

食源性碳水化合物结构解析新技术前沿与展望

陈士国, 张唯希, 朱凯, 侯志强, 叶兴乾

(浙江大学生物系统工程与食品科学学院 智能食品技术与装备国家地方联合工程实验室
浙江省食用农产品资源挖掘与高值利用重点实验室 杭州 310058)

摘要 碳水化合物不仅为人类提供主要能量来源,还具有维持肠道健康,调节血糖和胆固醇水平,促进新陈代谢,调节免疫系统等重要功能。食源性多糖是一类具有重要生物活性和健康功效的碳水化合物。近年来,探究食源性碳水化合物的精准构效关系成为重要的科学问题。然而,与基因组学和蛋白质组学相比,食源性碳水化合物固有的结构多样性和复杂性给其研究带来了重大挑战,已远落后于蛋白和脂质大分子的研究。基于此,在经典的糖链解析方法基础上,重点阐述质谱联用技术在食源性糖链解析方面的突破,并探讨最新的基于人工智能的数据处理方法和分析技术在食源性糖链质谱解析中的应用。本综述旨在帮助读者更深入地了解食源性碳水化合物的新型结构解析策略,并对高通量、精准的食源性糖生物信息学的未来趋势进行展望。

关键词 食源性多糖; 结构解析; 质谱; 糖生物信息学

文章编号 1009-7848(2024)09-0001-17 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.09.001

1 食源性碳水化合物

碳水化合物是健康饮食不可或缺的一部分,不仅因为碳水化合物是人类饮食中的主要能量来源(40%~80%)^[1],其还赋予食物重要的结构特性,并具有众多重要的生理功能(菌群调控,免疫调节,降低血脂、血糖等)。许多研究表明富含游离葡萄糖和果糖的饮食与心血管和慢性代谢疾病的发生密切相关^[2-3]。此外,碳水化合物可以影响肠道微生物组,例如在婴儿发育的早期阶段,在人乳低聚糖(HMO)优先喂养的婴儿中的有益细菌(如双歧杆菌)显著上升,有助于的新生儿形成完善的免疫系统^[4]。近年来,以 Jeffrey Gordon 教授领衔的团队多次在《Cell》《Nature》《Science》主刊发表系列论文,阐明了天然多糖为主的食源性碳水化合物可通过调节肠道微生物组来改善人体健康^[5]。研究食源性碳水化合物的精准构效机制,已成为食品科学和生命科学领域的重要课题。然而,受限于糖链复杂组分和分子结构,食源性碳水化合物的研究尚在起步阶段,远落后于蛋白质和脂质等大分子

的研究^[6]。

食源性碳水化合物复杂的“化学信息”源于单糖结构的复杂性,即:1)多样的单糖组成;2)化学异构构型(即 α -和 β -)^[7];3)不同的环连接结构(即吡喃糖和呋喃糖结构);4)不同手性形式(即L-和D-);5)羟基取代基团具有不同官能团(如磷酸盐、硫酸盐、甲基)的修饰。进一步地,单糖单体可以通过不同糖苷键连接,从而产生潜在的不同分支和连接异构的小分子寡糖或大分子多糖^[8]。由于结构决定功能,因此,精细研究食源性碳水化合物的结构对于理解其生物学功能和作用机制至关重要^[9-10]。

2 传统食源性碳水化合物结构解析策略

目前,对于糖链的分析主要基于其初级结构信息:分子质量测定、单糖组成、糖苷键构成和连接形式,传统结构分析依赖大量的分析技术和化学手段,策略可以总结为“糖含量与分子质量测定-部分降解-甲基化分析-核磁共振”^[11-12]。

单糖组成的测定有助于预测多糖主链的核心结构和研究多糖的理化性质。气相色谱(GC)、气相色谱-火焰化离子检测器(GC-FID)或气相色谱-质谱联用(GC-MS)是传统多糖结构分析中不可缺少的工具,特别是对水解单糖、甲基化单糖和甲基化低聚糖的分析,可以识别糖的异构体。

收稿日期: 2024-04-02

基金项目: 国家自然科学基金原创探索项目(32250019);
国家重点研发计划项目(2022YFF1100204)

第一作者: 陈士国,男,博士,教授

E-mail: chenshiguo210@163.com

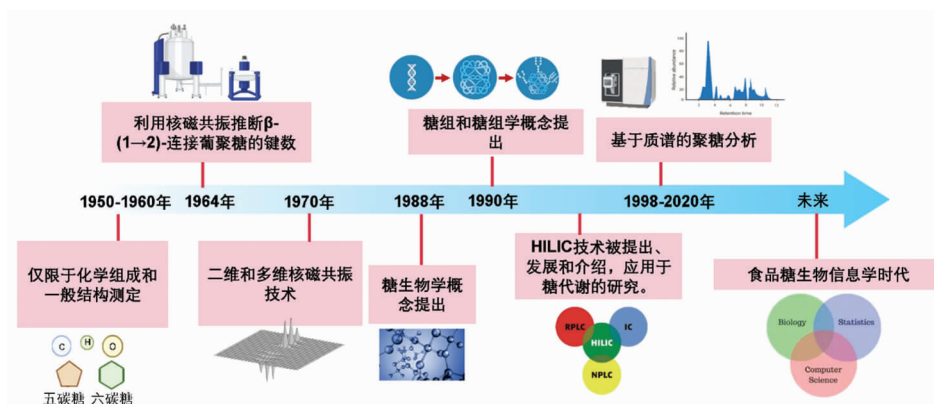


图1 与食品碳水化合物相关研究的里程碑

Fig.1 Milestones related to food carbohydrates

甲基化分析是分析糖苷键信息最有效的方法之一,通过将碳水化合物中的OH和NH基团转化为o-甲基和n-甲基,采用GC-MS方法鉴定各种甲基衍生物的片段和确定各种单糖残基的位置^[13]。通过气相色谱-质谱结合标准谱分析,可以鉴定出各种部分甲基化的单糖衍生物,从而确定每个单糖连接的位置,即糖苷键的位置^[14]。甲基化的方法有Haworth法、Hakomori法、Purdie法和Menzie法等^[15-17]。Ciucanu和Kerek的甲基化方法使用较多^[18-19]。通过甲基化分析尚不能确定多糖中杂糖苷键的构型和单糖残基的序列,需要借助核磁共振波谱(NMR)。

一维NMR通常只能解析简单的多糖,二维NMR(2D-NMR)中重要的化学位移相关谱(HSQC谱、HMBC谱、HHCOSY谱、NOESY谱),可得出直接或远程异核耦合的关系,判断出碳、氢之间的

相互关系^[20]。随着NMR技术的飞跃发展,1H的NMR的磁场强度在800兆以上,然而结合核磁二维谱仍无法给出多糖支链细节结构信息,比如修饰基团的位置及数量。另外,核磁共振技术对样品纯度和浓度要求很高,其通常需要微摩尔/纳摩尔水平的纯化和均质样品;而多糖分子质量大,溶解性差,会干扰NMR技术的测试结果。

虽然“前处理-糖含量与分子质量测定-部分降解-甲基化分析-核磁共振”的策略可以提供较为完整的多糖的结构信息,但是过程耗时、精度低、通量低,且容易在过程中造成部分结构的丢失,无法满足食品多糖结构高效、快速、精细鉴定的研究需求。因此,对于多糖的结构分析,需要更加完整的结构鉴定策略,并从单糖、寡糖等多个方面进行多维验证。

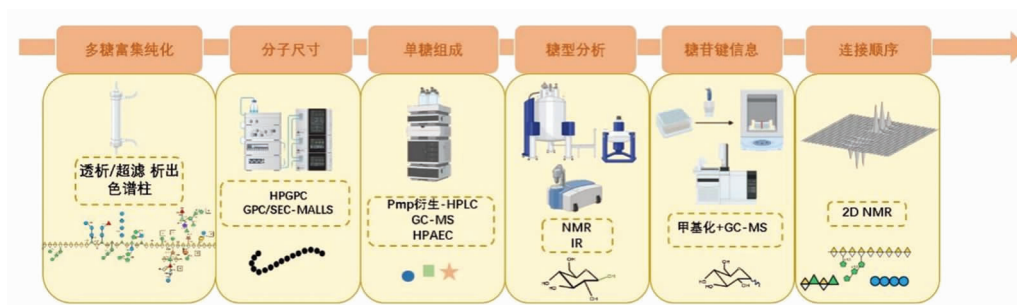


图2 解析食源性多糖结构的传统方法

Fig.2 Traditional methods for analyzing the structure of foodborne polysaccharides

3 食源性碳水化合物新型结构解析策略

LC-MS技术具有高效分离、灵敏度高和信息

丰富等优势,已成为糖链高通量解析的主流方向^[21-22]。经过数十年的发展,糖链质谱技术相关技

术已日渐成熟,尤其是关于 N/O-聚糖、糖胺聚糖和人乳寡糖的质谱策略构建,促进了糖组学的进一步发展^[23-26]。近年来,针对食源性多糖的整体和精细结构分析,已有一些基于质谱的糖链结构解析策略的构建,以下进行总结和讨论。

