

전기융합법을 이용한 게르마늄 강화 효모의 균주개발

오선우^{1*} · 이성희¹ · 이현주² · 한은숙³

¹게란티제약(주) 중앙연구소, ²한경대학교 영양조리과학과, ³중앙대학교 식품영양학과

Studies on the Electrofusion Applied to the Yeast to Produce High Quantity of Organic Germanium

Sun-Woo Oh^{1*}, Sung-Hee Lee¹, Hyun-Joo Lee², and Eun-Sook Han³

¹Research Institute, Geranti Pharm. LTD., Seoul 135-080, Korea

²Department of Nutrition and Culinary Sciences, Hankyong National University, Gyeonggi-do 456-749, Korea

³Department of Food and Nutrition, Chung Ang University, Gyeonggi-do 456-756, Korea

Abstract *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces rouxii* were electrofused and fermented in germanium-fortified nutrients to produce high-yield, organic germanium. The conditions for the preparation of protoplasts from both strains and for electrofusion were studied. The protoplasts of both cells formed long pearl chains and the cell membranes were lysed and fused through cellulase and high frequency voltage (450~750V/128~512 μsec). The fusants with the fastest growth were selected, and then characterized for their carbohydrate usage and tolerance to glucose and salts. The glucose tolerance of the fusants was better than that of *S. cerevisiae* and similar to that of *Z. rouxii*. The fusants appeared to have resistance to 12% NaCl. The cell size of the fusants was greater than that of the parental strains. The fusant cells contained more germanium than the parental cells did. The electrofusion of *S. cerevisiae* and *Z. rouxii* increased the cell capacity and accumulation of germanium in the yeasts. This method was proved to be effective to produce a high quantity of organic germanium.

Key words: electrofusion, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii*, organic germanium

서 론

효모(*Saccharomyces cerevisiae*)는 주류 및 제빵 산업 등의 식품 분야에서 오래전부터 유용한 용도로 사용되어 왔으며, 근래에는 효모 균체 성분과 대사과정 등에 대한 연구가 활발히 진행되어 이에 대한 유용성이 점차 증가되고 있다. 또한 효모는 자체적으로 단백질, 비타민, 미네랄 등이 함유되어 있어 영양적으로도 우수하고, 각종 질환의 개선 및 예방 또는 치료효과를 나타낼 수 있는 생리활성 물질도 함유하고 있어서 건강기능식품의 원료로 각광받고 있다(1).

효모는 배양 특성상 알코올의 생성농도에 의해 성장이 제한되고 배지 중 공급되는 탄소원의 농도에 따라 균체성장이 지체되는 한계를 극복하기 위해 효모에 대한 많은 연구가 수행되어 왔다. 과거 발효공업에서는 유용균주를 자연계에서 분리 선발하거나 변이주를 육성하여 사용하여 왔다(2). 근래에는 유전자재조합 기술이나 세포융합 방법을 응용하여 과거 이용하지 못했던 자원을 이용할 수 있는 상태로 변환시키거나 목적산물을 더욱 효율적으로 생산하는 연구가 활발히 진행되고 있다(3-7). 균주개발법은 크게 계대 배양을 통한 우량균주 선발, 돌연변이, 세포융합,

유전자도입의 4가지로 나누어진다. 이 중에서 세포융합법은 균주 개량의 확률이 높고, 안전하며 적은 비용으로 간편하게 이용되는 방법이다. 전기융합법은 물리적인 융합방법으로 세포가 전기장 내에 있을 때 인접세포막 사이에 전자기적 에너지에 의해 일시적인 구멍이 생겨 세포막 병합과 세포융합 과정을 촉진시키는 원리를 이용하여 원형질체를 융합시키는 기술이다(3).

