

Changes in Cordycepin and Liquiritigenin Content and Inhibitory Effect on NO Production in Fermented Licorice and Dongchunghacho

Ziyu Wang¹, Mei Li¹, Ke Li, Beung Gu Son¹, Jum Soon Kang¹, Young Hoon Park¹, Yong Jae Lee¹, Sun Tae Kim², Jae-Chul Jung³, Young Guen Lee⁴ and Young Whan Choi^{1*}

¹Department of Horticultural Bioscience, College of Natural Resources and Life Science, Pusan National University, Miryang 50463, Korea

²Department of Plant Bioscience, College of Natural Resources and Life Science, Pusan National University, Miryang 50463, Korea

³NOVAREX Co., Ltd. Ochang-eup, Cheongwon-gu, Cheongju-si, Chungcheongbuk-do, 28126, Korea

⁴Department of Food Science and Technology, College of Natural Resources and Life Science, Pusan National University, Miryang 50463, Korea

Received October 20, 2016 / Revised November 1, 2016 / Accepted November 8, 2016

Traditional Korean fermented herbal plants are potential sources of new food that promote health, but they are still produced by yeast, fungi or bacteria fermentation. In the present work, mushroom (*Paecilomyces tenuipes* and *Cordyceps militaris*) fungal dongchunghacho were used to fermented *Glycyrrhiza uralensis* Fischer (licorice) or mixed with pupa. The pupa were tested as solid substrates for the production of cordycepin, liquiritin, and liquiritigenin. The fermented substrates were analyzed the content of cordycepin, liquiritin, liquiritigenin, and glycyrrhizin productivity and inhibitory activity of NO. The cordycepin content of 70% EtOH extract from the fermented mixture of licorice and 50% pupa with *C. militaris* increased maximum at 33 times. Pupa was very excellent for the production of cordycepin. The liquiritin content was decreased in all the assays inoculated with *P. tenuipes* and *C. militaris* dongchunghachos. The liquiritigenin content was higher when fermented with *P. tenuipes* than *C. militaris*. The addition of pupa significantly reduced the liquiritin content and glycyrrhizin production. As a result, the liquiritigenin content increased in fermented *P. tenuipes* and *C. militaris*, and liquiritin and glycyrrhizin decreased. The inhibition of NO production in the different ethanolic extracts fermented with licorice and pupa was also significantly increased and higher than that of a nonfermented extract in higher polar solvent extracts. The contents of cordycepin and biological active compounds were altered in accordance with the concentration of pupa and fungi. This study provides basic data for use in developing dongchunghacho fungi as a functional food resource.

Key words : Cordycepin, *Cordyceps militaris*, NO production, pupa, solid-state fermentation

서 론

감초(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)는 전 세계적으로 약 30여 종이 보고되고 있으며, 우리나라에서는 감초(*Glycyrrhiza uralensis* Fischer), 광과감초(*G. glabra* Linne) 및 신과감초(*G. inflata* Bat.)가 재배되고 있다[33]. 감초는 뿌리와 추출경을 그대로 또는 주피를 제거한 것으로 단맛, 쓴 맛의 완하, 여러 가지 한약재의 약성을 화합시키는 성질이 있어 우리나라의 한방의 약 조제시 70%이상 첨가되고 있고[27], 한방에서 가장 높은 빈도로 사용되는 약재로서 알려져 있다.

감초의 뿌리와 줄기에는 triterpenoid saponin 계통인 gly-

cyrrhizin (glycyrrhizic acid)과 glycyrrhizinate은 천연 감미료로 사용되고 있으며[9], flavonoid계통인 liquiritin, isoliquiritin, apioliquiritin, liquiritigenin, glycyrol, glycyrin, licoricidin 및 licoricone과, isoflavonoid계통인 glabridin과 glabrene, 페놀계통인 licopyranocoumarin과 glycocoumarin [10] 및 coumarin계통인 herniarin과 umbelliferone이 주요 생리활성 성분으로 알려져 있다[17]. 이러한 성분들로 인하여 감초는 오랜 기간 동안 한약재로 사용되어 왔으며 본초 문헌에서 감초는 화를 식히고 목의 아픈 증상을 없애며 약물중독을 제거하고 위의 적열을 제거하며 노관통을 없애는 효능이 있다고 기록되어 있다. 또한 현대의학에서도 감초의 항염증, 항괴양, 항알레르기 및 항바이러스 작용 등이 밝혀졌다[3]. 특히 감초의 주요 생리활성을 나타내는 성분은 glycyrrhizin으로서 약 6-14% 함유되어 있으며 항알레르기[16], 만성 간염[14], AIDS를 포함한 바이러스성 질환[26], 혈당 강하, 항암활성[4] 및 혈중 콜레스테롤 함량 강하, 혈압 저하, 항진균, 항산화 등의 많은 생리 활성이 있어[1, 9] 약품, 건강식품 및 화장품에 사용되고 있다.

한약재의 효능 또는 안전성을 증대시키기 위하여 발효, 추

*Corresponding author

Tel : +82-55-350-5522, Fax : +82-55-350-5529

E-mail : ywchoi@pusan.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.

출방법 및 추출용매 등의 다양한 방법이 개발되고 있는데, 포제(炮製)는 한약재의 효능 증대와 독성을 제거하여 부작용 감소, 용해성 촉진, 약성변화, 효능증가, 효능조절, 잡질과 비약용 부분 제거, 순도증진 및 저장의 편리성 등을 개선할 수 있으며, 특히 약성을 변화시킬 수 있다고 하였다[25]. 또한 한약재의 발효는 새로운 활성성분의 생성, 한약재내의 생리활성 성분의 함량 증가, 체내 흡수율 증가, 소화 및 흡수력 증대, 색과 맛의 개선, 농약 및 독성물질의 감소 등의 한약재의 약성을 강화시키고 새로운 약효를 얻을 수 얻을 수 있는 장점이 있으며, 유익한 세균을 증가시켜 건강을 유지하는데 도움을 주는 것으로 알려져 있다[30]. 따라서 최근에는 다양한 균주를 이용하여 발효 한약재의 효능증대효과를 보고하였는데, 유산균, 효모, 바실러스, 곰팡이 등의 유익한 미생물을 이용한 발효기술 진보로 다당체, 올리고당, 사포닌, 아미노산, 펩타이드, 피틴산 등의 발효산물을 얻거나 또는 상호 간의 시너지 작용에 의해 생리활성효능이 상승되는 것으로 알려져 있다[31].

특히 감초의 경우에는 *Aspergillus kawachii*의 조효소액[14]과 누룩으로 발효한 감초는 fibroblast 콜라겐 생성능 및 liquiritigenin의 함량을 증가시키고[32], 식물과 미생물 유래의 조효소액으로 발효한 감초는 flavonoid 배당체로부터 당이 분리되어 무배당체가 증가되고[20], liquiritin은 생체 내에서 β -D-glucuronidase에 의해 주요 생리활성 성분인 glycyrrhizic acid로 대사된다고[20, 22]하였다.

발효를 위해서 다양한 균주가 이용되고 있는데, 동충하초로 발효한 복령과 후박은 간암세포의 성장을 저해시킨다고[28, Shon] 하였다. 특히 동충하초는 cordycepin, cordycepic acid, 아미노산, 다당류, 비타민 등이 유용성분으로 보고되고 있으며[34], 그 중 주요 생리활성 성분인 cordycepin (3'-deoxyadenosine과 2'-deoxycoformycin)은 면역증강, 항균작용, 항당뇨 작용, 고지질혈증 개선작용 및 혈소판 응집억제 작용이 보고되어 있다[1, 5, 19]. 우리나라에서는 *P. tenuipes*와 *C. militaris*가 식품의 원료로, *C. sinensis*가 생약으로 허용되어 있어 수요가 점점 증가되고 있는 추세이다.

