

## 커피와 작두콩 추출물의 혼합에 따른 항염증 효과

배훈천<sup>1</sup> · 박정업<sup>2</sup> · 문제학<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>전남대학교 농업생명과학대학 식품공학과, <sup>2</sup>전남대학교 약학대학

### Anti-inflammatory effects of a mixture of coffee and sword bean extracts

Hun Cheon Bae<sup>1</sup>, Jung Up Park<sup>2</sup>, and Jae-Hak Moon<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science & Technology, College of Agriculture and Life Sciences, Chonnam National University

<sup>2</sup>College of Pharmacy and Research Institute of Drug Development, Chonnam National University

**Abstract** Coffee is one of the most widely consumed beverages in the world, and sword bean (*Canavalia gladiata*, SB) reportedly possesses various biological activities. Therefore, in this study, to reduce caffeine intake and improve coffee function, SB was selected as a supplementary material for blending coffee. The antioxidant and anti-inflammatory activities of coffee with the SB extract at concentrations of 0.1-0.5% (v/v) were evaluated using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and RAW 264.7 cells, respectively. The DPPH radical-scavenging activity of SB-treated coffee depended on the concentration of the SB extract. In the cell culture experiment, cytotoxicity was not observed at any SB concentration. In addition, the inducible nitric oxide synthase protein expression as well as the increases in nitric oxide and interleukin-6 expression were effectively inhibited by SB addition to the coffee. These results indicate that SB might be useful as a supplementary ingredient to enhance the caffeinated drink functions.

**Keywords:** coffee, sword bean, anti-inflammatory, antioxidative activities, blending coffee

## 서 론

국내 커피 시장은 최근 수년 동안 급격한 성장세를 보여왔다. 관세청 수출입 무역통계에 의하면, 국내 커피류 수입량은 2008년에 10만 2천 톤으로 2억 9천만 달러이던 것이 2018년에는 15만 8천 톤으로 6억 4천만 달러에 달해 지난 10년간 50% 이상 증가한 것으로 집계되었다(Korea customs service, 2019). 또한, 커피의 품목별 국내 판매액 변동 현황을 살펴보면 2008년에 1조 1천억 원이었던 것이 2017년에는 4조 3천억 원 규모로 성장하였으며, 볶은 커피 품목은 2008년에 434억 원 규모에 불과하였던 것이 2017년에는 5357억 원 대로 집계되어 10배 이상의 성장률을 보였다(KOSIS, 2019). 그리고 원두커피가 인스턴트커피를 빠른 속도로 대체하면서 전체 커피 시장의 규모가 확대되고 있는데, 이는 커피의 효능이 널리 알려지면서 수요가 증가했기 때문으로 판단된다.

WHO 산하 국제암연구소(IARC)에서는 1990년에 커피가 방광암을 유발할 가능성이 있음을 제시하면서 커피를 ‘인체 암 유발 가능성이 있는 물질(possibly carcinogenic to human)’인 ‘2B군’으로 분류한 바 있다. 그러나 2016년에는 커피와 방광암 간의 상관관계가 입증되지 않았으며 커피를 발암물질 목록에서 제외한다고 발표하였다(Loomis 등, 2016). 최근에는 커피가 심혈관 질

환과 암에서 비롯된 사망률을 낮추며(Lopez-Garcia 등, 2009), 하루 4잔의 커피 소비는 폐경 후 발암 위험도를 감소시키고(Lafranchi 등, 2018), 커피가 간암과 만성간질환의 위험성 또한 낮춘다는 연구 결과(Loftfield 등, 2020)들이 보고되었다. 또한 커피가 신체 활동 시 신진대사를 높여 체중감소에 도움을 줄 뿐만 아니라(EFSA와 NDA, 2015) 커피의 음용 습관이 삶의 질과 정신건강에 유익한 효과가 있는 것으로 분석되었다(Lopez-Garcia 등, 2014).

작두콩(*Canavalia gladiata*)은 콩과의 한해살이 덩굴성 식물로서 6~7월에 꽃이 피며, 8~10월에 꼬투리를 맺고 늦가을에 열매가 익는다. 작두콩은 식용하는 콩 중에서 크기가 가장 크며, 콩을 포함하고 있는 콩각지의 모양이 작두를 닮았다고 하여 작두콩 혹은 도두(刀豆)라 불리기도 한다(Cho 등, 1999). 민간요법에서는 축농증, 치질, 종기 등의 화농성 염증을 다스리는 데 사용되었으며(Chang 등, 2011), 항암(Jeon 등, 2005)과 항당뇨(Nimenibo-Uadia, 2003)에 효능이 있다고 보고된 바 있다. 작두콩에는 많은 콩과식물에 함유되어 있는 haemagglutinin과 같은 적혈구 응집 인자(가열에 의해 변성되어 독성 없음)와 canavanine 등의 비단백 아미노산 성분이 함유되어 있으며(Ekanayake 등, 2007), 작두콩 미성숙두로부터 새로운 gibberellin인 canavalia gibberellin I과 II가 분리되었음이 보고되었다(Tamura 등, 1967). 그리고 작두콩 추출물이 구강 세균에 미치는 항균효과와 구강 상피세포에 미치는 세포독성 효과를 평가한 결과, 비알콜성 구강 세정제로서의 유용성 또한 보고된 바 있다(Nakatsuka 등, 2014). 뿐만 아니라 작두콩의 함유 성분은 일반 콩과 다른 성분학적 조성을 지니며 항산화 활성 또한 매우 높음이 확인된 바 있다(Kim 등, 2013). 작두콩의 주된 항산화 화합물은 gallic acid 유도체로 gallic acid와 그 methyl ester에 더하여 당과 gallic acid 2분자 및

\*Corresponding author: Jae-Hak Moon, Department of Food Science & Technology, College of Agriculture and Life Sciences, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea  
Tel: +82-62-530-2141  
E-mail: nutrmoon@jnu.ac.kr  
Received February 21, 2020; revised April 13, 2020;  
accepted April 13, 2020

3분자가 에스터 결합을 하고 있는 일련의 gallic acid 유도체들의 존재가 확인되었다(Kim 등, 2013; Pandurangan 등, 2015). 이러한 gallic acid와 gallic acid 유도체들은 강력한 항산화제이면서 항암, 항염증, 항균 등의 생리활성 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Negi 등, 2005).

