The Korean Journal of Culinary Research
Vol. 20, No. 6, pp. 190~199 (2014)

메밀 추출물의 항산화 및 항염증 효능

강 현 우¶
영산대학교 한국식품조리학과¶

Antioxidant and Anti-inflammation Effects of Water Extract from Buckwheat

Hyun Woo Kang¶
Department of Korean Food & Culinary Arts, Youngsan University, Busan, 612-743, Korea¶

Abstract

This study was conducted to investigate the effects of the hot water extract from buckwheat (WEB) in RAW-264.7 macrophage cells against lipopolysaccharide (LPS). In these experiments, we evaluated the anti-inflammatory effects of WEB by measuring MTT assay, nitric oxide (NO), inducible NOS (iNOS) production, and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by Western blotting. The extracts showed a protective effect by increasing cell viability on LPS in RAW264.7 cells. WEB (0.25, 0.5, and 1.0 mg/mL) significantly suppressed LPS-stimulated production of NO. Also, WEB reduced the expression of iNOS and COX-2 proteins. The present results show that WEB has potent anti-inflammatory effects on RAW264.7 cells. In addition, WEB has various antioxidant effects as a result of 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) and 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) which possess a radical scavenging activity. The total polyphenol and flavonoid contents of the WEB were 13.22±3.69 mg GAE/g extract and 38.53±5.20 mg CE/g extract respectively. The present results give the understanding of biological activities of buckwheat and encourage their application for supplements.

Key words: buckwheat, water extract, antioxidant, anti-inflammation, RAW264.7 cells

Ⅰ. 서 론

메밀(Buckwheat)은 오래전부터 구황작물의 하나로 쌍자엽 식물의 마디풀과에 속하며, 고지대의 서늘한 기후와 척박한 땅에서 단기간 생육하는 식물로 세계 여러 나라에서 재배하고 있으며, 이용형태에 따라 중국과 러시아에서는 죽이나 비스켓 형태로 많이 이용하고 있고(Kim SH et al 2007), 유럽, 미국, 캐나다 등에서는 메밀빵, 스파게티, 마카로니의 형태로 이용하고 있다(Kim BR et al 2000). 또한, 일본에서는 국수형태로서 널리 대중화되어 있으며, 우리나라에서는 막국수, 메밀부침과 메밀묵 등의 주원료로 소비되어 왔으나, 경제성장에 따라 식생활이 서구화되면서 증가하는 각종 성인병의 예방과 치료에 메밀이 효과가 있다는 연구결과와 함께 메밀의 소비도 증가하고 있다(Pomeranz Y 1985; Kim BR et al 2000). 메밀 성분 중 회분은 대체적으로 2.0% 내외이며, 단백

¶ : 강현우, 051-540-7203, khw7200@ysu.ac.kr, 영산대학교 한국식품조리학과, 부산광역시 해운대구 반송순환로 142

질은 약 13%로서 종피와 과피에 많이 함유되어 있다. 또한, 메밀의 무기질 성분으로 K, Mg, Ca, P 및 Fe의 함량이 많고, Mn, Zn, Na 및 Se 등은 미량 함유되어 있다(Lee SY et al 1991). 기존의 메밀에 관한 연구에서 K와 Mg은 주로 과피에 있으면서 단백질 부분에 농축되어 있기 때문에 단계적으로 제분을 할 경우에는 최종 단계에서 얻어지는 메밀가루에 무기질 함량이 많다고 보고하였다(Lee SY et al 1991).

최근에 항산화 효소 체계를 상승시키면서 인체에 무해한 항산화제를 천연자원으로부터 탐색하는 시도가 다양하게 연구되는 추세이다(Halliwell B et al 1992; Lee JH 2007). 이미 항산화물질로 합성 항산화제와 폴리페놀, 플라보노이드, 카로티노이드, 아스코르브산, 토코페롤, 인지질 등의 천연 항산화제가 있으나(Lee SJ et al 2010), 합성 항산화제의 부작용으로 인하여 보다 안전하고 생체 방어력을 증가시킬 수 있는 천연 항산화제에 대한 연구가 활성화 되는 경향이다(Ito N et al 1985; Park HS 2011). 천연 항산화제는 대부분 천연자원 유래의 항산화성 화합물로서, 줄기, 잎, 뿌리, 꽃, 열매, 씨앗 등의 많은 부분에 존재하고 있으며, 주로 페놀화합물로서 프리 라디칼 및 활성산소종의 생성억제나 활성을 저해하여 항산화 물질로서의 역할을 하는 것으로 보고되고 있다(Kim YS et al 2011; Oh SI · Lee MS 2010; Kang HW 2012).

