

원산지 및 품종에 따라 조제된 흥국균 균사체-고체발효 원두커피의 생리활성

김 훈 · 유광원¹ · 이준수² · 백길훈² · 신지영*

(주)코스비스바이오 기업부설연구소, ¹한국교통대학교 식품영양학과, ²충북대학교 식품공학과

The Pharmacological Activity of Coffee Fermented Using *Monascus purpureus* Mycelium Solid-state Culture Depends on the Cultivation Area and Green Coffees Variety

Hoon Kim, Kwang-Won Yu¹, Jun-Soo Lee², Gil-Hun Baek², and Ji-Young Shin*

R & D Center, Cosis-Bio Corporation Limited

¹Department of Food and Nutrition, Korea National University of Transportation

²Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University

Abstract In previous work, we fermented coffee beans using solid-state culture with various fungal mycelia to enhance the physiological activity of the coffee. The coffee fermented with *Monascus* sp. showed a higher physiological activity than non-fermented coffee or other coffees fermented with mushroom mycelium. The aim of this study was to characterize the various fermented coffees with respect to their area of cultivation and their variety using *Monascus purpureus* (MP) mycelium solid-state culture. Thirty types of green coffee beans, which varied in terms of their cultivation area or variety, were purchased from different suppliers and fermented with MP under optimal conditions. Each MP-fermented coffee was medium roasted and extracted further using hot water (HW) under the same conditions. Of the HW extracts, those derived from MP-Mandheling coffees had the highest yield (13.6-15.5%), and MP-Robusta coffee showed a significantly higher polyphenolic content (3.03 mg gallic acid equivalent/100 mg) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) free radical scavenging activity (27.11 mg ascorbic acid equivalent antioxidant capacity/100 mg). Furthermore, in comparison to other MP-fermented coffees at 1,000 µg/mL, MP-Robusta coffee showed not only the most effective inhibition of tumor necrosis factor- α (TNF- α) production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells (67.1% of that in LPS-stimulated control cells), but also an effective inhibition of lipogenesis in 3T3-L1 adipose cells (22.2% of that in differentiated control cells). In conclusion, these results suggest that Vietnam Robusta coffee beans solid-state fermented with MP mycelium are amenable to industrial applications as a functional coffee beverage or material.

Keywords: *Monascus purpureus*, solid-state culture, pharmacological activity, arabica coffee, robusta coffee

서 론

커피는 쓴맛, 떫은맛, 신맛, 단맛 등이 조화되어 만들어지는 대표적인 음료로서 전 세계적으로 가장 널리 음용되고 있는 기호 식품으로 우리나라에서도 커피전문점 확산과 자가소비 증가 등 커피시장이 지속적으로 성장하고 있다. 커피는 꼭두서니과(*Rubiaceae*) 코페아속(*Coffea*)에 속하며, 상업적으로 재배하는 품종은 크게 아라비카 (*Coffea arabica* L.)와 로부스타(*Coffea canephora*) 및 리베리카(*Coffea liberica*)로 나눌 수 있다. 그 중 향기와 맛이 좋아 최고의 품질로 인정받고 있는 아라비카종은 전 세계 산출량의 약 70%를 차지하고 있으며, 남은 30%의 대부분은 로부스타종이고, 리베리카종은 2-3%밖에 생산되지 않는다. 브라질, 콜롬비아 등 중미와 남미에서는 대부분의 아라비카가 생산되고, 베

트남, 인도네시아, 인도 등 동남아시아 지역에서는 로부스타가 주로 생산된다. 커피에는 다른 식품에 비해 폴리페놀 등의 항산화 성분 함량이 높아 세포 손상을 유발하는 자유라디칼 소거능이 높다고 알려져 있다(1,2). Kim 등(3)은 최근 시판 커피 한 컵에 함유된 caffeine과 chlorogenic acid 등의 생리활성 성분과 항산화활성에 대해 보고하였으며, Chu 등(4)은 신경세포 보호효과를 갖는 lipophilic antioxidant와 chlorogenic acid 등이 커피생두보다 로스팅한 원두커피에 높은 함량을 나타낸다는 결과도 보고하였다. 또한 커피는 알츠하이머(5), 파킨슨 병(6), 제2형 당뇨병(7), 콜레스테롤(8), 심장 질환 및 간경변(9-11), 항지질대사(12) 등에도 우수한 보호효과를 갖는 것으로 알려지면서 기호식품을 넘어서 커피의 약리적인 효과에도 많은 연구가 이루어지고 있는 추세이다.

한편, 커피의 과다섭취는 정서불안, 신경과민, 수면장애 및 위장장애 등의 카페인 중독증(caffeinism)을 유발할 수 있다고 알려져 있으며(13), 카페인이 지방산화를 증가시켜 혈중 유리지방산, 콜레스테롤 및 중성지방 함량을 높여 심혈관계, 특히 관상동맥질환을 발생시킬 수 있다는 연구(14,15)와 함께 이를 부정하는 연구(16,17)도 지속적으로 보고되어 커피섭취와 심혈관계 질환과의 상관성은 여전히 논쟁이 되고 있다. 따라서 커피의 유용성분 극대화 및 함께 유해성분을 감소시키기 위한 다양한 공정개발과 이

*Corresponding author: Ji-Young Shin, R & D Center, Cosis-Bio Corporation Limited, Jincheon, Chungbuk 365-863, Korea
Tel: 82-43-532-2766
Fax: 82-43-532-2765
E-mail: gutezeit@hanmail.net
Received July 18, 2013; revised November 19, 2013; accepted November 22, 2013

에 따른 기능성커피의 개발은 일상적으로 섭취하는 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, 접합균류, 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. 자낭균류에 속하는 *Monascus*속 곰팡이는 전통적으로 홍국의 제조에 이용되어 왔으며, 중국을 비롯한 아시아 여러 나라에서는 식용색소, 식품의 보존 및 살균제, 건강식품 등으로 이용되어 왔다(18,19). 특히, 홍국균이 생산하는 콜레스테롤 생합성효소(HMG-CoA reductase) 억제물질인 천연 스타틴(natural statin: monacolin K, mevinolin, lovastatin)의 생산 및 유효성 검증에 관한 최근의 많은 연구결과는 홍국의 경제적 효용가치를 시사하는 중요한 단서가 되고 있다(20-22). 최근 저자들은 인도네시아산 Mandheling 커피생두에 3종의 버섯 균사체 및 2종의 홍국균 균사체를 각각 고체발효한 5종의 발효원두커피를 제조한 후 생리활성 증가 및 성분 변화를 보고한 바 있다. 5종의 진균류 균사체-고체발효 원두커피 중에서도 홍국균 2종(*M. purpureus* 및 *M. ruber*)으로 고체발효한 원두커피에서 각각 항산화 및 면역활성이 일반 원두커피에 비해 유의적으로 증가했으며, 카페인 함량에 영향을 주지 않으면서 클로로젠산이 유의적으로 증가시킴을 확인하였다(23).

