

## *Aureobasidium pullulans* SM-2001에 의한 $\beta$ -1,3/1,6-글루칸의 생산

서형필·김지모·<sup>1</sup>신현동·<sup>1</sup>김태권·<sup>2</sup>장희정·<sup>2</sup>박복련·†이진우  
동아대학교 생명자원과학대학 생물공학전공, <sup>1</sup>경북대학교 자연과학대학 유전공학과, <sup>2</sup>(주) 글루칸  
(접수 : 2002. 6. 25., 게재승인 : 2002. 8. 19.)

## Production of $\beta$ -1,3/1,6-glucan by *Aureobasidium pullulans* SM-2001

Hyung-Pil Seo, Ji-Mo Kim, Hyun-Dong Shin<sup>1</sup>, Tae-Kwon Kim<sup>1</sup>, Hee-Jung Chang<sup>2</sup>, Bok-Ryun Park<sup>2</sup>, and Jin-Woo Lee<sup>†</sup>  
Division of Biochemical Engineering, College of Natural Resources & Life Science, Dong-A University,  
Busan 604-714, Korea

<sup>1</sup>Department of Genetic Engineering, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

<sup>2</sup>Glucan Co. Ltd., Deungchon-Dong, Kangsei-Ku, Seoul 157-030, Korea

(Received : 2002. 6. 25., Accepted : 2002. 8. 19.)

Production of the exopolymer by *Aureobasidium pullulans* SM-2001, UV induced mutant of *A. pullulans* ATCC 42023, was investigated. The exopolymer produced by *A. pullulans* SM-2001 was confirmed to be  $\beta$ -1,3-linked homoglucans containing a few  $\beta$ -1,6-linked single glucosyl branches ( $\beta$ -1,3/1,6-glucan) with the nuclear magnetic resonance(NMR) spectrum. The average molecular weight of  $\beta$ -1,3/1,6-glucan produced by *A. pullulans* SM-2001 was about  $2.6 \times 10^5$  by the gel permeation chromatographic analysis. Sucrose was known to be better carbon source for the production of  $\beta$ -1,3/1,6-glucan than other tested carbon sources in this study. Maximal conversion rate of  $\beta$ -1,3/1,6-glucan was about 50% when the carbon source was 0.5%(w/v) sucrose.

**Key Words :**  $\beta$ -1,3/1,6-glucan, *Aureobasidium pullulans*, NMR, molecular weight

### 서론

$\beta$ -글루칸은 포도당이  $\beta$ -1,3 화합 결합을 중심으로 중합된 다당류를 총칭하며, 버섯, 효모 등 미생물의 세포벽의 구성성분이나 세포외로 분비되는 미생물 유래의  $\beta$ -글루칸과 보리, 귀리와 같은 맥아류의 식이 섬유에서 추출되는 식물성  $\beta$ -글루칸이 있다(1-3). 식물성 유래의  $\beta$ -글루칸은  $\beta$ -1,3-결합의 기본 구조에  $\beta$ -1,4-결합이 가지 형태를 이루는 분자구조( $\beta$ -1,3/1,4-글루칸)를 갖고 있고, 나머지 것들은  $\beta$ -1,3-,  $\beta$ -1,6-, 또는  $\beta$ -1,3-결합의 기본 구조에  $\beta$ -1,6-결합이 가지 형태를 이루는 분자구조( $\beta$ -1,3/1,6-글루칸)를 갖고 있다. 이러한  $\beta$ -글루칸은 수용성 식이 섬유의 형태로 낮은 농도에서 높은 점성을 나타내며, 항암, 항콜레스테롤, 항산화, 면역증강 및 피부 재생 효과 등과 같은 여러 가지 생리활성 촉진효과가 밝혀지고 있어서 건강식품소재 및 식품첨가물로 이용이 증가되고 있다(4-8). 또한, 인간의 정상적인 세포 조직의 면역기능을 활

성화시켜 암세포의 증식과 재발을 방지하고 면역세포의 기능을 활발하게 하는 인터페론과 인터루킨의 생성을 촉진시켜 간접적으로 암세포의 증식을 억제할 수 있다(3,9).

