

흑삼의 제조 및 항암효과

이지현 · 신귀남 · 김의검 · 신현중¹ · 명창선 · 오한진² · 김동희³ · 노성수⁴ ·
조 원⁴ · 서영배⁴ · 박용진⁵ · 강철우⁵ · 송규용*

충남대학교 약학대학, 1: (주)금산천년홍삼, 2: 성균관대학교 의과대학, 3: 대전대학교 한의과대학 병리학교실,
4: 대전대학교 한의과대학 본초학교실, 5: 백남한의원

Preparation of Black Ginseng and its Antitumor Activity

Jee Hyun Lee, Gui Nan Shen, Eui Keom Kim, Hyun Joong Shin¹, Chang Seon Myung, Han Jin Oh², Dong Hee Kim³,
Seong Soo Roh⁴, Won Cho⁴, Young Bae Seo⁴, Yong Jin Park⁵, Cheol Woo Kang⁵, Gyu Yong Song*

*College of Pharmacy, Chungnam National University, 1: Geum-San Chun-Yun Red Ginseng Co. Ltd. Seoul,
2: Cheil General Hospital & Women's Health Care Center, Sungkyunkwan University,
3: Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University,
4: Department of Herbalogy, College of Oriental Medicine, Daejeon University,
5: Baeknam Oriental Medical Hospital, Daejeon*

The purpose of this study is to prepare black ginseng and evaluate its antitumor activity. In order to achieve such aim, 5 year fresh ginsengs were steamed at 95°C for 3 hr in pottery apparatus and dried at 60°C for 12-36 hr. This process was repeated again nine times in same condition. Among the ginseng saponins in black ginseng, the amount of Ginsenoside Rg₃ was examined by HPLC. 10.05 mg of Ginsenoside Rg₃ was obtained from 1 g of dried black ginseng prepared. The extract of black ginseng exhibited stronger cytotoxic activity against MCF-1, HT-1080 and Hepa 1C1C7 tumor cell lines in vitro than the extract of red ginseng. Also, the extract of black ginseng exhibited stronger antitumor activity(33%) in BDF1 mice bearing Lewis lung carcinoma cells(LLC) than the extract of red ginseng(23%). From these results, it was concluded that black ginseng had antitumor activity suggesting its application for the prevention and treatment of cancer.

Key words : Black ginseng, Ginsenoside Rg₃, antitumor activity

서 론

35억 달러 세계 인삼시장을 잡기 위하여 국내 바이오 벤처 기업들이 연간 35억 달러에 달하는 세계 인삼 관련 신물질 개발에 열을 올리고 있다. 현재 인삼을 기능성식품으로 표준화하여 세계 시장에서 성과를 올리고 있는 기업은 스위스 파머톤사뿐이며 뒤늦게 국내에서도 인삼에 대한 국가차원의 연구와 벤처업체의 상품화가 진행되고 있다.

우리나라의 홍삼은 약 1,000년 전부터 제조된 역사적 기록을 가지고 있으며, 이는 한의학적 전통제약기술인 포제법으로 포제된 포제생약이라 할 수 있다¹⁾. 일반적인 생약의 포제목적은 첫째

독성 등 부작용의 경감, 둘째 생약 성능의 개변과 약효의 증강, 셋째 보관이나 저장성의 향상, 마지막으로 맛·냄새 교정 및 변색방지 등으로 알려져 있다.

홍삼이란 수삼에 적절한 열처리 공정을 가하여 만든 것으로, 2차적인 성분변환이 일어나 수삼에 존재하지 않는 특유의 새로운 약효성분들이 생성되고, 일정한 활성성분은 함량 증가가 일어난다. 이렇듯 인삼의 가공방법에 따라 인삼에 존재하지 않는 새로운 성분이 생성되며 인삼에 비해서 항암작용을 비롯한 여러 가지 생리활성에 대해서 보다 우수한 효과를 나타내는 새로운 가공 인삼을 개발 할 수 있다^{2,9)}.

중국의 경우 백삼에는 거의 존재하지 않고, 홍삼에 소량 존재하는 인삼사포닌인 Rg₃를 대량 생산하는 방법을 개발하여 ‘Shenyi’ 라는 상품으로 항암치료를 위해 유통되고 있다.

