

## Biological Activity and Chemical Characteristics of *Cordyceps militaris* Powder Fermented by Several Microscopic Organisms

Hee-Young Ahn<sup>1</sup>, Kyu-Rim Park<sup>1</sup>, Kyoung-Hoon Yoon<sup>1,3</sup>, Jae-Yun Lee<sup>2</sup> and Young-Su Cho<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biotechnology, Dong-A University, 37, Nakdong-daero 550beon-gil, Saha-gu, Busan 604-714, Korea

<sup>2</sup>CMG biofarm, Silla University, 140, Baegyang-daero 700beon-gil, Sasang-gu, Busan 617-736, Korea

<sup>3</sup>MieV Life Science, MieV Co. Ltd., 215, Galmachi-ro, Jungwon-gu, Seongnam 462-901, Korea

Receive January 13, 2015 / Revised February 10, 2015 / Accepted February 10, 2015

The comparative effects of the fibrinolytic action, antioxidative activity, and tyrosinase inhibition of *Cordyceps militaris* powder and fermented *Cordyceps militaris* powders were investigated using several microscopic organisms. The nutritional components such as phenolic compounds, flavonoids, and minerals were also measured. The total phenolic compounds and flavonoid concentrations were highest in the *Cordyceps militaris* powder fermented by *Aspergillus oryzae*. Major minerals were K, Ca, Mg, and Zn. Native polyacrylamide gel electrophoresis (native-PAGE) analysis of the total protein patterns of *Cordyceps militaris* powder and fermented *Cordyceps militaris* powders revealed slight varietal differences. Fibrinolytic activity was highest in the *Cordyceps militaris* powder fermented by *Bacillus subtilis* and *Aspergillus kawachii*. The DPPH radical scavenging activity was slightly stronger in the powder fermented by *Monascus purpureus*; however, these samples all exhibited a relatively low activity when compared with butylated hydroxytoluene (BHT). Tyrosinase inhibition activity was stronger in the powder fermented by *Aspergillus oryzae* than in unfermented powder. These results may provide basic data for understanding the biological activities and chemical characteristics of *Cordyceps militaris* powder fermented by several microscopic organisms for the development of functional foods.

**Key words** : Antioxidative activity, *Cordyceps militaris*, fermentation, fibrinolytic activity, tyrosinase inhibition activity

### 서 론

버섯은 담자균강(Basidiomycota)과 일부의 자낭균강(Ascomycota)에 속하는 종으로 당질, 단백질, 비타민, 무기질과 같은 영양소가 풍부하여 오래전부터 한방 및 민간생약으로 이용되어 왔으나, 최근 다양한 효능이 알려져 의약품 및 건강식품으로의 용도가 증가하고 있는 추세이다. 버섯의 효능으로는 콜레스테롤저하효과[18], 혈당강하 작용[19], 항균작용[33] 등이 보고되어 있으며, 이 밖에도 항염증작용, 간 보호 작용, 항산화작용, 강장작용과 항암작용[28] 등이 알려져 있으며 최근에 최 등[10]은 버섯류의 혈전용해능을 보고한바 있다. 버섯의 유용성분은 alkaloids, flavonoids 및 terpenoids와 같은 저분자 물질[13]뿐만 아니라 다당류, 단백질, tannin 등과 같은 고분자 물질[32]이 다양하게 혼재되어 있다. 동충하초(冬蟲夏草)란 겨울에는 벌레 상태로 있다가 여름이 되면

버섯이 된다는 뜻에서 나온 말인데 곰팡이의 일종인 동충하초균이 주로 온습도가 높아지는 시기에 살아있는 곤충의 몸속으로 들어가 발육 증식하면서 기주곤충을 죽이고 얼마 후 자실체를 곤충 표피에 형성하는 일종의 약용버섯을 말한다. 즉, 식물체를 기주로 하여 발생하는 상항버섯, 영지버섯, 표고버섯 등과는 다른 동물성인 곤충을 기주로 식물성인 자실체(버섯)를 형성한다. 동충하초는 전 세계적으로 약 300여종이 보고되어 있으며 그 중에서 대표적인 동충하초 속으로는 완전세대 자낭균류(Ascomycetes)의 맥각균과(Clavicipitaceae)에 속하는 *Cordyceps* 속과 불완전균류의 *Paecilomyces*속, *Torrubiella*속 및 *Podonectria*속이 대표적이다[16]. 효능으로는 면역증강활성, 항암활성, 항바이러스효과 및 항염증 효과 등 다양한 생리활성이 보고됨에 따라 그 이용 가능성이 증대되고 있다[22]. 동충하초의 유용성분으로는 cordycepin, cordycepic acid, 아미노산, 다당류, 비타민 등이며 [25], 그 중 주요 생리활성 성분인 cordycepin (3'-deoxyadenosine 과 2' deoxycycoformycin)은 면역증강과 항균작용, 항당뇨 작용, 고지혈증 개선작용 및 혈소판 응집억제 작용이 보고되어 있다[14].

최근에는 생활의 향상 및 다양화로 인한 자연식품, 저칼로리 식품, 무공해식품의 선호추세로 버섯의 소비량이 날로 증가하는 경향이다. 한편, 발효과정을 거치게 되면 유용성분의 증가, 새로운 생리활성 부여, 흡수를 증가발효식품의 생리 활성 작용

#### \*Corresponding author

Tel : +82-200-7586, Fax : +82-200-7505

E-mail : choys@dau.ac.kr

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.

이 알려지면서 세계적으로 식품,약품,화장품 등 다양한 분야에서 활용되고 있다. 유산균, 효모, 바실러스, 곰팡이 등의 유익한 미생물을 이용한 발효기술의 진보로 다당체, 올리고당, 사포닌, 아미노산, 펩타이드, 피틴산 등의 발효산물을 얻거나 bio-conversion에 의하여 유효 성분의 생성 및 증가로 다양한 생리 활성작용을 나타내는 것으로 잘 알려져 있다[34].

