

게르마늄강화효모 내의 GeO₂ 정성분석

김소연 · 김명희 · 우희권* · 김보혜¹ · 손창욱² · 정진욱² · 백대헌²

전남대학교 화학과 나노기술연구센터, ¹동신대학교 한약재산업학과, ²계란티제약(주) 중앙연구소

Qualitative Analysis of GeO₂ in Germanium-Fortified Yeast. Kim, So-Yeun, Myoung-Hee Kim, Hee-Gweon Woo*, Bo-Hye Kim¹, Tsang-Uk Sohn², Jin-Wook Jung², and Dae-Heoun Baek². Department of Chemistry and Nanotechnology Research Center, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea, ¹Department of Korean Medicinal Supply, Dongshin University, Naju 520-714, Korea, ²Geranti Pharm. Ltd., 678-20 Yeoksam-dong, Kangnam-gu, Seoul 135-080, Korea – This study was designed to investigate that inorganic germanium (GeO₂) did not exist in germanium-fortified yeast or obtained to non-detectable value by current analytical methods and equipments. For this purpose, we achieved GeO₂ qualitative analysis protocol which could be the scientific basis of the study. Since reddish brown precipitate was formed from the reaction of GeO₂ with 1 equiv NaBH₄, and dark brown precipitate was also formed from the reaction of GeO₂ with 2 equiv NaBH₄, GeO₂ was qualitatively analyzed by observing these particular colored-precipitates. Because no color change was showed from the reaction between NaBH₄ and SiO₂, the color change could be caused by charge transfer transition on Ge-O and B binding properties. The reaction between NaBH₄ and germanium-fortified yeast did not show any color change and precipitate formation which meant no GeO₂ existed in germanium-fortified yeast. The reaction between NaBH₄ and supernatant specimen collected from the outside of dialysis membrane (MWCO 1,200 dalton) did not show any color change and precipitate formation. Therefore, we considered that the both germaniums in and outside of the dialysis membrane were organic germaniums. Germanium-fortified yeast which was biosynthesized organic germanium can be applied not only as a new functional material for improving health, prevention and treatment of chronic degenerative diseases including cancers, and the regulation of immune system, but also as a new materials.

Key words: Germanium-fortified yeast, germanium dioxide, germanium-amino acid, sodium borohydride

서 론

탄소(C)와 같은 4A족(최근 IUPAC의 결정에 의해 14족으로 불림)에 속하는 게르마늄(Ge)은 실리콘(Si)과 함께 반도체 산업에 널리 쓰이고 있다. 게르마늄은 지각에 다량 존재하는 실리콘에 비해 자연에 존재하는 양이 극히 적으며, 화학적 성질은 탄소와 주석(Sn) 양쪽 모두의 특성을 나타내고 있다. 경이롭게도 실리콘과 주석은 산화물 형태로 최근에 비타민제에 보충 디네랄로서 첨가되기 시작하였다 (www.certrum.com).

게르마늄 원소는 1886년 독일의 화학자 Clemen Winkler에 의해 최초로 발견되었다. 이후 1930년에 이르러 노벨의 화학 수상자인 A. Alexis Carrel 박사 등에 의해 프랑스와 스페인의 국경에 위치한 Lourdes 샘물이 암, 결핵, 뇌종양 등 여러 가지 난치병에 큰 효과가 있다고 알려져 성분을 분석한 결과, 높은 함량의 게르마늄에 의해 치료효과가 나타난다는 보고서를 통해 게르마늄의 의학적 효능이 처음 발견되었다

[2, 9]. 그 후 체내에 잔류하지 않고 다양하고 강력한 약리작용을 보이는 유기게르마늄에 대한 연구가 활발히 진행되었고, 최근에는 게르마늄이 강화된 쌀, 달걀, 참외, 버섯, 감귤 등이 생산되기에 이르렀다. 예로부터 전통적으로 보양강장제로 이름이 높아 동의보감에 그 효능이 밝혀진 인삼, 마늘, 영지버섯, 알로에, 개 등 다양한 천연 약용식물에 비교적 많은 유기게르마늄이 함유된 사실이 밝혀졌다[5, 12]. 1960년대에 이르러 일본의 Kazuhiko Assai 박사에 의해 Ge-132 (Organic Germanium-132, bis(2-carboxyethylgermanium (IV)) sesquioxide: O[Ge(=O)CH₂CH₂C(=O)OH]₂)라는 유기 게르마늄이 세계 최초로 화학적으로 실험실에서 합성 개발되었다[1]. 그 동안 고농도의 인체에 안전한 유기게르마늄을 미생물을 이용하여 짧은 시간에 대량생산하기 위한 많은 연구들이 진행되었다. Nobuhiro 등은 게르마늄을 함유하는 효모의 생산 가능성을 제시하였고[8], 미생물 내의 유기게르마늄의 축적에 관한 활발한 연구 결과 Klapinska 등이 *Pseudomonas putida* 세포 내에서 유기게르마늄의 축적은 주로 soluble fraction에서 이루어지고 이 중 대다수가 핵산과 단백질에 결합되어 있다는 것을 전자현미경 분석사진을 통해 확인하였다[4]. Wei는 효모가 고농도의 무기게르마늄을

*Corresponding author

Tel: 82-62-530-3378, Fax: 82-62-530-3389

E-mail: hgwoo@ch.onnam.ac.kr

흡수할 수 있으며 효모 균체 내에 축적된 게르마늄이 유기 게르마늄임을 밝힘으로써 효모가 무기게르마늄을 유기게르마늄으로 전환하는 능력이 있음을 보고하였다[13]. 또한 Lynn 등은 효모 내에서 대사과정에 의해 무기게르마늄이 유기게르마늄으로 전환되어, 생물학적 동화과정에 의해 독성이 없어진다는 연구를 통해 효모가 무기원소의 독성을 무력화시킨다고 보고하였다[7]. Sanai 등은 유기게르마늄과 무기게르마늄을 비교 실험하여 유기게르마늄의 안전성을 보고한 연구결과를 발표했고[10], 또한 유기게르마늄은 인체에 안전하고 약리효과가 매우 탁월하지만 무기게르마늄의 경우 신장 및 간 기능 장애를 일으킨다는 일부 보고가 있다[11].

현재까지 자연계에서의 게르마늄은 Ge 총량으로 분석되고 있으며 유·무기게르마늄의 선택적 특성분석과 이를 위한 정성, 정량 분석법에 대한 기준은 국내외를 통해 전무한 상태이다. 따라서 본 연구에서는 효모 내에서 발효 초기에 이용되는 원료물질인 무기게르마늄(GeO_2)이 생합성과정을 통해 인체에 유익한 유기게르마늄으로 전환됨을 확인하고 이를 정성적으로 검증하기 위한 분석 프로토콜을 제시하고자 하였으며, 게르마늄강화효모 내에 유해한 무기게르마늄은 존재하지 않거나 실질적으로 “검출 불가(n.d: non-detectable)” 수준임을 확인하기 위한 목적으로 수행하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 연구에 사용된 효모는 생명공학연구소(KRIBB) 유전자은행(KCTC)에서 분양 받은 *Saccharomyces cerevisiae* (KCTC-7904) 균주를 사용하였다. 배지는 펩톤 0.3~0.5%, 효모추출물 0.1~0.3%, 포도당 3~5%, 맥아추출물 0.1~0.3%를 함유하는 YM broth(Difco, NJ, USA)를 사용하였으며, Lee [5] 등이 발견한 20시간의 배양시간으로 pH 4~8과 20~50°C의 배양조건 하에서 균체를 생산하였다.

