

게르마늄강화효모의 제조 및 이의 게르마늄 결합에 관한 연구

이성희* · 안상두¹ · 노숙령² · 손창욱

게란티제약(주) 중앙연구소, ¹중앙대학교 화학과, ²중앙대학교 식품영양학과

A Study on Preparation and Binding Properties of Germanium-fortified Yeast

Sung-Hee Lee^{1,*}, Sangdoo Ahn², Sook-Nyung Rho³ and Tsang-Uk Sohn¹

¹GerantiPharm. Ltd. 678-20 Yoksam-dong, Kangnam-gu, Seoul 135-080, Korea

²Department of Chemistry, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

³Department of Food and Nutrition, Chung-Ang University, Kyunggi-Do 456-756, Korea

Received September 23, 2005; Accepted October 18, 2005

The aim of this study was to identify binding properties of germanium (Ge) in Germanium-fortified Yeast using optimum manufacturing process. The ratio of yeast cell and germanium solution was 1 : 0.5 (50%), and pH 6.5, 35°C and 20 h during fermentation, and Germanium-fortified Yeast produced. In results of the XRD, NMR and FT-IR analysis, it was different adding inorganic Ge (GeO₂) during fermentation process from transformed into germanium in Germanium-fortified Yeast. And germanium concentration was not shown any difference before and after in the dialysis test with SGF (simulated gastric fluids). Therefore, Germanium-fortified Yeast of Geranti made by using biosynthetic technology was considered that transformed into organic properties during fermentation process. And, this result showed that Germanium-fortified Yeast was not dissociated under SGF (simulated gastric fluids) condition because of its structural binding safety. Thus, Germanium-fortified Yeast was transformed into organic germanium during biosynthetic cultivation. It is expected that this Germanium-fortified Yeast can be applied as a new dietary functional materials for cellular immunity, recovery of injured cells and immune system, and possible anticancer activities by activation immune cells like macrophage.

Key words: Germanium-fortified Yeast, fermentation, Germanium binding

서 론

게르마늄이라는 원소는 1886년 독일의 화학자 Clemen Winkler에 의해 최초로 발견되었다. 이러한 게르마늄의 의학적 인 효능이 처음 발견된 것은 1930년 프랑스와 스페인의 국경 지방인 Lourdes의 샘물이 여러 가지 질병에 큰 효과가 있다고 알려져 샘물의 성분 분석 결과 게르마늄의 함량이 높아 치료 효과를 보인다는 보고서가 발표된 이후부터이다.^{1,2)} 이후 인삼, 영지, 마늘, 명일엽 등 보양 및 강장의 작용이 있다고 알려진 식품에서 비교적 많은 양의 천연유기게르마늄이 존재한다는 사실이 밝혀졌고^{3,4)} 1960년대에 이르러 일본의 Kazuhiko Assai 박사에 의해 Ge-132라는 화학 합성 유기 게르마늄이 세계 최초로 개발되었다.⁵⁾ 게르마늄의 효과가 알려지면서 미생물에 의

한 무기게르마늄을 유기게르마늄으로 전환시키는 연구가 활발 해졌고, 유기게르마늄이 항종양 효과⁶⁾ 뿐만 아니라 항돌연변이 작용⁷⁻⁹⁾이 있다는 것이 밝혀지면서 유기게르마늄의 생산은 기능 성 식품과 의약품 소재로 중요한 의미를 갖게 되었다. Klapcinska 등은 *Pseudomonas. Putida* 세포 중의 게르마늄의 축적은 주로 수용성 분획에 있고 대다수가 핵산과 단백질에 결합돼 있음을 전자현미경 사진 분석을 통해 확인하였다.⁹⁾ 그리고 효모가 고농도의 무기게르마늄을 흡수할 수 있으며, 배양을 통해 효모 균체 내에 축적된 게르마늄이 95% 이상이 유기 게르마늄임을 밝혀 효모가 무기 게르마늄을 유기 게르마늄으로 전환하는 능력이 있다는 것이 보고되었다.¹⁰⁾ 또한, 효모가 무기 원소의 독성을 무독화 시킨다는 보고¹¹⁾는 효모 내에서 대사과 정에 의해 무기게르마늄이 유기 게르마늄으로 전환되어 생물학 적 동화작용에 의해 독성이 없어진다는 것을 의미한다.

