

단일 및 복합 프로바이오틱스 균주에 의한 쓴메밀 내 Rutin의 Quercetin으로의 생물전환 및 이의 생리활성 비교

김승인^{1†}, 조은비^{1†}, 조교희¹, 권창¹, 임석희¹, 김종원¹, 정명준¹, 김수정^{2*}, 임상현^{1*}

¹㈜셀바이오텍 세포공학연구소

²농촌진흥청 국립식량과학원 고령지농업연구소

Received: November 21, 2023 / Revised: December 5, 2023 / Accepted: December 13, 2023

Comparison of Bioconversion Ability and Biological Activities of Single and Multi-Strain Probiotics for an Active Molecule in Roasted Tartary Buckwheat

Song-in Kim^{1†}, Eunbee Cho^{1†}, Kyohee Cho¹, Chang Kwon¹, Seok-hee Lim¹, Jong Won Kim¹, Myung Jun Chung¹, Su Jeong Kim^{2*}, and Sanghyun Lim^{1*}

¹R&D Center, Cell Biotech Co., Ltd., 50, Gimpo 10003, Republic of Korea

²Highland Agriculture Research Institute, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Pyeongchang 25342, Republic of Korea

In this study, we aimed to evaluate the bioconversion ability of single (*Lactiplantibacillus plantarum* CBT LP3, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CBT SL6, *Streptococcus thermophilus* CBT ST3) and multi-strain probiotics to convert rutin to quercetin in roasted tartary buckwheat, and to assess their biological activities. To evaluate the bioconversion efficiency, each strain was cultured for 24 h in MRS media with 5% roasted tartary buckwheat 'Hwangguem-Miso' powder. After then, rutin and quercetin contents were determined by HPLC. Additionally, the biological activities were compared before and after bioconversion of an ingredient. Anti-oxidant effects were measured by DPPH and ABTS assays. Anti-inflammatory effects were determined by measuring NO production, and levels of iNOS, TNF- α , IL-6 and IL-4 using an LPS-induced Raw 264.7 cell model. The bioconversion rate under the combination of three species of probiotics significantly increased more than single species. Antioxidant efficacy results showed the highest activity when the combination of three species of probiotics cultured. The pro-inflammatory factors such as nitric oxide, iNOS, TNF- α , and IL-6 were significantly decreased when the three types of probiotics were combined than single strain was cultured. In addition, level in the anti-inflammatory factor IL-4 was increased. The multi-strain probiotics showed increased bioconversion efficiency, effects of anti-oxidant and anti-inflammatory compared to the single strain. These findings suggest that the fermentation of tartary buckwheat by probiotics may be a valuable candidate for developing functional foods with anti-oxidation and anti-inflammation.

Keywords: Korean indigenous probiotics, tartary buckwheat, rutin, quercetin, bioconversion, anti-inflammation

서 론

메밀 (*Fagopyrum* ssp.)은 일년생 초본으로 분류학적으로

*Corresponding authors

S. J. Kim

Phone: +82-33-330-1840, Fax: +82-33-330-1519

E-mail: sjkim30@korea.kr

S. Lim

Phone: +82-31-987-6205, Fax: +82-31-987-6216

E-mail: shlim@cellbiotech.com

[†]These two authors contributed equally to this work.

는 피자식물문(*Magnoliophyta*), 목련강(*Magnoliopsida*), 마디풀목(*Polygonales*), 마디풀과(*Polygonaceae*), 메밀속(*Fagopyrum*)으로 분류된다. 우리나라를 포함하여 일본, 중국, 네팔 등 아시아를 비롯하여 유럽, 남미 등 전 세계적으로 분포한다[1]. 메밀의 종류는 재배종과 야생종을 포함하여 약 20여종이 있으며, 우리나라에서는 일반메밀(*Fagopyrum esculentum*, sweet buckwheat, common buckwheat)과 쓴메밀(*Fagopyrum tataricum*, bitter buckwheat, tartary buckwheat)이 대표적인 재배종이다[1].

메밀은 식이섬유가 풍부하고, 플라보노이드, 페놀화합물

등의 유용한 성분뿐만 아니라, 아연, 망간, 마그네슘, 인, 구리와 같은 미네랄도 많이 함유되어 있어, 건강식품으로 주목 받고 있다[2]. 메밀은 플라보노이드계 생리활성 물질인 rutin, quercetin 등의 고함유 식품으로, 콜레스테롤, 당뇨, 고혈압, 비만, 항산화, 항염증, 인지능력 및 신경세포보호 등에 효과가 보고되고 있다[3-10]. 쓴메밀과 일반메밀의 생리활성 성분을 비교한 연구내용에 따르면, 일반메밀에 비해 쓴메밀의 총 페놀 및 플라보노이드의 함량이 각각 2배와 2.7배 정도 높게 함유되어 있으며[11], 메밀의 대표적 기능성분인 rutin은 일반메밀에 비해 쓴메밀이 약 59배 많이 함유된 것으로 보고 되었다[5]. Rutin은 많은 생리활성을 갖고 있음에도 불구하고 생체이용률이 낮은 단점이 있으며, 일반적으로 플라보노이드계 물질들의 항산화 활성은 배당체보다는 aglycone이 높다고 알려져 있다[12]. Rutin 및 quercetin의 생리활성을 비교한 연구결과에서도 항산화, 항염증, 신경퇴행성 질환 및 항비만 등에서 rutin에 비해 quercetin의 활성이 더 좋은 것으로 확인되었다[13-15]. Rutin의 낮은 생체이용률은 배당체 구조를 갖는 플라보노이드계 물질의 공통된 특징으로, 이를 개선하기 위하여 배당체의 당 결합을 끊어주는 화학적 방법이 있으나, 이는 기본 구조를 유지하기가 어려워 각종 불필요한 부산물 및 오염 물질을 생성할 수 있다는 문제점이 있다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 생물학적 방법인 미생물이나 이들이 생산하는 대사산물 등을 활용한 연구가 활발히 이루어지고 있다[14, 16]. 미생물이 생산하는 다양한 효소 중에는 플라보노이드 배당체의 당 결합을 끊을 수 있는 β -glucosidase, cellulase, α -rhamnosidase 및 pectinase 등이 있으며[17], 결합 내 존재하는 미생물 중에는 rutin 등 기타 배당체들을 가수분해 하여 당 부분이 제거된 aglycone 형태로 장내 흡수가 가능하게 해준다[18].