실험 재료

유기게르마늄을 함유한 효모는 게란티제약(주)에서 생산한 Geranti Bio Ge-Yeast 제품을 사용하였고, 효모 내의 게르마늄 함량측정을 위한 대조군으로 사용한 99.99%의 GeO_2 powder는 독일 PPM사로부터, 게르마늄 표준액 (Ge standard solution), 탄산칼슘, NaBH_4 , D_2O , CDCl_3 등은 Sigma Aldrich로부터 각각 구입하여 정제 없이 즉시 사용하였다. Bis-histidino germanate와 bis-glycino germanate는 문헌에 보고된 방법에 의해 합성하였다[3].

실험 기기

원심분리기는 한일과학 MF 300 모델을 사용하였다. 초음파 활성을 위해 초음파 세척기(Branson 5510 또는 Daihan D250H)에 물을 전파 매질로 사용하여 시행하였다.

시료 분석

게르마늄의 단백질에 대한 결합상태를 확인하기 위해 게르마늄강화효모 Geranti Bio Ge-Yeast를 대상으로 한 실험에서 얻어진 ^1H NMR 스펙트럼의 복잡성과 MWCO 1,200의 투석막을 통과하지 못하는 고분자인 것으로 미루어[6] 게르마늄강화효모 내의 대부분의 게르마늄은 Ge-폴리펩티드(혹은 올리고펩티드) 형태로 존재하는 유기게르마늄들일 것으로 생각된다. 아래에 따로 기술한 것처럼 투석막 외부에 존재하는 게르마늄의 유기태(organic form) 여부를 확인하기 위해 99.99% GeO_2 (control), Ge-amino acid 화합물, Geranti Bio Ge-Yeast 및 기타 대조 물질들을 각각 600 MHz NMR(Bruker Advance 600 spectrometer with 5 mm TXI PFG inverse probe head, Germany)에서 ^1H NMR 스펙트라 라이브러리를 얻음으로써 게르마늄강화효모 내에 존재하는 게르마늄의 유기태 여부를 확인하였다. GeO_2 정성분석 실험 시 나타나는 발색 침전반응의 분광학적 데이터는 고체 UV-VIS 스펙트럼을 찍은 결과를 통해 얻었으며, Biorad사(USA)의 FTS-3000(Golden Gate single reflection diamond ATR) 모델의 FT-IR spectrometer를 이용하여 그 차이를 비교하였다. 결정구조를 알아보기 위한 XRD 분석은 Bruker 사 (Germany)의 D4 Endeavor 모델의 XRD($\text{Cu K}\alpha$, $\lambda=1.541\text{\AA}$)를 사용하여 $2\theta = 10\sim 70^\circ$ 범위에서 측정하였다. 침전 시료들의 성분조성분석을 위한 ICP-AES 분석은 한국기초과학지원연구원 광주센터에 의뢰해 얻었다.

GeO_2 정성분석

물에서 1당량의 SiO_2 와 2당량의 NaBH_4 와의 반응: 공기 중에서 100 ml 둥근 바닥 플라스크에 흰색 실리카 분말 (SiO_2 , 8.3 mmol, 0.5 g)에 2차 증류수(10 ml)를 가한 후에 10분 정도 상온에서 강하게 교반하였다. 또한 NaBH_4 (17 mmol, 0.64 g)에 2차 증류수(10 ml)를 가한 후에 상온에서 강하게 교반하여 녹이고, 실리카 서스펜션 용액에 NaBH_4 용액을 가한 후 12시간 동안 상온에서 강하게 교반하였다. 또한 추가로 1시간가량 초음파를 가하여 기포 발생, 색 변화 및 새로운 침전 생성 등이 일어나는지를 관찰하였다.

물에서 1당량의 GeO_2 와 1당량의 NaBH_4 와의 반응: 공기 중에서 100 ml 둥근 바닥 플라스크에 흰색 GeO_2 분말(4.8 mmol, 0.50 g)에 2차 증류수(10 ml)를 가한 후에 10분 정도 상온에서 강하게 교반하였다. 또한 NaBH_4 (5.0 mmol, 0.19 g)에 2차 증류수(10 ml)를 가한 후에 상온에서 강하게 교반하여 녹였다. GeO_2 서스펜션 용액에 NaBH_4 용액을 가한 후 12시간동안 상온에서 강하게 교반하였다. 이 때 분석조건은 ICP-AES 분석의 기기측정치(ppm)는 Ge(35.53), Na(79.89), B(6.248)이었고, IR(KBr pellet)은 3400 vs br(O-H, 수분), 2131 w, 1655 s, 1388 m, 1163 w, 1024 w, 758 m, 507 m이었으며, 고체 UV-VIS 스펙트럼(λ_{abs})은 200~300 nm(max), 300~550 nm(tailing), 그리고 XRD(2θ)

는 10도였다.

물에서 1당량의 GeO_2 와 2당량의 NaBH_4 와의 반응: 공기 중에서 100 ml 둥근 바닥 플라스크에 흰색 GeO_2 분말(4.8 mmol, 0.50 g)에 2차 증류수(10 ml)를 가한 후에 10분 정도 상온에서 강하게 교반하였다. 또한 NaBH_4 (10 mmol, 0.38 g)에 2차 증류수(10 ml)를 가한 후에 강하게 교반하여 녹인다. GeO_2 서스펜션 용액에 NaBH_4 용액을 가한 후 12시간 동안 상온에서 강하게 교반하였다. 이 때 분석조건은 ICP-AES 분석의 기기 측정치(ppm)는 Ge(0.776), Na(825.3), B(125.7)이었고. IR(KBr pellet)은 3273 br(O-H, 수분), 1969 w, 1622 w, 1076 w, 769 m, 529 m이었으며, 고체 UV-VIS 스펙트럼(λ_{abs})은 200~350 nm(max), 350~1,100 nm (tailing), 그리고 XRD(2 θ)는 27도, 50도였다.

물에서 1당량의 Na_2CO_3 , 1당량의 GeO_2 와 2당량의 NaBH_4 와의 반응: 공기 중에서 100 ml 둥근 바닥 플라스크에 흰색 Na_2CO_3 (4.8 mmol, 0.51 g)에 2차 증류수(40 ml)를 가한 후에 5분 정도 상온에서 강하게 교반하여 녹였다. 이 수용액에 흰색 GeO_2 분말(4.8 mmol, 0.50 g)을 가한 후에 5분 정도 강하게 교반하여 녹였다. 또한 NaBH_4 (10 mmol, 0.38 g)에 2차 증류수(10 ml)를 가한 후에 강하게 교반하여 녹였다. Na_2CO_3 - GeO_2 물유리 용액에 NaBH_4 용액을 가한 후 12시간 동안 상온에서 강하게 교반하였다.

물에서 1당량의 bis-glycino germanate와 2당량의 NaBH_4 와의 반응: 공기 중에서 30 ml 바이알에 bis-glycino germanate (0.42 mmol, 0.10g)에 2차 증류수(5 ml)를 가하여 O=Ge(glycine)₂ 수용액을 만든 후에 10분 정도 상온에서 강하게 교반하여 녹였다. 또한 NaBH_4 (0.84 mmol, 0.032 g)에 2차 증류수(5 ml)를 가한 후에 강하게 교반하여 녹인 후 이 용액을 O=Ge(glycine)₂ 수용액에 가하였다.

