

## METODY OKREŚLANIA STRUKTURY POLISACHARYDÓW

### METHODS FOR DETERMINING POLYSACCHARIDES STRUCTURE

**Justyna Samaszko-Fiertek, Monika Kuźma,  
Barbara Dmochowska, Rafał Ślusarz, Janusz Madaj\***

*Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego  
ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk  
\*e-mail: janusz.madaj@ug.edu.pl*

---

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Izolowanie i oczyszczanie egzopolisacharydów
2. Określanie struktury pierwszorzędowej polisacharydów
  - 2.1. Identyfikacja składu cukrowego
  - 2.2. Określenie sposobu powiązania reszt cukrowych
  - 2.3. Oznaczenie sekwencji reszt cukrowych
  - 2.4. Ustalenie wielkości pierścieni składników cukrowych
  - 2.5. Przypisanie monosacharydów do szeregu konfiguracyjnego D lub L
  - 2.6. Oznaczenie konfiguracji anomerycznych atomów węgla
  - 2.7. Identyfikacja i miejsce podstawienia składników niecukrowych

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

---

**Dr Justyna Samaszko-Fiertek** w roku 2004 ukończyła Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w Gdańsku. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskała w roku 2010. Jest adiunktem w Pracowni Chemii Cukrów na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Tematyka badawcza: badaniach mechanizmu oddziaływania wankomycyny ze ścianą komórkową bakterii Gram-dodatnich, opracowanie metod syntezy nowych pochodnych antybiotyków glikopeptydowych.

**Dr Monika Kuźma** ukończyła studia na kierunku Ochrona Środowiska na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Rozprawę doktorską pod tytułem: „Badanie struktury pierwszorzędowej oraz właściwości reologicznych egzopolisacharydów wyodrębnionych z hodowli *Pseudomonas mutabilis*”. obroniła na początku 2011 roku, uzyskując stopień doktora nauk chemicznych. Od stycznia 2010 roku związana z Zakładami Farmaceutycznymi Polpharma SA, pracując w Laboratorium Rozwoju Analitycznego w Dziale Badań i Rozwoju.

**Dr Barbara Dmochowska** w roku 1994 ukończyła Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w Gdańsku. Jest adiunktem w Pracowni Chemii Cukrów na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Tematyka badawcza: tworzenie czwartorzędowych soli N-D-glikoamoniowych i alditoliloamoniowych z udziałem amin o potencjalnych właściwościach biologicznych.

**Dr Rafał Ślusarz** ukończył studia chemiczne na Uniwersytecie Gdańskim. Także na Wydziale Chemii UG, w 2004 roku uzyskał stopień doktora nauk chemicznych, po obronie rozprawy pt. „Symulowanie dynamiką molekularną blokowania i aktywacji receptorów sprzężonych z białkiem G”. Obecnie zajmuje się badaniem zmian konformacyjnych układów cukrowych i glikoproteinowych podczas swoistego oddziaływania z fragmentami konstrukcyjnymi komórek bakteryjnych oraz enzymami organizmów wyższych metodami modelowania molekularnego. Jego warsztat pracy obejmuje dynamikę molekularną, analizę statystyczną, optymalizację, dokowania oraz badanie oddziaływań międzycząsteczkowych.

**Dr hab. Janusz Madaj**, prof. nadzw. UG, ukończył studia chemiczne na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w roku 1989. W tym samym roku podjął pracę w Zakładzie Chemii Cukrów UG. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskał w roku 1995. W latach 1997–1998 odbył staż naukowy w Case Western Reserved University w Cleveland, Ohio USA w grupie profesora Vincenta M. Monnier. W roku 2004 uzyskał stopień doktora habilitowanego nauk chemicznych po przedstawieniu rozprawy na temat: „Badania dróg tworzenia i przemian wybranych związków cukrowych”. Jego aktualne zainteresowania naukowe skupiają się na chemii organicznej ze szczególnym uwzględnieniem chemii węglowodanów. Ostatnio swoje prace koncentruje na badaniach mechanizmu oddziaływania wankomycyny ze ścianą komórkową bakterii Gram-dodatnich oraz wpływem na to oddziaływanie fragmentów cukrowych.

## ABSTRACT

Sequencing of polysaccharides is difficult to achieve because of the heterogeneous nature of the polysaccharide structure, high molecular weight (the size of a polysaccharide varies between approximately 16,000 and 16,000,000 daltons (Da)), and polydispersity of the polymer chains.

The following information is essential to determine the primary structure of a polysaccharide:

- monosaccharide composition: nature and molar ratios of the monosaccharide building blocks;
- relative configuration of monosaccharides: D or L;
- anomeric configuration:  $\alpha$ - or  $\beta$ -configuration of the glycosidic linkage;
- ring size: presence and distinction of furanosidic and pyranosidic rings;
- linkage patterns: linkage positions between the monosugars and branches;
- sequences of monosaccharide residues in the repeating units;
- substitutions: position and nature of OH-modifications, such as O-phosphorylation, acetylation, O-sulfation, etc.;
- molecular weight and molecular weight distribution.

A polysaccharide extracted from plant materials or food products is usually purified before being subjected to structural analysis. The first step of characterizing a polysaccharide is the determination of its purity, which is reflected by its chemical composition, including total sugar content, level of uronic acids, proteins, ash, and moisture of the preparation. The second step is the determination of monosaccharide composition, which will unveil structural information such as the number of monosaccharides present in the polysaccharide and how many of each sugar unit. NMR spectroscopy has become the most powerful and noninvasive physicochemical technique for determining polysaccharide structures. It can provide detailed structural information of carbohydrates, including identification of monosaccharide composition, elucidation of  $\alpha$ - or  $\beta$ -anomeric configurations, establishment of linkage patterns, and sequences of the sugar units in oligosaccharides and/or polysaccharides. Monosaccharide composition can be determined also by analysis of totally acid hydrolyzed polysaccharide using high performance liquid chromatography (HPLC) or gas chromatography (GC). The ring size and glycosidic linkage positions of sugar units in a polysaccharide could be established by methylation analysis and/or cleavage reduction. The anomeric configuration is conventionally determined by oxidation, and this method can be combined with mass spectrometry to obtain more structural information.

**Keywords:** polysaccharides, monosaccharides, oxidative degradation, methylation analysis, acetolysis, NMR, MS

**Słowa kluczowe:** polisacharydy, monosacharydy, degradacja oksydacyjna, analiza metylacyjna, acetoliza, NMR, MS

---

---

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

Ac	– acetyl
COSY	– spektroskopia korelacyjna (ang. <i>correlation spectroscopy</i> )
DMSO	– dimetylosulfotlenek
ELSD	– detektor rozpraszania światła przez odparowanie (ang. <i>evaporative light scattering detector</i> )
ESI-MS	– spektrometria mas z jonizacją elektrosprejem (ang. <i>electrospray ionisation mass spectrometry</i> )
FAB-MS	– spektrometria mas z jonizacją szybkimi atomami (ang. <i>fast atom bombardment mass spectrometry</i> )
GC	– chromatografia gazowa (ang. <i>gas chromatography</i> )
GC-MS	– chromatografia gazowa z detektorem masowym (ang. <i>gas chromatography mass spectrometry</i> )
Glc	– glukoza
GTA	– aldehyd glutarowy
HMBC	– heterokorelacyjne widmo dwuwymiarowe dalekiego zasięgu (ang. <i>heteronuclear multiple bond coherence</i> )
HPLC	– wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. <i>high-performance liquid chromatography</i> )
HSQC	– heterokorelacyjne widmo dwuwymiarowe poprzez jedno wiązanie (ang. <i>heteronuclear single quantum correlation</i> )
MALDI	– wspomagana matrycą jonizacja laserem (ang. <i>matrix assisted laser desorption and ionisation</i> )
Me	– metyl
NMR	– magnetyczny rezonans jądrowy (ang. <i>nuclear magnetic resonance</i> )
NOE	– jądrowy efekt Overhausera (ang. <i>nuclear overhauser effect</i> )
NOESY	– spektroskopia efektu Overhausera (ang. <i>nuclear overhauser effect spectroscopy</i> )
PS	– polisachryd (ang. <i>polysaccharide</i> )
Rha	– ramnoza
SEC	– chromatografia wykluczania (ang. <i>size-exclusion chromatography</i> )
SPE	– ekstrakcja do fazy stałej (ang. <i>solid-phase extraction</i> )
TCA	– kwas trichlorooctowy
TFA	– kwas trifluorooctowy
TOCSY	– korelacyjna spektroskopia zupełna (ang. <i>total correlation spectroscopy</i> )
TRIS	– tris(hydroxymethyl)aminomethane (2-amino-2-hydroksymetylo-propano-1,3-diol)

