

동충하초 추출물을 함유한 리큐르의 제조공정에 따른 Cordycepin 및 Alcohol 함량 분석

최선효¹, 권상철^{*}

¹한국교통대학교 식품공학과

The Analysis of Cordycepin and Alcohol Content in accordance with The Various Manufacturing Process of The Liqueur Containing The *Cordyceps* Extract

Seon-Hyo Choi¹, Sang-Chul Kwon^{*}

¹Department of Food Science and Technology, Korea National University of Transportation

요약 본 연구에서는 동충하초 추출물을 이용한 건강지향적인 리큐르를 개발하고, 제조방법에 대한 기준을 마련하였다. 동충하초 리큐르는 Sample을 21가지의 처리구로 나누어 제조하였고, 각각의 Cordycepin의 함량, Cordycepin의 안정성, 알코올 함량(Methanol and Ethanol)을 분석하였다. 시료 내 Cordycepin 함량분석 결과 증류 후에 동충하초를 넣고 3개월 침출한 시료의 경우(DL-3) 최대 58 µg/mL 검출되었고 발효 시에는 동충하초를 넣는 것은 무의미하므로 증류 후 동충하초를 넣어야 할 것으로 생각된다. 시료의 알코올 함량 분석 결과 Methanol은 시료 모두에서 검출되지 않았다. Ethanol 함량은 증류 후에 동충하초를 3개월 침출한 군에서 31.4%와 막걸리에 동충하초를 8 g 첨가한 군에서 17.2%로 나타내었다. Cordycepin의 안정성을 분석한 결과 Cordycepin 함량이 보관도중에 조금씩 감소하는 결과를 보여 제품 생산 시 함량을 조금 높여서 생산하여야 할 것으로 생각된다.

Abstract We manufactured a liqueur containing *Cordyceps* extract. 21 kinds of the liqueur were manufactured and analyzed the cordycepin content, cordycepin stability and alcohol content. Cordycepin content was detected up to 58 µg/mL in DL-3(adding *Cordyceps militaris* and leached for 3 months). Results of Alcohol content analysis, Methanol was not detected in all samples. Ethanol contents showed at 31.4% from the Leaching process for 3 months after distillation, and at 17.2% from the rice wine adding *Cordyceps militaris* 8 g. In the results of the Cordycepin content stability analysis, the Cordycepin content decreased during storage period little by little, so our considered opinion is that the cordycepin content should be increased slightly when producing as products.

Keywords : Cordycepin, *Cordyceps militaris*, Ethanol, Liqueur, Methanol

1. 서론

동충하초는 버섯의 균사체가 겨울에는 곤충의 유충이나 성충의 체내에 잠복해 있다가 여름에 곤충의 체내에서 버섯으로 돌아오는 모습에서 연유된 버섯의 일종이다

[1]. 동충하초의 가장 대표적인 자실체를 형성하는 *Cordyceps* 속은 전 세계적으로 300여종이 있으며[2], 현행 우리나라 식품공전상 “식품원재료분류표”에 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*)가 제시되어 있다[3]. 동충하초의 생리활성 물질로 충초소(cordycepin), 충초

본 연구는 산업통상자원부와 한국 산업기술진흥원의 지역특화산업 육성사업으로 수행되었음.

*Corresponding Author : Sang-Chul Kwon(Korea National Univ.)

Tel: +82-10-5468-8355 email: ksc6969@hanmail.net

Received August 11, 2015

Revised (1st September 2, 2015, 2nd September 7, 2015)

Accepted December 4, 2015

Published December 31, 2015

산(cordycepic acid), 아미노산, 다당류, 비타민 전구체 등이 알려져 있다[4-6]. 밀리타리스 동충하초는 cordycepin을 다량 함유하고 있으며 항균, 항암, 면역기능 증강 및 마약에 대한 해독기능[7], 종양성장의 억제 및 면역조절 기능[8] 등이 알려져 있다. 동충하초에 대하여 김 등[9]과 Cory 등[10]은 항암작용을, 송 등[11]과 Kou 등[12]은 면역증강기능을, 심 등[13]과 Kiho 등[14, 15]은 혈당강하 또는 콜레스테롤 저하효과 등을 보고하였고, 고와 최[16]는 고콜레스테롤혈증을 유발한 흰 쥐에 밀리타리스 동충하초의 균사체 분말을 3% 수준으로 급여하였더니 혈청의 중성지방, 총콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 및 동맥경화지수를 낮추는 효과가 있다고 하였다. 박 등[17, 18]은 동충하초의 항균, 항산화 및 아질산염소거능 등을 보고하였다.

