

國立臺灣大學生物資源暨農學院農業化學系

碩士論文

Department of Agricultural Chemistry
College of Bioresources and Agriculture
National Taiwan University
Master's thesis



不同產地硫磺菌菌株的培養子實體多醣體之
物化性質及抗發炎活性研究

Studies on the physicochemical properties and
anti-inflammatory activities of polysaccharides from
cultured fruiting bodies of *Laetiporus sulphureus* of
different origins isolated

蔡承勳

Cheng-Hsun Tsai

指導教授：黃良得 博士

共同指導教授：羅凱尹 博士

Advisor: Lean-Teik Ng, Ph.D

Co-advisor: Kai-Yin Lo, Ph.D

中華民國 114 年 8 月

August, 2025



國立臺灣大學碩士學位論文

口試委員會審定書

MASTER'S THESIS ACCEPTANCE CERTIFICATE
NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY

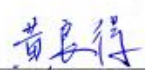
不同產地硫磺菌菌株的培養子實體多醣體之物化性質及抗發炎活性
研究

Studies on the physicochemical properties and anti-inflammatory
activities of polysaccharides from cultured fruiting bodies of
Laetiporus sulphureus of different origin isolates

本論文係蔡承勳 R12623013 在國立臺灣大學農業化學所完成之碩士學位論文，於民國 114 年 07 月 15 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明。

The undersigned, appointed by the Department / Graduate Institute of Agricultural Chemistry on 15, 07, 2025 have examined a Master's Thesis entitled above presented by Cheng-Hsun Tsai R12623013 candidate and hereby certify that it is worthy of acceptance.

口試委員 Oral examination committee:

羅凱尹  (指導教授 Advisor) 黃良得  (指導教授 Advisor)
盧美光  蘇俊翰 



系（所、學位學程）主管 Director: _____

謝誌

兩年的碩士生涯即將結束，一路上多虧有老師與同學們的幫忙，讓我從一個什麼都不懂門外漢到能夠順利完成這本論文，真的是非常幸運。首先，我想先感謝我的指導教授黃良得老師，每當我遇到困難時，老師總能夠給我指出明確的方向，也會適時地點出我的缺失，讓我在這短短的兩年間對於這個領域的專業知識突飛猛進，日後必定會將老師的提點銘記在心。感謝羅凱尹老師在實驗上的協助，讓我能夠順利完成我的研究，也十分感謝老師在口試中的提點。接下來想感謝盧美光老師與蘇俊翰老師，因為有老師們的建議，讓我在處理論文的問題上更加游刃有餘。

接著必須感謝家宜學姊，只要是在實驗室中遇到的問題，妳都很樂意提供解答與建議，也很感謝妳在實驗室人口逐漸萎縮下帶我進行萃取、物化性質以及所有的細胞實驗，可以說沒有學姊的指導我應該沒辦法如此順利的畢業吧！謝謝阿董、宗彥以及靜遠，不管是實驗遇到困難或是想找人聊天，你們都願意傳授經驗與提供建議，讓我能夠快速適應緊湊的實驗室生活。謝謝孟暘，在平常忙碌的生活中陪我一起抱怨實驗做不出來、想晚餐要吃什麼還有分享最近又出了哪些新遊戲，也謝謝楚翰以及同宇，每當實驗做得很鬱悶的時候只要找你們聊聊、健身或是玩牌後，心情就會舒暢不少。謝謝曾經是中興土環同學的阿喵跟政軒，不管是找我去看棒球或是傳一堆廢片給我看，你們都讓我的碩士生涯增添不少色彩。

最後我想感謝我的家人願意無條件地讓我出去看看外面的世界，使我能夠在這個離家快 400 公里的城市盡情探索，在我需要協助的時候也很樂意提供我支援，真的是非常感謝你們！最後的最後我想感謝我自己以及在人生中所遇到的所有人（可能還有生物），當時的每一個決定、想法、建議甚至是一面之緣都是造就現在的我的重要養分，也豐富了我的生命，現在我已走到的一個名為碩士的旅程盡頭，但這不代表結束，而是另一個嶄新的開始。