선행 연구에서는 배당체 구조의 진세노사이드 Rb1과 Rd를 저분자 구조인 compound K로 생물전환하는 프로바이오틱스 균주를 확인하였으며[19], 프로바이오틱스 17종의 유전자 분석을 통하여 rutin에서 quercetin으로 전환하는 효소(α -rhamnosidase와 β -glucosidase) 유전자를 확인하고, 프로바이오틱스와 쓴메밀 배양을 통해 quercetin으로 생물전환하는 균주를 확인하였다[20]. 본 연구에서는, 쓴메밀이 첨가된 배양액에서 생물전환률이 우수한 단일 유산균 3종 및 유산균 복합배양을 통해 rutin에서 quercetin으로 전환능을 비

교하고, 배양 전후의 항산화, 항염 활성을 비교하여 천연물인 쓴메밀과 유산균의 발효가 건강에 도움이 되는지를 조사하고자 한다.

재료 및 방법

볶음 쓴메밀 첨가 배지 제조 및 균주의 배양

본 연구에 사용된 쓴메밀 ‘황금미소’(*Fagopyrum tataricum* L. Gaertn cv. Hwangguem-Miso)는 농촌진흥청 국립식량과학원 고령지농업연구소(Highland Agriculture Research Institute, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Republic of Korea)에서 개발한 품종이다. 볶음 쓴메밀 분말은 쓴메밀 종실을 침지, 증제, 탈피, 볶음, 분말 공정을 거쳐 제조된 것으로 봉평영농조합(Korea)으로부터 구입하였다.

균주는 선행연구[20]를 통하여 rutin에서 quercetin으로 전환되는 전환률이 가장 우수한 것으로 확인된 (주)셀바이오틱의 프로바이오틱스 3종(CBT LP3, SL6, ST3)을 사용하였다(Table 1). 실험에 사용된 균주는 De Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) 배지(BD Difco, USA)를 사용하여 37°C에서 24시간 동안 호기적으로 배양하였으며, 복합 균주 배양은 각 균주를 동일한 비율로 희석하여 사용하였다.

볶음 쓴메밀 첨가 배지는 glucose을 제거한 MRS 배지에 볶음 쓴메밀 분말 50 g/L, 식품첨가물인 상업용 효소 Cellulase KN® (Bision Corporation, Republic of Korea)를 원물의 0.5%(w/w) 첨가하여 제조하였다. 각 프로바이오틱스를 610 nm에서 흡광도 값이 1.0이 되도록 배양 후 배양액을 4,255 × g로 10분간 원심분리하여 상등액을 제거하고, 볶음 쓴메밀 첨가 배지에 접종하여 37°C에서 24시간 동안 호기적으로 배양하였다.

Rutin, quercetin 및 isoquercetin 대사체 함량 분석

배양액에서 rutin과 isoquercetin의 함량을 분석하기 위해, 배양여액을 원심분리(4,255 × g, 10분) 후 상등액을 0.22 μ m PTFE membrane syringe filter (13 mm diameter, Agilent Technologies, USA)로 여과하여 제조하였다.

배양액에서의 quercetin 분석 시료는 배양여액과 ethyl acetate를 1:1로 혼합한 후에 원심분리(4,255 × g, 3분)하여

Table 1. Probiotics species used in this study and their origin.

Species	KCTC No. ¹⁾	Origin
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> CBT LP3	10782BP	Korean fermented vegetable product, kimchi
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CBT SL6	11865BP	Korean human feces
<i>Streptococcus thermophilus</i> CBT ST3	11870BP	Korean human feces

¹⁾List of Korean collection for type cultures (KCTC) reference number

Table 2. HPLC conditions for rutin and quercetin content determination.

Item	Condition	
Column	Eclipse Plus C ₁₈ (4.6 x 250 mm, 5 μm)	
Flow rate	1 ml/min	
Injection volume	10 μl	
Mobile phase	A: 0.1% Formic acid in water B: Acetonitrile	
Wavelength	259 nm	
Column temperature	35 °C	
Gradient elution system of mobile phase		
Time (min)	A (%)	B (%)
0	75	25
4.5	50	50
7.5	40	60
10	0	100
12	0	100
13	75	25
15	75	25

상등액을 취하는 과정을 2회 반복하여 수행하였다. 취득한 ethyl acetate 층을 원심증발농축기(CVE-2000, Sunil Eyela Co. Ltd., Republic of Korea)를 이용하여 농축한 뒤 methanol에 용해하여 분석하였다.

성분분석은 UV-detector가 부착된 HPLC (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific, USA)를 사용하였고, 분석 조건은 Table 2와 같다. Column은 Eclipse Plus C₁₈ (4.6 x 250 mm, particle size 5 μm, Agilent Technologies) 역상 컬럼을 사용하였다. 표준 물질로 rutin은 Phytolab (Vestenbergsgreuth, Germany), isoquercetin (quercetin 3-β-D-glucoside)과 quercetin은 Sigma-Aldrich (USA)사의 HPLC grade 제품을 사용하였다.

항산화 활성 분석

ABTS (2,2'-Azino-bis-3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid, Sigma-Aldrich) 라디칼 소거 활성은 ABTS 양이온 라디칼의 흡광도가 각 샘플의 항산화 성분에 의해 억제되어 특유의 색인 청록색으로 변하는 현상을 이용하여 수행하였다[21, 22]. 7 mM ABTS 용액과 39.2 mM potassium persulfate 용액을 혼합하여 차광한 상태로 16시간 상온에 방치하여 라디칼의 생성을 유도한 후, ABTS 라디칼 용액이 750 nm에서 흡광도 값이 1.0이 되도록 희석하여 실험에 사용하였다. 소거활성은 96 well plate에 ABTS 라디칼 용액 용액 180 μl에 시료 20 μl를 첨가하고 15분간 반응시킨 후 iMark™ Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad Laboratories, USA)를 사용하여 750 nm에서 흡광도를 측정

하였다.

DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma-Aldrich) 라디칼 소거법은 보라색의 DPPH 용액이 항산화 물질의 전자공여로 인해 탈색되어 나타내는 정도를 흡광도로 측정하여 항산화능을 평가하는 원리를 이용하였다. DPPH 라디칼 소거 활성은 99% methanol에 DPPH를 0.2 mM로 첨가한 용액을 540 nm에서 흡광도가 1.0가 되도록 희석하여 사용하였다. 희석한 DPPH 용액 180 μl에 시료 20 μl를 첨가하고, 실온에서 30분간 반응 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

항산화 활성의 양성 대조물질로는 ascorbic acid (L-Ascorbic acid, Sigma-Aldrich)를 사용하였고, 결과는 시료를 처리하지 않은 대조군에 대한 %로 계산하였으며, 이를 50% 감소시키는 값으로 환산하여 나타내었다.

세포배양 및 시료 동결건조

RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(Republic of Korea)에서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (DMEM, Life Technologies Inc., USA) 배지에, 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone™, GE healthcare life sciences, USA), 100 U/ml penicillin (Hyclone™, GE healthcare life sciences) 및 100 μg/ml streptomycin (Hyclone™, GE healthcare life sciences)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

우수한 생물전환률이 확인된 프로바이오틱스 3종(LP3, SL6, ST3)과 이들의 복합균주(3MIX, LP3 + SL6 + ST3)를 1일차 배양액 및 프로바이오틱스에 첨가하지 않은 1일차 배양액을 동결건조하였고, 이를 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich)에 녹여 세포에 처리하였다.

세포 생존율 측정

생물전환률이 우수한 시료의 세포 생존율을 알아보기 위하여 MTT assay 방법을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포를 96 well plate에 1.0 x 10⁵ cells/well로 분주하고 24시간 후 1.0 μg/ml 농도의 LPS와 각 시료를 농도별(1.25, 2.5, 5, 10, 20%, V/V)로 동시에 처리하였다. 그 후 24시간 배양 후 0.5 mg/ml의 MTT 용액을 100 μl씩 첨가하여 1시간 배양하였다. 배양을 완료한 후 상층액을 제거하고 300 μl의 DMSO 용액을 분주하여 실온에서 10분 동안 shaking한 후 plate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

NO 생성량 측정

NO (Nitric oxide) 생성량은 Griess Reagent Kit (Biomax, Republic of Korea)를 사용하여 배양액 중에 존재하는 NO₂⁻ 형태로 측정하였다[23]. RAW 264.7 세포를 96 well plate에 1.0 x 10⁶ cells/ml로 분주한 후, 24시간 동안 배양한 후 시료

와 LPS (1.0 µg/ml) 동시에 처리하여 24시간 동안 다시 배양하였다. 그 후 생성된 NO는 원심분리하여 상등액을 취한 후, 제조사의 프로토콜에 따라 상등액 50 µl에 25 µl의 N1 버퍼와 25 µl의 N2 버퍼를 순차적으로 혼합하여 10분간 암실에서 반응시키고 iMark™ Microplate Absorbance Reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite (NaNO₂)를 연속희석법으로 희석하여 표준농도곡선을 그렸으며, 표준곡선과 비교하여 NO 생성량을 산출하였다. NO의 양성대조군으로 quercetin (Sigma-Aldrich)을 사용하였다.

Quantitative Real-time RT-PCR

배양된 RAW 264.7 세포에 TRIzol reagent (Invitrogen™, USA)를 처리하여 total RNA를 분리하였다. RNA는 RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany)을 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 역전사하였고, cDNA로 합성하여 실험에 이용하였다. 타겟 mRNA 발현량을 분석하기 위해, PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa Bio, Inc., Japan)를 사용하여 CFX96 Dx Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad Laboratories)에서 mRNA 발현량을 측정하였다. Real-Time PCR 조건은 pre-denaturation 과정을 95°C에서 30초, annealing 과정을 60°C에서 30초씩 35 cycles로 증폭하였으며 extension은 72°C에서 30초간 수행하였다. 실험군 및 대조군의 internal standard로 β-actin를 사용하였다. 실험에 사용된 mRNA의 primer 및 sequence는 Table 3과 같다[24].

Pro/anti-inflammatory cytokines 분비량 측정

ELISA kit (Mouse DuoSet ELISA kit, R&D systems, USA)를 이용하여 RAW 264.7 세포의 세포배양액 내의 IL-6 및 IL-4 사이토카인 분비량을 측정하였다. 세포배양액을 얻기 위해 RAW 264.7 세포를 1.0 × 10⁴ cells/well로 24 well plate에 접종하고 18시간 배양하였다. 이 후 각 시료를 처리하고 1 µg/ml LPS로 자극을 주어 12시간 배양 후에 원심분리를 통해 상등액을 분리하여 실험에 사용하였다. 실험은 R&D systems ELISA kit에서 제공하는 실험 방법에 따라 진행

Table 3. Primer sequences of individual gene for real-time RT-PCR.

Gene	Sequence	Reference
iNOS	forward 5'-CATGCTACTGGAGGTGGGTG-3'	Kim et al. (2019)
	reverse 5'-CATTGATCTCCGTGACAGCC-3'	
TNF-α	forward 5'-AGCACAGAAAGCATGATCCG-3'	
	reverse 5'-CTGATGAGAGGGAGGCCATT-3'	
β-actin	forward 5'-ATCACTATTGGCAACGAGCG-3'	
	reverse 5'-TCAGCAATGCTGGGTACAT-3'	

행하였으며, microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

각 실험은 3회 반복으로 수행하였으며, 통계분석은 GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., USA) 통계 소프트웨어를 사용하여 평균 ± 표준편차(Mean ± SD)로 표기하였다. 결과의 유의성 분석을 위하여 일원배치 분산분석(ANOVA)을 실시하였으며, Turkey의 방법으로 사후검정을 진행하여 p-value (<0.05, <0.01, <0.001)로 통계적 유의성을 평가하였다.

