

培地内 게르마늄 처리가 玄米 誘導 캘러스의 게르마늄 吸收에 미치는 영향

權泰午* · 南宮承泊* · 朴炳雨*

Effect of Germanium Treatment in Culture Medium on Germanium Absorption by Callus Induced from Brown Rice

Tae Oh Kwon*, Seung Bak Namkoong* and Byung Woo Park*

ABSTRACT : This study was carried out to investigate the effect of Germanium(Ge) treatment in the culture media on the Ge absorption by the callus induced from brown rice cv. Dongjinbyeo.

MS medium was more effective on the growth ratio of callus and the content of Ge and some inorganic elements except K in callus than N₆ medium.

The more Ge treatment in the N₆ or MS medium, the more Ge absorption by the callus, but the growth ratio of callus and the content of Ca, Mg, and K in callus were decreased. The content of Fe, Mn, Zn, and Cu was increased under treatment up to 100~200mg /l Ge, but tended to be decreased under treatment more than that of Ge concentration.

Under treatment less than 150mg /l Ge, GeO₂(inorganic Ge) was more effective on the Ge absorption by callus than Ge-132(organic Ge), but Ge-132 was more effective on the Ge absorption by callus and the activity of callus in case of treatment more than 150mg /l Ge.

The lower pH of culture medium, the higher Ge content in the callus. When callus was cultured on medium supplemented with Ge and 0.1~1.0mM of citric acid or *myo*-inositol, content of Ge and some inorganic elements in callus, as well as growth and dry weight of callus, were tend to increase in comparison to control, but *myo*-inositol was more effective on them than citric acid.

Key words : Germanium content, Culture medium, Callus, Brown rice.

Germanium (Ge)은 週期律表에서 炭素, 珪素, 朱錫 및 납과 함께 IV_A에 속하는 32번째의 원소이며 微量元素인데, 전자산업에서는 초기에 半導體로서 중요하게 쓰였다. Ge-132는 1967년 Asai Ge Research Institute에서 합성되어¹³⁾, 다년간 연구결과 interferon 생성에 기인한 抗腫瘍 효과⁶⁾, 항돌연변이 작용¹⁰⁾, 면역강화 작용¹⁵⁾ 및 virus

감염치료²⁾와 rheumatism 질환의 치료효과⁴⁾ 이외에 해열, 진통작용^{5,8)} 그리고 중금속 해독작용⁹⁾ 등의 다양한 약리작용이 밝혀진 이후, 임상 및 영양학적 측면에서 널리 적용되고 있는 실정이다.

시중에는 출처도 不明하고 保社部의 허가도 없는 온갖 합성유기 Ge이 떠도는데, Jao 등⁷⁾은 식물에서 抽出한 천연유기 Ge이 무기 Ge 및 합성유

* 圓光大學校 農學科(Dept. of Agronomy, Wonkwang Univ., Iksan, Chonbuk 570-749, Korea)

** 이 논문은 1995년도 원광대학교 교비지원에 의하여 연구됨.

기 Ge보다 뛰어난 항암효과가 있다고 보고한 바 있다. 人蔘, 靈芝, 마늘, 알로에, 컴프리를 비롯한 많은 珍貴한 生藥類들이 Ge을 다량 함유한다고 하며, 明日葉은 이들 식물 등과 같이 토양에 함유된 Ge을 흡수하여 식물체내에 유기Ge 형태로 함유하는 것으로 알려져 있다¹⁾.

최근 조직배양의 발달로 식물체로부터 캘러스의 대량생산은 단시일에 가능하며, 유용변이체도 기내에서 선발이 가능하게 되었다. 캘러스 분말은 capsule化가 용이하며, 재분화된 식물체 또한 有機 Ge이 다량 함유할 것으로 생각되기에 藥學 및 醫學 분야에서 관심이 많을 것 같다.

高橋 等^{16,17)}은 식물의 Ge 吸收能은 식물의 종류에 따라 현저한 차이가 있는데, 그 경향은 식물의 珪素 흡수능의 大小에 대체로 일치한다고 하였으며, 또한 우리가 주식으로 하고 있는 벼는 규산 흡수력이 강하기에 Ge 흡수 또한 많다고 하였다.

