

산삼의 배양 및 그 응용에 관한 연구

신 미 희

한국화장품 기술개발연구소

요약

산삼은 고유의 생약으로 민간 또는 한방에서 효능을 인정받아 왔으나 산삼의 희귀성으로 인하여 산삼에 대한 연구가 활발하지 못하였다. 따라서 본 실험은 식물 조직 배양 기술을 이용하여 산삼 부정근을 대량으로 배양하고 추출하여 화장품 원료로서의 적용 가능성을 연구하였다.

본 실험에서 사용한 산삼 부정근은 강원도 평창에서 채취한 110년생 천종삼으로 산삼으로부터 유래된 캘러스에서 부정근을 유도한 후 절취하여 생물 배양기에서 액체 현탁액으로 대량 배양하였다. 약 5주간의 배양기간을 거쳐 증식된 산삼 부정근을 세척하여 건조시킨 후 추출하여 산삼 부정근 추출물을 얻었다.

산삼 부정근 추출물의 미백 효과 측정을 위하여 tyrosinase 억제 실험과 DOPA 자동산화 그리고 B-16 melanoma cell를 이용한 미백 실험을 실시하였고 유해성 검증을 위해서 안전성 실험과 세포 독성 실험을 실시하였다. *in vitro* 상의 유해성 실험은 transformed mouse fibroblast L929를 배양하여 NR assay, MTT assay를, *in vivo* 상의 안전성 실험은 인체 첩포를 이용한 Patch test를 실시하여 피부 반응의 관찰을 통해서 자극 혹은 알레르기성 반응의 발생여부를 실시한 결과 무해하였으며 melanin 생성 억제 실험 결과 미백효과가 우수한 것으로 나타났다.

I. 서론

일반적으로 산삼을 식물학적으로 분류하자면 오가피과, 현화식물, 피자식물에 속하여 기원은 거의 일억년전으로 추정되고 있다. 우리나라 산삼의 기원은 전라남도 모후산에서 최초로 발견된 것으로 전해 내려온다. 산삼은 그 자생조건이 매우 까다롭고 환경조건에 많은 영향을 받기 때문에 환경조건이 적절하지 않은 장소에서는 땅속에 묻힌 채로 오랜 세월을 보내다가 시간이 지나 그 씨앗의 발아조건이 조성되면 비로소 그 싹을 틔운다. 때문에 현재에도 산삼에 대한 분자 생물학적, 생리학적 자료들이 부재하고 고서를 토대로 한 효능과 약간의 형태학적 자료들만이 있을 뿐이다. 하지만 산삼의 효능은 그것을 직접 이용하는 사람들에 의해 오랜기간을 거쳐 입증되어 왔다.

삼의 종류는 많이 있지만 천연산삼은 그 모양새나 약효에 있어서 다른 삼과는 전혀 다른 모습과 약효를 지니고 있다. 또한 타 식물이 전혀 가지고 있지 않은 saponin 등 생리활성 물질을 다량함유하고 있어서 면역기능 향진, 암세포 성장억제, 항당뇨작용, 심장강화 및 혈압조절, 간기능 강화, 위장기능 강화, 강장효과, 뇌기능 강화, 노화억제, 허약체질 개선 등의 효능이 있으며 약리적인 효능이 매우 뛰어나 오랫동안 동양의 신비한 영약으로 알려져 왔다.

현재 미백에 대한 관심이 높아짐에 따라 화장품에 ascorbic acid, kojic acid, arbutin, hydroquinone, 유용성 감초산 추출물(licorice extract) 및 각종 식물 추출물(1) 등이 사용되어 왔다. 이들 중에서 kojic acid는 tyrosinase의 활성부위에 존재하는 구리이온을 킬레이트시켜 효소활동을 저해하는 작용(2)을 하는데, 성능이 좋은 반면 화장품에 배합시 안정성에 문제점이 있어 사용하는데 부적절하며, hydroquinone은 피부에 대한 자극성이 높아 안전성 문제로 인하여 현재 화장품에 사용하지 못하고 있다.

