

Aureobasidium pullulans IMS-822가 생산하는 β -(1→3)(1→6)-Glucan의 특성 분석

이석준 · 안극현 · 박찬선 · 윤병대 · 김민수*

한국생명공학연구원 생물산업기술연구센터

국내 토양시료로부터 점액성 고분자물질을 생산하는 효모 균주를 분리 및 동정하여 *Aureobasidium pullulans* IMS-822라 명명하였다. *A. pullulans* IMS-822가 생산하는 외분비성 폴리머를 정제 및 동결 건조하여 구조분석을 수행하였다. HPLC를 이용한 구성당 성분분석에서 포도당 단일성분으로 구성되어 있음을 확인하였다. FT-IR을 이용한 구조분석에서는 890 cm^{-1} 부근에서의 β -configuration을 확인하였으며, 3300 cm^{-1} 부근으로 shift된 완만한 -OH stretching은 폴리머를 구성하고 있는 분자 사이에 강한 수소결합이 작용하고 있는 것으로 추측되었다. ^{13}C -NMR 분석결과는 *A. pullulans* IMS-822가 생산하는 외분비형 다당류인 (1,3)-linked β -D-glucosyl unit의 6개의 탄소, δ 105.05 ppm (C1), 75.82 ppm (C2), 86.62 ppm (C3), 70.61 ppm (C4), 78.13 ppm (C5), 63.22 ppm (C6) 및 β -(1,3)D-glucosyl 잔기에 분기사슬 되어 있는 δ 72.11 ppm의 C-6의 signal을 확인할 수 있었다. *A. pullulans* IMS-822가 생산하는 β -(1→3)(1→6)-glucan의 알칼리 수용액(0.5%, w/v)에 $24.0\ \mu\text{M}$ 의 Congo red 첨가하여 30분간 반응시킨 후 400~700 nm의 범위에서 최대흡수파장의 변화를 조사한 결과 NaOH의 농도가 증가함에 따라 최대흡수파장은 장파장으로 이동하여 498 nm에서 515 nm까지 이동하였다. 최대흡수파장은 0.4 M NaOH 농도에서 점차로 감소하여 506 nm 부근에서 안정화되는 것으로 나타남으로써 순차적 구조를 가지는 것으로 확인되었다.

Key words □ *Aureobasidium* sp., β -(1→3)(1→6)-glucan, viscosity-average molecular weight, aqueous conformation

β -Glucan은 지질대사 개선작용, 정장작용, 혈당치 상승 억제 효과, 항종양 효과, 면역 증강 효과 등과 같은 우수한 생체 조절 기능성이 밝혀짐에 따라 그 용도 측면에서 주목받고 있는 생물 소재로서 미생물류, 담자균류, 식물의 세포벽에 주로 포함되어 있으며, 이러한 생물체의 골격인 세포벽을 구성하는 성분으로서 존재하고 있다. β -glucan의 구조는 β -(1→2), (1→3), (1→4), (1→6)-D-glucopyranose 중합체의 주사슬(backbone)로 구성되어 있으며, 다양한 형태의 β -glucan 중에서도 면역증강작용을 가지는 다당류로서는 β -(1→3)-glucan이 많아, shizophyllan (22, 23), scleroglucan (21), curdlan (6), *Aureobasidium* sp.의 β -(1→3)-glucan (12, 17) 등 항종양활성이 있는 것이 밝혀져 왔고, *Coriolus versicolor*의 단백다당인 PSK (20), *Lentinus edodes*의 다당류인 lentinan, *Schizophyllum commune*의 다당류인 schizophyllan은 이미 일본에서 의약품으로 인가되어 암치료제로서 시판되고 있다(1). 버섯류를 포함하는 다양한 곰팡이류가 생산하는 β -(1→3)(1→6)-glucan은 면역증강을 통한 다양한 암에 대한 항암활성, 항세균성, 항바이러스성 활성이 뛰어나고(16, 18), 또한, 상처 치료효과와 피부재생 효과가 탁월해 항염증 및 피부의 노화방지 효과가 확인 되었으며(3), 이밖에, 혈압강하작용 또는 혈당강하작용 등의 다양한 약리학적 효능이 발표되어 의약품

산업 및 건강보조식품, 화장품 산업 등에의 응용이 기대되고 있다(7, 11, 13, 14, 15).

