pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 37, No. 5, pp. 364~371 (2022)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2022.37.5.364

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

동과 발효물의 조골세포 분화 촉진 및 파골세포 생성 억제 효과

최예은 · 양정모 · 유희원 · 조주현*
(주)하람 중앙연구소

Effect of Fermented *Benincasa hispida cong.* Extract on Promotion of Osteoblast Differentiation and Inhibition of Osteoclast Generation

Ye-Eun Choi, Jung-Mo Yang, Hee-Won Yoo, Ju-Hyun Cho*
Haram Central Research Institute, Cheongju, Republic of Korea

(Received August 23, 2022/Revised September 13, 2022/Accepted September 16, 2022)

ABSTRACT - The bones of the human body support the structures of the body and provide protection for a person's internal organs. Bone metabolic diseases are on the rise due to a significant increase in life expectancy over a short period of time. Therefore, we investigated the osteoblast differentiation promoting and osteoclastogenesis inhibitory activities of fermented *Benincasa hispida cong.* (HR1901-BS, HR1901-BSaf). We evaluated the alkaline phosphatase (ALP) activity of MC3T3-E1 mouse calvarial-derived osteoblasts. We also evaluated expression of ALP, osteocalcin (OCN), and runt-related transcription factor 2 (Runx2), which regulate osteoblast differentiation. To assess effects on osteoclast formation, tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity in RAW264.7 cells was analyzed. ALP activity increased by 121-136% and 140-156%, respectively in the presence of HR1901-BS and HR1901-BSaf. Expression of osteoblast differentiation factor also increased significantly. We also confirmed that HR1901-BS and HR1901-BSaf decreased TRAP activity in osteoclasts by 35-47% and 23-39%, respectively. Our results showed that fermented *Benincasa hispida cong.* (HR1901-BS, HR1901-BSaf) increase bone mineralization and osteoblast differentiation activity in MC3T3-E1 cells, and inhibit bone resorption activity in RAW264.7 cells. In conclusion, fermented *Benincasa hispida cong.* (HR1901-BS, HR1901-BSaf) can be used as an effective natural resource for preventing and treating bone-related diseases.

Key words: *Benincasa hispida*, Fermentation, Osteoblast, Osteoclast

뼈는 칼슘과 인이 무기질화된 조직으로, 미네랄의 저장 창고이며 몸을 지탱하고 보호하는 역할을 한다[1,2]. 골 조직은 골 형성(osteogenesis), 무기질화(mineralization), 재형성(remodeling)의 과정을 거쳐 만들어지며, 이 과정은 오래되거나 손상된 뼈를 제거하는 파골세포(osteoclast)와 새로운 뼈를 생성하는 조골세포(osteoblast)의 상호작용에 의해 항상성을 유지한다[3,4]. 조골세포는 osteocalcin (OCN), alkaline phosphatase (ALP) 및 제1형 콜라겐(type I collagen)을 포함하는 골 기질 단백질을 생산하며, 제1형 콜라겐은 전체 골기질의 90% 이상을 이루고 있다. 조골세포의 무기질화는 세포 및 세포외 기질(extracellular matrix)에 칼슘, 무기질이 침착되어 hydroxyapatite라는 무기물질을 형성하게 된다[5]. 파골세포는 콜라겐을 용해시키는 cathepsin K, OSCAR, TRAP 등의 단백질 분해효소 및 산의 분비를 통해 뼈를 분해한다[6]. 조골세포와 파골세포의 균형이 깨진 경우 골다공증(골소실) 또는 골경화증(골 증가)와 같은 병리학적 상태가 초래될 수 있다[7].

동과(*Benincasa hispida cong.*)는 박과(Cucurbitaceae)의 1년생 덩굴식물로 원산지는 동남아시아, 인도, 중국 남부 지역 및 한국의 전라도 일부 지역으로 추정된다. 동과의 형태는 줄기가 굵고 단면이 사각이며, 잎은 심장형이다. 과실은 호박과 비슷하게 긴 타원형 또는 원형이며 껍질의 색은 녹색, 과육은 희고 두텁고 종자는 백색 또는 황백색이다[8,9]. 우리나라에서는 겨울 가까이 수확하여 1년간 저장하여 먹기 때문에 동과(冬瓜)로 불리우며, 성숙한 과실

*Correspondence to: Hee-Won Yoo, Haram Central Research Institute, Cheongju 28160, Republic of Korea
Tel: +82-10-8936-9763, Fax: +82-43-838-7235
E-mail: heewon2@eharam.com

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal 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.

표면에 특유한 흰 납(wax) 물질이 덮혀 있어 영어로는 White gourd, Wax gourd, Ash gourd 등 다양하게 불린다[10]. 동과는 한약재로서 과육은 수종, 발열, 소갈, 어지러움, 호상, 기미 등을 치료하며, 종자는 충수염, 폐열, 기침, 신장염, 요도염, 부종, 폐농양, 임질, 각기 치질 등을 다스리며 껍질은 수종, 설사, 종기, 배뇨곤란, 중풍 등에 효능이 있는 것으로 알려져 있다[11]. 동과의 항염증 효과, 위보호 효과, 지방세포 분화 억제, 혈당강하 효과 등의 연구가 진행되고 있으나, 동과의 뼈 건강에 미치는 영향에 대한 연구는 진행된 바 없다[12-17].

