

게르마늄 강화 송이균사체의 항산화 및 항암 활성에 관한 연구

김혜자¹ · 김완겸¹ · 조화은¹ · 최윤희¹ · 이기남^{1,3} · 정명수^{2,3*}

1: 원광대학교 한의학전문대학원, 2: 원광대학교 한의과대학, 3: 원광대학교 한국전통의학연구소

Study on Activities of Antioxidant and Anticancer of Germanium-fortified *Tricholoma matsutake* Mycelium

Hae Ja Kim¹, Wan Gyeom Kim¹, Hwa Eun Cho¹, Yun Hee Choi¹, Ki Nam Lee^{1,3}, Myong Soo Chong^{2,3*}

1: Professional Graduate School of Oriental Medicine, 2: College of Oriental Medicine, 3: Research Center of Traditional Korean Medicine, Wonkwang University

The purpose of this study was evaluated physiological activity effect of organic germanium in culture broth of germanium-fortified *Tricholoma matsutake* mycelium and germanium-fortified yeast. Proliferation *Tricholoma matsutake* mycelium and yeast was inhibited by addition of germanium. Contents of organic germanium in *Tricholoma matsutake* mycelium and yeast was increased in dose-dependent manner. And low concentration(1,000 ppm) of germanium in mycelium was almost changed organic germanium. In the result of antioxidant activity as SOD-like activity, contents of total polyphenol compound and electron donating ability, activity of germanium-fortified *Tricholoma matsutake* mycelium was higher than that of germanium-fortified yeast. To evaluate of antitumor effects in vitro, we examined nitric oxide production of Raw 264.7 cell and cytotoxicity of HT1080 cell by MTT assay. Nitric oxide production of germanium-fortified *Tricholoma matsutake* mycelium was shown low level in low concentration(1,000 ppm) than other groups. The anticancer effect of germanium-fortified *Tricholoma matsutake* mycelium on HT 1080 cell was indicated a strong inhibitory effect in low concentration(1,000 ppm). These results suggest that organic germanium in culture broth of germanium-fortified *Tricholoma matsutake* mycelium has valuable physiological activities as antioxidant and anticancer effect, and it was higher than that of germanium-fortified yeast.

Key words : germanium, *tricholoma matsutake*, antioxidant, Raw 264.7 cell, HT 1080 cell

서 론

게르마늄(Germanium dioxide, GeO₂, 锗曼寧)은 원소기호 Ge(锗), 원자번호 32, 원자량 72.61, 비중 7~8인 아금속 반도체 물질로 1886년 독일의 화학자 Clemen Winkler가 최초로 발견하였으며, 자연계에는 동식물, 흙, 암석 등에 분포되어 있고 산업적으로는 전자산업, 의료용품, 섬유, 식품 등의 분야에서 유용물질로 활용되고 있다¹⁾.

게르마늄은 생리적으로 면역증강, 항산화, 항암활성 등의 약리효과가 있는 것으로 연구되고 있으며, 식물계에서는 유기게르마늄(Organic germanium)의 형태로 인삼, 마늘, 영지, 명일엽, 알로에 등에 천연상태로 다량(100~160 µg/kg) 함유되어 있는 것으로 보고되어 있다^{2,4)}.

* 교신저자 : 정명수, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학

E-mail : neurokid@wku.ac.kr, Tel : 063-850-6912

접수 : 2008/12/18 · 수정 : 2009/02/10 · 채택 : 2009/04/01

이러한 유기게르마늄은 게르마늄으로부터 촉매반응에 의해 화학적으로 합성되는 것으로 천연 생합성 유기게르마늄, 생체 함유 유기게르마늄, 화학 합성 유기게르마늄 등으로 분류되고 있으며, 특히 효모 등의 미생물은 무독화된 유기게르마늄을 자체적으로 합성하여 축적할 수 있는 것으로 보고되어 있어 *Saccharomyces sp.*를 이용하여 게르마늄이 결합된 단백질을 함유하는 효모를 대량 생산 하려는 시도가 이루어지고 있다⁵⁻⁷⁾. 또한 효모 등의 미생물 세포내에 축적된 게르마늄은 주로 수용성으로 대부분 핵산이나 단백질과 결합되어 있고⁸⁾ 균체 내에 축적된 게르마늄은 대부분 유기게르마늄으로 전환되어 있어 인체에 무독하며 다양한 생리 활성을 갖고 있는 것으로 보고되어 있다⁹⁾.

한편, 송이버섯(*Tricholoma matsutake*)은 미생물의 일종으로 고등균류에 속하는担子菌류로서, 맛과 향이 뛰어나 식용으로 이용되고 있으며 β-glucan 등 다당체 성분이 함유되어 있어 면역증강, 항암활성, 콜레스테롤, 혈당 저하 등의 성인병 예방 효과가

있는 것으로 보고되어 있다^{10,11)}.

