

**EGZOPOLISACHARYDY BAKTERYJNE
– BUDOWA I FUNKCJE**

**BACTERIAL EXOPOLYSACCHARIDES
– STRUCTURE AND FUNCTIONS**

**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. Egzopolisacharydy

1.1. Biosynteza egzopolisacharydów

1.1.1. Wewnątrzkomórkowa biosynteza egzopolisacharydów

1.1.2. Zewnątrzkomórkowa biosynteza egzopolisacharydów

2. Budowa i zastosowania egzopolisacharydów bakteryjnych

2.1. Ksantan

2.2. Żelan

2.3. Egzopolisacharydy bakterii kwasu mlekowego

2.4. Dekstran

2.5. Bakteryjna celuloza

2.6. Kwas alginowy

2.7. Kwas hialuronowy

2.8. Mannany

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

Exopolysaccharides fulfil protective functions and allow bacteria live in the communities, single or mixed, by facilitating adhesion to surfaces and to each other. Microbes prefer to exist in the form of a biofilm. The term biofilm was introduced in 1978 and is the group of microorganisms surrounded by extracellular, highly hydrated mucus, which allows adhesion on various surfaces and adhesion of cells to each other [1]. The extracellular slime owes its character mainly due to the presence of exopolysaccharides. Bacteria living in biofilms, have a high resistance to external factors, such as changes in temperature, pH, humidity, oxygenation, presence of bacteriocins, antibodies or antibiotics. They may be up to 1,000 times more resistant to antibiotics than planktonic forms. They can be synthesized inside and outside bacteria cell. The structure of the bacterial exopolysaccharide is very diverse, but very often, due to the presence of uronic acid residues, or non-sugar organic acids as pyruvic acid, succinic acid, as well as residues of inorganic acids such as phosphoric acid or sulfuric acid, they are negatively charged particles. In addition, a characteristic of most of the exopolysaccharides (EPS) is their enormous molecular mass of up to several million g/mol [11]. Thanks to its rheological properties, ease of isolation, and often biodegradable antioxidant activity extracellular polysaccharides are increasingly used in industry as a gelling agents, hardening and thickening agents, emulsifiers, food coatings and pharmaceutical products. In addition, they can be used as bandages, anti-cancer agents, cholesterol-lowering, antiulcer or immunomodulators [20–27]. This article discusses in details the selected exopolysaccharides such as xanthan, gellan, exopolysaccharides of lactic acid bacteria, dextran, bacterial cellulose, alginic acid, hyaluronic acid, mannans.

Keywords: exopolysaccharide, hyaluronic acid, bacterial cellulose, dextran, gellan, xanthan

Słowa kluczowe: egzopolisacharydy, kwas hialuronowy, celuloza bakteryjna, dekstran, żelan, ksantan

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

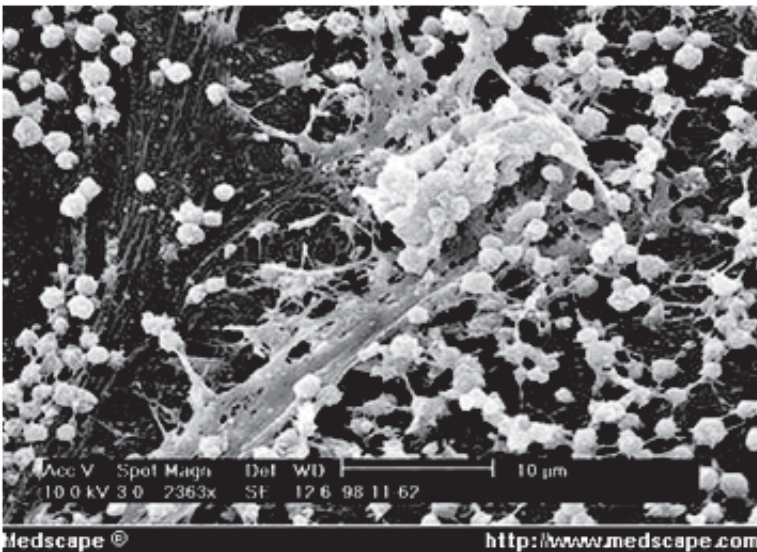
Ac	– acyl
BC	– celuloza bakteryjna (ang. <i>bacterial cellulose</i>)
EPS	– egzopolisacharyd (ang. <i>exopolysaccharide</i>)
Fucp	– fukopiranoza
Gal	– galaktoza
GDP	– guanozynodifosforan (ang. <i>guanosine diphosphate</i>)
Glc	– glukoza
GlcP	– glukopiranoza
GlcA	– kwas glukouronowy
GlcPA	– kwas glukopiranouronowy
GPC	– żelowa chromatografia filtracyjna (ang. <i>gel permeation chromatography</i>)
HA	– kwas hialuronowy (ang. <i>hyaluronic acid</i>)
LAB	– bakterie kwasu mlekowego (ang. <i>lactic acid bacteria</i>)
Lac	– mleczan
L-Gl	– L-glicerynian
LPS	– lipopolisacharyd (ang. <i>lipopolysaccharide</i>)
Man	– mannoza
Manp	– mannopiranoza
Pyr	– pirogronian
Rha	– ramnoza
SEC	– chromatografia wykluczenia (ang. <i>size exclusion chromatography</i>)
Xp	– ksylopiranoza
UDP	– urydynodifosforan (ang. <i>uridindiphosphat</i>)

WPROWADZENIE

Spora część bakterii, zarówno Gram-dodatnich, ujemnych jak i mykobakterii posiada zdolność syntezy pozakomórkowych polisacharydów, które ze względu na stopień związania z powierzchnią komórki dzieli się na polisacharydy otoczkowe (CPS), ściśle związane ze ścianą komórkową oraz egzopolisacharydy (EPS), śluzowe polisacharydy luźno związane z powierzchnią mikroorganizmu. Pozakomórkowe polisacharydy przede wszystkim chronią mikroorganizmy przed działaniem czynników zewnętrznych oraz umożliwiają im życie w skupiskach.

1. EGZOPOLISACHARYDY

Egzopolisacharydy, zwane również polisacharydami śluzowymi (ang. *slime*) w odróżnieniu do polisacharydów otoczkowych luźno przywierają do komórki mikroorganizmu. Polisacharydy śluzowe pełnią funkcje ochronne oraz umożliwiają życie w społecznościach, jedno czy wielogatunkowych, poprzez ułatwienie przylegania do powierzchni oraz do siebie wzajemnie. Poniżej przedstawiono zdjęcie komórek *Staphylococcus aureus* otoczonych pozakomórkowym śluzem.



Rysunek 1. Biofilm *Staphylococcus aureus*, zdjęcie ze skaningowego mikroskopu elektronowego [Janice Carr, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA USA]

Figure 1. *Staphylococcus aureus* biofilm, image from a scanning electron microscope [Janice Carr, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA USA]

Przywykliśmy myśleć o bakteriach jako o pojedynczych, planktonowych formach. Jednakże obserwacje mikroorganizmów w różnych środowiskach pozwa-

lają wysnuć wnioski, iż planktonowe formy bardzo rzadko występują w naturze. Mikroby preferują funkcjonowanie w formie biofilmu. Termin biofilm został wprowadzony już w 1978 roku i oznacza grupę mikroorganizmów, otoczonych zewnątrzkomórkowym, wysoce uwodnionym śluzem, umożliwiającym adhezję do martwych bądź żywych powierzchni oraz przyleganie komórek wzajemnie do siebie [1]. Pozakomórkowy śluz zawdzięcza swoją postać obecności egzopolisacharydów, niejednokrotnie również białek, syntezowanych przez mikroorganizmy. Mikroorganizmy w biofilmie posiadają zdolność porozumiewania się za pomocą chemicznych sygnałów, proces ten nazywany jest *quorum sensing* (QS) [2–6].