항암효과가 우수한 몇 종류의 버섯에서 추출한  $\beta$ -글루칸은  $\beta$ -1,3/1,6-결합의 분자구조를 가지고 있으며, 일반적으로  $\beta$ -1,3-, 또는  $\beta$ -1,6-결합의 분자구조 보다  $\beta$ -1,3/1,6-결합의 분자구조를 가지는  $\beta$ -글루칸 생리활성 촉진 능력이 우수한 것으로 알려져 있다(10).  $\beta$ -1,3/1,6-글루칸의 생산 방법은 특정 버섯에서 추출하여 정제하거나 효모의 세포벽에서 분리하여 정제하고 있으나 낮은 함량의 유효 성분 및 정제의 난이도 등의 이유로 가격이 상당히 고가이다(11).

*Aureobasidium pullulans* 균주에 의하여 생산되는 고분자 중합체중에서 가장 잘 알려진 풀루란은  $\alpha$ -글루칸이나(12,13), 이외에도 여러 종류의 다양한 분자구조를 가진 고분자 중합체를 생산한다. 이 중에는  $\beta$ -1,3-결합을 기본 구조로  $\beta$ -1,6-결합의 포도당 가지를 갖는  $\beta$ -1,3/1,6-글루칸을 생산한다는 보고도 있으며, 생산된 글루칸의  $\beta$ -1,3-결합과  $\beta$ -1,6-결합의 비는 68 : 32 이었다(14). 최근 일본의 한 회사에서  $\beta$ -1,3/1,6-글루칸을 생산하는 효모를 개발하여 비교적싼 가격에 대량 생산하고 있으며, 기능성 음료의 첨가제 등으로 사용하고 있다.

본 연구는  $\alpha$ -1,4-1,6-글루칸인 풀루란을 생산하는 *A. pullulans*

† Corresponding Author : Division of Biochemical Engineering,  
College of Natural Resources & Life Science, Dong-A  
University, Busan 604-714, Korea  
Tel : +82-51-200-7593, Fax : +82-51-200-6993  
E-mail: jwlee@mail.donga.ac.kr

ATCC 42023(15)에 자외선을 처리하여 변이주를 얻은 후, 이 변이주들을 배양하여 배양액 중에 생산한 고분자 중합체를 분리하였다. 분리한 고분자 중합체를 화학적 처리방법으로 정량분석을 하였고, 핵자기공명(NMR) 분석기를 사용하여 화학구조를 확인하였으며, 크로마토그래피(Gel permeation chromatography)를 사용하여 분자량을 측정하였다. 핵자기공명 분석스펙트럼을 비교하여 생산되는 고분자중합체가  $\beta$ -1,3/1,6-글루칸임을 확인하였으며,  $\beta$ -1,3/1,6-글루칸의 생산에 영향을 주는 탄소원의 종류 및 농도 등과 같은 기초적인 연구를 수행하고, 미생물을 이용하여 저렴한 생산비로  $\beta$ -1,3/1,6-글루칸을 대량 생산할 수 있는 방법을 개발하였다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 배지

*Aureobasidium pullulans* ATCC 42023에 자외선을 조사하여 얻은 변이주들 중에서  $\beta$ -1,3/1,6-글루칸을 생산하여 체외로 분비하는 변이주를 획득하고, *Aureobasidium pullulans* SM-2001로 명명하였다(12,16). *A. pullulans* SM-2001의 배지는 5.0g/L의  $K_2HPO_4$ , 1.0g/L의 NaCl, 0.2g/L의  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.6g/L의  $(NH_4)_2SO_4$ (Sigma Co., USA) 및 2.5g/L의 효모 추출물(yeast extract, Difco Lab., USA)이 포함된 것을 사용하였으며, 탄소원으로는 설탕을 20%(w/v) 농도로 증류수에 녹여 멸균한 후, 멸균된 배지에 무균적으로 0.5~2.0%(w/v)으로 혼합하여 사용하였다(17).

