

## 게르마늄강화효모의 게르마늄결합 단백질의 분리 및 확인에 관한 연구

이성희\* · 이상광<sup>1</sup> · 이현주<sup>2</sup> · 이용섭<sup>3</sup> · 박은우<sup>4</sup>

계란티제약(주) 중앙연구소\*, 한국기초과학지원연구원<sup>1</sup>, 한경대학교 영양조리학과<sup>2</sup>  
서울벤처정보대학원대학교 컴퓨터응용기술학과<sup>3</sup>, 서울대학교 응용생명화학부<sup>4</sup>

### Study on Identification and Purification of Germanium-fortified Yeast

Sung Hee, Lee\*, Sang Kwang Lee<sup>1</sup>, Hyun Joo Lee<sup>2</sup>, Yong Sub Yi<sup>3</sup> and Eun Woo Park<sup>4</sup>

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

<sup>1</sup>Korea Basic Science Institute, 52 Yeo-eun-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-333, Korea

<sup>2</sup>Department of Nutrition and Culinary Sciences, Hankyong National University, Gyeonggi-do, Korea

<sup>3</sup>Seoul of University of Venture and Information, Seoul 137-070, Korea

<sup>4</sup>Applied Biology and Chemistry, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Received December 30, 2005; Accepted February 9, 2006

This study was designed to investigate the optimum manufacturing condition of germanium-fortified yeast, and the binding properties of germanium (Ge) in germanium-fortified yeast. The nutritional optimum conditions were glucose 3.0 (w/v) %, yeast extracts 0.3 (w/v) % and peptone 0.5 (w/v) %, and the amounts of yeast cells were 67.4 mg/ml. And, the standard germanium-fortified yeast was produced under the condition at the ratio of yeast cell and germanium solution was 1 : 0.5 (50%), pH 6.5 and 35-40°C during fermentation. In results of the identification, binding of germanium-protein showed structural difference between the inorganic Ge (GeO<sub>2</sub>) added during fermentation process and germanium-fortified yeast. Therefore, germanium-fortified yeast made by biosynthetic technology formed structurally safe organic germanium during fermentation process. Germanium-fortified yeast can be applied as a new functional material for the improvement of health, the prevention and treatment of chronic degenerative disease like cancer, and the enforcement of immune system.

**Key words:** germanium-fortified yeast, fermentation, germanium, germanium-protein

### 서 론

효모의 일종인 *Saccharomyces cerevisiae*는 식품 분야에서 오래 전부터 여러 가지 유용 물질의 원료로 사용되어 왔다. 즉, 균체 내에 50% 내외의 단백질, 지질, RNA 등의 핵산, 각종 비타민 및 미네랄을 함유하고 있으며 다양한 용도로 사용되고 있다.<sup>1)</sup> 효모는 발효 문화의 기원과 함께 사용되기 시작하였으며, 분자 생물학, 분자유전학을 비롯한 여러 분야의 생물학 연구를 위한 model system으로서 지대한 기여를 해왔다.<sup>2)</sup> 효모의 자가소화에 의해 생산된 효모 추출물은 단백질, 핵산, 지질, 비타민의 원료로 사용되어 왔으며 미생물 발효 배지, 조미료, 건강 식품 등에 사용되어 전 세계적으로 큰 시장을 형성하고 있다.<sup>3)</sup> 효모는 단일 세포(single cell)로는 최고의 비타민 B군 공

급원이고, 생체내의 대사활동에 중요한 역할을 담당하는 효소를 다량 함유하고 있어, 기능성 원료로 연구되고 있다.<sup>4,5)</sup> 이러한 효모를 이용한 연구로는 양 등<sup>6)</sup>의 토양으로부터 *Saccharomyces cerevisiae* D1 분리 연구, 인 등<sup>7)</sup>의 효모추출물 제조 방법 연구, 박 등<sup>8)</sup>의 효모 변이주를 이용하여 베타글루칸 면역활성능에 대한 연구 등이 있으며 많은 분야에서 연구가 활발하게 진행되고 있다.

