

동충하초(*Cordyceps militaris*) 균사체 액체발효 포스트바이오틱스로부터 항염증 활성다당 분리

김연숙 · 신현영* · 김 훈** · 정은진* · 김현경*** · 서민근**** · 서형주***** · †유광원*****

한국교통대학교 식품영양학전공 대학원생, *고려대학교 대학원 의생명융합과학과 러닝헬스시스템융합전공 대학원생,
중앙대학교 생명공학대학 연구교수, *숙명여자대학교 식품영양학과 대학원생, ****(주)네오크레마 연구개발부 주임연구원,
*****고려대학교 대학원 의생명융합과학과 러닝헬스시스템융합전공 교수, *****한국교통대학교 식품영양학전공 교수

Anti-Inflammatory Active Polysaccharide from Postbiotics of *Cordyceps militaris* Mycelium-Liquid Culture

Yeon Suk Kim, Hyun Young Shin*, Hoon Kim**, Eun-Jin Jeong*, Hyun-Gyeong Kim***,
Min Geun Suh****, Hyung Joo Suh***** and †Kwang-Won Yu*****

Graduate School Student, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

*Graduate School Student, Transdisciplinary Major in Learning Health System, Dept. of Integrated Biomedical & Life Science, Korea University, Seoul 02841, Korea

**Research Professor, College of Biotechnology & Natural Resources, Chung-Ang University, Anseong 17546, Korea

***Graduate School Student, Dept. of Food & Nutrition, Sookmyung Women's University, Seoul 04310, Korea

****Senior Researcher, Dept. R & D, Neo-Cremar Corporation, Ltd., Seoul 05702, Korea

*****Professor, Transdisciplinary Major in Learning Health System, Dept. of Integrated Biomedical & Life Science, Korea University, Seoul 02841, Korea

*****Professor, Major in Food & Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

Abstract

To investigate the anti-inflammatory activity of submerged culture using *Cordyceps militaris* mycelium, culture-including mycelia was extracted and lyophilized into postbiotics (hot-water extract; CM-HW). HW was fractionated into crude polysaccharide (CM-CP) by ethanol precipitation, and CM-CP was further dialyzed into CM-DCP by dialysis with running water using 12~14 kDa dialysis tube. When the cytotoxicity of subfractions against cells was assessed, no subfraction had a cytotoxic impact that was substantially different from the control groups. In an inflammatory model using LPS-stimulated RAW 264.7 cells, CM-DCP significantly decreased IL-6 and MCP-1 production levels compared to the LPS-control group. CM-DCP also inhibited IL-6 and IL-8 secretion in HaCaT keratinocytes stimulated with TNF- α and IFN- γ . In the meanwhile, the neutral sugar content and mannose ratio of anti-inflammatory CM-DCP were higher than the other fractions, and CM-DCP contained β -1,3/1,6-glucan of 216.1 mg/g. High pressure size exclusion chromatography revealed that CM-DCP contained molecules with a molecular weight range of 5.6 to 144.0 kDa. In conclusion, postbiotics of *C. militaris* mycelium significantly promoted anti-inflammatory activity, suggesting that neutral polysaccharides including Glc and Man contribute to the anti-inflammation in RAW 264.7 or HaCaT cells.

Key words: *Cordyceps militaris*, liquid culture, postbiotics, anti-inflammatory activity, polysaccharide

서 론

버섯은 인체에 필요한 다양한 영양소와 기능성을 가지고 있으며, 담자균류와 자낭균류에 속하는 고등균류로써, 대개

영양기관인 균사체와 번식기관인 자실체로 분리되어 있다 (Choi 등 2010). Rathore 등(2017)의 연구에 따르면 버섯을 섭취하게 되면 인체에 이로운 역할을 지니는데, 대표적으로 항암, 항산화, 중증질환 등의 예방에 효능이 있다고 알려져, 버

† Corresponding author: Kwang-Won Yu, Professor, Major in Food & Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea. Tel: +82-43-820-5333, Fax: +82-43-820-5850, E-mail: kwyu@ut.ac.kr

섯의 소비는 꾸준히 증가하고 있는 것으로 알려져 있다. 버섯의 소비 형태는 대개 자실체를 섭취하는 것으로 알려져 있으나, 자실체는 가격이 비싸고, 생육 기간이 길어 산업적으로 활용에는 많은 어려움이 따르는 것으로 알려져 있다(Suh 등 2022). 반면, 균사체를 이용한 발효는 최적 배양조건 선정 시 높은 수율과 짧은 배양 기간의 생산 등의 이점이 있으며, 이에 따라 현재 버섯 균사체를 활용한 많은 연구가 보고되고 있다(Shin 등 2021a; Shin 등 2022a; Suh 등 2022). 국내에서는 버섯 균사체를 통해 면역증진(Shin 등 2022a), 항염증(Park 등 2013) 및 항당뇨(Kim 등 2013) 등의 효능이 보고되고 있으며, 균사체의 발효를 통해 조제된 추출물은 균체 유래 물질과 균체가 생성하는 대사산물 등을 포함하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 버섯 균사체 유래 물질과 균체가 생성한 대사산물은 *fungi* 유래 포스트바이오틱스의 소재로 활용 가능할 것으로 판단되며, 유산균에 의해 조제된 포스트바이오틱스가 아닌 *fungi* 유래 포스트바이오틱스 소재를 활용함으로써 최근 발달하고 있는 포스트바이오틱스 시장에서 학문/산업적으로 기여하는 바가 클 것으로 판단된다.

자낭균강(Ascomycota) 맥각균과(Clavicipitaceae)에 속하는 동충하초(*Cordyceps militaris*)는 곤충을 기주로 하여 자실체를 발생하거나 충체상에 포자를 형성하는 버섯의 한 종류이다(Koh JB 2003). 동충하초를 이용한 많은 연구가 보고되고 있으며, 국내에서는 항염증(Choi 등 2012), 면역증진(Lee 등 2007a), 항암효과(Heo 등 2007) 등이 있으며, 국외로는 항산화(Won & Park 2005), 알코올에 의한 간 독성 예방(Cha 등 2013), 면역증진(Liu 등 2016) 및 항염 효과(Liu 등 2019) 등 다양한 기능성 효과를 보고하고 있다. 동충하초에는 cordycepin(3-deoxyadenosine), D-mannitol(cordycepic acid) 및 다당류 등을 함유하고 있으며(Chou 등 2014), 특히 다당류와 관련된 exopolysaccharide(EPS)에 대해 다양한 연구들이 보고되고 있다. EPS는 미생물 세포벽의 일부로서, 외부에 다당류를 생성하여 축적되는 미생물의 1차 및 2차 대사산물 등이 포함된다(Lee 등 2007b). 1차 대사산물로 세포벽 구성 다당류와 2차 대사산물인 분비 다당류를 포함하고 있으며 균사체 유래 성분과 배양액을 통해 얻을 수 있다. EPS는 직접적인 에너지원으로 이용되기보다 외부물질 및 스트레스로부터 자신을 보호하는 작용을 하며(Kang 등 2005), 항산화(Kang 등 2022), 면역증강(Yu 등 2022) 및 당뇨병 예방효과(Sun 등 2021) 등의 효능이 보고되고 있다. 대표적인 버섯의 EPS에 해당하는 β -glucan은 면역증강 효과가 뛰어나고, 당뇨 예방 및 항콜레스테롤 등과 같은 건강증진 효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다(Park 등 2012).

