

진균류 균사체의 고체발효 커피생두로부터 조제한 원두커피의 생리활성

- 연구노트 -

신지영¹ · 김 훈¹ · 김동구¹ · 백길훈² · 정현상² · 유광원^{3*}

¹(주)코시스바이오 기업부설연구소

²충북대학교 식품공학과

³한국교통대학교 식품영양학과

Pharmacological Activities of Coffee Roasted from Fermented Green Coffee Beans with Fungal Mycelia in Solid-state Culture

Ji-Young Shin¹, Hoon Kim¹, Dong-Gu Kim¹, Gil-Hun Baek²,
Heon-Sang Jeong², and Kwang-Won Yu^{3*}

¹R&D Center, CosisBio Corporation Limited, Chungbuk 365-863, Korea

²Dept. of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Chungbuk 361-763, Korea

³Dept. of Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Chungbuk 368-701, Korea

Abstract

Green coffee beans (CB, Indonesian Mandheling) were fermented with three kinds of mushrooms (*Phellinus linteus*, PL; *Hericium erinaceum*, HE; *Ganoderma lucidum*, GL) or two kinds of mycelia from molds (*Monascus purpureus*, MP; *Monascus ruber*, MR) using solid-state culture to enhance physiological activity. After roasting of fermented green coffee beans, roasted coffees were extracted with a hot-water decoction or 95% ethanol reflux. Yields from hot water extracts (HW, 17.7~25.3%) were higher than those from ethanolic extracts (EE, 9.5~12.2%). Hot-water extracts of roasted coffees from green coffee beans fermented with two molds (MP-CB-HW and MR-CB-HW) showed higher total polyphenols, flavonoids, and DPPH free radical scavenging activity than roasted coffees from non-fermented (CB-HW) or fermented green coffee beans with the three mycelia from mushrooms. MR-CB-HW also had the most potent macrophage stimulating and mitogenic activity (1.32 and 1.40-fold of CB-HW, respectively). In addition, MP-CB-EE and MR-CB-EE did not show any cytotoxicity to the RAW 264.7 cell at a concentration of 100 µg/mL, and these extracts significantly inhibited nitric oxide (NO) production from the LPS-stimulated RAW 264.7 cell line (38.6 and 37.0% of the LPS-treated group). Meanwhile, the chlorogenic acid concentrations of MP-CB-HW or MR-CB-HW highly increased (to 76.21 or 76.73 µg/mL, respectively), but caffeine concentrations were not affected by solid-state fermentation. In conclusion, the physiological activities of roasted coffees were enhanced by the solid-state culture of green coffee beans with *M. purpureus* or *M. ruber*, suggesting that these roasted coffees could possibly serve industrial applications as functional coffee beverages.

Key words: green coffee beans, roasted coffee, fungal mycelia, solid-state culture, physiological activity

서 론

커피는 쓴맛, 떫은 맛, 신맛, 단맛 등이 조화되어 만들어지는 대표적인 음료로서 전 세계적으로 가장 널리 음용되고 있는 기호식품으로 우리나라에서도 커피전문점 확산과 자가소비 증가 등 커피시장이 지속적으로 성장하고 있다. 커피에는 다른 식품에 비해 폴리페놀 등의 항산화성분 함량이 높아 세포 손상을 유발하는 자유라디칼 소거능이 높다고 알려져 있으며(1,2), 최근에는 신경세포 보호효과를 갖는 lipophilic antioxidant와 chlorogenic acid 등이 커피생두보다 로스팅한 원두커피에 높은 함량을 나타낸다는 결과도 보고

되고 있다(3). 또한 커피는 알츠하이머(4), 파킨슨 병(5), 제2형 당뇨병(6), 콜레스테롤(7), 심장 질환 및 간경변(8-10) 등에도 우수한 보호효과를 갖는 것으로 알려지면서 기호식품을 넘어서 커피의 약리적인 효과에도 많은 연구가 이루어지고 있는 추세이다. 그러나 커피의 과다섭취는 정서불안, 신경과민, 수면장애 및 위장장애 등의 카페인 중독증(caffeinism)을 유발할 수 있다고 알려져 있으며(11), 카페인이 지방산화를 증가시켜 혈중 유리지방산, 콜레스테롤 및 중성지방 함량을 높여 심혈관계, 특히 관상동맥질환을 발생시킬 수 있다는 연구(12,13)와 함께 이를 부정하는 연구도(14,15) 지속적으로 보고되어 커피 섭취와 심혈관계 질환과의 상관성

*Corresponding author. E-mail: kwyu@ut.ac.kr
Phone: 82-43-820-5333, Fax: 82-43-820-5850

은 여전히 논쟁이 되고 있다. 따라서 커피의 유용성분 극대화 함께 유해성분을 감소시키기 위한 다양한 공정개발과 이에 따른 기능성커피의 개발은 일상적으로 접취하는 기호식품을 통한 다양한 만성질환 예방에 크게 기여할 수 있다고 사료된다.

한편 지구상에 수 만종이나 존재하는 귀중한 생물자원인 진균류(fungus)는 세균류(bacterium)와 대립되는 개념으로 통곰팡이류, 집합균류, 자낭균류 및 담자균류를 총칭하는데 효모(yeast), 곰팡이(mold) 및 버섯류(mushroom) 등의 진핵생물이 속하며, 대부분 영양기관인 균사체(mycelium)와 번식기관인 포자(spore)를 가지고 있다. 오래전부터 한방 및 민간생약으로 사용되어 온 진균류는 특히 최근에 액체배양을 통해 얻은 균사체의 항산화활성, 항암활성과 면역증강활성 등의 생리활성에 대한 연구가 꾸준히 진행되고 있다(16-19). 따라서 이러한 진균류 균사체가 커피생두를 영양원으로 이용하여 생육함으로써 균류의 생물학적 전환능력(biotransformation)을 유도할 수 있다면 커피생두의 유용성분 증진과 균사체 증식에 따른 생리활성 시너지 효과 및 카페인 중독증 등의 부작용 완화를 기대할 수 있어 균사체가 배양된 커피생두의 커피음료 또는 기능성 소재 활용성이 높을 것으로 사료된다.

그러므로 본 연구에서는 원두커피의 생리활성 증진을 위하여 식품에 사용이 허가된 버섯 3종(상황, 노루궁뎅이 및 영지버섯) 및 홍국균 2종의 5종 진균류 균사체를 커피생두에 고체발효시킨 후 원두커피로 배전하고 추출물의 생리활성을 평가함으로써 다양한 만성질환을 예방할 수 있는 기능성 커피 소재로서의 가능성을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

5종 진균류 균사체의 종균배양

다양한 생리활성과 함께 오래전부터 식용으로 사용되어 식품의약품안전청(KFDA, Chungwon, Korea)에서 식품으로 사용이 허가된 버섯과 홍국균의 5종 진균류를 이용하여 생리활성이 증진된 균사체-고체발효 커피생두를 제조하기 위하여 상황버섯(*Phellinus(P.) linteus*, PL), 노루궁뎅이버섯(*Hericium(H.) erinaceum*, HE), 영지버섯(*Ganoderma(G.) lucidum*, GL)과 *Monascus(M.) purpureus*(MP)와 *Monascus ruber*(MR)의 홍국균 2종을 농촌진흥청 국립농업과학원 농업유전자원센터(Suwon, Korea)로부터 분양받았다. 5종 진균류 균사체는 potato dextrose agar(PDA, Difco, Detroit, MI, USA) 평판배지에서 25~30°C로 10~15일간 배양한 후 potato dextrose broth(PDB, Difco)가 담긴 flask에 접종하고 shaking incubator(Jeio tech, Daejeon, Korea)에서 4~7일간 배양하여 커피생두 고체발효용 진균류 종균으로 제조하여 추후 실험에 사용하였다.