그밖에 천연물 특히 식물 중에서 미백 활성 성분을 찾기 위한 연구가 계속 이루어져왔고, 그 중 상백피, 감초, 작약, 계피, 고삼, 갈근, 당귀, 목단피, 반하, 알로에 등 다수의 식물 추출물(3, 4) 및 생약재 추출물 등이 tyrosinase 억제 활성이 있다는 사실은 밝혀졌으나, 이들 역시 안전성, 변색 가능성 등의 측면에서 화장품이나 의약품에 유효농도 이상으로 사용하는데는 많은 문제점을 갖고 있으며, 미백에 있어 그 효과가 명백하지 않다는 한계가 있었다.

따라서, 피부에 대한 자극이 거의 없으면서 미백 효과가 우수한 천연 원료에 대한 연구가 지속되어 왔다. 이에 본 연구는 종래의 미백 원료들이 가지고 있는 문제점을 해결하고 보다 미백 효과가 뛰어난 원료를 찾기 위하여 식물 조직배양으로부터 얻어진 산삼 부정

근을 그 대상으로 삼았다.

본 연구는 천연산삼의 부정근을 인공적으로 조직 배양하여 추출한 추출물의 화장품 원료로서의 이용 가능성을 조사하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 산삼부정근 배양 및 추출

1-1. 산삼부정근 배양

110년산 천종삼(강원도 평창에서 채취)의 식물체로부터 유기된 캘러스로부터 유도된 부정근을 발근에 적합한 성장 호르몬 IBA(Indolebutyric acid) 5.0mg/l(Duchefa), 5% scurose 가 함유한 Murashige & Skoog medium(Duchefa)에서 현탁 배양(Fig. 1) 하였다.

1-2. 산삼부정근 추출

건조시킨 조직배양 산삼 부정근 1kg에 70% 에탄올 30kg 및 1,3-butylenglycol 3kg을 넣어 혼합한다. 그 다음 충분히 숙성시킨 후 여과지(Toyoroshi Kaicha, Ltd. 5C, 185mm)로 여과시킨다. 60mmHg, 55℃~60℃에서 농축시킨 다음 다시 한번 여과시켜 추출물을 얻었다.

2. 멜라닌 생성 억제 실험

2-1. B-16 melanoma cell 내의 melanin 생성 억제 실험

산삼 부정근 추출물에 대하여 B-16 melanoma cell을 이용하여 미백효과를 측정하였다. B-16 melanoma cell을 10% FBS(GIBCO)가 함유된 DMEM(GIBCO)으로 6 well에 세포 수 2×10^4 cells/well의 농도로 각 well에 2ml씩 첨가하고 5% CO₂, 37℃ 조건하에서 24시간 배양하였다. Gordon(5)의 방법에 따라 실험하였으며 ELISA reader로 490nm에서 흡광도를 측정하여 melanin 저해율을 측정하였다. 또한 video microscope를 이용하여 사진촬영 후 미백 활성을 육안 판정하였다.

2-2. Tyrosinase inhibitory activity

Test tube에 0.1M phosphate buffer(pH6.5) 2.2ml와 1.5mM tyrosine solution 400 μ l 첨가한 후 농도별로 희석한 산삼 부정근 추출물을 200 μ l 넣는다. 여기에 2,000U/ml mushroom tyrosinase 200 μ l(6)을 첨가한다. ELISA reader를 이용하여 37℃에서 enzyme kinetic과 흡광도를 470nm에서 측정하였다.