한편, 게르마늄은 면역 증강, 항산화, 항암 기능 등 생리학적인 효능과 더불어 치료효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 인삼, 영지, 마늘, 명일엽 등에 천연적으로 다량 존재함이 밝혀졌다(8,9). 이후 게르마늄에 대한 연구가 활발해지면서 인체에 안전한 유기 게르마늄의 합성에 대한 연구가 시작되었다. 1960년대에 일본의 Kazuhiko Asai는 Ge 132라는 화학합성 유기 게르마늄을 개발하였고(10), 이후 미생물을 이용하여 무기 게르마늄을 유기 게르마늄으로 전환하는 연구들이 진행되었다(11). 효모는 고농도의 무기 게르마늄을 흡수하여 배양과정에서 흡수된 무기 게르마늄 중 95% 이상을 유기 게르마늄으로 전환하는 능력을 가지고 있음이 보고되었다(12). 또한 효모는 무기원소를 생합성과정을 통해 무독화시킨다는 것으로 보고되어 무기상태의 원소가 생물학적 동화작용에 의해 독성이 없어지는 것이 알려졌다(13).

본 연구는 고 농도의 게르마늄을 균체 내로 다량 유입시킬 수 있고, 건조 균체량의 수율이 높은 효모균주를 개발하고자, 전기 융합된 효모를 생산하고 효모 배지에 게르마늄을 첨가하여 게르마늄 강화 효모를 생산하였다. 단순히 무기 게르마늄이 첨가된 배지에서 배양된 효모는 성장이 저해되어 대량의 건조균체를 생산하지 못하고 만족할 만한 양의 유기 게르마늄을 생산하지 못

*Corresponding author: Sun-Woo Oh, Geranti Pharm. LTD. 678-20 Yoksam-dong, Kangnam-gu, Seoul, 135-080, Korea
Tel: 82-2-556-8275
Fax: 82-2-553-7851
E-mail: ohkn0507@hanmail.net

Received August 1, 2006; accepted September 29, 2006

한다. 따라서 발효성 효모인 *Saccharomyces cerevisiae*와 내삼투압성 *Zygosaccharomyces rouxii*를 전기융합하여 새로운 균주를 형성하고 이들의 기본적인 성질을 조사하고, 게르마늄의 수율을 확인하여 고함량 게르마늄 효모를 생산할 수 있는 최적 조건을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 기기

사용 균주: 실험에 사용한 균주는 *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7904, *Zygosaccharomyces rouxii* KCTC 7966로 한국유전자은행에서 분양받아 사용하였다.

효소와 시약: 효모의 세포벽 분해효소로서 lyticase와 cellulase는 Sigma(St. Louis, MO, USA)제품, viscozyme과 novozyme은 Novo Nordisk(Krogshoejvej, Denmark)제품을 사용하였다. 전처리 시약으로서 2-mercaptoethanol은 Sigma사 제품을 사용하였다. 이외의 시약은 특급품을 사용하였고, 배지조성 시약은 Table 1에 제시하였고, Difco (USA)제품을 이용하였다.

사용기기: 고주파 및 고전압펄스를 발생시키기 위해 실험에 이용한 electrofusion system(NK System Co., FI-700, Japan)을 사용하였다. 본 장치의 fusion chamber는 슬라이드 글라스 표면에 20×2×2 mm의 chamber가 설치되어 있고, 20×2 mm의 전극판이 chamber 안쪽에 2 mm의 간격으로 설치되어 있으며, 슬라이드 위에 있는 외부 전극봉에 본체로부터 단자를 연결하여 사용하였다.

실험방법

균주배양: *S. cerevisiae*는 YM agar plate에서, *Z. rouxii*는 malt extract agar plate에 배양하고, 형성된 single colony는 YPD 및

Table 1. Media composition

Media	Composition	(g/L)
YPD	Yeast extract	10
	Peptone	20
	Dextrose	20
YM-DS	Yeast extract	3
	Malt extract	3
	Peptone	5
	Dextrose	50
	NaCl	1
YM agar	Yeast extract	3
	Malt extract	3
	Peptone	5
	Dextrose	10
	Agar	20
Malt extract agar	Malt extract	20
	Glucose	20
	Peptone 1 agar	20
Regeneration media	Yeast extract	4
	Peptone	5
	Dextrose	50
	Noble agar (0.8%)	8
	Noble agar (2.0%)	20

