

## 상황버섯(*Phellinus linteus*) 균사체 액체 발효물로부터 면역 활성 다당 분획

신현영<sup>1,2</sup> · 김 훈<sup>3</sup> · 정은진<sup>4</sup> · 김현경<sup>4</sup> · 신중철<sup>5</sup> · 최상용<sup>5</sup> · 서형주<sup>1</sup> · 문성권<sup>3</sup> · 유광원<sup>4</sup>

<sup>1</sup>고려대학교 대학원 의생명융합과학과, <sup>2</sup>고려대학교 4단계 BK21 러닝헬스시스템융합사업단  
<sup>3</sup>중앙대학교 생명공학대학, <sup>4</sup>한국교통대학교 식품영양학전공, <sup>5</sup>(주)네오크레마 연구개발부

### Immunostimulatory Polysaccharide Fractionated from a Liquid Culture by *Phellinus linteus* Mycelium

Hyun Young Shin<sup>1,2</sup>, Hoon Kim<sup>3</sup>, Eun-Jin Jeong<sup>4</sup>, Hyun-Gyeong Kim<sup>4</sup>, Jung-Cheul Shin<sup>5</sup>,  
Sang-Young Choi<sup>5</sup>, Hyung Joo Suh<sup>1</sup>, Sung-Kwon Moon<sup>3</sup>, and Kwang-Won Yu<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Integrated Biomedical and Life Science, Graduate School and

<sup>2</sup>BK21FOUR R&E Center for Learning Health Systems, Korea University

<sup>3</sup>College of Biotechnology and Natural Resources, Chung-Ang University

<sup>4</sup>Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation

<sup>5</sup>Department of R & D, Neo Cremar Corporation Limited

**ABSTRACT** A liquid culture was fermented using *Phellinus linteus* mycelium, and 5 fractions were isolated to evaluate the possibility of using them as postbiotic ingredients. The fractions isolated were: Hot-water extract (PL-HW) from whole liquid culture, crude polysaccharide (PL-CP) from PL-HW by ethanol (EtOH) precipitation, hot-water extract (PM-HW) from isolated mycelia, crude polysaccharide (PM-CP) from PM-HW, and exopolysaccharide (EPS) from culture supernatant by EtOH precipitation. Innate immunostimulating activity using the RAW 264.7 cell line showed that EPS induced the most effective production of tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), interleukin-6 (IL-6), and nitric oxide. In addition, adaptive immunostimulating activity using splenocytes isolated from C3H/HeN mice revealed that PL-HW, PM-HW, and EPS induced prominent splenocyte proliferation. Specifically, EPS stimulated the production of Th1-activated cytokines such as TNF- $\alpha$  and interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) in splenocytes, suggesting its effectiveness in cell-mediated adaptive immune activation. General chemical analysis showed that the immunostimulatory EPS was composed of neutral sugar (90.2%), uronic acid (6.1%), protein (1.2%), and polyphenols (2.5%). Component sugar analysis indicated that EPS was composed of a high proportion of glucose (94.9%), and small amounts of mannose (3.8%), galactose (0.9%), and glucuronic acid (0.4%). In conclusion, it was confirmed that glucan-type exopolysaccharide fractionated from the culture supernatant of the *P. linteus* mycelium can promote both innate and adaptive immune cell stimulation.

**Key words:** *Phellinus linteus* mycelium, liquid culture, innate immunostimulating activity, splenocyte, exopolysaccharide

## 서 론

포스트바이오틱스(postbiotics)란 프로바이오틱스를 포함하는 다양한 미생물의 대사 및 발효 작용을 통해 체외로 분비하거나 생성되는 모든 대사산물을 의미하는 포괄적인 용어로(Kim과 Park, 2021), 이들은 주로 인체에 유익한 영향을 미치는 것으로 알려진 기능성 대사산물을 일컫는다.

아직 정확한 정의에 대해서는 논의 중에 있지만, 최근 연구에서는 포스트바이오틱스를 프로바이오틱스가 생성하는 대사산물에 한정하지 않고, 다양한 세균, 진균 및 곰팡이 기원의 산물로서 오히려 숙주에 유익한 효과를 부여하는 기능에 초점을 맞춘 용어로 사용되고 있는 실정이다(Żółkiewicz 등, 2020). 현재까지 연구된 포스트바이오틱스의 종류로는 단쇄 지방산(short chain fatty acid, SCFA), 향균성 펩타이드

Received 13 September 2021; Revised 27 September 2021; Accepted 28 September 2021

Corresponding author: Kwang-Won Yu, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, 61, Daehak-ro, Jeungpyeong-gun, Chungbuk 27909, Korea, E-mail: kwyu@ut.ac.kr

Author information: Hyun Young Shin (Graduate student), Hoon Kim (Professor), Eun-Jin Jeong (Student), Hyun-Gyeong Kim (Student), Hyung Joo Suh (Professor), Sung-Kwon Moon (Professor), Kwang-Won Yu (Professor)

© 2022 The Korean Society of Food Science and Nutrition.

This is Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

(anti-microbial peptide, AMPs) 및 세포 외 고분자 물질(extracellular polymeric substances) 등이 알려져 있으며, 최근 이들에 의한 염증 및 면역조절 작용, 유해균 억제 및 유익균 활성화, 정장 작용, 항암 작용, 항균 작용 등 다양한 건강증진 역할이 보고되고 있다(Cuevas-González 등, 2020). 한편 포스트바이오틱스 생산에 관한 연구로는 프로바이오틱스인 유산균에 의해 생성된 대사산물이 주를 이루고 있는 반면에(Moradi 등, 2020), 진균(fungus) 등의 고등균류에 의해 생성된 포스트바이오틱스 연구는 상대적으로 매우 부족한 실정이다. 하지만 최근 버섯, 효모 등의 진균류에 대한 균사체 배양 기술이 발전함에 따라 배양 과정 중 체외로 분비하는  $\beta$ -glucan 등의 exopolysaccharide(EPS)가 건강에 긍정적인 영향을 준다고 보고되고 있어(Jiang 등, 2016), 본 연구에서는 버섯 균사체의 배양을 통해 생성되는 대사산물을 이용하여 면역증진 기능성 포스트바이오틱스 소재로서의 활용 가능성을 확인하고자 하였다.