생물전환(biotransformation)이란 생합성(biosynthesis), 생촉매(biocatalysis) 등의 용어와 의미상 중복성을 지니는 용어로, 미생물의 효소적 기능을 이용하여 전구물질로부터 원하는 산물을 제조하는 기술을 말한다. 즉, 미생물 발효 또는 효소처리 등의 생물학적 방법을 통해 천연물 생리활성물질의 구조적 변화를 유도하여 유효성분의 함량 증가, 흡수율 개선 및 새로운 기능성분의 생성에 기여할 수 있는 것으로 알려져 있다[18-20]. 이처럼 생물 전환 공정은 천연물이 가진 성분이나 소재의 활용성을 증진시키기 위해 의약품, 화장품, 식음료 등 다양한 분야에서 활용되고 있다.

따라서 본 연구에서는 *Bacillus subtilis* CJH 101 및 *Bacillus safensis* CJH 102에 의해 발효된 동과 발효물의 골 형성에 미치는 영향을 세포수준에서 연구하였으며, 조골세포 전구세포인 MC3T3-E1 세포와 파골세포 전구세포인 RAW 264.7 세포를 이용하여 조골세포 및 파골세포의 증식 및 분화에 동과 발효물이 미치는 영향을 분석하였다.

Materials and Methods

사용 균주 및 배양 조건

본 연구에 사용된 균주는 청국장으로부터 분리하였으며, 분리된 균주는 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)의 GenBank database를 이용하여 BLAST search를 통해 분석하였다. 분석된 *Bacillus subtilis* CJH 101(등록번호 MW063656) 및 *Bacillus safensis* CJH 102(등록번호 MW188550) 균주를 동과 발효에 사용하였다.

동과 발효물 제조

본 연구에서는 충북 괴산에서 2020년 8월에 수확한 동과(*Benincasa hispida cong.*)를 사용하였으며, 동과 열매 중 껍질과 씨앗을 제외한 과육 부분을 사용하였다. HR1901-BS의 발효는 멸균한 동과 분쇄물 150 g에 12 시간 배양한 *Bacillus subtilis* CJH 101 (초기 균수 7×10^6CFU/ml) 6 mL을 접종한 뒤 30°C 배양기(FMT ST-S, Fermentech, Korea)에서 72 시간 동안 진행하였다. HR1901-BSaf의 발효는 멸균한 동과 분쇄물 150 g에 12 시간 배양한 *Bacillus safensis* CJH 102 (초기 균수 2×10^7CFU/mL) 6 mL을 접종한 뒤 25°C 배양기(FMT ST-S, Fermentech, Korea)에서 72 시간 동안 진행하였다. 동과 발효물에 5 배의 물을 넣고 120°C에 4 시간 동안 끓여 추출한 다음 여과하여, 농축기로 10-20 brix로 농축한 다음 동결건조기(Labconco, Kansas City, Mo, USA)를 이용하여 분말화 하였다. HR1901-BS의 수율은 건조물 대비 1.6%, HR1901-BSaf의 수율은 건조물 대비 2.4%를 나타냈다.

세포배양

조골전구세포(pre-osteoblast)인 MC3T3-E1은 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양 받아 αMEM (Gibco RBL Co., Grand Island, NY, USA) 배지에 10% Fetal bovine serum (Gibco RBL Co., Grand Island)과 100 units/mL penicillin-streptomycin (Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA)을 첨가하여 사용하였다. 대식세포(murine macrophage cell line)인 RAW 264.7은 한국세포주은행에서 분양 받아 Dulbecco's Modified Eagles Medium (Hyclone Laboratories) 배지에 10% Fetal bovine serum (Gibco RBL Co.)과 100 units/mL penicillin-streptomycin (Hyclone Laboratories)을 첨가하여 사용하였고 37°C, 5% CO_2 incubator (311GP, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 배양하였다.

조골세포 증식 측정

MC3T3-E1 cell을 5×10^3 cells/100 μL이 되도록 96 well-plate에 분주하고 24 시간 동안 37°C, 5% CO_2 incubator에서 배양한 다음 발효물을 48 시간 동안 처리하였다. MTT 시약(DoGenBio, Seoul, Korea)을 첨가하여 2시간 동안 배양 한 후, microplate reader (Epoch, Biotek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

세포 내 ALP 측정

MC3T3-E1를 5×10^3 cells/250 μL로 48well-plate에 분주하고 24 시간 동안 37°C, 5% CO_2 incubator (311GP, Thermo Fisher Scientific)에서 배양한 다음, 발효물을 48 시간 동안 처리하였다. 배양 후 PBS로 세척하고 Lysis buffer를 첨가하여 lysis 시킨 후 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 세포막 성분 등을 침전시켜 상층액을 수집하고, 상층액 내 ALP activity를 ALP assay kit (ab83369, abcam, Cambridge, UK)를 이용하여 사용자 매뉴얼에 기재된 방법대로 정량하여 분석하였다.

