기 위해 Turbiscan™ 장비를 사용하여 각 노출배지 내에서 분산 안정성을 파악하였다. 분산 안정성은 Turbiscan™에서 제공하고 있는 Turbiscan™ 안정성 지수(Turbiscan Stability Index, TSI) 지수를 통해 비교가 가능하며, TSI의 값에 따라 A⁺부터 D까지의 등급으로 분산 안정성이 평가될 수 있다(Luo et al. 2017). A⁺는 TSI가 0.5 이하일 때의 등급으로 입자가 시간의 경과에 따라 매우 안정적으로 분산됨을 의미하며, 더 낮은 등급으로 갈수록 분산 안정성이 감소하는 것을 나타낸다. 24시간 동안 각 노출배지별 E171의 TSI를 측정한 결과, 물벼룩과 어류배지에서 모두 시간의 경과에 따라 TSI가 점차 증가하였으며, 24시간 이후 측정된 TSI는 각각 2.95, 2.09로 모두 분산의 불안정화(destabilization)

Table 3. Hydrodynamic diameter, polydispersity index (PDI), and global TSI grade of E171 in each exposure medium

Exposure medium	0 h		24 h		24 h-TSI grade
	Hydrodynamic diameter (nm)	PDI	Hydrodynamic diameter (nm)	PDI	
<i>D. magna</i>	303.5	0.25	303.1	0.24	B
<i>D. rerio</i>	288.8	0.23	292.3	0.24	B

가 시작되는 단계를 의미하는 B등급의 분산 안정성을 나타냈다(Table 3). 이는 24시간 이후에 E171의 분산이 불안정화가 될 수 있지만, 24시간 전까지는 각 노출배지 내에서 안정적으로 분산을 유지될 수 있음을 의미한다. 따라서 본 연구에서는 독성시험에서 요구하는 충분한 분산 안정성을 유지하기 위해 노출배지, 교체주기를 24시간으로 설정하여 시험을 수행하였다.

3.2. 물벼룩/어류 노출시험

E171의 수생태독성시험은 공인 시험기준인 OECD 시험지침(OECD TG 202, 203)에 따라 물벼룩(*D. magna*), 제브라피쉬(*D. rerio*)를 대상으로 각각 수행되었다. 물벼룩의 경우, 100 mg L⁻¹의 농도에서 최대 35%의 유영저해 개체가 관찰되었으며, CETIS™로 분석된 EC₅₀ 값은 141.7 mg L⁻¹였다(Table 4). *D. magna*에 대한 TiO₂의 독성에 관한 대다수의 연구에서 100 mg L⁻¹ 이상의 48-h EC₅₀ 값이 보고되었으며, 본 연구의 EC₅₀ 또한 이전 연구 결과와 유사한 결과를 보여주었다(Lee *et al.* 2009; Zhu *et al.* 2009). 이는 E171의 크기, 종류 및 노출기간에 따라 독성값의 편차가 존재할 수 있지만, E171이 물벼룩에 독성을 나타낼 수 있음을 시사한다(Fiordaliso *et al.* 2022).

어류 노출시험 결과에서는 모든 노출농도에서 치사나 이상행동 개체가 관찰되지 않았다. 선행 연구에 따르면, 단일입자의 직경이 30 nm 이하의 TiO₂ 나노입자가 노출된 *D. rerio*에서 100 mg L⁻¹에 이르는 모든 노출농도에서 치사가 관찰되지 않았다(Griffitt *et al.* 2009). 또한, 동일한 TiO₂를 100 mg L⁻¹의 농도로 *D. rerio*에 장기간 노출한 독

성시험에서 통계적으로 유의한 정도의 생물농축이 확인되지 않았다(Tang *et al.* 2019). 이는 소화관으로 유입된 TiO₂가 배변 활동을 통해 체내로부터 효과적으로 배출되는 것이 주된 이유로 확인되었다(Xiong *et al.* 2011). 앞선 두 종에 대한 독성시험에서 도출된 독성값 EC₅₀와 LC₅₀ 모두 OECD 시험지침에서 권장하는 독성시험의 최대농도 100 mg L⁻¹을 초과하였다. 이를 통해 입자상 물질의 수생태독성시험에서 정확한 독성값을 도출하기 위해 기존의 용해성 화학물질에 대한 독성시험지침에서 권장하는 최대 노출농도를 초과하는 시험농도의 설정이 필요함을 확인하였다. 또한, 실제 환경적 현실성을 고려한 100 mg L⁻¹ 이하 농도의 E171이 물벼룩에 독성을 나타낼 수 있는 반면, 어류에는 가시적인 독성을 나타내지 않는 것을 확인하였다.