소나무 비늘버섯과(*Hymenochetaceae*), 진흙버섯속(*Phellinus*)에 속하고, 주로 뿔나무 줄기에 자생하며 삿갓표면을 제외하고는 모두 황색을 띄고 있는 상황버섯은 전 세계적으로 *P. linteus*, *P. ignarius* 및 *P. baumii* 등의 다양한 종이 보고되고 있으나, 우리나라에서는 목질진흙버섯(*P. linteus*)만을 상황버섯으로 인정하고 있다(Lee 등, 2006). 상황버섯은 예로부터 식용보다는 다양한 치료제로 주로 이용되어 온 우리나라의 대표적인 약용버섯으로, 최근 항산화(Song 등, 2003), 항염증(Huang 등, 2012), 항암(Chung 등, 2010) 및 면역 활성화(Kim 등, 1996) 등의 다양한 생리활성 증진기능이 보고되고 있다. 이들의 탁월한 생리활성으로 인해 암시약의 원료로 분류되기도 했으나, 다양한 추가 연구를 통해 부작용이 거의 없는 것으로 확인되면서 최근 다시 식품원료로 변경되기도 했다. 이처럼 우수한 생리활성을 나타내고 있는 상황버섯에는 polysaccharides, terpenoids, phenylpropanoids 및 furans 등의 활성 물질들이 존재한다고 보고되고 있는데, 이들은 다양한 질병을 예방하는 약리 활성이 우수한 것으로 알려져 있다(Chen 등, 2019). 현재까지 상황버섯의 균사체 배양물을 이용하여 항산화(Ma 등, 2014), 당뇨 개선(Hwang 등, 2005) 및 면역 활성화(Jiang 등, 2016) 등의 생리활성이 연구되어져 왔으나, 균사체 액체 발효물에서 균사체 내 및 균사체 외 대사산물 등에 관한 생리활성 비교 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 상황버섯 균사체 액체 발효물로부터 균사체와 배양액이 모두 포함된 whole liquid culture와 배양액이 제거된 균사체를 열수 추출하고 주정 침전한 획분 및 균사체를 제외한 배양액만을 주정 침전시켜 얻은 EPS 획분을 각각 분획하여 RAW 264.7 대식세포주와 마우스로부터 얻은 초대배양(primary cell culture) 비장세포(splenocyte)를 이용한 선천 및 적응 면역 세포 활성화를 측정하여 면역 활성 포스트바이오틱스 소재로서의 산업적 활용 가능성을 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 상황버섯 균사체 액체 발효물

본 연구에 사용된 상황버섯(*Phellinus linteus*) 균사체는 한국미생물보존센터(KCCM; Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였으며, 시약은 potato dextrose agar(PDA), potato dextrose broth(PDB), calcium carbonate( $\text{CaCO}_3$ ), magnesium sulfate( $\text{MgSO}_4$ ), monosodium glutamate, glucose,  $\alpha$ -amylase, corn starch를 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 이용하였다. 기본배지로 PDB배지와 (주)네오크레마(Seoul, Korea)에서 제조한 배양배지를 이용하였으며, 1차로 PDA 평판배지에 접종하여 28°C 배양기에서 7일 동안 배양하였다. 이후 상황버섯 균주의 절편을 취하여 멸균된 시험관에 같이 넣어 PDB배지로 접종하여 27°C, 150 rpm의 조건에서 3~5일간 현탁 배양을 실시하였다. 배양된 균주는 -80°C 초저온냉동고(Ilshin Biobase, Dongducheon, Korea)에 frozen vegetative mycelium 형태로 보관하여 이용하였다. 2차 배양배지는 1차 배양배지와 동일한 조성으로 이용하였으며, 1차 배양시킨 균주를 2차 배양배지에 전량 배양하여 28°C, 150 rpm 조건에서 5일간 현탁 배양하였다. 본 배양은 앞서 배양한 동일 배지 조성을 이용하여 5 L를 발효기(Fermentec, Cheongju, Korea)에 3.2 L를 분주하여 2차 배양시킨 균사체 300 mL를 배양하여 37°C에 500 rpm 회전수와 1 vvm의 통기량 pH 5.0 조건에서 7~10일 배양하였다.

### 상황버섯 균사체 액체 발효물의 분획

상황버섯 균사체 액체발효물의 분획 과정은 Fig. 1에 나타냈다. 배양이 완료된 상황버섯 균사체 액체 발효물(균사체와 배양액을 모두 포함한 whole liquid culture; PL)은 7,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 균사체(PM) 및 배양액(culture supernatant)으로 분리하였다. 먼저, PL은 121°C에서 60분간 고압 멸균하고 7,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 회수하고 여과(filter paper)한 후 회전감압농축기(Eyela, Tokyo, Japan)에서 농축 및 동결건조(Ilshin Biobase)를 진행하여 상황버섯 균사체 액체 발효물의 열수추출물(PL-HW)로 조제하였다. 또한 배양액이 제거된 균사체(PM)도 상기와 동일한 방법으로 추출하여 균사체 열수추출물(PM-HW)로 조제하였다. 한편, 열수추출물인 PL-HW와 PM-HW는 각각 소량의 증류수에 용해한 다음 3배량(v/v)의 주정(95%)을 첨가한 후 침전물을 회수하여 농축 및 동결건조하여 각각의 조다당 획분(PL-CP & PM-CP)으로 분획하였다. 또한, 균사체가 제거된 배양액에 주정을 첨가하여 침전물을 회수하고 동결건조하여 EPS 획분으로 분획하여 시료로 사용하였다.

### RAW 264.7 세포주를 이용한 대식세포 자극 활성

마우스 유래 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포

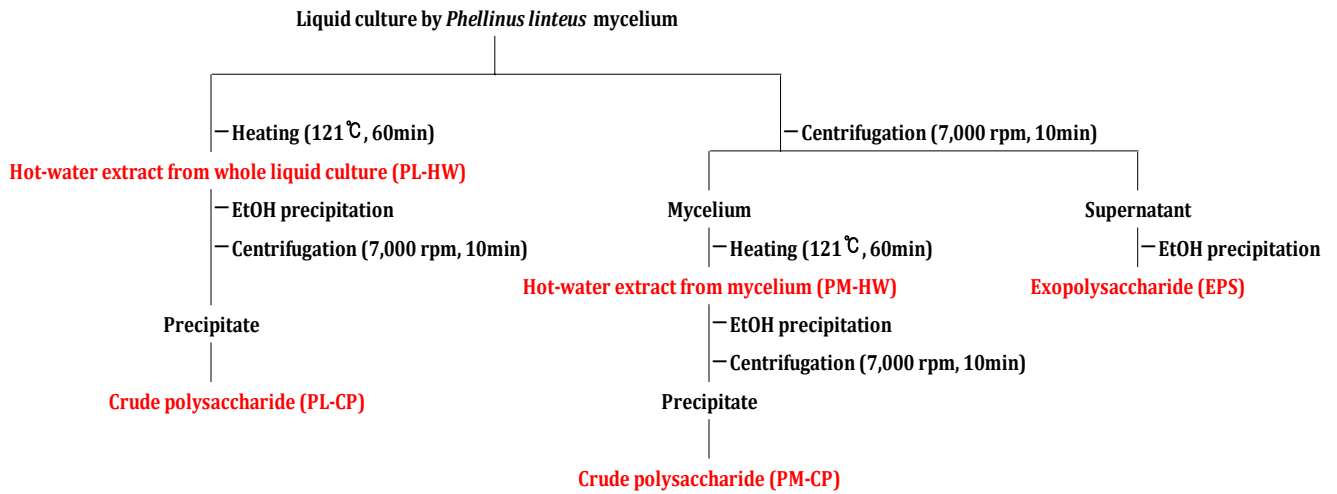


Fig. 1. Fractionation of liquid culture by *Phellinus linteus* mycelium.

