

提升天然产物来源多糖结构研究关键问题概述

殷军艺, 谢明勇, 聂少平*

南昌大学食品科学与技术国家重点实验室 南昌 330047

摘要: 多糖广泛存在于植物、动物和微生物中, 对人类膳食和健康有重要影响, 但由于多糖结构复杂性、结构理论的局限性以及对其生物活性机制认识不到位, 目前多糖研究明显落后于蛋白质。为了促进天然产物来源多糖研究, 本文概述了有关多糖结构研究中存在的关键问题并提出了一些建议, 即应正确判断多糖结构类型、提高多糖制备效率以保证相关研究结果的可重现性、利用以“部分降解-甲基化-NMR”技术为核心手段提高多糖结构表征结果可靠性。更为重要的是, 不应“照搬”有关蛋白质研究的理论和思路, 建立适合于多糖结构分析的理论与方法有利于提升本领域研究水平。

关键词: 多糖; 结构表征; 理论

1. 前言

碳水化合物包含储存型(如淀粉)、结构型(如纤维素、阿拉伯木聚糖、果胶)等类型碳水化合物, 对人类膳食和健康有重要影响。除单糖外, 碳水化合物是单糖以各种类型糖苷键链接形成的化合物。19世纪末, 德国著名科学家 Fischer 就开始简单结构糖类研究^[1], Haworth 等人在 1920-1940 期间开展了大量有关糖环结构的基础研究工作^[2-4], 之后越来越多的科学家加入到糖化学研究领域。正因得益于此, 淀粉、纤维素、甲壳素和透明质酸等碳水化合物得到了极大重视, 并利用各种经典化学方法对其结构开展了诸多研究工作。1962年, Morgan 和 Watkins 报道了一些结构简单的糖对特定血清反应的抑制作用^[5], 表明自然界中的碳水化合物会和蛋白质、脂类共价连接。但直到 1980 年, 糖链结构的测定仍比较困难^[6]。1988 年, 发生了意见在碳水化合物研究历史上非常重要的事, 即牛津大学 Dwek 博士首先提出了“糖生物学(Glycobiology)”这一概念^[7]。之后, 更多科学家认识到了碳水化合物在生命科学中的作用: 如同蛋白质和核酸, 碳水化合物是一类在机体生命活动中非常重要的生物大分子, 参与受精、细胞生长、细

胞-细胞识别、免疫反应、病毒复制和炎症反应等生命活动^[6]。美国加利福尼亚大学知名糖生物学专家 Ajit Varki 博士甚至宣称“Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct”^[8]。

多糖 (Polysaccharide) 通常指 10 个以上单糖通过糖苷键连接在一起形成的长链聚合物, 广泛存在于植物、动物、微生物 (真菌和细菌) 中。近年来, 大量研究报告天然产物来源活性多糖具有免疫调节^[9-12]、肠道菌群调节^[13-16]、抗肿瘤^[17-20]、抗氧化^[21-23]和降血糖^[24-26]等功能, 包括华盛顿大学 Gordon 教授等科学家发现多糖可通过肠道微生态发挥特定生物活性^[13,27-29], 这对多糖生物活性研究是一个巨大贡献。

了解多糖结构有助于阐述其生物活性机制以及发掘新的生物学功能, 除了多糖结构表征中用到的经典化学方法, 科学家们也尝试在其他方面进行努力并有所突破, 如 Edge 等利用“酶阵列”法实现了寡糖序列快速分析^[30]。Rief 等利用原子力显微镜分析葡聚糖 (Dextran) 单分子力谱、测定多糖中的碳与硅原子之间的共价键^[31], 开启了碳水化合物微观结构研究大门。两年后, Venkataraman 等利用 MALDI-MS 结合新型分析系统首次实现了在皮摩尔数量级上对类肝素葡萄糖胺聚糖结构序列进行解析^[32]。离子淌度-质谱连用技术 (Ion mobility-mass spectrometry) 是近些年发展起来的, 现在人们用它可实现对碳水化合物异构体进行识别^[33]。同时, 高级显微技术 (如激光共聚焦显微镜、拉曼光谱) 的发展, 使得在生物体上“原位分析”多糖结构或相互作用成为可能^[34,35]。除此之外, 人们发现溶解性多糖单加氧酶 (Lytic polysaccharide monooxygenase) 氧化降解纤维素、甲壳素等“拮抗性”多糖, 已发出了此多糖类生物质工业化利用的积极信号^[36-40]。