따라서 본 연구에서는 동충하초 균으로 감초를 발효하여 감초의 성분과 동충하초의 주요 생리활성 성분인 cordycepin의 함량증가를 통한 생리활성 증대 효과를 조사하기 위하여 동충하초 버섯균의 cordycepin과 감초의 glycyrrhizic acid과 glycyrrhizin의 함량을 측정하였다. 또한 발효균주의 성분생성과 감초에 함유되어 있는 성분의 전환을 통해서 생리활성 증대효과와 함께 건강기능성 소재로서의 가치향상을 기대할 수 있는 기초자료로 제시하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 감초(*Glycyrrhizae Radix*)는 (주)노바렉스

부설연구소에서 감정한 것으로 제천시에서 재배한 세균을 구입하여 완전히 분쇄한 것을 재료로 사용하였으며, 번데기는 중국산으로서 마트에서 구입하여 사용하였다. 감초의 발효에 사용된 균주는 눈꽃 동충하초(*Paecilomyces tenuipes*)와 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*)로서 부산대학교 이상몽 교수님 연구실로부터 분양 받아서 발효에 사용하였다.

시약 및 기기

HPLC 분석 및 시료의 추출에 사용한 유기용매는 Fisher scientific (Fisher scientific Korea, Seoul, Korea)의 HPLC급 용매를 사용하였다. 그 외는 모두 특급시약을 사용하였다. HPLC 분석기기는 Agilent 1100 Series LC system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)의 system controller, photodiode array detector (PDA), auto sample injector, degasser를 사용하였으며 HPLC column은 Phenomenex사의 Luna C18 column (150×4.6 mm, 5 μ m, Phenomenex, USA)을 사용하였다. 눈꽃 동충하초 균주 보관용 배지는 PDA (potato dextrose agar, Difco, USA), 밀리타리스 동충하초 보관 및 배양용 배지는 MEA (malt extract agar, Difco, USA)를 이용하였으며 액체종균 생산용 배지는 potato dextrose broth (PDB, Difco, USA)와 MEB (malt extract broth, Difco, USA)를 사용하였다. 군사배양을 위한 항온배양기(HST-301M-3D, Korea)와 회전진탕배양기(HST-201M-SLI, Korea)를 사용하였다.

동충하초 균주 배양

균주는 PDA 또는 MEA 평판배지에서 4°C에서 보존하면서 30일 간격으로 계대배양하였다. 군사생장을 위해 PDA 또는 MEA 평판배지를 이용하였고 항온배양기에서 25°C로 7일간 배양하였다. PDB 또는 MEB 배지는 300 ml 삼각플라스크에 100 ml씩 각각 넣어 121°C에서 15분간 살균한 다음 냉각시켜 사용하였다. PDA 평판배지에서 7일간 배양된 균사의 가장자리부위를 직경 5 mm코르크 보리를 사용하여 각각 3조각을 채취하여 PDB와 MEB 액체배지에 접종한 후 25°C에서 7일간 진탕배양(150 rpm)하여 액체 종균을 생산하였다.

동충하초 고체발효 및 검액의 조제

잘게 파쇄한 감초에 번데기를 20%와 50%로 잘 섞어서 500 ml 배양병에 넣은 후, 121°C에서 30분간 고온가압 멸균한 후 상온에서 30분간 식혔다. 각각의 배지에 동충하초 액체종균 현탁액을 5%(v/w) 수준으로 접종하여 25±1°C의 배양기에서 50일간 고체발효시켰다.

건조된 발효물을 완전히 분말화 한 다음 검체 0.5 g에 95%와 50% pretanol 및 증류수를 각각 10 ml 넣어 1시간 초음파하여 추출한 다음, 3,000 rpm에서 원심분리하여 상등액을 취하고, 9 ml를 다시 첨가하여 2회 반복하여 초음파 추출한 용액을 모두 합하여 총량을 30 ml로 조정하였다. 추출액 5 ml를 취하

여 0.45 µm syringe filter로 여과한 여액을 검액으로 사용하였다. 나머지 25 ml를 Whatman filter paper No 2 (No. 2 filter paper, Whatman, Clifton, NJ, USA)로 필터하여 rotary vacuum evaporator (rotavator R-200, Büchi, Flawil, Switzerland)로 45°C에서 감압 농축한 다음 NO 또는 MTT 분석 자료로 사용하였다.

표준품의 준비

실험에 사용한 지표 성분인 cordycepin, liquiritin, liquiritigenin 및 glycyrrhizic acid (Fig. 1)을 구입하여, cordycepin, liquiritin 및 liquiritigenin은 1, 5, 10, 25, 50 µg/ml과 glycyrrhizic acid는 5, 10, 20, 30, 50 µg/ml농도로 희석하여 검량선을 작성하였다.

HPLC 분석조건 및 분석 조건 검증

동충하초의 주요성분인 cordycepin과 감초의 주요성분인 liquiritin, liquiritigenin 및 glycyrrhizic acid의 함량을 확인하였다. Cordycepin, liquiritin, liquiritigenin 및 glycyrrhizic acid의 정량분석은 용매별 추출물을 0.45 µm syringe filter (Millipore, Billerica, MA, USA)로 여과하였다. 본 실험에서 사용한 고성능액체크로마토그래피(HPLC)는 Agilent 1100 series (Agilent Technologies Inc., CA, USA)이고, 칼럼은 역상

(reverse phase) 칼럼인 Luna C₁₈ (5 µm, 4.6 mm×150 mm), 검출기는 UV detector (254 nm)를 사용하였다. 이동상은 0.025 % formic acid (A용액)과 acetonitrile (B용액)을 사용하였고 펌프 프로그램을 통해 gradient를 설정하였으며 유속은 0.8 ml/min로 하였다. 제조된 각각의 용액을 autosampler로 10 µl씩 주입하여 분석실험을 실시하였다. 이동상 용매의 조성 gradient 조건은 Table 1에서 보는 바와 같이 다양한 조건으로 설정하여 분석실험을 수행하였다. HPLC로 분석하여 얻은 chromatogram의 면적을 회귀직선방정식에 대입하여 각각의 cordycepin, liquiritin, liquiritigenin 및 glycyrrhizic acid의 함량을 구했으며 각각의 시료에 대해 3회 반복하여 지표성분의 함량을 산출하였다.

HPLC를 이용한 분석법의 신뢰도와 재현성을 검증하기 위해서 ICH 가이드라인에 의한 분석을 수행하였다. 직선성 (linearity)은 다섯 개의 농도(6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/ml) 별로 피크 면적비를 구하여 표준품 농도(X축)와 피크 면적비(Y축)에 대한 검량선을 작성하였고, 검량선으로부터 직선성의 상관계수를 구하여 확인하였다.