미생물 균체를 이용하는 연구는 SCP(single-cell protein)용 효 모를 중심으로 이루어졌고, 이 효모를 이용한 유기게르마늄의 생산가능성은 VanDyke 등¹²⁾ 이 배양액의 GeO₂ 농도가 1.0

*Corresponding author

Phone: 82-2-556-1367; Fax: 82-2-553-7851

E-mail: gepfarm@gerantiusa.com

mg/ml에 이르렀을 때 *Saccharomyces cerevisiae*이 GeO₂에 적응할 수 있음을 보고하면서 시작되었다. 효모는 영양학적으로 우수한 것으로 알려져 수 천년 동안 인류의 식생활에 이용되었을 뿐만 아니라, 그 자체로도 훌륭한 영양공급원으로 단백질, 비타민, 미네랄 등이 함유된 저지방·고단백질을 특징으로 하는 차세대 단백질 공급원인 단일세포 단백질로 각광 받고 있다. 효모는 단일 세포로는 최고의 비타민 B군 공급원이고, 생체 내의 대사활동에 중요한 역할을 담당하는 효소를 다량 함유하고 있어, 건강기능제품으로 애용되고 있다.¹³⁾ 이러한 효모를 이용한 기능성 제품의 연구로는 효모 변이주를 이용하여 베타글루칸 면역활성능에 대한 연구,¹⁴⁾ 효모로부터 B형 간염 백신을 생산하여 그 면역성과 안정성에 관하여 연구,¹⁵⁾ 그리고 효모 추출물을 이용한 월경전증후군(Premenstrual syndrome, PMS) 감소 효과에 관한 연구¹⁶⁾ 등이 있으며 많은 분야에서 연구가 활발하게 진행되고 있다.

이에 우리는 대량 생산이 가능하여 산업적인 이용 가치가 높은 효모를 활용하고자 하는 방안으로 개발 방향을 잡고 추진하였으며,¹⁷⁾ 효모의 이용 각도를 새로운 방법으로 모색하고자 좀 더 안정화된 유기게르마늄 함유하는 게르마늄 강화 효모를 개발하였다. 본 연구에서는 게르마늄 강화 효모의 제조 방법에 따른 최적의 조건을 잡고 제조된 게르마늄 강화 효모 내의 게르마늄의 결합상태 확인을 목적으로 한다.

재료 및 방법

균주 및 배지. 본 연구에서 사용한 균주는 *Saccharomyces cerevisiae*, KCTC 1199를 생명공학연구소(KRIBB) 유전자은행(KCTC)에서 분양 받아 사용하였으며, 배지는 YM Broth(Difco 사, 미국)을 사용하였다. 일차 배양시 균체만을 분리 후 균체에 게르마늄 용액과 배양액을 넣어 균체와 게르마늄을 일정 조건에서 다시 배양하여 게르마늄 이온을 균체 내로 유입시키는 공정을 거쳤다. 각 배양 공정은 균체 생산 공정과 균체 유입 공정의 2단계로 나누어 게르마늄 강화 효모를 제조하였다. 이 때 건조효모분말은 제 2공정인 균체 유입 공정에서 게르마늄을 첨가하는 공정을 거치지 않았으며, 그 외의 나머지 공정은 게르마늄 강화 효모와 같은 공정을 거쳐 제조하여 사용하였다.

게르마늄 강화 효모 생산 조건에 따른 게르마늄 함량 측정. 게르마늄 강화 효모 생산 공정 중 1) 게르마늄 첨가 농도 0, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 및 6000 ppm에 따른 게르마늄 함량 변화, 2) 효모 균체와 게르마늄용액 혼합비율을 0 %, 1 : 0.5(50%), 1 : 1(100%), 1 : 2(200%) 및 1 : 3(300%)에 따른 균체 내 게르마늄 함량 변화, 3) 효모 균체 내로 게르마늄 유입에 따른 온도(20, 30, 35, 40, 45 및 50°C) 및 pH(4, 5, 6, 6.5, 7 및 8)의 영향에 따른 게르마늄 함량 변화, 그리고 4) 배양 시간(5, 10, 15, 20, 25 및 30 시간)에 따른 게르마늄 함량 변화 효과를 측정하였다.

효모 내의 게르마늄 함량 측정. 게르마늄 표준액(Aldrich사 USA, Ge standard solution)을 사용하였으며, 게르마늄의 측정은 ICP-AES(Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy, Ultima2, Horiba Jovin. Yvon. Co. Japan)로 각

시료 당 세 번 반복 측정하였다.