截止目前, 国际上已经成立了诸多碳水化合物或多糖研究中心 (表 1), 但由于多糖结构复杂性、结构理论的局限性以及对其生物活性机制认识不到位, 目前多糖研究明显落后于蛋白质。本文对天然产物来源多糖结构研究中存在的一些关键问题进行了概述, 旨在促进该领域研究。

2. 多糖分离纯化和结构表征的主要研究内容

正如上文所述, 多糖通常由各种单糖通过糖苷键连接而成, 想要精准地表征

多糖结构并非易事，下面几条内容可能对于更好理解多糖结构并进行表征会有帮助。

(1) 为了获得糖含量高、分子量分布窄、电核均一性好的多糖，鼓励综合使用分级沉淀、柱分离等各种分离纯化手段；(2) 多糖一级结构包括相对分子质量、单糖组成、单糖残基的构型和成环类型、糖残基连接方式、主链和支链结构，需要综合利用化学分析和仪器分析进行表征（如表 2 所示）。

3. 多糖分离纯化

天然产物来源多糖通常是细胞壁成分之一，因此有必要通过破壁方式提高多糖提取得率，相应的方法有高温提取、酶法处理、机械破壁等。在提取前，常用乙醇、正己烷回流或浸提法除去脂类、色素。多数情况下，多糖是一类极性大分子，因此可用水、碱液等极性溶剂提取（表 3），有时 DMSO 也会用于杂聚木糖的提取^[41]。多糖提取常用辅助方法有酶法辅助提取^[42,43]、微波辅助提取^[44,45]、超声辅助提取^[46,47]、亚临界水提取^[48,49]和电场辅助提取^[50]等。

经上述方法提取得到的多糖常含有混合物，如色素、单糖、低聚糖、脂类和蛋白质等，透析、膜过滤、有机试剂沉淀和离子交换树脂等方式可以除去这些小分子混合物，此外双氧水是一种较为常用的脱色剂，但可能会造成多糖降解^[51]。多糖中游离蛋白可以利用蛋白酶、Sevag 试剂、三氯乙酸、三氯三氟乙酸等除去。多糖各种分离纯化方法的原理和注意事项，在此之前综述中有过详细论述^[52,53]，因此本文不再详细阐述各种方法的优缺点，仅作简要描述：

(1) 根据不同电荷性质、溶解性以及分子量大小等，粗多糖可针对性地使用各种方法进行分离纯化，需要注意首先应将粗多糖中的中性糖和酸性糖分离，对应的方法有离子交换色谱、十六烷基三甲基溴化铵沉淀法等。对多糖而言，其所带电荷的均一性是一个非常重要指标。之后再利用沉淀法、超滤法和凝胶柱色谱法对不同分子量或尺寸的多糖进一步分离，其中 Sephadex、Sephacryl 和 Sepherose 等是常用凝胶柱色谱填料。

(2) 传统多糖分离纯化流程繁琐、耗时，不容易获得具有良好均一性的生物活性多糖组分，因此人们尝试一些新的方法，诸如双水相体系^[54,55]、三相分配技术^[56,57]、离子液^[58]、径向流层析色谱^[59,60]、对目标生物大分子的特异性吸附技术^[61]等，但仍有很多工作需要推进。

(3) 有时利用不同溶剂依次提取各种多糖, 是一种较好的方式, 例如利用不同的溶剂分别从科科纳果 (*Solanum sessiliflorum* D.) 的果肉和果皮中提取得到了木聚糖、阿拉伯半乳木葡聚糖、葡甘露聚糖^[62]。