커피의 가장 대표적인 성분 중의 하나로 카페인을 들 수 있다(Nieber, 2017). 커피를 마신 후 카페인에 반응하는 정도는 사람에 따라 매우 다양하게 나타나는데, 이는 성별과 유전적인 차이, 순환기계 스테로이드 호르몬 등의 변화가 매개하는 카페인 민감성의 차이에서 비롯되는 것으로 해석되고 있다(Wootton-Beard와 Ryan, 2011; Nieber, 2017). 따라서 커피를 균형잡힌 건강식단의 한 부분으로 충분히 즐기기 위해서는 카페인 섭취량을 줄이고 유용한 생리활성 화합물의 섭취량을 늘리는 음료의 개발이 필요하다. 그 효과적인 방법중의 하나로 본 연구에서는 커피와 작두콩 추출물을 혼합하는 방법을 고안하였으며, 이에 따른 효과를 평가하기 위해 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거능에 대하여 세포실험을 통한 항염증 효과를 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

본 실험에는 2018년에 수확된 브라질산 아라비카종 커피생두(Coffea arabica Green bean Brazil Red Bourbon NY2 Scr. 16 Cerrado Pulped Natural Veloso Estate, GSC International Co. Seoul, Korea)를 사용하였다. 작두콩은 2016년에 전남 화순에서 수확한 적색 콩으로 화순군 작두콩 생산자 조합(Sword Red Bean, Hsfarm, Jeonam, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

Gallic acid와 chlorogenic acid 및 caffeine은 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, acetonitrile (MeCN)과 methanol (MeOH)은 HPLC 등급으로 Fisher Scientific Korea Ltd. (Seoul, Korea)에서 구입하였으며, acetic acid (AcOH)는 Sigma-Aldrich Chemical Co. 제품을 사용하였다.

### 커피와 작두콩 추출물 및 그들의 혼합액 제조

커피는 생두 1 kg을 210°C에서 12분 40초간, 작두콩은 생두 1 kg을 170°C에서 15분간 반열풍식 로스터(THCR-01, Taehwan Auto Co., Gyeonggi, Korea)를 이용하여 각각 로스팅하였다. 볶은 커피는 커피밀(R-220, Fuji royal Co., Tokyo, Japan)을, 작두콩은 분쇄기(SP-7405S, Comac Co., Seoul, Korea)를 이용하여 각각 분쇄하였다. 분쇄한 각각의 분말(20 g)에 10배량의 정제수(200 mL)를 첨가하고 homogenizer (ULTRA-TURRAX T50, IKA, Seoul, Korea)를 이용하여 균질화시켰다. 균질화된 각 시료를 37°C에서 30분 간격으로 5분씩 5회에 걸쳐 sonication을 가하면서 추출한 후, 원심분리(5000 RPM, 4°C, 10 min)를 행하여 얻어진 상층액을 진공 여과(No. 2 Whatman, Maidstone, UK)하여 커피 추출물과 작두콩 추출물을 각각 제조하였다. 그리고 이들 각 추출액을 최종적으로 200 mL가 되도록 정제수를 첨가하여 정용하였다. 정용한 추출 용액은 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였으며, 실험 직전에 해동하여 커피 추출 용액과 작두콩 추출 용액 각각을 100:0, 100:100, 100:200, 100:300, 100:400 및 100:500 (mL/mL)가 되도록 혼합한 후, 증류수를 가하여 각 시료의 용액이 1 mL가 되도록 한 다음, 증류수를 이용하여 각각 10배 희석하여 실험에 이용하였다. 즉, 제조된 시료들 중 커피 추출물의 최종 농도는 모든 시료에서 0.1%, 그리고 작두콩 추출물의 최종 농도는

각각 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 및 0.5%였다.

### High Performance Liquid Chromatography (HPLC) 분석

커피와 작두콩 혼합 추출물의 지표성분으로 gallic acid와 chlorogenic acid 및 caffeine을 사용하였다. 이들 표준품 화합물은 1.0 mg/mL의 MeOH에 용해시켜 4°C에서 보관하였으며, 이들 표준품 화합물 3종을 다음과 같은 분석조건에서 HPLC를 이용하여 동시에 분석하였다. 즉, HPLC 컬럼은 Shim-pack CLC-ODS-(M) (4.6×250 mm, Shimadzu, Kyoto, Japan)을 사용하였다. 컬럼 온도는 실온이었으며, 유속은 분당 1.0 mL였다. 이동상은 2% acetic acid 함유 수용액을 A 용매로, MeCN을 B 용매로 하고, 용매 B의 비율을 0%에서 100%가 되도록 35분 동안 gradient 방법에 따라 용출시켰다. 검출기는 SPD-M20A (Shimadzu)를 이용하여 254 nm에서 분석하였다.