본 연구진은 이전 연구에서 상황버섯 균사체 액체발효물 유래의 포스트바이오틱스를 이용하여 면역증강 및 항염증

활성을 검증하여 활성획분을 분리하고, 산업적인 활용 가능성을 제시하였다(Shin 등 2021a; Shin 등 2022a; Suh 등 2022). 또한, 버섯 균사체를 이용한 액체배양은 대량 생산과 원료공급이 쉽고 다양한 기능성을 가진 대사산물을 얻을 수 있다는 장점이 있다(Kim 등 2006). 한편, 동충하초 자실체를 이용한 항염증 활성은 많이 보고되고 있으나(Yoon 등 2015; Chiu 등 2016), 동충하초 균사체의 액체발효물 유래의 포스트바이오틱스에서 항염증 활성 및 활성획분의 특성에 대한 연구는 부족한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 동충하초 균사체의 액체발효에서 균사체를 포함한 액체배양액 전체를 추출한 후 동결건조하여 포스트바이오틱스 및 주정 침전물(CM-CP)과 주정 침전물을 투석막을 이용하여 저분자 물질을 제거한 후 분획한 투석물(CM-DCP)로 분획하여 마우스 유래 대식 세포주인 RAW 264.7과 인간 피부 각질 형성 세포주인 HaCaT에 대한 항염증 활성을 분석하였다. 또한, 획분들의 구성분과 구성당을 포함한 화학적 특성과 β -1,3/1,6-glucan 함량을 분석하였으며, 동충하초 균사체 액체발효물 유래 포스트바이오틱스로부터 항염증 활성과 활성획분의 특성을 동정하여 산업적인 소재로 활용하기 위한 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 동충하초 균사체 액체발효 및 포스트바이오틱스 제조 및 분획

본 연구에서 이용된 동충하초 균사체 액체발효물 유래 포스트바이오틱스는 (주)네오크레마(Neo Cremar Co., Ltd, Seoul, Korea)에서 제공받아 이용되었으며, 액체발효는 glucose, glutamate(MSG), corn starch, soy peptone, yeast extract, monosodium 등이 첨가된 멸균배지에서 생물반응기(Fermentec, Cheongju, Korea)를 이용하여 진행되었다. 동충하초 균사체 액체발효가 끝나면 균사체가 포함된 전체 액체배양액은 고압 멸균기를 이용하여 121°C에서 60분간 추출한 후 동결건조(Ilshin Biobase, Yangju, Korea)를 진행하여 포스트바이오틱스(CM-HW)를 조제하였다. 포스트바이오틱스에 다시 5배의 95% 주정을 첨가하여 상온에서 교반하여 침전물을 형성하였으며, 원심분리를 통해 침전물을 회수하고 동결건조하여 조다당획분(crude polysaccharide; CM-CP)으로 분획하였다. 또한, 고분자 물질을 제거하기 위해 조다당획분을 소량의 증류수에 용해시킨 후 Shin 등(2022b)의 방법을 이용하여 투석(MWCO 12,000~14,000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 진행하고 농축한 후 동결건조하여 투석-조다당획분(dialyzed-crude polysaccharide; CM-DCP)으로 분획하였다(Fig. 1A).

2. 세포주 및 배양조건

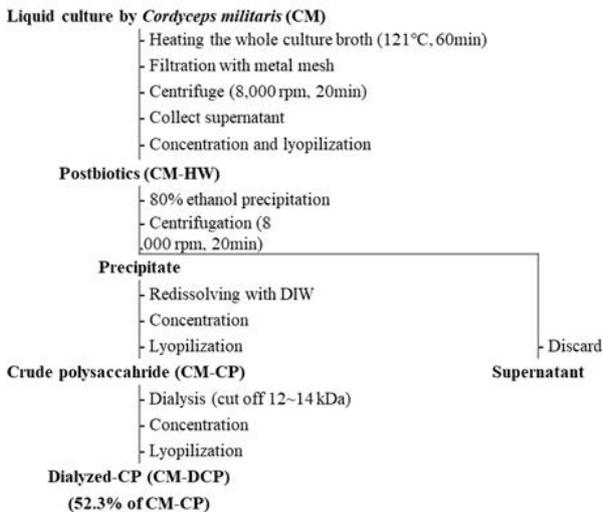
본 연구에서 사용된 세포주는 RAW 264.7(마우스 유래 대식세포)과 HaCaT(인체 유래 각질형성 세포)으로 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank; KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하여 분석에 이용되었다. 각각의 세포주는 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM; Hyclone, San Angelo, TX, USA)에 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco, Waltham, Massachusetts, USA) 및 1% penicillin-streptomycin(P/S; GenDEPOT, Katy, TX, USA)을 첨가한 배지를 이용하여 배양하였으며, 2~3일 간격으로 계대배양을 진행하였다. 세포주는 5% CO₂를 유지하는 배양기(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 37°C 조건에서 배양하여 연구에 이용하였다.

3. RAW 264.7 대식세포를 이용한 항염증 활성

RAW 264.7 세포주를 이용하여 동충하초 균사체 액체발효물 유래 포스트바이오틱스 분획회분 처리에 따른 항염증 활

성을 평가하였다. RAW 264.7 세포를 96 well plate에 6×10^4 cells/well로 조정된 후 37°C 조건에서 5% CO₂를 유지하는 배양기에서 약 80% confluent가 될 때까지 24시간 동안 배양하였다. 이후 배양된 상등액을 제거하고 SFM(serum free-DMEM) 160 μ L와 농도별로 희석된 시료를 20 μ L 첨가하여 30분간 배양한 후 추가로 lipopolysaccharide(LPS; Sigma-Aldrich) 20 μ L를 첨가하여 24시간 동안 재배양하여 LPS에 의해 유도된 염증 모델을 형성하였다. LPS에 의해 염증이 유도된 RAW 264.7 세포주에 대한 시료 독성평가는 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT) 시약을 처리한 후 30분간 반응하였다. 이후 상등액을 제거하고 100 μ L의 dimethyl sulfoxide(DMSO) 분주하여 550 nm의 흡광도에서 측정된 후 LPS 유도군 대비 세포 생존율(cell viability, %)을 나타냈다. 한편, 세포 배양 시 형성된 염증매개 물질인 cytokine 및 chemokine인 IL-6(interleukin-6) 및 MCP-1(monocyte chemoattractant protein-1)은 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)로 분석하였으며, BD Bioscience(San Diego, CA, USA)에서 제공된 standard reference를 이용한 표준곡선을 통해 함량을 나타냈다.

(A)



(B)

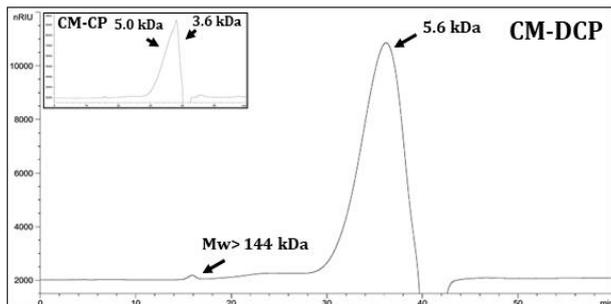


Fig. 1. Fractionation of liquid culture by *Cordyceps militaris* mycelium (A) and molecular weight chromatogram of CM-CP and DCP (B).

4. HaCaT 세포를 통한 항염증 활성

HaCaT 세포를 이용하여 동충하초 균사체 액체발효물 유래 포스트바이오틱스 분획회분 처리에 따른 항염증 활성을 평가하였다. HaCaT 세포를 96 well plate에 2×10^4 cells/well로 조정된 후 37°C 조건에서 5% CO₂를 유지하는 배양기에서 monolayer를 형성할 때까지 배양하였다. 이후 배양된 상등액을 제거하고 SFM 200 μ L를 분주하여 24시간 동안 starvation을 진행하였다. 이후 SFM 160 μ L와 농도별로 희석된 시료를 20 μ L 첨가하고 배양한 다음, 1시간 후 각각 tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 interferon- γ (IFN- γ)가 혼합된 용액을 20 μ L 첨가하여 24시간 동안 재배양을 진행하였으며 T+에 의해 유도된 염증 모델을 형성하였다. HaCaT 시료에 의한 독성평가는 MTT 시약을 이용하여 측정하였으며, T+ 대조군 대비 세포 생존율(%)로 나타냈다. 세포 배양 시 형성된 염증성 사이토카인인 IL-6 및 IL-8의 함량은 ELISA로 분석하였으며, BD Biosciences에서 제공된 standard를 이용하여 작성된 표준곡선을 통해 함량을 나타냈다.

