

홍국균(*Monascus ruber*) 균사체-커피생두 발효물로부터 조제된 원두커피의 생리활성

김 훈 · 서형주 · 신지영* · 황종현** · †유광원**

고려대학교 의생명융합과학과, *(주)코시스바이오, **한국교통대학교 식품영양학과

Physiological Activity of Roasted Coffee prepared from Fermented Green Coffee Bean with *Monascus ruber* Mycelium

Hoon Kim, Hyung-Joo Suh, Ji-Young Shin*, Jong-Hyun Hwang** and †Kwang-Won Yu**

Dept. of Integrated Biomedical and Life Science, Korea University, Seoul 02841, Korea

*CosisBio Limited Cooperation, Chungbuk 28962, Korea

**Dept. of Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Chungbuk 27909, Korea

Abstract

To enhance the physiological activities of roasted coffee (RC), 30 kinds of green coffee beans (GCB) with different cultivating areas and varieties were fermented with *Monascus ruber* mycelium (MR) by solid-state culture. After the dried MR-fermented GCB was subjected medium roasting, each RC was extracted with hot-water. Among the hot-water extracts, the highest yield was the hot-water extract of RC from MR-fermented Indonesia Mandheling GCB (15.5%). However, the hot-water extract of RC from MR-fermented Ethiopia Sidamo GCB showed significantly higher polyphenolic contents (3.08 mg GAE/100 mg) and ABTS free radical scavenging activity (25.41 mg AEAC/100 mg). Meanwhile, the hot-water extract of RC from MR-fermented Vietnam Robusta GCB showed not only the effective inhibition of TNF- α level (73.7% inhibition of LPS-stimulated control) from LPS-stimulated RAW 264.7 cells but also significant inhibition of lipogenesis (63.5% inhibition of lipid differentiation control) in 3T3-L1 pre-adipose cells. In conclusion, these results suggest that roasted coffees from Ethiopia Sidamo and Vietnam Robusta green coffee beans fermented with *Monascus ruber* mycelium using solid-state culture could have industrial applications as functional coffee beverages.

Key words: *Monascus ruber*, green coffee bean, solid-state culture, physiological activity, roasted coffee

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. 최근 생활 수준의 향상과 더불어 다양한 음료에 대한 기능성 연구도 동시에 활발히 진행되고 있는 추세로, 특히 음료 중 전 세계적으로 가장 소비량이 높은 커피의 기능성에 대한 연구는 그

가치가 높다고 할 수 있다. 실제로 많은 연구에서 다양한 방법을 통한 커피의 생리활성 효과와 그 작용기작을 증명하기 위한 연구가 진행되어 왔다. Cano-Marquina 등(2013)은 1990년부터 2012년까지 보고된 커피에 대한 연구를 종합한 바 있으며, 커피 속에 존재하는 카페인(cafeine), 클로로겐산(chlorogenic acid) 및 디터르펜(diterpene) 등의 생리활성 물질들이 알츠하이머(Eskelinen 등 2009), 파킨슨 병(Hu 등 2007), 제2형 당뇨병(Chu 등 2011), 콜레스테롤(Choi 등 2010) 및 심장 질환 및 간경변(Whayne TF 2014; Lopez-Garcia 등 2006; Saab 등 2014)

† Corresponding author: Kwang-Won Yu, Dept. of Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Chungbuk 27909, Korea. E-mail: kwyu@ut.ac.kr, Phone: +82-43-820-5333

등에 우수한 보호효과를 갖는 것으로 알려지면서 기호식품을 넘어서 커피의 약리적인 효과에도 많은 연구가 이루어지고 있는 추세이다. 하지만 이와 같은 생리활성에 관한 연구 이외에도 커피의 과다 섭취로 야기되는 카페인 중독증(caffeinism)을 비롯한 정서불안, 신경과민, 수면장애 및 위장장애 등의 부정적인 연구도 함께 보고되어 있다(Mackay & Rollins 1989; McMullen 등 2011). 따라서 커피의 유용성분 증진과 함께 유해성분을 감소시키기 위해 생물학적 전환(발효) 등을 이용한 다양한 공정 개발과 이에 따른 기능성커피의 개발은 일상적으로 섭취하는 기호식품을 통한 새로운 커피시장의 개척 및 다양한 대사성 질환 예방에 크게 기여할 수 있다고 사료된다.

한편, 홍국균으로 알려진 *Monascus* 속은 자낭균류에 속하는 곰팡이로 전통적으로 홍국의 제조에 이용되었을 뿐 아니라, 아시아 여러 나라에서 식품색소, 식품의 보존 및 살균제, 건강식품 등으로도 다양하게 이용되어 왔다(Potakova P 2013; Ma 등 2000). 최근 들어 *Monascus* 속의 홍국균이 생산하는 홍국색소는 식품첨가물로 다양하게 이용되고 있으며, monacolin K, mevlinolin, lovastatin, γ -aminobutyric acid(GABA), acetylcholine과 같은 생리활성물질은 콜레스테롤 생합성 효소(HMG-CoA reductase) 활성억제, 혈압상승 억제 및 항산화 활성과 같은 유효성 검증에 관한 연구결과를 통해 많은 주목을 받고 있는 실정이다(Huang 등 2007; Mazoni & Rollini 2002; Tsukahara 등 2009). 이러한 홍국의 우수한 생리활성 효능을 새로운 건강기능식품 개발에 활용하려는 연구가 활발하게 이루어지고 있는 가운데 홍국을 가공공정에 활용한 커피, 된장, 고추장, 발효 콩, 쿠키, 죽 등이 상품화 되고 있다(Kim 등 2014; Kim 등 2015; Kim & Rhyu 2000; Pyo & Lee 2007; Jeong 등 2013). 또한, 균사체가 가지는 생물학적 변환능력(biotransformation)을 이용하여 생리활성이 우수한 홍국균 균사체가 커피생두를 영양원으로 생육할 수 있다면, 커피가 가지는 다양한 생리활성 성분이 홍국균 균사체의 약리작용과 더불어 시너지 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