### 고분자 중합체의 생산

전배양은 고체 배지에서 일정시간 배양한 *Aureobasidium pullulans* SM-2001을 한 백급니 취하여 250 mL 용량의 플라스크에 멸균하여 준비된 50 mL의 배지에 접종한 후, 30°C에서 180 rpm의 진탕 속도로 72시간 진탕 배양하였다. 본배양은 전배양한 배양액을 500 mL 용량의 플라스크에 멸균되어 준비된 150 mL의 동일 배지에 5%(v/v)를 접종하여 전배양과 동일한 방법으로 5일간 배양하였다. 상기 배양액을 8000×g의 범위에서 20분간 원심분리하고 균체를 제거한 상등액을 회수하였다. 회수한 상등액에 2배 용량의 95% 에탄올을 첨가하고 잘 혼합하여 4°C에서 하룻밤 동안 방치하였다. 이 용액을 8000×g의 범위에서 20분간 원심분리하고 상등액을 제거한 후, 침전물을 95% 에탄올로 2회 세척하였다. 세척한 침전물을 적당한 양의 증류수에 용해시킨 다음, 2일 동안에 5회 증류수를 바꾸어 주면서 투석하여 염성분을 포함한 저분자 물질을 제거하였다. 투석막(Dialysis membrane, Spectrum Lab., USA)은 배제 분자량이 14,000인 것을 사용하였으며, 상기 투석액의 내부 분획을 진공 동결 건조하여 회수하였다. 최종적으로 핵자기공명 분석법외에 화학적으로 정량분석을 실시하여  $\beta$ -1,3/1,6-글루칸임을 확인하고, 농도를 확인하였다.

### 핵자기공명 분석

사용한 표준시료는 커드란(curdlan, Sigma Co., USA), 푸슈트란(pustulan, Calbiochem. Co., Germany)이며, 각각  $\beta$ -1,3- 및  $\beta$ -1,6- 결합의 포도당으로 구성된 다당류이다. 각 시료 및 *A. pullulans* SM-2001의 배양액에서 분리·정제한 고분자중합

체를 5 mg씩 0.5 mL의  $Me_2SO_4-d_6$ (Sigma Co., USA)에 섞어서 하루동안 70°C에 방치하여 용해시켰으며, 용해된  $\beta$ -글루칸에 에탄올을 1 mL을 첨가하여 하루간 4°C에서 방치한 후 원심분리를 하였다. 침전된 각 시료를 건조시켜 5 mg 취하여 위와 동일한 방법으로 용해시켜 핵자기공명 분석기의 시료로 사용하였다. 핵자기공명 분석은 70°C에서 500MHz Varian Unity Plus Spectrometer(Varian Co., USA)를 통해 분석하였고, Trimethylsilane(TMS, Pierce Biotech., USA)를 표준물질로 사용하였다.

### 분자량 측정

*Aureobasidium pullulans* SM-2001의 배양액에서 분리·정제한  $\beta$ -1,3/1,6-글루칸의 분자량은 Gel permeation chromatography(Viscotek, USA)를 사용하여 측정하였으며 컬럼은 측정할 수 있는 분자량의 허용범위가  $5 \times 10^6$ 인 TSK PWXL6000(Viscotek, USA)을 사용하였다. 시료를 100 ppm의  $NaN_3$ (Sigma Co., USA) 수용액에 0.1% 내외의 농도로 녹여 0.45  $\mu$ m membran filter로 여과한 후, 100  $\mu$ L를 inject하여 분석하였다. 이동상은 HPLC용 증류수를 사용하였으며, 유속은 0.8 mL/min으로 조절하였다. Refractive index detector(Viscotek, USA)를 사용하였으며, 분자량이  $5.80 \times 10^3$ 에서  $1.06 \times 10^6$  사이의 각기 다른 분자량을 갖는 6개의 폴룰란(pullulan, Sigma Co., USA)을 사용하여 분자량의 표준곡선을 작성하였다.

### 일반분석

*Aureobasidium pullulans* SM-2001의 건조 균체량은 배양액을 원심분리한 후, 상등액을 제거하여 얻은 균체를 동일한 양의 증류수로 세척한 후, 80°C에서 일정한 무게를 얻을 때까지 건조하여 균체량을 측정하였다.

