

커피박에 의한 구름버섯 균사체의 생장 촉진

이민구 · 신동일 · 박희성*

대구가톨릭대학교 생명공학과

Acceleration of the Mycelial Growth of *Trametes versicolor* by Spent Coffee Ground

Min-Ku Lee, Dong-Il Shin and Hee-Sung Park*

Department of Biotechnology, Catholic University of Daegu, Kyungsan, Kyungbuk 712-702, Korea

(Received 8, November 2012., Revised 14, November 2012., Accepted 6, December 2012)

ABSTRACT: *Trametes versicolor*, a common inhabitant of dead hardwoods in temperate climates, belongs to one of the important medicinal mushrooms. In this study, spent coffee ground(SCG), instant coffee powder(ICP) and instant decaffeinated coffee powder(IDCP) were examined for their effect on the mycelial growth of *T. versicolor*. Adding SCG was proven to be significantly beneficial at the concentration as high as 10%. ICP and IDCP, both containing concentrated polyphenols, were also beneficial at low concentration less than 1%. 1% SCG culture resulted in ten-fold increased yield of dry cell mass compared to the control culture. Adding coffee substances was recommended as a useful tool for accelerating the growth and strengthening the physiological activity of the mycelium.

KEYWORDS: Mycelial growth, Spent coffee ground, *Trametes versicolor*

구름버섯(*Trametes versicolor*)은 세계적으로 분포하는 활엽수의 고목이나 가지 위에서 자생하는 백색 부후균에 속하는데 전 세계에 걸친 주요 25 종의 약용버섯들 중의 하나에 속하기도 한다(Boa, 2004). 구름버섯의 단백당류인 polysaccharide-K는 면역조절기능 및 항암 보조제로서 매우 잘 알려져 있는데(Cheng and Leung, 2008) 구름버섯 균사체의 경우 발효를 통한 laccase의 대량 생산에 이용되고 있다(Rancano *et al.*, 2003).

커피는 다양한 생리활성물질을 포함하는데 flavonoids (catechins, anthocyanins 등), caffeic acid 및 ferulic acid 등을 주로하여 nicotinic acid, trigonelline, quinolinic acid, tannic acid, pyrogalllic acid 및 caffeine 등이 밝혀져 있다(Minamisawa *et al.*, 2004). 이들 성분 중 caffeine, chlorogenic acid, hydroxycinnamic acids 및 melanoidins는 대표적 항산화 물질로서(Vignoli *et al.*, 2011) 만성질환(Alzheimer, Parkinson, 2형 당뇨, 심장질환, 암 등)의 예방이나 억제 또는 수명 연장 효능이 알려져 있다(Nkondjock *et al.*, 2006). 볶은 커피콩에는 탄수화물(38-42%), melanoidins(23%), 지질(11-17%), 단백질(10%), 미네랄(4.5-4.7%), chlorogenic acid(2.7-3.1%), 지방산(2.4-2.5%), caffeine(1.3-2.4%) 등을 비롯하여 기타 850종 이상의 휘발성 성분이 포함되어 있는 것으로 밝혀져

있다(Esquivel and Jimenez, 2012). 한편, 커피제조 후의 폐기물인 커피박(spent coffee ground: SCG)의 생성은 세계적으로 연간 6백만 톤 이상으로 추산됨으로써(Tokimoto *et al.*, 2005) 재활용 연구가 한창이며 연료소재, 사료 또는 비료 첨가물(Saenger *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 1998), 기능성 물질 소재원(Simoes *et al.*, 2009), 바이오디젤 원료(Franca *et al.*, 2009) 또는 버섯재배용 배양토 혼합물(Machado *et al.*, 2012)로서의 이용이 연구되고 있다.

버섯 균사체 생장에 미치는 커피의 영향은 별로 연구된 바 없으며 본 연구에서는 약리적 효과가 우수한 구름버섯 균사체 생장에 미치는 커피의 영향을 분석하였다.

