

柑橘囊衣果胶多糖及其降解产物硫酸酯化对抗肿瘤活性的影响

朱 凯¹, 刘闪闪¹, 叶兴乾^{1,2,3}, 陈士国^{1,2,3*}

(¹浙江大学生物系统工程与食品科学学院 智能食品加工技术与装备国家地方联合工程实验室

浙江省农产品加工技术研究重点实验室 南方果蔬保鲜技术集成科研基地

浙江省健康食品制造与品质控制国际合作基地 杭州 310058

²浙江大学馥莉食品研究院 杭州 310058

³浙江大学宁波研究院 浙江宁波 315100)

摘要 果胶是广泛存在于植物细胞壁中的大分子多糖,具有多种生理活性功能。有研究发现对多糖进行改性,可以提高其生物活性。本文以柑橘罐头废水中回收的柑橘囊衣果胶(PP)及其降解寡糖(POS1 和 POS2)为研究对象,通过硫代巴比妥酸(TBA)和二甲基亚砷(DMSO)两种方法进行硫酸酯化,提高其活性。分子质量和单糖组成分析表明:经两种体系硫酸酯化后,果胶多糖和寡糖分子质量均降低,且均有阿拉伯糖和半乳糖单糖单元脱落。采用傅里叶变换红外光谱(FTIR)、核磁共振谱(NMR)对柑橘囊衣果胶多糖及其硫酸酯产物进行结构分析,各组分的半乳糖醛酸的 H4 在硫酸酯化后出现低场位移动,POS1 的半乳糖异头氢和 POS2 的阿拉伯糖异头氢信号均向低场位移动,说明在主链和侧链均发生硫酸酯化。细胞模型试验表明,对柑橘囊衣果胶寡糖 POS1 及 POS2 进行硫酸酯化后,其体外抗肿瘤活性增强。其中,POS1-T 的效果最佳,为 30.25%。这说明硫酸化可有效提高果胶的抗肿瘤效果。

关键词 果胶;寡糖;硫酸酯化;柑橘囊衣;抗肿瘤

文章编号 1009-7848(2022)02-0023-08 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2022.02.003

硫酸化多糖是指在糖单元羟基上含有硫酸根的多糖,包括直接从植物中提取的,人工合成的天然中性多糖的硫酸衍生物^[1]。多糖硫酸化后,硫酸化的羟基显示出位阻和静电排斥的变化。此外,多糖链的弯曲和延伸以及水溶性增加,导致生物学活性的改变^[2]。大量研究表明,与未硫酸化的多糖相比,硫酸化的多糖具有更好的生物特性,如硫酸软骨素、褐藻多糖硫酸酯、肝素等具有抗凝血、抗癌^[3]、抑制糖尿病^[4]等生理活性。研究者尝试将不同来源的植物多糖进行硫酸酯化改性,赋予其更强的生理活性^[5-7]。多糖硫酸酯化修饰是用硫酸基团取代大分子糖基单元的羟基,形成半合成酸性多糖,导致其空间结构和理化性质发生改变,使某些活性降低或不具活性的糖类物质产生新活性^[8]。如 Xie 等^[6]对青钱柳多糖进行硫酸酯化,增强了其抗氧化性。

果胶是一类广泛分布于植物细胞壁的复杂性杂多糖^[9]。根据果胶结构形式的不同,可将其分为 3 种类型,即:同型半乳糖醛酸聚糖(Homogalacturonan, HG)、鼠李半乳糖醛酸聚糖 I(Rhamn-galacturonan I, RGI)和鼠李半乳糖醛酸聚糖 II(Rhamngalaeturonan II, RGII)^[10-11]。果胶具有良好的乳化、增稠、稳定和凝胶性能,被广泛应用于食品、医药和其它工业上^[12-13]。越来越多的研究表明,果胶还具有改善肠道环境^[4]、控制肥胖、抗肿瘤^[15]等多种生理活性。柑橘罐头生产过程中会产生较多的酸水、碱水等工业废水,如不加以回收利用而直接排放,就会对环境造成极大污染,并浪费废水中的糖类等资源。本课题组研究人员前期从柑橘罐头的生产废水中回收柑橘囊衣果胶多糖,结果发现其具有高 RG-I 含量特征,并具有优异的益生、抗癌活性^[16]。通过过氧化氢-铜离子(H₂O₂-Cu²⁺)、超声-过氧化氢-抗坏血酸(US-H₂O₂-VC)两种降解体系,对柑橘囊衣果胶进行降解,提高了其生物活性^[17]。

常见的多糖硫酸化修饰方法包括氯磺酸-甲酰胺法、氯磺酸-嘧啶法、N(SO₃Na)₃法、三氧化

收稿日期: 2021-02-21

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31871815);浙江省重大专项(2020C02033)

作者简介: 朱凯(1992—),男,硕士

通信作者: 陈士国 E-mail: chenshiguo210@163.com

硫-嘧啶法等。本文参考作者所在实验室对柑橘果胶的硫酸酯化及其活性的研究结果^[18],通过TBA和DMSO两种方法进行硫酸酯化,并探究柑橘囊衣果胶多糖及其硫酸酯产物的结构和活性。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