구조분석기기. 게르마늄 결합 상태를 확인하기 위하여 NMR, FT-IR 및 XRD실험을 실시하였다. 배양 단계에서 게르마늄을 첨가하지 않은 건조효모를 대조군으로 비교 분석하였다. NMR 분석을 위하여 건조효모와 게르마늄 강화 효모 10 mg을 각각 1 ml D₂O에 녹인 시료를 만들었으며, 600 MHz NMR(Bruker Avance 600 spectrometer with 5 mm TXI PFG inverse probe head, Germany)에서 ¹H NMR 스펙트럼을 얻었다. IR분석은 Biorad사(USA)의 FTS-3000(with Golden Gate single reflection diamond ATR) 모델의 FT-IR spectrometer를 이용하여 건조효모와 게르마늄 강화 효모 그리고 인공위액에 처리한 게르마늄 강화 효모의 차이점을 비교하였다. XRD 분석은 Bruker사(Germany)의 D4 Endeavor 모델의 XRD(Cu K_α, λ=1.541Å)를 사용하여 10~70° 범위의 2θ에서 측정하였으며, 배양단계에 첨가한 무기형태의 GeO₂, 건조효모와 게르마늄 강화 효모의 차이점을 분석하였다.

인공위액(SGF, Simulated Gastric Fluids)의 조제. 인공위액은 NaCl 2.0 g과 35-37%의 HCl 8.2 ml을 혼합 후 증류수 1000 ml를 채워 제조하였으며, 반응온도는 water bath 37-0.5°C로 2시간 반응시킨 후 산 가수 분해의 반응 종결을 위하여 50 mM NaOH를 가하여 pH를 중화하였다.

투석에 의한 유기게르마늄의 함량 측정. 게르마늄 강화 효모 내에서 단백질과 결합하고 있는 게르마늄이 위액 조건에서 어느 정도 해리되는지 알아보기 위하여, 게르마늄 강화 효모 300 mg을 20 ml의 증류수 및 인공위액에 각각 녹인 후 투석막(Sigma, MWCO 1,200 Da)에 담아 2시간 동안 투석을 실시한 후, 투석 전과 후에 투석막 안과 밖의 용액에 포함된 게르마늄 함량을 ICP-AES기기를 이용하여 분석하였다.

자료 분석 및 통계처리. 연구 결과는 SAS(Statistical Analysis System) PC package program을 이용하여 분석하였다. 각 실험군의 결과는 평균값과 표준편차를 산출하였고, 각 실험군간의 비교는 paired t-test를 실시하여 군간의 통계적 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

본 연구는 게르마늄 강화 효모의 제조 공정을 위한 최적의 조건을 잡고 제조된 게르마늄 강화 효모 내의 게르마늄의 결합 상태를 확인하였으며, 이 때 사용한 영양소별 최적 조건은 글루코스 3.0중량%, 효모추출물 0.3중량%, 펩톤 0.5중량% 및 물(나머지)이었다. 이외의 조건 즉, 혼합 비율, pH, 배양 온도, 그리고 배양 시간에 따른 최적 조건을 잡고자 하였으며, 이에 맞추어 제조된 게르마늄 강화 효모의 결합 상태에 확인하고자 분석을 실시하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

게르마늄 강화 효모 생산 조건에 따른 게르마늄 함량. 균체 내의 게르마늄 함량은 Fig. 1과 같이 배양 공정 중 첨가된 게르마늄의 농도에 비례하여 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 효모 균체와 게르마늄 용액(5,000 ppm)의 혼합 비율(부피비)에 따른 균체 내의 게르마늄 함량은 게르마늄 용액의 부피가 효모 균체보다 커지면 오히려 감소하는 경향을 보여준다(Fig. 2). 즉,

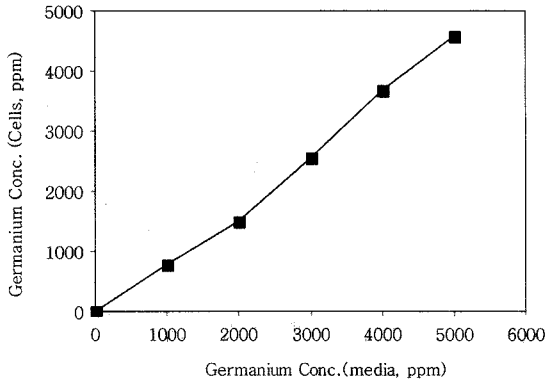


Fig. 1. Change of the germanium concentration according to added-germanium during fermentation.

