J Appl Biol Chem (2023) 66:9, 60–66
https://doi.org/10.3839/jabc.2023.009

Online ISSN 2234-7941
Print ISSN 1976-0442

Article: Bioactive Materials

Effect of *Lentinula edodes* water extracts and Lentinan on proliferation of myosatellite cell of *Bos taurus* Hanwoo

Sohee Kim[1] · Sehyuk Oh[2] · Sanghun Park[2] · Eunjin Kim[3] · Jungseok Choi[2] · Hwayong Lee[1]

표고 자실체 물 추출물과 베타글루칸이 한우 근육위성세포 증식에 미치는 영향

김소희[1] · 오세혁[2] · 박상훈[2] · 김은진[3] · 최정석[2] · 이화용[1]

Received: 24 November 2022 / Accepted: 2 February 2023 / Published Online: 15 February 2023
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2023

Abstract *Lentinula edodes* is one of the most produced mushrooms in the world. In this study, the effects of *L. edodes* water extracts and lentinan, a beta-glucan from this mushroom, on the proliferation of *Bos taurus* Hanwoo myosatellite cells were studied. The beta-glucan content of the *L. edodes* water extract was approximately 15.20% at 85 ℃ for 4 h, 13.64% at 100 ℃ for 4 h, 9.48% at 40 ℃ for 8 h and 8.21% at room temperature for 24 h. *L. edodes* water extract was added to the culture of Hanwoo myosatellite cells. The expression of the *MyoD* gene increased in the addition of the extract at 40 ℃ for 8 h and 100 ℃ for 4 h, and the expression of the *Myogenin* gene increased in the addition of the extract at 40 ℃ for 8 h, but proliferation and activity did not increase compared to no addition. However, the addition of lentinan to the culture of Hanwoo myosatellite cells increased the expression of *Myogenin* gene related to muscle formation increased and the proliferation and viability of the cells. This study proved that the components of *L. edodes* can affect the proliferation of Hanwoo myosatellite cells, and further research will help develop the mushroom industry and cultured meat industry in the future.

Keywords Hanwoo · Lentinan · *Lentinula edodes* · Myosatellite cell · Water extract

Sohee Kim and Sehyuk Oh are contributed equally to this work.

Jungseok Choi (✉)
E-mail: jchoi@chungbuk.ac.kr

Hwayong Lee (✉)
E-mail: leehy@chungbuk.ac.kr

[1]Department of Forest Science, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Republic of Korea

[2]Department of Animal Science, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Republic of Korea

[3]Department of Forest Therapy, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Republic of Korea

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서 론

버섯은 수분 함량이 높기 때문에(약 90%) 100 g당 30 kcal로 다른 식품에 비하여 칼로리는 낮지만, 당질, 단백질, 무기질, 비타민 등 다양한 영양소가 함유된 식품으로 전세계적으로 소비되고 있다[1]. 또, 많은 버섯에는 항암, 면역 향상 등에 영향을 주는 물질이 포함되어 있다[2]. 따라서 많은 버섯은 대부분 식용 (54%) 및 약용(38%)으로 이용되어 왔다[3]. 버섯의 다양한 생리활성 물질이 밝혀지면서, 주로 향과 영양소를 이용한 식품 재료로 사용되던 버섯을 의약품과 기능성 식품 개발에도 이용하려는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 몇 종류의 버섯은 약리효과가 밝혀져 이미 제품 생산에 이용되고 있다[4]. 꽃송이버섯[5], 그리고 상황버섯[6] 등은 화장품 소재로도 이용되고 있다. 버섯의 다양한 생리활성 물질이 밝혀져 있다. 버섯의 기능성 물

질 중 베타글루칸은 다당류의 일종으로 버섯류, 효모, 곡류 등에 존재하고 있는데[7], 수용성 식이섬유인 베타글루칸이 우리 몸으로 들어오면 혈액으로 흡수돼 암 세포 등을 잡아먹는 대식세포를 활성화시키며[8], 지질 대사 개선을 유도하고 체지방 형성과 축적을 억제한다[9]. 또, 베타글루칸은 면역증진 및 항암활성이 있다 [10]. 버섯류의 베타글루칸은 표고의 렌티난(lentinan), 잎새버섯의 글리포란(grifolan), 느타리류의 플레우란(pleuran), 팽이버섯의 플라뮬린(flammulin), 영지의 GI-1, 치마버섯의 시조필란(shizophylan), 구름버섯의 클레스틴(krestin) 등이 알려져 있으며 이용되고 있다[2].

베타글루칸은 골격근의 기능을 촉진할 수 있는 것으로 알려져 있는데[11]. C2C12 근아세포를 이용한 실험들에서 보리 유래의 베타글루칸의 처리는 근관이 근섬유로 전환되는 속도를 빨라지게 하며[11], 보이차 추출물 또한 C2C12 근아세포의 근관 형성을 증진시켰다[12]. 동백나무 뿌리 추출물은 C2C12 근아세포의 근발생을 촉진하는 것으로 알려져 있으며[13], 닭의 난황 추출물은 C2C12 근아세포의 증식 및 분화를 향상시켰다[14]. 따라서 베타글루칸과 이러한 추출물들은 C2C12 근아세포의 증식에 영향을 주는 것이 확인되었기 때문에, 소, 돼지, 닭 같은 가축의 세포에도 적용이 가능할 것이다. 배양육은 세포의 증식에 필요한 영양소와 에너지원을 세포조직으로 만들어 근육세포를 분화시켜 제작한다[15]. 근발생은 근육조직이 형성 되는 과정으로 근형질막과 기저막 사이에 위치하고 있는 위성세포가 활성화되어 근아세포로의 분화를 통해 이루어진다[16]. 배양육 생산을 위한 세포배양 배지에는 말이나 소의 태아 혈청이 필요하며, 이 혈청은 임신우를 도축하여 얻고 있어 배양육 생산이 증가할수록 가축 도축도 증가하는 구조이다[17]. 이러한 문제를 해결하기 위하여, 표고 및 잎새버섯 추출물을 물고기 섬유아세포의 배양[18], 그리고 미세 녹조류 추출물의 소 근육세포의 배양[19]을 통하여 첨가물의 효과를 검증하는 시도가 있었다.