Bakterie żyjące w postaci biofilmu, wykazują dużą oporność na czynniki zewnętrzne, takie jak zmiany temperatury, pH, wilgotności, natlenienie, obecność bakteriocynów, przeciwciał czy antybiotyków. Mogą być nawet do 1000 razy bardziej odporne na działanie antybiotyków w porównaniu z formami planktonowymi. Najnowsze badania pokazują, że większość infekcji bakteryjnych jest spowodowana z udziałem biofilmu [7, 8]. Bakterie tworzą biofilmy na rozmaitych powierzchniach od skał, poprzez tkanki organizmów żywych, narzędzia i implanty medyczne, po instalacje wodne czy klimatyzacyjne [9, 10].

Dodatkowo wyrzucanie śluzu przez pory na zewnątrz komórki jest jednym ze sposobów poruszania się bakterii. U *Myxococcus xanthus* pory rozmieszczone są na przeciwnych biegunach komórki. Podczas wyrzucania polimeru węglowodanowego zaobserwowano ruch bakterii w przeciwnym kierunku.

Struktura egzopolisacharydów bakteryjnych jest ogromnie zróżnicowana, aczkolwiek bardzo często, za sprawą obecności reszt kwasów uronowych, lub niecukrowych kwasów organicznych jak pirogronowego, bursztynowego, a także reszt nieorganicznych kwasów, jak na przykład fosforowego czy siarkowego, są to ujemnie naładowane cząsteczki. Dodatkowo cechą charakterystyczną większości EPS-ów jest ich ogromna masa cząsteczkowa sięgająca kilku milionów g/mol [11].

1.1. BIOSYNTeza EGZOPOLISACHARYDÓW

Obecnie w wielu ośrodkach naukowych prowadzi się badania nad technologią otrzymywania mikrobiologicznych polimerów, poprzez optymalizację warunków hodowli, tak aby mikroorganizmy syntetyzowały polisacharydy o zadanych cechach i z wysoką wydajnością. Proces biosyntezy można regulować poprzez zmiany temperatury, odczynu środowiska hodowli, składu pożywki czy natlenienia. Aktywność drobnoustrojów w produkcji egzopolisacharydów jest coraz częściej stymulowana przy użyciu metod inżynierii genetycznej. W celu ingerencji w szlak biosyntezy egzopolisacharydów konieczna jest znajomość jego przebiegu. Obecnie wiadomo, że większość EPS-ów syntetyzowana jest wewnątrz komórki, według bardzo zbliżonego mechanizmu do syntezy polisacharydów ściany komórkowej – LPS-ów czy peptydoglikanu. Jednakże, znany jest również mechanizm biosyntezy egzopolisacharydów zachodzącej pozakomórkowo. Wyjątkami egzopolisachary-

dów syntezowanych poza komórką mikroorganizmu są: dekstran, alternan i lewan [12, 13]. Dodatkowo znajomość szlaku biosyntezy jest bardzo istotna w projektowaniu leków przeciwbakteryjnych. Jak wcześniej wspomniano mikroorganizmy otoczone EPS mogą być do 1000 razy bardziej odporne na działanie antybiotyków w porównaniu z formami planktonowymi, stąd też celowe jest hamowanie biosyntezy EPS-ów u szczepów patogennych.

1.1.1. Wewnątrzkomórkowa biosynteza egzopolisacharydów

Większość egzopolisacharydów powstaje w wyniku wewnątrzkomórkowego szlaku biosyntezy, w którym wyróżnić można cztery główne etapy: transport cukrów do wnętrza cytoplazmy, syntezę cukrowych nukleotydów, polimeryzację jednostek cukrowych oraz eksport polimeru na zewnątrz komórki. W proces syntezy i transportu egzopolisacharydów zaangażowanych jest wiele enzymów, regulowanych przez klaster genów, odpowiedzialnych za aktywację monosacharydów poprzez tworzenie pochodnych nukleotydowych, modyfikacje ich struktury w wyniku epimeryzacji, dekarboksylacji oraz dehydrogenacji, tworzenie oligosacharydowych jednostek, ich polimeryzację i transport na zewnątrz komórki bakteryjnej.

Na uwagę zasługuje fakt, iż pewna część bakterii, przykładowo *Lactobacillus casei* podgat. *cremoris*, posiada geny kontrolujące biosyntezę egzopolisacharydów zlokalizowane na plazmidzie, a nie jak u większości dotąd poznanych bakterii na chromosomie [14]. Wiele pozakomórkowych polisacharydów jest częściowo podstawiona grupami acetylowymi, pirogromianowymi, bursztynianowymi, fosforanowymi, sulfonowymi czy metylowymi. W badaniach nad szlakiem biosyntezy egzopolisacharydu *Klebsiella pneumoniae* wykazano, że grupa acetylowa wywodzi się z acetylokoenzymu A, natomiast prekursorem grupy pirogromianowej jest fosfoenolopirogromian. W O-metylowanych polisacharydach donorem funkcji metylowej jest metionina lub S-adenozylometionina. Obecność reszt kwasu fosforowego(V), występujących w niektórych polisacharydach, jest wynikiem przeniesienia grupy fosforanowej z ATP na grupę hydroksylową cukru [15].

Zrozumienie szlaku biosyntezy EPS może ułatwić przykład ksantanu. Jest to proces niezwykle złożony, w który zaangażowane są nośniki energetyczne. Jego szczegółową prezentację można znaleźć w literaturze [15].

Biosynteza ksantanu przez *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 jest wieloetapowym procesem i ma miejsce w różnych regionach komórki, od cytoplazmy po błonę białkowo-lipidową, przestrzeń peryplazmatyczną i zewnętrzną błonę komórkową. Rozpoczyna się od syntezy prekursorowych cukrowych nukleotydów. Do syntezy prekursorów UDP-glukozy i GDP-mannozy wykorzystywane są geny *xanA* i *xanB* zlokalizowane w innym miejscu chromosomu. Geny te odpowiadają za syntezę cukrowych prekursorów wykorzystywanych również do syntezy LPS-u. Trzeci prekursor UDP-glukouronian powstaje w wyniku utlenienia UDP-glukozy,

regulowanego przez gen *ugd* [15-18]. Proces syntezy ksantanu jest regulowany przez klaster 12 genów, od *gumB* do *gumM*.

Po syntezie cukrowych nukleotydów ma miejsce przeniesienie glukozy-1-fosforanu z UGP-glukozy na nośnikową jednostkę fosforanu undekaprenyłu (C-55-P), gdzie kolejno są dostarczane pozostałe substraty w celu syntezy powtarzającej się pentasacharydowej jednostki budulcowej ksantanu. Po utworzeniu pentasacharydu następuje przyłączenie grup niecukrowych, pirogronianowej i acetylowej. Powyższe etapy zachodzą na wewnętrznej stronie błony cytoplazmatycznej. Następnie ma miejsce przeniesienie pentasacharydowego fragmentu połączonego z nośnikiem lipidowym do przestrzeni peryplazmatycznej przez błonę cytoplazmatyczną, gdzie następuje polimeryzacja fragmentów pentasacharydowych, poprzez redukujący koniec. Finalnym etapem jest transport polisacharydu z przestrzeni peryplazmatycznej na zewnątrz komórki. Proces polimeryzacji i transportu ksantanu na zewnątrz komórki nie jest do końca poznany, aczkolwiek wydaje się być bardzo zbliżony do mechanizmu Wzy-zależnego [Wzy – białko membranowe (polimeraza O-antygenowa), która kontroluje polimeryzację łańcuchów polisacharydowych przez dodawanie kolejnych podjednostek do redukującego końca powstającego polimeru] mającego miejsce podczas syntezy fragmentu O-swoistego lipopolisacharydów *Enterobacteriaceae*.