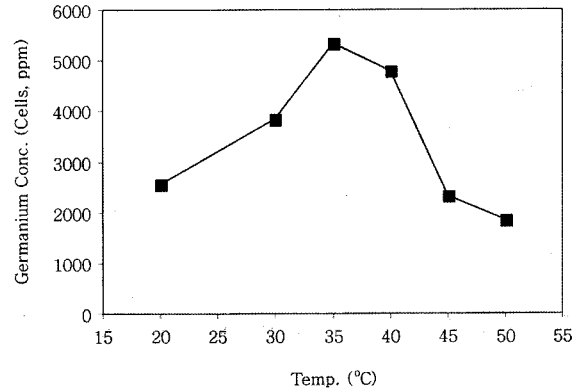


Fig. 4. Change of the germanium concentration according to temperature during fermentation.

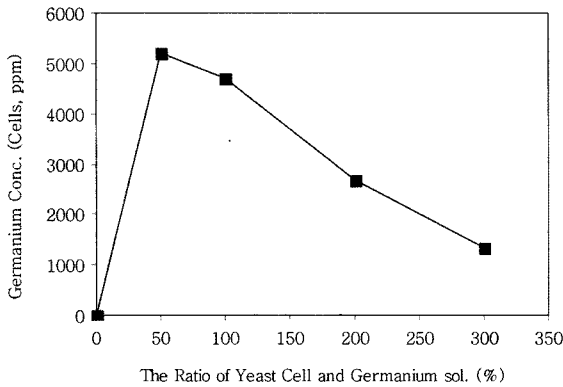


Fig. 2. Change of the germanium concentration according to the ratio of yeast cell and germanium solution during fermentation.

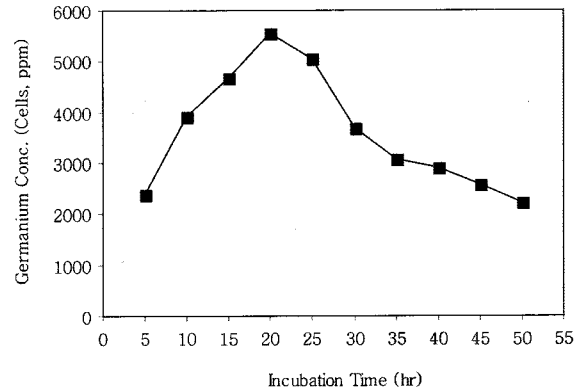


Fig. 5. Change of the germanium concentration according to incubation time during fermentation.

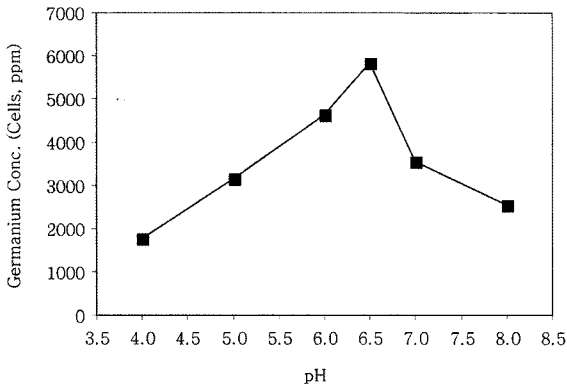


Fig. 3. Change of the germanium concentration according to pH during fermentation.

효모 균체와 게르마늄의 혼합 비율이 1:0.5(50%)일 때 5,215 ppm으로 가장 높은 게르마늄 함량을 나타냈으며, 1:1(100%)일 때 4,698 ppm, 1:2(200%)일 때 2,672 ppm, 그리고 1:3(300%)일 때 1,340 ppm으로 나타났다. 이러한 결과를 바탕으로 균체와 게르마늄 용액(5,000 ppm)의 혼합 비율을 1:0.5(50%)로 하여 배양하는 것이 고농도의 게르마늄 강화 효모를 생산하는 적절한 조건임을 알 수 있었다. 게르마늄 용액(5,000 ppm)과 균체와의 혼합 비율 1:0.5(50%)로 배양 조건을 맞춘 후 pH 변화에 따른 효모 균체 내 게르마늄 함량의 비교 결과는 Fig. 3과 같이 나타났다. pH 변화에 비교적 민감하게 반응하였으며,