구름버섯 균사체는 농업유전자원연구센터(KACC 43259)로부터 제공받았으며 potato dextrose agar(PDA) 또는 potato dextrose broth(PDB) 배지를 이용하여 25°C 암 조건에서 균사체 배양을 실시하였다. 커피 첨가 배지를 포함하여 모든 배지의 pH는 5.4로 조정하였다. SCG(spent coffee ground, 커피박)은 근처 커피전문점으로부터 입수하였으며 50°C에서 일정 무게가 될 때까지 건조시킨 후 사용하였다. Instant coffee powder(ICP) 및 instant decaffeinated coffee powder(IDCP)는 일반 상점의 것을 구입하여 사용하였다. 액체배양을 위하여 PDA배지에 배양 중인 균사체를 금속 loop를 이용하여 직경 5mm pellet으로 제작하고 10개 pellet을 100 mL PDB에 접종하였다. 균사체 배양(120 rpm, 25°C) 후 여과장치를 이용하여 배

*Corresponding author <E-mail : hspark@cu.ac.kr>

양액을 제거하고 증류수로 세척한 후 균사체를 수집하였다. 균사체는 일정무게에 도달할 때까지 50°C에서 건조시킨 후 건조중량(dry cell weight: DCW)을 측정하였다. 균사체 추출액(*T. versicolor* methanolic extracts: TVMe) 제조를 위하여 동결건조한 균사체 0.1 g을 1 mL의 70% methanol에 녹인 후 교반추출(22°C, 24 hr, 150 rpm)을 실시하고 원심분리(12,000 rpm, 10 min) 후 0.45 µm filter로 추출액을 여과시켜 준비하였다. 총 폴리페놀 함량(total polyphenol content: TPC)은 Folin-Ciocalteu 용액을 이용하여 측정하였으며(Capannesi *et al.*, 2001) garlic acid를 이용한 standard curve에 근거하여 garlic acid equivalents(GAE)로 표시하였다. Polysaccharides 측정은 phenol-sulfuric acid 방법(Buysee and Merckx, 1993)에 의하였으며 glucose standard curve를 기준으로 하였다.

볶은 커피콩에는 100 g당 3 g 정도 TPC가 측정되며(Nebesny and Budryn, 2003) 커피원두 종류 및 볶는 방식 그리고 커피음료 제조 방식에 따라 커피음료의 TPC나 성분 면에서 차이를 보인다(Hecimovic *et al.*, 2011). 본 실험에서의 SCG는 100 g 당 0.4 g의 TPC가 측정되었다. 한편, ICP 및 IDCP 모두는 48 mg TPC/1 g powder 제품으로서 SCG의 12배 높은 TPC로 계산되었다. 커피 첨가에 의한 구름 균사체 생육 변화를 관찰하기 위하여 1-10% SCG 포함 또는 0.1-3% ICP 및 IDCP 포함 PDA배지를 준비한 후 균사체 pellet을 얹어 놓고 균사체 생육을 관찰하였다. Fig. 1에서와 같이 SCG의 경우 무처리에 비해 10% 처리 군까지 모두에서 성장촉진을 관찰할 수 있었다. ICP의 경우 1-3% 농도 모두에서 성장억제 현상이 나타났다. 저농도 ICP 경우 0.1%에서만 약간의 성장촉진을 관찰할 수 있었다. ICP는 IDCP 보다 성장 저해능이 강한 것으로 나타났다. 이러한 결과를 통하여 일정농도의