통계처리

실험은 3회 반복하였고, 엑셀프로그램을 이용하여 평균 (mean)±표준편차(SD)로 나타내었다. Student's t-test를 이용

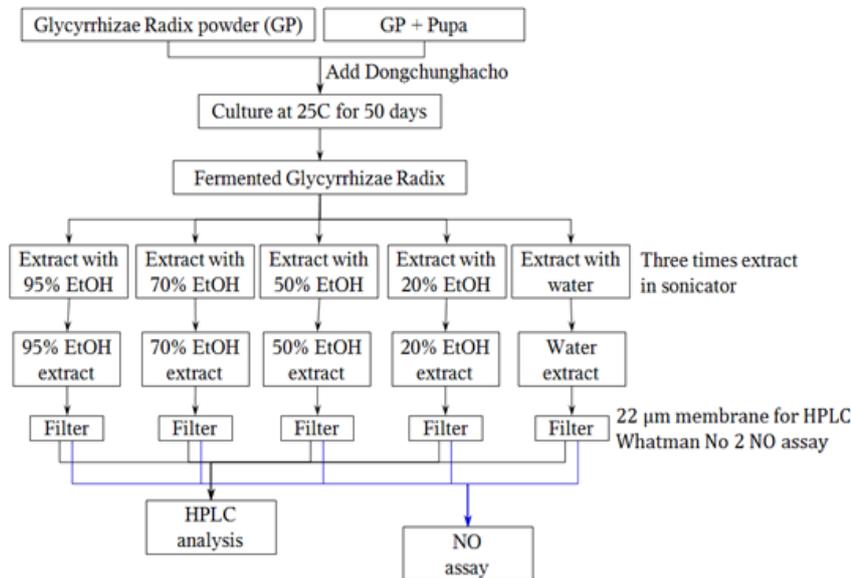


Fig. 1. Scheme of solid-fermentation of *Glycyrrhizae Radix* powder and pupa with *Paecilomyces tenuipes* and *Cordyceps militaris*.

Table 1. Conditions of HPLC analysis

Flow rate	0.8 ml/min
Detector	UV 254 nm
Injection Volume	10.0 µl
Column Temperature	Room temperature
Mobile Phase	0.025% formic acid in H ₂ O (A), CH ₃ CN (B)
Analytical condition	0-15 min (20→40, B), 15-30 min (40→100,B), 30-40 min (100, B), 40-50 min (100→20, B)

하여 통계적으로 분석하였으며, p값이 0.05 이하이면 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

HPLC를 이용한 감초와 동충하초의 지표성분 분석

동충하초의 지표성분인 cordycepin과 감초의 지표성분인 liquiritin, liquiritigenin 및 glycyrrhizic acid (Fig. 1)를 HPLC로 분석한 결과, cordycepin의 검량선은 $y = 35.42x + 0.96$ ($r^2 = 1.0000$)으로 양호한 직선성을 나타내었으며, retention time은 약 9.418분대로 확인되었다. 감초의 지표성분인 liquiritigenin, liquiritin 및 glycyrrhizic acid의 검량선은 각각 $y = 11.50x - 3.52$ ($r^2 = 0.9998$), $y = 8.93x - 4.23$ ($r^2 = 0.99998$) 및 $y = 7.52x - 13.15$ ($r^2 = 0.9991$)으로 양호한 직선성을 나타냈으며(Fig. 3), HPLC chromatogram에서 retention time은 각각 17.113, 22.202 및 32.271 min분대로 확인되었다(Table 2). 또한, cordycepin, li-

quiritigenin, liquiritin 및 glycyrrhizic acid 검출한계(LOD, limit of detection)는 각각 0.124, 1.184, 1.047, 2.841 $\mu\text{g/ml}$ 이었으며, 정량한계(LOQ, limit of quantitation)는 0.408, 3.907, 3.456, 9.376 $\mu\text{g/ml}$ 이었다.

발효 추출물의 cordycepin 함량

동충하초가 학술적으로 효능이 확인된 것은 맥각균과의 코디셉스속에 해당되는 밀리타리스 동충하초(*C. militaris*)로서 임상적으로 허약증상, 만성기관지염, 거담과 천식, 폐결핵, 빈혈 및 병후 허약 등에 치료에 처방되어 왔다[18]. 특히 밀리타리스 동충하초에서 처음 분리된 cordycepin (3'-deoxyadenosine, Fig. 1)은 adenosine nucleoside의 ribose 3번 탄소에 OH가 없는 adenosine 유사물질로 밝혀졌다[8]. 1970년대에 cordycepin이 핵산의 합성 중에 폴리아데닐화를 억제시킨다는 효과가 알려지면서 많은 연구가 진행되었으며, 암 등의 다양한 인체질환의 예방 및 치료제로서의 개발 가능성이 있는 것으로

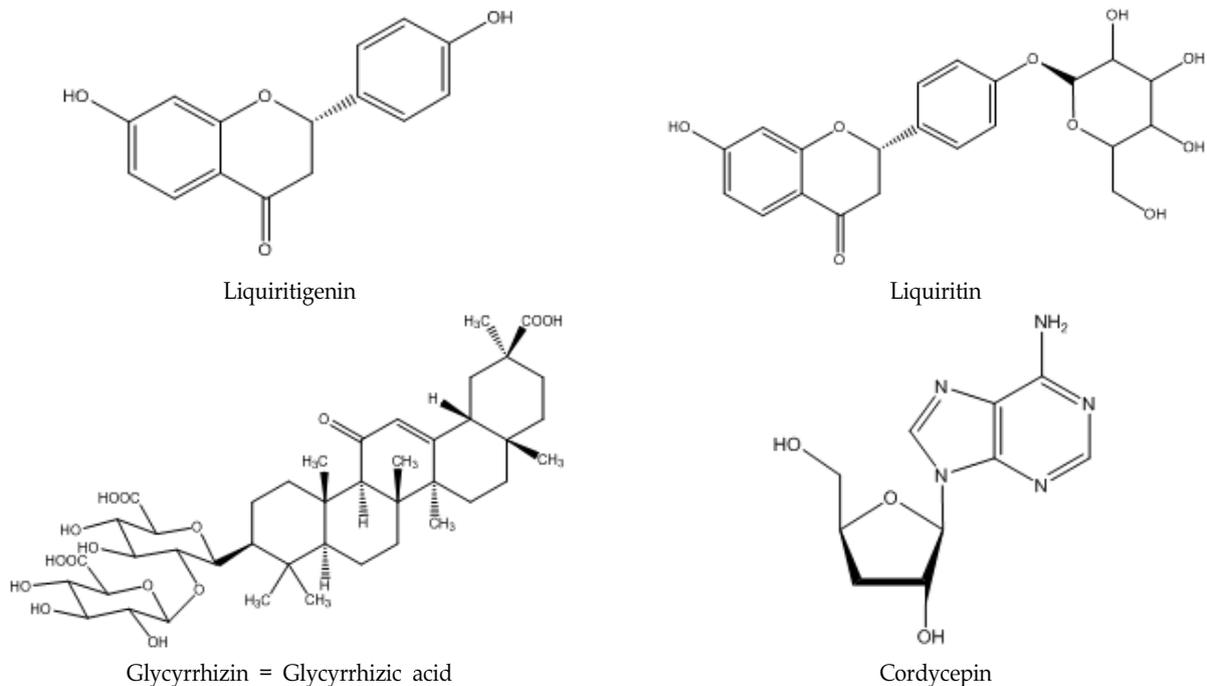


Fig. 2. Chemical structures of the liquiritigenin, liquiritin, and glycyrrhizic acid in licorice and cordycepin in *Cordyceps militaris*.

Table 2. Retention time and parameters of calibration curve, LOD and LOQ study of standard cordycepin, liquiritin, liquiritigenin and glycyrrhizic acid for HPLC method validation

Compounds	Retention time (min)	Correlation coefficient (r2)	Linear range ($\mu\text{g/ml}$)	Regression equation	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)
Cordycepin	9.418	1.0000	1-50	$y = 35.42x + 0.96$	0.124	0.408
Liquiritigenin	17.113	0.9998	1-50	$y = 11.50x - 3.52$	1.184	3.907
Liquiritin	22.202	0.9999	1-50	$y = 8.93x - 4.23$	1.047	3.456
Glycyrrhizic acid	32.271	0.9991	5-50	$y = 7.52x - 13.15$	2.841	9.376

In the regression equation $y = ax + b$, x refers to the concentration of the compounds ($\mu\text{g ml}^{-1}$), y the peak area, and r^2 the correlation coefficient of the equation. LOD means limit of detection and LOQ means limit of quantification.