5. 분자량 분포

시료의 분자량 분포를 확인하기 위해 high performance size exclusion chromatography(HPSEC)를 이용하였다. 적당한 농도로 희석한 시료를 PVDF membrane filter를 사용해 여과한 후 Table 1과 같은 방법을 이용하여 분석하였다. 분석에 이용된 표준물질은 galactose와 각기 다른 분자량을 가진 pullulan을 이용하였으며 retention time(RT)를 통해 표준곡선

을 작성하고 시료의 RT와 비교하여 kDa으로 계산하였다.

6. 구성분 및 구성당 분석

구성분 분석을 진행하기 위해 중성당 및 산성당 함량은 각각 Dubois 등(1956)의 phenol- sulfuric acid법 및 Blumenkrantz & Asboe-Hansen(1973)의 *m*-hydroxybiphenyl법을 이용하여 분석하였으며, 표준물질로 glucose(Glc) 및 glucuronic acid(Glc A)를 사용하여 분석하였다. 단백질 함량은 Bradford 방법(Bradford MM 1976)을 이용하였으며, 표준물질은 BSA(bovine serum albumin)를 이용하였다. 총 폴리페놀 함량의 경우, Kim 등(2016)의 방법을 이용하여 분석하였으며, 표준물질로 gallic acid를 이용해 함량을 계산하였다. 구성당 분석의 경우 Honda 등(1989) 및 Shin 등(2021b)의 방법을 참고하여 2 M trifluoroacetic acid를 시료에 처리하여 aldose 단위로 분해하였다. 이후 NaOH와 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazoline(PMP)을 첨가하여 당류에 PMP를 결합시켜 유도체로 전환시킨 다음 유도체를 중화시키기 위해 HCl을 첨가하고 water와 chloroform을 이용해 분리 및 추출을 진행하였다. 이후 물 증만 회수한 후 PVDF membrane filter(0.45 μ m, Jaema Trade Inc., Wonju, Korea)를 이용해 여과하여 HPLC에 주입하여 분석하였다. 분석 조건은 Table 1에 나타냈으며, 결과는 당류의 area와 response factor를 이용하여 이를 mole%로 나타냈다.

7. β -1,3/1,6-glucan 함량 분석

동충하초 균사체 액체발효물 유래 포스트바이오틱스 분획획분에 대한 β -1,3/1,6-glucan 함량은 Megazyme kit(Mushroom and Yeast β -glucan assay procedure; K-YBGL)을 이용하여 분석하였다. 제조사에서 제공한 방법에 따라 글루칸을 추출하였으며, 510 nm의 흡광도에서 측정된 총 글루칸(total glucan)

및 알파 글루칸(α -glucan)의 흡광도는 glucose 용액을 표준물질로 하여 분석하였다. 이후 Megazyme calculator를 이용하여 함량(mg/g)으로 계산하였다. 대조군으로 제조사에서 제공된 49%의 베타글루칸 표준품을 이용하였으며, 최종적으로 베타글루칸의 함량은 총 글루칸에서 알파글루칸의 함량을 빼준 값으로 나타냈다.

8. 통계처리

모든 시험결과는 3회 반복하였으며 시험결과는 평균 \pm 표준편차(standard deviation, SD)로 나타냈다. RAW 264.7 세포주와 HaCaT 관련 염증억제 활성은 SPSS V26(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용한 Student's *t*-test로 계산하여 각각 $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ 수준에서 유의성을 검증하였다. 한편, 중성당, 산성당, 단백질 및 총 폴리페놀 등의 구성분을 분석한 결과는 분산의 동질성을 비교하기 위해 Levene's test를 실시한 후, 동질성을 갖는 경우 ANOVA 분산분석을 실시하여 각 측정값 간의 유의성을 Duncan's multiple range test에 의해 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 동충하초 균사체 액체발효물 유래 포스트바이오틱스 분획획분의 세포독성

특정 미생물이 만들어내는 포스트바이오틱스(postbiotics)는 장내 미생물 및 면역체계 구성 등과 같은 건강상의 이점을 제공한다(Kim 등 2021). 본 연구에서는 동충하초(*Cordyceps militaris*, CM) 균사체의 액체발효물을 포스트바이오틱스 소재로 활용하여 기능성 식품 소재로의 활용 가능성을 확인하고자 하였다. 항염증 소재로서 동충하초 균사체 액체배양물

Table 1. HPLC analytical condition for the component sugar and molecular weight of subfraction from liquid culture by *Cordyceps militaris* mycelium

Analysis	Molecular weight	Component sugar
Instrument	Agilent 1260 series (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA, USA)	YL-9100 series (Young Lin Co., Ltd., Anyang, Korea)
Detector	Refractive index	UV at 254 nm
Column	Superdex TM 75 GL column (10 \times 300 mm, GE Healthcare, Anaheim, CA, USA)	YMC-Triart C18 (250 \times 4.6 mm, 5 μ m, YMC Co., Ltd., Kyoto, Japan)
Column temperature	Room temperature	30 $^{\circ}$ C
Flow rate	0.5 mL/min	1 mL/min
Eluent	50 mM ammonium formate buffer (pH5.5)	0.1 M sodium phosphate buffer (pH6.7): acetonitrile (82:18)
Injection volume	20 μ L	20 μ L
Data calculator	Chemstation (Agilent Technologies)	Autochro-3000 (Young Lin)

유래 포스트바이오틱스의 이용 가능성을 검토하기 위해 균사체 액체배양물로부터 균사체를 포함하는 전체 액체배양액을 열수추출한 후 포스트바이오틱스(CM-HW)를 조제하였으며, 포스트바이오틱스로부터 95% 주정을 이용하여 분리한 조다당 획분(CM-CP)과 12~14 kDa의 투석막을 이용하여 저분자 물질을 제거한 투석-조다당 획분(CM-DCP)으로 분획하였다. 포스트바이오틱스에는 균사체 유래 물질과 균사체에서 배양액으로 분비된 EPS(exopolysaccharide) 등과 같은 대사산물이 포함되어 있을 것으로 판단되었다.

염증 억제 활성은 세포주에 시료처리 후 염증 매개 인자(LPS 또는 사이토카인)를 처리하여 시료처리에 따른 염증성 물질의 생산 억제를 평가하는 시험법이다. 그러므로 시료 처리에 의해 세포주가 세포독성을 나타내면 사멸한 세포 때문에 관련 바이오 마커가 감소할 수 있어, 이를 염증 억제 활성이 나타난다고 오인할 수 있다. 따라서 먼저 시료처리에 따른 세포독성 평가를 진행하였으며, RAW 264.7 세포주의 시료 처리에 의한 세포독성 결과는 Fig. 2A에 나타났다. 동충하초 균사체 액체배양물 유래 포스트바이오틱스 분획 3종은 500~1,000 µg/mL의 농도범위에서 LPS 유도군 대비 세포 생존율이 90% 이상인 것을 확인하였는데, López-García 등(2014)에 따르면 ISO 10993-5에 따라 시료 처리군의 세포 생존율이 80% 이상이면 세포독성이 없다고 간주된다. 이를 통해 동충하초 균사체 액체배양물 유래 포스트바이오틱스의