柑橘囊衣果胶多糖(PP, $M_w=792$ ku)提取自生产柑橘罐头中产生的废水^[16],果胶降解产物POS1($500 \text{ u} < \text{POS1} < 3 \text{ ku}$)和POS2($3 \text{ ku} < \text{POS2} < 5 \text{ ku}$)采用 $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Cu}^{2+}$ 体系制备^[17]。

葡聚糖标品,美国Sigma公司;重水,美国CIL公司;DMEM培养基,美国Gibco公司;MCF-7细胞系,中国科学院;其它试剂均为分析纯,国药集团化学试剂公司。

1.2 仪器与设备

Waters 2659 高效液相色谱仪(Waters2414 示差检测器,Waters PDAU1966 检测器),美国Waters公司;3K15离心机,美国Sigma-Aldrich公司;MS105DU电子天平,瑞士METTLER TOLEDO公司;1510全波长酶标仪、Nicolet5700红外光谱仪,美国Thermo公司。

1.3 试验方法

1.3.1 柑橘囊衣果胶多糖及其降解产物硫酸酯化

1.3.1.1 三氧化硫吡啶-DMSO体系硫酸酯化 称取200 mg PP、POS1、POS2各3份,分别加入20 mL DMSO进行溶胀,磁力搅拌12 h后加入三氧化硫复合物溶液(2 g SO_3 吡啶复合物溶于4 mL DMSO),于80 °C下反应3 h,待反应液冷却后滴加100 mL冰水,纯净水透析72 h(每4 h更换一次水),将所得溶液真空冷冻干燥,产物分别记为PP-D、POS1-D及POS2-D并置于干燥器中备用。

1.3.1.2 TBA-三氧化硫吡啶-DMSO体系硫酸酯化 称取PP、POS1、POS2各3份,将其溶于超纯水中,完全溶解后,制成果胶溶液。用TBA滴定至pH值在6.0~6.5之间后,冷冻干燥,制得果胶TBA盐。

称取200 mg果胶TBA盐3份,分别加入10 mL DMSO进行溶胀,磁力搅拌12 h后加入三氧化硫吡啶复合物溶液(2 g SO_3 吡啶复合物溶于4 mL DMSO),于室温下反应3 h,待反应后滴加入

100 mL冰水,纯净水透析72 h(每4 h更换一次水),将所得溶液真空冷冻干燥,产物分别记为PP-T、POS1-T及POS2-T并置于干燥器中备用。

1.3.2 柑橘囊衣果胶硫酸酯及果胶降解产物硫酸酯结构分析

1.3.2.1 红外光谱分析(FTIR) 分别取0.5 mg PP、PP-D、PP-T、POS1、POS1-D、POS1-T、POS2、POS2-D、及POS2-T干燥样品与KBr以1:100的比例混匀,经压片机压片,利用Nicolet 5700红外光谱仪上测定,扫描波长范围为450~4 500 cm^{-1} 。

1.3.2.2 分子质量分析(HPSEC) 分别称取1,3,5,12,50,80,150,270,410 ku分子质量的葡聚糖标品及样品2 mg,分别溶于1 mL超纯水中,过0.45 μm 水膜。HPSEC检测条件:Waters 2695高效液相色谱仪,流动相0.2 mol/L NaCl溶液,流速0.5 mL/min,进样量20 μL ;Waters Ultrahydrogel 250及Waters Ultrahydrogel 500,柱温40 °C;Waters 2414示差检测器,40 °C。

1.3.2.3 单糖组成分析 配制标准单糖(甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖、岩藻糖)的混合溶液(各单糖浓度为2 mmol/L)。取上述混合溶液400 μL 于离心管中,加入0.3 mol/L NaOH溶液450 μL ,0.5 mol/L PMP(甲醇)450 μL ,混匀,置于70 °C水浴锅中反应30 min后,取出并冷却至室温,加入0.3 mol/L HCl 450 μL 中和,离心去沉淀,加水至1 mL,加入1 mL氯仿进行萃取,充分震荡、离心并收集水相,重复3次,过0.45 μm 水膜备用。

分别取PP、PP-D、PP-T、POS1、POS1-D、POS1-T、POS2、POS2-D、及POS2-T(2 mg)溶于1 mL纯净水中,加入1 mL 4 mol/L TFA,置于具塞试管中、氮气封口,110 °C水解8 h,冷却至室温,加入200 μL 甲醇,一边用水浴(70 °C)升温,一边氮气吹干(或者离心浓缩),反复3次,待衍生化。

参考Zhang等^[19]方法,并作适当调整。流动相:A相:体积分数15%乙腈+0.05 mol/L pH=6.8的磷酸盐缓冲溶液;B相:体积分数40%乙腈+0.05 mol/L pH=6.8的磷酸盐缓冲溶液。色谱柱:C18分离柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);紫外检测波长250 nm;进样体积:10 μL ;柱温:25 °C;流速:1.0 mL/min;时间梯度:0-10-30 min;浓度梯度:0-