中文摘要



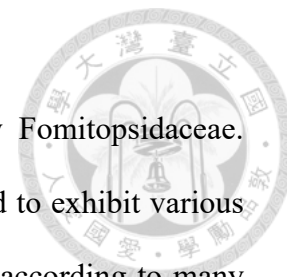
硫磺菌 (*Laetiporus sulphureus*) 屬於白肉迷孔菌科真菌，其多醣體已被證實具抗癌及抗發炎等生物活性，因多醣體的複雜性高，不同物種、萃取方法，以及不同產地所取得的多醣體在物化性質與活性上可能有差異。本研究主要目的為探討南投 (NT)、雲南 (YN)、東勢 (DS) 與豐丘 (FQ) 等產地和硫化多糖 (Sulfate polysaccharides, SPS) 及一般多糖 (Polysaccharides, PS) 的萃取方法對硫磺菌多醣體的物化性質與抗發炎活性影響。結果顯示，各產地 SPS 的產率依序為 7.54%、9.46%、4.12% 與 3.48%，而 PS 的產率則約為 1 至 1.5% 之間。SPS 比 PS 具有較低的總醣與較高的蛋白質含量，而硫酸根含量除 FQ 產地外，各產地之 PS 皆高於 SPS。SPS 的單醣組成以葡萄糖、甘露糖、半乳糖及岩藻糖為主，其分子量分布以 2.80 kDa 最多。在傅立葉轉換紅外光譜中 SPS 顯示出羥基、烷基、CHO 與 C=O 振動、C-H、S=O、C-O-C 與 C-O-H 等鍵結，為典型的多醣體圖譜。PS 的單醣組成同樣以葡萄糖、甘露糖、半乳糖及岩藻糖為主，各組間的分子量分布相似，皆具有約 10-25 kDa 與 500-600 kDa 之分子量群，而 PS 的官能基種類與 SPS 相似，屬於多醣體的圖譜。抗發炎活性顯示所有產地之 SPS 與 PS 對一氧化氮的抑制效果皆不佳，但所有產地之 SPS 對 TNF- α 與 IL-6 等發炎相關因子的抑制則顯示有良好的效果。這些結果說明各產地之 SPS 與 PS 具有明顯物化性質的差異，且所有 SPS 對於 LPS 誘導 RAW 264.7 細胞之發炎因子具有良好的抑制效果，而 PS 的抑制效果則較差，這些結果皆說明不同萃取方法與產地差異對於多醣體的物化性質與活性具有不同程度的影響。由於南投產地之 SPS (NTS) 比其他多醣體具有最佳的抑制 TNF- α 與 IL-6 生成效果，因此試驗進一步分析 NTS 的化學結構。NMR 結果顯示，NTS 之主鏈由 α -(1 $\rightarrow$ 6) 半乳糖與 β -(1 $\rightarrow$ 6) 葡萄糖構成，且在部分葡萄糖的 3-O 位置具有甘露糖與葡萄糖鏈的鍵結，而半乳糖的 2-O 位置則具有甘露糖與岩藻糖殘基。針對不同產地硫磺菌之研究結果表明，在硫化多醣體的萃取方法下，硫磺菌的多醣體皆表現出抗發炎活性，此結果顯示出硫磺菌多

醣體在發炎治療與相關藥物開發的潛力。

關鍵字：硫磺菌、多醣體、不同產地、物化性質、抗發炎、化學結構



Abstract



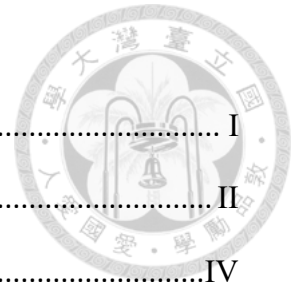
Laetiporus sulphureus is a fungus belonging to the family Fomitopsidaceae. Polysaccharides extracted from *L. sulphureus* have been confirmed to exhibit various bioactivities, such as anticancer and anti-inflammatory. However, according to many previous studies, the structures of polysaccharides are complex, their physicochemical properties may vary depending on species, extraction methods, and even origins. This study aimed to investigate the differences in physicochemical properties and anti-inflammatory activities of *L. sulphureus* polysaccharides obtained from different regions (NT, YN, DS, and FQ) and extraction methods (SPS and PS). Based on the results, the yields of SPS from NT, YN, DS, and FQ regions were 7.54%, 9.46%, 4.12%, and 3.48%, respectively, while the yields of PS were approximately 1% to 1.5%. SPS had lower sugar content and higher protein content than PS. However, except FQ, the sulfate content of SPS was lower than PS. Results of monosaccharide composition showed that SPS and PS mainly consisted of glucose, mannose, galactose, and fucose. SPS from different origins had a molecular weight of 2.80 kDa, and PS of different origins had molecular weight of 10-25 kDa and 500-600 kDa. The FT-IR spectra of SPS and PS showed that all of them have hydroxyl, alkyl, formyl (–CHO), carbonyl (C=O), C–H, sulfonyl (S=O), ether (C–O–C), and hydroxyl (C–O–H) bonds. In anti-inflammatory analysis, both SPS and PS exhibited weak inhibitory effects on nitric oxide production. However, SPS from different origins possessed good inhibitory effects on TNF- α and IL-6 production. These results showed that SPS had stronger anti-inflammatory activity than PS, and the physicochemical properties showed that fruiting bodies from different locations but using the same extraction method possessed similar total sugar content, total protein content, monosaccharides composition, and functional group composition. As the SPS obtained from NT exhibited the best inhibition effects

on TNF- α and IL-6 production, further experiment was performed to analyze its chemical structure. The NMR results showed that the main chain of NTS consisted of α -(1 $\rightarrow$ 6)-linked galactose and β -(1 $\rightarrow$ 6)-linked glucose, and the mannose and glucose side chains were substituted at the 3-*O* position of certain glucose, while mannose and fucose residues were attached to the 2-*O* position of galactose. According to the results, SPS from all origins exhibited anti-inflammatory activities. These findings showed that polysaccharides of *Laetiporus sulphureus* have potential for inflammation treatment and related drug development.