체내 염증 반응에서 마크로파지(macrophage) 세포는 병원체와 반응하여 사이토카인(cytokine)을 생성하고(Jin HJ et al 2010; Strorck M et al 1994), 유도성 산화질소 합성효소(iNOS)와 cyclo-oxygenase-2(COX-2)를 생합성하여 nitric oxide (NO) 및 prostaglandin E2(PGE2)를 생성하는 것으로 알려져 있다(Moncada S et al 1991; Wink DA · Mitchell JB 1998). 그러나 염증 반응이 일어나면 관련 세포에서 iNOS의 발현이 증가하여 많은 양의 NO가 생성하고, 과도하게 생성된 NO는 조직의 손상, 유전자 변이, 신경 손상 등을 유발하고, 부종 등의 염증 반응을 촉진시키는 매개체로 작용하는 것으로 보고되어진다(Yun HY et al 1996). Prostaglandin E2(PGE2)는 통증과 발열에 주로 관여하는 염증 인자로서 염증 반응이 일어나면 대식세포의 COX-2에 의해 생성된다(Wang MT et al 2007, Sarkar D et al 2008). 따라서 염증 반응에서 생성되는 물질 중 iNOS, COX-2의 단백질 발현의 억제를 확인하여 항염증 효과를 분석하는 추세이다(Lee CB 2012; Ha HJ · Lee CB 2014).

이처럼 우수한 영양성분과 조리법 및 효능을 갖는 메밀이지만 아직 메밀 연구가 미흡한 실정으로 본 연구에서는 다양한 효능을 나타내는 메밀 열수 추출물의 항산화 및 항염증 효과를 검증하여, 메밀을 이용한 생리 기능성 바이오 소재 개발 및 조리 연구를 위한 기초자료로 활용하고자 한다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료

실험에 사용된 메밀은 국내 강원지역에서 생산된 메밀을 농산물 시장(Busan, Korea)에서 구입하여 음건하고 분쇄기로 파쇄하여 사용하였다(Hanil, Seoul, Korea). 염증성 모델인 RAW264.7 세포는 활성측정을 위해 사용하였고 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받았다. Lipopolysaccharide(LPS)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)사에서 구입하였다. 그리고 세포실험을 위해 사용된 시약인 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM), Fetal Bovine Serum(FBS), Penicillin Streptomycin은 Lonza사(Walkersville, MD, USA)에서 구입하였다. 그 외에 모든 시약은 분석용 특급시약을 사용하였다.

2. 열수 추출

실험에 사용된 메밀 열수 추출을 위한 용매는 3차 멸균 증류수를 사용하였고, 추출은 건조 분말 메밀 20 g을 3차 증류수 500 mL를 첨가하여 70℃

에서 40분 동안 3회 추출하였다. 추출물은 여과지(No. 11, Whatman, Maidstone, England)로 잔재물을 제거한 후 rotary vacuum evaporator(EYELA, Tokyo, Japan)로 농축하고 동결건조하였다. 동결건조 후 샘플은 −20℃에 보관하여 실험에 사용하였다.

3. 총 폴리페놀 함량 측정

추출 시료 용액 1 mL에 3차 증류수 9 mL를 첨가한 후 Folin & Ciocalteau's phenol reagent 1 mL를 넣고 혼합하여 실온에서 5분간 반응시켰다. 반응용액에 7% Na_2CO_3 용액 10 mL를 넣어 다시 혼합한 다음, 3차 증류수로 25 mL로 정용하였다. 이 혼합 용액을 23℃에서 2시간 동안 정치한 후, 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 gallic acid를 이용하여 작성된 검량선으로부터 총 페놀화합물 함량을 계산하였다.

4. 총 플라보노이드 함량 측정

각 시료 및 표준용액 0.5 mL를 대조액과 시험용액으로 두 개의 시험관에 취하고, 에탄올 1.5 mL, 10% Aluminum nitrate(Yakuri pure chemicals Co., Ltd., Osaka, Japan) (0.1 mL) 및 1.0 M Potassium acetate (Junsei chemical Co., Ltd.) 0.1 mL, 증류수 2.8 mL를 잘 혼합 후 실온에서 40분간 정치하고, UV/Visible spectrophotometer(UV-2550, Shimadzu)를 사용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하여 작성한 검량선으로부터 함량을 구하였다. 공시험의 경우, 10% Aluminum nitrate 0.1 mL 대신 증류수 0.1 mL를 가하였고, 이때 quercetin (Sigma)을 이용한 검량선은 quercetin의 최종농도가 0, 1, 5, 10 μg/mL가 되도록 하여 위와 같은 방법으로 415 nm에서 흡광도를 측정하여 작성하였다.

5. ABTS 라디칼을 이용한 총 항산화력 측정

2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) 라디칼을 이용한 항산화력 측정은 ABTS cation decolorization assay 방법을 이용하였다. 7 mM ABTS와 2.45 mM 과황산칼륨을 증류수에 용해시키고, 암실에서 24시간 동안 방치하여 ABTS 라디칼을 형성시킨 후, 734 nm에서 흡광도를 측정하여 0.70±0.02가 되게 에탄올로 희석하였다. 희석된 용액 760 μL와 증류수 200 μL, 각각의 추출물 40 μL를 혼합하여 흡광도를 측정하였다. 추출물 비첨가군으로는 80% 메탄올을 사용하였고, ABTS 라디칼 소거능은 다음과 같은 계산식에 따라 계산하였다(Yaar M · Gilchrest BA 2001; Sep GU et al 2013).