3.3. 생물체 내 ROS 형성

TiO₂ 나노입자는 물과 반응하여 하이드록실 라디칼(·OH)을 발생시키며, 수중의 용존된 산소(O₂)와 반응하여 과산화수소(H₂O₂)와 초과산화 음이온(O₂⁻) 등 ROS를 생성하는 것으로 알려져 있다(Brunet *et al.* 2009; Nguyen *et al.* 2021). 이러한 과정에서 발생하는 ROS는 생물체에 강한 산화스트레스를 유발할 수 있다고 알려져 있다(Proquin *et al.* 2017). 이러한 이유로 산화스트레스의 지표인 생물체 내 ROS를 정량하기 위해 물벼룩과 어류에 100 mg L⁻¹ 농도의 E171을 각각 48시간, 96시간 동안 노출한 후 생물체 내 ROS 생성률을 대조군과 비교했다. 실험 결과, 물벼룩의 경우 96시간 동안 E171에 노출된 후 시험군 내 ROS의 함량이 대조군보다 222.5% (1 < 0.005) 더 증가하였으며, 어류 또한 295.3% (p < 0.005) 더 증가한 것을 확인하였다(Fig. 1). 현재까지 여러 연구를 통해 TiO₂가 생물체 내에 ROS를 형성하여 항산화 반응의 불균형 및 DNA 손상 또는 세포물질대사를 방해하는 등 다양한 독성을 유발하는 것이 증명되었다(Federici *et al.* 2007; Lu *et al.* 2021). 선행 연구에 따르면 [101]과 [001], 2종류의 결정구조를 가진 TiO₂ 나노입자를 24시간 동안 *D. magna*에 노출했을 때 체내 ROS 함량이 대조군과 비교하여 모두 통계적으로 유의한 수준으로 증가한 것이 관찰되었으며, TiO₂에 의한 ROS 생성과 *D. magna*의 유영저해율 간의 선형상관관계가 확인된 바 있다(Ma *et al.* 2012; Lu *et al.* 2021). 또한, 682 nm의 유체역학적 직경의 TiO₂가 100 mg L⁻¹의 농도로 96시간 동안 *D. rerio*에 노출되었을 때, 대조군과 비교하

Table 4. Immobilization and lethality of *Daphnia magna* (n = 4) and *Danio rerio* (n = 3) in each exposure concentration, respectively, and their toxicity values

Concentration (mg L ⁻¹)	<i>D. magna</i>	<i>D. rerio</i>
	Immobilization (%)	Lethality (%)
0	0	0
6.25	0	0
12.5	0	0
25	5 ± 10	0
50	15 ± 10	0
100	35 ± 25.2	0
EC ₅₀ or LC ₅₀ (mg L ⁻¹)	141.7	> 100

여 ROS 함량이 증가하는 것이 관찰되었다(Al-Ammari *et al.* 2021). 이처럼 본 실험에서 사용된 TiO₂ 혼합물인 E171 또한 선행 연구 결과와 동일하게 물벼룩과 어류의 체내에 ROS를 생성하는 데 기여할 수 있음을 확인하였다.

3.4. 산화스트레스 관련 유전자 발현 및 효소 활성

수생물의 항산화 시스템은 온도, 산소농도, pH, 화학물질 등 여러 환경인자에 의해 발생하는 산화스트레스를 감소시키기 위한 방어체계이다. 여러 환경적 산화스트레스를

완화하는 항산화 과정에서 단백질효소의 활성 및 관련유전자의 발현 등 중요한 정보를 확인할 수 있다(Valavanidis *et al.* 2006; Yoo *et al.* 2019). 과산화수소와 초과산화 음이온과 같은 ROS는 생물체 내 산화스트레스를 유발할 수 있으며, 이는 생물체 내 산화스트레스의 방어기전인 CAT, SOD와 같은 항산화효소의 활성을 촉진한다. CAT는 peroxisome의 마커효소로 과산화수소를 O₂와 H₂O로의 분해과정 촉진할 수 있다(Brunet *et al.* 2009). SOD는 초과산화 음이온을 제거하기 위한 효소로서 물분자와 함께 O₂⁻를 H₂와 O₂로 분해할 수 있다(Nguyen *et al.* 2021). CAT와 SOD 모두 효과적으로 각각 과산화수소, 초과산화 음이온과 같은 ROS의 함량을 줄이며 세포를 보호할 수 있다.