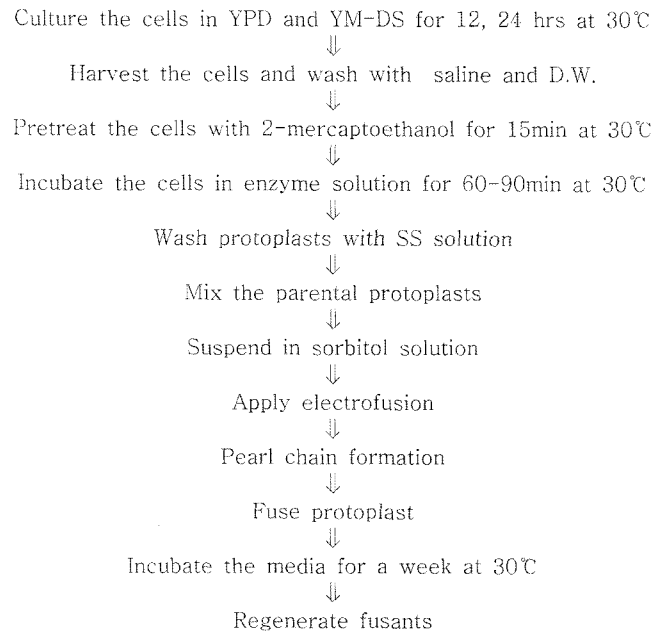


Fig. 1. procedure for protoplast formation, electrofusion and regeneration.

YM-DS배지(121°C 15분간 멸균되어 냉각됨)에 각각 백금이로 1회 접종하였다. 접종 후 shaking incubator(Vision Scientific Co., KMC-8480SF, Korea)에서 온도 30°C, 150 rpm 속도로 *S. cerevisiae*는 12시간, *Z. rouxii*는 24시간 동안 배양하였다.

세포벽 분해: 배양액을 6,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 균체를 회수하고 멸균생리식염수와 증류수로 차례로 세척한 다음 2-mercaptoethanol solution에 현탁하여 30°C에서 15-30분간 전처리하고, 효소용액(Lyticase, SIGMA Co. USA)에 1×10^6 cells/mL 농도로 재현탁시킨 것을 30°C에서 60-90분간 처리하여 원형질체를 형성시켰다.

전기융합: *S. cerevisiae*와, *Z. rouxii*의 원형질체를 5×10^5 protoplasts/mL 농도로 조정하여 1:1의 비율로 혼합하고, SS용액(sorbitol 1 M, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4)으로 1회 세척한 다음 sorbitol용액으로 2회 세척한 후 electrofusion chamber에 80 μL 를 넣고, 고주파(1.5-3.0 MHz/35-50 pV)를 발생시켜 pearl chain을 형성한 것에 고전압 펄스(450-750 V/128-512 μsec)를 반복적으로 가하여 융합시켰다. 융합세포를 SS용액으로 1회 세척한 다음 증충배양방법으로 재생배지에 도말하였고, 30°C에서 7일간 배양하여 재생시켰다 (Fig 1).

게르마늄 배지 내의 전기융합 효모 균체 선발: 융합된 세포를 효모추출물 1.0 g/L, 펩톤 2.0 g/L, 포도당 5.0 g/L, 노블아가(noble agar) 20 g/L 함유한 평판배지에 무균적으로 도말하여 증충 배양하였다(24 hr, 30°C). 성장한 균체 중에서 당 및 염 내성이 좋은 균체를 선발하였다.

균체 크기 측정: 친주와 이들의 각 원형질체, 융합과정 중의 세포와 융합체를 광학현미경(Harris-Swift, UK) 및 CCD system(Panasonic, Japan)으로 형태를 관찰하였다. 30°C에서 12-24시간 배양한 균체를 micrometer에서 비디오 프린터(Panasonic, Japan)

로 출력하여 균체의 크기를 측정하였고 세포의 체적은 다음 식에 의해 구하였다.

$$V = 4/3\pi \cdot a/2 \cdot (b/2)^2$$

V: cell volume, a: length of cell, b: width of cell

탄소원 자화성 측정: 친주와 융합주의 콜로니를 glucose, sucrose, galactose, lactose, maltose, raffinose 2%가 함유된 배지에 접종하여 30°C, 150 rpm에서 48시간 진탕배양하였고, 그 자화성을 조사하였다. 또한 포도당 농도에 따른 성장을 살펴보기 위해서 포도당 50%에서의 친주와 융합주의 자화성도 살펴보았다.