적정 pH는 6.0-6.5의 범위로 나타났으며, 최적의 pH는 6.5일 때로 가장 높은 게르마늄 함량(5,836 ppm)을 나타냈다. 배양 온도에 따른 효모 균체 내 게르마늄 함량 비교 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 적정 배양 온도는 35-40°C로 나타났으며, 35°C일 때 가장 높은 게르마늄 함량인 5,344 ppm을 나타냈다. 마지막으로 배양 시간에 따른 효모 균체 내 게르마늄 함량 비교 결과는 Fig. 5와 같이 나타나 15-25시간의 배양 시간이 적정한 것으로 보이며, 최적의 배양 시간은 20시간으로 가장 높은 게르마늄 함량(5,541 ppm)을 나타냈다. 배양을 통해 효모가 무기게르마늄을 유기게르마늄으로 전환하는 능력이 있음을 보고한 연구 결과¹⁰⁾와 같이 본 실험 조건에 의해 제조된 게르마늄 강화 효모 역시 유기게르마늄을 함유한 효모로 판단되며 이에 대한 기기 분석을 실시하였다.

위의 조건을 충족하여 제조된 게르마늄 강화 효모는 건조 균체량이 12.5 g/였으며, 이 중 성상 및 용해도가 가장 좋은 시료(3,210 ppm)를 선정하여 배양 과정 중에 첨가된 무기 형태인 GeO₂, 게르마늄을 첨가하지 않는 건조 효모 그리고 게르마늄 강화 효모의 각각의 구조를 XRD 기기를 이용하여 분석한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 무기물 형태인 GeO₂는 명확한 결정 형태를 띠고 있는 것으로 나타났으나, 게르마늄을 첨가하지 않는 건조 효모와 게르마늄 강화 효모는 GeO₂와는 달리 결정 형태의 구조를 포함하고 있지 않은 것으로 나타났다. 이는 발효 과정 중에 첨가된 GeO₂가 효모 내에 유입되면서 무기 형태의

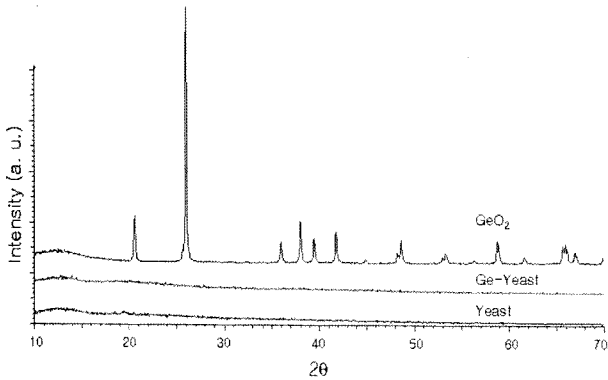


Fig. 6. XRD patterns for (a) GeO_2 powder, (b) Germanium-fortified yeast, and (c) dried-yeast.

GeO_2 과는 다른 형태로 존재하는 것을 의미한다. 따라서, 배양 조건별 실험 결과를 종합해 보면, 균체와 게르마늄 용액 혼합 비율 1:0.5(50%)로 하고, pH 6.5, 온도 35°C 그리고 배양 시간은 20시간으로 하는 것이 높은 함량의 게르마늄을 효모 균체 내로 유입시켜 게르마늄 강화 효모를 생산하는 조건으로 판단된다. 그리고 이러한 배양 과정을 통해 생산된 게르마늄 강화 효모는 배양 과정 동안의 구조적 변화에 의해 효모 내에 유입된 무기 형태인 GeO_2 게르마늄과는 다른 구조를 형성하고 있다는 것을 알 수 있었다.

게르마늄결합상태. 상기 조건으로 제조된 게르마늄 강화 효모 내에 함유된 게르마늄 결합 상태를 확인하기 위하여 NMR 및 FT-IR 실험을 실시한 결과는 Fig. 7과 8과 같다. 건조효모와 게르마늄 강화 효모의 1H -NMR 스펙트럼을 비교하여 살펴