### 세포 배양

RAW 264.7 대식세포는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. RAW 264.7 세포주는 1% penicillin-streptomycin (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)과 10% fetal bovine serum (FBS, ThermoFisher Scientific)이 첨가된 Dulbecco Modified Eagle's medium (DMEM, Welgene, Daegu, Korea) 배지를 사용하였으며, 37°C의 인큐베이터에서 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 배양하였다.

### DPPH Radical-scavenging 활성 평가

DPPH radical-scavenging 활성은 기존의 방법을 참고하여 평가하였다(Park 등, 2016). 즉, MeOH에 희석한 추출물과 표준시료를 96 well plate (SPL life sciences Co., Gyeonggi, Korea)에서 0.2 mM DPPH (Sigma-Aldrich) 용액과 1:1 (v/v)로 혼합하고 차광하여 실온에서 30분간 반응시킨 후, ELISA microplate reader (ELx808 ELISA, Bio Teck Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구로는 vitamin C (Vit C, Sigma-Aldrich)를 사용하였으며, DPPH radical-scavenging 활성의 정도는 다음과 같이 계산하였다.

Antioxidant activity (%)

$$= [(Control\text{-}sample\text{의 흡광도}) / Control] \times 100$$

### 세포독성 평가

커피와 작두콩 혼합 추출물의 세포독성을 평가하기 위해 RAW 264.7 세포주를 96 well plate에 1.0×10<sup>4</sup> cells/well 농도로 동일하게 분주하고 24시간 동안 안정화한 후에 각 well에 혼합 추출물을 농도별로 처리하여 이를 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양액에 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS, Promega, WI, USA) 시약을 처리한 후, 4시간 뒤에 490 nm에서 ELISA microplate reader (ELx808)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

### Nitric Oxide (NO) 측정

NO는 Park 등 (2016)의 실험방법에 따라 측정하였다. 즉, 커피와 작두콩 혼합 추출물의 NO 생성 저해 효능을 평가하기 위하여 RAW 264.7 세포를 48-well plate (SPL life sciences Co.)에 1×10<sup>5</sup> cells/well이 되도록 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 배양액에 작두콩 추출물을 농도별(0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5%)로 전처리하여 2시간 동안 배양한 후, 각 well에 LPS (Sigma-Aldrich)

를 500 ng/mL 농도로 처리하고 24시간 배양하였다. 배양 후에는 배양 상층액 100  $\mu$ L를 취하여 동량의 Griess 시약[1% sulfanilamide in 2.5%  $H_3PO_4$ , 0.1% *N*-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride] (Sigma-Aldrich)을 첨가하고, 10분간 방치한 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 nitrite의 농도는 LPS를 처리한 대조군과 LPS를 처리하지 않은 대조군에서 생성된 nitrite 양의 차이를 기준으로 각 시료의 NO 생성 저해 활성을 확인하였다.

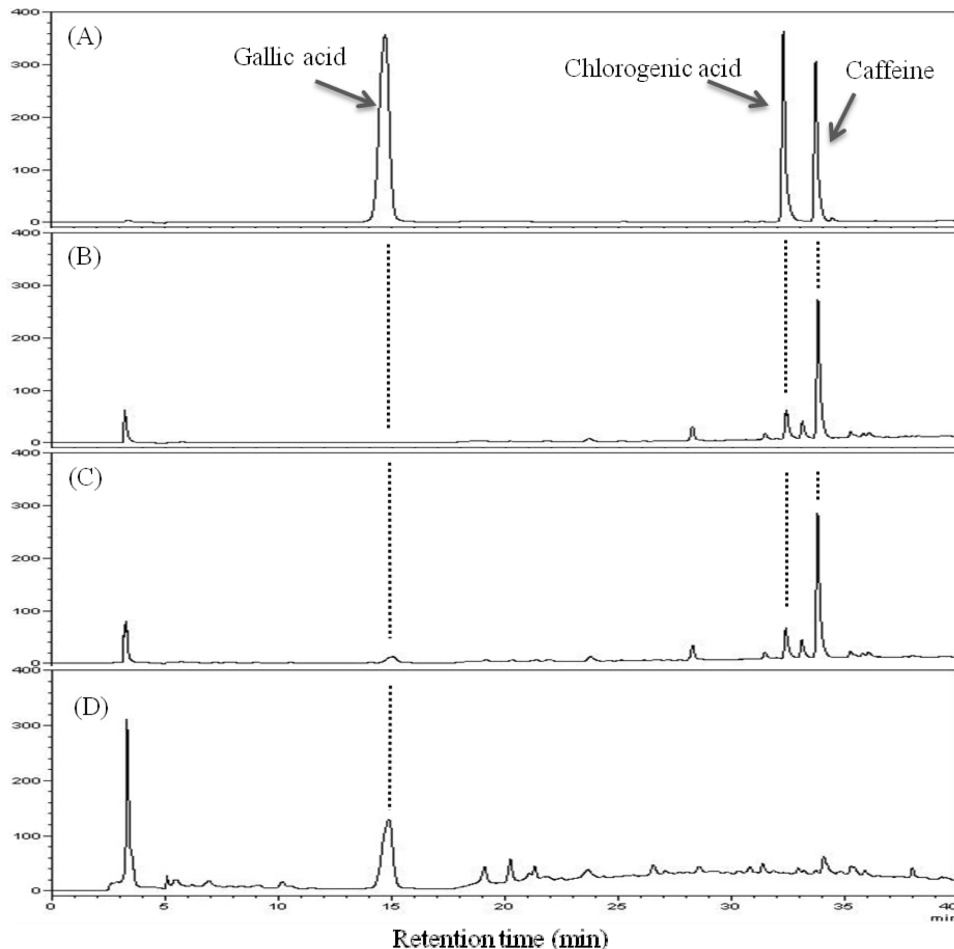
#### 염증성 Cytokines 측정

RAW 264.7 세포를 48-well plates에  $1 \times 10^5$  cells/well이 되도록 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 배양액에 작두콩 추출물을 농도별(0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5%)로 전처리하여 2시간 동안 배양한 후, 각 well에 LPS를 500 ng/mL 농도로 처리하고 24시간 배양하였다. 배양이 끝난 plate를 1500 rpm, 15분 동안 원심분리한 후, 상층액만 취하여 IL-6 (Biolegend, CA, USA)와 TNF- $\alpha$  (R&D system, Minneapolis, MN, USA)를 측정하였다. 이는 제조사의 프로토콜에 따라 상온에서 진행하였고, 흡광도는 ELISA microplate reader를 사용하여 450 nm에서 30분 이내에 측정하였다.

