

효모를 이용한 유기게르마늄의 제조

송원종 · 이상철 · 오태광*

대지원(주) 중앙연구소, *한국과학기술연구원 유전공학연구소

Preparation of Organic Germanium by Yeast Cell

Won-Jong Song, Sang-Chul Lee and Tae-Kwang Oh*

Daijy Corp Central Institute, 678-20 Yoksam, Kangnam-gu, Seoul 135-080, Korea

*Genetic Engineering Research Institute, KIST, Taejon

Abstract — A process of organically bound germanium preparation was developed for healthy food using inorganic germanium adapted *Saccharomyces cerevisiae*. Adaptations of *Saccharomyces cerevisiae* against inorganic germanium were successively carried out through stepwise increase of GeO_2 concentration in order to produce high quantities of germanium bound yeast. Productivity of yeast and quantities of germanium in yeast were obtained 70.2 g/l and 9780 ppm, respectively, when adapted yeast and fed batch culture were used. Germanium taken-up yeast is to be organically bound germanium by evidence of no difference of germanium content after dialysis.

게르마늄의 의학적인 효능이 처음 발견된 것은 1930년 프랑스와 스페인의 국경지방인 Lourdes의 샘물이 여러가지 질병치료에 큰 효과가 있다는 보고서가 발표된 이후 계속된 샘물의 성분 분석결과 게르마늄의 함량이 매우 높다는 사실이 알려지면서부터이다. 그후 체내에 잔류하지 않고 약리작용을 할 수 있는 유기게르마늄에 대한 연구가 활발히 진행되어 인삼, 마늘, 영지, 명일엽 등과 같은 보양, 강장의 작용이 있는 약초에 비교적 많은 양의 유기게르마늄이 함유되어 있다는 것이 밝혀졌고, 유기게르마늄을 암, 간염, 류마치스 관절염, 피부질환, 노화 등과 같은 난치성 성인병 치료에 이용하려는 연구가 계속되고 있다.

지금까지 알려진 생체내에서 유기게르마늄의 역할은 세포내 산소공급 증진(1), 혈액의 정화(2), 체내 중금속의 체외 배출 촉진(3), NK세포와 macrophage의 활성화(4), 인터페론 분비 유도(5), cytotoxic T-lymphocyte의 생산 조절(6) 등이다. Marczynski(7)는 게르마늄이 DNA 내에서 자유전자의 전위와 방향성을 유지시켜주고, DNA의 electron conductivity와 hole conductivity를 조절하며, 이들 conductivity는 유전자 발현에 대한 정보의 ON/OFF에 참여한다고 주장하였다.

그 동안 고농도의 안전한 유기게르마늄을 식물체를 이용하지 않고, 미생물을 이용해서 짧은 시간에 대량 생산하려는 노력을 경주해 왔다. 이 결과, Nobuhiro(8) 등은 게르마늄을 함유하는 효모의 생산가능성을 제시하였고, Slawson(9) 등과 Hung(10) 등은 게르마늄이 미생물에 대해 독성을 보이지만 미생물의 균체내에 energy independent passive binding 또는 energy dependent mechanism 모두에 의해서 축적될 수 있음을 발표하였다. 미생물 cell 내의 유기게르마늄의 축적은 Klapcinska(11) 등이 *Pseudomonas putida* cell 내에서 게르마늄의 축적은 주로 soluble fraction에서 이루어지고, 이중 대다수가 nucleic acid와 proteins에 결합되어 있다는 것을 전자현미경 사진분석을 통해 확인하였다.

미생물균체를 이용하는 연구는 SCP(single-cell protein)용 효모를 중심으로 이루어졌고, 이 효모를 이용한 유기게르마늄 생산가능성은 VanDyke(12) 등이 배양액의 GeO_2 농도가 1.0 mg/ml에 이르렀을 때 *Saccharomyces cerevisiae*의 생장이 완전히 저해됨과 미생물이 고농도 GeO_2 에 적응할 수 있음을 보고하면서 시작되었다. Wei(13)는 효모가 고농도의 무기게르마늄을 흡수할 수 있으며 효모균체 내에 축적된 게르마늄의 95% 이상이 유기게르마늄임을 밝히고, 효모가 무기게르마늄을 유기게르마늄으로 전환하는 능력이 있음을 보고하였다. 또한 게르마늄을 함유한 효모가 Kehlbeck(14) 등의 실험결과에서와 같이 동

Key words: Organic germanium, yeast, adaptation, fed batch culture

*Corresponding author

물실험에서 항종양효과가 있을 뿐만 아니라, 동물의 건강에 유효하다는 것이 밝혀지면서 효모를 이용한 유기게르마늄의 생산은 점차 건강식품소재로 중요한 의미를 갖게 되었다.