이에 본 연구에서는 송이자실체와 동일한 효능을 지닌 송이 균사체를 인공 배양하여 유기게르마늄의 생성 및 약리적 효능에 관한 연구와 대조군으로 효모를 이용한 유기게르마늄의 생성 및 효능을 병행하여 비교 실험하였다. 즉, 게르마늄 강화 배지에 송이균사체와 효모균체를 배양하여 균체내로 게르마늄을 유입시켜 게르마늄 농도별 균체함량 및 균체 내 유기게르마늄 함량을 분석하였으며, 균사체 내의 생합성 메커니즘에 의해 유기화된 게르마늄의 항산화 효과 등 생리활성능과 대식세포주 Raw 264.7에서의 NO 생성능, 인간유래 섬유성육종암세포주 HT 1080에서의 MTT assay에 의한 항암활성 효과에 대한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 원료 및 사용균주

본 연구에서는 PDB(Potato Dextrose Broth)배지를 기본으로 하여 게르마늄(germanium dioxide, GeO₂)을 바이오헬스(주)에서 구입하여 게르마늄 함유 PDB배지의 원료로 사용하였으며, 송이 균사체(*Tricholoma matsutake* mycelium, 경북 울진산)는 국립산림과학원에서, 효모균체(*Saccharomyces cerevisiae* 7268)는 한국생명공학연구원에서 분양받아 계대 배양 후 실험에 사용하였다.

2. 배지 제조

송이균사체와 효모균체 배양배지는 게르마늄(GeO₂)을 0, 1,000, 2,000, 3,000, 4,000 및 5,000 ppm의 농도로 PDB배지에 각각 용해, 분산시키기 위하여 2,450 MHz(1 kW)의 microwave로 10분간 처리하여 게르마늄 함유 PDB배지(PDB+Ge medium)를 제조한 다음 121℃에서 20분간 멸균한 후 배지로 사용하였다.

3. 배양 및 시료 제조

게르마늄 함유 시료는 멸균한 0 ~ 5,000 ppm 농도의 게르마늄 함유 PDB배지(PDB+Ge medium)에 송이균사체와 효모균체 전배양액을 각각 5%(v/v)씩 접종하여 송이균사체는 24℃에서 14일간 진탕(170 rpm) 암 배양 하였으며, 효모균체는 24℃에서 48시간 진탕배양한 후 송이균사체는 여과하여, 효모균체는 원심분리로 각각의 균체를 회수하여 증류수로 3회 세척하여 -30 ~ -40℃, 1.0~0.1 mmHg 진공도에서 동결 건조하여 시료로 사용하였다. 0, 1,000, 2,000, 3,000, 4,000 및 5,000 ppm의 게르마늄 함유 PDB배지에서 송이균사체를 배양한 배양물을 각각 T-0, T-1000, T-2000, T-3000, T-4000, T-5000으로 명명하였으며, 상기 농도의 게르마늄 함유 PDB배지에서 효모균체를 배양한 배양물을 각각 Y-0, Y-1000, Y-2000, Y-3000, Y-4000, Y-5000으로 명명하였다.

4. 균체량 측정

균체 농도는 건조중량(Dry Cell Weight, DCW)을 기준으로 측정하였으며 건조 균체량은 송이균사체 배양액은 여과하여, 효모균체 배양액은 원심분리 하여 각각의 균체를 증류수로 3회 세척하여 재 여과 및 원심분리한 후 동결 건조하여 측정하였다.

5. 균체의 유기게르마늄 함량 측정

균체 내 게르마늄 함량 측정은 Lee 등의 방법¹²⁾을 변형하여 수행하였다. 동결건조 시료를 170℃ microwave에서 2~5분간 건조시킨 후 시료 0.2~0.3 g에 KNO₃ 5 ml를 가하여 45℃로 overnight 시킨 다음 95℃에서 5시간 분해하였다. 분해액을 최종으로 10 ml로 정용한 후 NO. 6 여과지로 여과하여 ICP-AES (Inductively coupled plasma atomic emission spectrometer, Optima 3300DV, Perkin-Elmer, USA)로 분석하였다.

6. 총 폴리페놀 화합물 함량

총 폴리페놀 화합물 함량은 Folin-Denis법¹³⁾을 응용하여 측정하였다. 즉, 각 배양물은 증류수를 이용해 1 µg/ml 농도로 희석하여 2 N Folin 시약 200 µl를 첨가하고 잘 혼합하여 3분간 방치하였다. 여기에 10% Na₂CO₃ 2 ml를 첨가하여 실온에서 1시간동안 방치한 후 ELASA를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 폴리페놀 화합물은 tannic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다. Tannic acid를 이용한 표준곡선은 최종농도가 0, 37.5, 75, 150, 300 µg/ml이 되도록 하여 위와 같은 방법으로 725 nm에서 흡광도를 측정하여 작성하였다.

7. SOD 유사 활성능

SOD(Superoxide dismutase) 유사활성측정은 SOD assay kit(Dojindo Molecular Technologies, Inc., U.S.A)를 이용하여 superoxide anion radical(O₂⁻)의 소거 활성을 측정하였다. 동결건조한 각 시료를 D.W.에 농도별로 희석한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 kit의 계산법에 따라 활성능을 측정하였다.