15%–25% B 相。

1.3.2.4 一维核磁共振图谱分析 ($^1\text{H-NMR}$) 分别取 5 mg PP、PP-D、PP-T、POS1、POS1-D、POS1-T、POS2、POS2-D 及 POS2-T, 用 99.9% 重水交换 2 次, 真空冷冻干燥, 再加入 0.6 mL 重水溶解, 利用 Bruker 公司的 AVIII 800M 核磁波谱仪在 20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行 $^1\text{H NMR}$ 测定。

1.3.3 柑橘囊衣果胶硫酸酯及果胶降解产物硫酸酯抗肿瘤活性的测定

1.3.3.1 MCF-7 细胞培养 以 PP、PP-D、PP-T、POS1、POS1-D、POS1-T、POS2、POS2-D 及 POS2-T 为研究对象, 探究其对 MCF-7 肿瘤细胞生物活性的抑制作用, 具体方法参照 Wu 等^[20]的研究, 并作一定程度的修改。从 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出来装有 MCF-7 细胞的冻存管后, 将冻存管置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中迅速解冻至液体完全融化。在超净工作台内, 取出细胞悬浮液加入离心管后, 再立刻注入 10 倍培养液 (DMEM 培养液, 含有 10% 胎牛血清、50 U/mL 盘尼西林、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素以及 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素), 混合均匀后 1 000 r/min 离心 5 min, 弃掉上清液并向离心管内加入 10 mL 培养液, 混匀后制成细胞悬液。将细胞浓度调至 5×10^4 cell/mL。将细胞悬液分装入培养瓶内, 将培养瓶放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱内培养, 每 24 h 更换一次培养液并传代一次, 传代 3 次后用于 MTT 试验。

1.3.3.2 MTT 法检测 MCF-7 增值

1) 接种细胞 取处于对数生长期的 MCF-7 细胞, 1 000 r/min 离心 10 min, 用含有 10% 胎牛血清的培养液将细胞浓度调制 1×10^5 cell/mL 后, 取 100 μL (1×10^4) MCF-7 细胞接种于 96 孔培养板中, 然后分别加入 PP、PP-D、PP-T、POS1、POS1-D、POS1-T、POS2、POS2-D 及 POS2-T 以及不含样品的培养液各 100 μL , 浓度梯度均设置为 50, 125, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 每孔 5 个平行孔。调零孔不加 MCF-7 细胞悬液, 只加入 10% 胎牛血清 200 μL , 每孔 5 个平行孔;

2) 培养细胞 接种细胞并混匀后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 96 h;

3) 呈色 每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 磷酸缓冲液 20 μL ;

4) 终止培养 同等条件下继续培养 4 h, 终

止培养。1 000 r/min 离心 5 min, 然后弃去 96 孔培养板孔内的培养液, 分别加 150 μL DMSO 于每孔内, 震荡 10 min, 充分溶解结晶物;

5) 测定 OD 值 酶标仪检测波长 570 nm 处的吸光值。按照下面公式计算细胞生产抑制率:

细胞生长抑制率 (%) = $(1 - \text{试验孔 OD}_{570\text{nm}} / \text{对照孔 OD}_{570\text{nm}}) \times 100$

2 结果与分析

2.1 柑橘囊衣果胶降解产物及其硫酸酯化果胶降解产物的结构

2.1.1 果胶硫酸酯化测定 柑橘囊衣果胶及其果胶降解产物的硫酸酯化多糖 (PP、PP-D、PP-T、POS1、POS1-D、POS1-T、POS2、POS2-D 和 POS2-T) 红外光谱如图 1a~c 所示。硫酸酯化前、后的果胶多糖及其寡糖具有非常接近的吸收波形、吸收强度和峰宽, $3\ 750 \sim 3\ 050\ \text{cm}^{-1}$ (O-H) 和 $2\ 927\ \text{cm}^{-1}$ (C-H) 处保留原果胶多糖特征吸收峰^[21], 说明相关硫酸酯化法并不会剧烈的改变果胶结构。同时在 $827\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 242\ \text{cm}^{-1}$ 附近出现强吸收峰, 这分别是 C-O-S 的对称振动吸收峰和 S=O 的非对称伸缩振动吸收峰^[22-23], 表明羟基上有硫酸酯基, 硫酸化修饰已经完成。此外, 可以利用 $800 \sim 850\ \text{cm}^{-1}$ 的区域来推测酯化反应中硫酸基的取代位置, 一般而言, $850, 830, 810\ \text{cm}^{-1}$ 附近分别是硫酸基在 C-3、C-2、C-6 位发生了取代, 结合本试验红外光谱结果表明, 上述样品的硫酸酯化反应主要发生在 C-2 位。综上, 采用 TBA 和 DMSO 体系 2 种方法均能实现对柑橘囊衣果胶及其寡糖的硫酸酯化。

