

아메리카동애등에(*Hermetia illucens*) 추출물의 항산화 활성

박관호¹ · 최지영¹ · 남성희¹ · 김성현¹ · 곽규원¹ · 이석현¹ · 노시갑^{2*}
¹농촌진흥청 국립농업과학원, ²경북대학교 농업생명과학대학

Antioxidant activities of black soldier fly, *Hermetia illucens*

Kwanho Park¹, Jiyoung Choi¹, Sunghye Nam¹, Sunghyun Kim¹, Kyuwon Kwak¹, Seokhyun Lee¹ and Sikab Nho^{2*}

¹National Academy of Agricultural Science, RDA, Wanju 565-851, Korea

²College of Agriculture and Life science, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

(Received September 29, 2014, Accepted November 05, 2014)

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the possibility of black soldier fly (*Hermetia illucens*) as a animal feedstuff. Insect resources have been widely recognized that it exhibits its own biological activity by whole body or its metabolic intermediates. To accomplish this, its general and biological activities were measured. The present study was conducted to compare antioxidant activity of black soldier fly larva, pupa and grasshopper by examining radical scavenging activity using DPPH (2,2 diphenyl 1-picryl hydrazyl). DPPH radical scavenging activity was conducted on the EtOH, MeOH, H₂O fractions of black soldier fly larvae. Results showed that black soldier fly pupa on the H₂O fraction contained the highest DPPH radical scavenging activity among the samples. FRAP assay are more suitable methods to evaluate antioxidant activity of black soldier fly extracts. Among the samples, the FRAP value showed higher antioxidant activity in the extracts from black soldier fly pupa extract on H₂O fraction. These results suggest that black soldier fly larva and pupa extract has antioxidant activity and its fractions can be utilized to develop functional feedstuff.

Key words : Black soldier fly, *Hermetia illucens*, Antioxidant activity

서 론

현재까지의 유용생물자원활용에 대한 관심이나 연구는 주로 한약재와 같은 식물군에 대하여 집중되어 왔으며, 유용곤충의 이용개발에 대해서는 전 세계적으로도 그 관심도가 아주 낮은 형편이었다(Park et al. 2005). 환경적응력이 뛰어난 곤충은 지구상에서 가장 많은 종을 가지고 있으며 전 세계에 분포되어 있다. 이러한 곤충자원은 생명공학기술의 발달로 다양한 분야에서 이용 가치를 높이고 있다. 곤충자원은 많은 분야에 응용 되고 있는데 유용물질 생산, 인간의 질병연구 수단, 생물소재 개발, 약용곤충으로 이용, 친환경 농업 등에 이용이 되고 있다(Cudjoe et al. 2005, Sivagnaname and Kalyanasundaram 2004). 아메리카동애등에(*Hermetia illucens*, black soldier fly BSF)는 먹이 선택폭이 매우 광범위하여 음식물쓰레기와 같은

유기성폐기물로도 잘 사육되는 것으로 알려져 있다(Sheppard et al. 2002, Diener et al. 2009). 따라서 아메리카동애등에를 이용한 유기성폐기물의 유기적 분해와 분해산물의 재이용과 같은 환경친화적인 기술에 의한 산물은 다양한 자원으로 전환될 수 있다. 이러한 BSF의 잠재적 가치에 대한 광범위한 연구가 축산분뇨와 음식물쓰레기 처리에서 이루어지고 있으며, 그 과정에서 생성되는 부산물에 대한 연구가 진행되고 있다(Sheppard et al. 1994, Newton et al. 2005, Kim et al. 2008). BSF의 생태적 특성을 이용하여 유기성폐기물인 음식물쓰레기와 축산폐기물 등의 친환경적인 처리와 유기자원의 재활용(Sheppard et al. 1998) 및 번데기 사료화(Hale 1973, Bondari and Shppard 1987) 등에 관한 연구가 진행되고 있다. BSF의 번데기와 유충은 어분과 비견되는 가치를 가지고 있으며 다양한 애완용 동물의 특수 사료로 사용이 가능할 것이다(Park et al. 2012).

