

동충하초를 이용한 유기게르마늄의 생산

김승 · 김재성 · Kumar Sapkota · 최봉석 · 박세은 · 박열 · 전홍성 · 유진철¹ · 최한석² · 김명곤³ · 김성준*

조선대학교 생명공학과 BK21 단백질활성제어 인력양성사업팀, ¹조선대학교 약학과,
²전북대학교 식품공학과, ³익산대학 특용작물가공과

Biosynthesis of Organic Germanium Using *Cordyceps militaris*

Seung Kim, Jae-Sung Kim, Kumar Sapkota, Bong-Suk Choi, Se-Eun Park, Yeal Park,
Hong-Sung Chun, Jin-Cheol Yoo¹, Han-Seok Choi², Myung-Kon Kim³ and Sung-Jun Kim*

Department of Biotechnology, BK21 Research Team for Protein Activity Control and
¹Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

²Department of Food Science and Technology, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

³Department of Industrial Crop Production and Processing, Iksan National College, Iksan 570-752, Korea

(Received September 27, 2006)

ABSTRACT: In the present study, an attempt has been made to produce a high quality medicinal mushroom *Cordyceps militaris* supplemented with organic Ge. *Cordyceps militaris* was cultivated in SDAY liquid medium containing yeast extract 10 g, peptone 10 g, glucose 40 g per liter and chrysalis media supplemented with inorganic Ge at 100, 500, 1000, and 5000 ppm concentrations. The greatest organic Ge production of 442.4 ppm/g and 284 ppm/g were observed in SDAY liquid and Chrysalis media cultures supplemented with 100 ppm inorganic Ge respectively. Similarly, 4,509.7 ppm/g and 1,058 ppm/g of organic Ge were obtained from liquid and chrysalis media cultures supplemented with 5,000 ppm and 1,000 ppm inorganic Ge, respectively. In addition, higher concentration of organic Ge was obtained in mycelia than fruiting bodies. These results indicate that the concentration of organic Ge increase with decreasing inorganic Ge concentration in the medium. This is the first report on production of high valuable *Cordyceps militaris* contained with organic Ge.

KEYWORDS: Adaptation, *Cordyceps militaris*, Inorganic germanium, Organic germanium

동충하초는 살아있는 곤충에 침입하여 이를 기주로 자실체를 형성하거나 충체위에 포자과를 형성하는 곤충기생균으로, AD 800년경 Fungus-born wasp로 서양문화에 최초로 기록되었다(Kobayashi and Shimazu, 1983). 동충하초는 거의 모든 곤충균의 전 생육단계에 걸쳐 기주의 외피(cuticle)를 통하여 침입하며, 균사는 충체 내의 모든 기관이 소비될 때까지 생장을 지속한 후 단단하게 응축된 내생균핵(endosclerotium)을 형성한다. 이러한 동충하초는 전세계적으로 널리 분포되어 있으며, 현재 약 100속 750여종이 알려지고 있다(Arora *et al.*, 1991). 특히 동충하초속균의 유용성분의 이용측면에서 균사 배양물이나 자실체의 추출성분의 약리효과가 많이 알려져 있으며, 이중 번데기 동충하초가 생산하는 Cordycepin(3'-deoxyadenosin)은 RNA 합성을 저해함으로써 탈피호르몬인 ecdysone을 억제하여 용화를 저지하고, 또한 항세균, 항암효과를 가지는 것으로(Iwashima *et al.*, 1992; Hung *et al.*, 1996) 보고되고 있으며, Furuya *et al.*(1983)은 *Cordyceps*속과 *Isaria*속

의 배양균사체로부터 Ca²⁺ 길항작용과 근육수축 작용제의 기능을 갖는 N⁶-(2-Hydroxyethyl)adenosine과 cordycepin, adenosine을 추출하여 보고하기도 하였다. 이외에 번데기 동충하초는 항진균, 면역기능의 증강제, 마약중독의 해독제 등의 다양한 생리활성(Ying *et al.*, 1987)을 가지고 있으며, 건강식품소재로서 널리 이용되어지고 있다.

게르마늄의 의학적인 효능이 처음 발견된 것은 1930년 프랑스와 스페인의 국경지방인 Lourdes의 샘물이 여러 가지 질병치료에 큰 효과가 있다는 보고서가 발표된 이후 계속된 샘물의 성분분석 결과 게르마늄의 함량이 매우 높다는 사실이 알려지면서부터이다. 그 후 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, 피부질환, 노화 등과 같은 난치성 성인병 치료에 이용하려는 연구가 계속되고 있다(한국과학기술원, 1995).