따라서, 본 연구에서는 이전 연구결과를 바탕으로 홍국균-고체발효 원두커피의 다양한 산지별 및 품종별 특성을 확인하고자 하였다. 즉, 다양한 유통경로를 통해 확보한 30여종의 산지별 및 품종별 커피생두에 홍국균의 고체배양을 통해 각각의 발효커피로 조제하고 생리활성을 비교하여 최적의 홍국균-고체발효 커피를 선정하고, 이를 산업화하는데 기초자료로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

홍국균 균사체의 종균배양

본 연구의 고체발효에 사용된 홍국균 균사체(*M. purpureus*, MP)는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업유전자원센터(Suwon, Korea)로부터 분양받았으며, 균사체는 potato dextrose agar (PDA, Difco, Sparks, MD, USA) 평판배지에서 25°C로 약 7-10일간 배양한 후 potato dextrose broth (PDB, Difco)가 담긴 erlenmeyer flask에 접종하고 shaking incubator (Jeio tech, Daejeon, Korea)에서 약 5일마다 계대배양하였다. 커피생두 고체발효용 홍국균 균사체는 PDB 배지에서 3회정도 계대배양한 종균으로 추후 실험에 사용하였다.

홍국균 균사체-고체발효 커피생두의 제조

본 연구의 소재가 되는 커피는 다양한 원산지로부터 커피생두(green coffee bean)를 직수입하여 국내로 유통하는 (주)지에스씨 인터네셔널(Seoul, Korea), (주)엠아이커피(Seoul, Korea) 및 (주)에이엠씨(Goyang, Korea)의 3곳의 공급업체를 선정하여 총 30여종의 각기 다른 원산지와 품종의 커피생두를 구입하였다. 구입한 커피생두는 각각 100 g (수분함량 13-14%)을 칭량하여 증량대비 2배수의 물로 2시간동안 30°C에서 침지하여 조직을 연화시킨 후, 물기를 제거한 다음 생두의 내부까지 충분한 열전달을 위해 121°C에서 120분간 고압멸균하였다. 멸균된 30종의 커피생두에 확보한 홍국균 균사체 종균 10 mL를 접종하고 25°C에서 모두 10일동안 고체배양하였으며, 발효가 종료된 커피생두는 50°C drying oven (Jeio tech)에서 48시간 동안 건조하여 수분을 제거한 30종의 홍

Table 1. Sample number and extraction yield of hot-water extracts of MP-fermented coffee beans depending on cultivating areas or varieties purchased from different suppliers

Supplier ¹⁾	Sample No.	Cultivating areas and varieties	Yield (%) ²⁾
A	1	Mexico SHG	12.1
	2	Colombia Supremo	12.7
	3	Brazil Santos	12.5
	4	Indonesia Mandheling	13.9
	5	Costa rica SHB Tarazu	11.8
	6	Tanzania Kilimajaro AA	9.5
	7	Guatemala SHB Antigua	12.5
	8	Ethiopia Mocha sidamo G2	12.6
	9	Ethiopia Yirgacheffe	12.8
B	10	Kenya AA	12.9
	11	Costa rica SHB Tarazu	11.7
	12	Guatemala SHB Antigua	11.1
	13	Indonesia Mandheling	15.5
	14	Papua new guinea Diamond	11.4
	15	Colombia Pitalito	10.7
	16	Ethiopia Yirgacheffe	10.4
	17	Ethiopia Sidamo G2	11.1
	18	Brazil Cerrado	11.4
C	19	Ethiopia Yirgacheffe	11.9
	20	Colombia Supremo	9.9
	21	Indonesia Mandheling	13.6
	22	Tanzania AA	11.1
	23	Papua new guinea Marawaka	11.3
	24	Costa rica SHB	9.0
	25	Brazil Cerrado	9.8
	26	Vietnam robusta	12.6
	27	Kenya AA	12.2
	28	Ethiopia Sidamo G2	11.0
	29	Guatemala Antigua	12.1
	30	Brazil Santos	11.2

¹⁾A; GSC international Co., Ltd. Korea, B; M.I coffee Co., Ltd. Korea, C; AMC Co., Ltd. Korea.

²⁾Yield (w/w%) against raw materials.

국균 균사체-고체발효 커피생두로 조제하였다.

고체발효 원두커피 및 열수추출물의 제조

30종의 홍국균 균사체-고체발효 커피생두는 coffee roaster (Genecafe, Asan, Korea)에서 중배전(235-240°C, 12-13분간 로스팅)하여 각각의 고체발효 원두커피(roasted coffee)로 조제한 후, coffee grinder (Bazzatra, Bellevue, WA, USA)를 이용하여 동일 크기로 분쇄하였다. 고체발효 원두커피의 열수추출물은 이후 20배 물을 가한 후 decoction법을 이용하여 2시간 동안 half volume이 되도록 추출하였으며(over 90°C), Whatman No. 2 여과지(GE healthcare, Buckinghamshire, UK)를 이용하여 잔사를 제거하였다. 추출 여과액은 원심분리(7,600×g, 4°C, 30분)로 불용성 침전물을 제거하고 상등액은 농축 및 동결건조하여 30종의 홍국균 균사체-고체발효 원두커피의 열수추출물로 조제하였다(Table 1).

항산화 성분 분석 및 항산화 활성

30종의 커피생두로부터 조제된 홍국균 균사체-고체발효 원두커피 열수추출물의 총 폴리페놀 화합물 함량은 Folin-Ciocalteu법(24)

을 이용하여 측정하였다. 즉, Folin-Ciocalteus reagent가 알칼리 조건에서 시료의 polyphenol 화합물에 의해 환원되면 청색에서 노란색으로 발색되는 원리를 이용하여, 추출물 시료 100°C에 알칼리 조건을 형성하기 위해 2% Na₂CO₃을 2 mL를 가한 후 3분간 반응시키고 50%의 Folin-Ciocalteus' reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 100°C에서 첨가해 30분간 반응시킨 후 반응액을 750 nm에서 측정함으로써 총 polyphenol의 함량을 확인하였다. 표준물질로는 gallic acid를 사용하여 검량선을 작성한 후 총 폴리페놀 화합물 함량을 gallic acid에 대한 mg gallic acid equivalents (GAE)/100 mg 추출물로 나타내었다. 한편, 화학적으로 안정화된 free radical인 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) cation을 이용한 decolorization assay에 의한 총 항산화력은 Choi 등(25)의 방법에 의하여 측정하였다. 즉, 7.4 mM ABTS (Sigma-Aldrich)와 2.6 mM potassium persulphate를 12시간 이상 암소에서 방치하여 청록색의 ABTS 양이온을 형성시킨 후 이 용액을 734 nm에서 흡광도 값이 1.5가 되도록 물 흡광계수 ($\epsilon=3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)를 이용하여 증류수로 희석하였다. 이 용액에 시료 50 μL 를 가한 후 상온에서 60분간 방치하여 반응액의 흡광도 변화를 측정하였으며, 표준물질인 L-ascorbic acid에 대한 mg ascorbic acid equivalents antioxidant capacity (AEAC)/100 mg 추출물로 비교, 산출하여 나타내었다.