분획획분 3종은 상기 농도범위에서 세포독성이 없다고 판단되었다. 또한, Fig. 2B에는 각질 형성 세포주인 HaCaT의 세포독성 평가를 나타냈으며, RAW 264.7 세포주와 동일농도 범위에서 분석을 진행하였다. 세포 독성평가결과, TNF-α+INF-γ(T+I) 유도군 대비 105% 이상의 세포 생존율을 보였을 뿐만 아니라 12.8~29.0%의 통계적으로 유의한 세포증식능이 확인되었다. Lee 등(2015)의 연구에서 동충하초 자실체 추출물을 처리한 RAW 264.7 세포주의 세포독성 평가에서 10~200 µg/mL의 범위에서는 유의적인 세포독성이 관찰되지 않았으나 300~1,000 µg/mL에서는 세포독성이 나타난 반면, 본 연구에서 500~1,000 µg/mL에서 세포독성이 나타나지 않은 것을 확인할 수 있었다. 따라서 동물실험을 통해 추가적인 안정성에 관련된 평가가 필요할 것으로 판단되지만, 본 결과와 Lee 등(2015)의 연구를 비교해 볼 때, 동충하초 자실체에 비해 균사체에 의한 액체배양이 안전성 측면에서 활용 가능성이 높을 것으로 판단되었다. 세포독성 평가 결과를 종합해보면, 대식세포주인 RAW 264.7 세포주와 각질 형성 세포주인 HaCaT 세포주를 이용한 세포독성 평가 결과, 500~1,000 µg/mL의 농도 범위에서 유의한 세포독성은 나타나지 않았으며, 이후 동일농도 범위에서 염증 관련 바이오 마커의 분석을 진행하였다.

2. RAW 264.7 세포주를 이용한 염증 억제

RAW 264.7 대식세포주는 선천면역과 적응면역에서 항상

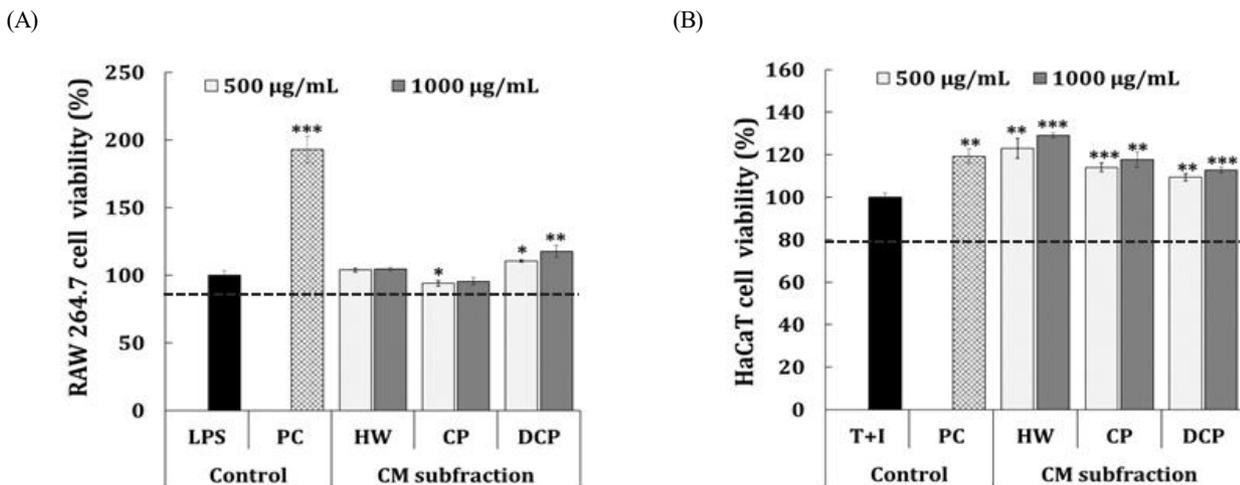


Fig. 2. Cytotoxicity of subfraction from liquid culture of *Cordyceps militaris* mycelium against RAW 264.7 macrophage (A) and HaCaT keratinocyte (B). After each subfraction treated RAW 264.7 or HaCaT cells, inflammatory substances, such as lipopolysaccharide (LPS) or TNF-α+IFN-γ (T+I) was subsequently stimulated for 24 hr. A dexamethasone (50 and 20 µg/mL, for RAW 264.7 and HaCaT, respectively) was used as positive controls (PC). CM-HW; postbiotics from *C. militaris* mycelium liquid culture, CP; crude polysaccharide of HW, and DCP; dialyzed-CP. Results are expressed as mean±S.D. of three independent tests in triplicate. Asterisks mean significant difference between inflammation group (LPS or T+I) and each group by Student's *t*-test. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001.

성 유지에 관여하며, 염증 발생 시 사이토카인을 분비하여 초기방어에 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다 (Kim 등 2009). 본 연구에서는 동충하초 균사체 액체발효물 유래 포스트바이오틱스 분획획분 처리 시 대식세포에서 분비되는 염증 유발 인자의 생성에 미치는 영향을 평가하였다. IL-6는 과량 생산시 염증을 유발하는 대표적인 친염증성 사이토카인으로 알려져 있으며, 이에 따라 IL-6 생성능을 분석하였다(Fig. 3A). 양성 대조군으로 이용된 dexamethasone(50 µg/mL)은 6.8 ng/mL(78.8%)의 IL-6 생성량을 나타내어, LPS 유도군(29.3 ng/mL) 대비 통계적으로 유의한 억제 활성을 나타냈다. 동충하초 균사체 액체발효물 유래 포스트바이오틱스(CM-HW)는 500~1,000 µg/mL의 농도범위에서 LPS 유도군 대비 24.6~27.1 ng/mL(7.6~16.5%)의 통계적으로 미약한 IL-6 억제활성을 나타내었으나, 주정 침전물인 조다당획분(CM-CP)은 20.4~22.2 ng/mL(24.7~31.0%)를, 투석-조다당획분(CM-DCP)은 16.7~22.2 ng/mL(23.4~44.1%)의 유의한 억제활성을 나타냈다. 또한, 항염증 활성을 갖는 CM-CP와 CM-DCP는 500 µg/mL의 농도에서는 시료 간 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았으나, 1,000 µg/mL의 농도에서는 시료 간 유의한 차이를 확인할 수 있었다($p < 0.01$). 다음으로 혈관 내 대식세포를 유도시켜 만성 염증을 유발하는 케모카인인 MCP-1의 억제활성 평가 결과를 Fig. 3B에 나타냈다. 양성 대조군 처리 시 1.5 ng/mL(71.5%)의 MCP-1 생성을 나타내어, LPS 유도군(5.0 ng/mL) 대비 통계적으로 유의한 억제 활성을 나타냈다.

동충하초 균사체 액체발효물의 포스트바이오틱스(CM-HW)는 LPS 유도군 대비 통계적으로 유의한 억제 활성을 나타내지 않았으나, 조다당획분과 투석-조다당획분 경우에는 500~1,000 µg/mL 범위에서 각각 4.3~4.5 ng/mL(11.9~15.6%) 및 3.7~3.7 ng/mL(26.3~27.0%)의 통계적으로 유의한 MCP-1 억제활성이 확인되었다. 또한, CM-CP와 CM-DCP의 시료 간의 MCP-1 생성능에 대한 유의차를 확인한 결과, 500 µg/mL의 농도에서는 $p < 0.05$, 1,000 µg/mL의 농도에서는 $p < 0.01$ 의 통계적인 유의차가 나타났으며, 투석-조다당획분(CM-DCP)이 동충하초 균사체 유래 포스트바이오틱스 획분 중 가장 우수한 획분임을 확인하였다. Liu 등(2021)의 연구에서는 동충하초 균사체를 이용하여 분리한 조다당획분이 RAW 264.7 세포주에서 항염증성 사이토카인인 IL-10의 mRNA 발현량의 증가와 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포주에서 친염증성 사이토카인 TNF- α , IL-6, IL-1 β , 및 iNOS(inducible nitric oxide synthase) mRNA 발현량의 감소를 나타내었다. 본 연구에서는 친염증성 사이토카인 IL-6와 MCP-1만을 분석하였지만, 유사한 경향을 확인할 수 있었으므로 추후 다양한 사이토카인과 mRNA 발현량 검증을 진행하여 구체적인 염증 억제 활성과 그 기작을 연구하고자 한다. 종합적으로, 동충하초 균사체 액체발효물 유래 포스트바이오틱스의 조다당획분과 투석-조다당획분의 처리시 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포주에서 통계적으로 유의한 IL-6 및 MCP-1 생성 감소를 확인할 수 있었으며, CM-CP보다 CM-DCP가 염증 억제활성이 우수한 것으