pH에 따른 게르마늄 흡수율 측정: 전기융합으로 개량한 융합주를 YM배지 50 mL이 들어있는 250 mL의 배양용 플라스크에 백금으로 1회 접종하여 진탕 배양기에서 150 rpm, 30°C로 균체농도가 10~12 g/L(약 24시간 배양)로 성장할 때까지 배양하였다. pH를 2~12로 조절되고 게르마늄 용액(100 ppm) 50 mL가 함유된 250 mL의 배양용 플라스크에 접종한 후 150 rpm, 30°C로 진탕배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 균체를 원심분리하여 회수하고, 수회 세척하여 균체 표면에 묻어 있는 무기 게르마늄을 제거하고 건조시켜서 건조 균체량을 측정하였다.

균체내 게르마늄 함량 측정: 효모에 유입된 게르마늄(100 ppm)을 정량하기 위하여 pH 5.5, 24시간 배양한 효모의 성장이 완료된 후 원심분리하여 균체만 모은다. 모아진 효모를 0.85% 생리 식염수로 2회, 2차 증류수로 2회 세척하여 효모균체 표면에 잔류하는 게르마늄 이온을 완전히 제거하였다. 상기 효모균체를 수분 함량 3% 이내로 건조한 건조효모 1g에 질산 30 mL를 넣어 완전히 가열분해 시킨 후 pH를 5.5으로 보정하여 페닐플루오르 용액 1 mL, 사이클로헥산을 1 mL, 시료 1 mL을 혼합하여 30°C에서 30분간 방치 후 525 nm에서 흡광도를 측정하여 미리 구한 표준곡선에 의해 게르마늄 함량을 구한다.

결과 및 고찰

세포 융합 및 융합 빈도

Electrofusion chamber에 고주파를 발생시켜 pearl chain을 형성하고 고전압 펄스를 반복적으로 가한 후 *S. cerevisiae*와 *Z. rouxii*의 융합주를 형성하였다(Fig. 2). 양극사이에 전류가 흐르게 되면 세포내 이온들이 전극을 향하여 이동하면서 세포내에서 (+) (-)의 정렬이 일어났다. 세포막에 존재하는 음전하는 교류 전기장의 밀도가 높은 곳으로 이동하여 dielectrophoresis가 생기고, 주파수를 증가시키면 이온들이 더 이상 이동하지 못하면서 사슬모양으로 전기장 내에서 배열하여 pearl chain을 형성하였다(1). 이렇게 형성된 원형질체들은 fusion chamber 내의 전기장을 따라 밀접하게 접촉한 후(2), 짧은 시간의 강한 직류를 가하자 세포막의 파괴가 일어나고 세포막의 재 유착 과정에 의해서 두 세포간의 융합이 일어났다(3,4).

*S. cerevisiae*와 *Z. rouxii*를 세포융합시켰을 때 최소배지에 자란 colony수는 200개이고, 완전배지에서 자란 colony수는 2.89×10^7 으로서 융합빈도는 5.63×10^{-6} 이었다. 융합체는 임의방향으로 출아법으로 증식하였고, pH 6.2에서 빠르게 생육하는 것으로 나타났다. 질산염 자화성은 음성이었다.

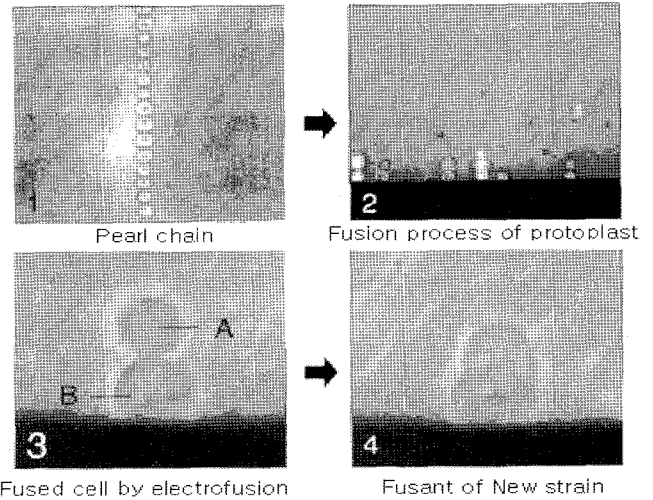
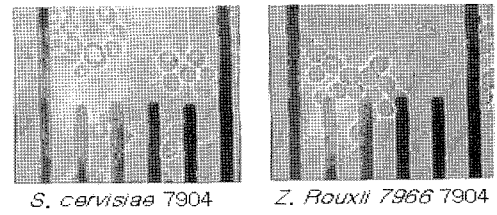