따라서 본 연구에서는 몇 종류의 유용 미생물을 이용하여 동충하초를 발효시켜 균 종간의 변화를 비교 검토하고 이를 건강식품 소재로 활용하기 위한 기초 자료를 얻는 목적으로 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료 및 발효 조건

본 실험에 사용한 변태기 동충하초(*Cordyceps militaris*) 분말은 2014년 6월 청원농산(김해, 경남)으로부터 제공받아 사용하였다. 동충하초 분말의 발효 균주는 본 연구실내 보관중인 균주 중 2종의 유산균 *Lactobacillus hilgardii* (Lh), *Lactobacillus acidophilus* (La)와 1 종의 효모 *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), 1 종의 세균 *Bacillus subtilis* (Bs), 4 종의 곰팡이 *Monascus purpureus* (Mp), *Aspergillus oryzae* (Ao), *Aspergillus kawachii* (Ak), *Rhizopus oryzae* (Ro) 균주를 1차적으로 선택하였다. 전 배양시킨 이들 각각의 균주를 동충하초 분말에 접종한 후 30°C에서 3일간 고형발효 시켰으며, 발효 중간에 발효물의 건조를 막기 위하여 멸균된 증류수를 약간씩 뿌려주었다. 발효 후 자연 건조하였으며 완전히 건조 후 시료로 사용하였다.

### 발효물의 pH 및 산도 변화 측정

동충하초 분말과 발효 동충하초 분말을 1% (w/v) 농도로 추출한 수용액의 pH는 pH meter (Methrohm 691, Swiss)로 직접 측정하였고, 적정 산도는 시료액 10 ml에 각각 증류수 50 ml을 가한 후 잘 흔들어 1% phenolphthalein 용액 4~5 방울 떨어뜨리고 0.1 N NaOH로 적정한 후 그 소모량을 총 산도로 환산하였다. 추출물의 총 산도는 acetic acid 값이 0.0006을 계산식에 적용하였다.

$$\text{Total acidity (acetic acid, \% W/V)} = \left[ \frac{\text{titrated 0.1 N NaOH ml} \times 0.0006}{\text{sample ml}} \right] \times 100$$

### 페놀성 화합물 측정

페놀성 화합물의 함량은 Folin-Denis법[31]으로 측정하였다. 즉, 각 1% (w/v) 시료 용액에 Folin-ciocalteu's phenol reagent를 첨가하여 잘 혼합하고 실온에서 반응시킨 후, 7.5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 가하여 혼합하고 50°C에서 발색시켜 spectrophotometer (Hitachi U-2900, Tokyo, Japan)의 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 페놀성 화합물의 함량은 tannic acid를 일정 농도(0-500 µg/ml)로 하여 시료와 동일한 방법으로 측정

한 표준곡선으로부터 계산하였다.

### Flavonoid 함량 측정

Flavonoid 함량은 Jia 등의 방법[17]에 따라 측정하였다. 각 1% (w/v) 시료 용액에 5% NaNO<sub>2</sub> 용액을 가하고, 10% AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O를 잘 혼합하여 반응시킨 용액을 spectrophotometer의 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 flavonoid 함량은 표준물질로서 (+)-catechin hydrate을 일정 농도(20-200 µg/ml)로 시료와 동일한 방법으로 측정하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

### Native-PAGE (Non-denatured polyacrylamine electrophoresis)에 의한 단백질 패턴 비교

동충하초 분말과 발효 동충하초 분말의 단백질 패턴은 Davis 방법[11]에 따라 slab-type polyacrylamide gel을 사용하였다. Native-PAGE의 gel 농도는 7.5%를 사용하였다. 즉 분리 gel은 30% acrylamide, 0.8% bis-acrylamide, 1.5 M Tris-HCl buffer (pH 8.8), 0.05% TEMED 및 10% 과산화암모늄을 혼합하여 1 mm 두께로 만들어 사용하였다. 분리 gel 위에는 5% 농축 gel [30% acrylamide, 0.8% bis-acrylamide, 0.5 M Tris-HCl buffer (pH 6.8)]을 만들어 5× sample buffer [(312.5 mM Tris-HCl, pH 6.8), 50% glycerol, 0.05% bromophenol blue] 용액에 혼합한 시료를 농축 gel 내에 형성된 홈에 일정량씩 주입하였다. 전기영동은 Tris-glycine 완충액(25 mM Tris, 192 mM glycine, pH8.8) 하에서 1.5 mA/gel (cm)의 정전류를 통하여 행하고, 저온(4°C)에서 2 시간 통전시켰다. 영동이 완료된 gel은 7% 초산 액에 용해한 1% coomassie brilliant blue R-250으로 염색한 후 7% 초산 액으로 충분히 탈색시켜 건조 및 사진촬영을 하였다.

### 미네랄 함량 측정

동충하초 분말과 발효 동충하초 분말의 미네랄 함량은 A. O. A. C 분석 방법[1]에 준하여 측정하였다. 즉, 각 시료 분말 1 g을 정확히 취해 550°C에서 3시간 회화시킨 후 6 N HCl에 용해시켜 완전히 산 분해시켜 수욕 상에서 산을 완전히 제거하고, 이 건고물에 3 N HCl을 가하여 여과한 후 원소 종류에 따라 각각 일정비율로 희석하여 원자흡광 분광광도계 (Analyst 300, Perkin Elmer, Norwalk CT, USA)를 이용하여 측정하였다.

### DPPH free radical에 의한 전자공여 활성 측정

항산화 활성 측정은 Blois의 방법[6]에 따라 측정하였다. 즉, DPPH (α,α'-diphenyl-β-picrylhydrazyl)용액은 100 ml 에탄올에 DPPH 16 mg을 녹인 후 증류수 100 ml를 혼합하여 여과지 (Whatman filter paper NO. 2)로 여과시켜 만들었다. 동충하초와 발효 동충하초의 각 추출물 분말을 0.01%, 0.05%, 0.10%,

0.50%, 1.00%의 농도로 만든 시료 용액을 1 ml 취하고, 여기에 DPPH 반응 용액 5 ml을 넣어 잘 혼합한 후 실온에서 30분간 반응시킨 후 spectrophotometer의 528 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 활성 비교를 위하여 기존에 항산화제로 많이 사용되고 있는 합성 항산화제 BHT (butylated hydroxytoluene)를 0.05% 농도로 첨가하여 시료와 동일한 방법으로 흡광도를 측정하였다. DPPH를 이용한 항산화 활성은 시료 첨가구와 무첨가구의 흡광도차를 백분율(%)로 표시하였다.

$$\text{DPPH free radical scavenging activity(\%)} = [1 - (\text{Abs}/\text{Abc})] \times 100$$

Abc: Absorbance of control treatment at 528 nm  
 Abs: Absorbance of sample treatment at 528 nm

**Tyrosinase 저해 활성 측정**

Tyrosinase 활성은 Masamoto 등의 실험 방법[27]을 약간 변형하여 측정하였다. *In vitro* mushroom tyrosinase 활성 저해 능력을 측정하기 위하여 1.5 ml plastic cuvette에 2.5 mM 3,4-dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) 0.3 ml, 시료 추출물 0.05 ml 및 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8)을 혼합하여 25°C에서 먼저 반응시켰다. 여기에 1,380 units/ml mushroom tyrosinase (2,500 unit, Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA) 0.05 ml를 넣은 후 25°C에서 2분간 반응시키면서 475nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다. 대조구는 시료가 들어있지 않는 시료 용해 용액을 사용하였고, 양성 대조구는 tyrosinase 저해제로 알려진 0.6 mM kojic acid를 사용하였다. 이때 tyrosinase 활성 저해율(%)은 다음의 공식에 의하여 산출하였다.

$$\text{Tyrosinase 활성저해율 (\%)} = 100 - [(A - B) / A] \times 100$$

- A는 시료가 들어있지 않은 반응액의 0.5-1분 사이의 흡광도 차이.  
 - B는 시료가 들어있는 반응액의 0.5-1분 사이의 흡광도 차이.

