새로운 식품원료인 아메리카왕거저리 유충 탈지분말의 *In Vivo* 독성시험

김선영^{1*} · 곽규원^{1*} · 강 건² · 오윤식² · 윤형주¹ · 김용순¹ · 박관호¹ · 김은선¹ · 김선돈²

¹농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부 곤충산업과

²(주)켄온 비임상연구소 안전성약리센터

In Vivo Toxicity Study of Freeze-Dried Skimmed Powder of *Zophobas atratus* Larvae (frpfdZAL), a Novel Food Source

Sun Young Kim^{1*}, Kyu-Won Kwak^{1*}, Gun Kang², Yun-Shik Oh², Hyung Joo Yoon¹,
Yong-Soon Kim¹, Kwanho Park¹, Eunsun Kim¹, and Sun-Don Kim²

¹Industrial Insect Division, Department of Agricultural Biology, National Institute of
Agricultural Sciences, Rural Development Administration

²Safety Pharmacology Center, Nonclinical Research Institute, Chemon Inc.

ABSTRACT *Zophobas atratus* (Coleoptera: Tenebrionidae), the giant mealworm beetle, has been recognized as an edible insect with a high protein content for new human food source and animal feed. On the other hand, the potential toxicity and food safety of *Z. atratus* is not well understood. Therefore, this study evaluated the toxicity of freeze-dried skimmed powder of *Z. atratus* larvae (frpfdZAL), known as the super mealworm, using different model approaches, including acute oral toxicity studies in SD rats and Beagle dogs and skin sensitization in Hartley guinea pigs (Buehler's method) in accordance with the OECD guidelines and the principles of Good Laboratory Practice. No toxicological changes were observed in the clinical signs, body weights, and gross findings in acute single-dose administration in SD rats and Beagle dogs. In addition, skin sensitization rate was 0%, and its sensitization potential was classified as grade I (very weak) using Buehler's method. In conclusion, frpfdZAL is safe with no adverse effects and can be applied as an edible ingredient for animal feed or used for other biological purposes.

Key words: edible insect, *Zophobas atratus*, food safety, acute oral toxicity, skin sensitization

서 론

국제연합식량농업기구(FAO) 보고서에 따르면 2050년대에 세계인구가 90억에 달하며 지금의 2배 이상의 식량이 소요될 것으로 예측하였고 이에 대비하여 곤충을 미래식량자원으로 지정하였다(Alstron 등, 2009). 곤충은 영양학적으로 양질의 단백질, 불포화지방산, 미네랄, 비타민 등이 함유되어 있다고 알려져 있고, 가축보다 적은 양의 온실가스, 암모니아 가스를 방출한다고 보고하였다(Ghaly와 Alkokaik, 2009; MacEvilly, 2000; Nonaka, 2009). 이러한 식용곤충 활용은 가축에 비해 단백질 함량은 유사하나 지구온난화, 대기 및 수질 오염, 토지 황폐화 등과 같은 환경오염 피해가 감소하여 환경친화적인 장점이 있다(Nakagaki와 Defoliart, 1991). 전 세계 113개국에서 곤충이 섭취되고 있고

현재까지 국내 식품공전에 등록된 곤충은 누에 유충과 번데기, 벼메뚜기, 백강잠, 갈색거저리 유충, 흰점박이꽃무지 유충, 장수풍뎅이 유충, 쌍별귀뚜라미이며, 2020년에 아메리카왕거저리 유충 탈지분말과 수벌 번데기가 한시적 식품원료로 추가되어 식용 가능한 곤충은 총 9종이다. 특히 벨기에에서는 아메리카왕거저리의 영양성과 안전성이 인정되어 법적으로 허용된 상황이다(Kim 등, 2020a).

아메리카왕거저리는 완전변태 곤충으로 딱정벌레목(Coleoptera) 거저리과(Tenebrionidae)에 속한다. 갈색거저리(*Tenebrio molitor*)보다 약 3~4배 더 큰 형태의 대형 거저리류이며 중남미에 주로 분포한다(Park 등, 2013). 이러한 아메리카왕거저리는 맥주박으로 사육되었을 때 영양성이 우수함을 확인하였고(Kim 등, 2018), 최근의 연구를 통해 탈지 후 일반성분, 아미노산 등의 영양성분이 풍부하며, 중금속, 병원성 미생물 등의 유해성이 없음을 확인하였다. 탈지 후 아메리카왕거저리 유충은 조지방을 제외한 모든 영양성분에서 탈지 전 유충보다 1.2~1.6배 많았고, 아미노산과 무기질 함량 역시 1.1~1.3배, 1.1~1.4배 높은 것으로 확인되었다. 탈지 전후 아메리카왕거저리 유충은 조단백질 함량이 갈색거저리 또는 장수풍뎅이보다 1.1~1.5배 높았고, 필

Received 9 Feb 2021; Accepted 12 Mar 2021

Corresponding author: Sun-Don Kim, Safety Pharmacology Center, Nonclinical Research Institute, Chemon Inc., 240, Nampyeong-ro, Yangji-myeon, Cheoin-gu, Yongin-si, Gyeonggi 17162, Korea, E-mail: sunkim@chemon.co.kr

*These authors contributed equally to this work.