Western blot

Western blotting 분석법을 통해 조골세포의 분화와 관련된 단백질들의 발현 양상을 살펴보았다. MC3T3-E1 세포를 100 mm dish에 일정한 양으로 분주 및 24 시간 배양

한 후, 분화 유도를 위해 분화 유도 배지로 교환하였다. 분화된 세포에 발효물을 농도별로 처리하여 CO_2 incubator에서 24 시간 동안 분화 배양하였다. 배양된 세포를 원심분리로 harvest 하여 PBS로 세척 후, RIPA buffer (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 원심 분리한 상층액을 취해 BSA kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 단백질 농도를 정량하였다. 정량한 값을 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)- polyacrylamaide gel에서 전기영동을 이용하여 80-90V에서 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질은 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 100 V 1 시간 transfer 한 후 5% skim milk에 넣어 상온에서 1 시간 정도 blocking 시킨 후 TBS-T로 15 분간 3 회 세척하였다. 1:200-1:1000로 희석된 1차 항체를 처리하여 반응시킨 후 TBS-T로 세척하였다. 그 다음 2차 항체를 1:3,000로 희석한 Horseradish peroxidase (HRP)가 결합되어 있는 anti-rabbit IgG와 anti-mouse IgG (Cell signaling, USA)를 1 시간 반응 시켰다. 그 후 membrane을 TBS-T로 세척하였다. 단백질 발현 정도는 ECL kit (Bio-Rad)를 사용하여 membrane 위에 가하여 발광시켜 chemiluminescence로 확인한 후, imaging densitometer (ImageJ bundled with 64-bit Java 1.8.0_112)를 사용하여 발현 정도를 정량하였다.

파골세포 세포독성 측정

RAW 264.7 cell을 5×10^3 cells/100 μL 이 되도록 96 well-plate에 깔고 24 시간 동안 37°C, 5% CO_2 incubator에서 배양한 다음 발효물을 24 시간 동안 처리하였다. MTT 시약을 첨가하여 2 시간 동안 배양 한 후, microplate reader (Epoch, Biotek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

파골세포 생성억제(TARP assay)

Raw 264.7 세포를 5×10^3 cells/250 μL로 48well-plate에 분주하고 M-CSF (10 ng/mL)와 RANKL (100 ng/mL)을 첨가한 배지에 발효물을 농도별로 처리하여 파골세포 분화를 확인하였다. 배양 후 PBS로 세척하고 Lysis buffer를 첨가하여 lysis 시킨 후 12,000 rpm에서 15 분간 원심분리하여 세포막 성분 등을 침전시켜 상층액을 수집하고, 상층액 내 TRAP activity를 TRAP assay kit (K411-500, BioVision, Milpitas, CA, USA)를 이용하여 사용자 매뉴얼에 기재된 방법대로 정량하여 분석하였다.

통계처리

실험에서 얻어진 통계적 유의성은 Graph Pad Prism 8.0 (Graph Pad software, San Diego, CA, USA) package program을 이용하여 실험군 당 평균과 표준편차로 표시하였고, Student's t-test와 one way analysis of varance (ANOVA) test를 실시한 유의성을 검정하였다.

Results and Discussion

조골세포의 증식에 미치는 영향

조골세포는 세포 및 세포외 기질에 칼슘, 무기질이 침착되는 무기질화를 통해 뼈를 생성하며, ALP, OCN등의 뼈 기질 단백질을 분비하고 parathyroid hormone, estrogen 수용체 등을 함유하고 있다[21,22]. MC3T3-E1 세포는 mouse calvarial 유래의 pre-osteoblastic cell로 조골세포 활성의 초기 마커인 ALP 활성 및 세포 무기질화 등을 기반으로 골 형성 관련 연구에서 유용하게 사용되고 있다[23,24]. 따라서 조골세포의 증식에 미치는 동과 발효물의 효능을 확인하기 위해 MC3T3-E1 세포에 HR1901-BS 및 HR1901-BSaf 을 처리하여 48시간 동안 배양한 후 MTT assay kit를 이용하여 조골세포 증식을 확인하였다.

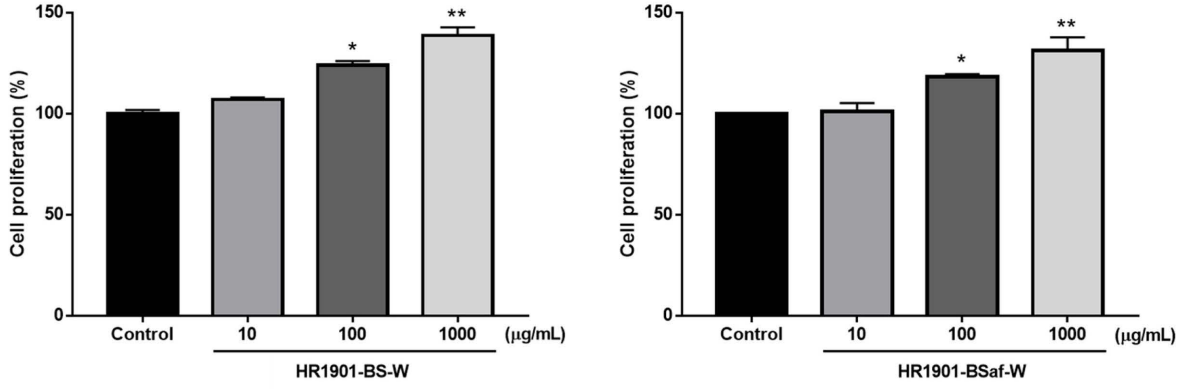

Fig. 1. Effect of HR1901-BS (a) and HR1901-BSaf (b) on the proliferation of osteoblast cells. All values are expressed as the mean±standard deviation. *P <0.05, ** P <0.01, and *** P <0.001 when compared with the control.

HR1901-BS 및 HR1901-BSaf 100 μg/mL, 1000 μg/mL 처리군에서 대조군 대비 각각 123%, 138% 및 118%, 131% 수준으로 증가하는 경향을 보였다(Fig. 1).