Fig. 2. The electrical fusion-process of *S. cerevisiae* and *Z. rouxii*.

전기융합 효모균체의 선별 및 성장 확인

융합된 세포를 배지에서 계대하여 성장이 빠른 균체를 선별하고 탄수화물 이용성 및 당 내성, 염내성의 특성을 확인하였다. 탄수화물의 이용성에서 *S. cerevisiae*와 융합체는 비슷한 양상의 이용성을 보였지만, 다당류인 dextrin은 융합체만 이용하는 것으로 나타났다(Table 2). 포도당 농도에 따른 내성 실험에서는 *Z. rouxii*와 융합체가 유사한 내성을 보였으며, *S. cerevisiae* 보다 좋은 내성을 나타냈다. *S. cerevisiae*는 포도당 농도가 40% 이상에서는 생육이 불가능 한 것으로 나타났다(Table 3).

NaCl에 대한 내염성

NaCl첨가량 (3-18%)에 따른 내성을 살펴본 결과(Table 4), 융합주와 *S. cerevisiae*는 12%까지 염내성을 나타냈으며, *Z. rouxii*는

Table 2. Carbohydrate usage of the yeast

Carbohydrate	<i>S. cerevisiae</i> KCTC 7904	<i>Z. rouxii</i> KCTC 7966	Fusants
Glucose	+	+	+
Galactose	+	-	+
Fructose	+	+	+
Maltose	-	+	-
Lactose	-	-	-
Sucrose	+	-	+
Starch (Soluble)	-	-	-
Dextrin	-	+	+
Mannitol	-	-	-
Raffinose	+	-	+

Table 3. Glucose tolerance test

Glucose concentration (%)	<i>S. cerevisiae</i> KCTC 7904	<i>Z. rouxii</i> KCTC 7966	Fusants
0	-	-	-
1	+	+	+
2	+	+	+
5	+	+	+
10	+	+	+
20	+	+	+
30	+	+	+
40	-	+	+
50	-	+	+

Table 4. NaCl tolerance of parents and fusants

NaCl (%)	<i>S. cerevisiae</i> KCTC 7904	<i>Z. rouxii</i> KCTC 7966	Fusants
0	+	+	+
3	+	+	+
6	+	+	+
9	+	+	+
12	+	-	+
15	-	-	-
18	-	-	-

9%까지 염 내성을 나타냈다. Lee 등(14)의 연구에서는 *S. cerevisiae* D-71과 *Z. rouxii* SR-S의 융합주의 염내성은 16%로 보고되었으며, *S. cerevisiae*는 8%, *Z. rouxii*는 20%까지 염내성을 보여서 *S. cerevisiae*는 본 연구와 유사한 결과를 보였지만, 융합주와 *Z. rouxii*는 본 연구보다 다소 높은 값이었다. Seu 등(7)의 연구에서는 융합주의 염내성이 8%, *S. diastaticus*는 5%의 염내성을 보여서 융합주는 본 연구와 유사한 염 내성을 보였다. 본 연구에서 *S. cerevisiae*가 *Z. rouxii*보다 염내성이 다소 높은 것으로 확인되었으나, 추후 연구가 더 필요한 것으로 사료된다. 이러한 연구결과로, 융합주의 염내성이 친주보다 높음을 알 수 있었다. 세포는 생존을 위해서 세포 내 산-염기 균형, 세포 부피, 그리고 염 내성에 영향을 받는다. 한편, 세포벽 제거로 분리되어 나오는 원형질체 세포를 삼투압이 안정된 상태로 유지하기 위해서는 sorbitol이나 mannitol, 또는 KCl같은 성분을 첨가하며 반응용액의 점도가 너무 높거나 낮은 경우도 원형질체의 안정성이 떨어진다(15). 따라서 염의 농도가 높은 경우에는 세포 원형질체가 불안정하므로 융합체의 경우 8-12% 염농도가 적합한 것으로 판단된다.