8. 전자 공여능

전자공여능(Electron donating ability, EDA) 측정은 Blois 방법¹⁴⁾에 준하여 각 배양물의 DPPH(α-α-diphenyl-β-picrylhydrazyl radicals)에 대한 수소공여 효과로 측정하였다. 일정 농도의 시료에 4.0×10⁻⁴ M DPPH 용액을 150 µl 가하고, 혼합하여 실온에서 반응시켰다. 이 반응액을 525 nm에서 흡광도를 측정하였으며 전자공여 효과는 시료 첨가 전·후의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

9. NO 생성유도 효과 측정

NO(Nitric Oxide) 생성유도 효과 측정은 Lee 등의 방법¹⁵⁾을 응용하여 측정하였다. 즉, 단핵대식세포주인 Raw 264.7 세포로부터 일산화질소 생산의 지표로서 배양 상층액 내에 안정된 NO 산화물인 NO₂를 Griess 반응으로 측정하였다. 즉, 100 µl의 그리스 시약(0.5%의 설파닐아미드, 2.5%의 인산 및 0.5%의 나프틸에틸렌아민)을 각 배양물의 희석액 각각 100 µl에 첨가하고, 그 혼합물을 37℃에서 10분간 반응시킨 후 microplate reader로 540 nm에서 측정하였으며, 일산화질소의 농도는 아질산염의 표준커브로부터 계산하였다. 각 시료에 대한 양성대조구로는 100 µg/ml의 LPS를 처리하여 활성화를 유도한 세포를 사용하였다.

10. MTT assay에 의한 암세포 증식억제 효과 측정

암세포 증식억제 효과 측정은 Lee 등의 방법¹⁵⁾을 응용하여 측정하였다. 즉, 인간 섬유성육종암세포주인 HT 1080에 대한 암세포 증식억제 효과를 보기 위해 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자주빛 formazan 생성물로 변하는 MTT환원을 바탕으로 MTT 분석법으로 측정했다. HT 1080 세포는 RPMI(rosewell park memorial institute)-1640 배지를 이용 1×10^7 cell/ml의 밀도로 현탁하여 24 well plate에 $500 \mu\text{l}$ 씩 분주한 후 3시간 incubation 하였으며 여기에 각각의 농도로 희석한 추출시료 $5 \mu\text{l}$ 넣어 처리한 후 24시간 배양하였다. 배양 후 MTT 용액을 각 plate에 $20 \mu\text{l}$ 첨가하고 다시 2시간 동안 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 배양 종료 후 MTT-formazan 생성물은 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 이용하여 용해하여 570 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

11. 통계처리

모든 자료의 통계분석은 SPSS program을 이용하여 one-way ANOVA(analysis of variance)로 검정하여 평균 \pm 표준편차로 나타내었으며, 유의성 검정은 Duncan's multiple range test에 따라 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

결 과

1. 게르마늄 농도가 균체 생육에 미치는 영향

게르마늄 함유 배지에서 송이균사체와 효모균체를 배양하여 균체량을 측정한 결과 송이균사체 및 효모균체 모두 게르마늄이 첨가된 모든 농도의 배지에서 균체의 증식이 억제되었으며, 송이균사체의 경우 게르마늄 첨가군 간에는 게르마늄 농도에 큰 영향을 받지 않은 것으로 나타났으나 효모균체의 경우 게르마늄 농도에 의존적으로 균체 증식이 둔화되었다. 따라서 게르마늄 2,000 ppm ~ 5,000 ppm 농도의 시료군 간에는 균체량 증식에 큰 변화를 보이지 않아 1,000 ppm 게르마늄 강화 송이균사체 시료(T-1000)와 3,000 ppm 게르마늄 강화 송이균사체 시료(T-3000), 1,000 ppm 게르마늄 강화 효모균체 시료(Y-1000)와 3,000 ppm 게르마늄 강화 효모균체 시료(Y-3000)를 선정하여 각각 TL과 TH, YL과 YH라 명명하여 0 ppm 게르마늄 강화 송이균사체 시료인 TC, 0 ppm 게르마늄 강화 효모균체 시료인 YC와 함께 총 6군을 실험 시료로 사용하기로 하였다(Table 1).

2. 균체 내 유기게르마늄 함량

각각의 송이균사체와 효모균체를 회수하여 게르마늄 함량을 측정할 결과, 1,000 ppm 농도에서 TL은 $998.26 \text{ mg}/100 \text{ g}$ 로 YL의 $827.44 \text{ mg}/100 \text{ g}$ 보다 유의적인 차이($p < 0.05$)로 높았으며, TH가 $1,973.27 \text{ mg}/100 \text{ g}$ 로 YH의 $1,598.38 \text{ mg}/100 \text{ g}$ 보다 유의적인 차이($p < 0.05$)로 유기게르마늄 함량이 높았다. 첨가한 게르마늄 대비 유기게르마늄으로의 변환율은 TL은 0.998로 99.8%가 유기게르마늄으로 전환됨을 알 수 있었고, YL은 0.827로 나타났으며, TH는 0.657, YH는 0.532로 다소 낮게 나타나 고농도의 게르마늄 시료

에서 송이균사체 및 효모균체의 유기게르마늄 생산능은 저하되었다(Table 2).

Table 1. Effect of germanium dioxide(GeO_2) concentration on the *Tricholoma matsutake* mycelium and yeast growth (DCW, g/500 ml)

Conc. of GeO_2 (ppm)	T. Mycelium	Yeast
0	0.89 ± 0.00^c	0.60 ± 0.01^c
1000	0.73 ± 0.04^b	0.44 ± 0.03^b
2000	0.64 ± 0.04^{ab}	0.42 ± 0.01^b
3000	0.60 ± 0.01^a	0.42 ± 0.03^b
4000	0.64 ± 0.01^{ab}	0.38 ± 0.04^{ab}
5000	0.60 ± 0.02^a	0.31 ± 0.02^a

All values are mean \pm S.E. Alphabet: Different superscripts in the table indicate significant difference by Duncan's multiple range test($p < 0.05$). *Tricholoma matsutake* mycelium : culture for 14 day at 24°C Yeast : culture for 48 hr at 24°C