수아미노산, 불포화지방산 등의 영양성분도 풍부하게 나타났다(Kim 등, 2019). 한편, 아메리카왕거저리의 주 먹이원인 밀기울과 어분, 소르빈산, methyl-*p*-hydroxybenzoate, 식용유, agar 등을 첨가한 인공사료와 밀기울만 먹인 유충의 영양성분을 비교한 결과, 인공사료를 먹인 군의 조단백질, 탄수화물, 식이섬유 등의 영양성분이 전반적으로 우수하였다. 특히 필수아미노산 9종이 밀기울을 먹인 군에 비해 1.3~1.9배 높았으며, 불포화지방산은 두 군간 큰 차이가 없었다(Kim 등, 2020b). 이러한 결과를 토대로 식용곤충은 먹이원에 따라 영양학적 가치가 달라지며, 식용곤충을 섭취할 경우 그에 따른 잠재적인 독성 혹은 면역 반응이 고려되어야 할 것이다.

식용곤충 중 국내외 활용 빈도가 높은 갈색거저리 유충, 쌍별귀뚜라미 추출물의 안전성을 평가한 결과, 설치류에서 최대 농도인 3,000 mg/kg/d를 90일 투여 시 부작용이 나타나지 않았다(Han 등, 2016; Yu 등, 2020). 장수풍뎅이 유충에서도 최대 농도 2,500 mg/kg/d를 설치류에 90일간 투여 시 부작용이 나타나지 않았다(Noh 등, 2015). 또한, 아메리카왕거저리 유충 탈지분말을 최대 5,000 mg/kg/d를 90일간 설치류에 투여 시 시험물질 투여에 의한 독성이 나타나지 않았고, 알레르기 반응에 의한 면역글로불린 E의 수치도 정상으로 확인되었다(Kim 등, 2020c).

그러나 현재 전 세계적으로 식용곤충의 안전성을 보증하는 정부 규정, 식용곤충의 표준화 및 품질 관리 등의 전반적인 시스템은 부족한 실정이다(Kim 등, 2020c). 예를 들면, 중국에서는 매년 1,000명 이상의 환자가 누에 번데기를 섭취한 후 아나필락시스 반응을 경험하는 것으로 보고되었다(Ji 등, 2008). 스페인에서는 기생충 부위를 함유한 렌즈콩의 흡입 또는 섭취와 관련된 알레르기 증상에 대한 연구도 확인되었다(Armentia 등, 2006). 이러한 고단백질 식품 섭취로 인한 알레르기뿐만 아니라 여러 독성반응에 대한 심층적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

이처럼 신소재 식품(novel food) 또는 동물 사료의 단백질 공급원으로 활용되기 위해 안전성 검증을 위한 더욱 구체적인 독성시험 연구가 필요하다. 따라서 본 연구에서 설치류를 이용한 13주 아만성 독성평가 및 알레르기 반응 평가(Kim 등, 2020c) 결과를 바탕으로 아메리카왕거저리 유충 탈지분말에 대한 설치류(SD 랫드) 및 비설치류(Beagle dog)의 단회 경구독성시험, 기니피그를 이용한 피부감작성 시험을 수행하였다. 결과적으로 본 논문에서 아메리카왕거저리 유충 탈지분말의 설치류 및 비설치류 단회 독성시험과 피부감작성 시험을 통하여 독성학적 안전성 평가를 구체화하였다.

재료 및 방법

frpfdZAL의 조제 및 분석

아메리카왕거저리 10령 유충을 경기도(용인 소재)와 전라남도(담양 소재) 농가에서 구입하였다. 구입한 유충은 순

화를 위해 온도 $26\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 65%, 광주기 12L:12D의 국립농업과학원 곤충산업과 사육실에서 플라스틱 사육상자(가로 $27\times$ 세로 $36\times$ 높이 8 cm)에 넣어 2일간 사육하였다. 순화된 유충을 2일간 절식시킨 후 체반을 이용하여 분변을 분리하고 흐르는 물에 2회 세척한 다음 물기를 제거하였다. 이처럼 전처리된 유충을 115°C , 0.9 kgf/cm^2 로 5~15분 동안 가압증기멸균기(Tomy Kogyo Co., Ltd., Tokyo, Japan)로 고온고압 멸균하고 영하 70°C 의 초저온 냉동고(Nihon Freezer, Tokyo, Japan)에서 24시간 이상 보관하였다. 그런 다음 동결건조기(IlShinBioBase, Dongducheon, Korea)를 이용하여 약 65시간 동안 건조시켰다. 아메리카왕거저리의 경우 지방이 많아 분말 제조 등 식용 소재로 사용하는 데 문제점이 있었다. 이를 해결하기 위해 아메리카왕거저리 유충을 탈지하여 분말을 제조하였다. 탈지 후 유충 제조는 동결건조한 유충(10령 기준, 조지방 36.3% 함유)을 120°C , 60 mPa로 30분 동안 유압식 착유기(National Engineering Co., Ltd., Goyang, Korea)로 착유하였다. 그런 다음 100 메쉬로 분쇄기(Goryeo Industry, Siheung, Korea)에 분쇄하여 21.2%의 조지방을 함유한 유충 탈지분말을 제조하였다. 유충 탈지분말의 성상은 이미, 이취가 없으며, 고유의 풍미와 냄새가 있는 회갈색이었다. 아메리카왕거저리 유충 탈지분말의 안전성 검증을 위해 식중독균에 속하는 대장균(*Escherichia coli* O157:H7), 대장균군(Coliform group), 살모넬라균(*Salmonella* spp.), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 곰팡이독소인 총 아플라톡신과 오클라톡신 A, 중금속에 속하는 납(Pb), 카드뮴(Cd), 비소(As), 수은(Hg)을 분석하였다. 분말은 칭량한 후 목표 농도에 이르기까지 homogenizer와 vortexer로 부형제(멸균증류수) 안에 균질하게 현탁시켰다.