ABTS scavenging activity (%)
$= [1 - (A / B)] \times 100$
A : 추출물 첨가군의 흡광도 값
B : 추출물 비첨가군의 흡광도 값

6. DPPH 라디칼 소거활성

항산화 효과를 측정하기 위하여 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼을 이용하여 측정하였다. 메탄올과 증류수의 6 : 4(v/v) 혼합용매에 녹인 0.1 mM DPPH와 각각의 추출물을 2 : 1 비율로 균일하게 혼합한 다음 상온에서 약 1시간 반응시킨 후, 흡수분광광도계를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로 메탄올을 첨가하였고, DPPH 라디칼 소거능의 정도는 다음과 같은 계산식에 따라 계산하였다(Han NK et al 2014).

DPPH scavenging activity (%)
$= [1 - (S / C)] \times 100$
S : 추출물과 DPPH 용액의 흡광도 값
C : 메탄올과 DPPH 용액의 흡광도 값

7. 세포 배양

RAW264.7 마크로파지 세포의 배양은 DMEM 배지에 10% 불활성시킨 FBS를 첨가하고, 항생제를 mL 당 10 μg 넣은 것을 사용하였다. 세포는 10~12번의 계대배양을 통해 세포가 안정된 상태에서 실험을 진행하였고, 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양하였다.

8. 세포 생존 분석

세포의 생존율은 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT) 환원 방법을 이용하여 측정하였다. 세포를 24-well plates에 5×10^4 cells/mL 농도로 1.0 mL씩 분주한 뒤 24시간 동안 배양하고, 각 시료를 최종 농도(0, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 그리고 2.0 mg/mL)가 되도록 세포에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 MTT 용액(5.0 mg/mL)을 가하고 37℃에서 4시간을 배양하여 MTT를 환원시켜 생성된 formazan이 배지에서 분리되지 않도록 배지를 제거하였다. DMSO를 200 μL 분주하여 20분 동안 혼합한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(SECOMAM, Ales, 프랑스)(Lee SJ 2012).

9. NO 측정

LPS에 의해 손상된 세포로부터 생성된 nitrite를 측정하기 위하여 Griess 반응을 이용하였다. MA JS 등(2010)의 방법을 응용하여 Griess 시약의 diazo기가 nitrite를 만나면 분홍색으로 변하게 되는 색의 반응을 측정하였다. RAW264.7 세포를 24-well plates에 5×10^4 cells/well이 되도록 분주하고, 12시간 배양한 후 추출물을 0, 0.125, 0.25, 0.5 그리고 1.0 mg/mL와 LPS 0.1 μg/mL의 농도로 동시 처리 또는 LPS 단독 처리하여 18시간을 배양하였다. Nitrite의 측정은 Griess reagent system을 이용하여 분석하였다.

10. 단백질 발현량 분석

단백질 발현량 분석은 Lee SJ 등(2012)의 방법에 준하여 진행하였다. RAW264.7 세포를 60 mm tissue culture dish에 2×10^5 cells/well에 되도록 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후 추출물을 처리한 배지로 교환하고 24시간 배양한 후 PBS로 세척하였다. Lysis buffer 100 μL를 첨가하여 세포를 용해시키고 원심분리하여(4℃, 12,000 rpm, 20 min) 세포막 성분들을 제거하였다. 원심 분리하여 얻은 단백질은 bradford assay로 정량하였으며, 20 μL의 단백질을 10%의 SDS-PAGE를 이용하여 전기 영동한 후, PVDF에 70 V에서 2시간 동안 옮기고, TBST로 5회 이상 세척한 후 꺼내서 5% 탈지유로 하룻밤 동안 반응시켜 항체의 비특이적 결합을 억제시켰다. 5회 세척 후 1차 항체(1:1,000)를 1시간 동안 반응시킨 후 다시 2차 항체(1:1,000)를 반응시키고, ECL kit(Amersham Pharmacia, England)를 이용하여 발현량을 측정하였다. 밴드의 밀도는 LAS-3000 (Bid-rad, America)의 이미지 측정기로 수치화하였다.

