

# Rôle des polysaccharides lors de la fixation des métaux lourds par les feuilles de chêne

Autor(en): **Vassileva, E. / Martin, M. / Robin, D.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Archives des sciences et compte rendu des séances de la Société**

Band (Jahr): **49 (1996)**

Heft 1: **Archives des Sciences**

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-740406>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Archs Sci. Genève	Vol. 49	Fasc. 1	pp. 1-10	Avril 1996
-------------------	---------	---------	----------	------------

# RÔLE DES POLYSACCHARIDES LORS DE LA FIXATION DES MÉTAUX LOURDS PAR LES FEUILLES DE CHÊNE

PAR

**E. VASSILEVA\***, **M. MARTIN\*\***, **D. ROBIN\*\*** & **W. HAERDI\*\***

*(Ms soumis le 12.10.1995, accepté le 23.1.1996)*

## ABSTRACT

**Role of polysaccharides in the heavy metal fixation on oak leaves.** – Dried oak leaves on oak trees possess the property of accumulating metals originating from atmospheric fall out and hence they can serve as bioindicators. Oak leaves contain several organic compounds that can bind heavy metals, of which proteins play an an important role in metal binding. This paper describes the role of polysaccharides in metal binding. Polysaccharides were extracted, purified, separated and concentrated by means of ion chromatography. Preliminary studies on the metals bound to these polysaccharides have allowed us to gain some insight as to the way in which they are fixed to the surface of oak leaves.

**Key-words:** Bioindicator, heavy metals, polysaccharides, pectins, oak leaves.

## INTRODUCTION

L'utilisation d'espèces végétales ou animales pour la détection ou l'étude de la répartition des micropolluants présente un grand intérêt. Malgré les nombreuses études sur la bioaccumulation des métaux lourds par les végétaux, la nature de leur fixation demeure encore partiellement inexplicquée, particulièrement pour les végétaux supérieurs. Martin et Robin [1, 2] ont utilisé les feuilles de chêne en tant que bioindicateur vis-à-vis du cadmium, du zinc et du plomb. Lorsqu'elles sont sèches, les feuilles accumulent ces métaux qui y restent bien fixés [3]. Une relation linéaire a été déterminée entre les immissions et les concentrations de métaux dans les feuilles, permettant l'utilisation de ces feuilles de manière quantitative afin de connaître les immissions en un lieu donné.

Selon plusieurs auteurs [4-7] le processus de fixation des métaux se fait essentiellement avec les groupes fonctionnels des parois cellulaires. Dans les cas des algues Green et ses collaborateurs suggèrent une liste des groupes fonctionnels responsables de

---

\* Faculté de chimie, Université de Sofia, Bulgarie.

\*\* Département de chimie Inorganique, Analytique et Appliquée, Université de Genève, 30, quai Ernest-Ansermet, CH-1211 Genève 4.

la fixation des métaux: amines, imizadoles, hydroxylys, carboxylates, thiols et thioethers [8]. Selon d'autres auteurs [9] les sites possibles sont les groupes anioniques des acides polygalacturoniques, la chitine (polymère d'acétylglucosamine), la cellulose et différents monomères des polysaccharides.

Dans son dernier travail, E. Vassileva [10] a montré que les protéines jouent un rôle important dans le processus de fixation des métaux lourds. La faible quantité de protéine (0.2%) restant dans les feuilles de chêne sèches fixent environ 25% du cadmium et 10 à 15% du cuivre.

Les pectines et les hémicelluloses sont parmi les polysaccharides présents dans les parois cellulaires celles qui jouent un rôle constitutif chez les organismes vivants. Ce sont des macromolécules glucosidiques composées principalement par des acides  $\alpha$  D-galacturoniques liés en 1-4 et partiellement estérifiées par du méthanol. Il serait important de déterminer le rôle de leurs groupes fonctionnels, présents dans les feuilles sèches, pour le processus de bioaccumulation des métaux lourds, afin de mieux connaître la nature de la liaison feuille - métal.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes limités à l'étude des composés formés entre les pectines présentes dans les feuilles de chêne et les métaux lourds.