4. 多糖结构表征

多糖结构通常很复杂, 例如 RG-II 型果胶有多达 21 种不同类型的糖苷键^[63], 因此多糖结构测定需要综合利用各种化学、仪器分析方法 (表 2) 以及生物学手段, 这些分析方法的详细原理、优点、缺点以及注意事项, 在一些综述中也有过详细介绍与讨论^[53,64,65], 因此本文重点强调如何利用这些方法促进多糖的结构研究。

4.1 多糖“纯度”和分子量

虽然有诸多多糖分子量及其分布测定方法, 多凝胶柱串联合 HPSEC-MALLS-RI-Vis 色谱系统在目前来讲是比较可靠的手段^[66-68]: 1) 通过测定不同分子量标准品保留时间, 建立分子量与相对保留时间的标准曲线, 计算获得样品的分子量信息, 再结合、对比根据多角度光散射信号和示差信号所得到的样品分子量信息, 可获得比较可靠结果; 2) 利用分子量和特性黏度、 R_g 、 R_h 之间的关系, 通过分析样品尺寸、构象形状、相互作用和电荷特性, 有助于判断多糖几何取向是否一致性; 3) 分析结果中包含了常被人们忽略但非常重要的样品回收率信息。

4.2 单糖组成

多糖中常见单糖有果糖、岩藻糖、阿拉伯糖、鼠李糖、木糖、葡萄糖、半乳糖、甘露糖、葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸等^[69], 此外还有一些氨基糖、唾液酸等成分。多数情况下, 多糖需要预先经过甲醇、盐酸、硫酸或三氟乙酸水解, 然后再进行单糖定性、定量分析。单糖组成分析是多糖结构和功能研究基础, 其结果准确性与否, 直接影响到后续甲基化分析、NMR 图谱解析的效率和准确性, 但实际上在多糖结构研究中并没有得到足够重视。多糖中糖苷键酸水解难易程度存在差别, 需要进行水解条件的优化, 尽可能选择低温、低酸浓度的温和条件, 避免水解后产生的单糖受酸和热的作用发生分解、重组反应。同时也应该特别注意水

解效率，即样品回收率情况。在诸多单糖组成分析手段中，离子色谱法由于不需要对样品水解后再衍生，因此是一种比较理想的检测手段^[70]。

4.3 精细结构表征

多糖链结构，除了上述单糖组成和分子量测定外，更重要的是糖苷键类型、主链结构和支链结构等信息^[65]。碳水化合物结构理论和相关表征方法经历了 100 多年的发展与积累，建立了高碘酸氧化、Smith 降解、NMR、MSⁿ 等方法，每种方法都有各自特点，我们推荐综合使用相关分析方法，这在之前的综述中有过论述，即综合利用“部分降解-甲基化-NMR”手段表征复杂多糖结构^[64]，而一些学者在具体研究中也用这种思路解析复杂多糖的结构^[71-74]。

5. 结语

多糖研究方兴未艾，一代又一代先驱和科技工作者付出了巨大的努力，才取得了今天的成绩，但也必须承认多糖结构理论和手段还不尽如人意。正如 Lerouxel 等提到，现阶段人们认为生物体内的多糖合成没有固定模式，是经过酶促反应在细胞内质网和高尔基体中生成^[75]，由于酶的活性不均一性，催化生成的糖链有较大差异，导致糖链序列的多样性。但也正如作者在该文中所列举的诸多不确定和亟待解决的问题^[75]，这只是研究进行到现在所揭示的多糖生物合成过程，多糖生物体内的合成复杂调控机理以及是否存在结构合成的精确性，仍有待大力研究。

在另一方面，根据目前已有报道，单从化学结构角度看，多糖结构“无序性”也并非绝对，至少在某种程度上可以将天然产物来源多糖分为葡聚糖、半乳聚糖、半乳甘露聚糖、葡甘聚糖、阿拉伯木聚糖、果胶（HG、XG、RG-I 和 RG-II 型）等结构类型。所以，对于多糖结构研究工作者而言，借助已有技术和知识，提升多糖结构分析结果的准确性，将有助于促进糖化学和糖生物学发展，具体包括以下几个方面：