조골세포의 alkaline phosphatase 활성에 미치는 영향

염기성 인산분해 효소(ALP)는 모든 조직에 존재하며, 골조직에 존재하는 ALP는 조골세포 분화 초기에 발현되며 골 성장이 증가함에 따라 그 생성이 증가한다. ALP는 조골세포 표면 및 기질 소포에서 관찰되는 인자이며, 조골세포의 분화 및 조골세포의 무기질화 과정 동안 무기인산 운반, 세포 분열, 분화의 조절자로 알려져 있으며, 세포의 표현형 또는 발달 성숙도를 평가하는 biomarker로 사용되고 있다[25,26]. 동과 발효물이 ALP 활성에 미치는 영향을 확인한 결과는 Fig. 2와 같다. HR1901-BS 및 HR1901-BSaf 100 μg/mL, 1000 μg/mL 처리군에서 각각 control 대비 약 121%, 136% 및 140%, 156%의 유의성 있는 증가를 나타냈다. Moon 등[27]의 연구에 따르면 *Bacillus subtilis* MV1로 발효 된 *Malva verticillata* 잎에서 MC3T3-E1 조골세포의 ALP 활성이 증가되었으며, 수성 추출물보다 약 2-3배 증가하였다.

조골세포 분화 관련 인자에 미치는 영향

조골세포는 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell; MSC)에서 유래하는 세포이며 이는 지방세포(adipocyte), 근모세포(myoblast), 연골모세포(chondroblast) 계통으로 분화될 수 있다[28-30]. 조골세포 계통으로의 후속 분화는 runt-related transcription factor 2 (Runx2)의 활성화가 관여한다. 조골세포로 분화하기 위한 중간엽 줄기세포의 증식은 fibronectin, collagen, osteoponitin을 발현하며, 세포 주기의 종료 후 ALP와 콜라겐 분비를 통해 세포외 기질의 성숙을 유도하는 조골세포 분화의 초기 인자이며, 분화 후기에 나타나는 기질의 광물화는 organic scaffold에 광물성 물질의 침착을 촉진하는 OCN이 풍부할 때 발생한다[31,32]. 따라서 조골세포 분화의 핵심 전사인자라 할 수 있는 ALP, OCN, Runx2의 발현에 미치는 동과 발효물의 영향을 확인하였다. 양성대조군으로 사용한 genistein은 에스트로겐과 유사한 구조 및 기능을 가지는 식물 유래 화합물인 식물성 에스트로겐이며 폐경 후 골다공증의 예방 및 골형성 자극 경로인 Runx2를 활성화하여 ALP, OCN 및 OPN의 발현을 유도한다고 알려져 있다[33-36]. 또한 파골세포의 TRAP 활성 억제 및 파골세포 형성 억제 효능이 보고되었다[37,38]. 조골세포의 분화 마커와 관련된 인자의 발현을 확인하기 위해 HR1901-BS 및 HR1901-BSaf을 10, 100, 1000 μg/mL 처리 하고 24시간 배양 한 후 western blot을 통해 단백질 발현을 확인하였다. 그 결과는 Fig. 3과 같다. 세포외 기질의 광물화 조건을 만들어 조골세포 분화에 관여하는 ALP의 경우 HR1901-BS의 10, 100, 1000 μg/mL 처리농도에서 양성대조군으로 사용한 genistein대비 각각 79%, 97%, 106%를 나타냈으며, HR1901-Bsaf의 10, 100, 1000 μg/mL 처리농도에서 genistein대비 각각 85%, 93%, 104%를 나타냈다. 조골세포 분화 후기에 관여하는 OCN의 경우 HR1901-BS의 10, 100, 1000 μg/mL 처리농도에서 genistein 대비 각각 37%, 82%, 124%를 나타냈으며, HR1901-Bsaf의 의 10, 100, 1000 μg/mL 처리농도에서 genistein 대비 각각 80%, 105%, 136%를 나타냈다. 조골세포의 골형성 촉진의 핵심 조절인자인 Runx2의 경우 HR1901-BS의 10, 100, 1000 μg/mL 처리농도에서 genistein 대비 각각 100%, 126%, 154%를 나타냈으며, HR1901-Bsaf의 10, 100, 1000 μg/mL 처리농도에서 genistein 대비 각각 76%, 98%, 116%를 나타냈다.