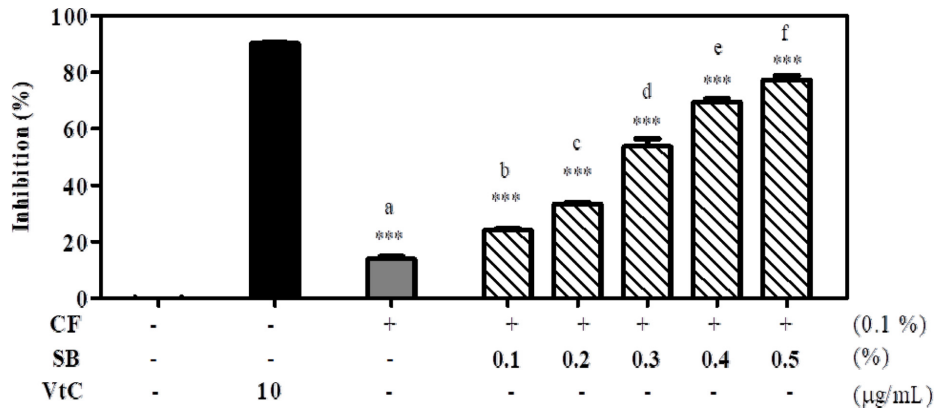
#### iNOS 단백질 발현량 측정

Western blot analysis를 이용한 iNOS 단백질의 발현량 측정은

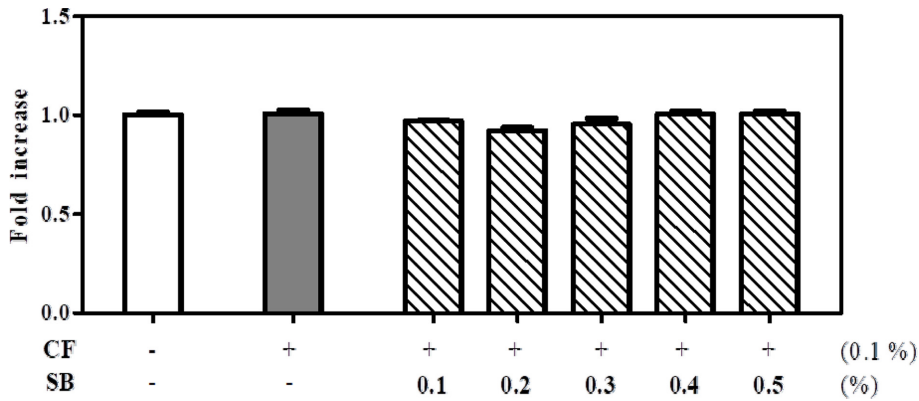
Park 등(2016)의 방법을 참고하여 행하였다. 즉, RAW 264.7 세포를 6-well plate (SPL life sciences Co.)에  $1 \times 10^6$  cells/well이 되도록 분주하고, 37°C의 5%  $CO_2$  배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 커피와 작두콩 혼합 추출물 또는 양성 대조군인 Celecoxib (10  $\mu$ M) (Sigma-Aldrich)를 2시간 동안 전처리하고 LPS (200 ng/mL)를 가하여 24시간 동안 배양하였다. 작두콩 커피 추출물과 LPS가 처리된 RAW 264.7 세포에서 lysates를 추출하기 위해서 세포를 cold PBS로 1회 세척한 후, cell lysates는 cell lysis buffer (Promega)를 처리하여 30분 동안 4°C에서 배양하고, 13,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 후 상층액을 취하여 단백질을 추출하였다. 동량의 cell lysates를 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리하였다. 분리된 단백질을 polyvinylidene fluoride membranes (Millipore, Bedford, MA, USA)를 이용하여 옮긴 후, 5% skim milk에서 1시간 동안 blocking하였다. 1차 항체인 iNOS (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)는 1:1000으로 희석하여 4°C에서 16시간 반응시켰다. TBS/T (0.05% tween 20 in TBS)로 15분간 4회 세척한 후, horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit 2차 항체를 1:5000으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. Western bright™ (Advansta Corp., CA, USA)을 이용하여 단백질을 검출하였다. 단백질의 밴드는 C300 (Azure Biosystems Inc., Dublin, CA, USA)를 이용하여 관찰하였다.