국내의 경우 인삼의 대표적 기능성 제품은 지난 98년 바이

* 교신저자 : 송규용, 대전시 유성구 공동 220, 충남대학교 약학대학

· E-mail : gysong@cnu.ac.kr, · Tel : 042-821-5926

· 접수 : 2006/04/17 · 수정 : 2006/07/05 · 채택 : 2006/07/30

오벤처기업 진생사이언스가 개발한 ‘선삼’ 으로, 지난 2001년 선삼정으로 개발돼 국내 건강기능성식품 시장에 본격 알려진 이후 국내는 물론 전 세계적인 발명품으로도 인정받으며 기능성 인삼의 선두주자로 자리매김 한 상태이다¹⁰⁾.

이밖에도 한국생명공학연구원과 바이오벤처기업 비티진이 공동 개발한 ‘황삼EX’, ㈜남일농장 인삼영농조합과 바이오벤처기업인 ㈜그린바이오와 손잡고 제품화한 ‘굉화홍삼’, ㈜유니젠과 미국 UPI사와 공동 개발 한 ‘바이오맥스’, (주)CJ의 ‘식스플러스’, (주)일동제약의 ‘황삼’ 과 같은 여러 종류의 가공인삼이 개발되고 있다.

이와 같이 프리미엄 인삼 시대를 맞이하여 본 연구팀은 물과 불을 함께 사용하여 증숙하는 가장 대표적인 방법인 구증구폭(九蒸九曝)의 원리를 이용한 새로운 가공인삼을 개발하게 되었다. 구증구폭은 중국 송나라 이전부터 사용되었는데 검은깨, 흰콩, 대추, 광나무열매, 측백나무잎, 팥잎, 검은콩 등 다양한 약재에 이용되어 왔으며, 대표적인 것으로 지황을 구증구폭한 숙지황이 있다. 문헌에 의하면, 구증구폭의 효과는 단식을 할 수 있을 만큼 배고픔을 잊게 하거나, 흰머리를 검게 하는 등 신체의 저항력을 증가 시키는데 좋은 것으로 나타나 있다.

이에 본 연구는 소량으로 경험적인 아닌 대량생산할 수 있는 표준화된 흑삼의 제조방법을 개발하였으며, 제조된 흑삼의 함압, 향전이, 비만억제 및 뇌기능 개선효과를 관찰하여 새로운 고부가가치 신기능성 가공인삼으로써의 개발 가능성을 타진하고자 하였다.

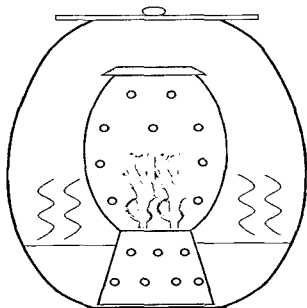


Fig. 1. The pottery apparatus used to steam ginseng.

재료 및 방법

1. 동물

실험에 사용된 동물은 자중 4주령(18~20g)의 BDF1계 생쥐로써 SLC, Inc(Japan) 사로부터 수입하여 실험당일까지 고품사료와 물을 充分히 공급하고 실온 22±2℃를 계속 유지하면서, 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2. 기구 및 시약

실험에 사용한 기구는 HPLC(Shimadzu LC-6AD, Japan), ELSD 검출기(ELSD-LT, Shimadzu, Japan), 컬럼(Shiseido, 5µm, 250×4.6mm, Japan), CO₂ incubator(Vision scientific Co., Model VS-9108 MS), clean bench(Vision scientific Co., KMC-14001),