노인 연령층 증가 및 성인병 증가로 인한 의료비 증가로 식품의 기능성에 대한 국민관심이 높아지고 있으며 식품을 통하여 질병을 예방할 수 있는 기능성 가공식품 및 소재 가공기술의 개발이 절실히 필요하다.

동충하초의 기능성을 이용한 식품개발로는 박 등[19, 20]이 동충하초를 첨가한 증편을, 김 등[21]이 동충하초 분말을 첨가한 젤리를, 정 등[22]이 동충하초를 첨가한 식빵을, 이 등[23]이 동충하초 균사체를 이용한 죽을 제조하여 각각의 기능성과 품질특성을 보고하였다. 기존 동충하초 관련 주류는 동충하초에 주정 또는 담금주용 술을 붓고 일정시간 보관, 숙성하여 동충하초의 성분을 추출하는 방법으로 생산하여 향이나 충초소 등 주요 성분 함량이 낮아 그 효능을 보기 어렵다. 따라서 본 연구에서는 기능성의 증대 및 가공식품산업의 육성을 도모하기 위하여 동충하초 추출물로 차별화된 리큐르 발효제품을 개발하고자 동충하초 리큐르의 제조공정을 발효 공정, 증류 공정, 증류 후 침출 공정으로 나누어 충초소의 함량, 충초소의 안정성, 리큐르의 알코올함량(Methanol and Ethanol)을 분석하였다.

2. 연구방법

2.1 실험재료

본 실험에 사용한 동충하초 품종은 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*)로 부산에서 구입하여 사용하였다.

2.2 동충하초 리큐르 제조

동충하초 리큐르는 발효 공정, 증류 공정, 증류 후 침출 공정으로 나누어 제조하였다. 발효공정은 입국 20 kg에 주모 10 L를 접종하고 50 L로 정량하여 1차 사입하고, 25℃에서 1주일간 발효하였다. 1차 사입한 50 L에 쌀 60 kg, 동충하초 2 kg, 정제효소 100 g을 첨가하고 물을 넣어 200 L로 정량하여 2차 사입하였다. 2차 사입한 시료 200 L를 발효 후에 증류(F-1), 증류-제성-여과(F-2), 동충하초 첨가-증류(F-3), 동충하초 첨가-증류-제성-여과(F-4)의 4개의 처리구로 나누어서 제조하였다.

증류공정은 시판 막걸리에 동충하초를 첨가하여 증류한 공정으로 동충하초를 0 g(D-1), 4 g(D-2), 8 g(D-3), 12 g(D-4), 16 g(D-5), 20 g(D-6)씩 첨가한 6개의 처리구로 나누어 제조하였다.

증류 후 침출공정은 입국 40 kg에 주모 20 L를 접종하고 60 L로 정량하여 1차 사입하고, 25℃에서 1주일간 발효하였다. 1차 사입한 60 L에 쌀 100 kg, 정제효소 100 g을 첨가하고 물을 넣어 400 L로 정량하여 2차 사입하였다. 2차 사입한 시료 400 L를 증류하여 알코올도수 40%인 증류식소주를 제조하여 대조군(DL-C)으로 사용하였다. 알코올도수 40%인 증류식소수에 동충하초 첨가 후 6시간 추출(DL-1), 동충하초 1개월 침출(DL-2), 3개월 침출(DL-3), 5개월 침출(DL-4)의 4개의 처리구로 나누어서 제조하였다.

2.3 충초소 함량분석

충초소 함량은 시료를 50% 메탄올로 추출한 후 0.45 μm PTFE filter로 여과한 것을 검액으로 사용하였다. 충초소 기준물질을 각각 농도별로 용매에 희석하여 표준용액으로 하고 각 농도에 따른 피크 넓이로 계산하여 정량곡선을 작성하였다. 용액 시료 내 충초소 함량을 Table 1의 HPLC(High Performance Liquid Chromatograph) 분석조건에서 측정하였다.