1.1.2. Zewnątrzkomórkowa biosynteza egzopolisacharydów

Zdecydowanie mniejsza część egzopolisacharydów syntezowana jest poza komórką mikroorganizmu i tak opisanymi w literaturze przykładami są: dekstran, alternan i lewan. Dekstran jest homopolisacharydem, zbudowanym z reszt D-glukopiranozy, połączonych wiązaniem glikozydowym $\alpha(1\rightarrow6)$, często rozgałęzionym w pozycji 3, rzadziej w 2 i 4. Dekstran jest syntezowany przez Gram-dodatnie bakterie *Leuconostoc mesenteroides*, przy użyciu dekstranosacharazy (glukozylotransferazy), katalizującej rozpad wiązania glikozydowego w cząsteczce sacharozy, a następnie przenoszącej glukozę na redukujący koniec powstającego dekstranu. Energia potrzebna do procesu syntezy polimeru powstaje z rozpadu wiązania glikozydowego w cząsteczce sacharozy.



Alternan jest egzopolisacharydem produkowanym również przez bakterie z gatunku *Leuconostoc mesenteroides*. Podobnie do dekstranu zbudowany jest z reszt D-glukopiranozy, aczkolwiek połączone są one na przemian wiązaniami $\alpha(1\rightarrow6)$ i $\alpha(1\rightarrow3)$. Formowanie alternanu zachodzi w obecności alternanosacharazy, analogicznie jak w przypadku dekstranu. Przypuszcza się, że alteranosacharaza jest wynikiem translacji zmutowanej sekwencji genu oryginalnie kodującego dekstranosacharazę.

Kolejnym przykładem pozakomórkowo wytwarzanego z sacharozy egzopolisacharydu jest lewan – β -2,6-fruktan syntezowany między innymi przez bakterie Gram-dodatnie z rodzaju *Bacillus*, *Streptococcus* oraz Gram-ujemne z rodzaju *Erwinia* i *Gluconobacter*. Enzymem umożliwiającym przemianę sacharozy w lewan jest lewanosacharaza, katalizująca hydrolizę sacharozy oraz przeniesienie D-fruktozy na powstający łańcuch lewanu i jej przyłączenie poprzez wiązanie β -2,6-glikozydowe [12, 19].

sacharoza \rightarrow lewan + D-glukoza

2. BUDOWA I ZASTOSOWANIA EGZOPOLISACHARYDÓW BAKTERYJNYCH

Egzopolisacharydy bakteryjne spełniają wiele funkcji, od ochrony mikroorganizmów przed czynnikami zewnętrznymi takimi jak: zmiany temperatury, wilgotności, odczynu czy obecności substancji toksycznych, poprzez umożliwianie adhezji i formowania biofilmu, stabilizowanie enzymów oraz magazynowanie składników pokarmowych. Dzięki swym właściwościom reologicznym, łatwości izolowania, biodegradowalności oraz często aktywności przeciwutleniających pozakomórkowe polisacharydy znajdują coraz szersze zastosowanie w przemyśle jako substancje żelujące, utwardzające i zagęszczające, emulgatory, powłoki produktów spożywczych i farmaceutycznych. Dodatkowo próbuje się je wykorzystywać jako opatrunki, środki przeciwnowotworowe, obniżające poziom cholesterolu, przeciwwrzodowe czy immunomodulatory [20–27]. Przykładami bakteryjnych egzopolisacharydów o szerokim zastosowaniu przez człowieka są: bakteryjna celuloza, ksantan, żelan, dekstran, kwas alginowy, kwas hialuronowy czy egzopolisacharydy bakterii fermentacji mlekowej (LAB). Przykłady zastosowań zestawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Zastosowania wybranych egzopolisacharydów bakteryjnych [12, 28, 29]
Table 1. Applications of selected bacterial exopolysaccharides [12, 28, 29]

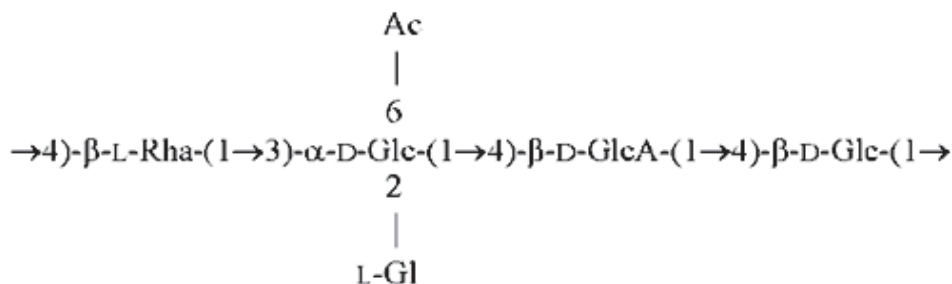
Egzopolisacharyd	Zastosowanie	Bakterie
Celuloza	Materiał opatrunkowy, tzw. sztuczna skóra, membrana akustyczna w sprzętach audio, dodatek do żywności (bakteryjny błonnik), membrana w technikach separacyjnych	<i>Acetobacter xylinum</i> (<i>Gluconacetobacter xylinum</i>)
Ksantan	Środek stabilizujący, zagęszczający, żelujący (w połączeniu z gluko-mannanem) w przemyśle spożywczym, kosmetycznym, farmaceutycznym, w drukarstwie	<i>Xanthomonas campestris</i>

Egzopolisacharyd	Zastosowanie	Bakterie
Żelan	Środek żelujący, stabilizujący w przemyśle spożywczym, kosmetycznym farmaceutycznym, biomedycznym, substytut agaru w hodowlach bakterii termofilnych, nośnik leków	<i>Sphingomonas elodea</i>
EPS-y bakterii kwasu mlekowego	Środki poprawiające reologię i teksturę oraz zapobiegające synerdzie produktów mlecznych	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
Dekstran	Preparat krwiozastępczy, poprawiający krążenie, obniżający poziom cholesterolu, lubrykant, sito molekularne i wzorzec masy w chromatografii	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Leuconostoc dextranicum</i>
Alginy	Składniki hipoalergicznymi preparatów opatrunkowych, powłoka ochronna sadzonek, powłoki nawozów, pestycydów, matryca stabilizująca do przechowywania żywych komórek i enzymów	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Azotobacter vinelandii</i>
Kurdlan	Środek wiążący, żelujący, stabilizujący, zagęszczający, usztywniający	<i>Agrobacterium radiobacter</i> , <i>Agrobacterium biohar</i>
Kwas hialuronowy	Środek nawilżający oczy oraz stawy, wypełniający zmarszczki i blizny, powłoka implantów, składnik kosmetyków	<i>Streptococcus zooepidemicus</i> , <i>Pasturella multocida</i>

Struktury oraz zastosowanie wybranych egzopolisacharydów bakteryjnych przedstawiono w dalszych podrozdziałach.

2.1. KSANTAN

Ksantan jest głównym, komercyjnie dostępnym egzopolisacharydem. Od 1969 roku jest zarejestrowany przez FDA (ang. *Food and Drug Administration*) jako bezpieczny dodatek do żywności – E415. Pod względem budowy chemicznej jest rozgałęzionym heteropolisacharydem syntezowanym przez większość szczepów *Xanthomonas campestris*. Składa się z reszt D-glukopiranozy połączonych wiązaniem $\beta(1\rightarrow4)$, z których co druga podstawiona jest resztą trisacharydową, zbudowaną z dwóch reszt D-mannopiranozy i jednej reszty kwasu D-glukouronowego. Końcowa reszta mannozy podstawiona jest, w pozycji 4 i 6, resztą kwasu pirogronowego. Masa molowa ksantanu jest rzędu około $0,9\text{--}2,0 \times 10^6$ g/mol [30–32].