물에서 1당량의 글리신과 2당량의 NaBH_4 와의 반응: 공기 중에서 100 ml 둥근 바닥 플라스크에 글리신(4.2 mmol, 0.3 g)에 2차 증류수(10 ml)를 가한 후에 5분 정도 상온에서 강하게 교반하여 녹였다. 또한 NaBH_4 (8.4 mmol, 0.32 g)에 2차 증류수(10 ml)를 가한 후에 강하게 교반하여 녹였다. 글리신 수용액에 Na_3BH_4 용액을 가하였다.

물에서 Geranti Bio Ge-Yeast와 과량의 NaBH_4 와의 반응: 공기 중에서 100 ml 둥근 바닥 플라스크에 몰타르에서 곱게 갈아 분말 상태로 만든 게르마늄강화효모(0.5 g)에 2차 증류수(10 ml)를 가한 후에 5분 정도 상온에서 강하게 교반하니 서스펜션이 얻어졌다. 또한 NaBH_4 (17 mmol, 0.64 g)에 2차 증류수(10 ml)를 가한 후에 강하게 교반하여 녹였다. Geranti Bio Ge-Yeast 서스펜션에 NaBH_4 용액을 가한 후 24시간 동안 상온에서 맹렬하게 교반하여 기포 발생, 색 변화, 침전 생성 등을 관찰하였다. 또한 MWCO 1,200 dalton의 투석막을 통과한 상등액에 대해서도 NaBH_4 로 실험한 결과 마찬가지로 24시간 동안 상온에서 맹렬하게 교반하여 기포 발생, 색 변화, 침전 생성 등을 관찰하였다.

GeO_2 정량분석

GeO_2 는 염기성염인 알콕시염(R-ONa 형태) 또는 중성 알콕아민($\text{N}((\text{CH}_2)_n\text{OH})_3$)과 반응하여 알콕시기가 치환된 다양한 유기게르마늄 화합물들을 형성한다고 알려져 있다. 또한 GeO_2 는 $(\text{Me}_3\text{Si})_2\text{NH}$ 와 물에서 반응하여 예상되는 $\text{Ge}[\text{N}(\text{SiMe}_3)_2]_4$ 대신에 $\text{Ge}(\text{OSiMe}_3)_4$ 를 형성한다고 알려져 있다. 최근 연구에 의하면 GeO_2 는 1당량의 Na_2CO_3 염기 존재 하에서 비교적 크기가 큰 아미노산들인 히스티딘, 메티오닌, 글루타티온 등의 아미노산과 반응하여 단량체 형태의 $\text{O}=\text{Ge}(\text{HN}-\text{CH}(\text{R})\text{C}(=\text{O})\text{OH})_2$ 가 생성된다고 보고되었다. 따라서 GeO_2 의 정량분석은 다음과 같은 실험을 통해 가능할 것으로 사료되어 아래의 방법으로 진행하였다. 첫째, GeO_2 와 각종 아미노산 또는 유기산을 반응시켜 Ge-Amino acid가 결합된 형태의 유기게르마늄 화합물을 얻는다. 이때 화합물의 구조는 반응에 사용한 아미노산 혹은 유기산이 무엇인가에 따라 결정되므로 쉽게 알 수 있다. 둘째, 이 화합물에 기지 농도의 기준물질을 첨가한 후 ^1H NMR 스펙트럼을 찍는다. 셋째, 이 스펙트럼에서 인테그랄(적분)비를 비교하여 GeO_2 의 정확한 존재량을 정량적으로 분석한다 물론 ^1H NMR 스펙트럼을 얻지 못할 정도의 미량이 존재할 경우 ICP로 정량분석 할 수 있다. 본 연구의 목적은 GeO_2 의 정성분석이며 Geranti Bio Ge-Yeast 내에 GeO_2 가 존재할 경우의 분석법으로 이용될 수 있다.

투석실험

투석실험을 위해 NaCl 2.0 g과 35~37%의 HCl 8.2 ml를 혼합한 후 증류수 1,000 ml를 채워 인공위액(SGF, Simulated Gastric Fluids)을 제조하였으며, $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 의 항온조에서 2시간 반응시킨 후 산 가수분해의 반응종결을 위해 50 mM NaOH를 가하여 중화시켰다. 투석막(Sigma, MWCO 1,200 dalton) 내부에는 분자량이 1,200 dalton 보다 큰 폴리펩타이드 수준의 단백질과 게르마늄이 결합된 형태의 유기게르마늄으로 간주하였으며 투석막 외부로 흘러나온 게르마늄을 분석한 결과 무기게르마늄이 아니라 분자량이 작은 소중합체 수준의 올리고 펩타이드와 게르마늄이 결합된 유기게르마늄으로 간주하였다.

결과 및 고찰

본 연구는 효모 내에서 생합성된 유기게르마늄을 함유한 게르마늄강화효모 Geranti Bio Ge-Yeast 내의 무기게르마늄의 잔존 여부를 GeO_2 의 정성 정량 프로토콜에 의한 실험을 통해 확인하기 위하여 수행하였다. 대조군으로는 99.99%의 GeO_2 (PPM사, 독일)를 사용하여 이를 NaBH_4 와 반응시켜 발색 침전반응을 관찰하였고, 게르마늄강화효모와 MWCO 1,200 dalton의 투석막을 통과한 여과액을 각각 NaBH_4 와 반응시켜 발색과 침전물 형성을 비교 관찰하였다. 또한

GeO₂와 아미노산(히스티딘과 글리신)을 반응시켜 합성한 O=Ge(아미노산)₂에 대해서도 같은 실험을 수행하였으며 그 결과는 다음과 같다.

GeO₂ 정성분석

GeO₂의 정성분석은 알콕시(RO⁻) 또는 아세톡시 [CH₃C(=O)O⁻] 음이온을 GeO₂와 반응시켜 Ge(OR)₄ 또는 Ge(OAc)₄로 변환시키는 방법도 가능할 것으로 생각되나, 여기에서는 NaBH₄와 GeO₂를 반응시켜 불용성 갈홍색 (또는 진한 갈색; 가해주는 NaBH₄ 농도에 따라 색이 약간씩 다름) 물질의 침출을 보는 방법을 택하여 정성분석 프로토콜을 수립하였다. Geranti Bio Ge-Yeast 내의 GeO₂ 잔존 여부를 확인하기 위한 대조군으로서 독일 PPM 사에서 구입한 99.99%의 GeO₂ 분말을 사용하였다. 참고로, GeO₂와 NaBH₄의 반응에서 일어나는 발색 및 침전과 관련된 GeO₂의 검출한계 (LOD: Limit of Detection)를 알아보기 위해 NaBH₄와 반응하는 GeO₂의 양과 용매의 양을 조절하여 다음과 같이 실험을 수행하였다. 즉, GeO₂ 0.1당량 서스펜션 용액(GeO₂ 0.05 g, D.W 10 ml)에 NaBH₄ 용액(NaBH₄ 0.19 g, D.W 10 ml)을 가한 후 12시간 동안 상온에서 강하게 교반한 결과 노랑색으로의 발색은 관찰되었으나 침전이 관찰되지 않았으므로 이를 과량의 용매에 의한 것으로 보고 용매의 양을 20 ml에서 1 ml로 줄여 GeO₂ : NaBH₄ = 1 : 2의 비율로 실험을 진행해 본 결과, 예상대로 침전과 발색을 확인할 수 있었다.