주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 구입하였으며, 10% fatal bovine serum(Gibco, Waltham, MA, USA)과 1% penicillin-streptomycin(GenDEPOT, Katy, TX, USA)을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Hyclone, San Angelo, TX, USA) 배지에서 배양하였다. 세포주는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건이 유지되는 배양기 (Sanyo, Sakata, Japan)에서 2~3일에 한 번씩 계대배양하여 연구에 이용되었다. 한편, 액체 발효물 5종 희분에 의한 대식세포주의 면역 활성을 평가하기 위해 RAW 264.7 세포주를 8×10<sup>5</sup> cells/mL의 농도로 세포액을 조제하고 96 well plate에 200 μL 분주하여 배양기에서 약 18시간 배양하였다. 이후 배양액을 제거하고 serum free-DMEM 180 μL와 적당한 농도로 조제된 시료 20 μL를 첨가하여 24시간 동안 재배양하였다. 시료 처리에 의한 RAW 264.7 세포의 독성 평가는 0.1 mg/mL의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(Invitrogen, Eugene, OR, USA) 용액을 100 μL 분주하여 30분간 배양하고, 이후 dimethyl sulfoxide 100 μL를 분주하여 보라색의 pigment를 용해시켜 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시료 무처리군에 대한 세포 생존율(cell viability, %)로 확인하였다. 한편, 세포배양을 통해 형성된 산화질소(nitric oxide, NO)의 함량은 griess assay를 통해 측정되었으며 sodium nitrate를 이용하여 표준곡선을 작성하여 μM로 함량을 평가하였다. 세포에서 분비되는 사이토카인인 tumor necrosis factor-α(TNF-α)는 Invitrogen에서 구입한 enzyme-linkage immunosorbent assay(ELISA kit)를 통해 분석하였으며, monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1) 및 interleukin-6(IL-6)는 BD Bioscience(San Diego, CA, USA)에서 구입한 ELISA kit으로 측정하였다. 각 제조사에서 제공된 standard reference를 이용하여 작성된 표준곡선을 통해 함량을 계산하였다.

### 비장세포의 마이트젠 및 사이토카인 생성능

비장세포를 통한 동물실험은 중앙대학교 동물실험윤리위원회 의 심의(승인번호: 2021-00032)를 거친 후 진행하였으며, 실험동물은 6주령의 C3H/HeN 마우스(♀)를 두얼바이오택(Seoul, Korea)로부터 구입하여 1주일간 정상식으로 적응 기간을 거친 후 실험에 사용되었다. 마우스를 경추 탈구시킨 후 무균적으로 비장을 적출하고 마쇄하여 금속망에 여과하여 비장세포(splenocyte)를 회수하였다. 회수한 비장세포는 0.2% NaCl을 이용하여 적혈구를 제거하고 2.5×10<sup>6</sup> cells/mL의 농도로 조제한 후 96-well plate에 180 μL씩 분주하였다. 이후 희석된 시료들을 20 μL 첨가하고 48시간 동안 배양함으로써 비장세포에 미치는 시료의 활성을 조사하였다. 시료에 대한 비장세포 증식능은 Ez-cytox (Dogenbio, Seoul, Korea)를 이용하여 평가되었으며, 시료 무처리군에 대한 세포 생존율(cell viability, %)로 확인하였다. 한편, 비장세포가 생산하는 사이토카인 중 Th1 림프구 활성화에 중요한 역할을 하는 TNF-α(Invitrogen) 및 interferon-γ(IFN-γ, BD bioscience)는 ELISA법을 이용하여 평가하였으며, 각 제조사에서 제공되는 standard reference를 이용하여 계산되었다.

### 구성분 및 구성당 분석

구성분 평가를 위한 중성당 및 산성당 함량은 phenol-sulfuric acid법(Dubois 등, 1956) 및 *m*-hydroxybiphenyl 법(Blumenkrantz와 Asboe-Hansen, 1973)을 통해 분석하였으며, 표준물질로 glucose 및 glucuronic acid를 이용하였다. 단백질 함량은 bovine serum albumin(BSA)을 표준물질로 하여 Bradford(1976)의 방법으로 측정되었다. 총 폴리페놀 함량 분석은 Marinova 등(2005)의 방법을 이용하여 평가하였으며, 표준물질로 gallic acid를 이용하여 계산되었다. 중성당, 산성당, 단백질 및 총 폴리페놀 함량은 %(w/w)로 나타내었으며, 상황버섯 균사체 액체 발효물 활

성 분석의 구성당은 Honda 등(1989)의 방법을 이용하여 HPLC-UV로 분석하였다. 시료의 가수분해를 위해 2 M trifluoroacetic acid를 사용하고, 0.3 M NaOH와 PMP(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazoline)를 첨가하여 단당류에 PMP를 결합시켰다. 0.3 M HCl을 첨가하여 중화시키고 2상 용매계(water, chloroform)로 분리 및 추출하고 물 층만을 회수하여 PVDF membrane filter(0.45 µm, Jaema Trade Inc., Gangwon, Korea)로 여과한 후 YMC-Triart C18 column(250×4.6 mm, 5 µm, YMC Co., Ltd., Kyoto, Japan)이 장착된 HPLC(YL 9100, Young Lin Co., Ltd., Gyeonggi, Korea)에서 254 nm의 파장에서 분석하고 결과는 단당류의 mole%를 peak area와 response factor를 이용하여 나타냈다.