**혈전용해 활성 측정**

동충하초 분말과 발효 동충하초 분말의 혈전용해 효소 활성은 fibrin plate법[5]을 변형하여 lysed zone으로 측정하였다. Fibrin plate는 0.06% fibrinogen (Singma, St. Louis MO, USA)을 0.2 M borate buffer (pH 7.5)에 용해시킨 후 petri dish에 10 ml씩 분주하고 thrombin (500 unit, Sigma, St. Louis MO USA) 40 unit를 균일하게 섞이도록 가하면서 균일한 두께의 fibrin clot를 형성시킨 후 실온에서 30분간 방치한 후 사용하였다. 시료를 증류수에 1% 농도로 용출시킨 후 여과(Whatman No.2)하여 fibrin plate 상에 50 µl씩 점적하여 37°C에서 3시간 동안 반응시킨 후 생성된 투명한 부위의 직경을 측정하였다. 직경은 서로 수직인 두 개의 지름을 측정하였고, 투명대가 타원인 경우에는 가장 긴 지름과 가장 짧은 지름을 측정하여 투명대의 면적을 구하였다.

**통계처리**

실험으로부터 얻어진 결과치는 one-way ANOVA 검정에 의한 평균치와 표준오차(mean ± SE)로 표시하였으며, 각 실험군 간의 유의성 검증은 Duncan's multiple range test로 하였다[12].

**결과 및 고찰**

**발효물의 pH 및 산도 변화**

번데기 동충하초 (*Cordyceps militaris*, C군) 분말 1% 추출 수용액에서 pH는 6.46으로 중성에 가까운 pH를 나타내었고, 산도는 1.13%이었다(Table 1). *Lactobacillus hilgardii* 이용 발효 번데기 동충하초(CLh군)와 *Lactobacillus acidophilus* 이용 발효 번데기 동충하초(CLa군)의 분말 1% 추출 수용액의 pH는 각각 5.34와 4.18이었고, 산도는 1.59%, 2.03%로 이는 유산균에 의해 발효 전과 비교하여 pH는 낮아지고, 산도는 증가한 것으로 보인다. *Saccharomyces cerevisiae* 발효 번데기 동충하초(CSc군), *Bacillus subtilis* 발효 번데기 동충하초(CBs군), *Monascus purpureus* 발효 동충하초(CMp군), *Aspergillus kawachii* 발효 번데기 동충하초(CAk군)의 분말 1% 추출 수용액의 pH는 발효 전과 유사한 수준이었고, 0.96-1.23%의 범위에서 산도를 나타내었다. 발효 전과 비교 하였을 때, CAo군 분말 1% 추출 수용액의 pH는 7.65로 증가하였고, *Rhizopus oryzae* 발효 번데기 동충하초(CRo군)분말 1% 추출 수용액의 pH는 5.91로 낮아졌다.

**총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량**

폴리페놀은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물 중

Table 1. pH and acidity of *Cordyceps militaris* powder (C) and fermented C with several microscopic organisms

	pH	Acidity (%)
C	6.46±0.01	1.13±0.02
CLh	5.34±0.03	1.59±0.02
CLa	4.18±0.03	2.03±0.02
CSc	6.53±0.01	1.23±0.01
CBs	6.62±0.02	0.96±0.01
CMp	6.20±0.02	1.13±0.02
CAo	7.65±0.01	1.43±0.02
CAk	6.46±0.01	1.02±0.02
CRo	5.91±0.01	0.93±0.03

Values are mean ± SE, n=3.

C : *Cordyceps militaris* (C)  
 CLh : C Fermented by *Lactobacillus hilgardii*  
 CLa : C Fermented by *Lactobacillus acidophilus*  
 CSc : C Fermented by *Saccharomyces cerevisiae*  
 CBs : C Fermented by *Bacillus subtilis*  
 CMp : C Fermented by *Monascus purpureus*  
 CAo : C Fermented by *Aspergillus oryzae*  
 CAk : C Fermented by *Aspergillus kawachii*  
 CRo : C Fermented by *Rhizopus oryzae*

의 하나로 다양한 구조와 분자량을 가지며, phenolic hydroxyl기를 가지고 있어 단백질 및 기타 거대 분자들과 결합하는 성질을 가지고, 항산화 효과 등의 생리활성 기능을 가진다[23]. 폴리페놀에 속하는 성분인 플라보노이드는 C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>를 기본 골격으로 노란색 또는 담황색을 나타내는 페놀계 화합물의 총칭으로 자연계에 널리 분포하고 있으며 폴리페놀과 같이 채소류, 식물체, 곡물, 과일류 등에 함유되어 있는 것으로 알려져 있다[15]. C군 분말의 총 폴리페놀은 2.68%의 비율로 이중 플라보노이드는 0.42%를 차지하여 전보[2]와 같이 *C. militaris*의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 유사하게 나타났다 (Table 2). 발효군 중에서 총 폴리페놀 함량은 CAo군 4.60%, CMp군 2.94%, CSc군 2.78%, CLa군 2.74%의 순으로 발효전보다 증가하였고, 플라보노이드 함량은 CAo군 1.52%, CRo군 0.67%, CLa군 0.56%, CSc군 0.50% 순으로 증가하였다. CLh군, CBs군, CAk군에서는 발효 전에 비해 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 비슷하거나 감소하는 경향을 보였다.