2-3. Dopachrome의 autoxidation(9)에 의한 melanin 생성 억제 실험

135U/ml tyrosinase solution을 25℃에서 10분 동안 배양하고 0.03% DOPA solution(6)을 가하여 5분 동안 배양 후 여기에 시료를 PBS에 단계별로 희석시켜 더한 다음 60분동안 반응시킨다. 0.2ml HCl을 첨가하고 1200×g에서 15분동안 원심분리한다. 침전물을 6N HCl 1ml과 증류수로 행군 다음 soluene 350 2ml에 녹인다. spectrophotometer를 이용하여 400nm에서 흡광도를 측정하였다.

2-4. Trypan blue exclusion method를 이용한 cell viability

B-16 melanoma cell을 10% FBS가 함유된 DMEM배지로 12well plate에 3×10^4 cell/well이 되도록 분주한 후 5% CO₂, 37℃ incubator에서 2-3일 배양한다. 배양 후 배지를 제거하고 농도별로 희석한 시료를 첨가하고 5% CO₂, 37℃ incubator에서 24시간 배양한다. 배양 후 cell을 회수하여 1ml의 배지와 0.2ml의 0.4% Trypan blue(GIBCO)를 섞은 solution을 넣은 후 5분~15분 후에 hemocytometer를 이용하여 cell수를 측정하였다.

3. Cell cytotoxicity

3-1. NR assay

Mouse fibroblast L929를 2% BCS가 함유된 DMEM배지를 이용하여 96well plate에 3×10^3 cell/well이 되도록 분주한 후 Babich(7)의 방법에 따라 실험을 실시하였다. 색소를 추출하여 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 측정하여 세포 생존율(NR50)을 구하였다.

3-2. MTT assay

Mosmann(8)의 방법에 따라 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 측정하여 세포생존율(MTT50)을 구하였다.

4. 인체 첩포시험

8mm fin chamber(면적 50mm², 부피 20μl)에 필터 종이 디스크를 얹은 후 산삼 부정근 추출물(4%)을 마이크로피펫을 이용하여 0.015ml씩 채운 후 첩포 시험을 하였다. Micropore tape이 부착된 첩포(3cm×7cm의 면적)를 연구 참여자의 전박부에 24시간 동안 부착하고 24시간이 지난 후 첩포를 제거하였다. 약 60분간 안정을 취하도록 한 후 첫 판독을 시행하였고, 첩포 부착 후 48 시간이 경과한 후 2차 판독을 시행하였다. 판정 기준은 아래 기술되어 있는 Table 1 의 판정 기준을 이용하였다.

반응	가중치	판정의 기준
-	0	무반응
±	0.5	희미한 홍반
+	1	경계가 뚜렷하나 약한 홍반, 부종 및 구진
++	2	뚜렷한 홍반, 구진 및 수포
+++	3	대수포

Table 1. 판독을 위한 판정기준

칩포 부착 후 24시간과 48시간에 판독한 결과를 아래에 기술된 공식을 이용하여 각 시료에 대한 피부 반응도를 산출하였다. 칩포 부착 후 24시간과 48시간에서의 피부 반응도를 계산한 후 산술 평균하여 각 시료의 평균 피부 반응도를 계산하였다.

$$\text{피부반응도} = \frac{\sum(\text{Grade} \times \text{No. of responses})}{3(\text{Maximum grad}) \times 30(\text{No. of total subjects})} \times 100$$

위에 기술된 공식에 의해서 계산된 피부반응도를 미리 정한 아래에 기술된 Table 2의 판정기준에 준거하여 각 시료의 반응도를 판정하였다.

피부 평균 반응도	판정 기준
0.0 ~ 0.9	무자극
1.0 ~ 2.9	경자극
3.0 ~ 4.9	중자극
5.0 이상	강자극

Table 2. 계산된 피부 반응도에 따른 판정 기준

III. 결과

1. Melanin 생성 억제율

1-1. Cell내의 melanin 생성 억제율

산삼 부정근 추출물 및 인삼 추출물을 이용하여 B-16내의 melanin 생성 억제율을 측정된 결과 산삼 부정근 추출물 및 농축액은 다른 시료에 비하여 우수한 것으로 나타났다. 또한 인삼 농축액의 경우 0.05%농도에서 17%의 억제율을 보여 산삼 부정근 추출물과는 현저한 차이를 보여준다(Fig. 2).