3.1 LC/QqQ-MS 技术多反应监测(MRM)模式下联用分析整体糖链

MRM-质谱联用策略是一种强有力的目标分子定量测量工具,在定量蛋白、代谢产物中已有广泛应用,也被证明是一种定量糖蛋白、寡糖和单糖的有效方法^[27-29]。多反应监测模式主要依靠三重四级杆质谱(QqQ-MS)实现,定量由母离子在碰撞室产生的特征性子离子碎片,具有重复性好,精密度和准确度高等优势,可以用来分析糖链的单糖组成、低聚糖组成、糖苷键组成,从而实现糖链整体结构解析。这种策略被广泛应用于生命科学、药物、食品科学等领域对多糖的定性、定量分析中,如分析人体液中的糖胺聚糖,检测低分子质量肝素,检测人乳寡糖,分析复杂生物样本中多糖等^[30-33]。在食品领域,液相色谱-三重四级杆质谱联用(LC/QqQ-MS)被应用于分析果蔬、谷物、豆、坚果、饮料、动物产品中的单糖,解析胡萝卜等食物多糖中的糖苷键信息^[34-35]。

3.1.1 单糖及低聚糖组成 食物中的多糖经三氟乙酸水解成游离单糖,游离单糖与衍生试剂 1-苯基-3-甲基-5-吡啶酮(PMP)或醋酸酐反应,以增加检测的灵敏度;衍生物经高效液相色谱-串联质谱分析,外标法定量^[17,36]。基于 LC-MS 的碳水化合物分析技术大大提高了单糖检测的灵敏度和特异性,分析时间大大缩短,能够实现高通量的测定。LC/QqQ-MS 在 MRM 模式下的分析已应用于乳清蛋白运动营养粉、油茶饼粕等食物中多糖以及植物来源多糖的单糖组成测定^[37-38]。粗多糖经简单分离后,经可控酸水解解聚,PMP 标记后,采用高效液相色谱-质谱联用可以在 MRM 模式下检测所得低聚糖。此种方法被用于糖胺聚糖、贝类多糖的结构表征^[39]。

3.1.2 糖苷键信息 食物中的多糖经碘甲烷的过甲基化,三氟乙酸水解,再用 PMP 衍生,结合 LC/QqQ-MS 在 MRM 模式下的分析,可以阐明并相对定量来自寡糖和多糖的糖苷键残基^[40-41]。这个策

略提供了高效的色谱分离,样品运行时间短,可以实现高通量的糖苷键测定,已被用于标准半乳糖、复杂基质中多糖,如胡萝卜多糖等的糖苷键信息分析^[13,41-42]。

3.2 基于自下而上(Bottom up)及自上而下(top down)策略分析多糖精细结构

3.2.1 多糖精细结构“Bottom-up”解析策略 由于多糖无法直接在质谱中分析,自下而上的 bottom-up 方法是将长链的多糖降解为单糖或者寡糖,再通过色谱分离,最后结合质谱等方法,确定单糖及寡糖的组成情况。

3.2.1.1 分离 目前,多孔石墨化碳色谱(PGC)^[45]、亲水性相互作用色谱(HILIC)^[46]、反相作用色谱(RP)^[47]均被广泛用于 LC-MS 对多糖的解析中,在牛乳寡糖、半乳糖低聚糖等分析中已有应用。

3.2.1.2 精细结构解析 自下而上的糖组学已广泛应用于糖胺聚糖的分析^[48-49]。糖胺聚糖通过化学或酶切分解成较小的双糖/寡糖,先用色谱技术分离,然后用质谱完成双糖、低聚糖的鉴定和定量。目前,针对食源性多糖分子质量大、支链多、黏度大的特性,将其降解成寡糖后结合 LC-MS 解析其结构的策略,已成为发展趋势。相关研究均证明通过酸水解、酶降解或氧化降解,结合 LC-MS 可以实现对复杂植物多糖的精细结构解析^[43,50-52]。来自加利福尼亚大学的 Lebrilla 团队^[53]基于 LC-MS 技术提出“单糖分析—糖苷键测定—顺序降解—寡糖序列分析—多糖结构”的完整解析策略,表明基于 LC-MS 建立的解析策略可以实现未知多糖精细结构的高通量解析。Amicucci 等^[42]进一步基于金属芬顿氧化反应,将结构多样化的植物多糖分解成足够长度的寡糖,通过 LC-MS 构建不同来源的植物寡糖指纹图谱,成功定性了来自苹果和洋葱的 9 种多糖(淀粉、纤维素、 β -葡聚糖、甘露聚糖、半乳糖、阿拉伯聚糖、木聚糖、甲壳素)。另外,使用 PGC-LC-MS/MS 策略的应用也越来越多,PGC 柱的高温液相色谱分离有利于多糖的同分异构体分离,并可通过串联质谱对其进行灵敏的鉴定和定量^[54-55]。

基于 bottom up 的多糖解析策略,将多糖降解后得到的双糖和寡糖采用 LC-MS 测定,技术发展较为成熟,能够更好地解析构成多糖的各个部分。

表 1 近 5 年基于质谱对不同食源性多糖的解析
Table 1 Analysis of different foodborne polysaccharides based on mass spectrometry in recent five years

来源	提取方法	前处理方法	分离纯化手段	解析方法		糖苷键	结构	参考文献
				单糖	低聚糖			
冬南瓜	/	金属芬顿反应	C18 柱纯化, PGC 柱富集	水解 (4 mol/L TFA, 100 °C, 2 h) --PMP 衍生 --UHPLC/QqQ MS	/	采用 Galermo 等的方法: 甲基化-水解-衍生-UHPLC/QqQ MS	Gal-(1 → 6)-Glc-(1 → X)-Fru-(2 → X)-Fru	[34]
胡萝卜	/	切碎、冻干、磨粉, 加水配制原液, 进一步均质化	/	/	/	甲基化-水解-衍生-UHPLC/QqQ MS	存在 I 型阿拉伯半乳糖(t-f-阿拉伯糖、4-半乳糖和 t-半乳糖)、木聚糖(4-p-木糖、3,4-p-木糖)、阿拉伯糖(5-f-阿拉伯糖)。	[41]
麦麸	/	金属芬顿反应【Fe ₂ (SO ₄) ₃ ·5H ₂ O, H ₂ O ₂ 】	PGC 柱纯化。用 40% ACN 和 0.05% (v/v) TFA 洗脱寡糖。	4 mol/L TFA/100 °C 水解 2 h --PMP 衍生 --UHPLC/QqQ MS,	Nano chip Q-TOF-MS; NMR	采用 Galermo 等的方法: 甲基化-水解-衍生-UHPLC/QqQ MS	由 β-葡聚糖、地衣聚糖、阿拉伯木聚糖、木聚糖组成	[42]
猴头菇	微波辅助提取法	葡聚糖酶消化	超滤	2.5 mol/L TFA 110 °C 4h --三甲基硅烷化衍生-GC-MS	HILIC-UHPLC-ESI--MS/MS	HILIC-HCD-ESI--MS/MS	主要结构骨架为 →6 (Hex)1 → 以及末端 GalA, Fuc, 乙酰基、→4Hex1 → 和 →3Hex1 → 等多种可能的取代基	[43]
黑木耳	超声辅助提取	微波辅助法水解 (1.5 M TFA, 100 °C, 20 min)	/	2.5 mol/L TFA 110 °C 4h --三甲基硅烷化衍生-GC-MS	LC-QTOF-MS; HILIC-UPLC-ESI--MS; HILIC-UPLC-ESI--HCD-MS/MS	粉末状氢氧化钠和碘化甲砷在二甲基亚砷溶液中甲基化-水解-衍生-GC-MS	GlcAw → Hexm → GlcAx → Hexn → GlcAy → Hexp → GlcAz → Hexq → (w, x, y, z = 0, 1; M, n, p, q ≥ 0; Hex1 → 6Hex, GlcA1 → 4Hex, Hex1 → 4GlcA)	[44]

注: “/”表示文中未提到。

然而,该技术方法需要大量的样品制备步骤,分析周期较长,同时还会造成多糖的空间结构缺失。

3.2.2 多糖精细结构“Top down”解析策略 Top down 即自上而下的分析策略, top 指的是完整多糖分子的质量测定, down 指对完整多糖的碎裂,通过完整多糖的质量及其碎裂谱图信息实现多糖的鉴定。一维和二维核磁共振(NMR)光谱被用于自上而下完整的肝素链分析^[48,56-58],可以提供关于糖醛酸残基立体化学的详细信息,然而,核磁共振波谱需要毫克级的纯样品完成糖胺聚糖的完整结构分析。目前,使用 LC-MS 进行自上而下解析的策略已应用于糖胺聚糖的结构表征,然而,这仅限于低分子糖胺聚糖链,如 bikunin 和 Lmwhs^[59-60]。基于 top down 的解析策略减少了多糖结构的丢失,然而通量较低,不适合分析复杂的样本,并且在完整多糖碎裂、质谱分析、生物信息学等方面的技术相对不完善。

3.3 质谱与其它分离方法联用分析糖链中的异构体

3.3.1 红外光谱与质谱联合获得单糖片段指纹图谱 通过低温红外光谱技术得到具有单糖组成和硫酸化特征的解析红外光谱,用此方法可获得糖胺聚糖的低聚糖至五糖的高分辨红外光谱^[61]。低温红外光谱对微小的结构差异敏感,产生的红外指纹图谱可与质谱互为补充,支撑质谱技术对碳水化合物精细结构进行高效、精准地解析。利用红外多光子解离光谱(IRMPD)和质谱联用能区分吡喃糖和呋喃糖连接的半乳糖残基^[62]。对糖类化合物在质谱中分解的碎片结构进行光谱探索,不同的立体异构、区域异构以及顺序异构都在红外图谱中有明显的特征。将单糖片段的红外指纹图谱与单糖标准品进行比较,可以通过单糖片段的红外指纹图谱确定寡糖中的单糖组分,并且可以识别单糖之间糖苷键的立体化学信息^[63]。与其它基于质谱的测序策略相比,这个方法不需要分析物的化学衍生化,从而节省了大量的样品制备,将质谱测序策略的优势与 IR 光谱对糖类化合物异构体的高分辨率相结合。进一步,LC-MS-IRMPD 将 LC-MS 与 IRMPD 进行联合,可以识别碳水化合物在 LC 色谱图中观察到的双峰分布,即 α 和 β 异构体,使 LC 分离离子的在线光谱表征成为可