이러한 관점에서 최근 저자들은 Indonesia Mandheling 커피생두에 3종의 버섯 균사체 및 2종의 홍국균 균사체를 각각 고체발효한 커피생두 발효물을 조제하였으며, 각각의 발효생두를 원두커피로 제조한 후 생리활성 증가 및 성분 변화를 확인한 바 있다. 특히, 홍국균 2종(*Monascus purpureus* 및 *Monascus ruber*)으로 고체배양한 Indonesia Mandheling 원두커피는 다른 진균류 균사체의 고체배양을 이용해 조제된 원두커피 또는 일반 원두커피에 비해 항산화 및 면역활성이 유의적으로 증가했으며, 카페인 함량에 영향을 주지 않으면서 클로로겐산을 유의적으로 증가시킴을 확인하였다(Shin 등 2013). 또한 그 연구를 바탕으로 *M. purpureus* 균사체를 다양한 산지별 및 품종별 커피생두에 각각 고체배양한 발표커피

를 조제하여 항산화, 항염증 및 지방생성 억제활성을 평가하였으며, 30종의 커피품종 중에서 Vietnam Robusta 발효커피가 기능성 커피음료 및 기능성소재로의 활용에 좋은 소재가 될 수 있을 것으로 제시한 바 있다(Kim 등 2014). 따라서 본 연구에서는 이전까지의 연구결과를 바탕으로 발효특성이 다른 홍국균 균사체인 *M. ruber*를 30종의 산지별 및 품종에 따른 커피생두에 고체발효하여 얻은 발효물을 배전하여 원두커피를 조제하고, 이들의 생리활성을 비교함으로써 홍국균-커피생두 발효물로부터 생리활성이 증강된 원두커피를 산업화하기 위한 기초자료로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

1. 홍국균 균사체의 종균배양

본 연구에서 커피생두의 고체발효를 위해 사용한 홍국균 균사체(*Monascus ruber*, MR)는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업유전자원센터(Gyeonggi-do, Korea)로부터 분양받았으며, 균사체는 potato dextrose agar(Difco, Detroit, MI, USA) 평판배지에서 25°C로 약 7~10일간 배양한 후 potato dextrose broth(Difco)가 담긴 Erlenmeyer flask에 접종하고, shaking incubator(Jeio tech, Daejeon, Korea)에서 약 5일마다 계대배양하였다. 커피생두 고체발효용 홍국균 균사체는 PDB 배지에서 3회 정도 계대배양한 종균을 실험에 사용하였다.

2. 홍국균 균사체-고체발효 커피생두의 제조

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

3. 고체발효 원두커피 및 열수추출물의 제조

30종의 홍국균 균사체-커피생두 고체발효물은 coffee roaster(Genecafe, Gyeonggi-do, Korea)에서 중배전(235~240°C, 12~13분간 로스팅)하여 각각의 원두커피(roasted coffee)로 조제한

Table 1. Extraction yield of hot-water extract of roasted coffee prepared from fermented green coffee bean with *Monascus ruber*

Supplier	Sample No.	Cultivating areas and varieties	Yield (%) ¹⁾
A	1	Mexico SHG	10.2
	2	Colombia Supremo	10.4
	3	Brazil Santos	11.7
	4	Indonesia Mandheling	13.7
	5	Costa Rica SHB Tarazu	11.2
	6	Tanzania Kilimanjaro AA	10.1
	7	Guatemala SHB Antigua	11.2
	8	Ethiopia Mocha Sidamo G2	11.9
	9	Ethiopia Yirgacheffe	10.7
B	10	Kenya AA	11.7
	11	Costa Rica SHB Tarazu	11.0
	12	Guatemala SHB Antigua	12.3
	13	Indonesia Mandheling	15.5
	14	Papua New Guinea Diamond	11.7
	15	Colombia Supremo Pitalito	10.2
	16	Ethiopia Yirgacheffe	10.0
	17	Ethiopia Mocha Sidamo G2	10.9
	18	Brazil Cerrado	11.2
C	19	Ethiopia Yirgacheffe	11.1
	20	Colombia Supremo	10.2
	21	Indonesia Mandheling	13.7
	22	Tanzania AA	10.8
	23	Papua New Guinea Marawaka	12.4
	24	Costa Rica SHB	9.0
	25	Brazil Cerrado	11.6
	26	Vietnam Robusta	13.2
	27	Kenya AA	14.9
	28	Ethiopia Mocha Sidamo G2	11.9
	29	Guatemala Antigua	11.9
	30	Brazil Santos	9.5

¹⁾ Yield (w/w%) against raw materials.

후, coffee grinder(Bazzatra, Gyeonggi-do, Korea)를 이용하여 동일 크기로 분쇄하였다. 균사체-커피생두 발효물로부터 조제된 원두커피 열수추출물은 원두커피에 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 균

사체-커피생두 발효물로부터 조제된 원두커피의 열수추출물로 조제하였다(Table 1).

4. 항산화 성분함량 및 항산화 활성

30종의 홍국균-커피생두 발효물로부터 조제된 원두커피 열수추출물의 총 폴리페놀 화합물 함량은 Folin-Ciocalteu법(Velioglu 등 1998)을 이용하여 측정하였다. 즉, Folin-Ciocalteus' reagent가 알칼리 조건에서 시료의 폴리페놀성 화합물에 의해 환원되면 청색에서 노란색으로 발색되는 원리를 이용하여, 추출물 시료 100 µL에 알칼리 조건을 형성하기 위해 2% Na₂CO₃을 2 mL를 가한 후 3분간 반응시키고, 50%의 Folin-Ciocalteus' reagent(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 100 µL를 첨가해 30분간 반응시킨 후 반응액을 750 nm에서 측정함으로써 총 폴리페놀의 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 안정한 free radical인 ABTS cation을 이용한 decolorization assay에 의한 총 항산화력은 Choi 등(2006)의 방법에 의하여 측정하였다. 즉, 7.4 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(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 µL를 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.