염증성 사이토카인 및 nitric oxide 억제활성

항염증 활성실험에 사용된 murine macrophage cell line인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받았으며, GenDEPOT (Houston, TX, USA)에서 구입한 10% Fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL의 penicillin 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 streptomycin이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기 (Vision Scientific, Daejeon, Korea)에서 2-3일 간격으로 계대하면서 배양하였다. 또한, 항염증실험의 염증유도에 사용된 lipopolysaccharide (LPS from *Escherichia coli*)는 Sigma-Aldrich에서 구입하여 사용하였으며, 염증성 사이토카인인 tumor necrosis factor (TNF)- α 및 interleukin (IL)-6는 BD Bioscience (San Diego, CA, USA)의 ELISA kit를 구입하여 사용하였다.

홍국균 균사체-고체발효 원두커피 열수추출물의 항염증 활성을 측정하기 위해서 RAW 264.7 세포는 10% FBS/DMEM 배지에서 1×10^6 cells/mL로 조정하여 96-well plate에 200 μL 씩 분주한 뒤 5% CO₂ 배양기에서 배양시켜 세포를 부착시켰다. 12시간 뒤 배양액은 모두 제거하고 새로운 10% FBS/RPMI-1640 배지 160 μL 와 농도별로 희석된 추출물 20 μL 를 함께 첨가한 다음, 30분 후에 LPS를 처리하고 다시 6시간(TNF- α), 24시간(IL-6 및 NO) 동안 각각 배양하였다. LPS로 유도된 TNF- α , IL-6 및 NO 억제능은 세포배양 상등액 50 μL 를 취하여 BD Bioscience사의 instruction manual에 의한 ELISA법 및 Griess reagent 반응법(26)을 이용하여 측정하고 LPS 처리군에 대한 억제율(%)로 나타내었다. 한편, 각 시료의 사이토카인 및 NO 억제능을 측정하기 위해서는 시료 자체의 RAW 264.7 세포에 대한 독성확인이 선행되어야 하기 때문에, RAW 264.7 세포에 대한 시료의 독성여부를 CCK-8 kit를 사용하여 확인하였으며(27), saline 대조군에 대한 세포생존률(%)로 나타내었다.

3T3-L1 세포배양 및 Oil red O staining

실험에 사용한 3T3-L1 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하였고, 10% bovine serum (BS, Gibco, Grand Island, NY, USA)과 100 U/mL의 pen-

icillin, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 streptomycin이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂의 조건에서 3일마다 계대배양하며 사용하였다. 지방분화 억제능을 확인하기 위해 3T3-L1 지방전구세포는 24 well tissue culture plate에 5×10^4 cells/well로 분주하고 세포 증식기에는 10% BS를 함유한 DMEM으로 confluent (day -2) 때까지 2일 간격으로 배지를 교환하면서 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. Confluent로부터 2일 후(day 0), 분화를 유도하기 위한 분화 유도 배지로 10% FBS와 5 $\mu\text{g/mL}$ 의 insulin (INS, Sigma), 517 nM의 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, Sigma), 1 μM 의 dexamethasone (DEX, Sigma)이 함유된 DMEM으로 교환하고, 분화유도 3일 후에는(day 3) 10% FBS와 insulin만이 함유된 DMEM 배지로 교환하였다. 이후 2일 간격으로 10% FBS만이 함유된 DMEM으로 배지를 교환하면서 세포의 지방분화 상태를 확인하였으며, 시료는 day 0과 day 3에 두 번 처리하고 대조군에는 시료대신 saline을 처리하였다. 분화를 유도한 지 7일 후(day 7), 생성된 중성지방의 양을 측정하기 위해 배양액을 제거하고 PBS로 2번 세척하였으며, 회수한 세포를 10% formalin이 함유된 PBS로 20분간 고정하였다. 이후 formalin을 제거한 다음 증류수로 4회 세척한 세포는 0.5%(w/v) Oil red O working solution/60% isopropanol 용액을 첨가하여 20분간 세포 내 중성지방을 염색하였다. 염색된 세포 내 중성지방은 100% isopropanol로 추출하여 520 nm로 흡광도를 측정하고 지방의 분화정도는 일반배지 (10% BS/DMEM)에 saline이 첨가된 미분화 대조군에 대한 relative activity (%)로 나타내고, 분화유도 배지에 시료 대신 saline이 첨가된 분화 대조군에 대해서는 inhibitory activity (%)로 표시하였다.

결과 및 고찰

고체배양을 통해 조제된 홍국균-고체발효 원두커피의 열수추출물 제조

본 연구는 홍국균 균사체-고체발효 원두커피의 다양한 생리활성의 증진을 확인한 이전의 연구결과(23)를 바탕으로, 홍국균 균사체의 고체발효를 다양한 산지별 및 품종별 커피생두에 적용하여 이들의 발효특성 및 각각의 생리활성을 비교하여 산업화할 수 있는 기초자료로 활용하고자 한다. 따라서 KFDA (식품의약품안전처)에서 식품으로 사용이 허가된 홍국균 균사체(*M. Purpureus*, MP)를 이용하여 다양한 산지별 및 품종별 커피생두에 각각 고체발효시켜 각각의 홍국균 균사체(MP)-고체발효 커피생두를 조제하고자 하였다.

즉, 다양한 원산지로부터 커피생두를 직수입하여 국내로 유통하는 3곳의 공급업체(A, (주)지에스씨인터네셔널; B, (주)엠아이커피; C, (주)에이엠씨)에서 총 30종의 커피생두를 구입하였는데, 커피생두의 품종으로는 순수 Robusta종(*Coffea canephora*)인 베트남산 Robusta (26번), Robusta종과 Arabica종이 섞인 브라질산 Santos 또는 Cerrado (3, 18 및 30번) 및 인도네시아산 Mandheling (4, 13, 21번)을 제외하고는 모두 순수 Arabica종(*Coffea arabica L.*)으로 분류할 수 있다. 30종의 커피생두는 각각 홍국균 균사체-고체발효 커피생두(MP-fermented green coffee beans)로 조제되었으며, 증배전 후 decoction법을 이용한 30종의 홍국균 균사체-고체발효 원두커피 열수추출물(hot-water extract of MP-fermented roasted coffee beans)로 조제되었다. 추출수율은 Table 1에 나타나 있는데, 커피생두의 품종이 많아서 열수로 1회만 추출하였기 때문에 이전의 연구결과(23)에 비해 수율은 낮았으나 3곳의 공급업체에서 모두 MP-고체발효 인도네시아산 Mandheling 원두커피 열수추출물(MP-Mandheling)인 4, 13 및 21번 시료에서 가장 높은 수율을 나타내었다(발효물 대비 13.6-15.5%).

