



Development of Bio-Mixed Beverage Using Fermentations of the Sanghwang Mushrooms

Oh-Sung Kwon¹, Junwon Lee²

¹*Department of Reaearch and Development, Boeun Mulsan. Co. Ltd.*

²*Department of Biomedicinal Science & Biotechnology, Paichai University*

ABSTRACT

Recently, the elderly population has increased rapidly and it is growing interest in health, so the mushrooms are used as a material for functional food, but the Sanghwang mushrooms research related to material production using the techniques for the mass culture that are valuable industrially has yet to be revealed. In this study, mixed fermenting products of curcuma root and the Sanghwang mushrooms were developed as a beverage and food material with a increased ability to inhibit osteoclast differentiation. Bone marrow-derived macrophages(BMMs) derived from bone marrow cells were cultured for 3 d with the absence or presence of receptor activator of NF- κ B ligand(RANKL) with increasing concentrations(2-20 μ g/mL) of mixed fermenting products. The fermentation broths inhibited RANKL-induced osteoclastogenesis in a dose-dependent manner that the formation of multinucleated osteoclast were confirmed by the low tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP) activity without inhibiting the growth of bone marrow cells. The fermentation broths was cultured with edible soy and the sterilized solutions showed a brown liquid was charged in case of the beverage bottle. In order to use the bio-mixed fermentation broth as a primary base of the beverage, it is required the sensory evaluation, stability and expiration date.

© 2016 KKITS All rights reserved

KEYWORDS : Basidiomycetes, Fermentations, Inhibitory activity, Sanghwang mushrooms, TRAP

ARTICLE INFO: Received 6 April 2016, Revised 13 June 2016, Accepted 13 June 2016.

*Corresponding author is with the Department of Biomedicinal Science & Biotechnology, Paichai

University, Daejeon, Korea, 35345, KOREA
E-mail address: junwon@pcu.ac.kr

1. 서론

국내 건강기능식품 산업은 글루코사민 제품이 히트상품이 되며 시장이 크게 확대되었으나, 업체 간의 경쟁이 심화되며 감마리놀렌산, 오메가3, EPA/DHA 제품 등의 매출이 정체기에 접어들었으며 이엽우피소 혼입 논란에 의해 전체 건강기능식품 시장은 상당한 피해를 보았다. 현재는 홍삼 제품으로 건강기능식품에 대한 시장이 유지되는 실정이다.

우리나라는 노인성 질병도 증가하고 있는데, 그 중 골다공증(osteoporosis)은 폐경 및 노화에 따른 골 흡수작용을 하는 파골세포의 활성이 높아져 발병하게 되며[1] 발병원인으로는 칼슘 부족, 생활 습관, 유전적 요인, 운동량부족 등을 들 수 있으며 특히 폐경기 이후 여성들에게서 빈발한다. 이외에도 부갑상선 기능 항진, 갑상선 기능 항진, 만성 신부전, 장기간 부신피질 호르몬 투여 등의 다양한 요인에 의하여 발생한다[3].

따라서 이러한 문제점을 해결하고자 천연물로부터 골질환에 효과가 있는 소재 탐색연구가 진행되고 있다. 삼백초 추출물은 파골세포의 분화를 억제하였으며 NFATc1, TRAP, OSCAR 단백질의 발현은 억제되는 것이 보고되었다[3]. 면화자, 향부자, 쇠양 등에서 파골세포의 활성을 억제한다는 결과도 보고되어 있으나[4, 5, 6] 상황버섯 대량 배양기술에 의한 골질환 관련소재 생산 및 제품 등 산업적으로 가치 있는 연구는 아직 이루어지지 않고 있다.

최근 노인인구가 급격히 증가하여 기능성식품의 소재로서 버섯류가 이용되고 있다. 버섯류의 기능성 소재화는 기술 개발이 용이하고 제조공정이 단순하여 하나의 시설로 소량 다품종 생산이 가능하며 기능성 생리활성물질을 대량생산하고 산업화할 수 있는 장점을 가지고 있다.

담자균류의 일종인 상황버섯은 항암활성, 면역증

강 및 항산화 등의 약리 효과가 알려져 있으며[7, 8, 9, 10] 기존 항암제와는 달리 면역 기능의 회복에 의한 것으로 부작용이 거의 없는 것으로 알려져 있어 건강식품 및 의약품 소재로 주목 받고 있다[11, 12]. 국내 상황버섯을 이용하는 기능성 식품의 시장은 상황버섯의 효능에 대한 인지도 증대와 건강 음료에 대한 선호도 증대 등으로 인해 높은 시장 성장률을 보이고 있다.