*Corresponding author. E-mail: nicegano@korea.kr

그러나 BSF의 부산물에 대한 연구는 초기 단계이며, 추출물의 항산화 연구와 같은 부산물의 활용 연구는 전무한 실정이다.

이에 본 연구는 사회적으로 문제가 되고 처리비용을 발생시키는 음식물쓰레기를 BSF를 이용하여 친환경적으로 처리 후 생성되는 부산물인 동애등에 유충과 번데기의 천연항산화제로서의 적용 가능성을 확인하고 물질 분리와 같은 후속 연구에 기초 자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에서는 대조군으로서 국내산과 중국산 메뚜기를 구입하여 동결건조 후 마쇄하여 -70°C 에 보관하면서 실험에 사용하였다. 아메리카동애등에는 부화 후 7일, 14일 경과한 유충과 암갈색으로 변하는 노숙유충 그리고 번데기를 동결건조 후 마쇄하여 실험에 사용하였다.

2. 추출물 제조

실험에 사용된 시료 추출을 위한 용매는 3차 증류수와 에탄올 그리고 메탄올을 사용하였다. 각각의 용매 20 mL에 마쇄하여 준비된 시료 2g을 첨가하고 상온에서 24시간 동안 추출하였다. 용매 추출 후 4°C , $13000 \times \text{rpm}$ 에서 30분간 원심분리 하여 상층액을 취하였다. 각 시료의 증류수 추출물은 동결건조 하였다. 에탄올 및 메탄올 추출물은 감압 농축하여 동결건조 하였다.

3. DPPH radical 소거활성

항산화 활성 측정 방법 중 DPPH assay는 radical 소거활성 측정방법으로 간단하면서도 효과적인 측정 방법으로 많이 이용되어진다. 0.2 mM DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 에탄올에 녹여 준비하였다. 96well plate에 시료 10 μL 과 DPPH 용액 190 μL 를 희석하여 실온에서 30분간 반응시킨 후, 517 nm의 파장에서 흡광도의 값을 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도에 대한 곤충시료의 radical 소거활성 비율(% inhibition)은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거능 (Inhibition, \%)} = \left[\frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{(A_{\text{control}})} \right] \times 100$$

4. FRAP 활성 측정

FRAP(Ferric reducing antioxidant power) 측정은 Benzie and Strain(1996)의 방법을 변형하여 실험곤충 추출물의 항산화능을 측정하였다. Acetate buffer(pH 3.6, 300 mM):

10 mM의 TPTZ(2, 4, 6-triplyridyl-s-triazine): 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 를 10 : 1 : 1:의 비율로 섞어 실험 직전에 만들어서 사용하였다. 곤충시료 10 μL 에 반응액 190 μL 를 혼합 후 150초 간격으로 약 25분간 590 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료별 활성 정도는 15분 후의 값을 기준으로 하였다.

5. 통계분석

본 연구의 실험 결과들은 3회 반복하였으며 모든 자료는 ANOVA test, 평균 차이에 대한 유의성 검정은 Duncan's multiple range test로 $P < 0.05$ 수준일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