Rysunek 3. Struktura jednostki powtarzalnej żelanu
 Figure 3. Structure of repeating unit of gellan

Żelan, dzięki unikalnym właściwościom reologicznym znalazł zastosowanie w przemyśle spożywczym, kosmetycznym, farmaceutycznym oraz biomedycznym jako środek żelujący, zagęszczający i stabilizujący – E418. Wykorzystywany jest, między innymi, jako nośnik leków, umożliwiający powolne uwalnianie substancji czynnych. Właściwości żelujące żelanu zależą od stężenia, temperatury, obecności jedno- i dwuwartościowych kationów, jednak głównie od stopnia O-acetylowania. Wysoce acetylowany polimer tworzy delikatne, elastyczne, termoodwracalne żele, natomiast forma odacetylowana daje żele twarde, kruche i nieelastyczne [34, 39, 40].

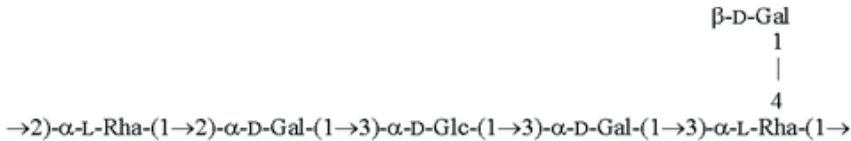
2.3. EGZOPOLISACHARYDY BAKTERII KWASU MLEKOWEGO

Wiele bakterii kwasu mlekowego (LAB) wykorzystywana jest w przetwórstwie mleczarskim w celu otrzymania danego produktu, poprawienia konsystencji czy konserwacji poprzez zakwaszenie. Jedną z bakterii kwasu mlekowego jest *Streptococcus thermophilus* THS, szeroko stosowana w mleczarstwie w procesie fermentacji. Dla przykładu razem z *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* jest używana do produkcji jogurtów oraz niektórych twardych serów.

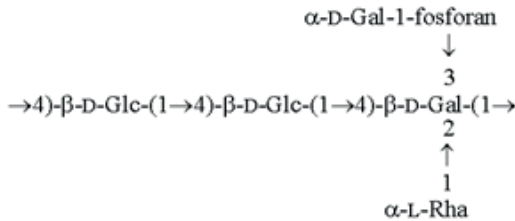
Przydatność *S. thermophilus* nie wynika tylko z możliwości zakwaszania produktów mlecznych, ale również możliwości syntezowania egzopolisacharydów. Pozakomórkowe polisacharydy poprawiają właściwości reologiczne produktów fermentacji (konsystencję) i zmniejszają podatność na synerezę (wydzielania się osrodka dyspersyjnego z żelu, przykładowo wydzielanie się serwatki z kwaśnego mleka). Wpływ na właściwości reologiczne egzopolisacharydów ma: skład chemiczny, sposób połączenia reszt cukrowych (pozycja wiązania glikozydowego), obecność łańcuchów bocznych i podstawników niecukrowych oraz długość polisacharydu. Cechą charakterystyczną egzopolisacharydów bakterii kwasu mlekowego, jest to, że w większości zbudowane są z reszt D-galaktopiranozy, D-glukopiranozy i L-ramnopiranozy. Kilka przykładowych struktur powtarzających się jednostek EPS-ów zamieszczono na Rysunku 4. I tak egzopolisacharyd syntezowany przez *S. thermophilus* Sfi12, zawierający wiązania glikozydowe o konfiguracji α jest bar-

dziej elastyczny, giętki niż śluzowaty polisacharyd *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* B40, gdzie reszty cukrowe połączone są wiązaniami β glikozydowymi. Częściowe usunięcie łańcuchów bocznych z egzopolisacharydów *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* B39 i B891 zmniejszyło właściwości zagęszczające tych polimerów. Porównanie pozakomórkowych polisacharydów o identycznej strukturze pierwszorzędowej wykazało, że egzopolisacharyd *S. thermophilus* Sts o masie cząsteczkowej około $3,7 \times 10^6$ g/mol jest zdecydowanie bardziej lepki od syntezowanego przez *S. thermophilus* Rs polisacharydu o mniejszej masie cząsteczkowej rzędu $2,6 \times 10^6$ g/mol [41–43].

Poza właściwościami głównie teksturotwórczymi obserwuje się jeszcze inny rodzaj korzyści z wytwarzania egzopolisacharydów przez LAB, a mianowicie EPS-y pozostają dłużej w przewodzie pokarmowym, przez co umożliwiają kolonizację bakteriom probiotycznym. Dodatkowo wykazano działanie przeciwnowotworowe, immunostymulujące oraz obniżające poziom cholesterolu EPS-ów bakterii kwasu mlekowego.

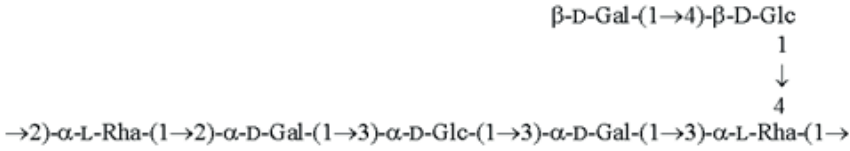
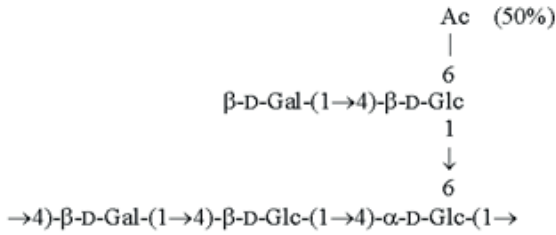
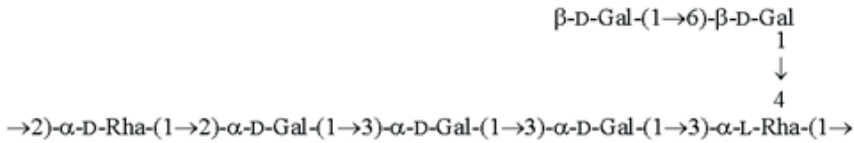


Streptococcus thermophilus Sfi12

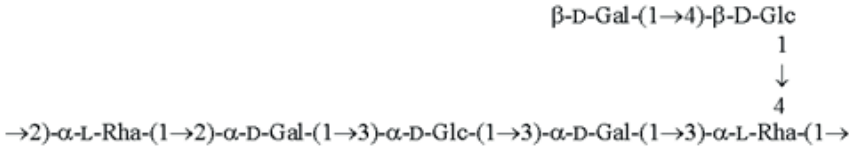
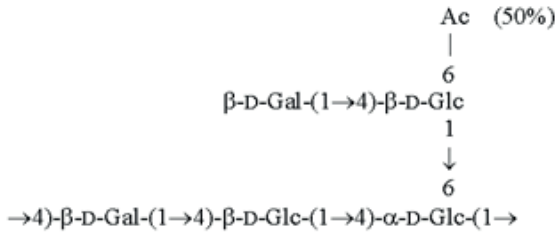
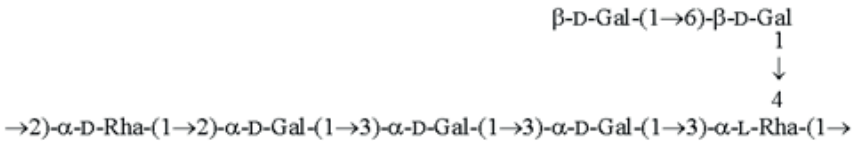