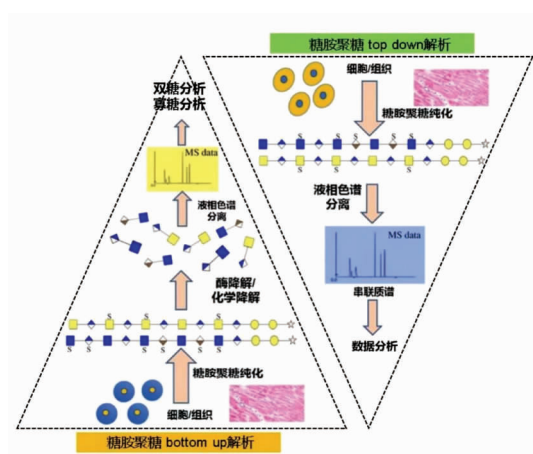


图 3 采用自上而下和自下而上的方法分析糖胺聚糖 (GAGs)^[48]

Fig.3 Analysis of glycosaminoglycans (GAGs) using top-down and bottom-up methods^[48]

能,弥补了 LC-MS 无法区分同分异构体的缺陷^[64]。

3.3.2 离子淌度与质谱联用区分多糖同分异构体

离子淌度,通过惰性漂移气体分离寡糖异构体,联合质谱实现对复杂寡糖的高通量解析。气相中的离子在电场作用下与惰性气体相对位移发生碰撞时,由于离子所带电荷和自身立体结构,其受碰撞产生的阻力大小不同,产生的碰撞截面积也不同,从而区分出不同的寡糖。离子淌度可作为一种模块化组件加入常用的 LC-MS 中,将液相色谱流出的组分进一步分离,以简化质谱图^[65]。另外,离子淌度还可与常用的质谱碎裂模式 CID (碰撞诱导解离)和 UVPD (紫外光解离)结合^[66],让离子通过离子淌度分离后被碎裂,再进行质谱分析,就是把质谱碎裂后的碎片离子继续引入离子淌度质谱中实现类似 MS_n 的效果 (IMS_n),IMS_n 能够阐明复杂分支和链接异常的结构。

离子淌度质谱对多糖的相关研究多集中于糖肽、O-/N-glycan 和糖胺聚糖等^[67-68],而针对食源性多糖的研究屈指可数。目前有研究将不同的离子淌度技术应用于复杂寡糖的快速鉴定和区别,如人乳寡糖、果胶寡糖等^[69-70]。近 20 年来,IM-MS 取得了巨大发展,已出现多种商业 IM-MS 仪器,如 T wave 离子淌度质谱(TWIMS)、高场非对称波形离子迁移谱(FAIMS Quantum)、安捷伦 6560 离子淌度 Q-TOF 液质联用系统 (6560 IM QToF-MS)

和离子淌度质谱仪(ABSciex Selexion)等,特别是离子操纵(SLIM)、串联捕获离子迁移率光谱仪(TIMMS)和环形离子淌度(Cyclic IMS)等高分辨率IMS的发展,帮助分离复杂和异质聚糖(包括组成、键和支化异构体),弥补质谱不能很好区分同分异构体的缺点^[71]。越来越多的研究表明高分辨

离子淌度-质谱联用在食品糖组学解析中的巨大应用前景^[72]。另外,将离子淌度质谱与红外光谱联合(IMS-IR)作为一种新兴的工具,可以确定聚糖中的糖苷键类型、分支结构和修饰情况,是区分糖链立体异构体的重要手段^[73-74]。

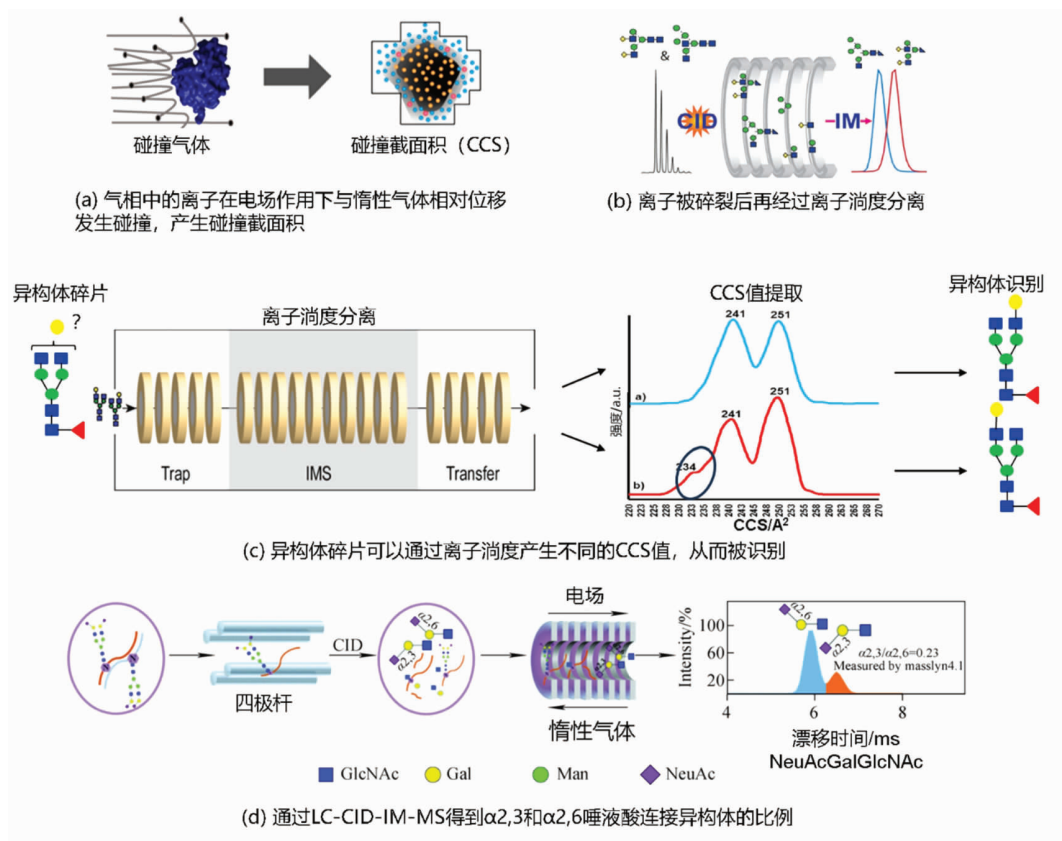


图4 离子淌度分离异构体示意图^[65-66,75-76]

Fig.4 Schematic diagram of ion mobility separation isomers^[65-66,75-76]

3.4 糖链单分子测定策略

无论是传统多糖解析策略,还是食源性多糖鉴定的新型策略,对多糖结构的检测大多建立在对分子结构进行破坏的基础上,尚未有一个适合的方法能够在分子结构完整的基础上检测多糖结构的精细信息。目前,在进行植物多糖分子结构检测的同时,能保持多糖分子的完整性的方法正在兴起,如纳米孔测序技术和扫描隧道显微镜等。

3.4.1 纳米孔道多糖测序技术 纳米孔作为一种新型纳米传感器,具有很高的空间分辨率,灵敏度高,测试速度快。目前利用纳米孔对基因的检测已较为成熟,不仅可用在DNA和RNA的测序上,还

可以检测细菌、病毒和多糖等生物大分子的结构^[77]。纳米孔对分析物之间微小结构差异的敏感性可用于识别糖类,基于纳米孔的单分子传感技术为阐明聚糖结构甚至聚糖序列提供了潜力。然而,多糖的小分子尺寸和低电荷密度限制了多糖的直接纳米孔检测。目前利用固态纳米孔对糖类结构进行检测的对象多为人体中含有的糖类以及人体摄入较多的糖类,很少应用于植物多糖的结构鉴别研究。纳米孔道针对糖单分子的现有研究包括合成硫酸乙酰肝素聚合度检测、单糖检测、识别芳香型标签等^[78-83]。

目前,纳米孔对糖类分子结构的解析存在几

个方面的难点,首先,无法保证试验中采集的所有数据都是分子的过孔信号,存在多糖分子到达纳米孔附近且未穿过纳米孔而产生触碰信号的可能;其次,目前纳米孔的化学修饰会影响与多糖的结合作用,可以选择与多糖结合更好的修饰物修饰纳米孔;另外,高品质的纳米孔批量制备和后期数据整理分析导出等瓶颈也需要克服。

3.4.2 扫描隧道显微镜和原子力显微镜 从生物分子的成像可以了解其不同的结构和功能。扫描隧道显微镜是基于量子力学的隧穿效应,用 1 根金属针尖作为探针,使之与样品表面形成两个电极,通过记录针尖与样品表面隧道电流的变化就可得到样品的表面信息。Wu 等^[84]在 2020 年借助扫描隧道显微镜首次实现了对单个多糖分子的成像,能够达到亚纳米的分辨率,可以区分不同的多