### 통계처리

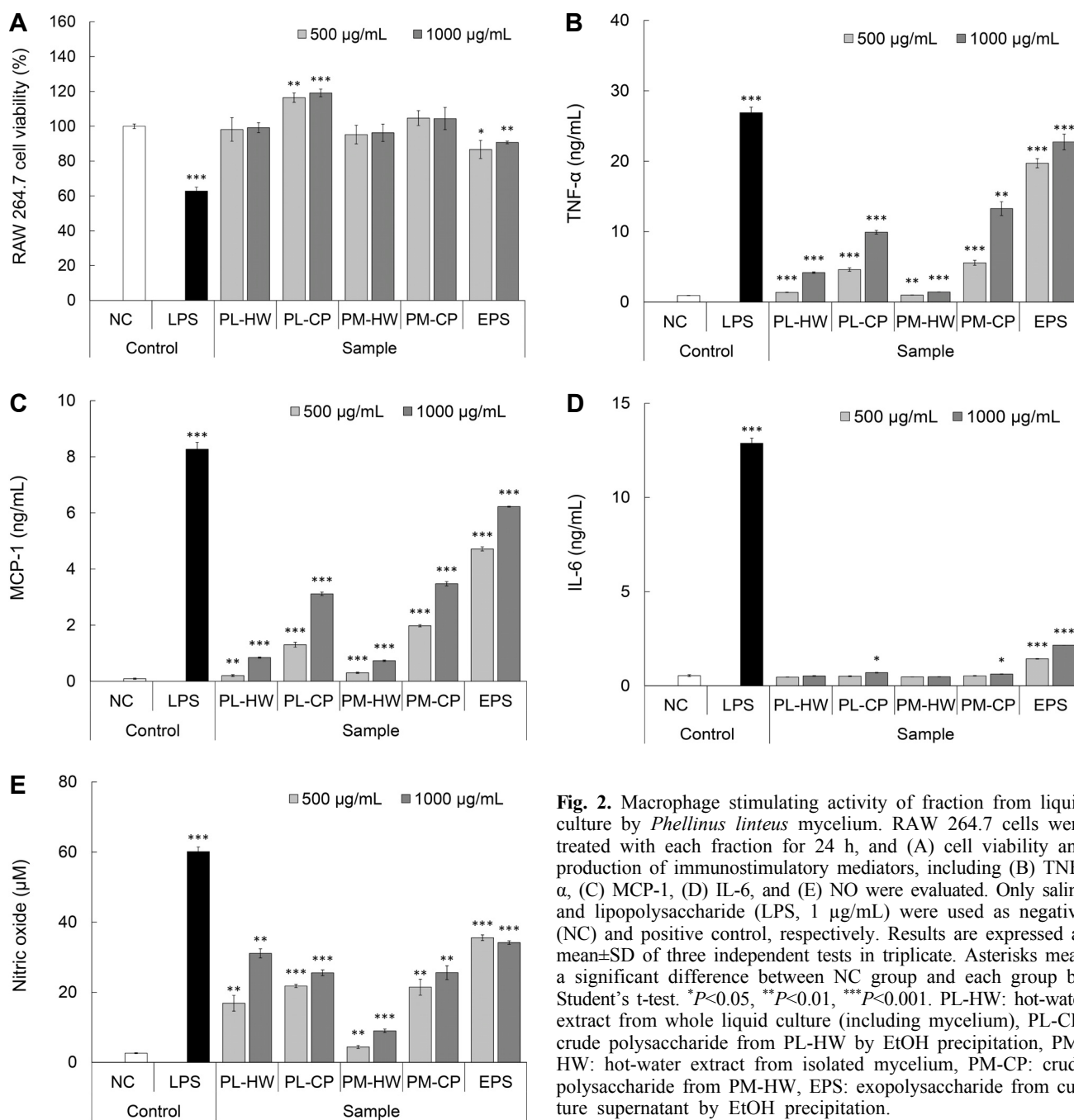
모든 시험은 3번 반복하여 실시하였으며 결과를 평균±표준편차(standard deviation, SD)로 나타냈다. RAW 264.7 세포주 및 비장세포 관련 면역 활성은 Statistical Package for the Social Science(SPSS V26, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용한 Student's t-test로 계산하였으며 각각  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$  수준에서 대조군과의 유의성을 검증하였다. 한편, 구성분의 분석결과는 분산의 동질성을 비교하기 위해 Levene's test를 실시한 후, 동질성을 갖는 경우 분산 분석(ANOVA)을 실시한 다음 각 측정값 간의 유의성을 Duncan's multiple range test로  $P < 0.05$  수준에서 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### RAW 264.7 세포주를 이용한 대식세포 자극 활성

마우스 유래 RAW 264.7 세포주는 선천면역계(자연면역계)를 담당하는 대표적인 대식세포는 주로 적응면역(획득면역)이 작용하기 전 신속하게 1차 방어의 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Yu 등, 2012). 또한, 항원-항체복합체의 제거 뿐만 아니라 바이러스, 미생물 및 외부물질에 의한 식세포 작용과 적응면역에 관여하기도 한다(Shin 등, 2021). 따라서 본 연구에서는 상황버섯 균사체 액체 발효물의 선천적 면역 활성 기능성 소재로서의 활용 가능성을 확인하기 위해 RAW 264.7 대식세포주를 5종 희분과 배양한 후 대식세포 활성화에 기여하는 NO와 사이토카인의 생성능을 평가하고자 하였다. 먼저, 시료 처리에 의한 RAW 264.7 세포독성 평가를 진행하였다(Fig. 2A). 5종의 희분은 500과 1,000 µg/mL의 농도에서 음성대조군(negative control; NC) 대비 85% 이상의 생존율을 확인하였으며, ISO 가이드라인에 따르면 시료 대조군 대비 생존율이 80% 이상이면 시료에 따른 세포독성은 없다고 평가하기 때문에 유의적인 세포독성은 나타나지 않는 것으로 확인되었다(López-García 등, 2014). 시료 처리에 의한 대식세포 활성을 평가하기 위하여 면역세

포의 조절작용에 중요한 사이토카인으로, 주로 활성화된 대식세포에 의해 분비되어 종양 생성과 바이러스 복제를 억제하는 능력을 갖는 것으로 알려져 있는 TNF-α의 생성능을 평가하였다. 양성대조군으로 이용된 lipopolysaccharide (LPS)는 그람음성 박테리아의 구성 물질로, 선천면역 반응을 활성화시켜 면역 관련 cytokine 등을 방출하는 것으로 보고되어 있으며(Park 등, 2019), 1 µg/mL 농도에서 음성대조군(NC, 0.9 ng/mL) 대비 26.9 ng/mL(28.7배)의 통계적으로 유의한 TNF-α 생성능이 확인되었고, 5종 희분은 500과 1,000 µg/mL의 농도에서 NC 대조군 대비 통계적으로 유의한 TNF-α 생성능이 확인되었다(Fig. 2B). 먼저, PL의 열수추출물(PL-HW)은 NC 대조군 대비 1.4와 4.2 ng/mL(1.5와 4.5배)의 통계적으로 유의한 생성능이 확인되었고, PL-HW의 주정 침전을 통해 조제된 조다당 희분(PL-CP)은 동일 농도에서 NC 대조군 대비 4.6과 9.9 ng/mL(4.9와 10.6배)가 증가한 TNF-α 생성능을 나타냈다. PL로부터 분리된 균사체의 열수추출물인 PM-HW는 NC 대조군 대비 1.0과 1.4 ng/mL(1.1과 1.5배)의 TNF-α 생성능을 보여 큰 차이를 보이지 않았으나, 주정 침전을 통해 조제된 조다당 희분(PM-CP)은 PM-HW보다 크게 증진된 5.6과 13.3 ng/mL(6.0과 14.2배)의 생성능을 나타냈다. 또한, PL로부터 분리한 배양액의 주정 침전물인 EPS 희분은 NC 대조군 대비 19.7과 22.7 ng/mL(21.1과 24.3배)의 통계적으로 유의한 TNF-α 생성능으로 5종 희분 중 가장 우수한 TNF-α 생성능을 가지는 것으로 확인되었다. 대식세포 활성을 평가하기 위한 2번째 마커는 MCP-1로 활성화된 대식세포에서 생성되어 감염이나 조직 손상에 의해 유도되는 염증 반응 장소로 단구세포 등을 동원시키는 케모카인이다. MCP-1의 생성능은 Fig. 2C에 나타냈으며, LPS 대조군은 1 µg/mL의 농도에서 NC 대조군(0.1 ng/mL) 대비 8.3 ng/mL(88.1배)의 통계적으로 유의한 MCP-1 생성능을 보였다. 5종 희분을 처리한 경우, 균사체와 배양액의 whole liquid culture의 열수추출물인 PL-HW는 500과 1,000 µg/mL의 농도에서 NC 대조군 대비 0.2와 0.8 ng/mL(2.2와 9.0배)였으나, PL-HW의 주정 침전을 통해 분획된 PL-CP는 PL-HW에 비해 500과 1,000 µg/mL의 농도에서 각각 1.3과 3.1 ng/mL(13.9와 33.2배)의 증진된 MCP-1 생성능을 나타냈다. 또한, 균사체만의 희분에서도 열수추출물(PM-HW)은 NC 대조군 대비 500과 1,000 µg/mL의 농도에서 각각 0.3과 0.7 ng/mL(3.2와 7.8배)의 MCP-1 생성능을 나타냈으나 주정 침전물인 조다당 희분(PM-CP)은 동일 농도에서 각각 2.0과 3.5 ng/mL(21.1과 37.1배)의 생성능 증가를 확인할 수 있었다. 한편, 배양액만의 주정 침전물인 EPS는 500 µg/mL 농도에서도 NC 대조군 대비 4.7 ng/mL(50.3배)의 생성으로 TNF-α의 경우와 유사하게 5종 희분 중 가장 우수한 MCP-1 생성능을 확인할 수 있었다. 세 번째 마커인 IL-6는 pathogen-associated molecular patterns로 알려진 특이적인 미생물 화합물에 반응하여 대식세포로부터 분비되는 사이토카인으로