centrifuge (Beckman Co., GS-6R), inverted microscope(Nikon Co., Japan), bright microscope(UFX-DX, Nikon), linear accelerator(Varian Co, U.S.A.), ELISA-reader(Emax, U.S.A), rotary vacuum evaporator(Büchi 461), autoclave (Hirayama, Japan), micro-pipet(Gilson, U.S.A), autostill WG25(Japan), titer plate shaker(Labline Inst., U.S.A), culture flask(Falcon 3024), multiwell plate(96-well, Falcon), conical tube, disposable pipet (5 ml, 10 ml, 25 ml, Falcon) 및 syringe filter(0.22, 0.45 µm, Falcon), 시약은 RPMI 1640, fetal bovine serum(FBS), dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), HBSS(Hank's balanced salt solution), glycerol, bromophenol blue, trypsin -EDTA, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium-bromide (MTT), penicillin-streptomycin, sodium hydroxide, trypan blue, phenol red, sodium azide 및 isopropanol 등은 Sigma 製品, ethanol, HCl은 Merck 製品, sodium bicarbonate는 Gibco 製品, 스크류 세척기, 옹기증숙기, 냉풍건조기, 원적외선 건조기 등을 각각 사용하였다.

3. 흑삼의 제조

1) 인삼의 구입

금산에서 생산되어 유통되는 5년근 수삼을 구입한 후, 대전 대학교 본초학교실에서 규격에 맞는 것만을 선별한 후, 수삼을 스크류 세척기에 넣고 10분간 총 3회 반복해서 세척하였다. 이때 세척과정 중에 거피가 되지 않도록 주의하였다.

2) 증숙방법

세척된 수삼을 건조하지 않고 증숙 할 경우, 수삼이 터지는 경우가 많으므로 이를 방지하기 위하여 40℃에서 24시간 건조하였다. 24시간 저온에서 말린 인삼을 증숙기로 사용한 옹기(Fig. 1)에 넣고 증숙하였다. 옹기에 7 리터의 생수를 넣은 후 수삼을 부드러운 무명 천으로 다발모양으로 감싸서 놔두 부분을 아래로 향하게 하여 옹기 안에 가지런히 세웠다. 예열시간은 옹기에서 수증기에 세어 나오는 데까지의 시간으로 통상 30여분 소요되었다. 이때 증숙온도는 95℃이며, 이 온도를 3시간 동안 일정하게 유지하였다.

3) 건조방법

원적외선 열선이 내장된 건조기의 내부온도를 60℃로 유지시킨 후 팬을 돌리면서 골고루 수삼을 건조시켰다. 이때 냉풍 건조 시간은 1차 증숙 수삼 건조 시간은 36시간, 2차 증숙 수삼 건조 시간은 14시간이며 3차부터 9차까지의 증숙 수삼 건조 시간은 12시간이었다.

4. 흑삼의 추출

상기의 증숙 및 건조를 9회 반복하여 얻은 흑삼 20 g을 취하여 분쇄한 후 100 ml의 물을 넣고 실온에서 5시간 방치한 뒤 메탄올 1 리터를 넣고 3시간 썩 3회 환류 추출하였다. 추출한 용액을 실온까지 냉각시킨 후 여과한 뒤 감압농축기를 이용하여 메탄올을 추출물을 얻었다. 메탄올 추출물을 200 ml의 물에 현탁시킨 후 200 ml의 에테르로 2회 추출하여 비극성 물질을 제거하

였다. 물층은 물로 포화된 부탄올 200 ml을 가하여 3회 추출하였으며, 이로부터 얻어진 부탄올 분액을 모아 감압 건조한 잔사를 성분 분석 및 생리활성 측정을 위한 시료로 사용하였다.

5. 흑삼 중에 존재하는 Ginsenoside Rg₃의 성분 분석

1) 시료의 제조

흑삼 추출물에 존재하는 인삼사포닌의 성분을 분석하기 위하여 위에서 제조한 흑삼 추출물 20 mg을 메탄올 1 ml에 녹인 후 0.45 μm 필터로 여과한 여액을 HPLC 분석을 위한 시료로 사용하였다.

2) HPLC 분석 조건

사용한 HPLC 장치는 Shimadzu LC-6AD(Japan) 이었으며, 컬럼은 Shiseido(5 μm, 250×4.6 mm)를 사용하였다. 이동상으로 사용한 A 용매는 CH₃CN:H₂O:5%acetic acid=15:80:5, B 용매는 CH₃CN:H₂O=80:20 이었다. 용매는 gradient elution system으로 0분(0%B), 0-10분(30%B), 10-25분 (50%B), 25-40(100%B), 40-50분(100%B), 50-53분(0%B), 53-56분(0%B)으로 조절하였다. 전개온도는 실온이었고 유속은 0.3ml/min이었으며, 검출기는 ELSD-LT (Shimadzu, Japan)를 사용하여 Ginsenoside Rg₃를 분석하였다.