동물의 면역계에 대한 활성 증진력을 갖는 β -(1→3)-glucan은 여러 가지 종류의 식용버섯, 효모, 보리, 귀리 등에 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 특히 담자균(버섯)의 자실체나 균사체에 함유되어 있는 β -glucan은 면역 증강 활성이 높고, 표고버섯 자실체로부터 추출되는 lentinan과 같은 β -(1→3)-glucan은 의약품으로서 이용되고 있다. 그러나 일반적으로 담자균의 자실체나 균사체에 함유되어 있는 β -glucan은 그 생육·재배 조건에 따라 함량이나 분자량 등이 크게 차이가 있고, 여러 가지 종류의 불순물을 포함하고 있어 분리 및 정제에 어려움이 따르며, 물에 대한 용해성이 낮아 다양한 용도로의 이용에 많은 제한이 있다.

이에 비하여, 균체 외로 면역 증강 활성이 높은 수용성 β -glucan을 분비 생산하는 미생물을 이용한 발효 생산은 균일하고, 생산수율이 우수하며, 정제하기에 간편하면서도 수용성인 고효성의 β -glucan을 얻을 수 있으므로 매우 유효한 방법으로 판단되며, β -glucan을 생산하는 미생물로는 *Aureobasidium* sp. 등이 알려져 있다(1, 2, 17).

Aureobasidium sp.의 한 균주로부터 세포외로 생산되는 β -(1→3)-glucan은 main chain의 glucose 4개마다 3개가 β -(1→6)으로 결합한 포도당의 분지를 갖고, sulfoacetate를 2.5% 결합한 β -(1→3)(1→6)-glucan 구조로서, 의약품으로 사용되고 있는 lentinan 및 schizophyllan과 동일한 구조 및 수용액 상태에서 유

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-63-570-5220, Fax: 82-63-570-5219
E-mail: ms5732@kribb.re.kr

사한 물성적·기능적 특성을 가지는 것으로 알려져 있다(12). 일반적으로 β -(1→3)-glucan은 분자량, β -(1→6)결합의 분지도, β -glucan chain간의 상호결합 및 이에 따른 전체적인 입체구조(triple helix) 형성능 등에 따라 생리적 활성이 크게 영향을 받는 것으로 보고되어 있다(24, 25, 26). 또한, 분자량 100,000~200,000 이상의 β -glucan들이 항암활성이 높으며, 5,000~10,000의 저분자의 물질들은 활성이 거의 없는 것으로 보고되어 있다(4, 5, 9).

재료 및 방법

생산균주의 분리 및 동정

각지에서 채취한 토양 시료 일정량을 멸균된 생리 식염수에 넣고 진탕한 후 상등액 일정량을 취하여 희석하고, 그 희석액을 potato dextrose agar plate (pH 5.6, 30°C)에서 24~72시간 배양하여 점액성 물질을 생산하는 약 60여 종을 1차 분리하였다. 순수 분리된 미생물들을 potato dextrose broth (pH 5.6, 30°C)에서 5일간 진탕배양한 후 원심분리(12,000×g, 20분)하여 균체를 제거하였다. 균체를 제거한 상등액에 3배 volume의 에탄올을 첨가하여 폴리머들을 침전시켰다. 침전된 폴리머를 증류수에 재용한 후 laminarinase (Sigma)를 처리하였을 때 유리되는 단당을 환원당 정량법으로 분석하여, 유리되는 환원당의 수치가 가장 높은 종을 선별하여 IMS-822로 명명하였다.

분리한 균주 IMS-822의 동정을 위하여 배양학적 및 생리학적 특성을 확인하였으며(자료 미제시), 18S 리보솜 RNA 유전자의 내부 전사 스페이서(internal transcribed spacer) 1, 5.8S 리보솜 RNA 유전자 그리고 내부 전사 스페이서 2를 포함하는 500 bp의 염기서열을 분석하였다. 선별한 균주로부터 18S rDNA 분절 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'을 프라이머(primer) 세트로 중합효소 연쇄반응(PCR)하여 증폭시킨 후, 증폭 산물을 정제된 다음 자동염기서열 분석 장치(Applied Biosystems model 373A automatic sequencer)와 키트(Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit, Perkin-Elmer Applied Biosystems)를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 선별한 균주의 18S rDNA는 유전자은행의 블라스트 프로그램을 이용하여 상동성을 분석하였다. 그 결과, 선별된 균주는 표준 균주인 *Aureobasidium pullulans* UWFP 769와 100%의 상동성을 나타내었다. 이에 *Aureobasidium pullulans* IMS-822라 명명된 균주를 한국생명공학연구원 유전자은행(KCTC, Korean Collection for Type Cultures)에 기탁하였다(기탁 번호: KCTC 11179BP).