**Fig. 2.** Macrophage stimulating activity of fraction from liquid culture by *Phellinus linteus* mycelium. RAW 264.7 cells were treated with each fraction for 24 h, and (A) cell viability and production of immunostimulatory mediators, including (B) TNF- $\alpha$ , (C) MCP-1, (D) IL-6, and (E) NO were evaluated. Only saline and lipopolysaccharide (LPS, 1  $\mu$ g/mL) were used as negative (NC) and positive control, respectively. Results are expressed as mean $\pm$ SD of three independent tests in triplicate. Asterisks mean a significant difference between NC group and each group by Student's t-test. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001. PL-HW: hot-water extract from whole liquid culture (including mycelium), PL-CP: crude polysaccharide from PL-HW by EtOH precipitation, PM-HW: hot-water extract from isolated mycelium, PM-CP: crude polysaccharide from PM-HW, EPS: exopolysaccharide from culture supernatant by EtOH precipitation.

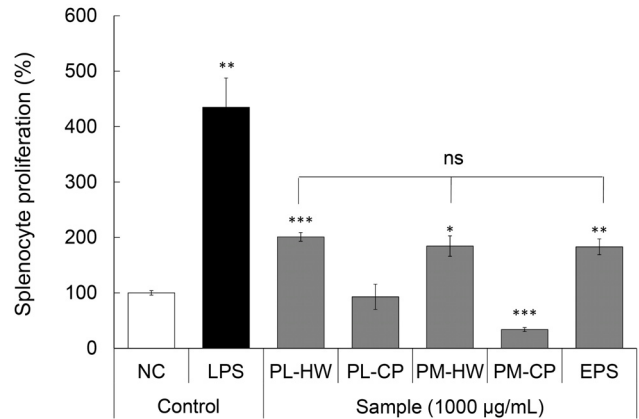
로 시료의 IL-6 생성능은 Fig. 2D에 나타냈는데, LPS 대조군은 NC 대조군(0.5 ng/mL) 대비 12.9 ng/mL(23.8배)의 IL-6 생성능을 보였다. 그러나 PL-HW 및 PM-HW는 통계적으로 유의한 IL-6 생성능은 확인되지 않았으며, 이들의 주성 침전으로부터 분획된 조다당 획분인 PL-CP와 PM-CP도 1,000  $\mu$ g/mL의 농도에서 NC 대조군 대비 유의적인 IL-6 생성능을 보이지는 않았다. 그러나 EPS의 경우에는 500과 1,000  $\mu$ g/mL 농도에서 각각 1.4와 2.2 ng/mL(2.6과 4.0배)의 유의적인 IL-6 생성능이 확인되었다. 마지막으로, 대식세포에서 생성되는 면역 반응의 중요한 조절인자 중의

하나로 외부 침입물질이나 종양에 대한 숙주의 방어기전에 중요한 역할을 하는 NO 생성능은 Fig. 2E에 나타냈다. 양성 대조군으로 이용된 LPS 처리군은 NC 대조군(2.6  $\mu$ M) 대비 60.1  $\mu$ M(22.9배)의 통계적으로 유의한 NO 생성능이 확인되었고, 상황버섯 균사체 액체 발효물 획분 중 PL-HW의 경우에도 500과 1,000  $\mu$ g/mL 농도에서 각각 16.9와 31.1  $\mu$ M(6.4와 11.8배)의 통계적으로 유의한 NO 생성능을 보였다. PL-CP의 경우 500  $\mu$ g/mL의 농도에서는 PL-HW보다 우수한 활성(21.8  $\mu$ M, 8.3배)을 나타냈으나 1,000  $\mu$ g/mL 농도에서는 25.6  $\mu$ M(9.7배)로 PL-HW보다 감소하는 결과를

보여주었다. 균사체만의 PM-HW는 NC 대조군 대비 4.4와 9.0  $\mu\text{M}$ (1.7과 3.4배)의 낮은 수준의 NO 생성능을 보였으나, 조다당 획분인 PM-CP는 21.5와 26.6  $\mu\text{M}$ (8.2와 9.8배)로 현저히 증가한 생성능을 나타냈다. 한편, 배양액의 EPS 획분에서는 500과 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 NC 대조군 대비 각각 35.6과 34.2  $\mu\text{M}$ (13.0과 13.5배)의 5종 획분 중 가장 우수한 NO 증진 활성을 나타냈다. 결과적으로 RAW 264.7 세포주를 이용한 대식세포 자극 활성 결과, 상황버섯 균사체 액체 발효물로부터 원심분리를 통해 균사체를 제거하고 배양액만을 주정 침전으로 분획한 EPS가 대식세포 활성인자의 생성을 가장 우수하게 촉진하여 균사체에 의한 대사산물이 선천면역계의 활성화에 중요한 역할을 하는 것으로 추정되었다. Park과 Hong(2017)의 연구에서 상황버섯 균사체를 이용하여 배양액으로부터 조제된 조다당 획분이 동일 세포주인 RAW 264.7 세포에서 mRNA 수준에서 inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, TNF- $\alpha$  및 IL-6의 발현량을 증가시킬 수 있는 것이 확인된 바 있어, 본 연구 결과와 유사한 경향을 나타냈다. 따라서 상황버섯 균사체 액체 발효물의 배양액으로부터 분획한 EPS는 면역 활성 포스트바이오틱스로서 활용될 수 있는 가능성을 제시하였다.