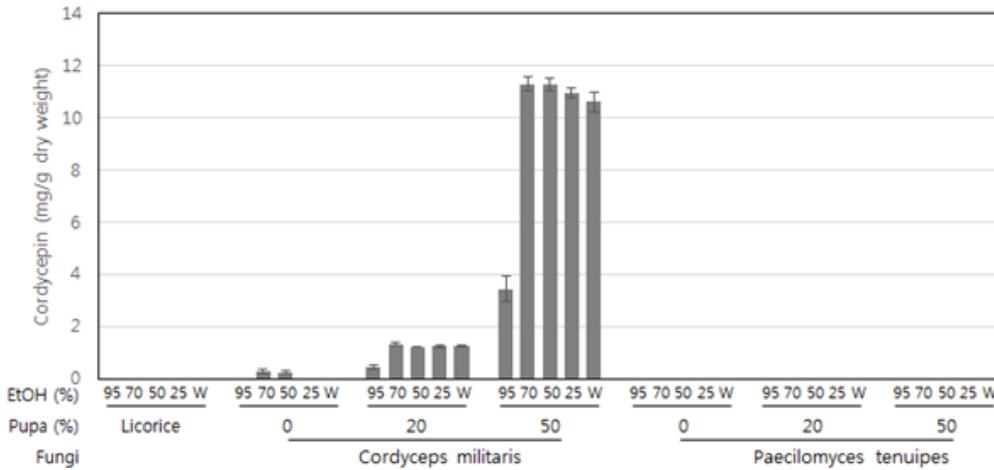


Fig. 3. Quantification of cordycepin (mg/g dry weight) in extracts of fermented with *Cordyceps militaris* and *Paecilomyces tenuipes* as affected by five different extracting solvents. Data are mean±standard deviation obtained by triplicate analyses.

보고되었는데[15, 21], 본 연구에서는 감초에 발효원인 번데기를 20와 50%로 첨가하여 눈꽃 동충하초와 밀리타리스 동충하초의 균주로 배양한 후, 추출물의 cordycepin의 함량 증가 또는 효능 증대의 가능성을 조사하였다(Fig. 3). 발효하기 전의 감초와 번데기 추출물 및 눈꽃 동충하초인 *P. tenuipes* 균주의 발효물에서는 cordycepin이 전혀 관측되지 않았으나, 밀리타리스 동충하초 발효 추출물에서는 cordycepin이 생성되었는데, 감초에 번데기의 첨가비율이 높을수록 함량이 증가하는 경향이였다(Table 2). 발효 하지 않은 감초와 감초에 번데기를 0, 20 및 50%첨가하여 발효한 발효물을 95%, 70%, 50%, 25% EtOH 및 물 추출물의 cordycepin의 함량은 70% EtOH 추출물에서 함량이 가장 많았으며, 70% EtOH 추출용매를 기준으로 EtOH의 함량이 증가하거나 감소할수록 함량은 점차 감소하는 경향이였다. 감초에 번데기를 첨가하지 않은 밀리타리스 동충하초 발효 추출물의 cordycepin 함량은 70% 또는 50% EtOH로 추출시에 각각 0.31±0.08과 0.25±0.05 mg/g dry weight 으로서 가장 많았다. 발효원으로서 번데기를 20%와 50% 첨가하여 밀리타리스 동충하초로 발효한 추출물은 번데기의 첨가 함량이 높을수록 증가하였으며, 특히 감초에 번데기를 50% 첨가 후 밀리타리스 동충하초 균주 발효물의 70%와 50% EtOH 추출물은 번데기 무첨가 발효 추출물보다 각각 cordycepin 함량이 각각 36배 증가한 11.29±0.27 mg/g dry weight 와 45배 증가한 11.26±0.24 mg/g dry weight였다. 모든 발효 추출물의 cordycepin 함량은 추출용매인 EtOH의 농도가 50-70%보다 증가하거나 낮아지면 감소하는 경향이였다. 그러나 눈꽃 동충하초 발효 추출물에서는 cordycepin이 검출되지 않았다. 본 실험 결과서 보는 바와 같이 감초 발효시에 발효원 으로서 번데기 첨가는 동충하초의 주요 생리활성 성분인 cordycepin의 함량을 현저하게 증가시켰으며, 밀리타리스 동충하초의 액체배양시 cordycepin 생산성은 균주의 종, 광도, 배지 배양기간에 따라서 다르다고 하였는데[11], 본 연구에서는

눈꽃 동충하초는 cordycepin을 전혀 생성하지 않았으며, 밀리타리스 동충하초균주로서 감초 배양시에 발효원인 번데기를 첨가하여 배양함으로써 cordycepin의 함량을 현저히 증가시키는 경향이였다. 따라서 감초에 발효원인 번데기를 첨가한 발효는 동충하초의 주요 생리활성 성분인 cordycepin의 함량 증대로 인해서 생리활성 효과가 증대될 수 있을 것으로 기대 된다.

발효 추출물의 감초 주요 생리활성 성분 함량 분석

감초(*Glycyrrhiza radix*)는 콩과에 속하는 다년생 식물로 주로 뿌리가 이용되며, 맛이 달고 독이 없어 한약 조제시 첨가하여 사용하는 경우가 많은 약재 중 하나이다[7]. 감초는 발효시에 다양한 성분의 함량변화가 일어나는 것으로 보고되고 있는데, 본 연구에서는 감초를 동충하초균으로 발효시에 번데기를 농도별로 첨가하여 발효한 후 에탄올로 추출한 다음 감초의 주요 성분인 liquiritin, liquiritigenin 및 glycyrrhizin 등의 함량을 비교하였다(Fig. 4).

감초의 발효 전 liquiritin의 함량은 70% EtOH로 추출시에 3.40±0.14 mg/g dry weight로서 가장 많았으며, 70% EtOH 용매를 기준으로 용매의 EtOH농도가 증가하거나 감소할수록 감소하는 경향이였으며, 특히 물 추출물에서는 0.930±0.08 mg/g dry weight로서 70% EtOH 추출물보다 약 1/3가량 감소하였다(Fig. 4A). 발효 후의 liquiritin의 함량은 동충하초 균의 종류 및 번데기의 첨가량에 따라서 약간의 차이가 있었는데, 번데기를 첨가하지 않고 감초를 눈꽃 동충하초 균주와 밀리타리스 동충하초 균주로 발효 후 70% EtOH로 추출시에는 각각 1.14±0.05과 1.22±0.10 mg/g dry weight로서 거의 차이가 없었으나, 감초와 번데기를 50%로 혼합한 후 발효한 발효물의 liquiritin함량은 감초 단독 발효물의 32.4%와 64.8%로서 현저히 감소하였다. 발효감초를 여러 가지 농도의 EtOH로 추출하였을 경우, liquiritin함량은 눈꽃 동충하초 균주로 발효하