Exo-polysaccharide의 생산 및 정제

Exo-polysaccharide의 생산을 위한 *A. pullulans* IMS-822의 배지는 sucrose 100 g/L, NaNO₃ 4 g/L, K₂HPO₄ 1 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L, KCl 0.5 g/L, FeSO₄ 0.01 g/L, oxalic acid 0.7 g/L로 구성되었으며, 30°C로 조절된 5-L의 발효조에서 pH를 4.5로 유지하면서 5일간 배양하였다. 배양액을 증류수로 2배 희석하여 원심분리(8,000×g, 20 min)하고, 균체를 제거한 상등액에 3배 volume의 ethanol을 첨가하고 30°C에서 30분간 진탕 교반하여

침전시킨 후 증류수에 녹였다. β -Glucan을 생산하는 *A. pullulans*는 일반적으로 pullulan을 동시에 생성함으로 배양액 내에 혼재하는 pullulan을 제거하기 위하여 1차 정제된 배양액 1 L에 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)에 용해된 50 unit의 pullulanase (Novozyme) 및 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) 3 L를 첨가하여 37°C에서 24시간 반응하였다. 반응이 종료된 후 3배 volume의 ethanol을 첨가하고 30°C에서 30분간 진탕 교반하여 침전시켰으며, 여분의 단당류를 제거하기 위하여 상기의 과정을 3회 반복하였다. 침전물을 일정량의 증류수에 재용해한 후 동결 건조하여 exo-polysaccharide 분말을 얻을 수 있었다. 또한 pullulan 분해효소인 laminarinase 처리, Bradford법 및 UV scanning (200~660 nm)을 통하여 pullulan, 단백질 및 색소를 포함하고 있지 않음을 확인하였다. 위와 같은 배양조건에서 *A. pullulans* IMS-822는 배양 96시간에 생산량이 최고에 달하여 약 30 g/L의 exo-polysaccharide를 생산하였으며, 구성은 pullulan이 약 60%이며 β -(1→3)-glucan이 약 40% 정도를 차지하는 것으로 분석되었다.

점도평균 분자량 분석

점도평균 분자량 분석을 위하여 동결 건조한 분말을 0.65 M의 NaCl 용액에 용해하여 0~0.4%의 용액을 제조한 후 Ubbelohde type의 capillary viscometer를 이용하여 30±1°C에서 고유점도(intrinsic viscosity)를 측정하였다. 고분자의 고유점도는 분자량의 크기 및 모양 등에 따라 다르게 나타날 수 있으나 Mark-Houwink equation에 의하여 분자량과 다음과 같은 관계에 있다. 여기서 K와 a는 고분자의 구조적 특성에 기인하는 상수이며, 고유점도를 측정하기 위한 기본함수들은 다음과 같다.

$$\text{Relative viscosity} : \eta_r = \eta/\eta_0 \approx t/t_0$$

$$(\eta_0 : \text{solvent viscosity, } \eta : \text{solution viscosity})$$

$$\text{Specific viscosity} : (t/t_0) - 1 \approx (\eta/\eta_0) - 1 = \eta_r - 1 = \eta_{sp}$$

$$\text{Reduced viscosity} : \{(t/t_0) - 1\}/C = \{(\eta/\eta_0) - 1\}/C = (\eta_r - 1)/C = \eta_{sp}/C = \eta_{red}$$

$$(T : \text{time, } C : \text{concentration})$$

$$\text{Inherent viscosity} : \ln \eta_r/C = \eta_{inh}$$

$$\text{Intrinsic viscosity} : \lim \eta_{sp}/C = \lim \ln \eta_r/C = [\eta] \text{ (Huggin's equation)}$$

$$C \rightarrow 0 \quad C \rightarrow 0$$

$$\text{Mark-Houwink equation} ; [\eta] = KMw^\alpha \text{ (K and } \alpha : \text{Mark-Houwink constant)}$$