2.1.2 分子质量及单糖组成 采用 HPSEC 法和 HPLC-PMP 法分别测定了硫酸酯化前、后, 柑橘囊衣果胶多糖 PP 及其降解物 POS1 ($500\ \text{u} < \text{POS1} < 3\ \text{ku}$)、POS2 ($3\ \text{ku} < \text{POS2} < 5\ \text{ku}$) 的分子质量和单糖组成, 结果如表 1 所示。分子质量测定结果表明, 与硫酸酯化前相比, 硫酸酯化后 PP、POS1、POS2 的分子质量均发生了不同程度的降低, 说明反应较为剧烈, 对糖链产生了一定程度的降解^[24]。然而值得注意的是, 对于果胶寡糖 POS1、POS2 而言, 硫酸酯化后分子质量并没有出现像果胶多糖 PP 一样的剧烈下降, 可能是由于添加硫酸基团增加了寡糖的分子质量^[25]。由于 TBA 法反应相对温

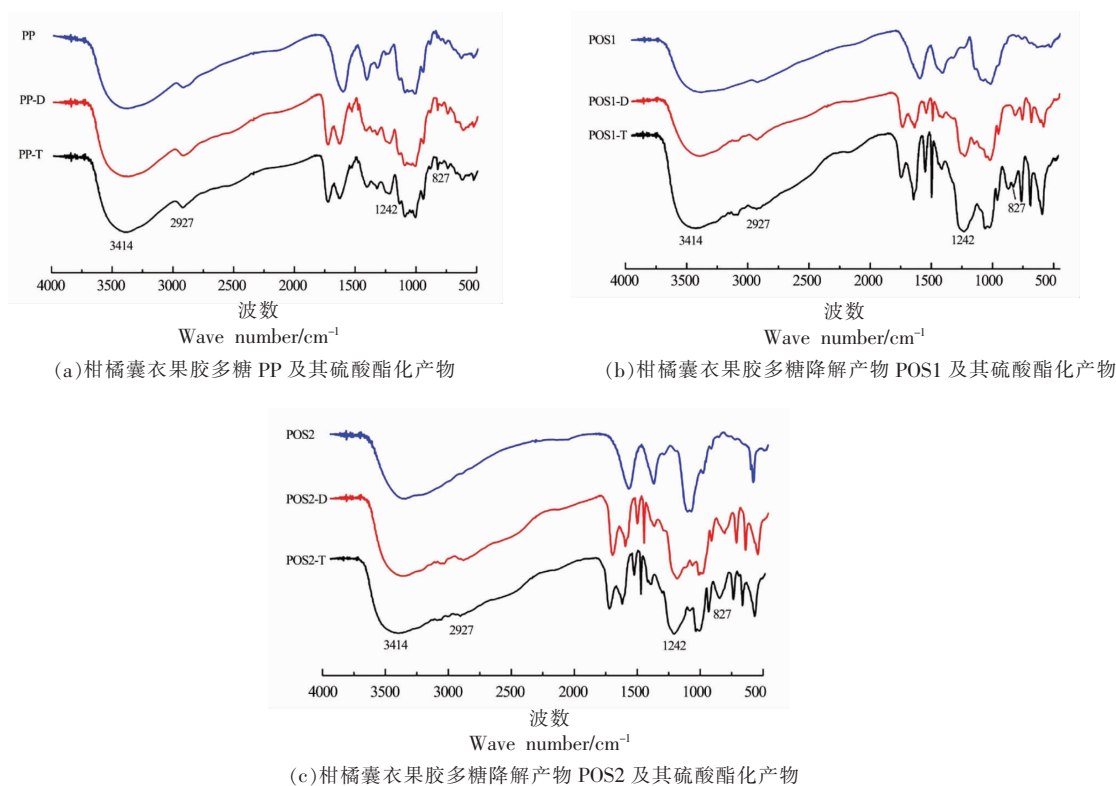


图 1 果胶硫酸酯化前、后的红外光谱图

Fig.1 FTIR spectra of the pectic polysaccharide before and after sulfate esterification

和, 因此其制备的果胶硫酸酯的分子质量低于 DMSO 法。

通过对硫酸酯化前、后的单糖组成分析发现, 两种体系制备的硫酸酯样品的单糖组成与硫酸酯化前相比, 差异不大。在 Chaouch 等^[26]的研究中指出, 硫酸酯化的果胶多糖的阿拉伯糖和木糖比例呈现下降趋势。然而, 本研究中果胶多糖 PP 在硫酸酯化前、后的单糖组成比例并没有发生显著地

改变, 仅在半乳糖醛酸和阿拉伯糖的含量上呈现细微差异。对于 POS1 和 POS2, 硫酸酯化前、后, 单糖组成成分虽没有变化, 但是组成比例存在一定的差异性。其中, 通过对比 POS1 的酯化产物 POS1-D、POS1-T 发现, TBA 法制备的硫酸酯 (POS1-T) 中, 鼠李糖物质的量比得到了较大的提高, 可能是因为在制备 POS1-D 的过程中, 其它单糖如半乳糖和葡萄糖等, 存在一定的脱落现象。

表 1 柑橘囊衣果胶多糖 PP 及其降解产物 POS1 和 POS2 硫酸酯化前、后的单糖组成和分子质量

Table 1 Monosaccharide composition and molecular weight of pectin polysaccharide PP and its degradation products POS1 and POS2 before and after sulfation