결과 및 고찰

단독 및 복합 프로바이오틱스에서 생물전환능 비교

Rutin은 α-rhamnosidase에 의해 isoquercetin으로, isoquercetin은 β-glucosidase에 의해 quercetin으로 전환되며, rutinoidase에 의해 rutin에서 quercetin으로 전환될 수 있다. 본 연구진의 선행연구에서 한국형 프로바이오틱스 17종으로부터 α-rhamnosidase와 β-glucosidase 유전자 보유 여부와 각 균주별 쓴메밀의 rutin이 quercetin으로 전환되는 전환능을 확인하였다. CBT LP3, SL6, ST3 균주의 생물전환능이 우수하였고, 복합효소 Cellulase KN® 첨가가 생물전환능 증가 및 빠른 전환을 일으켰다[20]. 따라서 본 연구에서는 생물전환능이 우수하여 선발된 3종의 프로바이오틱스 균주를 이용하여 단독 및 복합균주의 생물전환능을 평가하였다. 각 균주의 배양 전과 배양 후의 생균수 및 pH 변화를 측정된 결과, 배양 전과 후의 생균수 차이는 없었으며, pH는 배양 전 6.3에서 배양 후 LP3: 4.9, SL6: 5.1, ST3: 5.2, 3MIX: 5.0으로 배양 후 감소되는 경향을 보였다(Data not shown). 볶음 쓴메밀 분말이 포함된 배양액은 배양 전에 rutin이 965.8 µM, quercetin이 4.0 µM의 농도였으나, 24시간 배양 후 rutin이 8.1–17.0 µM, quercetin이 673.5–937.8 µM의 농도로 quercetin의 농도가 크게 증가된 것을 확인하였다(Fig. 1). 단독 및 복합균주 조합별 전환률은 단독 균주 배양 시 84–89%, 2중 복합 균주 배양 시 70–90%, 3중 복합 균주 배양 시 97%로 3중 복합 균주 배양이 가장 우수한 전환능이 있는 것으로 확인되었다(Table 4).

볶음 쓴메밀 분말 첨가 배양여액의 항산화 효과

볶음 쓴메밀 첨가 배지에서 단독 및 복합 프로바이오틱스 균주 배양여액의 항산화 효과를 평가하기 위하여 DPPH와 ABTS를 측정하였으며, 결과는 RC₅₀ value (Concentration for 50% reduction of free radical)로 표시하였다. 이들 두 라디칼은 항산화 물질로부터 전자 또는 수소를 제공받으면

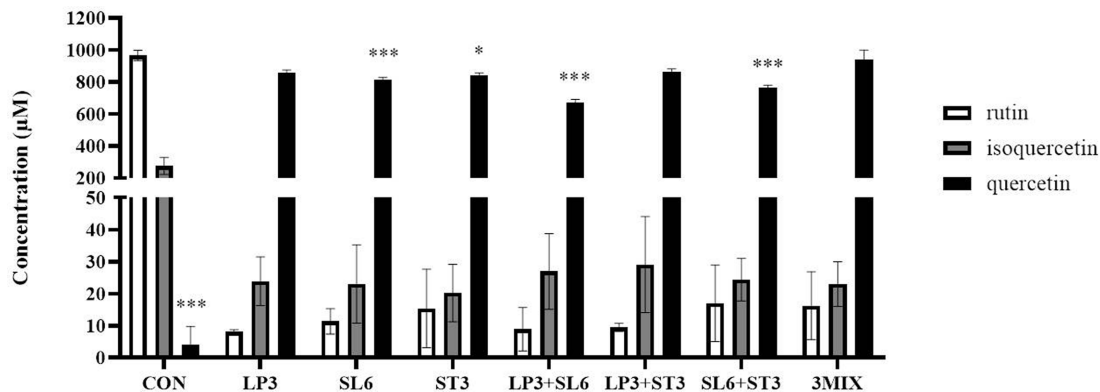


Fig. 1. Comparison of bioconversion activities of rutin and isoquercetin to quercetin with each probiotics and enzyme complex.

Quercetin yield (mol quercetin/mol rutin + isoquercetin). CON, no probiotics inoculated media with roasted tartary buckwheat powder; LP3, SL6, ST3, each probiotics cultured media in T-MRS; LP3 + SL6, LP3 and SL6 probiotics cultured media in T-MRS; LP3 + ST3, LP3 and ST3 probiotics inoculated group; SL6 + ST3, SL6 and ST3 probiotics cultured media in T-MRS; 3MIX, LP3, SL6 and ST3 probiotics cultured media in T-MRS. Results are expressed as mean \pm standard deviation (SD) of the mean. * $p < 0.05$ vs. 3MIX, *** $p < 0.001$ vs. 3MIX (Quercetin).

Table 4. The yield of bioconversion of rutin and isoquercetin to quercetin with each probiotics and enzyme complex.

Probiotics species	Quercetin yield (mol quercetin/mol rutin + isoquercetin)
LP3	88.95 \pm 1.34%
SL6	84.10 \pm 1.13%
ST3	87.00 \pm 1.27%
LP3 + SL6	69.75 \pm 0.63%
LP3 + ST3	89.55 \pm 1.34%
SL6 + ST3	79.10 \pm 0.98%
3MIX	97.05 \pm 3.18%

Table 5. RC₅₀ values (Concentration for 50% reduction of free radical) resulting from DPPH radical and ABTS radical scavenging of each probiotics.

Treatment	RC ₅₀ (μ g/ml)	
	DPPH	ABTS
Vit C	0.07 \pm 0.00	0.05 \pm 0.00
Quercetin	0.06 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00
T-MRS	0.57 \pm 0.00	0.58 \pm 0.01
3MIX	0.41 \pm 0.01	0.21 \pm 0.01
LP3	0.68 \pm 0.02	0.56 \pm 0.02
SL6	0.69 \pm 0.02	0.57 \pm 0.00
ST3	0.57 \pm 0.08	0.56 \pm 0.01

¹)2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

²)2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt

환원되어 고유의 색이 변하게 되어, 다양한 소재들의 항산화 활성을 측정하기 위한 방법으로 널리 이용되고 있다[25]. 배양 전 배양액의 DPPH와 ABTS의 RC₅₀ value는 각각 0.6, 0.6 μ g/ml로 확인되었다. 단일 균주 배양 시 배양액의 항산화 효과가 없었지만, 3종 복합균주 배양 시 대조군 대비 RC₅₀ value가 각각 0.4, 0.2 μ g/ml로 항산화 효과가 증진되는 것을 확인하였다(Table 5). 이는 3종 복합균주 배양에 따른 대사산물에 의한 시너지 효과로 사료된다. 선행연구에서 쓴메밀 가공공정 중 증숙, 로스팅, 추출 조건 등의 변화는 폴리페놀, 플라보노이드 등의 기능성 물질의 함량 변화를 가져오고 이에 따른 항산화 활성이 변화한다고 보고하였다[26–28]. 이러한 복합균주 배양에 따른 자유라디칼 소거 활성의 증가는 쓴메밀의 항산화 효과를 증진시킬 수 있음을 시사한다.