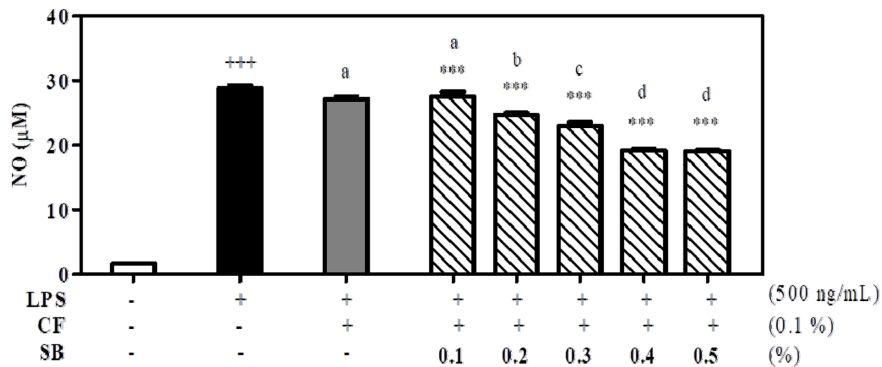
**Fig. 1.** HPLC chromatograms of marker compounds in the mixture of coffee (CF) and sword bean (SB). A, standard solution; B, coffee extract (CF); C, CF/SB=1:1 (v/v); D, SB extract.



**Fig. 2. DPPH radical-scavenging activity of the mixtures of coffee (CF) and sword bean (SB).** The ratio of CF and SB was 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, and 1:5 (v/v). The mixture of CF and SB dissolved in methanol was mixed with DPPH (0.2 mM in methanol) in a 96-well plate for 30 min, and the absorbance was measured at 470 nm using a microplate reader. VtC (vitamin C, 10 µg/mL) was used as the positive control. \**p*<0.05 and \*\*\**p*<0.001 compared to the untreated group. Different letters mean significant differences at *p*<0.05 by Duncan’s multiple range test.



**Fig. 3. Effect of the mixture of coffee (CF) and sword bean (SB) on cell viability in RAW 264.7 cells.** RAW 264.7 cells were seeded into 96-well plate overnight and then were treated with CF and mixture of CF and SB (1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, v/v) for 24 h. The cell viability was tested by MTS assays. The data are representative of three independent experiments and expressed as mean±SEM.

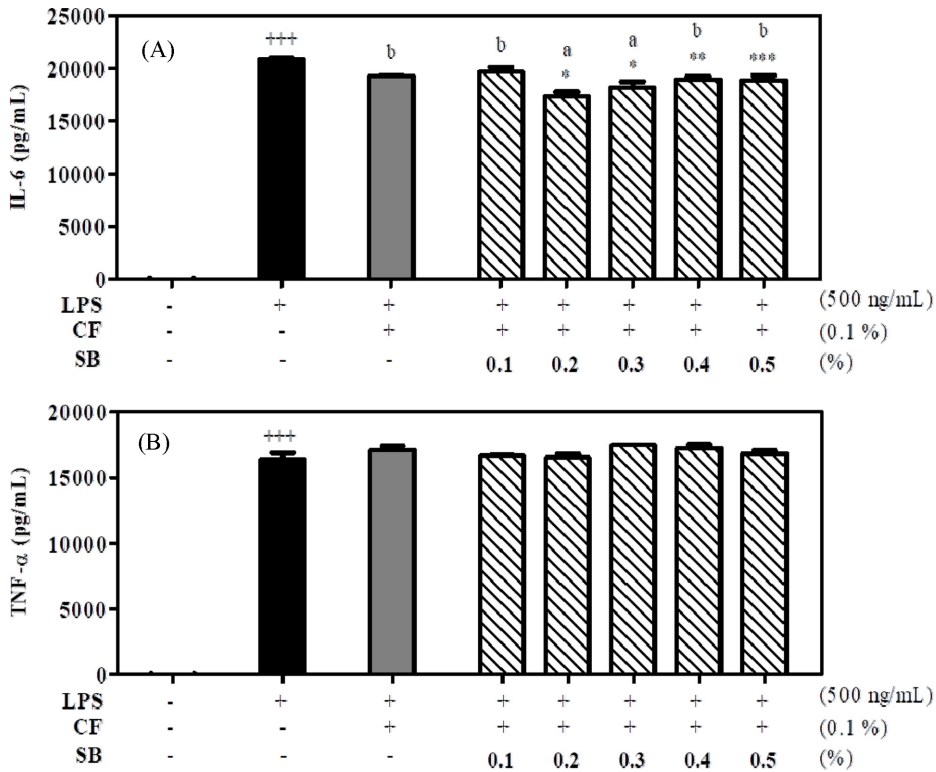


**Fig. 4. Effects of the mixture of coffee (CF) and sword bean (SB) on NO production in LPS-activated RAW 264.7 cells.** NO synthesis were measured in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pretreated with the mixture of CF and SB for 2 h and then incubated with LPS (500 ng/mL) for 24 h. The production of NO in the supernatant was detected by Griess reagent. +++*p*<0.001 in comparison with the untreated group. \*\*\**p*<0.001 correlated with the LPS-treated group. Different letters above a bar are significantly different at *p*<0.05 by Duncan’s multiple range test.

**통계분석**

모든 실험은 3회 반복 실시하였으며, 실험결과에 대한 통계는 Graph Pad Prism ver. 5.01 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) 프로그램을 이용하여 일원배치분산분석(one-way ANOVA)과 Tukey’s post hoc test를 실시하여 *p*<0.05 유의 수준

에서 평균(mean)±표준오차(standard error of the mean, SEM)로 통계처리하였다. 농도의존성에 대한 비교가 필요한 부분에 대해서는 IBM SPSS Statistics 20 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)을 사용하여 평균비교 일원배치분산분석과 Duncan 사후검정을 통해 *p*<0.05 수준에서 통계처리하여 추가로 표시하였다.