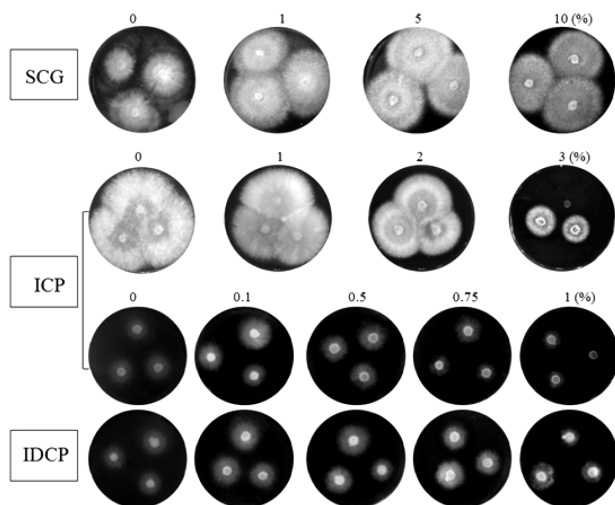


Fig. 1. Mycelial growth of *T. versicolor* in solid culture supplemented with various concentrations of spent coffee ground (SCG), instant coffee powder (ICP) and instant decaffeinated coffee powder (IDCP).

polypehno를 제공할 수 있는 커피 물질은 구름 균사체의 성장을 촉진할 수 있는 효과가 확인되었는데 고농도의 polyphenol이나 또는 caffeine에 의한 성장억제 효과도 관찰할 수 있었다. 식물의 polyphenol 화합물의 항균 및 항진균 작용은 널리 알려져 있는데 커피의 chlorogenic acid에 의한 항진균 효과가 보고된 바 있다(Sung and Lee, 2010).

커피 첨가에 의한 성장 촉진을 정량적으로 비교하기 위하여 액체배양을 실시하고 3중 실험 결과의 평균 DCW로 비교하였다. 8일간 액체배양을 실시하였을 때 커피처리군 모두에서 균사체 덩어리의 크기가 무처리에 비해 매우 커져있음을 확인할 수 있었다(Fig. 2A). SCG 및 IDCP 농도가 높아질수록 덩어리 크기는 비례적으로 감소함도 관찰되었는데 이 때 균사체 색은 반비례적으로 진해지는 경향을 보였다. 정량적 DCW의 비교 결과는 Fig. 2B에서 보이고 있다. 무처리 군은 0.13 g/100 mL로써 이에 비해

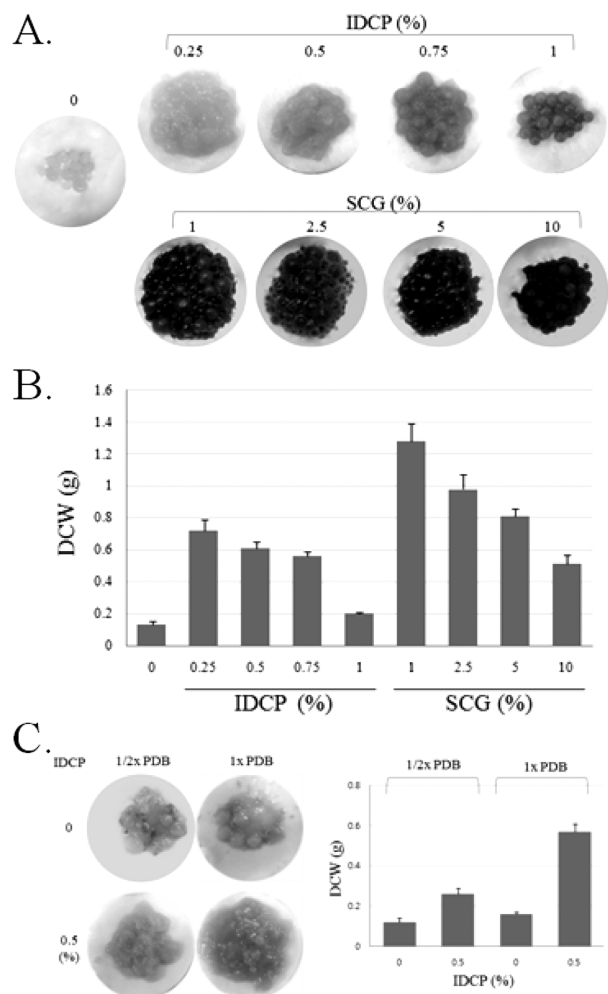


Fig. 2. Mycelial growth of *T. versicolor* in submerged culture supplemented with IDCP and SCG. Cells were harvested (A) and measured in dry cell weight (DCW). Cells grown in 1/2xPDB and 1xPDB in the presence or absence of IDCP were compared (C).