탄소원 자화성

친주와 융합주의 탄소원에 대한 자화성은 Table 5와 같이 나타났다. *S. cerevisiae*는 glucose 농도가 50% 이상이 되면 성장이 감소되었고, 반면, *Z. rouxii*와 융합주는 glucose 50%에서도 자화성을 나타냈다. 또한 Sucrose와 galactose에서는 *Z. rouxii*보다 *S. cerevisiae*와 융합주가 더 좋은 자화성을 보여서 탄소원 자화성은 상호 보완됨을 알 수 있었다. Table 3에서 보는 바와 같이 glucose 40% 이상에서는 *S. cerevisiae*가 생존하지 못하는 반면, *Z. rouxii*는 고농도 기질에서도 성장하였으며, 융합체는 *Z. rouxii*의 영향으로 성장이 가능한 것으로 보였다.

효모는 고농도 기질에서는 발효력이 떨어지는 양상을 보이며(16,17), 이를 개선하기 위해서 세포융합방법을 이용하여 효모의

Table 5. Assimilation of carbon sources (2%) by the parents and fusant

Carbon sources	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Z. rouxii</i>	Fusant
Glucose 2%	+++	++	+++
Glucose 50%	-	+++	+
Sucrose	+++	+	+++
Galactose	+++	-	+++
Lactose	-	-	-
Maltose	-	+	-
Raffinose	++	+	++

Table 6. Cell size and capacity of the parents and the fusant

Strains	Cell length (μm)	Cell width (μm)	Cell volume (μm^3)
<i>S. cerevisiae</i>	7.3	5.7	125.4
<i>Z. rouxii</i>	5.7	5.3	84.1
Fusant	7.8	6.7	180.8

Table 7. The effect of pH on the waste of GeO_2

pH	Amount of cell (g/L)	Waste rate of GeO_2 (%)	pH after incubation
2	0.14	7.22	2.18
3	0.45	3.42	2.62
4	6.11	4.48	3.04
5	6.51	10.61	3.82
6	6.38	7.44	4.04
7	6.35	8.70	4.26
8	5.84	9.97	4.66
9	4.95	3.00	4.92
10	4.50	4.05	5.56
11	3.89	4.69	6.62
12	2.47	7.65	6.75

빠른 성장속도와 더불어 고농도 기질에서 내성을 가지도록 하는 연구가 많이 진행되었다(18). 본 연구결과에서도 융합체가 친주보다 탄소원 자화성이 우수한 것으로 나타나 전기융합으로 개발된 융합체는 고농도 기질에서도 생육이 가능한 것으로 나타났다.

균체 크기 측정

친주와 융합체의 크기를 광학현미경하에서 측정된 결과, Table 6과 같이 *S. cerevisiae* 7904는 $125.4 \mu\text{m}^3$ 이었고, *Z. rouxii* 7966는 $84.1 \mu\text{m}^3$ 이었으며, 융합체는 $180.8 \mu\text{m}^3$ 로 친주보다 컸다. 세포융합에 따른 세포 체적의 증가비율은 친주에 비해 평균적으로 179.6% 증가하였다. Sabelnikov 등(19)의 연구와 Kazunobu 등(20)의 연구에서도 친주보다 융합주의 세포 체적 및 DNA 함량이 더 많은 것으로 보고되어 본 연구결과와 같음을 알 수 있었다. 세포의 균체크기는 유기 게르마늄 함량의 증가에 직접적인 영향을 미치고, 효모를 이용한 식품가공에도 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

pH에 따른 게르마늄 흡수율 측정

전기융합된 효모의 pH 변화에 따른 균체 내 게르마늄의 소모율을 확인해 본 결과, pH 5에서 균체소모율은 6.51 g/L , 산화게르마늄 소모율은 10.61%이었다(Table 7). 효모 배양 조건에 따른 균