样品	单糖组成物质的量比								Mw/u
	Man	Rha	GluA	GalA	Glu	Gal	Ara	Fuc	
PP	0.11	11.49	0.18	24.3	0.23	18.4	42.20	2.3	792 000
PP-D	0.69	11.88	0.84	22.91	0.66	18.56	40.31	2.85	224 000
PP-T	0.93	11.08	0.42	21.52	0.93	19.16	38.05	2.75	281 000
POS1	5.31	5.82	0.5	43.15	11.08	12.92	19.93	0.24	1 800
POS1-D	1.69	6.56	0.56	40.68	33.75	7.23	8.02	1.32	1 300
POS1-T	7.56	26.73	3.25	30.81	21.85	3.82	0.80	5.16	1 700

(续表 1)

样品	单糖组成物质的量比								Mw/u
	Man	Rha	GluA	GalA	Glu	Gal	Ara	Fuc	
POS2	1.84	7.90	2.34	17.04	15.58	20.1	33.21	0.41	3 800
POS2-D	1.44	5.02	0.48	9.11	20.67	33.94	30.33	0.02	1 600
POS2-T	1.52	9.65	0.83	10.96	10.5	24.43	30.56	8.56	1 800

注:Man. 甘露糖;Rha. 鼠李糖;GluA. 葡萄糖醛酸;GalA. 半乳糖醛酸;Glu. 葡萄糖;Gal. 半乳糖;Ara. 阿拉伯糖;Fuc. 岩藻糖。

2.1.3 硫酸酯化后果胶核磁共振图谱分析 硫酸酯化前、后果胶、POS1 及 POS2 的 ^1H NMR 谱图如图 2a~c 所示,4.8~4.5 是硫酸基及 β -异构体 C1 质子信号,而在硫酸酯化以后,各组分的 ^1H NMR 谱图中 4.8~4.5 均有新的信号产生,表明生成了新的硫酸酯化产物。上述 3 种样品经过硫酸酯化以后,阿拉伯糖异头氢信号向低场位移移动,表明阿拉伯糖发生了硫酸酯化;而 Ara-H2 化学位移 $\delta=4.21$ 向低场位移至 $\delta=4.48$ ^[20],同时结合红外光谱

分析结果,说明在阿拉伯糖的 C2 位发生了硫酸基取代。此外,根据此前的报道^[27],果胶的 GalA 单元存在 2, 3-O-位被硫酸化的现象,图 2 中硫酸酯化后的 PP、POS1 及 POS2 的 GalA-H4 化学位移均不同程度地向低场位移,进一步证明了硫酸化位点也发生于果胶 HG 主链。对于 PP、POS1 和 POS2,硫酸酯化后的化学位移存在较大的变化,一些氢信号消失或减弱,可能是因为在制备硫酸酯化产物的过程中,PP、POS1 及 POS2 发生了较大程