많은 버섯 중 표고는 한국, 중국, 일본 등 아시아 국가에서 일반적으로 재배되는 식용버섯으로[20], 전세계 식용 버섯 생산의 약 22%를 차지하고있다[3]. 이 버섯은 단백질, 지방산, 비타민, 식이섬유 등이 풍부하여 영양학적 가치가 매우 높고, 항종양, 항바이러스, 항진균, 항산화, 면역 조절 및 간 보호 활성과 약리학적 잠재력이 확인되었다[21]. 특히 표고에 함유되어 있는 베타글루칸인 렌티난은 항암효과가 뛰어난 것으로 알려져 있다[22].

전세계적으로 많이 재배, 이용되고 있는 표고는 대부분 식용으로 이용되고 있다. 이 표고를 이용한 추출물의 이용이 확대된다면 표고 산업이 더욱 활성화될 것으로 생각된다. 본 연구에서는 표고 물 추출물과 표고 유래의 베타글루칸인 렌티난이 한우 근육세포의 증식에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료 및 추출 조건

본 연구에서 사용한 표고 자실체는 충북대학교 농업생명환경대학 버섯재배사에서 재배한 산조 108호를 사용하였다. 수확한 버섯을 40 ℃에서 약 3일간 강제순환식 열풍건조기(BF-150C, BioFree, Bucheon, korea)로 건조시켰으며, 건조된 자실체를 곱게 분쇄한 후 분쇄물을 100 μm mesh의 체로 걸러 사용하였다. 물 추출 조건은 기존의 서수영 등[23]의 연구에서 상온 24시간 진탕, 정경임 등[24], 오정환 등[25]의 연구에서 40 ℃ 8시간, 최미연 등[26]의 연구에서 85-95 ℃ 5시간, 황용주 등[27]의 연구에서 100 ℃ 1시간으로 추출한 연구들을 약간 변형하여 용매비를 1:10 (w/v)로 하여 상온 24시간 방치, 중탕기(WB-11, DAIHAN Scientific Co., Ltd., Wonju, Korea)를 이용하여 40 ℃ 8시간, 85 ℃ 4시간, 100 ℃ 4시간으로 하였다. 감압농축기를 이용해 농축시킨 후 동결 건조하였다.

베타글루칸 함량

표고 물 추출물에서 β-glucan assay kit (Megazyme, Bray, Ireland)를 이용하여 베타글루칸을 결정하였다. 추출 농축된 시료 100 mg에 12M HCl 2.0 mL를 넣고 녹을 때까지 vortex 후 ice에 2시간 처리하였다. 그 후 증류수 4 mL를 넣어 잘 섞어 주고 6 mL를 추가한 후 100 ℃ water bath에서 2시간 처리하였다. 이 반응액을 상온에서 식힌 후 0.2 M sodium acetate buffer (pH 5.0)를 100 mL가 될 때까지 가했다. 그 후 6 mL의 8 M NaOH를 추가하고 13,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상등액 0.1 mL에 200 mM sodium buffer용액에 녹인 exo-1,3-β-glucanase (20 U/mL) plus β-glucosidase 0.1 mL를 가하고 40 ℃ 중탕기에서 60분간 반응시켰다. 이 반응액에 GOPOD 3 mL를 넣고 40 ℃에서 20분간 반응시킨 후 분광광도계(Mobi, Microdigital, Seongnam, Korea)을 이용하여 510 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 총 글루칸 함량 계산에 사용하였다. 또한 시료 100 mg에 1.7 M NaOH를 2 mL 넣고 ice에서 20분간 처리하였다. 이 반응액에 1.2 M sodium acetate buffer (pH 3.8) 8 mL와 amyloglucosidase (1630 U/mL)+invertase (500 U/mL) 용액 0.2 mL를 가하고 40 ℃ 중탕기에서 30분간 처리한 후 13,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상등액 0.1 mL에 0.2 M sodium acetate buffer (pH 5.0) 0.1 mL와 GOPOD 시약 3 mL를 넣고 40 ℃에서 20분간 반응시킨 후 510 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 알파글루칸 함량의 계산에 사용하였다. 베타글루칸의 함량은 총 글루칸 함량에서 알파글루칸 함량을 빼준 값으로 계산하였다.

근육위성세포 배양

충청북도 청주시 청원구 오창읍에 위치한 팜스토리한냉(farmstory)에서 얻은 한우 뒷다리근육에서 근육위성세포를 추출하였다. 한우 뒷다리근육을 콜라게나아제 type 2 (Gibco™, Grand Island, NY, USA)를 이용하여 섬유조직을 제거하였다. 조직 잔해를 제거하고, 5분간 800 g로 원심분리하여 펠렛을 만들었다. 펠렛을 차례로 100 μm 나일론 필터와 40 μm 나일론 필터로 걸러 근육위성세포를 획득하였다. 근육위성세포의 배양은 37 ℃, 5% CO_2의 배양조건 하에 20% FBS가 첨가된 Ham's F-10 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 배양배지에서 수행하였다.