구성당 성분분석

동결 건조한 시료를 증류수에 용해하여 0.2% 용액(w/v)을 제조한 후 동일분량의 2 M Trifluoroacetic acid (TFA)를 첨가하여 121°C에서 1시간동안 가수분해하였다. 가수 분해물을 원심분리(15,000×g, 30 min)하여 불순물을 제거한 다음 speed-vac에서 TFA가 완전히 제거될 때까지 건조하였다. 증류수에 재용해하여 얻어진 가수 분해물 일정량을 당분석용 column (YMC-Pack

Polyamine, 250×4.6 mm ID)에 5 μl injection하였다. 이동상으로는 H₂O를 사용하여 1.0 ml/min의 속도로 용출시키고, RI detector가 장착된 HPLC (Agilent Technologies 1200 series)로 분석하여, 당 표준품(Sigma)과의 용출시간을 비교하여 분석하였다.

FT-IR 분석

A. pullulans IMS-822가 생산하는 exo-polysaccharide의 IR spectrum은 Perkin-Elmer 1750 spectrometer와 Perkin-Elmer 7300 data processor (128 scans at 2 cm⁻¹ resolution)를 사용하였으며, 동결 건조된 시료 2 mg과 IR spectroscopic grade의 KBr 200 mg을 혼합한 KBr disc 방법으로 측정하였다.

¹³C-NMR 분석

NMR 결과를 얻기 위하여, 동결 건조된 시료 2 g을 200 ml의 증류수에 용해한 후 1 M의 TFA 용액 200 ml을 혼합하였다. 50°C의 교반기에서 24시간 반응시킨 후 원심분리(12,000×g, 30 min)하여 상등액을 감압 농축하였다. 농축액을 Bio-Gel P2 레진을 이용하여 유사분자량 범위를 분획하여 동결건조한 후 일정량을 D₂O에 용해하여 25°C에서 NMR (Varian, 400 MHz) 분석을 위한 시료로 사용하였다.

결과 및 고찰

점도평균분자량

A. pullulans IMS-822가 생산하는 exo-polysaccharide의 intrinsic viscosity를 계산하기 위하여 Ubbelohde type의 capillary viscometer를 이용하여 0~0.4%의 농도에서 감소점도(reduced viscosity)를 측정하였다(Fig. 1). 고유점도란 고분자의 농도가 0에 무한히 근접할 때 나타나는 고분자의 점도를 의미함으로 직선회귀식을 이용하여 계산할 수 있다. Carboxymethyl cellulose (CMC)를 표준물질로 사용하고, Huggin's equation과 Mark-Houwink equation을 이용하여 측정한 점도평균분자량은 약 8.9×10⁵인 것으로 측정되었다. *Aureobasidium* sp.가 생산하는 β-glucan에 대한 연구가 보고되어 있으나 분자량에 관한 정보가 제

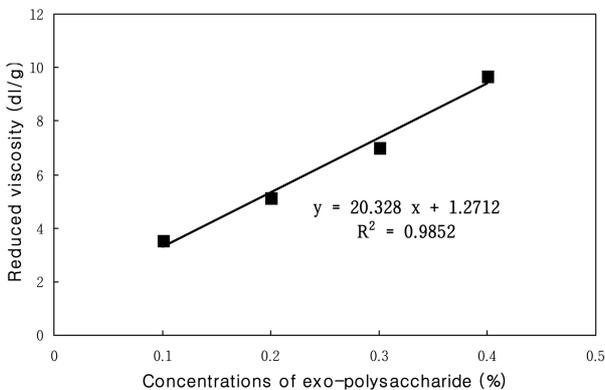


Fig. 1. Intrinsic viscosity of the exo-polysaccharide at the 0.65 M NaCl solution.