5종 진균류 균사체-고체발효 커피생두 제조

본 연구는 커피생두 자체를 고체배지로 이용하여 진균류 균사체를 생육시킴으로써 균사체의 생리활성 성분과 함께 커피생두에 대한 균주의 생물학적 전환능력에 의해 커피생두의 기능성을 증진시키는 것이 목적이다. 따라서 KFDA에서 식품으로 사용이 허가된 버섯 균사체 3종(PL, HE 및 GL)과 홍국균 균사체 2종(MP 및 MR)을 이용하여 현재 국내에서 대중적으로 가장 많이 유통되고 있는 대표적인 커피생두 품종 중 하나인 인도네시아산 Mandheling 커피생두에 고체발효시켜 3종 버섯 및 2종 홍국균 균사체-고체발효 커피생두를 조제하였다. 인도네시아산 Mandheling 커피생두는 (주)발리빈(Goyang, Korea)에서 구입하여 5종 진균류 균사체-고체발효의 커피생두로 제조하였다.

먼저 구입한 커피생두 100 g(수분함량 13~14%)에 대해 2배수의 물로 2시간 동안 30°C에서 침지하여 조직을 연화시킨 후, 물기를 제거한 다음 121°C에서 120분간 고압멸균 하였다. 멸균된 커피생두에 3종의 버섯 균사체(PL, HE 및 GL) 및 2종의 홍국균 균사체(MP 및 MR) 액체종균을 10%(w/v) 접종하고 PL과 GL은 30°C에서, HE, MP와 MR은 25°C에서 각각 고체배양 하였다. 5종 진균류 균사체-고체발효 커피생두는 모두 상이한 증식속도 및 경향을 나타내었으나, 일관성과 경제성을 고려하여 모두 10일 배양을 통한 고체발효물로 조제하였으며, 발효가 종료된 커피생두는 모두 50°C drying oven(Jeio tech)에서 48시간 동안 건조하여 수분을 제거한 5종의 균사체-고체발효 Mandheling 커피생두(PL-CB, HE-CB, GL-CB, MP-CB 및 MR-CB)로 조제되었다.

고체발효 원두커피 및 용매추출물 제조

3종 버섯 및 2종 홍국균 균사체-고체발효 커피생두를 coffee roaster(Genecafe, Ansan, Korea)에서 중배전(235~240°C, 12~13분간 로스팅)하여 각각의 원두커피(roasted coffee)로 조제한 후 coffee grinder(Bazzatra, Gyeonggi-do, Korea)를 이용하여 동일 크기로 분쇄하였다. 원두커피의 용매추출물 중 열수추출물은 배전 및 분쇄된 5종 균사체-고체발효 원두커피에 20배 물을 가한 후 decoction법을 이용하여 2시간 동안 half volume이 되도록 추출하였으며(over 90°C), 여과지(No. 2)를 이용하여 잔사를 제거하였다. 추출여과액은 원심분리(7,600×g, 4°C, 30분)로 불용성 침전물을 제거하고 상등액은 농축 및 동결건조 하여 5종 진균류 균사체-고체발효 원두커피의 열수추출물로 조제하였다(상황버섯, PL-CB-HW; 노루궁뎅이버섯, HE-CB-HW; 영지버섯, GL-CB-HW; *M. purpureus*, MP-CB-HW와 *M. ruber*, MR-CB-HW).

에탄올추출물의 경우에는 배전 및 분쇄된 5종의 균사체-고체발효 원두커피에 10배의 주정(95% ethanol)을 가하고 heating mantle(Misung Scientific Co., Yangjoo, Korea)로 환류추출법을 이용하여 2시간 동안 추출하였으며(3회 반복), 여과로 잔사를 제거하고 추출여과액은 원심분리 후 상

등액을 농축 및 동결건조하여 균사체 종류에 따른 에탄올추출물(PL-CB-EE, HE-CB-EE, GL-CB-EE, MP-CB-EE와 MR-CB-EE)로 조제하였다. 한편 비발효한 인도네시아산 Mandheling 커피생두를 배전한 원두커피의 열수추출물과 에탄올추출물(CB-HW와 CB-EE)을 각각 조제하여 활성을 비교하기 위한 시료대조군으로 사용하였다.

항산화 성분 분석 및 항산화 활성

3종의 버섯 및 2종의 홍국균 균사체-고체발효 커피생두로부터 조제된 원두커피의 열수 및 에탄올추출물의 총 폴리페놀 화합물 함량은 Folin-Ciocalteu법(20)을 이용하여 측정하였다. 즉 Folin-Ciocalteu's reagent가 알칼리 조건에서 시료의 polyphenol 화합물에 의해 환원되면 청색에서 노란색으로 발색되는 원리를 이용하여 추출물 시료 100 μ L에 알칼리 조건을 형성하기 위해 2% Na_2CO_3 을 2 mL를 가한 후 3분간 반응시키고 50%의 Folin-Ciocalteu's reagent(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 100 μ L를 첨가해 30분간 반응시킨 후 반응액을 750 nm에서 측정함으로써 항산화 성분인 총 polyphenol의 함량을 확인하였다. 표준물질로는 tannic acid를 사용하여 검량선을 작성한 후 원두커피 추출물의 총 폴리페놀 화합물 함량은 tannic acid에 대한 mg tannic acid equivalents(TAE)/100 mg 추출물로 나타내었다. 총 플라보노이드 함량은 Zhishen 등(21)의 방법에 따라 flavonoid에 알칼리를 반응시키면 flavan 또는 flavonol 배당체가 황색을 나타내는 것을 원리로 이용하여 측정하였는데, 80% 에탄올을 사용해 적당히 희석한 추출물 시료 500 μ L에 10% aluminium nitrate 100 μ L와 1 M potassium acetate 100 μ L를 가한 후 암소에서 40분간 방치하고 변화한 흡광도 값을 415 nm에서 측정하여 표준물질인 quercetin에 대한 mg quercetin equivalents(QE)/100 mg 추출물로 나타내었다.

한편 화학적으로 안정화된 free radical인 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl, Sigma-Aldrich Co.)는 항산화 물질과 반응하면 전자를 내어주면서 라디칼이 소멸되고 색이 변하게 되므로, Cheung 등(22)의 방법을 응용하여 균사체-고체발효 원두커피 추출물에 의해 DPPH의 색이 얼어지는 정도를 측정하여 항산화력으로 나타내었다. 즉 0.2 mM DPPH radical 용액에 시료 50 μ L를 가한 후 상온에서 60분간 반응시켜 반응액의 흡광도 변화를 517 nm에서 측정하여 표준물질인 ascorbic acid에 대한 mg ascorbic acid equivalents antioxidant capacity(AEAC)/100 mg 추출물로 비교, 산출하여 나타내었다.