### Splenocyte를 이용한 마이토젠 및 사이토카인 생성능

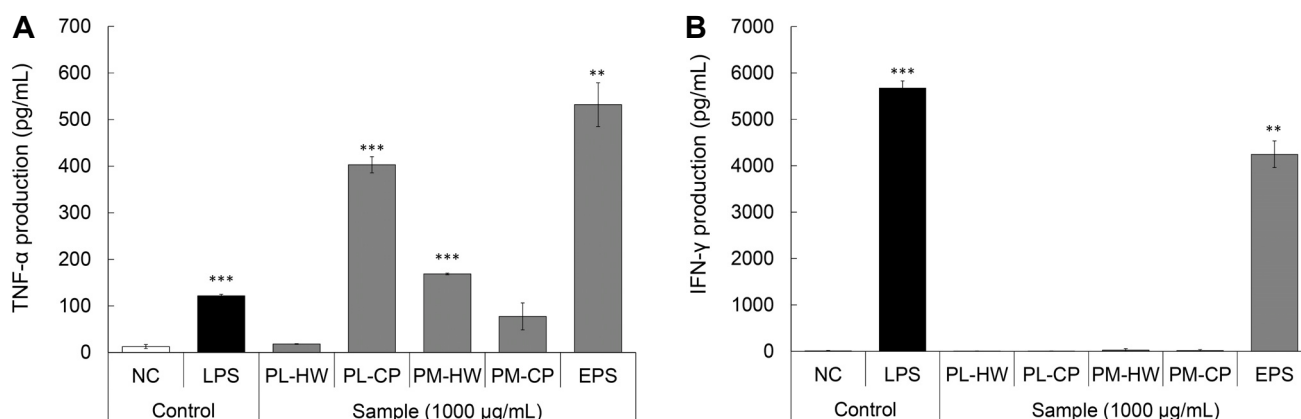
비장(spleen)은 체내 주요한 림프 기관으로, B 및 T cell의 성숙과 항원에 의해 자극 받은 림프구의 분화가 이루어지기 때문에 면역 활성화에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다(Son과 Shin, 2021). 따라서 C3H/HeN(6 weeks, female) 마우스의 비장을 채취하여 조제한 비장세포(splenocyte) 현탁액에 상황버섯 균사체 액체 발효물의 5종 획분을 초대배양(primary culture)한 후 비장세포의 마이토젠(mitogen) 활성을 평가하였다(Fig. 3). 양성대조군은 B cell 마이토젠으로 널리 알려진 LPS를 이용하였으며(Andersson 등, 1979), 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 NC 대조군 대비 434.8%의 비장세포 증식능이 확인되었고, 균사체와 배양액의 PL의 열수추출물(PL-HW)은 NC 대조군 대비 201.0% 및 PL로부터 분리한 균사체만의 열수추출물(PM-HW)과 EPS는 NC 대조군 대비 각각 184.5 및 183.1%의 유의적인 비장세포의 마이토젠 활성을 나타냈으나 3개 획분 간 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다. 그러나 이들로부터 주정 침전으로 조제된 조다당 획분인 PL-CP와 PM-CP는 NC 대비 통계적으로 유의한 비장세포 증식능을 보이지 않았다. 비장세포의 마이토젠 활성 마커로서는 여러 종류의 사이토카인이 이용되고 있으나, 본 연구에서는 T 림프구 CD4+ 수용체가 면역 반응에 의해 활성화되어 T helper type 1(Th1) 세포의 세포-매개 적응 면역 반응 활성화를 알아보기 위해 TNF- $\alpha$  및 IFN- $\gamma$ 를 측정하였다(Seo 등, 2013). 먼저 비장세포의 TNF- $\alpha$  생성능은 Fig. 4A에 나타냈으며, 양성대조군으로 LPS를 이용하였다. LPS 처리군의 경우, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 NC



**Fig. 3.** Splenocyte proliferation of fraction from liquid culture by *Phellinus linteus* mycelium. Splenocytes were isolated from C3H/HeN mice. The splenocytes were treated with each fraction for 48 h, and proliferation was estimated. Only medium and lipopolysaccharide (LPS, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were used as negative (NC) and positive controls, respectively. Results are expressed as mean  $\pm$  SD of three independent tests in triplicate. Asterisks mean a significant difference between NC group and each group by Student's t-test. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . PL-HW: hot-water extract from whole liquid culture (including mycelium), PL-CP: crude polysaccharide from PL-HW by EtOH precipitation, PM-HW: hot-water extract from isolated mycelium, PM-CP: crude polysaccharide from PM-HW, EPS: exopolysaccharide from culture supernatant by EtOH precipitation.

대조군(12.7  $\text{pg}/\text{mL}$ ) 대비 121.5  $\text{pg}/\text{mL}$ (9.6배)의 통계적으로 유의한 TNF- $\alpha$  생성능이 확인되었다. 한편, 시료의 TNF- $\alpha$  생성능은 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 측정하였으며, PL-HW 및 PM-CP에서는 통계적으로 유의한 생성능이 확인되지 않았다. 그러나 PL-CP 및 PM-HW는 각각 NC 대조군 대비 402.9  $\text{pg}/\text{mL}$ (31.8배) 및 168.6  $\text{pg}/\text{mL}$ (13.3배)의 통계적으로 유의한 TNF- $\alpha$  생성능을 나타냈다. 배양액만을 취하여 분획한 EPS는 NC 대조군 대비 532.0  $\text{pg}/\text{mL}$ (42.0배)의 통계적으로 유의한 TNF- $\alpha$  생성능이 확인되어 5종 획분 중 가장 우수한 TNF- $\alpha$  생성능을 나타냈다. 비장세포의 IFN- $\gamma$  생성능은 Fig. 4B에 나타냈으며, 양성대조군으로 이용된 LPS는 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 NC 대조군(10.1  $\text{pg}/\text{mL}$ ) 대비 5,675.3  $\text{pg}/\text{mL}$ (561.6배)의 통계적으로 유의한 IFN- $\gamma$  생성능을 가지는 것으로 확인되었다. 상황버섯 균사체 액체 발효물의 5종 획분 중 PL-HW, PL-CP 및 PM-HW와 PM-CP는 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 통계적으로 유의한 IFN- $\gamma$  생성능을 나타내지 않았으나, 배양액만을 분획한 EPS는 NC 대조군 대비 4,247.8  $\text{pg}/\text{mL}$ (420.3배)의 우수한 IFN- $\gamma$  생성능이 확인되어 5종 획분 중 유일한 INF- $\gamma$  생성에 효과적인 시료로 판단되었다. 결과적으로 EPS만이 비장세포의 증식능과 일치되는 결과를 나타냄으로써 상황버섯 균사체 액체 발효물의 배양액을 주정 침전으로 얻은 EPS가 Th 1-관련 세포-매개성 적응면역을 활성화시키는 것으로 확인되어 향후 Th 2-관련 사이토카인을 분석하여 체액성 면역에 관한 연구도 필요할 것으로 사료된다(Kang 등,