Lactococcus lactis B40

Rysunek 4. Struktury wybranych egzopolisacharydów bakterii kwasu mlekowego [41–43]
Figure 4. Structures of selected exopolysaccharides of lactic acid bacteria [41–43]

*Lactococcus lactis B39**Lactococcus lactis B891**Streptococcus thermophilus Sts i Rs*

Rysunek 4. Ciąg dalszy
Figure 4. Continuation

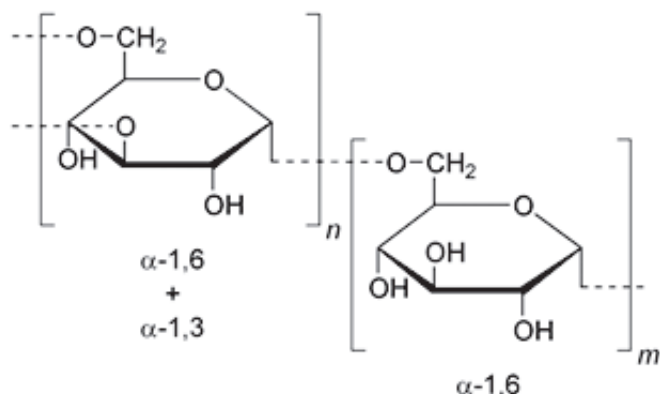
*Lactococcus lactis B39**Lactococcus lactis B891**Streptococcus thermophilus Sts i Rs*

Rysunek 4. Ciąg dalszy
Figure 4. Continuation

2.4. DEKSTRAN

Stosowanym na szeroką skalę egzopolisacharydem, produkowanym również przez bakterie kwasu mlekowego należące do gatunku *Leuconostoc mesenteroides* oraz *Leuconostoc dextranicum*, jest dekstran. Ze względu na specyficzne zastosowania zasługuje na oddzielne omówienie. Jak wspomniano wcześniej, dekstran

jest α -D-glukanem, w którym reszty cukrowe połączone są wiązaniem glikozydowym $\alpha(1\rightarrow6)$, często rozgałęzionym w pozycji 3, rzadziej w 2 i 4 wiązaniem α -glikozydowymi.

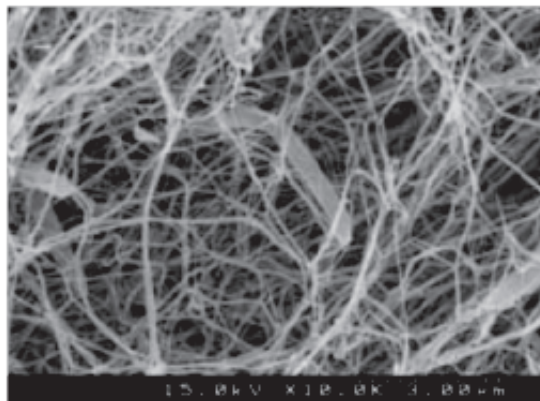


Rysunek 5. Przykładowa struktura dekstranu
Figure 5. Structural model of dextran

Główne zastosowanie znalazł w medycynie jako preparat krwiozastępczy, nośnik w szczepionkach, składnik roztworu do przechowywania organów w transplantologii oraz szeroko stosowany lubrykant. W przemyśle laboratoryjnym dekstran wykorzystuje się jako wypełnienie w chromatografii wykluczania, nazywanej również sączeniem molekularnym (ang. *Size Exclusion Chromatography*, SEC, ang. *Gel Permeation Chromatography*, GPC) oraz jako wzorzec masy cząsteczkowej [34].

2.5. BAKTERYJNA CELULOZA

Celuloza, czyli $\beta(1\rightarrow4)$ -D-glukan jest najpowszechniej występującym polimerem na ziemi. Stanowi główny składnik roślinnej biomasy, aczkolwiek jest również syntezowana przez bakterie (ang. *bacterial cellulose*, BC), głównie Gram-ujemne z rodzaju *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* i *Sarcina*. Najbardziej wydajnym i najszerzej wykorzystywanym producentem bakteryjnej celulozy jest *Acetobacter xylinum* (w 1998 roku został zaklasyfikowany do odrębnego rodzaju *Gluconacetobacter*, przyjmując nazwę *Gluconacetobacter xylinum*). Łańcuchy bakteryjnego β -D-glukanu łączą się w procesie krystalizacji w mikrofibryle o szerokości 40–120 nm, grubości rzędu 3–4 nm i długości 1–9 μ m. Mikrofibryle BC są co najmniej sto razy cieńsze niż w celulozie roślinnej. Dodatkowo BC posiada wysoki wskaźnik krystaliczności (60%), natomiast stopień polimeryzacji wynosi zazwyczaj 2000–6000. Poniżej zamieszczono fotografię, na której wyraźnie widoczne są włókna celulozy otaczające komórki *Gluconacetobacter xylinum*.



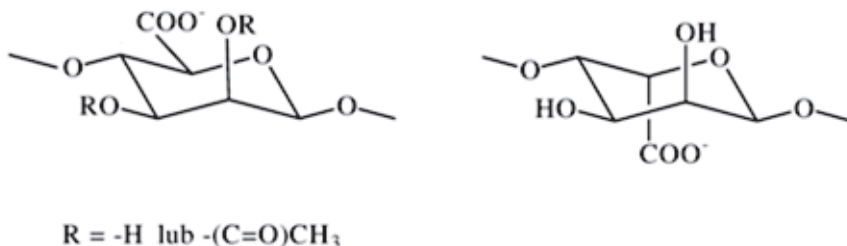
Komórki *Gluconacetobacter xylinum* otoczone celulozą, zdjęcie ze skaningowego mikroskopu elektronowego [44]
Gluconacetobacter xylinum cells surrounded by cellulose, image from a scanning electron microscope [44]

W zależności od zastosowanej metody hodowli bakterii, produkt celulozowy może być wytwarzany w formie płata o dowolnej powierzchni, rurek o zróżnicowanej średnicy, kulek czy pulpy. Silne uwodnienie (do 97%) płatów celulozowych sprawia, że przypominają one napęczniałą skórę o bardzo gładkiej powierzchni, stąd też często nazywa się je sztuczną skórą. Bakteryjna celuloza cechuje się wyjątkową czystością, nie towarzyszą jej inne substancje, jak ligniny czy hemicelulozy, charakterystyczne dla celulozy roślinnej, co znacznie upraszcza proces produkcji. W przypadku celulozy roślinnej produkcja wiąże się z wytwarzaniem przez fabryki bardzo dużej ilości produktów skażających środowisko naturalne. Charakterystyczne cechy celulozy bakteryjnej to wysoka elastyczność, krystaliczność oraz ogromna wytrzymałość mechaniczna. W ostatnich latach obserwuje się intensywny wzrost zainteresowania bakteryjną celulozą. Dotychczas znalazła ona zastosowanie głównie jako materiał opatrunkowy, szczególnie przydatny w leczeniu trudno gojących się ran. Opatrunek z bakteryjnej celulozy cechuje się wysoką czystością, elastycznością, wytrzymałością, porowatością, a także przepuszczalnością dla gazów, co uniemożliwia rozwój bakterii beztlenowych w miejscach nim zabezpieczonych. Jednocześnie materiał ten jest nieprzepuszczalny dla drobnoustrojów z zewnątrz i chroni ranę przed wtórną infekcją. Błony BC chronią również organizm przed utratą płynów ustrojowych poprzez zabezpieczenie pozbawionych skóry powierzchni ciała, co ma ogromne znaczenie dla chorych leczonych z powodu rozległych oparzeń. BC znajduje również zastosowania w mikrochirurgii jako sztuczne naczynia krwionośne [45–49].