Table 8. Germanium concentration of parents and fusant

Strains	Germanium concentration (ppm)
<i>S. cerevisiae</i>	1,856
<i>Z. rouxii</i>	1,310
Fusant	5,180

체내 게르마늄 함량을 분석한 연구(21)에서 효모는 pH 변화에 따라 게르마늄 함량이 비교적 민감하게 반응하였으며, pH 6~6.5에서 최대 함량을 나타냈고 pH 7 이상에서는 게르마늄 함량이 저하되는 것으로 보고되었다. 본 연구에서는 pH 6부터 게르마늄 소모율이 저하되다가 pH 8까지 서서히 증가하였으나, 9이후부터는 게르마늄 소모율이 급격히 저하되어 게르마늄 흡수 최적 pH는 pH 5~8의 범위로 간주될 수 있다. 본 연구에서는 융합효모를 대상으로 pH 변화에 따른 게르마늄 소모율을 확인하였고, 최적 pH는 5~8로 확인되었다.

효모균체 내 게르마늄 함량

pH 5.5에서 건조 효모내 함유되어 있는 게르마늄 농도는 *S. cerevisiae*는 1,856 ppm, *Z. rouxii*는 1,310 ppm, 융합체는 5,180 ppm으로 친주보다 약 4배 이상 게르마늄 농도가 가장 높았다 (Table 8). 균체의 크기 및 체적도 친주보다 융합체가 더 큰 것으로 확인되었고 (Table 6), 이에 따라 게르마늄의 균체 내 농도도 융합체가 가장 높은 것으로 확인되었다. Lee와 Kim의 연구논문 (14)에 의하면 *S. cerevisiae*와 *Z. rouxii*의 전기융합으로 형성된 새로운 융합주는 유전적으로도 안정하고, 친주에 비해 체적이 컸으며, glucose와 sucrose에 대한 발효력도 증가된 것으로 보고하고 있다. 이러한 연구결과는 융합 균주가 유용한 물질을 생산하는데 효과적이며, 본 연구의 고품량 유기 게르마늄의 생산에도 효과적임을 알 수 있다.

요 약

고함량 게르마늄을 함유시키기 위해서 *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7904와 *Zygosaccharomyces rouxii* KCTC 7966를 전기융합하고 효모 배지에 게르마늄을 첨가하여 게르마늄 강화 효모를 생산하였다. 전기융합된 효모의 원질체는 여러 개의 긴 pearl chain을 형성했고, fusion chamber 내의 강한 직류에 의해서 세포막의 파괴가 일어나고 세포막의 재유착 과정에 의해서 두 세포간의 융합이 일어났다. 융합된 세포를 배지에서 계대하여 성장이 빠른 균체를 선별하고, 탄수화물 이용성 및 당 내성, 염내성의 특성을 확인한 결과, 당내성은 융합체가 *Z. rouxii*와 유사하고, *S. cerevisiae*보다 좋은 내성을 보였다. *S. cerevisiae*는 포도당 농도가 40% 이상에서는 생육이 불가능 한 것으로 나타났다. NaCl첨가량에 따른 내성을 살펴본 결과, 융합주는 12%까지 내성을 나타냈다. 융합체의 크기는 친주보다 컸으며, pH 5의 범위에서 게르마늄의 최적 소모율을 나타냈다. pH 5.5에서 건조 효모내 함유되어 있는 게르마늄 농도는 *S. cerevisiae*는 1,856 ppm, *Z. rouxii*는 1,310 ppm, 융합체는 5,180 ppm으로 친주보다 약 4배 이상 게르마늄 농도가 가장 높았다. 게르마늄의 함량을 높이기 위한 *S. cerevisiae*와 *Z. rouxii*의 전기융합은 효모 균체의 체적을 증가시켰을 뿐만 아니라, 게르마늄의 균체내 축적율도 증가시켜서 다량의 유기 게르마늄을 생산하는 데 매우 효과적이었다.