（1）正确认识多糖结构类型

虽然很多研究者都认为多糖结构的不确定性、分析结果的低重现性、无规律性，但正如上文提到的，大家并不否认天然产物来源中普遍存在的葡聚糖、半乳

聚糖、半乳甘露聚糖、葡甘聚糖、阿拉伯木聚糖、果胶等结构类型多糖。目前的一些报道结果可能由于技术局限性等原因，导致许多报道的多糖结构都是“独一无二”的，即他人很难重复获得相同结果。例如，我们从车前子种皮中以阿拉伯木聚糖为主的多糖组分中进一步纯化获得果胶结构类型多糖，进一步修正、丰富了车前子中的多糖类型^[73,76]。因此，擅长利用已有知识对获得的含有多种单糖、多种糖苷键类型的多糖进行科学地分析与判断。

(2) 提高多糖提取制备效率，保证样品可重现性

多糖提取制备时，考虑到后续分离纯化中的损失，各项理化性质分析、精确结构解析、溶液构象分析、体内外实验等研究需要的大量样品，应当从原料提取制备的第一步开始就要注意，即应当最大程度一次性提取制备获得足够的多糖，如果按照水溶性精制多糖得率 2% 计算，如果要完成上述分析，原料投料量最好满足 3 kg 以上。目前文献中的很多报道，作者在文中阐述时仅提及 100-500 g 的原料用量用于制备多糖，若整个实验都是按照这样的原料量进行提取（或多批次制备），此时多糖结构与功能实验结果的可重复性可能会差很多。

此外，多糖分离纯化目的，除了满足结构分析、功能活性研究等需求外，应当特别注意得率问题，即不提倡以牺牲样品得率来单纯满足结构分析和功能活性机制探索需求。对于纯化制备得到的某一多糖，从其单糖组成及比例、电荷均一性、分子量分布等方面综合分析、评价，保证用于结构分析的样品是比较理想的“均一”多糖。

(3) 利用基于“部分降解-甲基化-核磁共振”为核心的多糖结构表征方法，促进多糖结构研究

在前期论述中^[64]，我们曾专门分析了如何提高多糖结构分析精确性的方法，即鉴于多糖结构的复杂性（特别是杂聚糖），目前很难用一种或几种方法解析出其一级结构，必须结合大量的化学分析和现代仪器分析方法进行综合解析，可以将“部分降解-甲基化-核磁共振”作为多糖精细结构表征的核心技术，是现阶段切实可行的方法，再辅助结合离子色谱、ESI-MS、Maldi-Tof-MS、离子淌度-质谱联用等技术，可对多糖结构进行科学、准确的解析。

此外，不能将蛋白质结构理论与研究思路“照搬”至多糖相关研究，应尽快建立适合用多糖结构分析的理论与方法，有利于提升本领域研究水平。

表 1. 一些碳水化合物/多糖研究机构、中心

机构名称	成立年份	研究重点	网站链接
法国 Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV)	1966	几乎涵盖了碳水化合物所有研究领域，包括体内与体外合成、结构表征、功能和应用，尤其是在低聚糖、多糖、糖蛋白和糖基材料等	https://www.cermav.cnrs.fr/en
英国牛津大学 Oxford Glycobiology Institute	1982	目前研究项目包括抗病毒药物发现、糖蛋白治疗、结构糖生物学	https://www.bioch.ox.ac.uk/glycob/
美国佐治亚大学 Complex Carbohydrate Research Center	1985	植物、微生物和动物来源复杂碳水化合物结构与功能，分析探讨碳水化合物在生物体生长、宿主-病原体相互作用、疾病发展中的作用	https://www.ccrc.uga.edu/
美国普渡大学 Whistler Center for Carbohydrate Research	1986	与实际应用有关的碳水化合物（淀粉、亲水胶体）、生物聚合物结构与功能关系研究	http://www.whistlercenter.purdue.edu/
美国哈佛大学 National Center for Functional Glycomics	未知	糖生物学技术开发，重点探索能被与人体生理、疾病密切相关重要蛋白质识别的糖原的机制	https://ncfg.hms.harvard.edu/