IDCP 0.25, 0.5, 0.75 및 1% 처리는 각각 0.72, 0.61, 0.56, 0.2 g/100 mL로 측정되었으며 0.25% IDCP는 무처리의 5배 이상의 증가를 보여주었다. 한편 0.5% IDCP를 첨가한 1/2xPDB 배지에서 무첨가의 PDB배지에서의 균사체 생육보다 높게 나타남으로써 커피성분의 생육촉진 효과를 재확인할 수 있었다(Fig. 1C). SCG는 1, 2.5, 5 및 10% 처리에서 각각 1.28, 0.98, 0.81, 0.51 g/100 mL이 측정되었으며 1% SCG는 10 배 가까운 증가를 보여주고 있다. 이러한 결과는 SCG를 포함하는 탄수화물, 단백질, polyphenol 또는 기타 성분이 구름버섯 균사체 생장에 매우 효과적임을 보여주고 있다.

커피에 의한 구름버섯 균사체의 생육 촉진이 확인됨과 함께 균사체 색변화가 관찰됨으로써 균사체 TPC의 변화를 조사하였다. 버섯은 그 종류에 따라 TPC 차이가 많이 나타나는데 자실체의 경우 1 g당 1-6 mg GAE가 분석된 바 있다(Palacios *et al.*, 2011). 붉은 커피에는 20-40 mg GAE/g이 포함되어 있는 것으로 보고되어 있다(Hecimovic *et al.*, 2011). 무처리 TVMe의 TPC는 1.1 g GAE/100 g으로 측정되었으며 커피 처리의 경우 TPC는 1.6-2.7 g GAE/100 g으로 측정되어 1.5-2.5배 TPC 증가가 확인되었다. 다만 IDCP나 SCG의 처리농도에 비례한 TPC 증가는 매우 완만하였으며 10% SCG의 경우에는 5% SCG와 유사하게 나타났다. 이로써 육안으로 관찰된 균사체 색의 강도변화와 TPC의 변화는 그 연관성이 매우 적은 것으로 판단되었다. 한편 polysaccharides의 양적 변화는 커피처리 유무와 관련성이 없는 것으로 나타났다(Table 1). TPC의 증가가 전적으로 커피에 의한 것인지 또는 커피성분에 의한 균사체 내 polyphenol 생합성 증가에 의한지는 불분명하다.

Phenol 화합물이 항산화능을 지니는 것은 잘 알려져 있으나 각 phenol화합물이나 이들 그룹들의 구성에 따라 상승 또는 길항작용이 존재하는 것으로 알려져 있다(Becker *et al.*, 2004). 커피 항산화능은 주로 polyphenol류에 기인하는 것으로 잘 알려져 있으며 이들 polyphenol 화합물들

Table 1. Contents of total polysaccharides and polyphenols in the mycelium of *T. versicolor*

Coffee treatment	Total polysaccharide content(g/100 g)	Total polyphenol content(gGAE/100 g)
0	80.8±0.7	1.1±0.1
IDCP0.25	81.5±0.9	1.6±0.0
IDCP0.5	80.3±0.9	1.7±0.1
IDCP0.75	81.1±0.5	1.9±0.2
IDCP1	81.9±0.8	2.3±0.5
SCG1	81.0±0.4	2.5±0.6
SCG2.5	80.8±0.4	2.5±0.6
SCG5	81.9±0.9	8.7±0.8
ISG10	80.8±0.9	2.6±0.6

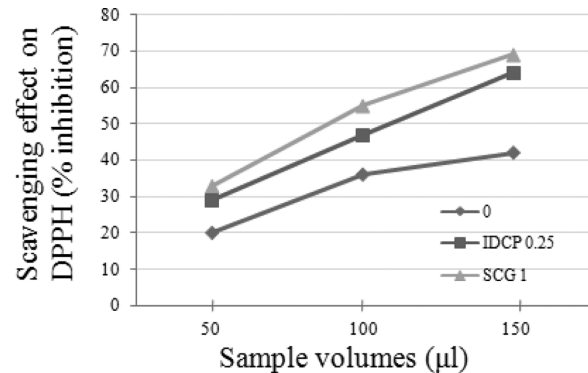


Fig. 3. DPPH scavenging activity of methanolic extract of *T. versicolor* mycelium grown with IDCP and SCG.