**Native-PAGE에 의한 단백질 영동 패턴비교**

8가지 균주로 각각 발효한 번데기 동충하초와 그 번데기 동충하초의 분말의 단백질을 Native-PAGE로 분석한 결과 C군에서 여러 종류의 밴드가 관찰되었다(Fig. 1). CLh군과 CLa군에서는 C군에서 관찰된 밴드가 거의 나타나지 않았지만, CSc군, CBs군, CMp군, CAk군, CRo군에서는 C군에 나타난 밴드와 비슷한 경향을 나타내었고, C군보다 밴드가 뚜렷한 양상이었다. 특히, CAo군에서 C군과는 다른 형태의 밴드를 나타내어 *Aspergillus oryzae* 균주의 작용으로 인해 새로운 단백질이 생성된 것으로 보인다. 이는 cordycepin 고함유 번데기 동충하초를 균주 발효 후 native-PAGE로 본 결과, 본 연구의 결과와 같이 *Aspergillus oryzae*로 발효시킨 군에서 새로운 단백질이 나타나 번데기 동충하초는 *Aspergillus oryzae*의 작용에 의한 bioconversion의 결과인 것으로 추측되며[3], 새로 나타

Table 2. Concentrations of polyphenolic compounds and flavonoids of *Cordyceps militaris* powder (C) and fermented C with several microscopic organisms

	Total phenolic compounds concentrations (%)	Flavonoids concentrations (%)
C	2.68±0.03	0.42±0.02
CLh	2.46±0.02	0.38±0.05
CLa	2.74±0.06	0.56±0.02
CSc	2.78±0.04	0.50±0.02
CBs	2.65±0.02	0.36±0.04
CMp	2.94±0.01	0.38±0.03
CAo	4.60±0.03	1.52±0.03
CAk	2.67±0.04	0.45±0.02
CRo	2.35±0.03	0.67±0.03

Values are mean ± SE, n=3. Abbreviations are the same as in Table 1.

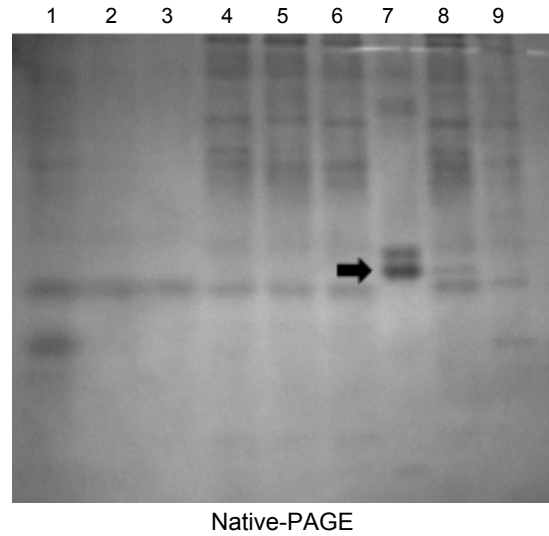


Fig. 1. Electrophoretic patterns of *Cordyceps militaris* powder (CM) and fermented CM with several microscopic organisms using native-polyacrylamide gel electrophoresis. 1: *Cordyceps militaris* (C), 2: C Fermented by *Lactobacillus hilgardii* (CLh), 3: C Fermented by *Lactobacillus acidophilus* (CLa), 4: C Fermented by *Saccharomyces cerevisiae* (CSc), 5: C Fermented by *Bacillus subtilis* (CBs), 6: C Fermented by *Monascus purpureus* (CMp), 7: C Fermented by *Aspergillus oryzae* (CAo), 8: C Fermented by *Aspergillus kawachii* (CAk), 9: C Fermented by *Rhizopus oryzae* (CRo).

난 특정 단백질 밴드에 대한 추가적인 연구가 필요한 것으로 사료되어진다.

**Mineral 함량**

8가지 균주로 각각 발효시킨 번데기 동충하초와 그 번데기 동충하초의 분말의 주요 mineral인 K, Mg, Ca, Na, Fe, Zn 순으로 높은 함량을 나타내었고 (Table 3), 또한 Oh 등의 연구 [29]에서 *C. militaris*의 미네랄 함량이 K, P, Mg, Ca, Fe 순으로 나타나 본 연구의 결과는 이와 유사한 경향을 보였다. CLh군, CLa군을 제외한 발효군은 C군의 mineral 함량보다 증가하였으며, 이중 CAo군에서 K의 함량이 60.40 ppm, Mg의 함량이 36.86 ppm, Ca의 함량이 18.35 ppm, Zn의 함량이 0.69 ppm으로 다른 발효군에 비해 비교적 큰 증가를 나타내었다. K는 세포 내액의 주된 양이온으로 나트륨과 함께 체액의 삼투압과 수분 균형을 조절하며, 나트륨, 수소 이온과 함께 산과 염기 균형에 관여하는 것으로 알려져 있다[24]. Cordycepin 함량을 높은 동충하초의 *Bacillus subtilis* 발효 결과 다른 균주 발효군에 비해 K와 Na의 함량이 크게 증가하였고[3], 본 연구의 CBs군은 K의 함량이 64.59 ppm, Na의 함량이 31.39 ppm으로 다른 발효군에 비해 높은 수치를 나타내어 유사한 경향을 나타내었다.

Table 3. Mineral concentration (ppm) of *Cordyceps militaris* powder (C) and fermented C with several microscopic organisms (ppm)

	K	Mg	Ca	Na	Fe	Zn
C	28.63±1.38	19.86±0.10	8.43±0.68	3.83±0.29	1.03±0.05	0.45±0.01
CLh	32.39±0.17	14.35±0.04	5.51±0.03	13.86±0.11	1.33±0.17	0.30±0.00
CLa	42.72±0.20	19.27±0.10	8.16±0.04	17.28±0.06	1.38±0.39	0.38±0.00
CSc	43.78±0.06	27.07±0.09	12.74±0.05	4.50±0.33	2.48±0.20	0.53±0.00
CBs	64.59±0.22	26.78±0.09	12.69±0.03	31.39±0.08	1.85±0.36	0.56±0.00
CMp	45.54±0.23	28.72±0.05	13.55±0.05	5.35±0.11	2.52±0.12	0.54±0.01
CAo	60.40±0.18	36.86±0.16	18.35±0.09	6.21±0.04	2.32±0.15	0.69±0.01
CAk	45.95±0.83	28.35±0.06	13.78±0.19	5.29±0.20	1.77±0.21	0.55±0.01
CRo	40.64±0.11	26.00±0.18	12.38±0.03	3.97±0.13	1.08±0.33	0.51±0.01

Values are mean ± SE, n=3. Abbreviations are the same as in Table 1.