Table 2. Organic germanium contents of *Tricholoma matsutake* mycelium and yeast cultured at difference of GeO_2 concentration

Samples	Organic germanium (mg/100 g)	Converting ratio
TC	2.10 ± 0.03^a	0.002
TL	998.26 ± 6.69^c	0.998
TH	$1,973.27 \pm 24.44^e$	0.657
YC	1.10 ± 0.02^a	0.001
YL	827.44 ± 9.95^c	0.827
YH	$1,598.38 \pm 56.69^d$	0.532

All values are mean \pm S.E. Alphabet: Different superscripts in the table indicate significant difference by Duncan's multiple range test($p < 0.05$). TC: T-0 ppm GeO_2 culture group, TL: T-1000 ppm GeO_2 culture group, TH: T-3000 ppm GeO_2 culture group, YC: Y-0 ppm GeO_2 yeast culture group, YL: Y-1000 ppm GeO_2 culture group, YH: Y-3000 ppm GeO_2 culture group

3. 총 폴리페놀 화합물의 함량

농도에 따른 각 배양물의 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과, TC에서 총 폴리페놀 함량이 $96.99 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 유의적으로 가장 높았고, TL $83.79 \mu\text{g}/\text{ml}$, TH $70.51 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났다. 한편, YC는 $18.86 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타난 반면 YL과 YH는 각각 18.71 , $16.94 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 순으로 낮았다(Fig. 1).

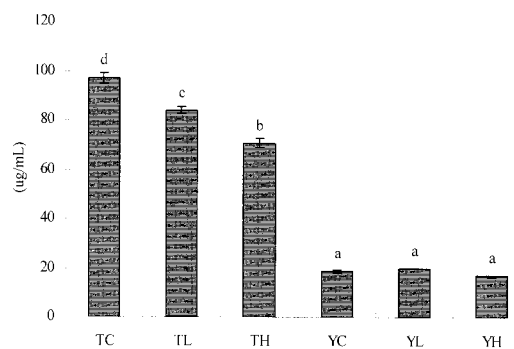


Fig.1. Contents of total polyphenol compounds in *Tricholoma matsutake* mycelium and yeast fortified Germanium. All values are mean \pm S.E. Alphabet: Different superscripts in the table indicate significant difference by Duncan's multiple range test($p < 0.05$). Abbreviations are same as Table 2.

4. SOD 유사 활성능

농도에 따른 각 배양물의 SOD 유사 활성능을 측정한 결과, 각 배양물은 모든 농도에서 SOD 유사 활성능이 있었으며 농도에 비례하여 높게 나타났다. 즉, $5 \text{ mg}/\text{ml}$ 의 농도에서 TL은 76.06%로

가장 높은 활성을 보였으며, TH 74.86%, TC 71.99%, YC 33.91%, YL 25.06% 및 TH 23.46%의 순으로 나타났다. 10 mg/ml의 농도에서 TL이 87.56%로 가장 높은 활성을 보인 반면, TH 87.16%, TC 84.15%, YL 43.51%, YH 43.04% 및 YC 42.31%로 나타났다. 20 mg/ml의 농도에서 TH가 95.25%로 모든 실험군 중에서 가장 높았으며, TL이 94.78%, TC 92.37%, YH 72.79%, YL 67.51% 및 YC 52.27%로 유의적인 차이(p<0.05)로 가장 낮았다(Fig. 2).

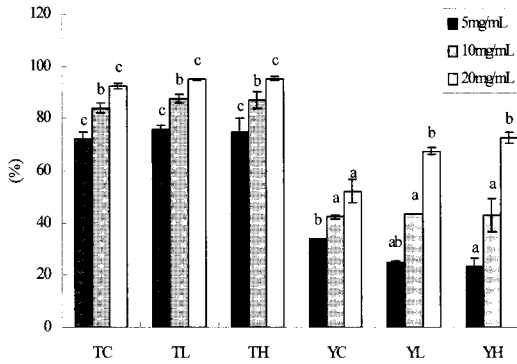


Fig. 2. SOD like activity of *Tricholoma matsutake* mycelium and yeast fortified Germanium. All values are mean ± S.E. Alphabet: Different superscripts in the table indicate significant difference by Duncan's multiple range test(p<0.05). Abbreviations are same as Table 2.

5. 전자 공여능

농도에 따른 각 배양물의 전자공여능을 측정된 결과, 1 mg/ml의 농도에서 TC는 7.53%로 가장 높은 전자공여능을 보였으며, YL 6.87%, YC 6.47%, TH 6.26%, TL 6.18%, YH 5.83%의 순으로 나타났다. 5 mg/ml의 농도에서 TH가 9.69%로 가장 높았고, TC 9.32%, TL 7.40%, YL 7.13%, YC 6.79% 및 YH 6.20%로 가장 낮았다. 10 mg/ml의 농도에서 TC가 12.94%로 유의적인 차이(p<0.05)로 높게 나타났으며, TH 10.52%, TL 9.93%, YL 7.44%, YC 7.00% 및 YH 6.47%의 순으로 나타났다(Fig. 3).