본 연구는 벼에서 Ge을 다량 함유한 캘러스를 단시일에 다량 생산함으로써 국민의 보건향상에도 크게 이바지하고, 수도 육종의 기초자료로 활용하고자 벼의 현미에서 유도된 캘러스를 Ge이 첨가된 배지에 배양한 후, 캘러스의 Ge 흡수 양상을 검토하였던 바 이를 보고한다.

材料 및 方法

동진벼의 성숙 종자를 재료로 2,4-D 2.0 mg/l를 첨가한 N₆배지³⁾에 멸균 처리한 현미를 페트리 접시당 20 粒을 치상한 후, 25℃에서 암배양하여 유도된 캘러스를 같은 조건에서 1차 계대배양한 후 증식된 캘러스를 공시재료로 사용하였다.

배지종류별 Ge 농도에 따른 캘러스 내 Ge 흡수 시험은 N₆배지, MS배지¹¹⁾에 2,4-D 2.0 mg/l와 무기Ge인 GeO₂를 사용하여 Ge 농도를 무처리, 50, 100, 200, 300 mg/l를 첨가하여 배지의 pH를 5.7로 조절한 후, 캘러스를 페트리 접시당 0.5g 치상하고 25℃에서 암배양 4주 후 캘러스의 생체중을 조사하였으며, 건조 후 캘러스 내 Ge 함량 및 기타 무기원소의 측정시료로 사용하였다.

Ge의 종류 및 농도에 따른 캘러스 내 Ge 흡수

시험은 무기Ge(GeO₂)과 유기Ge(Ge-132)을 사용하였으며, N₆배지에 2,4-D 2.0 mg/l와 Ge 농도를 무처리, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 300 mg/l를 첨가하여 배지의 pH를 5.7로 조절한 후, 캘러스를 치상하고 25℃에서 암배양 4주 후, 캘러스의 활력 및 캘러스 내의 Ge 함량을 조사하였다.

배지의 pH별 캘러스 내 Ge 흡수 시험은 N₆배지에 2,4-D 2.0 mg/l와 무기Ge(GeO₂), 유기Ge(Ge-132)를 사용하여 Ge 농도 50 mg/l를 첨가하여 pH를 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5로 조절한 후, 캘러스를 치상하고 25℃에서 암배양 4주 후, 캘러스의 활력 및 캘러스 내의 Ge 함량을 조사하였다.

또한 캘러스내의 Ge 함량 증대를 위하여 Ge의 킬레이트제라고 생각되는 citric acid와 myo-inositol을 각각 무처리, 0.1 mM, 1.0 mM, 10.0 mM에 무기Ge(GeO₂)를 사용하여 Ge 농도 10 mg/l와 2,4-D 2.0 mg/l가 첨가된 N₆배지를 pH 5.7로 조절한 후, 캘러스를 치상하고 25℃에서 암배양 4주 후, 캘러스의 활력 및 캘러스 내의 Ge 함량을 조사하였다.

캘러스 내의 Ge 및 기타 무기원소의 함량 분석은 처리별 agar가 묻지 않게 수거한 캘러스를 따뜻한 증류수로 2회 수세하고 70℃에서 열풍건조시켜 乳棒으로 분쇄하고 40 mesh의 체를 통과한 시료 0.5 g에 濃窒酸 5ml를 가하고 microwave digestion(Model : Questron QMAX-4000, America)에서 분해하여 ICP(Model : Varian Liberty 110, Australia)로 측정하였다.

結果 및 考察

1. 배지종류별 Ge 농도에 따른 캘러스생육 및 캘러스 내 Ge 및 무기원소 함량

배지별 Ge 농도에 따른 캘러스의 증식율을 조사한 결과는 표 1과 같다. N₆배지보다는 MS배지에서 생체중 증식율이 좋았으며 두 배지 모두 Ge 농도가 높을수록 캘러스의 증식율은 감소되었고, 캘러스 색깔 또한 milk white에서 pale brown, brown으로 변하였다.