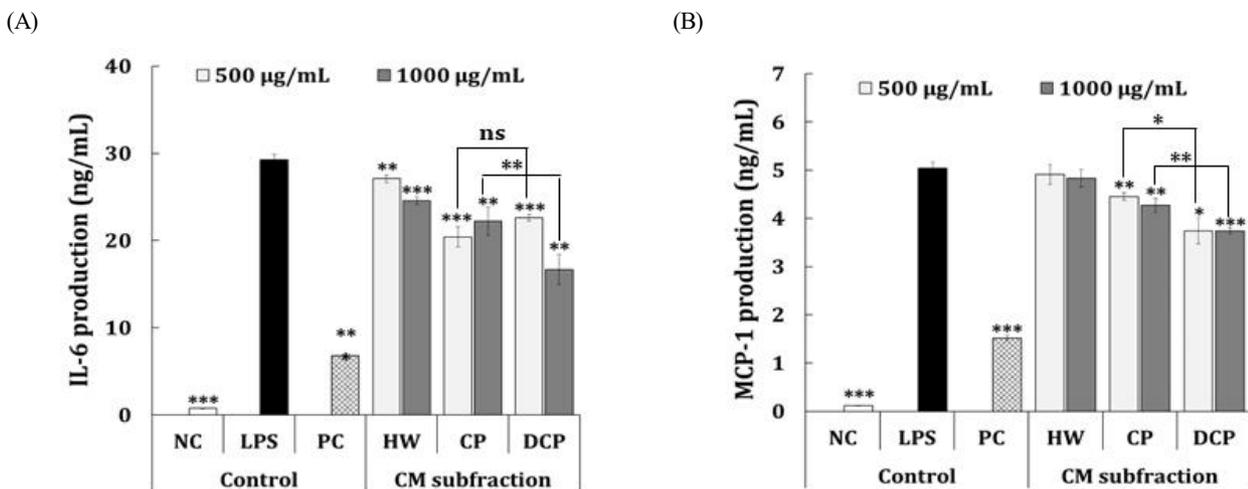


Fig. 3. Anti-inflammatory activity of subfraction from liquid culture of *Cordyceps militaris* mycelium on LPS-stimulated RAW 264.7 cell. RAW 264.7 cells were treated with subfraction followed by lipopolysaccharide (LPS) treatment for 24 hr, and production of IL-6 (A) or MCP-1 (B) was evaluated. A dexamethasone (50 µg/mL) was used as a positive control (PC). CM-HW; postbiotics from *C. militaris* mycelium liquid culture, CP; crude polysaccharide of HW, and DCP; dialyzed-CP. Results are expressed as mean±S.D. of three independent tests in triplicate. Asterisks mean significant difference between the LPS group and each group by Student's *t*-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

로 확인되어 투석을 이용한 저분자 물질의 제거가 고분자 물질의 활성증진에 기여하는 것으로 추정되었다.

3. HaCaT 세포를 이용한 피부염 억제 활성

HaCaT 세포주는 인간 유래 각질 형성 세포로, TNF- α 와 IFN- γ (T+I)를 동시 처리하여 피부염증 모델을 확립하고 동충하초 균사체 액체발효물 유래 포스트바이오틱스 분획획분의 항염증 활성을 측정하였다. T+I로 인해 자극된 HaCaT 세포주는 macrophage-derived chemokine(MDC) 및 IL-8과 같은 케모카인을 형성하는데, 이러한 케모카인은 피부에 염증 또는 감염을 발생시킨다고 알려져 있어(Jo IJ 2022), 이를 활용하여 동충하초 균사체 액체발효물 유래 포스트바이오틱스 분획획분을 처리하여 IL-6와 IL-8의 생성에 미치는 영향을 평가하였다. Fig. 4A는 IL-6 억제 활성 결과를 나타냈다. 양성대조군으로 이용된 dexamethasone(20 μ g/mL)은 340.9 pg/mL(68.8%)의 IL-6 생성을 나타내었으며, T+I 유도군(1,039.0 pg/mL)과 비교한 결과 통계적으로 유의한 IL-6 억제활성을 나타냈다. 한편, 포스트바이오틱스(CM-HW)는 500 μ g/mL의 농도범위에서 T+I 유도군 대비 905.3 pg/mL(13.2%)의 IL-6 억제활성이 나타났다. 반면, 포스트바이오틱스의 주정 침전물인 조다당획분(CM-CP)에서는 500~1,000 μ g/mL의 농도범위에서 T+I 유도군 대비 441.9~550.1 pg/mL(48.2~58.9%), CM-DCP에서 382.2~486.6 pg/mL(54.5~64.8%)으로 조다당획분보다 투석-조다당획분(CM-DCP)의 IL-6 억제활성이 우수한 것

으로 확인되었다. IL-8은 면역세포가 과도하게 유도하여 혈관 내 세포 주위 급성 염증반응을 일으키는 것으로 보고되고 있으며, Fig. 4B에 IL-8 억제활성을 나타냈다. 양성 대조군으로 이용된 dexamethasone은 T+I 유도군(678.5 pg/mL) 대비 131.1 pg/mL(89.8%)로 유의한 억제 활성을 나타냈으며, 포스트바이오틱스(CM-HW)의 경우에는 500 μ g/mL의 범위에서 515.9 pg/mL(26.7%)의 IL-8 억제활성을 나타냈다. 한편, 조다당획분(CM-CP)은 T+I 유도군 대비 218.6~402.7 pg/mL(45.2~75.4%)의 통계적인 억제활성이 확인되었고, CM-DCP는 144.6~267.6 pg/mL(67.4~87.6%)으로 유의한 IL-8 억제 활성을 나타냈다. 또한, CM-CP와 DCP는 IL-8 생성능에 대해 시료 간의 통계적으로 유의한 IL-8 억제 활성이 나타났으며(500 μ g/mL; $p<0.01$ 및 1,000 μ g/mL; $p<0.001$), 투석-조다당획분(CM-DCP)이 가장 우수한 염증 억제효과를 나타내었다. 결론적으로 피부 각질 세포인 HaCaT를 이용한 피부염증 억제 활성 평가 결과에서 동충하초 균사체 액체발효물 유래 포스트바이오틱스로부터 분획되고 저분자 물질을 제거한 CM-DCP는 IL-6와 IL-8의 우수한 억제활성이 나타나 투석-조다당획분의 고분자 물질이 피부염증을 억제시키는데 중요한 역할을 하는 것으로 확인되었다. RAW 264.7 세포 및 HaCaT 세포의 항염증 활성을 종합하였을 때, 동충하초 균사체 액체발효물 유래 포스트바이오틱스에서 분획된 고분자 물질인 CM-DCP는 우수한 항염증 활성을 나타내어 향후 산업적으로 피부염 감소효과를 가진 기능성 소재로서 동충하초 균사