게르마늄이라는 원소는 1886년 독일의 화학자 Clemens Winkler에 의해 최초로 발견되었다. 게르마늄의 효능은 프랑스와 스페인의 국경 지방인 Lourdes의 샘물의 질병 치료 효과가 성분 중 게르마늄의 함량이 높아 치료 효과를 보인다는 보고서가 1930년 처음 발표된 이후부터 알려지기 시작하였다.<sup>9,10)</sup> 그 후 체내에 잔류하지 않고 약리작용을 할 수 있는 유기게르마늄에 대한 연구가 활발히 진행되어 인삼, 영지, 마늘, 명일엽 등 보양 및 강장의 작용이 있다고 알려진 식품에서 비교적 많은 양의 천연 유기게르마늄이 함유된 사실이 밝혀졌고<sup>11)</sup>, 1960년대에 이르러 일본의 Kazuhiko Assai 박사에 의해 Ge-132라는

\*Corresponding author  
Phone: 82-2-556-1367; Fax: 82-2-553-7851  
E-mail: gepharm@gerantiusa.com

화학 합성 유기 게르마늄이 세계 최초로 개발되었다.<sup>12)</sup> 지금까지 알려진 체내에서의 유기게르마늄의 역할은 세포 내 산소 공급 증진<sup>13)</sup>, 혈액의 정화<sup>9)</sup>, 체내 중금속의 체외 배출 촉진<sup>12)</sup>, 면역 세포의 활성화<sup>14)</sup> 등이다. 이와 같은 게르마늄의 기능으로 고농도의 안전한 유기게르마늄을 식물체를 이용하지 않고, 미생물을 이용해서 짧은 시간에 대량 생산하려는 노력을 기울인 결과, Nobuhiro 등<sup>15)</sup>은 게르마늄을 함유하는 효모의 생산 가능성을 제시하였다. VanDyke 등<sup>16)</sup>은 배양액의 GeO<sub>2</sub> 농도가 1.0 mg/ml에 이르렀을 때 *Saccharomyces cerevisiae*가 GeO<sub>2</sub>에 적응할 수 있음을 보고하였으며, 이를 계기로 게르마늄 관련 연구가 시작되었다. Wei<sup>17)</sup>는 효모가 고농도의 무기게르마늄을 흡수할 수 있으며, 배양을 통해 균체 내에 축적된 게르마늄이 95% 이상이 유기게르마늄임을 밝혀 효모가 무기게르마늄을 유기 게르마늄으로 전환하는 능력이 있다는 것을 보고하였다. Klapcinska 등<sup>18)</sup>은 *Pseudomonas putida* 세포 중의 게르마늄의 축적은 주로 수용성 분획에 있고 대다수가 핵산과 단백질에 결합해 있음을 전자현미경 사진 분석을 통해 확인하였다. 또한, 효모가 무기원소의 독성을 무독화 시킨다는 보고<sup>19)</sup>는 효모 내에서 대사과정에 의해 무기 게르마늄이 유기게르마늄으로 전환되어 생물학적 동화작용에 의해 독성이 없어진다는 것을 의미한다.

본 연구에서는 면역 기능을 지닌 신소재로써<sup>20)</sup> 산업적인 이용 가치가 높은 게르마늄 강화 효모를 개발하는 과정에서<sup>21)</sup> 게르마늄 강화 효모의 제조 방법에 따른 최적의 조건을 확립하고 제조된 게르마늄 강화 효모의 게르마늄 결합상태를 확인하는 것을 목적으로 하였다.

## 재료 및 방법

**균주 및 배지 조성.** 효모는 생명공학연구소(KRIBB) 유전자은행(KCTC)에서 분양 받은 *Saccharomyces cerevisiae*(KCTC-1199) 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, 이 등<sup>22)</sup>의 20시간을 배양 시간으로 pH 4-8과 20-50°C의 조건에서 균체를 생산하였다.