보면(Fig. 7) 거의 유사한 구조를 가지고 있으나 부분적으로 차이가 있음을 알 수 있다(예를 들면 5.2 ppm 부근). Fig. 8의 FT-IR 실험 결과를 살펴보면 $\sim 1400\text{ cm}^{-1}$ 과 $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ 의 영역에서 건조 효모와 게르마늄 강화 효모 사이에 약간의 차이가 있음을 알 수 있다. 이것은 배양시 첨가한 게르마늄이 효모 균체와 결합하면서 구조적인 변화를 일으켜 나타나는 차이로 보여진다. 이는 Klapcinska⁹⁾ 등의 연구에 의하면 효모가 고농도의 무기게르마늄을 흡수할 수 있다는 연구 결과 및 Wei 등의 배양을 통해 효모 균체 내에 축적된 게르마늄이 95% 이상이 유기게르마늄임을 밝히고, 효모가 무기게르마늄을 유기게르마늄으로 전환하는 능력이 있음을 보고한 연구와 같은 결과라 할 수 있다.¹⁰⁾ 또한, 효모가 무기원소의 독성을 무독화 시킨다는 보고¹¹⁾에서도 알 수 있듯이 효모 내에서 대사과정에 의해 무기 게르마늄이 유기게르마늄으로 전환시켜 생물학적 동화작용에 의해 독성이 없어진다는 결과와 같은 경향으로 본 게르마늄 강화 효모의 발효 과정에 첨가한 무기 형태의 GeO_2 가 배양 과정 동안 균체 내에서 게르마늄이 유입되는 과정에서 게르마늄이 단백질(혹은 펩타이드)과 결합하여 구조에 변화를 형성한 것으로 판단된다.^{9,17)}

투석에 의한 유기게르마늄의 안정성 분석. 게르마늄 강화 효모 내에서 단백질과 결합하고 있는 게르마늄이 위액 조건에서 어느 정도 해리되는지 알아보기 위하여 투석막(Sigma, MWCO 1,200 Da)을 이용한 투석 실험을 실시하였다(Table 1). 증류수와 인공위액 안에서 투석막을 이용한 투석 전후에 따른 게르마늄 총량의 차이를 살펴보면 투석 전후에 따른 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 즉, 투석막의 분자량의 투석 범위(1,200 dalton) 내에서 투석 전후에 따른 비교시 대부분의 게르마늄은 투석막

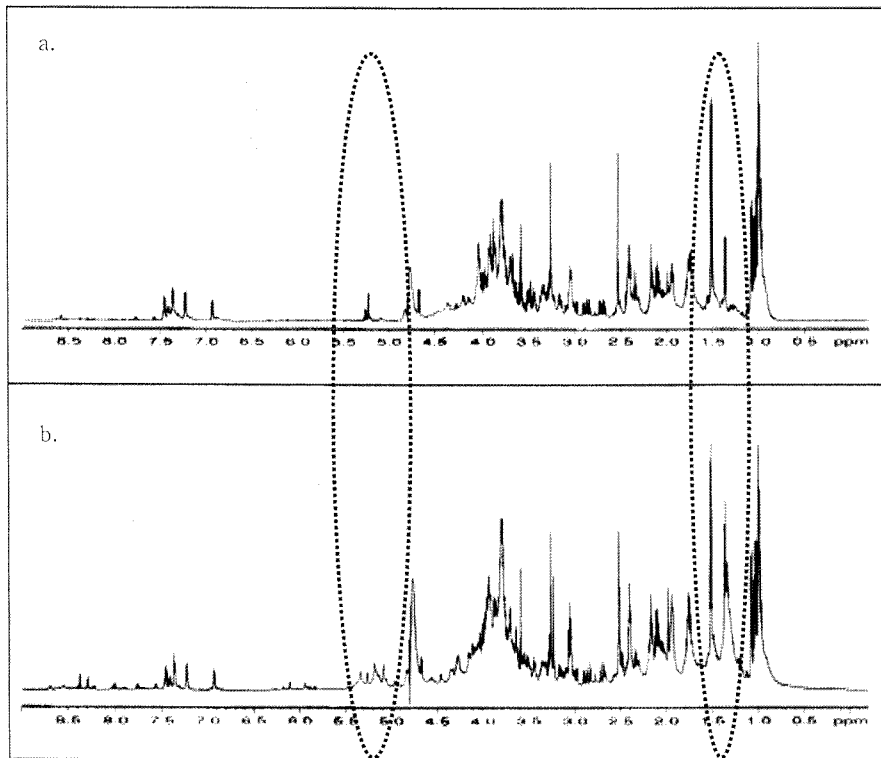


Fig. 7. 1H NMR spectra for (a) dried-yeast and (b) Germanium-fortified yeast.