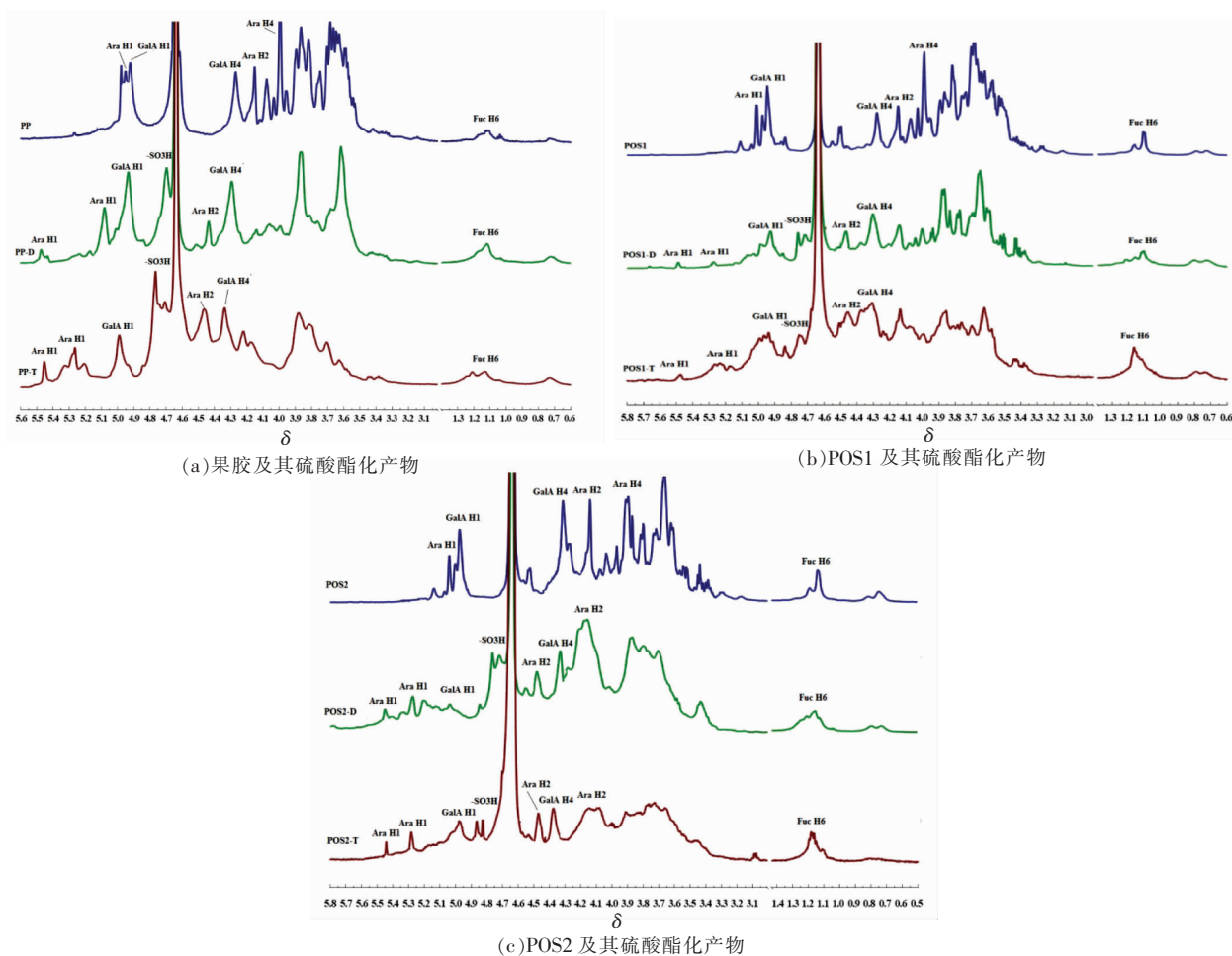


图 2 果胶硫酸酯化前、后的一维核磁共振氢谱图

Fig.2 ^1H NMR spectra of pectins before and after sulfate esterification

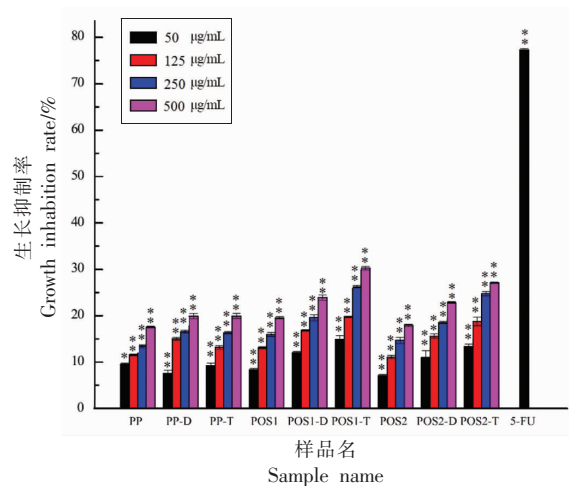
度的降解,致使一些糖单元脱落,其中半乳糖醛酸异头氢信号强度减弱较为明显,说明糖主链发生了降解。同时,对于硫酸酯化产物,在 $\delta=5.27$ 附近出现了新的信号,这归属于阿拉伯糖异头氢的信号,这可能是由于果胶侧链也发生了一定程度的降解,暴露出更多的阿拉伯糖侧链。与DMSO法制备的硫酸酯化样品不同,TBA法的异头氢信号相对单一,可能是该方法的条件相对温和,取代方式相对单一^[22]。

2.2 果胶、POS1、POS2及其硫酸酯产物的抗肿瘤活性

前期相关研究表明,果胶多糖及其降解产物具有一定的抗癌活性^[28-30]。体外试验已成为筛选天然的抗肿瘤药物的重要手段,其中MTT比色法因其快捷、简单和污染小等特点而受到人们的重视^[31]。如图3所示,PP、PP-D、PP-T、POS1、POS1-D、POS1-T、POS2、POS2-D及POS2-T均能对体外培养的MCF-7肿瘤细胞活性增殖表现出一定的抑制作用,且对于每个样品,随着质量浓度的升高,抗肿瘤活性也随之增强,表明上述9种物质抑制MCF-7增殖作用呈剂量依赖性,与相关研究结果一致^[5]。对于PP而言,两种体系制备的硫酸酯产物抗肿瘤活性几乎无差异;然而对于POS1和POS2而言,硫酸酯化后,其抗肿瘤活性均得到了一定程度的增强,且相对而言,TBA体系制备的硫酸酯产物比DMSO制备的硫酸酯产物效果好。通过单因素方差分析发现,当质量浓度为50 $\mu\text{g/mL}$ 时,与阴性对照组相比,PP对MCF-7细胞的体外增殖抑制具有显著性差异($P < 0.05$),PP-D、PP-T、POS1、POS1-D、POS1-T、POS2、POS2-D及POS2-T的其余作用点均表现出极显著性差异($P < 0.01$)。当上述9种物质的质量浓度为500 $\mu\text{g/mL}$ 时,它们对MCF-7细胞的体外生长抑制率都达到了最高,其中POS1-T的效果最佳,为30.25%。进一步表明柑橘囊衣果胶经过 $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Cu}^{2+}$ 体系降解后,其体外抗肿瘤活性增强,且对降解产物POS1及POS2进行硫酸酯化后,其体外抗肿瘤活性进一步增强。