6. 세포배양

In vitro 細胞毒性 測定에는 MCF-1(human breast carcinoma cells line), HT-1080(Human human, Caucasian, fibrosarcoma cell line), Hepa 1C1C7(Murine Hepatoma cell line) 암세포를 使用하였는데 이들의 培養液은 모두 L-glutamine이 포함된 RPMI 1640 培地에 56℃ 水槽에서 30分間 加溫하여 不活性化시킨 fetal bovine serum(FBS)을 10% 包含하고 1% 抗生劑(penicillin-G 10만units/streptomycin 100 mg)와 NaHCO₃ 2 g을 添加하여 製造하였다.

7. MCF-1, HT-080, Hepa 1C1C7 癌株에 對한 細胞毒性 측정

Fosman이 개발한 방법인 MTT법¹¹⁾으로 세포독성을 측정 MCF-1(human breast carcinoma cells line), HT-1080(Human human, Caucasian, fibrosarcoma cell line), Hepa 1C1C7(Murine Hepatoma cell line) 를 10% FBS가 첨가된 RPMI1640으로 5% CO₂, 37℃ 배양기에서 배양하였다. 세포를 배양한 후 Trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 배양용기로부터 분리하고 1×10⁴ cells를 96well plate에 분주하고 24시간 배양한 후 약제를 농도별로 계대 희석하여 well당 100 μl씩 분주하였다. 이를 48시간 배양한 후 MTT(5 mg/ ml)10 μl씩 넣고 4시간동안 배양한 후 phosphate-buffered solution(PBS)로 세척하였다. 이 세척한 plate를 DMSO 100 μl를 넣고 상온에서 20분 방치한 후 ELISA 570 nm에서 흡광도를 측정하였고 약제를 처리하지 않은 대조군을 100%로 하여 사멸률을 계산하였다.

8. In vivo Tumor inhibition assay¹²⁾

Teruhiro의 방법으로 Lewis lung carcinoma cell을 마우스당 1×10⁶ cells/ml의 濃度가 되도록 細胞 浮游液을 만들고 이 浮游液

을 BDF1 마우스의 왼쪽 겨드랑이에 移植하였다. 移植 後 24時間 부터 各 群을 6마리로 配定하였다. 대조군은 생리식염수 0.2 ml을, 실험군은 흑삼 및 홍삼 추출물을 생리식염수에 현탁시킨 용액 0.2 ml을 20 mg/kg/day의 농도로 마우스 복강에 매일 1회 주사하였다. 시료는 대조군의 tumor volume이 약 2 cm³가 될 때까지 투여하였다(약 2주). 그 후 tumor 크기를 측정하여 다음의 계산식으로 tumor 면적을 구하여 inhibition of tumor volume를 측정하였다.

$$TV = \frac{L(cm) \times W^2(cm)}{2}$$

$$IRTV(\%) = \frac{\text{Mean of TV of control group} - \text{Mean of TV of treated group}}{\text{Mean TV of control group}} \times 100$$

TV : Tumor volume, L: Tumor length, W : Tumor width, IRTV : Inhibition ratio of tumor volume

9. 통계처리

실험결과는 unpaired student's T-test를 사용하여 통계처리를 하였으며, P<0.05, P<0.01 및 P<0.001 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 흑삼의 제조

금산에서 재배된 5년근의 인삼을 구증구폭의 원리에 따라서 특수제작된 옹기(Fig. 1)에 넣고 증숙과 건조를 반복하였다. Fig. 2에서와 같이 1차 증숙된 인삼은 전형적인 적갈색의 홍삼의 형태를 띠었으며, 2차 증숙을 거쳐 8차의 증숙 과정을 거치면 점점 색깔이 적갈색에서 흑색으로 변하는 것을 알 수 있었다. 마지막으로 9차 증숙과정을 거치면 완전히 외형이 흑색인 흑삼을 제조할 수 있었다.