11. 통계분석

모든 결과는 3회 반복 측정 후 평균±표준편차로 나타내었으며, 유의성 검증은 Window용 SPSS 12.0 version을 이용하여 student *t*-test one way를 이용하였으며, Duncan's new multiple range test으로 사후검증하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 총 페놀 및 플라보노이드 함량

메밀의 2차대사산물인 플라보노이드는 항산화, 항고혈압, 항염증, 항균, 항암작용 등의 효능을 가지고 있는 기능성 성분으로 주목받고 있다(Moon et al 1999). 플라보노이드는 플라본(flavone)을 기본구조로 한 수용성 식물 색소로 액포에 존재하는 2차 대사산물로 플라본류(flavones), 플라보놀류(flavonols), 이소플라본(isoflavone), 칼콘(chalcone), 오론(aurone), 안토시아닌(anthocyanin) 등을 총칭하는 말로서, 화학식의 기본 구조가 C_6-C_3-C_6로 거의 비슷하게 이루어져 있다. 메밀에서 발견되는 주요 플라보노이드로는 rutin, orientin, isoorientin, vitexin, isovitexin, quercetin 등이 있으며, 페놀산으로 chlorogenic acid가 있다고 보고되었다(Margna U · Margna E 1978; Watanabe M · Ito M 2002). 일반적으로 항산화 활성은 페놀성 화합물이 원인물질로 관련되어 있는 것이 알려져 있어 gallic acid를 표준용액으로 하여 작성한 검정곡선으로부터 각 추출물의 총 페놀함량을 조사

<Table 1> Total polyphenol and flavonoid contents of extracts from buckwheat

	Total polyphenol (mg GAE[1])/g extract)	Flavonoid (mg CE[2])/g extract)
WEB	13.22±3.69[a]	38.53±5.20[a]

[1] Gallic acid equivalents
[2] Catechin equivalents

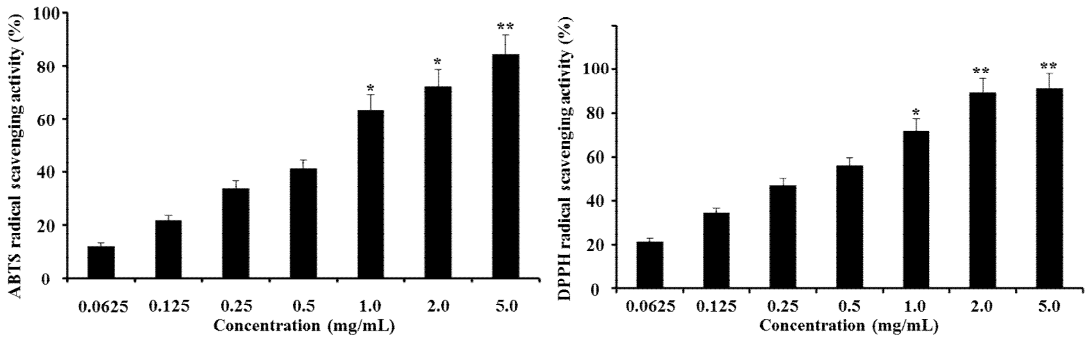
한 결과를 <Table 1>에 나타내었다. 열수 추출물의 총 페놀함량은 13.22±3.69 mg GAE/g extract을 확인하였다. Park BJ 등(2004)의 연구에서는 메밀의 총 페놀함량에서는 쓴메밀이 15.6 mg/g 건조중량, 단메밀이 8.59 mg/g 건조중량으로 보고하였다. 또한, 플라보노이드 함량을 분석한 결과는 38.53±5.20 mg CE/g extract로 Lee MK 등(2011) 연구와 비교하였을 때 수확시기와 품종에 따라 분석한 결과에서 최저 34.12~57.36 mg/g 건조중량을 기록하였고, 본 연구결과와 유사한 것을 확인하였다. 그러나 이러한 기능성이 부각되었음에도 불구하고, 메밀의 생리활성적인 사례는 미흡한 실정으로 본 연구 결과는 식품학적으로 중요한 자료를 제공할 것으로 사료된다.

2. 항산화력 측정

항산화 활성을 측정하는 방법 중 ABTS 라디칼 소거는 항산화 활성뿐만 아니라, 식물성 화학물질(phytochemicals)의 항산화 효과 측정에 최근까지 가장 활발하게 사용되고 있는데(Ku KM et al 2009), 과황산칼륨과의 반응에 의해 생성된 ABTS 라디칼이 추출물의 유효 물질에 의해 제거되어 라디칼 특유의 색인 청록색이 탈색되는 것을 이용하여 항산화 효과를 측정한다(Han NK et al 2014). 메밀의 열수 추출물의 항산화 활성을 비교한 결과는 <Fig. 1>에서 나타내었으며, 수치는 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 그리고 5.0 mg/mL에서 17.83, 22.01, 36.55, 39.87, 60.90, 66.27 그리고 81.34%의 소거효능을 각각 나타내었다. 비교군으로 사용한 합성 항산화제인 BHT의 값이 91.27%를 확인하였다. 기존의 연구에서는 두 종류의 메밀 유기용매 추출을 통해 ABTS 라디칼 소거효능을 확인하였을 때 5 μL/mL에서 쓴메밀이 91.52%, 단메밀이 69.67%의 활성(Han NK et al 2014)에 따라 본 연구와 비교하였을 때 메밀의 유효단일물질이 아닌 추출물로써 우수한 항산화 활성을 확인하였고, 이는 충분히 천연자원을 활용한 합성대체 천연 항산화제로써의 응용이 가능할 것으로 사료된다.