Key words:

Laetiporus sulphureus, polysaccharides, different origins, physicochemical properties, anti-inflammatory, chemical structure

目次

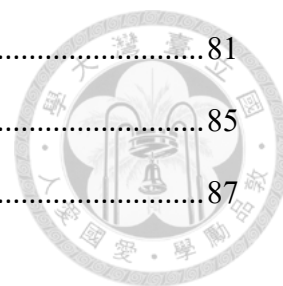


謝誌.....	I
中文摘要.....	II
Abstract.....	IV
目次.....	VI
圖次.....	X
表次.....	XII
第一章、前言.....	1
第二章、文獻回顧.....	2
2.1. 菇類.....	2
2.1.1. 菇類簡介.....	2
2.1.2. 藥用菇類.....	2
2.2. 菇類多醣體.....	5
2.2.1. 多醣體與菇類多醣體簡介.....	5
2.2.2. 菇類多醣體之分子量.....	5
2.2.3. 生長環境與產地差異.....	6
2.2.4. 蛋白質與多肽.....	6
2.2.5. 菇類多醣體之免疫調節活性.....	6
2.2.6. 菇類多醣體之抗發炎活性.....	7
2.3. 硫磺菌.....	10
2.3.1. 硫磺菌簡介.....	10
2.3.2. 硫磺菌多醣體的結構與生物活性.....	10
2.4. 巨噬細胞與抗發炎.....	12
2.4.1. 巨噬細胞.....	12
2.4.2. 脂多醣與發炎.....	12

2.4.3. 一氧化氮與 iNOS	13
2.4.4. TNF- α 與 IL-6	13
第三章、研究動機與目的.....	16
第四章、材料與方法.....	17
4.1. 材料及化學試劑.....	17
4.2. 含硫多醣體 (SPS) 與純化多醣體 (PS) 之製備	18
4.2.1. 含硫多醣體 (SPS) 之萃取與純化	18
4.2.2. 純化多醣體 (PS) 之萃取與純化	18
4.3. 總醣含量分析.....	20
4.3.1. 原理.....	20
4.3.2. 測定方法.....	20
4.4. 多醣體物化性質分析.....	21
4.4.1. 蛋白質含量分析.....	21
4.4.2. 硫酸根含量分析.....	21
4.4.3. 多醣體分子量分析.....	21
4.4.4. 單醣組成分析.....	22
4.4.5. 醣苷鍵種類分析.....	23
4.5. 細胞培養.....	25
4.5.1. 細胞種類與培養條件.....	25
4.5.2. 細胞活化與繼代培養.....	25
4.5.3. 細胞冷凍保存.....	25
4.6. 細胞存活率分析 (MTT assay).....	27
4.6.1. 原理.....	27
4.6.2. 實驗步驟.....	27
4.7. 一氧化氮 (nitric oxide, NO) 產量分析	28
4.7.1. 原理.....	28

4.7.2. 實驗步驟.....	28
4.8. TNF- α 與 IL-6 激素定量分析	29
4.8.1. 樣品製備.....	29
4.8.2. 分析步驟.....	29
4.9. 多醣體化學結構鑑定分析.....	31
4.9.1. 核磁共振 (nuclear magnetic resonance, NMR) 光譜分析	31
4.10. 統計分析.....	32
第五章、結果與討論.....	33
5.1. 含硫多醣體 (SPS) 與純化多醣體 (PS) 之產率	33
5.2. 含硫多醣體 (SPS) 與純化多醣體 (PS) 之物化性質差異	35
5.2.1. 總醣、總蛋白與硫酸根含量.....	35
5.2.2. 分子量分布.....	37
5.2.3. 單醣組成.....	43
5.2.4. 官能基組成.....	47
5.3. 含硫多醣體 (SPS) 與純化多醣體 (PS) 之抗發炎活性.....	50
5.3.1. 細胞存活率.....	50
5.3.2. 一氧化氮的抑制.....	52
5.3.3. TNF- α 與 IL-6 激素的抑制	57
5.4. 南投產地含硫多醣體 (NTS) 之化學結構	67
5.4.1. ^1H NMR 圖譜	67
5.4.2. ^{13}C NMR 圖譜	69
5.4.3. COSY 圖譜.....	70
5.4.4. TOCSY 圖譜	72
5.4.5. ROESY 圖譜	74
5.4.6. HSQC 圖譜.....	77
5.4.7. HMBC 圖譜.....	79