Fig. 2. Photography of black ginseng. The raw ginseng was steamed for 3 hr. at 95℃ in pottery and dried for 12 to 36 hr. at 60℃ nine times.

2. 증숙 차수에 따른 인삼 추출물의 양

금산에서 생산되어 유통되는 5년근 수삼을 구입한 뒤 건조한 백삼과 증숙 차수에 따른 인삼 추출물의 양을 측정하였다. 증숙하지 않은 백삼 1 g으로부터 얻은 추출물의 양은 42.1 mg이었다. 이에 비해서 1차 증숙 후의 추출물의 양은 62.1 mg이었으며

증숙 횡수가 증가할 수록 추출물의 양이 증가되는 경향을 나타내었다. 특히, 마지막 9차 증숙된 흑삼의 경우 추출물의 양은 98.9 mg으로써 증숙하지 않은 백삼보다 2배 정도 증가되었다 (Table 1).

Table 1. The amount of extract in 1 g of dried ginseng

	백삼	1차	2차	3차	4차	5차	6차	7차	8차	9차
량량 (mg)	42.1	64.2	71.5	83.8	89.6	94.6	96.0	97.2	98.1	98.9

3. 증숙 차수에 따른 인삼의 Ginsenoside Rg₃ 양

Ginsenoside Rg₃는 최근에 항암 및 뇌기능 개선 효과등이 있다고 알려져 있어 많은 주목을 끌고 있다¹³⁻¹⁵⁾. 이에 착안하여 본 연구팀이 개발한 흑삼제조 과정 중 생성되는 여러 가지 사포닌 중에서 Ginsenoside Rg₃를 선정하여 그 함량을 측정하였다. 실험결과, 증숙하지 않은 백삼에는 Ginsenoside Rg₃가 존재하지 않았다. 이에 비해서 증숙 횡수에 따른 인삼 추출물의 양과 마찬가지로 1차 증숙된 인삼 1 g 중에는 0.22 mg이 존재하였으며 증숙 횡수가 증가할수록 Ginsenoside Rg₃의 양이 증가되는 경향을 나타내었다. 특히, 마지막 9차 증숙된 흑삼의 경우 추출물의 양은 10.05 mg으로써 1차 증숙된 인삼에 비해서 무려 45배 정도 증가되었다(Table 2).

Table 2. The amount of Ginsenoside Rg₃ in 1 g of dried ginseng

	백삼	1차	2차	3차	4차	5차	6차	7차	8차	9차
량량 (mg)	-	0.22	0.37	0.52	0.75	1.18	2.86	5.01	8.79	10.05

3. 암세포에 대한 in vitro 세포독성

9차 증숙하여 제조한 흑삼 추출물의 항암효과를 관찰하기 위하여 여러 가지 암세포에 대한 in vitro 세포독성을 측정하였다. 흑삼의 human breast carcinoma cells line인 MCF-1에 대한 IC₅₀ 값은 304.39±21.79 µg/ml이었으며, 홍삼의 IC₅₀ 값은 1,212.32±98 µg/ml로 나타났다. 즉, 흑삼의 세포독성이 홍삼에 비해서 3배 정도 강함을 알 수 있었다. Human fibrosarcoma cell line인 HT-1080에 대한 흑삼의 IC₅₀ 값은 293.82±35.42 µg/ml이었으며, 홍삼의 IC₅₀ 값은 1,715.8±67.43 µg/ml로 흑삼이 홍삼에 비해서 5배 정도 세포독성이 강하였다. 또한 murine hepatoma cell line인 Hepa 1C1C7 암세포에 대한 흑삼 및 홍삼의 IC₅₀ 값은 각각 327.3±48.07와 1,034.8±65.09 µg/ml로 나타났다. 즉, 흑삼의 세포독성이 홍삼에 비해서 3-5배 정도 강함을 알 수 있었다(Table 3).