Sample 명		처리농도(%)	Melanin 생성 억제율(%)
산삼추출물	산삼 부정근 추출물	0.50	86
		0.25	76
		0.10	61
	산삼 부정근 농축액	0.05	93
		0.025	76
		0.01	57
인삼추출물	인삼 추출물	5.0	57
		1.0	21
		0.5	13
	인삼 농축액	0.05	17
		0.025	12
		0.01	10
	인삼 부정근 농축액	0.01	19
		0.005	2
	Arbutin		1.00
0.50			78
0.10			58

Table 3. melanin 생성 억제율

1-2. Cell viability

B-16 melanoma cell을 이용하여 cell viability를 측정한 결과 melanin 억제 효과를 보인 농도에서의 cell viability는 시료를 처리하지 않은 것과 비슷한 수치를 나타내었다. Fig. 3에서 보이는 결과와 같이 산삼 부정근 추출물 1% 이하에서의 cell viability는 거의 100%로 나타났으며 농축액의 경우에도 역시 0.05%이하에서의 cell viability는 거의 100%를 나타내었다.

1-3. Tyrosinase inhibitory activity

Table 4에서 보는 바와 같이 산삼 부정근 추출물은 인삼 추출물과 비교해 높은 tyrosinase inhibition 효과를 나타내었다. 산삼 부정근 농축액은 1% 농도에서 45%의 inhibition rate를 보였으며 같은 농도에서 85%의 억제율을 보인 arbutin보다는 다소 적은 수치를 나타내었으나(table 4) 인삼 부정근과 인삼 추출물과 비교해 볼 때 월등히 높은 수치를 나타내었다.

Sample 명		처리농도(%)	Tyrosinase 억제율(%)
산삼추출물	산삼 부정근 추출물	1	35
		0.1	15
	산삼 부정근 농축액	1	45
		0.1	20
인삼추출물	인삼 추출물	10	8
		1	5
	인삼 농축액	10	12
		1	7
	인삼 부정근 농축액	10	9
		1	3
Arbutin		1	85
		0.1	70

Table 4. Tyrosinase inhibition rate

1-4. Dopachrome의 auto-oxidation에 의한 melanin생성 억제 실험

산삼 부정근과 그 농축액의 DOPA 자동산화 억제 실험 결과는 Table 5와 같다. 각 실험 물질의 농도가 증가함에 따라 억제율도 기하 급수적으로 증가하였으며 산삼 부정근 농축액 0.1% 농도에서는 68%로 arbutin과 비슷한 억제율을 보였다. 또한 인삼 농축액 1% 농도에서는 단지 7%정도의 억제율을 보였다.

Sample 명		처리농도(%)	Inhibition rate(%)
산삼추출물	산삼 부정근 추출물	1	61
		0.1	35
	산삼 부정근 농축액	1	95
		0.1	62
인삼추출물	인삼 추출물	10	8
		1	0
	인삼 농축액	10	25
		1	17
	인삼 부정근 농축액	10	15
		1	7
Arbutin		1	87
		0.1	70

Table 5. Dopachrome의 auto-oxidation에 의한 melanin 생성 억제

2. Cell cytotoxicity

L929를 이용하여 산삼 부정근 추출물에 대한 세포 독성 실험을 실시한 결과는 다음과 같다(Table 6). 현재 화장품에 일반적으로 사용하고 있는 미백 물질을 대조군으로 하여 산삼 부정근 추출물을 비교 실험한 결과 산삼 부정근 추출물의 NR50값은 1이상, MTT50값 역시 1이상으로 대조군인 kojic acid와 vitamin C, arbutin 보다 훨씬 좋은 결과를 얻었다.