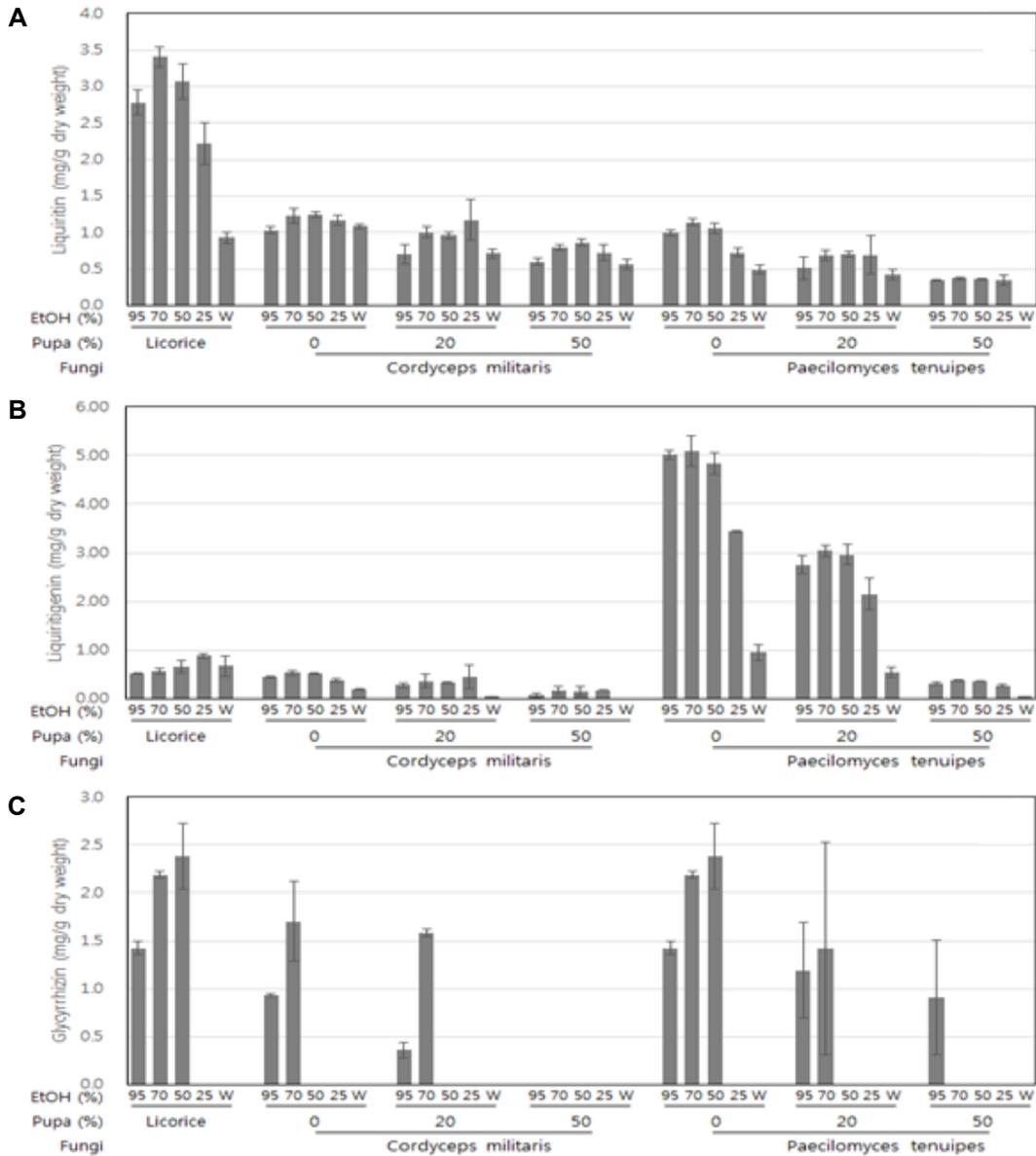


Fig. 4. Quantification of liquiritin (A), liquiritigenin (B) and glycyrrhizin (C, mg/g dry weight) in the five different extracting solvents as affected by pupa concentration in *Glycyrrhizae Radix* extracts fermented with *Paecilomyces tenuipes* and *Cordyceps militaris*. Data are mean±standard deviation obtained by triplicate analyses.

였을 때에 밀리타리스 동충하초 균주 발효 추출물보다 더 많이 감소하는 경향이였다. 이러한 결과는 눈꽃 동충하초로 발효하였을 때에 밀리타리스 동충하초 균주 발효보다 생장이 더 좋았는데(테이터 제시하지 않았음), 균의 생장시에 사용하는 발효원(번데기)과 균의 종류에 따라 작용하는 효소의 종류와 활성 등의 차이로 인해서 발효 후에 liquiritin 함량의 차이가 있었을 것으로 생각된다.

감초에 발효원(번데기)을 첨가하여 동충하초 균주인 눈꽃 동충하초와 밀리타리스 동충하초 균주 발효물의 에탄올 추출물의 liquiritigenin 함량을 조사하였다(Fig. 4B). 발효하지 않은 감초의 경우 25% EtOH로 추출시에 0.88±0.05 mg/g dry

weight로서 함량이 가장 많았다. 70% EtOH로 추출시에 liquiritigenin의 함량은 발효하지 않은 감초 추출물보다 감초에 번데기를 20% 첨가하여 눈꽃 동충하초로 발효한 추출물에서 현저히 증가하였다. 또한 liquiritigenin의 함량은 추출용매의 극성이 증가할수록 즉 EtOH의 함량이 감소할수록 감소하는 경향이였다. 그러나 밀리타리스 동충하초 균주로 발효하였을 경우에는 발효하지 않은 감초 추출물보다 liquiritigenin의 함량이 감소하는 경향이였으며, 50-70% EtOH의 용매로 추출시에 함량이 가장 많았으며, 이를 기준으로 하여 용매의 극성이 증가하거나 감소하였을 경우에는 감소하였다.

감초의 지표물질인 liquiritin은 flavonoid 화합물로서 liq-

uiritigenin에 1개의 glucose가 결합된 배당체이다[20]. Liquiritin은 감초를 발효시키면 함량의 변화를 쉽게 가져오는 것으로 알려져 있는데, *Lactobacillus pentosus* 유래의 β -glucosidase [20], *Aspergillus kawachii*의 조효소액[13], 누룩[32]균 등을 이용하여 발효하면 liquiritigenin으로 전환되어[20] liquiritigenin의 함량이 증가되고, 이로 인하여 항산화작용도 높아진다[13]하였다. 따라서 본 연구에서도 대부분 liquiritin의 함량이 감소하는 발효 추출물은 liquiritigenin의 함량이 증가하였는데, 이는 비록 작용하는 동충하초 균의 종류에 따라 차이가 있었을 지라도 liquiritin에 결합되어 있는 당이 분해되어 liquiritigenin으로 전환됨으로서 liquiritigenin의 함량이 증가되었을 것으로 추측된다.

발효 추출물의 glycyrrhizic acid (glycyrrhizin)의 함량은 발효하기 전의 감초에서 70%와 50% EtOH로서 추출시에 각각 2.19±0.04와 2.38±0.34 mg/g dry weight으로서 가장 많았으며, 95% EtOH 추출물에서는 현저히 감소되었으며, 25% 이하의 EtOH 농도에서는 전혀 추출되지 않았다(Fig. 4C).

감초에 번데기를 0%, 20% 및 50%첨가한 배지를 눈꽃 동충하초 균주로 발효한 추출물의 glycyrrhizin 함량은 번데기 무첨가(0%) 발효물을 70% EtOH로 추출시에 가장 많았으며, 번데기의 첨가 농도가 높을수록 감소하였다. 또한 번데기 무첨가 발효물은 50% EtOH 이하, 20% 번데기 첨가 발효물은 50% EtOH 이하 및 50% 번데기 첨가 발효물은 70% 이하의 EtOH 추출물에서는 검출되지 않았다. 감초에 번데기를 20% 및 50%를 첨가한 후, 밀리타리스 동충하초 발효 추출물의 경우에도 눈꽃 동충하초 발효 추출물과 유사한 경향이었는데, 전체적으로 함량이 낮았다.