5.4.8. NTS 之結構討論.....	81
第六章、 結論.....	85
第七章、 參考文獻.....	87



圖次



圖 2-1、菇類細胞壁剖面圖	4
圖 2-2、菇類中多醣體、酚類化合物與三萜類化合物之結構	4
圖 2-3、菇類多醣體之免疫調節機制	9
圖 2-4、硫磺菌子實體型態	11
圖 2-5、硫磺菌多醣體之重複單元的鍵結模式	11
圖 2-6、脂多醣的化學結構示意圖	15
圖 5-1、NTS 的高效液相層析圖譜.....	39
圖 5-2、YNS 的高效液相層析圖譜	39
圖 5-3、DSS 的高效液相層析圖譜.....	40
圖 5-4、FQS 的高效液相層析圖譜.....	40
圖 5-5、NTP 的高效液相層析圖譜.....	41
圖 5-6、YNP 的高效液相層析圖譜	41
圖 5-7、DSP 的高效液相層析圖譜.....	42
圖 5-8、FQP 的高效液相層析圖譜.....	42
圖 5-9、單醣標準品波峰分布圖	44
圖 5-10、各產地之 SPS 多醣體之傅立葉轉換紅外光譜	48
圖 5-11、各產地之 PS 多醣體之傅立葉轉換紅外光譜.....	49
圖 5-12、不同產地與濃度之 SPS 對 LPS 誘導 RAW 264.7 細胞的存活率影響...	51
圖 5-13、不同產地與濃度之 PS 對 LPS 誘導 RAW 264.7 細胞的存活率影響.....	51
圖 5-14、各產地之 SPS 對 LPS 誘導小鼠巨噬細胞之一氧化氮產生抑制效果....	53
圖 5-15、各產地間 SPS 對 LPS 誘導小鼠巨噬細胞之一氧化氮產生抑制效果 比較.....	54
圖 5-16、各產地之 PS 對 LPS 誘導小鼠巨噬細胞之一氧化氮產生抑制效果.....	55
圖 5-17、各產地間 PS 對 LPS 誘導小鼠巨噬細胞一氧化氮之產生抑制效果	

比較.....	56
圖 5-18、各產地之 SPS 對 LPS 誘導小鼠巨噬細胞之 TNF- α 激素產生抑制效果.....	59
圖 5-19、各產地間 SPS 對 LPS 誘導小鼠巨噬細胞之 TNF- α 激素產生抑制效果比較.....	60
圖 5-20、各產地之 PS 對 LPS 誘導小鼠巨噬細胞之 TNF- α 激素產生抑制效果.....	61
圖 5-21、各產地間 PS 對 LPS 誘導小鼠巨噬細胞之 TNF- α 激素產生抑制效果比較.....	62
圖 5-22、各產地之 SPS 對 LPS 誘導小鼠巨噬細胞之 IL-6 激素產生抑制效果 ..	63
圖 5-23、各產地間 SPS 對 LPS 誘導小鼠巨噬細胞之 IL-6 激素產生抑制效果比較.....	64
圖 5-24、各產地之 PS 對 LPS 誘導小鼠巨噬細胞之 IL-6 激素產生抑制效果.....	65
圖 5-25、各產地間 PS 對 LPS 誘導小鼠巨噬細胞之 IL-6 激素產生的抑制效果比較.....	66
圖 5-28、NTS 多醣體之 ^1H NMR 圖譜	68
圖 5-29、NTS 多醣體之 ^{13}C NMR 圖譜	69
圖 5-30、NTS 多醣體之 COSY 圖譜	71
圖 5-31、NTS 多醣體之 TOCSY 圖譜.....	73
圖 5-32、NTS 多醣體之 ROESY 圖譜.....	76
圖 5-33、NTS 多醣體之 HSQC 圖譜	78
圖 5-34、NTS 多醣體之 HMBC 圖譜.....	80
圖 5-35、NTS 多醣體之重複單元與化學結構.....	82

表次



表 2-1、菇類多醣體之鍵結模式、結構、分子量與生物活性	8
表 4-1、多醣體分子量之 HPLC 分析條件	22
表 4-2、多醣體單醣組成之 HPLC 分析條件	23
表 5-1、各產地硫磺菌的 SPS 與 PS 多醣體之產率	34
表 5-2、各產地硫磺菌的 SPS 多醣體之總醣、總蛋白與硫酸根含量百分比	36
表 5-3、各產地硫磺菌的 PS 多醣體之總醣、總蛋白與硫酸根含量百分比	36
表 5-4、各產地硫磺菌 SPS 多醣體之分子量分布	38
表 5-5、各產地硫磺菌 PS 多醣體之分子量分布	38
表 5-6、各產地硫磺菌 SPS 多醣體之單醣組成	45
表 5-7、各產地硫磺菌 PS 多醣體之單醣組成	46
表 5-8、各產地 SPS 之 TNF- α 半抑制濃度	60
表 5-9、各產地 SPS 之 IL-6 半抑制濃度	64
表 5-10、NTS 多醣體之各單醣殘基之 ^1H 與 ^{13}C 的化學位移	83