공되지 않아 직접적인 비교가 어려우나(2, 17), *Hericium erinaceus*로부터 추출한 β-glucan의 분자량 1.0×10⁶ (8)과 비슷하였으며, *Lentinus edodes*로부터 추출한 β-(1→3)-glucan의 분자량 5.2×10⁵ (24)에 비하여서는 다소 큰 분자량을 가지는 것으로 나타났다. β-(1→3)-glucan의 분자량은 분지도 및 삼중 나선 구조와 더불어 항암활성에 중요한 역할을 하며(6), 분자량 5,000~10,000 범위의 저분자들은 항암활성이 극히 낮으며, 분자량 100,000~200,000 이상의 고분자들만이 높은 항암활성을 나타내는 것으로 보고되어 있으므로(1), *A. pullulans* IMS-822가 생산하는 β-(1→3)(1→6)-glucan도 항암활성을 나타내기 위한 적당한 분자량으로 생각된다.

구성당 분석

HPLC를 이용하여 *A. pullulans* IMS-822가 생산하는 polymer의 구성당 성분을 분석한 결과 glucose 단일성분으로 구성된 것으로 나타났다(Fig. 2). *Aureobasidium* sp.가 세포외로 분비하는 외분비형 다당류 중에서 포도당으로만 구성된 폴리머는 pullulan과 β-(1→3)-glucan 두 종류가 알려져 있고, 실험재료로 사용한 폴리머는 laminarinase를 처리하여 pullulan을 제거한 상태임으로,

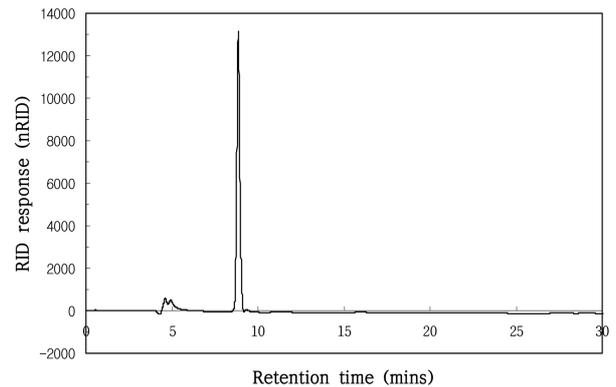


Fig. 2. Component determination of the exo-polysaccharide by HPLC analysis. The peak at 8.856 min represents that of glucose.

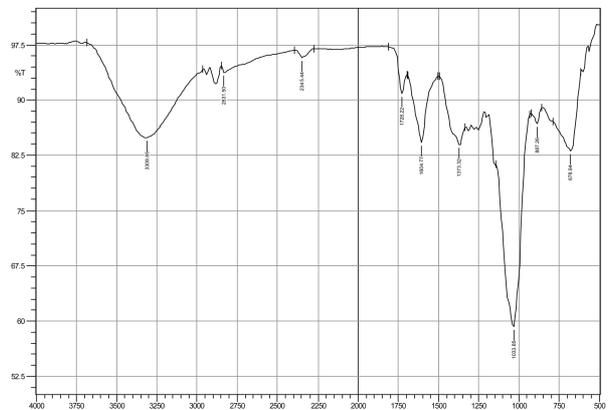


Fig. 3. Infrared spectra of exo-polysaccharide produced by *A. pullulans* IMS-822.

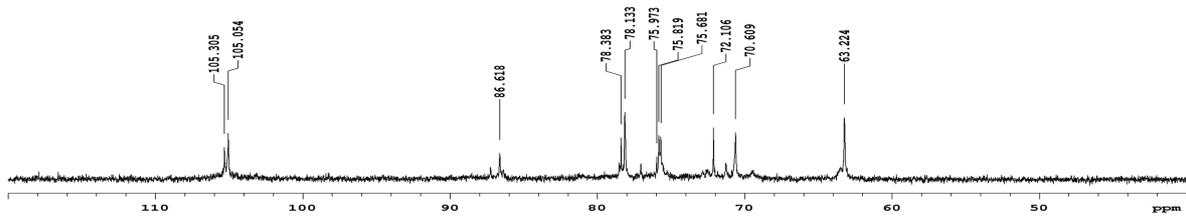


Fig. 4. ^{13}C -NMR spectroscopy of exo-polysaccharide produced by *A. pullulans* IMS-822.

이 결과는 *A. pullulans* IMS-822가 생산하는 exo-polysaccharide가 β -(1 \rightarrow 3)-glucan임을 추측할 수 있다.