**Fig. 4.** TNF- $\alpha$  (A) and IFN- $\gamma$  (B) production from C3H/HeN mice-splenocytes by fraction from liquid culture by *Phellinus linteus* mycelium. Splenocytes were treated with each fraction for 48 h, and production was estimated. Only medium and lipopolysaccharide (LPS, 1  $\mu$ g/mL) were used as negative (NC) and positive controls, respectively. Results are expressed as mean $\pm$ SD of three independent tests in triplicate. Asterisks mean significant difference between NC group and each group by Student's t-test. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001. PL-HW: hot-water extract from whole liquid culture (including mycelium), PL-CP: crude polysaccharide from PL-HW by EtOH precipitation, PM-HW: hot-water extract from isolated mycelium, PM-CP: crude polysaccharide from PM-HW, EPS: exopolysaccharide from culture supernatant by EtOH precipitation.

**Table 1.** General chemical analysis of various fractions from liquid culture by *Phellinus linteus* mycelium (%)

Sample	PL-HW <sup>1)</sup>	PL-CP	PM-HW	PM-CP	EPS
Yield <sup>2)</sup>	13.2	14.4	17.2	16.2	39.6
Neutral sugar	90.4 $\pm$ 2.5 <sup>a3)</sup>	85.0 $\pm$ 10.3 <sup>a</sup>	90.0 $\pm$ 3.7 <sup>a</sup>	87.3 $\pm$ 4.1 <sup>a</sup>	90.2 $\pm$ 6.1 <sup>a</sup>
Uronic acid	5.2 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	6.3 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	5.3 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	5.7 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	6.1 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>
Protein	0.9 $\pm$ 0.0 <sup>c</sup>	4.1 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	1.2 $\pm$ 0.1 <sup>bc</sup>	4.0 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>	1.2 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>
Polyphenol	3.5 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	4.6 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	3.4 $\pm$ 0.3 <sup>c</sup>	3.0 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	2.5 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>PL-HW: hot-water extract from whole liquid culture (including mycelium), PL-CP: crude polysaccharide from PL-HW by EtOH precipitation, PM-HW: hot-water extract from isolated mycelium, PM-CP: crude polysaccharide from PM-HW, EPS: exopolysaccharide from culture supernatant by EtOH precipitation.

<sup>2)</sup>Yield (%) was calculated against the liquid fermentation.

<sup>3)</sup>All results are expressed as mean $\pm$ SD for three independent experiments. Different letters within a column are significantly different ( $P$ <0.05) by Duncan's multiple range test.

2014). 대식세포를 이용한 선천적 면역계의 활성화와 비장세포를 통한 획득면역계의 활성화 결과로부터 상황버섯 균사체 액체 발효물의 균사체 배양액을 주정 침전시켜 EPS로 분획할 때 면역 활성을 촉진시킬 수 있는 고분자 다당 및 단백당 함량이 높을 것으로 추정되어, 이들을 면역 활성 증진용 포스트바이오틱스 소재로 활용할 수 있는 방안을 마련하고자 한다.

### 구성분 및 구성당 분석

상황버섯 균사체 액체 발효물의 5종 획분에 대한 일반성분을 분석한 결과는 Table 1에 나타내었는데, 시료 모두 중성당(PL-HW: 90.4%, PL-CP: 85.0%, PM-HW: 90.0%, PM-CP: 87.3% 및 EPS: 90.2%)이 가장 높은 함량을 보였고, 산성당(5.2~6.3%)과 단백질(0.9~4.1%)은 소량 함유되어 있는 것으로 확인되었다. 한편, 총 폴리페놀 함량도 PL-HW는 3.5%, PL-CP 4.6%, PM-HW 3.4%, PM-CP 3.0% 및 EPS에서 2.5%의 함량을 보여 활성 획분인 EPS 획분과 모든 구성분에서 유의적으로 큰 차이를 보이지는 않았다. 한

편, 다당 및 단백당 함유의 고분자 획분인 EPS의 구성당을 분석한 결과(Table 2), 주요 구성당으로 glucose(94.9%)가 매우 높은 비율을 보였고 그 외 소량의 mannose(3.8%), galactose(0.9%) 및 glucuronic acid(0.4%)를 포함하는 획분인 것으로 확인되어 glucan의 존재 가능성을 추정할 수

**Table 2.** Component sugar analysis of immunostimulatory fraction from liquid culture by *Phellinus linteus* mycelium

Component sugar (mol %)	
EPS <sup>1)</sup>	
Mannose	3.8 $\pm$ 0.0
Rhamnose	—
Glucuronic acid	0.4 $\pm$ 0.1
Galacturonic acid	—
Glucose	94.9 $\pm$ 0.1
Galactose	0.9 $\pm$ 0.0
Xylose	—
Arabinose	—
Fucose	—

<sup>1)</sup>EPS: exopolysaccharide from culture supernatant by EtOH precipitation.

있었다. Hu 등(2015)의 연구에서는 *Clitocybe maxima* 유래 EPS가 면역 활성화에 중요한 역할을 한다고 보고했으며, 상황버섯 배양액 유래 EPS에는 glucan, mannan 및 man-noglucan을 포함하는 다당류를 함유하는 것으로 보고되어 있기 때문에(Baker 등, 2008), 추후 본 연구의 활성 획득인 EPS 획득의 정확한 구조를 규명하기 위해 column separation, methylation 및 mass spectrometry를 통한 구조적 규명에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 요 약

포스트바이오틱스 소재 활용 가능성을 평가하고자 *Phellinus linteus* 균사체에 의해 발효된 액체 배양액에서 5종의 시료(액체 발효물의 열수추출물: PL-HW, 액체 발효물 열수추출물의 주정침전: PL-CP, 균사체 열수추출물: PM-HW, 균사체 열수추출물의 주정침전: PM-CP 및 배양 상등액 주정침전: EPS)를 분획하였다. RAW 264.7 세포를 이용한 선천면역 세포 활성을 평가한 결과, EPS가 가장 우수한 TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-6 및 NO의 생성능을 유도하는 것으로 나타났다. 마우스 비장으로부터 분리된 primary splenocyte를 이용한 적응면역 세포 활성 평가에서, PL-HW, PM-HW 및 EPS가 우수한 비장세포 증식 활성을 유도하는 것으로 나타났다. 특히, EPS는 primary splenocyte에서 Th1 관련 사이토카인인 TNF- $\alpha$ 와 IFN- $\gamma$ 의 생산을 유의적으로 증진시킴으로써 세포-매개 적응면역 반응 활성화에 효과적일 수 있을 것으로 사료되었다. 일반성분 분석결과, 활성 시료인 EPS는 중성당(90.2%), 산성당(6.1%), 단백질(1.2%) 및 폴리페놀(2.5%)의 조성을 가지는 것으로 확인되었으며, 구성당 분포는 중성당으로서 높은 비율의 glucose(94.9%)와 소량의 mannose(3.8%), galactose(0.9%) 및 glucuronic acid(0.4%)를 함유하고 있는 것으로 나타났다. 결론적으로 배양 상등액으로부터 분리된 EPS는 glucan의 존재를 확인할 수 있었으며, 선천면역 및 적응면역세포의 자극을 촉진할 수 있는 것으로 확인되었다.