Table 3. Cytotoxic Effect of extract of black and red ginseng on tumor cell lines

Group	IC ₅₀ (µg/ml)		
	MCF-1	HT-1080	Hepa 1C1C7
홍삼 추출물	1,212.32±98.45	1,715.8±67.43	1,034.8±65.09
흑삼 추출물	304.39±21.79	293.82±35.42	327.3±48.07
Adriamycin	0.11±0.05	0.11±0.03	0.35±0.08

a) Mean ± S.E. b) The cytotoxicity was determined as IC₅₀ (µg/ml) value in comparison with untreated control group. Adriamycin as a positive group was used.

4. In vivo 항암실험

흑삼 추출물의 항암효과를 관찰하기 위하여 BDF1 마우스에 Lewis lung carcinoma를 이식한 모델을 이용하여 흑삼의 항암효과를 측정하였다. Table 4에서와 같이 대조군의 tumor volume은 2,394.91±70.62 mm³인데 비해서 비교물질로 사용된 항암제인 taxol 투여군의 tumor volume은 1,481.75±37.16 mm³로서 38.9%의 항암효과를 나타내었다. 이에 비해서 흑삼 추출물 20 mg을 투여한 군의 tumor volume은 1,603.77±34.54 mm³로서 33.0%의 유의성 있는 항암효과를 나타내었다(P<0.01). 또한 홍삼 20 mg을 투여한 군의 tumor volume은 1,833.99±60.96 mm³로 23.3%의 유의성 있는 항암효과를 나타내었다(P<0.01). 즉, 흑삼의 항암효과는 비교물질로 사용한 기존의 항암제인 taxol에 비해서는 항암효과가 낮았지만, 홍삼에 비해서는 우수한 항암효과를 나타냄을 알 수 있었다 (Table 4).

Table 4. Antitumor activity of extract of black and red ginseng on BDF1 mice bearing Lewis lung carcinoma

Group	Concentration (mg/kg/day)	Tumor volume (mm ³)	% of inhibition
Control	-	2,394.91±70.62 ^a	-
흑삼 추출물	20	1,603.77±34.54**	33.0 ^b
홍삼 추출물	20	1,833.99±60.96*	23.3
Taxol	12.5	1,481.75±37.16**	38.9

^a Mean ± S.E. ^b The antitumor activity was determined as inhibition ratio(%) in comparison with untreated control group. Taxol (12.5 mg/kg/day) as a positive group was administered. *Statistically significant value compared with control data(***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05)

고찰

Well-Being 시대를 맞이하여 돈의 가치보다는 건강을 최우선 과제로 삼는 시대가 도래 했다. 최근 각종 성인병 발병의 주요 원인이 식생활에 있다는 것이 속속 밝혀지고 있고, 또한 의약품의 오남용에 따른 부작용이 널리 인식됨에 따라 건강 증진 내지 질병예방을 위한 접근방법의 하나로 기능성 식품에 대한 관심이 고조되고 있다. 인삼은 사회·문화적 측면에서 볼 때 우리 민족의 고유 유산이자 자원으로서 많은 농가가 인삼재배를 생계 수단으로 삼고 있으며 한국인의 대표 보양식으로 인식되어 있다.

그러나 한국 인삼 산업은 위기이다. 세계 인삼류 시장의 규모는 대략 35억불을 상회한다고 추정된다. 한국산 고려인삼은 가격이 비싸지만 상품의 품질이 가격에 미치지 못하여 한국산 고려인삼의 신규수요가 계속 감소하고 있는 추세이다. 한국산 고려인삼의 세계시장 점유율은 80년대 초 30-40% 수준이었으나 현재는 10%이하에 머물고 있다. 현재 국내 인삼 시장 개방은 최소시장접근 (MMA)이 허용된 인삼류는 20%의 저율관세로 수입이 가능하며, 95년 34톤 (국내 생산량의 0.3%)에서 2004년 56.8톤 (국내 생산량의 0.5%)까지 시장을 개방하였다. 국내 시장을 더욱 더 개방해야 하기 때문에 증저가 인삼 수입이 급증할 것으로 예상되므로 인삼을 경작하는 농민들에게 커다란 경제적 손실을 초래할 것이다.