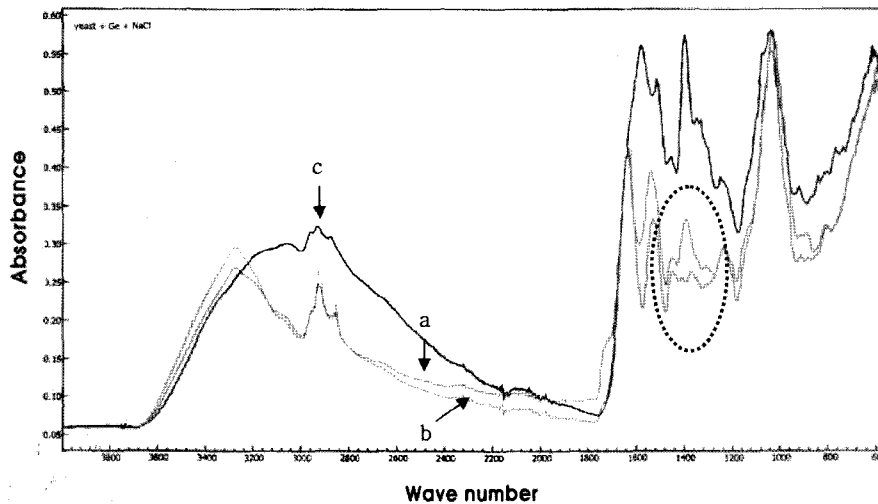


Fig. 8. FT-IR Spectra for (a) dried-yeast, (b) Germanium-fortified yeast and (c) solid part of Germanium-fortified yeast in SGF (simulated gastric fluids).

Table 1. Dialysis and ICP experiments of Germanium-fortified Yeast to determine free germanium content in SGF (Simulated Gastric Fluid) solution

	Germanium concentration (ppm)	
	Before dialysis	After dialysis
In water	36.3 ± 0.2 ^{1,2)}	33.4 ± 0.2 ³⁾
In SGF	38.9 ± 0.3	32.8 ± 0.2 ³⁾

¹⁾N = 10

²⁾Values are Mean ± SD (Standard Deviation)

³⁾Not significant differences between before dialysis and after dialysis at $\alpha = 0.05$ by *t*-test.

을 통과하지 못한 것으로 보여지며, 투석막의 분자량의 투석 범위(1,200 dalton) 내에서 투석막을 통과한 게르마늄은 저분자의 아미노산이나 올리고 펩타이드의 형태로 결합한 것으로 보여진다. 이의 결과로 보아 효모 균체 내에 유입된 게르마늄이 본 실험 조건 하에서는 인공 위액에서 무기 형태 혹은 이온 형태의 게르마늄으로 쉽게 해리되지 않는 것으로 알 수 있었다. 유기게르마늄은 안전하고 약리효과가 탁월하지만 무기게르마늄의 경우 신장 및 간 기능 장애를 일으킨다는 보고가 있다.¹⁸⁾ Sanai¹⁹⁾ 등은 무기게르마늄과 유기게르마늄을 비교 실험하여 유기게르마늄의 안전성을 보고한 연구 결과가 있으나, 아직 안전성에 관한 논쟁이 계속되고 있다. 그러므로, 안전성과 유효성이 뛰어난 천연 유기게르마늄의 중요성이 강조되고 있는 실정이다. 본 연구에서 사용한 게르마늄 강화 효모는 생합성 기법을 이용하여 생산된 게르마늄을 강화한 유기게르마늄으로 각종 암, 성인병의 예방과 치료, 인체 면역력의 증진 등 건강 증진을 위한 새로운 기능성 원료로의 활용이 기대되며, 이에 대한 지속적인 연구를 진행하고 있다.

초 록

본 연구는 게르마늄 강화 효모의 제조 공정을 위한 최적의 조건을 잡고 제조된 게르마늄 강화 효모 내의 게르마늄의 결합

상태 확인을 목적으로 하였으며, 그 결과는 다음과 같다. 균체와 게르마늄 용액 혼합 비율 1:0.5(50%)로 하여 균체와 게르마늄 배양시 최적 조건인 pH 6.5, 온도 35°C 그리고 배양 시간은 20시간 배양하는 것이 높은 함량의 게르마늄을 효모 균체 내로 유입시켜 게르마늄 강화 효모를 생산하였으며, 이의 배양 과정을 통해 생산된 게르마늄 강화 효모는 배양 과정 동안의 구조적 변화에 의해 효모 내에 유입된 무기 형태인 GeO₂ 게르마늄과는 다른 구조를 형성하고 있었다. 또한 NMR 및 FT-IR 실험을 실시한 결과 게르마늄 강화 효모의 발효 과정에 첨가한 무기 형태의 GeO₂가 배양 과정 동안 균체 내에서 게르마늄이 유입되는 과정에서 게르마늄이 단백질(혹은 펩타이드)과 결합하여 구조에 변화를 형성하였으며, 인공위액 안에서 투석막을 이용한 투석 전후에 따른 게르마늄 총량에서 투석 전후에 따른 차이가 나타나지 않았다. 따라서 게르마늄 강화 효모는 생합성 기법을 이용하여 게르마늄을 강화한 유기 게르마늄 생산 방법으로 배양 과정을 통해 구조적으로 안전한 유기 게르마늄을 형성하여 인공위액 조건에서도 해리되지 않는 것으로 보여지며, 각종 암, 성인병의 예방과 치료, 인체 면역력의 증진 등 건강 증진을 위한 새로운 기능성 원료로의 활용이 기대되며, 이에 대한 지속적인 연구가 사료된다.