실험동물의 사육 및 관리

본 시험에 사용된 모든 동물은 특정 병원체 부재(specific-pathogen free) 환경에서 온도 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55\pm 15\%$, 환기 횟수 10~20회/h, 조명시간 12시간(오전 8시 점등~오후 8시 소등) 및 조도 150~300 Lux로 유지되는 (주)캠온 비임상연구소 동물실에서 사육하였다. 동물공급처에서 제공한 '시험계의 병원체 검사 성적서'와 사료, 물 및 오염물질에 대한 검사에서 시험 결과에 영향을 줄 만한 이상은 관찰되지 않았다.

동물시험은 '생명윤리 및 안전에 관한 법률'에 따라 (주)캠온 비임상연구소의 실험동물윤리위원회의 승인을 받아 진행하였으며 동물관리 규정을 준수하였다(설치류 시험: 18-R629, 비설치류 시험: 18-D537, 피부감작성 시험: 19-G199).

특정 병원체 부재 Sprague-Dawley(SD) 랫드는 (주)샘타코 바이오코리아(Osan, Korea)에서 암수 각 22마리씩 입수하여 실험실 내에 6일간 일반사료 및 물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 순화 및 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

Beagle dog는 (주)오리엔트바이오(Seongnam, Korea)에서 입수하여 동물실 내에 14일간 일반사료 및 물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 순화 및 적응시킨 후, 일반증상을 관찰하여 체중감소가 없고 혈액 및 혈액생화학 검사에서 이상이 없는 건강한 Beagle dog 암수 2마리씩 선별하여 실험에 사용하였다.

특정 병원체 부재 Hartley 기니피그는 (주)샘타코 바이오코리아에서 수컷 22마리를 입수하여 실험실 내에 7일간 일반사료 및 물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 순화 및 적응시킨 후 건강하다고 판단되는 동물만을 실험에 사용하였다.

실험동물의 관리 및 독성시험은 식품의약품안전처 고시 의약품 등의 독성시험기준(제2017-71호; MFDS, 2017)과 비임상시험관리기준(ENV/MC/CHEM(98)17; OECD, 1997)에 따라 수행하였다(Ha 등, 2020; Kang 등, 2020).

SD 랫드의 단회 독성시험

시험물질인 frpfdZAL을 예비시험 결과를 토대로 1,000, 2,500 및 5,000 mg/kg의 용량으로 투여하는 시험물질 투여군과 멸균주사용수만 투여하는 부형제대조군을 설정하였고, 군당 10마리(암수 각 5마리)에 4개군을 설정하였다. 시험물질인 frpfdZAL을 멸균주사용수에 용해해 10 mL/kg의 용량으로 overnight 절식(대략 16~20시간 절식, 음수는 제공함) 후 경구투여용 존대를 장착한 syringe tube를 이용하여 단회 경구투여하였다. 식이와 음수에 따른 시험물질인 frpfdZAL의 변화를 최소화하기 위해 투여 후 3~4시간 후에 사료와 음수를 공급하였다. 모든 실험동물에 대해 시험물질인 frpfdZAL을 투여 후 사망률을 포함하여 동물의 행동, 자세 및 보행 이상 등에 일반증상을 하루에 최소한 1회 이상 관찰하였고 그 증상을 기록하였다. 모든 실험동물의 체중을 투여 직전과 투여 후 Day 1, 2, 4, 8, 15에 각각 측정 및 기록하였다. 또한, Day 15에 살아있는 모든 실험동물에 대해 CO₂로 안락사 후 모든 장기에 대해서 육안소견을 각각 관찰 및 기록하였다(Ha 등, 2020; Kang 등, 2020).

Beagle dog에 용량 증가(dose escalation, DE)법을 이용한 단회 독성시험

시험물질 frpfdZAL을 예비시험 결과를 토대로 Beagle dog에 DE법을 이용하여 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg으로 투여하는 시험물질 투여군을 설정하였고, 암수 각 2마리에 용량 증가법을 이용하여 캡슐로 단회 경구투여하였다. 시험물질 frpfdZAL을 1차(1,250 mg/kg) 및 2차(1차 투여 후 Day 1에 2,500 mg/kg) 경구투여 후 모든 동물에 대해 매일 2회 이상 사망률을 포함하여 일반증상을 관찰 및 기록하였고, 체중은 투여 직전 및 Day 1, 2, 4, 7일에 각각 측정 및 기록하였다. 2차 투여 후 Day 1에 시험물질 frpfdZAL을 5,000 mg/kg으로 3차 투여하였다. 3차 투여 후 2주간 사망을 포함한 일반증상을 매일 2회 이상 관찰 및 기록하였고 체중측정은 투여 전 및 Day 1, 2, 4, 8, 15에 측정하였다.

Day 15에 살아 있는 모든 동물에 펜토바르비탈(Entobar, Hanlim Pharm. Co., Ltd., Yongin, Korea)을 이용하여 안락사 후에 모든 장기에 대해서 육안소견을 각각 관찰 및 기록하였다(Song 등, 2005).