실험동물과 동물세포 배양

실험동물은 생후 6주령의 C3H/He, ICR 및 BALB/c 마우스(♀)를 (주)샘타코(Osan, Korea)에서 구입한 후 사육조에 넣고 정수된 물과 실험동물용 펠렛사료(Samyang Co., Incheon, Korea)를 자유공급하였다. 한편 세포독성 및 nitric oxide 생성 억제실험에 사용된 RAW 264.7(murine macro-

phage cell line) 세포주는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받았으며, GenDEPOT(Houston, TX, USA)에서 구입한 10% fetal bovine serum(FBS), 100 U/mL의 penicillin 및 100 μ g/mL의 streptomycin이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO_2 배양기(Vision Scientific, Daejeon, Korea)에서 2~3일 간격으로 계대하면서 배양하였다. 또한 항염증실험의 염증유도에 사용된 lipopolysaccharide(LPS from *Escherichia coli*)는 Sigma-Aldrich Co.에서 구입하였고, 마이토젠 및 장관면역활성 측정에 사용된 EZ-Cytox cell viability kit는 Daeil Labservice Co.(Seoul, Korea)에서 입수하여 실험에 사용하였다.

면역활성

마크로파지 활성은 lysosomal phosphatase 효소 활성도를 통해 측정하였는데, ICR 마우스 복강에 3% thioglycollate medium(Sigma-Aldrich Co.)을 2 mL 주입하고 72시간 경과된 후에 유도된 복강 마크로파지를 회수하여 실험에 이용하였다. 마크로파지는 100 U/mL의 penicillin, 100 μ L/mL의 streptomycin, 1.25 μ L/mL fungizone-amphotericin B 및 10% FBS를 함유한 RPMI 1640 medium(10% FBS-RPMI)으로 세척하고 1×10^6 cells/mL로 분산시킨 후 96-well plate(SPL Life Science Co. Ltd., Pocheon, Korea)에 200 μ L씩 분주하여 마크로파지 monolayer를 형성시켰다(23). 2시간 후 상등액을 제거하고 non-adherent cell을 RPMI 1640 medium으로 3회 세척한 후 10% FBS-RPMI 180 μ L와 시료 20 μ L를 분주하여 배양하면서 마크로파지를 자극하였다. 24시간 후 상등액을 제거하고 남은 마크로파지에 0.1% Triton X-100(Sigma-Aldrich Co.) 25 μ L로 세포막을 용해시켜 분비된 lysosomal phosphatase에 기질로서 100 mM *p*-nitrophenyl phosphate(Sigma-Aldrich Co.) 150 μ L와 0.1 M citrate buffer 50 μ L를 첨가하여 반응시켰다. 시료의 마크로파지 활성은 반응 30분 후 0.2 M borate buffer를 가하여 정지시키고 405 nm에서 ELISA reader(TECAN, Grödingen, Austria)로 흡광도를 측정하여(24) saline 대조군에 대한 phosphatase 활성을 relative activity(%)로 나타내었다.

한편 비장세포를 이용한 마이토젠 활성은 BALB/c 마우스를 경추탈구시킨 후 멸균적으로 spleen을 적출하여 마쇄하고 0.2% NaCl로 적혈구를 용혈시킨 후 금속망(#200)으로 여과하여 splenocyte를 회수하여 RPMI로 3회 세척한 다음 5×10^6 cells/mL로 세포현탁액을 조제하였다. 비장세포 현탁액은 96-well plate에 90 μ L씩 분주하고 적당한 농도로 희석한 시료 10 μ L를 첨가하여 48시간 동안 5% CO_2 배양기에서 배양하였으며, 시료의 마이토젠 활성은 10배 희석한 EZ-Cytox 용액을 사용한 WST assay(25)를 통해 측정하여 비장세포 증식도에 대한 relative activity(%)로 나타내었다. 또한 Peyer's patch를 경유한 장관면역 활성은 Yu 등의 방법(26)을 이용하여 측정하였는데, C3H/He 마우스 복부를 절개하여 소장벽 위의 Peyer's patch를 적출한 후 마쇄하고

금속망(#200)으로 여과하여 Peyer's patch 세포액으로 조제하였다. 세포현탁액은 10% FBS-RPMI로 세척하여 2×10^6 cells/mL의 세포농도로 조정 후 96-well plate에 180 μ L씩 분주하고 적당히 희석된 시료를 20 μ L 첨가하여 5일간 배양하고 상등액(conditioned medium)만을 회수하여 골수세포 증식실험에 사용하였다. 골수세포는 동일 마우스의 대퇴부 뼈에서 회수한 다음 여과, 세척하고 2.5×10^5 cells/mL로 조정하여 100 μ L씩 well에 분주하고 conditioned medium을 50 μ L씩 첨가하여 6일간 재배양하였다. 시료의 Peyer's patch를 경유한 장관면역 활성은 배양액에 EZ-Cytox 용액 10 μ L를 첨가하고 6시간 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 saline 대조군의 골수세포 증식도에 대한 relative activity(%)로 표시하였다.

Nitric oxide 생성 억제활성

3종의 버섯 및 2종의 균사체-고체발효 커피생두의 배전과 분쇄로 조제된 원두커피의 열수 및 에탄올추출물의 nitric oxide(NO)의 생성 억제능을 측정하기 위해 먼저 시료의 독성여부를 EZ-Cytox 용액을 사용하여 확인하고(25) saline 대조군에 대한 세포생존율(%)로 표시하였다. 한편 NO 생성 억제능은 RAW 264.7 cell을 10% FBS-DMEM에서 1×10^6 cells/mL로 조정하여 96-well plate에 200 μ L씩 분주한 다음 5% CO₂ incubator에서 배양하여 세포를 부착시켰다. 12시간 뒤 배양액을 모두 제거하고 새로운 10% FBS-DMEM 160 μ L와 시료 20 μ L를 함께 첨가하고 30분 후에 LPS(1 μ g/mL)를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. LPS로 유도된 NO의 측정에는 세포배양 상등액을 50 μ L 취하여 Griess 시약 반응법(27)을 이용하여 측정하고 LPS처리군에 대한 억제율(%)로 나타내었다.

HPLC를 이용한 카페인 및 클로로겐산 함량 분석

커피에는 다양한 생리활성을 나타내는 화합물이 많이 존재한다고 이미 잘 알려져 있으며, 진균류 균사체를 통한 커피생두의 고체발효과정 동안 이들 성분들 간에도 다양한 변화가 일어날 것으로 예측하고 이들 성분의 변화를 확인하기 위하여 대표적인 생리활성 성분인 카페인과 클로로겐산을 HPLC system(YL Instrument Co. Ltd., Anyang, Korea)으로 분석하였다. 생리활성 성분 분석을 위한 장치로는 YL-9110 quaternary pump(YL Instrument Co. Ltd.)와 YL-9120 UV/Vis detector(YL Instrument Co. Ltd.)를 이용하였으며, 분석칼럼은 Phenomenex(Torrance, CA, USA)의 Luna 5 μ C18을 사용하였다. 이동상은 1% acetic acid(J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA)와 acetonitrile(Burdick&Jackson, Muskegon, MI, USA)을 1.0 mL/min의 유속으로 사용하였으며, gradient 조건은 1% acetic acid와 acetonitrile을 0분에서 40분까지 92:8에서 73:27의 비율로 변화시켰고, 40분부터 45분까지는 73:27을 다시 92:8로 변화시켰다. UV detector의 파장은 280 nm를 사용하였으며 시료의 주입량은 20 μ L로

하였고, 각각의 표준물질을 10~1,000 ppm으로 분석하여 검량선을 작성한 후 진균류 균사체-고체발효 원두커피 열수추출물의 카페인 및 클로로겐산의 함량(μ g/mL)을 도출하였다.