1. DPPH radical 소거활성

생물은 생존을 위해 에너지를 필요로 하는데 산소를 호흡하고 유기물을 산화시켜 에너지를 생산한다. 그 과정에 대량의 활성산소가 만들어지게 되는데, 이 활성 산소는 많은 세포내 방어 관련 효소에 의하여 scavenging이 되나 일부는 세포내 DNA와 단백질에 손상을 입히게 된다(Heo et al. 2006). 이 과정에 세포는 SOD(superoxide dismutase)를 이용하여 활성산소를 제거하게 된다. 대표적인 항산화제로는 Vitamin C와 E가 알려져 있으며, 식/음료로의 첨가제로 많이 사용되어 지고 있다(Jaxa et al. 2005, Misso et al. 2005). 항산화 물질의 가장 특징적인 기작은 유리기와 반응하는 것으로 유리기 소거작용은 활성라디칼(free radical)에 전자를 공여하여 항산화효과나 인체에서 노화를 억제하는 척도로 사용된다(Blois 1958, Halliwell 1991). DPPH radical은 alcohol 용액 내에서는 DPPH의 질소 원자와 alcohol간에 수소결합이 형성되기 때문에 다른 유리라디칼보다 비교적 안정하고, 항산화 활성을 갖는 물질과 반응하면 진보라색의 DPPH의 색깔이 점점 열어져 흡광도가 감소하게 되므로 흡광도의 감소를 측정함으로써 radical 소거 활성을 쉽게 측정할 수 있다(Jeong et al. 1994). BSF 유충과 메뚜기의 물, 에탄올, 메탄올 추출물의 항산화 활성에 대한 결과를 그림. 1에 나타내었다.

BSF 분획물의 항산화 활성은 다양한 추출방법을 이용하여 추출한 후 DPPH 라디칼 소거능으로 평가하였다. BSF 번데기 물 추출물의 경우(그림. 1A), 양성대조군으로 사용된 Vitamin C(5 mg/mL)는 $109.0 \pm 0.15\%$ 로 DPPH 라디칼 소거능을 보인 반면 국산 메뚜기와 BSF 번데기는 각각 109.5 ± 28 , $147.8 \pm 1.6\%$ 로 매우 높은 DPPH 라디칼 소거능을 보였다. 메뚜기의 물 추출물의 경우 BSF 번데기의 물 추출물 보다 활성은 낮았지만 대조군인 Vitamin C보다 높은 활성을 나타냈다. 메뚜기의 경우 국산과 중국

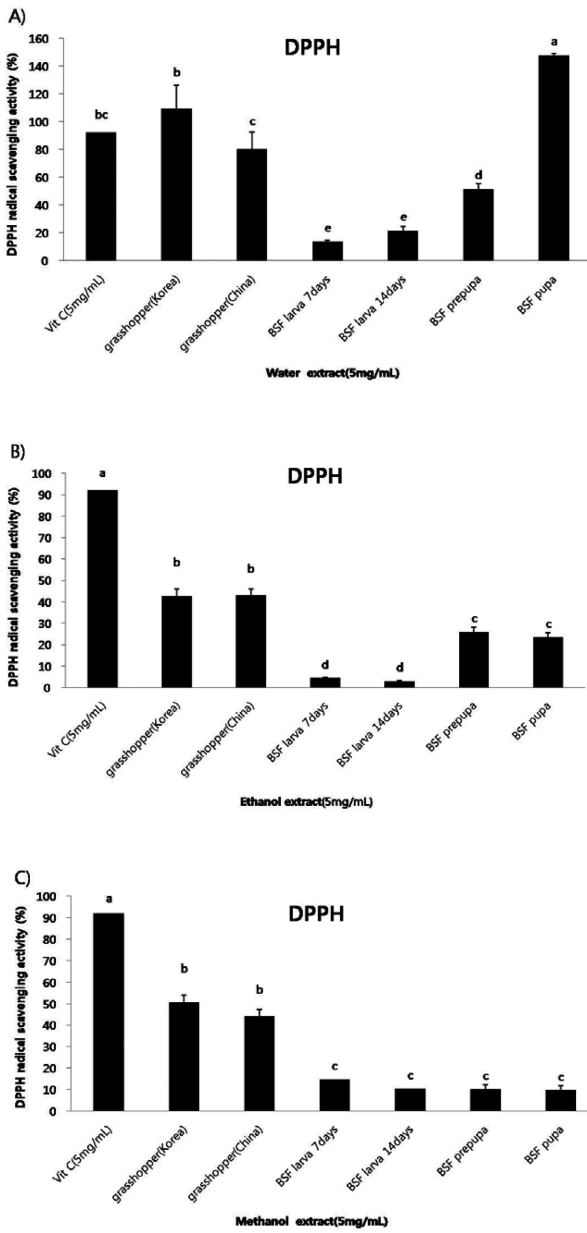


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity. A) Extract in water. B) Extract in ethanol. C) Extract in methanol. Statistical analysis was performed using the Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

산 추출물 간의 유의적인 차이는 없었으나, 각각의 BSF 유충 추출물보다는 높은 활성을 나타내었다.