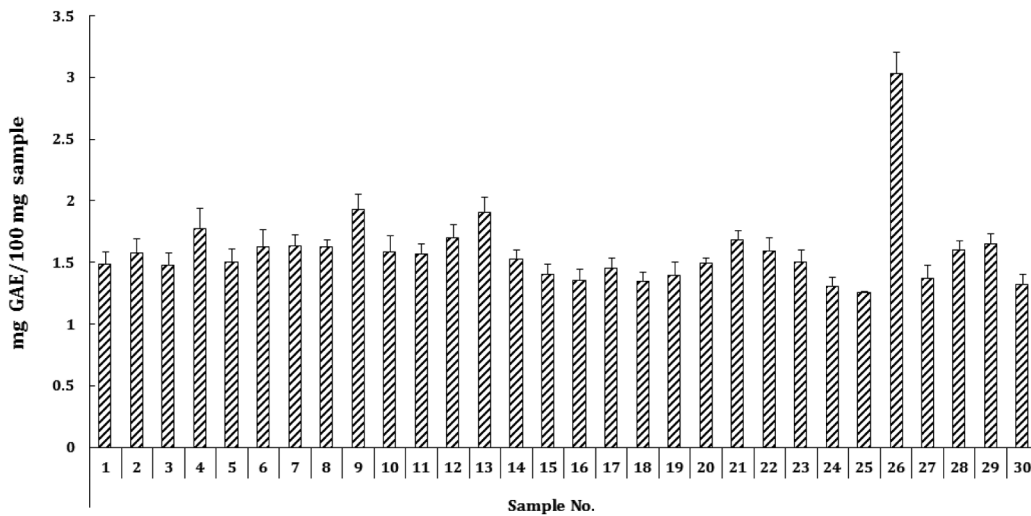


Fig. 1. Polyphenolic contents of hot-water extracts of MP-fermented coffee beans depending on cultivating areas or varieties purchased from different suppliers. Extract name of sample numbers refer to Table 1. Results are expressed as mean±SD of quadruplicate samples.

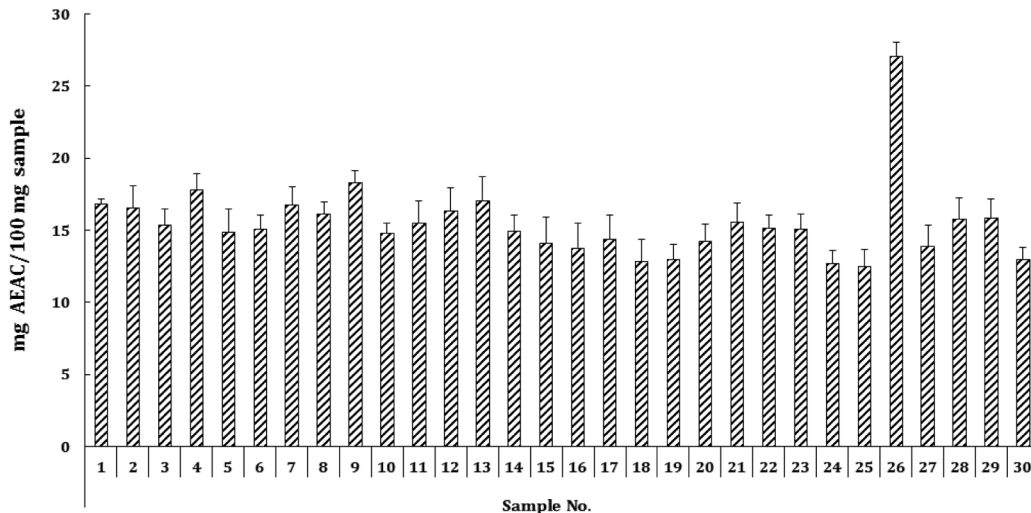


Fig. 2. ABTS free radical scavenging activity of hot-water extracts of MP-fermented coffee beans depending on cultivating areas or varieties purchased from different suppliers. Extract name of sample numbers refer to Table 1. Results are expressed as mean±SD of quadruplicate samples.

홍국균 균사체-고체발효 원두커피 열수추출물의 항산화능 비교

30종의 MP-고체발효 원두커피 열수추출물에 대한 항산화 활성 능력을 나타내는 총 폴리페놀 함량과 ABTS 자유라디칼 소거능은 Fig. 1과 2에 각각 나타내었다. 먼저, 대표적인 항산화 성분이라고 알려져 있는 총 폴리페놀 함량의 측정결과(Fig. 1), 26번 시료인 MP-Robusta는 다른 MP-고체발효 원두커피 열수추출물(1.26-1.93 mg GAE/100 mg)에 비해서 약 1.5-2.4배 정도의 높은 폴리페놀 함량을 나타내었다(3.03 mg GAE/100 mg). 일반적으로 원두커피의 폴리페놀 함량은 아라비카종에 비해 로부스타종에서 높다고 이미 보고되어 있으므로(28), MP-Robusta가 다른 MP-고체발효 원두커피에 비해서 폴리페놀 함량이 월등히 높은 것은 커피 자체가 지니고 있는 폴리페놀 성분이 발효과정에서도 분해되지 않음과 함께 발효과정을 통하여 커피 속 다양한 성분이 항산화 물질로 전환되었을 가능성을 제시하는 것으로 사료될 수 있다.

ABTS 자유라디칼을 이용한 라디칼 소거능 측정결과도 총 폴리페놀 함량 측정 결과와 크게 다르지 않았는데, 26번 시료인 MP-Robusta가 27.11 mg AEAC/100 mg을 나타내어 다른 MP-고체

발효 원두커피(12.54-18.32 mg AEAC/100 mg)에 비해 1.5-2.2배 정도 높은 자유라디칼 소거활성을 나타내었다(Fig. 2). 일반적으로 원두커피의 항산화활성 역시 아라비카종에 비해 로부스타종에서 높다고 이미 알려져 있으며, 항산화활성에 관여하는 성분으로는 chlorogenic acid(29,30)를 비롯하여 배전공정 중 화학적으로 쉽게 분해되어 형성하는 caffeic acid, cinnamic acid 및 ferulic acid 등의 함량 역시 아라비카종에 비해 로부스타종에서 높다고 보고되어 있다(31-33). MP-Robusta는 총 폴리페놀 성분과 더불어 라디칼형성을 억제하는 항산화활성이 다른 MP-고체발효 원두커피보다도 우수하게 나타났으므로, 추후 베트남산 로부스타 커피는 홍국균 균사체에 의해 발효되기 전후를 비교하여 항산화활성의 증감여부를 확인할 필요가 있을 것으로 사료된다.

RAW 264.7 세포주를 이용한 염증성 사이토카인 및 산화질소 생성 억제능 비교

염증(inflammation)은 외부 자극에 대한 생체조직의 방어반응의 하나로 대부분의 염증은 유해물질이나 화학적 자극에 의한 손상

Table 2. RAW 264.7 cell viability of hot-water extracts of MP-fermented coffee beans depending on cultivating areas or varieties purchased from different suppliers

No. ¹⁾	Viability ²⁾	No.	Viability	No.	Viability
1	125.08±6.28 ³⁾	11	115.70±3.08	21	125.61±3.46
2	125.66±5.61	12	116.46±2.76	22	123.68±4.33
3	123.59±5.50	13	119.39±4.19	23	123.13±6.14
4	121.73±3.32	14	122.39±6.22	24	122.92±4.54
5	123.49±4.20	15	123.03±6.56	25	125.14±4.91
6	117.11±3.46	16	120.93±3.89	26	118.52±3.73
7	123.34±3.78	17	124.52±4.66	27	121.16±4.58
8	121.84±4.48	18	121.68±5.47	28	121.44±4.74
9	119.73±5.45	19	116.42±4.10	29	117.98±5.68
10	118.56±4.21	20	123.32±2.88	30	119.81±3.55
Saline control ⁴⁾			100±2.19		

RAW 264.7 cells (2×10^5 cells/well) were treated with 1,000 µg/mL of hot-water extracts for 24 h. The cell viability were determined by CCK-8 kit assay.