통계처리

실험결과에 대한 통계분석은 SPSS 통계프로그램(Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 실험결과의 평균과 표준편차를 산출하고 평균치 \pm SD로 나타내었으며, 분산분석(ANOVA)을 실시한 후 각 측정값 간의 유의성을 Duncan's multiple range test로 검증하였다.

결과 및 고찰

고체발효 커피생두로 조제된 원두커피의 용매추출물 제조 커피생두의 기능성을 증진시키기 위하여 식품으로 사용이 허가된 진균류 중 버섯 균사체 3종(PL, HE 및 GL)과 홍국균 균사체 2종(MP 및 MR)의 고체발효를 이용하였다. 커피생두는 국내에서 많이 유통되고 있는 대중적 품종 중 하나인 인도네시아산 Mandheling 커피생두(green coffee bean, CB)를 사용하였다. 5종 진균류 균사체-고체발효 Mandheling 커피생두(PL-CB, HE-CB, GL-CB, MP-CB 및 MR-CB)는 물로 침지 및 가압멸균한 커피생두에 평균 10%를 접종하고 10일 동안 배양하여 조제하였다(Table 1). 다음으로 증배전을 통해 원두커피로 조제한 후 원두커피 열수추출물(PL-CB-HW, HE-CB-HW, GL-CB-HW, MP-CB-HW와 MR-CB-HW) 및 에탄올추출물(PL-CB-EE, HE-CB-EE, GL-CB-EE, MP-CB-EE와 MR-CB-EE)로 조제하였으며, 시료대조군인 비발효-원두커피의 열수추출물(CB-HW)과 에탄올추출물(CB-EE)도 조제하였다. Table 1에서 나타낸 바와 같이 수율은 시료대조군인 비발효-커피생두로부터 조제된 원두커피 추출물이 열수에서 25.3%와 에탄올추출물에서 10.3%를 나타내었다. 한편 진균류 균사체-고체발효 커피생두의 경우에는 2종 홍국균 균사체-고체발효 커피생두의 원두커피가 3종 버섯 균사체의 원두커피에 비해 열수추출물에서는 2.1~4.5%, 에탄올추출물의 경우에도 0.3~2.5% 가량 수율이 높은 것으로 나타났는데, 이러한 수율에서의 차이는 균사체의 증식과도 연관이 있는 것으로 사료되었다. 즉 Table 1의 하단 사진에서 제시한 것처럼 5종 균사체의 증식을 육안으로 관찰한 결과, 균사체의 종류에 따라 증식속도는 상이하게 다르겠지만 동일한 배양시간(10일) 동안 홍국균 균사체-고체발효 커피생두가 버섯 균사체-고체발효 커피생두보다 월등히 높은 증식을 나타내고 있음을 확인할 수 있었기 때문이다.

진균류 균사체-고체발효 원두커피 용매추출물의 항산화 성분 및 활성

3종 버섯 및 2종 홍국균 균사체를 이용하여 제조한 균사체

Table 1. Antioxidant component contents and antioxidant activities of hot-water or ethanolic extracts from roasted coffee of fermented green coffee beans with mushrooms or molds mycelia by solid-state culture

Extract ¹⁾		Total polyphenol (mg TE/100 mg)		Total flavonoid (mg QE/100 mg)		DPPH radical scavenging (mg AEAC/100 mg)		Yield (%) ²⁾	
		HW	EE	HW	EE	HW	EE	HW	EE
Non-fermented coffee	CB	1.44±0.44 ^{b3)}	1.56±0.04 ^d	0.22±0.02 ^a	0.28±0.05 ^b	14.84±0.27 ^c	16.78±0.44 ^d	25.3	10.3
	PL-CB	1.37±0.03 ^b	1.34±0.03 ^b	0.27±0.02 ^b	0.25±0.02 ^{ab}	12.75±0.42 ^b	13.04±0.81 ^b	20.3	11.7
	HE-CB	1.63±0.04 ^c	1.51±0.06 ^{cd}	0.33±0.02 ^c	0.28±0.03 ^b	14.98±0.82 ^c	14.77±0.86 ^c	20.1	9.5
Fermented coffee	GL-CB	1.20±0.03 ^a	1.18±0.07 ^a	0.23±0.03 ^{ab}	0.20±0.02 ^a	10.08±0.18 ^a	11.04±0.61 ^a	17.7	9.5
	MP-CB	1.77±0.09 ^d	1.41±0.06 ^{bc}	0.40±0.02 ^d	0.29±0.03 ^b	18.66±0.64 ^d	12.93±0.63 ^b	22.2	12.0
	MR-CB	1.79±0.02 ^d	1.47±0.09 ^{cd}	0.40±0.03 ^d	0.27±0.03 ^b	18.24±0.66 ^d	13.22±0.56 ^b	23.1	12.2

TE, tannic acid equivalents; QE, quercetin equivalents; AEAC, ascorbic acid equivalent antioxidant capacity.
¹⁾CB, roasted coffee from non-fermented Indonesian Mandheling green coffee bean; PL-CB/HE-CB/GL-CB/MP-CB/MR-CB, roasted coffee from fermented green coffee bean with 3 mushroom mycelia (PL, *P. linteus*; HE, *H. erinaceum* or GL, *G. lucidum*) or 2 molds mycelia (MP, *M. purpureus* or MR, *M. ruber*) for 10 days, respectively.
²⁾Yield (w/w%) against raw materials.
³⁾Results are expressed as mean±SD of quadruplicate samples, and the different superscript is significantly different (p<0.05) in each column.

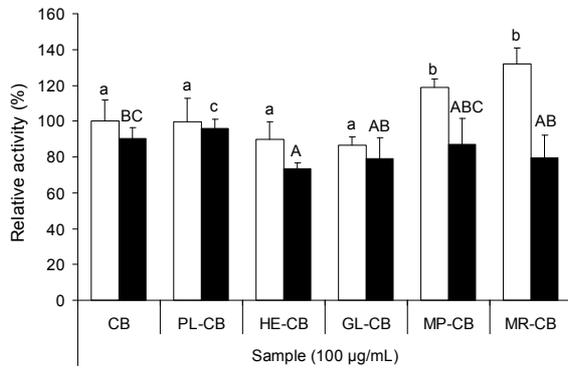


-고체발효 커피생두로부터 증배전을 통하여 조제한 원두커피의 열수 및 에탄올추출물에 대한 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량 및 DPPH 자유라디칼 소거능은 Table 1과 같이 나타내었다. 먼저 버섯 균사체의 경우, 열수추출물에서는 노루궁뎅이버섯 균사체-고체발효 열수추출물(HE-CB-HW)만이 시료대조군인 비발효-원두커피 열수추출물(CB-HW)에 비해 유의적으로 높은 총 폴리페놀 함량을 나타내었으며, 플라보노이드 함량에서는 3종의 버섯 균사체-고체발효 열수추출물 모두 CB-HW보다 유사하거나 약간 높은 경향을 확인할 수 있었다. 그러나 DPPH 라디칼 소거능에서는 대조군인 HE-CB-HW보다 유의적으로 증가된 활성을 나타내지는 않았다. 한편, 에탄올추출물에서는 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량 및 DPPH 자유라디칼 소거능 모두 시료대조군인 CB-EE에 비해 3종의 버섯 균사체-고체발효 열수추출물이 모두 낮은 활성을 나타내었다. 그러나 2종 홍국균 균사체-고체발효 원두커피 열수추출물인 MP-CB-HW와 MR-CB-HW는 시료대조군인 비발효-원두커피 또는 3종의 버섯 균사체-고체발효 원두커피 열수추출물에 비해서 항산화 성분 중 총 폴리페놀 함량에서는 CB-HW에 비해 1.2배, 플라보노이드 함량에서는 1.8배의 유의적으로 증가된 함량을 나타내었으며 DPPH 자유라디칼 소거능도 CB-HW보다 1.2배의 유의적인 활성의 증진을 확인할 수 있었다(Table 1). 그러나 에탄올추출물에서는 2종의 홍국균-고체발효 원두커피 열수추출물인 MP-CB-EE와 MR-CB-EE가 시료대조군인 비발