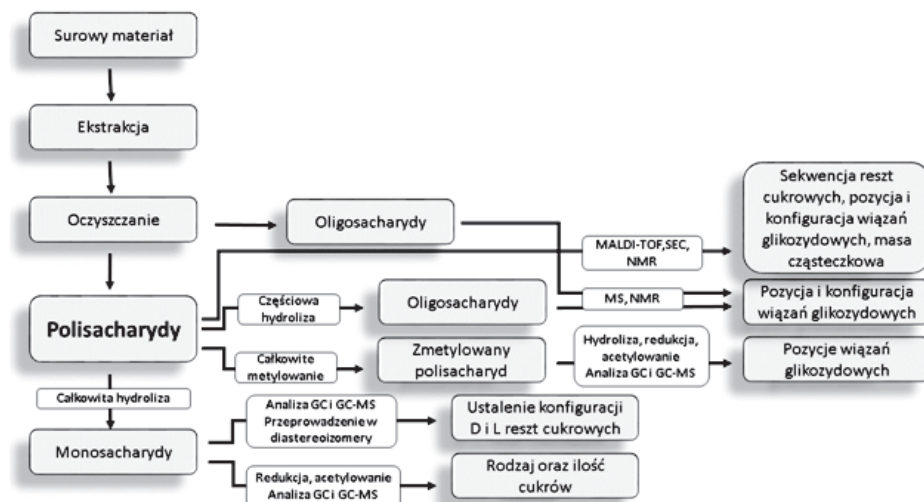
## WPROWADZENIE

Szacuje się, że każdego roku na Ziemi powstaje w procesie biosyntezy prowadzonej przez rośliny i bakterie fotosyntetyzujące około  $4 \times 10^{11}$  ton węglowodanów. Większość z tych związków jest produkowana jako polisacharydy (PS). Jak dla każdego polimeru, nie jest możliwe przypisanie im odrębnej masy cząsteczkowej, ponieważ są one polidispersyjnymi cząsteczkami, które charakteryzuje się podając średnią masę cząsteczkową. Polisacharydy występują w ogromnej różnorodności strukturalnej. Są one produkowane przez wszystkie grupy organizmów, w tym mikroorganizmy, glony, grzyby, rośliny i zwierzęta.

Analiza połączeń cukrów w polisacharydach jest niezwykle ważną dziedziną badań strukturalnych. Proces ustalenia struktury PS należy do jednych z najtrudniejszych badań. Jak skomplikowane i pracochłonne jest to zadanie niech świadczy poniższy opis. Dwie cząsteczki tego samego aminokwasu można połączyć ze sobą na jeden sposób. W wyniku połączenia glikozydowo dwóch takich samych cząsteczek monosacharydu można uzyskać aż 11 disacharydów. Dwa różne aminokwasy pozwalają uzyskać 4 różne peptydy, dwa cukry 20 sacharydów i to nie uwzględniając możliwości różnej wielkości pierścienia.

### 1. IZOLOWANIE I OCZYSZCZANIE EGZOPOLISACHARYDÓW

W analizie materiału pochodzenia naturalnego kluczowym etapem jest proces izolowania i oczyszczania próbki. Istotne jest aby badana substancja nie uległa żadnym przemianom podczas tych procesów oraz aby nie została zanieczyszczona.



Rysunek 1. Schemat przykładowego sposobu postępowania podczas analizy polisacharydów  
Figure 1. Diagram of an analytical procedure of polysaccharides

Do najczęściej wykorzystywanych metod izolowania polimerów węglowodanowych należą:

- ekstrakcja przy użyciu aldehydu glutarowego (GTA);
- ekstrakcja przy użyciu aldehydu mrówkowego;
- ekstrakcja buforami np. octanowym [1] lub TRIS [2];
- ekstrakcja w obecności żywicy kationowymiennej;
- ekstrakcja trudno rozpuszczalnych w wodzie polisacharydów roztworem NaOH;
- ekstrakcja ultradźwiękami;
- odwirowywanie;
- ekstrakcja wodą na gorąco;
- wytrącanie etanolem.

Podstawowym parametrem danej metody ekstrakcji jest jak największy odzysk egzopolimerów przy jak najmniejszym stopniu lizy komórek bakteryjnych. Ekstrakcja na gorąco, czy przy użyciu ultradźwięków prowadzi do znacznego odzysku substancji pozakomórkowych, niestety towarzyszy temu znaczne zanieczyszczenie materiałem komórkowym. Liczne badania procesu izolowania materiału pozakomórkowego wskazują, iż w większości przypadków najodpowiedniejszą metodą jest ekstrakcja 3% roztworem aldehydu glutarowego [3, 4]. Metoda ta charakteryzuje się wysoką wydajnością ekstrakcji substancji pozakomórkowych oraz minimalnym stopniem przenikania materiału komórkowego. Jak wykazano, aldehyd glutarowy zapobiega lizie komórek bakteryjnych poprzez stabilizowanie ściany komórkowej, dzięki czemu praktycznie unikamy zanieczyszczeń pochodzenia wewnątrzkomórkowego. Często, w celu zwiększenia odzysku, stosuje się techniki łączone, przykładowo ekstrakcja GTA, a dopiero po niej sonikacja czy ekstrakcja przy użyciu żywicy jonowymiennej [5, 6].

Kolejnym etapem jest izolowanie egzopolisacharydów z ekstraktów pozakomórkowych i ich oczyszczenie. W celu usunięcia niecukrowych substancji wysokocząsteczkowych: białek i kwasów nukleinowych, wykorzystuje się najczęściej procesy strącania lub/i metody enzymatyczne. Kwasy nukleinowe usuwa się poprzez strącanie 40% roztworem etanolu przy pH 4,5 lub używając enzymów deoksyrybonukleazy (DNA-zy) i rybonukleazy (RNA-zy). Białka najczęściej strąca się etanolem, alkoholem izopropylowym czy roztworem kwasu trichlorooctowego (TCA) lub przy użyciu proteaz. Typowo stosowanym enzymem proteolitycznym jest Proteinaza K [7, 8].

Po usunięciu interferujących makrocząsteczek należy polisacharydy oddzielić od niskocząsteczkowych zanieczyszczeń. Dogodną metodą oczyszczenia polimerów jest dializa. W zależności od masy cząsteczkowej badanego polisacharydu dobiera się odpowiedni rodzaj worka dializy, o określonej wielkości porów (ang. *cut-off*). Następnie dializat najczęściej frakcjonuje się metodą sączenia molekularnego, używając między innymi wypełnień typu Bio-Gel P-100, Sephacryl S-400, Sephadex G-50 czy Sepharose 6B, lub poprzez chromatografię jonowymienną, stosując mię-

dzy innymi kolumny z wypełnieniem Sephadex A-25, Hitrap Q czy DEAE Sepharose [9, 10].