第一章、前言

藥用蕈類的發展與使用已有悠久的歷史，其所含有的活性成分使得它們廣泛應用於食品、機能性產品或保養化妝品等領域。

在許多活性成分中，多醣體是其中最主要的成分之一，研究已證實其具有抗癌 (Jen & Ng, 2025)、抗病毒 (Sousa et al., 2022)、抗發炎與免疫調節等功能 (Shi et al., 2025)，為具有極高應用潛力的成分。然而研究發現多醣體的化學特性複雜度高，不同萃取方法、產地、萃取溫度與萃取溶液 pH 值所取得的多醣體在單醣種類、分子量、醣苷鍵型態等物化性質上皆有顯著差異，這些差異可能會影響多醣體的生物活性 (Cui et al., 2023)，因此分析多醣體的物化性質可以作為初步評估其生物活性與效力的依據。

本研究的藥用蕈類為硫磺菌 (*Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murill)，是屬於擔子菌門硫磺菌屬的真菌，主要生長於亞洲、歐洲與美洲，在臺灣也有其族群分布。先前研究中已發現硫磺菌的多醣體帶有硫酸根基團，這些含硫多醣體 (sulfated polysaccharides) 為多醣體的衍生物，通常會帶有較多負電而有較高的溶解度，因此很容易與細胞產生反應而顯現出較佳的生物活性。這類的含硫多醣體大多來自於藻類，目前真菌來源的含硫多醣體也僅有硫磺菌被報導能夠自然產生，然而來自不同產地硫磺菌的多醣體的物化性質與生物活性差異尚未被研究，因此了解不同產地的硫磺菌多醣體特性能促進其在醫藥與保健產品領域上的發展及應用。

發炎為身體遭遇外來刺激時所引發的一系列防禦反應，但過度的發炎反而會造成如敗血症或自體免疫疾病等病症，因此適時抑制發炎反應十分重要。目前許多菇類的多醣體已經確認具有抗發炎的效果，但針對不同產地硫磺菌的抗發炎活性卻較少有系統性的探討，因此本研究擬使用脂多醣誘導小鼠巨噬細胞 RAW 264.7 的發炎模式進行評估不同產地硫磺菌多醣體的抗發炎活性，並探討其物化性質差異，同時也針對具有最佳抗發炎活性之多醣體進行化學結構分析。

第二章、文獻回顧

2.1. 菇類

2.1.1. 菇類簡介

菇類是真菌界 (Fungi) 中大型真菌的統稱，這些真菌在分類上屬於子囊菌門 (Ascomycota) 與擔子菌門 (Basidiomycota)。菇類的特色為具有明顯的子實體，其主要由菌傘 (cap) 與菌柄 (stalk) 所構成，而在菌傘的下方會有許多皺褶，此處為產生與存放孢子的重要位置。菇類的細胞構造與植物相似，兩者皆具有細胞壁，但由圖 2-1 的剖面可知菇類的細胞壁是由幾丁質、 β -葡聚糖與蛋白質所構成 (Ehren et al., 2020; Ifuku et al., 2011; Paudel et al., 2016)，與葡萄糖組成的植物細胞壁不同。

一般來說，菇類會生長於枯木或落葉等植物殘體上，藉由分解其中的有機物獲得碳源與生長所需之養分，可促進木質部中的碳重新進入碳循環中，是自然界中重要的分解者，這樣的特性也使得菇類分布十分廣泛，並且在幾千年前便進入人類的視野，成為常見的食材之一。菇類具有豐富的營養成分，例如多醣體、蛋白質、固醇類化合物、酚類或維生素等 (Krishnamoorthi et al., 2022)，其中蛋白質的占比約為 19-38% (Braaksma & Schaap, 1996)，且含有多種胺基酸，包含苯丙胺酸 (Phenylalanine)、纈胺酸 (Valine)、蘇胺酸 (Threonine)、異白胺酸 (Isoleucine)、亮胺酸 (Leucine)、甲硫胺酸 (Methionine)、離胺酸 (Lysine)、組胺酸 (Histidine) 與多種非必要胺基酸 (Davila & Du, 2023)；菇類的脂質含量低，但不飽和脂肪酸的含量豐富，例如亞油酸 (0.0–81.1%)、油酸 (1.0–60.3%) 與亞麻酸 (0.0–28.8%) 等 (Sande et al., 2019)；至於醣類在菇類中也十分豐富，其含量依據不同品種與萃取方法可能會有所差異。

得益於其豐富的營養成分與人們的健康意識提升，目前針對菇類的需求仍持續上升。在 2022 年時全球的菇類市場已達 503.2 億美元，且預測到 2030 年時市場規模可能達到 797.5 億美元 (Rijia et al., 2025)，顯示這些真菌具有龐大的發展潛力。