5. 염증성 사이토카인 및 nitric oxide 억제활성

항염증 활성실험에 사용된 murine macrophage cell line인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양 받았으며, GenDEPOT(Houston, TX, USA)에서 구입한 10% Fetal bovine serum(FBS), 100 U/mL의 penicillin과 100 µg/mL의 streptomycin(GenDEPOT)이 함유된 DMEM(GenDEPOT) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기(Vision Scientific, Gyeonggi, Korea)에서 2~3일 간격으로 계대하면서 배양하였다. 또한, 항염증실험의 염증유도에 사용된 lipopolysaccharide(LPS from *Escherichia coli*)는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 염증성 사이토카인인 tumor necrosis factor(TNF)- α 및 interleukin(IL)-6는 BD Bioscience(San Diego, CA, USA)의 ELISA kit를 구입하여 사용하였다. 항염증 활성을 측정하기 위해서 먼저 RAW 264.7 세포는 10% FBS/DMEM 배지에서 1×10^6 cells/mL로 조정하여 96-well plate에 200 µL씩

분주한 뒤 5% CO₂ 배양기에서 배양시켜 세포를 부착시켰다. 12시간 뒤 배양액은 모두 제거하고 새로운 10% FBS/RPMI-1640 배지 160 µL와 농도별로 희석된 추출물 20 µL를 함께 첨가한 다음, 30분 후에 LPS를 처리하고, 다시 일정시간동안 배양하였다(TNF-α; 6시간, nitric oxide; 24시간). LPS로 유도된 TNF-α 및 nitric oxide(NO) 억제능은 세포배양 상등액 50 µL를 취하여 BD Bioscience사의 instruction manual에 의한 ELISA법 및 Griess reagent 반응법(Fox JB 1979)을 이용하여 측정하고, LPS 처리군에 대한 억제율(%)로 나타내었다. 한편, 시료의 TNF-α 및 NO 억제능을 측정하기 위해서는 시료 자체의 RAW 264.7 세포에 대한 독성확인이 선행되어야 하기 때문에, RAW 264.7 세포에 대한 시료의 독성 여부를 CCK-8 kit (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)를 사용하여 확인하였으며(Ishiyama 등 1996), saline 대조군에 대한 세포생존율(%)로 나타내었다.

6. 3T3-L1 세포배양 및 Oil red O staining

실험에 사용된 3T3-L1 세포는 American type culture collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하였고, 10% bovine serum(BS, Gibco, NY, USA)과 100 U/mL의 penicillin, 100 µg/mL의 streptomycin이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂의 조건에서 3일마다 계대배양하며 사용하였다. 지방 분화 억제능을 확인하기 위해 3T3-L1 지방전구세포는 24 well tissue culture plate에 5×10⁴ cells/well로 분주하고, 세포 증식 기에는 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 배지(MDI)로 10% FBS와 5 µg/mL의 insulin (INS, Sigma), 517 nM의 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMx, Sigma), 1 µM의 dexamethasone(DEX, Sigma)이 함유된 DMEM으로 교환하고, 분화유도 3일 후(day 3)에는 10% FBS와 insulin만이 함유된 DMEM 배지로 교환하였다. 이후 2일 간격으로 10% FBS만이 함유된 DMEM으로 배지를 교환하면서 세포의 지방 분화 상태를 확인하였으며, 시료는 day 0과 day 3에 2회 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 분화 정도는 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

1. 홍국균-커피생두 발효물로부터 조제된 30여종 원두커피 열수추출물

기능성 원두커피의 산업적 개발 가능성을 검토하기 위하여 국내에 수입되는 30여종의 산지별 및 품종별 커피생두에 홍국균(*Monascus ruber*, MR) 균사체를 고체발효시켜 MR 균사체-커피생두(green coffee bean) 발효물을 조제한 후, 증배전을 통해 품종에 따른 MR 균사체-원두커피(roasted coffee)로 제조하였다. 커피는 전 세계적으로 다양한 품종이 재배되고 있으나, 상업적으로 재배하는 주요 품종은 세계 산출량의 약 70%를 차지하고 있는 아라비카종(*Coffea arabica* L.)과 약 30%를 차지하고 있는 로부스타종(*Coffea canephora*)으로 구분되어진다(Kim 등 2014). 따라서 본 실험에서 사용된 커피생두의 품종도 순수 로부스타종인 Vietnam Robusta(26번), 로부스타종과 아라비카종이 섞인 브라질산 Santos 또는 Cerrado(3, 18 및 30번) 및 Indonesia Mandheling(4, 13, 21번)을 제외하고는 모두 순수 아라비카종을 구입하여 진행하였다. 다음으로 이와 같이 제조된 30여종 MR-원두커피의 다양한 생리활성(항산화, 항염증 및 지방세포 분화억제능 등)을 측정하기 위하여 각 시료에 20배의 물을 첨가한 후 decoction시킴으로써 MR-원두커피의 열수추출물을 조제하였다. 원두커피의 열수추출물 수율은 Table 1에 나타내었는데, 커피생두의 품종이 많아서 열수로 1회만 추출하였기 때문에 Shin 등(2013)의 연구결과에 비해 수율은 전반적으로 낮았으나, MR-Indonesia Mandheling 커피생두로부터 조제된 원두커피 열수추출물(시료번호 4, 13 및 21번)이 공급업체에 따라 차이를 보이지 않으면서 모두 높은 수율을 보여주었다(발효물 대비 13.7~15.5%).

2. 원두커피 열수추출물의 항산화활성

홍국균-커피생두 발효물로부터 조제된 30종의 원두커피 열수추출물에 대한 대표적인 항산화 성분인 폴리페놀 함량과 ABTS 라디칼 소거능은 Fig. 1과 2에 각각 나타내었다. 먼저, 항산화 활성이 강하다고 알려져 있는 총 폴리페놀 함량의 측정결과(Fig. 1), 8번 시료인 MR-Ethiopia Sidamo G2 커피생두 발효물의 원두커피 열수추출물(3.08 mg GAE/100 mg)과 26번 시료인 MR-Vietnam Robusta 커피생두 발효물의 원두커피 열수추출물(2.52 mg GAE/100 mg)이 다른 원두커피 열수추출물에 비해서 우수한 폴리페놀 함량을 나타내었다. 일반적으로 원두커피의 폴리페놀 함량은 아라비카종에 비해 로부스타종에서 약 1.5~2배 가량 높다고 이미 보고되어 있다

(Hečimović 등 2011). 그러나 본 연구결과에서는 동일하게 발효를 진행한 30종의 원두커피 중에서 아라비카종인 Ethiopia Sidamo G2 커피가 가장 높은 폴리페놀 함량을 나타낸 것으로 보아, 이는 발효과정을 통하여 커피 속 다양한 성분이 폴리페놀성 물질로 전환되었을 가능성을 제시하는 것으로 사료될 수 있다. ABTS를 이용한 라디칼 소거능 측정결과도 총 폴리페놀 함량과 유사한 결과를 나타내었는데, 8번 시료인 MR-