表 2. 多糖结构表征常用方法

测定指标	研究方法	
	化学分析	仪器分析
多糖纯度及分子量	显色反应（糖含量、糖醛酸含量和蛋白质含量）	HPGPC/HPSEC, 激光光散射, 非对称流场分离 与多角度激光光散射连用 (AFFF-MALS), HPLC/UPLC-ELSD, Maldi-Tof/MS 等
单糖组成	酸法或酶法水解, 水解产物再利用 HPTLC、HPLC、HPAEC、GC、GC-MS、IM-MS (离子淌度-质谱连用技术) 等分析	
糖残基糖环形式 (吡喃环、呋喃环)	高碘酸氧化、Smith 降解等, 降解产物再用 GC、GC-MS 分析	红外光谱、1D NMR
糖残基异头异构形式 (α -和 β -)	糖苷酶水解等	1D NMR、红外光谱、拉曼光谱等
单糖残基类型	甲基化、高碘酸氧化、Smith 降解等, 降解产物再用 GC-MS、IM-MS 等分析	ESI-MS ⁿ 、Maldi-Tof-MS ⁿ 、1D/2D NMR
糖残基连接顺序	选择性酸水解、糖苷酶顺序水解等	ESI-MS ⁿ , Maldi-Tof-MS ⁿ , 1D/2D NMR

表 3. 各种多糖提取方法优缺点比较

方法	优点	缺点	注意事项
水提法	方便操作、环境友好	耗时、耗能，对非水溶性组分不适用	利用不同的温度进行提取，获得不同性质多糖组分
稀碱溶液提取	提取得到一些酸性多糖以及和纤维素、木质素连接的多糖	与水提物相比，该法提取得到的样品中包含更多木质素、蛋白质和其他混合物	提取温度应该控制在 10 °C 以下，碱液中最好添加硼氢化钠，避免多糖降解
稀酸溶液提取	常用于果胶提取	提取液中和后常伴随沉淀出现	
有机溶剂，如 DMSO、2-甲氧基-LiCl		费用较高，不常用	

辅助提取方法：酶法辅助提取、微波辅助提取、超声辅助提取、亚临界水提取和电场辅助提取等。

参考文献

- [1] Fischer E. Ueber die glucoside der alkohole. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 1893, 26: 2400-2412.
- [2] Haworth W. A revision of the structural formula of glucose. *Nature*, 1925, 116:430.
- [3] Haworth WN, Hirst EL. CCCXLVIII. The structure of carbohydrates and their optical rotatory power. Part I. General introduction. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 1930: 2615-2635.
- [4] Haworth WN. The structure of carbohydrates. *Helvetica Chimica Acta*, 1928, 11: 534-548.
- [5] Watkins WM, Morgan W. Further observations on the inhibition of blood-group specific serological reactions by simple sugars of known structure. *Vox Sanguinis*, 1962, 7: 129-150.
- [6] Dwek RA. Glycobiology: toward understanding the function of sugars. *Chemical Reviews*, 1996, 96: 683-720.
- [7] Rademacher T, Parekh R, Dwek R. Glycobiology. *Annual Review of Biochemistry*, 1988, 57:785-838.
- [8] Varki A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, 1993, 3: 97-130.
- [9] Cobb BA, Wang Q, Tzianabos AO, et al. Polysaccharide processing and presentation by the MHCII pathway. *Cell*, 2004, 117: 677-87.
- [10] Kang S, Min H. Ginseng, the 'immunity boost': the effects of *Panax ginseng* on immune system. *Journal of Ginseng Research*, 2012, 36: 354.
- [11] Li WJ, Li L, Zhen WY, et al. *Ganoderma atrum* polysaccharide ameliorates ROS generation and apoptosis in spleen and thymus of immunosuppressed mice. *Food and Chemical Toxicology*, 2017, 99: 199-208.
- [12] Ramberg JE, Nelson ED, Sinnott RA. Immunomodulatory dietary polysaccharides: asystematicreview of the literature. *Nutrition Journal*, 2010, 9: 54.
- [13] Flint HJ, Bayer EA, Rincon MT, et al. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6: 121-131.
- [14] Cuskin F, Lowe EC, Temple MJ, et al. Human gut Bacteroidetes can utilize yeast mannan through a selfish mechanism. *Nature*, 2015, 517: 165-169.
- [15] Larsbrink J, Rogers TE, Hemsworth GR, et al. A discrete genetic locus confers xyloglucan metabolism in select human gut Bacteroidetes. *Nature*, 2014, 506: 498-502.
- [16] Hu JL, Nie SP, Wu QM, et al. Polysaccharide from seeds of *Plantago asiatica* L. affects lipid metabolism and colon microbiota of mouse. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 62: 229-234.
- [17] Liu LQ, Nie SP, Xie MY. Tumor microenvironment as a new target for tumor immunotherapy of polysaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2016, 56: S85-S94.
- [18] Meng X, Liang H, Luo L. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review