糖连接方式并辨别位置异构体。后来 STM 在蛋白多糖和脂多糖的单分子成像中也有应用^[85]。原子力显微镜(AFM)是在扫描隧道显微镜基础上发展起来的。相对于 DNA、蛋白质等生物大分子,AFM 在多糖方面的研究起步较晚,研究难度在于多糖分子往往带有支链,所得图像分辨率相对较差。近年来,用 AFM 解析单个多糖分子高级结构以及多糖胶体的研究相继被报道,运用 AFM 对果胶、黄原胶、大豆多糖、香菇多糖等多糖大分子物质进行了单分子或分子间网络结构的观察^[86-91]。AFM 与单分子力光谱技术的结合(AFM-SMFs),可提供在单链水平多糖的分子内和分子间相互作用情况,得到了广泛的应用^[92-93]。除了 STM 和 AFM,多维 NMR、X-射线衍射法、圆二色谱等也被用来研究多糖的高级结构。

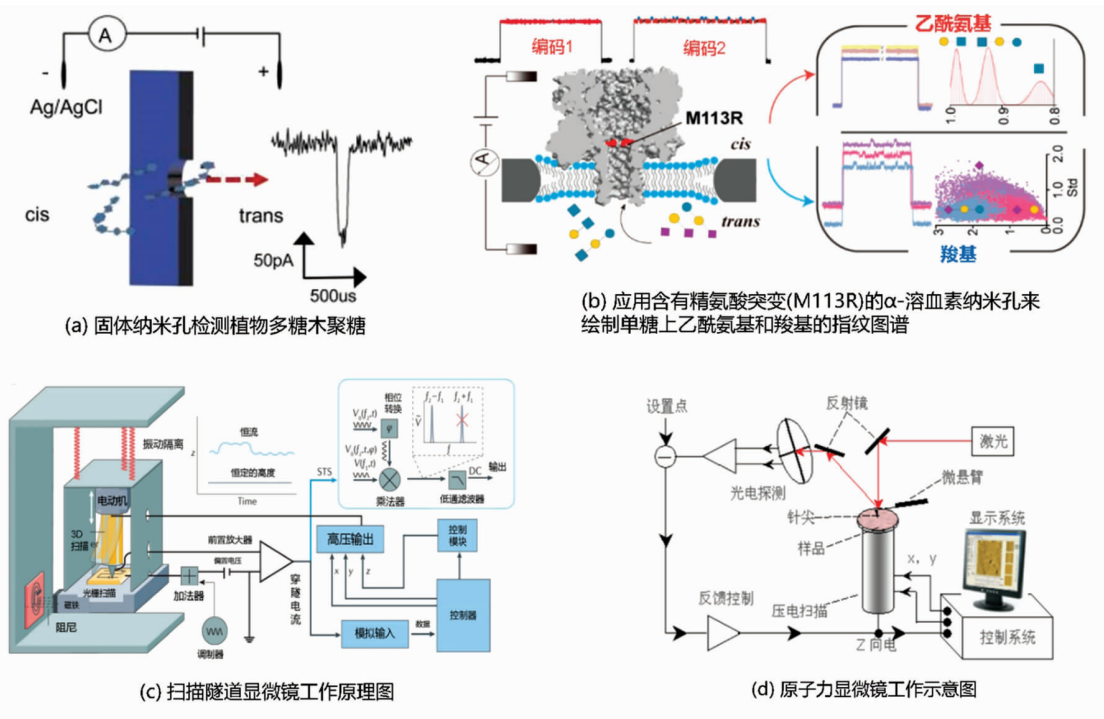


图 5 纳米孔多糖测序及扫描隧道显微镜示意图^[80,94-96]

Fig.5 Schematic diagram of polysaccharide sequencing by nanopore^[80,94-96]

3.5 新型糖链测序技术存在的问题

近 10 年来,多反应监测模式下的液相色谱-质谱联用,使得多糖结构高通量分析得以发展。离子淌度质谱为多糖同分异构体的分析提供了方法。纳米孔、扫描隧道显微镜等的应用为以后多糖单分子的分析奠定了基础。这些新型测序技术在

一定程度上解决了多糖结构复杂,难以解析的问题。除此之外,糖组学落后于其它组学的原因,还有糖组学试验数据本身的特点:1)稀疏性,即由于低丰度、电离困难、异构体和许多其它潜在问题,以此导致在糖组学试验中有一些无法注释的聚糖部分;2)标识的不一致性,聚糖结构有多种不同的

表示方法,在不同的数据库的表示方法可能不一样。随着糖组学研究的深入,糖链格式统一的工作获得较大改善,如糖链符号命名法(SNFG)对单糖种类用不同几何形状表示并定义了RGB编码用于着色,这种以图形方式表示糖链结构的标准已获得广泛的认可。通过将质谱与数据库相结合,糖蛋白结构的自动化分析已成为可能,被应用于研究聚糖在传染病、癌症等疾病中的作用,然而在食品领域的多糖数据库还很缺乏。在新型测序技术发展的同时,需要结合AI等生物信息学技术,对产生的海量数据进行整理和分析。

4 食源性糖生物信息学

糖生物学的积累及糖组学的兴起推动了糖生物信息学的发展,试验数据的积累也推动一大批糖生物信息学数据库的建立。世界范围内发展起众多类似的数据库,为糖生物信息学的发展奠定了基础^[97],如GLYCOSCIENCES.de^[98]、CFG^[99]、KEGG^[100]、GlycoBase、GlycomeDB等,均建立了糖链结构数据。通过匹配质谱数据库对化合物进行结构重构,实现对糖链结构的自动解析,是未来基于复杂食品糖链整体结构分析的重要突破方向。在食品领域,目前已有牛奶寡糖的专门数据库,如MilkOligoDB,包括3193个条目,783种独特的乳寡糖结构^[101]。

4.1 食源性糖链结构数据库

4.1.1 基于LC-MS/MS的糖链三维质谱数据库

上文提到,聚糖结构的表征通常采用液相色谱联合质谱的方法,然而,基于MS产生的大量高度复杂结构数据,在手工分析时耗时且费力,因此需要建立数据库以及应用专门的软件来对试验获得的质谱数据进行整合和分析。基于LC-MS/MS的糖链三维质谱数据库中,包括保留时间(RT)、质谱图和二级质谱数据3个方面的数据。过去几年中,糖蛋白质组学数据分析取得了一些进展,将糖和肽段部分分开单独鉴定,使处理软件能够跟上大规模蛋白质组水平的糖肽分析,在生物、医学等领域有广泛的应用^[102-104]。近几年,有许多基于LC-MS的数据分析方法软件,分析N-聚糖以及O-聚糖,如GlycReSoft、SweetSEQer、GlycanID、GlyTouCan、Glyseeker、MultiGlycan、GlySeq、pGlyco 2.0、

StrucGP,改善了人工分析师的工作流程,而近5年不断改进的方法和软件工具也提供了更高的灵敏度、速度和准确性^[105]。根据寡糖的结构信息来推测多糖结构是一种常见的方法,寡糖的单糖组成、糖苷键连接方式、化学修饰可以提供关于多糖中可能存在的单糖类型、连接方式和化学修饰信息。根据二糖解离机制建立专门的二糖数据库和逻辑解析顺序,可以为寡糖结构的测定提供一种简单、快速、灵敏的方法。例如:利用低能碰撞诱导解离(CID)和二糖CID谱数据库,可以鉴定低聚葡萄糖、低聚甘露糖的结构^[106-107]。针对N-聚糖、糖肽类的基于LC-MS的数据库和数据收集分析软件有很多,然而针对食源性多糖的多维质谱数据库屈指可数,应用较多的是人乳寡糖^[108]。Amicucci等^[42]通过对多糖标品降解的寡糖作为各自多糖母体的唯一标识符,通过LC-MS/MS分析,创建了包含近400种独特结构的寡糖质谱参考库,对实现多糖的质谱识别和结构鉴定具有重大意义。

目前基于LC-MS的食源性糖组学存在一些瓶颈,主要包括以下几个方面:1)建立聚糖质谱库存在困难,因为给定的化学分子式中碳水化合物异构体数量很多,构建完整的聚糖质谱文库非常耗时;2)即使所有的同分异构体都是可用的,它们也无法通过单一的质谱加以区别,需要采用多级串联质谱法获得质谱,这样获得的光谱可能会有上百个;3)将试验的MS/MS谱与所有可能的理论结构相比较是一个麻烦且费时的过程,因为可能的结构数量与聚糖的大小成指数增长;4)要精确地推演聚糖的拓扑结构,需要对每一个糖苷键进行裂解,然而,质谱通常有噪声,可能存在碎片离子的谱峰连续丢失的情况;5)在建立数据库后,需要专门的糖生物信息学工具来处理质谱数据,鉴别聚糖结构并显示结果,然而,目前可用的软件工具存在昂贵、无法高通量实施标准化LC-MS聚糖分析的缺点。

4.1.2 基于NMR的聚糖结构信息库

在NMR中,可以获得聚糖的化学位移、耦合常数和谱线形状等信息。CSDB是包含聚糖结构和核磁共振光谱数据的数据库,而一些综合性聚糖数据库如GlycomeDB中也包含了NMR的数据。GLYCOSCIENCES.de中包含了3000多个核磁共振光谱,

存储为化学位移列表^[109]。CCMRD 是第 1 个复杂碳水化合物的固态核磁共振数据库, 该数据库目前拥有超过 400 种固态核磁共振化合物的化学位移信息^[110]。针对植源性多糖, Zhao 等^[111]提出了一种索引高分辨率 ssNMR 数据来分析碳水化合物信号的统计方法, 生成模拟光谱并将其与试验数据进行比较, 以促进重要的真菌和植物多糖的鉴定, 如真菌中的几丁质和葡聚糖以及植物中的纤维素、半纤维素和果胶聚合物, 启发未来植物多糖结构的研究。