¹⁾Extract name of number refer to Table 1.

²⁾Viability (%)=[(absorbance of sample)/(absorbance of saline control)] × 100.

³⁾Results are expressed as mean±SD of quadruplicate samples.

⁴⁾Control is only saline without extract.

으로 일어나며(34), 염증반응이 발생되면 염증매개인자(pro-inflammatory mediators)로 잘 알려진 tumor necrosis factor (TNF)-α, interleukin (IL)-1β, IL-6 및 산화질소(nitric oxide) 등은 숙주에게 치명적인 결과를 초래할 수 있는 것으로 보고되고 있다(35,36), 따라서 본 연구에서는 MP-고체발효 원두커피 열수추출물 30종이 LPS로 유도된 RAW 274.7 세포의 TNF-α, IL-6 및 NO의 생성에 미치는 영향을 확인하기로 하였다. 먼저, RAW 264.7 세포에 대한 추출물 시료의 독성이 없는 농도조건을 확립하기 위해 세포독성을 CCK-8 kit를 사용하여 측정하였는데, Table 2에

나타낸 바와 같이 MP-고체발효 원두커피 열수추출물 30종은 모두 1,000 µg/mL의 시료농도에서 saline 대조군의 1.15-1.25배로 독성을 나타내지 않았다. 따라서 LPS로 유도시킨 RAW 264.7 세포의 항염증 관련 실험은 시료농도 100과 1,000 µg/mL의 수준에서 확인하기로 하였다.

TNF-α 생성 억제능의 경우, Fig. 3에 나타낸 바와 같이 시료농도 100 µg/mL에서는 23번 시료인 MP-Marawaka (7752.6 pg/mL, LPS 자극군의 22.2% 억제)를 제외한 다른 MP-고체발효 원두커피 열수추출물 시료들은 서로 활성차이가 크지 않았으며, 오히려 LPS 자극군(9959.9 pg/mL)과 비교하여 TNF-α의 생성을 증가시키는 경향을 나타내는 시료도 확인되었다. 그러나 시료농도 1,000 µg/mL에서는 시료들의 TNF-α 생성 억제능이 모두 우수하게 증가하였는데, 특히 26번 시료인 MP-Robusta (3274.2 pg/mL)에서 가장 우수한 TNF-α 생성 억제능을 나타내었으며, 이것은 LPS 자극군의 67.1%를 억제하는 활성으로 확인되었다.

한편, IL-6는 TNF-α, IL-1β 더불어 염증에 중요한 작용을 하는 전염증성 매개물질로 알려져 있는 사이토카인으로, 100 µg/mL의 농도에서 16번 시료인 MP-Yirgacheffe (3991.4 pg/mL)가 LPS 자극군(4770.3 pg/mL)의 16.3%를 억제하여 가장 우수한 IL-6 생성 억제능을 나타내었으나, TNF-α의 결과와는 달리 시료농도가 1,000 µg/mL로 증가했을 때는 30종의 MP-고체발효 원두커피 열수추출물들이 모두 억제활성을 나타내지 않았다(Fig. 4). 또한, LPS로 유도된 RAW 264.7 세포의 NO 생성 억제활성의 경우(Fig. 5), 100 µg/mL의 시료농도에서 13번 시료인 MP-Mandheling (42.3 µM)이 LPS 자극군(51.6 µM)에 비해 17.3% 억제능을 나타냈지만, IL-6의 결과와 마찬가지로 시료농도가 1,000 µg/mL로 증가했을 때에는 농도의존적인 활성의 증가는 확인되지 않았으며, 시료들 간의 유의적인 차이를 나타내지도 않았다.

3T3-L1 지방전구세포를 이용한 지방생성 억제능 비교

지방전구세포로부터 지방세포로의 분화는 뚜렷이 형태학적 또는 생화학적 변화를 보이는데, 3T3-L1 세포처럼 이미 확립된 지

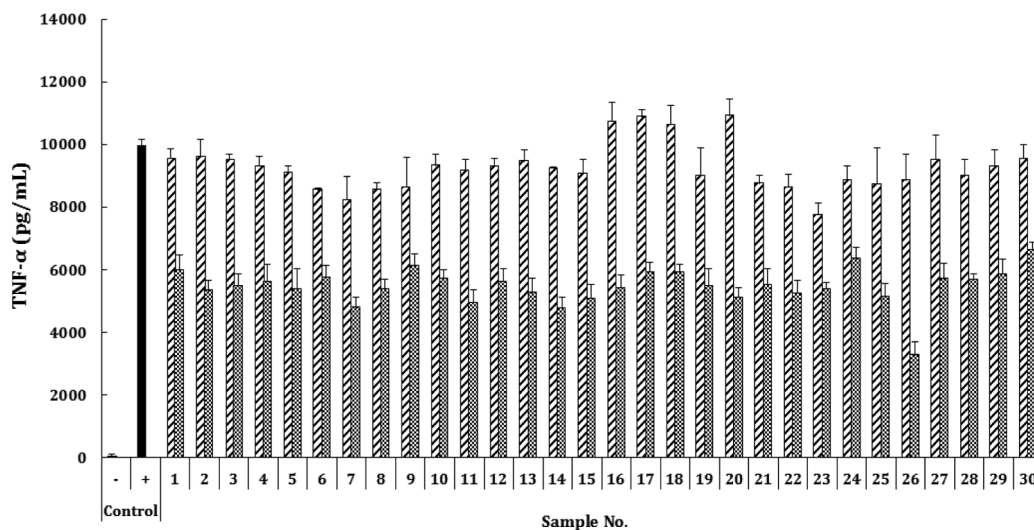


Fig 3. Inhibitory effect of hot-water extracts of MP-fermented coffee beans depending on cultivating areas or varieties purchased from different suppliers on the production of tumor necrosis factor (TNF)-α in LPS-stimulated RAW 264.7 cell line. RAW 264.7 cells (2×10^5 cells/well) were treated with 100 µg/mL (▨) or 1,000 µg/mL (▩) of hot-water extracts for 30 min prior to the addition of LPS (10 ng/mL), and then the cells were further incubated for 6 h. □, only saline without extract or LPS; ■, only LPS (from *E. coli*, 10 ng/mL) without extract. TNF-α concentrations in the cultured media were determined by sandwich ELISA. Extract name of number refer to Table 1. Results are expressed as mean±SD of quadruplicate samples.