표고 자실체 물 추출물과 렌티난이 근육위성세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 근육위성세포 배양액에 표고 물 추출물과 렌티난을 첨가하여 배양하였다. 한우 근육위성세포에 표고 자실체 물 추출물과 렌티난의 처리 후 세포의 증식과 활성을 알아보기 위하여 각 처리별 표고 자실체 물 추출물을 2

mg/mL 처리하였고, 그리고 렌티난(BIOFRON, La Mirada, CA, USA)을 10, 20, 그리고 40 μg/mL을 첨가하여 배양하였다. 근육위성세포의 접종량은 확인 세포의 증식량 및 *MyoD*, *Myogenin*의 발현을 확인하기 1,800 cell/cm^{2}을 그리고 세포활성을 확인하기 위해 5,000 cell/cm^2 였다.

근육위성세포 증식

표고 자실체의 물 추출물과 렌티난의 첨가에 따른 세포의 증식 정도는 각각 세포배양 3일후와 4일후에서 확인하였다. 세포수는 배양된 근육위성세포에 typsin-EDTA를 처리해 세포현탁액을 만든 후, trypan blue로 세포를 염색해서 자동세포계수기(Invitrogen, us)를 이용하여 측정하였다. 세포 활성은 CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하였다.

*MyoD*와 *Myogenin* 유전자의 발현

근육의 형성에 관련된 유전자인 *MyoD*, *Myogenin*의 발현을 확인하였다. 첨가물에 대한 초기 반응을 확인하기 위하여 접종 1일 후 *MyoD* 유전자, *Myogenin* 유전자의 발현을 확인하였다. RNA의 추출은 TRIzol reagent를 사용하였다. cDNA는 GainWhite™ cDNA Syn. dT_{15} Master Mix (GainBio, Daejeon, Korea)를 사용하여 제작하였다. *MyoD* 유전자와 *Myogenin* 유전자의 발현은 실시간 중합효소 연쇄반응으로 분석하였다. 발현량 분석을 위한 내부 대조구는 *RPS9* 유전자를 사용하였다. 1 μL의 cDNA를 각각의 20 μL 반응액에서 주형으로 사용하였고, 반응액은 10 μL BioFACT™ 2X Real-Time PCR Master Mix (BIOFACT, Daejeon, Korea) 및 1 μL의 각 primer로 구성되었다. 유전자의 증폭은 95 ℃에서 10분 처리 후 95 ℃에서 10초, 60 ℃에서 20초, 그리고 72 ℃에서 20초를 40회 반복하였다. 분석을 위해 사용한 프라이머는 de Las Heras-Saldana 등[28]의 연구에서 사용한 *MyoD* (Forward - AGG CCT TCG AGA CGC TCA A / Reverse - TGG CGT TGC GCA GGA T), *Myogenin* (Forward - AGA AGG TGA ATG AAG CCT TCG A / Reverse - GCA GGC GCT CTA TGT ACT GGA T), *RPS9* (Forward - GAG CTG GGT TTG TCG CAA AA / Reverse - GGT CGA GGC GGG ACT TCT)을 사용하였다. 각 유전자들의 상대적인 정량은 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법을 이용하였다.

통계 처리

통계분석은 SPSS 16.0을 이용하였으며, 유의성 검정은 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance)을 하여 $p<0.05$의 유의수준에서 Duncan's multiple range tests로 사후검정 하였다.

결과 및 고찰

표고 자실체 추출조건에 따른 글루칸 함량 및 한우 근육위성세포의 증식

베타글루칸은 근아세포의 증식과 분화를 증가시키며, 골격근의 기능을 향상시키는 것으로 알려져 있다[11]. 따라서 본 연구에서 표고 물 추출 온도에 따른 베타글루칸 함량과 한우 근육위성세포의 증식에 대하여 알아보고자 하였다.

각 표고 물 추출물에서 추출 수율은 40 ℃ 8시간 추출 조건에서 약 31.5%로 가장 높았으며, 상온 24시간 추출 조건에서 약 19.7%, 85 ℃ 4시간 추출 조건에서 약 10.0%, 100 ℃ 4시간 추출 조건에서 약 6.8%이었다. 각 표고 물 추출물에서 베타글루칸 함량은 85 ℃ 4시간 추출 조건에서 약 15.20%로 가장 높았고, 100 ℃ 4시간 추출 조건에서 약 13.64%, 40 ℃ 8시간 추출 조건에서 각 약 9.48%이었고, 상온 24시간 추출 조건에서는 약 8.21%이었다. 추출된 베타글루칸의 함량은 85 ℃까지 점진적으로 증가하다가 100 ℃에서는 다시 낮아지는 경향을 나타냈다(Table 1).

버섯의 베타글루칸 추출 수율은 온도의 증가[29], 초임계 유체[30] 및 추출 압력[31]에 따라 증가하는 것으로 알려져 있다. 식물인 보리 품종 제주쌀보리, 제주청보리의 최적 추출온도는 65 ℃, 제주 맥주 보리의 최적 추출 온도는 75 ℃로, 보리의 경우에도 추출 온도에 따라서 베타글루칸의 추출양이 달랐다[32]. 본 연구에서도 추출 온도에 따라 베타글루칸의 추출양이 달랐으며, 85 ℃에서 가장 좋은 효율을 나타냈다.