*Aureobasidium pullulans* SM-2001의 배양에 의한  $\beta$ -1,3/1,6-글루칸의 생산성은 phenol-sulfuric acid method을 이용하여 분석하였다(17). 분석은 시료 1.0 mL에 80%(w/v) 페놀용액 0.2 mL을 첨가한 후, 황산 5.0 mL을 넣고 혼합한 다음 분광광도계(Helios  $\beta$ , ThermoSpectronic, England)를 이용하여 490 nm의 파장에서 시료의 흡광도를 읽어 측정하였으며, 표준시료는 0.01~0.05 mg/mL 농도의 포도당으로 표준곡선을 작성하여 비교하였다.

## 결과 및 고찰

### 균체 증식 및 고분자 중합체의 생산

탄소원으로 0.5%(w/v) 설탕을 사용한 배지에 *A. pullulans* SM-2001 균주를 배양하면서 시간의 변화에 따른 균체 증식 및 체외로 분비되는 고분자 중합체의 생산량을 Figure 1에 나타내었다. 초기 pH 7.0에서 48시간 배양 후, pH 5.6까지 내려갔다가 서서히 상승하여 120시간에 6.8까지 이르렀다. 건조 균체량도 배양시간과 더불어 계속 증가를 하였다. 배양 48시간부터 배양액의 점도가 증가되었고, 갈색을 띠기 시작하였다. Phenol-sulfuric acid method로 측정된 체외로 분비되는 고분자 중합체의 생산은 배양 120시간에 2.20 g/L까지 증가하였다. 설탕을 탄소원으로 사용하여 생산한 고분자 중합체의 최대 변환율은 44%이었다.

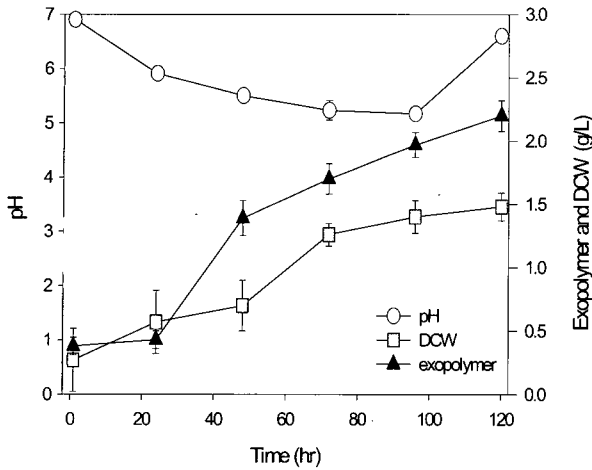


Figure 1. Cell growth and production of the polysaccharide by *A. pullulans* SM-2001 in a culture medium contained 0.5%(w/v) sucrose as carbon source at 30°C and 200rpm in a shaking incubator.

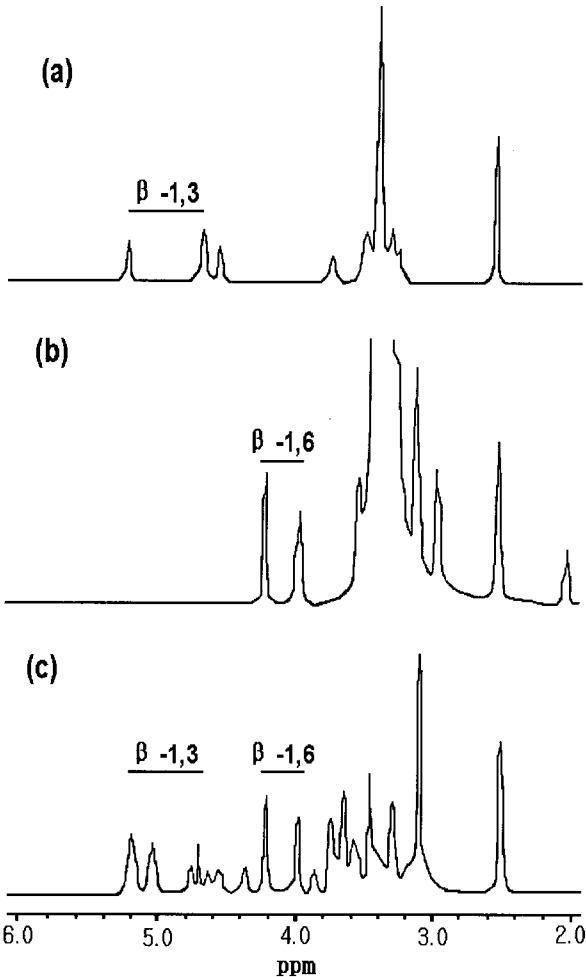


Figure 2. MNR spectra of (a) curdlan, (b) pustulan and (c)  $\beta$ -glucan produced by *A. pullulans* SM-2001.