2.1.2. 藥用菇類

除了食用之外，具有藥理活性的菇類也開始被注意，例如靈芝 (*Ganoderma*



lucidum)、舞菇 (*Grifola frondosa*)、冬蟲夏草 (*Ophiocordyceps sinensis*)、烏苓參 (*Xylaria nigripes*) 與巴西蘑菇 (*Agaricus blazei*) 等，藥用菇類便是這些菇類的統稱。目前在許多地區皆有使用藥用菇類的習慣，而亞洲地區藥用菇類的應用則已有千年歷史。許多研究已經證明藥用菇類具有良好藥理活性，例如抗癌 (Jen & Ng, 2025)、降血糖 (Wang et al., 2014)、降血壓 (Okamoto et al., 2020)、降膽固醇 (Cheung, 1998) 與免疫調節 (Lu et al., 2023) 等；這些藥理活性可能來自於菌絲體、子實體或孢子等部位。此外，研究也發現藥用菇類的活性成分主要有多醣體 (polysaccharides)、醣蛋白 (glycoproteins)、三萜類化合物 (triterpenoids) 與酚類化合物 (phenolic compounds) 等 (Venturella et al., 2021)，其結構可參考圖 2-2，這些活性成分已被應用在多種機能性食品與藥品的開發。

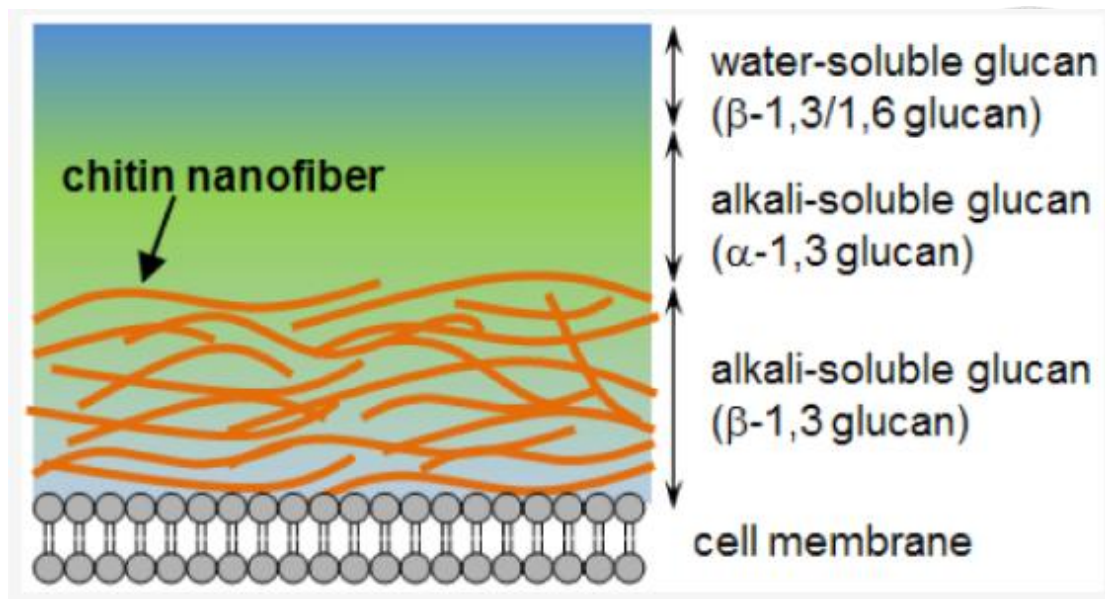


圖 2-1、菇類細胞壁剖面圖 (Ifuku et al., 2011)

Figure 2-1. The cross-section of fungal cell wall (Ifuku et al. 2011).