## 2. OKREŚLANIE STRUKTURY PIERWSZORZĘDOWEJ POLISACHARYDÓW

Badając strukturę pierwszorzędowną polisacharydów należy określić: skład cukrowy, sposób połączenia reszt monosacharydowych, sekwencję poszczególnych reszt, wielkość pierścieni cukrowych jednostek budujących polimer, konfigurację D lub L, konfigurację anomerycznych atomów węgla oraz rodzaj i miejsce podstawienia składników niecukrowych. Najpowszechniej wykorzystywanymi technikami w analizie struktury pierwszorzędownej polisacharydów są: chromatografia gazowa, chromatografia cieczowa, spektrometria mas oraz magnetyczny rezonans jądrowy [11–13].

### 2.1. IDENTYFIKACJA SKŁADU CUKROWEGO

W analizie strukturalnej polisacharydów pierwszym, nieodzownym etapem jest ustalenie składu cukrowego, czyli typu reszt monosacharydowych budujących polimer. W tym celu należy polisacharyd poddać całkowitej depolimeryzacji, następnie zależnie od metod detekcji ewentualnie odpowiedniej derywatywacji. Najczęściej, w celu kompletnej depolimeryzacji polisacharydu wykorzystuje się reakcję kwaśnej hydrolizy wodnymi roztworami kwasu siarkowego(VI), chlorowodorowego, czy trifluorooctowego. Stosowana jest także solwoliza chlorowodem w bezwodnym metanolu (np. 2 M HCl/MeOH). Stałe szybkości reakcji hydrolizy wiązań glikozydowych w polisacharydzie różnią się znacząco i są zależne od typu wiązania glikozydowego, rodzaju reszt cukrowych, wielkości pierścienia reszt oraz konfiguracji anomerycznej wiązań. I tak labilność poszczególnych wiązań glikozydowych w warunkach kwaśnej hydrolizy przedstawia się następująco (od najwrażliwszego wiązania): 1,2 > 1,3 > 1,4 > 1,6.

Wiązania glikozydowe tworzone przez reszty aminocukrów czy kwasów uronowych wymagają zastosowania do hydrolizy wyższych stężeń kwasów (np. 4 M TFA) w porównaniu z wiązaniami tworzonymi przez cukry obojętne. Natomiast kwasy sjałowe i deoksycukry są bardzo wrażliwe na warunki kwaśnej hydrolizy i mogą wręcz ulegać degradacji. W tym wypadku należy zastosować łagodniejsze warunki (0,02 M TFA) lub przeprowadzić depolimeryzację w warunkach niewodnych, jak na przykład metanolizę czy solwolizę fluorowodem. Reakcję metanolizy wykonuje się przy użyciu 0,1–0,5 M roztworu chlorowodoru w metanolu, natomiast w reakcji solwolizy wykorzystuje się bezwodny fluorowódor, który jest silnie toksyczny, a zważywszy na fakt rozwoju alternatywnych metod, jest obecnie coraz rzadziej stosowany.

Wielkość pierścienia monosacharydów budujących PS ma wpływ na trwałość wiązań glikozydowych i tak reszty furanozowe są o wiele bardziej labilne niż piranozowe (10–1000 razy szybciej ulegają odszczepieniu). Wykazano również, że anomery  $\alpha$  łatwiej hydrolizują w porównaniu z anomerami  $\beta$  [14–16].

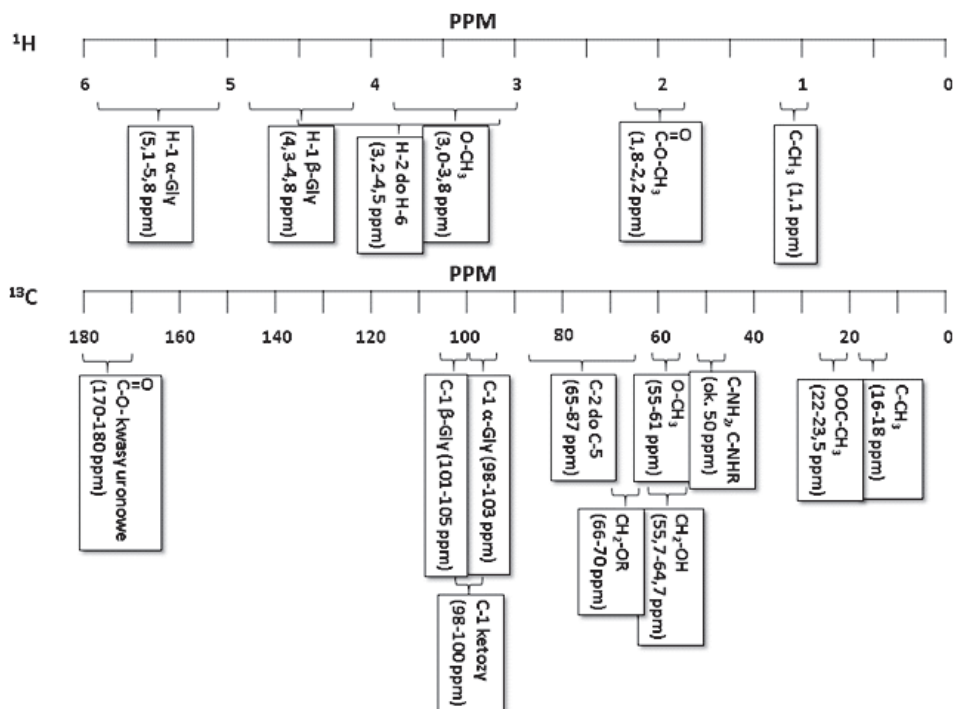
Po całkowitej depolimeryzacji polisacharydu najczęściej detekcji poszczególnych monosacharydów dokonuje się poprzez chromatografię gazową (GC) oraz chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią mas (GC-MS).

W tym celu należy mieszaninę po hydrolizie przekształcić w lotne pochodne, najczęściej acetyloalditole lub pochodne trimetylosililowe. Identyfikacji cukrów dokonuje się porównując czasy retencji z substancjami wzorcowymi oraz poprzez analizę widm mas.

Mniej powszechnie stosowaną techniką w analizie cukrów jest wysokosprawną chromatografią cieczową, głównie za sprawą utrudnionej detekcji. Dotychczas do identyfikacji natywnych cukrów najczęściej wykorzystywano detekcję refraktometryczną lub elektrochemiczną, które wiążą się z pewnymi ograniczeniami. I tak głównym czynnikiem ograniczającym zastosowanie detektora refraktometrycznego jest brak możliwości pracy w gradiencie fazy ruchomej, natomiast w warunkach detekcji elektrochemicznej nie wszystkie składniki cukrowe są stabilne. Stosowane są również detektory UV czy fluorescencyjne, aczkolwiek te wymagają przeprowadzania cukrów w odpowiednie pochodne. Jednak za sprawą detektora ELSD nastąpił przełom w badaniach cukrów za pomocą HPLC. ELSD jest uniwersalnym detektorem umożliwiającym elucję gradientową, przez co idealnie nadaje się do analizy sacharydów. Dodatkowo wyróżnia się on wysoką czułością w porównaniu z detektorem refraktometrycznym oraz stabilnością linii podstawowej [17–19].