**핵자기 공명기에 의한 정성분석**

*A. pullulans* SM-2001의 배양액에서 분리·정제한 고분자 중합체의 화학구조를 확인하기 위하여  $\beta$ -1,3-결합의 커드란,

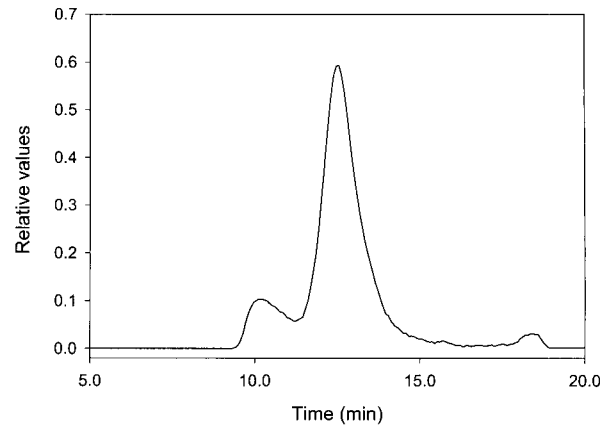


Figure 3. Gel permeation chromatography of  $\beta$ -1,3/1,6-glucan produced by *A. pullulans* SM-2001.

$\beta$ -1,6-결합의 푸슈투란을 표준 물질로 사용하여 핵자기공명 분석기로 화학 구조를 분석하고 비교하였다(18-20).

Figure 2. (a)는  $\beta$ -1,3-결합으로 연결된 커드란의 핵자기공명 분석스펙트럼으로,  $\delta$  4.510,  $\delta$  4.523,  $\delta$  4.640 및  $\delta$  5.183에서  $\beta$ -1,3-결합과 관련된 특이한 수소의 화학적 이동이 나타난 것으로 판명되어진다.  $\beta$ -1,6-결합으로 연결된 푸슈투란의 핵자기공명 분석스펙트럼은 Figure 2. (b)에 나타내었는데, 여기서는  $\delta$  3.978,  $\delta$  3.999,  $\delta$  4.283, 그리고  $\delta$  4.250에서  $\beta$ -1,6-결합과 관련된 수소의 화학적 이동이 관찰되었다. Figure 2. (c)는 본 실험의 시료인 *A. pullulans* SM-2001의 배양액에서 분리하여 정제한 고분자 중합체의 핵자기공명 분석스펙트럼이다. *A. pullulans* SM-2001의 배양액에서 분리하여 정제한 고분자 중합체의 핵자기공명 분석스펙트럼을 표준물질들의 분석스펙트럼과 비교하면 수소의 화학적 이동의 형태가  $\beta$ -1,3-결합의 커드란과  $\beta$ -1,6-결합의 푸슈투란에서 얻은 수소의 화학적 이동 형태와 일치하는 양상을 보였다. 이러한 결과를 종합해 볼 때, *A. pullulans* SM-2001이 생산하여 체외로 분비하는 고분자 중합체는  $\beta$ -1,3- 및  $\beta$ -1,6-결합이 서로 혼합되어 있는 가지형태의  $\beta$ -글루칸( $\beta$ -1,3/1,6-글루칸)으로 결정화도가 낮은 무정형 구조를 지닌 수용성의 고분자 중합체이며, GC (data not shown)와 NMR을 사용하여 분석한 결과, 구성물질은 포도당으로 판단되었다.