세포 생존율(%)

Sample		NR50	MTT50
산삼 부정근 추출물		1 ↑	1 ↑
대 조 군	Arbutin	0.59	0.61
	Vitamin C	0.004	0.031
	Kojic acid	0.035	0.039

Table 6. Cytotoxicity test 결과

3. 인체 첩포 시험

피 시험자 30명의 전박부에서 시행한 첩포 시험의 검사 결과를 근거로 하여 피부 반응도를 계산해보면 다음 표와 같다.

시험 결과, 산삼 부정근 추출물(4%)에서는 알리지 반응이나 자극 반응이 전혀 관찰되지 않았으며 Table 7의 판정 기준에 의하여 무자극으로 판정하였다.

Sample	24 hrs				48 hrs				Reaction Grade(%)		
	±	+	++	+++	±	+	++	+++	24hrs	48hrs	Mean Score
산삼 부정근 추출물(4%)									0.00	0.00	0.00

Table 7. 피부 반응도

IV. 고찰

산삼 부정근의 미백 효과를 알아보기 위한 실험을 실행한 결과 melanin 생성 억제에 우수한 것으로 나타났다. 산삼 농축액은 대조군인 arbutin과 비교해 tyrosinase inhibition rate는 약간 떨어지나 Dopa auto-oxidation 저해 효과에서는 대조군과 비슷한 결과를 얻었다. 또한 B-16 melanoma cell내의 melanin 억제율을 측정된 결과, 대조군 보다 높은 수치를 보였다. 이러한 결과들로 미루어 볼 때 산삼근 추출물은 tyrosinase 뿐만 아니라

melanin을 생성하는 각각의 단계에 영향을 미치는 proteins family에 영향을 주어 hydroxylation이나 oxidation에 영향을 주는 것으로 보여진다.

melanin 생성을 억제하는 것은 독성에 의한 세포 사멸에 의한 것 일수도 있는데 cell viability을 실험한 결과 Fig. 2와 같이 시료처리를 하지 않은 것과 비교해 차이가 없었다. 또한 cytotoxicity test인 NR assay와 MTT assay에서도 세포 독성은 없는 것으로 보아 산삼 부정근 추출물의 melanin 억제 효과는 세포 사멸에 의한 것이 아닌 tyrosinase와 연관된 효소와 기타의 여러 가지 억제 작용에 의한 것이리라 생각된다.

산삼의 어떤 성분이 이런 미백 작용을 하는지에 관해서는 앞으로 더욱더 많은 실험과정을 거쳐야 할것으로 생각된다. 실험결과에서 볼 수 있듯이 산삼 부정근 추출물이 여타의 인삼 추출물이나 인삼 부정근 추출물에서 보여지는 결과보다 상당히 좋은 효과를 가진다는 것을 알 수 있다.

산삼 부정근은 위의 안전성 실험결과에서 나타난 것과 같이 기존에 쓰이고 있는 화학물질과는 달리 천연물질의 추출물로 인체에 유익하다고 생각된다. 앞으로 다른 효능, 효과 탐색 실험을 거쳐 미백이 아닌 다른 영역에서의 결과도 기대할 수 있으리라 생각된다. 피부에 대한 자극이 거의 없으면서 미백 효과가 우수한 천연 원료에 대한 이러한 조직배양으로부터 얻어진 산삼 부정근에 대한 연구는 경제적인 뿐 아니라 종래의 미백 원료들이 가지고 있는 문제점을 해결하고 보다 미백 효과가 뛰어난 원료로 그 개발 가능성이 높음을 보여준다.