Ethiopia Sidamo G2 커피생두 발효물의 원두커피 열수추출물 (25.41 mg AEAC/100 mg)과 26번 시료인 MR-Vietnam Robusta 커피생두 발효물의 원두커피 열수추출물(19.93 mg AEAC/ 100 mg)이 다른 원두커피 열수추출물에 비해 높은 자유라디칼 소거활성을 보여주었다(Fig. 2). 원두커피의 항산화활성 역시 아라비카종에 비해 로부스타종에서 높다고 알려져 있으며, 항산화활성에 관여하는 성분으로는 chlorogenic acid(Sato

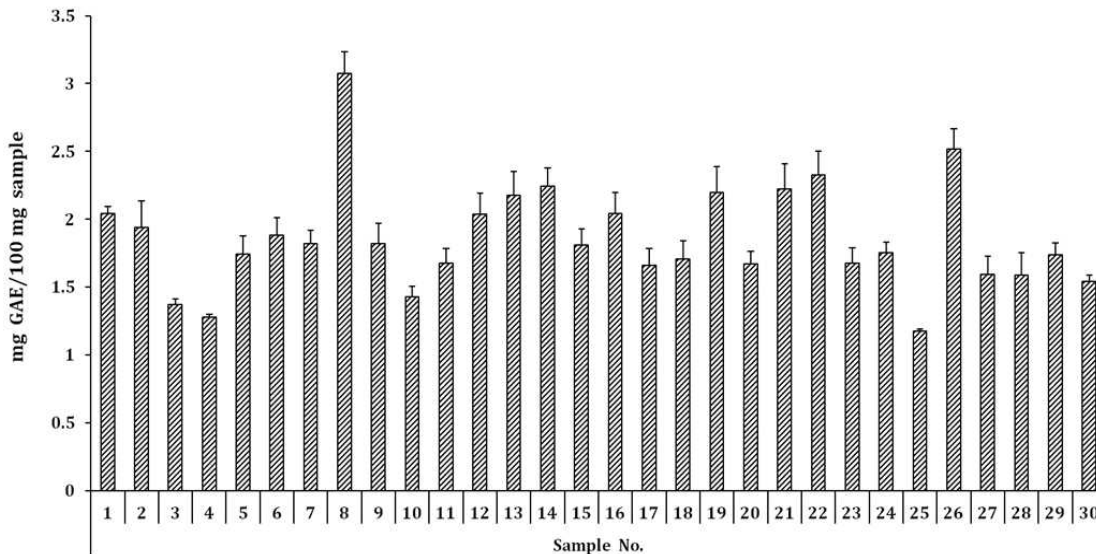


Fig. 1. Polyphenolic content of hot-water extract of roasted coffee prepared from fermented green coffee bean with *Monascus ruber*. Extract name of number refer to Table 1. Results are expressed as mean±S.D. of quadruplicate samples.

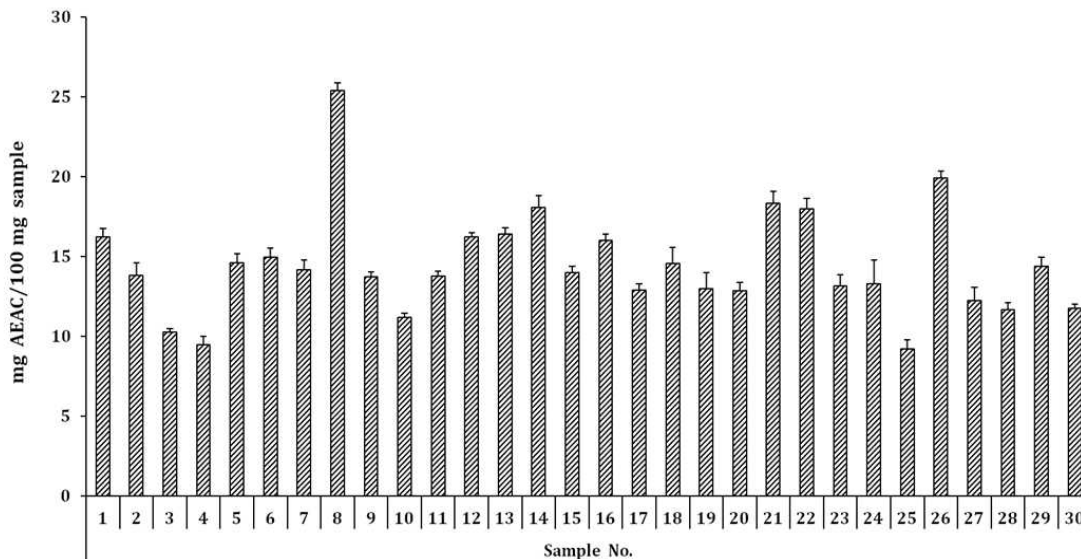


Fig. 2. ABTS free radical scavenging activity of hot-water extract of roasted coffee prepared from fermented green coffee bean with *Monascus ruber*. Extract name of number refer to Table 1. Results are expressed as mean±S.D. of quadruplicate samples.

등 2011; Yen 등 2005)를 비롯하여 배전공정 중 화학적으로 쉽게 분해되어 형성하는 caffeic acid, cinnamic acid 및 ferulic acid 등의 함량 역시 아라비카종에 비해 로부스타종에서 높다고 이미 보고되어 있다(Trugo & Macrae 1984a; Trugo & Macrae 1984b; Clifford & Jarvis 1988). 그러나 8번 시료인 MR-Ethiopia Sidamo G2 커피생두 발효물의 원두커피 열수추출물이 총 폴리페놀 성분과 더불어 라디칼 형성을 억제하는 항산화활성이 다른 MR-커피생두 발효물의 원두커피 열수추출물보다도 월등히 우수하게 나타냄으로써, 추후 Ethiopia Sidamo G2 커피가 홍국균 균사체에 의해 발효되기 전후를 비교함으로써 항산화활성의 증감 여부를 확인할 필요가 있을 것으로 사료된다.