## MÉTHODOLOGIE

### *Enrichissement des feuilles*

Des feuilles réduites en poudre sont mises en contact avec une solution ionique de métal (en excès) à 1 g/l, dans une proportion feuille / solution de 1 à 50. On lave à plusieurs reprises avec de l'eau distillée afin d'éliminer les métaux non fixés. Nous avons choisi de fixer une concentration maximum de métaux afin de pouvoir suivre facilement l'évolution de leurs concentrations tout au long des différentes extractions.

### *Description du schéma d'extraction I des pectines*

*Préparation des parois cellulaires* [11]. Afin de faciliter la compréhension des schémas d'extractions, nous avons appelé S les solides et L les liquides (voir figure 1). Les lipides et les pigments sont extraits au soxhlet à partir de 6 g de poudre de feuilles de chêne enrichies en métal. Les mélanges de solvants suivants sont utilisés successivement: chloroforme - méthanol (2:1) et méthanol - eau (80:20). Après 3 heures d'extraction le résidu [S1] est centrifugé et séché à température ambiante (voir schéma d'extraction). On ajoute à 5 g de ce résidu 200 ml de tampon phosphate pH 7,5 contenant 0,02% d'azide de sodium agissant comme bactéricide. Cette suspension est homogénéisée et on ajoute 100 mg de pronase. Après 9 heures d'hydrolyse à 30°C, le résidu [S2] est centrifugé et retraité 6 heures avec 50 mg de pronase [S3]. Pour amorcer le processus de gélatinisation de l'amidon, le résidu est centrifugé puis chauffé à 95°C dans 400 ml d'eau pendant 5 minutes. La température est abaissée à 50°C et on fait agir

l'amylase pendant 3 heures (1,25 mg d'amylase dans 100 ml de tampon acétate pH 5,6). Le résidu est récupéré par centrifugation et lavé successivement à l'eau, l'éthanol, l'acétone et l'éther. On obtient [S4] solide contenant les parois cellulaires purifiées.

Les surnageants [L2, L3, L4] sont concentrés par lyophilisation. Les polysaccharides solubles dans l'eau sont précipités par de l'éthanol, puis récupérés par centrifugation. Les lavages successifs sont effectués comme dans l'étape précédente. (Fraction 1 des pectines).

#### *Fractionnement des parois cellulaires [12].*

On traite 5 g de parois cellulaires [S4] avec 100 ml d'oxalate d'ammonium 1%, à pH 5, pendant 4 heures à 100°C. Après centrifugation le résidu solide est retraité 3 fois dans les mêmes conditions. Le surnageant [L5] est concentré et précipité avec de l'éthanol, on obtient la fraction des pectines solubles dans l'oxalate d'ammonium (fraction 2).

Le résidu non soluble [S5] est traité à de l'acide oxalique à 0,5%. De la même manière que précédemment (lavages et précipitation à l'éthanol), on obtient la fraction des pectines solubles dans l'acide (fraction 3).

La suite de l'extraction ne figure pas sur le schéma, mais nous l'avons réalisée afin de montrer le rôle mineur de la cellulose et des hémicelluloses pour la fixation des métaux:

Les résidus non solubles dans l'acide oxalique [S6] sont traités 16 heures, à 20°C avec 100 ml de NaOH 10%. On obtient un résidu de cellulose.

Le surnageant est précipité par acidification à pH 5 avec de l'acide acétique glacial. Après centrifugation, on obtient des précipités d'hémicellulose A. On ajoute de l'éthanol au surnageant acidifié afin de précipiter la fraction d'hémicellulose B.

#### *Description du schéma d'extraction II des pectines [13].*

On mélange 2 g de feuilles de chêne avec 100 ml de tampon acétate (0,1 M, pH 4,5). On ajoute 1 mg de polygalacturonase (Sigma Chemical Co. U.S.A., fungal origin) et on incube à 30°C pendant 24 heures. L'enzyme est désactivée par traitement thermique (2 minutes à 100°C). On obtient ainsi selon le schéma d'extraction II, une fraction riche en pectines. (Voir figure 1).