**DPPH free radical에 의한 전자공여 활성**

DPPH는 항산화 물질로부터 전자 혹은 수소를 받으면 비라디칼로 전환되면서 흡광도가 변화함에 따라 짙은 자주색으로 탈색되는 정도를 지표로 하여 항산화 능력을 측정하는 것으로, 일반적으로 식물체에 존재하는 (+)-catechin, quercetin, flavonoid, vanillic acid 등의 polyphenol 화합물이 DPPH free radical에 의한 전자공여 활성능을 가지는 것으로 알려져 있다 [26]. 8가지 균주를 이용한 발효 번데기 동충하초 추출물 1%의 DPPH 전자공여능을 측정한 결과는 Fig. 2과 같다. 대조군으로 사용된 합성 항산화제인 BHT는 90%가 넘는 전자공여 활성을 나타내었으며, C군에서는 60%의 활성을 나타내었고, 발효 추출물군에서는 대체로 C군과 비슷하거나 증가하는 경향을 나타내었다. 이 중 CMp군, CBs군, CSc군순으로 높은 전자공여 활성을 보였고, CAk군과 CLa군은 비슷한 수준의 활성을 보였다. 앞서 폴리페놀과 플라보노이드 함량 측정결과에서 CAo군에서 높은 함량을 나타내 DPPH 전자공여능이 높게 나타날 것으로 예상했으나, 비교적 낮은 수치를 나타내어 이는 보편

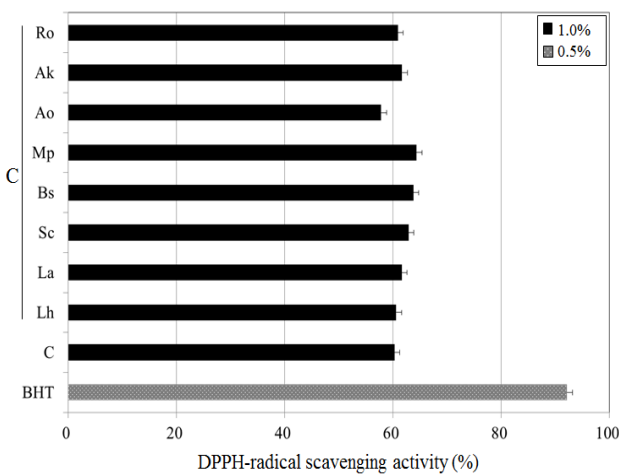


Fig. 2. DPPH free radical scavenging activities of *Cordyceps militaris* powder (C) and fermented C with several microscopic organisms. Values are mean ± SE, n=3. Abbreviations are the same as in Table 1.

적으로 알려진 폴리페놀의 증가에 의한 전자공여 활성의 증가 [20]와는 상이한 결과를 나타내었다. 이의 결과는 발효 분말의 추출 과정에서 발효물 간의 추출 정도의 차이 때문인 것으로 사료된다.

**Tyrosinase 저해 활성**

Tyrosinase는 melanin 생합성 과정의 주요 효소로 tyrosine을 기질로 이용하는 효소이며, melanin 생성이 과도할 경우 인체에서는 기미, 주근깨, 검버섯, 피부 노화 및 피부암 유발이 일어나고, 채소, 생선 및 과일 등에서는 갈변화 현상을 일으켜 식품의 품질 저하를 야기한다. 이러한 현상을 방지하기 위해 tyrosinase 저해에 관한 연구가 진행되고 있으며, 최근에는 안전성을 고려한 천연물에서의 tyrosinase 저해 연구가 보고되고 있다[9]. 8가지 균주로 발효시킨 번데기 동충하초 추출물의 tyrosinase 저해 활성을 본 결과 대부분의 발효 추출물군에서 tyrosinase 저해 활성이 증가하였고, 이 중 CAo군, CMp군, CSc군, CAk군순으로 활성이 높았으며, CAo군은 61%의 tyrosinase 저해 활성을 보였다(Fig. 3). 이는 melanoma 세포 증식과 멜라닌 생합성을 억제시키는 대표적인 화합물 중 폴리페

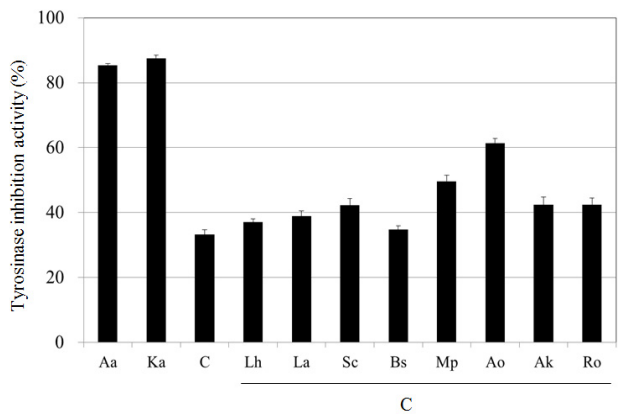


Fig. 3. Tyrosinase inhibition activity of *Cordyceps militaris* powder (C) and fermented C with several microscopic organisms. Values are mean ± SE, n=3. Abbreviations are the same as in Table 1.

놀, 플라보노이드, albutin, kojic acid 등으로 제시되고 있는데 [21], Table 2에서 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 발효 전에 비해 크게 증가한 CAo균이 Tyrosinase 저해 활성에 큰 영향을 준 것으로 사료된다. *A. oryzae*, *A. kawachii*, *Monascus purpureus*를 이용한 발효 참당귀는 발효하지 않은 참당귀에 비해 tyrosinase 저해 활성이 증가한 것으로 보고[7]되어 본 연구와 같이 곰팡이 균사체로 발효시킴으로써 tyrosinase 저해 활성 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

**발효 균주에 따른 혈전용해 활성**

혈전의 생성은 활성화된 thrombin에 의해 혈장 단백질인 fibrinogen이 fibrin으로 전환됨으로써 생성되며, 혈전용해 효소 활성을 가진 물질들은 혈액응고의 기질인 fibrin을 가수분해하여 혈전증을 완화시킬 수 있고, 최근에는 각종 천연물 또는 발효물에서 혈전용해 활성 물질을 탐색하는 연구가 활발히 진행되고 있다[30].