Hartley계 기니피그를 이용한 피부감작성 시험(Buehler 법)

시험물질 frpfdZAL에 대하여 면역독성 평가의 일환으로 접촉성 과민반응 유발의 가능성을 확인하기 위해 접촉성 알레르기 시험에 많이 사용되는 동물인 기니피그를 사용하였고, 피부감작성 반응 평가는 일반적으로 사용되는 경피투여를 선택하여 홍반, 가피 및 부종의 형성 정도를 평가하였다(OECD, 1992). 시험물질 및 양성대조물질의 경우 시험물질은 멸균주사용수, 양성대조물질 DNCB(1-chloro-2,4-dinitrobenzene)는 80% 에탄올 용액(감작 유도 시) 또는 100% 아세톤(야기 유도 시)을 사용하여 각각 50% 용액을 만들었다. 감작 및 야기 부위에 부형제, 시험물질 및 양성대조물질을 각각 2.0×3.0 cm/0.5 mL로 철포용 거즈위에 도포한 다음 약 6시간 동안 폐쇄 철포하였다. 감작 및 야기한 다음 야기 처치 제거 후 24, 48시간의 피부감작성을 평가하였다. 피부반응 및 피부감작성을 비교 평가하기 위해 부형제대조군 및 양성대조군을 두었으며 피부반응 및 피부감작성은 Table 1과 같은 평가 기준으로 홍반, 가피 및 부종의 형성을 관찰하였고 점수화 및 평가를 실시하였다.

통계방법

통계학적 분석은 상용으로 널리 사용되는 통계 패키지인 SPSS Statistics 22 for Medical Science(SPSS Inc., Chicago, IL USA)를 이용하였으며 유의수준은 $P < 0.05$ 로 설정하였다.

랫드 단회투여 독성시험의 경우 체중에 대해 자료의 정규성을 가정하고 모수적 일원분산분석(one-way ANOVA)을

Table 1. Grading scale of skin reaction and ranking and categorization of potential sensitization

Grading scale of skin reactions		
Response	Grade	
No visible change	0	
Discrete or patchy erythema	1	
Moderate and confluent erythema	2	
Intense erythema and swelling	3	

Ranking and categorization of potential sensitization		
Sensitization rate (%) ¹⁾	Grade	Category
0 ~ 8	I	Very weak
9 ~ 28	II	Weak
29 ~ 64	III	Moderate
65 ~ 80	IV	Strong
81 ~ 100	V	Very strong

¹⁾Sensitization rate (%) = (No. of sensitized animals/ No. of animals used) × 100.

적용하였으며, 사망 동물이 발생하지 않아 반수치사량은 산출하지 않았다. Beagle dog의 단회투여 독성시험은 군별 암수 각 2마리로 통계 분석을 위한 동물 수가 충분하지 않기 때문에 통계처리는 실시하지 않았다. 다만 기니피그의 피부 감작성 시험(Buehler 법)은 평가기준표(Table 1)에 따른 독성평가 방법이므로 통계처리는 실시하지 않았다.

결과 및 고찰

시험물질 frpfdZAL의 구성성분

시험물질 frpfdZAL의 조성 비율(Table 2)은 크게 조단백질(crude protein, 61.39%), 조지방(crude fat, 21.24%), 조섬유질(crude fiber, 7.04%), 회분(crude ash, 4.54%) 및 총 탄수화물(total carbohydrate, 3.45%) 등으로 나타났다. 특히 단백질의 함량이 다른 조성물의 함량에 비해 상대적으로

Table 2. General components of frpfdZAL

General components	Compositional average (%)
Moisture	2.34
Crude protein	61.39
Crude fat	21.24
Total carbohydrate	3.45
Crude ash	4.54
Crude fiber	7.04
Vitamin	Contents (mg/100 g)
Vitamin E (tocopherol)	1.20
Vitamin B ₃ (niacin)	203.24
Vitamin C	5.78
Mineral	Contents (mg/100 g or µg/100 g)
Calcium (Ca)	40.17
Phosphorus (P)	1,029.45
Potassium (K)	1,267.04
Magnesium (Mg)	257.28
Iron (Fe)	5.28
Zinc (Zn)	12.33
Copper (Cu)	1.22
Manganese (Mn)	1.45
Selenium (Se)	65.73 µg/100 g
Mycotoxin	Contents (µg/kg)
Total aflatoxins (aflatoxin B ₁ , B ₂ , G ₁ , and G ₂) and ochratoxin A	ND
Food poisoning bacteria	Qualitative analysis
<i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Coliform</i> group, <i>Salmonella</i> spp., <i>Staphylococcus aureus</i>	All negative
Heavy metal	Contents (mg/kg)
Lead (Pb)	0.03
Cadmium (Cd)	0.08
Arsenic (As)	0.02
Mercury (Hg)	ND

ND: Not detected.

로 높았다. 비타민 E, B₃ 및 C의 함량은 1.20, 203.24 및 5.78 mg/100 g으로 확인되었다. Mycotoxin 및 식중독균 등은 없는 것으로 확인되었다. 또한 중금속 함량도 미량으로 함유되어 있어 식품원료의 최저 기준치에 부합되는 수치로 확인되었다(Kim 등, 2019; Kim 등, 2020c).

본 시험에서 고려해야 할 사항은 시험물질 frpfdZAL의 단백질 함량으로 일반적인 단백질의 과량 또는 반복적인 섭취 등으로 인해 신장 및 간의 이상을 초래하는 것으로 알려졌다(Díaz-Rúa 등, 2017; Mutlu 등, 2006; Pesta와 Samuel, 2014). 특히 triglyceride 침착, 염증의 증가, 산-염기 평형의 이상, 신장 이상 등을 유발하는 것으로 보고되어 있다(Kalantar-Zadeh 등, 2020). 결론적으로 시험물질 frpfdZAL을 이용한 본 시험의 경구독성 및 Hartley계 기니피그의 피부에 직접적인 도포에 따른 독성학적인 변화는 관찰되지 않았을 뿐만 아니라 Kim 등(2020c)의 랫드를 이용한 13주 반복 경구투여 독성시험에서 일반증상, 혈액 및 혈액생화학 적 검사, 조직병리학적 검사에서 시험물질 frpfdZAL의 과량 노출에 따른 독성학적으로 특기할 만한 점은 관찰되지 않았다. 따라서 비임상시험 결과를 토대로 시험물질 frpfdZAL의 구성성분 중 독성을 유발할 만한 특정성분 또는 인자는 확인되지 않았다.