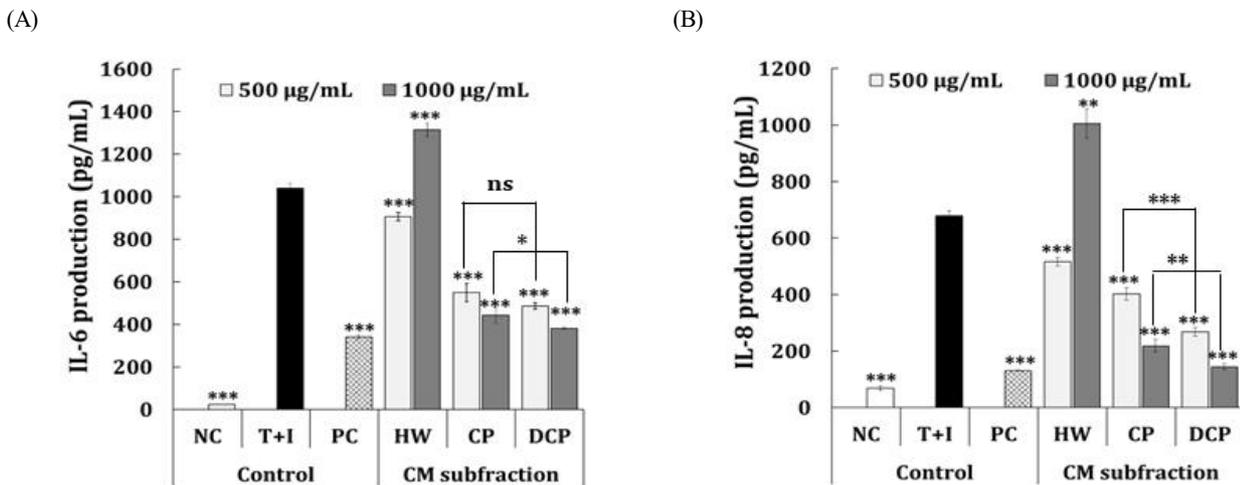


Fig. 4. Anti-inflammatory activity of subfraction from liquid culture of *Cordyceps militaris* mycelium on TNF- α +IFN- γ -stimulated HaCaT keratinocyte. HaCaT keratinocyte were treated with each subfraction followed by TNF- α +IFN- γ (T+I) treatment for 24 hr, and the production of IL-6 (A) or IL-8 (B) was evaluated. A dexamethasone (20 μ g/mL) were used as positive control (PC). CM-HW; postbiotics from *C. militaris* mycelium liquid culture, CP; crude polysaccharide of HW, and DCP; dialyzed-CP. Results are expressed as mean \pm S.D. of three independent test in triplicate. Asterisks mean significant difference between T+I group and each group by Student's *t*-test. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

체 액체발효물 유래 포스트바이오틱스의 활용이 가능할 것으로 판단되었다.

4. 분자량 분석

동충하초 균사체 액체발효물 유래 포스트바이오틱스로부터 분획된 활성 획분인 투석-조다당획분(CM-DCP)의 분자량을 분석하기 위해 HPSEC를 이용하여 분자량 분포를 분석하였으며, Fig. 1B에 CM-CP 및 CM-DCP의 HPLC 크로마토그램을 나타냈다. 표준물질과 retention time(RT)을 비교하여 CM-CP와 DCP와 분자량을 분석한 결과, 조다당획분(CM-CP)은 3.6~5.0 kDa의 낮은 분자량 분포가 확인되었다. 한편, CM-DCP의 분자량 분포는 CP와 유사한 경향을 나타내었지만, 5.6 kDa 저분자 물질과 144 kDa 이상의 고분자 물질이 함유되어진 것으로 나타났다. Shin 등(2021a)은 상황버섯 균사체 액체발효물 유래 조다당획분이 동일 세포주에 우수한 항염증 활성을 보고하였는데, 본 연구에서도 동충하초 균사체 액체발효물의 포스트바이오틱스에서 고분자 획분이 항염증 활성에 주로 관여하는 것으로 확인되었으며, 투석과 ultrafiltration (UF) 등을 이용한 저분자 물질의 제거가 고분자 물질의 함량을 증가시켜, 기능성을 더욱 우수하게 유도할 수 있는 것으로 추정되었다. 향후 다양한 컬럼 크로마토그래피를 통해 활성물질을 정제하여 활성에 기여하는 활성부위를 구조적으로

동정하고자 한다.

5. 구성분 및 구성당 분석

동충하초 균사체 액체발효물 유래 포스트바이오틱스의 분획획분에 대한 구성분을 확인하기 위해 중성당, 산성당, 단백질 및 총 폴리페놀 함량을 분석하였다(Table 2). 중성당 함량의 경우 CM-HW는 786.3 µg/mg, CP 832.4 µg/mg 및 DCP는 917.3 µg/mg로 투석-조다당획분이 가장 높은 함량을 나타냈으며, 산성당의 경우에는 CM-HW(33.5 µg/mg), CP(37.8 µg/mg) 및 DCP(41.1 µg/mg)가 유사한 함량을 보였다. 한편, 단백질 함량은 CM-HW가 3.2 µg/mg, CP 1.7 µg/mg 및 DCP는 1.9 µg/mg으로 구성분 중 가장 적게 함유하였으며, 총 폴리페놀 함량의 경우에는 HW(13.2 µg/mg), CP(4.7 µg/mg) 및 DCP(2.6 µg/mg)에 모두 소량 함유하고 있는 것으로 나타났다. 구성분 분석에서 분획획분 모두 중성당이 가장 높은 함량을 보여 HPLC-UVD를 이용하여 구성당을 확인하였다(Table 2). 동충하초 균사체 액체발효물 유래 포스트바이오틱스의 주요 구성당은 glucose(98.3%), mannose(0.9%) 및 galactose (0.8%)이었고, 이는 조다당획분(CM-CP)과 투석-조다당획분(CM-DCP)에서도 유사한 경향이 나타났으며, 조다당획분인 CM-CP에서는 포스트바이오틱스에 비해 mannose와 galactose (2.7과 2.4%)가 소량 증가하였으며, glucose는 94.9%가 함유되어 있는 것

Table 2. Chemical property of subfraction from liquid culture by *Cordyceps militaris* mycelium

Sample	Subfraction from postbiotics of CM		
	CM-HW	CM-CP	CM-DCP
Neutral sugar (µg/mg)	786.3±14.8 ^{a1)}	832.4±26.2 ^a	917.3±40.8 ^a
Uronic acid (µg/mg)	33.5±7.6 ^b	37.8±1.2 ^b	41.1±4.0 ^b
Protein (µg/mg)	3.2±0.1 ^c	1.7±0.1 ^c	1.9±0.2 ^c
Polyphenol (µg/mg)	13.2±0.7 ^c	4.7±0.6 ^c	2.6±0.4 ^c
	Component sugar (mol %)		
Mannose	0.9±0.0 ^b	2.7±0.1 ^b	4.0±0.0 ^b
Rhamnose	-	-	-
Glucuronic acid	-	-	-
Galacturonic acid	-	-	-
Glucose	98.3±0.1 ^a	94.9±0.4 ^a	92.4±0.0 ^a
Galactose	0.8±0.0 ^c	2.4±0.2 ^b	3.6±0.0 ^c
Xylose	-	-	-
Arabinose	-	-	-
Fucose	-	-	-

CM-HW: postbiotics from *C. militaris* mycelium liquid culture, CP: crude polysaccharide of HW, DCP: dialyzed-CP.

All results of composition content are expressed as mean±S.D. for three independent experiments. Different letters within a column are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

¹⁾ The difference in the superscript letter of the content value means a significant difference at $p<0.05$.