#### *Séparation des protéines par chromatographie d'échange d'ions [14].*

On dilue 0,1 g des fractions de pectines 1, 2 et 3 dans du TRIS - HCl 0,025 M. Ces solutions sont passées sur une colonne échangeuse d'anions de 0,6 ml remplie de DEAE - DE52 (diéthylaminoéthyle - cellulose). On élue avec un gradient de NaCl (0 - 1M) dans du TRIS - HCl 0,025 M à pH 7,5 réalisé avec une pompe péristaltique imposant un débit de 10 ml/h (volume total d'élution: 300 ml). Des volumes de 10 ml sont prélevés avec un collecteur de fractions. Toutes ces séparations sont faites à température ambiante.

**- Extraction I**

1. Etape de délipidation : extraction au soxlet successivement avec  $\text{CHCl}_3 / \text{CH}_3\text{OH}$  et  $\text{CH}_3\text{OH} / \text{H}_2\text{O}$
2. Etape de déprotéinisation avec des protéases en milieu tampon phosphate à pH 7,5
3. Action de l'  $\alpha$ -amylase en milieu acétique à pH 5,6
4. Précipitation des polysaccharides et des protéines dans l'éthanol
5. Extraction avec  $\text{NH}_4\text{C}_2\text{O}_4$  1 %
6. Extraction avec  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  0,5 %

**- Extraction II**

- 4 et 2 idem extraction I
3. Action de la polygalacturonase

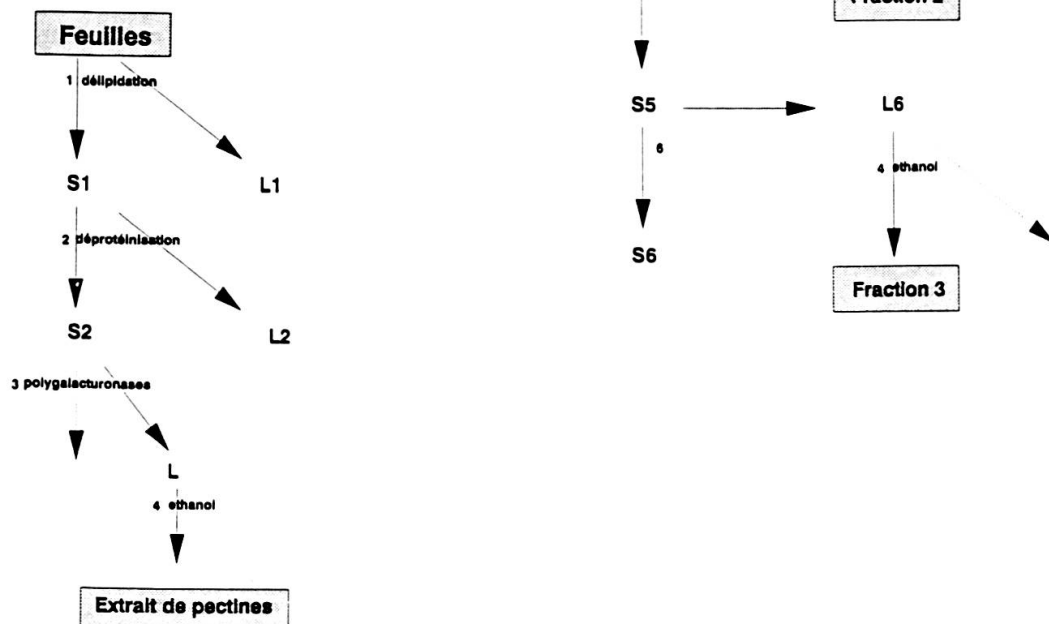


FIG. 1

Description schématique des extractions I et II décrites dans le paragraphe «Méthodologie».

### *Séparation des pectines par chromatographie d'échange d'ions [15, 16].*

Les pectines des fractions 1, 2 et 3 sont purifiées et séparées aussi sur une colonne en verre (10 x 0,8 cm), remplies de DEAE - Sepharose CL-6B sous forme d'acétate (Pharmacia). On dilue 0,1 g dans 10 ml de tampon d'acétate (0,05 M, pH 4,8). Ce volume est passé sur la colonne. On lave avec 100 ml de tampon acétate afin d'éliminer les sucres non fixés, puis on effectue un gradient avec un tampon acétate (pH 4,8 0,05 M - 1 M) pour éluer les sucres fixés. L'élution (350 ml) est réalisée avec une pompe péristaltique imposant un débit de 10 ml/h. Des volumes de 10 ml sont prélevés avec un collecteur de fractions, à température ambiante.