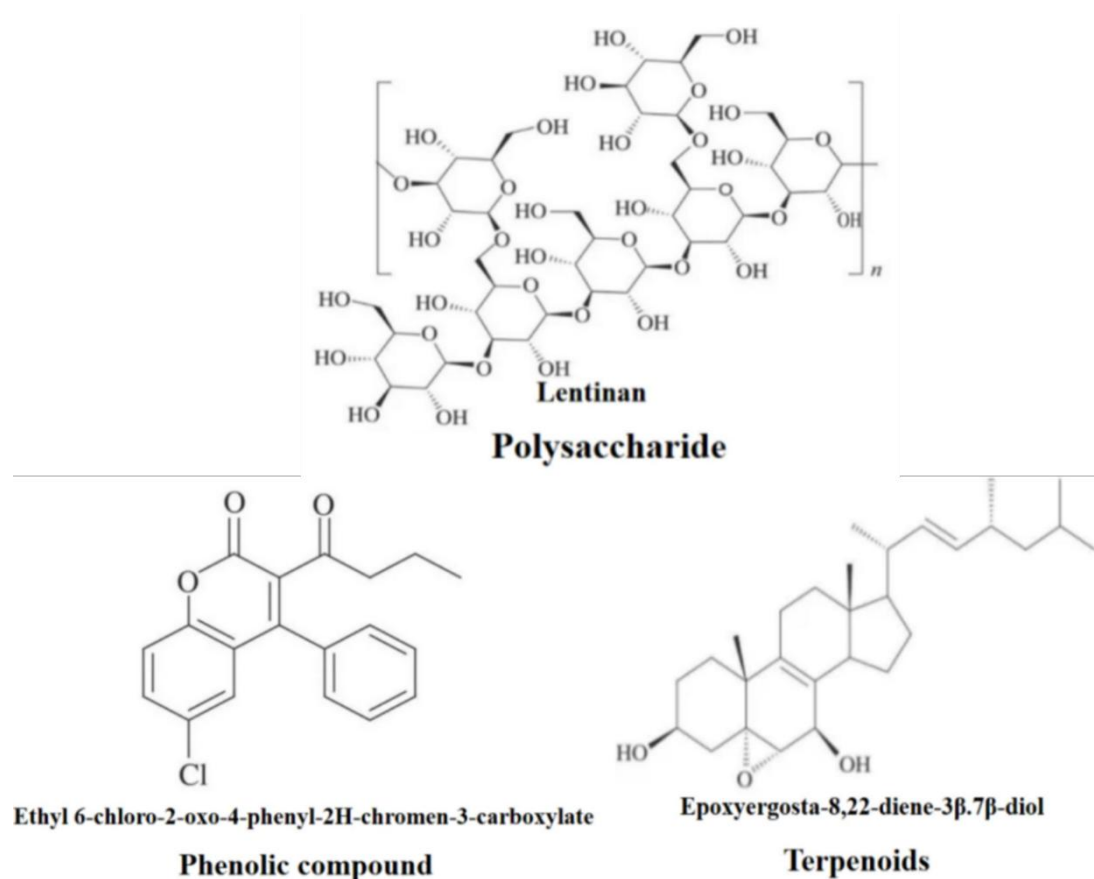


圖 2-2、菇類中多醣體、酚類化合物與三萜類化合物之結構 (Guo et al., 2025)

Figure 2-2. Structures of mushroom polysaccharides, phenolic compounds, and triterpenoids (Guo et al. 2025).

2.2. 菇類多醣體

2.2.1. 多醣體與菇類多醣體簡介

多醣體為生物體中常見的物質，其主要是由多個單醣以醣苷鍵 (glycosidic bond) 互相連接所組成的鏈狀大分子化合物。多醣體由單醣的組成的種類大致可分為同質多醣 (homopolysaccharides) 與異質多醣 (heteropolysaccharides) 兩種。同質多醣代表此多醣分子以相同的單醣相接而成，例如葡聚醣與半乳聚醣，而異質多醣體則是由多種單醣所組成，例如半乳葡聚醣與岩藻葡聚醣等。

除單醣種類外，各單醣間的鍵結方式也十分多樣，以植物葛根為例，其葡聚醣的鍵結型式為 $\rightarrow 3$)- α -Glc-(1 $\rightarrow$ 與 $\rightarrow 4$)- β -Glc-(1 $\rightarrow$ (Li et al., 2024)，而菇類多醣體則通常含有 $\rightarrow 3$)- β -Glc-(1 $\rightarrow$ 與 $\rightarrow 6$)- β -Glc-(1 $\rightarrow$ (Palacios et al., 2012; Samuelsen et al., 2019; Synytsya & Novák, 2013)，這些不同的組合方式使得多醣體的型態十分多元。

菇類的多醣體廣泛存在於細胞壁與細胞內，是維持結構、獲得能量與傳遞訊息的重要分子。菇類的多醣體大多由葡萄糖、半乳糖、岩藻糖與甘露糖等單醣組成 (Lu et al., 2023; Samuelsen et al., 2019)，其鍵結形式、分子量、單醣種類與占比等性質會因為萃取的溫度、溶劑種類、酸鹼值或是不同萃取部位等而有所不同，進而產生多種生物活性，因此多醣體是目前菇類最主要被研究的活性物質之一。

2.2.2. 菇類多醣體之分子量

菇類多醣體的分子量大小普遍被認為是影響其生物活性的因素，研究指出分子量越大的多醣體越容易與細胞的受體結合，且較大的多醣體分子變化性高，因此容易展現良好的生物活性 (Meng et al., 2016)；例如囊口菇 (*Macrocybe titans*) 的大分子量多醣體對於三陰性乳癌細胞 MDA-MB-231 的凋亡效果優於小分子量多醣體 (da Silva Milhorini et al., 2025)；烏苓參的兩種純化多醣體以分子量較大者具有較好的抑制一氧化氮、TNF- α 與 IL-6 分泌的效果 (任, 2018)。因此分析多醣體的分子量可以初步推測其生物活性的強弱。

雖然大分子量的多醣體一般具有較佳的生物活性，但研究也指出多醣體的分子量過大可能會受限於組織屏障而較難進入細胞或與受體結合，進而影響其生物活性 (Yang et al., 2022)。目前已有許多小分子量多醣體的研究，如雲南雞油菌的

多醣體 CY-2 分子量約為 26.9 kDa，可抑制 α -葡萄糖苷酶的活性，具有降血糖功效 (Tian et al., 2023)；猴頭菇多醣體 HEFP 多醣體的分子量約為 15-17 kDa，其具有緩解小鼠潰瘍性腸炎與平衡腸道菌叢的功效 (Li et al., 2024)。