울금(*Curcuma longa L.*)은 다년생 초본의 덩이줄기로 커큐미노이드(curcuminoids)에 의한 항암 효과가 중요한 것으로 보고되어 왔고[13], 열대지방과 일본의 오키나와에서 재배되며 카레의 식용 재료와 약재로 사용되어 왔으며 울금의 뿌리와 줄기의 주성분인 커큐민(curcumin), 칼레빈(calectin), 사이클로커큐민(cyclocurcumin), 디메톡시커큐민(demethoxy-curcumin)은 항산화와 세포보호 역할을 한다[14, 15, 16].

본 연구에서는 상황버섯 균사체를 이용하여 울금을 발효시켜 파골세포의 활성을 억제하는 능력이 증대된 식품소재로 사용하여 제품을 개발하고 음료 등의 소재로 사용하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 실험재료

파골세포의 분화에 사용되는 배지는 α -MEM(α -Minimal essential medium, Gibco, New York Grand Island), penicillin-streptomycin solution (5000 units/ml penicillin; 50000 μ g/ml streptomycin). FBS(fetal bovine serum, HyClone Laboratories)이며, 세포의 염색에 이용되는 staining solution은 Naphthol AS-MX, Fast red violet LB salt (SIGMA-Aldrich)을 사용하였다. 세포독성확인을 위한 MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl

tetrazolium bromide) solution는 SIGMA-Aldrich사에서 구매하였다[19].

2.2 상황버섯 시료제조

설탕 1.5%(w/v) 및 대두분 0.5%(w/v)을 함유하는 배지에 상황버섯을 접종하여 20 시간 배양하고, 울금 0.2%(w/v)를 첨가하여 65시간 동안 추가 발효시킨 발효액을 10mg/ml의 농도로 증류수에 녹여 사용하였다[18].

2.3 TRAP assay

골수세포는 8주령의 ICR 마우스를 이용하여 경추탈골법을 진행한 후 femur와 tibia를 각각 분리하여 얻었다. 분리된 femur와 tibia의 각 끝을 잘라 1% α -MEM으로 통과시켜 골수세포를 모았다[19].

대조군은(positive control, P.C) M-CSF 와 RANKL만을 첨가하였고, M-CSF, RANKL, 상황버섯 발효 울금 sample을 첨가하여 실험군으로 나누어 진행하였다. 72시간 후 pNPP(Para-Nitrophenyl phosphate) 기질을 넣어주어 흡광도(O.D) 450nm에서 측정하였다[19].

2.4 Cell viability assay

세포 생존능을 측정하기 위해 MTT 방법을 이용하였다. BMMs(1×10^4 cell/well) 세포의 배양에서 다양한 농도의 sample을 96-well plate에 첨가하여 48 시간 배양하여 대조군과 실험군으로 나누어 진행하였다. 그 후 MTT solution을 well에 각각 20 μ 씩 분주한 후 O.D 570nm에서 측정하였다[19].

2.5. 상황버섯 배양 및 음료 개발

상황버섯 균사체 배양은 5L-발효조를 통하여 배양 후 상등액 및 균사체를 회수하여 사용하였다. 회수한 배양액을 필터링 하였고 상황균사체 발효농축액 10%, 홍삼 1%, 오미자 1.0%, 벌꿀 1.0%를 배합비율로 하여 혼합하였다. 살균은 90°C에서 10분 살균처리 했다.

3. 실험결과

3.1 TRAP assay

골수 조혈모세포는 M-CSF와 RANKL 등에 의하여 다핵형 파골세포로 분화되며, 다핵 파골세포에서 발현되는 TRAP의 활성을 측정하였다. 성숙하고 분화된 파골세포의 수를 대조군과 비교하여 나타내었으며, 각 농도별로 3회 이상 파골세포 저해 실험을 반복하여 그 결과를 <표 1>에 제시하였다.

표 1. TRAP 활성에 대한 상황버섯 발효액의 효과
Table 1. Effect of Sanghwang mushrooms fermentations on the TRAP activity.
(* 20ug/mL)

상황버섯 발효액 농도 (ug/mL)	파골세포 수 (개)	파골세포 형성 저해능 (%)
2	150.3 \pm 7.2	35.4 \pm 3.6
5	74.7 \pm 3.5	68.3 \pm 5.8
20	10.8 \pm 3.6	92.1 \pm 9.4
대조군	224.5 \pm 10.3	100
Silibinin[17]*	35.5 \pm 6.7	82.5 \pm 5.4
IC50 : 3.6ug/mL		

또한, <그림 1>에서 보는 바와 같이 TRAP 활성 저해 효과를 파골세포를 염색하여 사진을 통해 확인할 수 있다.