### *Analyses effectuées dans les fractions*

La teneur en métaux est déterminée dans chaque fraction par spectrométrie d'absorption atomique avec flamme (AAF), après extraction à l'acide nitrique concentré.

La concentration totale en protéines est déterminée selon la procédure décrite par Bradford [17], en utilisant comme standard du «bovine serum albumine BSA». Pour chacune des fractions, on a mesuré les absorbances avec un spectrophotomètre UV à 280 nm.

Le contenu total en sucres est déterminé par la méthode de Dubois [18]. Les acides uroniques sont mesurés par une méthode utilisant du carbazole [19], avec l'acide D galacturonique comme standard.

La teneur en sucres neutres a été déterminée par une méthode à l'orsinol [20]. Les corrections nécessaires par rapport aux sucres neutres sont faites par la méthode développée par Sakura [21]. Ces sucres neutres ont aussi été analysés par chromatographie en phase gazeuse sous la forme de leurs acétates d'alditol [22, 23, 24]. Pour cela les fractions de polysaccharides sont hydrolysées avec de l'acide trifluoroacétique 2 M pendant 1 heure à 120°C [25] ou selon la méthode décrite par Saeman [26].

Les mesures du degré d'estérification (DE) nécessitent 2 titrations potentiométriques, l'une donnant le nombre N de charges négatives et l'autre le nombre N' de groupes carboxyliques libres après désestérification [27]. DE est calculée avec la relation suivante:  $DE = N' / (N + N')$ .

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

Des feuilles de chêne enrichies en métaux, contenant 3650 ppm de cuivre ou 1600 ppm de cadmium ont été traitées selon le schéma d'extraction I. A chaque étape d'extraction correspond une proportion de différents composés (monosaccharides, lipides, protéines, pectines, hémicelluloses, cellulose). Les métaux ont été analysés par AAF dans chaque extrait solide et liquide. Nous ne présenterons que les résultats les plus intéressants, permettant de dresser un bilan du fractionnement. Les résultats de ces mesures figurent dans le tableau 1.

TABLEAU 1

Composition des feuilles de chêne (% pondéral), déterminée selon le schéma d'extraction I, avec la distribution du cuivre et du cadmium (%) dans ces différents extraits.

	Composition % pondéral	Cuivre %	Cadmium %
[L1]	17	18	31
Fraction 1	14	29	35
Fraction 2	19	29	19
Fraction 3	8	13	5
[S6]	41	9	10

Les monosaccharides et les lipides ont été regroupés dans une même fraction [L1]. La quantité de métaux liés à cette fraction est loin d'être négligeable, mais elle est inférieure aux quantités fixées sur les pectines (fractions 1, 2 et 3).

La fraction [S6] représentant un pourcentage de 41% par rapport à la masse initiale, est peu complexante vis-à-vis des métaux (10% maximum). Cette fraction contient la cellulose (85%) et les hémicelluloses A et B (3 et 12%). Il est d'ailleurs difficile de déterminer exactement les pourcentages de métaux liés à ces fractions car les pH des solutions extractantes (soude et acide acétique) ne conviennent pas pour effectuer ce genre de détermination.

Par chromatographie d'échange d'ions il a été possible de séparer et de déterminer, dans ces 3 fractions principales, la quantité de métaux fixés sur les protéines ou sur les pectines.

– Un premier passage d'un des extraits sur résine DEAE-Cellulose DE52 permet de fixer les protéines et de garder en solution les autres molécules organiques. Les protéines sont présentes uniquement dans la fraction I. Dans cette fraction, pour le cadmium, la moitié de ce métal est liée aux pectines, le reste étant lié aux protéines. Pour le cuivre, 15% est lié aux protéines, le reste étant lié aux pectines.

– Un second passage sur résine DEAE Sepharose CL-6B, fixant les pectines, permet d'éliminer les protéines restantes ou les autres composés organiques. Nous pouvons alors effectuer l'élution des différents composés et procéder aux analyses des différentes fractions obtenues. Ayant aussi vérifié que les métaux libres ne sont pas retenus sur ces colonnes, nous sommes donc certains que les métaux présents dans une fraction sont bien liés soit aux protéines, soit aux pectines.