- on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities. *Carbohydrate Research*, 2016, 424: 30-41.
- [19] Zhang W, Xu P, Zhang H. Pectin in cancer therapy: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 2015, 44: 258-271.
- [20] Zong A, Cao H, Wang F. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 90: 1395-1410.
- [21] Chen Y, Xie MY, Nie SP, et al. Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum*. *Food Chemistry*, 2008, 107: 231-241.
- [22] Li Q, Wang W, Zhu Y, et al. Structural elucidation and antioxidant activity a novel Se-polysaccharide from Se-enriched *Grifola frondosa*. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 161: 42-52.
- [23] Jiang J, Kong F, Li N, et al. Purification, structural characterization and *in vitro* antioxidant activity of a novel polysaccharide from *Boshuzhi*. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 147: 365-371.
- [24] Wang J, Jin W, Zhang W, et al. Hypoglycemic property of acidic polysaccharide extracted from *Saccharina japonica* and its potential mechanism. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 95:143-147.
- [25] Luo Q, Cai Y, Yan J, et al. Hypoglycemic and hypolipidemic effects and antioxidant activity of fruit extracts from *Lycium barbarum*. *Life Sciences*, 2004, 76: 137-149.
- [26] Zhu KX, Nie SP, Li C, et al. A newly identified polysaccharide from *Ganoderma atrum* attenuates hyperglycemia and hyperlipidemia. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 57: 142-150.
- [27] Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 2009, 457: 480-484.
- [28] Seedorf H, Griffin NW, Ridaura VK, et al. Bacteria from diverse habitats colonize and compete in the mouse gut. *Cell*, 2014, 159: 253-266.
- [29] Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 2006, 444: 1027-1131.
- [30] Edge C, Parekh R, Rademacher T, et al. Fast sequencing of oligosaccharides using arrays of enzymes. *Nature*, 1992, 358: 693-694.
- [31] Rief M, Oesterhelt F, Heymann B, et al. Single molecule force spectroscopy on polysaccharides by atomic force microscopy. *Science*, 1997, 275: 1295-1297.
- [32] Venkataraman G, Shriver Z, Raman R, et al. Sequencing complex polysaccharides. *Science*, 1999, 286: 537-542.
- [33] Hofmann J, Hahm H, Seeberger P, et al. Identification of carbohydrate anomers using ion mobility-mass spectrometry. *Nature*, 2015, 526: 241-244.
- [34] Ding SY, Liu YS, Zeng Y, et al. How does plant cell wall nanoscale architecture correlate with enzymatic digestibility? *Science*, 2012, 338: 1055-1060.
- [35] Chundawat SP, Donohoe BS, da Costa Sousa L, et al. Multi-scale visualization and characterization of lignocellulosic plant cell wall deconstruction during thermochemical pretreatment. *Energy & Environmental Science*, 2011, 4:

973-984.