**게르마늄 강화 효모 생산 조건에 따른 게르마늄 함량 측정.** 게르마늄 강화 효모 생산 공정 중 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 변화와 효모 균체 내로의 게르마늄 흡수에 따른 온도(20, 30, 35, 40, 45 및 50°C) 및 pH(4, 5, 6, 6.5, 7 및 8)의 변화에 따른 게르마늄 함량 변화를 측정하였다.

**시료 전처리.** 제조된 게르마늄 강화 효모 3g을 액체질소로 동결시킨 후 막자 사발로 분쇄하여 세포벽을 파쇄하였다. 세포벽이 파쇄된 게르마늄 강화 효모를 4-5 ml/ 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer로 현탁시키고 이 액을 원심분리하여(12,000 rpm, 20분, VS-21SMT, 비전과학, 한국) 상등액만을 취하여 수용성 추출물을 얻었다. 이 액을 0.45 µm(Millipore, USA) 필터로 이물질을 제거한 후 분리정제를 위한 시료로 사용하였다.

**게르마늄 함량 측정.** 게르마늄의 함량 측정은 ICP 분석기

(SHIMADZU, ICPS-1000, Japan)로 분석하였으며, 분석 조건은 파장 209,49 nm, R.F. Power 1.2 kw, Torch height 15 mm였으며, 게르마늄 표준액(Aldrich사, Ge standard solution)을 사용하였다.

**Ion Exchange Chromatography.** 게르마늄 강화 효모 추출물의 정제는 Bio-Rad System의 Liquid Perfusion Chromatography를 사용하였으며, 컬럼은 음이온 컬럼(Poros HQ-20, USA)과 양이온 컬럼(Poros HS-20, USA)을, buffer A는 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)와 elution buffer B는 50 mM Tris-HCl(pH 7.5)과 1 M NaCl을 사용하였다. 4 ml/min 의 유속으로 컬럼을 다음의 조건으로 전개하였다. 약 5분간 buffer A로 세척, 다음 5분간 buffer B, 이후 5분간 buffer A로 세척하였다. 시료 2 ml를 컬럼에 주입 후 같은 유속으로 5분간 buffer A, 10분간 buffer B로 전개하였다. 이때 컬럼에서 나오는 단백질을 280 nm에서 흡광도를 측정하였으며 각 분획 당 4 ml씩 받았다.

**Gel Filtration.** Bio-Rad System의 Liquid Perfusion Chromatography를 사용하였으며 column은 SHODEX Protein KW-803(8 mm × 300 mm, exclusion limit 1.5 × 10<sup>5</sup>, USA), buffer는 50 mM Tris-HCl(pH 7.5)를 사용하였다. 유속은 0.5 ml/min로 약 15-20분간 컬럼을 세척하였으며, 시료를 주입 후 같은 유속으로 40분간 컬럼을 전개하였다. 이때 컬럼에서 나오는 단백질을 280 nm에서 흡광도를 측정하였으며 각 분획 당 1 ml씩 받았다. 각 분획물 중 활성 peak 시료를 모아 농축한 후 prep. cell unit(Bio-Rad Co. USA)에서 정제하였으며, Prep. cell에 사용한 gel은 5% polyacrylamide gel이었다. Tris-glycine buffer(pH 8.3)를 40 mA로 3시간 전개 시킨 후 각 분획 당 1 ml씩 받았다.

## 결과 및 고찰

**게르마늄 강화 효모 생산 조건에 따른 게르마늄 함량.** 게르마늄 강화 효모 제조에 필요한 배지 조성 결과는 Table 1과 같으며, 영양소별 최적 조건은 글루코스 3.0%, 효모추출물 0.3%,

Table 1. The culture medium of yeast with the different nutritional composition

Glucose (%)	Peptone (%)	Yeast extract (%)	Amount of yeast (mg/ml)
1.0	0.1	0.1	41.6 ± 1.9 *
2.0	0.1	0.1	44.5 ± 2.1
3.0	0.1	0.1	49.8 ± 1.8
4.0	0.1	0.1	41.4 ± 1.8
5.0	0.1	0.1	52.2 ± 2.4
3.0	0.2	0.1	50.9 ± 2.3
3.0	0.3	0.1	56.7 ± 2.5
3.0	0.4	0.1	53.3 ± 2.4
3.0	0.5	0.1	53.6 ± 2.2
3.0	0.5	0.2	53.5 ± 2.9
3.0	0.5	0.3	67.4 ± 2.8
3.0	0.5	0.4	58.8 ± 2.8
3.0	0.5	0.5	53.3 ± 2.6

\*Mean ± S.D., n=5.