감초(*Glycyrrhiza Radix*)의 주성분 중에서 사포닌 계통의 glycyrrhizin은 비당질의 고감미에 속하는 천연 감미료로서 보통 6-14% 함유되어 있으며, 설탕의 250배의 감미를 가지고 있

어 과자류, 음료, 조미료, 담배의 향 등에서도 이용되고 있다. 또한 항산화 효과를 가지고 있어서 식품 성분의 산화를 방지하여 품질의 안정화[29], 항종양 및 혈중 cholesterol 저하[23], 항알레르기[16], 만성 간염[14] 및 AIDS를 포함한 바이러스성 질환[26]에 뛰어난 효과가 있는 것으로 알려지고 있다[22]. 특히 감초는 법제 조건과 발효시에 발효원의 종류에 따라서 glycyrrhizic acid함량이 증가하거나 감소하고[6], 생체내의 장내세균에 의해서 glycyrrhizin의 aglycone인 18 β -glycyrrhetic acid로 전환하거나 β -glucuronidase에 의해서도 glycyrrhizin을 glycyrrhetic acid로 효소 전환된다[2]고 하였다. 본 연구에서도 감초의 발효시에 첨가되는 발효원인 번데기의 농도 및 발효균인 동충하초의 종류에 따라서 glycyrrhizin의 증감에 현저한 차이가 있어서 선행의 연구에서 보고한 바와 유사한 결과를 얻었다. 이에 본 연구에서는 감초에 발효원(번데기)의 첨가농도를 조절하여 2종의 동충하초 발효물을 식용 가능한 EtOH 추출물의 NO생성 억제효과를 조사하였다. 또한 감초의 주요성분과 동충하초의 주요성분을 증가시켜 발효소재의 효용 가치를 극대화한 다음 기능성 식품 소재를 개발하고자, 우리나라에서 가장 많이 사용되고 있는 감초를 동충하초로 발효하여 그 효능을 검증하였다.

감초 발효 추출물의 NO 생성 억제 효과

발효하지 않은 감초와 번데기 및 감초에 번데기를 첨가하여 동충하초 균 발효 추출물이 대식세포에 영향을 줄 수 있는 최소농도를 검증하기 위하여 세포독성 실험을 수행한 결과 (Table 3), 모든 추출물은 최대 농도인 100 μ g/ml의 농도에서 80%이상의 세포 생존율을 보였다(테이더 미제시). 발효하지 않은 감초와 발효원(번데기) 또는 번데기를 감초에 첨가하여 동충하초로 발효한 추출물의 일산화질소(NO)의 생성 억제효과를 검증하기 위하여 대식세포인 RAW 264.7 세포에 LPS를

Table 3. Inhibitory effect of the five different extracting solvents as affected by pupa concentration in *Glycyrrhizae Radix* extracts fermented with *Paecilomyces tenuipes* (FPT) and *Cordyceps militaris* (FCM) NO production

Ferment	Fermentation ²⁾			EtOH concentration (%)				Water
	Fungi	G	P	95%	70%	50%	25%	
Non-fermentation	Con-G ^{y)}	100		21.64±2.11 ^{x)}	41.23±12.57	34.24±0.84	>100	s>100
	Con-P		100	>100 ^{w)}	>100	>100	>100	>100
Fermentation	FPT	100	0	18.09±0.79	18.23±2.16	31.13±15.65	68.09±18.04	>100
		80	20	17.74±0.57	16.75±2.62	33.59±5.83	>100	>100
	FCM	50	50	20.56±0.75	18.53±0.94	34.51±3.33	>100	>100
		100	0	17.77±3.83	9.54±0.29	17.43±0.34	65.18±14.00	>100
	FCM	80	20	16.84±0.41	10.98±1.57	33.38±1.69	>100	>100
		50	50	14.02±0.59	28.95±3.00	16.04±1.51	29.46±0.01	38.01±11.79

²⁾Camcho cultured with *Paecilomyces tenuipes* and *Cordyceps militaris* dongchngghacho based on pupa concentration.
^{y)}Con-G means non-fermented *Glycyrrhizae Radix* extract, Con-P means non-fermented pupa extract, FPT means *Glycyrrhizae Radix* extract fermented with *Paecilomyces tenuipes*, FCM means *Glycyrrhizae Radix* extract fermented with *Cordyceps militaris*.
^{w)}Data are mean±standard deviation obtained by triplicate analyses.
^{w)}IC₅₀ was higher than 100 μ g/ml extracts.

처리하여 NO생성 억제효과를 IC₅₀값으로 비교하였다. 발효하지 않은 감초의 NO 생성에 대한 IC₅₀값은 추출용매인 EtOH의 농도가 낮을 수록 값이 증가하여 NO생성 억제효과가 감소하는 경향이었으며, 25% EtOH와 물 추출물에서는 효과가 없었다. 특히 발효원인 번데기 추출물은 EtOH의 농도에 관계없이 100 µg/ml 이하의 농도에서는 효과가 없었다.

눈꽃 동충하초 발효물의 95%와 70% EtOH 추출물은 IC₅₀가 20 µg/ml 이하로서 발효하지 않은 감초 추출물보다 NO 생성 억제효과가 높았으나, 50% EtOH 추출물의 경우 번데기를 20%와 50% 첨가한 발효 추출물은 발효하지 않은 감초추출물과 유사한 효과를 나타내었다. 25% EtOH 추출물은 감초 단독 발효 추출물에서만 NO 생성 억제효과가 있었다.

밀리타리스 동충하초 발효 추출물의 NO생성 억제효과는 발효하지 않은 감초 추출물보다 감초 단독 발효(0%), 20% 및 50% 번데기 첨가 발효 추출물이 현저히 높았다. 50% EtOH 추출물의 경우, 감초 또는 50%번데기 첨가 발효 추출물은 발효하지 않은 감초 추출물보다 약 2배의 NO생성억제효과가 있었다. 감초에 번데기의 첨가량이 많은 동충하초 발효추출물일수록 NO생성 억제효과가 증가하는 경향이였다. 특이한 점은 번데기의 첨가량에 따라서 약간의 차이는 있었으나, 25%의 EtOH 추출물과 물 추출물에서 NO생성 억제효과가 현저하게 증가되었다. 이러한 효과는 발효정도를 시각적으로 관찰하였을 때에 번데기를 첨가하는 농도가 높을수록 균의 생장이 촉진되었는데, 이로 인해서 발효시의 감초와 동충하초의 주요 생리활성 성분 함량변화, 동충하초 균이 생성한 성분의 종류, 생성된 각 성분들의 혼합비율 등에 의해서 생리활성의 차이가 있었을 것으로 생각된다. 또한 밀리타리 동충하초의 경우 극성이 높은 물과 25% EtOH 추출물이 NO 생성억제 효과가 증가된 결과는 가공시에 좋은 잇점으로서 발효산물을 이용한 가공분야에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

이상의 결과를 종합적으로 고찰하면, 감초는 한약재에서 가장 높은 빈도로 처방되는 약재로 보중익기, 윤편지해, 청열해독, 조화약성 등의 효능이 있고 감미료로도 이용되고 있다[35]. 최근에 식물(*Prunus dulcis*) 유래 발효원으로 발효한 감초와 미생물(*Lactobacillus pentosus*) 유래 발효원으로 발효한 감초에서 발효원에 따라 flavonoid 지표성분인 liquiritigenin 생성에 차이가 있음이 보고되었다[20]. 본 연구에서는 감초를 번데기와 혼합한 고체발효 추출물의 경우에 감초의 성분변화, 동충하초 생리활성 성분의 생성 등으로 인하여 생리활성 효능이 달랐을 것으로 추측된다. 발효에 의한 성분변화와 생리활성 효과의 향상은 일반적으로 독성의 감소, 새로운 물질의 생성, 함량의 변화 등의 다양한 효과가 있는 것으로 보고되고 있는데, 다양한 균으로 발효시에 생리활성 효능의 증대에 관한 효과는 많이 보고되어 있다. 감초를 발표시키면 liquiritin 함량의 변화가 쉽게 일어나는데, *Lactobacillus pentosus* 유래의 β-glucosidase에 의해서 liquiritigenin으로 전환되고[20], *Aspergillus*

*kawachii*의 조효소액을 첨가함으로써 liquiritigenin의 함량이 증가되었고 이에 따라 항산화작용도 높아졌다고 보고하였다[13]. 또한 누룩을 이용한 경우에도 감초의 liquiritigenin이 증가함이 확인되었다[32].