2.4 알코올 함량분석

시료 각각의 에탄올 및 메탄올의 함량을 분석하기 위하여 전처리하는 시료를 클로로포름으로 추출한 후 0.45 μm PTFE filter로 여과한 것을 검액으로 하였고 에탄올 및 메탄올 기준물질을 각각 농도별로 용매에 희석하여 표준용액으로 하고 각 농도에 따른 피크 넓이로 계산하여 정량곡선을 작성하였다. 시료의 알코올 함량은 Table 2의 GC 분석조건에서 측정하였다.

Table 1. HPLC conditions for cordycepin analysis

Parameters	Conditions		
Column	Agilent eclipse XDB C18 (5 μ m, 4.6 \times 150 mm)		
Column temperature	30 $^{\circ}$ C		
Detector	UV 254 nm		
gradient condition	Time (min)	Water (%)	MeOH (%)
	0	90	10
	2	90	10
	6	10	90
	7	10	90
	8	90	10
13	90	10	
Flow rate	1 ml/min		
Injection volume	10 μ L		

Table 2. GC/FID conditions for Ethanol and Methanol analysis

Parameters	Conditions
Column	ZB-624
Temperature conditions	Isothermal for 5 min Then 10 $^{\circ}$ C/min from 50 $^{\circ}$ C to 280 $^{\circ}$ C Then isothermal for 5 min at 280 $^{\circ}$ C
Detector	FID@ 280 $^{\circ}$ C
Carrier gas	N ₂ , 1.0ml/min
Injection volume	Split 10:1 @ 280 $^{\circ}$ C, 1 μ L

2.5 총초소 안정성 평가

시료는 각각 주정과 증류수 비율(30:70, 35:65, 40:60, 45:55, 50:50)에 총초소 표준물질을 75 mg/L을 첨가한 후 배양기에서 35 $^{\circ}$ C, 30일간 보관 후 성분분석을 하였다. 시료를 50% 메탄올로 추출한 후 0.45 μ m PTFE filter로 여과한 것을 검액으로 하였고 총초소 기준물질을 각각 농도별로 용매에 희석하여 표준용액으로 하고 각 농도에 따른 피크 넓이로 계산하여 정량곡선을 작성하였다. 용액 시료 내 총초소 함량을 Table 3의 HPLC 분석조건에서 측정하였다.

Table 3. HPLC conditions for cordycepin analysis

Parameters	Conditions
Column	Agilent eclipse XDB C18 (5 μ m, 4.6 \times 150 mm)
Column temperature	30 $^{\circ}$ C
Detector	UV 254 nm
Flow rate	1 ml/min
Injection volume	10 μ L

3. 연구결과

3.1 총초소 함량분석

시료 내 총초소 함량분석 결과를 Table 4에 나타내었다. 분석 결과, 발효 전에 동충하초를 넣고 증류한 시료에서는 총초소가 모두 검출되지 않았다. 증류 후 동충하초를 넣고 3개월 침출한 시료의 경우 최대 58 g/mL 검출되었고, 동충하초를 12 g 첨가한 막걸리에서 총초소 함량이 증류 전에는 6.9 μ g/mL가 나왔으므로 10배는 넣어야 된다는 결과를 예측할 수 있었다. 증류 후에는 총초소가 검출되지 않았으므로 증류 후 동충하초를 넣어야 할 것으로 생각된다.

Table 4. Cordycepin contents of the Liquor containing the *Cordyceps* extract

Samples	Cordycepin content (μ g/mL)
F-1	ND ¹⁾
F-2	ND
F-3	ND
F-4	ND
DL-C	ND
DL-1	9.4
DL-2	51.0
DL-3	58.1
DL-4	56.2
D-1 ²⁾	ND
D-1 ³⁾	ND
D-2 ²⁾	ND
D-2 ³⁾	0.5
D-3 ²⁾	5.1
D-3 ³⁾	ND
D-4 ²⁾	6.9
D-4 ³⁾	ND
D-5 ²⁾	11.7
D-5 ³⁾	ND
D-6 ²⁾	21.3
D-6 ³⁾	ND

1) : Not detected

2) : Before distillation process

3) : After distillation process

3.2 알코올 함량분석

시료의 알코올 함량 결과(Table 5), 메탄올은 시료 모두에서 검출되지 않았다. 에탄올 함량은 증류 후 침출 공정 중 3개월 침출한 군에서 31.4%로 나타내었고, 증류 공정에서는 증류 후 동충하초를 8 g 첨가한 군에서 17.2%로 가장 높은 함량을 나타내었다.