3.4.1. Cat, Sod 유전자 발현

CAT와 SOD 항산화효소의 상대적인 유전자 발현을 측정된 결과, 물벼룩의 경우 E171에 노출된 시험군에서 대조군과 비교하여 각각 2.4배, 2.8배($p < 0.05, 0.005$) 증가하였으며 통계적으로 유의한 차이를 보였다(Fig. 2). 이러한 결과는 물벼룩이 E171에 노출되었을 때 불리한 외부 자극에 저항하기 위해 관련 항산화효소의 유전자를 과발현하여 항산화효소의 활성을 증가시킬 수 있음을 시사한다(Tang *et al.* 2019). 어류의 경우 E171 노출로 인한 *Cat*와 *Sod* 유전자 발현에 유의한 차이는 나타나지 않았다. 선행 연구에 따르면, 본 연구에서 사용된 E171의 유체역학적 직경과 비슷한 400 nm 이하의 TiO₂ 입자를 100 mg L⁻¹ 농도로 7일

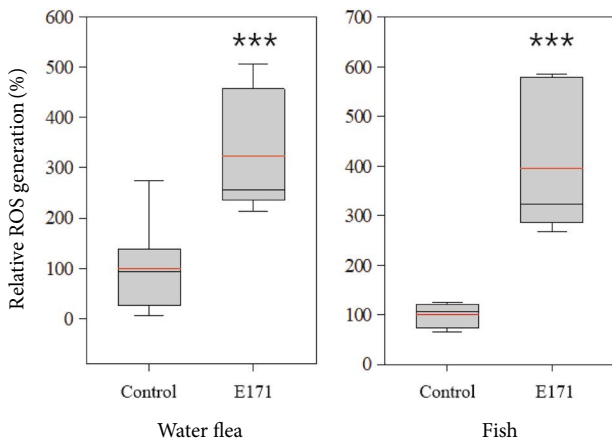


Fig. 1. Reactive oxygen species (ROS) levels in water flea ($n=4$) and fish ($n=3$) after exposure to 100 mg L⁻¹ of E171. The red and black lines represent the mean and median values, respectively. *, **, and *** indicate statistically significant differences from control values at $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.005$, respectively.

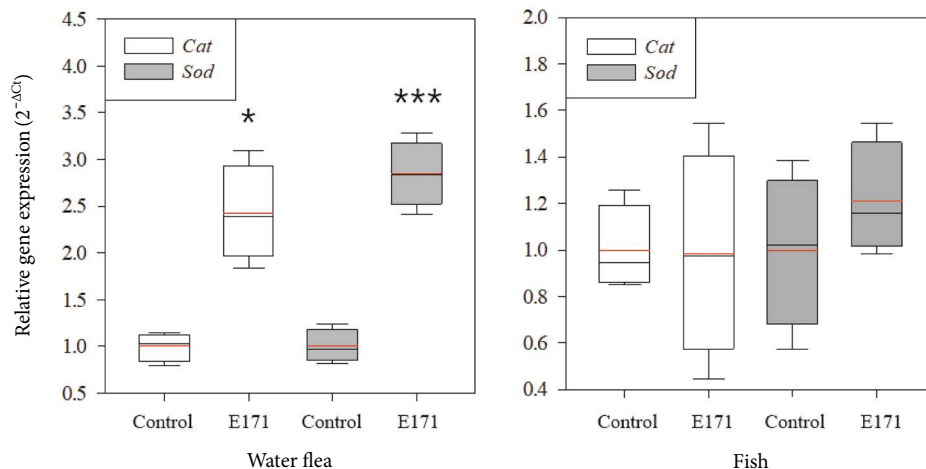


Fig. 2. Expression of *Cat* and *Sod* after exposure to E171 in water flea ($n=4$) and fish ($n=3$), respectively. The red and black lines represent the mean and median values, respectively. *, **, and *** indicate statistically significant differences from control values at $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.005$, respectively.

간 *D. rerio*에 노출하였을 때, 대조군과 비교하여 *D. rerio*의 간에서 *Cat* 유전자 발현은 증가하였지만, *Sod* 유전자 발현에서는 통계적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다. 그러나 동일 연구에서 크기가 더 작은 약 100 nm의 유체역학적 직경을 지닌 TiO₂ 입자의 경우, 10, 50, 100 mg L⁻¹의 모든 농도에 노출된 *D. rerio*의 간 세포 내에서 *Cat*와 *Sod* 유전자 발현이 대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 차이를 보였다(Tang *et al.* 2019). 이는 E171의 크기 및 노출기간에 따라 산화스트레스 관련 유전자 발현에 편차가 존재할 수 있음을 보여준다.