Table 1. Effects of Ge concentration and culture medium on the growth and color of callus induced from brown rice of *Oryza sativa* cv. Dongjinbyeo

Medium	Ge concentration (mg / l)	Fresh wt. initial(g), A	Fresh wt. final(g), B	(B-A) / A × 100 (%)	Color
N ₆	0	0.5	1.81	262	milk white
	50	0.5	1.22	144	pale brown
	100	0.5	1.07	114	pale brown
	200	0.5	0.91	82	brown
	300	0.5	0.80	60	brown
MS	0	0.5	2.88	476	milk white
	50	0.5	1.83	266	milk white
	100	0.5	1.41	182	pale brown
	200	0.5	1.25	150	pale brown
	300	0.5	0.87	74	brown

배지별 Ge농도에 따른 캘러스 내 Ge 및 기타 무기원소의 함량은 표 2와 같다. 배지의 종류에 따라서는 N₆배지보다는 MS배지에서 K를 제외한 모든 원소의 캘러스 내 함량이 높았다. 이는 N₆배지와 MS배지의 조성 중 N₆배지가 MS배지보다 K, S, P의 成分이 높기에 N₆배지에서 K의 함량이 높았던 것으로 생각되며, 두 배지에 동일 농도의 Ge을 첨가하여도 N₆배지보다는 MS배지에서 Ge의 함량이 높았다. 두 배지에서 Ge농도가 높을수록 캘러스 내 Ge함량은 증가되었으며 Ca, Mg, K의 함량은 Ge농도가 높을수록 감소되는 경향이고 N₆배지의 Mn, Cu를 제외하고는 Fe, Mn, Zn, Cu함량 등은 대체로 Ge농도 100~200 mg / l가

지는 증가되나 그 이상의 농도에서는 감소되는 경향이였다.

高橋 等^{16,17)}의 결과에서 벼는 규산 흡수력이 강하기 때문에 Ge 흡수 또한 크다고 한 바 있는데, 벼의 캘러스 내에서도 상당히 높은 Ge이 흡수되었음을 알 수 있다. 차¹⁴⁾에 의하면 羌活에서 GeO₂의 사용량이 많으면 많을수록 캘러스 내 Ge함량이 증가되었는데, GeO₂ 20 mg / l를 사용할 경우 캘러스 중 350ppm까지 증가되었다.

2. Ge 종류 및 농도에 따른 캘러스 내 Ge함량

N₆배지에 2,4-D 2.0 mg / l와 Ge 종류 및 농도를 달리 첨가하여 배지의 pH를 5.7로 조절한 후,

Table 2. Effects of Ge concentration and culture medium on the absorption of germanium and several essential elements of callus induced from brown rice of *Oryza sativa* cv. Dongjinbyeo

Medium	Ge conc. (mg / l)	Ge (ppm)	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Zn	Cu
		 % % ppm ppm ppm ppm	
N ₆	0	—	15.24	0.295	0.271	151	15	40	5
	50	441	14.09	0.277	0.259	166	14	56	6
	100	742	12.59	0.262	0.230	186	12	66	6
	200	1256	11.85	0.252	0.208	192	11	54	6
	300	1876	9.94	0.237	0.185	162	10	40	5
MS	0	—	12.79	0.558	0.377	234	46	92	18
	50	659	11.50	0.527	0.307	248	59	116	21
	100	867	9.64	0.497	0.275	261	65	138	28
	200	1501	9.46	0.468	0.268	281	76	144	28
	300	2096	7.86	0.446	0.237	259	66	101	17

Table 3. Effects of concentrations and compounds of Ge on the callus activity and Ge absorption by callus induced from brown rice of *Oryza sativa* cv. Dongjinbyeo

Ge conc. (mg/l)	Callus treated with GeO ₂			Callus treated with Ge-132*		
	Ge(ppm)	Activity**	Color	Ge(ppm)	Activity	Color
0	-	++	pale brown	-	++	pale brown
25	184	++	"	109	++	"
50	469	+++	"	343	+++	"
75	796	+++	"	534	+++	"
100	878	+++	"	802	+++	"
150	1094	+++	"	1133	++++	pale yellow
200	1224	++	brown	1677	++++	"
250	1623	++	"	2196	++++	"
300	2078	++	"	2753	++++	"