따라서 본 연구에서는 효모를 이용하여 유기게르마늄을 생산하기 위해 효모배지의 혼양(adaptation), 발효방법 개선을 통하여 유기게르마늄효모의 게르마늄 함량과 생산량을 높이는 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 실험에서 균주는 *Saccharomyces cerevisiae* KC-TC 1199를 유전공학연구소로부터 분양받아 사용하였다. 배지는 YM Broth(Difco 사, 미국)를 사용하였다.

게르마늄 함유배지 적응효모균주의 선별

유기게르마늄의 함량이 높은 효모를 생산하기 위해서 고농도의 무기게르마늄이 함유된 배지에서 효모를 생육시키므로 무기게르마늄에 대한 효모의 혼양(adaptation) 실험을 하였다. 초기 0.5 mg/ml의 GeO_2 가 함유된 YM 배지(Difco 사, 미국)에 *Saccharomyces cerevisiae*를 접종하고 증식시킨 후, 이후 0.6 mg/ml의 GeO_2 가 함유된 배지로 옮기는 방법으로 GeO_2 의 배지 중 농도를 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg/ml로 점차 높이면서 효모를 28°C에서 150 rpm으로 24시간 동안 생육시켜서 무기게르마늄에 대한 내성이 높은 효모를 선별하였다.

무기게르마늄과 탄수화물의 유가배양이 효모생장에 미치는 영향

무기게르마늄에 대해서 적응이 된 효모와 적응이 되지 않은 효모를 250 ml 플라스크에 각각 100 ml 씩 배양하여 배양 9시간 후에 10 mg/ml GeO_2 1 ml와 0.2 g glucose를 유가배양한 경우와 그렇지 않은 경우를 균체생산량과 균체내 유기게르마늄 함량을 비교하여 측정해서 무기게르마늄, 탄수화물의 유가배양 시 효과를 측정하였다.

효모의 게르마늄함량 측정

게르마늄의 측정은 최원형(15) 등이 실험한 방법의 변형을 사용하여 정량하였다. 생산된 효모균체를 식염수로 3회, 증류수로 3회 세척하고 60°C에서 autolysis 한 후 20 kHz 고주파로 20분간 sonication 하여 효모균체를 완전히 파괴하였다. 이 분쇄액 1.0 ml을 취하여 6 N HCl 0.43 ml을 함유하는 ethanol 100 ml에

용해된 phenylfluorone 0.04% 용액과 착물을 형성시킨 후, 안정제로 arabic gum 2×10^{-3} %를, 흡광도 증폭을 위해 ammonium bromide 2×10^{-4} %를 첨가하고 20분간 방치한 후, chloroform과 ethanol의 3:2 혼합용매를 첨가하였다. 이상의 시료를 5분간 강하게 진탕한 후, 분리된 유기용매층을 석영셀에 옮기고 505 nm에서 흡광도를 측정하여 게르마늄의 농도로 환산하였다.

투석에 의한 유기게르마늄의 함량 결정

효모에 의해서 생산된 게르마늄이 유기게르마늄인지, 무기게르마늄인지 확인하기 위해서 무기게르마늄과 생산된 유기게르마늄효모를 각기 투석막으로 투석하여 투석되는지 여부에 따라 고분자인지, 저분자인지를 결정하였다. 본 연구에서 생산된 유기게르마늄 함유효모 1 g을 20 ml의 증류수에 녹인 시료와 무기게르마늄 시료로 0.01 M GeO_2 용액 20 ml을 각기 게르마늄 정량방법에 의해서 정량한 후 이들을 각기 투석막(분자량 투석범위: 10,000 Dalton)에 넣고 증류수를 이용하여 투석한다. 이때 시간별로 시료를 채취하여 투석막 내의 게르마늄 함량을 정량하였고, 무기게르마늄시료 용액의 게르마늄이 측정되지 않을 때 투석을 종료하였다.