현재까지의 연구로 볼 때 감초는 배당체인 주요성분이 발효를 통해 비당질로 전환이 될 경우 생리활성이 증가되어 건강기능식품으로의 활용가능성을 높일 수 있고[20], 발효에 의해 liquiritin이 liquiritigenin으로 전환되어[20] 함량이 증가된 liquiritigenin은 항균활성의 증가[13], 카드뮴으로 유발된 세포의 독성을 억제하고 특히 세포내 해독작용과 관련된 글루타치온의 고갈상황에서는 완벽한 세포보호 효과[12], 납에 의해 유도된 PC-12 cell의 세포독성에 대한 보호효과[24] 등이 보고됨으로써 발효에 의한 생리활성 효능 증대에 대한 관심은 높아지고 있다.

본 연구에서도 동충하초로 발효시에 liquiritin으로부터 glucose가 분리됨으로서 liquiritin은 감소하고 liquiritigenin의 함량이 대부분 증가함을 확인 할 수 있었으며, glycyrrhizin의 함량은 감소하는 경향이였다(Table 3, Table 4). 특히 밀리타리스 동충하초 균주로 발효시에는 동충하초의 주요 생리활성물질인 cordycepin이 생성되었으며, 극성이 높은 25% EtOH와 물 추출물에서 NO생성 억제효과가 높았으므로 유기용매의 함량이 높고 극성이 낮을수록 추출 및 가공이 어렵다는 것을 고려한다면 생리활성이 높은 가공품의 제조에 유리하게 활용될 수 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서는 2종의 동충하초 발효균주와 발효원으로서 번데기 첨가 및 발효물을 극성이 다른 용매로 추출하여 감초와 동충하초의 주요 생리활성 성분을 분석함으로써 생물자원 추출시의 주요 생리활성 효과와 성분의 함량은 추출용매 극성의 중요성이 증명되었으며, 추출용매의 상대적인 비율에 따라서 생리활성의 차이가 있음을 증명하였다. 이러한 결과는 발효 추출물의 성분 profiling과 함량을 분석하여 생리활성을 비교함으로써 더욱 명확하게 밝혀질 수 있을 것으로 기대된다. 또한 본 연구에서도 동충하초를 이용한 감초의 발효는 동충하초의 생리활성 성분인 cordycepin의 생성 및 함량증가와 더불어, 동충하초 균에 의해서 감초의 유효성분인 liquiritin, liquiritigenin 및 glycyrrhizin의 함량의 변화가 있었으며, 이로 인해서 추출하는 용매에 따라서 생리활성 효과에 차이가 있었다는 것을 증명하였다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

References

- Ahn, H. Y., Park, K. R., Yoon, K. H., Lee, J. Y. and Cho, Y. S. 2016. Biological activity and chemical characteristics

- of *Cordyceps militaris* powder fermented by several microscopic organisms. *J. Life Sci.* **25**, 197-205.
2. Alessandra, M., Antonella, D. L., Isabella, D. L., Cesare, P. and Mario, D. R. 2002. Enzymatic production of 18- β -glycyrrhetic acid from *Glycyrrhiza glabra* L. *Biotech. Let.* **24**, 1907-1911.
 3. Asl, M. N. and Hosseinzadeh, H. 2008. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp, and its bioactive compounds. *Phytother. Res.* **22**, 709-724.
 4. Chang, S. T., Chen, P. F. and Chang, S. C. 2001. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *J. Ethnopharmacol.* **77**, 123-127.
 5. Cho, H. J., Cho, J. Y., Rhee, M. H., Kim, H. S., Lee, H. S. and Park, H. J. 2007. Inhibitory effects of cordycepin (3'-deoxyadenosine), a component of *Cordyceps militaris*, on human platelet aggregation induced by thapsigargin. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 1134-1138.
 6. Choi, H. J., Lee, W. J., Park, S. H., Song, B. W., Kim, D. H. and Kim, N. J. 2005. Studies on the processing of crude drugs (IX) - Preparing standardization and regulation of stir-frying *Glycyrrhizae* root (1). *Kor. J. Pharmacogn.* **36**, 209-219.
 7. Chung, W. T., Lee, S. H., Cha, M. S., Sung, N. S., Hwang, B. and Lee, H. Y. 2001. Biological activities in roots of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. *Kor. J. Med. Crop Sci.* **9**, 45-54.
 8. Cunningham, K. G., Manson, W., Spring, F. S. and Hutchinson, S. A. 1950. Cordycepin, a metabolic product isolated from cultures of *Cordyceps militaris* (Linn.) Link. *Nature* **166**, 949.
 9. Fenwick, G., Lutowski, J. and Nieman, C. 1990. Licorice *Glycyrrhiza glabra* L.-Composition uses and analysis. *Food Chem.* **38**, 119-143.
 10. Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T. and Okuda, T. 1988. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 2090-2097.
 11. Jo, S. J., Lee, T. H., Chae, D. H. and Han, Y. H. 2004. Optimization of culture and media composition on the production of cordycepin by *Cordyceps militaris*. *Kor. J. Microbiol.* **40**, 217-220.
 12. Kim, S. C., Byun, S. H., Yang, C. H., Kim, C. Y., Kim, J. W. and Kim, S. G. 2004. Cytoprotective effects of *Glycyrrhizae* radix extract and its active component liquiritigenin against cadmium-induced toxicity (effects on bad translocation and cytochrome c-mediated PARP cleavage). *Toxicology* **197**, 239-251.
 13. Kim, S. I., Kim, J. E., So, J. H., Rhee, I. K., Chung, S. K., Lee, K. B., Yoo, Y. C. and Song, K. S. 2004. Changes in liquiritigenin contents in licorice extract treated by the crude enzyme extract from *Aspergillus kawachii*. *Kor. J. Pharmacogn.* **35**, 309-314.
 14. Kiso, Y., Tohin, M., Ino, H., Hattori, M., Saamoto, T. and Namba, T. 1984. Mechanism of antihepatotoxin activity of glycyrrhizin. Effect on free radical generation and lipid peroxidation. *Planta Medica.* **50**, 298-302.
 15. Ko, B. S., Lu, Y. J., Yao, W. L., Liu, T. A., Tzean, S. S., Shen, T. L. and Liou, J. Y. 2013. Cordycepin regulates GSK-3 β / β -catenin signaling in human leukemia cells. *PLOS ONE* **8**, e76320.
 16. Kumagai, A., Nanabosh, M., Asanuma, Y., Yagur, T. and Nishino, K. 1967. Effect of glycyrrhizin on thymolytic and immuno-suppressive action of cortisone. *Endocrinol. Jpn.* **14**, 39-42.
 17. Lee, J. W., Ji, Y. J., Yu, M. H., Bo, M. H., Seo, H. J., Lee, S. P. and Lee, I. S. 2009. Antimicrobial effect and resistant regulation of *Glycyrrhiza uralensis* on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat. Prod. Res.* **23**, 101-111.
 18. Liang, Y. L., Liu, Y., Yang, J. W. and Liu, C. X. 1997. Studies on pharmacological activities of cultivated *Cordyceps sinensis*. *Phytotherapy Res.* **11**, 237-241.
 19. Muller, W. E., Weiler, B. E., Charubala, R., Pfeleiderer, W., Leserman, L., Sobol, R. W., Suhadolnik, R. J. and Schroder, H. C. 1991. Cordycepin analogues of 2',5'-oligo-adenylate inhibition of reverse transcriptase. *Biochemistry* **30**, 2027-2033.
 20. Na, I. S., Park, M. J., Noh, C. H., Min, J. W., Bang, M. H. and Yang, D. C. 2008. Production of flavonoid aglycone from Korean *Glycyrrhizae* Radix by biofermentation process. *Kor. J. Orient. Physiol. Pathol.* **22**, 569-574.
 21. Nakamura, K., Shinozuka, K. and Yoshikawa, N. 2015. Anticancer and antimetastatic effects of cordycepin, an active component of *Cordyceps sinensis*. *J. Pharmacol. Sci.* **127**, 53-56.
 22. Németh, K., Plumb, G. W., Berrin, J. G., Juge, N., Jacob, R., Naim, H. Y., Williamson, G., Swallow, D. M. and Kroon, P. A. 2003. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in human. *Eur. J. Nutr.* **42**, 29-42.
 23. Nishino, H., Yoshioka, K., Iwashima, A., Takizawa, H., Konoshi, S., Okamoto, H., Okabe, H., Shibata, S., Fujiki, H. and Sugimura, T. 1986. Glycyrrhetic acid inhibits tumor-promoting activity of teleocidin and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage mouse skin carcinogenesis. *J. Cancer Res.* **77**, 8-33.
 24. Park, E. Y., Park, J. S., Lee, J. R., Jee, S. Y., Byun, S. H. and Kim, S. C. 2007. Cytoprotective effects of liquiritigenin, a component of licorice, against lead-induced cytotoxicity in PC-12 cells. *Kor. J. Herbology* **22**, 17-24.
 25. Park, J. S., Park, S. H., Oh, I. S., Chang, Y. N., Bang, K. S., Byeon, E. J. and Lee, J. H. 2013. A comparative study of physiological activity of *Glycyrrhiza uralensis* Fischer stems and leaves by processing methods. *Kor. J. Plant Res.* **26**, 539-547.
 26. Pompei, R., Flore, O., Marcialis, M. A. and Loddò, B. 1979. Glycyrrhizic acid inhibits virus growth and activates virus particles. *Nature* **281**, 689-690.
 27. Sim, H. K., Hoang, S. W., Baek, B. S. and Bae, M. J. 1996. Effect of *Glycyrrhiza glabra* extracts on Immune response. *Life Res. Indus.* **1**, 5-13.
 28. Shon, M. Y. 2007. Antioxidant and anticancer activities of *Poria cocos* and *Machilus thunbergii* fermented with mycelial