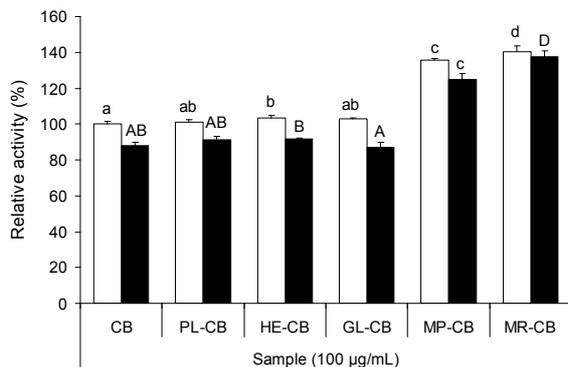
효-원두커피 에탄올 추출물인 CB-EE와 유사한 총 폴리페놀(0.9배)과 플라보노이드 함량(0.9~1.0배)을 보이거나 다소 저하된 DPPH 자유라디칼 소거능(0.8배)을 나타내었다(Table 1). 이러한 결과로부터 진균류 중 홍국균에 의한 커피생두의 고체발효는 비발효-커피생두 또는 버섯 균사체-고체발효보다 항산화 성분과 활성을 증진시키는 것으로 확인되었으며, 감소된 수율(CB-HW, 25.3%; MP-CB-HW, 22.2%; MR-CB-HW, 23.1%)에도 불구하고 항산화활성이 증진된 효과를 나타낸 것으로 미루어 홍국균 균사체 발효과정 중 커피생두에서 다양한 물질로부터 항산화 관련 성분으로의 전환 가능성이 일어나고 있음을 나타내는 것으로 확인되었다.

진균류 균사체-고체발효 원두커피 용매추출물의 면역활성
 면역활성을 측정하기 위해 3종의 버섯 및 2종의 홍국균 균사체-고체발효 원두커피 열수 및 에탄올추출물은 모두 증류수에 일정농도로 용해시켜 사용하였다. 마크로파지, 마이토젠 및 장관면역 활성 등의 면역활성에서 에탄올추출물은 열수추출물에 비해 대체적으로 낮은 활성을 나타냄으로써 에탄올추출물의 저분자보다는 물에 추출되는 고분자 물질이 주로 면역활성에 관여하는 것으로 관찰되었다. 일반적으로 면역활성을 자극하는 활성성분, 즉 다당류 또는 단백다당 등의 고분자 화합물은 저분자가 용출되는 에탄올추출물보다 물 추출물에 포함되는 보고(28)와도 일치되는 결과를 나타내었다. 마크로파지 증식활성은 Fig. 1A와 같이 나타내었

A) Macrophage activity



B) Mitogenic activity



C) Intestinal immune system modulating activity through Peyer's patch

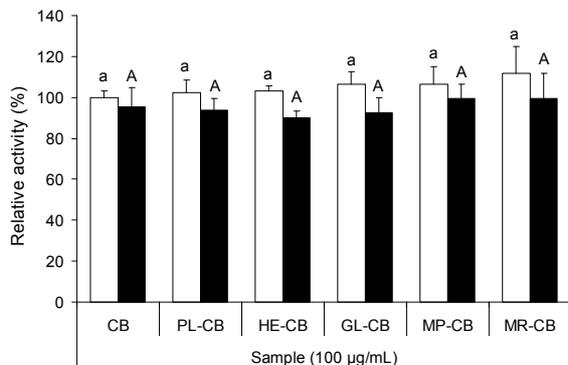


Fig. 1. Immunostimulating activities of hot-water or ethanolic extracts from roasted coffee of fermented green coffee beans with mushrooms or molds mycelia by solid-state culture. Final concentration of sample is 100 µg/mL. CB, roasted coffee from non-fermented Indonesian Mandheling green coffee bean; PL-CB/HE-CB/GL-CB/MP-CB/MR-CB, roasted coffee from fermented green coffee bean with 3 mushroom mycelia (PL, *P. linteus*; HE, *H. erinaceum* or GL, *G. lucidum*) or 2 molds mycelia (MP, *M. purpureus* or MR, *M. ruber*) for 10 days, respectively. □, hot-water extract; ■, ethanolic extract. Results are expressed as mean ± SD of quadruplicate samples, and the different letters (small letters, hot-water extracts; large letters, ethanolic extracts) are significantly different ($p < 0.05$) in each activity.

는데, 시료농도 100 µg/mL에서 시료대조군인 비발효-원두커피 열수추출물(CB-HW)과 3종의 버섯 균사체-고체발효 원두커피 열수추출물인 PL-CB-HW, HE-CB-HW 및 GL-CB-HW는 유사한 활성(0.9~1.0배)을 나타낸 반면, 2종의

홍국균 균사체-고체발효 원두커피 열수추출물인 MP-CB-HW와 MR-CB-HW는 각각 CB-HW에 비해 1.18배와 1.32배의 유의적으로 증가된 활성을 나타내었다. 에탄올추출물에서는 전체적으로 열수추출물에 비해 낮은 활성(CB-HW에 비해 0.73~0.90배)을 나타내었으며, 열수추출물에서 가장 높은 활성을 나타낸 2종의 홍국균 균사체-고체발효 원두커피의 경우에도 에탄올추출물(MP-CB-EE 및 MR-CB-EE)에서는 CB-HW에 비해 0.79~0.83의 활성만을 나타내었다 (Fig. 1A).

비장세포의 마이토젠 활성 결과에서도 이러한 경향은 더욱 두드러졌는데, 마크로파지 활성과 마찬가지로 시료농도 100 µg/mL에서 시료대조군인 비발효-원두커피 열수추출물(CB-HW)과 비교하여 2종의 홍국균 균사체-고체발효 원두커피 열수추출물(MP-CB-HW 및 MR-CB-HW)은 CB-HW의 1.35와 1.40배로 유의적인 증가활성을 나타내었다 (Fig. 1B). 그러나 3종의 버섯 균사체-고체발효 원두커피 열수추출물(PL-CB-HW, HE-CB-HW 및 GL-CB-HW)은 마크로파지 활성에서와 마찬가지로 시료대조군인 CB-HW와 유의적인 차이(1.00~1.02배)를 나타내지 않았다. 한편 장관면역활성 결과에서는 Fig. 1C에서 나타낸 바와 같이 3종의 버섯 및 2종의 홍국균 균사체-고체발효 원두커피 열수추출물 또는 에탄올추출물이 시료대조군인 비발효-원두커피 및 비발효-발아 원두커피 열수 또는 에탄올추출물과 유의적인 활성 차이를 나타내지 않았다.