볶음 쓴메밀 분말 첨가 배양액의 항염증 효과

Lipopolysaccharide (LPS)로 유도된 마우스 유래 RAW 264.7 세포 *in vitro* 모델은 항염증 효능 평가에 보편적으로 널리 사용되고 있는 방법이다[29, 30]. 볶음 쓴메밀 분말을 첨가하여 배양한 프로바이오틱스 배양액의 항염활성을 평가하기 위해 각 시료를 1.25, 2.5, 5, 10, 20% (V/V) 농도로 처리 및 LPS 1.0 μ g/ml로 염증반응을 유도하여 24시간 뒤 세포 생존율을 MTT assay 방법으로 측정하였다. 10% 이상의 농도에서 유의적으로 세포 사멸이 확인된 그룹이 있었으며, 5% 농도로 처리시 약 10% 내외로 세포사멸이 관찰되었지만 통계적으로 유의미한 차이는 없었다(Fig. 2A). 따라서 5%로 시료 처리 후 염증활성을 측정하였고, 50.0 μ M quercetin을

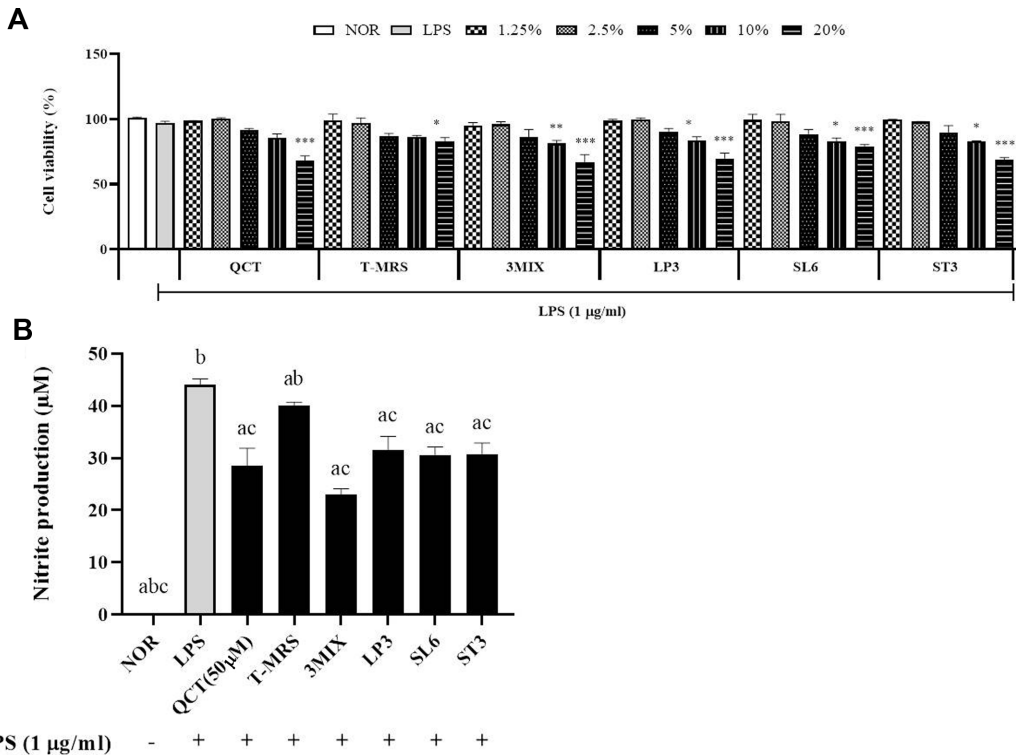


Fig. 2. The effects of probiotics-cultured media with roasted tartary buckwheat powder on cell viability (A) and inhibition of nitrite production (B) in RAW 264.7 macrophages treated with various samples. NOR, untreated group; LPS, LPS-induced group; QCT, 50 µM of quercetin treated group; T-MRS, MRS included roasted tartary buckwheat powder; 3MIX, three probiotics mixture (LP3, SL6, ST3) cultured media in T-MRS; LP3, LP3 probiotics cultured media in T-MRS; SL6, SL6 probiotics cultured media in T-MRS; ST3, ST3 probiotics cultured media in T-MRS. Results are expressed as mean ± standard deviation of the mean (SD), (N = 3). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. NOR, a: vs. LPS group, b: vs. QCT group, c: vs. T-MRS. Significant difference $p < 0.05$

양성대조군으로 사용하였다. LPS 단독 처리군의 NO 생성량은 44.0 µM이었으며, 프로바이오틱스를 첨가하지 않은 배지의 NO 생성량은 40.0 µM로 확인되었다. 볶음 쓴메밀 분말 첨가 후 단독 균주 배양액 처리군의 NO 생성량은 각각 LP3: 31.6 µM, SL6: 30.6 µM, ST3: 30.8 µM으로 확인되었다. 3종 복합 균주 배양액 처리군의 NO 생성량은 21.5 µM으로 LPS 단독 투여군과 비교하여 약 48% 감소하는 효과를 보여 가장 우수한 NO 생성 억제 효과를 나타내었다. 양성대조군으로 사용한 quercetin 처리 보다 약 10% NO 생성 감소를 보였으나, 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Fig. 2B). 쓴메밀의 생물전환으로부터 다양한 생리활성물질이 항염작용을 한 것으로 사료되어 quercetin 단독 치료 보다 NO 생성 억제가 개선된 것으로 추정되며 추후 대사체 분석을 통해 항염 관련 물질을 평가할 필요성이 있다.