3. 원두커피 열수추출물의 RAW 264.7 세포주를 이용한 항염증활성

염증(inflammation)은 외부 자극에 대한 생체조직의 방어반응의 하나로 대부분의 염증은 유해물질이나 화학적 자극에 의한 손상으로 일어나며(Cho 등 2009), 염증반응이 발생되면 여러 가지 염증매개인자(pro-inflammatory mediators)가 생성되어 이들로 인하여 임상적으로는 발적, 발열, 종창, 동통, 기능장애 등의 증상이 일어난다고 알려져 있다(Yun & Hoe 2008). 특히, 초기 면역반응에 중요한 역할을 하는 선천면역계 세포인 마크로파지가 이물질에 대응할 때 분비하는 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 산화질소(nitric oxide, NO) 등은 숙주에게 치명적인 결과를 초래할 수 있는 것으로 보고되고 있으며(Seymour

& Henderson 2001), 내독소로 잘 알려진 lipopolysaccharide (LPS)는 RAW 264.7 세포와 같은 마크로파지 또는 단구에서 앞에서 언급된 염증성 사이토카인과 NO 및 NO₂와 같은 산화질소의 생성을 증가시키는 것으로 알려져 있다(Moncada & Higgs 1991; Clària J 2003; Lowenstein & Snyder 1992).

따라서 본 연구에서는 MR-커피생두 발효물로부터 조제된 원두커피 열수추출물 30종의 대표적인 염증매개인자로 알려진 TNF- α 및 NO의 생성에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 먼저, RAW 264.7 세포에 대한 항염증 실험을 진행하기에 앞서 원두커피 열수추출물의 세포독성이 없는 농도조건을 확립하기 위해 동일 세포주에 대한 독성 여부를 CCK-8 kit를 사용하여 확인하였다. Table 2에 나타낸 바와 같이, MR-커피생두 발효물의 원두커피 열수추출물 30종은 모두 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 시료농도에서 saline 대조군의 1.15~1.25배로 RAW 264.7 세포에 대한 독성을 나타내지 않았으므로, LPS로 유도시킨 RAW 264.7 세포의 항염증 관련 실험은 시료농도 100 및 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도수준에서 확인하기로 하였다. TNF- α 억제활성의 경우(Fig. 3), 시료농도 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 모든 MR-커피생두 발효물로부터 조제된 원두커피 열수추출물에서 억제활성을 나타내지 못했지만($p>0.05$), 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 시료농도에서 모든 MR-커피생두 발효물의 원두커피 열수추출물들이 LPS 자극군에 비해 유의적인 억제효과를 나타내었으며($p<0.05$), 특히 26번 시료인 MR-Vietnam Robusta 커피생두 발효물의 원두커피 열수추출물이 가장 우수한 TNF- α 억제능을 보여주

Table 2. RAW 264.7 cell viability of hot-water extract of roasted coffee prepared from fermented green coffee bean with *Monascus ruber*

No. ¹⁾	Viability ²⁾	No.	Viability	No.	Viability
1	123.14 \pm 4.38 ³⁾	11	116.82 \pm 7.21	21	112.60 \pm 3.03
2	119.71 \pm 1.88	12	120.62 \pm 2.59	22	113.58 \pm 2.46
3	112.66 \pm 3.49	13	121.66 \pm 8.33	23	111.77 \pm 8.44
4	118.71 \pm 5.56	14	111.35 \pm 7.28	24	116.54 \pm 7.79
5	118.30 \pm 4.00	15	115.08 \pm 6.60	25	128.76 \pm 9.50
6	118.89 \pm 7.48	16	117.46 \pm 1.93	26	117.87 \pm 3.71
7	122.83 \pm 3.45	17	117.93 \pm 3.98	27	115.10 \pm 4.07
8	120.23 \pm 1.83	18	118.48 \pm 6.80	28	117.31 \pm 6.30
9	114.61 \pm 3.98	19	131.81 \pm 9.32	29	117.41 \pm 4.42
10	119.62 \pm 2.80	20	115.44 \pm 1.71	30	117.60 \pm 6.47
Saline control ⁴⁾			100 \pm 9.22		

RAW 264.7 cells (2×10^5 cells/well) were treated with 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of hot-water extracts for 24 hours. 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)] \times 100.

³⁾ Results are expressed as mean \pm S.D. of quadruplicate samples.

⁴⁾ Control is only saline without extract.

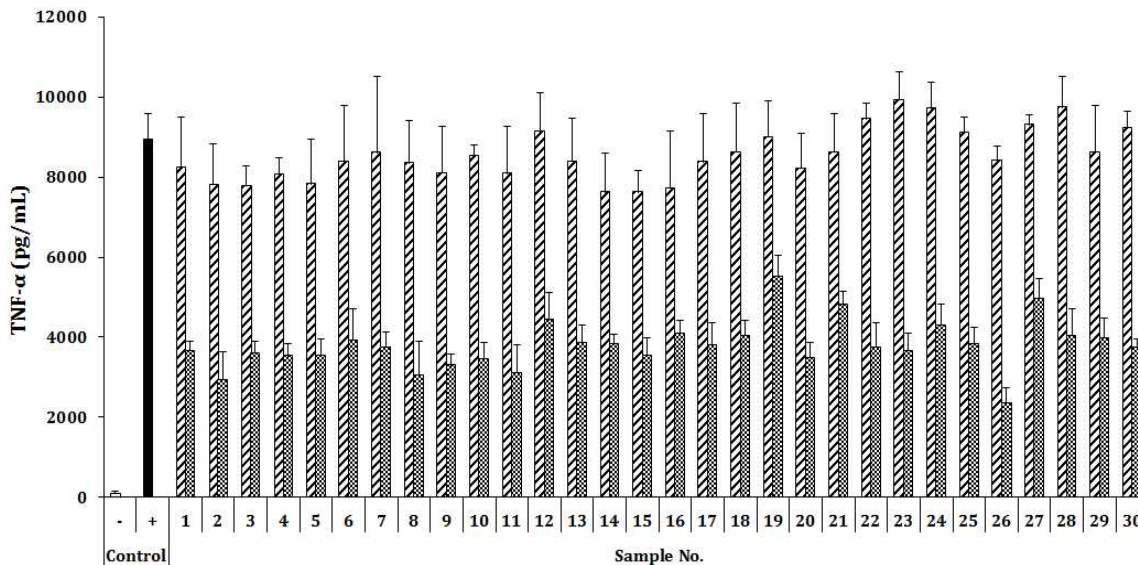


Fig. 3. Inhibitory effect of hot-water extract of roasted coffee prepared from fermented green coffee bean with *Monascus ruber* on the production of tumor necrosis factor (TNF)-α in LPS-stimulated RAW 264.7 cell line. RAW 264.7 cells (2×10^5 cells/well) were treated with 100 μg/mL (▨) or 1,000 μg/mL (▩) of hot-water extracts for 30 minutes prior to the addition of LPS (10 ng/mL), and then the cells were further incubated for 6 hours. □; only saline without sample, ■; only LPS (from *Escherichia coli*, 10 ng/mL). 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±S.D. of quadruplicate samples.