## 감사의 글

본 논문은 2020년 전라북도 선도기업 육성사업(선도기업 기술개발 역량강화 지원사업; 과제번호 2020-나-6)으로 수행한 연구로 전북테크노파크와 (주)네오크레마에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Baker JR, Kim JS, Park SY. Composition and proposed structure of a water-soluble glycan from the Keumsa Sangwhang mushroom (*Phellinus linteus*). *Fitoterapia*. 2008. 79:345-350.
- Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochem*. 1973. 54:484-489.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976. 72:248-254.
- Chen W, Tan H, Liu Q, Zheng X, Zhang H, Liu Y, et al. A review: The bioactivities and pharmacological applications of *Phellinus linteus*. *Molecules*. 2019. 24:1888. <https://doi.org/10.3390/molecules24101888>
- Chung BH, Seo HS, Kim HS, Woo SH, Cho YG. Antioxidant and anticancer effects of fermentation vinegars with *Phellinus linteus*, *Inonotus obliquus*, and *Pleurotus ostreatus*. *Korean J Med Crop Sci*. 2010. 18:113-117.
- Cuevas-González PF, Liceaga AM, Aguilar-Toalá JE. Postbiotics and paraprobiotics: From concepts to applications. *Food Res Int*. 2020. 136:109502. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109502>
- DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*. 1956. 28:350-356.
- Honda S, Akao E, Suzuki S, Okuda M, Kakehi K, Nakamura J. High-performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strongly ultraviolet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives. *Anal Biochem*. 1989. 180:351-357.
- Hu SH, Cheung PCK, Hung RP, Chen YK, Wang JC, Chang SJ. Antitumor and immunomodulating activities of exopolysaccharide produced by big cup culinary-medicinal mushroom *clitocybe maxima* (higher basidiomycetes) in liquid submerged culture. *Int J Med Mushrooms*. 2015. 17:891-901.
- Huang GJ, Huang SS, Deng JS. Anti-inflammatory activities of inotilone from *Phellinus linteus* through the inhibition of MMP-9, NF- $\kappa$ B, and MAPK activation *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One*. 2012. 7:e35922. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035922>
- Hwang HJ, Kim SW, Lim JM, Joo JH, Kim HO, Kim HM, et al. Hypoglycemic effect of crude exopolysaccharides produced by a medicinal mushroom *Phellinus baumii* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci*. 2005. 76:3069-3080.
- Jiang P, Yuan L, Huang G, Wang X, Li X, Jiao L, et al. Structural properties and immunoenhancement of an exopolysaccharide produced by *Phellinus pini*. *Int J Biol Macromol*. 2016. 93: 566-571.
- Kang BK, Kim KBWR, Ahn NK, Choi YU, Kim MJ, Park SW, et al. Immuno-stimulating activities of skipjack tuna *Katsuwonus pelamis* cooking juice concentrates on mouse macrophages and spleen cells. *Kor J Fish Aquat Sci*. 2014. 47:776-784.
- Kim BY, Park SS. The concepts and applications of postbiotics for the development of health functional food product. *Curr Top Lact Acid Bact Probiotics*. 2021. 7:14-22.
- Kim HM, Han SB, Oh GT, Kim YH, Hong DH, Hong ND, et al. Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Int J Immunopharmacol*. 1996. 18:295-303.
- Lee KH, Kwon HJ, Chun SS, Kim JH, Cho YJ, Cha WS. Biological activities of extracts from *Phellinus linteus*. *J Korean Soc Appl Biol Chem*. 2006. 49:298-303.
- López-García J, Lehocký M, Humpolíček P, Sába P. HaCaT keratinocyte response on antimicrobial atelocollagen substrates: extent of cytotoxicity, cell viability and proliferation. *J Funct Biomater*. 2014. 5:43-57.
- Ma XK, Zhang H, Peterson EC, Chen L. Enhancing exopolysaccharide antioxidant formation and yield from *Phellinus* species through medium optimization studies. *Carbohydr Polym*. 2014. 107:214-220.



- Marinova D, Ribarova F, Atanassova M. Total phenolics and total flavonoids in Bulgaria fruits and vegetables. *J Chem Technol Metall.* 2005. 40:255-260.
- Moradi M, Kousheh SA, Almasi H, Alizadeh A, Guimarães JT, Yılmaz N, et al. Postbiotics produced by lactic acid bacteria: The next frontier in food safety. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2020. 19:3390-3415.
- Park EJ, Lee YS, Jeong HC, Lee SH, Lee HJ. Mitigation effects of red *Platycodon grandiflorum* extract on lipopolysaccharide – Induced inflammation in splenocytes isolated from mice. *J Nutr Health.* 2019. 52:243-249.
- Park HM, Hong JH. Immune-enhancing effects of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* mycelium on *Mori ramulus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2017. 46:26-33.
- Seo MJ, Kang BW, Park JU, Kim MJ, Lee HH, Ryu EJ, et al. Effect of black garlic extract on cytokine generation of mouse spleen cells. *J Life Sci.* 2013. 23:63-68.
- Shin HY, Kim H, Shin JY, Lee SJ, Yu KW. The physiological activity of crude polysaccharide solvent extracted from herbal medicine mixture. *Korean J Food Nutr.* 2021. 34:36-46.
- Son SU, Shin KS. Immuno-stimulating and anti-metastatic activities of the polysaccharides isolated from *Angelica gigas*. *Korean J Food Sci Technol.* 2021. 53:304-312.
- Song YS, Kim SH, Sa JH, Jin C, Lim CJ, Park EH. Anti-angiogenic, antioxidant and xanthine oxidase inhibition activities of the mushroom *Phellinus linteus*. *J Ethnopharmacol.* 2003. 88:113-116.
- Yu AR, Park HY, Choi IW, Park YK, Hong HD, Choi HD. Immune enhancing effect of medicinal herb extracts on a RAW 264.7 macrophage cell line. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2012. 41:1521-1527.
- Żółkiewicz J, Marzec A, Ruszczyński M, Feleszko W. Postbiotics – A step beyond pre- and probiotics. *Nutrients.* 2020. 12: 2189. <https://doi.org/10.3390/nu12082189>