Kolejnym sposobem identyfikacji składu cukrowego polisacharydu jest analiza widm magnetycznego rezonansu jądrowego, zarówno protonowego jak i węglowego. Do tego celu użyteczny jest zakres anomeryczny widma. Przesunięcie chemiczne protonów anomerycznych mieści się w zakresie 4,3–5,7 ppm, natomiast anomerycznych atomów węgla 90–110 ppm. Informacje o liczbie różnych reszt cukrowych uzyskuje się z liczby sygnałów anomerycznych protonów i atomów węgla. Analizując dogłębnie homo- i heterokorelacyjne widma dwuwymiarowe (COSY, TOCSY, HSQC i HMBC) można określić wartości przesunięć chemicznych wszystkich protonów i atomów węgla. Ich przesunięcia chemiczne mieszczą się odpowiednio w zakresie  $\delta_{\text{H}}$  3–4,3 ppm oraz  $\delta_{\text{C}}$  ~50–87 ppm i porównać je z danymi literaturowymi [13].

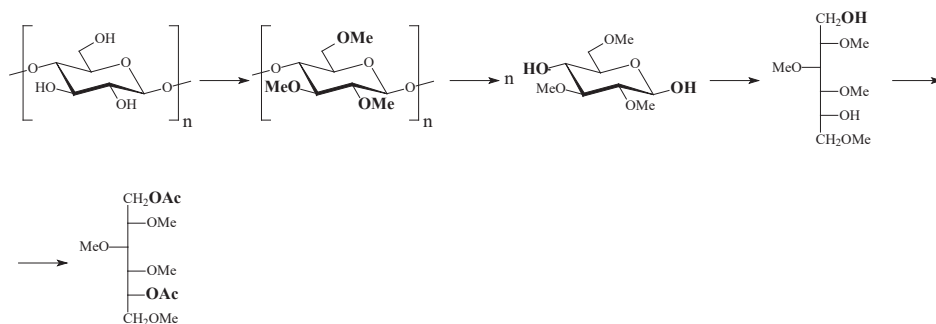




Rysunek 2. Wartości przesunięć chemicznych cukrów na widmach <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR  
 Figure 2. Chemical shifts in the <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spectra of sugars.

## 2.2. OKREŚLENIE SPOSOBU POWIĄZANIA RESZT CUKROWYCH

Poza wielowymiarowymi technikami NMR, najczęściej stosowaną metodą określania sposobu powiązania reszt cukrowych w polisacharydach jest analiza metylacyjna, polegająca na całkowitym zmetylowaniu polisacharydu, następnie jego hydrolizie, redukcji i acetylowaniu (Rys. 3). Uzyskane częściowo metylowane i acetylowane pochodne alditoli analizuje się techniką GC porównując czasy retencji składników badanej próbki z wzorcami. Analizując preparaty techniką GC-MS, uzyskuje się dodatkowo widma mas poszczególnych pochodnych.



Rysunek 3. Schemat analizy metylacyjnej

Figure 3. Scheme of methylation analysis

Poniżej zestawiono kilka powszechnie stosowanych metod metylowania polisacharydów:

- *metoda Hakomori*, w której preparat PS rozpuszczony w dimetylo-sulfotlenku (DMSO), poddaje się działaniu dimetylosulfinylu sodu (dimisylu sodu), a następnie jodku metylu [20];
- *metoda Kerekà–Ciucanu*, w której preparat PS rozpuszcza się w DMSO, dodaje się suchego, sproszkowanego wodorotlenku sodu i jodku metylu. Procedura jest prostsza niż w przypadku metody Hakomori, jednak aminocukry mogą ulegać niepełnej metylacji [21];
- *metoda Prehmà*, w której próbkę PS rozpuszcza się w fosforanie trimetylu, następnie wprowadza się 2,6-di-*tert*-butylopirydynę i trifluorometanosulfonian metylu. Jest to łagodna metoda, wykorzystywana w przypadku polisacharydów zawierających składniki labilne w środowisku zasadowym [22];
- *metoda Kuhnà*, w której preparat PS rozpuszcza się w *N,N*-dimetyloformamidzie lub DMSO i poddaje działaniu jodku metylu, bądź siarczanu dimetylu w obecności tlenku baru [23].

Istotnym etapem analizy metylacyjnej jest oczyszczanie próbki po reakcji metylowania. Stosuje się kilka sposobów oddzielenia zmetylowanego polisacharydu od zanieczyszczeń. Są to:

- dializa [24];
- ekstrakcja chloroformem [25–27];
- ekstrakcja do fazy stałej (SPE), z użyciem kolumnienki wypełnionej krzemionką z chemicznie związaną fazą oktadecylową (Sep-Pak, C18) [28, 29];
- sączenie molekularne na złożu Sephadex LH-20 [30, 31].

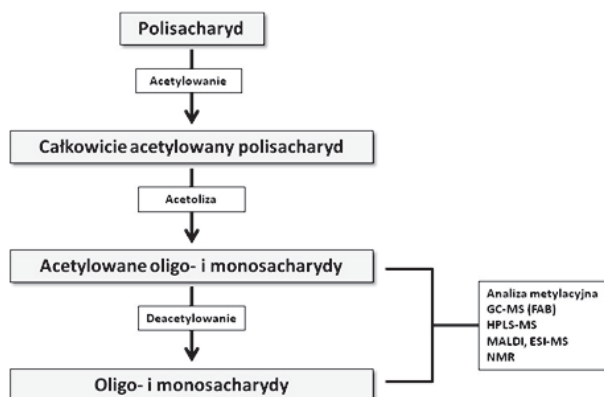
Potwierdzeniem wyników analizy metylacyjnej jest analiza jedno- i dwuwymiarowych widm NMR oraz porównanie uzyskanych wyników z danymi literaturowymi. Wartości przesunięć chemicznych zarówno atomów węgla jak i protonów ulegają zmianie po przeprowadzeniu węglowodanów w ich metylowe pochodne.

### 2.3. OZNACZENIE SEKWENCJI RESZT CUKROWYCH

Poza analizą widm 1D i 2D NMR, informacje o sekwencji reszt cukrowych uzyskuje się dzięki różnorodnym metodom selektywnej degradacji oligosacharydów, w tym takich jak: częściowa kwaśna hydroliza, acetoliza, utlenianie połączone z łagodną hydrolizą (hydroliza oksydacyjna), czy trawienie enzymatyczne. Również wyniki analizy metylacyjnej dostarczają informacji o sekwencji reszt cukrowych. Doboru metody degradacji dokonuje się w oparciu o skład cukrowy i rodzaj wiązań występujących w badanym polisacharydzie.

Częściowa kwaśna hydroliza jest wykorzystywana gdy w polisacharydzie znajdują się składniki labilne w roztworze o niskim pH, takie jak kwasy sialowe, czy deoksycukry oraz reszty cukrowe posiadające pierścień pięcioczłonowy (furanozowy) czy nietrwałe wiązania jak na przykład fosfodiestrowe. Częściową hydrolizę w warunkach kwaśnych wykorzystano między innymi w badaniach nad strukturą gellanu – egzopolisacharydu syntezowanego przez *Sphingomonas elodea*. Polisacharyd poddano hydrolizie w 0,05 M TFA, 100°C przez 45 minut, w wyniku czego otrzymano mieszaninę oligosacharydów, którą następnie frakcjonowano metodą sączenia molekularnego. Poszczególne oligocukry identyfikowano techniką ESI-MS. Głównym produktem częściowej hydrolizy okazał się charakterystyczny tetrasacharydowy fragment powtarzającej się jednostki gellanu oraz ten sam tetrasacharyd zawierający przyłączoną resztą glicerolu. Mimo, że natywny gellan zawierał reszty acetylowe to w trakcie analizy nie zaobserwowano O-acetylowanych oligocukrów, co potwierdza większą labilność tej grupy w środowisku kwaśnym w porównaniu z resztą glicerolu. Obecność tetrasacharydowej jednostki powtarzalnej gellanu wynika z rozpadu wiązania glikozydowego pomiędzy resztą ramnozy a glukozą [ $\alpha$ -L-Rha-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Glc], co jest zgodnie z tym, że 6-deoksycukry tworzą wiązania glikozydowe mniej trwałe w warunkach kwaśnej hydrolizy [32]. Częściową hydrolizę wykorzystano również podczas analizy struktury antygeny O *Salmonella* Abortusequi O4 i *Salmonella* Agona. Oba antygeny zawierają resztę abekozy (3,6-dideoksyheksozy) labilną już w 0,2 M TFA w 4°C [33, 34].