**$\beta$ -1,3/1,6-글루칸의 분자량**

설탕을 탄소원으로 사용하여 배양한 *A. pullulans* SM-2001의 배양액에서 분리하여 정제한  $\beta$ -1,3/1,6-글루칸의 분자량을 측정된 결과는 Figure 3과 같다. 전체 피크 면적의 80.0%가 주피크였으며, 100만 이상의 고분자와 만 이하의 저분자가 각각 9.3%, 2.4%의 비율로 검출되었다. 주피크의 평균 분자량은  $2.6 \times 10^5$ 이었으며, polydispersity (Mw/Mn)는 1.61으로 비교적 단일 분자량의 균일한 중합체임을 나타냈다.

$\beta$ -1,3/1,6-글루칸의 생리활성 효과는  $\beta$ -1,3-의 기본 결합에 가지 형태로 결합되어 있는  $\beta$ -1,6-결합의 정도와 분자량에 영향을 받는다고 한다. 항암효과가 입증된 *Phytophthora* 속의 미생물에서 분리한  $\beta$ -1,3/1,6-글루칸의  $\beta$ -1,6-결합은 14~50%이며, 분자량은 13~50 kd으로 알려져 있다(10).

**Table 1.** Effect of carbon source on production of polysaccharide by *A. pullulans* SM-2001

Carbon source	pH <sup>a</sup>	DCW <sup>b</sup> (g/L)	Polysaccharide(g/L)	Y <sub>ps</sub>	Y <sub>xs</sub>	Y <sub>p/x</sub>
Glucose	6.9	1.67	2.07	0.41	0.33	1.23
Fructose	6.7	2.08	2.20	0.44	0.42	1.06
Mannose	7.0	2.22	2.53	0.51	0.44	1.14
Sucrose	7.1	1.84	2.40	0.48	0.37	1.30
Maltose	6.7	2.31	1.40	0.28	0.46	0.60
Dextrin	7.1	1.84	1.33	0.27	0.37	0.72
Starch	7.7	1.84	2.30	0.46	0.37	1.25

a. final pH of medium, b. dry cells weight

**Table 2.** Effect of sucrose as the carbon source on production of polysaccharide by *A. pullulans* SM-2001

Sucrose(%)	pH	DCW(g/L)	Polysaccharide(g/L)	Y <sub>ps</sub>	Y <sub>xs</sub>	Y <sub>p/x</sub>
0.0	7.7	1.23	0.96	-	-	0.78
0.5	6.7	1.48	2.46	0.49	0.30	1.66
1.0	5.4	2.28	3.33	0.33	0.23	1.46
3.0	3.8	3.70	5.29	0.18	0.12	1.43
6.0	3.7	5.80	6.42	0.11	0.10	1.11
10.0	4.0	11.41	7.51	0.08	0.11	0.66

**$\beta$ -1,3/1,6-글루칸 생산에 미치는 탄소원의 영향**

*A. pullulans* SM-2001에 의한  $\beta$ -1,3/1,6-글루칸의 생산에 미치는 탄소원의 영향을 Table 1에 나타냈다. 본 실험에 사용된 탄소원은 포도당, 젓당, 만노오스(mannose), 설탕, 맥아당, 텍스트린(dextrin) 및 수용성 전분이었다. 포도당, 젓당 및 만노오스와 같은 단당류와 설탕 및 수용성 전분의 농도를 0.5%(w/v)로 사용하였을 때의  $\beta$ -1,3/1,6-글루칸의 변환율은 약 40~50%로 비교적 높은 변환율을 나타냈다. 만노오스와 설탕을 탄소원으로 사용하여 생산된  $\beta$ -1,3/1,6-글루칸의 농도는 각각 2.53 및 2.40 g/L 이었다. 만노오스와 설탕이  $\beta$ -1,3/1,6-글루칸의 생산에 우수한 탄소원으로 밝혀졌으나 경제적인 측면을 고려할 때 설탕이 만노오스 보다 우수한 탄소원으로 평가된다.