특히, 유기게르마늄은 생체내에서 세포내 산소공급 증

*Corresponding author <E-mail: sjbkim@mail.chosun.ac.kr>

진(Levine and Kidd, 1986) 이외에 혈액의 정화(Sandra, 1988), 체내중금속의 체외 배출 촉진(Asai, 1980), NK 세포와 macrophage의 활성화(Aso *et al.*, 1985), 인터페론 분비 유도(Aso *et al.*, 1982), cytotoxic T-lymphocyte의 생산조절(Kobayashi *et al.*, 1992) 등의 다양한 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 많은 연구자들이 미생물을 이용해 유기게르마늄을 짧은 시간에 대량 생산하려는 노력을 계속해왔으며 이러한 결과 Nobuhiro *et al.*(1980)은 게르마늄을 함유하는 효모의 생산가능성을 제시하였고, Slawson *et al.*(1992)과 Lee *et al.*(1990)은 게르마늄이 미생물에 대해 독성을 보이지만 미생물의 균체내에 energy independent passive binding 또는 energy dependent mechanism에 의해서 축적될 수 있음을 보고하였다. Klapcinska and Chmielowski(1986)는 유기게르마늄의 축적이 *Pseudomonas putida* cell 내에서 핵산과 단백질에 결합되어 있다는 것을 전자현미경 사진 분석을 통해 확인하였다. 미생물균체를 이용하는 연구는 SCP(single-cell protein)용 효모를 중심으로 이루어졌고, 이 효모를 이용한 유기게르마늄 생산 가능성은 Van Dyke(1989) 등이 배양액의 GeO_2 농도가 1.0 mg/ml 에 이르렀을 때 *Saccharomyces cerevisiae*의 생장이 완전히 저해됨과 미생물이 고농도 GeO_2 에 적응할 수 있음을 보고하면서 시작되었다. 따라서 본 연구에서는 약리적 활성을 가진 유기게르마늄을 생산하기 위하여 균체회수량이 높고 생존력이 강한 동충하초를 무기게르마늄이 첨가된 배지에서 배양하여 게르마늄 생산 여부를 확인하였으며, 또한 자실체 배양을 통한 게르마늄 동충하초 생산을 실시하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 실험에 사용된 매미동충하초(*Cordyceps militaris*) 균주는 국립약산대학 특용작물가공과 균이학 실험실에서 분양받아 사용하였다. 또한 균주배양에 사용한 배지는 SDAY 배지(yeast extract 10 g, peptone 10 g, glucose 40 g/l)를 사용하였다.

게르마늄 무첨가 배지 및 첨가 배지에서의 동충하초 배양

동충하초의 균체량 및 성장 곡선을 알아보기 위하여 게르마늄이 첨가되지 않은 SDAY 배지에서 25°C , 170 rpm의 조건으로 배양을 실시하였다. 또한 유기게르마늄을 생산하기 위해서 저농도의 무기게르마늄이 함유된 배지에서 동충하초를 적응시킨 후 점차 고농도의 무기게르마늄을 함유한 배지로 바뀌가면서 게르마늄 적응 실험을 실시하였다. 매미동충하초를 20 ppm의 무기게르마늄이 함유된 액체배지에 무균적으로 접종하여 게르마늄에 대한 적응력을 갖게 한 다음, 100 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm, 5,000

ppm 농도의 고농도 배지에 2% 농도로 접종하고 25°C 에서 170 rpm으로 약 21일간 배양하여 균사체내에 고농도의 게르마늄을 함유할 수 있도록 유도하였다.

균체량 분석

균체농도는 건조중량(Dry Cell Weight, DCW)을 기준으로 측정하였으며, 건조균체량은 동충하초 배양액을 filter paper(Whatman No. 4)를 사용하여 증류수로 3회 세척하여 감압여과한 후 80°C 에서 항량이 될 때까지 건조하여 측정하였다.

번데기배지 배양에 의한 균사체 및 자실체 생산

매미동충하초를 20 ppm의 게르마늄이 첨가된 SDAY 배지에 접종하여 5일간 배양한 후 액체균사체를 형성시켜 100 ppm 게르마늄용액($10 \text{ ml}/100 \text{ g}$)을 넣은 번데기배지에 5 ml 접종하여 동충하초 배양을 실시하였다.