따라서 선진국을 중심으로 부가가치가 높은 기능성 원료를 이용한 식품개발이 이루어지고 높은 증가율을 나타내고 있는 상

황이다. 따라서 최근 들어 인삼 내 특성 성분이나 기능을 강화한 이른바 ‘기능성 인삼’ 제품의 상품화가 서서히 이루어지고 있어 ‘인삼’이라는 이름 또한 상품의 특성을 나타내는 쪽으로 바뀌고 있는 추세이다. 즉, 최근 생명공학기술을 이용, 항암·면역력 강화 등 효능 및 효과를 극대화시킨 인삼제품들이 잇달아 출시돼 ‘프리미엄 인삼 시대’를 실감케 하고 있다.

이와 같은 맥락에서 본 연구팀은 새로운 고부가가치 신기능성 가공인삼을 개발하기 위하여 구증구폭의 원리를 이용하였다. 급산에서 재배된 5년근의 인삼을 구증구폭의 원리에 따라서 특수제작된 용기(Fig. 1)에 넣고 증숙과 건조를 반복하였다. 본 연구의 실험조건인 95℃에서의 증숙과 60℃의 건조과정을 반복한 결과 Fig. 2에서와 같이 1차 증숙된 인삼은 전형적인 적갈색의 홍삼의 형태를 띠었다. 또한 2차 증숙을 거쳐 4차의 증숙 과정을 거치면 점점 색깔이 진해지다가 5차 증숙된 인삼은 부분적으로 흑색을 나타내기 시작하였다. 이어서 6차부터 점점 흑색을 나타내기 시작하여 9차 증숙과정을 거치면 외형이 완전히 흑색을 띠는 전형적인 흑삼을 제조할 수 있었다.

한편, 백삼과 증숙 차수에 따른 인삼 추출물의 양을 측정할 때, 증숙하지 않은 백삼 1 g으로부터 얻은 추출물의 양은 42.1 mg이었다. 1차 증숙 후의 추출물의 양은 62.1 mg이었으며 증숙과정을 거칠수록 추출물의 양이 증가되는 양상을 보였다. 마지막 9차 증숙된 흑삼의 추출물은 98.9 mg으로써 증숙하지 않은 백삼보다 2배 정도 증가되었다(Table 1). 또한 인삼에 존재하는 여러 가지 사포닌 성분 중 최근에 함양 등 여러 가지 효과¹³⁻¹⁵⁾가 밝혀진 Ginsenoside Rg₃의 함량을 분석한 결과 백삼에는 존재하지 않았지만 1차 증숙한 인삼에서는 0.22 mg이 존재하였다. 또한 증숙 횟수에 따라서 Ginsenoside Rg₃의 양이 증가하는 경향을 나타냈으며 마지막 9차 증숙한 흑삼에는 무려 10.05 mg이나 존재하였다(Table 2). 이러한 이유는 백삼에 존재하는 사포닌의 aglycon에 결합되어 있는 sugar 부분이 증숙 과정 중에 열에 의해서 가수분해되기 때문이다.

이러한 Ginsenoside Rg₃가 다량 함유된 흑삼의 항암 효과를 검토하기 위하여 1차적으로 여러 가지 암세포에 대한 in vitro 세포독성을 측정한 결과, 실험에 사용한 MCF-1(human breast carcinoma cells line), HT-1080(Human human, Caucasian, fibrosarcoma cell line) 및 Hepa 1C1C7(Murine Hepatoma cell line) 암세포에 대해서 흑삼 추출물은 홍삼 추출물에 비해서 3-5 배정도 강한 세포독성을 나타내었다(Table 3). 또한 in vivo 실험에서 흑삼 추출물은 홍삼 추출물에 비해서 체중감소와 같은 부작용 없이 우수한 항암효과를 나타내었다(Table 4).

결 론

고부가가치 신기능성 가공인삼을 개발하여 항암효과 등을 측정하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

급산에서 구입한 5년근의 수삼을 특수 제작한 용기에서 95℃에서 증숙한 후 원적외열선이 내장된 건조기에서 60℃에서 건조하는 과정을 9회 반복하여 흑삼을 제조하였다. 건조 흑삼 1

g중에 백삼에는 존재하지 않고 홍삼에는 미량 존재하는 Ginsenoside Rg₃가 10.05 mg 함유되어 있었다. 또한 흑삼 추출물은 홍삼 추출물에 비해 in vitro 세포독성 실험에서 여러 가지 암세포에 대해서 강한 세포독성을 나타냈으며, in vivo 실험에서도 우수한 항암효과를 나타내었다.