**$\beta$ -1,3/1,6-글루칸 생산에 미치는 설탕의 영향**

$\beta$ -1,3/1,6-글루칸의 생산을 위한 탄소원으로 사용한 설탕의 농도에 따른 *A. pullulans* SM-2001 균주의 균체 증식 및  $\beta$ -1,3/1,6-글루칸의 생산에 미치는 영향을 Table 2에 나타냈다. 설탕의 농도가 증가할수록  $\beta$ -1,3/1,6-글루칸의 생산량은 증가하였으나 변환율은 급속히 감소하였다. 탄소원으로 사용한 설탕의 농도가 0.5%(w/v)일 때 49%의 최대 변환율을 얻었다. 탄소원으로 사용한 설탕의 농도가 증가할수록 균체 증식과 고분자 중합체의 생합성에 사용되는 기질 이용도 역시 급속히 감소하였다. 이는 미생물을 이용한 생산물의 생산에 일반적인 현상인 기질저해(catabolite repression) 현상에 의한 것으로 생각된다(21-24). 경제적인 탄소원인 설탕을 사용하여  $\beta$ -1,3/1,6-글루칸의 생산성을 향상시키기 위하여 기질저해를 받지 않는 새로운 변이주를 선별하거나 이단 배양과 같은 공정 개발에 대한 연구가 실행되어야 하며 생산배지의 최적화에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다.

**요 약**

항암, 항콜레스테롤, 항산화 및 면역증강 효과와 피부재생

효과 등 여러 가지 생리활성이 밝혀지고 있는  $\beta$ -1,3/1,6-글루칸은 크게 식물성 유래, 효모 및 곰팡이 유래, 버섯 유래의 것으로 등으로 분류할 수 있다. 풀루란을 생산하는 *Aureobasidium pullulans* ATCC 42023에 자외선을 조사하여 얻은 변이주인 *Aureobasidium pullulans* SM-2001 균주가 생산하여 체외로 분리하는 고분자 중합체를 핵자기 공명분석기로 분석한 결과,  $\beta$ -1,3- 및  $\beta$ -1,6- 결합이 서로 혼재되어 있는  $\beta$ -1,3/1,6-글루칸의 전형적인 구조임을 확인하였으며, 평균 분자량은  $2.6 \times 10^5$  임을 확인하였다. 또한,  $\beta$ -1,3/1,6-글루칸의 생산에 최적인 탄소원이 설탕임을 확인하였으며, 0.5% (w/v)의 설탕을 탄소원으로 사용하였을 경우 약 50%의 변환율로  $\beta$ -1,3/1,6-글루칸을 생산할 수 있었다. 이는 생물공학적인 방법으로  $\beta$ -1,3/1,6-글루칸의 생산을 의미하며 저렴한 생산비로 대량 생산할 수 있는 방법의 개발을 의미한다.

**감 사**

본 연구는 2002년 부산·울산지방중소기업청 산·학·연 공동기술개발 컨소시엄 사업의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

**REFERENCES**

1. Naohito, O., U. Michkharu, T. Aiko, T. Kazuhiro, N. M. Noriko, A. Yoshiyuki, W. A. Maki, T. Hiroshi, T. Shigenori, and Y. Toshiro (1999), Solubilization of yeast cell-wall  $\beta$ -(1→3)-D-glucan by sodium hypochlorite and dimethyl sulfoxide extraction, *Carbohydr. Reserch.* **316**, 161-172.
2. Navarini, L., J. Bella, A. Flaibani, R. Gilli, and V. Rizza (1996), Structural characterization and solution properties of an acidic branched (1→3)- $\beta$ -D-glucan from *Aureobasidium pullulans*, *Bio. Macromol.* **19**, 157-163.
3. Sandula, J., G. Kogan, M. Kacurakova, and E. Machova (1999), Microbial (1→3)- $\beta$ -D-glucans, their preparation,