파골세포의 TRAP 활성에 미치는 영향

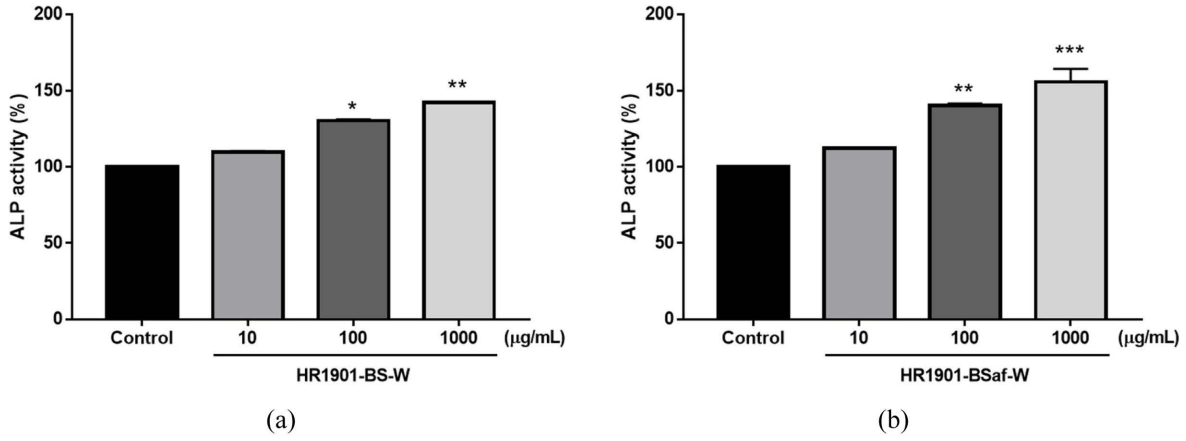

Fig. 2. Effect of HR1901-BS (a) and HR1901-BSaf (b) on the ALP activity of osteoblast cells. All values are expressed as the mean ± standard deviation. **P* <0.05, ** *P* <0.01, and *** *P* <0.001 when compared with the control.

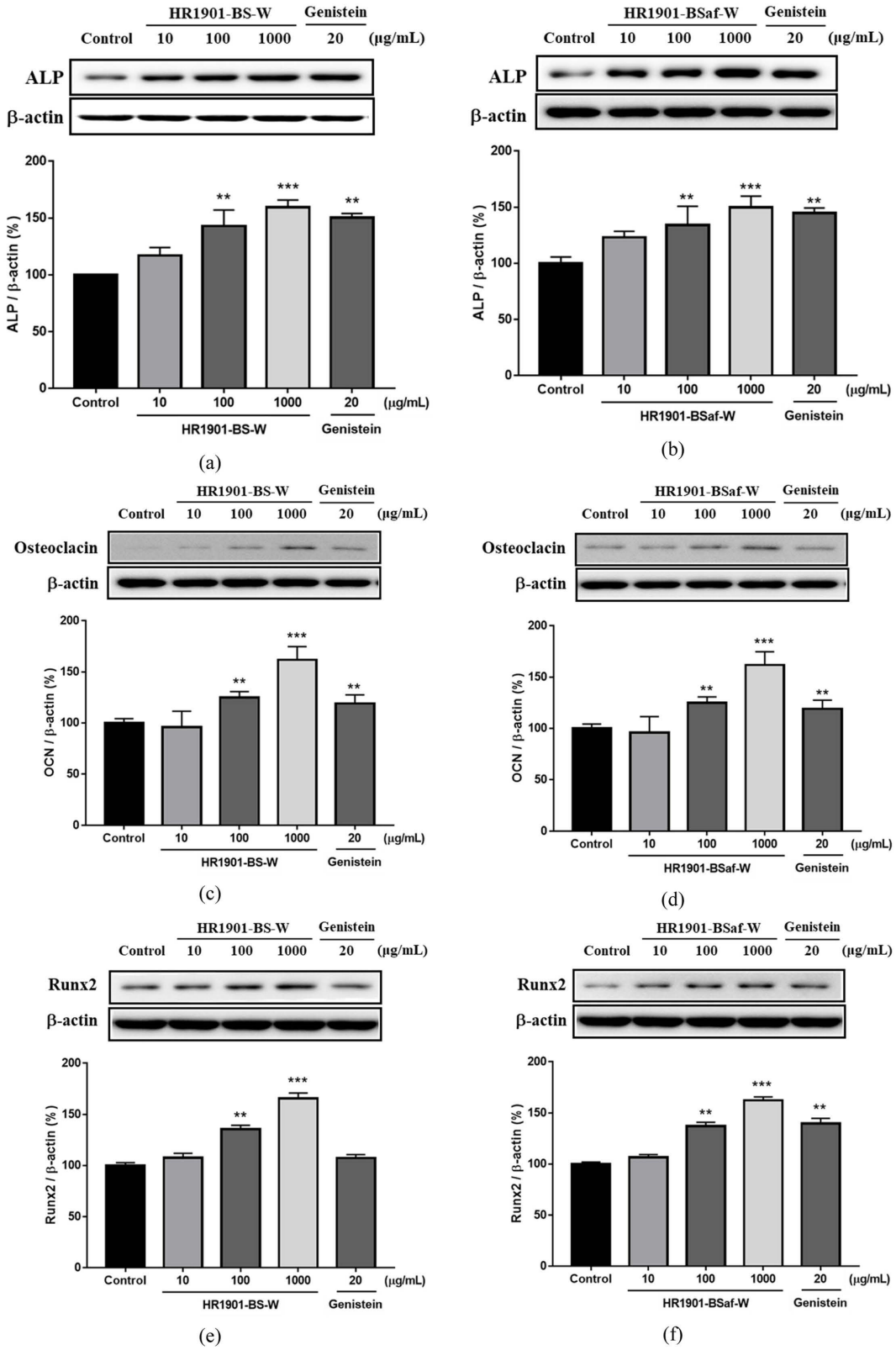

Fig. 3. Effects of HR1901-BS and HR1901-BSaf on the protein expression levels of alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (OCN) and runt-related transcription factor 2 (Runx2) in the MC3T3-E1 cells. Modulation of Osteoblast differentiation related protein expressions by HR1901-BS and HR1901-BSaf was evaluated by Western blot analysis. β-actin was used as an internal control. As a positive control, 20 μg/mL of genistein was used. All values are expressed as the mean ± standard deviation. *P <0.05, ** P <0.01, and *** P <0.001 when compared with the control.