Les pectines retenues sur les colonnes remplies de DEAE Sepharose sont éluées avec un gradient linéaire d'acétate de sodium (0,05 - 1 M). Dans chaque fraction, nous avons analysé les métaux et déterminé la concentration en sucre total et en sucres acides. Nous avons appliqué ces techniques aux fractions 1, 2 et 3 de l'extraction I. On obtient ainsi les figures 2 et 3. Les concentrations du cuivre et du cadmium ont été multipliées par 20 et 10 afin de mieux visualiser leurs variations et pour conserver une échelle unique en ordonnées.

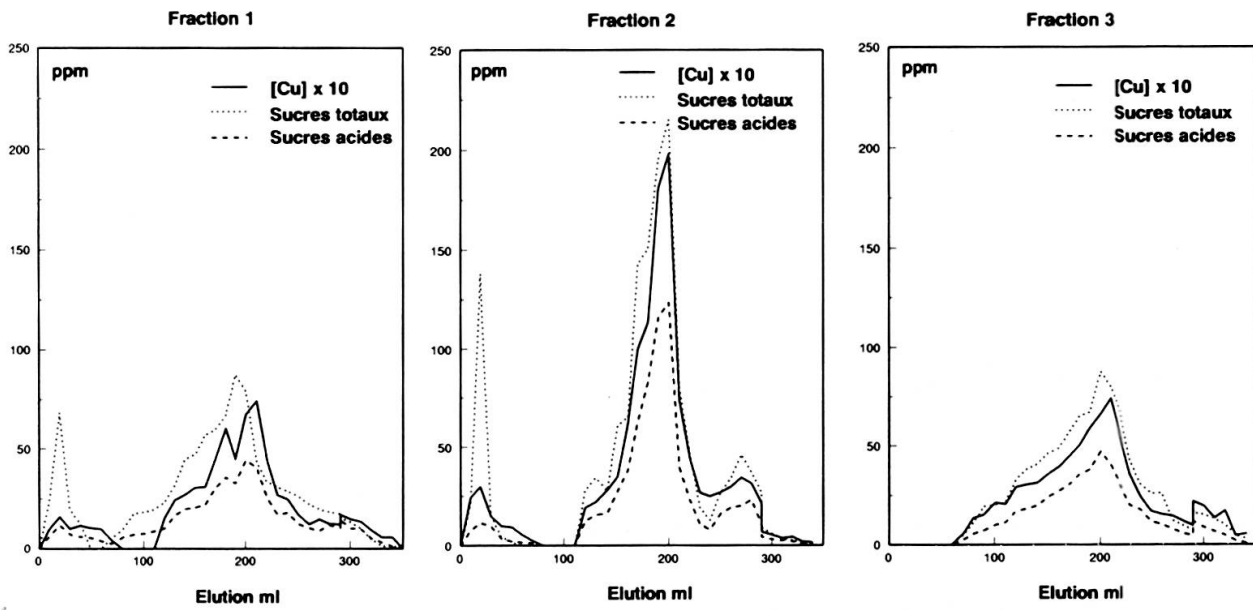


FIG. 2

Chromatographie d'échange d'ions (DEAE - Sepharose CL - 6 B) effectuée sur les fractions 1, 2 et 3 extraites à partir de feuilles de chêne enrichies en cuivre et déprotéinisées. On remarquera la concentration (ppm) en sucre total (.....), celle des acides uroniques (-----) et celle du cuivre (———).