3.3 총초소 안정성 평가

시료를 각각 주정과 증류수 비율(30:70, 35:65, 40:60, 45:55, 50:50)에 총초소 표준물질을 75 mg/L을 첨가한 후 배양기에서 35°C, 30일간 보관 후 성분 분석한 결과 (Table 6) 총초소 함량이 보관도중 조금씩 감소하는 결과를 보여 제품 생산 시 함량을 조금 높여서 생산하여야 할 것으로 생각된다. 또한 주정 알코올도수가 총초소 함량에도 영향을 주므로 제품 생산 시 주정 알코올함량도 고려해야 할 것으로 생각된다.

Table 5. Ethanol and Methanol contents of the Liquor containing the *Cordyceps* extract

(µg/mL)			
Samples	Ethanol content	Samples	Ethanol content
F-1	441.464	D-1 ¹⁾	110.121
F-2	259.262	D-1 ²⁾	133.049
F-3	419.971	D-2 ¹⁾	112.262
F-4	263.805	D-2 ²⁾	100.275
DL-C	332.534	D-3 ¹⁾	117.009
DL-1	14.252	D-3 ²⁾	172.047
DL-2	235.849	D-4 ¹⁾	109.613
DL-3	314.592	D-4 ²⁾	151.699
DL-4	322.000	D-5 ¹⁾	110.234
		D-5 ²⁾	150.830
		D-6 ¹⁾	110.545
		D-6 ²⁾	143.244

1) : Before distillation process
2) : After distillation process

Table 6. Cordycepin contents of the Liquor incubated at 35°C for 30 days after adding the Cordycepin standard 75 µg/L

(µg/mL)	
Samples	Cordycepin content
30 : 70	74.3
35 : 65	67.2
40 : 60	64.3
45 : 55	65.2
50 : 50	59.7

4. 논의

본 연구에서는 동충하초 추출물을 이용한 리큐르를 개발하기 위하여 시료를 21가지의 처리구로 나누어 제조하였다. 시료 내 총초소 함량분석 결과 증류식 소주에 동충하초를 넣고 3개월 침출한 시료의 경우 최대 58 µg/mL 검출되었다. 차 등[24]에 의하면 증류수를 이용하여 초음파 추출을 하였을 때 총초소의 추출이 가장

유효하였으며, 육종에 의해 총초소 함유량을 높인 *C. militaris* JLM 0636이 7.42 mg/g으로 지금까지 보고된 것보다 상당히 높은 것으로 알려졌다. 하지만 알코올 발효 후 총초소 함량이 얼마나 되는지 알 수 없어 추후 연구가 필요할 것으로 생각된다. 시료의 알코올 함량 분석 결과 메탄올은 시료 모두에서 검출되지 않았으며 에탄올 함량은 동충하초를 3개월 침출한 군에서 31.4%, 막걸리에 동충하초를 8 g 첨가한 군에서 17.2%로 나타내었다. 총초소의 함량은 보관도중에 조금씩 감소하는 결과를 보였는데, Yang 등[25]에 의하면 알코올 발효가 진행되는 중에도 총초소 함량이 감소하였다고 하여 본 연구결과와 비슷하였다. 따라서 제품 생산 시 함량을 조금 높여야 할 것으로 생각된다. Chun 등[26]은 원료로서 참살과 *cordyceps militaris*의 비율을 1:1로 하여 제조하였을 때 맛있는 황주를 생산하는데 최적의 비율이라고 보고하였다. 총초소 함량과 알코올 함량을 종합적으로 비교해 봤을 때 총초소 함량이 가장 많으면서 알코올 함량도 충족시킬 수 있는 것으로써 증류식 소주에 동충하초를 3개월 침출한 공정이 리큐르개발에 가장 적합한 공정인 것으로 생각된다.