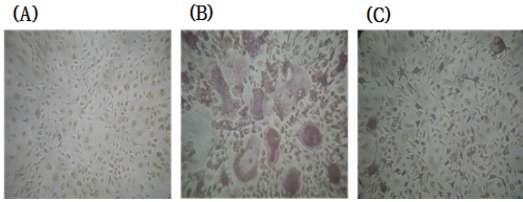


그림 1. TRAP 염색에 대한 상황버섯 발효액의 효과
 Figure 1. Effect of Sanghwang mushrooms fermentations on the RANKL-induced TRAP staining.
 (A) MCSF, (B) MCSF+RANKL,
 (C) MCSF+RANKL+ SAMPLE 5ug/mL

3.2 Cell viability assay

파골세포의 TRAP 활성을 저해하는 상황버섯 발효액이 파골세포의 성장을 저해하는 것인지 알아보기 위해 세포 생존능 검사를 진행하였다. 생존능은 대조군의 흡광도에 대한 시료의 흡광도를 백분율로 나타내었다. 각 농도별로 3회 이상 독성 실험을 반복하여 그 결과를 <표 2>에 제시하였다. 추출물을 첨가하지 않은 대조군으로부터 세포의 생존율을 비교한 결과 상황버섯 발효액은 대조군과 차이가 나타나지 않았다.

표 2. 상황버섯 발효액의 세포 생존능 효과.
 Table 2. Effect of Sanghwang mushroom fermentation broths on cell viability.

상황버섯 발효액 농도 (ug/mL)	세포 생존능 (%)
2	98.3±5.8
5	98.8±6.3
20	96.4±5.3
대조군	100
Silibinin*	90.4±6.7

(* 20ug/mL)

이 실험결과로 상황버섯 발효액은 골수 세포의

성장을 저해하지 않고 다핵형 파골세포의 형성이 감소하여 TRAP 활성이 낮게 나타났음을 확인하였다.

3.3 상황버섯 배양 및 음료 개발

상황버섯 균사체 배양은 식용 대두분 및 설탕을 사용하였으며 배양액을 원심분리 하였다<그림 2>. 회수한 배양액을 필터링 하였고 홍삼, 오미자, 벌꿀을 혼합하였다. 살균 처리된 혼합액은 갈색의 약한 액상을 나타냈으며 음료규격의 케이스병에 정량 충전하였다<그림 3>.



그림 2. 상황버섯 배양액
 Figure 2. Sanghwang mushroom fermentation broths



그림 3. 음료규격의 케이스병에 정량 충전된 상황버섯 배양액
 Figure 3. Sanghwang mushroom fermentation broths charged amount in case of the beverage bottle standards.

4. 결 론

담자균류인 상황버섯을 이용한 울금 발효액은 ADH와 ADLH의 활성을 높이고 알콜의 분해 능력이 뛰어나 인체내 장기에 안좋은 영향을 주기 전에 숙취해소에 도움을 줄 수 있기 때문에 음료나 식품의 첨가물로서 가능성을 이미 확인하였다[18]. 또한, 본 연구에서 상황버섯 발효액의 파골세포 분화 억제 활성을 측정하였으며, 이들을 바탕으로 노인성 질병에 효과적이며 다양한 질병을 예방할 수 있는 음료를 개발하였다.

상황발효액은 5µg/mL 농도에서 68.3%의 TRAP 저해 활성을 나타냈으며, 파골세포의 생존능 실험에서는 대조군과 유의미하게 차이가 없게 나타났다. 이를 바탕으로 골흡수를 담당하는 파골세포의 형성을 억제하여 골다공증 같은 골질환의 예방과 개선에 효과가 있을 것으로 판단되었다.