2.6. KWAS ALGINOWY

Kwas alginowy jest liniowym egzopolisacharydem syntezowanym przez brunatnice (*Macrocystis*, *Laminaria*) oraz bakterie: *Azotobacter vinelandii* i *Pseudomonas*

aeruginosa. Jego masa molowa jest rzędu 10–1000 3 g/mol. Zbudowany jest z reszt kwasów uronowych: β -D-mannopiranouronowego (M) i α -L-gulopiranouronowego (G) połączonych wiązaniem $\beta(1\rightarrow4)$. Reszta kwasu mannopiranouronowego może być częściowo O-acetylowana w pozycji 2 i 3 (Rys. 6). Przypuszcza się, że grupy acetylowe podstawiające resztę kwasu mannopiranouronowego zapobiegają epimeryzacji do kwasu gulopiranouronowego [50]. W zależności od mikroorganizmu syntezującego ten egzopolisacharyd i warunków zewnętrznych stosunek ilości reszt obu kwasów jak i ich sekwencja są zmienne.



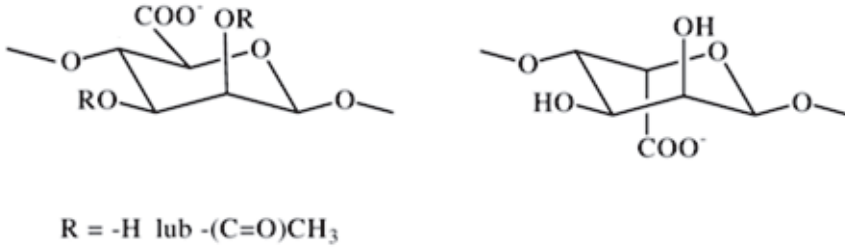
Rysunek 6. Struktura reszt kwasów manno- i gulopiranouronowego
Figure 6. Structure of manno- and gulopyranuronic acids

Właściwości kwasu alginowego ściśle zależą od stosunku M/G i tak im więcej reszt G tym tworzy się sztywniejszy żel. Wykazano również, że reszty G silniej wiążą się z kationami magnezu niż reszty M.

Dzięki właściwościom reologicznym kwas alginowy oraz jego sole –alginiany stosuje się jako: zagęszczacze żywności, leki w chorobach układu pokarmowego, impregnaty tkanin, składniki opatrunków do ran oraz w drukarstwie. W produktach spożywczych oznaczane są symbolami od E-400 do E-404 [33, 51–53].

2.7. KWAS HIALURONOWY

Kwas hialuronowy (HA) jest liniowym, wysokocząsteczkowym polisacharydem zbudowanym z reszt 2-acetamido-2-deoksy-D-glukopiranozy i kwasu D-glukopiranouronowego, połączonych odpowiednio wiązaniami $\beta(1\rightarrow4)$ i $\beta(1\rightarrow3)$, (Rys. 7). HA posiada bardzo dobre właściwości hydrokoloidalne, podaje się, że 1 g może wiązać około 6 litrów wody [28, 54].

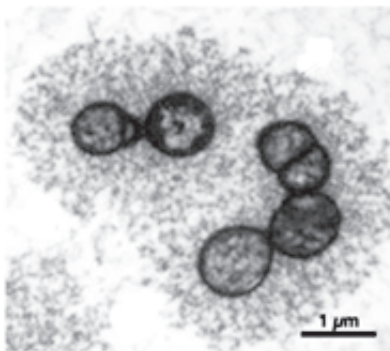


Rysunek 7. Powtarzająca się jednostka budulcowa kwasu hialuronowego
 Figure 7. Repeating unit of *hyaluronic acid*

Kwas hialuronowy jest jednym z głównych składników międzykomórkowego płynu maziowego skóry, przestrzeni stawowych, pępowiny, ciała szklistego oka. W największej ilości występuje w mazi stawowej i skórze. Jest również polisacharydem o najwyższej masie cząsteczkowej, rzędu kilku milionów g/mol, syntezowanym przez kręgowce.

Kwas hialuronowy znalazł szerokie zastosowanie w medycynie, kosmetyce, jak również w przemyśle spożywczym. Przykładowo stosowany jest w ortopedii w chorobach zwyrodnieniowych stawów, w okulistyce do produkcji soczewek oraz jako składnik kropli nawilżających, w ginekologii i urologii do wzmacniania ściany pęcherza moczowego, w medycynie estetycznej do redukcji blizn i zmarszczek. Coraz częściej stanowi również materiał pokrywający protezy [55].

HA do celów komercyjnych do niedawna był głównie otrzymywany z grzebieni kogucich, aczkolwiek jest to metoda czasochłonna, trudna w oczyszczaniu i odpadotwórcza. W ostatnich latach odchodzi się od substancji pochodzenia zwierzęcego i w tym wypadku próbuje się, z powodzeniem, izolować kwas hialuronowy z hodowli bakteryjnych [56]. Między innymi szczepy bakterii z gatunku *Streptococcus zooepidemicus*, *Streptococcus thermophilus* oraz *Pasturella multocida* w warunkach naturalnych wytwarzają pozakomórkowo kwas hialuronowy o identycznej strukturze jak występujący w organizmach wyższych. Jest to egzopolisacharyd bezpieczny dla organizmu ludzkiego, praktycznie niewywołujący reakcji immunologicznej [57, 58]. Poniższe zdjęcie przedstawia kolonię *Streptococcus zooepidemicus* otoczoną kwasem hialuronowym.



Komórki *Streptococcus zooepidemicus* otoczone kwasem hialuronowym [59]
Streptococcus zooepidemicus cells surrounded by hyaluronic acid [59]

2.8. MANNANY

Mannany są wielkocząsteczkowymi cukrami zbudowanymi z reszt mannozy, połączonych wiązaniem glikozydowym. Mogą zawierać reszty innych cukrów, najczęściej D-glukozy, 2-acetamido-2-deoksy-D-glukozy, D-galaktozy, D-ksylozy czy też składniki niecukrowe takie jak grupy fosforanowe, siarczanowe, pirogronianowe oraz białka. Zidentyfikowano zarówno mannany liniowe, jak i rozgałęzione, o regularnej i nieregularnej budowie, o konfiguracji wiązań glikozydowych α i β .

Źródła mannozowych polimerów w przyrodzie są cały czas intensywnie badane. Zidentyfikowano mannany syntezowane zarówno przez organizmy prokariotyczne jak i eukariotyczne, stąd też ze względu na pochodzenie można wyróżnić mannany bakteryjne, grzybowe, czy roślinne.

Mannany są istotnym czynnikiem stymulującymi układ odpornościowy gospodarza, wykazują bardzo szerokie spectrum właściwości immuno- i chemioterapeutycznych. Stwierdzono również ich działanie fitotoksyczne. Dodatkowo, dzięki swym własnościom reologicznym znajdują zastosowanie jako substancje żelujące, stabilizujące, filmotwórcze, głównie w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym.