었고, 이는 LPS 자극군과 비교하여 73.7%의 억제효과를 나타내는 것으로 확인되었다. NO는 L-arginine을 기질로 하여 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 생성되는 무기 유리체로 LPS 처리에 의해 급격히 증가되는 염증 유발에 중요한 분자인데, 그람 음성균의 세포외막 구성성분인 lipopolysaccharide(LPS)에 의해 자극 받은 단구 또는 대식세포에서 inducible NOS(iNOS) 또는 cyclooxygenase 2(COX-2)와 같은 pro-inflammatory enzyme에 의해 과발현된 nitric oxide(NO)와 prostaglandin(PG)은 류마티스 관절염, 다발성 경화증, 알츠하이머 병, 패혈성 쇼크 등의 자가면역질환을 야기한다고 보고되고 있다(Cho 등 2009; Moncada & Higgs 1991). 30종의 MR-커피생두 발효물의 원두커피 열수추출물에 대한 NO 억제활성은 Fig. 4에 나타내었는데, 100 μg/mL의 시료농도에서 억제활성은 전반적으로 유사했으나(LPS 유도군의 11.3-17.9% 억제), 1,000 μg/mL의 시료농도에서는 20.9-36.1%로 억제활성이 모두 유의적으로 증가했으며, 특히 같은 품종이지만 다른 공급업체인 4번과 13번(MR-Indonesia Mandheling 커피생두로부터 조제된 원두커피 열수추출물)에서 억제활성이 우수한 것으로 나타났다(각각 33.3과 36.1% 억제).

4. 원두커피 열수추출물의 3T3-L1 지방전구세포를 이용한 지방생성 억제능

지방전구세포로부터 지방세포로의 분화는 뚜렷이 형태학적 또는 생화학적 변화를 보이는데, 3T3-L1 세포처럼 이미 확립된 지방전구세포나 지방조직 유래의 기질전구세포는 *in vitro*에서 지방세포 생성의 과정을 관찰하는데 널리 이용되어 왔다. 본 연구에서 3T3-L1 지방전구세포의 지방생성 억제에 미치는 영향을 Oil red O staining으로 비교한 결과, 분화를 유도시킨 대조군(MDI 분화배지에 saline 첨가군)에서 생성된 중성지방은 미분화 유도군(일반배지에 saline 첨가군)에 비해 7.2배의 지방생성량을 나타내었다. 30종의 MR-커피생두 발효물의 원두커피 열수추출물(MDI 분화배지에 추출물 첨가군)은 100 μg/mL의 시료농도에서 지방생성 억제능을 전혀 나타내지 못했으나(data not shown), 시료농도가 1,000 μg/mL로 증가함에 따라 분화 유도 대조군에 비해 15.9-63.4%의 수준으로 억제활성이 증가됨을 확인할 수 있었다. 특히 26번 시료인 MR-Vietnam Robusta 커피생두 발효물로부터 조제된 원두커피 열수추출물의 경우 분화유도군에 비해 63.5%의 지방생성이 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 5). 이러한 결과는 로부스타종이 아라비카종에 비해 높게 함유하고 있는 항비만 성분인 caffeine 또는 chlorogenic acid(Cho 등 2010; Hsu 등 2006)에 따른 결과일 수도 있으나, 홍국균의 발효과정을 통해 강력한 콜레스테롤 합성 억제력인 가지는 모나콜린류(Endo A 1980; Endo 등 1985) 등 2차 대사산물(secondary metabolite)의 생산

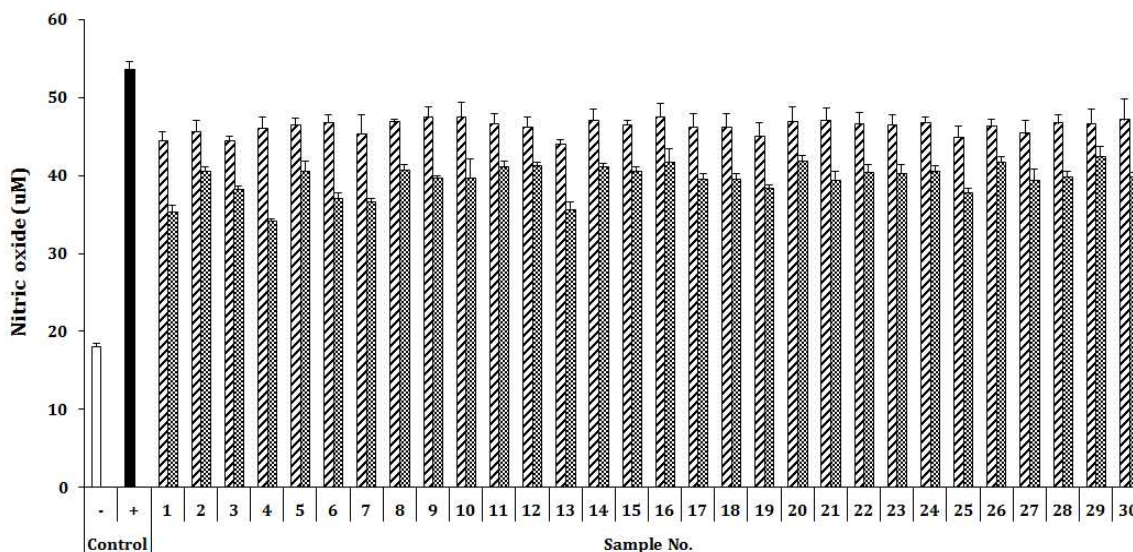


Fig. 4. Inhibitory effect of hot-water extract of roasted coffee prepared from fermented green coffee bean with *Monascus ruber* on the production of nitric oxide (NO) in LPS-stimulated RAW 264.7 cell line. RAW 264.7 cells (2×10^5 cells/well) were treated with 100 $\mu\text{g/mL}$ (▨) or 1,000 $\mu\text{g/mL}$ (▩) 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 hours. □; only saline without sample, ■; only LPS (from *Escherichia coli*, 1 $\mu\text{g/mL}$). 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 S.D. of quadruplicate samples.