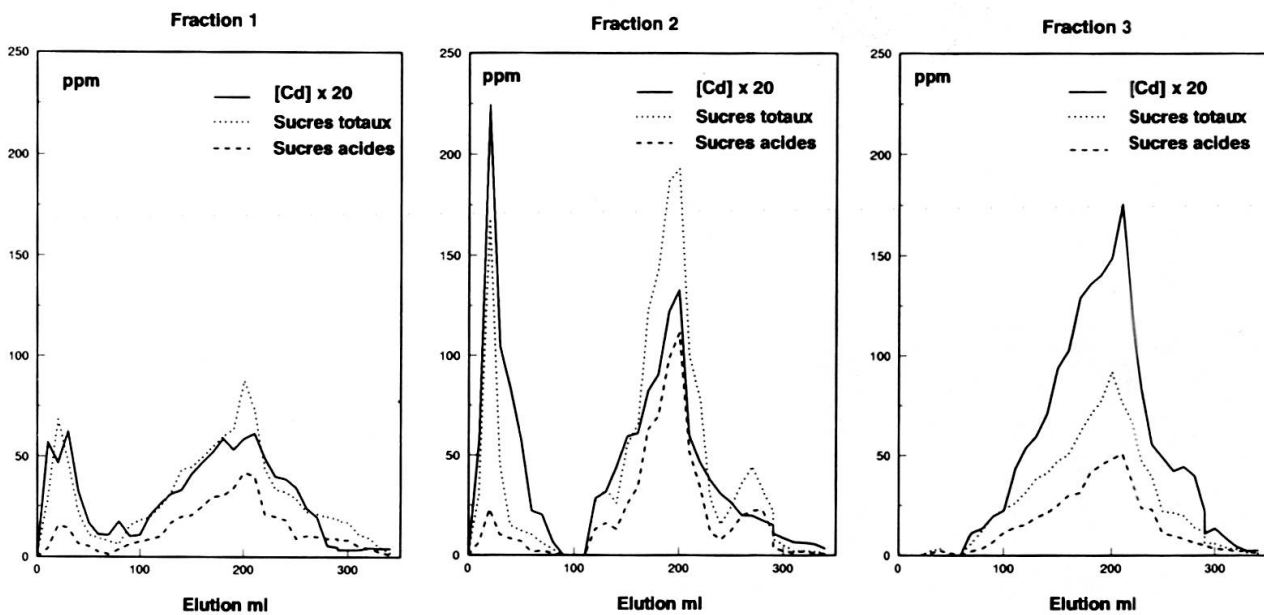


FIG. 3

Chromatographie d'échange d'ions (DEAE - Sepharose CL - 6 B) effectuée sur les fractions 1, 2 et 3 extraites à partir de feuilles de chêne enrichies en cadmium et déprotéinisées. On remarquera la concentration (ppm) en sucre total (.....), celle des acides uroniques (-----) et celle du cadmium (———).



On peut observer que les variations de concentration des métaux suivent celles des acides uroniques (sucres acides) dosés avec la méthode colorimétrique proposée. Ces figures permettent de vérifier la distribution des composés pectiques. Les rendements de ces passages sur colonne varient de 70 à 80%. L'élution des fractions 1 et 2 montrent deux pics :

– Le premier pic correspond à des polysaccharides riches en sucres neutres (le rapport sucres neutres / acides uroniques est d'environ 14). Ce sont probablement des sucres qui ne sont pas liés par liaison covalente au squelette pectique, ils représentent pour les fractions 1 et 2, 7% et 9% de leur poids sec.

– Le second pic correspond à des pectines riches en acides uroniques. L'élution de la fraction 3 montre un seul pic, riche en acides uroniques (dans cette fraction on ne trouve pas de sucres non liés).

Afin de prouver que les métaux sont bien liés aux pectines, nous avons utilisé l'enzyme polygalacturonase (schéma d'extraction II) qui hydrolyse spécifiquement les pectines. Nous avons effectué la même technique chromatographique d'échange d'ions sur ces extraits et présentons les résultats avec la figure 4.