**Fig. 5. Effects of the mixture of coffee (CF) and sword bean (SB) on production of inflammatory mediators in LPS-activated RAW 264.7 cells.** RAW 264.7 cells were pretreated with the mixture of CF and SB for 2 h and then incubated with LPS (500 ng/mL) for 24 h. The inflammatory mediators were measured in the cell supernatants by ELISA. A, LPS-induced production of IL-6. B, TNF- $\alpha$  production in LPS-induced RAW 264.7 cells. +++ $p$ <0.001 in comparison with the untreated group. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 and \*\*\* $p$ <0.001 correlated with the LPS-treated group. Different letters mean significant differences at  $p$ <0.05 by Duncan's multiple range test.

## 결과 및 고찰

### 작두콩 첨가 커피 추출물의 지표 성분 분석

분석대상 화합물 3종을 혼합하여 HPLC 분석을 행한 결과, gallic acid는  $t_R$  14.98 min에서, chlorogenic acid는  $t_R$  32.31 min에서, 그리고 caffeine은  $t_R$  33.89 min에서 각각 검출되었다(Fig. 1A). Fig. 1에 제시한 바와 같이 커피와 작두콩 혼합 추출물의 HPLC chromatogram 상에서 표준품의 화합물이 검출되었던  $t_R$ 과 동일한 용출 위치에서 각각의 peak들이 관찰되었다. Gallic acid는 커피 추출물에서는 검출되지 않았고(Fig. 1B), 커피와 작두콩 혼합 추출물(Fig. 1C) 및 작두콩 추출물(Fig. 1D)에서 그 peak를 확인할 수 있었다. Chlorogenic acid와 caffeine은 커피 및 커피와 작두콩 추출물이 혼합된 시료에서만 검출되었으며(Fig. 1B, 1C), 작두콩 추출물(Fig. 1D)에서는 그들의 peak가 검출되지 않았다.

### DPPH Radical-scavenging 활성

활성산소는 염증 사이토카인을 포함한 다양한 염증 관련 인자들의 발현에 영향을 미침으로써 염증을 유발한다. 최근의 많은 연구 결과들로부터 활성산소가 만성 염증과 암 발생을 매개하는 것으로 보고되고 있다(Bystrom 등, 2014). 커피와 작두콩 추출물의 항산화 활성을 비교하기 위해 DPPH radical-scavenging 활성을 측정된 결과, 작두콩 무첨가군이 14%, 작두콩 0.1% 첨가군이 24%, 작두콩 0.2% 첨가군이 33%, 작두콩 0.3% 첨가군이 54%, 작두콩 0.4% 첨가군이 69%, 그리고 작두콩 0.5% 첨가군이 77%로 측정되어 DPPH radical-scavenging 활성은 작두콩 추출물의 농도에 의존적으로 증가함을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

### 작두콩 첨가 커피의 세포독성 평가

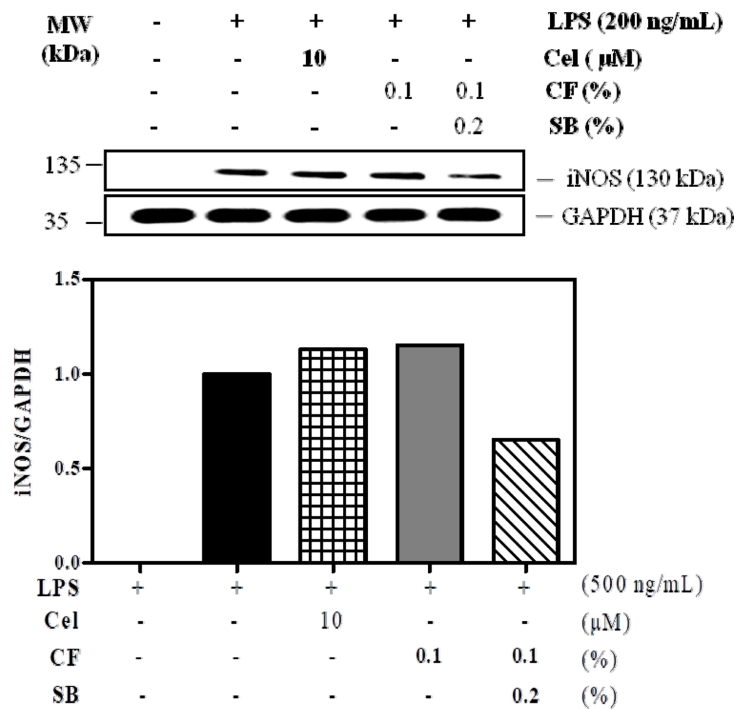
RAW 264.7 대식세포에 대한 커피와 작두콩 커피 혼합 추출물의 세포독성을 평가하기 위하여 커피 추출물(0.1%), 그리고 커피와 작두콩 혼합 추출물을 농도별(1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, v/v)로 처리하여 MTS assay를 행하여 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과 시료 6종 모두 세포독성을 나타내지 않는 것으로 확인되었다(Fig. 3).

### 작두콩 첨가 커피의 RAW 264.7 세포에서 NO 생산 저해 효과

커피와 작두콩 혼합 추출물의 NO 생성 억제능을 확인하기 위해 RAW 264.7 세포에 커피와 작두콩 추출물 시료를 2시간 동안 전처리한 후, LPS를 500 ng/mL 농도로 처리하여 24시간이 경과한 후 세포 배양 상층액을 Griess 시약과 반응시켜 NO의 생성량을 측정하였다. 그 결과 LPS에 노출된 RAW 264.7 세포에서 28.8  $\mu$ M이 생성되었던 NO가 커피와 작두콩 1:2 (v/v) 혼합 추출물에서는 24.6  $\mu$ M로 유의하게 감소되었다. 또한 1:3 (v/v) 혼합 추출물에서는 22.9  $\mu$ M, 1:4 (v/v) 혼합추출물에서는 19  $\mu$ M로 관찰되어 NO의 생성은 작두콩 추출물의 농도가 증가함에 따라 농도의존적으로 억제되는 것으로 관찰되었다(Fig. 4).