항산화 효능을 위해 DPPH 라디칼 소거능 측정법을 많이 이용하는 데, DPPH는 보라색의 비교적 안정한 자유라디칼로 다양한 항산화제 및 천연물로부터 항산화 물질을 검색하는데 일반적으로 환원 작용에 의해 라디칼이 소거되어 탈색되므로 이를 이용하여 항산화 효과를 측정한다. <Fig. 1>에서 ABTS 실험과 동일 농도인 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 그리고 5.0 mg/mL로 측정하였을 때, 각각의 소거활성은 20.76, 37.11, 43.29, 50.83, 69.27, 83.58 그리고 86.77%로 농도 의존적인 소거효능을 확인하였다. 기존의 연구에서는 에탄올과 1,3-butyleneglycol을 7:3의 비율의 혼합용매로 추출한 쓴메밀과 단메밀 추출물 모두 농도 의존적인 DPPH 라디칼 소거능을 보고하였으며, 추출물 농도 5 μL/mL에서 쓴메밀은 79.63%로 단메밀 49.30%인 것에 비해 높은 소거 활성을 나타내었다(Han NK et al 2014). 그리고 Kim SH 등(2007)은 항산화 활성을 측정하기 위해 메밀 지상부에서 분리된 quercetin-3-O-a-L-rhamnoside와 quercetin-3-O-rutinoside의 DPPH 라디칼 소거효능 연구에서 표준품으로 사용한 L-ascorbic acid보다 강한 활성을 나타냈다고 보고하였다. 이는 본 연구와 비교하였을 때 본 연구에서 사용한 식품소재의 항산화 단일 물질 분리 및 규명을 통해 천연 항산화제로써의 가능성이 있다고 판단되어진다.

3. 세포 생존 및 NO 측정

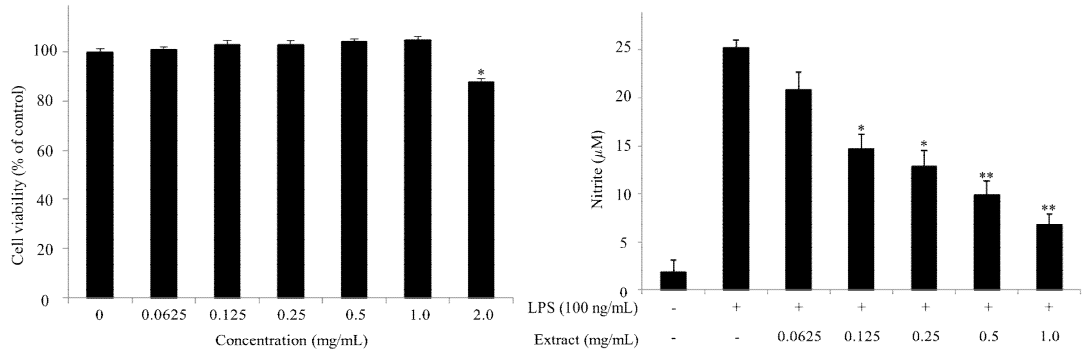


(A) (B)

<Fig. 1> Scavenging effect of WEB on ABTS(A) and DPPH(B) radical. Results are expressed as mean±S.D. of data obtained from three independent experiments. (*, p<0.05 and **, p<0.01 versus control).

메밀의 열수 추출물을 이용하여 마크로파지 세포인 RAW264.7를 이용하여 세포독성을 측정하고자 MTT assay로 분석하였다. MTT assay는 생존 세포의 미토콘드리아 능력을 이용하는 검사법으로 탈수소 효소 작용에 의하여 노란색의 수용성 기질(MTT tetrazolium)이 청자색을 띄는 비수용성 MTT-formazan 결정체로 환원되는 형태로 본 연구의 1.0 mg/mL까지는 약 100% 이상의 세포생존을 확인하였고(Fig. 2(A)), 이 결과는 천연소재가 세포주에 특별한 독성이 없다는 것을 의미한다. 또한, 연구를 수행하면서 추출물 처리 농도는 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 그리고 1.0 mg/mL를 선택하였다. Lee HH(2008)은 메밀 추출물을 이용한 보고 연구에서 HaCaT 세포와 melanoma B16F10 세포를 이용하여 세포 독성실험을 수행하였을 때 100 μg/mL 농도 범위에서 독성이 없음을 확인하였다.