진균류 균사체-고체발효 원두커피의 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포의 nitric oxide 생산 억제활성

그람 음성균의 세포외막 구성성분인 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 자극받은 단구 또는 대식세포에서 inducible nitric oxide synthase(iNOS) 또는 cyclooxygenase 2(COX-2)와 같은 pro-inflammatory enzyme에 의해 과발현된 nitric oxide(NO)와 prostaglandins(PG)는 류마티스 관절염, 다발성 경화증, 알츠하이머 병, 폐혈성 쇼크 등의 자가면역 질환을 야기한다고 보고되고 있다(29,30). NO의 합성경로 중 iNOS에 의한 NO 생성은 자극에 의해 지속적으로 대량 생산이 유도됨으로써 염증반응에 기여하게 되는데, 세균의 내독소(endotoxin)로 알려진 LPS를 마크로파지에 처리하게 되면 염증성 cytokine, NO와 같은 매개물질이 생성되어 병리적인 반응이 유발되어진다고 알려져 있다(31).

3종의 버섯 및 2종의 홍국균 균사체-고체발효 원두커피 열수 및 에탄올추출물의 LPS 자극에 의한 RAW 264.7 세포주에 대한 nitric oxide(NO) 억제 활성을 검토하기 위하여 먼저 시료의 RAW 264.7 세포주에 대한 독성을 검토한 결과 (Table 2), 100 µg/mL의 농도에서는 에탄올추출물의 경우 saline 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않거나 열수추출물에서는 95% 이상의 높은 생존율을 나타내었다. 그러나 500 µg/mL로 시료농도가 높아진 경우에는 CB와 PL-CB의 열수추출물에서 95% 이하의 유의적인 생존율을 나타냄으로

Table 2. RAW 264.7 cell viability of hot-water or ethanolic extracts from roasted coffee of fermented green coffee beans with mushrooms or molds mycelia by solid-state culture

Extract ¹⁾	Cell viability (% of control) ²⁾				
	Hot-water extract		Ethanolic extract		
	100 µg/mL	500 µg/mL	100 µg/mL	500 µg/mL	
Control	100±0.87 ^{bd}		100±4.42 ^{aa}		
Non-fermented coffee	CB	95.51±1.19 ^a	94.38±1.36 ^A	93.68±7.57 ^a	98.92±3.21 ^A
Fermented coffee	PL-CB	95.78±1.00 ^a	94.61±2.08 ^A	95.74±3.42 ^a	97.53±4.98 ^A
	HE-CB	96.92±0.50 ^a	95.22±1.94 ^{AB}	93.28±5.29 ^a	96.61±4.00 ^A
	GL-CB	100.17±0.73 ^b	97.89±0.97 ^{CD}	95.85±3.98 ^a	94.91±3.15 ^A
	MP-CB	99.86±0.69 ^b	96.20±0.62 ^{ABC}	94.31±2.42 ^a	93.19±2.47 ^A
	MR-CB	102.77±0.42 ^c	97.32±0.90 ^{BC}	96.63±3.01 ^a	93.58±2.88 ^A

¹⁾Extracts refer to Table 1, and control is only saline without any extract.

²⁾Cell viability (%)=(absorbance of sample/absorbance of saline control)×100.

³⁾Results are expressed as mean±SD of quadruplicate samples, and different superscript (small letters, 100 µg/mL; large letters, 500 µg/mL) is significantly different (p<0.05) in each activity.

써 RAW 264.7 세포주에 대한 NO 억제 활성을 측정하기 위한 열수 및 에탄올추출물의 농도는 독성이 발휘되지 않는 수준인 100 µg/mL의 농도에서 진행하였다(Table 2).

LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에 대한 NO 생성 억제 활성을 측정한 결과, 열수추출물의 경우 가장 높은 억제능을 나타낸 MR-CB-HW에서 LPS 자극군의 29.9%의 NO 생성을 억제하였으나, 이는 시료대조군인 비발효-원두커피 열수추출물인 CB-HW(22.6% 억제)와 비교하여 유의적인 차이를 나타내지는 않았다(Fig. 2). 그러나 에탄올추출물에서는 2종의 홍국균-고체발효 원두커피 에탄올추출물인 MP-CB-EE와 MR-CB-EE에서 각각 38.6과 37.0%의 억제효과를 나타내어, 시료대조군인 CB-EE(각각 27.4% 및 23.3% 억제)와 비교하여 유의적으로 높은 억제활성을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이러한 결과로부터 염증성 분자인 NO의 억제활성은 면역활성과 달리 저분자가 주로 포함되어 있다고 사료되

는 에탄올추출물, 특히 MP-CB-EE와 MR-CB-EE에서 증가됨을 알 수 있었다.

HPLC를 이용한 카페인 및 클로로겐산의 동시분석

일반적으로 미생물 발효과정을 통해 기질 내 다양한 물질이 분해되고, 또 새로운 저분자 화합물이 생성된다고 많은 연구에서 보고되어 있다. 진균류 균사체를 통한 고체발효과정에서 나타나는 활성성분들의 변화를 확인하기 위해 커피의 대표적인 수용성 생리활성성분인 카페인과 클로로겐산을 분석하기로 하였다. 이들 성분들은 이미 많은 연구를 통하여 추출법 및 분석법이 확립되어 있다(32-35). 본 연구에서는 자체 동시분석법을 개발하여 분석을 진행하였으며 위 성분들이 물에 용해되는 수용성 성분으로 알려져 있기 때문에(36) 분석은 열수추출물로만 진행하였다.

먼저 xanthine 유도체 중의 하나로 인체 내 신경 전달체계를 자극하여 각성, 강심 및 이노작용(37) 등의 생리활성을 나타내는 카페인에 대해 Fig. 3에서 나타낸 바와 같이 5종의 진균류 균사체-고체발효 원두커피 열수추출물에서 비발효 원두커피 열수추출물과 비교하여 모두 변화가 거의 없는 것으로 나타났다(44.28~55.46 µg/mL). 카페인은 다량으로 섭취 시 정서불안, 신경과민, 수면장애 및 위장장애 등의 카페인 중독증(caffeinism)과 함께(11), 최근 관상동맥질환을 발생시킬 수 있다는 연구(12,13) 등의 부정적인 연구결과가 발표되고 있는데, 본 연구결과를 통해 진균류 균사체를 이용한 고체발효 커피의 경우 발효과정동안 카페인을 분해시키거나 합성시키지는 않는 것으로 사료될 수 있다.

한편 커피내의 대표적인 폴리페놀 화합물로서 항산화활성(38,39)을 비롯하여 항염증(40), 항암(41) 및 항지질대사활성(42) 등의 다양한 약리작용에 관여하는 클로로겐산의 경우, 3종의 버섯 균사체-고체발효 원두커피에서는 비발효 원두커피(39.13 µg/mL)에 비해 감소하는 경향을 나타내었으나(9.44~32.23 µg/mL), 2종의 홍국균 균사체-고체발효 원두커피에서는 유의적으로 증가한 결과를 나타내었다(MP-CB-HW, 76.21; MR-CB-HW, 76.73 µg/mL)(Fig. 3). 최근

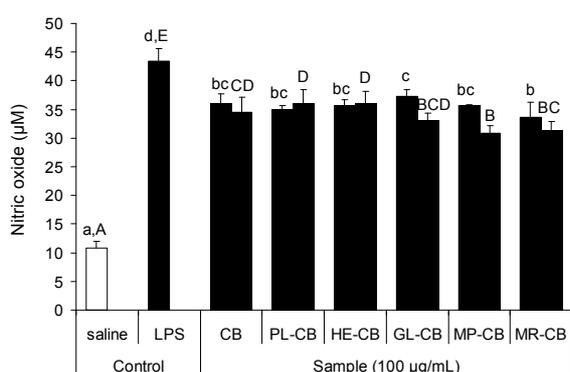


Fig. 2. Inhibitory effects of hot-water or ethanolic extracts from roasted coffee of fermented green coffee beans with mushrooms or molds mycelia by solid-state culture on nitric oxide (NO) in LPS-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cell line. Extracts refer to Fig. 1. □, only saline without sample or LPS; ■, only LPS (from *Escherichia coli*, 1 µg/mL) without sample; ▨, hot-water extract; ▩, ethanolic extract. Results are expressed as mean±SD of quadruplicate samples, and values the different letters (small letters, hot-water extracts; large letters, ethanolic extracts) are significantly different (p<0.05) in each activity.