**Table 2. Comparison of germanium accumulated in the yeast by the ratio of yeast and inorganic germanium**

The ratio of yeast: inorganic germanium	The amount of accumulated germanium in the yeasts (ppm)
1 : 0.5	5215 ± 125.32*
1 : 1	4698 ± 89.87
1 : 2	2672 ± 56.44
1 : 3	1340 ± 27.28

\*Mean ± S.D., n=5.

**Table 3. The effect of pH and temperature during yeast fermentation**

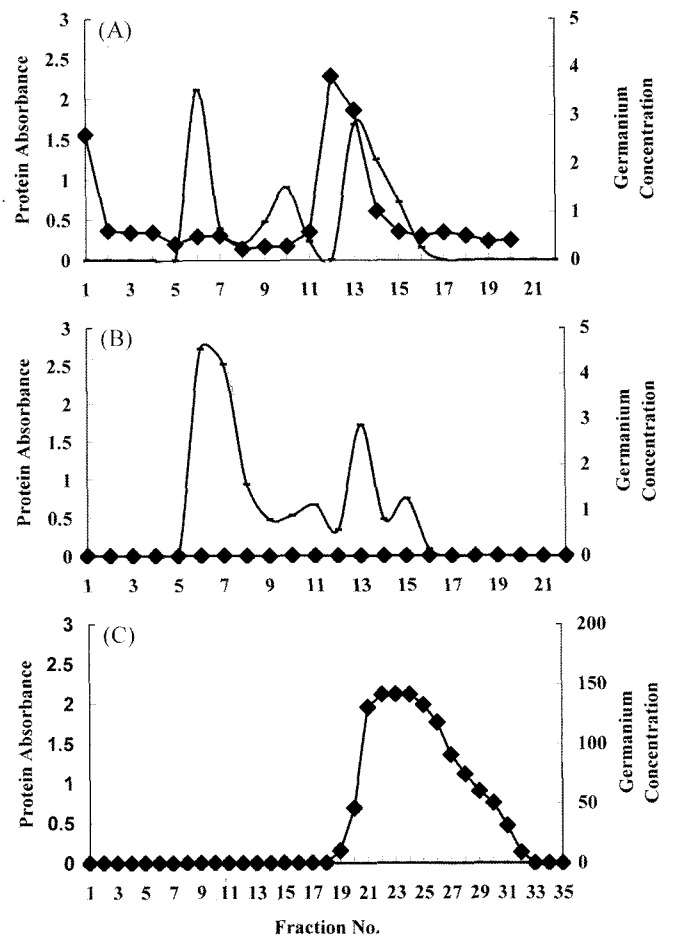
pH	Germanium <sup>1)</sup> (ppm)	Temp (°C)	Germanium (ppm)
4.0	1775 ± 22.12	20	2552 ± 35.21*
5.0	3168 ± 27.85	30	3845 ± 55.58
6.0	4638 ± 38.97	35	5344 ± 62.14
6.5	5836 ± 53.86	40	4789 ± 49.72
7.0	3556 ± 42.12	45	2321 ± 22.14
8.0	2567 ± 31.03	50	1842 ± 18.87

<sup>1)</sup>Concentration of organic germanium accumulated in the yeasts.

<sup>2)</sup>Mean ± S.D., n=5.