* bis-β-carboxyethylgermanium sesquioxide

** +: poor, ++: moderate, +++: good, ++++: excellent

Table 4. Effect of pH of N₆ medium treated with 50 mg/l Ge on the callus activity and Ge absorption by callus induced from brown rice of *Oryza sativa* cv. Dongjinbyeo

pH of medium	Callus treated with GeO ₂			Callus treated with Ge-132*		
	Ge(ppm)	Activity**	Color	Ge(ppm)	Activity	Color
4.5	623	++	pale brown	555	++	pale brown
5.0	516	++	"	485	++	"
5.5	497	++	"	355	++	"
6.0	385	+++	"	342	+++	"
6.5	379	+++	"	317	+++	"

* bis-β-carboxyethylgermanium sesquioxide

** +: poor, ++: moderate, +++: good, ++++: excellent

캘러스를 치상하고 25℃에서 암배양 4주 후, 캘러스내의 Ge 함량을 조사한 결과는 표 3과 같다. 배지의 Ge 사용량에 따른 캘러스 내 Ge 함량은 무기Ge(GeO₂) 및 유기Ge(Ge-132)의 사용량이 많을수록 증가되었는데, Ge의 사용량이 100 mg/l 이하에서는 무기Ge의 사용이 유기Ge의 경우보다 캘러스 내 Ge 함량이 높았으나 Ge의 사용량이 100 mg/l 이상에서는 유기Ge의 사용이 무기Ge의 경우보다 오히려 높았다. 캘러스의 활력은 무기Ge은 Ge농도 50~150 mg/l, 유기Ge은 Ge농도 150 mg/l 이상에서 좋은 경향이였다.

남궁¹²⁾에 의하면 명일엽과 일당귀의 캘러스 배양에서 무기Ge(GeO₂), 유기Ge(C.E.Ge.O.)의 50 ppm까지 처리한 결과 동일농도에서 두 식물 모두 GeO₂를 처리한 캘러스가 C.E.Ge.O.를 처리한 것보다 Ge함량이 많았다고 하였다.

3. 배지의 pH별 캘러스 내 Ge함량

N₆배지에 2,4-D 2.0 mg/l와 Ge 50 mg/l를 첨가한 후 배지의 pH를 4.5에서 6.5까지 조절하고 배양 4주 후 캘러스 내 Ge 함량을 분석한 결과는 표 4와 같이 배지의 pH가 낮을수록 캘러스활력은 약간씩 떨어지는 경향이나 캘러스 내 Ge 함량은 증가되었으며, 무기Ge(GeO₂) 처리가 유기Ge(Ge-132) 처리보다 캘러스 내 Ge 함량이 높았다. 이는 朴¹⁴⁾이 羌活에서 배지의 pH가 낮을수록 캘러스 내 Ge 함량은 증가한다고 보고한 바와 일치한다.

4. 킬레이트제 첨가에 의한 캘러스 내 Ge함량

Ge의 킬레이트제로 생각되는 citric acid와 myo-inositol을 무처리, 0.1, 1.0, 10.0 mM에

Table 5. Effect of concentration of citric acid and *myo*-inositol in N₆ medium treated with GeO₂(10 mg /l Ge) on the activity and dry weight of callus induced from brown rice of *Oryza sativa* cv. Dongjinbyeo

Compound	Concentration(mM)	Callus activity	Callus dry wt. (g)
Citric acid	0	+	0.320
	0.1	++	0.872
	1.0	++	0.964
	10.0	+	0.270
<i>myo</i> -inositol	0.1	+++	1.199
	1.0	+++	1.214
	10.0	+	0.400

+: poor, ++: moderate, +++: good

Table 6. Effects of concentrations of citric acid and *myo*-inositol in N₆ medium treated with GeO₂(10 mg /l Ge) on the absorption of Ge and some mineral elements by callus induced from brown rice of *Oryza sativa* cv. Dongjinbyeo

Compound	Conc. (mM)	Ge (ppm)	K	Ca %	Mg	Mn	Zn ppm	Cu
Citric acid	0	63	15.16	0.299	0.267	15	45	5
	0.1	75	16.53	0.324	0.308	17	64	9
	1.0	90	17.75	0.313	0.309	22	65	11
	10.0	54	13.96	0.310	0.298	27	50	9
<i>myo</i> -inositol	0.1	82	19.56	0.357	0.329	18	68	13
	1.0	97	18.54	0.332	0.315	20	77	15
	10.0	59	15.25	0.316	0.310	21	72	15