용매의 양을 줄인 상태에서 GeO₂ 0.01 g으로 실험한 결과에서도 미세한 노랑색으로의 발색이 관찰되었고, 물을 날린 후 미세한 침전을 얻었다. 용매의 양을 0.1 ml까지 줄여서 실험한 결과, GeO₂의 스케일을 0.0001 g(0.1 mg)로 줄여도 미세한 침전과 색변을 관찰할 수 있었다. 결론적으로 용매를 줄일 경우 본 프로토콜에 의해 GeO₂를 0.1 mg까지도 검출할 수 있으므로(LOD: Limit of Detection 0.1 mg) 미국 FDA 기준치 1.5 mg를 고려할 때 매우 만족스러운 결과를 확보할 수 있었다. 1당량의 NaBH₄를 GeO₂에 가하면 1분 후부터 노랑색으로의 색 변화와 함께 수소 기포 발생이 관찰되었으며, 1시간 이내에 계속되는 기포 발생과 함께 갈홍색 침전이 생성되었다. 이 반응은 초음파를 가하면 더 빨리 진행되었으며 12시간 후 여과, 세척 및 건조하여 ~98% 수율로 얻어진 갈홍색 침전을 Fig. 1과 같이 고체 UV-VIS를 찍었을 때 200~300 nm에서 매우 큰 흡수 띠가 보이고 300~550 nm까지 tailing이 관찰되었으며(Fig. 1), XRD를 찍었을 때 10 도 부근에 결정성 분리띠가 확인되었다(Fig. 2). 그리고 2당량의 NaBH₄를 GeO₂에 가하면 반응 1분 후부터 노랑색으로의 색 변화와 함께 기포 발생이 관찰되었다. 계속되는 기포 발생과 함께 점차 노랑색에서 갈홍색으로 그리고 최종적으로 흑갈색으로 20분 이내에 변하였다. 이 반응은 초음파를 가하면 더 빨리 진행되었으며 12시간 후 원

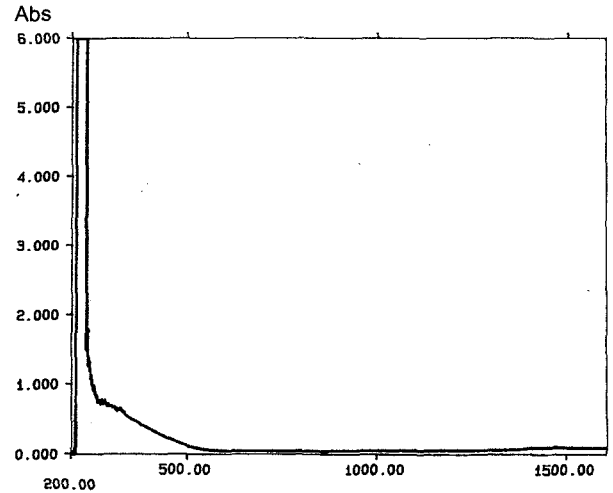


Fig. 1. Solid state UV-VIS spectrum of precipitate from the reaction of GeO₂ with 1 equiv NaBH₄.

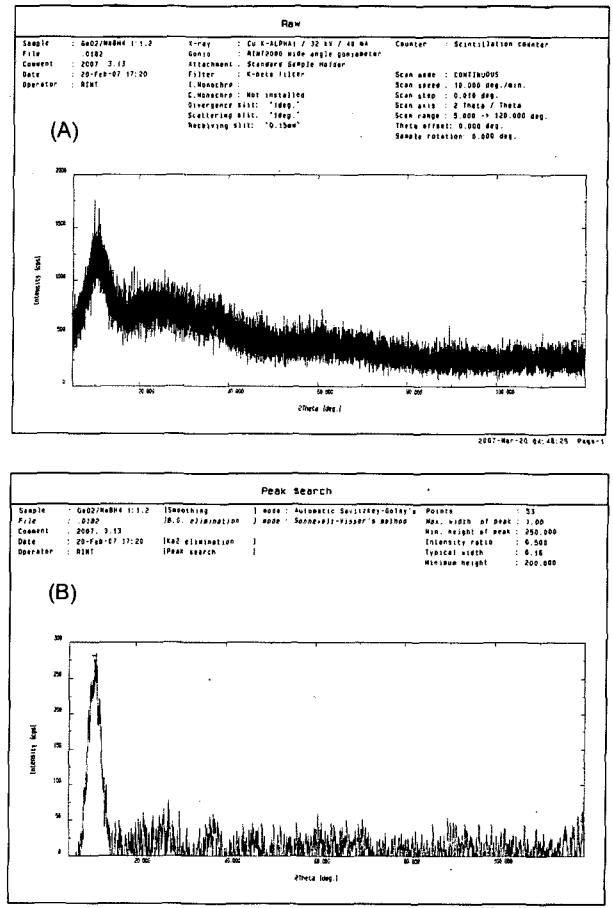


Fig. 2. XRD pattern of precipitate from the reaction of GeO₂ with 1 equiv NaBH₄.

심분리, 여과, 물로 세척 및 건조하여 ~100% 수율로 얻어진 흑갈색 침전을 고체 UV-VIS를 찍었을 때 200~350 nm에서 매우 큰 흡수띠가 보이고 350~1,500 nm까지 tailing이 관찰

되었으며(Fig. 3), XRD를 찍었을 때 27도와 50도 부근에 결정성 피크가 확인되었다(Fig. 4). 참고로 GeO_2 의 XRD 피크는

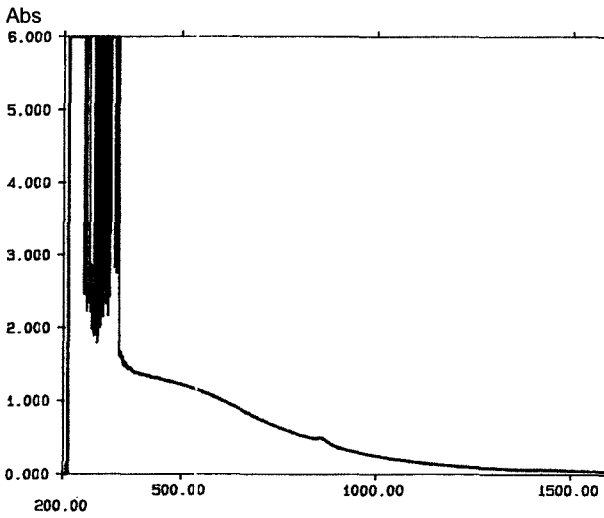


Fig. 3. Solid state UV-VIS spectrum of precipitate from the reaction of GeO_2 with 2 equiv NaBH_4 .