지금까지의 연구를 바탕으로 항산화 활성을 나타내는 메밀 추출물을 이용하여 세포에 처리하여 염증성 cytokine, NO와 같은 매개물질을 세균 내독소로 알려진 LPS를 처리하였을 때의 억제 효능을 확인하였다(Fig. 2(B)). RAW264.7 세포에 LPS(100 ng/mL) 단독처리군 및 LPS와 항산화 활성이 우수했던 메밀 추출물을 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 그리고 1.0 mg/mL 농도의 동시처리군의 NO 생성 억제 효과를 확인하였을 때 메밀 추출물에



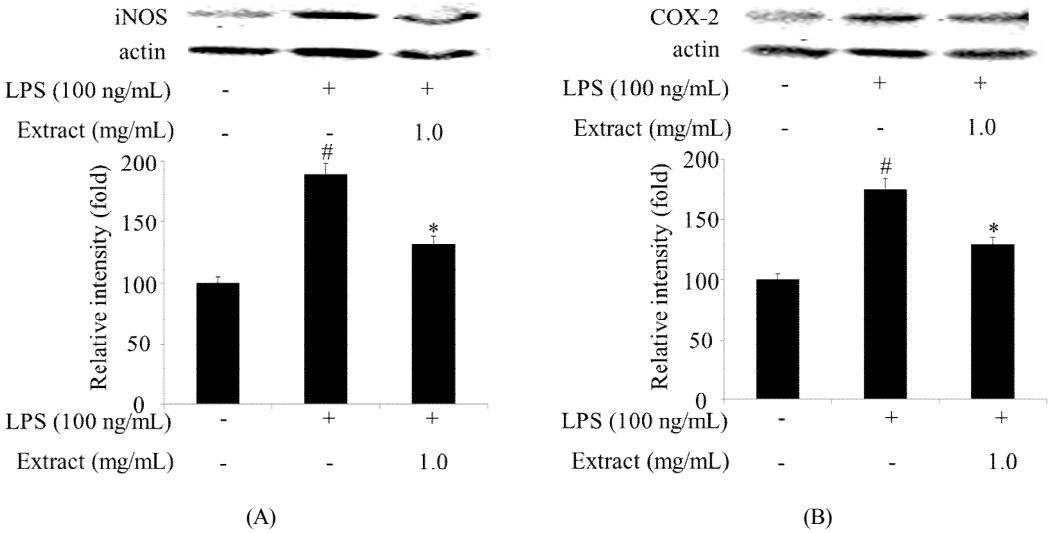
(A) (B)

<Fig. 2> Effect of extract on cytotoxicity(A) and inhibition of NO(B) in RAW264.7 cells. Extract was treated with various concentrations in RAW264.7 cells for 18~24 hr. Values are expressed as the mean±SD (n=3) of determinations made in triplicate experiments. *p<0.05, **p<0.01 versus control.

대하여 농도 의존적으로 NO 생성저해 활성을 확인하였으며, 저농도에서도 유의적인 NO 생성 저해 활성을 나타내었다. RAW264.7세포에 무처리군 대비 LPS(100 ng/mL) 단독 처리군에서는 약 8배의 NO가 증가한 반면, LPS와 메밀 추출물 1.0 mg/mL 농도로 처리한 경우에는 80%에 가까운 NO를 저해하였다. 향후 실질적으로 항염증 활성을 나타내는 유효물질의 분리 및 동정하는 연구가 필요할 것으로 판단된다.

4. Western Blot법을 이용한 단백질 발현량 분석

지금까지의 결과를 바탕으로 메밀 추출물의 NO생성에 영향을 미치는 iNOS와 COX-2의 세포내 단백질 발현억제에 관한 활성을 western blot으로 명확하게 분석하였다. 마크로파지 세포에 LPS (100 ng/mL) 단독 처리군과 메밀 추출물 1.0 mg/mL를 같이 처리하였을 때 iNOS 단백질 발현 억제에 크게 관여하는 것을 확인하였고(Fig. 3(A)), COX-2에서도 유의적으로 차이를 나타냈다(Fig. 3(B)). 이러한 결과로부터 메밀 추출물이 iNOS의 발현억제효과(42.3%)와 COX-2의 발현억제효과(39.6%)가 탁월함을 확인할 수 있었으며, iNOS와 COX-2의 발현억제가 NO의 생성억제를 유도함을 확인할 수 있었다. 기존의 연구에서는 메밀 추출물이 피부종양에 관여하는 B16F10 mouse melanoma 세포를 이용하여 멜라닌 합성 억제 효과를 측정하였을 때 1.0 μL/mL에서 38.24% 멜라닌 합성이 억제된다고 보고하였고(Han NK et al 2014), 암세포에서는 폐암세포주인 Calu-6와 위암세포주인 SNU-601 세포에 대해서 메밀 추출물이 탁월한 억제효능이 있는 것으로 알려져 있다(Lee HH 2008). 본 연구는 메밀 추출물이 염증성 질환 세포주에 용이한 작용을 하는 것을 확인하는 것으로 iNOS와 COX-2의 발현억제를 통해 NO의 생성저해를 유도하는 것을 나타낸다. 하지만 추가적으로 각 단백질 혹은 사이토카인을 조절하는 주요 인자에 대한 연구가 필요하며, 지금까지 결과들은 천연자원이 갖는 안정성에 집중하며, 부작용 등의 문제에서도 자유로울 수 있을 것으로 판단되며, 향후 조리업과 외식업계에 메밀의 특성에 관한 과학적 데이터를 제시함으로써 메밀의 정보를 알



<Fig. 3> Effect of extract on LPS-induced iNOS (A) and COX-2 (B) expression in RAW264.7 cells. Data are presented as the mean±SEM (n=3) for three independent experiments. *p<0.05: compared with the LPS-treated group by ANOVA followed by the Bonferroni multiple comparison tests.