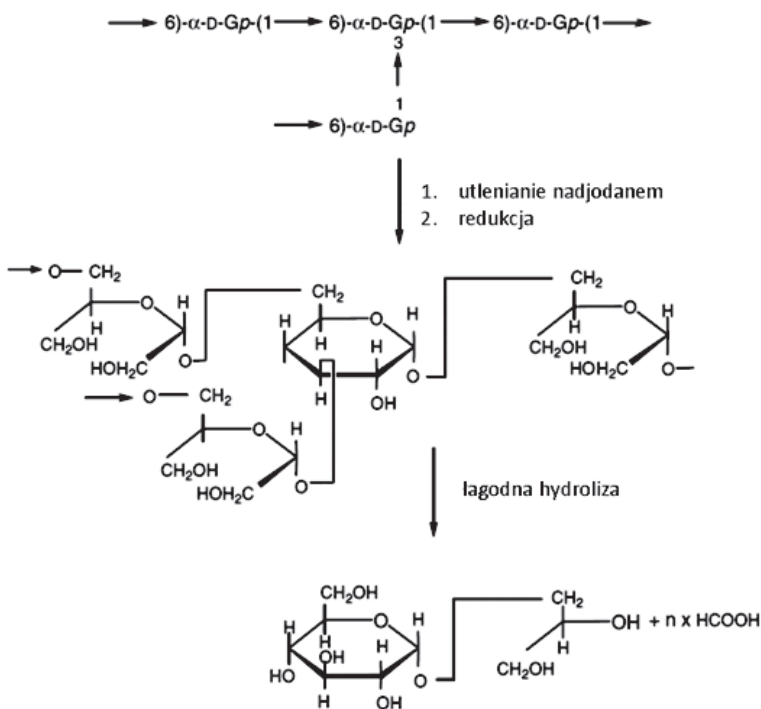
Inną szeroko stosowaną metodą częściowej degradacji polisacharydów jest acetoliza pomocna w ustalaniu struktury polisacharydów, w których występuje wiązanie glikozydowe (1 $\rightarrow$ 6). W reakcji acetolizy wykorzystuje się znaczne różnice w trwałości wiązań glikozydowych. Wiązanie (1 $\rightarrow$ 6) jest bardzo czułe, podczas gdy pozostałe wiązania są stosunkowo trwałe w warunkach reakcji. Wrażliwość poszczególnych wiązań glikozydowych w warunkach acetolizy przedstawia następujący szereg: 1,6  $\gg$  1,4 > 1,3 > 1,2 [35]. Schemat procedury acetolizy przedstawia Rysunek 4. W wyniku acetolizy otrzymuje się mieszaninę mono- i oligosacharydów będących odzwierciedleniem rozgałęzień polimeru, co jest bardzo cenne w analizie wysoce rozgałęzionych polimerów [36, 37]. Produkty acetolizy identyfikuje się głównie za pomocą spektrometrii mas i magnetycznego rezonansu jądrowego.



Rysunek 4. Schemat acetolizy  
Figure 4. Scheme of acetolysis

Acetolizę wykorzystuje się między innymi do ustalenia sekwencji reszt cukrowych w mannanach izolowanych z różnych gatunków drożdży, badając mono- i oligosacharydy powstałe w wyniku reakcji. Mannany grzybowe zazwyczaj zbudowane są z szkieletu mannonowego o wiązaniach  $\alpha(1\rightarrow6)$ , które są nieregularnie podstawione w pozycji 2 przez mono- lub oligosacharydowe fragmenty.

Kolejną metodą degradacji polisacharydu używaną w celu określenia jego struktury jest hydroliza oksydacyjna. Najszerszej wykorzystywanym wariantem tej metody jest degradacja Smitha (Rys. 5). Polega ona na utlenianiu polisacharydu jodanem(VII) sodu, w wyniku czego następuje rozerwanie wiązania pomiędzy sąsiadującymi ze sobą hydroksylowanymi atomami węgla. Reakcji ulegają wszystkie końcowe cukry nieredukujące, poza 3,6-dideoksypiranozami. Dodatkowo wewnątrz łańcucha polisacharydowego utleniają się wszystkie reszty oprócz 3-podstawionych. Produkty utleniania poddaje się redukcji, łagodnej lub całkowitej hydrolizie z utworzeniem aldoz, 1,2-dioli, gliceryny, czy tetritoli, które identyfikować można na szereg różnych sposobów, głównie poprzez spektrometrię mas z jonizacją technikami MALDI i ESI.



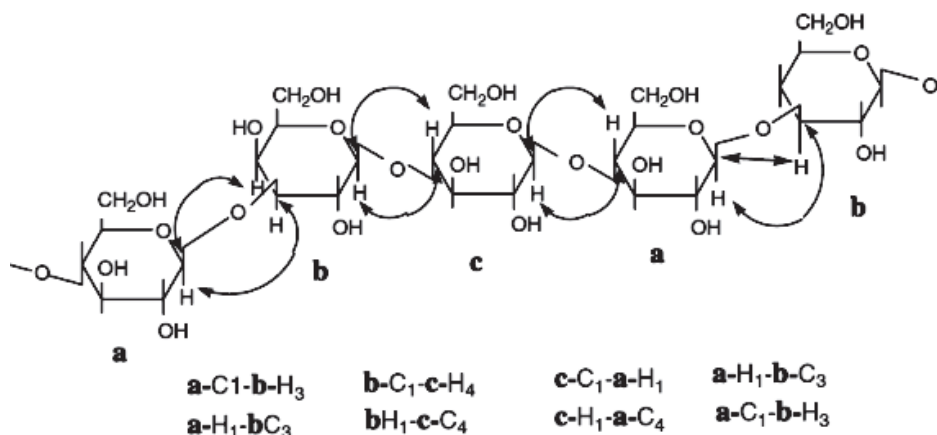
Rysunek 5. Degradacja Smitha dekstranu [38]

Figure 5. Smith degradation of dextran [38]

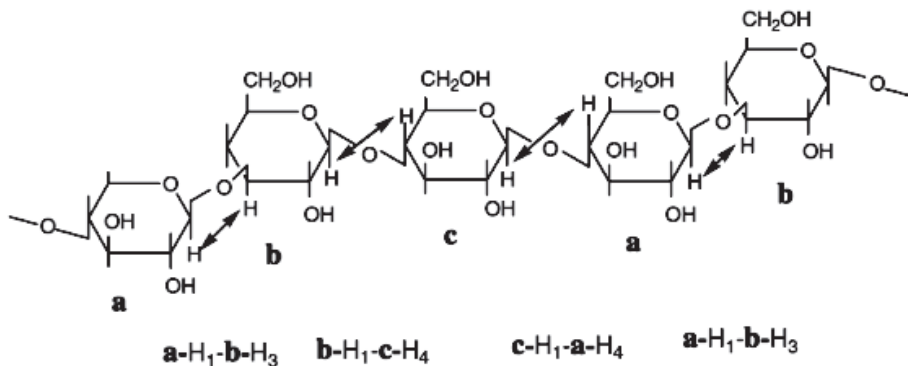
Degradację Smitha zastosowano między innymi w celu ustalenia struktury fukoidanu izolowanego z brunatnicy *Chorda filum* oraz antygeny somatycznego *Salmonella* Dakar [39, 40].