결과 및 고찰

게르마늄함유 배지에서 효모균주의 혼양

게르마늄 농도 500 ppm을 첨가한 YM 배지에서 효모를 28°C, 150 rpm으로 24시간 동안 증식시킨 후, 게르마늄의 함량을 600~5,000 ppm까지 점차적으로 높여서 같은 조건으로 배양하는 방법으로 *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 1199를 혼양시켰다. 결과적으로 5,000 ppm의 게르마늄이 함유된 배지에서도 생육이 가능한 효모균주를 혼양하였고, 혼양된 정도에 따라

Table 1. Effect of germanium concentration on germanium accumulation of *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 1199

Concentration of GeO_2 (ppm)	Germanium accumulated in yeast cell ($\mu g/g$)*
1,000	280
2,000	320
3,000	503
4,000	890
5,000	1,083

*Dry weight base

Table 2. Effect of germanium adaptation and germanium addition method on yeast productivity and germanium accumulation of yeast cell

GeO ₂ adaptation	Method of addition	Amount of yeast produced (g/l)*	Accumulation of GeO ₂ in yeast cell (µg/g)*
Adapted yeast	not added	58.5	0.98
	add at start	53.1	1,083
	add at logarithmic phase**	39.3	2,154
	add at logarithmic phase with 6% glc.	70.2	9,780
Non-adapted yeast	not added	61.8	0
	add at start	52.2	415
	add at logarithmic phase	33.6	624
	add at logarithmic phase with 6% glc.	46.5	821

*Dry weight base, **logarithmic phase: After 8 hours fermentation.

효모 내로 유입되는 게르마늄의 양을 정량한 결과 Table 1에서와 같이 혼양정도가 높을 수록 효모 내에 유입되는 게르마늄의 농도가 높았고, 최고 5,000 ppm에서 혼양된 효모의 세포내 게르마늄 유입량은 1,083 µg/g으로 나타났다. 이와같은 결과로 혼양시 게르마늄에 대한 내성이 증가할 뿐만 아니라 게르마늄 유입능력도 좋아짐을 알 수 있다. 따라서 게르마늄 함량이 높은 효모를 생산하기 위해서는 고농도 게르마늄에 혼양된 효모를 사용하는 것이 좋은 생산량을 가졌다.

게르마늄 및 glucose의 유가배양 효과

고농도로 조성된 선정배지에 게르마늄에 혼양된 효모와 혼양되지 않은 효모를 이용하여 게르마늄을 첨가하지 않은 경우, 발효초기에 첨가한 경우, 효모의 생육대수기에 첨가한 경우, 효모의 생육대수기에 6% glucose와 동시에 첨가한 경우로 나누어서 효모생산량과 게르마늄 함량을 조사한 결과는 Table 2와 같이 나타났다. 게르마늄에 혼양된 효모가 그렇지 않은 효모에 비해서 세포내 게르마늄의 농도가 높게 나타났고, 효모의 생육대수기에 glucose와 게르마늄을 동시에 첨가하였을 때가 게르마늄의 세포내 유입이 가장 큰 것으로 나타났다. 혼양된 효모를 사용해서 생육대수기에 게르마늄과 glucose를 동시에 첨가하였을 때, 건조중량으로 70.2 g/l(배지)의 효모생산량과 9,780 µg/g(효모)의 게르마늄 함량을 얻을 수 있었다.

투석에 의한 효모세포내 유기게르마늄 함량 측정

효모균체에 축적된 게르마늄이 유기태인지 무기태인지의 여부를 알기 위해 생산된 효모를 autolysis 한 후, 투석막을 이용해서 투석을 실시하였다. 투석한