4.2 糖链异构体数据库

4.2.1 基于 IMS 的糖链 CCS 值数据库 目前, 绝大多数复合碳水化合物都是使用基于质谱 (MS) 的技术进行表征的。由于构成单糖都具有相同的原子组成和质量, 因此仅通过碳水化合物的质谱数据无法明确指定特定的分子结构。离子淌度质谱提供了额外的气相分离维度。有研究表明, 具有相同光谱碎片的异构体, 可以通过 CCS 值进一步的区分^[112]。在过去 10 年中, 离子淌度质谱 (IM-MS) 越来越多地用于分离和分析同分异构体聚糖及其共轭物。根据其形状导致的碰撞截面 (CCS) 不同, 可以分离质量相同而结构不同的分子, 即 CCS 值可作为不同结构聚糖的依据, 用作数据库中结构识别的附加搜索标准, 提供异构体种类和/或结构信息^[113]。对于小分子的代谢物, 已经发展了基于离子淌度质谱的碰撞截面预测方法和数据库^[114]。对于聚糖, 已提供 500 多个带负电荷的 *n*-聚糖及其片段的参考 CCSs 组成的校准数据集^[115], 该研究也表明葡聚糖可以用于 CCS 值测定时的校准。近年来, 研究人员尝试建立聚糖 CCS 值数据库, 如 GlycoMob^[116], 目前包含超过 1 200 个葡寡糖和 *N*-糖及其片段的参考 CCS 值, 通过 CCS 参考库匹配实现快速识别聚糖结构。目前 CCS 值在糖肽、鞘糖脂、糖胺聚糖等都有应用^[117-119], 集中于医学、制药领域^[120], 然而在食源性聚糖中应用较少。基于已知结构的植物寡糖 cIMS-cIMS 指纹图谱库, 通过分子网络 (IM-MN) 方法, 在同时考虑 *m/z* 和 CCS 的前提下, 可以洞察植物糖链在异构体水平上的结构差异, 为后续的研究提供了有益的参考^[121]。

4.2.2 基于 IMS-MS 联合低温红外光谱的糖链异

构体数据库 3.3.2 节中提到将离子淌度质谱与红外光谱联用, 可以区分糖链中的异构。基于 IM-MS 和 IRMPD 数据, 双糖在 IM-MS 中具有特定的特征, 在红外信号中有结构差异, 可以作为进一步分析未知双糖的参考指纹库, 有利于以后天然多糖中半乳糖呋喃糖的筛选^[122]。目前, 已有基于 IMS-IR 构建的参考数据集, 其中包含寡糖标准品 CCS、MSn 和 IR 振动指纹谱信息, 通过 IMSn 方法, 可以在低温 IR 光谱检测之前, 多次重新捕获、碎片化和淌度分离糖苷键碎片离子, 并分别将碎片的 IR 光谱与参考库匹配, 实现对未知糖链的精准结构鉴定^[85]。这种策略不仅有助于实现对植物多糖的从头测序, 还能够区分糖链中 α 和 β 异构。相关策略已应用于 HMO、*N*-glycan 解析中^[123-124]。

4.3 深度学习的趋势

对于聚糖的信息学分析算法从最常见的随机森林、支持向量机到人工神经网络、图卷积神经网络, 是未来的发展趋势^[125]。传统机器学习解决问题的思路一般为数据获取及预处理、特征提取及表达、特征选择、推测与识别。特征提取及表达步骤起着非常关键的作用, 实际中一般是人工提取特征, 这仍然需要消耗大量的人力和时间。而深度学习让计算机自主学习, 图神经网络利用包含在节点及其连接边中的信息, 以及包含在图的邻域和模块中的上、下文信息, 来预测单个节点和整个图的属性。SPRINT-Gly^[126]利用深度神经网络和支持向量机分别预测 *n*-连锁和 *o*-连锁糖基化位点。基于图卷积神经网络 (GCNN) 的模型 Sweetnet^[127], 使用单糖的连接和特性, 以及在一个聚糖中的连接作为输入来预测聚糖的性质。聚糖的类图性质与 GCNN 架构之间的更好匹配, 允许模型学习更多的关联和统计依赖关系, 以便用于预测。这意味着, 能够充分整合非线性的替代模型架构, 能够从聚糖序列中提取更多信息, 从而提高预测性能。

深度机器学习技术能利用复杂的算法, 运行、收集并分析大规模、异质性的糖链结构数据集, 利用已知的训练集对数据的类型和应答结果进行预测, 可以在较少人工参与的情况下自动学习特征和规律, 未来在复杂食源性糖链精准结构的解析研究中具有极大的应用潜力。

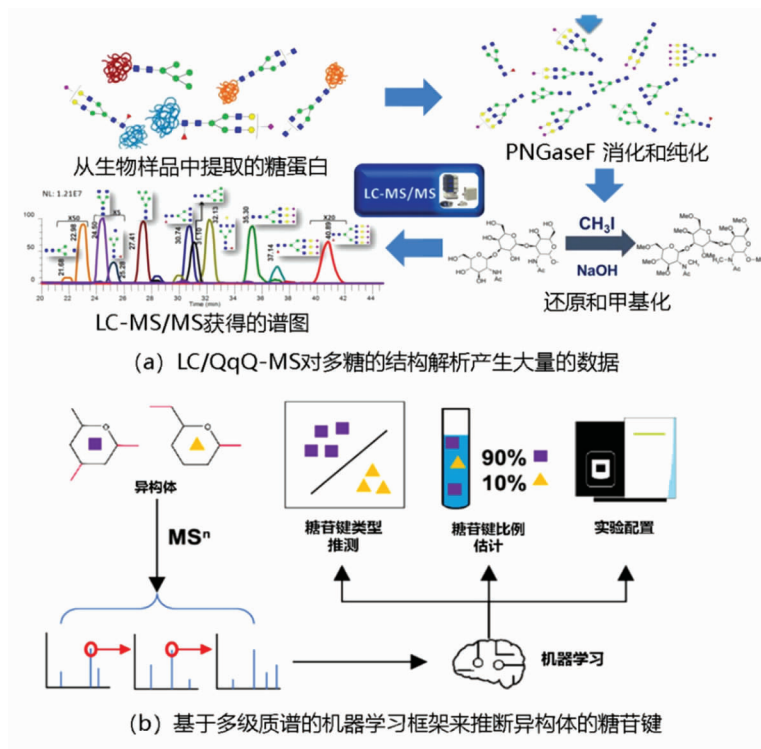


图6 基于质谱的多糖高通量结构解析结合AI分析^[13,105]

Fig.6 The high-throughput structure analysis of polysaccharides based on mass spectrometry combined with AI analysis^[13,105]

5 总结与展望

糖链解析是生命科学领域的重要课题,糖组学在医学领域对人体和细胞中的聚糖研究已有广泛的应用,而近年来聚糖在食品领域中的研究也逐渐兴起。首先,结构解析策略的进一步创新和发展,对于推进食品糖组学的应用至关重要。液相色谱—质谱联用目前是食源性多糖结构高通量解析的核心技术,而离子淌度及其与红外光谱的联用也是区分多糖结构的具有潜力的技术,支撑质谱技术对食源性碳水化合物精细结构进行高效且精准地解析。其次,另一个关键领域是糖组学生物信息学工具的设计。目前食源性多糖没有专门的质谱数据库,且食源性糖链的质谱数据数量级距离实现食源性糖组学高通量分析和信息学算法还有巨大的鸿沟。未来需要建立针对食源性多糖的高效、可控降解并联合LC-MS技术的解析方法,同时在质谱的后端建立食源性多糖数据库,基于单分子的纳米孔技术也应建立对应的数据库和机器学习方法,提供额外维度的多糖单分子结构

数据,结合信息学技术,实现对食源性多糖结构的高效解析。

聚糖在食品中广泛存在,它们的结构和组成可以影响食品的质量和食品安全。通过高通量聚糖测序,可以分析食品中的聚糖结构和组成,进行食品成分分析和质量安全检测。还可以研究食品中聚糖结构与其功能特性之间的联系,为食品配方和加工工艺的优化提供指导,促进健康食品的进一步开发。将聚糖的高通量测序与后端AI技术的整合分析结合在一起,为食源性多糖结构的进一步认识和开发提供了依据,对于食品成分分析、构效关系研究、健康食品开发、个性化营养都有重要的意义。通过高通量测序和信息软件的分析,还可以研究食源性多糖与人体肠道菌群的关系,从而为不同人群定制食谱,实现个性化营养补充。同时可为进一步明确食源性糖链精准构效关系提供理论基础,为后基因时代食源性糖组学精准测量提供有技术支撑,助力健康中国国家战略和国家生命糖质研究计划的实施,增进全人类健康福祉。