Wysocze specyficzne enzymy, trawiące polisacharydy określonych miejscach, są często wykorzystywane w celu określenia sekwencji cukrów w polimerze. Hydrolizę enzymatyczną wykorzystano między innymi podczas badania struktury ksantanu, który poddawano kolejno działaniu liazy ksantanowej,  $\beta$ -D-glukanazy,  $\beta$ -D-glukozydazy, hydrolazy nienasyconej pochodnej kwasu glukuronowego oraz  $\alpha$ -D-mannozydazy. Produkty zidentyfikowano techniką spektrometrii mas z jonizacją elektrosprejem [41].

Analiza dwuwymiarowych widm NMR jest nieocenionym źródłem informacji o sekwencji monocukrów w polisacharydzie. Na widmie heterokorelacyjnym HMBC można zaobserwować sprzężenia pomiędzy protonem anomerycznym jednej reszty cukrowej, a atomem węgla kolejnej (schemat oddziaływań, Rys. 6). Natomiast na widmie NOESY pojawiają się sygnały sprzężenia przez przestrzeń pomiędzy protonem anomerycznym jednej reszty cukrowej z najbliższym przestrzennie protonem kolejnej reszty (Rys. 7).



Rysunek 6. Odziaływania, które można zaobserwować w postaci sygnałów na widmie HMBC  $\beta$ -D-glukanu  
 Figure 6. Illustration of HBMC effects of  $\beta$ -D-glucan



Rysunek 7. Odziaływania typu NOE w  $\beta$ -D-glukanie  
 Figure 7. Illustration of NOE effects of  $\beta$ -D-glucan

#### 2.4. USTALENIE WIELKOŚCI PIERŚCIENI SKŁADNIKÓW CUKROWYCH

Monosacharydy w roztworze występują w formie łańcuchowej oraz pierścieniowej, zarówno pięcio- jak i sześcioczłonowej. Natomiast w polisacharydzie, gdzie cukry są z sobą połączone poprzez wiązanie glikozydowe, mamy do czynienia wyłącznie z formami pierścieniowymi, za wyjątkiem reszt końcowych (redukcujących). W celu określenia wielkości pierścieni cukrowych w badanym polisacharydzie możemy się posłużyć wynikami analizy metylacyjnej. Pochodne 1,5-di-O-acetylowe oraz 1,4-di-O-acetylowe wskazują odpowiednio na strukturę pierścienia piranozowego (sześcioczłonowego) i furanozowego (pięciodzłonowego). Problem pojawia się, gdy grupami acetylowymi są podstawione pozycje 1, 4 i 5. Wówczas należy interpretację oprzeć o wyniki analiz NMR albo korzystając z metod chemicznych

zmetylowaną próbkę tak hydrolizować, aby powstało jak najwięcej disacharydów, które należy zredukować, poddać etylowaniu i przeprowadzić całkowitą hydrolizę produktu. Uzyskane, w końcowym etapie octany metyloetyloalditoli można analizować metodą GC-MS.

Obecność reszt furanozylowych można również potwierdzić analizując jednowymiarowe widmo  $^{13}\text{C}$  NMR, gdyż odpowiadające atomom węgla tworzącym pierścień pięcioczłonowy sygnały występują w zakresie  $\delta$  83-88 ppm. Brak sygnałów w tym zakresie wyklucza występowanie pierścieni furanozowych w badanym polisacharydzie.

## 2.5. PRZYPISANIE MONOSACHARYDÓW DO SZEREGU KONFIGURACYJNEGO D LUB L

Określenie konfiguracji D i/lub L jest koniecznym etapem badań struktury polisacharydu, ponieważ wiele cukrów takich jak galaktoza, arabinoza, ramnoza czy fukoza występuje w związkach wielkocząsteczkowych w postaci obu enancjomerów, często w tym samym polisacharydzie.

Najczęściej stosowanymi metodami ustalania konfiguracji D, L cukrów są:

- pomiar skręcalności optycznej – szybka i tania metoda, która jednak wymaga stosunkowo dużej ilości próbki;
- dichroizm kołowy octanów alditoli lub benzoesanów cukrów [42];
- metody enzymatyczne – wykorzystanie specyficznych dla danej konfiguracji cukru enzymów. Przykładowo, metodą tą posłużono się w celu określenia konfiguracji absolutnej reszt cukrowych egzopolisacharydu *Lactococcus rhamnosus* KL37C [43, 44];
- chromatografia gazowa na fazach nieczynnych optycznie, po przeprowadzeniu analizowanych monocukrów w diastereoizomeryczne pochodne [45, 46];
- chromatografia gazowa na chiralnych fazach stacjonarnych – metoda niewymagająca przeprowadzania w diastereoizomeryczne pochodne, przez co wygodniejsza, jednakże do oznaczeń konieczna jest kolumna chromatograficzna z chiralną fazą. Wykorzystano ją między innymi do określenia konfiguracji absolutnej składników galaktanu z *Helix pomatia* [47, 48];
- analiza widm NMR pochodnych cukrów – wykorzystywane są pochodne (S)-2-metylomaślanu [49, 50].

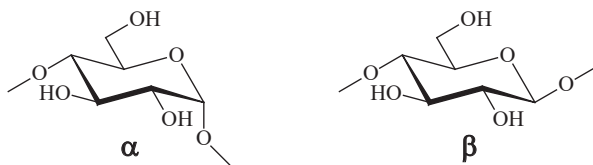
Najczęściej wykorzystywaną metodą ustalania konfiguracji względnej reszt cukrowych w bakteryjnych polisacharydach jest chromatografia gazowa na niechiralnych fazach stacjonarnych. Badane enancjomery cukrowe poddaje się na ogół reakcji z optycznie czynnym alkoholem, [np. (S)-butan-2-olem, czy (S)-oktan-2-olem] w wyniku czego powstają diastereoizomeryczne produkty, które po przeprowadzeniu w lotne pochodne można rozdzielić na niechiralnej fazie stacjonarnej, przy czym właściwości chromatograficzne glikozydów D-cukru i (R) alkoholu są

identyczne jak glikozydów L-cukru i (S) alkoholu, co eliminuje konieczność posiadania dodatkowych wzorców. Poza optycznie czynnymi alkoholami stosuje się również inne odczynniki jak na przykład 1-fenyletanol [51].

## 2.6. OZNACZENIE KONFIGURACJI ANOMERYCZNYCH ATOMÓW WĘGLA

W polisacharydach reszty cukrowe występują w formie pierścieni.

W wyniku zamknięcia w pierścień węgle C-1 (w przypadku aldoz) oraz C-2 (w przypadku ketoz) stają się centrum chiralnym. Konsekwencją tego procesu wiązanie glikozydowe może posiadać konfigurację  $\alpha$  lub  $\beta$  (Rys. 8).



Rysunek 8. Konfiguracja  $\alpha$  i  $\beta$  anomerycznego atomu węgla reszty D-glukopiranozy  
Figure 8.  $\alpha$  and  $\beta$  configuration of anomeric carbon atom of D-glucopyranose

Istnieje kilka sposobów ustalania konfiguracji  $\alpha$  i  $\beta$  anomerycznych atomów węgla. Należą do nich między innymi:

- analiza widm NMR;
- metody enzymatyczne;
- selektywne utlenianie.