아울러, 산삼 부정근 추출물이 각각의 어떤 단계에 영향을 미치는지에 대해 보다 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 참고문헌

1. Maeda K, and Fukuda M. J. Soc. Cosmet. Chem. 42, 1991, 361,
2. G. Prota, Cometic & Toiletries, 111(5), 1996, 43
3. T. Ikeda and T. Tsutsumi Fragrance J., 6, 1990, 59
4. T. Ikeda and T. Tsutsumi Fragrance J., 14, 1995, 174
5. H. Gordo, J. Invest Dermatol. 125, 1991, 797
6. Mason H. S., et al. Bilchem. Biophys. Act, 1965, 111
7. Babich, H. et al. Mol. Toxicity(1214)
8. Tim Mosmann. J. Immunol. Methods, 65, 1983, 55

9. Hearing, V. J. and Jimenez, M. Pigment cell Res. 2, 1989, 95
10. Hearing, V. J. and Jsukamoto, K., FASEB J., 5, 1991, 2902
11. P. Mason, et al., J. Biol. Chem. 172, 1948, 83
12. Jackson, I. J. A cDNA encoding tyrosinase-related protein maps to the brown locus in mous. Proc. Nat. Acad. Sci, 85, 1988, 4392
13. Prota, D., J. Invest. Dermatol, 75, 1980, 122

Abstract

Korea mountain ginseng known as oriental miracle drug is an important medicinal plant. The effect of mountain ginseng adventitious roots extract has been described. The valuable root of mountain ginseng contained several kinds of ginsenosides that have been confirmed to have many active functions for the human body. However, the study of mountain ginseng has a limit because the price of wild ginseng is very expensive and rare.

The mountain ginseng adventitious roots were derived from mountain ginseng callus that were induced from mountain ginseng roots. Adventitious roots were separated from callus and grown in solid media(Murachige and stoog media). It was cultured in a 20L bioreactor. After culturing for 40days, adventitious roots were harvested. Afterwards the harvested mountain ginseng adventitious roots were dried and extracted.

We examined the effect on melanogenesis of mountain ginseng adventitious roots extract. Here, we report the inhibitory effect of melanin biosynthesis on the adventitious roots extract of *In vitro* test. Also, we assessed the safety of adventitious roots extract. *In vitro*, cytotoxicity of adventitious roots extract was assessed in mouse fibroblast using two method: The neutral red uptake assay and the MTT assay. *In vivo*, the allergic and irritant were patch tested in 30 patients.

Consequently, extract of mountain ginseng adventitious roots have inhibitory effect on melanin biosynthesis in B-16 melanoma cell test, tyrosinase inhibitory test and DOPA auto-oxidation test. There were decreased 86%(0.5% concentration), 45%(1% concentration) and 61%(1% concentration), respectively