SD 랫드 단회투여 독성시험

SD 랫드에 시험물질 frpfdZAL을 고용량 5,000 mg/kg으로 두고 공비 2로 2,500 및 1,250 mg/kg으로 군 설정하여 경구투여 시 사망률은 시험 전 기간에 관찰되지 않았다. 또한 시험물질 frpfdZAL 투여와 관련된 일반증상은 시험 전 기간에 관찰되지 않았다. 체중 변화는 Table 3과 같이 Day 1, 2, 4, 8, 15에 체중 및 증체량 감소가 관찰되지 않았으며, 부검조건에서 시험물질에 의한 독성변화는 관찰되지 않았다.

그 외 탈모(loss of fur)가 5,000 mg/kg 투여군 암컷 1례에서 Day 15에 관찰되었으나 이는 발생 예가 적거나 동물시험 중에 관찰될 수 있는 일반증상으로 시험물질과 무관한 우발적인 변화로 사료된다(Lee 등, 2012). 따라서 시험물질 frpfdZAL을 SD 랫드에 단회 경구투여하였을 때 대략의 치사량(approximate lethal dose)은 암수 모두 5,000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단한다.

독성시험 중 단회투여 독성시험은 두 종 이상의 동물을 사용하도록 국내외의 식품의약품안전처를 포함하는 규제 기관 및 OECD 가이드라인에서 요구하고 있으며, 그중 한 종은 설치류, 또 다른 한 종은 비설치류를 제시하고 있다. 설치류에는 랫드가 현재 가장 많이 사용되고 있다. 따라서 SD 랫드를 이용한 시험물질 frpfdZAL에 대한 독성평가지험을 통해 최대 5,000 mg/kg 단회 경구투여 시 일반증상, 체중 변화 및 부검조건 등의 시험 결과를 바탕으로 시험물질에 의한 독성은 없는 것으로 판단한다.

Table 3. Body weights in SD rats

Day	Groups (mg/kg)			
	G1 (0)	G2 (1,000)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
Male				
1	237.73±10.60	240.50±9.77	239.08±5.36	239.56±6.75
2	270.57±12.20	271.93±10.43	272.59±10.21	275.24±5.88
4	279.40±11.33	281.99±8.87	284.78±10.29	285.62±7.96
8	302.34±17.84	305.49±8.69	302.55±13.68	308.53±11.21
15	333.83±18.88	338.97±11.51	338.29±20.62	344.14±13.66
Gain	96.09±12.71	98.47±3.78	99.21±20.48	104.57±10.67
N	5	5	5	5
Female				
1	174.21±10.71	174.20±11.33	177.10±12.35	178.52±9.13
2	189.55±13.18	195.27±13.90	197.68±10.93	198.99±11.85
4	195.37±10.97	195.34±11.68	199.85±12.21	196.56±7.55
8	201.33±13.03	198.63±8.46	207.79±14.22	202.84±7.12
15	213.14±9.51	212.50±12.98	220.13±12.65	219.06±13.25
Gain	38.93±5.09	38.30±6.10	43.03±2.22	40.53±6.33
N	5	5	5	5

The day of administration was designated Day 1.
Gain is body weight on Day 15 – body weight on Day 1.
Data are expressed as mean±SD.

Beagle dog에 DE법을 이용한 단회 독성시험

Beagle dog에 DE법에 의한 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg을 일주일 간격으로 단회 경구투여 시 사망 동물은 관찰되지 않았으며, 일반증상, 체중 변화 및 부검소견에서 시험물질에 의한 독성변화는 관찰되지 않았다.

그 외 사료 남김(remaining of food), 사료 구토(vomiting of food), 연변(soft stool) 및 설사(diarrhea)가 투여기간에 불규칙적으로 관찰되었다(Table 4). 체중 감소는 2,500 mg/kg 투여군 수컷 1례에서 투여 후 Day 4 및 7, 암컷 1례에서 투여 후 Day 7에 관찰되었으며, 5,000 mg/kg 투여군 수컷 전례에서 투여 후 각각 Day 4 및 15, 암컷 전례에서 투여 후 각각 Day 4 및 8, 15에서 관찰되었다(Table 4). 상기의 변화들은 Beagle dog를 사용하는 실험(Tams, 2003)에서 정상적으로 관찰될 수 있는 수준이었고, 5,000 mg/kg 투여 후 Day 2에 관찰된 설사의 경우 특기할 만한 체중 변화를 동반하지 않았기 때문에 시험물질에 의한 영향은 아닌 것으로 판단한다.

따라서 본 시험 조건에서 시험물질 frpfdZAL의 독성작용에 의한 이상이 관찰되지 않는 최대내성 용량(maximum tolerance dose)은 암수 Beagle dog에서 모두 5,000 mg/kg으로 판단한다.

독성시험 중 단회투여 독성시험은 시험물질을 실험동물에 단회투여 시 단기간 내에 나타나는 독성을 질적 및 양적으로 검사하는 시험을 말한다. Beagle dog는 독성시험에 적합한 실험동물로 일반독성시험에 널리 사용되고 있으며 풍부한 시험기초 자료가 축적되어 있어 시험 결과의 해석 및 평가에 유용하게 이용되고 있다(Song 등, 2005). 또한 설치류와 달리 치사량까지 투여할 수 없는 한계성으로 단회투여 독성시험

이후에 반복투여 독성시험의 용량 설정을 위한 시험으로 진행될 수 있다. 특히 Beagle dog에 DE법에 의한 단회 경구 투여하였을 때 나타나는 급성독성의 유무와 섭취량의 한계를 조사할 수 있는 장점이 있다. 따라서 Beagle dog를 이용한 시험물질 frpfdZAL에 대한 독성평가시험을 통해 최대내성 용량은 5,000 mg/kg으로 판단한다.