중 chlorogenic acids, caffeic acid, ferulic acid, p-coumaric acid, 그리고 proanthocyanidins 등이 항산화능에 주요 역할을 보인다(Niseteo *et al.*, 2012). 버섯의 경우 항산화능과 관련하여 주로 glucan, glycan 또는 pepto-polysaccharides 등의 polysaccharides 그리고 phenol화합물 역할이 많이 알려져 있다. 본 실험에서는 커피 처리에 의해서 TPC가 증가한 만큼 TVMe의 항산화능 증가가 비례적으로 발생하는지를 분석하였다. 이를 위하여 DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free-radical 소거능 분석법(Hatano *et al.*, 1988)을 이용하였다. 0.1 mL 희석 TVMe, 0.5 mL 500 μM DPPH 그리고 0.4 mL 0.1 M Tris-HCl(pH 7.4)의 혼합액을 실온에서 반응(20 min, 암조건) 시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. Ascorbic acid를 이용한 DPPH 소거능을 기준으로 50% 항산화능을 보이는 시료 농도를 IC₅₀로 정하였다. 그 결과 무처리 TVMe 보다 IDCP 또는 SCG 처리 TVMe의 항산화능이 비교적 높게 나타남으로써 커피에 의한 TPC 증가가 항산화능 증대에 어느 정도 기여하는 것으로 판단되었다(Fig. 3).

커피의 polyphenol성분은 항암이나 항당뇨 기능성을 지니는 것으로 잘 알려져 있으며 커피 제조 폐기물인 SCG의 기능성 재활용도 주목받고 있다. 본 연구에서는 구름버섯 균사체 배양과정에서 IDCP나 SCG에 의한 균사체의 생육촉진이 확인됨은 물론 TPC 및 항산화능 증대가 확인됨으로써 구름버섯 균사체의 생장촉진 및 기능성 증대를 위한 커피의 효능을 확인할 수 있었다. 이로써 laccase 등 산업적 효소 생산을 위한 균사체 배양 시(Rancano *et al.*, 2003; Madhavi and Lele, 2009) 커피의 균사체 생육촉진제로서의 이용을 기대해 볼 만 하다. 한편으로는 항산화능 증대에 근거하여 균사체 추출물의 항암 또는 항당뇨 등의 기능성 상승도 기대해볼만 할 것이다.

적 요

구름버섯은 온대지역에서 흔히 발견되는 목재 부후균으로서 중요한 약용버섯의 일종이다. 본 연구에서는 커피박,

과립커피 및 과립 디카페인 커피의 구름버섯 균사체 생장에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, 커피박은 10% 농도에서까지 그리고 과립커피의 경우 1% 미만에서 균사체 생육을 촉진시키는 것으로 확인되었다. 1% 커피박의 경우 무처리에 비해 10배 정도의 건조중량 증가가 측정됨으로써 구름균사체의 생육촉진제로서의 커피 효능을 확인할 수 있었다. 또한 커피는 균사체의 페놀화합물 및 항산화 효능 증대를 위한 유용 물질로 판단되었다.