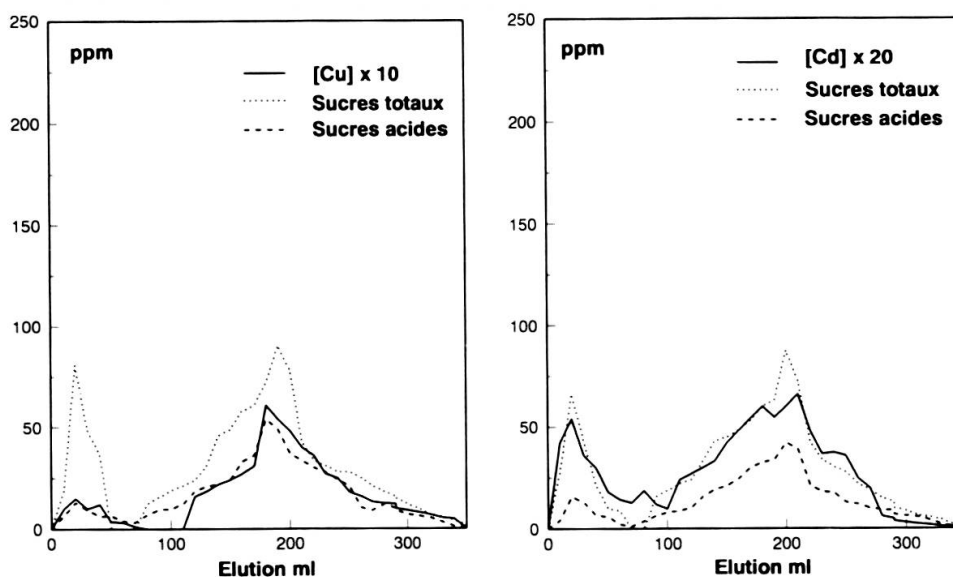


FIG. 4

Chromatographie d'échange d'ions DEAE - Sepharose CL - 6 B) effectuée sur la fraction des pectines extraites selon le modèle d'extraction II à partir de feuilles de chêne enrichies en cadmium et en cuivre. On remarquera la concentration (ppm) en sucre total (.....), celle des acides uroniques (-----) et celle du cadmium (———).

L'allure des 2 chromatogrammes présentés sont comparables à ceux obtenus avec l'extraction I. On remarquera aussi que les concentrations extraites sont plus faibles que celles obtenues précédemment: la quantité de métaux extraits (cuivre 48% et cadmium 20%) après 24 heures d'hydrolyse permettent de confirmer nos résultats. Ces valeurs sont inférieures à celles obtenues pour la somme des fractions 1, 2 et 3, car ces extractions sont moins spécifiques que celle utilisant l'enzyme polygalacturonase.

En mettant en parallèle les quantités de cuivre et de cadmium fixés par rapport aux quantités initiales dans les feuilles, un doute pourrait surgir. En effet les feuilles utilisées contiennent plus de cuivre que de cadmium et l'on peut donc se demander si le fait d'avoir cette proportion de métaux dans les feuilles n'a pas influencé la répartition des métaux fixés sur des sites préférentiels. Afin d'éliminer ce doute, nous avons effectué le même travail avec des feuilles 10 fois moins chargées en métaux (150 ppm de cadmium et 400 ppm de cuivre). Nous avons obtenu pratiquement la même proportion de métaux sur ces feuilles, soit 16% pour le cadmium et 49% pour le cuivre.

Les feuilles exposées naturellement aux immissions contiennent encore 10 à 100 fois moins de métaux. Nous pensons cependant qu'il est possible d'extrapoler le comportement des feuilles chargées en métaux à celles naturelles car la capacité des feuilles à fixer les métaux est énorme et les concentrations utilisées bien loin de la saturation.

### CONCLUSIONS

L'extraction séquentielle des différents constituants des feuilles de chêne et leur fractionnement par chromatographie d'échange d'ions et analyse par absorption atomique nous a permis de mettre en valeur le rôle important des pectines dans le processus de fixation des métaux lourds par les feuilles de chêne.

Il existe d'autres méthodes d'extraction des pectines donnant des rendements supérieurs. Nous avons choisi ces conditions, car notre but est d'extraire le complexe métal-pectines, ce qui impose un pH d'extraction proche de la neutralité.

Il n'a pas été possible de réaliser ce travail avec des feuilles exposées naturellement aux immissions en métaux lourds car ces concentrations sont trop faibles pour être mesurées dans les différents extraits avec une précision suffisante. Dans le cas de feuilles enrichies en métaux, ces pectines peuvent fixer environ 50% du cuivre et 20% du cadmium.

L'usage de la chromatographie en phase gazeuse couplée avec un spectre de masse pourrait apporter des renseignements complémentaires intéressants sur la nature et la composition des différentes pectines extraites.

### RÉSUMÉ

Les feuilles de chêne sèches sur l'arbre ont la propriété d'accumuler des métaux provenant de pollutions atmosphériques et peuvent être utilisées comme bioindicateur. Plusieurs composés organiques présents dans les feuilles, peuvent fixer les métaux. Un travail précédent a montré le rôle important joué par les protéines, celui des polysaccharides est présenté ici. Celles-ci ont été extraites, purifiées, séparées et concentrées au moyen de méthodes chromatographiques d'échange d'ions. L'étude des métaux liés à ces polysaccharides a permis d'étudier dans une première approche leur fixation à la surface des feuilles de chêne.