FT-IR 분석

A. pullulans IMS-822가 생산하는 exo-polysaccharide의 구조분석을 위하여 KBr-disc 방법을 이용한 IR spectrum에서 나타난 흡수피크는 891 cm^{-1} 부근에서의 β -configuration, 3300 cm^{-1} 부근에서의 -OH stretching, 1030 cm^{-1} 부근에서의 -OH 또는 -CH stretching, 1570 cm^{-1} 및 1740 cm^{-1} 부근에서의 -CO stretching로 나타났다(Fig. 3). 이러한 결과는 *Lentinus edodes*로부터 추출한 β -glucan과 유사한 경향을 나타내었으며(24), *A. pullulans* IMS-822가 생산하는 exo-polysaccharide가 D-glucose의 β -configuration으로 구성된 β -glucan임을 알 수 있다.

^{13}C -NMR 분석

A. pullulans IMS-822가 생산하는 exo-polysaccharide의 구조분석을 위하여 실시한 ^{13}C -NMR 결과는 (1 \rightarrow 3)-linked β -D-glucosyl unit의 6개의 탄소, δ 105.05 ppm (C1), 75.82 ppm (C2), 86.62 ppm (C3), 70.61 ppm (C4), 78.13 ppm (C5), 63.22 ppm (C6) 및 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucosyl 잔기에 분기사슬되어 있는 δ 72.11 ppm의 C-6임을 분명하게 나타내고 있다(Fig. 4). 본 연구에서는 저분자화된 시료를 대상으로 하여 ^{13}C -NMR 분석을 행한 결과로 인하여 β -(1 \rightarrow 3) 결합과 β -(1 \rightarrow 6) 결합의 분지도를 파악할 수 없어 정확한 구조를 추정하기는 어려우나 β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-D-glucan으로서 상용되고 있는 lentinan 및 scleroglucan의 구조와 유사하였다. 저분자화하지 않은 시료의 NMR data를 얻기 위하여 NaOD/D₂O 및 DMSO-*d* 등의 용매를 사용하고 측정온도를 100°C 로 높여 분석을 실시하였으나 만족할 만한 결과를 얻을 수 없었는데, 이는 거대분자가 가지는 분자량 또는 분자자체의 견고한 구조에 기인한 것으로 판단된다. 향후 거대한 생물고분자의 명확한 구조를 파악하기 위하여서는 저분자화하지 않은 상태에서도 ^{13}C -NMR 분석이 가능한 기술개발이 필요한 것으로 생각된다.

수용액상의 구조

고분자의 β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-D-glucan이 수용액 상태에서 나선형의 구조를 가지고 있으며 강한 알칼리 조건하에서 분자간 및 분자 내의 수소결합이 절단되어 나선형구조의 변성을 유도하는 것으로 알려져 있으므로, *A. pullulans* IMS-822가 생산하는 β -glucan의 입체구조를 파악하기 위하여 0~1.0 M NaOH 수용액에

β -glucan의 농도를 0.5%로 조정하여 Ubbelohde 형태의 capillary viscometer를 이용하여 비점도를 측정한 결과, NaOH의 농도 0.4 M에서 수용액의 비점도가 급격하게 감소하는 것으로 보아 나선형 구조의 변성이 진행되는 것으로 생각된다(자료 미제시). 이러한 비점도 변화는 NaOH의 첨가가 분자간 및 분자 내에 존재하는 수소결합을 절단하는 것을 의미하며, 0.4 M의 NaOH 농도에서 수소결합의 대부분이 절단되는 것으로 추정된다. 고분자의 β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-glucan이 알칼리 수용액 상태에서 Congo red dye와 결합하여 Congo red dye의 최대흡수파장(λ_{max})을 변동시키는 특성을 가지는 것으로 알려져 있으므로, 0~1.0 M NaOH 수용액(β -glucan의 농도, 0.5%)에 $24.0\ \mu\text{M}$ 의 Congo red를 첨가하여 30 분간 반응시킨 후 400~700 nm의 범위에서 최대흡수파장의 변화를 조사하였다(Fig. 5). Congo red dye의 최대흡수파장은 NaOH의 농도에 따라서 다르게 나타났는데, NaOH의 농도가 증가함에 따라 최대흡수파장은 장파장으로 이동하여 498 nm에서 515 nm까지 이동하였다. 최대흡수파장은 0.4 M NaOH 농도에서 점차로 감소하여 506 nm 부근에서 안정화되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 *Hericum erinaceus*로부터 추출한 β -glucan이 0.15 M NaOH 농도에서 나선 구조의 착란현상이 나타나는 것과 비교해 볼 때(8), *A. pullulans* IMS-822가 생산하는 β -glucan은 상당히 정렬된 구조를 가지고 있으며 강알칼리 조건하에서도 비교적 안정된 상태를 유지하고 있다는 것을 의미한다.