mushrooms. *Food Indus. Nutr.* **12**, 51-57.

29. Sohn, E. J., Kang, D. G., Lee, A. S., Lee, Y. M., Yin, M. H., Yeum, K. B. Noh, S. Y. and Lee, H. S. 2003. Antioxidant activities of glycyrrhizin and its effect on renal expression of Na, K-ATPase in gentamicin-induced acute renal failure rats. *J. Physiol. Pathol. Kor. Med.* **17**, 542-548.

30. Suhr, S. S. and Jung, S. K. 2009. Antiviral effects of fermented *Lonicerae flos* on A type influenza virus. *Kor. J. Orient. Int. Med.* **30**, 465-480.

31. Tsukahara, M., Shinzato, N., Tamaki, Y., Namihira, T. and Matsui, T. 2009. Red yeast rice fermentation by selected *Monascus* sp. with deep-red color, lovastatin production but no citrinin, and effect of temperature-shift cultivation on lovastatin production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **158**, 476-482.

32. Um, Y. R., Shim, K. S., Lee, J. H., Park, H. Y. and Ma, J. Y. 2009. Quantitative analysis of glycyrrhizic acid in fermented *Glycyrrhizae radix* by HPLC. *Kor. J. Orient. Med.* **15**, 85-89.

33. Zheng, Y. F., Wei, J. H., Fang, S. Q., Tang, Y. P., Cheng, H. B., Wang, T. L., Li, C. Y. and Peng, G. P. 2015. Hepatoprotective triterpene saponins from the roots of *Glycyrrhiza inflata*. *Molecules* **20**, 6273-6283.

34. Zhu, J. S., Halpern, G. M. and Jones, K. 1998. The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine, *Cordyceps sinensis* Part I. *J. Altern. Complement Med.* **4**, 289-303.

초록 : 동충하초균주로 발효한 감초의 주요성분 함량 변화 및 NO 생성 억제 효과

왕자옥¹ · 이매¹ · 이커¹ · 손병구¹ · 강점순¹ · 이웅재¹ · 박영훈¹ · 김선태² · 정재철³ · 이영근⁴ · 최영환^{1*}
 (¹부산대학교 원예생명과학과, ²부산대학교 식물생명과학과, ³㈜노바렉스, ⁴부산대학교 식품공학과)

약용식물의 발효는 새로운 식품의 소재 개발이 가능하나, 발효 균주는 대부분 이스트, 유산균, 박테리아 등이 이용되고 있다. 본 연구에서는 감초와 번데기 단독 또는 감초에 발효원인 번데기를 20%와 50%로 첨가한 혼합물의 배지에 눈꽃 동충하초(*Paecilomyces tenuipes*)와 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*)를 이용하여 고체배양방법을 확립하였다. 동충하초 발효물을 식품소재로 개발하기 위하여 식용 가능한 용매인 에탄올 95%, 70%, 50%, 25% 및 물로서 추출한 다음 동충하초로부터 생성된 cordycepin과 감초의 지표성분인 liquiritin, liquiritigenin과 glycyrrhizin의 함량 및 NO생성 억제효과를 조사하였다. Cordycepin함량은 감초에 번데기를 50%로 혼합한 배지에 밀리타리스 동충하초 균주를 접종하여 발효한 발효물을 70% EtOH추출하였을 경우에 가장 많았으며, 번데기를 첨가하지 않은 밀리타리스 동충하초 발효물 추출물보다 함량이 33배 정도 증가하였다. 또한 추출용매의 극성이 70% EtOH보다 높거나 낮아지면 감소하는 경향이었으며, 특히 발효원으로서 번데기의 첨가는 cordycepin의 함량을 현저하게 증가시켰다. Liquiritin의 함량은 발효하지 않은 감초보다 눈꽃 동충하초와 밀리타리스 동충하초로 발효한 모든 추출물에서 감소하였다. Liquiritigenin의 함량은 눈꽃 동충하초로 발효한 추출물이 밀리타리스 동충하초 발효 추출물보다 현저히 증가하였으나, 밀리타리스 동충하초 균주의 발효 추출물은 발효하지 않은 감초 추출물과 거의 차이가 없었으며, 두 균주 모두 번데기의 첨가량이 증가할수록 liquiritigenin의 함량이 감소하는 경향이였다. 감초에 번데기의 첨가량 또는 추출 용매의 극성이 증가하면 liquiritin과 glycyrrhizin의 함량은 현저히 감소하였다. 이상의 결과로부터, cordycepin 함량은 *C. militaris* 균주로 liquiritigenin은 *P. tenuipes*로 발효시에 현저하게 증가하였으나, liquiritin과 glycyrrhizin은 감소하였다. 감초를 동충하초로 발효시에 번데기의 첨가는 주요 성분의 변화를 현저하게 유도하였다. 동충하초 발효 추출물은 NO생성 억제효과가 증가하였으며, 고극성 용매 추출물에서 그 효과가 현저하였다. 감초의 발효시에 생성된 cordycepin과 liquiritin, liquiritigenin 및 glycyrrhizin의 함량은 발효원으로서 첨가되는 번데기, 추출용매의 극성, 발효 균주의 종류 등에 따라서 현저한 차이가 있었다. 이러한 결과는 동충하초 균주를 이용한 기능성 식품 소재를 개발하기 위한 기초 자료로서 활용이 가능할 것으로 기대된다.