많은 선행연구에서 LPS로 유도된 대식세포의 염증반응에서 TNF-α 발현증가가 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 발현을 증가시키고, 증가된 iNOS에 의하여 NO 생성이 증가한다고 알려져 있다[30]. 본 연구에서는 볶음 쓴메

밀 분말을 첨가하여 배양한 프로바이오틱스 배양액의 항염 활성을 평가하기 위해 LPS로 염증을 유도한 대식세포에 시료를 처리하였다. iNOS와 TNF-α의 mRNA 발현을 qRT-PCR로 측정된 결과, iNOS의 mRNA 발현은 LPS 단독 처리군에서 약 27배 발현이 증가하였으며, 배양액 처리군은 LPS 단독 처리군과 비교하여 3MIX 56%, LP3 48%, SL6 42%, ST3 48%, 볶음 쓴메밀 분말이 포함된 프로바이오틱스 미접종 배양액(T-MRS) 11%의 iNOS 발현을 억제하여 3MIX 처리군이 가장 염증 억제 효과가 우수하였다(Fig. 3A). 이는 양성대조군으로 사용한 quercetin 보다 유의하게 발현이 억제되었다(Fig. 3A). TNF-α 발현은 LPS 단독 처리에 의해 약 6.6배 증가하였지만, 볶음 쓴메밀 분말 첨가배지에서 프로바이오틱스를 배양한 배양액 처리에서 각각 3MIX 49%, LP3 45%, SL6 47% 및 ST3 47% 억제되었다(Fig. 3B).

볶음 쓴메밀 분말 첨가 배양액의 사이토카인 분비 조절

볶음 쓴메밀 분말 첨가배지에서 프로바이오틱스 배양액의 염증 억제기능이 염증유발 관련 사이토카인(pro-

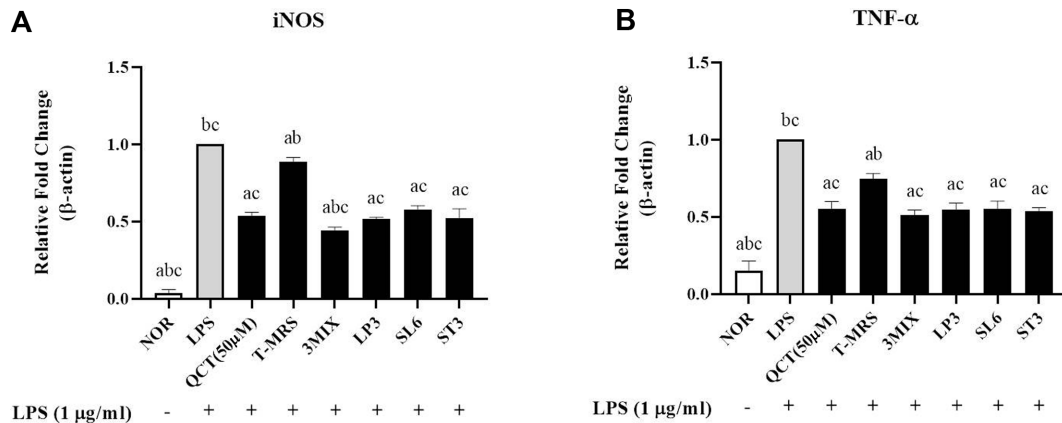


Fig. 3. Levels of iNOS (A) and TNF- α (B) gene expression in LPS induced-RAW 264.7 macrophages treated probiotics cultured media with roasted tartary buckwheat powder. NOR, untreated group; LPS, LPS-induced group; QCT, 50 μ M of quercetin treated group; T-MRS, MRS included roasted tartary buckwheat powder; 3MIX, three probiotics mixture (LP3, SL6, ST3) cultured media in T-MRS; LP3, LP3 probiotics cultured media in T-MRS; SL6, SL6 probiotics cultured media in T-MRS; ST3, ST3 probiotics cultured media in T-MRS. Results are expressed as mean \pm standard deviation of the mean (SD), ($N = 3$). a: vs. LPS group, b: vs. QCT group, c: vs. T-MRS. Significant difference $p < 0.05$

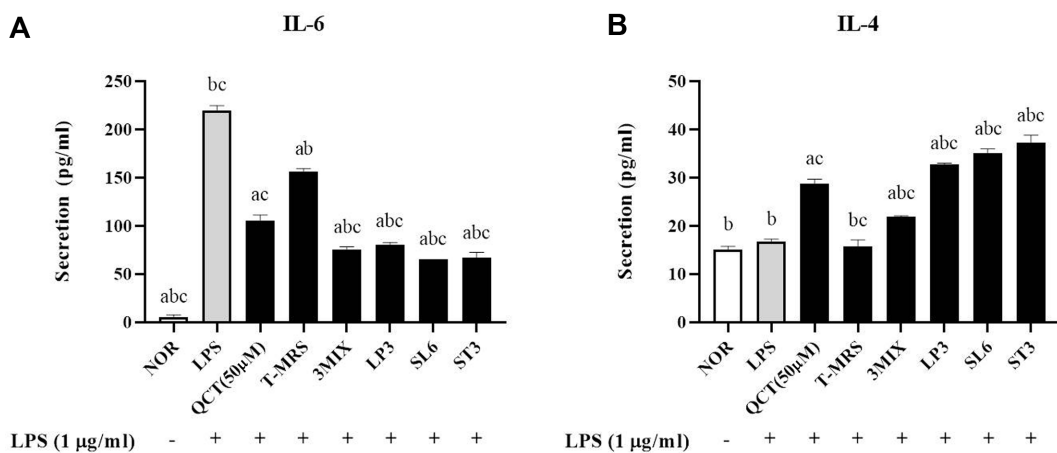


Fig. 4. Production of IL-6 (A) and IL-4 (B) in LPS induced-RAW 264.7 macrophages treated with various samples. NOR, untreated group; LPS, LPS-induced group; QCT, 50 μ M of quercetin treated group; T-MRS, MRS included roasted tartary buckwheat powder. treated group; 3MIX, three probiotics mixture (LP3, SL6, ST3) cultured media in T-MRS; LP3, LP3 probiotics cultured media in T-MRS; SL6, SL6 probiotics cultured media in T-MRS; ST3, ST3 probiotics cultured media in T-MRS. Results are expressed as mean \pm standard deviation of the mean (SD) ($N = 3$). a: vs. LPS group, b: vs. QCT group, c: vs. T-MRS. Significant difference $p < 0.05$

inflammatory cytokines) 또는 항염증 관련 사이토카인 (anti-inflammatory cytokines) 조절에 의한 것 인지를 확인하고자, IL-6 및 IL-4의 분비량을 ELISA 방법으로 측정하였다. LPS 단독 처리에 의해 IL-6 분비량은 약 45배 증가한 219.9 μ g/ml로 확인되었다. 볶음 쓴메밀 분말 첨가배지에 프로바이오틱스 배양한 배양여액 처리 시 각각 3MIX 74.9 μ g/ml, LP3 80.6 μ g/ml, SL6 65.1 μ g/ml, ST3 66.8 μ g/ml로 측정되어, 63–70%의 IL-6 분비가 억제되었으며, T-MRS 처리군에서 156.2 μ g/ml로 약 29%의 억제되었다(Fig. 4A). 또