References

- [1] J. M. Sung, Y. B. Yu, D. Y. Cha. "Mushroom Science", p. 569. Kyohaksa, Seoul, 1998.
- [2] Y. Kobayashi, D. Shimizu. "Iconography of vegetable wasps and plant worms", Hoikusha Pub. Co., Ltd., Osaka, pp. 280-285, 1983.
- [3] KFDA, Food Ingredients Search Engine 2004, KFDA, 2004. Available From:http://fse.foodnara.go.kr/origin/search_data_list.jsp, (accessed Jun, 2015)
- [4] K. G. Cunningham, W. Manson, F. S. Spring, S. A. Hutchinson, "Cordycepin, a metabolic product from cultures of *Cordyceps militaris* (Linn.)" Link. Nature, pp.949-954, 1950.
- [5] Y. C. Kuo, C. Y. Lin, W. J. Tasi, C. L. Wu, C. F. Chen, M. S. Shiao, "Growth inhibitors against tumor cells in *Codyceps sinensis* other than cordycepin and polysaccharides. Cancer Invest", pp. 611-615, 1994.
- [6] J. S. Zhu, G. M. Halpern, K. Jones, "The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine. *Cordyceps sinensis* Part II", J Altern Complement Med, pp. 289-303, 1998.
- [7] J. Ying, X. Mao, Q. Ma, Y. Zong, H. Wen, "Icons of medical fungi from China", Science Press, Beijing, China, pp. 60-85, 1987.
- [8] H. M. Lee, Y. J. Lee, T. S. Park, "Tumor Growth Inhibitory and Immunomodulatory Activities of