3 结论

以柑橘囊衣果胶PP及其 $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Cu}^{2+}$ 降解的寡



注:*. $p < 0.05$; **. $p < 0.01$ (与空白对照组相比)。

图3 果胶、POS1、POS2及其硫酸酯产物对MCF-7的抗肿瘤活性

Fig.3 Anti-proliferation effects of native pectic polysaccharide, POS1, POS2 and their sulfated products on MCF-7 cells

糖POS1和POS2为研究对象,采用DMSO和TBA两种体系成功地对其进行硫酸酯化,研究了硫酸酯化后产物结构和生物活性。通过分子质量测定和单糖组成分析表明,经两种体系硫酸酯化后,果胶多糖和寡糖的分子质量均呈降低趋势,且存在一些单糖单元脱落。结合 $^1\text{H-NMR}$ 数据,POS1的半乳糖异头氢和POS2的阿拉伯糖异头氢信号均向低场位移动,并且各组分的半乳糖醛酸的H4也向低场移动,说明果胶多糖及寡糖在主链和侧链均发生了硫酸酯化。抗肿瘤活性结果表明,柑橘囊衣果胶经过 $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Cu}^{2+}$ 体系降解后,其体外抗肿瘤活性增强,且降解产物POS1及POS2经过硫酸酯化后,其体外抗肿瘤活性进一步增强。其中,POS1-T的效果最佳,为30.25%,表明硫酸酯化可以提高果胶的抗肿瘤活性。

参 考 文 献

- [1] WANG Z J, XIE J H, YANG Y J, et al. Sulfated *Cyclocarya paliurus* polysaccharides markedly attenuates inflammation and oxidative damage in lipopolysaccharide-treated macrophage cells and mice[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 40402.
- [2] ZHANG L N, CHEN L, XU X J, et al. Compari-

- son on chain stiffness of a water-insoluble (1→3)- α -D-glucan isolated from *Poria cocos* mycelia and its sulfated derivative[J]. Carbohydrate Polymers, 2005, 59(2): 257-263.
- [3] YAN X F, YANG Y, HE L Q, et al. Gambogic acid grafted low molecular weight heparin micelles for targeted treatment in a hepatocellular carcinoma model with an enhanced anti-angiogenesis effect[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2017, 522(1): 110-118.
- [4] MOTO M, TAKAMIZAWA N, SHIBUYA T, et al. Anti-diabetic effects of chondroitin sulfate on normal and type 2 diabetic mice[J]. Journal of Functional Foods, 2018, 40: 336-340.
- [5] WEI D F, WEI Y X, CHENG W D, et al. Sulfated modification, characterization and antitumor activities of *Radix hedysari* polysaccharide[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2012, 51(4): 471-476.
- [6] XIE J H, WANG Z J, SHEN M Y, et al. Sulfated modification, characterization and antioxidant activities of polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* [J]. Food Hydrocolloids, 2016, 53: 7-15.
- [7] WANG J D, NIU S F, ZHAO B T, et al. Catalytic synthesis of sulfated polysaccharides. II: Comparative studies of solution conformation and antioxidant activities[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 107: 221-231.
- [8] 黄玉龙, 赵保堂, 宋坤, 等. 兰州百合多糖硫酸酯的制备及其抗氧化活性的测定[J]. 中国酿造, 2016, 35(6): 122-127.
- HUANG Y L, ZHAO B T, SONG K, et al. Preparation and antioxidant activity of polysaccharide sulfate from Lanzhou lily[J]. China Brewing, 2016, 35(6): 122-127.
- [9] ATMODOJO M A, HAO Z, MOHNEN D. Evolving views of pectin biosynthesis[J]. Annual Review of Plant Biology, 2013, 64: 747-779.
- [10] 谢明勇, 李精, 聂少平. 果胶研究与应用进展[J]. 中国食品学报, 2013, 13(8): 1-14.
- XIE M Y, LI J, NIE S P. A review about the research and applications of pectin[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(8): 1-14.
- [11] MAO G Z, WU D M, WEI C Y, et al. Reconsidering conventional and innovative methods for pectin extraction from fruit and vegetable waste: Targeting rhamnogalacturonan I[J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 94: 65-78.
- [12] LUO Y C, PAN K, ZHONG Q X. Casein/pectin nanocomplexes as potential oral delivery vehicles[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2015, 486(1): 59-68.
- [13] ZHANG Y, LIN J, ZHONG Q X. The increased viability of probiotic *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514 encapsulated in emulsions with multiple lipid-protein-pectin layers[J]. Food Research International, 2015, 71: 9-15.
- [14] LUIS A S, BRIGGS J, ZHANG X, et al. Dietary pectic glycans are degraded by coordinated enzyme pathways in human colonic Bacteroides[J]. Nature Microbiology, 2018, 3(2): 210-219.
- [15] LECLERE L, CUTSEM P V, MICHIELS C. Anti-cancer activities of pH- or heat-modified pectin[J]. Front Pharmacol, 2013, 4: 128.
- [16] CHEN J L, CHENG H, WU D, et al. Green recovery of pectic polysaccharides from citrus canning processing water[J]. Journal of Cleaner Production, 2017, 144: 459-469.
- [17] LI J H, LI S, ZHENG Y F, et al. Fast preparation of rhamnogalacturonan I enriched low molecular weight pectic polysaccharide by ultrasonically accelerated metal-free Fenton reaction[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 95: 551-561.
- [18] 尹馨梓. 柑橘果胶的硫酸酯化及其活性的探究[D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- YIN X Z. Study on sulfation and activity of citrus pectin[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2014.
- [19] ZHANG L F, ZHANG X Z, LIU D H, et al. Effect of degradation methods on the structural properties of citrus pectin[J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 61(2): 630-637.
- [20] WU S W, FU X, YOU L J, et al. Antioxidant, antitumor and immunomodulatory activities of water-soluble polysaccharides in *Abrus cantoniensis* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 89: 707-716.
- [21] ZHANG Y L, LU X Y, ZHANG Y N, et al. Sulfated modification and immunomodulatory activity of water-soluble polysaccharides derived from fresh Chinese persimmon fruit[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2010, 46(1): 67-71.