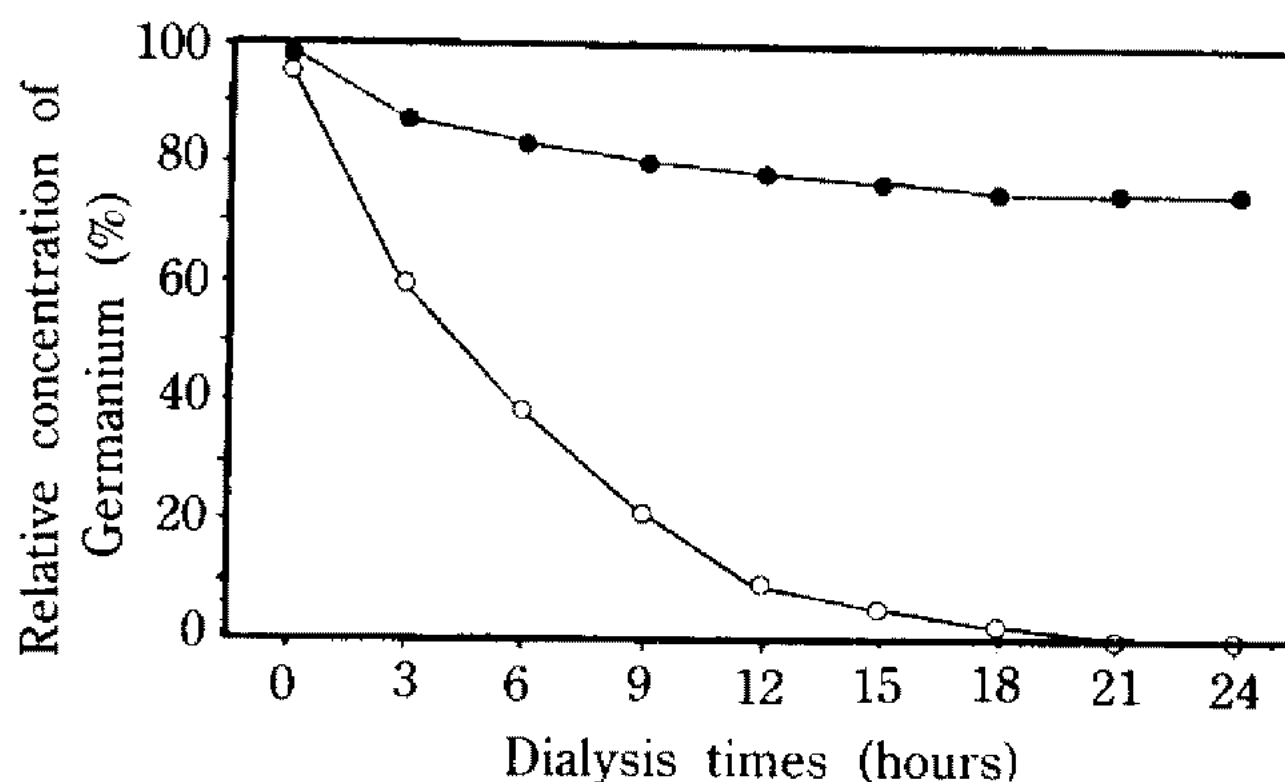


Fig. 1. Change of germanium concentration of organic germanium yeast and GeO₂ during dialysis against distilled water.

-●-: organic germanium, -○-: GeO₂

결과는 Fig. 1에 나타난 바와 같이 GeO₂는 투석 21 시간 후에 완전히 투과되는 반면, 효모에서 생산된 유기게르마늄은 76%가 투석막을 통과하지 못하는 것으로 보아 효모에서 생산된 게르마늄은 고분자의 단백질 핵산 등에 chelate 된 유기태로 존재할 것으로 추정된다. 또한 본 연구에서 사용한 투석막의 분자량 투석범위가 10,000 dalton이므로 저분자 peptide 등에 결합된 게르마늄은 투석막을 투과한 것으로 추정되어 유기태 게르마늄의 함량은 이보다 높은 비율로 존재 하리라 생각된다.

유기게르마늄은 안전하고 약리효과가 탁월하지만, 무기게르마늄은 신장 및 간장의 기능장애를 일으킨다고 보고되고 있다(16). Sanai(17) 등은 무기게르마늄과 유기게르마늄을 비교실험하여 유기게르마늄의 안전성을 보고한 바 있으나, 화학합성 유기게르마늄의 위험성이 보고되면서 유기게르마늄의 안전에 관한 논쟁이 지금도 계속되고 있다(18). 그러므로 안전성과

유효성이 뛰어난 천연유기게르마늄의 중요성이 강조되고 있으며, Jao(19) 등은 천연유기게르마늄이 무기게르마늄 및 합성유기게르마늄보다 뛰어난 항암효과를 보인다고 발표하였다.