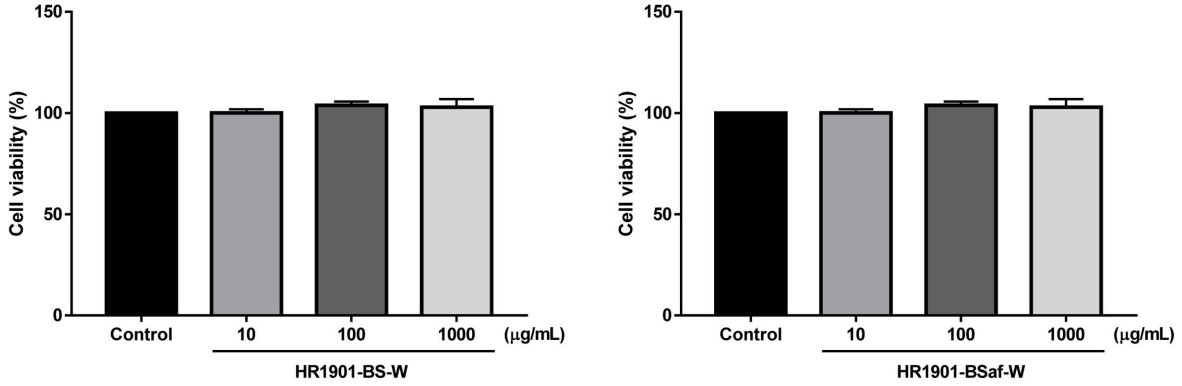

Fig. 4. Effect of HR1901-BS (a) and HR1901-BSaf (b) on the cell viability of the RAW 264.7 cells. All values are expressed as the mean ± standard deviation. **P* <0.05, ** *P* <0.01, and *** *P* <0.001 when compared with the control.

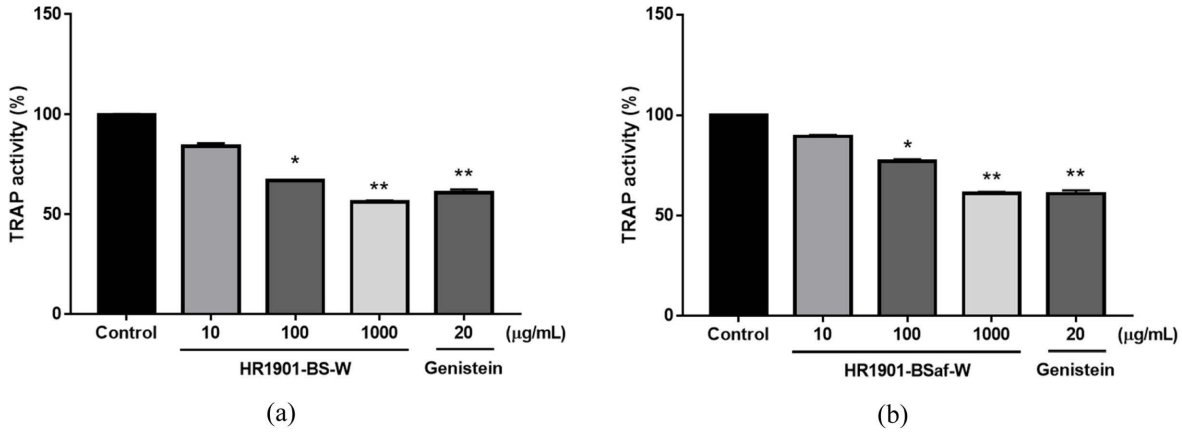

Fig. 5. Effect of HR1901-BS (a) and HR1901-BSaf (b) on the tartrate-resistant acid phosphatase (TARP) activity of the RAW 264.7 cells. As a positive control, 20 μg/mL of genistein was used. All values are expressed as the mean±standard deviation. **P* <0.05, ** *P* <0.01, and *** *P* <0.001 when compared with the control.

파골세포는 hematopoietic stem에서 유래된 단핵구/대식세포(monocyte/macrophage) 계통의 세포이며, macrophage colony stimulation factor (M-CSF) 및 NF-κB ligand (RANKL)의 두가지 사이토카인을 통해 세포가 융합되면서 다핵의 파골세포를 형성하게 된다. M-CSF 자극은 파골세포 전구체 증식을 촉진하며, RANKL은 파골세포 전구체를 자극하여 세포 주기를 종료하고 최종적으로 파골세포로의 분화가 이루어진다[39,40]. 파골세포는 골 표면에 부착되어 actin ring을 형성하여 골 기질을 분해/흡수하며 산생성이 활발하고 tartrate resistant acid phosphatase (TRAP)과 칼시토닌 수용체를 분비하여 뼈 흡수작용을 한다[42]. 따라서 본 연구에서는 미분화된 파골세포 전구세포로부터 파골세포의 생성 및 분화에 미치는 동과 발효물의 잠재적인 역할을 확인하기 위해 murine macrophage 유래RAW 264.7 세포에 M-CSF 및 RANKL을 처리하여 파골세포 형성 중 핵심 전사인자인 TRAP 활성을 측정하였다. HR1901-BS 및 HR1901-BSaf에 대한 세포독성평가에 MTT assay를 이용하였으며, RAW 264.7 세포의 분화 과정 중에 10, 100, 1000 ug/mL의 HR1901-BS 및 HR1901-BSaf를 처리하여 세포 독성을 확인하였다(Fig. 4). 동과 발효물을 처리한 RAW 264.7 세포에서 10, 100, 1000 ug/mL의 모든 농도에서 독성이 없는 것을 확인하였다. 파골세포의 분화 형태를 측정하고자 TRAP 효소 활성을 측정한 결과는 Fig. 5와 같다. HR1901-BS 및 HR1901-BSaf 100 μg/mL, 1000 μg/mL 처리군에서 각각 35%, 47% 및 23%, 39% 감소하는 것을 확인하였으며, 양성대조군으로 사용한 Genistein 20 μg/mL 처리군에서는 39% 감소하였다. 따라서 HR1901-BS 및 HR1901-BSaf은 파골세포에 대한 TRAP 활성을 저해하여 파골세포 활성 억제에 영향을 주는 것으로 사료된다. 따라서 동과 발효물 HR1901-BS 및 HR1901-BSaf은