W celu określenia konfiguracji anomerycznych atomów węgla za pomocą widm magnetycznego rezonansu jądrowego korzysta się z wartości przesunięć chemicznych zarówno protonów jak i węgli anomerycznych. Wartości te znajdują się (Rys. 2):

- dla protonu H-1 anomeru  $\alpha$  w zakresie 5,1–5,8 ppm;
- dla protonu H-1 anomeru  $\beta$  w zakresie 4,3–4,8 ppm;
- dla węgla anomerycznego anomeru  $\alpha$  w zakresie 98–103 ppm;
- dla węgla anomerycznego anomeru  $\beta$  w zakresie 101–105 ppm. (Rys. 2)

Również stałe sprzężenia  $^3J_{\text{H1-H2}}$  dostarczają informacji o konfiguracji anomerycznej. Stała sprzężenia  $^3J_{\text{H1-H2}}$  o wartości 2–3 Hz świadczy o konfiguracji  $\alpha$ , a  $^3J_{\text{H1-H2}}$  o wartości 7–8 Hz jest dowodem na występowanie konfiguracji  $\beta$ . Jednak dotyczy to tylko cukrów o konfiguracji *gluko-* i *galakto-*, gdyż dla konfiguracji *manno-* stałe dla anomerów  $\alpha$  i  $\beta$  wykazują porównywalnie małe wartości. Dodatkowo z nierozprzężonego widma heterokorelacyjnego  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  (HSQC) można określić stałe sprzężenia  $^1J_{\text{H1-C1}}$ . Wynoszą one ~160 i 170 Hz odpowiednio dla anomeru  $\beta$  (położenie aksjalne protonu anomerycznego) i anomeru  $\alpha$  (położenie ekwatorialnego) [13, 16, 52].

Kolejnym sposobem określenia konfiguracji anomerycznej są metody enzymatyczne, wykorzystujące stereospecyficzne dla danej konfiguracji enzymy. Metodę tą



wykorzystano do ustalenia konfiguracji anomerycznej reszty mannozy występującej w antygenie O *Salmonella* grupy B, D i E, stosując  $\alpha$ - i  $\beta$ -mannozydazę [53]. W ustalaniu konfiguracji anomerycznej pomocna może być metoda utleniania, w której w pełni zacetylowany polisacharyd utlenia się tlenkiem chromu(VI) w lodowatym kwasie octowym. Produkty utleniania poddaje się analizie metylacyjnej. Są one różne dla anomerów  $\alpha$  i  $\beta$ , gdyż glikozydy, w których aglikon występuje w pozycji ekwatorialnej, ulegają znacznie szybciej reakcji utleniania niż te, w których aglikon występuje w pozycji aksjalnej. Polisacharyd, w którym występują wiązania  $\alpha$ -glikozydowe jest bardzo powoli utleniany, w wyniku czego produkty analizy metylacyjnej są podobne do tych z natywnego polisacharydu. Natomiast dla polisacharydów o wiązaniach  $\beta$ -glikozydowych utlenianie zachodzi bardzo szybko, w rezultacie produkty metylowania są znacząco różne [54]. Powyższą metodę zastosowano między innymi do ustalenia konfiguracji anomerycznej wiązań glikozydowych w egzopolisacharydzie wyizolowanym z *Rhodococcus* szczep 33 oraz polisacharydzie otoczkowym *Klebsiella* typ 61 [55, 56].

## 2.7. IDENTYFIKACJA I MIEJSCE PODSTAWIENIA SKŁADNIKÓW NIECUKROWYCH

Polisacharydy często oprócz jednostek monosacharydowych zawierają podstawniki niecukrowe, takie jak reszty acetylowe, metylowe, siarczanowe, fosforanowe i wiele innych. Identyfikacja i określenie miejsca przyłączenia tych grup jest niezbywalnym etapem badań struktury PS-u, gdyż decydują one w dużej mierze o właściwościach chemicznych i fizycznych polimeru. Najszerzej stosowana metodą identyfikacji składników niecukrowych jest analiza widm NMR. W zależności od rodzaju podstawnika obserwuje się zmiany przesunięć chemicznych zarówno protonów jak i atomów węgla w stosunku do niepodstawionej grupy. Generalizując przesunięcie chemiczne wzrasta o 0,2–0,5 ppm na widmie protonowym i 6–7 ppm na widmie węglowym po podstawieniu grup hydroksylowych polisacharydu resztą metylową, acetylową, siarczanową czy fosforanową. Dodatkowo grupy zawierające atomy wodoru i/lub węgla będą dawały charakterystyczne sygnały na widmach. Przykładowo, sygnał protonów podstawnika metylowego występuje przy  $\sim 1,1$  ppm, natomiast atom węgla tej grupy daje sygnał przy 17,8 ppm na widmie węglowym. Podobnie możemy zidentyfikować resztę acetylową, której protony dają sygnał przy  $\delta H \sim 2,0$  ppm, natomiast węgle odpowiednio metylowy przy  $\delta C \sim 25$  ppm i karbonylowy przy  $\delta C \sim 170$  ppm. Podstawienie grupą siarczanową skutkuje zwiększeniem wartości przesunięcia chemicznego o 2–5 ppm. W przypadku podstawienia grupami funkcyjnymi zawierającymi atomy azotu czy fosforu, oprócz charakterystycznych zmian w wartościach przesunięć chemicznych odpowiednich protonów i atomów węgla rejestruje się również widma azotowe ( $^{14}N$ ,  $^{15}N$ ) i fosforowe ( $^{31}P$ ). Przykładowo w wiązaniu fosfodiestrowym na widmie  $^{31}P$  obserwujemy przesunięcie chemiczne w zakresie od  $-0,78$  do  $+1,68$  ppm, natomiast reszta fosforanowa połączona z cukrem wiązaniem monoestrowym daje sygnał przy  $\sim 4$  ppm [11, 52, 57].

## UWAGI KOŃCOWE

Rosnąca liczba zastosowań polisacharydów w przemyśle spożywczym, kosmetycznym czy medycynie sprawia, że konieczne staje się poznawanie struktury naturalnie występujących polisacharydów. Różnorodność występujących biopolimerów węglowodanowych sprawia, że określanie budowy tych naturalnych substancji wielkocząsteczkowych należy do wyjątkowo trudnych i pracochłonnych zadań. Duże masy cząsteczkowe, przy niewielkiej ilości pozyskiwanych do badań próbek stanowi dodatkowe wyzwanie. W artykule tym staraliśmy się przybliżyć typowe metody wykorzystywane do analizy strukturalnej polisacharydów i mamy nadzieję, że dla zainteresowanych stanowić on będzie wprowadzenie w tę problematykę i zachętę do pogłębienia wiedzy w oparciu o literaturę anglojęzyczną [58, 59].

## PODZIĘKOWANIE

Praca finansowana z DS 530-8455 -D 501-16.

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J.A. de Vries, F.M. Rombouts, A.G.J. Voragen, W. Pilnik, *Carbohydr. Polym.*, 1984, **4**, 89.
- [2] B. Lindberg, B. Lindqvist, J. Lönngren, D.A. Powell, *Carbohydr. Res.*, 1980, **78**, 111.
- [3] J. Azeredo, R. Oliveira, V. Lazarova, *Wat. Sci. Tech.*, 1998, **37**, 367.
- [4] M. Kuzma, B. Clack, J. Edwards, R. Tylingo, J. Samaszko, J. Madaj, *Carbohydr. Res.*, 2012, **348**, 84.
- [5] Y. Wang, Z. Cheng, J. Mao, M. Fan, X. Wu, *Carbohydr. Polym.*, 2009, **77**, 713.
- [6] X. Wang, H.L. Ma, *Chin. Food Sci. Technol.*, 2007, **9**, 99.
- [7] L.A. de Weger, B. Jann, K. Jann, B. Lugtenberg, *J. Bacteriol.*, 1987, **169**, 1441.
- [8] L.A. de Weger, G.V. Bloembergen, T. van Wezel, M. van Raamsdonk, D.C. Glandorf, J. van Vuurde, K. Jann, B.J. Lugtenberg *J. Bacteriol.*, 1996, **178**, 1955.
- [9] S.R. Sudhamani, R.N. Tharanthan, M.S. Prasad, *Carbohydr. Polym.*, 2004, **56**, 423.
- [10] S. Omarsdottir, B.O. Petersen, B.S. Paulsen, A. Togola, J.Ø. Duus, E.S. Olafsdottir, *Carbohydr. Res.*, 2006, **341**, 2449.
- [11] D.I. Grice, J.C. Wilson, *Analytical approaches towards the structural characterization of microbial wall glycopolymers*, [w:] *Microbial Glycobiology*, A. Moran, P.J. Brennan, M. von Itzstein (Red.), San Diego, CA, Academic Press 2010.
- [12] F.N. Lamari, R. Kuhn, N.K. Karamanos, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2003, **793**, 15.
- [13] J.Ø. Duus, C.H. Gotfredsen, C. Bock, *Chem. Rev.*, 2000, **100**, 4589.
- [14] J.C. Michalski, *Methods on Glycocojugates*, A. Verbert (Red.), Harwood Academic Publishers, 1995.
- [15] J.H. Pazur, *Carbohydrate Analysis*, M.F. Chaplin, J.F. Kennedy (Red.), Oxford University Press, 1994.
- [16] J. Szafranek, *Zagadnienia Biofizyki Współczesnej*, 1988, **13**, 129.
- [17] D. Asa, *American Laboratory*, 2006, **38**, 16.
- [18] M.M. Bernárdez, J.M. Miguélez, J.G. Queijeiro, *J. Food Comp. Anal.*, 2004, **17**, 63.