2. FRAP을 통한 환원력 측정

FRAP 활성 실험은 물질의 환원력을 측정하는 실험으로 Ferric tripyridyltriazine(FeIII-TPTZ) 복합체가 환원제 (antioxidant)에 의해서 파란색의 ferrous tripyridyltriazine(Fe II-TPTZ) 복합체로 될 때 흡광도를 측정하여, 검색하고자 하는 화합물에 대한 환원력(ferric reducing ability)를 보는

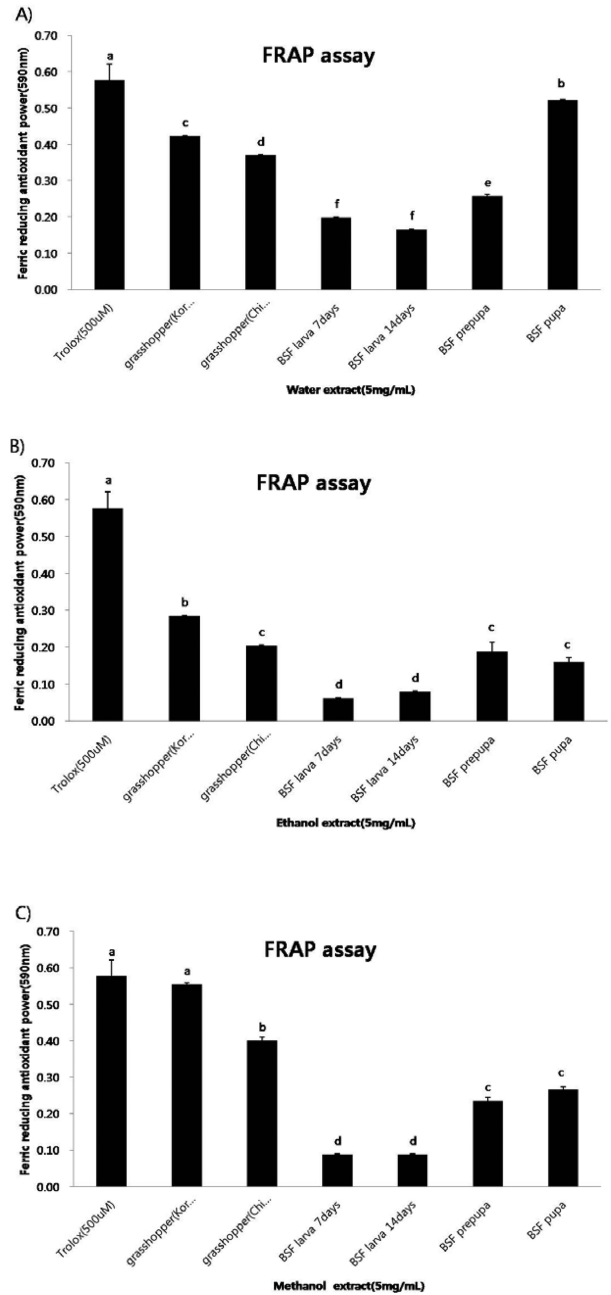


Fig. 2. Ferric ion reducing anti-oxidant power(FRAP) assay. A) Extract in water. B) Extract in ethanol. C) Extract in methanol.. Statistical analysis was performed using the Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