펩톤 0.5%였으며, 이 때 생성된 균체량은 67.4 mg/m<sup>2</sup>였다. 효모 균체와 게르마늄 용액(5,000 ppm)의 혼합 비율(부피비) 결과는 Table 2와 같이 효모 균체와 게르마늄의 혼합 비율이 1 : 0.5(50%)일 때 5,215 ppm으로 가장 높은 게르마늄 함량을 나타냈다. 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 Table 3과 같이 나타나 VanDyke 등<sup>16)</sup>이 배양액의 GeO<sub>2</sub> 농도가 1.0 mg/m<sup>3</sup>에 이르렀을 때 *Saccharomyces cerevisiae*가 GeO<sub>2</sub>에 적응할 수 있음을 보고한 연구보다 낮은 게르마늄 농도에서 배양 조건이 형성되었다. 효모는 배양 조건 중 pH 변화에 비교적 민감하게 반응하였으며, 적정 pH는 6.0-6.5의 범위로 나타났으며, 최적의 pH는 6.5 일 때가 가장 높은 게르마늄 함량(5,836 ± 53.86 ppm)을 나타냈다. 배양 온도에 따른 효모 균체 내 게르마늄 함량 비교 결과, 적정 온도는 35-40°C로 나타났으며, 최적 온도는 35°C일 때 가장 높은 게르마늄 함량인 5,344 ± 62.14 ppm을 나타냈다. 게르마늄 강화 효모 내에 게르마늄의 함량이 높을수록 용해도가 낮아지는 경향이 있어, 최적 배양 조건(pH 6.5, 35°C, 20시간)으로 생산된 게르마늄 강화 효모 중 성장, 풍미 및 용해도가 가장 좋은 시료(3,210 ppm)를 선정하여 게르마늄 결합 단백질을 확인하고자 시료로 사용하였다. 배양 과정을 통해 효모가 무기게르마늄을 유기게르마늄으로 전환하는 능력이 있음을 보고한 연구 결과<sup>10)</sup>와 같이 본 실험 조건에 의해 제조된 게르마늄 강화 효모 역시 유기게르마늄을 함유한 효모로 판단되어 이에 대한 분리 정제를 실시하였다.

**단백질의 분리, 정제 및 확인.** 게르마늄 결합 단백질을 분리하기 위해 이온 교환 수지를 이용하여 효모에 의해 생성된 게르마늄이 해리 상태로 존재하지 않는 것을 확인할 수 있었고, 게르마늄과 protein의 complex 형성에 의하여 Ge-binding protein이 charge를 띄지 않는 것으로 보여진다. 따라서 효모에 의한



**Fig. 1. Elution profile of gel filtration (Shodex protein KW-803 column) for yeast extract.** (A) Yeasts were grown in the presence of GeO<sub>2</sub>, (B) Yeasts were grown in the absence of GeO<sub>2</sub>, (C) Only GeO<sub>2</sub>. ◆: Germanium concentration, ■: Protein absorbance.

유기 게르마늄의 존재를 확인하기 위하여 gel filtration을 수행하였다. 게르마늄 강화 효모 추출물을 이용하여 gel filtration column을 통과한 분획을 280 nm에서 단백질의 흡광도를 측정하였고, ICP 측정으로 게르마늄의 함량을 확인하였다.

무기게르마늄 존재 하에서의 게르마늄 강화 효모 추출물을 gel filtration한 결과 12번과 13번 분획에서 단백질과 게르마늄이 모두 검출되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1-A). 한편 무기게르마늄이 없는 조건에서 배양한 게르마늄 강화 효모 추출물의 gel filtration 결과에서는 단백질의 elution profile은 무기게르마늄 존재 하에서의 결과와 일치했지만, 12번과 13번 분획에서의 ICP 측정 결과 게르마늄의 존재를 확인할 수 없었다(Fig. 1-B).

Fig. 1-A에서 게르마늄의 존재가 무기게르마늄 자체인지 효모에 의해 생산된 새로운 형태의 게르마늄인지를 확인하기 위하여 해리 형태의 무기게르마늄을 이용한 gel filtration을 수행하였다. Fig. 1-C에서 보는 바와 같이 해리 형태의 무기게르마늄(GeO<sub>2</sub>)은 단백질의 존재 유무에 상관없이 20번 이상의 분획에 존재 한다는 것을 알 수 있었다. 따라서 무기게르마늄의 존재 하에 배양된 게르마늄 강화 효모 추출물 12번과 13번 분획