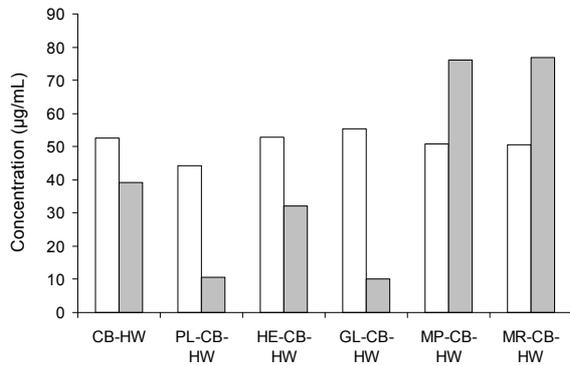


Fig. 3. Caffeine and chlorogenic acid concentrations of hot-water extracts from roasted coffee of fermented green coffee beans with mushrooms or molds mycelia by solid-state culture. Extracts refer to Fig. 1. □, caffeine concentrations; ■, chlorogenic acid concentrations.

커피에서 추출 및 정제된 클로로겐산이 Svetol 및 GCA라는 이름으로 상품화되었으며, 식품첨가물로 다양하게 유통되고 있는 것을 감안할 때 본 연구에서 나타난 바와 같이 비발효 원두커피에 비해 클로로겐산이 약 2배 정도 증가된 홍국균 균사체-고체발효 원두커피는 산업화에도 매우 긍정적인 것이라 사료된다.

결론적으로 홍국균 균사체를 이용한 고체발효-원두커피는 비발효 일반 원두커피에 비해서 항산화, 면역 및 NO 생성을 억제하는 항염증활성을 증가시켰으며, 항산화 및 면역활성에는 고분자 물질이, 염증유발 성분인 산화질소(NO)의 억제활성에는 저분자 성분이 관여하고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 홍국균 균사체-고체발효 원두커피는 카페인 함량은 변화시키지 않은 채 중요한 생리활성에 관여하는 클로로겐산의 함량을 유의적으로 증가시켰다. 현재 커피는 대중적으로 맛과 향이 중요한 기호식품으로만이 주로 이용되고 있지만, 홍국균 균사체를 이용한 고체발효 원두커피는 식품의 기능성소재 등의 다양한 소재로 이용 가능할 것으로 사료된다. 한편, 본 연구에서 가장 우수한 효과를 나타낸 홍국균에는 azaphilone 색소류(monascin, ankaflavin, rubropunctatin, monascorbiurin, rubropunctamine 및 monascorbamine)에 의한 항염증 작용, γ -aminobutyric acid의 신경전달 및 혈압강하 효과, dimerumic acid, tannin, phenol 및 unsaturated fatty acids 등에 의한 항산화 작용 등 다양한 생리활성이 이미 보고되어 있으므로(43-47), 홍국균 균사체의 단순한 첨가에 의한 커피의 생리활성 증진이 아니라 발효과정에 의해 균사체의 생물학적 전환이 유도되었음을 명백히 밝히기 위해서는 활성회분의 정제 및 구조동정 등이 수반되어야 할 것이다. 또한 다양한 생리활성의 추가연구로 기존 커피에서 문제가 되고 있는 카페인 중독증(caffeinism) 및 대사질환 억제활성 등과 관련된 추가적인 연구 또한 필요할 것으로 사료된다.

요 약

커피의 생리활성을 증진시키기 위해 고체발효를 이용하여 인도네시아산 Mandheling 커피생두에 3종의 버섯 균사체(*Phellinus linteus*, PL; *Hericium erinaceum*, HE; *Ganoderma lucidum*, GL) 및 2종의 홍국균 균사체(*Monascus purpureus*, MP; *Monascus ruber*, MR)를 배양하였다. 균사체-고체발효 커피생두를 로스팅하여 얻은 원두커피는 decoction법에 의한 열수추출물과 reflux에 의한 에탄올추출물로 조제하였는데, 열수추출물(HW, 수율 17.7~25.3%)은 에탄올추출물(EE, 9.5~12.2%)보다 더 높은 수율을 나타내었다. 2종의 홍국균 균사체-고체발효 커피생두로부터 조제된 원두커피 열수추출물(MP-CB-HW, MR-CB-HW)은 비발효 원두커피 또는 3종 버섯 균사체-고체발효 원두커피 열수추출물보다 높은 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량과 DPPH 자유라디칼 소거능을 나타내었다. 또한, 홍국균 균사체-고체발효 원두커피 중에서도 MR-CB-HW는 가장 높은 마크로파지 활성과 미토콘드리아 활성을 나타내었다(CB-HW의 1.32배와 1.40배). MP-CB-EE와 MR-CB-EE는 100 µg/mL의 시료농도에서 세포에 대한 독성을 나타내지 않으면서도 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포의 산화질소(NO)의 생성을 효과적으로 억제하였다(LPS 처리군의 38.6과 37.0%). 한편, 홍국균 균사체를 이용한 고체발효는 카페인 함량에 영향을 주지 않으면서 클로로겐산을 유의적으로 증가시켰다(76.21~76.73 µg/mL). 결론적으로 원두커피의 생리활성은 *M. purpureus* 또는 *M. ruber*와 커피생두의 고체발효에 의해서 증진되었으며 이러한 결과는 홍국균-고체발효 원두커피가 기능성 커피음료의 소재로 이용될 가능성을 제시하는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 2012년도 중소기업청 기술혁신과제(농공상용 합형 기술개발사업, 과제번호 SA114110)의 지원에 의하여 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

문 헌

- Brezová V, Šlebodová A, Staško A. 2009. Coffee as a source of antioxidants: An EPR study. *Food Chem* 114: 859-868.
- Esquivel P, Jiménez VM. 2012. Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Res Int* 46: 488-495.
- Chu YF, Brown PH, Lyle BJ, Chen Y, Black RM, Williams CE, Lin YC, Hsu CW, Cheng IH. 2009. Roasted coffees high in lipophilic antioxidants and chlorogenic acid lactones are more neuroprotective than green coffees. *J Agric Food Chem* 57: 9801-9808.
- Eskelinen MH, Ngandu T, Tuomilehto J, Soininen H, Kivipelto M. 2009. Midlife coffee and tea drinking and the risk of late-life dementia: a population-based CAIDE study. *J Alzheimers Dis* 16: 85-91.