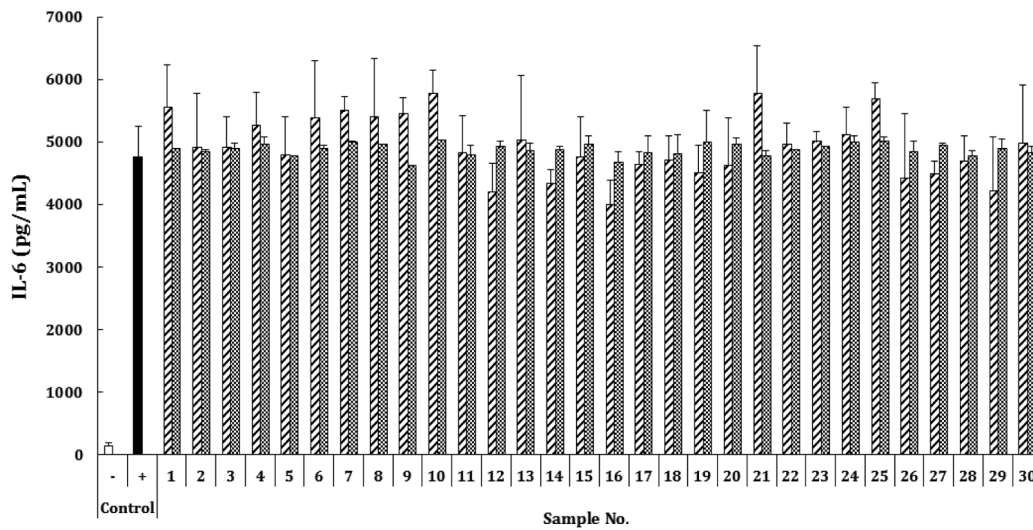


Fig 4. Inhibitory effect of hot-water extracts of MP-fermented coffee beans depending on cultivating areas or varieties purchased from different suppliers on the production of interleukin(IL)-6 in LPS-stimulated RAW 264.7 cell line. RAW 264.7 cells (2×10^5 cells/well) were treated with 100 $\mu\text{g/mL}$ (▨) or 1,000 $\mu\text{g/mL}$ (▩) of hot-water extracts for 30 min prior to the addition of LPS (100 ng/mL), and then the cells were further incubated for 24 h. □, only saline without extract or LPS; ■, only LPS (from *E. coli*, 100 ng/mL) without extract. IL-6 concentrations in the cultured media were determined by sandwich ELISA. Extract name of number refer to Table 1. Results are expressed as mean \pm SD of quadruplicate samples.

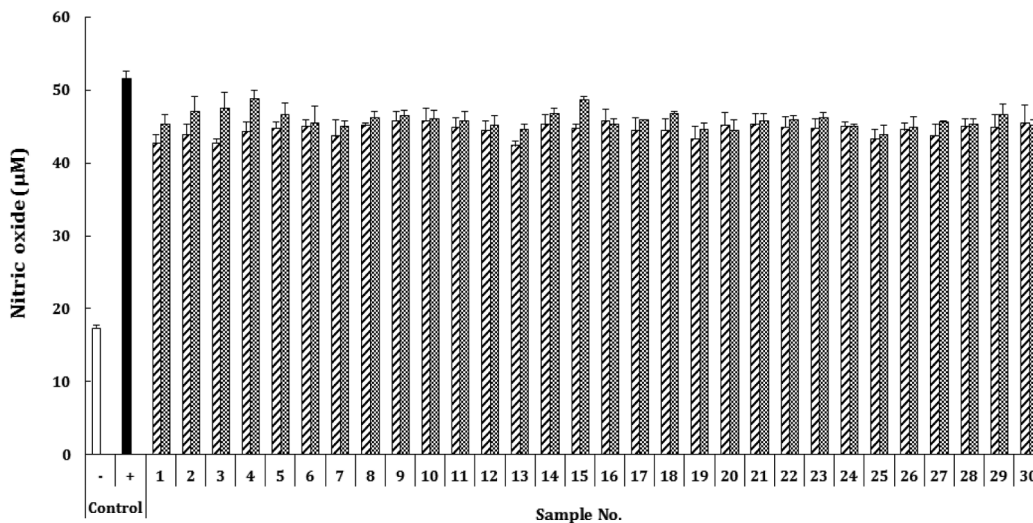


Fig 5. Inhibitory effect of hot-water extracts of MP-fermented coffee beans depending on cultivating areas or varieties purchased from different suppliers on the production of nitric oxide (NO) in LPS-stimulated RAW 264.7 cell line. RAW 264.7 cells (2×10^5 cells/well) were treated with 100 $\mu\text{g/mL}$ (▨) or 1,000 $\mu\text{g/mL}$ (▩) of hot-water extracts for 30 min prior to the addition of LPS (1 $\mu\text{g/mL}$), and then the cells were further incubated for 24 h. □, only saline without extract or LPS; ■, only LPS (from *E. coli*, 1 $\mu\text{g/mL}$) without extract. NO concentrations in the cultured media were determined by griess reaction. Extract name of number refer to Table 1. Results are expressed as mean \pm SD of quadruplicate samples.

방전구세포나 지방조직 유래의 기질전구세포는 *in vitro*에서 지방 세포생성의 과정을 관찰하는데 널리 이용되어 왔다. 따라서 MP-고체발효 원두커피 열수추출물 30종의 3T3-L1 지방전구세포의 지방생성 억제에 미치는 영향을 Oil red O staining으로 확인한 결과, 분화를 유도시킨 대조군(MDI 분화배지에 saline 첨가군)에서 생성된 중성지방은 미분화 대조군(일반배지에 saline 첨가군)에 비해 11.9배의 지방생성량을 나타내었다. MP-고체발효 원두커피 열수추출물 30종의 지방생성 억제활성(MDI 분화배지에 추출물 첨가군)은 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 시료농도에서 모든 추출물 시료에서 지방생성의 억제능을 전혀 나타내지 않았지만(data not shown),

시료농도 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 26번 시료인 MP-Robusta는 분화유도군에 비해 22.2%의 지방생성을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 6). 더불어 다른 MP-고체발효 원두커피 열수추출물들이 지방생성 억제효과를 나타내지 못하는 것에 비해 MP-Robusta는 분화유도군과 유의적인 차이($p < 0.001$)를 나타내는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 로부스타 품종이 아라비카 품종에 비해 높게 함유하고 있는 항비만 성분인 caffeine 또는 chlorogenic acid(37,38)에 따른 결과일 수도 있으나, 홍국균의 발효과정을 통해 강력한 콜레스테롤 합성 억제력인 가지는 모나콜린류(39,40) 등 2차 대사산물(secondary metabolite)의 생산에 기인할 수도 있을 것이라