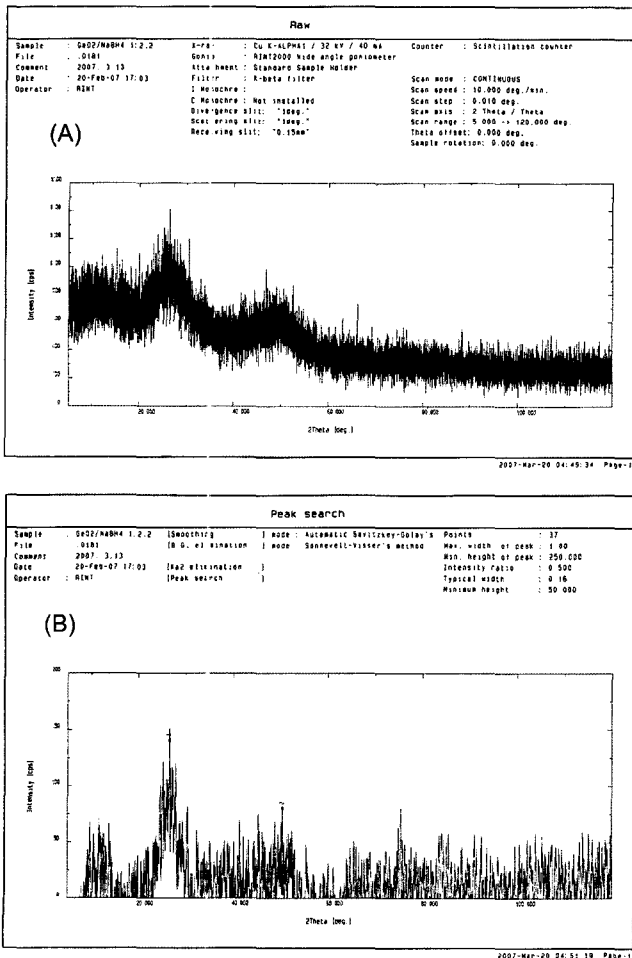


Fig. 4. XRD pattern of precipitate from the reaction of GeO_2 with 2 equiv NaBH_4 .

20~70도에 다수 존재하지만 비교 결과 GeO_2 는 존재하지 않음을 발견하였다[6]. 이 독특한 색을 띠는 침전 생성으로부터 GeO_2 의 존재를 정성적으로 분석이 가능하였다.

한편, GeO_2 와 NaBH_4 는 물에 서서히 녹아 무색인데 그 반응 생성물인 갈홍색(1:1 몰비) 또는 진한 갈색(1:2 몰비)의 침전물은 물에 녹지 않으므로 GeO_2 가 아님을 알 수 있었으며, 그 물질의 구조를 유추하기 위해 원심분리기(3,000 rpm, 10분)를 사용하여 회수 후 수 차례 2차 증류수로 세척하고 진공오븐(10^{-2} torr, 80°C)에서 건조하였다. 건조 후 이들 시료들의 용해도와 녹는점을 측정할 수 없었는데 그 이유는 시료들이 용매에 녹거나 용융되지 않았기 때문이다. 생성물의 결정상 확인을 위하여 XRD 분석을 하였고(Fig. 2, 4) IR (Fig. 5, 6)로도 분석을 시행하였다.

침전반응이 GeO_2 의 존재와 관계가 있는지의 여부를 알아보기 위해 1당량의 Na_2CO_3 와 1당량의 GeO_2 와 2당량의 NaBH_4 를 반응시켜 보았으며, 이때 반응 5분 후부터 노랑색으로의 색 변화와 함께 기포 발생이 관찰되었다. 계속되는 기포 발생과 함께 점차 노랑색이 갈홍색, 진한 갈색 그리고 최종적으로 흑갈색으로 1시간 이내에 변화하였다. 이후 흑갈색 침전 생성이 시작되어 점차 양이 많아졌다. 12시간 후 원심분리, 여과, 물로 세척 및 건조하여 ~100% 수율로 흑갈색 침전이 얻어졌다. 이 반응은 초음파를 가하면 더 빨리 진행되었다.

1당량의 bis-glycino germanate와 2당량의 NaBH_4 와의 반응에서는 서서히 노랑색으로 변화했으나 예상대로 침전이 얻어지지 않았다. 이는 반응물에 GeO_2 가 존재하지 않기 때문일 것으로 생각되며 Bis-histidino germanate에 대해서도 비슷한 결과가 얻어졌다. 마찬가지로 1당량의 글리신과 2당량의 NaBH_4 와의 반응에서도 색 변화나 침전 생성이 관찰되지 않았다.

이를 토대로 Geranti Bio Ge-Yeast와 과량의 NaBH_4 를 반응시켜 보았으며 Geranti Bio Ge-Yeast 서스펜션에 NaBH_4 용액을 가한 후 24시간 동안 상온에서 맹렬하게 교반하였으나 기포 발생, 색 변화, 침전 생성 등이 관찰되지 않았다. 또한 MWCO 1,200 dalton의 투석막을 통과한 상등액에 대해서도 NaBH_4 로 실험한 결과 24시간 동안 상온에서 맹렬하게 교반하였으나 기포 발생, 색 변화, 침전 생성 등이 관찰되지 않아 Geranti Bio Ge-Yeast 내에 GeO_2 가 존재하지 않음을 정성적으로 확인할 수 있었다.

결국 불용성 침전 고체 시료의 XRD, UV-VIS 및 IR 분석으로부터 갈홍색 침전물에 GeO_2 는 없음이 확인되었고, ICP-AES 분석을 통해 침전물은 GeO_2 와 NaBH_4 의 반응에 의해 NaGeBO_x 의 형태를 가진다는 것을 알 수 있었다. SiO_2 와의 반응 시 색 변화가 일어나지 않는 것으로 보아 색은 Ge-O와 B간의 결합에 의해 생기는 특수한 전자전이 때문일 것으로 생각된다. 왜냐하면, 일반적으로 색의 발현은 라디칼종일 경우, 불포화 유기물질 내에 길게 확장된 공액현상, 전

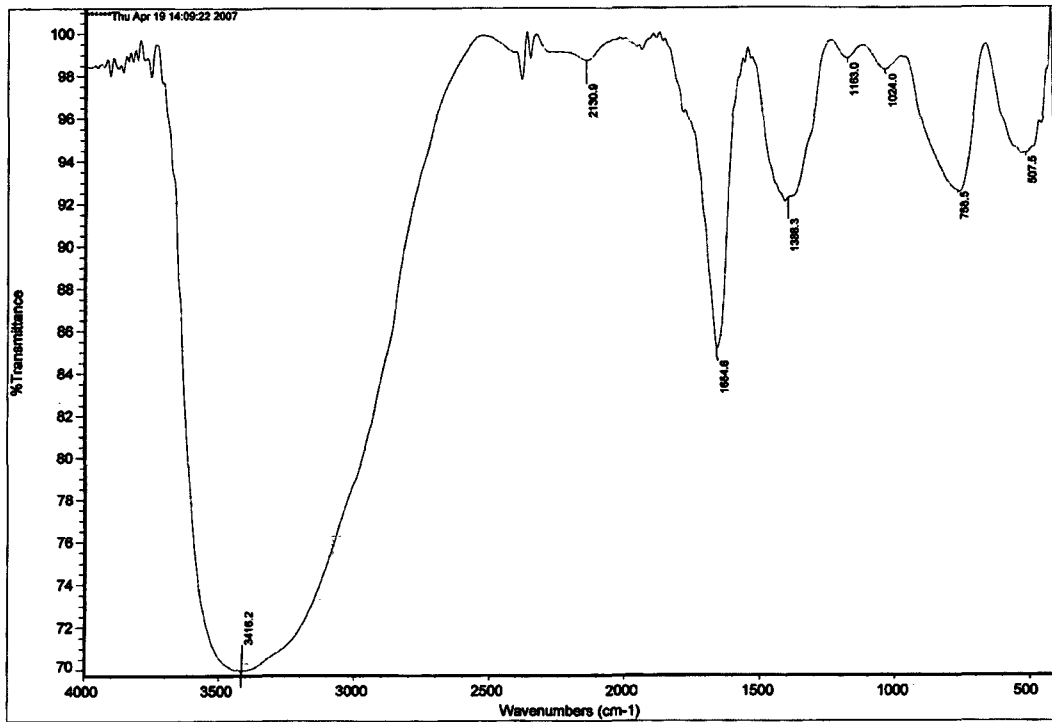


Fig. 5. IR spectrum of precipitate from the reaction of GeO_2 with 1 equiv NaBH_4 .