으로 확인되었다. 한편, 활성획분인 CM-DCP의 경우에는 glucose가 92.4%로 감소하면서 mannose(4.0%)와 galactose(3.6%)로 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 포스트바이오틱스(CM-HW)의 주요 구성당인 glucose 대부분은 유리당뿐만 아니라 α 및 β -glucan의 형태로 존재할 가능성을 보여주고 있으나, 조다당획분 분획 후 투석으로 분획된 CM-DCP에서는 glucose 유리당의 제거와 함께 galactomannan 및 glucomannan 등의 복합다당류도 소량 포함하고 있음을 나타내었다. 다양한 균류에 관찰되는 EPS의 경우 glucan과 mannan 또는 glucomannan 혹은 galactomannan 등으로 이루어진 다당류가 주성분으로 보고되고 있기 때문에(Hamidi 등 2020), 위와 같은 다당류들이 동충하초 균사체 액체발효 유래 포스트바이오틱스의 항염증 활성에 관여하고 있는 것으로 추정되었다. 결론적으로, 활성획분인 투석-조다당획분(CM-DCP)에는 glucose를 주요 구성당으로 하는 glucan 외에도 mannose나 galactose 등의 중성당이 함유된 144 kDa 이상의 복합다당류가 포함되어 있음을 확인할 수 있었는데, 이는 동충하초 균사체뿐만 아니라 EPS 유래의 가능성을 제시함으로써 포스트바이오틱스로서의 항염증 기능성 소재 활용가능성을 제시하고 있는 것으로 보여준다.

6. β -1,3/1,6-glucan 분석

β -glucan은 버섯류에 존재하는 다당류의 일종으로, 면역작용을 통해 인체의 면역시스템에 작용하여 정상 세포의 면역기능을 활성화하고 세포조직의 면역활성을 높여 항암, 혈당조절 및 항비만 등과 같은 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Cho 등 2013). 따라서 본 연구에서도 동충하초 균사체의 액체배양물 유래 포스트바이오틱스의 분획획분을 이용하여 유효/지표물질을 확립하기 위하여 β -1,3/1,6-glucan 함량을 분석하였다(Fig. 5). Megazyme kit의 49% 표준물질을 이용하여 β -글루칸 함량을 분석한 결과, 표준물질은 498.1 mg/g을 나타낸 반면, CM-HW가 50.2 mg/g, CP가 26.3 mg/g 및 DCP는 216.1 mg/g으로 나타났다. 또한, CM-HW와 CP는 571.1 mg/g과 672.4 mg/g의 높은 α -글루칸 함량을 나타내었으나 조다당획분에서 저분자 물질을 제거한 CM-DCP는 비교적 적은 545.5 mg/g의 α -글루칸 함량을 나타냈다. 이는 투석에 의해 유리당 등의 저분자 물질이 제거됨으로써 β -glucan 함량이 증대된 것을 나타내었다. Shin 등(2021a)은 상황버섯 균사체 액체발효물을 이용하여 면역증강 및 항염증 활성을 분석하였는데, 활성획분의 구성당이 glucose와 mannose를 주로 함유하고 있었으며, 균사체로부터 생산된 EPS가 β -glucan을 포함하고 있다고 보고하였다. 본 연구에서도 동충하초 균사체 액체발효물 유래 포스트바이오틱스로부터 분획한 항염증 활성을 지닌 투석-조다당획분이 이와 유사한 구성분을 나타내

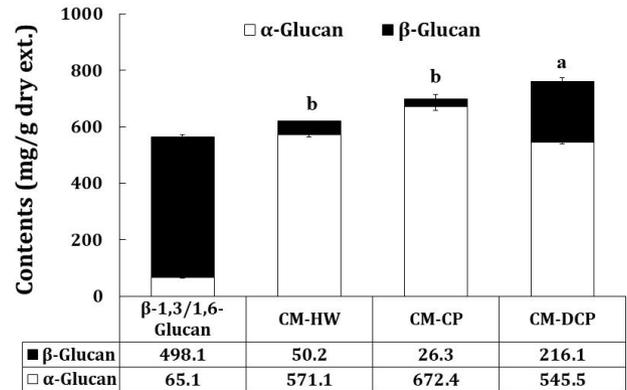


Fig. 5. β -1,3/1,6-glucan content of subfraction from liquid culture of *Cordyceps militaris* mycelium. All results are expressed as mean \pm S.D. for three independent experiments. Different letters within a column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. CM-HW; post-biotics from *C. militaris* mycelium liquid culture, CP; crude polysaccharide of HW, and DCP; dialyzed-CP.

고 있으므로 향후 β -glucan과 항염증 활성과의 상관성을 연구하여 동충하초 유래 포스트바이오틱스의 항염증 활성물질 및 지표물질로서의 β -glucan 활용가능성을 검토하고자 한다.

요약 및 결론

동충하초 균사체를 이용한 액체배양의 항염증 활성을 조사하기 위해 균사체를 포함한 액체배양액을 추출하고 동결건조하여 포스트바이오틱스(CM-HW)를 조제하였다. 또한, 포스트바이오틱스는 주정 침전에 의해 조다당획분(CM-CP)으로 분리되었으며, 조다당획분은 12~14 kDa의 투석막을 이용하여 투석-조다당획분(CM-DCP)으로 분획하였다. 시료에 의한 세포독성 평가는 MTT 시약을 이용하여 분석하였으며, 대조군에 비해 시료 처리군의 유의한 세포독성은 나타나지 않았다. CM-DCP는 LPS 유도군에 비해 RAW 264.7 세포에서 IL-6 및 MCP-1 분비량을 유의미하게 감소하였으며, TNF- α 및 IFN- γ 로 유도된 HaCaT 세포에서 CM-DCP를 처리함으로써 IL-6 및 IL-8의 분비가 감소되었다. HPSEC에 의한 CM-DCP의 분자량 분포를 확인한 결과, 5.6 kDa과 144 kDa 이상의 물질이 혼재되어 있는 것으로 확인되었으며, 구성분 분석 결과, CM-DCP의 중성당 함량 및 mannose 비율이 다른 분획물보다 높았으며, β -1,3-1,6-glucan 함량은 216.1 mg/g로 나타났다. 결론적으로, 동충하초 균사체 유래 포스트바이오틱스는 항염증 활성을 촉진하였으며, glucose와 mannose를 포함한 중성 다당류가 항염증 활성에 기여하는 것으로 사료된다.