각 표고 자실체 물 추출물을 근육세포의 배양에 적용한 후 1일이 지났을때, *MyoD* 유전자와 *Myogenin* 유전자의 발현을 확인하였다. *MyoD*와 *Myogenin*는 MRFs (Myogenic Regulatory Factors)로 근모세포의 증식, 이동 및 융합 조절의 기능을 하는 것으로 알려져 있다[33]. 특히 *MyoD*, *Myogenin*은 근관 형성과 근모세포 융합의 핵심 조절인자이다[34]. 100 ℃ 4시간 추출물을 처리한 경우 *MyoD*의 발현이 무처리에 비하여 약 4배 증가하였으며, 40 ℃ 물 추출물을 처리하였을 때, *MyoD* 유전자의 발현은 4.2배 그리고 *Myogenin* 유전자의 발현은 약 6.3배 증가한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). *MyoD* 유전자의 발현은 베타글루칸의 함량이 약 9.48% 이었던 40 ℃의 8시간 추출물과, 약 13.64%이었던 100 ℃ 4시간 추출물에서 발현량이 가장 높았고 베타글루칸 함량이 약 8.21% 이었던 상온 24시간 추출물에서 가장 낮았다. *Myogenin* 유전자의 발현량은 40 ℃의 8시간 추출물에서 가장 높았으며, 통계적으로 유의하지는 않지만 100 ℃ 4시간 추출물, 85 ℃ 4시간 추출물, 상온 24시간 추출물 순이었다.

Table 1 Total, alpha, and beta-glucan contents by water extraction temperature of *Lentinula edodes* fruit body (%)

Extraction condition	Extraction yield	Total glucan	α-glucan	β-glucan
Room temperature for 24 hours	19.7±2.44[1)a2)]	12.66±0.476[b]	4.45±0.070[a]	8.21±0.518[c]
40 ℃ for 8 hours	31.5±0.06[b]	13.26±0.901[b]	3.79±0.231[b]	9.48±1.119[c]
85 ℃ for 4 hours	10.0±1.71[c]	15.84±0.906[a]	0.65±0.028[d]	15.20±0.890[a]
100 ℃ for 4 hours	6.8±1.31[c]	14.88±0.208[a]	1.25±0.043[c]	13.64±0.251[b]

[1)]The results are represented by the mean±S.D. of values obtained from three replications.
[2)]Different letters indicate significant differences by Duncan's multiple range test ($p<0.05$)

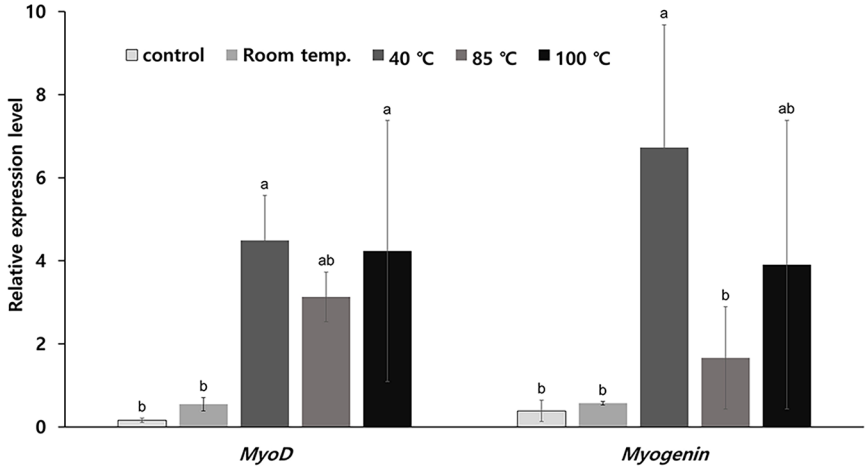

Fig. 1 Relative expression levels of *MyoD*, *Myogenin* in Hanwoo myosatellite cells by extracts of *Lentinula edodes* fruit body to extraction temperature (p <0.05)

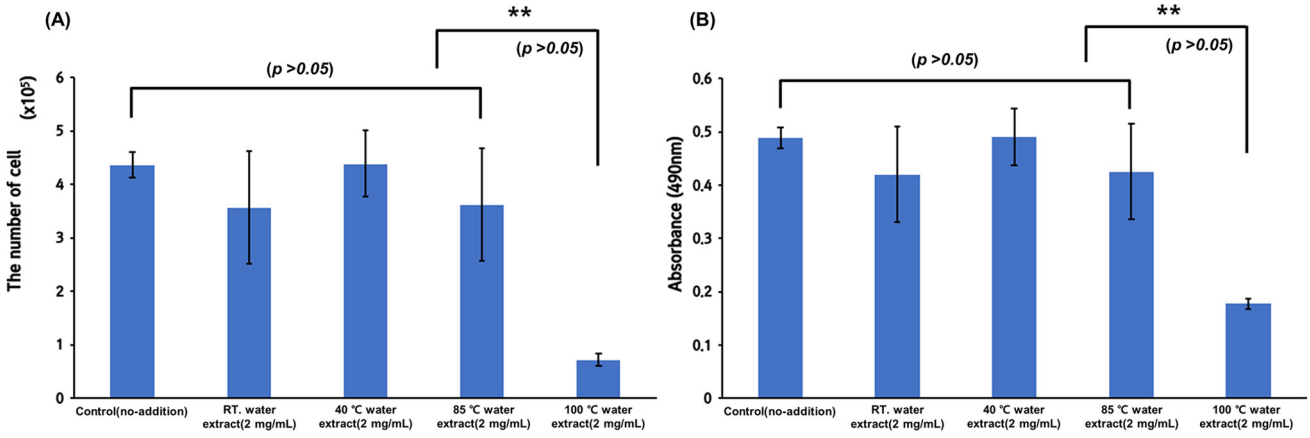

Fig. 2 Proliferation (A) and cell viability (B) of Hanwoo myosatellite cells by addition of water extract using *Lentinula edodes* fruit body (p <0.05)