조골세포 증식 및 분화 촉진과 파골세포의 증식 억제 효능을 확인하였으며, 추후 골질환 관련 기능성식품 소재로서의 가능성을 확인하였다.

Acknowledgment

본 연구는 2021년도 중소벤처기업부의 중소기업기술개발사업(S3206438)의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

국문요약

본 연구는 천연물의 효능을 미생물을 이용하여 증가시키거나 새로운 효능을 도출하고자 하는 연구를 통해 *Bacillus subtilis* CJH 101 및 *Bacillus safensis* CJH 102 로 발효한 동과 발효물(HR1901-BS, HR1901-BSaf)의 뼈 건강 관련 효능을 평가하였다. 뼈를 형성하는 조골세포의 증식을 비교한 결과, 동과 발효물은 조골세포의 증식을 농도 유의적으로 증가시키는 것으로 나타났으며 조골세포 분화 유도 및 무기질화에 관여하는 ALP 활성을 효과적으로 촉진시켰다. 또한 조골세포 분화를 조절하는 전사 인자인 ALP, OCN, Runx2의 발현이 증가됨을 확인하였다. 뼈를 흡수하는 파골세포의 활성을 확인하기 위해 TRAP 활성을 측정한 결과 동과 발효물은 TRAP 활성을 유의적으로 억제하는 것을 확인하였다. 따라서 동과 발효물(HR1901-BS, HR1901-BSaf)은 조골세포의 활성 증가 및 파골세포의 활성 억제를 통해 골대사에 긍정적인 영향을 미치므로 뼈 대사 및 골다공증 관련 기능성 식품 소재로 활용 가능할 것으로 사료된다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Ye-Eun Choi https://orcid.org/0000-0001-8298-248X
Jung-Mo Yang https://orcid.org/0000-0002-1984-7311
Hee-Won Yoo https://orcid.org/0000-0003-2683-0638
Ju-Hyun Cho https://orcid.org/0000-0003-2901-2489

References

1. Frost, H.M., Dynamics of bone remodeling. *Bone biodynamics*, 315-334 (1964).
2. Feng, X., McDonald, J.M., Disorders of bone remodeling. *Annu. Rev. Pathol.*, **6**, 121 (2011).
3. Papachroni, K.K., Karatzas, D.N., Papavassiliou, K.A., Basdra, E.K., Papavassiliou, A.G., Mechanotransduction in osteoblast regulation and bone disease. *Trends Mol. Med.*, **15**, 208-216 (2009).
4. Zhu, L., Tang, Y., Li, X.Y., Keller, E.T., Yang, J., Cho, J.S., Weiss, S.J., Osteoclast-mediated bone resorption is controlled by a compensatory network of secreted and membrane-tethered metalloproteinases. *Sci. Transl. Med.*, **12**, eaaw6143 (2020).
5. Blair, H.C., Larrouture, Q.C., Li, Y., Lin, H., Beer-Stoltz, D., Liu, L., Nelson, D.J., Osteoblast differentiation and bone matrix formation in vivo and in vitro. *Tissue Eng. Part B Rev.*, **23**, 268-280 (2017).
6. Charles, J.F., Aliprantis, A.O., Osteoclasts: more than 'bone eaters'. *Trends Mol. Med.*, **20**, 449-459 (2014).
7. Sözen, T., Özışık, L., Başaran, N.Ç., An overview and management of osteoporosis. *Eur. J. Rheumatol.*, **4**, 46 (2017).
8. Nanjing University of Chinese Medicine, Dictionary of Traditional Chinese Medicine, Shanghai Science and Technology Press, 2006.
9. Mohammad, N.A., Anwar, F., Mehmood, T., Hamid, A.A., Muhammad, K., Saari, N., Phenolic compounds, tocochromanols profile and antioxidant properties of winter melon [*Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn.] seed oils. *J. Food Meas. Charact.*, **13**, 940-948 (2019).
10. Sew, C.C., Zaini, N.A.M., Anwar, F., Hamid, A.A., Saari, N., Nutritional composition and oil fatty acids of kundur [*Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn.] seed. *Pak. J. Bot.*, **42**, 3247-3255 (2010).
11. Moon, C.J., (2006). Coloured illustration for discrimination of herbal medicine IV. *Korea Food & Drug Administration* p. 38.
12. Lee, K.H., Choi, H.R., Kim, C.H., Anti-angiogenic effect of the seed extract of *Benincasa hispida* Cogniaux. *J. Ethnopharmacol.*, **97**, 509-513 (2005).
13. Rachchh, M.A., Jain, S.M. Gastroprotective effect of *Benincasa hispida* fruit extract. *Indian J. Pharmacol.*, **40**, 271 (2008).
14. Shetty, B.V., Arjuman, A., Jorapur, A., Samanth, R., Yadav, S. K., Valliammai, N., Rao, G. M., Effect of extract of *Benincasa hispida* on oxidative stress in rats with indomethacin induced gastric ulcers. *Indian J. Pharmacol.*, **52**, 178-182 (2008).
15. Mandana, B., Russly, A.R., Farah, S.T., Noranizan, M.A., Zaidul, I.S., Ali, G., Antioxidant activity of winter melon (*Benincasa hispida*) seeds using conventional Soxhlet extraction technique. *Int. Food Res. J.*, **19**, 229-234 (2012).
16. Moon, M.K., Kang, D.G., Lee, Y.J., Kim, J.S., Lee, H.S., Effect of *Benincasa hispida* Cogniaux on high glucose-induced vascular inflammation of human umbilical vein endothelial cells. *Vasc. Pharmacol.*, **50**, 116-122 (2009).
17. Lim, S.J., Effects of fractions of *Benincasa hispida* on antioxidative status in streptozotocin induced diabetic rats. *J. Nutr. Health.*, **40**, 295-302 (2007).
18. Perkins, C., Siddiqui, S., Puri, M., Demain, A.L., (2016). Biotechnological applications of microbial bioconversions.