동충하초의 게르마늄함량 측정

동충하초의 게르마늄 함량 측정은 Van dyke(1989)의 실험방법을 변형하여(Slawson *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1990) 실행하였으며, 액체배양에서 얻어진 균사체와 번데기 배지에서 수확된 균체를 시료로 사용하였는데 번데기 배지에서 획득된 균체는 균사체 부분과 자실체 부분으로 분리하여 실험을 수행하였다. 모든 시료는 75°C 에서 12시간 열풍건조한 후 사용하였으며, 액체배양에서 얻어진 동충하초 균사체 및 번데기 배지에서 생산된 균사체는 생리 식염수로 1회, 3차 증류수로 3회 세척 후 건조를 행하였다. 건조된 시료는 질산으로 분해하여 0~5 ppm 농도로 희석하여 준비하였다. 여기에서 보여진 농도범위는 시료 내의 게르마늄 예상치 농도로서 농도가 5 ppm 이상이 되면 기준값에서 벗어나게 되어 standard curve(5,000 ppm germanium standard solution-Aldrich)의 최대값이 5 ppm인 데이터 오차 범위가 커지게 된다. 그리고 5 ml cap tube에 phenylfluorone 용액 1 ml과 cyclohexanol 1 ml을 첨가하고 교반한 후 준비한 시료 1 ml을 가하여 충분히 섞어 주었다. 이후 30°C 에서 30분간 방치 후 525 nm에서 흡광도를 측정하여 총 게르마늄의 함량을 산출하였다.

결과 및 고찰

액체배양에 의한 게르마늄 동충하초 생산

게르마늄 무첨가 배지 및 게르마늄 첨가 배지에서 동충하초를 배양한 결과 Fig. 1과 같은 결과를 얻을 수 있었다. 3일째 대수 증식기에 접어들어 6일째 되는 시점까지 높은 성장곡선을 나타내었으며 6일째 이후로는 급격한 변화 없이 성장함을 확인하였다. 또한 게르마늄이 첨가된 배지에서의 배양결과 첨가된 게르마늄의 증가에 따라 균체 증식 속도의 둔화 및 생산량의 감소를 초래하였으나 500 ppm

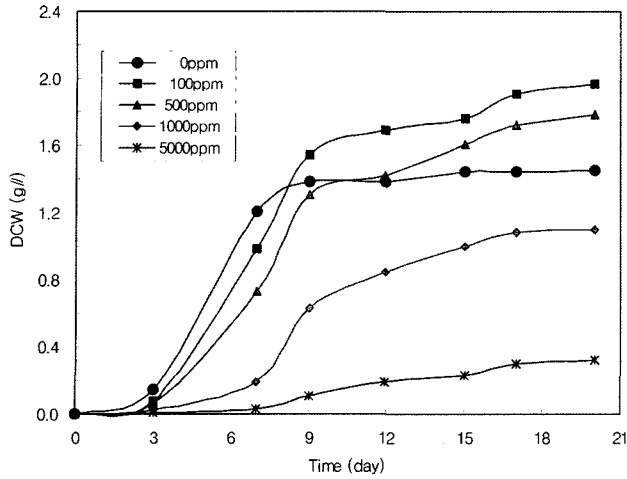


Fig. 1. Effect of germanium dioxide (GeO₂) concentration on the cell growth.

이하의 농도에서는 게르마늄이 첨가되지 않은 배지에 비해 오히려 높은 균사체 생산성을 보여 낮은 농도의 게르마늄은 동충하초 배양의 영양물질로 작용하는 것으로 추정된다. 그러나 모든 농도의 처리구에서 배양 3일까지의 유도기간 중 균사체성장이 무첨가 배지의 유도기간 중 성장보다 낮았는데 이는 게르마늄첨가에 따른 초기 적응단계가 길어지기 때문으로 추정된다.