표고 자실체 물 추출물을 한우 근육위성세포의 증식에 적용하였다 처리한 한우 근육위성세포의 수는 증식 3일차에 무처리에서 약 4.37×10^5개, 상온 24시간 추출 조건에서 약 3.56×10^5개, 40 ℃ 8시간 추출 조건에서 약 4.39×10^5개, 85 ℃ 4시간 추출 조건에서 약 3.62×10^5개, 100 ℃ 4시간 추출 조건에서 약 0.71×10^5개였다. 세포활성도는 증식 3일차에 각 처리에서 O.D. 값이 무처리에서 약 0.49, 상온 24시간 추출 조건에서 약 0.42, 40 ℃ 8시간 추출 조건에서 약 0.49, 85 ℃ 4시간 추출 조건에서 약 0.43, 100 ℃ 4시간 추출 조건에서 약 0.18이었다. 표고물 추출물을 근육위성세포에 적용하였을 때 증식과 활성은 무처리, 상온 24시간 추출, 40 ℃ 8시간 추출, 85 ℃ 4시간 추출은 통계적으로 차이를 보이지 않았고, 100 ℃ 4시간 추출 조건에서는 다른 조건보다 낮았다.

표고의 추출물은 그 추출 조건에 따라 면역조절 기능[35], 항산화 효과[36] 등이 달라지는 것으로 알려져 있다. 차가버섯(*Inonotus obliquus*)의 고온고압 추출물에서는 베타글루칸과 총 페놀 화합물이 많이 추출되며, 효소 추출물은 열수 추출물보다 더 많은 베타글루칸 추출되고, 효소와 초음파 추출은 열수 추출물보다 트리테르페노이드의 함량이 증가하는 것으로 밝혀졌다[37]. 또, 열수추출은 열 불안정성 화합물의 분해를 촉진하기도 한다[38]. 표고 85-95도 5시간 추출물은 P388 흰 생쥐의 백혈병성 임파모 세포에 독성을 나타내며[26], *Lignosus rhinocerotis*의 경우 4 ℃ 24시간 추출물이 90-95 ℃에서 60분 추출물에 비하여 인간의 암세포 및 일반세포에 대한 독성이 높은 것으로 알려져 있다[39]. *Donkioporiella mellea*의 추출물을 A549 세포주(인간 폐 암종)에 적용하였을 때, 25 ℃에서 24시간 추출물이, 90-95 ℃에서 20-30분 추출물에 비하여 높은 세포 독성 활성을 나타내는 경향을 나타내었는데, 90-95 ℃ 20-30분 추출물은 처리 농도가 높아지면서 세포 독성이 된 것으로 보고되었다[40]. 이처럼 버섯의 추출물을 이용한 암세포에 대한 세포 독성 연구들을 통하여 각 버섯의 종류, 추출 조건에 따라 세포독성이 달라질 수 있음을 알 수 있다. 따라서 각 추출 조건에 따라 추출물을 구성하는 물질의 구성이 달라질 수 있다. 본 연구에서 100 ℃ 4시간 추출 조건에서 한우근육위성세포의 증식에 적합하지 않은 물질이 추출되어 영향을 준 것으로 생각된다.

결과적으로, 각 추출 조건에 따라 추출되는 물질 및 그 함량

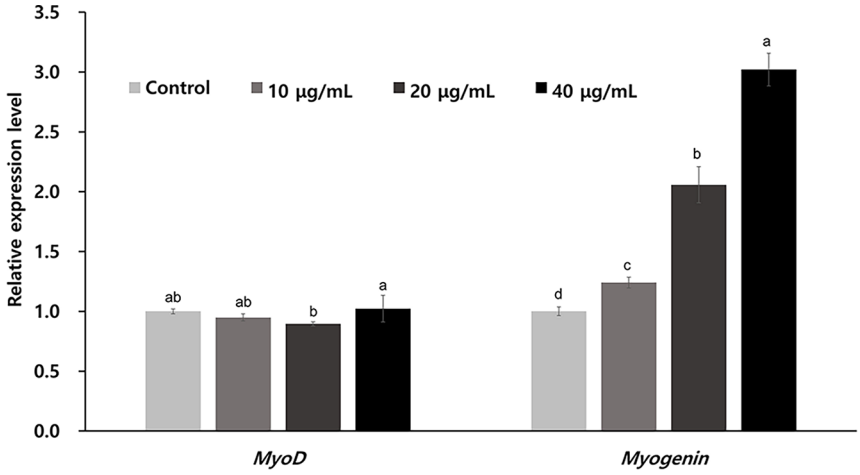

Fig. 3 Relative expression levels of *MyoD*, *Myogenin* in Hanwoo myosatellite cells by concentration of Lentinan added ($p<0.05$)

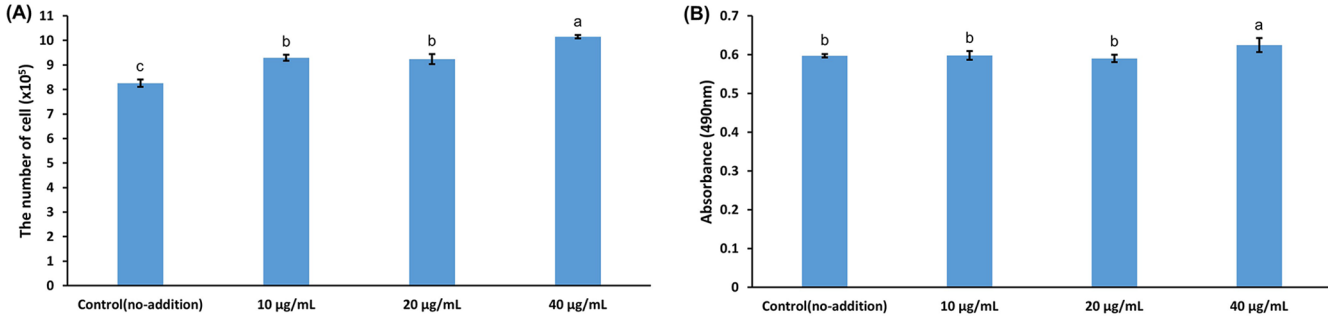

Fig. 4 Proliferation (A) and cell viability (B) of Hanwoo myosatellite cells by addition of Lentinan ($p<0.05$)