3.4.2. CAT, SOD 효소 활성

항산화 시스템의 변화를 더욱 정확하게 확인하기 위하여 CAT와 SOD 효소의 활성도를 측정한 결과, E171에 노출된 물벼룩에 경우 CAT와 SOD 효소의 활성이 대조군과 비교하여 각각 1.9배, 6.1배($p < 0.005$, 0.005), 어류의 경우 1.9배, 38.9배($p < 0.05$, 0.005) 증가하였으며 통계적으로 유의한 차이를 보였다(Fig. 3). CAT와 SOD 효소 활성의 증가는 물벼룩과 어류의 체내에 과산화수소와 초과산화음이온 2가지의 ROS가 생성되었음을 의미한다. 즉, E171이 물벼룩과 어류에서 산화스트레스를 유발하였으며, 이의 방어작용으로 CAT와 SOD 효소 활성이 증가한 것으로 해석된다. 비록 어류에서 항산화 유전자의 발현이 증가하지 않았지만, 어류가 E171에 의해 산화스트레스를 받았음을 ROS 생성량 증가와 항산화효소 활성의 증가를 통해 확인하였다. 이러한 결과는 생물종에 따라 항산화효소 활성의 증가가 통계적으로 유의한 수준의 관련효소의 유전자 발현으로 이어지지 않을 수 있음을 의미한다. 선행 연구에 따르면, DNA 발현과 단백질 수준이 낮은 상관관계를 보일 수 있는 원인으로 전사 후 메커니즘이나 단백질 반감기 등이 있으며, 이러한 이유로 mRNA 발현으로 단백질의 활성도의 변화를 항상 예측할 수 있는 것은 아닌 것으로 보고되었다(Greenbaum *et al.* 2003).

선행 연구에 따르면, 700 nm 이하의 유체역학적 직경을 지닌 TiO₂를 24시간 동안 *D. magna*에 노출했을 때, 체내 ROS 함량과 CAT, SOD 항산화효소의 활성이 모두 대조군과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가하였으며, 이는 본 실험 결과와 동일한 경향성을 보여준다(Lu *et al.* 2021). 또한, *D. rerio*를 이용한 TiO₂ 독성 연구에 따르면, 600 nm 이하의 유체역학적 직경의 TiO₂를 24시간 동안 노출했을 때,

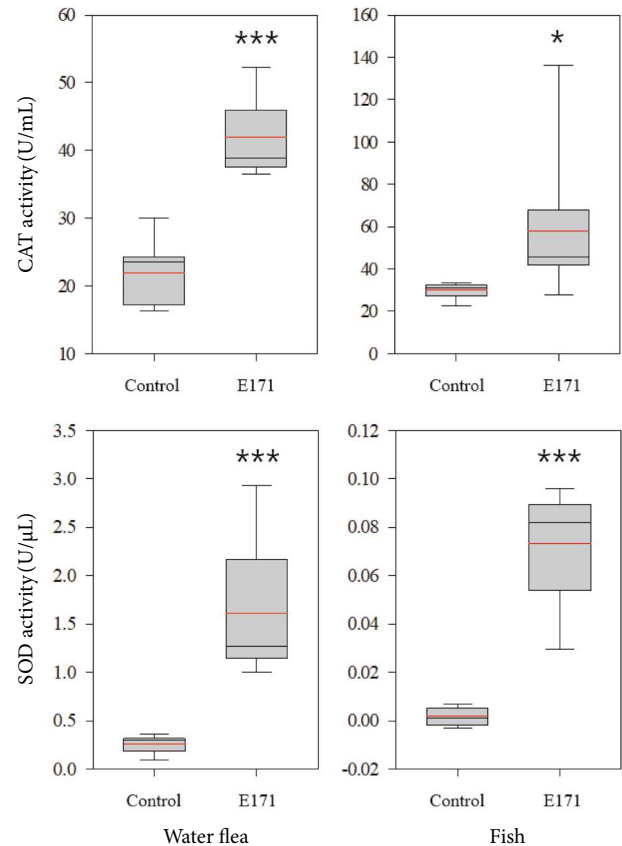


Fig. 3. Catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activity in water flea ($n=4$) and fish ($n=3$) after to 100 mg L⁻¹ of E171. The red and black lines represent the mean and median values, respectively. *, **, and *** indicate statistically significant differences from control values at $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.005$, respectively.

위장 내 SOD 효소의 활성이 대조군과 비교하여 149.6%로 증가하였으며, 평균 직경이 25 nm인 TiO₂의 경우 간 조직 내 CAT와 SOD 효소의 활성이 각각 132.3%, 126.2%로 증가하는 것이 확인되었다(Xiong *et al.* 2011; Tang *et al.* 2019). 따라서, E171이 선행 연구 결과와 동일하게 수생물에 산화스트레스를 유발하여 항산화효소를 활성화한다는 것을 확인하였다.