한 균주별 모든 배양여액이 quercetin 보다 IL-6 분비를 억제하여, quercetin 단독 물질 보다는 생물전환 여액에 quercetin을 포함한 다양한 항염물질이 포함되어 있을 것으로 추정된다. IL-4 분비량은 T-MRS에서 15.8 μ g/ml로 확인된 반면, 3MIX 21.8 μ g/ml, LP3 32.8 μ g/ml, SL6 37.2 μ g/ml로 프로바이오틱스와 배양 후 1.4–2.4배 증가되었다(Fig. 4B). Fig. 3, 4에서 확인한 바와 같이, 볶음 쓴메밀 분말 첨가 배지인 T-MRS 처리군과 비교하여, 프로바이오틱스 배양여액에서 염증 조절인자인 iNOS, TNF- α , IL-6, IL-4가 유의적

으로 조절되었으며, 이는 프로바이오틱스에 의한 생물전환으로 quercetin 함량의 증가일 것으로 판단된다. 이는 rutin은 프로바이오틱스와 쓴메밀이 가지고 있는 효소에 의하여 분해되기 용이하다는 점과[14, 31], quercetin이 rutin과 비교하여 항염 항산화 활성 및 생체이용률이 높은 것과 관련 있을 것으로 사료된다[32].

이상의 결과들을 종합해보면, 쓴메밀과 생물전환 효소를 가지고 있는 프로바이오틱스를 복합하여 배양하면 쓴메밀의 주요 생리활성 물질인 rutin의 97% 이상이 quercetin으로 생물전환 되는 것을 확인하였으며, 전환된 quercetin을 포함하여 다양한 미생물 대사체들이 생성되어 항염 및 다양한 생리활성을 나타낸 것으로 추정된다. 결론적으로, 프로바이오틱스를 이용한 쓴메밀 발효 또는 쓴메밀과 프로바이오틱스 병용 섭취가 쓴메밀의 생리활성 기능을 증대시킬 수 있을 것으로 사료되어, 프로바이오틱스를 이용한 쓴메밀 발효물의 대사체 연구 및 이의 생리활성 등의 추가연구를 통하여 건강기능식품 등의 기능성 원료 후보로 활용이 가능할 것으로 기대된다.

요 약

본 연구에서는 볶음 쓴메밀 ‘황금미소’ 분말을 첨가한 배지에 단일 및 복합 프로바이오틱스를 배양하여 쓴메밀 주요 성분인 rutin의 quercetin으로 생물전환능과 이의 항산화, 항염 생리활성을 평가하였다. 단일 균주 배양 시 생물전환률은 각각 LP3 89%, SL6 84%, ST3 87%로 보였으며, 프로바이오틱스 3종 복합 배양 시 97%로 단일균주와 비교하여 유의적으로 증가하였다. 배양 전 배양액과 3종의 단일 균주 배양 및 복합 균주 배양액에서 DPPH, ABTS 분석 결과, 3종 프로바이오틱스 복합 균주 배양 시 항산화 활성이 유의적으로 증가하였다. 또한, LPS에 의해 유도된 RAW 264.7 세포의 염증반응 분석결과, 산화질소 생성능, iNOS와 TNF- α 의 mRNA 발현, IL-6와 IL-4 사이토카인 분비능이 3종 프로바이오틱스 복합 균주 배양 시 가장 우수한 효능을 확인하였다.

이상의 결과는 쓴메밀 혹은 rutin이 풍부한 천연물과 이의 생물전환이 가능한 CBT LP3, SL6, ST3의 복합 섭취가 rutin 성분의 quercetin으로 전환 및 항염, 항산화 등의 생리활성 효력 증대에 영향을 줄 수 있을 것으로 판단된다.

Acknowledgments

This study was supported by R&D project from Rural Development Administration <Project: Development of anti-inflammatory tartary buckwheat probiotics product using the bioconversion ability of probiotics>, <Project: Development of high-quality and versatile buckwheat varieties (2nd stage), PJ016068032023> and Ministry of

Agriculture, Food and Rural Affairs <Project: Discovery and industrial development of postbiotics for modulating human microbiome, 321036-05-1-HD040>, Republic of Korea.