- [19] R. Slimestad, I.M. Vågen, J. Chromatogr. A, 2006, **1118**, 281.
- [20] S.I. Hakomori, J. Biochem. (Tokyo), 1964, **55**, 205.
- [21] J. Ciucanu, F. Kerek, Carbohydr. Res., 1984, **131**, 209.
- [22] P. Prehm, Carbohydr. Res., 1980, **78**, 372.
- [23] R. Kuhn, H. Trischmann, I. Löw, Angew. Chem., 1955, **67**, 184.
- [24] M.A. Olsthoorn, B.O. Petersen, S. Schlecht, J. Haverkamp, K. Bock, J.E.T. Oates, O. Holst, J. Biol. Chem., 1998, **273**, 3817.
- [25] Y.A. Knirel, E. Vinogradov, N. Jimenez, S. Merino, J.M. Tomas, Carbohydr. Res., 2004, **339**, 787.
- [26] H. Masoud, E. Altman, J.C. Richards, J.S. Lam, Biochemistry, 1994, **33**, 10568.
- [27] E. Vinogradov, K. Drift, J.E. Thomas-Oates, S. Meshkov, H. Brade, O. Holst, Eur. J. Biochem., 1999, **261**, 629.
- [28] T.J. Waeghe, A.G. Darvill, M. McNeil, P. Albersheim, Carbohydr. Res., 1983, **123**, 281.
- [29] A. Tacken, H. Brade, Carbohydr. Res., 1986, **149**, 263.
- [30] D.H. Shaw, M.J. Hart, O. Lüderitz, Carbohydr. Res., 1992, **231**, 83.
- [31] E. Jansson, A.A. Lindberg, B. Lindberg, R. Wollin, Eur. J. Biochem., 1981, **115**, 571.
- [32] V.M.F. Gonçalves, A. Reis, M.R.M. Domingues, J.A. Lopes-da-Silva, A.M. Fialho, L.M. Moreira, I. Sá-Correia, M.A. Coimbra, Carbohydr. Polym., 2009, **77**, 10.
- [33] Z. Kaczyński, J. Gajdus, H. Dziadziuszko, P. Stepnowski, J. Pharm. Biochem. Anal., 2009, **50**, 679.
- [34] J. Szafranek, J. Kumirska, M. Czerwicka, D. Kunikowska, H. Dziadziuszko, R. Głońska, FEMS Immunol. Med. Microbiol., 2006, **48**, 223.
- [35] J.C. Michalski, *Methods on Glycocojugates*, A. Verbert (Red.), Harwood Academic Publishers, 1995.
- [36] T.S. Stewart, P.B. Mendershausen, C.E. Ballou, Biochemistry, 1968, **7**, 1843.
- [37] B.L. Lindberg, J. Lönngren, S. Svensson, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 1975, **31**, 185.
- [38] A.O. Chizhov, A. Dell, H.R. Morris, S.M. Haslam, R.A. McDowell, A.S. Shashkov, N.E. Nifant'ev, E.A. Khatuntseva, A.I. Usov, Carbohydr. Res., 1999, **320**, 108.
- [39] J. Kocurek, C.E. Ballou, J. Bacteriol., 1969, **100**, 1175.
- [40] J. Kumirska, J. Szafranek, M. Czerwicka, M. Gołębiowski, M. Paszkiewicz, H. Dziadziuszko, D. Kunikowska, P. Stepnowski, Carbohydr. Res., 2008, **343**, 1120.
- [41] H. Nanakai, W. Hashimoto, H. Miki, S. Kawai, K. Murata, Appl. Environ. Microbiol., 1999, **65**, 2520.
- [42] K. Kaluarachchi, C.A. Bush, Anal. Biochem., 1989, **179**, 209.
- [43] H. Roth, S. Segal, D. Bertoli, Anal. Biochem., 1965, **10**, 35.
- [44] T. Lipiński, Ch. Jones, X. Lemercinier, A. Korzeniowska-Kowal, M. Strus, J. Rybka, A. Gamian, P. B. Heczko, Carbohydr. Res., 2003, **338**, 605.
- [45] G.J. Gerwig, J.P. Kamerling, J.F.G. Vligenthart, Carbohydr. Res., 1979, **77**, 1.
- [46] K. Leontein, B. Lindberg, J. Lönngren, Carbohydr. Res., 1978, **62**, 359.
- [47] H. Bretting, G. Jacobs, I. Benecke, W. König, J. Thiem, Carbohydr. Res., 1985, **77**, 225.
- [48] J. Heinrich, W.A. König, H. Bretting, P. Mischnick, Carbohydr. Res., 1997, **299**, 1.
- [49] W.S. York, S. Hantus, P. Albersheim, A.G. Darvill, Carbohydr. Res., 1997, **300**, 199.
- [50] A.S. Shashkov, G.M. Lipkind, Y.A. Knirel, N.K. Kochetkov, Magnet. Reson. Chem. 1988, **26**, 735.
- [51] L. Lindqvist, P.E. Jansson, J. Chromatogr. A., 1997, **769**, 253.
- [52] L. Yang, L.M. Zhang, Carbohydr. Polym., 2009, **76**, 349.
- [53] M. Fukuda, F. Egami, G. Hämmerling, O. Lüderitz, G. Bagdian, A.M. Staub, Eur. J. Biochem., 2005, **20**, 438.
- [54] J.H. Pazur, *Carbohydrate Analysis*, M.F. Chaplin, J.F. Kennedy (Red.), Oxford University Press, 1994.

- [55] T.R. Neu, T. Dengler, B. Jann, K. Poralla, *J. Gen. Microbiol.*, 1992, **138**, 2531.
- [56] A.S. Rao, N. Roy, *Carbohydr. Res.*, 1979, **76**, 215.
- [57] J. Ganeshapillai, E. Vinogradov, J. Rousseau, J.S. Weese, A. Monteiro, *Carbohydr. Res.*, 2008, **343**, 703.
- [58] J. Wingender, T.R. Neu, H-C. Flemming, *Microbial Extracellular Polymeric Substances Characterization*, Structure and Function Springer (Red.), 1999.
- [59] S.W. Cui, *Food Carbohydrates Chemistry, Physical Properties, and Applications*, Chapter 3. Structural Analysis of Polysaccharides, S.W. Cui (Red.), CRC, 2005.

Praca wpłynęła do Redakcji 13 czerwca 2016