### 커피와 작두콩 혼합 추출물의 IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 생성 저해 효과

RAW 264.7 세포에 커피와 작두콩 추출물 시료를 2시간 동안 전처리하고, LPS를 500 ng/mL 농도로 처리하여 24시간 동안 배양한 후, 배양 상층액을 ELISA를 이용하여 커피와 작두콩 혼합 추출물의 염증 매개체(IL-6, TNF- $\alpha$ ) 생성 저해 효과를 측정하였다. 그 결과, LPS 처리에 의해 RAW 264.7 대식세포의 IL-6와



**Fig. 6. Effects of the mixture of coffee (CF) and sword bean (SB) on iNOS expression in LPS-activated RAW 264.7 cells.** RAW 264.7 cells were pretreated with CF and SB mixtures for 2 h, and then LPS (200 ng/mL) was added to the cells for 18 h. The protein levels of iNOS were detected by Western blot analysis. Celecoxib (Cel, 10  $\mu$ M) was used as a positive control drug. iNOS was analyzed and quantified using Azure Spot software. iNOS protein levels were normalized by GAPDH.

TNF- $\alpha$ 의 생성이 유의적으로 증가하였으며, 커피와 작두콩 1:2와 1:3 (v/v) 혼합 추출물 처리군에서 LPS 단독 처리군에 비해 IL-6의 생성이 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 5A). 그러나 커피와 작두콩 1:4와 1:5 혼합 추출물 처리군의 경우 LPS 단독 처리군에 비해서는 유의적으로 감소하였으나 1:2와 1:3 (v/v) 혼합물 처리군보다는 그 효과가 낮은 것으로 나타나 농도 의존성을 보이지는 않았다. 따라서 커피와 작두콩 혼합 추출물의 IL-6 생성 저해능에 있어서는 배합에 따른 적정 농도가 존재하며, 커피와 작두콩 1:2와 1:3의 비율(v/v)이 그 적정 농도에 근접한 범위일 것으로 사료된다. TNF- $\alpha$ 의 경우에는 LPS 단독 처리군과 커피와 작두콩 혼합 추출물 처리군 간에 유의적인 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 5B).

#### 커피와 작두콩 혼합 추출물의 iNOS 발현 저해 효과

iNOS는 전염증성 사이토카인의 자극에 의해 NO를 대량으로 생성한다(Green 등, 1994). iNOS의 과도한 유도는 일반적으로 산화 환경에서 발생하고, 따라서 높은 수준의 NO는 과산화 반응과 세포독성을 초래하게 된다(Mungro 등, 2002). RAW 264.7 세포에 IL-6의 생성을 효과적으로 감소시킨 것으로 나타난 커피와 작두콩 1:2 (v/v) 혼합 추출물을 2시간 동안 전처리한 후, LPS를 200 ng/mL 농도로 첨가하여 18시간 동안 배양하였다. 비스테로이드성 항염증 화합물인 선택적 COX-2 저해제 celecoxib (Cel, 10 M)를 양성 대조군으로 사용하여 iNOS 염증성 단백질 발현 양상을 western blotting 방법으로 분석하였다. 그 결과 커피와 작두콩이 1:2 (v/v)의 비율로 혼합된 추출물이 LPS 처리로 염증이 유도된 RAW 264.7 세포에서 iNOS 발현을 유의하게 감소시켰다(Fig. 6). 커피와 작두콩 혼합 추출물의 iNOS 발현 억제 효과는 위의 NO 생성 저해능 평가에서 커피와 작두콩 혼합 추출물이 NO의 생성을 농도 의존적으로 감소시키고 커피와 작두콩 1:2 (v/v) 혼합 비

율에서 염증성 사이토카인인 IL-6의 생성을 유의하게 감소시켰던 것과도 일치하는 결과이다.

이상의 결과들로부터 작두콩을 커피의 블렌딩 소재로 이용함으로써 항산화와 항염증 효과가 향상됨을 알 수 있었다. 따라서 작두콩은 커피음료의 블렌딩 소재로서의 응용 가능성이 높다고 판단되며, 작두콩 추출물을 커피에 혼합하여 음용함으로써 카페인의 섭취량을 줄임과 동시에 커피만을 음용할 때보다 기능성 측면에 있어서도 효율적인 것으로 판단되었다. 이에, 본 연구결과가 작두콩이 커피의 블렌딩 소재로서 활용될 수 있는 기초자료로 활용될 수 있기를 기대한다.

## 요 약

커피에 작두콩 추출물의 혼합에 따른 항염증 효과를 평가하였다. 커피 추출물과 작두콩 추출물을 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 (v/v)의 비율로 혼합한 시료를 대상으로 DPPH를 이용한 항산화 활성 평가와 세포독성 평가 및 LPS로 염증이 유도된 RAW 264.7 세포에서 염증 매개물질인 NO, 염증성 cytokine인 TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 생성 및 iNOS 단백질의 발현을 측정하였다. 그 결과, DPPH radical-scavenging 활성은 작두콩 추출물의 농도에 의존적으로 높게 나타났으며, 커피와 작두콩 1:4 (v/v)의 혼합 비율에서 대략 80%의 DPPH radical-scavenging 활성을 보였다. MTS assay로 세포 생존율을 분석한 결과, 커피와 작두콩 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 (v/v) 혼합 추출물 모두에서 세포독성이 나타나지 않았다. LPS로 염증이 유도된 RAW 264.7 세포에서 TNF- $\alpha$ 의 발현 저해 효과는 관찰되지 않았지만, iNOS 단백질 발현과 그에 따른 NO와 IL-6의 생성은 효과적으로 억제됨이 확인되었다. 특히, 커피와 작두콩 1:2 (v/v) 혼합 비율에서 IL-6와 iNOS의 발현이 유의하게 감소하였다. 이와 같은 결과를 종합하여볼 때, 작두콩을 커피의 블

렌딩 소재로 이용함으로써 항산화와 항염증 기능이 향상된 커피 음료의 제조에 응용할 수 있을 것으로 시사되었다.