Hartley계 기니피그를 이용한 피부감작성 시험(Buehler 법)

시험물질 frpfdZAL에 의한 시험기간 중 모든 동물에서 사망 개체는 관찰되지 않았다. 또한 일반증상 및 체중 변화는 시험기간에 특기할 만한 독성변화가 관찰되지 않았다. 야기 부위에서 야기 처치 제거 후 시험물질을 제거하고 최종 관찰한 결과에서 시험물질 frpfdZAL에 의한 피부반응 및 감작성은 ‘매우 약함(1등급)’으로 평가하였다(Table 5). 반면, 양성대조군, DNCB의 경우 야기 부위에서 야기 처치 제거 후 약 24시간째에 모든 동물에서 grade 2인 홍반이 적용 부위 전체에 나타남이 관찰되었고(moderate and confluent erythema) 감작률 100%로 ‘매우 강함(V등급)’으로 평가하였으며, 48시간째 4례(#16, 18, 19, 20)에서 홍반이 적용 부위 전체에 나타남이 관찰되어 감작률 80%로 ‘강함(IV등급)’으로 평가하였다(Table 5).

피부감작성 시험(OECD, 1992)은 시험물질 등이 피부에 노출되어 항원에 의한 면역계가 과도하게 반응하는 알레르기성 접촉 피부염 및 아토피 피부염과 같은 유해영향을 평가할 수 있는 시험법으로 주로 기니피그를 사용하여 실시한다(Buehler, 1965; Botham 등, 1991). 실험동물에서 시험물질에 의한 자극을 나타낸 개체수가 적더라도 관련 시험물질이 대량 생산된 후 노출되는 사람의 수는 매우 많거나 손상

Table 4. Clinical signs in Beagle dogs

Clinical signs [1st]			
Group (mg/kg)	Animal ID	Signs	Observed on
Male			
G1 (1,250)	1	Normal	Day 1, 2~7
	2	Normal	Day 1, 2~7
Female			
G1 (1,250)	3	Normal	Day 1, 2~7
	4	Normal	Day 1, 2~7

Days are those from the 1st dosed day (Day 1).

Clinical signs [2nd]			
Group (mg/kg)	Animal ID	Signs	Observed on
Male			
G1 (2,500)	1	Normal Remaining of food Soft stool	Day 1, 2, 6 Day 3~5 Day 3~4, 7
	2	Normal	Day 1, 2~7
Female			
G1 (2,500)	3	Normal Remaining of food Vomiting	Day 1, 2~4 Day 5~7 Day 5
	4	Normal Remaining of food	Day 1, 2~5 Day 6~7

Days are those from the 2nd dosed day (Day 1).

Clinical signs [3rd]			
Group (mg/kg)	Animal ID	Signs	Observed on
Male			
G1 (5,000)	1	Normal	Day 1~15
		Terminal sacrifice	Day 15
	2	Normal	Day 1, 3~9, 11~15
		Diarrhea	Day 2
		Remaining of food	Day 10
		Terminal sacrifice	Day 15
Female			
G1 (5,000)	3	Normal	Day 1, 3~15
		Remaining of food	Day 2
		Terminal sacrifice	Day 15
	4	Normal	Day 1, 3~7, 9~11, 13~14
		Remaining of food	Day 2, 8, 12, 15
		Terminal sacrifice	Day 15

Days are those from the 3rd dosed day (Day 1).

을 입을 수도 있기에 피부에 노출될 수 있는 면역기계 관련 시험을 수행할 필요가 있다고 판단한다. 피부노출에 의한 시험법에 추가하여 경구투여로 인한 면역기계 이상 유무를 평가한 면역글로불린 E의 혈중노출시험(Kim 등, 2020c)과 밀접한 연관성이 있으며, Kim 등(2020c)의 시험에서 시험 물질을 최대 5,000 mg/kg/d로 랫드에 13주간 반복 경구투

Table 5. Evaluation of skin reaction in Hartley guinea pigs (Buehler's method)

Evaluation of skin reaction				
Vehicle control	24 h after challenge		48 h after challenge	
	Vehicle control	Test article (50%)	Vehicle control	Test article (50%)
Animal ID	Score		Score	
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0

Sensitization rate (%)

0

0

frpfdZAL	24 h after challenge		48 h after challenge	
	Vehicle control	Test article (100%)	Vehicle control	Test article (100%)
Animal ID	Score		Score	
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0
13	0	0	0	0
14	0	0	0	0
15	0	0	0	0

Sensitization rate (%)

0

0

Evaluation of skin reaction			
DNCB	24 h after challenge	48 h after challenge	
Animal ID	Score	Score	
16	2	2	
17	2	0	
18	2	2	
19	2	2	
20	2	2	
Sensitization rate (%)	100	80	

Grades are follows: sensitization rate (%)=(No. of positive animals/ No. of animals)×100.

DNCB, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene.

0: no visible change, 1: discrete or patchy erythema, 2: moderate and confluent erythema, 3: intense erythema and swelling.