GeO₂를 사용하여 Ge농도 10 mg /l와 2,4-D 2.0 mg /l를 첨가한 N₆배지에서 배양 4주 후 캘러스의 생육 및 Ge 함량을 조사한 결과는 표 5, 6과 같다. 표 5에서 캘러스의 활력은 citric acid와 *myo*-inositol의 무처리보다 0.1, 1.0 mM처리에서 좋았으며, 캘러스의 乾重은 캘러스활력과 같은 경향으로 무처리보다 0.1~1.0 mM에서 좋았고, 10.0 mM에서는 오히려 감소하여 무처리와 비슷한 경향이였다. Citric acid와 *myo*-inositol에서는 citric acid보다 *myo*-inositol이 첨가한 배지에서 캘러스활력이나 건물중이 높은 경향이였다.

캘러스 내 Ge 및 기타 원소의 함량은 표 6에서와 같다. Citric acid나 *myo*-inositol 첨가시 1.0 mM까지는 캘러스 내 Ge함량은 증가되었으나, 10.0 mM에서는 Ge함량이 급격히 저하되어 무처리보다도 낮았다. Citric acid 첨가보다는 *myo*-inositol의 첨가가 벼 캘러스 내 Ge함량이 더 높

았다. 기타 무기원소도 citric acid 첨가시 1.0 mM까지 K, Ca, Mn, Zn, Cu함량이 대체로 높고 10.0 mM에서 감소되었으며, Mg에서는 0.1 mM에서 제일 높고 그 이상 농도에서는 감소되었다. *myo*-inositol에서는 K, Ca, Mg의 함량은 0.1 mM에서 제일 높고 그 이상에서는 감소되었으나, Zn은 1.0 mM에서 제일 높았으며, Mn과 Cu는 10.0 mM까지 증가되는 경향이였다. 이들 무기원소도 citric acid보다는 *myo*-inositol의 첨가에서 대체로 캘러스 내 함량이 높았다.

明日葉에서 토양에 GeO₂와 citric acid 1 mM을 혼용처리하면 GeO₂ 단독처리보다 Ge 흡수가 증가되었으나, citric acid 10~100 mM을 혼용처리하면 GeO₂ 단독처리보다 Ge 흡수는 낮아지는 경향이였다¹²⁾. Cu와 Zn은 토양의 유기물과 결합하여 식물이 흡수하기 어려운 상태로 되기에 원소의 결핍을 초래한다고 하며¹⁸⁾, 明日葉에서도 Ge

과 citric acid를 혼용처리했을 경우에 Cu와 Zn은 citric acid의 첨가농도가 높을수록 낮아지는 경향이었다¹²⁾.

摘 要

동진벼의 현미에서 켈러스를 유도하여 증식할 경우 Ge첨가가 켈러스 내의 Ge함량에 미치는 영향을 검토한 결과는 다음과 같다.

배지별 Ge농도에 따른 켈러스증식율과 켈러스 내 Ge 및 무기원소의 함량은 N₆배지보다는 MS배지에서 켈러스증식이 좋았으며, 켈러스 내 K함량을 제외하고는 Ge 및 기타 무기원소의 함량이 대체로 높았다.

N₆배지와 MS배지 내 Ge농도가 높을수록 켈러스증식율은 감소되나 켈러스 내 Ge함량은 증가되었고 Ca, Mg, K의 함량은 감소되며 Fe, Mn, Zn, Cu의 함량 등은 Ge농도 100~200 mg/l까지는 증가되나 그 이상 농도에서는 감소되는 경향이었다.

Ge의 종류 및 농도에 따른 켈러스 내 Ge함량은 처리한 Ge농도가 높을수록 증가되었는데, Ge 사용량이 100 mg/l 이하에서는 무기Ge(GeO₂) 처리가 유기Ge(Ge-132) 처리보다 켈러스 내 Ge함량이 높았으나, 그 이상의 농도에서는 유기Ge 처리가 무기Ge 처리보다 켈러스 내 Ge함량이 높았고 켈러스 활력도 좋았다.