Mannany bakteryjne nie są tak popularne jak grzybowe czy roślinne, aczkolwiek również wśród tych prokariotycznych mikroorganizmów znajduje się przedstawiciele syntetyzujących mannozowe polimery. Najbardziej powszechne jest występowanie mannanów w strukturach powierzchniowych bakterii z rodziny *Mycobacteriaceae*. Jak wspomniano wcześniej mykobakterie charakteryzują się unikatową strukturą osłon komórkowych. Mykobakterie (prątki) wywołują jedne z najpoważniejszych schorzeń – gruźlicę (*Mycobacterium tuberculosis*) i trąd (*Mycobacterium leprae*). W skład ściany komórkowej mykobakterii wchodzi między innymi lipoarabinomannan, lipomannan. Natomiast arabinomannan i mannan są głównymi antygenami polisacharydowymi otoczki mykobakterii. Mannany mykobakterii zbudowane są głównie ze szkieletu mannozowego połączonych wiązaniami

glikozydowymi $\alpha(1\rightarrow6)$ rozgałęzionego resztami mannozyłowymi połączonymi poprzez wiązania $\alpha(1\rightarrow2)$ [60–62].

Fragmenty mannanowe zostały także zidentyfikowane w lipopolisacharydach, i tak antygen O szczepu bakterii *Hafnia alvei* PCM 1223 jest liniowym mannanem zbudowanym z powtarzającej się pentasacharydowej jednostki z wiązaniami pomiędzy resztami D-mannozyłowymi $\alpha(1\rightarrow2)$ i $\alpha(1\rightarrow3)$ (Rys. 8). Identyczne struktury antygenów O posiadają bakterie szczepów *Escherichia coli* O9 i *Klebsiella pneumoniae* O3, jednakże cząsteczki lipopolisacharydów tych bakterii nie są takie same, różnią się strukturą regionu rdzeniowego [63].



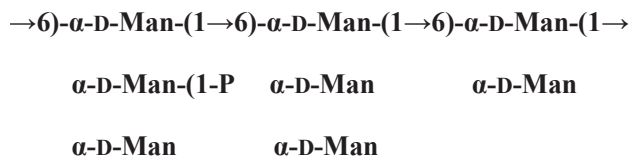
Rysunek 8. Struktura powtarzającej się jednostki antygeny O *Hafnia alvei* PCM 1223
Figure 8. Structure of repeating unit of O *Hafnia alvei* PCM 1223 antigen

Interesującym mannanem, wcześniej nie zidentyfikowanym, jest egzopolisacharyd bakterii *Inquilinus limosus* szczep LMG 20952T, patogenu niedawno wykrytego u pacjentów chorych na mukowiscydozę. Określenie struktury egzopolisacharydów mikroorganizmów związanych z uporczywymi infekcjami dróg oddechowych jest jednym z pierwszych etapów zrozumienia ich roli w patogenezie. Egzopolimer *Inquilinus limosus* szczepu LMG 20952T zbudowany jest z reszt D-mannopiranozy połączonych wiązaniem $\alpha(1\rightarrow2)$, całkowicie podstawionych w pozycji 4 i 6 grupami pirogronianowymi z utworzeniem ketali (Rys. 9) [64].



Rysunek 9. Struktura pozakomórkowego mannanu *Inquilinus limosus*
Figure 9. Structure of extracellular mannann of *Inquilinus limosus*

Jeden z głównych sprawców chorób przyzębia, *Porphyromonas gingivalis* W50, oprócz LPS-u i CPS-u syntetyzuje pozakomórkowy fosfomannan o strukturze bardzo zbliżonej do mannanów grzybowych. Łańcuch główny zbudowany jest z powtarzających się jednostek $\rightarrow 6)-\alpha\text{-D-Man}-(1\rightarrow$, natomiast rozgałęzienia zbudowane są z fragmentów mono- i disacharydowych o jednostce budulcowej $\alpha(1\rightarrow 2)\text{-D-Man}$, pomiędzy jednym z disacharydowych rozgałęzień a łańcuchem głównym występuje wiązanie fosfodiesterowe (Rys. 10) [65].



Rysunek 10. Struktura pozakomórkowego mannanu *Porphyromonas gingivalis* W50
Figure 10. Structure of extracellular mannann of *Porphyromonas gingivalis* W50

UWAGI KOŃCOWE

Prowadzone wspólnie badania struktury egzopolisacharydów bakteryjnych pozwoliły na ich wprowadzenie do wielu gałęzi gospodarki. Za jedną z najważniejszych na pewno należy uznać przemysł spożywczy. Poprawa jakości, w tym i tekstury produktów spożywczych, a także produkcja nowych rodzajów żywności nie byłaby możliwa bez zastosowania polisacharydów. Przy wysokich kosztach izolowania węglowodanów z masy roślinnej i ich przetwarzania do formy użytecznej, na szczególną uwagę zasługuje otrzymywanie tych związków na drodze mikrobiologicznej. Dlatego tak ważne i użyteczne wydaje się poznawanie budowy i własności bakteryjnych egzopolisacharydów. Coraz częściej jako ich źródło zaczyna się również upatrywać mikroflorę.

PODZIĘKOWANIE

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

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J.W. Costerton, G.G. Gessey, K.J. Cheng, *Sci. Am.*, 1978, **238**, 86.
- [2] J.J. Harrison, R.J. Turner, L.L.R. Marques, H. Ceri, *Am. Scient.*, 2005, **93**, 508.
- [3] J.W. Costerton, P.S. Stewart, E.P. Greenberg, *Science* 1999, **284**, 1318.
- [4] B. Vu, M. Chen, R.J. Crawford, E.P. Ivanowa, *Molecules*, 2009, **14**, 2535.
- [5] M. Rivas, M. Seeger, D.S. Holmes, E. Jedlicki, *Biol. Res.*, 2005, **38**, 283.
- [6] D.G. Davies, M.R. Parsek, J.P. Pearson, B.H. Iglewski, J.W. Costerton, E.P. Greenberg, *Science*, 1998, **280**, 295.
- [7] A.L. Spoering, K. Lewis, *J. Bacteriol.*, 2001, **183**, 6746.
- [8] P.S. Stewart, J.W. Costerton, *Lancet*, 2001, **358**, 135.
- [9] I. W. Sutherland, *Microbiology*, 2001, **147**, 3.
- [10] S. Tsuneda, H. Aikawa, H. Hayashi, A. Yuasa, A. Hirata, *FEMS Microbiol. Lett.*, 2003, **223**, 287.
- [11] R. Weiner, S. Langille, E. Quintero, *J. Industr. Microbiol.*, 1995, **15**, 339.
- [12] A. S. Kumar, K. Mody, B. Jha, *J. Basic Microbiol.*, 2007, **47**, 103.
- [13] P.R. Reeves, M. Hobbs, M.A. Valvano, M. Skurnik, C. Withfield, D. Coplin, N. Kido, J. Klena, D. Maskell, C.R.H. Raetz, P.D. Rick, *Trends Microbiol.*, 1996, **4**, 495.
- [14] W.M. De Vos, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1999, **10**, 498.
- [15] F.J. Vorhölter, S. Schneiker, A. Goesmann, L. Krause, T. Bekel, O. Kaiser, B. Linke, T. Patschkowski, C. Rückert, J. Schmid, V. K. Sidhu, V. Sieber, A. Tauch, S.A. Watt, B. Weisshaar, A. Becker, K. Niehaus, A. Pühler, *J. Biotechnol.*, 2008, **134**, 33.
- [16] F. Katzen, D.U. Ferreiro, C.G. Oddo, M.V. Ielmini, A. Becker, A. Pühler, L. Ielpi, *J. Bacteriol.*, 1998, **180**, 1607.
- [17] K. Born, V. Langendorff, P. Boulenger, Xanthan, *Biotechnology of Biopolymers*, John Wiley & Sons, Inc., 2004.