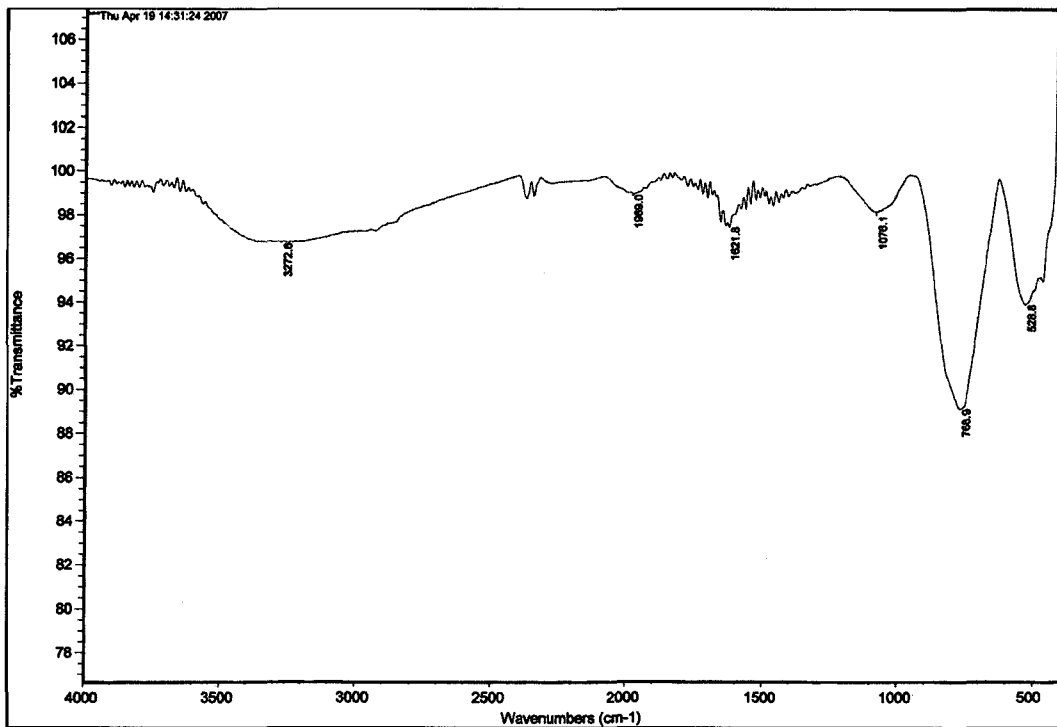


Fig. 6. IR spectrum of precipitate from the reaction of GeO_2 with 2 equiv NaBH_4 .

자풍부물질 전자부족물질 간의 전하이동전이(charge transfer transition: CT 전이)가 일어나는 경우에 생기는데 이 침전물질은 그 구조상 CT 착화합물질 확률이 높기 때문이다. 위의

결과를 토대로 하여 Geranti Bio Ge-Yeast 및 몇 가지 물질들과 NaBH_4 를 반응시켜보았으며, 그 결과를 Table 1에 나타내었다.

위에서 얻어진 결과를 검증하고 게르마늄 강화효모 내에 존재하는 게르마늄의 유기태 여부를 확인하기 위해 게르마늄 강화효모 2.0 g을 폴타르에서 갈아 분말로 만들어 100 ml 플라스크에 넣은 후 THF(HPLC용) 20 ml를 가하고 24 시간 정도 강하게 교반하여 추출하였다. 이 시료를 한국기초과학지원연구원 광주센터에 의뢰하여 ICP-AES로 분석하여 Ge 총량 89.48 ppm을 얻었으며, 이 결과를 표 2에 나타내었다. 또한 동일한 실험 조건 하에서 GeO₂를 추출한 결과 Ge는 검출되지 않았다. 이는 곧, 게르마늄 강화효모 내의 게르마늄은 유기태이므로 유기용매에 의해 추출되었고 GeO₂는 무기태이므로 유기용매에서 추출되지 않았음을 의미한다.

투석에 의한 무기 게르마늄 분석

게르마늄강화효모 내의 유기게르마늄이 SGF와 증류수 내에서 어느 정도 해리되는지를 알아본 결과 투석 전후에 따른 유의적인 차이는 나타나지 않았다[6]. 투석막의 분자량의 투석범위(MWCO, 1,200 dalton)내에서 투석막 내부에 존재하는 게르마늄은 당연히 고분자 폴리펩타이드 수준의 단백질과 결합한 유기게르마늄이 확실한 것으로 생각된다. 유기 게르마늄은 안전하고 약리효과가 탁월하지만 무기게르마늄은 독성을 나타낸다는 보고가 있으므로[10] 투석막을 통과

한 비교적 작은 크기의 게르마늄 화합물에 대하여 유기태 여부를 확인하는 실험을 수행하였다. 투석막을 통과한 게르마늄은 무기 GeO₂로 존재하기 보다는 저분자량의 아미노산이나 올리고 펩타이드와 결합된 유기게르마늄의 형태로 존재하고 있을 것으로 생각된다. 그 이유는 첫째, 산성 또는 염기성 아미노산 존재 하에서 펩타이드에 붙어있는 게르마늄 성분이 역으로 해리되어 GeO₂가 될 가능성은 극히 희박하고, 둘째, 한국기초과학연구소의 분석실험 결과 Geranti Bio Ge-Yeast를 물로 3회 세척 후 GeO₂가 검출되지 않는다는(n.d: non-detectable) 시험성적서가 나왔으며(Table 2), 셋째, 무기 게르마늄은 일반적으로 신장 등에 축적된다고 알려져 있으나 13주간 Geranti Bio Ge-Yeast를 투여한 쥐의 신장을 대상으로 한 한국화학시험연구원의 분석실험 결과에서도 신장 내의 게르마늄의 축적량이 0.0이라는 시험성적서가 나왔고(Table 3), 넷째, 게르마늄 양이온(Ge⁴⁺)은 위 내에서 물, 염산, 기타 아미노산 등의 리간드가 주위에 존재하므로 독성-불용성의 GeO₂ 보다는 수용성의 ion-ligand 배위화합물로 존재할 것이기 때문이다.

이를 뒷받침하기 위해 첫째, 투석막 외부의 상등액을 취하여 상기 GeO₂ 정성분석 프로토콜에 따라 NaBH₄와의 반응을 시도한 결과 GeO₂와 NaBH₄와의 반응에서 나타나는

Table 1. Comparison of reactions: NaBH₄ with some substances.