배양 배지의 경우 제품의 원가를 낮추기 위해 식용 대두분 및 설탕을 사용하였다. 식품공전의 기타음료 규격에 의하면 기타음료는 먹는 물에 식품 또는 식품첨가물 등을 가하여 제조하거나 또는 동·식물성원료를 이용하여 음용할 수 있도록 가공한 것으로 다른 식품유형이 정하여지지 아니한 음료를 말한다[20]. 또한, 산소량, 납, 카드뮴, 세균수 등과 같은 다양한 규격에 따라 음료를 제작하여야 한다. 음료제품의 경우 맛과 색깔에 따라 매출에 크게 영향을 받는다. 음료에 사용되는 배양액의 배합 재료 및 비율은 관능적 평가와 색도 및 추출물의 기호성, 농도 등을 종합적으로 고려하여 판단해야하기 때문에 추출물의 색은 색이 맑고 선명한 것을 기준으로 하여 선별하고 맛과 향의 기호성은 관능검사를 통하여 선별해야 한다.

본 연구 결과, 상황발효액은 골다공증 같은 뼈와 관련된 질환의 예방 및 치료제로써 가능성을 가지고 있으며 상황을 이용한 울금 혼합발효액을 음료

의 기본베이스로 사용하기 위해서는 관능평가와 안정성 및 유통기한 설정 등이 필요하다.

References

- [1] H. Takayanagi, *Osteoimmunology : shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems*, Nature Reviews Immunology, Vol. 7, pp. 292-304, 2007.
- [2] G. J. Cho, H. T. Park, J. H. Shin, T. Kim, J. Y. Hur, Y. T. Kim, K. W. Lee, and S. H. Kim, *The relationship between reproductive factors and metabolic syndrome in Korean postmenopausal women*, Korea National Health and Nutrition Survey, Vol. 16, pp. 998-1003, 2009.
- [3] J. S. Kill, M. G. Kim, H. M. Choi, J. P. Lim, Y. M. Boo, E. H. Kim, J. B. Kim, H. K. Kim, and K. H. Leem, *Inhibitory effects of angelicae gigantis radix on osteoclast formation*, Phytotherapy Research, Vol. 22, pp. 472-476, 2008.
- [4] K. S. Shim, S. N. Kim, M. H. Kim, Y. S. Kim, S. Y. Ryu, Y. K. Min, and S. H. Kim, *Inhibitory effects of saururus chinensis extracts on osteoclast differentiation*, Natural Product Sciences, Vol. 14, pp. 113-117, 2008.
- [5] K. Y. Han, D. Yang, E. J. Chang, Y. K. Lee, H. Huang, S. H. Sung, Z. H. Lee, Y. C. Kim, and H. H. Kim, *Inhibition of osteoclast differentiation and bone resorption by sauchinone*, Biochemical pharmacology, Vol. 74, pp. 911-923, 2007.
- [6] H. B. Kwak, J. H. Kim, D. J. Kim, Y. M. Kwon, J. M. Oh, and Y. K. Kim, *Effect of water extract of deer antler in osteoclast*