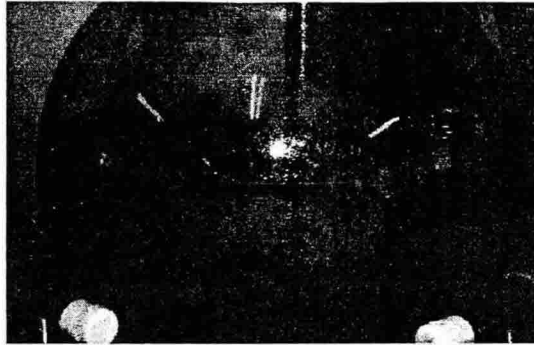


Figure 1. 켈러스에서 유도한 부정균을 절취하여 생물 배양기에 배양

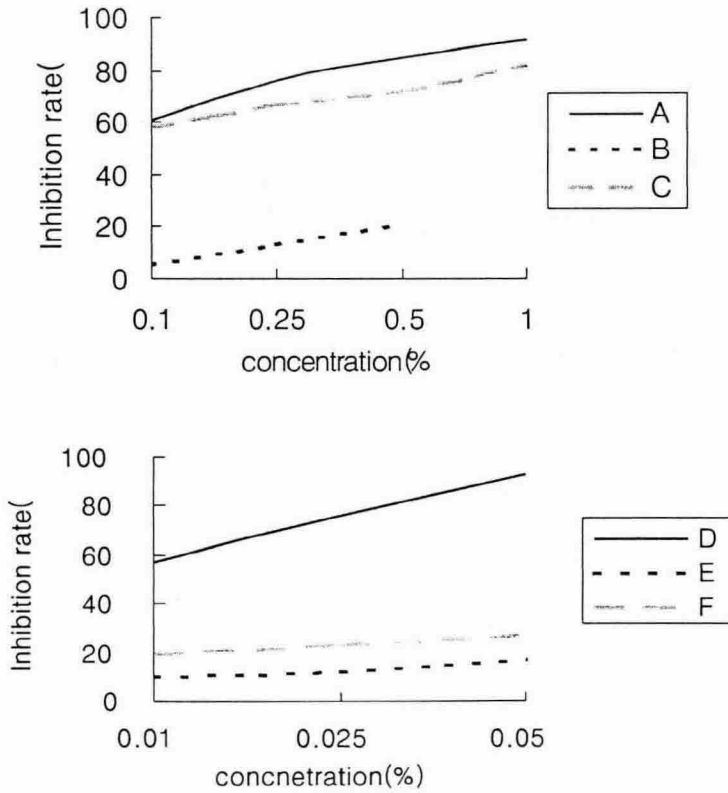


Figure 2. B-16 melanoma cell내 melanin 생성 억제 비교

A: 산삼 부정균 추출물

D: 산삼 부정균 농축액

B: 인삼 추출물

E: 인삼 농축액

C: arbutin

F: 인삼 부정균 농축

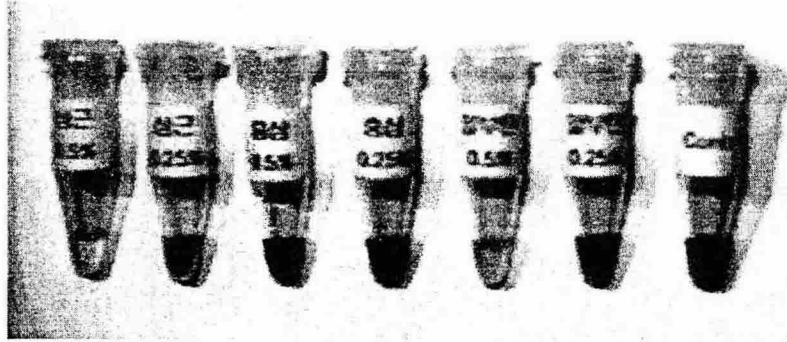


Figure 3. 회수된 B-16 melanoma cell을 video microscope를 이용하여 비교촬영

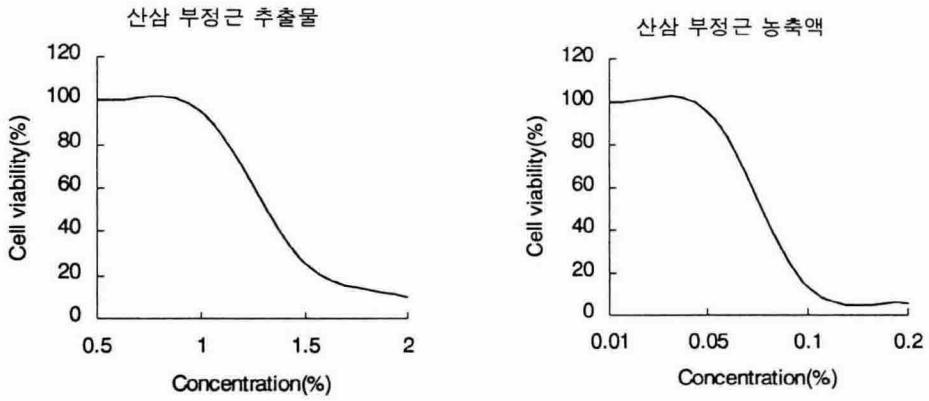


Figure 5. 시료 농도에 따른 cell viability