Reaction	Color change	Precipitate formation	Remarks
nH ₂ O+SiO ₂ +2NaBH ₄	X	X	No change
nH ₂ O+GeO ₂ +1NaBH ₄	O	O	Reddish brown precip. in 10 min.
nH ₂ O+GeO ₂ +2NaBH ₄	O	O	Dark brown precip. in 5 min.
nH ₂ O+Na ₂ CC ₃ +GeO ₂ +2NaBH ₄	O	O	Dark brown precip. in 5 min.
nH ₂ O+O=Ge(AA) ₂ +2NaBH ₄	O	X	Yellow color / no precipitate
nH ₂ O+AA+2NaBH ₄	X	X	No change

AA: Amino acid (L-Lysine or L-Histidine)

Table 2. ICP-AES data: Germanium-fortified Yeast (한국기초과학지원연구원 광주센터).

Sample	Element	Sample wt (g)	Solution wt (g)
Ge-fortified Yeast	Ge	0.1007	12.5666
Dilution Factor	Wavelength (nm)	Detection Value (ppm)	Net Conc. (ppm)
124.8	209.425	0.717	89.48

* Net Conc. = Detection Value (ppm) x D.F (dilution factor)

Table 3. Certificate of analysis (issued by Korea Basic Science Institute: Mar. 06. 2007).

Process	1 st Test	2 nd Test	3 rd Test	Reference
Fermentation (GeO ₂ input)	112.1 ppm	102.1 ppm	107.0 ppm	
Separation solution	78.3 ppm	76.8 ppm	80.7 ppm	
1 st Washing	1.91 ppm	1.92 ppm	1.90 ppm	
2 nd Washing	0.08 ppm	0.08 ppm	0.08 ppm	
3 rd Washing	n.d*	n.d	n.d	
Geranti Bio-Ge Yeast	3,042.0 ppm	3,044.0 ppm	3,064.0 ppm	Final product

* n.d: non-detectable (<0.02 ppm)

Table 4. 시험성적서 (한국화학시험연구원 : 시료 -Rat Kidney B02149: 2004 년 04 월 07 일).

시험 항목	시료 무게	단위	결과치	시험 방법
Ge (B02149 control (M-1))	0.2469 g	µg/kg	0.0	ICP-MS
Ge (B02149 control (M-2))	0.2079 g	µg/kg	0.0	ICP-MS
Ge (B02149 control (F-1))	0.1962 g	µg/kg	0.0	ICP-MS
Ge (B02149 control (F-2))	0.2092 g	µg/kg	0.0	ICP-MS
Ge (B02149 2,000 mg/kg (M-1))	0.2289 g	µg/kg	0.0	ICP-MS
Ge (B02149 2,000 mg/kg (M-2))	0.2308 g	µg/kg	0.0	ICP-MS
Ge (B02149 2,000 mg/kg (M-3))	0.2993 g	µg/kg	0.0	ICP-MS
Ge (B02149 2,000 mg/kg (M-4))	0.2943 g	µg/kg	0.0	ICP-MS
Ge (B02149 2,000 mg/kg (M-5))	0.2735 g	µg/kg	0.0	ICP-MS
Ge (B02149 2,000 mg/kg (F-1))	0.1746 g	µg/kg	0.0	ICP-MS
Ge (B02149 2,000 mg/kg (F-2))	0.1784 g	µg/kg	0.0	ICP-MS
Ge (B02149 2,000 mg/kg (F-3))	0.1593 g	µg/kg	0.0	ICP-MS
Ge (B02149 2,000 mg/kg (F-4))	0.1527 g	µg/kg	0.0	ICP-MS
Ge (B02149 2,000 mg/kg (F-5))	0.2546 g	µg/kg	0.0	ICP-MS

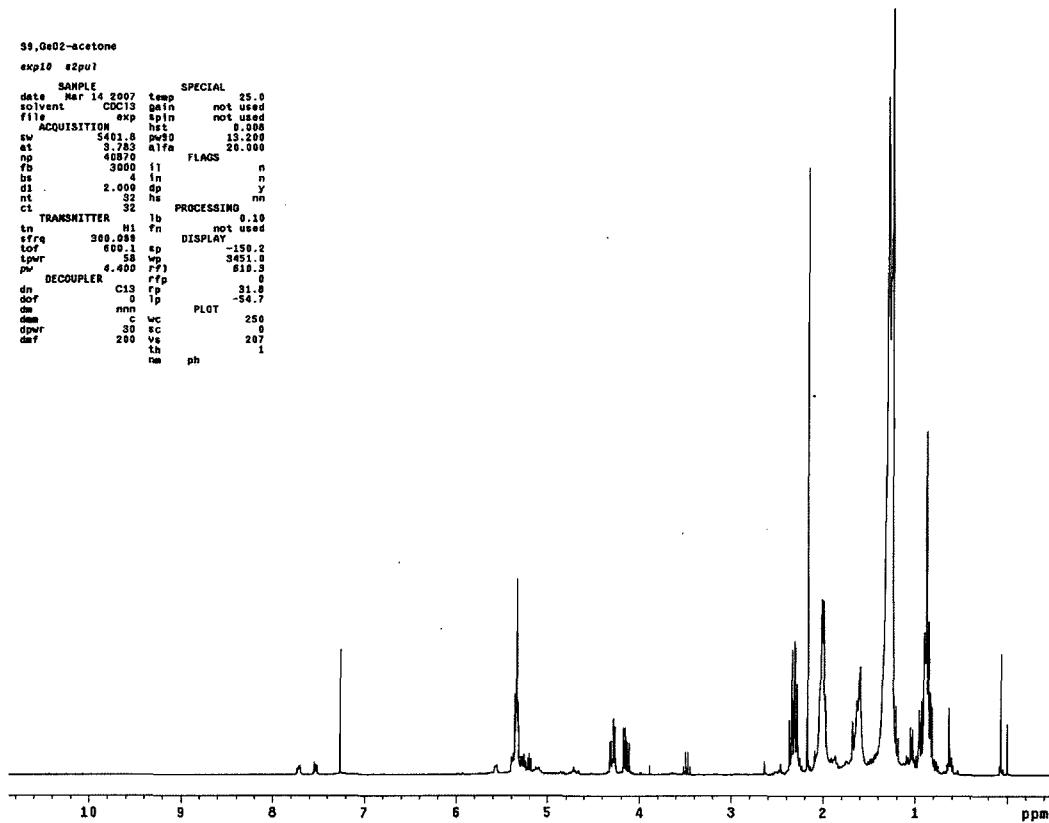


Fig. 7. ¹H NMR spectrum (in CDCl₃) extract of the specimen collected from the outside of the dialysis membrane (MWCO 1,200 dalton) with acetone.