- [36] Kracher D, Scheiblbrandner S, Felice AK, et al. Extracellular electron transfer systems fuel cellulose oxidative degradation. *Science*, 2016, 352: 1098-1101.
- [37] Courtade G, Wimmer R, Røhr ÅK, et al. Interactions of a fungal lytic polysaccharide monooxygenase with β -glucan substrates and cellobiose dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113: 5922-5927.
- [38] Frandsen KE, Simmons TJ, Dupree P, et al. The molecular basis of polysaccharide cleavage by lytic polysaccharide monooxygenases. *Nature Chemical Biology*, 2016, 12: 298-303.
- [39] Leggio LL, Simmons TJ, Poulsen JCN, et al. Structure and boosting activity of a starch-degrading lytic polysaccharide monooxygenase. *Nature Communications*, 2015, 6: 5961.
- [40] Arfi Y, Shamshoum M, Rogachev I, et al. Integration of bacterial lytic polysaccharide monooxygenases into designer cellulosomes promotes enhanced cellulose degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111: 9109-9114.
- [41] Prozil SO, Costa EV, Evtuguin DV, et al. Structural characterization of polysaccharides isolated from grape stalks of *Vitis vinifera* L. *Carbohydrate Research*, 2012, 356: 252-259.
- [42] Yin X, You Q, Jiang Z. Optimization of enzyme assisted extraction of polysaccharides from *Tricholoma matsutake* by response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 86: 1358-1364.
- [43] Rostami H, Gharibzahedi SMT. Cellulase-assisted extraction of polysaccharides from *Malva sylvestris*: Process optimization and potential functionalities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 101: 196-206.
- [44] Ren B, Chen C, Li C, et al. Optimization of microwave-assisted extraction of *Sargassum thunbergii* polysaccharides and its antioxidant and hypoglycemic activities. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 173: 192-201.
- [45] Song JF, Li DJ, Liu CQ. Response surface analysis of microwave-assisted extraction of polysaccharides from cultured *Cordyceps militaris*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2009, 84: 1669-1673.
- [46] Hromadkova Z, Ebringerova A, Valachovič P. Comparison of classical and ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from *Salvia officinalis* L. *Ultrasonics Sonochemistry*, 1999, 5: 163-168.
- [47] Ying Z, Han X, Li J. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves. *Food Chemistry*, 2011, 127: 1273-1279.
- [48] Luo X, Duan Y, Yang W, et al. Structural elucidation and immunostimulatory activity of polysaccharide isolated by subcritical water extraction from *Cordyceps militaris*. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 157: 794-802.
- [49] Zhao C, Yang RF, Qiu TQ. Ultrasound-enhanced subcritical water extraction of polysaccharides from *Lycium barbarum* L. *Separation and Purification Technology*, 2013, 120: 141-147.
- [50] Yang N, Jin Y, Jin Z, et al. Electric-field-assisted extraction of garlic