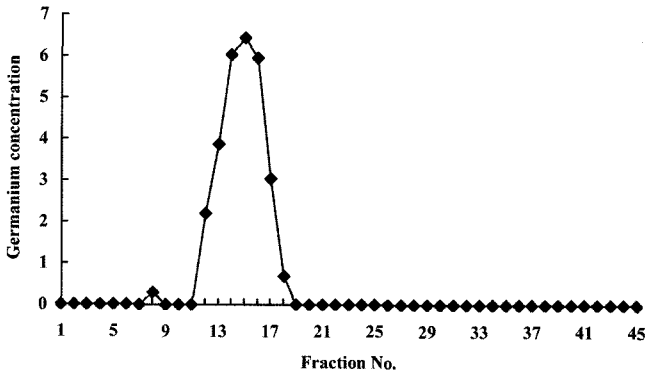


Fig. 2. Germanium contents of each fraction separated by prep. cell.

의 게르마늄은 해리된 무기 형태의 게르마늄이 아닌 단백질과 결합된 유기 형태의 게르마늄인 것을 확인할 수 있었다. Klapcinska 등<sup>9)</sup>의 연구에 의하면 효모가 고농도의 무기게르마늄을 흡수할 수 있다는 연구 결과 및 이 등<sup>22)</sup>의 게르마늄의 결합 상태를 NMR(Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer) 분석 결과와 같은 것으로 나타나, 이는 게르마늄이 배양 과정 중에 단백질과 결합된 형태로 전환된 것으로 사료된다.

Fig 1-A의 12번과 13번 분획에 존재하는 Ge-binding protein을 분리 및 확인 하기 위하여 prep. cell 정제를 수행하였다. Gel filtration에 의해 분리된 12번과 13번 분획을 모은 후 Ge-binding protein만을 순수 분리 하기 위해 prep. cell로 정제하고, ICP 측정으로 게르마늄의 함량을 확인하였다. Prep. cell로 정제를 실시한 결과 12번-18번 분획 범위에서 게르마늄이 존재함을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 가장 높은 게르마늄 함량을 나타내는 분획은 13-15번 세 개였다. 이들 분획에 대한 단백질의 존재 여부를 확인하기 위해 SDS-PAGE로 실험한 결과, Ge-단백질 복합체의 분자 질량은 약 34 kDa이 되는 것으로 나타났다(자료 미제시). 향후 Ge-단백질 복합체에 대한 연구는 Ge 결합 부위에 대한 단백질의 입체 구조 분석을 통해 소수성 결합(hydrophobic bond)이나 기타 다른 결합으로 형성되어 있는지 더 진행될 필요가 있다고 사료된다.

본 연구 결과에 따르면 효모 균체와 게르마늄 용액(5,000 ppm)의 혼합 비율을 1:0.5(50%), pH는 6.0-6.5 및 온도는 35-40°C로 배양하는 것이 게르마늄 강화 효모 내의 게르마늄을 고 함량으로 생산하는 적절한 조건임을 확인하였으며, 배양 조건 중 pH 6, 35°C 그리고 20시간으로 하여 성장, 풍미 및 용해도가 좋고 대량 생산이 가능한 게르마늄 강화 효모(3,210 ppm)의 추출물에서의 게르마늄은 효모에 의해 배양 과정 중에 단백질과 결합된 유기 게르마늄임을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구를 통하여 건강 기능성 제품에 응용 범위를 확대 시킬 수 있을 것으로 사료된다.