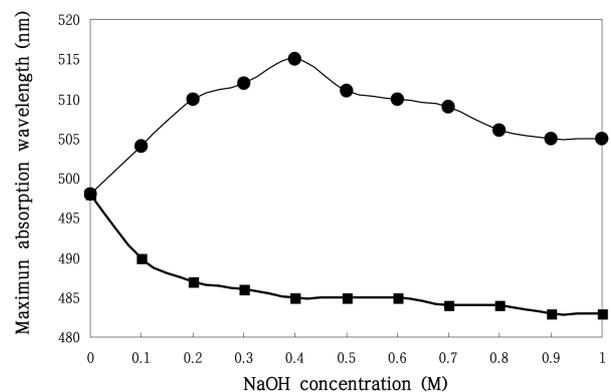


Fig. 5. Change in λ_{max} of Congo red and Congo red-exopolysaccharide complex at different NaOH concentration. The solution contained $24.0\ \mu\text{M}$ of Congo red and 0.5% of β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-glucan. (■), Congo red; (●), Congo red containing β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-glucan.

감사의 말

본 연구는 KRIBB 기관고유사업의 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

1. 박용일. 2000. 미생물다당류의 구조와 세포생리학적 기능. 미생물과 산업 26, 18-30.
2. 서형필, 김지모, 신현동, 김태권, 장희정, 박복련, 이진우. 2002. *Aureobasidium pullulans* SM-2001에 의한 β -1,3/1,6-글루칸의 생산. 한국생물공학회지 17, 376-380.
3. Barrett, D. 2002. From natural products to clinically useful anti-fungal. *Biochim. Biophys. Acta.* 1587, 224-233.
4. Blaschek, W., J. Kasbauer, J. Kraus, and G. Franz. 1992. Pythium aphanidermatum: culture, cell wall composition, and isolation and structure of antitumor storage and solubilized cell-wall (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -D-glucans. *Carbohydr. Res.* 231, 293-307.
5. Blaschek, W., M. Schultz, J. Kraus, and G. Franz. 1992. Antitumor activity of β -1,3/1,6-glucans from *Phytophthora* species. *Planta Med.* 58, 39-42.
6. Demleitner, S., J. Kraus, and G. Franz. 1992. Synthesis and antitumor activity of derivatives of curdlan and lichenan branched at C-6. *Carbohydr. Res.* 226, 239-246.
7. Drzikova, B., G. Dongowski, and E. Gebhardt. 2005. Dietary fiber-rich oat-based products affect serial lipids, microbiota, formation of short-chain fatty acids and steroids in rats. *Br. J. Nutr.* 94, 1012-1025.
8. Dong, Q., L. Jia, and J. Fang. 2006. A β -D-glucan isolated from the fruiting bodies of *Hericium erinaceus* and its aqueous conformation. *Carbohydr. Res.* 341, 791-795.
9. Fabre, I., M. Bruneteau, P. Ricci, and G. Michel. 1984. Isolation and structural study on *Phytophthora parasitica*. *Eur. J. Biochem.* 142, 99-103.
10. Fujimoto, K., M. Tomonaga, and S. Goto. 2006. A case of recurrent ovarian cancer successfully treated with adoptive immunotherapy and lentinan. *Anticancer Res.* 26, 4015-4018.
11. Georgopapadakou, N.H. 2001. Update on antifungal targeted to the cell wall: focus on β -1,3-glucan synthesis inhibitors. *Exp. Opin. Invest. Drugs* 10, 269-280.
12. Hamada, N. and Y. Tsujisaka. 1983. The structure of carbohydrate moiety of an acidic polysaccharide produced by *Aureobasidium* sp. K-1. *Agric. Biol. Chem.* 47, 1167-1172.
13. Kim, S.Y., H.J. Song, Y.Y. Lee, K.H. Cho, and Y.K. Roh. 2006. Biomedical issues of dietary fiber β -glucan. *J. Korean Med. Sci.* 21, 781-789.
14. Kim, Y.W., K.H. Kim, H.J. Choi, and D.S. Lee. 2005. Anti-diabetic activity of B-glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*. *Biotechnol. Lett.* 27, 483-487.
15. Kogan, G., M. Pajtinka, M. Babincova, E. Miadokova, P. Rauko, D. Slamenova, and T.A. Korolenkova. 2008. Yeast cell wall polysaccharides as antioxidants: can they fight cancer?. *Neoplasma* 55, 387-393.
16. Nameda, S., N.N. Miura, Y. Achida, and N. Ohno. 2007. Antibiotic project against septic shock in mice administered β -glucan and indomethacin. *Microbiol. Immunol.* 51, 851-859.