8가지 균주로 발효시킨 변태기 동충하초의 혈전용해능 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 각각의 추출물을 fibrin plate에 뿌려 incubation하여 1, 3, 6시간 후 결과를 보았다. 1시간 후 C군, CSc군, CBs군, CMP군, CAk군, CRo군에서 혈전용해 활성을 보이기 시작하였고, 3시간 후 CSc군, CBs군, CMP군, CAk군, CRo군에서 C군보다 크고 뚜렷한 혈전용해 환을 확인할 수 있었다. 6시간째에 CSc군, CBs군, CMP군, CAk군, CRo군은 C군에 비해 큰 혈전용해능을 나타내었으며, incubation 시간에 따라 혈전용해 활성이 증가하였다(Fig. 4A). 6시간 후의 혈전용해 활성을 수치적으로 환산한 결과(fig. 4B)에서 CBs군과 CAk군이 C군에 비해 약 4배 높은 활성을 나타내어 균주 발효로 인해 혈전용해 활성이 증가한 것을 확인하였으나, CLh군,

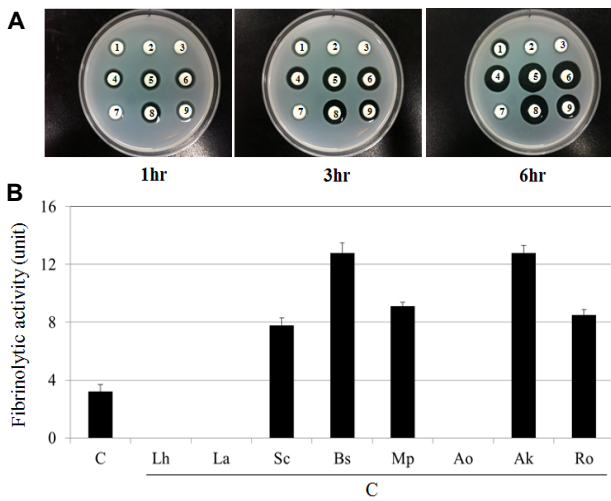


Fig. 4. Fibrinolytic activities of *Cordyceps militaris* powder (C) and fermented C with several microscopic organisms (A, B). Values are mean ± SE, n=3. Abbreviations are the same as in Table 1.

CLa군, CAo군에서는 혈전용해 활성이 나타나지 않았다. 이는 Fig. 1의 native-PAGE의 결과에서 CLh군, CLa군에서 단백질 밴드가 거의 나타나지 않았고, CAo군에서는 C군과는 다른 새로운 단백질 밴드가 나타난 것으로 미루어 보아 혈전용해 효소의 농도 감소 또는 발효로 인한 효소의 제거 현상 등의 이유로 추측된다. 특히, *Bacillus* 속은 발효과정에서 생성되는 생리 활성 물질 중 단백질 분해 활성과 혈전용해능을 가지는 것으로 알려져 있어[4] CBs에서 혈전용해 활성이 높게 나타난 것으로 사료된다.

**접종량과 발효 시간 및 온도에 따른 혈전용해 활성**

Fig. 3의 결과에서 혈전용해 활성이 높게 나타난 CBs군과 CAk군으로 선별하였다. 각 균은 균주별로 1% (v/w)와 5% (v/w) 수준으로 접종한 후, 30°C에서 발효시간을 24, 48, 72, 96시간으로 달리 하여 발효하였다. 각 발효 추출물을 fibrin

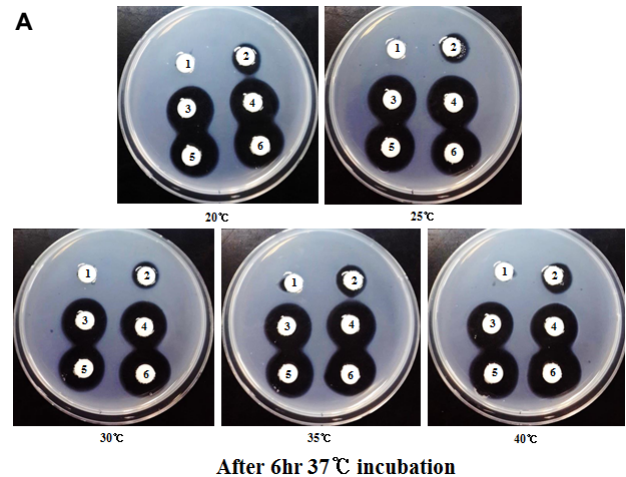


Fig. 5. Fibrinolytic activities of fermented *Cordyceps militaris* powder (C) according to fermentation time in a temperature of 30°C (A, B). Values are mean ± SE, n=3. 1: dry water, 2: *Cordyceps militaris* (C), 3: Ak 1% (C Fermented by *Aspergillus oryzae* 1%), 4: Ak 5% (C Fermented by *Aspergillus oryzae* 5%), 5: Bs 1% (C Fermented by *Bacillus subtilis* 1%), 6: Bs 5% (C Fermented by *Bacillus subtilis* 5%).

plate에 분주하고, 6시간 동안 incubation 한 결과 24, 48, 72시간 발효 추출물 CAk군, CBs군 모두 혈전용해 활성이 나타났다(Fig. 5A). 96시간 추출물을 분주한 plate에서는 C군은 혈전용해 활성이 나타나지 않았고, CAk군, CBs군에서는 혈전용해 활성을 보였지만 24, 48, 72시간의 발효 추출물에 비해 낮은 활성을 나타내었다. 24시간 발효 결과, CAk 1% 추출물에서 13.20 unit, CBs 1% 추출물에서 13.23 unit으로 비슷한 혈전용해 활성을 나타내었고, CBs 5% 추출물은 14.40 unit으로 CBs 1% 추출물보다 활성이 증가하는 경향을 보였다(Fig. 5B). 또한, 발효 시간이 증가함에 따라 혈전용해 활성은 감소하는 경향을 보여 24시간 발효 추출물에서 최대 활성을 나타내었고, 추출 농도 변화에 따른 큰 차이는 나타나지 않았다. Cha 등의 연구[8]에서 발효 누에 분말의 발효 시간을 3, 6, 9, 12일로 설정하여 혈전용해 활성을 비교한 결과, 발효 6일째에 높은 활성을 보였고, 최대 활성을 나타낸 뒤 점차 감소하는 경향을 나타낸 것으로 보고되었다.