参 考 文 献

- [1] KIELY L J, HICKEY R M. Characterization and analysis of food-sourced carbohydrates[J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2370: 67-95.
- [2] BELORKAR S A, GUPTA A K. Oligosaccharides: A boon from nature's desk[J]. *AMB Express*, 2016, 6(1): 82.
- [3] MACDONALD I A. A review of recent evidence relating to sugars, insulin resistance and diabetes[J]. *Eur J Nutr*, 2016, 55(Suppl 2): 17-23.
- [4] ZIVKOVIC A M, GERMAN J B, LEBRILLA C B, et al. Human milk glycomiome and its impact on the infant gastrointestinal microbiota[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108 (Suppl 1): 4653-4658.
- [5] HIBBERD M C, WEBBER D M, RODIONOV D A, et al. Bioactive glycans in a microbiome-directed food for children with malnutrition[J]. *Nature*, 2024, 625(7993): 157-165.
- [6] THAYSEN-ANDERSEN M, KOLARICH D, PACKER N H. Glycomics & glycoproteomics: From analytics to function[J]. *Mol Omics*, 2021, 17(1): 8-10.
- [7] PENG W, GUTIERREZ REYES C D, GAUTAM S, et al. MS-based glycomics and glycoproteomics methods enabling isomeric characterization[J]. *Mass Spectrom Rev*, 2023, 42(2): 577-616.
- [8] TRBOJEVIC-AKMACIC I, LAGEVEEN-KAMMEIJER G S M, HEIJS B, et al. High-throughput glycomic methods[J]. *Chem Rev*, 2022, 122(20): 15865-15913.
- [9] LIU H, XU J X, XU X Y, et al. Structure/function relationships of bean polysaccharides: A review[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2023, 63(3): 330-344.
- [10] WANG X Y, ZHANG D D, YIN J Y, et al. Recent developments in *Hericium erinaceus* polysaccharides: Extraction, purification, structural characteristics and biological activities[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2019, 59(sup1): S96-S115.
- [11] 聂少平, 唐炜, 殷军艺, 等. 食源性多糖结构和生理功能研究概述[J]. *中国食品学报*, 2018, 18(12): 1-12.
- NIE S P, TANG W, YIN J Y, et al. Research on structure and physiological function of foodborne polysaccharides[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2018, 18(12): 1-12.
- [12] WU Y, ZHOU H, WEI K H, et al. Structure of a new glycyrrhiza polysaccharide and its immunomodulatory activity[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1007186.
- [13] ZHOU S, WOODING K M, MECHREF Y. Analysis of permethylated glycan by liquid chromatography (LC) and mass spectrometry (MS)[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1503: 83-96.
- [14] LUO D H, WANG Z J, ZHOU R, et al. A polysaccharide from *Umbilicaria yunnana*: Structural characterization and anti-inflammation effects[J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 151: 870-877.
- [15] BLACK I, HEISS C, CARLSON R W, et al. Linkage analysis of oligosaccharides and polysaccharides: A tutorial[J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2271: 249-271.
- [16] HAKOMORI S. A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide[J]. *J Biochem*, 1964, 55: 205-208.
- [17] REN Y, BAI Y P, ZHANG Z D, et al. The preparation and structure analysis methods of natural polysaccharides of plants and fungi: A review of recent development[J]. *Molecules*, 2019, 24(17): 3122.
- [18] COLEMAN T J. Minimizing advertising risks [J]. *Health Mark Q*, 1984, 2(1): 83-89.
- [19] JOHNSON S B, BROWN R E. Simplified derivatization for determining sphingolipid fatty acyl composition by gas chromatography-mass spectrometry[J]. *J Chromatogr*, 1992, 605(2): 281-286.
- [20] DUUS J, GOTFREDSEN C H, BOCK K. Carbohydrate structural determination by NMR spectroscopy: Modern methods and limitations[J]. *Chem Rev*, 2000, 100(12): 4589-4614.
- [21] CAO W Q, LIU M Q, KONG S Y, et al. Novel methods in glycomics: A 2019 update[J]. *Expert Rev Proteomics*, 2020, 17(1): 11-25.
- [22] GRABARICS M, LETTOW M, KIRSCHBAUM C, et al. Mass spectrometry-based techniques to elucidate the sugar code[J]. *Chem Rev*, 2022, 122(8): 7840-7908.
- [23] AUER F, JARVAS G, GUTTMAN A. Recent advances in the analysis of human milk oligosaccharides by liquid phase separation methods[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2021, 1162: 122497.

- [24] DANG L Y, SHEN J C, ZHAO T, et al. Recognition of bisecting *N*-glycans on intact glycopeptides by two characteristic ions in tandem mass spectra [J]. *Anal Chem*, 2019, 91(9): 5478–5482.
- [25] SUN X J, LI L Y, OVERDIER K H, et al. Analysis of total human urinary glycosaminoglycan disaccharides by liquid chromatography–tandem mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2015, 87(12): 6220–6227.
- [26] TAO N, DEPETERS E J, FREEMAN S, et al. Bovine milk glycome[J]. *J Dairy Sci*, 2008, 91(10): 3768–3778.
- [27] HONG Q T, RUHAAK L R, TOTTEEN S M, et al. Label-free absolute quantitation of oligosaccharides using multiple reaction monitoring[J]. *Anal Chem*, 2014, 86(5): 2640–2647.
- [28] HUANG J C, KAILEMIA M J, GOONATILLEKE E, et al. Quantitation of human milk proteins and their glycoforms using multiple reaction monitoring (MRM) [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2017, 409(2): 589–606.
- [29] SONG E, PYREDDY S, MECHREF Y. Quantification of glycopeptides by multiple reaction monitoring liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2012, 26(17): 1941–1954.
- [30] MANK M, WELSCH P, HECK A J R, et al. Label-free targeted LC–ESI–MS (2) analysis of human milk oligosaccharides (HMOS) and related human milk groups with enhanced structural selectivity[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2019, 411(1): 231–250.
- [31] SUN X J, GUO Z M, YU M Q, et al. Hydrophilic interaction chromatography–multiple reaction monitoring mass spectrometry method for basic building block analysis of low molecular weight heparins prepared through nitrous acid depolymerization[J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1479: 121–128.
- [32] YU Y L, ZHANG F M, COLON W, et al. Glycosaminoglycans in human cerebrospinal fluid determined by LC–MS/MS MRM[J]. *Anal Biochem*, 2019, 567: 82–84.
- [33] ZHANG W Y, WANG T, CHEN X X, et al. Absolute quantification of twelve oligosaccharides in human milk using a targeted mass spectrometry–based approach[J]. *Carbohydr Polym*, 2019, 219: 328–333.
- [34] CASTILLO J J, GALERMO A G, AMICUCCI M J, et al. A Multidimensional mass spectrometry–based workflow for de novo structural elucidation of oligosaccharides from polysaccharides[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2021, 32(8): 2175–2185.
- [35] PAVIANI B, MASARWEH C, BHATTACHARYA M, et al. Eat your beets: Conversion of polysaccharides into oligosaccharides for enhanced bioactivity [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 256(Pt 2): 128472.
- [36] LI Y, LIANG J, GAO J N, et al. A novel LC–MS/MS method for complete composition analysis of polysaccharides by aldononitrile acetate and multiple reaction monitoring[J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 272: 118478.
- [37] NANDITA E, BACALZO N P JR, RANQUE C L, et al. Polysaccharide identification through oligosaccharide fingerprinting[J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 257: 117570.
- [38] 张磊. 超高效液相色谱–串联质谱法测定乳清蛋白运动营养粉多糖的单糖组成及含量[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(8): 279–288.
ZHANG L. Determination of monosaccharide composition and content of polysaccharide from sports nutrition powder of whey protein by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry [J]. *Food Industry Science and Technology*, 2023, 44(8): 279–288.
- [39] LIU B, LU J J, AI C Q, et al. Quick characterization of uronic acid–containing polysaccharides in 5 shellfishes by oligosaccharide analysis upon acid hydrolysis[J]. *Carbohydr Res*, 2016, 435: 149–155.
- [40] GALERMO A G, NANDITA E, BARBOZA M, et al. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry approach for determining glycosidic linkages[J]. *Anal Chem*, 2018, 90(21): 13073–13080.
- [41] GALERMO A G, NANDITA E, CASTILLO J J, et al. Development of an extensive linkage library for characterization of carbohydrates[J]. *Anal Chem*, 2019, 91(20): 13022–13031.
- [42] AMICUCCI M J, NANDITA E, GALERMO A G, et al. A nonenzymatic method for cleaving polysaccharides to yield oligosaccharides for structural analysis[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 3963.
- [43] YU L S, LIANG J, ZHANG Y, et al. Enzymatic–fingerprinting workflow of polysaccharides in *Hericium erinaceus* fruiting bodies: From HILIC–ESI(–)–