각각의 균사체를 회수하여 게르마늄 양을 정량한 결과, 효모배양에서 Wei(1992)가 효모균체내에 축적된 게르마늄의 95% 이상이 유기게르마늄으로 전환된다는 보고처럼 Table 1과 같은 결과를 얻을 수 있었다. 100, 500, 1000 ppm의 농도에서 생산된 유기게르마늄의 생산량은 배양액에 첨가해준 무기게르마늄의 농도에 비해 높게 나타났는데 이것은 동충하초가 성장하면서 무기게르마늄을 이용하고자 당, 산, 단백질 등의 유기물들을 결합시켜 그 질량이 증가하기 때문으로 사료된다. 그러나 5,000 ppm의 농도에서는 첨가해준 게르마늄에 비해 생산된 유기게르마늄은 조금 낮게 생산됨을 확인할 수 있었다. 이것은 게르마늄의 농도가 높아 동충하초가 전부 영양물질로 이용하지 못한 것으로 생각되며 배양 기간을 조정하면 첨가해준 게르마늄을 전부 유기화시킬 수 있을 것으로 추정된다. 또한, Table 1에서 보는 바와 같이 첨가해준 게르마늄에 양에 대해 생산되는 유기게르마늄의 양은 첨가한 게르마늄의 농도가 높아질수록 유기게르마늄의 생산량이 높아짐을 확

Table 1. Effect of germanium concentration on germanium accumulation of *Cordyceps militaris*

Concentration of GeO ₂ (ppm)[A]	Germanium accumulated in <i>Cordyceps militaris</i> (ppm/g)[B]	Converting ratio
0	0	0
100	442.4 ± 26.9*	4.42
500	853.6 ± 31.3*	1.71
1,000	1,404.2 ± 46.7*	1.40
5,000	4,509.7 ± 106.8*	0.90

Converting ratio was calculated with accumulation[B]/initial concentration[A].

All data represent means ± SD.

“*” means significantly different by paired Duncan’s test at p < 0.05.

인할 수 있었으나, 첨가해준 게르마늄 대비 100 ppm이었을 때 변환율이 4.42배로 가장 높음을 확인할 수 있었다. 추후 대량생산 시 배양기간 및 게르마늄 구입가격에 따른 생산제조 원가와 균사체 생산수를 측면까지 고려한다면 유기게르마늄을 생산하기 위한 무기게르마늄의 적정 첨가 농도는 100 ppm 적정할 것으로 판단된다.

고체배양에 의한 게르마늄 함유 동충하초 생산

적량의 균사체가 들어있는 소량의 액체배지를 100 ppm의 무기게르마늄 용액 10 ml을 첨가한 번데기고체배지에 접종하여 25°C에서 5일간 배양하여 번데기에 하얀색의 균사체가 전체적으로 퍼졌을 때, 배양온도를 18°C로 낮춰 영양생장에서 생식성장 조건으로 바꿔주어 동충하초의 자실체가 형성되도록 하였다. 약 60일간 배양하여 오렌지색의 자실체가 형성됐을 때 하단의 번데기균사체 부분과 상단의 자실체 부분을 따로 분리하여 각각의 게르마늄 함유량을 측정하였으며 그 결과를 Table 2에 나타내었다. 배양초기 번데기 배지에 무기게르마늄을 첨가만으로도 자실체의 유기게르마늄이 검출되었으나 그 함량은 균사체 부분의 함량보다 낮게 나타났다. 또한, 액체배지에서와 마찬가지로 배양초기 첨가량에 의존적으로 유기게르마늄양이 증가 되어졌으며, 100 ppm 농도로 첨가하였을 시 가장 높은 변환율을 나타내었다. 또한, 균사체와 자실체의 변환율을 합한 결과는 액체배지에서의 변환율과 비슷하게 나타나는 것으로 볼 때 균사체에 의해 배지 내의 무기게르마늄이 유기게르마늄으로 변환되어지고 이후 균사체 내의 축적된 일부가 자실체로 이행되었을 것으로 추정되나 이에 관한 추가적인 연구로써 배양 기간별 균사체와 자실체

Table 2. Organic germanium contents of *Cordyceps militaris* mycelium and fruiting body cultured in solid medium

Concentration of GeO ₂ (ppm)	Dry cell weight (g/100 g solid medium)	Organic germanium contents (converting ratio) (ppm/g)	
		mycelium	fruiting body
0	37	0	0
100	39	284 ± 22.3(2.84)	173 ± 16.7(1.73)
500	35	684 ± 34.2(1.37)	476 ± 28.2(0.95)
1,000	31	1,058 ± 101.2(1.06)	969 ± 39.4(0.97)

의 게르마늄 함량분석 연구가 요구된다.