여 시 혈중 면역글로불린 E의 부형제대조군(14.091±1.725 ng/mL)과 비교하여 그 면역글로불린 E의 혈중 농도 차이가 없음을 확인하였다(12.623±0.935 ng/mL). 또한 시험물질 frpfdZAL의 13주 반복투여 경구시험의 혈액학적 결과에서 알레르기 등에 의한 백혈구의 수치 변화 및 일반증상 관찰에서 면역기계 이상과 관련된 독성학적으로 유의미한 변화를 확인할 수 없었다(Kim 등, 2020c). 딱정벌레목 거저리과 곤충으로 국내외에서 식용 또는 동물 사료용으로 유통되고 있

는 갈색거저리 유충을 이용한 13주 반복 경구투여시험 결과에서도 면역글로불린 E 및 백혈구의 수치 등도 독성학적으로 유의미한 변화를 확인할 수 없었다(Han 등, 2016).

일반적으로 음식 알레르기는 음식물 섭취 후 나타나는 면역 반응(Boyce 등, 2010; de Gier와 Verhoeckx, 2018)으로 식용 곤충의 미생물, 독소 및 중금속으로 인한 안전성 측면뿐만 아니라 영양학적 가치에 영향을 미치는 것으로 알려졌다(van Huis 등, 2013; Riberio 등, 2018). 특히 본 시험물질 frpfdZAL과 같은 곤충을 이용한 식품의 특정 단백질에 대한 인체 면역계의 비정상적인 반응을 포함하는 다른 무해한 식품첨가물 또는 성분에 대한 부작용 가능성을 확인하는 측면에서 식품 알레르기의 연구가 고려되어야 한다(Verhoeckx 등, 2016). 구체적으로 곤충 유래 단백질의 일부 알레르기 성분은 아르기닌 키나아제, 트로포미오신, 미오신 및 유충 큐티클 단백질로 알려져 감작 및 교차 반응을 유발하는 것으로 보고되었다(Broekman 등, 2017). 특히 곤충 유래 단백질에 대한 감작과 관련하여 혈중 면역글로불린 E는 알레르기 성분에 대한 대표적인 지표로 사용되고 있다(Beyer, 2009). 따라서 현재까지의 비임상시험 결과를 토대로 국내에서 사육 및 유통되고 있는 아메리카왕거저리 유충은 일반독성 및 면역독성을 유발하지 않는 안전한 식품원료로 판단한다.

요 약

딱정벌레목 거저리과 곤충으로 국내외에서 식용 또는 동물 사료용으로 이용되고 있는 슈퍼 밀웜(super mealworm) 탈지분말에 대한 설치류 및 비설치류를 이용한 경구독성시험에서 시험물질 frpfdZAL에 의한 독성학적 변화를 관찰하지 못했다. 특히, Hartley계 기니피그를 이용한 피부감작성 시험에서 피부를 통한 생체 내 흡수에 따른 면역기계의 이상을 확인하지 못했다. 따라서 아메리카왕거저리 유충 탈지분말은 동물을 이용한 비임상시험에서 독성학적 변화가 없는 안전한 시험물질로 판단되며 본 연구 결과는 다른 식품원료 등에 적용 및 응용 가능한 자료로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 연구사업(세부과제명: 아메리카왕거저리, 풀무치 분말의 식품등록을 위한 안전성 평가, 세부과제번호: PJ01352502)의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

REFERENCES

- Alstron JM, Beddow JM, Pardey PG. Agricultural research, productivity, and food prices in the long run. *Science*. 2009. 325:1209-1210.
- Armentia A, Lombardero M, Blanco C, Fernández S, Fernández A, Sánchez-Monge R. Allergic hypersensitivity to the lentil pest *Bruchus lentis*. *Allergy*. 2006. 61:1112-1116.
- Beyer K. Ige test: *in vitro* diagnosis. In: Metcalfe DD, Sampson HA, Simon RA, Lack G, editors. *Food Allergy: Adverse Reactions to Foods and Food Additives*. 5th ed. Wiley-Blackwell, New York, NY, USA. 2014. p 269-277.
- Botham PA, Basketter DA, Maurer T, Mueller D, Potokar M, Bontinck WJ. Skin sensitization—A critical review of predictive test methods in animals and man. *Food Chem Toxicol*. 1991. 29:275-286.
- Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW, Jones SM, Sampson HA, Wood RA, et al. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: Report of the NIAID-sponsored expert Panel. *J Allergy Clin Immunol*. 2010. 126:S1-S58.
- Broekman HCHP, Knulst AC, de Jong G, Gaspari M, den Hartog Jager CF, Houben GF, et al. Is mealworm or shrimp allergy indicative for food allergy to insects?. *Mol Nutr Food Res*. 2017. 61:160161. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201601061>
- Buehler EV. Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig. *Arch Dermatol*. 1965. 91:171-175.
- de Gier S, Verhoeckx K. Insect (food) allergy and allergens. *Mol Immunol*. 2018. 100:82-106.
- Díaz-Rúa R, Keijer J, Palou A, van Schothorst EM, Oliver P. Long-term intake of a high-protein diet increases liver triacylglycerol deposition pathways and hepatic signs of injury in rats. *J Nutr Biochem*. 2017. 46:39-48.
- Ghaly AE, Alkoik FN. The yellow mealworm as a novel source of protein. *Am J Agric Biol Sci*. 2009. 4:319-331.
- Ha DH, Kim SD, Lee J, Kwon HH, Park GH, Yang SH, et al. Toxicological evaluation of exosomes derived from human adipose tissue-derived mesenchymal stem/stromal cells. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2020. 115:104686. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104686>
- Han SR, Lee BS, Jung KJ, Yu HJ, Yun EY, Hwang JS, et al. Safety assessment of freeze-dried powdered *Tenebrio molitor* larvae (yellow mealworm) as novel food source: Evaluation of 90-day toxicity in Sprague-Dawley rats. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2016. 77:206-212.
- Ji KM, Zhan ZK, Chen JJ, Liu ZG. Anaphylactic shock caused by silkworm pupa consumption in China. *Allergy*. 2008. 63:1407-1408.
- Kalantar-Zadeh K, Kramer HM, Fouque D. High-protein diet is bad for kidney health: unleashing the taboo. *Nephrol Dial transplant*. 2020. 35:1-4.
- Kang KY, Kim MS, Lee MS, Oh JJ, An S, Park D, et al. Genotoxicity and acute toxicity evaluation of the three amino acid additives with *Corynebacterium glutamicum* biomass. *Toxicol Rep*. 2020. 7:241-253.
- Kim SY, Kim HG, Ko HJ, Kim MA, Kim IW, Seo M, et al. Comparative analysis of nutrients and hazardous substances in *Zophobas atratus* larvae. *J Life Sci*. 2019. 29:1378-1385.
- Kim SY, Kim HG, Lee KY, Ko HJ, Kim NJ, Yoon HJ. Effects of brewer's spent grain on the growth and nutrition of the giant mealworm beetle, *Zophobas atratus*. *Int J Indust Entomol*. 2018. 37:73-81.
- Kim SY, Kwak KW, Kim E, Park K, Kim NH, Song MH, et al. Comparative analysis of nutrients and hazardous substances in *Locusta migratoria* from host plants. *Korean J Environ Agric*. 2020a. 39:253-262.
- Kim SY, Kwak KW, Lee KY, Ko HJ, Kim YS, Kim E, et al. Comparative analysis of nutritional components of *Zophobas atratus* larvae raised with artificial diet and wheat bran. *J Life Sci*. 2020b. 30:1109-1117.