리면서 소비 등에도 큰 영향을 미칠 것으로 예상되어지는 바이다.

Ⅳ. 결론 및 요약

본 연구에서는 생리활성이 우수한 것으로 알려진 메밀 열수 추출물로 마크로파지 세포에 LPS에 대한 염증성 질환 모델을 이용하여 세포생존, NO 생성 억제, 단백질 단계로 iNOS와 COX-2의 발현을 분석하였고, 항산화 활성 측정을 위해 ABTS와 DPPH 라디칼 소거 활성을 확인하였다. 각 추출물의 세포생존, NO생성 및 단백질 발현 분석에서 농도 의존적으로 LPS에 대해 억제 및 저해 효능을 확인하였고, 특히 0.25, 0.5 그리고 1.0 mg/mL에서 유의적인 차이를 확인하였다. ABTS와 DPPH 라디칼 소거 활성은 합성 항산화제인 BHT보다 활성이 좋지 않았지만, 천연 항산화제로써의 가능성을 확인하였고, 훌륭한 식품소재로써 기능성 식품 및 각종 질병에 대한 예방의 목적으로 활용이 가능할 것으로 사료된다. 이미 메밀에 관한 연구는 꾸준히 진행되는 추세로 본 연구에서 생리활성이 우수한 메밀을 이용한 조리는 영양학적, 미각적으로 시너지 효과를 볼 수 있을 것으로 사료되지만, 아직 메밀에 관한 연구가 미흡하여 아직까지 명확하게 확립되어 있는 단계가 아니다. 따라서 본 연구 결과는 조리 및 식품학적의 기초지식을 제공할 것으로 사료되어지고, 좀 더 정확한 결과를 위해 동물모델을 이용한 생리활성 연구가 필요할 것으로 판단되어지며, 메밀의 유효단일물질인 루틴(rutin) 등의 분리 방법 확립 등이 추가적으로 필요할 것으로 판단된다.

한글 초록

본 연구는 메밀의 항산화 및 항염증 활성을 측정하기 위해 열수 추출을 한 후 ABTS 및 DPPH 라디칼을 통한 항산화 활성 그리고 RAW264.7 세포에서 MTT, NO생성 억제, 단백질 발현량을 분석하였다. ABTS 라디칼과 DPPH 라디칼 활성 측정 시 추출물 농도 의존적으로 소거 활성을 확인하였고, 세포독성 평가에서는 1.0 mg/mL가 적정 농도임을 확인하였다. 열수 추출물 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 그리고 1.0 mg/mL에서 NO생성 억제효능은 0.5, 1.0 mg/mL에서 50% 이상을 나타내었고 ($p<0.05$), 단백질 발현 분석에서 LPS처리그룹에 비해 열수 추출물 처리군이 약 40% 저해하는 것을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 영산대학교 교내연구비 지원에 의해 연구되었음.

참고문헌

Ha HJ, Lee CB (2014). Antioxidant and anti-inflammation activity of red cabbage extract. *The Korean Journal of Culinary Research* 20(2):16-26.

Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE (1992). Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now. *J Lab Clin Med* 119(6): 598-620.

Han NK, Park CM, Kwon JC, Joung MS, Choi JW (2014). Whitening effect of *Fagopyrum tataricum* extract. *J Sco Cosmet Scientists Korea* 40(2):179-186.

Ito N, Fukushima S, Tsuda H (1985). Carcinogenicity and modification of the carcinogenic response by BHA, BHT, and other antioxidants. *Crit Res Toxicol* 15(2):109-150.

Jin HJ, Kim JS, Kang SS, Son KH, Chang HW, Kim HP (2010). Anti-inflammatory and anti-arthritic activity of the roots of *Sophora flavescens*. *J Ethnopharmacol* 127(3):589-595.

Kang HW (2012). Antioxidant and anti-inflammatory effect of extracts from *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer. *J Korean Soc Food*

Sci Nutr 41(8):1072-1078.

Kim BR, Choi YS, Lee SY (2000). Study on bread-making quality with mixture of buckwheat-wheat flour. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29(2):241-247.

Kim SH, Lee EY, Ham SS (2007). Antioxidation and antigenotoxic effects of buckwheat sprout extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36(8): 955-959.

Kim YS, Lee SJ, Hwang JW, Kim EH, Park PJ, Jeon BT (2011). Antioxidant activity and protective effects of extracts from *Helianthus tuberosus* L. leaves on t-BHP induced oxidative stress in chang cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40(11):1525-1531.