감사의 글

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

References

- Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochem* 54:484-489
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Cha JY, Ahn HY, Cho YS, Je JY. 2013. Protective effect of cordycepin-enriched *Cordyceps militaris* on alcoholic hepatotoxicity in Sprague-Dawley rats. *Food Chem Toxicol* 60: 52-57
- Chiu CP, Liu SC, Tang CH, Chan Y, El-Shazly M, Lee CL, Du YC, Wu TY, Chang FR, Wu YC. 2016. Anti-inflammatory cerebroside from cultivated *Cordyceps militaris*. *J Agric Food Chem* 64:1540-1548
- Cho JH, Lee JY, Lee MJ, Oh HN, Kang DH, Jhune CS. 2013. Comparative analysis of useful β -glucan and polyphenol in the fruiting bodies of *Ganoderma* spp. *J Mushrooms* 11: 164-170
- Choi JH, Kim GS, Lee SE, Cho JH, Sung GH, Lee DY, Noh HJ. 2012. Anti-inflammatory effects of *Cordyceps militaris* extracts. *J Mushrooms* 10:249-253
- Choi SJ, Lee YS, Kim JK, Kim JK, Lim SS. 2010. Physiological activities of extract from edible mushrooms. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39:1087-1096
- Chou SM, Lai WJ, Hong TW, Lai JY, Tsai SH, Chen YH, Yu SH, Kao CH, Chu R, Ding ST, Li TK, Shen TL. 2014. Synergistic property of cordycepin in cultivated *Cordyceps militaris*-mediated apoptosis in human leukemia cells. *Phytomedicine* 21:1516-1524
- DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350-356
- Hamidi M, Gholipour AR, Delattre C, Sedighi F, Seveiri RM, Pasdaran A, Kheirandish S, Pierre G, Safarzadeh Kozani P, Safarzadeh Kozani P, Karimitabar F. 2020. Production, characterization and biological activities of exopolysaccharides from a new cold-adapted yeast: *Rhodotorula mucilaginosa* sp. GUMS16. *Int J Biol Macromol* 151:268-277
- Heo JC, Nam SH, Kang SW, Hong IP, Lee KK, Park JY, Han SY, Lee SH. 2007. Comparison of antioxidant, anticancer and immunomodulating activities of extracts from Dong-ChongXiaCao. *Korean J Food Preserv* 14:681-687
- Honda S, Akao E, Suzuki S, Okuda M, Kakehi K, Nakamura J. 1989. High-performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strongly ultraviolet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives. *Anal Biochem* 180:351-357
- Jo IJ. 2022. Inhibitory activity of *Terminalia chebula* extract against TNF- α /IFN- γ -induced chemokine increase on human keratinocyte, HaCaT cells. *Korea J Herbol* 37:41-47
- Kang HJ, Baick SC, Yu JH. 2005. Studies on the properties of the stirred yogurt manufactured by exopolysaccharide producing lactic acid bacteria. *Food Sci Anim Resour* 25: 84-91
- Kang JY, Lee B, Kim CH, Choi JH, Kim MS. 2022. Enhancing the prebiotic and antioxidant effects of exopolysaccharides derived from *Cordyceps militaris* by enzyme-digestion. *LWT* 167:113830
- Kim DH, Park SJ, Jung JY, Kim SC, Byun SH. 2009. Anti-inflammatory effects of the aqueous extract of Hwangnyeonhaedok-tang in LPS-activated macrophage cells. *Korean J Herbol* 24:39-47
- Kim H, Suh HJ, Shin JY, Hwang JH, Yu KW. 2016. Physiological activity of roasted coffee prepared from fermented green coffee bean with *Monascus ruber* mycelium. *Korean J Food Nutr* 29:1-11
- Kim KH, Son D, Lee JS, Lee JW, Kim HS, Lee JH, Lee MC, Kim N, Song SW. 2013. Anti-diabetic studies of mass cultured mycelia from *Ganoderma applanatum* in db/db mice and human. *Korean J Food Nutr* 26:366-374
- Kim MC, Kim MJ, Kim T, Park GT, Son HJ, Kim GY, Son HJ, Kim GY, Choi WB, Oh DC, Heo MS. 2006. Comparison of antibacterial and antioxidant activities of mushroom mycelium culture extracts cultivated in the citrus extracts. *Korean J Biotechnol Bioeng* 21:72-78
- Kim SJ, Kim GH, Cho H. 2021. Postbiotics for cancer prevention and treatment. *Korean J Microbiol* 57:142-153
- Koh JB. 2003. Effect of liquid cultures of *Cordyceps militaris* on lipid metabolism and enzyme activities in hyperlipidemic female rats. *J Life Sci* 13:265-272

- Lee JJ, Lee YM, Chang HC, Lee MY. 2007b. Acute toxicity of *Leuconostoc kimchii* GJ2, an exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria isolated from kimchi, in mice. *J Life Sci* 17:561-567
- Lee JS, Kwon DS, Lee KR, Park JM, Ha SJ, Hong EK. 2015. Mechanism of macrophage activation induced by polysaccharide from *Cordyceps militaris* culture broth. *Carbohydr Polym* 120:29-37
- Lee JY, Roh SS, Seo YB. 2007a. Research on effects of *Cordyceps sinensis* in spleen cells of mouse. *Korean J Herbol* 22:47-55
- Liu JY, Feng CP, Li X, Chang MC, Meng JL, Xu LJ. 2016. Immunomodulatory and antioxidative activity of *Cordyceps militaris* polysaccharides in mice. *Int J Biol Macromol* 86:594-598
- Liu XC, Zhu ZY, Liu YL, Sun HQ. 2019. Comparisons of the anti-tumor activity of polysaccharides from fermented mycelia and cultivated fruiting bodies of *Cordyceps militaris* *in vitro*. *Int J Biol Macromol* 130:307-314
- Liu Y, Li QZ, Li LDJ, Zhou XW. 2021. Immunostimulatory effects of the intracellular polysaccharides isolated from liquid culture of *Ophiocordyceps sinensis* (*Ascomycetes*) on RAW264.7 cells *via* the MAPK and PI3K/Akt signaling pathways. *J Ethnopharmacol* 275:114130
- López-García J, Lehocký M, Humpolíček P, Sába P. 2014. HaCaT keratinocytes response on antimicrobial atelocollagen substrates: Extent of cytotoxicity, cell viability and proliferation. *J Funct Biomater* 5:43-57
- Park NK, Chun GT, Jeong YS. 2012. Development of extraction process of protein-bound polysaccharides from *Inonotus obliquus* mycelia. *Korean Soc Biotechnol Bioeng J* 27:177-185
- Park YJ, Nam JY, Yoon DE, Kwon OC, Kim HI, Yoo YB, Kong WS, Lee CS. 2013. Comparison of anti-inflammatory, antioxidant and anti-allergic effects of *Ganoderma* species mycelial extracts. *J Mushrooms* 11:111-115
- Rathore H, Prasad S, Sharma S. 2017. Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review. *PharmaNutrition* 5:35-46
- Shin HY, Kim H, Jeong EJ, Kim HG, Shin JC, Choi SY, Suh HJ, Moon SK, Yu KW. 2022a. Immunostimulatory polysaccharide fractionated from a liquid culture by *Phellinus linteus* mycelium. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 51:19-27
- Shin HY, Kim H, Jeong EJ, Kim HG, Son SU, Suh MG, Kim NR, Suh HJ, Yu KW. 2021a. Anti-inflammatory activity of liquid fermentation by *Phellinus linteus* mycelium. *Korean J Food Nutr* 34:487-497
- Shin HY, Kim H, Jeong EJ, Yu KW. 2022b. Macrophage stimulating activity of crude polysaccharide on maca (*Lepidium meyenii*) varieties. *Korean J Food Nutr* 35:7-15
- Shin HY, Kim H, Shin JY, Lee SJ, Yu KW. 2021b. The physiological activity of crude polysaccharide solvent extracted from herbal medicine mixture. *Korean J Food Nutr* 34:36-46
- Suh MG, Shin HY, Jeong EJ, Kim G, Jeong SB, Ha EJ, Choi SY, Moon SK, Yu KW, Suh HJ, Kim H. 2022. Immunostimulatory effect of postbiotics prepared from *Phellinus linteus* mycelial submerged culture *via* activation of spleen and Peyer's patch in C3H/HeN mice. *Pharmaceuticals* 15:1215
- Sun HQ, Yu XF, Li T, Zhu ZY. 2021. Structure and hypoglycemic activity of a novel exopolysaccharide of *Cordyceps militaris*. *Int J Biol Macromol* 166:496-508
- Won SY, Park EH. 2005. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of cultured mycelia and fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. *J Ethnopharmacol* 96:555-561
- Yoon JY, Kim JH, Baek KS, Kim GS, Lee SE, Lee DY, Choi JH, Kim SY, Park HB, Sung GH, Lee KR, Cho JY, Noh HJ. 2015. A direct protein kinase B-targeted anti-inflammatory activity of cordycepin from artificially cultured fruit body of *Cordyceps militaris*. *Pharmacogn Mag* 11:477-485
- Yu Y, Wen Q, Song A, Liu Y, Wang F, Jiang B. 2022. Isolation and immune activity of a new acidic *Cordyceps militaris* exopolysaccharide. *Int J Biol Macromol* 194:706-714

Received 18 November, 2022

Revised 19 December, 2022

Accepted 6 January, 2023