- Cordeyceps Militaris* Water Extracts in ICR Mice Bearing Sarcoma-180 Solid Tumor”, J Korean Soc Food Sci Nutr, Vol. 33, No. 1, pp. 59-65, 2004.
- [9] H. W. Kim, Y. H. Kim, X. F. Cai, K. S. Nam, S. J. Lee, H. S. An, E. H. Jeong, S. H. Yun, S. K. Sung, S. J. Lee, J. W. Hyun, “In vitro antitumor activity of ergosterol peroxide isolated from *cordyceps militaris* on cancer cell lines from Korean parients”, Kor J. Mycol, Vol. 29, No. 1, p. 61, 2001.
- [10] J. G. Cory, R. J. Suhadolnik, B. Resnick, M. A. Rich, “Incorporation of cordycepin (3'-deoxyadenosine) into ribonucleic acid of human tumor cells”, Biochim. Biophys. Acta, p. 646, 1965.
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0005-2787\(65\)90085-7](http://dx.doi.org/10.1016/0005-2787(65)90085-7)
- [11] C. H. Song, Y. J. Jeon, B. K. Yang, K. S. Ra, J. M. Sung, “The anti-complementary activity of exo-polymers produced from submerged mycelial cultures of higher fungi with particular reference to *Cordyceps militaris*”, J. Microbiol. Biotechnol, Vol. 8, No. 5, p. 536, 1998.
- [12] Y. C. Kou, W. J. Tsai, M. S. Shiao, C. F. Chen, C. Y. Lin, “*Cordyceps sinensis* as an immunomodulatory agent”, Am. J. Chin. Med, Vol. 24, pp. 111-125, 1996.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1142/S0192415X96000165>
- [13] J. Y. Shim, Y. S. Lee, S. S. Lim, K. H. Shin, J. E. Hyun, S. Y. Kim, E. B. Lee, “Pharmacological activities of *Pecilomyces japonica*, A new type cordyceps sp.”, Kor. J. Pharmacogn, Vol. 31, No. 2, p. 163, 2000.
- [14] T. Kiho, J. Hui, A. Yamane, S. Ukai, “Polysaccharides in fungi, XXXII. Hypoglycemic activity and chemical properties of a polysaccharide from the cultural mycellium of *Cordyceps sinensis*”, Biol. Pharm. Bull, Vol. 16, pp. 1291-1293, 1993.
- [15] T. Kiho, A. Yamane, J. Hui, S. Usui, S. Ukai. “Polysaccharides in fungi, XXXVI. Hypoglycemic activity of a polysaccharide(CS-F30) from the cultural mycellium of *Cordyceps sinensis* and its effect on glucose metabolism in mouse liver”, Biol. Pharm. Bull, Vol. 19, pp. 294-296, 1996.
- [16] J. B. Koh, M. A. Choi, “Effect of *Cordyceps militaris* on lipid metabolism in rats fed cholesterol diet”, Korean J Nutrition Vol. 34, pp. 265-270, 2001.
- [17] C. S. Park, C. J. Kwon, M. A. Choi, G. S. Park, K. H. Choi. “Antioxidative and nitrite scavenging activities of *cordyceps militaris* extracts”, Kor. J. Food Preservation, Vol. 9, No. 1, p. 109, 2002.
- [18] C. S. Park, C. J. Kwon, M. A. Choi, G. S. Park, K. H. Choi, “Antibacterial activities of *cordyceps* spp., mugwort and pine needle extracts”, Kor. J. Food Preservation, Vol. 9, No. 1, p. 102, 2002.
- [19] G. S. Park, C. S. Park, M. A. Choi, J. S. Kim, H. J. Cho, “Quality Characteristics of Jeung-Pyun added with concentrations of *Paecilomyces japonica* powder”, Korean J. Soc. Food Cookery SCI, Vol. 19, No. 3, June, 2003.
- [20] G. S. Park, K. S. Youn, S. H. Hwang, H. J. Cho, J. S. Kim, “Optimization for the Preparation of Jeung-Pyun, with Added *Paecilomyces Japonica* Powder, Using a Response Surface Methodology”, Korean J. Soc. Food Cookery SCI, Vol. 19, No. 4, August, 2003.
- [21] A. J. Kim, C. S. Yuh, I. S. Bang, “A Qualitative Investigation of Dongchunghacho Jelly with Assorted Increments of *Paecilomyces japonica* Powder”, Korean J. Food & Nutr, Vol. 20, No. 1, pp. 40-46, 2007.
- [22] M. H. Jung, G. S. Park, “Effect of *Paecilomyces japonica* and *Cordyceps militaris* Powder on Quality Characteristics of Bread”, J. Korean Soc. Food Sci. Nutr, Vol. 31, No. 5, pp. 743-748, 2002.
- [23] G. D. Lee, S. K. Kim, Y. H. Jeong, K. S. Youn, S. R. Shin, J. G. Ku, “Optimization on the Preparation Conditions of Instant Rice Gruel Using *Paecilomyces Japonica mycelia*”, J. Korean Soc. Food Sci. Nutr, Vol. 30, No. 5, pp. 870-876, 2001.
- [24] J. Y. Cha, H. Y. Ahn, S. J. Heo, S. H. Park, Y. K. Jeong, Y. S. Cho, “Improvement Effect of Cordycepin-Enriched *Cordyceps militaris* JLM 0636 Powder against Orotic Acid-Induced Fatty Liver in Rats”, Journal of Life Science, Vol. 21, No. 9, pp. 1274-1280, 2011.
- [25] R. Yang, D. Gu, Z. Gu, “CORDYCEPS RICE WINE: A NOVEL BREWING PROCESS”, Journal of Food Process Engineering Early View, Article first published online, 17 Jul, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jfpe.12251>
- [26] Y. U. E. Chun, G. E. Zhong-qiao, H. E. Ji-fang, “Study on *Cordyceps Militaris* Health Yellow Rice Wine [J]”, Liquor-Making Science & Technology, 2006.

최 선 효(Seon-Hyo Choi)

[정회원]



- 2014년 2월 : 한국교통대학교 식품공학과 졸업
- 2014년 3월 ~ 현재 : 한국교통대학교 식품공학과 석사과정

<관심분야>

발효공학, HACCP, 식품위생, 식품미생물, 식품가공

권 상 철(Sang-Chul Kwon)

[정회원]



- 1999년 2월 : 성균관대학교 생명자원과학과(농학석사)
- 2002년 2월 : 성균관대학교 식품생명공학과(이학박사)
- 1995년 10월 ~ 2011년 2월 : (주)참선진종합식품(R&D 부장)
- 2011년 3월 ~ 2013년 2월 : 한국식품산업협회 식품안전지원단
- 2013년 3월 ~ 현재 : 한국교통대학교 식품공학과 부교수

<관심분야>

발효공학, HACCP, 식품위생, 식품미생물, 식품가공