Key words: 게르마늄 강화 효모, 게르마늄, 발효, 구조분석

참고문헌

- Sandra, G. (1988) Therapeutic effects of organic germanium. *Med. Hypotheses* **26**, 207-215.
- Arimori, S., Watanabe, K., Yoshida, M. and Nagao, T. (1981) Effect of Ge-132 as Immunomodulator. In: *Immunomodulation by Microbial Products and Related Synthetic Compounds. Int. Symp. Osaka July 27-29.*
- Lee, H. K., Kim, J. S. and Kang, T. B. (2004) Extraction of Organic Germanium Compound from Garlic. *Inst. Natural Sci. Sangmyung Univ.* **12**, 1-18.

4. Schroeder, H. A. and Balassa, J. J. (1967) Arsenic, germanium, tin, and vanadium in mice: Effects on growth, survival and tissue levels. *J. Nutr.* **92**, 245-252.
5. Asai, K. (1980) In *Miracle Cure-Organic germanium*. Japan publications Inc. (USA)
6. Ishida, N., Suzuki, F. and Hayashi, Y. (1979) Antitumor effects of organic germanium compound (Ge-132) in mouse tumors. *Proc. the Japanese Cancer Assoc. Annual meeting*, p. 193.
7. Li, A. P., Dahl, A. R. and Hill, J. O. (1982) *In vitro* cytotoxicity and genotoxicity of dichloride and dibutylgermanium dichloride. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **64**, 482-485.
8. Kada, T., Mochizuki, H. and Miyao, K. (1984) Antimutagenic effects of germanium oxide on Trp-2-induced frame shift mutations in Salmonella typhimurium TA98 and TA1538. *Mutat. Res.* **125**, 145-151.
9. Klapcinska, B. and Chmielowski, J. (1986) Binding of germanium to *Pseudomonas putida* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 1144-1147.
10. Wei, X. S. (1992) Effect of yeast on bioenrichment of germanium. *Food Science.* **149**, 49-54.
11. Lynn, M. R. and Geoffrey, M. G. (1997) Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in vacuolar function a role for the vacuole in toxic metal ion detoxification. *Microbiol. Lett.* **152**, 293-298.
12. VanDyke, M. I., Lee, H. and J. T. Travers. (1989) Germanium toxicity in selected bacterial and yeast stains. *J. Ind. Microbiol.* **4**, 299-306.
13. Anna, K. K. (1990) In *Yeasts and yeast-like organisms*. (1st ed.), VCH Press, New York, pp. 131-205.
14. Park, J. H., Kang, M. S., Kim, H. I., Chung, B. H., Lee, K. H. and Moon, W. K. (2003) Study on immuno-stimulating activity of glucan isolated from the cell wall of yeast mutant *Saccharomyces cerevisiae* IS2. *Korean J. Food Sci. Technol.* **35**, 483-492.
15. Kang, J. K., Kim, Y. B., Kim, K. H. and Ha, S. K. (1986) A study of the immunogenicity and reactogenicity of the Smith Kline_RIT recombinant DNA yeast-derived hepatitis B in healthy young adults. *Korean J. Int. Med.* **31**, 318-322.
16. Yu, K. W., Oh, S. H., Choi, Y. S., Hwang, W. J. and Suh, H. J. (2001) The reduction effect of yeast hydrolysate SCP-20 on premenstrual syndrome. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutri.* **30**, 1000-1003.
17. Song, W. J., Lee, S. C. and Oh, T. K. (1995) Preparation of organic germanium by yeast cell. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 87-90.
18. Sanai, T., Oochi, N. and S. Okuda. (1990) Subacute nephrotoxicity of germanium dioxide in the experimental animal. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **103**, 345-353.
19. 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.