CBs군과 CAk군의 발효 온도를 20, 25, 30, 35, 40℃로 설정하여 각 군주별로 1% (v/w)와 5% (v/w) 수준으로 접종한 후, 24시간 동안 발효하였다. 각 군의 혈전용해능을 본 결과, 모든 plate에서 발효 추출물의 혈전용해 활성이 나타났고, 발효 추출물은 C군보다 높은 활성을 나타내었다(Fig. 6A). 발효 온도 25, 30, 35, 40℃에서 발효한 CAk군은 대체적으로 접종량이 높아짐에 따라 혈전용해 활성이 대체로 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 6B). 20, 25℃의 발효온도에서 CBs 1% 추출물과 CBs 5% 추출물은 각각 10.00 unit, 12.10 unit으로 일정한 활성을 보였고, 30℃에서 증가하였다가 35, 40℃의 발효온도에서도 CBs 1% 추출물은 12.10 unit으로 일정한 혈전용해 활성을 보였으며, CBs 5% 추출물에서는 30℃에서 13.20 unit, 35℃에서 14.40 unit, 40℃에서 15.00 unit으로 혈전용해 활성이 점차 증가하였다. 본 실험의 결과 발효 시간 24시간, 발효 온도 40℃에서 CAk 5% 추출물이 13.23 unit, CBs 5% 추출물이 15.00 unit으로 최대 혈전용해 활성을 갖는 것으로 확인하였고, 발효 시간과 발효 온도에 따라 추출되는 유리 성분이 달라져 각기 다른 혈전용해 활성이 나타나는 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 과제(결과물)는 2014년도 교육과학기술부의 재원으로 지원을 받아 수행된 산학협력 선도대학(LINC) 육성사업의 연구결과입니다.

### References

1. A.O.A.C. 1975. Official methods of analysis. 12th eds., Association of official analytical chemists. Washington, D.C., U.S.A.
2. Ahn, H. Y., Lee, J. H., Kang, M. J., Cha, J. Y. and Cho, Y. S. 2012. Fibrinolytic activity and chemical properties of Cordycepin-enriched *Cordyceps militaris* JLM 0636. *J. Life Sci.* **22(2)**, 226-231.
3. Ahn, H. Y., Park, K. R., Kim, Y. R., Cha, J. Y. and Cho, Y. S. 2013. Chemical characteristics fermented Cordycepin-enriched *Cordyceps militaris*. *J. Life Sci.* **23(8)**, 1032-1040.
4. Ahn, Y. S., Kim, Y. S. and Shin, D. H. 2006. Isolation, identification and fermentation characteristics of *Bacillus* sp. with high protease activity from traditional chenggukjang. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **38**, 82-87.
5. Astrup, T. and Mullertz, S. 1991. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **40**, 346-351.
6. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **26**, 1199-1204.
7. Cha, J. Y., Kim, H. W., Heo, J. S., Ahn, H. Y., Eom, K. E., Heo, S. J. and Cho, Y. S. 2010. Ingredients analysis and biological activity of fermented *Angelica gigas* Nakai by mold. *J. Life Sci.* **20(9)**, 1385-1393.

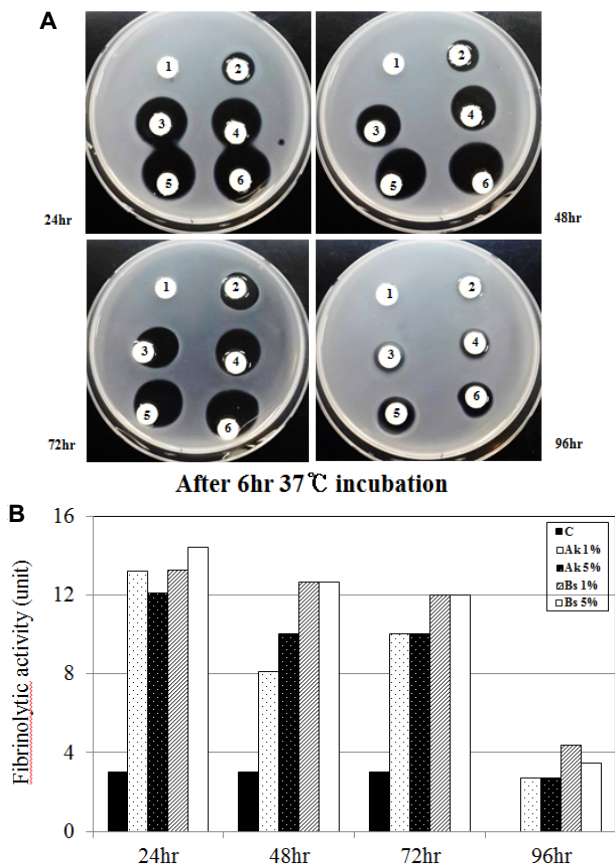


Fig. 6. Fibrinolytic activities of fermented *Cordyceps militaris* powder (C) according to fermentation temperature for 24 hr (A, B). Values are mean  $\pm$  SE, n=3. 1: dry water, 2: *Cordyceps militaris* (C), 3: Ak 1% (C Fermented by *Aspergillus oryzae* 1%), 4: Ak 5% (C Fermented by *Aspergillus oryzae* 5%), 5: Bs 1% (C Fermented by *Bacillus subtilis* 1%), 6: Bs 5% (C Fermented by *Bacillus subtilis* 5%).