- Kim SY, Kwak KW, Park ES, Yoon HJ, Kim YS, Park K, et al. Evaluation of subchronic oral dose toxicity of freeze-dried skimmed powder of *Zophobas atratus* larvae (frpfdZAL) in rats. *Foods*. 2020c. 9:995. <https://doi.org/10.3390/foods9080995>
- Lee JM, Lee MA, Do HN, Song YI, Bae RJN, Lee HY, et al. Historical control data from 13-week repeated toxicity studies in Crj:CD (SD) rats. *Lab Anim Res*. 2012. 28:115-121.
- MacEvilly C. Bugs in the system. *Nutr Bull*. 2000. 25:267-268.
- MFDS. Good Laboratory Practice Regulation for Non-Clinical Laboratory Studies. 2017. Osong, Korea. Notification no. 2017-32.
- Mutlu EA, Keshavarzian A, Mutlu GM. Hyperalbuminemia and elevated transaminases associated with high-protein diet. *Scand J Gastroenterol*. 2006. 41:759-760.
- Nakagaki BJ, Defoliart GR. Comparison of diets for mass-rearing *Acheta domesticus* (Orthoptera: Gryllidae) as a novelty food, and comparison of food conversion efficiency with values reported for livestock. *J Econ Entomol*. 1991. 84:891-896.
- Noh JH, Yun EY, Park H, Jung KJ, Hwang JS, Jeong EJ, et al. Subchronic oral dose toxicity of freeze-dried powder of *Allomyrina dichotoma* larvae. *Toxicol Res*. 2015. 31:69-75.
- Nonaka K. Feasting on insects. *Entomol Res*. 2009. 39:304-312.
- OECD. OECD Guideline for Testing of Chemicals. TG 406. Skin sensitisation. 1992.
- OECD. OECD Principles of Good Laboratory Practice. ENV/MC/CHEM(98)17. 1997.
- Park HC, Jung BH, Han T, Lee YB, Kim SH, Kim NJ. Taxonomy of introduced commercial insect, *Zophobas atratus* (Coleoptera; Tenebrionidae) and a comparison of DNA barcoding with similar tenebrionids, *Promethis valgipes* and *Tenebrio molitor* in Korea. *J Seric Entomol Sci*. 2013. 51: 185-190.
- Pesta DH, Samuel VT. A high-protein diet for reducing body fat: mechanisms and possible caveats. *Nutr Metab (Lond)*. 2014. 11:53. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-11-53>
- Ribeiro JC, Cunha LM, Sousa-Pinto B, Fonseca J. Allergic risks of consuming edible insects: A systematic review. *Mol Nutr Food Res*. 2018. 62:1700030. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700030>
- Song SW, Yang DC, Choung SY. Acute oral toxicity of adventitious roots extract derived from wild ginseng in beagle dogs. *J Toxicol Public Health*. 2005. 21:51-55.
- Tams TR. Gastrointestinal symptoms. In: Tams TR, editor. *Handbook of Small Animal Gastroenterology*. 2nd ed. Saunders, St. Louis, MO, USA. 2003. p 1-50.
- van Huis A, Van Itterbeeck J, Klunder H, Mertens E, Halloran A, Muir G, et al. Edible insects: future prospects for food and feed security. *FAO Forestry Paper 171*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. 2013.
- Verhoeckx K, Broekman H, Knulst A, Houben G. Allergenicity assessment strategy for novel food proteins and protein sources. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2016. 79:118-124.
- Yu SH, Yu S, Lee B, Kim H, Kim M, Lee Y. 28-day repeated oral dose toxicity study of an aqueous extract of *Gryllus bimaculatus* in sprague-dawley rat. *Toxicol Rep*. 2020. 7:577-582.