- MS screening to targeted MIM profiling[J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 173: 491–503.
- [44] XIA Y G, YU L S, LIANG J, et al. Chromatography and mass spectrometry –based approaches for perception of polysaccharides in wild and cultured fruit bodies of *Auricularia auricular-judae*[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 137: 1232–1244.
- [45] LOGTENBERG M J, DONNERS K M H, VINK J C M, et al. Touching the high complexity of prebiotic vivinal galacto –oligosaccharides using porous graphitic carbon ultra–high–performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry[J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(29): 7800–7808.
- [46] ELLINGSON D J, RUOSCH A J, FOSTER K L, et al. Analysis of six human milk oligosaccharides (HMO) in infant formula and adult nutritionals by 2AB labeling and quantification with HILIC –FLD: First action 2022.02[J]. *J AOAC Int*, 2022, 106(1): 112–126.
- [47] JI E S, LEE H K, PARK G W, et al. Isomer separation of sialylated O– and N–linked glycopeptides using reversed–phase LC–MS/MS at high temperature[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2019, 1110–1111: 101–107.
- [48] SOLAKYILDIRIM K. Recent advances in glycosaminoglycan analysis by various mass spectrometry techniques[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2019, 411(17): 3731–3741.
- [49] BECCATI D, ROY S, YU F, et al. Identification of a novel structure in heparin generated by potassium permanganate oxidation[J]. *Carbohydr Polym*, 2010, 82(3): 699–705.
- [50] WANDEE Y, UTTAPAP D, MISCHNICK P, et al. Production of pectic –oligosaccharides from pomelo peel pectin by oxidative degradation with hydrogen peroxide[J]. *Food Chem*, 2021, 348: 129078.
- [51] LI X, LIANG J, ZHANG D Y, et al. Low–polymerization compositional fingerprinting for characterization of *Schisandra* polysaccharides by hydrophilic interaction liquid chromatography –electrospray mass spectrometry[J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 185: 983–996.
- [52] PANDEIRADA C O, HAGEMAN J A, JANSSEN H G, et al. Identification of plant polysaccharides by MALDI–TOF MS fingerprinting after periodate oxidation and thermal hydrolysis[J]. *Carbohydr Polym*, 2022, 292: 119685.
- [53] AMICUCCI M J, GALERMO A G, GUERRERO A, et al. Strategy for structural elucidation of polysaccharides: Elucidation of a maize mucilage that harbors diazotrophic bacteria[J]. *Anal Chem*, 2019, 91(11): 7254–7265.
- [54] CHO B G, BANAZADEH A, PENG W, et al. Determination of isomeric glycan structures by permethylation and liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS)[J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2271: 281–301.
- [55] SHE Y M, TAM R Y, LI X, et al. Resolving isomeric structures of native glycans by nanoflow porous graphitized carbon chromatography –mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2020, 92(20): 14038–14046.
- [56] LEACH F E, 3RD, LY M, LAREMORE T N, et al. Hexuronic acid stereochemistry determination in chondroitin sulfate glycosaminoglycan oligosaccharides by electron detachment dissociation[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2012, 23(9): 1488–1497.
- [57] LIU X Y, ANGE K S, LIN L, et al. Top–down and bottom–up analysis of commercial enoxaparins[J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1480: 32–40.
- [58] YE H P, TOBY T K, SOMMERS C D, et al. Characterization of currently marketed heparin products: Key tests for LMWH quality assurance[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 85: 99–107.
- [59] LI L Y, LY M, LINHARDT R J. Proteoglycan sequence[J]. *Mol Biosyst*, 2012, 8(6): 1613–1625.
- [60] LI L Y, ZHANG F M, ZAIA J, et al. Top–down approach for the direct characterization of low molecular weight heparins using LC–FT–MS[J]. *Anal Chem*, 2012, 84(20): 8822–8829.
- [61] LETTOW M, GRABARICS M, MUCHA E, et al. IR action spectroscopy of glycosaminoglycan oligosaccharides[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2020, 412(3): 533–537.
- [62] HO J S, GHARBI A, SCHINDLER B, et al. Distinguishing galactoside isomers with mass spectrometry and gas–phase infrared spectroscopy[J]. *J Am Chem Soc*, 2021, 143(28): 10509–10513.
- [63] SCHINDLER B, BARNES L, RENOIS G, et al. Anomeric memory of the glycosidic bond upon fragmentation and its consequences for carbohydrate sequencing[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 973.

- [64] SCHINDLER B, LALOY-BORGNA G, BARNES L, et al. Online separation and identification of isomers using infrared multiple photon dissociation ion spectroscopy coupled to liquid chromatography: Application to the analysis of disaccharides regio-isomers and monosaccharide anomers[J]. *Anal Chem*, 2018, 90(20): 11741-11745.
- [65] 付彬, 梁宇颖, 陆豪杰. 离子迁移谱-质谱技术及其在蛋白质糖基化研究中的应用[J]. *质谱学报*, 2022, 43(5): 564-579.
- FU B, LIANG Y Y, LU H J. Ion migration spectrometry and its application in the study of protein glycosylation[J]. *Chinese Journal of Mass Spectrometry*, 2022, 43(5): 564-579.
- [66] HARVEY D J, WATANABE Y, ALLEN J D, et al. Collision cross sections and ion mobility separation of fragment ions from complex *N*-glycans[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2018, 29(6): 1250-1261.
- [67] GRAY C J, THOMAS B, UPTON R, et al. Applications of ion mobility mass spectrometry for high throughput, high resolution glycan analysis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1860(8): 1688-1709.
- [68] STRUWE W B, HARVEY D J. Ion mobility-mass spectrometry of glycoconjugates[J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2084: 203-219.
- [69] LEIJDEKKERS A G, HUANG J H, BAKX E J, et al. Identification of novel isomeric pectic oligosaccharides using hydrophilic interaction chromatography coupled to traveling-wave ion mobility mass spectrometry[J]. *Carbohydr Res*, 2015, 404: 1-8.
- [70] RATHAHAO-PARIS E, DELVAUX A, LI M, et al. Rapid structural characterization of human milk oligosaccharides and distinction of their isomers using trapped ion mobility spectrometry time-of-flight mass spectrometry[J]. *J Mass Spectrom*, 2022, 57(10): e4885.
- [71] ROJAS-MACIAS M A, MARIETHOZ J, ANDERSON P, et al. Towards a standardized bioinformatics infrastructure for *N*- and *O*-glycomics[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3275.
- [72] CHI C H, WANG Y S, NG L T. Structural characterization of mushroom polysaccharides by cyclic ion mobility-mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2022, 1680: 463445.
- [73] GRAY C J, SCHINDLER B, MIGAS L G, et al. Bottom-up elucidation of glycosidic bond stereochemistry[J]. *Anal Chem*, 2017, 89(8): 4540-4549.
- [74] MANZ C, PAGEL K. Glycan analysis by ion mobility-mass spectrometry and gas-phase spectroscopy [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2018, 42: 16-24.
- [75] PALLISTER E G, CHOO M S F, WALSH I, et al. Utility of ion-mobility spectrometry for deducing branching of multiply charged glycans and glycopeptides in a high-throughput positive ion LC-FLR-IMS-MS workflow[J]. *Anal Chem*, 2020, 92(23): 15323-15335.
- [76] OGANESYAN I, HAJDUK J, HARRISON J A, et al. Exploring gas-phase MS methodologies for structural elucidation of branched *N*-glycan isomers [J]. *Anal Chem*, 2022, 94(29): 10531-10539.
- [77] 于静静, 王磊, 刘全俊. 纳米孔单分子分析技术研究进展[J]. *材料导报*, 2015, 29(5): 110-115.
- YU J J, WANG L, LIU Q J. Research progress of nanopore single-molecule analysis[J]. *Materials Review*, 2015, 29(5): 110-115.
- [78] BAYAT P, RAMBAUD C, PRIEM B, et al. Comprehensive structural assignment of glycosaminoglycan oligo- and polysaccharides by protein nanopore[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 5113.
- [79] LI M M, XIONG Y T, CAO Y C, et al. Identification of tagged glycans with a protein nanopore[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 1737.
- [80] XIA B Q, FANG J, MA S Z, et al. Mapping the acetylamino and carboxyl groups on glycans by engineered alpha-hemolysin nanopores[J]. *J Am Chem Soc*, 2023, 145(34): 18812-18824.
- [81] XIA K, HAGAN J T, FU L, et al. Synthetic heparan sulfate standards and machine learning facilitate the development of solid-state nanopore analysis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(11): e2022806118.
- [82] ZHANG S Y, CAO Z Y, FAN P P, et al. Discrimination of disaccharide isomers of different glycosidic linkages using a modified *MspA* nanopore [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2023, 63(8): e202316766.
- [83] ZHANG S Y, CAO Z Y, FAN P P, et al. A nanopore-based saccharide sensor[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2022, 61(33): e202203769.
- [84] WU X, DELBIANCO M, ANGGARA K, et al. Imaging single glycans[J]. *Nature*, 2020, 582(7812): 375-378.