- differentiation*, Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology, Vol. 22, pp. 891-895, 2008.
- [7] T. L. Lu, G. J. Huang, T. J. Lu, J. B. Wu, C. H. Wu, T. C. Yang, A. Iizuka, and Y. F. Chen, *Hispolon from phellinus linteus has antiproliferative effects via MDM2-recruited ERK1/2 activity in breast and bladder cancer cells*, Food and Chemical Toxicology, Vol. 47, pp. 2013-21, 2009.
- [8] D. Sliva, A. Jedinak, J. Kawasaki, K. Harvey, and V. Slivova, *Phellinus linteus suppresses growth, angiogenesis and invasive behaviour of breast cancer cells through the inhibition of AKT signalling*, British Journal of Cancer, Vol. 98, pp. 1348-1356, 2008.
- [9] X. Zou, X. Guo, and M. Sun, *pH control strategy in a shaken minibioreactor for polysaccharide production by medicinal mushroom Phellinus linteus and its anti-hyperlipemia activity*, Bioprocess Biosyst Eng, Vol. 32, pp. 277-281, 2009.
- [10] M. Ye, J. K. Liu, Z. X. Lu, Y. Zhao, S. F. Liu, L. L. Li, M. Tan, X. X. Weng, W. Li, and Y. Cao, *Grifolin, a potential antitumor natural product from the mushroom Albatrellus confluens, inhibits tumor cell growth by inducing apoptosis in vitro*, FEBS Lett, Vol. 579, pp. 3437-3443, 2005.
- [11] T. Zhu, S. H. Kim, C. Y. Chen, *A medicinal mushroom: Phellinus linteus*, Current Medicinal Chemistry, Vol. 13, pp. 1330-1335, 2008.
- [12] J. C. Verster, and R. Penning, *Treatment and prevention of alcohol hangover*, Curr Drug Abuse Rev, Vol. 3, pp. 103-109, Review, 2010.
- [13] A. J. Ruby, *Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids*, Cancer letters, Vol. 94, pp. 79-83, 1995.
- [14] S. Toda, *Natural antioxidants. components isolated from rhizome of curcuma longa L*, Chem. Pharm. Bull, Vol.33, pp. 1725-1728, 1985.
- [15] W. Syu. *Cytotoxicity of curcuminoids and some novel compounds from curcuma zedoaria*, J. Nat. Prod, Vol. 61, pp. 1531-1534, 1998.
- [16] J. S. Shim, D. H. Kim, H. J. Jung, J. H. Kim, D. Lim, S. K. Lee, K. W. Kim, J. W. Ahn, J. S. Yoo, J. R. Rho, J. Shin, and H. J. Kwon, *Hydrazinocurcumin, a novel synthetic curcumin derivative, is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation*, Bioorganic & medicinal Chemistry, Vol. 10, pp. 2987-2992, 2002.
- [17] J. H. Kim, K. Kim, H. M. Jin, I. Song, B. U. Youn, J. Lee, and N. Kim, *Silibinin inhibits osteoclast differentiation mediated by TNF family members*, Mol Cells, Vol. 28(3), pp. 201-207, 2009.
- [18] O. S. Kwon, H. S. Kwak, J. Lee, *A Study on effects of hangover relief using mixed fermentation of the basidiomycetes*, Journal of Knowledge Information Technology and Systems, Vol. 7(5), pp. 41-48, 2012.
- [19] S. J. Yu, and J. Lee, *Screening of medicinal plants inhibitor on osteoclast activity*, Journal of Knowledge Information Technology and Systems, Vol. 10(2), pp. 237-246, 2015
- [20] foodcode
<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>, Mar. 2016.

상황버섯을 이용한 바이오 혼합음료 개발

권오성¹, 이준원²

¹보은물산(주)

²배재대학교 바이오·의생명공학과

요 약

최근 노인인구가 급격히 증가하고 건강에 대한 관심이 증가하여 기능성식품의 소재로서 버섯류가 이용되고 있으나, 상황버섯 대량 배양기술을 응용한 골질환 관련 소재 생산 및 제품 등 산업적으로 가치 있는 연구는 아직 이루어지지 않고 있다. 본 연구에서는 상황버섯 균사체를 이용하여 울금을 발효시켜 파골세포의 활성을 억제하는 능력이 증대된 식품소재로 사용하고 음료 제품을 개발하였다. 골수 세포로부터 유래한 골수유래 대식세포는 RANKL인자와 상황버섯 발효액을 2-20ug/mL 농도로 처리하여 3일 동안 배양하였다. 발효액은 파골세포의 성장을 저해하지 않고 다핵형 파골세포의 분화를 감소시켜 TRAP 활성이 낮게 나타났음을 확인하였다. 상황버섯 균사체는 식용 대두분과 같이 배양하였으며 배양액을 원심분리하고 살균 처리된 혼합액은 갈색의 액상을 나타냈으며 음료규격의 케이스병에 정량 충전하였다. 혼합발효액을 바이오 음료의 기본베이스로 사용하기 위해서는 관능평가와 안정성 및 유통기한 설정이 필요하다.

감사의 글

본 논문은 2016학년도 배재대학교 교내학술연구비 지원에 의하여 수행된 것임.



Oh-Sung Kwon received the bachelor and master's degrees in Microbiology from the Daejeon University in 1993 and 1995, respectively. He received the Ph.D. degree in the Department of Biotechnology from Yonsei University in 2001. From 2001 to 2010, he was a research director at Biolife co. ltd. He has been a Resaerch director in the Department of Research and Development at Boeun Mulsan since 2010. His current research interests functional food and prebiotics materials.

E-mail address: ohsung0626@gmail.com



Junwon Lee received the bachelor and master's degrees in Genetic Engineering from the PaiChai University in 1993 and 1996, respectively. He received the Ph.D. degree in the Department of Biotechnology from Yonsei University in 2001. From 2002 to 2004, he was a researcher at University of Pennsylvania School of Medicine and University of Pittsburgh. He has been a professor in the Department of Biomedical Science & Biotechnology at PaiChai University since 2008. His current research interests include functional materials for disease and biological convergence systems. He is a life member of the KKITS.

E-mail address: junwon@pcu.ac.kr