Mots-clés: Bioindicateur, métaux lourds, polysaccharides, pectines, feuilles de chêne.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] ROBIN, D., MARTIN M. & HAERDI W., *Archs Sci. Genève*, 44, 253-264 (1991).
- [2] MARTIN, M., ROBIN, D. & HAERDI W., *Archs Sci. Genève*, 47, 51-60 (1994).
- [3] MARTIN, M., ROBIN, D. & HAERDI, W., *Trav. Chim. Aliment. Hyg.*, 80, 58-65 (1989).
- [4] CRIST, R. H., OBERHOLSER, K., MCGARRLT, J., CRIST, D.R., JOHNSON, J.K. & BRITTSNA, J. M., *Environ. Sci. Technol.*, 26, 496-502 (1992).
- [5] CRIST, R.H., OBERHOLSER, K., WONG B. & CRIST D.R., *Environ. Sci. Technol.*, 26, 1523-1526 (1992).
- [6] Garnham, G.W., Codd, G.A. & Gadd, G.M., *Environ. Sci. Technol.*, 26, 1764-1770 (1992).
- [7] SKOWRONSKI, T., *Chernosphere*, 15, 69-73 (1986).
- [8] GREEN, B., HOSEA, M., MCPHERSON R., HENZL, M., ALEXANDER, M.D. & DARNALL, D.W., *Environ. Sci. Technol.*, 20, 627-632 (1986).
- [9] CRIST, R.H., OBERHOLSER, K., SHANK, N. & NGUYEN, M., *Environ. Sci. Technol.*, 15, 1212-1217 (1981).
- [10] VASSILEWA, E., MARTIN, M., ROBIN, D. & HAERDI, W., *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, sous presse (1995).
- [11] CARRÉ, B., BRILLOUET, J.M. & THIBAUT, J.F., *J. Agric. Food Chem.*, 33, 285-292 (1985).
- [12] ROMBOOUTS, F.M. & THIBAUT, J.F., *Carbohydrate Research*, 154, 177-187 (1986).
- [13] DEKKER, R.F. & RICHARDS, G.N., *J. Sci. Fd. Agric.*, 23, 475-483 (1972).
- [14] BOLLAG, D.M. & EDELSTEIN, S.J., *Protein Methods*, Wiley-Liss, New York, 90-91 (1991).
- [15] BARBIER, M. & THIBAUT, J.F., *Phytochemistry*, 21(1), 11-115 (1982).
- [16] SAKURAI, N., TANAKA, S. & KURAICHI, S., *Plant Cell Physiol.*, 28(6), 1059-1070 (1987).
- [17] BRADFORD, M.M., *Anal. Biochem.* 72, 248-254 (1976).
- [18] DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERTS, P.A. & SMITH, F., *Anal. Chem.*, 28, 350-356 (1956).
- [19] GALAMBOS, J.T., *Anal. Biochem.*, 19, 119-132 (1967).
- [20] TOOLLIER, M.T. & ROBIN, J.P., *Ann. Technol. Agric.*, 28, 1-15 (1979).
- [21] SAKURAI, N., TANAKA, S. & KURAISHI, S., *Plant Cell Physiol.*, 28, 1051-1058 (1987).
- [22] ENGLYST, H.N. & CUMMINGS, J.H., *Analyst*, 109, 937-942 (1984).
- [23] ENGLYST, H.N., WIGGINS, S. & CUMMINGS, J.H., *Analyst*, 107, 307-318 (1982).
- [24] SAWARDEKER, J.S., SLONEKER, J.H. & JEANES, A., *Anal. Chem.*, 37 (12), 1602-1604 (1965).
- [25] ALBERSHEIM, P., NEVINS, D.J., ENGLISH, P.D. & KAAR, A., *Carbohydrate Research*, 5, 340-345 (1967).
- [26] SAEMAN, J.F., MOORE, W.E., MITCHELL, R.L. & MILLETT, M.A., *TAPPI*, 37, 336-343 (1954).
- [27] GOLDBERG, R., MORVAN, C. & ROLAND, J.C., *Plant Cell Physiol.*, 27(3), 417-429 (1986).