4. 결 론

본 연구에서는 식품첨가제로 사용되고 있는 이산화타이타늄 혼합물인 E171의 수생물에 대한 독성을 파악하기 위해 나노물질의 특성을 반영한 최신 표준문건을 활용

하여 기존 시험법의 한계점을 보완한 최적의 독성시험을 수행하였다. 먼저, 분산제의 첨가 및 배지 교체주기 설정을 통해 독성시험에서 요구하는 충분한 분산 안정성을 확보한 후, 물벼룩과 어류의 독성시험을 진행한 결과, E171에 노출된 물벼룩에서 유영저해가 발생했지만, 어류의 경우 치사나 이상행동개체가 관찰되지 않았다. 또한, 생체 내 ROS 생성, 항산화효소 활성 및 관련 유전자 발현 분석 결과, E171은 물벼룩과 어류에 모두 산화스트레스를 유발하며 이의 방어작용으로 항산화효소의 활성이 증가하는 것을 확인하였으나, 항산화효소 관련 유전자의 발현 여부는 생물종에 따라 차이가 존재함을 확인하였다. 따라서, 본 연구 결과를 통해 E171은 실제 환경적 현실성을 고려한 농도에서 수생물에 산화스트레스를 유도할 수 있으나, 생물체의 종류에 따라 가시적인 독성의 정도와 산화스트레스 관련 유전자 발현에 차이가 존재함을 확인하였다. 다만, 본 연구에서 다루지 않은 저농도의 E171의 노출에 의한 수생물 내 산화스트레스 발생 유무와 만성독성의 추가적인 연구 및 산화스트레스 관련 효소의 활성과 유전자 발현의 상관관계에 대한 구체적인 독성기전의 해석이 필요할 것으로 판단된다.

적 요

식품첨가제로 주로 사용되는 이산화타이타늄 혼합물인 최근 E171은 체내 축적 및 유전 독성을 야기할 수 있다는 사실이 입증되어, 현재 규정 개정을 통해 E171의 식품첨가물 사용이 제한되고 있다. 그러나, 현재까지 E171의 인체 위해성 연구는 많이 진행된 반면, E171의 환경생물에 미치는 독성 연구는 상대적으로 부족한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 최근 우려되는 잠재적 독성물질인 E171의 환경적 위해성을 파악하기 위해 수생태계를 대표하는 물벼룩(*Daphnia magna*)과 제브라피쉬(*Danio rerio*)를 대상으로 나노물질의 특성을 반영한 최신 표준문건을 활용하여 기존 시험법의 한계점을 보완한 최적의 독성시험을 수행하였다. 독성시험 결과, 실제 환경적 현실성을 고려한 농도 범위의 E171에 노출된 물벼룩에서 유영저해가 발생했지만, 어류의 경우 치사나 이상행동개체가 관찰되지 않았다. 그러나, 산화스트레스 관련 분자생물학적 분석 결과, E171이 물벼룩과 어류에 모두 산화스트레스를 유발하여 이의

방어작용으로 항산화효소의 활성이 증가하는 것을 확인하였다. 다만, 항산화효소 관련 유전자의 발현 여부는 생물종에 따라 차이가 존재하였다. 따라서, 본 연구 결과를 통해 E171은 실제 환경적 현실성을 고려한 농도에서 수생물에 산화스트레스를 유도할 수 있으나, 생물체의 종류에 따라 가시적인 독성의 정도와 산화스트레스 관련 유전자 발현에 차이가 존재함을 확인하였다. 본 연구는 기존 시험법의 한계점을 보완한 최적의 독성시험을 통해 E171이 수생물에 미치는 위험성을 확인하였으며, 이 결과는 E171의 환경 위해성 평가를 위한 과학적 자료로서 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

CRedit authorship contribution statement

IG Song: Investigation, Visualization, Writing - original draft. K Kim: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing - original draft. H Yoon: Conceptualization, Methodology, Writing - original draft, Writing - review & editing. JW Park: Resources, Supervision, Writing - review & editing, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

사 사

본 연구는 한국연구재단 (과제번호: NRF-2015M3A7B6027948)과 국토교통부/국토교통과학-기술진흥원 (과제번호: RS-2020KA156177)의 지원으로 수행되었습니다.

REFERENCES

- Aksakal E, D Ekinci and CT Supuran. 2021. Dietary inclusion of royal jelly modulates gene expression and activity of oxidative stress enzymes in zebrafish. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* 36:885-894. <https://doi.org/10.1080/14756366.2021.1900167>
- Al-Ammari A, L Zhang, J Yang, F Wei, C Chen and D Sun. 2021. Toxicity assessment of synthesized titanium dioxide nanoparticles in fresh water algae *Chlorella pyrenoidosa* and a zebrafish liver cell line. *Ecotox. Environ. Safe.* 207:112037.