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

- Kim SJ, Sohn HB, Suh JT, Kim GH, Hong SY, Kim KD, et al. 2017. Domestic and overseas status of buckwheat production and future trends. *J. Korean Soc. Int. Agr.* **29**: 226-233.
- Sofi SA, Ahmed N, Farooq A, Rafiq S, Zargar SM, Kamran F, et al. 2023. Nutritional and bioactive characteristics of buckwheat, and its potential for developing gluten-free products: An updated overview. *Food Sci. Nutr.* **11**: 2256-2276.
- Kim DW, Hwang IK, Lim SS, Yoo KY, Li H, Kim YS, et al. 2009. Germinated buckwheat extract decreases blood pressure and nitrotyrosine immunoreactivity in aortic endothelial cells in spontaneously hypertensive rats. *Phytother. Res.* **23**: 993-998.
- Chang KJ, Seo GS, Kim YS, Huang DS, Park JI, Park JJ, et al. 2010. Components and biological effects of fermented extract from tartary buckwheat sprouts. *Korean J. Plant Res.* **23**: 131-137.
- Yoon BR, Cho BJ, Lee HK, Kim DJ, Rhee SK, Hong HD, et al. 2012. Antioxidant and anti-adipogenic effects of ethanolic extracts from tartary and common buckweats. *Korean J. Food Preserv.* **19**: 123-130.
- Nam HK, Hong SH, Shin KC, Oh DK. 2012. Quercetin production from rutin by a thermostable β -rutosidase from *Pyrococcus furiosus*. *Biotechnol. Lett.* **34**: 483-489.
- Kim JA. 2006. Study on the anti-obesity effects of germinated-buckwheat. Ms theses, Kangwon National University, Chuncheon, Korea.
- Fukushima T, Tokuji Y, Kinoshita M, Ohnishi M, Kawahara M, Ohba K. 2008. Anti-inflammatory effect of buckwheat sprouts in lipopolysaccharide-activated human colon cancer cells and mice. *Biosci. Biotech. Biochem.* **72**: 3148-3157.
- Holasova M, Fiedlerava V, Smrcinova H, Orsak M, Lachman J, Vavreinova S. 2002. Buckwheat-the source of antioxidant activity in functional foods. *Food Res. Int.* **35**: 207-211.
- Kim SJ, Sohn HB, Kim JW, Lim SH, Lee JN, Park SH, et al. 2023. Growth of intestinal bacteria and intestinal inflammation of sprout extract from common buckwheat and tartary buckwheat. *Korean J. Plant Res.* **36**: 455-468.
- Kim SJ, Sohn HB, Lee KT, Shin JS, Kim S, Nam JH, et al. 2019. Anti-inflammatory effects of seed ethanolic extracts of the common buckwheat and tartary buckwheat are mediated through the suppression of inducible nitric oxide synthase and pro-inflammatory cytokines in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells. *Korean J. Food Sci. Technol.* **51**: 565-575.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. 2002. Flavonoid antioxi-

- dants: Chemistry, metabolism and structure activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* **13**: 572-584.
13. Ademosun AO, Oboh G, Bello F, Ayeni PO. 2015. Antioxidative properties and effect of quercetin and its glycosylated form (Rutin) on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* **21**: NP11-17.
 14. Yang JW, Lee HN, Sung JH, Kim YH, Jeong HS, Lee JS. 2019. Conversion of rutin to quercetin by acid treatment in relation to biological activities. *Prev. Nutr. Food Sci.* **24**: 313-320.
 15. Kim GN, Kwon YI, Jang HD. 2011. Protective mechanism of quercetin and rutin on 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride or Cu²⁺-induced oxidative stress in HepG2 cells. *Toxicol. In Vitro* **25**: 138-144.
 16. Zuo Y, Xin X, Xu H, Yuan H, Li X, Yu Y, et al. 2020. Highly efficient bioconversion of flavonoid glycosides from citrus processing wastes in solvent-buffer systems. *Green Chem.* **22**: 3196-3207.
 17. Huynh NT, Smagghe G, Gonzales GB, Camp JV, Raes K. 2018. Bioconversion of kaempferol and quercetin glucosides from plant sources using *Rhizopus* spp. *Fermentation* **4**: 1-9.
 18. Amaretti A, Raimondi S, Leonardi A, Quartieri A, Rossi M. 2015. Hydrolysis of the rutinose-conjugates flavonoids rutin and hesperidin by the gut microbiota and bifidobacteria. *Nutrients* **7**: 2788-2800.
 19. Choi JW, Kwon C, Kim JW, Chung MJ, Yoon JH, Lim SH. 2022. Bioconversion of ginsenosides by *Bifidobacterium* CBT BG7, BR3 and BL3. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **50**: 395-403.
 20. Kwon C, Kim JW, Park YK, Kang SB, Chung MJ, Kim SJ, et al. 2023. Bioconversion of rutin in tartary buckwheat by the Korean indigenous probiotics. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **5**: 83-92.
 21. Kim YH, Lee YJ, Park SO, Lee SJ, Lee OH. 2013. Antioxidant compounds and antioxidant activities of fermented black rice and its fractions. *Korean J. Food Sci. Technol.* **45**: 262-266.
 22. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**: 1231-1237.
 23. Tsikas D. 2005. Review methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids. *Free Radic. Res.* **39**: 797-815.
 24. Kim SJ, Sohn HB, Lee KT, Shin JS, Kim S, Nam JH, et al. 2019. Anti-inflammatory effects of seed ethanolic extracts of the common buckwheat and tartary buckwheat are mediated through the suppression of inducible nitric oxide synthase and pro-inflammatory cytokines in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells. *Korean J. Food Sci. Technol.* **51**: 565-575.
 25. Floegel A, Kim DO, Chung SJ, Koo SI, Chun OK. 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J. Food Compos. Anal.* **24**: 1043-1048.
 26. Lee MH, Cho JH, Kim JC, Kim BK. 2014. Effect of roasting conditions on the antioxidant activities of tartary buckwheat. *Korean J. Food Sci. Technol.* **46**: 390-393.
 27. Ryu JY, Choi Y, Hong KH, Chung YS, Cho SK. 2020. Effect of roasting and brewing on the antioxidant and antiproliferative activities of tartary buckwheat. *Foods* **9**: 1331.
 28. Kim SJ, Sohn HB, Nam JH, Lee JN, Chang DC, Kim YH. 2022. Comparison of rutin content and quality characteristics of tea products from common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) and tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) by different processing and brewing methods. *Korean J. Food Sci. Technol.* **54**: 185-195.
 29. Xaus J, Comalada M, Valledor AF, Lloberas J, López-Soriano F, Argilés JM, et al. 2000. LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF- α . *Blood* **95**: 3823-3831.
 30. Salim T, Sershen CL, May EE. 2016. Investigating the role of TNF- α and IFN- γ activation on the dynamics of iNOS gene expression in LPS stimulated macrophages. *PLoS One* **11**: e0153289.
 31. An S, Lee CM, Haile DH, Yun SJ. 2019. Inactivation of rutin degrading enzymes in buckwheat groats by roasting and steaming. *Korean J. Med. Crop Sci.* **27**: 108-114.
 32. Yang CY, Hsiu SL, Wen KC, Lin SP, Tsai SY, Hou YC, et al. 2005. Bioavailability and metabolic pharmacokinetics of rutin and quercetin in rats. *J. Food Drug Anal.* **13**: 244-250.