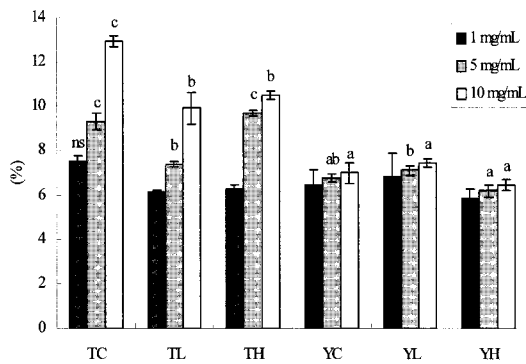


Fig. 3. Electron donating ability in *Tricholoma matsutake* mycelium and yeast fortified Germanium. All values are mean ± S.E. Alphabet: Different superscripts in the table indicate significant difference by Duncan's multiple range test(p<0.05). Abbreviations are same as Table 2.

6. NO 생성유도 효과

각 배양물의 NO 생성유도 효과에 미치는 영향을 조사하기 위하여 대식세포(Raw 264.7 cell)에서 LPS에 의한 NO 생성을

0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 mg/ml농도에서 측정된 결과, 무처리 대조군에서 NO의 생성이 2.27 μM로 거의 생성되지 않았으며 무처리 실험군 모두 농도 의존적으로 NO 생성유도 효과가 나타났다. 반면, LPS 처리 후 세포가 활성화됨으로써 대조군에서는 18.78 μM 농도로 현저히 증가하였다. LPS로 자극한 대조군에 비해 TC, TL 및 TH 모두 농도가 높을수록 NO 생성은 감소하였으나, YC, YL 및 YH는 농도 의존적으로 높은 NO 생성유도 효과가 있었다 (Table 3).

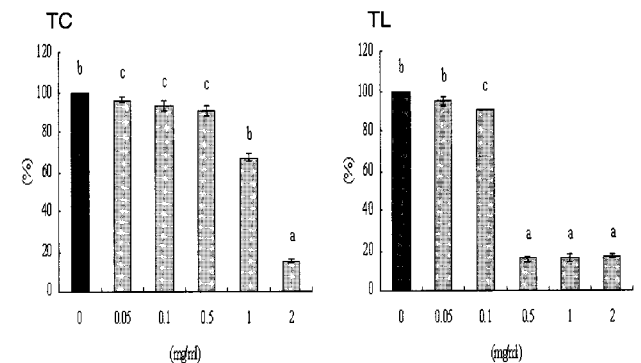
Table 3. Induction of NO production by *Tricholoma matsutake* mycelium and yeast fortified Germanium in Raw 264.7 cells (μM)

Conc. (mg/ml)	0.05	0.1	0.5	1	2	
LPS (-)	Control	2.27±0.03 ^b	2.27±0.03 ^{ab}	2.27±0.03 ^a	2.27±0.03 ^a	2.27±0.03 ^a
	TC	2.53±0.02 ^c	2.66±0.05 ^c	2.98±0.08 ^b	2.81±0.04 ^b	2.86±0.03 ^b
	TL	3.30±0.04 ^d	3.36±0.03 ^d	3.52±0.04 ^c	3.71±0.05 ^c	4.41±0.08 ^c
	TH	3.44±0.06 ^d	3.40±0.00 ^d	3.94±0.02 ^d	3.90±0.05 ^c	4.74±0.14 ^d
	YC	2.06±0.00 ^f	2.05±0.03 ^f	2.12±0.01 ^a	2.04±0.01 ^a	2.32±0.01 ^a
	YL	2.23±0.01 ^{ab}	2.37±0.09 ^b	2.17±0.00 ^a	2.26±0.01 ^a	2.53±0.03 ^a
	YH	4.23±0.13 ^e	4.56±0.17 ^e	4.67±0.18 ^e	4.91±0.15 ^d	5.08±0.17 ^e
LPS (+)	Control	18.78±0.46 ^c	18.78±0.46 ^d	18.78±0.46 ^f	18.78±0.46 ^d	18.32±0.06 ^c
	TC	13.18±0.00 ^a	8.28±0.07 ^b	2.76±0.02 ^a	2.42±0.00 ^a	2.62±0.04 ^a
	TL	18.04±0.00 ^c	7.48±0.01 ^a	3.76±0.00 ^b	3.80±0.00 ^b	4.06±0.03 ^b
	TH	27.34±0.03 ^d	17.18±0.13 ^d	4.63±0.08 ^c	4.31±0.14 ^b	4.31±0.05 ^b
	YC	18.25±0.09 ^e	17.27±0.04 ^e	17.98±0.02 ^e	18.34±0.03 ^e	21.19±0.11 ^c
	YL	16.09±0.00 ^b	14.40±0.35 ^c	16.74±0.13 ^d	17.24±0.19 ^c	19.02±0.01 ^d
	YH	33.69±0.50 ^e	32.28±0.28 ^f	32.70±0.10 ^e	33.11±0.50 ^e	34.66±0.85 ^e

All values are mean±S.E. Alphabet: Different superscripts in the table indicate significant difference by Duncan's multiple range test(p<0.05). Abbreviations are same as Table 2.