17. Navarini, L., J. Bella, A. Flaibani, R. Gilli, and V. Rizza. 1996. Structural characterization and solution properties of an acidic branched β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan from *Aureobasidium pullulans*. *Int. J. Biomolecules* 19, 157-163.
18. Ohno, N., M. Furukawa, N.N. Miura, Y. Adachi, M. Motoi, and T. Yadomae. 2001. Antitumor β -glucan from the cultured fruit body of *Agaricus blazei*. *Biol. Pharm. Bull.* 24, 820-828.
19. Reis, R.A., C.A. Tischer, P.A. Gorin, and M. Iacomini. 2002. A new pullulan and a branched (1 \rightarrow 3)-, (1 \rightarrow 6)-linked β -glucan from the lichenised ascomycete *Teloschites flavicans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 210, 1-5.
20. Sakai, T., Y. Yamashita, T. Maekawa, K. Mikami, S. Hoshino, and T. Shirakusa. 2008. Immunotherapy with PSK and fluoropyrimidines improves long-term prognosis for curatively resected colorectal cancer. *Cancer Biother. Radiopharm.* 23, 461-467.
21. Singh, P.P., R.L. Whistler, R. Tokuzen, and W. Nakahara. 1974. Scleroglucan, an antitumor polysaccharide from *Sclerotium glaucium*. *Carbohydr. Res.* 37, 245-247.
22. Sullivan, R., J.E. Smith, and N.J. Rowan. 2006. Medicinal mushrooms and cancer therapy: translating a traditional practice into Western medicine. *Perspect Biol. Med.* 49, 159-170.
23. Wasser, S.P. 2002. Medical mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 256-274.
24. Zhang, P., L. Zhang, and S. Cheng. 1999. Chemical structure and molecular weight of α -(1 \rightarrow 3)-D-glucan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 1197-1202.
25. Zhang, X., L. Zhang, and X. Xu. 2004. Morphologies and conformation of lentinan in aqueous NaOH solution. *Biopolymers* 75, 187-195.
26. Zhang, X., X. Li, X. Xu, and F. Zeng. 2005. Correlation between antitumor activity, molecular weight, and conformation of lentinan. *Carbohydr. Res.* 340, 1515-1521.

(Received September 30, 2008/Accepted March 16, 2009)

ABSTRACT: Analysis of β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-Glucan Produced by *Aureobasidium pullulans* IMS-822**Seog June Lee, Keug Hyun Ahn, Chan Sun Park, Byung Dae Yoon, and Min Soo Kim***

(Bioindustry Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-806, Republic of Korea)

The exo-polysaccharide producing microorganism, *Aureobasidium pullulans* IMS-822, was isolated and identified from soil. The viscosity-average molecular weight of exo-polysaccharide was calculated as 8.9×10^5 by Mark-Houwink equation. The sugar component of exo-polysaccharide was determined as glucose by HPLC analysis. The IR spectra indicated that the exo-polysaccharide has an absorption peak at 890 cm^{-1} for the β -configuration of D-glucan. The ^{13}C NMR signal at δ 86.62 ppm arose from the substituted C-3 of glucose. The signal at δ 72.11 ppm was assigned to C-6 of branched β -(1 \rightarrow 3)-D-glucosyl residues. Viscosity and Congo red reaction indicated that β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-glucan produced by *A. pullulans* IMS-822 has a highly ordered hydrogen-bond dependent conformation in aqueous solution, which collapses in strong alkaline solution.