5. Hu G, Bidel S, Jousilahti P, Antikainen R, Tuomilehto J. 2007. Coffee and tea consumption and the risk of Parkinson's disease. *Mov Disord* 22: 2242-2248.
6. Chu YF, Chen Y, Black RM, Brown PH, Lyle BJ, Liu RH, Ou B. 2011. Type 2 diabetes-related bioactivities of coffee: Assessment of antioxidant activity, NF- κ B inhibition, and stimulation of glucose uptake. *Food Chem* 124: 914-920.
7. Choi EY, Jang JY, Cho YO. 2010. Coffee intake can promote activity of antioxidant enzymes with increasing MDA level and decreasing HDL-cholesterol in physically trained rats. *Nutr Res Pract* 4: 283-289.
8. Chou T. 1992. Wake up and smell the coffee. Caffeine, coffee and the medical consequences. *West J Med* 157: 544-553.
9. Klatsky AL, Morton C, Udaltsova N, Friedman GD. 2006. Coffee, cirrhosis, and transaminase enzymes. *Arch Intern Med* 166: 1190-1195.
10. Lopez-Garcia E, van Dam RM, Willett WC, Rimm EB, Manson JE, Stampfer MJ, Rexrode KM, Hu FB. 2006. Coffee consumption and coronary heart disease in men and women: a prospective cohort study. *Circulation* 113: 2045-2053.
11. Mackay DC, Rollins JW. 1989. Caffeine and caffeinism. *J R Nav Med Serv* 75: 65-67.
12. Yano K, Rhoads GG, Kagan A. 1977. Coffee, alcohol and risk of coronary heart disease among Japanese men living in Hawaii. *N Engl J Med* 297: 405-409.
13. LaCroix AZ, Mead LA, Liang KY, Thomas CB, Pearson TA. 1986. Coffee consumption and the incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med* 315: 977-982.
14. Donahue RP, Orchard TJ, Stein EA, Kuller LH. 1987. Lack of an association between coffee consumption and lipoprotein lipids and apolipoproteins in young adults: the Beaver County Study. *Prev Med* 16: 796-802.
15. de Roos B, Sawyer JK, Katan MB, Rudel LL. 1999. Validity of animal models for the cholesterol-raising effects of coffee diterpenes in human subjects. *Proc Nutr Soc* 58: 551-557.
16. Chang ST. 1999. Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21st century: non-green evolution. *Int J Med Mushr* 1: 1-7.
17. Wasser SP. 2002. Medicinal mushrooms as a source of anti-tumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 258-274.
18. Yang BK, Park JB, Song CH. 2003. Hypolipidemic effect of an Exo-biopolymer produced from a submerged mycelial culture of *Hericium erinaceus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 1292-1298.
19. Sánchez C. 2004. Modern aspects of mushroom culture technology. *Appl Microbiol Biotechnol* 64: 756-762.
20. Velioglu YS, Mazza G, Cao L, Oomah BD. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J Agric Food Chem* 46: 4113-4117.
21. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. 1999. The determination of flavonoid content in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 64: 555-559.
22. Cheung LM, Cheung PCK, Ooi VEC. 2003. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chem* 81: 249-255.
23. Conrad RE. 1981. Induction and collection of peritoneal exudates macrophages. In *Manual of Macrophage Methodology*: Herscovitz BH, Holden HT, Ballanti JA, Ghaffar A, eds. Marcel Dekker Incorporation, New York, NY, USA. p 5-11.
24. Suzuki I, Tanaka H, Kinoshita A, Oikawa S, Osawa M, Yadomae T. 1990. Effect of orally administered β -glucan on macrophage function in mice. *Int J Immunopharmacol* 12: 675-684.
25. Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. 1996. A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol Pharm Bull* 19: 1518-1520.
26. Yu KW, Kiyohara H, Matsumoto T, Yang HC, Yamada H. 1998. Intestinal immune system modulating polysaccharides from rhizomes of *Atractylodes lancea*. *Planta Med* 64: 714-719.
27. Fox Jr JB. 1979. Kinetics and mechanisms of the Griess reaction. *Anal Chem* 51: 1493-1502.
28. Yu KW, Kim YS, Shin KS, Kim JM, Suh HJ. 2005. Macrophage-stimulating activity of exo-biopolymer from cultured rice bran with *Monascus pilosus*. *Appl Biochem Biotechnol* 126: 35-48.
29. Moncada S, Higgs EA. 1991. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 21: 361-374.
30. Clària J. 2003. Cyclooxygenase-2 biology. *Curr Pharm Des* 9: 2177-2190.
31. Lowenstein CJ, Snyder SH. 1992. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell* 70: 705-707.
32. De Maria CAB, Trugo LC, Moreira RFA, Petracco M. 1995. Simultaneous determination of total chlorogenic acid, trigonelline and caffeine in green coffee samples by high performance gel filtration chromatography. *Food Chem* 52: 447-449.
33. Casal S, Oliveira MB, Ferreira MA. 1998. Development of an HPLC/diode-array detector method for simultaneous determination of trigonelline, nicotinic acid, and caffeine in coffee. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 21: 3187-3195.
34. Casal S, Oliveira MB, Ferreira MA. 2000. HPLC/diode-array applied to the thermal degradation of trigonelline, nicotinic acid and caffeine in coffee. *Food Chem* 68: 481-485.
35. Perrone D, Donangelo CM, Farah A. 2008. Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography-mass spectrometry. *Food Chem* 110: 1030-1035.
36. Fujioka K, Shibamoto T. 2008. Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees. *Food Chem* 106: 217-221.
37. Farah A, de Paulis T, Moreira DP, Trugo LC, Martin PR. 2006. Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated arabica coffees. *J Agric Food Chem* 54: 374-381.
38. Yen WJ, Wang BS, Chang LW, Duh PD. 2005. Antioxidant properties of roasted coffee residues. *J Agric Food Chem* 53: 2658-2663.
39. Sato Y, Itagaki S, Kurokawa T, Ogura J, Kobayashi M, Hirano T, Sugawara M, Iseki K. 2011. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *Int J Pharm* 403: 136-138.
40. Krakauer T. 2002. The polyphenol chlorogenic acid inhibits staphylococcal exotoxin-induced inflammatory cytokines and chemokines. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 24: 113-119.
41. Nkondjock A. 2009. Coffee consumption and the risk of cancer: an overview. *Cancer Lett* 277: 121-125.
42. Cho AS, Jeon SM, Kim MJ, Yeo J, Seo KI, Choi MS, Lee MK. 2010. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food Chem Toxicol* 48: 937-943.
43. Cheng MJ, Wu MD, Su YS, Chen IS, Yuan GF. 2012. Anti-

- inflammatory compounds from *Monascus pilosus*-fermented rice. *Phytochem Lett* 5: 63-67.
44. Cheng MJ, Wu MD, Yuan GF, Su YS, Yanai H. 2012. Secondary metabolites produced by the fungus *Monascus pilosus* and their anti-inflammatory activity. *Phytochem Lett* 5: 567-571.
45. Lee YL, Yang JH, Mau JL. 2008. Antioxidant properties of water extracts from *Monascus* fermented soybeans. *Food Chem* 106: 1128-1137.
46. Tseng YH, Yang JH, Chang HL, Lee YL, Mau JL. 2006. Antioxidant properties of methanolic extracts from monascus adlay. *Food Chem* 97: 375-381.
47. Akihisa T, Tokuda H, Yasukawa K, Ukiya M, Kiyota A, Sakamoto N, Suzuki T, Tanabe N, Nishino H. 2005. Azaphilones, furanoisophthalides, and amino acids from the extracts of *Monascus pilosus*-fermented rice (red-mold rice) and their chemopreventive effects. *J Agric Food Chem* 53: 562-565.

(2012년 11월 8일 접수; 2013년 1월 15일 채택)