- polysaccharides via experimental transformer device. *Food and Bioprocess Technology*, 2016, 9: 1612-1622.
- [51] Wu SJ. Preparation and antioxidant activity of the oligosaccharides derived from *Laminaria japonica*. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 106: 22-24.
- [52] Shi L. Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharides from natural products: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 92: 37-48.
- [53] Nie SP, Xie MY. A review about the research of structure and function of polysaccharides from natural products. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2010, 2: 1-11.
- [54] Zhou XY, Zhang J, Xu RP, et al. Aqueous biphasic system based on low-molecular-weight polyethylene glycol for one-step separation of crude polysaccharides from *Pericarpium granati* using high-speed countercurrent chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1362: 129-134.
- [55] Yin JY, Jiang ZH, Yu H, et al. A new application of an aqueous diphasic solvent system in one-step preparation of polysaccharide from the crude water extract of *Radix Astragali* by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2012, 1262: 92-97.
- [56] Tan ZJ, Wang CY, Yi YJ, et al. Three phase partitioning for simultaneous purification of aloe polysaccharide and protein using a single-step extraction. *Process Biochemistry*, 2015, 50: 482-486.
- [57] Yan JK, Wang YY, Qiu WY, et al. Three-phase partitioning for efficient extraction and separation of polysaccharides from *Corbicula fluminea*. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 163: 10-19.
- [58] Hou Q, Li W, Ju M, et al. Separation of polysaccharides from rice husk and wheat bran using solvent system consisting of BMIMOAc and DMI. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 133: 517-523.
- [59] Wang J, Li X, Song G. An efficient separation method of polysaccharides: preparation of an antitumor polysaccharide APS-2 from *Auricularia polytricha* by radial flow chromatography. *Chromatographia*, 2013, 76: 629-633.
- [60] Yan PS, Cao LX, Zhang BZ. Efficient purification of antiproliferative polysaccharides from *Hypsizigus marmoreus* with radial flow chromatography. *Biotechnology Progress*, 2014, 30: 872-878.
- [61] Wei X, Duan J, Xu X, et al. Highly efficient one-step purification of sulfated polysaccharides via chitosan microspheres adsorbents. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2017, 5: 3195-3203.
- [62] Colodel C, das Graças Bagatin RM, Tavares TM, et al. Cell wall polysaccharides from pulp and peel of cubiu: A pectin-rich fruit. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 174: 226-234.
- [63] Ndeh D, Rogowski A, Cartmell A, et al. Complex pectin metabolism by gut bacteria reveals novel catalytic functions. *Nature*, 2017, 544: 65-70.
- [64] Xie MY, Yin JY, Nie SP. Research progress on structural characterization of polysaccharides from natural resources. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2017, 17: 1-19.

- [65] Yang L, Zhang LM. Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural resources. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 76: 349-361.
- [66] de Oliveira Salvalaggio M, de Freitas RA, Franquetto EM, Koop HS, et al. Influence of the extraction time on macromolecular parameters of galactomannans. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 116: 200-206.
- [67] Savi-Junior R, de Freitas RA, Sasaki GL, et al. Real-time monitoring of the change in stiffness of single-strand xanthan gum induced by NaCl. *Food Hydrocolloids*, 2015, 44: 191-197.
- [68] Cheong KL, Wu DT, Zhao J, et al. A rapid and accurate method for the quantitative estimation of natural polysaccharides and their fractions using high performance size exclusion chromatography coupled with multi-angle laser light scattering and refractive index detector. *Journal of Chromatography A*, 2015, 1400: 98-106.
- [69] Lovegrove A, Edwards C, De Noni I, et al. Role of polysaccharides in food, digestion, and health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2017, 57: 237-253.
- [70] Lee YC. Carbohydrate analyses with high-performance anion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1996, 720: 137-149.
- [71] Samanta S, Nandi AK, Sen IK, et al. Structural characterization of an immunoenhancing glucan isolated from a mushroom *Macrolepiota dolichaula*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 61: 89-96.
- [72] Guo Q, Cui SW, Wang Q, et al. Structural characterization of a low-molecular-weight heteropolysaccharide (glucomannan) isolated from *Artemisia phaeocephala* Krasch. *Carbohydrate Research*, 2012, 350: 31-39.
- [73] Yin J, Lin H, Li J, et al. Structural characterization of a highly branched polysaccharide from the seeds of *Plantago asiatica* L.. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 87: 2416-2424.
- [74] Liu W, Liu Y, Zhu R, et al. Structure characterization, chemical and enzymatic degradation, and chain conformation of an acidic polysaccharide from *Lycium barbarum* L. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 147: 114-124.
- [75] Lerouxel O, Cavalier DM, Liepman AH, Keegstra K. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides-a complex process. *Current Opinion in Plant Biology*, 2006, 9: 621-630.
- [76] Yin JY, Lin HX, Nie SP, et al. Methylation and 2D NMR analysis of arabinoxylan from the seeds of *Plantago asiatica* L.. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 88: 1395-1401.
- [77] Yin JY, Wang JQ, Lin HX, et al. Fractionation, physicochemical properties and structural features of non-arabinoxylan polysaccharide from the seeds of *Plantago asiatica* L.. *Food Hydrocolloids*, 2016, 55: 128-135.