의 차이가 있을 수 있기 때문에, 본 연구에서 한우 근육위성세포는 표고의 물 추출조건에 따라 *MyoD*와 *Myogenin* 유전자의 발현량과 세포 증식 및 세포 활성도가 달랐던 것으로 추정된다.

렌티난 함량에 따른 한우 근육위성세포의 증식

베타글루칸은 근아세포의 증식과 분화를 증가시키며, 골격근의 기능을 향상시키는 것으로 알려져 있다[11]. 본 연구에서 베타글루칸의 함량이 다른 여러 추출처리의 추출물을 한우 근육위성세포에 적용하였으나, 세포의 증식과 활성에는 영향을 주지 못하였으며, 오히려 100 ℃ 4시간 추출물에서는 세포의 증식과 활성이 감소하는 것으로 나타났다. 그래서 표고의 베타글루칸인 렌티난을 직접 이용하여 한우 근육위성세포에 배양하였다.

렌티난 처리 1일 후 *MyoD* 유전자의 발현량은 무처리에 비하여 20 μg/mL 처리 조건에서 약 0.10배 감소하였으나, 40 μg/mL 처리 조건에서 큰 차이를 나타내지는 않았으나 약 0.02배 증가하였다. *Myogenin* 유전자의 발현량은 무처리에 비하여 10 μg/mL 처리 조건에서 약 0.24배, 20 μg/mL 처리 조건에서 약 1.06배, 40 μg/mL 처리 조건에서 약 2.02배 증가하였다(Fig. 3). *Myogenin*는 골격근 형성을 위한 핵심 발달 조절인자이며, 손상된 근육의 재생을 촉진하는 발달의 중요한 지점에서 발현되는 것으로 알려져 있다[41].

처리한 한우 근육위성세포의 수는 증식 4일후에 무처리에서 약 8.25×10^5 개, 10 μg/mL 처리 조건에서 약 9.30×10^5 개, 20 μg/mL 처리 조건에서 약 9.24×10^5 개, 40 μg/mL 처리 조건에서 약 10.15×10^5개였다. 렌티난을 처리한 모든 처리구에서 무처리보다 세포증식 효과가 있었으며, 40 μg/mL 처리 조건에서 가장 증식에 가장 유리하였다. 세포활성도는 증식 4일차에 각 처리에서 O.D. 값이 무처리에서 약 0.60, 10 μg/mL 처리 조건에서 약 0.60, 20 μg/mL 처리 조건에서 약 0.59, 40 μg/mL 처리 조건에서 약 0.62 였다. 세포활성도는 40 μg/mL 처리 조건에서 다른 처리보다 유의하게 높았다(Fig. 4).

결론적으로, 표고 물 추출물은 한우 근육위성세포의 증식에 효과적이지 못하였으나, 렌티난은 한우 근육위성세포의 *Myogenin* 유전자 발현을 증가시켰으며, 세포의 증식과 세포활성을 증가시키는 것으로 나타났다.

초 록

표고는 전세계적으로 많이 생산되는 버섯 중 하나이다. 베타글루칸은 근아세포의 증식과 분화를 증가시키며, 골격근의 기능을 향상시키는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 표고 물 추출물과 표고의 베타글루칸인 렌티난이 한우 근육세포의 증식에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 표고 물 추출물의 베타글루칸

의 함량은 85 ℃ 4시간 추출조건에서 약 15.20%, 100 ℃ 4시간 추출조건에서 약 13.64%, 40 ℃ 8시간 추출조건와 상온 24시간 추출조건에서 각각 약 9.48%와 약 8.21%였다. 표고 물 추출물을 한우 근육위성세포의 배양에 첨가하였을 때, *MyoD* 유전자는 40 ℃ 8시간, 그리고 100 ℃ 4시간 추출물에서 그리고 *Myogenin* 유전자는 40 ℃ 8시간 추출물에서 발현이 증가하였고, 증식과 활성은 무처리에 비하여 증가하지 않았다. 하지만, 근육위성세포의 배양에 렌티난의 첨가는 한우 근육위성세포의 세포분화와 근육형성에 관련된 *Myogenin* 유전자의 발현, 세포의 증식과 활성을 증가시켰다. 본 연구는 표고의 성분이 한우근육위성세포의 증식에 영향을 줄 수 있는 것을 확인하였으며, 추가 연구를 통하여 차후 버섯 산업 및 배양육 산업의 발전에 도움을 줄 수 있을 것이다.

Keywords 근육위성세포 · 렌티난 · 물추출물 · 표고 · 한우

감사의 글 이 논문은 충북대학교 국립대학육성사업(2020)지원을 받아 작성되었음.