## 초 록

본 연구는 게르마늄 강화 효모의 제조 공정을 위한 최적의 조건을 확인하고 제조된 게르마늄 강화 효모 내의 게르마늄 결합 상태 확인을 목적으로 수행하였다. 그 결과 영양소별 최적

조건은 글루코스 3.0%, 효모추출물 0.3%, 펩톤 0.5%이었으며, 이 때 생성된 균체량은 67.4 mg/ml이었다. 또한 균체와 게르마늄 용액 혼합 비율은 1:0.5(50%), pH는 6.5 및 온도는 35°C로 배양하는 조건이 높은 함량의 게르마늄을 효모 균체 내로 흡수시켜 게르마늄 강화 효모를 생산하는 것을 가능하게 하였다. 배양 과정을 통해 생산된 게르마늄 강화 효모는 배양 과정 동안의 구조적 변화에 의해 효모 내에 흡수된 무기 형태인 GeO<sub>2</sub> 게르마늄과는 다른 구조를 나타내었다. 게르마늄 강화 효모는 효모 배양 과정을 통해 인체에 안전한 형태인 천연 유기 게르마늄을 형성하였다. 이는 각종 암, 성인병의 예방과 치료, 인체 면역력의 증진 등 건강 증진을 위한 새로운 기능성 원료로의 활용이 기대되며, 이에 대한 안전성 등의 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. Anna, K. K. (1990) In *Yeasts and yeast-like organisms*. (1st ed.), VCH Press, New York, pp. 131-205.
2. Kim, J. U. and Park, J. S. (1997) The classification, characterization and utilization in yeast. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 26-33.
3. Choi, S. J. and Jung, B. H. (1998) Simultaneous production process of invertase and yeast extract from baker's yeast. *Korean J. biotechnol. Bioeng.* **13**, 308-311.
4. 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.
5. 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.
6. Yang J. Y., Park K. H., Pek U. H. and Yu J. H. (1990) Screening and characterization of the high-alcohol producing *Saccharomyces cerevisiae* D1. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **18**, 511-516.
7. In M. J. and Chae H. J. (2004) Production of yeast extract by a combined method of autolysis and enzymatic hydrolysis. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **19**, 245-249
8. 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  $\beta$ -glucan isolated from the cell wall of yeast mutant *Saccharomyces cerevisiae* IS2. *Korean J. Food Sci. Technol.* **35**, 483-492.
9. Sandra, G. (1988) Therapeutic effects of organic germanium. *Medical Hypotheses* **26**, 207-215.
10. 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.
11. 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.
12. Asai, K. (1980) In *Miracle Cure-Organic germanium*. Japan publications Inc., New York, pp. 51-55

13. Levine S. A. and P. M. Kidd. (1986) Oxygen-nutrition for super health. *J. Orthomol. Medicine*. **1**, 145-148.
14. Aso H., F. Suzuki, T. Yamaguchi and Y. Hayashi. (1985) Induction of interferon and activation of NK cells and macrophages in mice by oral administration of Ge-132 an organic germanium compound. *Microbiol. Immunol.* **29**, 65-74.
15. Nobohiro W., I. Osamu, K. Takuro and Y. Koichi. (1980) New approaches to using spent brewer's yeast. *ASBC Journal*. **38**, 5-8.
16. VanDyke, M. I., Lee, H. and J. T. Travors. (1989) Germanium toxicity in selected bacterial and yeast stains. *J. Ind. Microbiol.* **4**, 299-306.
17. Wei, X. S. (1992) Effect of yeast on bioenrichment of germanium. *Food Science*. **149**, 49-54.
18. Klapcinska, B. and Chmielowski, J. (1986) Binding of germanium to *Pseudomonas putida* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 1144-1147.
19. Lynn, M. R. and Geoffrey, M. G. (1997) Mutants of *Sacchromyces cerevisiae* defective in vacuolar function a role for the vacuole in toxic metal ion detoxification. *Microbiol. Lett.* **152**, 293-298.
20. Lee S. H., Rho S. N. and Sohn T. U. (2005) Efficacy Study of Activation on Macrophage in Germanium-fortified Yeast. **48**, 246-251.
21. 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.
22. Lee S. H., Ahn S. D., Rho S. N. and Sohn T. U. (2005) A Study on Preparation and Binding Properties of Germanium-fortified Yeast. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **48**, 382-387.
23. Chung, H. C., Hahm, B. K., Bai, D. H., Toru, H. and Yu, J. H. (1996) The Yeast Cell Wall Lytic Enzyme Produced by *Dicyma* sp. YCH-37. I. Isolation of the Strain and Purification of the Enzyme. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 445-451.