7. MTT assay에 의한 암세포 증식억제 효과

각 배양물의 인간 섬유성육종암세포(HT 1080 cell)에 의한 항암 활성 결과, 무처리군의 세포생존도 100%를 기준으로 각 배양물을 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 mg/ml의 농도로 처리하여 세포독성을 확인한 결과 시료 농도에 의존적으로 암세포 증식억제 효과를 보였으며, 0.05 ~ 0.1 mg/ml의 농도에서는 모든 실험군이 암세포 증식억제 효과가 없는 것으로 나타났으며, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml의 농도에서는 TL이 각각 15.73%, 16.04%로 다른 실험군보다 유의적인 차이(p<0.05)로 암세포 생존율이 낮았으며, 2 mg/ml의 농도에서는 TC 15.52%, TL 17.03%, TH 36.31%로 나타나 효모균체 배양물 실험군인 YC 72.94%, YL 72.36%, YH 68.86%보다 유의적인 차이(p<0.05)로 암세포 생존율이 낮았다(Fig. 4).



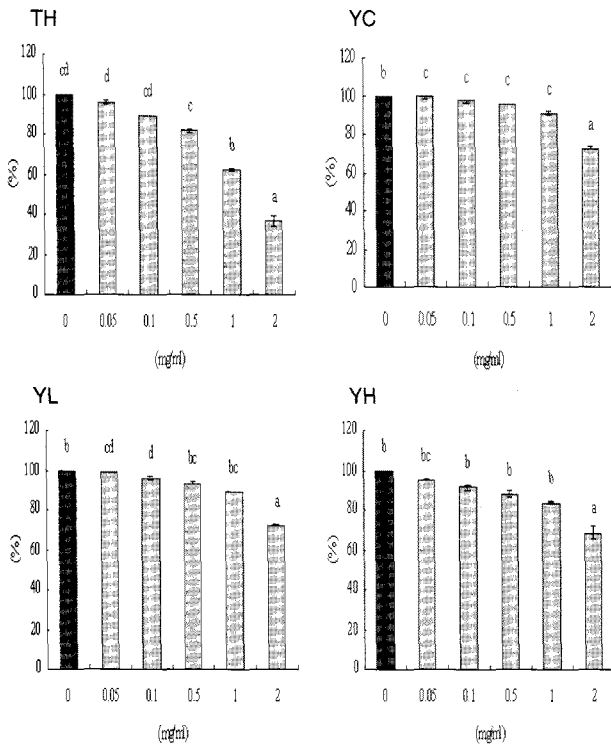


Fig. 4. Cytotoxicity of *Tricholoma matsutake* mycelium and yeast fortified Germanium on HT 1080 cells. All values are mean \pm S.E. Alphabet: Different superscripts in the table indicate significant difference by Duncan's multiple range test($p < 0.05$). Abbreviations are same as Table 2.

고찰

게르마늄(Germanium dioxide, GeO_2 , 锗曼寧)은 그 동안의 실험연구 결과 다양한 질병예방 및 치료효과가 확인되고 있다. 특히 유기게르마늄(Organic germanium)은 면역증강, 산소공급 및 해독작용, 활성산소 제거 등에 효과가 있는 것으로 Goodman 등이 보고하고 있으며 그 중에서도 인터페론 생성유도, 마크로파지 활성화, NK 세포활성 등도 확인되고 있다¹⁶⁾. 또한 유기게르마늄의 효과 실험에 있어서 화학적 합성 유기게르마늄인 Ge132의 항암활성 및 대식세포 활성화도 보고되고 있으며¹⁷⁾, Ge132의 원료 물질인 GeO_2 에 함유된 미량의 화학 오염물질에 의한 신경독성, 신장독성 등 다수의 인체 독성도 보고되고 있다^{18,19)}.

본 연구에서는 각종 실험을 통하여 입증되고 있는 유기게르마늄의 효능을 극대화시키고 또한 무기게르마늄(GeO_2)의 독성 등의 부작용을 제거하기 위하여 송이균사체의 배양과 효모발효 과정을 이용하여 유기게르마늄을 송이균사체와 효모균체 내에서 생합성 시키고 균사체 및 균체를 회수하여 유기게르마늄 함량과 총 폴리페놀 화합물 함량, SOD 유사활성 및 전자공여능 등의 항산화 활성과 Raw 264.7 cell과 HT 1080 cell을 이용하여 NO 생성능 및 항암활성을 분석하였다.

유기게르마늄의 생합성을 위하여 PDB배지에 게르마늄을 0, 1,000, 2,000, 3,000, 4,000 및 5,000 ppm의 농도로 첨가한 후 10 0°C에서 microwave 처리를 하여 10분 이상 용해 및 분산시켰는데, 이 때 배지용액 내에 게르마늄 침전물이 발견되지 않아 각각

의 농도에서 게르마늄은 microwave의 고주파에 의해 모두 용해된 것으로 판단된다. 각 시료의 게르마늄 함량을 분석한 결과, 일반 송이균사체의 게르마늄 함량은 2.10 mg/100 g로 나타났으나 1,000 ppm 게르마늄 강화 송이균사체 시료(TL)에서는 게르마늄 함량이 998.32 mg/100 g, 3,000 ppm 게르마늄 강화 송이균사체 시료(TH)에서는 1,973.27 mg/100 g로 나타났으며, 일반 효모균체의 게르마늄 함량은 1.10 mg/100 g, 1,000 ppm 게르마늄 강화 효모균체 시료(YL)에서는 게르마늄 함량이 827.44 mg/100 g, 3,000 ppm 게르마늄 강화 효모균체 시료(YH)에서는 1,598.38 mg/100 g로 나타났다. 이는 송이균사체와 효모균체가 배양액내의 게르마늄을 흡수하여 생체 내에서 유기화 함으로써 유기게르마늄이 생합성된 것으로 판단되었다. 또한 생합성된 유기게르마늄의 함량은 송이균사체가 효모균체보다 더 높게 나타났으며, 유기게르마늄으로의 전환율은 1,000 ppm의 저농도에서 3,000 ppm의 고농도에서보다 유의적으로 높았다. 이에 송이균사체 내의 유기게르마늄 생합성 과정에 대한 기전은 향후 더욱 연구되어야 할 것으로 생각된다.