- physico-chemical characterization and immunomodulatory activity, *Carbohydr. Polymers*, **38**, 247-253.
4. Bobek, P. and S. Galbavy (2001), Effect of pleuran (beta-glucan from *Pleurotus ostreatus*) on the antioxidant status of the organism and on dimethylhydrazine-induced precancerous lesions in rat colon, *Br. J. Biomed. Sci.* **58**(3), 164-168.
  5. Delatte, S. J., J. Evans, A. Hebra, W. Adamson, H. B. Othersen, and E. P. Tagge (2001), Effectiveness of beta-glucan collagen for treatment of partial-thickness burns in children, *J. Pediatr. Surg.* **36**(1), 113-118.
  6. Hetland, G., N. Ohno, I. S. Aaberge, and M. Lovik (2000), Protective effect of  $\beta$ -glucan against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection in mice, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **27**(2), 111-116.
  7. Nicolosi, R., S. J. Bell, B. R. Bistran, I. Greenberg, R. A. Forse, and G. L. Blackburn (1999), Plasma lipid changes after supplementation with beta-glucan fiber from yeast, *Am. J. Clin. Nutr.* **70**(2), 208-212.
  8. Tokunaka, K., N. Ohno, Y. Adachi, N. Miura, and T. Yadomae (2002), Application of *Candida* solubilized cell wall  $\beta$ -glucan in antitumor immunotherapy against P815 mastocytoma in mice, *Int. J. Immunopharmacol.* **2**(1), 59-67.
  9. Ohno, N., T. Miura, N. N. Miura, Y. Adachi, and T. Yadomae (2001), Structure and biological activities of hypochlorite oxidized zymosan, *Carbohydr. Polymers*, **44**, 339-349.
  10. Kraus, J., W. Blaschek, M. Schütz, and G. Franz (1992), Antitumoractivity of cell wall beta-1,3/1,6-glucans from *Phytophthora* species, *Planta. Med.* **58**, 39-42.
  11. Ukawa, Y., H. Ito, and M. Hisamatsu (2000), Antitumor effects of (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan and (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucan purified from newly cultivated mushroom, *Hatakeshimeji* (*Lyophyllum decastes* Sing.), *J. Biosci. Bioeng.* **90**, 98-104.
  12. Lee, J. W., W. G. Yeomans, A. F. Allen, F. Deng, R. A. Gross, and D. L. Kaplan (1999), Biosynthesis of novel polymers by *Aureobasidium pullulans*, *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5265-5271.
  13. Kim, J. H., M. R. Kim, J. H. Lee, J. W. Lee, and S. K. Kim (2000), Production of high molecular weight pullulan by *Aureobasidium pullulans* using glucosamine, *Biotechnol. Lett.* **22**, 987-990.
  14. Navarini, L., J. Bella, A. Flaibani, R. Gilli, and V. Rizza (1996), Structural characterization and solution properties of an acidic branched (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan from *Aureobasidium pullulans*, *Int. J. Biol. Macromol.* **19**, 157-163.
  15. Ueda, S., K. Fusita, K. Komatsu, and Z. Nakashima (1963), Polysaccharide produced by the genus *Pullularia*, *Appl. Microbiol.* **11**, 211-215.
  16. Bouveng, H. O., H. Kiessling, B. Lindberg, and J. McKay (1963), Polysaccharides elaborated by *Pullularia pullulans*, *Acta Chem. Scand.* **17**, 797-800.
  17. Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith (1956), Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.* **28**, 350-356.
  18. Deslandes, Y., R. H. Marchessault, and A. Sarko (1980), Triple-helical structure of (1-3)- $\beta$ -D-glucan, *Macromol.* **13**, 1466-1471.
  19. Harada, T., M. Masada, K. Fujimori, and I. Maeda (1966), Production of a firm, resilient gel-forming polysaccharide by a mutant of *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* 10C3, *Agric. Biol. Chem.* **30**, 196-198.
  20. Sathyanarayana, B. K. and E. S. Stevens (1983), Theoretical study of the conformations of pustulan (1-6)-beta-D-glucan, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1**(4), 947-959.
  21. Ebbole, D. J. (1998), Carbon catabolite repression of gene expression and condition in *Neurospora crassa*, *Fungal Gen. Biol.* **25**, 15-21.
  22. Anwar, M. N., M. Suto, and F. Tomita (1996), Isolation of mutants of *Penicillium purpurogen* resistant to catabolite repression, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 684-687.
  23. Wolff, J. A., C. H. MacGregor, R. C. Eisenberg, and P. V. Phibbs Jr. (1991), Isolation and characterization of catabolite repression control mutants of *Pseudomonas aeruginosa* PAO, *J. Bacteriol.* **173**, 4700-4706.
  24. Gancedo, J. M. (1998), Yeast carbon catabolite repression, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 334-361.