적 요

본 연구에서는 동충하초 균주를 이용하여 SDAY 배지 액체배양과 번데기배지 배양을 이용하여 100~5,000 ppm 농도에서 유기게르마늄 함유 동충하초 생산방법을 연구하여 게르마늄 동충하초 생산 가능성을 확인하였다. 액체배양과 번데기 배지 배양에서 게르마늄 첨가 농도를 100 ppm으로 조정했을 때, 생산되는 유기게르마늄의 양이 각각 442.4 ppm/g과 284 ppm으로 가장 높은 생산수율을 보여짐을 확인하였다. 또한 게르마늄의 양을 최대 5,000 ppm(액체배지)과 1,000 ppm(번데기배지)으로 첨가 했을 때 각각 4,509.7 ppm/g과 1,058 ppm/g의 유기게르마늄이 생산 되어지는 것도 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 비추어 볼 때, 무기게르마늄이 동충하초가 성장함에 있어 영양물질로 공급되어 양질의 유기게르마늄으로 변환 생산 되어진다는 것을 보여주는 것으로 해석할 수 있었다. 또한 본 연구 개발의 결과로 얻어진 게르마늄 함유 동충하초는 기존의 동충하초 효능에 유기게르마늄이라는 약리활성 물질이 첨가됨으로써 기능성식품, 화장품 원료 및 의약품 원료로도 사용될 수 있을 것으로 사료되어진다.

감사의 글

이 논문은 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 수행되었음.

참고문헌

한국과학기술원, 계란티제약(주)중앙연구소. 1995. 효모를 이용한 유기게르마늄의 제조. 한국산업미생물학회지 **33**: 87-90.
 Arora, D. K., Ajello, L. and Mukerji, K. G. 1991. Hand book of applied mycology. Marcel Dekker, Inc.
 Asai, K. 1980. Miracle cure: Organic Germanium. Japan Publication. Inc.
 Aso, H., Suzuki, F., Yamaguchi, T. and Hayashi, Y. 1982. Induction of interferon and activation of NK cells and macrophages

in mice by oral administration of Ge-132, and organic germanium compound. *Gantokagakuryoho*. **9**: 1976-1980.
 Aso, H., Suzuki, F., Yamaguchi, T. and Hayashi, Y. 1985. Induction of interferon and activation of NK cells and macrophages in mice by oral administration of Ge-132, and organic germanium compound. *Microbiol. Immunol.* **29**: 65-74.
 Furuya, T., Hirofani, M. and Matsuzawa, M. 1983. N⁶-(20Hydroxyethyl)adenosine, a biologically active compound form cultured mycelia of *Cordyceps* and *Isaria* species. *Phytochemistry* **22**: 2509-2512.
 Hung, Y. F., Thomason, M. J., Rhys-williams, W., Lloyd, A. W. and Hanlon, G. W. 1996. Chiral inversion of 2-phenylpropionic acid by *Cordyceps militaris*. *J. Appl. Bacteriol.* **81**: 242-250.
 Iwashima, A., Kawasaki, Y., Nosaka, K. and Nishimura, H. 1992. Effect of thiamin on cordycepin sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letter* **311**: 60-62.
 Klapcinska, B. and Chmielowski, J. 1986. Binding of germanium to *Pseudomonas putida* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 1144-1147.
 Kobayashi, H., Aso, H., Ishida, N. and Suzuki, F. 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.
 Kobayashi, Y. and Shimazu, D. D. 1983. Iconography of vegetable wasps and plant worms. Hoikusha Publishing Company Ltd., Osaka.
 Lee, H., Travers, J. T. and Van Dyke, M. I. 1990. Microbial interactions with germanium. *Biotechnol. Adv.* **8**: 539-546.
 Levine, S. A. and Kidd, P. M. 1986. Oxygen-nutrition for super health. *J. Orthomol. Medicine.* **1**: 145-148.
 Nobohiro, W., Osamu, I., Takuro, K. and Koichi, Y. 1980. New approaches to using spent brewer's yeast. *ASBC J.* **38**: 5-8.
 Sandra, G. 1988. Therapeutic effects of organic germanium. *Med. Hypotheses.* **26**: 207-215.
 Slawson, R. M., Van Dyke, M. I., Lee, H. and Travers, J. T. 1992. Germanium and silver resistance, accumulation, and toxicity in microorganisms. *Plasmid* **27**: 72-79.
 Van Dyke, M. I., Lee, H. and Travers, J. T. 1989. Germanium toxicity in selected bacterial and yeast strains. *J. Ind. Microbiol.* **4**: 299-306.
 Wei, X. S. 1992. Effect of yeast on bioenrichment of germanium. *Food. Science* **149**: 49-54.
 Ying, J., Mao, X., Ma, Q., Zong, Y. and Wen, H. 1987. Icons of medical fungi from China. Science press, Beijing, China.