- [22] CHEN S G, LI Z J, WANG Y M, et al. Sulfation of a Squid ink polysaccharide and its anticoagulant activities[J]. *Chemistry Journal of Chinese University*, 2010, 31(12), 2407–2412.
- [23] CHEN L, HUANG G L. Antioxidant activities of sulfated pumpkin polysaccharides [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 126: 743–746.
- [24] WANG Z J, XIE J H, KAN L J, et al. Sulfated polysaccharides from *Cyclocarya paliurus* reduce H₂O₂-induced oxidative stress in RAW264.7 cells[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 80: 410–417.
- [25] YU Y, SONG Q Q, HUANG L X, et al. Immunomodulatory activities of sulfated *Cyclocarya paliurus* polysaccharides with different degrees of substitution on mouse spleen lymphocytes[J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 64: 103706.
- [26] CHAOUCH M A, HAMMI K M, DHAHRI M, et al. Access to new anticoagulant by sulfation of pectin-like polysaccharides isolated from *Opuntia ficus indica* cladodes[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 120(Pt B): 1794–800.
- [27] ROMÁN Y, DE OLIVEIRA BARDDAL H P, IACOMINI M, et al. Anticoagulant and antithrombotic effects of chemically sulfated fucogalactan and citrus pectin[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 174: 731–739.
- [28] MEIJERINK M, RÖSCH C, TAVERNE N, et al. Structure dependent-immunomodulation by sugar beet arabinans via a SYK tyrosine kinase-dependent signaling pathway[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1972.
- [29] ZHANG H, CHEN J L, LI J H, et al. Extraction and characterization of RG-I enriched pectic polysaccharides from mandarin citrus peel[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 79: 579–586.
- [30] ZHANG T, LAN Y, ZHENG Y, et al. Identification of the bioactive components from pH-modified citrus pectin and their inhibitory effects on galectin-3 function[J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 58: 113–119.
- [31] SARGENT J M. The use of the MTT assay to study drug resistance in fresh tumour samples[J]. *Recent Results Cancer Res*, 2003, 161: 13–25.

Effects of Sulfation of Pectin Polysaccharides and Its Degraution Products from Citrus Segment Membrane on Antitumor Activity

Zhu Kai¹, Liu Shanshan¹, Ye Xingqian^{1,2,3}, Chen Shiguo^{1,2,3*}

(¹College of Biosystems Engineering and Food Science, National-Local Joint Engineering Laboratory of Intelligent Food Technology and Equipment, Zhejiang Key Laboratory for Agro-Food Processing, Integrated Research Base of Southern Fruit and Vegetable Preservation Technology, Zhejiang International Scientific and Technological Cooperation Base of Health Food Manufacturing and Quality Control, Zhejiang University, Hangzhou 310058

²Fuli Institute of Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058

³Ningbo Research Institute, Zhejiang University, Ningbo 315100, Zhejiang)

Abstract Pectin is a polysaccharide that widely exists in plant cell walls and has a variety of physiologically active functions. Various studies have confirmed that modification of polysaccharide can improve its biological activity. Therefore, in this study, the citrus segment membrane pectin (PP) and its degraded oligosaccharides (POS1 and POS2) recovered from the citrus canning waste water were carried out sulfate esterification in order to increase their activity. Molecular weight and monosaccharide composition analysis showed that after sulfating by TBA and DMSO systems, the molecular weight of sulfated pectin polysaccharides and oligosaccharides were decreased, and the content of arabinose and galactose reduced significantly. FTIR and NMR results shown that the H4 of each component of galacturonic acid showed a low-field shift after sulfation. And the anomer hydrogen signals of galactose and arabinose from POS1 and POS2 shifted to the low field, respectively. Which indicating that the main chain and the side chain were sulfated. The *in vitro* results showed that the anti-tumor activity of sulfated POS1 and POS2 was further enhanced. Among them, POS1-T has the best effect, with an inhibition rate of 30.25%. In summary, the results of the study indicated that sulfation could increase the antitumor effect of pectin polysaccharide and its oligosaccharides.

Keywords pectin; oligosaccharide; sulfation; citrus segment membrane; antitumor