8. Cha, J. Y., Kim, Y. S., Ahn, H. Y., Kang, M. J., Heo, S. J. and Cho, Y. S. 2011. Biological activity and biochemical properties of silkworm (*Bombyx mori* L.) powder fermented with *Bacillus subtilis* and *Aspergillus kawachii*. *J. Life Sci.* **21(1)**, 81-88.
9. Chang, M. I., Kim, J. Y., Kim, U. S. and Baek, S. H. 2013. Antioxidant, tyrosinase inhibitory, and anti-proliferative activities of Gochujang added with Cheonggukjang powder made from swaord bean. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **45(2)**, 221-226.
10. Choi, N. S., Seo, S. Y. and Kim, S. H. 1999. Screening of mushrooms having fibrinolytic activity. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **31**, 553-557.
11. Davis, B. J. 1964. Multiple range and multiple F test. *Biometrics* **1**, 1-42.
12. Duncan, D. B. 1957. Multiple range test for correlated and heteroscedastic means. *Biometrics* **13**, 164-176.
13. Wang, Y., Bao, L., Yang, X., Li, L., Li, S., Gao, H., Yao, X. S., Wen, H. and Liu, H. W. 2012. Bioactive sesquiterpenoids from the solid culture of the edible mushroom *Flammulina velutipes* growing on cooked rice. *Food Chem.* **132**, 1346-1353.
14. Guo, P., Kai, Q., Gao, J., Lian, Z. Q., Wu, C. M., Wu, C. A. and Zhu, H. B. 2010. Cordycepin prevents hyperlipidemia in hamsters fed a high-fat diet via activation of AMP-activated protein kinase. *J. Pharmacol. Sci.* **113**, 395-403.
15. Hetog, M. G. L., Hollman, P. C. H. and Van, D. P. B. 1993. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juice. *J. Agr. Food Chem.* **41**, 1242-1246.
16. Illana, E. C. 2007. *Cordyceps sinensis*, a fungi used in the Chinese traditional medicine. *Rev. Iberoam. Micol.* **24**, 259-262.
17. Jia, Z., Tang, M. and Wu, J. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* **64**, 555-559.
18. Kabir, Y., Kimura, S. and Tamura, T. 1998. Dietary effect of *Ganoderma lucidum*: Mushroom on blood press and lipid levels in spontaneously hypertentive rats (SHR). *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **34**, 433-438.
19. Kiho, T., Hui, J. Yamane, A. and Ukai, S. 1993. Polysaccharides in fungi. XXXII. Hypoglycemic activity and chemical properties of a polysaccharide from the cultural mycelium of *Cordyceps sinensis*. *Biol. Pharm. Bull.* **16**, 1291-1293.
20. Kim, E. J., Choi, J. Y., Yu, M. R., Kim, M. Y., Lee, S. H. and Lee, B. H. 2012. Total polyphenols, total flavonoid content, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **44(3)**, 337-342.
21. Kim, S. J., Heo, M. Y., Bae, K. H., Kang, S. S. and Kim, H. P. 2003. Tyrosinase inhibitory activity of plant extract (III): Fifty Korean indigenous plants. *J. Applied Pharmacol.* **11**, 245-248.
22. Lee, J. S., Kwon, J. S., Won, D. P., Lee, J. H., Lee, K. E., Lee, S. Y. and Hong, E. K. 2010. Study of macrophage activation and structural characteristics of purified polysaccharide from the fruiting body of *Cordyceps militaris*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 1053-1060.
23. Lee, O. H., Kim, K. Y., Jang, M. L., Yu, K. H., Kim, S. G., Kim, M. H. and Lee, S. H. 2008. Evaluation of proanthocyanidin contents in total polyphenolic compounds of Pine (*Pinus densiflora*) needle extracts and their antioxidative activities. *J. Life Sci.* **18(2)**, 213-219.
24. Lee, S. J., Shin, S. R. and Yoon, K. Y. 2013. Physicochemical properties of black Doraji (*Platycodon grandiflorum*). *Kor. J. Food Technol.* **45(4)**, 422-427.
25. Li, S. P., Zhang, G. H., Zeng, Q., Huang, Z. G., Wang, Y. T., Dong, T. T. and Tsim, K. W. 2006. Hypoglycemic activity of polysaccharide, with antioxidation, isolated from cultured *Cordyceps mycelia*. *Phytomedicine* **13**, 428-433.
26. Lim, J. D., Cha, H. S., Choung, M. G., Choi, R. N., Choi, D. J. and Youn, A. R. 2014. Antioxidant activities of acidic ethanol extract and the anthocyanin rich fraction from *Aronia melanocarpa*. *Kor. J. Food Cook. Sci.* **30(5)**, 573-578.
27. Masamoto, Y., Ando, H., Murata, Y., Shimoishi, Y., Tada, M. and Takahata, K. 2003. Mushroom tyrosinase inhibitory activity of esculentin isolated from seeds of *Euphorbia lathyris* L. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 631-634.
28. Mizuno, T., Kinoshit, T., Zhung, C., Ito, H. and Mayuzumi, Y. 1995. Antitumor-activity heteroglycans from niohshimeji, *Tricholoma giganteum*. *Food Reviews International* **59**, 563-567.
29. Oh, S. W., Kim, S. H., Song, H. N. and Han, D. S. 2003. Comparative chemical compositions of four kinds of Tochu-kaso. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **35(1)**, 15-22.
30. Son, S. J. and Lee, S. P. 2011. Evaluation of rheological and functional properties of roasted soybean flour and mixed cereals fermented by *Bacillus* sp. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **40(3)**, 450-457.
31. Swain, T., Hillis, W. E. and Oritega, M. 1959. Phenolic constituents of *Ptunus domestica*. I. Quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.* **10**, 83-88.
32. Tong, H., Xia, F., Feng, K., Sun, G., Gao, X., Sun, L., Jiang, R., Tian, D. and Sun, X. 2009. Structural characterization and *in vitro* antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. *Bioresour. Technol.* **100**, 1682-1686.
33. Erkel, G. and Anke, T. 1992. Antibiotics from Basidiomycetes XLI, clavicornic acid, A novel inhibitor of reverse transcriptase from *Clavicornia pyxidate*. *J. Antibiot.* **45**, 29-37.
34. Yang, S. A., Im, N. K. and Lee, I. S. 2007. Effects of metanolic extract from *Salvia miltiorrhiza* Bunge on *in vitro* antithrombotic and antioxidative activities. *Kor. J. food Technol.* **39**, 83-87.



## 초록 : 발효 동충하초의 유용성분 및 생리 활성 작용

안희영<sup>1</sup> · 박규림<sup>1</sup> · 윤경훈<sup>1,3</sup> · 이재윤<sup>2</sup> · 조영수<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>동아대학교 생명공학과, <sup>2</sup>씨엠지바이오팜, <sup>3</sup>(주)미에부생명과학)

본 실험은 동충하초 분말과 8가지 균주로 각각 발효한 동충하초 분말의 혈전용해 활성, 항산화 활성, tyrosinase 저해 활성 그리고 총 폴리페놀 함량, 플라보노이드 함량, 미네랄 함량을 비교 검토하였다. 발효한 결과 CAo균의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 발효 전에 비해 가장 증가하였고, 주요 미네랄인 K, Mg, Ca, Zn 등의 함량 역시 증가하였다. 또 native-PAGE를 이용하여 발효 전과 발효 후 단백질을 비교하였을 때, CAo균에서 새로운 단백질이 관찰되었다. DPPH 라디칼 소거능 측정에서는 CMp균이 다른 균에 비해 경미하게 높은 활성을 나타냈지만, 모든 균들이 합성항산화제인 butylated hydroxytoluene (BHT)에 비해 낮은 활성을 나타내었다. tyrosinase 저해 활성을 보았을 때 CAo균이 C군 보다 높은 활성을 나타내었다. 발효 후 번데기 동충하초의 항혈전을 비교한 결과, CAk균과 CBs균에서 큰 항혈전능을 나타내었다. 두 균주를 1%(v/w), 5%(v/w)로 접종하여 발효 시간과 발효 온도를 조정하면서 각각의 항혈전 최적 조건을 분석한 결과, CAk균과 CBs균 모두 5%(v/w)로 접종하여 40 °C에서 24시간 발효하였을 때 최대 항혈전 활성을 나타내었다. 따라서, 번데기 동충하초는 발효 균주에 따라 건강 기능성식품의 원료 또는 혈전용해제의 원료로써 가능성을 보이며 이에 대한 심층적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.