References

1. Mattila P, lampi R, Ronkainen R, Toivo J, Piironen V (2002) Basic composition and amino acid contents of mushrooms cultivated in Finland. J Agric Food Chem 50: 6419–6422. doi: 10.1021/jf020608m
2. Rop O, Mlcek J, Jurikova T (2009) Beta-glucans in higher fungi and their health effects. Nutr Rev 67: 624–631. doi: 10.1111/j.1753-4887.2009.00230.x
3. Royse DJ, Baars J, Tan Q (2017) Current overview of mushroom production in the world. In: Diego CZ, Pardo-Giménez A (ed) Edible and medicinal mushrooms: technology and applications. John Wiley & Sons Ltd: Hoboken. pp 5–13
4. Seok SJ, Kim JH (2019) Studies on the biological activity of water extract and solvent fractions of wild *Grifola frondosa*. J Mushroom 17: 241–246. doi: 10.14480/JM.2019.17.4.241
5. Jang YA, Kim HN, Yang JC, Lee JW, Kim BA, Lee JT (2015) A study on the possibility of extracts from *Sparassis crispa* for cosmetic ingredients. J of Korean Oil Chemists' Soc 32: 731–739. doi: 10.12925/jkocs.2015.32.4.731
6. Kim AR, Kim JE, Park SN (2011) Antioxidative activity and component analysis of *Phellinus linteus* Extracts. J Soc Cosmet Scientists Korea 37: 309–318. doi: 10.15230/SCSK.2011.37.4.309
7. Cho JH, Lee JY, Lee MJ, Oh HN, Kang DH, Jhune CS (2013) Comparative analysis of useful β-glucan and polyphenol in the fruiting bodies of *Ganoderma* spp. J Mushroom Sci Prod 11: 164–170. doi: 10.14480/JM.2013.11.3.164
8. Lee JS, Lee SH, Jang YM, Lee JD, Lee BH, Jung JY (2011) Macrophage and anticancer activities of feed additives on β-glucan from *Schizophyllum commune* in breast cancer cells. J Korean Soc Food Sci Nutr 40: 949–955. doi: 10.3746/jkfn.2011.40.7.949
9. Hong KH, Kim HS, Jang KH, Kang SA (2015) The Improvement Effects of β-glucan on adiposity and serum lipids levels in high fat diet-Induced obese rats. Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society 16: 3973–3981. doi: 10.5762/KAIS.2015.16.6.3973
10. Tian J, Ma J, Ma K, Guo H, Baidoo SE, Zhang Y, Yan J, Lu L, Xu H, Wang S (2013) β-glucan enhances antitumor immune responses by regulating differentiation and function of monocytic myeloid-derived suppressor cells. Eur J Immunol 43: 1220–1230. doi: 10.1002/eji.201242841
11. Li Y, Fan Y, Pan H, Qian H, Qi X, Wu G, Zhang H, Xu M, Rao Z, Wang L, Ying H (2018) Effects of functional β-glucan on proliferation, differentiation, metabolism and its anti-fibrosis properties in muscle cells. Int J Biol Macromol 117: 287–293. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.188
12. Lee H, Choi S, Lee B, Kim E, Lee W, Han H, Kim K (2020) Effect of Pu'er tea extract on C2C12 myoblast differentiation. Journal of Digital Convergence 18: 585–594. doi: 10.14400/JDC.2020.18.12.585
13. Heo JW, Song EJ, Kim MJ, Kim JH, Kim SE (2022) Effects of *Camellia japonica* roots extract on myoblast differentiation and muscle atrophy in association with mitochondrial function. Current Developments in Nutrition 6: 24. doi: 10.1093/cdn/nzac047.024
14. Joglekar D, Warren R, Browe D, Ekwueme E, Dariani M, Padliya ND, Freeman JW (2020) Investigating the effects of fertilized egg yolk extract on myoblast proliferation and differentiation. Regen Eng Transl Med 6: 125–137. doi: 10.1007/s40883-019-00137-y
15. Bhat ZF, Bhat HF, Pathak V (2014) Chapter 79 - Prospects for In Vitro Cultured Meat - A Future Harvest. In: Lanza R, Langer R, Vacanti J (ed). Principles of Tissue Engineering, 4th edn. Academic Press, Cambridge, pp 1663–1683
16. Mourkioti F, Rosenthal N (2005) IGF-1, inflammation and stem cells: interactions during muscle regeneration. Trends Immunol 26: 535–542. doi: 10.1016/j.it.2005.08.002
17. Moritz MSM, Verbruggen SEL, Post MJ (2015) Alternatives for large-scale production of cultured beef: A review. J Integr Agric 14: 208–216. doi: 10.1016/S2095-3119(14)60889-3
18. Benjaminson MA, Gilchriest JA, Lorenz M (2002) In vitro edible muscle protein production system (mpps): stage 1, fish. Acta Astronaut 51: 879–889. doi: 10.1016/s0094-5765(02)00033-4
19. Okamoto Y, Haraguchi Y, Yoshida A, Takahashi H, Yamanaka K, Sawamura N, Asahi T, Shimizu T (2022) Proliferation and differentiation of primary bovine myoblasts using Chlorella vulgaris extract for sustainable production of cultured meat. Biotechnol Prog 38: e3239. doi: 10.1002/btpr.3239
20. Kim KH, Ka KH, Kang JH, Kim S, Lee JW, Jeon BK, Yun JK, Park SR, Lee HJ (2015) Identification of single nucleotide polymorphism markers in the laccase gene of shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*). Mycobiology 43: 75–80. doi: 10.5941/MYCO.2015.43.1.75
21. Bisen PS, Baghel RK, Sanodiya BS, Thakur GS, Prasad GB (2010) *Lentinus edodes*: a macrofungus with pharmacological activities. Curr Med Chem 17: 2419–2430. doi: 10.2174/092986710791698495
22. Ng ML, Yap AT (2002) Inhibition of human colon carcinoma development by lentinan from shiitake mushrooms (*Lentinus edodes*). J Altern Complement Med 8: 581–589. doi: 10.1089/10755530232082 5093
23. Seo S, Jang Y, Ryoo R, Ka KH (2018) Antioxidant properties of water extracts from *Lentinula edodes* cultivars grown on oak log. Kor J Mycol 46: 51–57. doi: 10.4489/KJM.20180007
24. Jung KI, Choi YJ, Oh JH, Lee JI, Park SY, Kim HR, Jeon BJ, Kim D, KongCS (2019) Quality characteristics of cookies added with *Lentinus edodes* water extract. J Life Sci 29: 955–963. doi: 10.5352/JLS.2019.29.9.955
25. Oh JH, Lee JI, Karadeniz F, Kim HR, Park SY, Jung KI, Jeon BJ, Kim D, Park JH, Kong CS (2021) Quality characteristics of grilled fish paste formulation added with hot water extract powder from *Lentinus edodes* using One-Way ANOVA. J Korean Soc Food Sci Nutr 50: 307–314. doi: 10.3746/jkfn.2021.50.3.307
26. Choi MY, Jung TY, Hahm KJ (1995) Cytotoxic effects of hot water soluble polysaccharides from mushroom, *Lentinus edodes* and vitamin A & E supplementation against P_{388} cells. korean J Nutrient 28: 1091–1099.
27. Hwang YJ, Nam NH, Chang MJ, Noh GW, Kim SH (2003) Effect of *Lentinus edodes* and *Pleurotus eryngii* extracts on proliferation and apoptosis in human colon cancer cell lines. J Korean Sco Food Sci nutr 32: 217–222. doi: 10.3746/jkfn.2003.32.2.217
28. de las Heras-Saldana S, Chung KY, Lee SH, Gondro C (2019) Gene expression of Hanwoo satellite cell differentiation in longissimus dorsi