Crit. Rev. Biotechnol., **36**, 1050-1065.
19. Kiran, E.U., Trzcinski, A.P., Ng, W.J., Liu, Y., Bioconversion of food waste to energy: A review. *Fuel*, **134**, 389-399 (2014).
20. Sanchez, S., Demain, A.L., Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical, and biotechnological significance. *Org. Process Res. Dev.*, **15**, 224-230 (2011).
21. Adler, C.P., *Bone diseases: macroscopic, histological, and radiological diagnosis of structural changes in the skeleton.* Springer Science & Business Media (2013).
22. Long, F., Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 27-38 (2012).
23. Wang, D., Christensen, K., Chawla, K., Xiao, G., Krebsbach, P. H., Franceschi, R.T., Isolation and characterization of MC3T3?E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential. *J. Bone Miner. Res.*, **14**, 893-903 (1999).
24. Sudo, H., Kodama, H.A., Amagai, Y., Yamamoto, S., Kasai, S., *In vitro* differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J. Cell Biol.*, **96**, 191-198 (1983).
25. Golub, E.E., Boesze-Battaglia, K., The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Curr. Opin. Orthop.*, **18**, 444-448 (2007).
26. Gronthos, S., Zannettino, A.C., Graves, S.E., Ohta, S., Hay, S.J., Simmons, P.J., Differential cell surface expression of the STRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells. *J. Bone Miner. Res.*, **14**, 47-56 (1999).
27. Moon, K., Lee, S., Cha, J., *Bacillus subtilis* fermentation of *Malva verticillata* leaves enhances antioxidant activity and osteoblast differentiation. *Foods*, **9**, 671 (2020).
28. Jensen, E.D., Gopalakrishnan, R., Westendorf, J.J., Regulation of gene expression in osteoblasts. *Biofactors*, **36**, 25-32 (2010).
29. Stein, G.S., Lian, J.B., Van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Montecino, M., Javed, A., Pockwinse, S.M., Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. *Oncogene*, **23**, 4315-4329 (2004).
30. Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Kishimoto, T., Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, **89**, 755-764 (1997).
31. Long, F., Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 27-38 (2012).
32. Gronthos, S., Zannettino, A.C., Graves, S.E., Ohta, S., Hay, S.J., Simmons, P.J., Differential cell surface expression of the STRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells. *J. Bone Miner. Res.*, **14**, 47-56 (1999).
33. Poulsen, R.C., Kruger, M.C., Soy phytoestrogens: impact on postmenopausal bone loss and mechanisms of action. *Nutr. Rev.*, **66**, 359-374 (2008).
34. Abdi, F., Alimoradi, Z., Haqi, P., Mahdizad, F., Effects of phytoestrogens on bone mineral density during the menopause transition: a systematic review of randomized, controlled trials. *Climacteric*, **19**, 535-545 (2016).
35. Uchiyama, S., Yamaguchi, M., Genistein and zinc synergistically enhance gene expression and mineralization in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Int. J. Mol. Med.*, **19**, 213-220 (2007).
36. Ming, L.G., Chen, K.M., Xian, C.J., Functions and action mechanisms of flavonoids genistein and icariin in regulating bone remodeling. *J. Cell. Physiol.*, **228**, 513-521 (2013).
37. Lee, S.H., Kim, J.K., Jang, H.D., Genistein inhibits osteoclastic differentiation of RAW 264.7 cells via regulation of ROS production and scavenging. *Int. J. Mol. Sci.*, **15**, 10605-10621 (2014).
38. Li, B., Yu, S., Genistein prevents bone resorption diseases by inhibiting bone resorption and stimulating bone formation. *Biol. Pharm. Bull.*, **26**(6), 780-786 (2003).
39. Teitelbaum, S.L., Bone resorption by osteoclasts. *Science*, **289**, 1504-1508 (2000).
40. Ross, F.P., M-CSF, c-Fms, and signaling in osteoclasts and their precursors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1068**, 110-116 (2006).