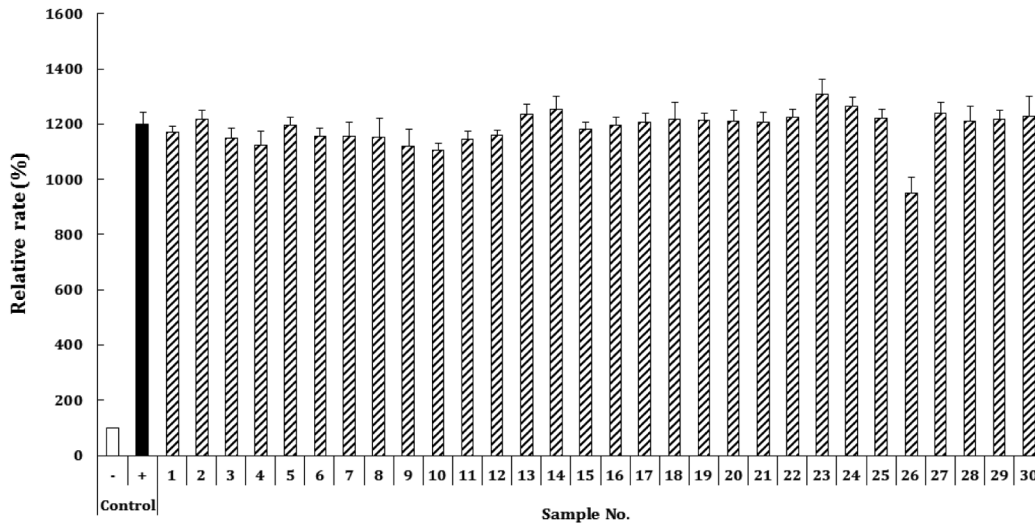


Fig 6. Anti-adipogenesis effects of hot-water extracts of MP-fermented coffee beans depending on cultivating areas or varieties purchased from different suppliers on 3T3-L1 pre-adipose cell line. 3T3-L1 pre-adipose (5×10^4 cells/well) were treated 10% BS/DMEM in humidified 5%-CO₂ incubator. At confluence (day 0), the medium was changed to DMEM containing 10% FBS, and differentiation was induced with 5 µg/mL INS, 1 µM DEX and 517 nM IBMX. The medium was discarded and maturation medium (DMEM containing 10% FBS with 5 µg/mL insulin) was added at day 3. After day 5, the medium was changed to DMEM containing with 10% FBS in every 2 days. Extracts were treated day 0 and day 3, and lipid droplets inside the cells were confirmed by Oil red O staining at day 7. □, non-differentiated control; ■, Differentiated control; ▨, 1,000 µg/mL of extracts treated when day 0 and 3 on differentiation. Extract name of number refer to Table 1. Results are expressed as mean±SD of quadruplicate samples.

고 사료된다. 더욱이, 저자들은 이미 선행연구를 통해 인도네시아산 Mandheling 커피가 홍국균 균사체와의 발효과정을 통해 caffeine의 함량은 유지한 채 chlorogenic acid의 함량만을 유의적으로 증가시킨 연구결과를 보고하여 홍국균에 의한 커피의 생물학적 전환(biotransformation) 가능성을 제시했었다(23).

결론적으로, 다양한 산지별 및 품종별 커피생두 30종을 이용하여 조제한 홍국균(MP) 균사체-고체발효 원두커피 열수추출물 중에서 베트남산 Robusta 커피를 이용한 홍국균(MP)-발효커피, 즉 26번 시료인 MP-Robusta는 다른 MP-고체발효 원두커피들보다 항산화, 항염증활성 및 항지질대사 활성이 우수한 것으로 나타났다. 이러한 결과가 홍국균 균사체의 단순 첨가에 의한 커피의 생리활성 증진이 아니라, 발효과정에 의해 균사체의 생물학적 전환이 유도되었음을 확실히 밝히기 위해서는 다양한 생리활성성분의 분석 및 활성획분의 정제 및 구조동정 등의 검증이 수반되어야 할 것으로 생각된다.

한편, 본 연구결과에서 가장 우수한 생리활성을 나타낸 베트남산 로부스타 커피의 경우 최근 브라질에 이어 전세계에서 두 번째로 많은 커피생산량을 기록하고 있어 안정적인 보급이 가능할 것으로 판단되며, 로부스타 품종의 경우 아라비카 품종보다 저렴한 원가를 감안할 때 본 연구의 목적인 저가의 커피품종을 이용한 고부가가치 기능성 발효커피 제조에도 적합한 품종일 것으로 사료된다. 반면, 일반적으로 로부스타 품종은 아라비카 품종에 비해서 품질이 떨어지는 것으로 인식되고 있는데, 홍국균의 발효과정을 통해 로부스타종의 강한 쓴맛과 향미가 부족한 점을 보완함과 함께 생리활성 성분의 증진을 목적으로 최적발효조건을 확립한다면, 새로운 기능성커피 및 기능성소재로의 활용도 가능할 것으로 보인다.

요 약

저자들은 이전 연구에서 커피의 생리활성을 증진시키기 위해

다양한 진균류 균사체의 고체배양을 이용하여 발효커피를 조제하였으며, 홍국균(*Monascus* sp.) 균사체를 이용하여 조제한 발효커피가 비발효 일반커피 또는 다른 버섯 균사체를 이용하여 조제한 발효커피에 비해 생리활성이 우수하게 증진됨을 확인한 바 있다. 따라서 본 연구에서는 다양한 산지별 및 품종별 커피생두를 이용하여 각각 홍국균(*M. purpureus*, MP) 균사체를 고체배양한 발효커피로 조제하고 이들의 특성을 확인하고자 하였다. 각기 다른 공급업체를 통하여 구입한 30종의 산지별 및 품종별 커피생두는 홍국균(MP) 균사체의 최적발효조건을 통해 배양되었으며, 동일조건에서 중배전 후 열수추출물로 조제되었다. 열수추출물 중에서 MP-Mandheling은 가장 우수한 추출수율을 나타내었으며(13.6-15.5%), MP-Robusta는 가장 우수한 총 폴리페놀 함량(3.03 mg GAE/100 mg) 및 ABTS 라디칼 억제능(27.11 mg AEAC/100 mg)을 나타내었다. 더욱이, MP-Robusta는 1,000 µg/mL의 시료농도에서 LPS로 유도한 RAW 264.7 세포의 TNF-α 생성을 가장 우수하게 억제하였을 뿐 아니라(LPS 유도군의 67.1% 억제), 3T3-L1 지방세포의 지방생성을 효과적으로 억제하는 항지질대사 활성을 나타내었다(분화 대조군의 22.2% 억제). 결론적으로, *M. purpureus* 균사체의 고체배양을 이용한 베트남산 로부스타 발효커피는 기능성 커피음료 및 기능성소재로의 활용등의 산업적인 응용에 좋은 소재가 될 것으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 2013년도 중소기업청 기술혁신과제(농공상용합형 기술개발사업, 과제번호 SA114110)의 지원에 의하여 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