결론적으로, *S. cerevisiae*와 *Z. rouxii*의 전기융합을 통해 개발

된 융합체는 40% 이상에서 당내성을 보이고, NaCl 15% 이상까지 내성을 나타냈으며, 균체의 크기 및 게르마늄의 흡수율도 친주보다 우수하였고, pH 5에서 최대의 게르마늄 흡수율을 보였다. 이렇게 개발된 융합체는 향후 고품량 게르마늄을 생산하는데 매우 유용한 균주로 이용될 수 있음을 확인하였다.

문 헌

1. Anna KK. Yeasts and Yeast-like Organisms. (1st ed.), VCH Press, New York, USA. pp. 131-205 (1990)
2. Peberdy JF, Ferenczy L. Fungal protoplasts. Applications in Biochemistry and genetics. Marcel Dekker, New York, USA. pp. 1-56 (1985)
3. Zimmermann U, Scheurich P. High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields. *Planta* 151: 26-32 (1981)
4. Bates GW, Gatner JJ, Shekhawat NS. Fusion of plant protoplast by electric fields. *Plant Physiol.* 72: 710-1113 (1983)
5. Bae YS, Seu JH. Protoplast fusion between *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida lipolytica* (I, II). *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 14: 17-27 (1986)
6. Seu JH, Kim YH, Jun DY, Lee, JT. A study on strain improvement by protoplast fusion between amylase secreting yeast and alcohol fermenting yeast (I, II). *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 14: 305-318 (1986)
7. Seu JH, Koo TK, Hong SD. A study on strain improvement by protoplast fusion between amylase secreting yeast and alcohol fermenting yeast (III, IV). *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 14: 359-363 (1986)
8. Lee HK, Kim JS, Kang TB. Extraction of organic germanium compound from garlic. *Inst. Natural Sci. Sanhmyung Univ.* 12: 1-18 (2004)
9. Schroeder HA, Balassa, JJ. Arsenic, germanium, tin, and vanadium in mice: Effect on growth, survival and tissue levels. *J. Nutr.* 92: 245-252 (1967)
10. Asai K. Miral cure-organic germanium. Japan Publication Inc. USA. pp. 45-69 (1980)
11. Klapcinska B, Chmielowski J. Binding of germanium to *Pseudomonas putida* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 1144-1147 (1986)
12. Wei, XS. Effect of yeast on bioenrichment of germanium. *J. Food Sci.* 149: 49-54 (1992)
13. Lynn, MR, Geoffrey MG. Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in vacuolar function a role for the vacuole in toxic metal ion detoxification. *Microbiol. Lett.* 152: 293-298 (1997)
14. Lee JS, Kim CJ. Characterization of fusant from protoplast fusion between *Saccharomyces cerevisiae* D-71 and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 16: 297-302 (1988)
15. Pina C, Calderon IL, Benitez T. Intergeneric hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces fermenti* obtained by protoplast fusion. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 995-1003 (1986)
16. Machamontri V, Chavanich S, Nilubol N, Ohta K, Hayashida S. Ethanol tolerant thermophilic *Saccharomyces* species. *Ann. Rep. ICME.* 5: 247-252 (1982)
17. Fujio Y, Atthasampuna P. Isolation and application of thermophilic microorganism for alcohol fermentation. *Ann. Rep. ICME.* 4: 382-388 (1981)
18. Loray MA, Spencer JFT, Spener DM, Figueroa LIC. Hybrids obtained by protoplast fusion with a salt-tolerant yeast. *J. Ind. Microbiol.* 14: 508-513 (1995)
19. Sabelnikov AG, Cymbalyuk ES, Gongadze G, Borovyagin VL. *Escherichia coli* membranes during electrotransformation: an electron microscopy study *Biochim. Biophys. Acta Biomembranes* 1066: 21-28 (1992)
20. Kazunobu S, Yan W, Masao K, Takuo S. Breeding a fermentation yeast at high temperature using protoplast fusion. *J. Ferment. Bioeng.* 81: 104-108 (1996)
21. Lee SH, Ahn SD, Rho SY, Shon TU. A study on preparation and binding properties of germanium-fortified yeast. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 48: 382-387 (2005)