총 폴리페놀 함량은 TL에서 83.79 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 높게 나타나고 있는데, 이는 송이균사체 함량이 TL에서 가장 높게 나타난 것과 연계해 볼 때 송이균사체내에 함유된 폴리페놀 함량에 기인한 것으로 판단되었다. 반면에 YL과 YH의 총 폴리페놀 함량은 각각 18.71, 16.94 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 낮았다. SOD 유사활성은 폴리페놀 함량과 동일한 경향으로, 그리고 시료 농도에 의존적으로 TL에서 76.06 ~ 94.78 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 비교적 높게 나타나고 있으며, 전자공여능(EDA)은 TC 7.53 ~ 12.94%로 농도 의존적으로 높게 나타났으며, TL 또한 6.18 ~ 9.93%로 비교적 높게 나타나 상대적으로 송이균사체 배양물이 항산화 효과가 높은 것으로 나타났으며, 이는 유기게르마늄에 의한 높은 세포내 산소공급 능력과 더불어 송이균사체 자체의 폴리페놀 등 항산화 효과에 기인한 것으로 판단되었다. 그러나 게르마늄 농도별 전자공여능은 송이균사체와 효모균체 배양물 모두에서 농도별 차이는 크지 않았다.

한편, 유기게르마늄의 면역 활성에 관한 효과와 관련하여 본 연구에서는 대식세포주 Raw264.7을 송이균사체와 효모발효에 의해 생성된 생합성 유기게르마늄이 활성화 시킬 수 있는지를 NO 생성능을 통하여 in vitro상에서 실험하였다.

대식세포는 체내로 유입된 암세포 등 이물질들을 비 특이적으로 탐식, 소화하여 NO(nitric oxide), H_2O_2 (hydrogen peroxide) 등의 세포독성 물질을 분비하여 암세포 등을 파괴하는 면역세포이다. 또한 대식세포는 암세포 등을 탐식하는 과정에서 IL-1, IL-6, TNF- α 등의 cytokine과 phosphatase 등의 효소를 분비하여 체내 면역체계를 조절하며 각 종 염증반응이나 조혈작용에도 관여하는 중요한 면역기관이다²⁰⁾. 또한 대식세포의 활성화의 지표인 NO 생성능과 연계하여 대식세포의 활성화 및 면역 활성 나아가 항암활성 등에 관하여 많은 보고가 되어 있다^{21,22)}.

각 배양물의 NO 생성유도 효과에 미치는 영향을 조사하기 위하여 대식세포(Raw 264.7 cell)에서 LPS에 의한 NO 생성을 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 mg/ml농도에서 측정된 결과, 무처리 대조군에서 NO의 생성이 2.27 μM 로 거의 생성되지 않았으며 무처리 실

험균 모두 농도 의존적으로 NO 생성유도 효과가 나타났다. 반면, LPS 처리 후 세포가 활성화됨으로써 대조군에서는 18.78 μ M 농도로 현저히 증가하였다. LPS로 자극한 대조군에 비해 TC, TL 및 TH 모두 농도가 높을수록 NO 생성은 감소하였으나, YC, YL 및 YH는 농도 의존적으로 높은 NO 생성유도 효과가 있었다. 한편, MTT assay를 이용해서 인간유래 섬유성육종암세포주인 HT 1080에 대한 송이균사체와 효모발효 생합성 유기게르마늄의 암세포 생존 저해율을 분석하였다. 각각의 실험군 중 TL, TH는 모든 농도에서 농도 의존적으로 암세포 생존 억제 효과를 나타내고 있으며, 또한 TL, TH는 YL, YH보다 유의적으로 암세포 생존 억제효과를 나타내고 있고, 특히 TL은 매우 높은 효과를 나타내었다. YC, YL 및 YH에서는 2 mg/ml 농도에서 암세포 생존율이 68.86 ~ 72.94%로 높게 나타났으며, TC에서는 15.52%로 매우 낮았다. 또한 TL, TH에서는 2 mg/ml 농도에서 각각 17.03%와 36.31%로 매우 낮게 나타나고 있어 유기게르마늄 함유 송이균사체 배양물의 암세포 생존 억제효과가 있는 것을 확인할 수 있었다.