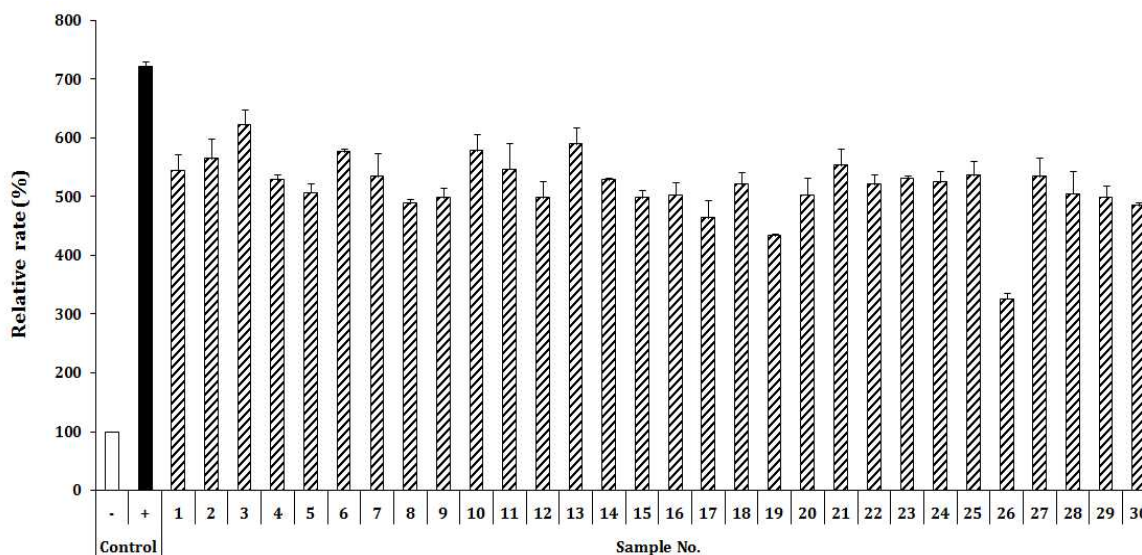


Fig. 5. Anti-adipogenesis effect of hot-water extract of roasted coffee prepared from fermented green coffee bean with *Monascus ruber* on 3T3-L1 pre-adipose cell line. 3T3-L1 pre-adipose (5×10^4 cells/well) were treated 10% BS/DMEM in humidified 5%-CO₂ incubator. At confluence (day 0), the medium was changed to DMEM containing 10% FBS, and differentiation was induced with 5 $\mu\text{g/mL}$ INS, 1 μM DEX and 517 nM IBMX. The medium was discarded and maturation medium (DMEM containing 10% FBS with 5 $\mu\text{g/mL}$ 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 $\mu\text{g/mL}$ of extracts treated when day 0 and 3 on differentiation. Extract name of number refer to Table 1. Results are expressed as mean \pm S.D. of quadruplicate samples.

에 기인할 수도 있을 것이라고 사료된다. 더욱이 이전 연구를 통해 저자들은 Indonesia Mandheling 커피가 홍국균 균사체와의 발효과정을 통해 caffeine의 함량은 유지한 채 chlorogenic acid의 함량을 유의적으로 증가시킨 결과를 보고하여 홍국균에 의한 커피의 생물학적 전환(biotransformation) 가능성을 제기하였었다(Shin 등 2013).

본 연구는 이미 다양한 생리활성의 증가가 확인된 홍국균 (*M. ruber*) 균사체-커피생두 발효물의 원두커피 결과를 바탕으로, 다양한 산지별 및 품종별 커피로 확대하여 최적의 생리활성 증진을 갖는 커피품종을 선정함으로써 향후 산업적으로 이를 활용하고자 하였다. 결론적으로, MR-Indonesia Mandheling 커피생두 발효물의 원두커피는 수율과 NO 생성을 억제하는 항염증 활성을, MR-Ethiopia Sidamo G2 커피생두 발효물의 원두커피는 항산화활성을, 그리고 MR-Vietnam Robusta 커피생두 발효물로부터 조제된 원두커피는 항산화활성과 함께 항지질대사 활성이 각각 우수한 것으로 나타났다. 향후 이들 각각의 홍국균-커피생두 발효물의 원두커피에서의 생리활성 증진이 배양된 홍국균 균사체의 단순한 효과가 아닌 발효과정의 의해 균사체의 생물학적 전환이 유도되었음을 명백히 밝히기 위해서 다양한 생리활성 성분의 분석과 함께 활성成分的 정제 및 활성성분의 구조동정 등을 진행할 예정이다.

요약 및 결론

원두커피의 다양한 생리활성을 증진시키기 위하여 홍국균 (*Monascus ruber*, MR) 균사체와 30여종의 산지별 및 품종별 커피생두를 고체발효하여 MR-커피생두 발효물로 조제하였다. 건조시킨 30종의 산지별 및 품종별 MR-커피생두 발효물은 중배전 조건에서 로스팅하여 원두커피로 조제한 후, 열수추출을 통해 MR-커피생두 발효물의 원두커피 열수추출물로 각각 조제하였다. 조제한 원두커피 열수추출물 중, MR-Indonesia Mandheling 커피생두 발효물로부터 조제된 원두커피 열수추출물은 가장 우수한 추출수율을 나타내었으며(15.5%), MR-Ethiopia Sidamo G2 커피생두 발효물의 원두커피 열수추출물은 유의적으로 가장 우수한 총 폴리페놀 함량(3.08 mg GAE/100 mg) 및 ABTS 라디칼 소거능(25.41 mg AEAC/100 mg)을 나타내었다. 한편, MR-Vietnam Robusta 커피생두 발효물의 원두커피 열수추출물은 LPS로 유도한 RAW 264.7 세포의 TNF- α 생성을 유의적으로 억제할 뿐 아니라(LPS 유도군의 73.7% 억제), 3T3-L1 지방전구세포의 지방생성능을 효과적으로 억제하는 항지질대사 활성(분화 유도군의 63.5% 억제)을 나타내었다. 결론적으로, 이러한 결과를 통해 *Monascus ruber* 균사체의 고체배양을 이용한 Ethiopia Sidamo G2와 Vietnam Robusta 커피생두 발효물로부터 조제된 원두커피는 다른 산지 및 품종보

다도 기능성 커피음료로의 활용에 좋은 소재가 될 것으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 2015년 한국교통대학교 지원을 받아 수행하였으므로 이에 감사드립니다.