Lee CB (2012). Anti-inflammation activity of water extracts from *Hericium erinacium* among medicinal mushrooms. *The Korean Journal of Culinary Research* 18(4):233-242.

Lee HH (2008). A study on the utilization of functional cosmetics materials using the bioactive compounds from buckwheat. *Korean Society for Aesthetics and Cosmetology* 6(2):1-8.

Lee JH (2007). Studies of antioxidant and anti-inflammatory activity for *Elsholtzia splendens*. *Annals of Plant Resources Research* 6:147-161.

Lee MK, Park SH, Kim SJ (2011). A time-course study of flavonoids in buckwheats (*Fagopyrum* species). *CNU Journal of Agricultural Science* 38(1):87-94.

Lee SJ, Kim EK, Hwang JW, Oh HJ, Chenong SH, Moon SH, Jeon BT, Lee SM, Park PJ (2010). Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysates of duck processing by-products. *Food Chem* 123(2):216-220.

Lee SJ, Kim YS, Hwang JW, Kim EK, Moon SH, Jeon BT, Jeon YJ, Kim JM, Park PJ (2012). Purification and characterization of a novel antioxidative peptide from duck skin by-products that protects liver against oxidative damage. Food Res Int 49(1):285-295.

Lee SY, Shim HH, Ham SS, Rhee HI, Choi YS, Oh SY. (1991). The nutritional components of buckwheat flours and physicochemical properties of freeze-fried buckwheat noodles. *J Korean Soc Food Nutr* 20(4):354-362.

Ma JS, Kim WJ, Kim JJ, Kim TJ, Ye SK, Song MD, Kang H, Kim DW, Moon WK, Lee KH (2010). Gold nanoparticles attenuate LPS-induced NO production through the inhibition of NF-jB and IFN-b/STAT1 pathways in RAW-264.7 cells. Nitric Oxide 23(3):241-219.

Margna U, Margna E (1978). Differential biosynthesis of buckwheat flavonoids from endogenous substrates. *Biochem Physiol Pflanzen* 173 (4):347-354.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991). Nitric oxide: physiolohy, pathophysiolohy, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43(2):109-142.

Moon TC, Park JO, Chung KW, Son KH, Kim HP, Kang SS, Chang HW, Chung KC (1999). Anti. inflammatory activity of the flavonoid components of *Lonicera japonica*. *Yakhak Hoeji* 43 (1):117-123.

Oh SI, Lee MS (2010). Functional activities of ethanol extracts from *Flammulina velutipes*. *Korean J Food Nutr* 23(1):15-22.

Park BJ, Chang KJ, Park JJ, Park CH (2004). Effects of temperature and photoperiod on the growth of tatary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). *Korean J Plant Resour* 17(3):352-357.

Park HS (2011) Comparison of antioxidant activities of wild grape seed(*Vitis coignetiea* seed) extracts by solvents. *The Korean Journal of Culinary Research* 17(1):270-279.

Pomeranz Y (1983). Buckwheat : Structure, composition, and utilization. *CRC Critical Reviews in Food Sci and Nutr* 19(3):238-248

Sarkar D, Saha P, Gamre S, Bhattacharjee S, Hariharan C, Ganguly S, Sen R, Mandal G, Chattopadhyay S, Majumdar S, Chatterjee M (2008). Anti-inflammatory effect of allylpyrocatechol in LPS-induced macrophages is mediated by suppression of iNOS and COX-2 via the NF-κB pathway. *Int Immunopharmacol* 8 (9):1264-1271.

Seo GU, Choi SY, Kim TW, Ryu SG, Park JH, Lee SC (2013). Functional activities of makgeolli by-products as cosmetic materials. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 23(4):505-511.

Storck M, Schilling M, Burkhardt K, Prestel R, Abendroth D, Hammer C (1994). Production of proinflammatory cytokines and adhesion molecules in *ex-vivo* xenogeneic kidney perfusion. *Transpl Int* 7(Suppl 1):647-649.

Wang MT, Honn KV, Nie D (2007). Cycloxygenases, prostanoids and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 26(3-4):525-534.

Watanabe M, Ito M (2002). Changes in antioxidative activity and flavonoids composition of the extracts from aerial parts of buckwheat during growth period. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 49(2):119-125. [in Japanese]

Wink DA, Mitchell JB (1998). Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 25(4-5): 434-456.

Yaar M, Gilchrest BA (2001). Skin aging: postulated mechanisms and consequent changes in structure and function. *Clin Geriatr Med* 17 (4):617-630.

Yun HY, Dawson VL, Dawson TM (1996). Neurobiology of nitric oxide. *Crit Rev Neurobiol* 10(3-4):291-316.

2014년 09월 18일 접수
2014년 10월 30일 1차 논문수정
2014년 11월 15일 2차 논문수정
2014년 11월 30일 3차 논문수정
2014년 12월 05일 논문게재확정