- <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112037>
- Baetke SC, T Lammers and F Kiessling. 2015. Applications of nanoparticles for diagnosis and therapy of cancer. *Br. J. Radiol.* 88:20150207. <https://doi.org/10.1259/bjr.20150207>
- Barber DJ and IC Freestone. 1990. An investigation of the origin of the colour of the *Lycurgus Cup* by analytical transmission electron microscopy. *Archaeometry* 32:33–45. <https://doi.org/10.1111/j.1475-4754.1990.tb01079.x>
- Bhattacharjya S, T Adhikari, A Sahu and AK Patra. 2021. Ecotoxicological effect of TiO₂ nano particles on different soil enzymes and microbial community. *Ecotoxicology* 30:719–732. <https://doi.org/10.1007/s10646-021-02398-2>
- Blaznik U, S Krušič, M Hribar, A Kušar, K Žmitek and I Pravst. 2021. Use of food additive titanium dioxide (E171) before the introduction of regulatory restrictions due to concern for genotoxicity. *Foods* 10:1910. <https://doi.org/10.3390/foods10081910>
- Brunet L, DY Lyon, EM Hotze, PJJ Alvarez and MR Wiesner. 2009. Comparative photoactivity and antibacterial properties of C60 fullerenes and titanium dioxide nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 43:4355–4360. <https://doi.org/10.1021/es803093t>
- Chavan S, V Sarangdhar and V Nadanathangam. 2020. Toxicological effects of TiO₂ nanoparticles on plant growth promoting soil bacteria. *Emerg. Contam.* 6:87–92. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2020.01.003>
- Dudefoi W, K Moniz, E Allen-Vercoe, MH Ropers and VK Walker. 2017. Impact of food grade and nano-TiO₂ particles on a human intestinal community. *Food Chem. Toxicol.* 106:242–249. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.05.050>
- ECHA. 2017. Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment Appendix R7-1 for Nanomaterials Applicable to Chapter R7b Endpoint Specific Guidance Version 2.0. European Chemicals Agency. Helsinki, Finland. <https://doi.org/10.2823/080237>
- EFSA. 2021. Safety Assessment of Titanium Dioxide (E171) as a Food Additive. *EFSA J.* 19:130. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6585>
- EPA, US. 2016a. Ecological Effects Test Guidelines; OCSPP 850.1010 Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.
- EPA, US. 2016b. Ecological Effects Test Guidelines; OCSPP 850.1075 Freshwater and Saltwater Fish Acute Toxicity Test.
- Federici G, BJ Shaw and RD Handy. 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquat. Toxicol.* 84:415–430. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.07.009>
- Fiordaliso F, P Bigini, M Salmona and L Diomede. 2022. Toxicological impact of titanium dioxide nanoparticles and food-grade titanium dioxide (E171) on human and environmental health. *Environ. Sci. Nano* 9:1199–1211. <https://doi.org/10.1039/d1en00833a>
- García-García S, S Wold and M Jonsson. 2009. Effects of temperature on the stability of colloidal montmorillonite particles at different pH and ionic strength. *Appl. Clay Sci.* 43:1. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2008.07.011>
- Grand View Research. 2021. Market Analysis Report: Titanium Dioxide Market Size, Share & Trends Analysis Report by Grade (Anatase, Rutile), by Production Process (Sulfate, Chloride), by Application (Paints & Coatings, Plastics) by Region, and Segment Forecasts, 2021–2028. Grand View Research. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/titanium-dioxide-industry/toc>
- Greenbaum D, C Colangelo, K Williams and M Gerstein. 2003. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol.* 4:1–8.
- Griffitt RJ, K Hyndman, ND Denslow and DS Barber. 2009. Comparison of molecular and histological changes in zebrafish gills exposed to metallic nanoparticles. *Toxicol. Sci.* 107:404–415. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn256>
- Han HY, MJ Yang, C Yoon, GH Lee, DW Kim, TW Kim, M Kwak, MB Heo, TG Lee, S Kim, JH Oh, HJ Lim, I Oh, S Yoon and EJ Park. 2021. Toxicity of orally administered food-grade titanium dioxide nanoparticles. *J. Appl. Toxicol.* 41:1127–1147. <https://doi.org/10.1002/jat.4099>
- Hou J, L Wang, C Wang, S Zhang, H Liu, S Li and X Wang. 2019. Toxicity and mechanisms of action of titanium dioxide nanoparticles in living organisms. *J. Environ. Sci. (China)* 75:40–53. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.06.010>
- Hong NH, YJ Jung and JW Park. 2016. Ecotoxicity assessment of silver nanomaterials with different physicochemical characteristics in diverse aquatic organisms. *Korean J. Environ. Biol.* 34:183–192. <https://doi.org/10.11626/KJEB.2016.34.3.183>
- Hund-Rinke K, C Nickel and D Kühnel. 2017. Considerations About the Relationship of Nanomaterial's Physical-Chemical Properties and Aquatic Toxicity for the Purpose of Grouping. *Umweltbundesamt. UBATEXTE.* 102:2017.
- Joudeh N and D Linke. 2022. Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *J. Nanobiotechnol.* 20:1–29. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01477-8>
- Lee SH and BG Lee. 2021. Bioaccumulation of Ag and Zn in earthworms (*Eisenia fetida*) from soil contaminated with Ag and Zn nanoparticles using a radiotracer method. *Korean J. Environ. Biol.* 39:550–558. <https://doi.org/10.11626/KJEB.2021.39.4.550>
- Lee SW, SM Kim and J Choi. 2009. Genotoxicity and ecotoxicity assays using the freshwater crustacean *Daphnia magna*