- [18] A. Becker, F.J. Vorhalter, *Xanthan Biosynthesis by Xanthomonas Bacteria: an Overview of Current Biochemical and Genomic Data, Microbial production of biopolymers and polymer precursors: applications and perspectives*, Horizon Scientific Press, 2009.
- [19] A.E. Ghaly, F. Arab, N.S. Mahmoud, J. Higgins, *Am. J. Biotech. & Biochem.*, 2007, **3**, 47.
- [20] C. Zhenming, F. Yan, *Journal of Ocean University of China*, 2005, **4**, 67.
- [21] G.T. Lamothe, L. Jolly, B. Mollet, F. Stingle, *Arch. Microbiol.*, 2002, **178**, 218.
- [22] S.M. Deutsch, H. Falentin, M. Dols-Lafargue, G. LaPointe, D. Roy, *Int. J. Food Microbiol.*, 2008, **125**, 252.
- [23] T.S. El-Tayeb, T.A. Khodair, *J. Appl. Sci. Res.*, 2007, **3**, 1564.
- [24] H. Trommer, R.H.H. Neubert, *Int. J. Pharmaceutics*, 2005, **298**, 153.
- [25] S.N. Aslam, M.A. Newman, G. Erbs, K.L. Morrissey, D. Chinchilla, T. Boller, T.T. Jensen, C. De Castro, T. Ierano, A. Molinaro, R.W. Jackson, M.R. Knight, R.M. Cooper, *Curr. Biol.*, 2008, **18**, 1078.
- [26] P.A. Sanford, I.W. Cottrell, D.J. Pettitt, *Pure Appl. Chem.*, 1984, **56**, 879.
- [27] L. Wang, S. Li, Y. Li, *FEMS Microbiol. Lett.*, 2003, **220**, 21.
- [28] I.W. Sutherland, *Trends Biotechnol.*, 1998, **16**, 41.
- [29] R. Van Kranenburg, I.C. Boels, M. Kleerebezem, W.M. De Vos, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1999, **10**, 498.
- [30] J.A. Casas, V.E. Santos, F. Garcia-Ochoa, *Enz. Microb. Technol.*, 2000, **26**, 282.
- [31] B. Katzbauer, *Polym. Degrad. Stabil.*, 1998, **59**, 81.
- [32] M.J. Lopez, M.C. Vargaz-Garca, F. Suarez-Estrella, J. Moreno, *J. Food Eng.*, 2004, **63**, 111.
- [33] K. Myszka, K. Czaczky, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2004, **4**, 18.
- [34] B. Vu, M. Chen, R.J. Crawford, E.P. Ivanowa, *Molecules*, 2009, **14**, 2535.
- [35] I. Rottava, G. Batesini, M.F. Silva, L. Lerin, D. Oliveira, F.F. Padilha, G. Toniazzo, A. Mossi, R.L. Cansian, M. Luccio, H. Treichel, *Carbohydr. Polym.*, 2009, **77**, 65.
- [36] F. Alvarez-Mancenido, K. Braeckmans, S. De Smedt, J. Demeester, M. Landin, R. Martnez-Pacheco, *Int. J. Pharmaceutics*, 2006, **316**, 37.
- [37] T.M.B. Bresolin M., Milas, M. Rinaudo, F. Reicher, J.L.M.S. Ganter, *Int. J. Biol. Macromol.*, 1999, **26**, 225.
- [38] A. J. Jay, I.J. Colquhoun, M.J. Ridout, G.J. Brownsey, V.J. Morris, A.M. Fialho, J.H. Leitao, I.S. Correia, *Carbohydr. Polym.*, 1998, **35**, 179.
- [39] P.J. Wilson, B.J. Howlin, G.A. Webb, *J. Mol. Struct.*, 1996, **385**, 185.
- [40] A.M. Fialho, L.M. Moreira, A.T. Granja, A.O. Popescu, K. Hoffmann, I. Sa-Correia, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, **79**, 889.
- [41] E.J. Faber, P. Zoon, J.P. Kamerling, J.F.G. Vliegthart, *Carbohydr. Res.*, 1998, **310**, 269.
- [42] E.L. Nordmark, Z. Yang, E. Huttunen, G. Widmalm, *Biomacromolecules*, 2005, **6**, 105.
- [43] A.D. Welman, I.S. Maddox, *TRENDS Biotechnol.*, 2003, **21**, 269.
- [44] S. Bielecki, A. Krystynowicz, M. Turkiewicz, H. Kalinowska, *Bacterial cellulose, Biopolymers*, Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim 2002.
- [45] I.M.G. Martins, S.P. Magina, L. Oliveira, C.S.R. Freire, A.J.D. Silvestre, C.P. Neto, A. Gandini, *Compos. Sci. Technol.*, 2009, **69**, 2163.
- [46] A. Krystynowicz, W. Czaja, A. Wiktorowska-Jeziarska, M. Concalves-Miskiewicz, M. Turkiewicz, S. Bielecki, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, **29**, 189.
- [47] T. Tsuchida, F. Yoshinaga, *Pure & Appl. Chem.*, 1997, **69**, 2453.
- [48] W.G. Haigh, *Biochem. J.*, 1977, **135**, 145.
- [49] S.S. Wong, S. Kasapis, Y.M. Tan, *Carbohydr. Polym.*, 2009, **77**, 280.
- [50] U. Remminghorst, B.H. Rehm, *Biotechnol. Lett.*, 2006, **28**, 1701.
- [51] N. Schurks, J. Wingender, H.C. Flemming, C. Mayer, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2002, **30**, 105.

- [52] C. Ouwerx, N. Velings, M.M. Mestdagh, M.A.V. Axelos, *Polym. Gels Netw.*, 1998, **6**, 393.
- [53] H. Ertesvåg, S. Valla, *Polym. Degrad., Stab.*, 1998, **59**, 85.
- [54] T.C. Laurent, J.R.E. Fraser, *FASEB J.*, 1992, **6**, 2397.
- [55] A. Ballini, S. Cantore, S. Capodiferro, F.R. Grassi, *Int. J. Med. Sci.*, 2009, **6**, 65.
- [56] J.M. Song, J.H. Im, J.H. Kang, D.J. Kang, *Carbohydr. Polym.*, 2009, **78**, 633.
- [57] N. Izawa, T. Hanamizu, R. Iizuka, T. Sone, H. Mizukoshi, K. Kimura, K. Chiba, *J. Biosci. Bioeng.*, 2009, **107**, 119.
- [58] A. Albersdörfer, E. Sackmann, *Eur. Phys. J. B*, 1999, **10**, 663
- [59] B.F. Chong, L.M. Blank, R. McLaughlin, L.K. Nielsen, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, **66**, 341.
- [60] W.B. Severn, R.H. Furneaux, R. Falshaw, P.H. Atkinson, *Carbohydr. Res.*, 1998, **308**, 397.
- [61] R.H. Furneaux, C.L. Landersjö, J.L. McCullough, W.B. Severn, *Carbohydr. Res.*, 2005, **340**, 1618.
- [62] E. Maes, B. Codeville, L. Kremer, Y. Guérardel, *Glycoconj. J.*, 2007, **24**, 439.
- [63] E. Katzenellenbogen, N.A. Kocharova, G.V. Zatonksy, J. Kübler-Kielb, A. Gamian, S. Shaskov, Y.A. Knirel, E. Romanowska, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2001, **30**, 223.
- [64] Y. Herasimenka, P. Cesutti, G. Impallomeni, R. Rizzo, *Carbohydr. Res.*, 2007, **342**, 2404.
- [65] N. Paramonov, M. Rangarajan, A. Hashim, A. Gallagher, J. Aduse-Opoku, J.M. Slaney, E. Hounsell, M.A. Curtis, *Mol. Microbiol.*, 2005, **58**, 847.

Praca wpłynęła do Redakcji 13 czerwca 2016