배지의 pH가 낮을수록 켈러스의 활력은 떨어지나 켈러스 내 Ge함량은 높았으며, citric acid와 myo-inositol의 0.1~1.0 mM을 배지에 처리한 경우 무시용보다 켈러스생육이나 켈러스 내 Ge 및 기타 무기원소의 함량이 증가되었는데, citric acid보다는 myo-inositol의 시용에서 더 증가되었다.

引用文獻

1. 浅井一彦. 1985. 驚異の元素ゲルマニウムと私. 玄同社, 東京, p. 28.
2. Aso, H., F. Suzuki, T. Ebina, and N. Ishida. 1989. Antiviral activity of carboxyethylgermanium sesquioxide(Ge-132) in mice infected with influenza virus. J. Biol. Respose Mod. 8(2):180.
3. Chu, C. C. 1978. The N₆ medium and its applications to anther culture of cereal crops. In Proc. Symp. Plant Tissue Culture, Science Press, Peking, pp. 43-50.
4. DiMartino, M. J. 1986. Antiarthritic and immunoregulatory activity of spirogermanium. J. Pharmacol. Exp. Ther. 236(1):103.
5. Harisch, G. 1985. Glutathione and glutathione-dependent enzymes of the rat liver after different doses of Sanumgerman. In "1st. Conf. on germanium" Hannover, Oct. 1984. Lekin & Samochowiec (eds.), Semmelweis-Verlaa.
6. Ishida, N., F. Suzuki, and Y. Hayashi. 1979. Antitumor effects of organogermanium compound (Ge-132) in mouse tumors. Proc. Jpn. Cancer Assoc. II. Annual Meeting, p. 193.
7. Jao, S. W., W. Lee, and Y. S. Ho. 1990. Effect of germanium on 1,2-dimethylhydrazine-induced intestinal cancer in rats. Dis. Col. & Rect. 33:99-104.
8. Komuro, T., N. Kaimoto, T. Katayama, and T. Hazato. 1986. Inhibitory effects of Ge-132 derivatives on enkephalin-degrading enzymes. Biotechnol. Appl. Biochem. 8:379.
9. Lee, H. M. and Y. Chung. 1991. Effect of organic germanium on metallothionein in liver and kidney of cadmium and mercury intoxicated rats. Yakhak Hoeii 35(2):99.
10. Mochizuki, H. and T. Kada. 1982. Antimutagenic effect of Ge-132 on γ -ray-induced mutation in *Escherichia coli* B/r Wp2 trp-. Int. J. Radiat. Biol. 42(6):

- 653.
11. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
 12. 南宮承泊. 1996. *Angelica*屬 植物의 器內培養 및 Germanium 含量 增大. 圓光大學校 大學院 博士學位論文(農學科).
 13. Oikawa, H. and N. Kakimoto. 1968. Synthesis of carboxyethylgermanium sesquioxide compound. *Proceedings of the 21st Annual Meeting of Japan Chemical Society*, p. 1946.
 14. 朴炳雨. 1996. 羌活의 켈러스 및 植物體中 Ge 含量에 미치는 GeO_2 와 Citric acid의 影響. 圓光大學校 大學院 碩士學位論文(農學科).
 15. Suzuki, F., R. R. Brutkiewicz, and R. B. Pollard. 1986. Cooperation of lymphokine(s) and macrophages in expression of antitumor activity of carboxyethylgermanium($Ge-132$). *Anticancer Res.* 62 (2):177.
 16. 高橋英一, 蕭聰明, 三宅靖人. 1976. ケイ酸植物のゲルマニウムに對する生育反應の特異性について(その1). ケイ酸の比較植物營養學的研究(第1報). *日土肥誌* 47(5):183-190.
 17. _____, 蕭聰明, 三宅靖人. 1976. ケイ酸植物のゲルマニウムに對する生育反應の特異性について(その2). ケイ酸の比較植物營養學的研究(第2報). *日土肥誌* 47(5):191-197.
 18. _____. 1993. 作物營養の基礎知識. 養分の吸収と生長. 農山漁村文化協會, 東京, pp. 121-122.