것이다. 낮은 pH에서 환원제에 의해 3가 철이 2가 철로 환원되는 원리를 기초로 고안되어진 방법이고 흡광도가 증가할수록 항산화 활성이 높다는 것을 의미한다(Student et al. 1980). DPPH 결과와 마찬가지로 BSF 번데기 물 추출물에서 가장 높은 환원력을 나타냈다. BSF 유충의 추출물은 낮은 환원력을 나타냈다. 메뚜기의 경우 물 추출

물에서 BSF 유충보다 높은 환원력을 나타냈으나 대조군인 trolox와 BSF 번데기의 환원력 보다는 낮은 활성을 나타냈다. 실험 결과 추출물의 용매에 따라서 환원력이 다르게 나오는 것을 알 수 있었다. 이는 추출 용매의 물리/화학적인 성질에 기인한다고 판단이 되어 진다. 실제 물과 같은 비유기성 용매의 경우 유기성 용매에 녹는 물질을 추출하기가 쉽지 않다. 이런 경우 최초 유기성 용매를 이용한 다음 이를 제거한 후 다시 물을 이용하여 녹이거나 농축하여 사용을 하게 된다. 본 실험에서의 활성은 물을 이용한 추출물에서 가장 좋은 활성을 볼 수 있었는데 이는 추후 이들 추출물의 산업적 이용 시 이점으로 작용하는 한편 유용한 물질 분리에는 그만큼 어려움이 있을 것으로 사료된다. 흔히 약용으로 사용되는 곤충류는 보존이나 보관 시 이들 약용성분의 변화가 예상된다. 따라서 서식지의 차이, 개체 차이, 계절적인 차이 등도 활성에 많은 차이를 나타내며 이러한 기초적인 결과도 생물활성과 유용성분의 분리정제에 많은 영향을 미치게 되리라 추측된다.

적 요

최근 곤충자원을 이용하여 식약용 및 사료로 활용하기 위한 많은 연구가 진행되고 있으며 미래의 자원으로 발전할 수 있는 가능성이 충분하다고 본다. 특히, 대량으로 생산이 용이하고 유충과 번데기의 조단백질 및 무기물 함량이 우수한 아메리카동애등에는 양계 및 양어사료의 원료로써 사용 가능성이 높게 평가되고 있다. 본 연구는 아메리카동애등에의 유충 및 번데기의 항산화 활성을 비교 평가하였다. 아메리카동애등에 번데기의 물 추출물의 경우 DPPH 라디칼 소거능이 $147.8 \pm 1.6\%$ 로 양성 대조군으로 사용된 Vitamin C(5 mg/mL)의 $109.0 \pm 0.15\%$ 와 메뚜기의 $109.5 \pm 28\%$ 보다 높은 활성을 나타 내었다. FRAP을 통한 환원력 측정에서도 DPPH 결과와 마찬가지로 아메리카동애등에 번데기의 물 추출물에서 가장 높은 환원력을 나타내었다.

위의 결과로 보아, 아메리카동애등에 유충 및 번데기의 추출물은 라디칼 소거능 및 산화환원작용을 통하여 항산화 활성을 가지는 것으로 사료되며, 특히 번데기의 추출물은 천연 항산화 소재로서의 활용가능성이 높은 것으로 기대되었다. 추후 추출물의 산업적인 활용가능성을 보다 명확히 확인하기 위하여 보다 많은 연구가 필요할 것으로 본다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연