- [85] ANGGARA K, SRSAN L, JAROENTOMEETCHAI T, et al. Direct observation of glycans bonded to proteins and lipids at the single-molecule level [J]. *Science*, 2023, 382(6667): 219–223.
- [86] 敖娇, 鲍家科, 夏玉吉, 等. 不同提取方法对金钗石斛多糖形貌结构的影响[J]. *中成药*, 2018, 40(7): 1648–1652.
AO J, BAO J K, XIA Y J, et al. Effect of different extraction methods on the morphology and structure of polysaccharide from *Dendrobium nobile* [J]. *Chinese Patent Medicine*, 2018, 40(7): 1648–1652.
- [87] HE P F, ZHANG A Q, ZHANG F M, et al. Structure and bioactivity of a polysaccharide containing uronic acid from *Polyporus umbellatus sclerotia*[J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 152: 222–230.
- [88] KAVITAKE D, DEVI P B, SINGH S P, et al. Characterization of a novel galactan produced by *Weissella confusa* KR780676 from an acidic fermented food[J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 86: 681–689.
- [89] 唐翠娥, 周培源, 刘延照, 等. 基于原子力显微镜研究黄原胶分子结构的云母片处理方法优化[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(14): 60–66.
TANG C E, ZHOU P Y, LIU Y Z, et al. Optimization of mica sheet processing method for molecular structure study of Xanthan gum based on atomic force microscopy[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2023, 44(14): 60–66.
- [90] 张红运, 杨立娜, 朱丹实, 等. 基于原子力显微图像和流变学特性的大豆种皮多糖构象分析[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(9): 38–46.
ZHANG H Y, YANG L N, ZHU D S, et al. Conformation analysis of soybean seed coat polysaccharides based on atomic force microscopic images and rheological properties[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(9): 38–46.
- [91] ZHANG X, HONG L, ZHU B J, et al. Atomic force microscopy based conformation and immunological activity of *Lentinan injections*[J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 253(Pt 3): 126901.
- [92] GIANNOTTI M I, VANCOSO G J. Interrogation of single synthetic polymer chains and polysaccharides by AFM-based force spectroscopy[J]. *Chemphyschem*, 2007, 8(16): 2290–2307.
- [93] QIAN L, ZHANG K, GUO X, et al. What happens when chitin becomes chitosan? A single-molecule study[J]. *RSC Adv*, 2023, 13(4): 2294–2300.
- [94] CAI Y, ZHANG B C, LIANG L Y, et al. A solid-state nanopore-based single-molecule approach for label-free characterization of plant polysaccharides[J]. *Plant Commun*, 2021, 2(2): 100106.
- [95] POGGI M A, GADSBY E D, BOTTOMLEY L A, et al. Scanning probe microscopy[J]. *Anal Chem*, 2004, 76(12): 3429–3443.
- [96] WANG R W, LU D Q, BAI H R, et al. Using modified aptamers for site specific protein-aptamer conjugations[J]. *Chem Sci*, 2016, 7(3): 2157–2161.
- [97] ABRAHAMS J L, TAHERZADEH G, JARVAS G, et al. Recent advances in glycoinformatic platforms for glycomics and glycoproteomics[J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2020, 62: 56–69.
- [98] LUTTEKE T, BOHNE-LANG A, LOSS A, et al. GLYCOSCIENCES.de: An Internet portal to support glycomics and glycobiology research[J]. *Glycobiology*, 2006, 16(5): 71R–81R.
- [99] RAMAN R, VENKATARAMAN M, RAMAKRISHNAN S, et al. Advancing glycomics: Implementation strategies at the consortium for functional glycomics [J]. *Glycobiology*, 2006, 16(5): 82R–90R.
- [100] HASHIMOTO K, GOTO S, KAWANO S, et al. KEGG as a glycome informatics resource[J]. *Glycobiology*, 2006, 16(5): 63R–70R.
- [101] DURHAM S D, WEI Z, LEMAY D G, et al. Creation of a milk oligosaccharide database, MilkOligoDB, reveals common structural motifs and extensive diversity across mammals[J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 10345.
- [102] POLASKY D A, NESVIZHSHKII A I. Recent advances in computational algorithms and software for large-scale glycoproteomics[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2023, 72: 102238.
- [103] SHIPMAN J, SOMMERS C, KEIRE D A, et al. Comprehensive *N*-glycan mapping using parallel reaction monitoring LC-MS/MS[J]. *Pharm Res*, 2023, 40(6): 1399–1410.
- [104] ZHANG X, REED C E, BIRDSALL R E, et al. High-Throughput analysis of fluorescently labeled *N*-glycans derived from biotherapeutics using an automated LC-MS-based solution[J]. *SLAS Technol*, 2020, 25(4): 380–387.
- [105] NI X, MURRAY N B, ARCHER-HARTMANN S,

- et al. Toward automatic inference of glycan linkages using MS (n) and machine learning horizontal line proof of concept using sialic acid linkages[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2023, 34(10): 2127–2135.
- [106] HSU H C, LIEW C Y, HUANG S P, et al. Simple method for de novo structural determination of underivatized glucose oligosaccharides[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 5562.
- [107] HSU H C, LIEW C Y, HUANG S P, et al. Simple approach for de novo structural identification of mannose trisaccharides[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2018, 29(3): 470–480.
- [108] REMOROZA C A, MAK T D, DE LEOZ M L A, et al. Creating a mass spectral reference library for oligosaccharides in human milk[J]. *Anal Chem*, 2018, 90(15): 8977–8988.
- [109] LOSS A, LUTTEKE T. Using NMR data on GLYCOSCIENCES.de[J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1273: 87–95.
- [110] KANG X, ZHAO W, DICKWELLA WIDANAGE M C, et al. CCMRD: A solid-state NMR database for complex carbohydrates[J]. *J Biomol NMR*, 2020, 74(4/5): 239–245.
- [111] ZHAO W, DEBNATH D, GAUTAM I, et al. Charting the solid-state NMR signals of polysaccharides: A database-driven roadmap[J/OL]. *Magn Reson Chem*, 2023[2023-09-19]. <https://www.x-mol.com/paper/1704747400528941056?Adv>.
- [112] HOFMANN J, STUCKMANN A, CRISPIN M, et al. Identification of lewis and blood group carbohydrate epitopes by ion mobility-tandem-mass spectrometry fingerprinting[J]. *Anal Chem*, 2017, 89(4): 2318–2325.
- [113] PAGEL K, HARVEY D J. Ion mobility-mass spectrometry of complex carbohydrates: Collision cross sections of sodiated *N*-linked glycans[J]. *Anal Chem*, 2013, 85(10): 5138–5145.
- [114] ASEF C K, RAINEY M A, GARCIA B M, et al. Unknown metabolite identification using machine learning collision cross-section prediction and tandem mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2023, 95(2): 1047–1056.
- [115] HOFMANN J, STRUWE W B, SCARFF C A, et al. Estimating collision cross sections of negatively charged *N*-glycans using traveling wave ion mobility-mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2014, 86(21): 10789–10795.
- [116] STRUWE W B, PAGEL K, BENESCH J L, et al. GlycoMob: An ion mobility-mass spectrometry collision cross section database for glycomics[J]. *Glycoconj J*, 2016, 33(3): 399–404.
- [117] GLASKIN R S, KHATRI K, WANG Q, et al. Construction of a database of collision cross section values for glycopeptides, glycans, and peptides de-termined by IM-MS[J]. *Anal Chem*, 2017, 89(8): 4452–4460.
- [118] MILLER R L, GUIMOND S E, SCHWORER R, et al. Shotgun ion mobility mass spectrometry sequencing of heparan sulfate saccharides[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1481.
- [119] WONGTRAKUL-KISH K, WALSH I, SIM L C, et al. Combining glucose units, *m/z*, and collision cross section values: Multiattribute Data for increased accuracy in automated glycosphingolipid glycan identifications and its application in triple negative breast cancer [J]. *Anal Chem*, 2019, 91(14): 9078–9085.
- [120] MANABE N, OHNO S, MATSUMOTO K, et al. A data set of ion mobility collision cross sections and liquid chromatography retention times from 71 pyridylaminated *N*-linked oligosaccharides[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2022, 33(9): 1772–1783.
- [121] OLLIVIER S, FANUEL M, ROGNIAUX H, et al. Molecular networking of high-resolution tandem ion mobility spectra: A structurally relevant way of organizing data in glycomics?[J]. *Anal Chem*, 2021, 93(31): 10871–10878.
- [122] FAVREAU B, YENI O, OLLIVIER S, et al. Synthesis of an exhaustive library of naturally occurring Galf-Manp and Galp-Manp disaccharides. Toward fingerprinting according to ring size by advanced mass spectrometry-based IM-MS and IRMPD[J]. *J Org Chem*, 2021, 86(9): 6390–6405.
- [123] ABIKHODR A H, BEN FALEH A, WARNKE S, et al. Identification of human milk oligosaccharide positional isomers by combining IMS-CID-IMS and cryogenic IR spectroscopy[J]. *Analyst*, 2023, 148(10): 2277–2282.
- [124] BEN FALEH A, WARNKE S, BANSAL P, et al. Identification of mobility-resolved *N*-glycan isomers [J]. *Anal Chem*, 2022, 94(28): 10101–10108.
- [125] BOJAR D, LISACEK F. Glycoinformatics in the ar-

- tificial intelligence era[J]. *Chem Rev*, 2022, 122(20): 15971–15988.
- [126] TAHERZADEH G, DEHZANGI A, GOLCHIN M, et al. SPRINT–Gly: Predicting *N*- and *O*-linked glycosylation sites of human and mouse proteins by using sequence and predicted structural properties [J]. *Bioinformatics*, 2019, 35(20): 4140–4146.
- [127] BURKHOLZ R, QUACKENBUSH J, BOJAR D. Using graph convolutional neural networks to learn a representation for glycans[J]. *Cell Rep*, 2021, 35(11): 109251.

Frontiers and Prospects of New Technologies for Structural Analysis of Food-Derived Carbohydrates

Chen Shiguo, Zhang Weixi, Zhu Kai, Hou Zhiqiang, Ye Xingqian

(College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, National-Local Joint Engineering Laboratory of Intelligent Food Technology and Equipment, Zhejiang Provincial Key Laboratory of Exploration and High-value Utilization of Edible Agricultural Products Resources, Hangzhou 310058)

Abstract Carbohydrates not only provide the main source of energy for humans, but also have important functions such as maintaining intestinal health, regulating blood sugar and cholesterol levels, promoting metabolism, and supporting the immune system. Therefore, exploring the precise structure–activity relationship of foodborne carbohydrates has become an important scientific problem. However, compared to genomics and proteomics, the inherent structural diversity and complexity of foodborne carbohydrates pose a major challenge to their study, which lags far behind that of proteins and lipid macromolecules. Based on this, this review focuses on the breakthrough of liquid chromatography and mass spectrometry (LC–MS), ion mobility mass spectrometry (IM–MS) and low–temperature infrared spectroscopy in the analysis of foodborne sugar chains on the basis of classical sugar chain analysis methods, and further discusses the application of the latest computer processing methods and analysis techniques in the analysis of foodborne sugar chain. This review not only aims to gain a deeper understanding of strategies for foodborne carbohydrate analysis, but also looks at future trends leading to high–throughput, accurate foodborne sugar bioinformatics.

Keywords foodborne polysaccharides; structural analysis; mass spectrometry; sugar bioinformatics