and semimembranosus. BMC Genomics 20: 156. doi: 10.1186/s12864-019-5530-7
29. Lee SH, Jang GY, Kim KJ, Lee MJ, Kim TJ, Lee J, Jeong HS (2012) Effect of temperature, solvent concentration, and pH on the β-glucan extraction. Korean J Food & Nutr 25: 871–877. doi: 10.9799/ksfan.2012.25.4.871
30. Benito-Román Ó, Alonso E, Cocero MJ, Goto M (2016) β-glucan recovery from *Ganoderma lucidum* by means of pressurized hot water and supercritical CO_2. Food Bioprod Process 98: 21–28. doi: 10.1016/j.fbp.2015.12.007
31. Smiderle FR, Morales D, Gil-Ramírez A, de Jesus LI, Gilbert-López B, Iacomini M, Soler-Rivas C (2017) Evaluation of microwave-assisted and pressurized liquid extractions to obtain β-d-glucans from mushrooms. Carbohydr Polym 156: 165–174. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.09.029
32. Kim HJ, Kim HJ (2015) Physicochemical characteristics of Jeju barley and extracted β-glucan. Food Eng Prog 19: 132–138. doi: 10.13050/foodengprog.2015.19.2.132
33. Braun T, Gautel M (2011) Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. Nat Rev Mol Cell Biol 12: 349–361. doi: 10.1038/nrm3118
34. Luo W, Li E, Nie Q, Zhang X (2015) Myomaker, Regulated by MYOD, MYOG and miR-140-3p, promotes chicken myoblast fusion. Int J Mol Sci 16: 26186–26201. doi: 10.3390/ijms161125946
35. Murphy EJ, Masterson C, Rezoagli E, O'Toole D, Major I, Stack GD, Lynch M, Laffey JG, Rowan NJ (2020) β-Glucan extracts from the same edible shiitake mushroom *Lentinus edodes* produce differential in-vitro immunomodulatory and pulmonary cytoprotective effects - Implications for coronavirus disease (COVID-19) immunotherapies. Sci Total Environ 732: 139330. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.139330
36. 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 Chemistry 99: 381–387. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.08.004
37. Hwang AY, Yang SC, Kim J, Lim T, Cho H, Hwang KT (2019) Effects of non-traditional extraction methods on extracting bioactive compounds from chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) compared with hot water extraction. LWT 110: 80–84. doi: 10.1016/j.lwt.2019.04.073
38. Roselló-Soto E, Parniakov O, Deng Q, Patras A, Koubaa M, Grimi N, Boussetta N, Tiwari BK, Vorobiev E, Lebovka N, Barba FJ (2016) Application of Non-conventional Extraction Methods: Toward a Sustainable and Green Production of Valuable Compounds from Mushrooms. Food Eng Rev 8: 214–234. doi: 10.1007/s12393-015-9131-1
39. Lau BF, Adbullah N, Aminudin N, Lee HB (2013) Chemical composition and cellular toxicity of ethnobotanical-based hot and cold aqueous preparations of the tiger's milk mushroom (*Lignosus rhinocerotis*). J Ethnopharmacol 150: 252–262. doi: 10.1016/j.jep.2013.08.034
40. Sairi AMM, Ismail SI, Sukor A, Rashid NMN, Saad N, Jamian S, Abdullah (2020) Cytotoxicity and anticancer activity of *Donkioporiella mellea* on MRC5 (Normal human lung) and A549 (Human lung carcinoma) cells lines. Evid Based Complement Alternat Med 2020: 7415672. doi: 10.1155/2020/7415672
41. Faralli H, Dilworth FJ (2012) Turning on myogenin in muscle: a paradigm for understanding mechanisms of tissue-specific gene expression. Comp Funct Genomics 2012: 836374. doi: 10.1155/2012/836374