References

1. Brezová V, Šlebodová A, Staško A. Coffee as a source of antiox-

- idants: An EPR study. *Food Chem.* 114: 859-868 (2009)
2. Esquivel P, Jiménez VM. Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Res. Int.* 46: 488-495 (2012)
 3. Kim MJ, Park JE, Lee JH, Choi NR, Hong MH, Pyo YH. Antioxidant capacity and bioactive composition of a single serving size of regular coffee varieties commercially available in Korea. *Korean J. Food Sci. Technol.* 45: 299-304 (2013)
 4. Chu YF, Brown PH, Lyle BJ, Chen Y, Black RM, Williams CE, Lin YC, Hsu CW, Cheng IH. Roasted coffees high in lipophilic antioxidants and chlorogenic acid lactones are more neuroprotective than green coffees. *J. Agr. Food Chem.* 57: 9801-9808 (2009)
 5. Eskelinen MH, Ngandu T, Tuomilehto J, Soininen H, Kivipelto M. Midlife coffee and tea drinking and the risk of late-life dementia: a population-based CAIDE study. *J. Alzheimer's Dis.* 16: 85-91 (2009)
 6. Hu G, Bidel S, Jousilahti P, Antikainen R, Tuomilehto J. Coffee and tea consumption and the risk of Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 22: 2242-2248 (2007)
 7. Chu YF, Chen Y, Black RM, Brown PH, Lyle BJ, Liu RH, Ou B. 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 (2011)
 8. Choi EY, Jang JY, Cho YO. 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 (2010)
 9. Chou T. Wake up and smell the coffee. Caffeine, coffee and the medical consequences. *West J. Med.* 157: 544-553 (1992)
 10. Klatsky AL, Morton C, Udaltsova N, Friedman GD. Coffee, cirrhosis, and transaminase enzymes. *Arch. Intern. Med.* 166: 1190-1195 (2006)
 11. Lopez-Garcia E, van Dam RM, Willett WC, Rimm EB, Manson JE, Stampfer MJ, Rexrode KM, Hu FB. Coffee consumption and coronary heart disease in men and women: a prospective cohort study. *Circulation* 113: 2045-2053 (2006)
 12. Kang KJ, Choi SS, Han HK, Kim KH, Kwon SS. Effects of instant coffee on weight, plasma lipids, leptin, and fat cell size in rats fed on a high fat diet. *Korean J. Food Sci. Technol.* 36: 478-483 (2004)
 13. Mackay DC, Rollins JW. Caffeine and caffeinism. *J. R. Nav. Med. Serv.* 75: 65-67 (1989)
 14. Yano K, Rhoads GG, Kagan A. Coffee, alcohol and risk of coronary heart disease among Japanese men living in Hawaii. *N. Engl. J. Med.* 297: 405-409 (1977)
 15. LaCroix AZ, Mead LA, Liang KY, Thomas CB, Pearson TA. Coffee consumption and the incidence of coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.* 315: 977-982 (1986)
 16. Donahue RP, Orchard TJ, Stein EA, Kuller LH. Lack of an association between coffee consumption and lipoprotein lipids and apolipoproteins in young adults: The Beaver County Study. *Prev. Med.* 16: 796-802 (1987)
 17. de Roos B, Sawyer JK, Katan MB, Rudel LL. Validity of animal models for the cholesterol-raising effects of coffee diterpenes in human subjects. *Proc. Nutr. Soc.* 58: 551-557 (1999)
 18. Blanc PJ, Loret MO, Santerre AL, Pareilleux A, Prome D, Prome JC, Laussac JP, Goma G. Pigments of *Monascus*. *J. Food Sci.* 59: 862-864 (1994)
 19. Ma J, Li Y, Ye Q, Li J, Hua Y, Ju D, Zhang D, Cooper R, Chang M. Constituents of red yeast rice, a traditional Chinese food and medicine. *J. Agr. Food Chem.* 48: 5220-5225 (2000)
 20. Endo A. Monacolin-K, a new hypocholesterolemic agent produced by *Monascus* species. *J. Antibiot.* 32: 852-854 (1979)
 21. Manzoni M, Rollini M. Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58: 555-564 (2002)
 22. Wang IK, Lin-Shiau SY, Chen PC, Lin JK. Hypotriglyceridemic effect of Anka (a fermented rice product of *Monascus* sp.) in rats. *J. Agr. Food Chem.* 48: 3183-3189 (2000)
 23. Shin JY, Kim H, Kim DG, Baek GH, Jeong HS, Yu KW. Pharmacological activities of coffee roasted from fermented green coffee beans with fungal mycelia in solid-state culture. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 42: 487-496 (2013)
 24. Velioglu YS, Mazza G, Cao L, Oomah BD. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruit, vegetables, and grain products. *J. Agr. Food Chem.* 46: 4113-4117 (1998)
 25. Choi Y, Lee SM, Chun J, Lee HB, Lee J. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chem.* 99: 381-387 (2006)
 26. Fox JB. Kinetics and mechanisms of the Griess reaction. *Anal. Chem.* 51: 1493-1502 (1979)
 27. Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. 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 (1996)
 28. Hecimovic I, Belšcak-Cvitanovic A, Horžic D, Komes D. Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. *Food Chem.* 129: 991-1000 (2011)
 29. Yen WJ, Wang BS, Chang LW, Duh PD. Antioxidant properties of roasted coffee residues. *J. Agr. Food Chem.* 53: 2658-2663 (2005)
 30. Sato Y, Itagaki S, Kurokawa T, Ogura J, Kobayashi M, Hirano T, Sugawara M, Iseki K. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *Int. J. Pharm.* 403: 136-138 (2011)
 31. Trugo LC, Macrae R. A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. *Food Chem.* 15: 219-229 (1984)
 32. Trugo LC, Macrae R. Chlorogenic acid composition of instant coffee. *Analyst* 109: 263-266 (1984)
 33. Clifford MN, Jarvis T. The chlorogenic acids content of green robusta coffee beans as a possible index of geographic origin. *Food Chem.* 29: 291-298 (1988)
 34. Cho W, Nam JW, Kang HJ, Windono T, Seo EK, Lee KT. Zedoarondiol isolated from the rhizoma of *Curcuma heyneana* is involved in the inhibition of iNOS, COX-2 and pro-inflammatory cytokines via the downregulation of NF- κ B pathway in LPS-stimulated murine macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 9: 1049-1057 (2009)
 35. Yun HJ, Heo SK, Yi HS, Kim CH, Kim BW, Park SD. Anti-inflammatory effect of Injinho-tang in RAW 264.7 cells. *Kor. J. Herbology* 23: 169-178 (2008)
 36. Seymour RM, Henderson B. Pro-inflammatory-anti-inflammatory cytokine dynamics mediated by cytokine-receptor dynamics in monocytes. *IMA J. Math. Appl. Med. Biol.* 18: 159-192 (2001)
 37. Cho AS, Jeon SM, Kim MJ, Yeo JY, Seo KI, Choi MS, Lee MK. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food Chem. Toxicol.* 48: 937-943 (2010)
 38. Hsu CL, Huang SL, Yen GC. Inhibitory effect of phenolic acids on the proliferation of 3T3-L1 preadipocytes in relation to their antioxidant activity. *J. Agr. Food Chem.* 54: 4191-4197 (2006)
 39. Endo A. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent that specifically inhibits 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *J. Antibiot.* 33: 334-336 (1980)
 40. Endo A, Hasumi K, Negishi S. Monacolin J and L, new inhibitors of cholesterol biosynthesis produced by *Monascus ruber*. *J. Antibiot.* 38: 420-422 (1985)