이상의 결과로 보아 Ginsenoside Rg₃를 다량 함유하고 있는 흑삼은 새로운 가공인삼으로써 개발 가능성이 충분하다고 판단되며, 향후 항암효과뿐만 아니라 뇌기능 보호효과 등과 같은 다양한 생리활성에 대한 추가 실험이 필요하리라 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2005년 농림기술개발연구과제 현장적용기술개발(과제번호 105061-3)의 의해 수행되었는바 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 이시진, 본초강목, 중국의학대계 41책, 서울, 정담, pp 231-232, 1998.
2. 제4회 국제인삼심포지움, 1984.
3. 김기환, 정인성, 홍삼다당체의 항암면역증강작용 연구, Korea J. Ginseng Sci, 21(2):78-84, 1997.
4. 서성욱, 정철현, 소화기계암의 수술후 면역기능에 대한 고려 홍삼의 효과, Korea J. Ginseng Sci, 22(1):32-42, 1998.
5. Saito, H. et al. Proc. 2nd International Ginseng symposium, 109, 1978.
6. Okamura, N., Kobayashi, K., Akaike, A., Yagi, A. Protective effect of ginseng saponins against impaired brain growth in neonatal rats exposed to ethanol. Biol Pharm Bull, 17(2):270-274, 1994.
7. 오미숙, 백기주, 전성실, 김규원, 최강주, 김남득, 홍삼 사포닌에 의한 유선상피 및 유선암세포의 분화 유도 효과 연구, Korea J. Ginseng Sci, 24(4):188-195, 2000.
8. 이혜연, 이한수, 홍삼 추출물의 입과구 증식 및 활성 촉진효과, Korea J. Ginseng Sci, 22(1):60-65, 1998.
9. 최영득, 박진아, 최형기, 남기열, 토끼와 흰쥐 음경해면체 이완작용에 홍삼사포닌 분획별 효과, Korea J. Ginseng Sci, 23(1):13-20, 1999.
10. Keum, Y.S., Park, K.K., Lee, J.M., Chun, K.S., Park, J.H., Lee, S.K., Kwon, H., Surh, Y.J. Antioxidant and anti-tumor promoting activities of the methanol extract of heat-processed ginseng, Cancer Lett. 150(1):41-48, 2000.
11. Rubinstein, L.V., Paull, K.D., Shoemaker, R.H., Simmon, R.M., Skehan, P. and Boyd, M.R. Correlation of screening data generated with a tetrazolium assay (MTT) versus a protein assay (SRB) against a broad panel of human tumor cell lines, Proceedings of the American Association for Cancer Research, 30, p 2418, 1989.

12. Kim, Y., Kim, S.B., You, Y.J., Ahn, B.Z. Deoxypodophyllotoxin; the cytotoxic and antiangiogenic component from *Pulsatilla koreana*, *Planta Med.*, 68(3):271-274, 2003.
13. Kim, H.S., Lee, E.H., Ko, S.R., Choi, K.J., Park, J.H., Im, D.S. Effects of ginsenosides Rg3 and Rh2 on the proliferation of prostate cancer cells. 27(4):429-435, 2004.
14. Kim, J.H., Lee, J.H., Jeong, S.M., Lee, B.H., Yoon, I.S., Lee, J.H., Choi, S.H., Kim, D.H., Park, T.K., Kim, B.K., Nah, S.Y. Stereospecific effects of ginsenoside Rg₃ epimers on swine coronary artery contractions. 29(2):365-370, 2006.
15. Cha, H.Y., Park, J.H., Hong, J.T., Yoo, H.S., Song, S., Hwang, B.Y., Eun, J.S., Oh, K.W. Anxiolytic-like effects of ginsenosides on the elevated plus-maze model in mice. 28(9):1621-1625, 2005.