References

- Cano-Maquina A, Tarfin JJ, Cano A. 2013. The impact of coffee on health. *Maturitas* 72:7-21
- Cho AS, Jeon SM, Kim MJ, Yeo JY, 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
- Cho W, Nam JW, Kang HI, Windono T, Seo EK, Lee KT. 2009. Zedoaronidol isolated from the rhizoma of *Curcuma heyneana* is involved in the inhibition of iNOS, COX-2 and pro-inflammatory cytokines via the down regulation of NF- κ B pathway in LPS-stimulated murine macrophages. *Int Immunopharmacol* 9:1049-1057
- 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
- Choi Y, Lee SM, Chun J, Lee HB, Lee J. 2006. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chem* 99:381-387
- 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
- Clària J. 2003. Cyclooxygenase-2 biology. *Curr Pharm Des* 9: 2177-2190
- Clifford MN, Jarvis T. 1988. The chlorogenic acids content of green robusta coffee beans as a possible index of geographic origin. *Food Chem* 29:291-298
- Endo A, Hasumi K, Negishi S. 1985. Monacolin J and L. New inhibitors of cholesterol biosynthesis produced by *Monascus ruber*. *J Antibiot* 38:420-422
- Endo A. 1980. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent that specifically inhibits 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme

- A reductase. *J Antibiot* 33:334-336
- 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
- Fox JB. 1979. Kinetics and mechanisms of the Griess reaction. *Anal Chem* 51:1493-1502
- Hečimović I, Belščak-Cvitanović A, Horžić D, Komes D. 2011. Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. *Food Chem* 129:991-1000
- Hsu CL, Hung SL, Yen GC. 2006. Inhibitory effect of phenolic acids on the proliferation of 3T3-L1 preadipocytes in relation to their antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 54:4191-4197
- 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
- Huang CF, Li TC, Lin CC, Liu CS, Shih HC, Lai MM. 2007. Efficacy of *Monascus purpureus* Went rice on lowering lipid ratios in hypercholesterolemic patients. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 4:438-440
- 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
- Jeong EJ, Kim KP, Bang BH. 2013. Quality characteristics of cookies added with Hongkuk powder. *Korean J Food Nutr* 26:177-183
- Kim EY, Rhyu MR. 2000. The chemical properties of *Doenjang* prepared by *Monascus koji*. *Korean J Food Sci Technol* 32:1114-1121
- Kim H, Yu KW, Lee JS, Baek GH, Shin JY. 2014. The pharmacological activity of coffee fermented using *Monascus purpureus* mycelium solid-state culture depends on the cultivation area and green coffees variety. *Korean J Food Sci Technol* 46:79-86
- Kim SH, Park BW, Kim JH. 2015. Quality characteristics of *Tarakjuk* (milk porridge) prepared with red yeast-rice. *Korean J Food Nutr* 28:313-319
- 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
- Lowenstein CJ, Snyder SH. 1992. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell* 70:705-707
- Ma J, Li Y, Ye Q, Li J, Hua Y, Ju D, Zhang D, Cooper R, Chang M. 2000. Constituents of red yeast rice, a traditional Chinese food and medicine. *J Agric Food Chem* 48:5220-5225
- Mackay DC, Rollins JW. 1989. Caffeine and caffeinism. *J R Nav Med Serv* 75:65-67
- McMullen MK, Whitehouse JM, Shine G, Whitton PA, Towell A. 2011. The immediate and short-term chemosensory impacts of coffee and caffeine on cardiovascular activity. *Food Funct* 2:547-554
- Moncada S, Higgs EA. 1991. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 21:361-374
- Potakova P. 2013. *Monascus* secondary metabolites: production and biological activity. *J Ind Microbial Biotechnol* 40:169-181
- Pyo YH, Lee TC. 2007. The potential antioxidant capacity and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of *Monascus*-fermented soybean extracts: evaluation of *Monascus*-fermented soybean extracts as multifunctional food additives. *J Food Sci* 72:S218-223
- Saab S, Mallam D, Cox GA 2nd, Tong MJ. 2014. Impact of coffee on liver disease: a systematic review. *Liver Int* 34:495-504
- 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
- Seymour RM, Henderson B. 2001. Pro-inflammatory-anti-inflammatory cytokine dynamics mediated by cytokine-receptor dynamics in monocytes. *IMA J Math Appl Med Biol* 18:159-192
- Shin JY, Kim H, Kim DG, Baek GH, Jeong HS, Yu KW. 2013. Pharmacological activities of coffee roasted from fermented green coffee beans with fungal mycelia in solid-state culture. *J Food Sci Nutr* 42:487-496
- Trugo LC, Macrae R. 1984a. A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. *Food Chem* 15:219-229
- Trugo LC, Macrae R. 1984b. Chlorogenic acid composition of instant coffee. *Analyst* 109:263-266
- Tsukahara M, Shinzato N, Tamaki Y, Namihira T, Matsui T. 2009. Red yeast rice fermentation by selected *Monascus* sp. with deep-red color, lovastatin production but no citrinin,

- and effect of temperature-shift cultivation on lovastatin production. *Appl Biochem Biotechnol* 158:476-482
- Velioglu YS, Mazza G, Cao L, Oomah BD. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruit, vegetables, and grain products. *J Agric Food Chem* 46:4113-4117
- Wayne TF Jr. 2014. Coffee: A selected overview of beneficial or harmful effects on the cardiovascular system? *Curr Vasc Pharmacol* 13:637-648
- Yen WJ, Wang BS, Chang LW, Duh PD. 2005. Antioxidant properties of roasted coffee residues. *J Agric Food Chem* 53:2658-2663
- Yun HJ, Hoe SK. 2008. Anti-inflammatory effect of Injinho-tang in RAW 264.7 cells. *Kor J Herbol* 23:169-178
-
- Received 23 December, 2015
Revised 29 December, 2015
Accepted 31 January, 2016