- and the larva of the aquatic midge *Chironomus riparius* to screen the ecological risks of nanoparticle exposure. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 28:86–91. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.03.001>
- Lu Y, H Zhang, H Wang, N Ma, T Sun and B Cui. 2021. Humic acid mediated toxicity of faceted TiO₂ nanocrystals to *Daphnia magna*. *J. Hazard. Mater.* 416:126112. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126112>
- Luo M, X Qi, T Ren, Y Huang, AA Keller, H Wang, B Wu, H Jin and F Li. 2017. Heteroaggregation of CeO₂ and TiO₂ engineered nanoparticles in the aqueous phase: Application of turbiscan stability index and fluorescence excitation-emission matrix (EEM) spectra. *Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.* 533:9–19. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.08.014>
- Ma H, A Brennan and SA Diamond. 2012. Photocatalytic reactive oxygen species production and phototoxicity of titanium dioxide nanoparticles are dependent on the solar ultraviolet radiation spectrum. *Environ. Toxicol. Chem.* 31:2099–2107. <https://doi.org/10.1002/etc.1916>
- Manier N, A Bado-Nilles, P Delalain, O Aguerre-Chariol and P Pandard. 2013. Ecotoxicity of non-aged and aged CeO₂ nanomaterials towards freshwater microalgae. *Environ. Pollut.* 180:63–70. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.04.040>
- Musial J, R Krakowiak, DT Mlynarczyk, T Goslinski and BJ Stanisz. 2020. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products - what do we know about their safety? *Nanomaterials* 10:1–23. <https://doi.org/10.3390/nano10061110>
- Nguyen TMP, P Lemaitre, M Kato, K Hirota, K Tsukagoshi, H Yamada, A Terabe, H Mizutani and S Kanehira. 2021. Preparation of anatase titanium dioxide nanoparticle powders submitting reactive oxygen species (ROS) under dark conditions. *Mater. Sci. Appl.* 12:89–100. <https://doi.org/10.4236/msa.2021.122006>
- OECD GD No. 317. 2021. Guidance Document on Aquatic and Sediment Toxicological Testing of Nanomaterials. Organisation for Economic Co-operation and Development.
- OECD GD No. 318. 2020. Guidance Document for the Testing of Dissolution and Dispersion Stability of Nanomaterials and the Use of the Data for Further Environmental Testing and Assessment Strategies. Organisation for Economic Co-operation and Development.
- OECD TG No. 202. 2004. *Daphnia* sp. Acute Immobilization Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Organisation for Economic Co-operation and Development. <https://doi.org/10.1787/9789264069947-en>
- OECD TG No. 203. 2019. Fish, Acute Toxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Organisation for Economic Co-operation and Development. <https://doi.org/10.1787/9789264069961-en>
- Ong WJ, N Zheng and M Antonietti. 2021. Advanced nanomaterials for energy conversion and storage: Current status and future opportunities. *Nanoscale* 13:9904–9907. <https://doi.org/10.1039/d1nr90103f>
- Ortelli S, A Costa, I Zanoni, M Blosi, O Geiss, I Bianchi, D Mehn, F Fumagalli, G Ceccone, G Guerrini and L Calzolari. 2021. TiO₂@BSA nano-composites investigated through orthogonal multi-techniques characterization platform. *Colloid Surf. B-Biointerfaces* 207:112037. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112037>
- Pakrashi S, S Dalai, TC Prathna, S Trivedi, R Myneni, AM Raichur, N Chandrasekaran and A Mukherjee. 2013. Cytotoxicity of aluminium oxide nanoparticles towards fresh water algal isolate at low exposure concentrations. *Aquat. Toxicol.* 132:34–45. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.01.018>
- Praetorius A, A Gundlach-Graham, E Goldberg, W Fabienke, J Navratilova, A Gondikas, R Kaegi, D Günther, T Hofmann and VDK Frank. 2017. Single-particle multi-element fingerprinting (spMEF) using inductively-coupled plasma time-of-flight mass spectrometry (ICP-TOFMS) to identify engineered nanoparticles against the elevated natural background in soils. *Environ. Sci. Nano* 4:307–314. <https://doi.org/10.1039/c6en00455e>
- Proquin H, C Rodríguez-Ibarra, CGJ Moonen, IM Urrutia Ortega, JJ Briedé, TM de Kok, H van Loveren and YI Chirino. 2017. Titanium dioxide food additive (E171) induces ROS formation and genotoxicity: contribution of micro and nano-sized fractions. *Mutagenesis* 32:139–149. <https://doi.org/10.1093/MUTAGE/GEW051>
- Richter V, A Potthoff, W Pompe, M Gelinsky, H Ikonomidou, S Bastian, K Schirmer, S Scholz and J Hofinger. 2008. Evaluation of health risks of nano- and microparticles. *Powder Metall.* 51:8–9. <https://doi.org/10.1179/174329008X286640>
- Schneider J, M Matsuoka, M Takeuchi, J Zhang, Y Horiuchi, M Anpo and DW Bahnemann. 2014. Underst-anding TiO₂ photocatalysis mechanisms and materials. *Chem. Rev.* 114:9919–9986. <https://doi.org/10.1021/cr5001892>
- Skocaj M, M Filipic, J Petkovic and S Novak. 2011. Titanium dioxide in our everyday life; Is it safe? *Radiol. Oncol.* 45:227–247. <https://doi.org/10.2478/v10019-011-0037-0>
- Su S, WWu, J Gao, J Lu and C Fan. 2012. Nanomaterials-based sensors for applications in environmental monitoring. *J. Mater. Chem.* 22:18101–18110. <https://doi.org/10.1039/C2JM33284A>
- Tang T, Z Zhang and X Zhu. 2019. Toxic effects of TiO₂ NPs on Zebrafish. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 16:523. <https://doi.org/10.3390/ijerph16040523>
- Taurozzi JS, VA Hackley and M Wiesner. 2012a. Preparation of Nanoparticle Dispersions from Powdered Material Using Ultrasonic Disruption (Version 1.1). National Institute of Stan-