특이한 색 변화와 갈홍색 침전이 관찰되지 않았다. 그러므로 투석막을 통과하여 외부에 존재하는 게르마늄도 역시 GeO₂의 형태가 아닌 유기게르마늄일 것으로 사료된다. 둘째, 유기용매(acetone, methylene chloride, chloroform, ethanol, THF)를 사용하여 유기게르마늄 성분의 추출을 시도하였고, 이때 얻어진 ¹H NMR 스펙트럼들은 모든 용매에 대해 비슷

하였으며 물의 경우[6] 보다 훨씬 더 간단한 스펙트럼이 얻어졌다. 여기에서 얻어진 결과들 중 acetone과 ether를 사용하여 추출한 ¹H NMR 스펙트럼을 Fig. 7과 8에 수록하였다. 이것으로 미루어 투석막 외부에 존재하는 게르마늄은 1,200 dalton의 투석막을 통과할 수 있는 비교적 작은 분자인 Ge-올리고 펩타이드 혹은 Ge-아미노산 등의 혼합물일 것으로

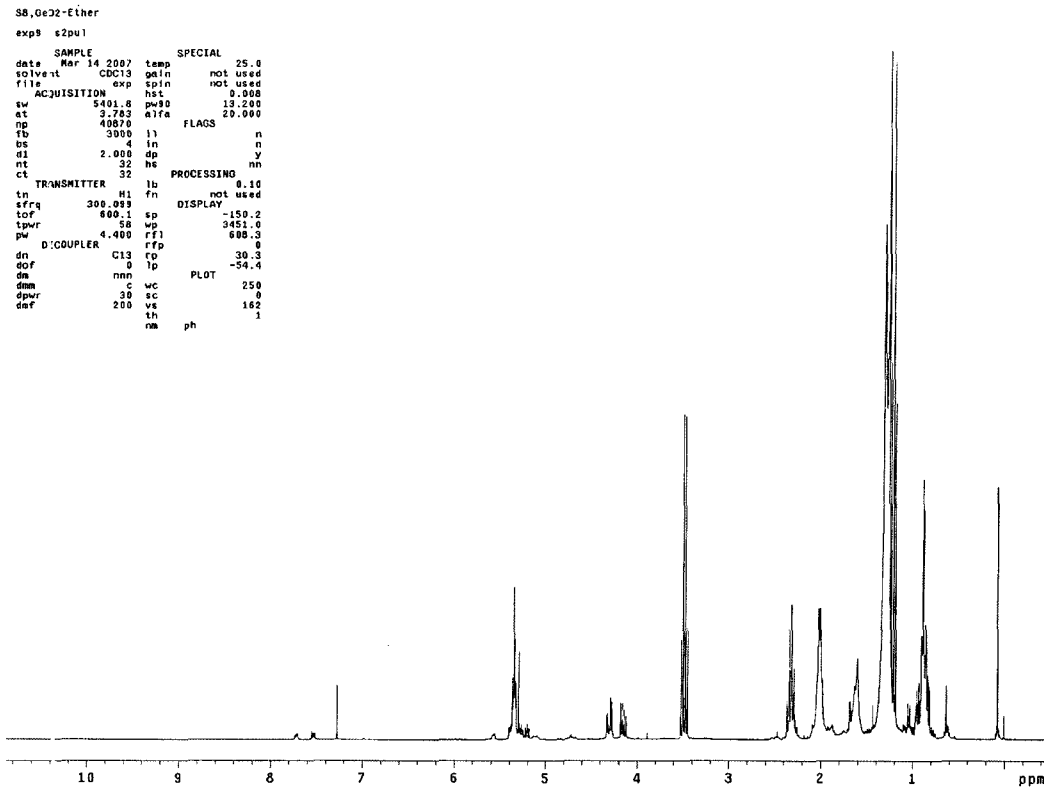


Fig. 8. 1H NMR spectrum (in $CDCl_3$) extract of the specimen collected from the outside of the dialysis membrane (MWCO 1,200 dalton) with ether.

사료된다. 아울러 보다 더 다양한 분석(정밀한 1H NMR 라이브러리를 사용한 분석, amino acid sequence 분석, MALDI-TOFF 질량분석, IR, 분자량, XRD, ICP)을 통해 각각의 분자들에 대한 구조를 규명하고 prep-HPLC를 사용하여 각개 분리를 위한 연구를 진행하고 있다.

요 약

본 연구는 효모 내에서 생합성된 유기게르마늄을 함유한 게르마늄강화효모 Geranti Bio Ge-Yeast 내에 무기게르마늄이 존재하지 않거나 불검출임을 확인하기 위해 수행하였으며, 이를 뒷받침하기 위한 과학적 논거를 제시하기 위해 GeO_2 의 정성분석 프로토콜을 수립하여 실험을 실시하였다. 1당량의 $NaBH_4$ 를 GeO_2 에 가하면 갈홍색의 침전이 관찰되고 2당량의 $NaBH_4$ 를 가하면 진한 갈색의 침전이 생성되는데 이 독특한 색을 띠는 침전 생성으로부터 GeO_2 의 존재를 정성적으로 분석이 가능하였다. SiO_2 와의 반응 시 색 변화가 일어나지 않는 것으로 보아 색은 Ge-O와 B간의 결합에 의해 생기는 전하이동 전이 때문일 것으로 생각되며, 게르마늄강화효모와의 반응에서는 발색이나 침전이 형성되지 않아 GeO_2 가 존재하지 않음을 확인하였다. 투석막 외부의 여과액을 취하여 상기 GeO_2 정성 프로토콜에 따라 $NaBH_4$ 와 반응을 시도하여도 특이한 색 변화와 갈홍색 침전이 관찰되

지 않았으므로 투석막을 통과하여 외부에 존재하는 게르마늄도 역시 GeO_2 의 형태가 아닌 유기게르마늄일 것으로 사료된다. Geranti Bio Ge-Yeast는 생합성 기법을 사용하여 생산된 게르마늄을 강화한 유기게르마늄으로서 더 다양한 분석과 연구를 통해 각각의 single compound들의 구조를 규명하고 분리 정제하는 연구가 필요하리라 사료된다.

참고문헌

1. Assai, K. 1980. in *Miracle Cure-Organic germanium*. Japan publications Inc., New York, pp. 51-55.
2. Arimori, S., K. Watanabe, M. Yoshita, and T. Nagao. 1981. Effect of Ge-132 as immunomodulator. In: *Immunomodulation by microbial products and related synthetic compounds*. Int. Symp. Osaka July 27-29.
3. Badawi, A. M. and A. A. Hafiz. 2007. Synthesis and immunomodulatory activity of some novel amino acid germanates. *J. Iran. Chem. Soc.*, 4: 107-113.
4. Klappinska, B. and J. Chmielowski. 1986. Binding of germanium to *Pseudomonas putida* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 1144-1147.
5. Lee, H. K., J. S. Kim, and T. B. Kang. 2004. Extraction of organic germanium compound from garlic. *Inst. National Sci. Sangmyung Univ.* 12: 1-18.
6. Lee, S. H., S. D. Ahn, S. N. Rho, and T. U. Sohn. 2005. A

- study on preparation and binding properties of germanium-fortified yeast. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **48**: 382-387.
7. Lynn, M. R. and M. G. Geoffery. 1997. Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in vacuolar function a role for the vacuole in toxic metal iron detoxification. *Microbiol. Lett.* **152**: 293-298.
8. Nobuhiro, W., I. Osamu, K. Takuro, and Y. Koichi. 1980. New approaches to using spent brewer's yeast. *ASBC Journal.* **38**: 5-8.
9. Sandra, G. 1988. Therapeutic effects of organic germanium. *Medical Hypothesis* **26**: 207-215.
10. Sanai, T., N. Oochi, and S. Okuda. 1990. Subacuten of germanium dioxide in the experimental animal. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **103**: 345-353.
11. Sanai, T., S. Okuda, and K. Onoyama. 1991. Chronic tubulointestinal changes induced by germanium dioxide in comparison with carboxyethylgermanium sesquioxide. *Kidney. Int.* **40**: 882-890
12. Schroeder, H. A. and J. J. Balassa. 1967. Arsenic, germanium, tin, and banadium in mice: Effects on growth, survival and tissue levels. *J. Nutri.* **92**: 245-252.
13. Wei, X. S. 1992. Effect of yeast on bioenrichment of germanium. *Food Science.* **149**: 49-54.

(Received Apr. 3, 2007/Accepted May 6, 2007)