구개발사업(과제번호: PJ0096082014)의 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

References

- Benzie IF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay, *Anal Biochem* **239**, 70~76.
- Blois MS. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199~1200.
- Bondari K, Sheppard DC (1987) Soldier fly, *Hermetia illucens* L., larvae as feed for channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque, and blue tilapia, *Oreochromis aureus* (Steindachner). *Aqua Fish Mgt* **18**, 209~220.
- Cudjoe E, Wiederkehr TB, Brindle ID (2005) Headspace gas chromatography-mass spectrometry: a fast approach to the identification and determination of 2-alkyl-3-methoxypyrazine pheromones in ladybugs, *Analyst* **130**, 152~155.
- Diener S, Zurbrugg C, Tockner K (2009) Conversion of organic material by black soldier fly larvae: establishing optimal feeding rates. *Waste Manag Res* **27**, 603~610.
- Hale OM (1973) Dried *Hermetia illucens* larvae (Diptera: Stratiomyidae) as feed additive for poultry. *J Ga Entomol* **8**, 16~20.
- Halliwell B. (1991) Drug Antioxidant effects-a basis for drug selection, *Drugs* **42**, 569~605.
- Heo JC, Park JY, Hwang JS, Park HC, Kang SW, Hwang SJ, Yun JY, Kwon TK, Lee SH (2006) Comparison of in vitro antioxidant activity and cyclooxygenase-2 promoter inhibitory activity in *Harmonia axyridis pallas* and *Coccinella septempunctata*. *Korean J Food Preserv* **13**(4), 513~518.
- Jaxa CT, Bednarz B, Drozdowska D, Gessek J, Gniot J, Janik K, Kawka UT, Maciejewski P, Ogrek M, Szpajer M, MIVIT Trial Group (2005) Antioxidant effects of combined vitamins C and E in acute myocardial infarction. The randomized, double-blind, placebo controlled, multicenter pilot Myocardial Infarction and VITamins (MIVIT) trial. *Kardiol Pol* **62**(4), 344~350.
- Jeong JW, Lee YC, Jung SW, Lee KM (1994) Flavour components of citron juice as affected by the extraction method. *Korean J Food Sci Technol* **26**, 709~712.
- Kim JG, Choi YC, Choi JY, Kim WT, Jeong GS, Park KH, Hwang SJ (2008) Ecology of the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) in Korea. *Kor J Appl Entomol* **47**, 337~343.
- Misso NL, Brooks WJ, Ray S, Vally H, Thompson PJ (2005) Plasma concentrations of dietary and nondietary antioxidants are low in severe asthma, *Eur Respir J* **26**, 257~264.
- Newton GL, Sheppard C, Watson DW, Burtle G, Dove R (2005) Using the black soldier fly, *Hermetia illucens*, As a value-added tool for the management of swine manure, Report for Mike Williams, Director of the Animal and poultry Waste Management Center, North Carolina State University, Raleigh, NC Agreements between the NC Attorney General, Smithfield

- Foods, and Premium Standard Farms, and Frontline Farmers.
- Park JY, Heo JC, An SM, Yun EY, Han SM, Hwang JS, Kang SW, Yun CY, Lee SH (2005) High throughput-compatible screening of anti-oxidative substances by insect extract library. *Korean J Food Preserv* **12**, 482~488.
- Park KH, Choi YC, Nam SH, Kim WT, Kim AY, Kim SY (2012) Recombinant expression and enzyme activity of chymotrypsin-like protease from black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). *Int J Indust Entomol* **25**(2), 181~185.
- Sheppard DC, Newton GL, Thompson SA, Davis J, Gasho G, Bramwell K (1998) Using soldier flies as a manure management tool for volume reduction, house fly control and feed-stuff production. In "Sustainable agriculture research and education, southern region" (G. Roland eds), pp. **51**, Georgia Station, Griffin, Georgia.
- Sheppard DC, Newton GL, Thompson SA, Savage S (1994) A value-added manure management-system using the black soldier fly, *Bioresource Tech* **50**, 275~279.
- Sheppard DC, Tomberlin JK, Joyce JA, Kiser BC, Sumner SM (2002) Rearing methods for the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae). *J Med Entomol* **39**, 695~698.
- Sivagnaname N, Kalyanasundaram M (2004) Laboratory evaluation of methanolic extract of *Atlantia monophylla* (Family: Rutaceae) against immature stages of mosquitoes and non-target organisms, *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* **99**, 115~118.
- Student AK, Hsu RY, Lane MD (1980) Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L 1 preadipocytes. *J Biol Chem* **225**, 4745~4750.