## References

- Bystrom LM, Guzman ML, Rivella S. Iron and reactive oxygen species: Friends or foes of cancer cells? *Antioxid. Redox Signaling*. 20: 1917-1924 (2014)
- Chang MI, Kim JY, Kim SJ, Baek SH. Effect of sword bean Chung-gukjang addition on quality of Kochujang. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 40: 1292-1299 (2011)
- Cho YS, Bae YI, Shim KH. Chemical components in different parts of Korean sword bean (*Canavalia gladiata*). *Korean J. Postharvest Sci. Technol.* 6: 475-480 (1999)
- European Food Safety Authority. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific opinion on the safety of caffeine. *EFSA J.* 13: 4102-4107 (2015)
- Ekanayake S, Skog K, Asp NG. Canavanine content in sword bean (*Canavalia gladiata*): Analysis and effect of processing. *Food Chem. Toxicol.* 45: 797-803 (2007)
- Green SJ, Scheller LF, Marletta MA, Seguin MC, Klotz FW, Slayter M, Nelson BJ, Nacy CA. Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. *Immunol. Lett.* 43: 87-94 (1994)
- Jeon KS, Na HJ, Kim YM, Kwon HJ. Antiangiogenic activity of 4-O-methylgallic acid from *Canavalia gladiata*, dietary legume. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330(4): 1268-1274 (2005)
- Kim JP, Lee HH, Moon JH, Ha DR, Kim ES, K JH, Seo KW. Isolation and Identification of antioxidants from methanol extract of sword bean (*Canavalia gladiata*). *Korean J. Food Sci. Technol.* 45: 777-784 (2013)
- Korea Customs Service. Trade statistics. Available from: <https://uni-pass.customs.go.kr/ets/index.do>. Accessed Nov. 23, 2019.
- Korean Statistical Information Service. Ministry of Food and Drug Safety. Production of food manufacturing and processing establishments. Available from: <http://kosis.kr/index/index.do>. Accessed Nov. 23, 2019.
- Lafranconi A, Micek A, De Paoli P, Bimonte S, Rossi P, Quagliarino V, Berretta M. Coffee intake decreases risk of oestrogenic breast cancer: A dose-response meta-analysis on respective cohort studies. *Nutrients* 10: 112 (2018)
- Loftfield E, Rothwell JA, Sinha R, Keski-Rahkonen P, Robinot N, Albanes D, Weinstein SJ, Derkach A, Sampson J, Scalbert A, Freedman ND. Prospective investigation of serum metabolites, coffee drinking, liver cancer incidence, and liver disease mortality. *JNCI, J. Natl. Cancer Inst.* 112: 286-294 (2020)
- Loomis D, Guyton KZ, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, et al. Carcinogenicity of drinking coffee, maté, and very hot beverages. *Lancet Oncol.* 17(7): 877-878 (2016)
- Lopez-Garcia E, Guallar-Castillon P, Leon-Muñoz L, Graciani A, Rodriguez-Artalejo F. Coffee consumption and health-related quality of life. *Clin. Nutr.* 33: 143-149 (2014)
- Lopez-Garcia E, Rodriguez-Artalejo F, Rexrode KM, Logroscino G, Hu FB, van Dam RM. Coffee consumption and risk of stroke in women. *Circulation.* 119: 1116-1123 (2009)
- Mungrue IN, Husain M, Stewart DJ. The role of NOS in heart failure: lessons from murine genetic models. *Heart Failure Rev.* 7: 407-422 (2002)
- Nakatsuka Y, Nagasawa T, Yumoto Y, Nakazawa F, Furuichi Y. Inhibitory effects of sword bean extract on alveolar bone resorption induced in rats by *Porphyromonas gingivalis* infection. *J. Periodontol Res.* 49: 801-809 (2014)
- Negi AS, Darokar MP, Chattopadhyay SK, Garg A, Bhattacharya AK, Srivastava V, Khanuja PS. Synthesis of a growth promoter from gallic acid. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15: 1243-1247 (2005)
- Nieber K. The impact of coffee on health. *Planta Med.* 83: 1256-1263 (2017)
- Nimeni-Uadia R. Effect of aqueous extract of *Canavalia ensiformis* seeds on hyperlipidaemia and hyperketonaemia in alloxan-induced diabetic rats. *Biokemistri* 15: 7-15 (2003)
- Pandurangan AK, Mohebbi N, Norhaizan ME, Looi CY. Gallic acid attenuates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in BALB/c mice. *Drug Des., Dev. Ther.* 9: 3923-934 (2015)
- Park JU, Kim SJ, Na CS, Choi CH, Seo CS, Son JK, Kang BY, Kim YR. Chondroprotective and anti-inflammatory effects of ChondroT, a new complex herbal medication. *BMC Complementary Altern. Med.* 16: 1-11 (2016)
- Tamura S, Takahashi N, Murofushi N, Yokota T, Kato J, Shiotani Y. Isolation of two new gibberellins from immature seeds of *Canavalia*. *Planta* 75: 279-282 (1967)
- Wootton-Beard PC, Ryan L. Improving public health?: The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. *Food Res. Int.* 44: 3135-3148 (2011)