결 론

게르마늄 강화 송이균사체와 효모균체 배양물에 함유된 유기게르마늄의 생리활성과 Raw 264.7 cell에서의 NO 생성능 및 HT 1080 cell에서의 항암활성을 측정된 결과, 송이균사체 및 효모균체 모두 게르마늄 강화로 균체 증식이 억제되었는데, 송이균사체는 효모균체 보다 게르마늄 농도에 의한 억제 정도가 유의적으로 낮았으며, 균체 내 유기게르마늄 함량은 게르마늄 농도에 의존적으로 증가되었다. 또한 저농도의 균주 내에 축적된 대부분의 게르마늄이 유기게르마늄으로 전환된 반면, 고농도에서는 유기게르마늄 전환율이 낮았다. 총 폴리페놀 함량은 송이균사체 배양물이 효모균체 배양물보다 게르마늄의 농도가 낮을수록 높았다. SOD 유사 활성능은 농도 의존적으로 높았으며, 송이균사체 배양물이 효모균체 배양물 보다 유의적인 차이로 높았고, 전자공여능 또한 송이균사체 배양물이 효모균체 배양물보다 유의적인 차이로 높았다. NO 생성유도 효과는 LPS 처리 후 세포가 활성화됨으로써 LPS로 자극한 대조군에 비해 TC, TL 및 TH 모두 농도가 높을수록 NO 생성은 감소하였으나, YC, YL 및 YH는 농도 의존적으로 높은 NO 생성유도 효과가 있었다. 또한 모든 배양물에서 농도 의존적으로 암세포 증식억제 효과를 보였으며 특히 송이균사체 배양물이 유의적인 차이로 암세포 증식억제 효과가 높았다. 이상의 실험결과에서 게르마늄 강화 송이균사체 배양물에 함유된 유기게르마늄이 항산화 작용 및 항암활성 등의 유용한 효능이 있음을 확인하였으며, 향후 지속적인 실험과 면밀한 연구검토 후 건강기능 식품 및 의약품 소재로 활용이 가능할 것으로 판단된다.

참고 문헌

1. Lee, J.S., Park, J.L., Kim, S.H., Park, S.H., Kang, S.K., Park,

C.B., Sohn, T.U., Jang, J.Y., Kang, J.K., Kim, Y.B. Oral Single and repeated-dose toxicity studies on Geranti Bio-Ge yeast, organic germanium fortified yeasts, in rats. *J Toxicol sci* 29: 541-553, 2004.

2. Sandra, G. Therapeutic effect of organic germanium. *Medical Hypotheses* 26: 207-215, 1988.

3. Lee, H.K., Kim, J.S., Kang, T.B. Extraction of organic germanium compound from garlic. *Inst Natural Sci Sangmyung Univ* 12: 1-18, 2004.

4. Schroeder, H.A., Balassa, J.J. Arsenic germanium, tin and vanadium in mice: Effects on growth, survival and tissue levels. *J Nutr* 92: 297-316, 1967.

5. Gadd, G.M. Microbial formation and transformation of organometallic and organometalloid compounds. *FEMS Microbiology Review* 11: 297-316, 1993.

6. Nobohiro, W., Osamu, I., Takuro, K., Koichi, Y. New approaches to using spent brewer's yeast. *ASBC journal* 38: 5-8, 1980.

7. Wei, X.S. Effects of yeast on bioenrichment of germanium. *Food science* 149: 49-54, 1992.

8. Klapcinska, B., Chmielowski, J. Binding of germanium to *Pseudomonas putida* cells. *Appl Environ Microbiol* 51: 1144-1147, 1986.

9. Lynn, M.R., Geoffrey, M.G. Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in vacuolar function a role for the vacuole in toxic metal ion detoxification. *Microbiol Lett* 152: 293-298, 1997.

10. Korean Forestry Reports, Reports on the pine musbroom in Korea. Forest Research Institute, Seoul, Korea. 18: 44-46, 1981.

11. An, J.S., Lee, K.H. Studies on the mineral contents of Korean mushroom. *Korean J Food Hygiene and Safety* 1(2):177-179, 1986.

12. Lee, S.T., Lee, Y.H., Choi, Y.J., Lee, S.D., Lee, C.H., Heo, J.S. Growth characteristics and germanium absorption of rice plant with different germanium concentration in soil. *Korean J Environ Agric* 24(1):40-44, 2005.

13. Swain, T., Hillis, W.E., Otega, M. Phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. Quantitative analysis of phenolic constituents. *J Sci Food Agric* 10: 83-88, 1959.

14. Blois, M.S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200, 1958.

15. Lee, B.G., Kim, S.H., Zee, O.P., Lee, K.R., Lee, H.Y., Han, J.W., Lee, H.W. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in Raw 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *Eur Pharmacol* 406: 301-309, 2000.

16. Goodman, S. Therapeutic effects of organic germanium.

- Medical hypothesis 26: 207-215, 1988.
17. Arimori, S., Watanabe, K., Yoshida, M., Nagato, T. Effect of Ge132 products and related synthetic compounds. Amsterdam ISBN Elsevier Science, pp 536-539, 1981.
 18. Bigitta, E.L., Mann, H., Melzer, H., Dunemann, L., Begerow, J. Renal and other failure caused by germanium Intoxication. Nephrol Dial Translant 14: 2464-2468, 1999.
 19. Tao, S.H., Bolger, P.M. Hazard assessment of germanium supplements. Regulatory Toxicology and pharm acology 25: 211-219, 1997.
 20. Yamada, H., Kiyohara, H., Cyong, J.C., Otsuka, Y. Purification and characterization of complement activating acidic polysaccharides from the roots of Lithospermum euchromum royale. International J Immunopharmacology 8: 71-82, 1986.
 21. Park, K.M., Kim, Y.S., Jeong, T.C., Joe, C.O., Shin, H.J., Lee, Y.H., Nam, K.Y., Park, J.D. Nitric oxide is involved in the immunomodulating activities of acidic polysaccharide from Panax ginseng. Planta Medica 67: 122-126, 2001.
 22. Park, J.D. Recent studied on the chemical constituents of Korean ginseng(Panax ginseng CA Meyer). Korean J Ginseng Sci 20: 389-396, 1996.