효모를 이용하여 유기게르마늄을 생합성하는 과정은 가장 안전하고 효과적인 유기게르마늄 생산방법이다. 본 실험에서 생산된 유기게르마늄함유 효모를 급성경구독성시험을 수행한 결과(미발표 결과) kg 당 5,000 mg의 유기게르마늄함유 효모를 경구투여하였으나 아무런 독성이 없어서 LD₅₀을 구할 수가 없었다.

본 유기게르마늄함유 효모는 각종 암, 성인병의 예방 및 치료, 인체면역력의 증강 등 건강증진에 크게 기여하는 치료제 및 건강보조식품으로의 활용이 기대되며, 이에 대한 더 많은 연구가 요구된다.

참고문헌

1. Levine S.A. and P.M. Kidd. 1986. Oxygen-nutrition for super health. *J. Orthomol. Medicine*. **1**: 145-148.
2. Sandra G. 1988. Therapeutic effects of organic germanium. *Med. Hypotheses*. **26**: 207-215.
3. Asai K. 1980. *Miracle Cure: Organic Germanium*. Japan Publications Inc.
4. Aso H., F. Suzuki, T. Yamaguchi, and Y. Hayashi. 1985. Induction of interferon and activation of NK cells and macrophages in mice by oral administration of Ge-132, an organic germanium compound. *Microbiol. Immunol.* **29**: 65-74.
5. Aso H., F. Suzuki, T. Yamaguchi, and Y. Hayashi. 1982. Induction of interferon and activation of NK cells and macrophages in mice by oral administration of Ge-132, an organic germanium compound. *Gantokagakuryoho*. **9**: 1976-1980.
6. Kobayashi H., H. Aso, N. Ishida, and F. Suzuki. 1992. Preventive effect of a synthetic immunomodulator, 2-carboxyethylgermanium sesquioxide, on the generation of suppressor macrophages in mice immunized with allogenic lymphocytes. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **14**: 841-864.
7. Marczynski B. 1988. Carcinogenesis as the result of the deficiency of some essential trace elements. *Med. Hypotheses*. **26**: 239-249.
8. Nobohiro W., I. Osamu, K. Takuro, and Y. Koichi. 1980. New approaches to using spent brewer's yeast. *ASBC Journal*. **38**: 5-8.
9. Slawson R.M., M.I. VanDyke, H. Lee, and J.T. Travers. 1992. Germanium and silver resistance, accumulation, and toxicity in microorganisms. *Plasmid*. **27**: 72-79.
10. Lee H., J.T. Travers, and M.I. VanDyke. 1990. Microbial interactions with germanium. *Biotechnol. Adv.* **8**: 539-546.
11. Klapcinska B. and J. Chmielowski. 1986. Binding of germanium to *Pseudomonas putida* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 1144-1147.
12. VanDyke M.I., H. Lee, and J.T. Travers. 1989. Germanium toxicity in selected bacterial and yeast strains. *J. Ind. Microbiol.* **4**: 299-306.
13. Wei X.S. 1992. Effect of yeast on bioenrichment of germanium. *Food Science*. **149**: 49-54.
14. Kehlbeck H. 1983. New germanium containing yeast for medicinal and veterinary use. *Deutsch Patent* DE3345211.
15. 최원형, 아진식, 김재수, 김도훈. 1992. Linear sweep voltametry와 UV-Vis spectrophotometry를 이용한 게르마늄분석. *Analytical Science and Technology*. **5**: 7-15.
16. Sanai T., N. Oochi, and S. Okuda. 1990. Subacute nephrotoxicity of germanium dioxide in the experimental animal. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **103**: 345-353.
17. Sanai T., S. Okuda, and K. Onoyama. 1991. Chronic tubulointerstitial changes induced by germanium dioxide in comparison with carboxyethylgermanium sesquioxide. *Kidney. Int.* **40**: 882-890.
18. Schauss A.G. 1991. Nephrotoxicity and neurotoxicity in humans from organogermanium compounds and germanium dioxide. *Biol. Trace Elem. Res.* **29**: 267-280.
19. Jao S.W., W. Lee, and Y.S. Ho. 1990. Effect of germanium on 1,2-dimethylhydrazin induced intestinal cancer in rats. *Dis. Colon Rectum*. **33**: 99-104.

(Received 18 October 1994)