참고문헌

- Becker, E. M., Nissen, L. R. and Skibsted, L. H. 2004. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *Eur. Food Res. Technol.* 219:561-571.
- Boa, E. 2004. Wild edible fungi, a global overview of their use and importance to people. Non-wood Forest Products Series no. 17. FAO, Rome. 147 pp.
- Buyse, J. and Merckx, R. 1993. An improved colorimetric method to quantify sugar content of plant tissue. *J. Exp. Bot.* 44:1627-1629.
- Capannesi, C., Palchetti, I., Mascini, M. and Parenti, A. 2001. Electrochemical sensor and biosensor for polyphenols detection in olive oils. *Food Chem.* 71:553 - 562.
- Cheng, K. F. and Leung, P. C. 2008. General review of polysaccharopeptides (PSP) from *T. versicolor*: pharmacological and clinical studies. *Cancer Ther.* 6:117-130.
- Esquivel, P. and Jimenez, V. M. 2012. Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Res. Int.* 46:488 - 495.
- Franca, A. S., Oliveira, L. S. and Ferreira, M. E. 2009. Kinetics and equilibrium studies of methylene blue adsorption by spent coffee grounds. *Desalination* 249:267-272.
- Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T. and Okuda, T. 1988. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chem. Pharm. Bull.* 36:1090-1097.
- Hecimovic, I., Belscak-Cvitanovic, A., Horzic, D. and Komes, D. 2011. Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. *Food Chem.* 129:991-1000.
- Machado, E. M. S., Rodriguez-Jasso, R. M., Teixeira, J. A. and Mussatto, S. I. 2012. Growth of fungal strains on coffee industry residues with removal of polyphenolic compounds. *Biochem. Eng. J.* 60:87-90.
- Madhavi V. and Lele, S. S. 2009. Laccase: properties and applications. *Bioresources* 4:1694-1717.
- Minamisawa, M., Yoshida, S. and Takai, N. 2004. Determination of biologically active substances in roasted coffees using a diode-array HPLC system. *Anal. Sci.* 20:325-328.
- Nebesny, E. and Budryn, G. 2003. Antioxidative activity of green and roasted coffee beans as influenced by convection and microwave roasting methods and content of certain compounds. *Eur. Food Res. Technol.* 217:157-63.
- Nkondjock, A., Ghadirian, P., Kotsopoulos, J., Lubinski, J., Lynch, H., Kim-Sing, C. and Horsman, D. 2006. Coffee consumption and breast cancer risk among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Int. J. Cancer* 118:103-107.
- Niseteo, T., Komes, D., Belscak-Cvitanovic, A., Horzic, D. and Budec, M. 2012. Bioactive composition and antioxidant potential of different commonly consumed coffee brews affected by their preparation technique and milk addition. *Food Chem.* 134:1870-877.
- Palacios, I., Moro, C., Lozano, M., D'Arrigo, M., Gullamon, E., Garca-Lafuente, A. and Villares, A. 2011. Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chem.* 128:674-678.
- Rancano, G., Lorenzo, M., Molares, N., Couto, S. R. and Sanroman, M. A. 2003. Production of laccase by *Trametes versicolor* in an airlift fermentor *Process Biochem.* 39:467-473.
- Saenger, M., Hartge, E., Werther, J., Ogada, T. and Siagi, Z. 2001. Combustion of coffee husks. *Renew. Energ.* 23:103-121.
- Silva, M. A., Nebra, S. A., Machado, M. J. and Sanchez, C. G. 1998. The use of biomass residues in the Brazilian soluble coffee industry. *Biomass Bioenerg.* 14:457-467.
- Simoes, J., Madureira, P., Nunes, F. M., Domingues, M. R., Vilanova, M. and Coimbra, M. A. 2009. Immunostimulatory properties of coffee mannans. *Mol. Nut. Food Res.* 53:1036-1043.
- Sung, W. S. and Lee, D. G. 2010. Antifungal action of chlorogenic acid against pathogenic fungi, mediated by membrane disruption. *Pure Appl. Chem.* 82:219-226.
- Tokimoto, T., Kawasaki, N., Nakamura, T., Akutagawa, J. and Tanada, S. 2005. Removal of lead ions in drinking water by coffee grounds as vegetable biomass. *J. Colloid Interf. Sci.* 281:56-61.
- Vignoli, J. A., Bassoli, D. G. and Benassi, M. T. 2011. Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. *Food Chem.* 124:863-868.