- dards and Technology Special Publication. 1200-2. <https://doi.org/10.6028/NIST.SP.1200-2>
- Taurozzi JS, VA Hackley and M Wiesner. 2012b. Preparation of a Nanoscale TiO₂ Aqueous Dispersion for Toxicological or Environmental Testing (Version 1.2). National Institute of Standards and Technology Special. Publication. 1200-3. <https://doi.org/10.6028/NIST.SP.1200-3>
- Taurozzi JS, VA Hackley and M Wiesner. 2012c. Preparation of Nanoscale TiO₂ Dispersions in Biological Test Media for Toxicological Assessment (Version 1.1). National Institute of Standards and Technology Special. Publication. 1200-4. <https://doi.org/10.6028/NIST.SP.1200-4>
- Valavanidis A, T Vlahogianni, M Dassenakis and M Scoullou. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64:178–189. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.013>
- Venator. 2013. Product data sheet of HOMBITAN®FG. www.venatorcorp.com.
- Xiong D, T Fang, L Yu, X Sima and W Zhu. 2011. Effects of nanoscale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. *Sci. Total Environ.* 409:1444–1452. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.01.015>
- Yoo JW, JS Cha, HR Kim, JW Pyo and YM Lee. 2019. Modulation of antioxidant defense system in the brackish water flea *Diaphanosoma celebensis* exposed to bisphenol A. *Korean J. Environ. Biol.* 37:73–81. <https://doi.org/10.11626/KJEB.2019.37.1.072>
- Yuan Y, Y Gao, L Mao and J Zhao. 2008. Optimisation of conditions for the preparation of β -carotene nanoemulsions using response surface methodology. *Food Chem.* 107:1300–1306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.015>
- Zhao X, S Wang, Y Wu, H You and L Lv. 2013. Acute ZnO nanoparticles exposure induces developmental toxicity, oxidative stress and DNA damage in embryo-larval zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 136:49–59. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.03.019>
- Zhao Y, Z Wang, D Li, W Feng, X Bian and J Xu. 2019. Two PBDEs exposure inducing feeding depression and disorder of digestive and antioxidative system of *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 176:279–287. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.03.116>
- Zhu X, L Zhu, Y Chen and S Tian. 2009. Acute toxicities of six manufactured nanomaterial suspensions to *Daphnia magna*. *J. Nanopart. Res.* 11:67–75. <https://doi.org/10.1007/s11051-008-9426-8>