2.2.3. 生長環境與產地差異

菇類的種類繁多，且許多種類分布廣泛，因此為了適應環境，菇類在生長過程中會針對其多醣體的結構、醣類組成或是蛋白質含量等方面進行調整，進而使得相同種類但生長於不同產地下的菇類多醣體有著不同的物化性質，例如來自三個產地的猴頭菇在經過相同方法萃取後的多醣體物化性質雖具有相似性，但在醣類含量、蛋白質含量、單醣組成以及醣苷鍵種類與比例上皆表現出差異 (Chen et al., 2023)，這樣的差異會使得多醣體的生物活性產生變化，例如來自塞爾維亞的野生靈芝 (GS) 與中國的栽培靈芝 (GCN) 在物化性質上具有差異，並且在生物活性研究中發現 GCN 具有較佳的抗氧化能力，而 GS 對於人類乳腺癌與子宮頸癌有抑制潛力 (Stojković et al., 2014)。

2.2.4. 蛋白質與多肽

研究指出有些菇類的多醣體會與蛋白質或多肽組成醣蛋白 (glycoprotein) 與醣肽 (glycopeptide)，這些結構複雜的複合物具有較高的彈性且容易被免疫受體辨認 (Han et al., 2014)；許多研究也證實這些複合多醣體具有多元的活性，例如香菇萃取之醣蛋白 SGP 中的疏水性胺基酸有助於與金屬離子的螯合，進而提高其抗氧化能力，另外其 O-糖肽鍵對體內激素的調節有正面影響，是優良的抗氧化劑 (Gao et al., 2023)。雲芝經過酪醇刺激後，其蛋白多醣體 IPS-T 的總碳水化合物、蛋白質和葡萄糖含量增加，使其抗腫瘤活性增強 (Wang et al., 2017)。

2.2.5. 菇類多醣體之免疫調節活性

當遇到外來病原菌、病毒或是其他刺激時，身體內的免疫細胞會活化並發送發炎訊號促使更多免疫反應啟動，是許多生物體內的重要防禦手段。菇類的多醣體已被確認具免疫促進性，其可藉由與免疫細胞上的受體結合促使自然殺手細胞、T 細胞、樹突細胞、嗜中性球及單核球等免疫細胞活化 (圖 2-3)；例如蟲草花多醣體 CMP-III 能夠增強巨噬細胞的吞噬功能，促進一氧化氮、TNF- α 和 IL-6 的

分泌，並且 CMP-III 可能透過活化 MAPKs 和 NF- κ B 訊號通路發揮其功能 (He et al., 2020); 靈芝孢子的水溶性多醣體可活化免疫細胞與促進一氧化氮產生 (Sheng et al., 2022); 雲芝多醣體可促進巨噬細胞 RAW264.7 的吞噬作用，也可以刺激一氧化氮等發炎因子分泌 (Zhang et al., 2021); 香菇多醣體可減緩癌細胞的增殖能力，對於胃癌細胞與結腸癌細胞的生長有抑制效果 (Park et al., 2024)。

2.2.6. 菇類多醣體之抗發炎活性

雖然發炎為生物體重要的防禦手段，但發炎反應持續的時間過長可能會造成許多問題，例如破壞正常的組織、發炎處纖維化與免疫系統失調等，可能導致慢性疾病，因此抑制不正常的發炎反應可協助身體恢復正常機能。

菇類多醣體也可以藉由調控免疫相關的基因表現與抑制發炎訊號通路來調控細胞激素的分泌，進而達到抑制不正常發炎的效果；例如人工培養的烏苓參多醣體 TXNP 與 CXNP 可抑制 RAW264.7 分泌 IL-1、TNF- α 、NO 及 PGE2 分泌，也減少 iNOS 及 COX-2 的表現及轉錄因子 NF- κ B 的活化 (陳，2015)；杏鮑菇多醣體 PEP-0.1-1、PEP-0-1 和 PEP-0-2 皆會透過 NF- κ B 和 MAPK 訊號通路顯著的抑制 NO、TLR4、TNF- α 、IL-6 與 IL-1 β 分泌 (Wang et al., 2024)。另外針對動物的實驗也顯示菇類多醣體的抗炎效果，例如香菇多醣體可抑制小鼠體內經脂多醣誘導之 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的分泌並保護腎臟免於受到發炎因子的破壞 (Song et al., 2020)，這些生物體外與體內的研究均顯示各種菇類的多醣體在抑制發炎上具有良好的效果。



表 2-1、菇類多醣體之鍵結模式、結構、分子量與生物活性 (Guo et al., 2025)

Table 2-1. Linkage patterns, structures, molecular weights, and bioactivities of fungal polysaccharides (Guo et al., 2025).

Mushroom types	Polysaccharide	Structure (basic unit)	Conformation	Mw (kDa)	Main bioactivities
<i>Hericium erinaceus</i> (Bull.) Pers.	<i>Hericium erinaceus</i> polysaccharide (HEP)	(1 → 6)- α -D-galactopyranosyl backbone generally has α -L-fucopyranose branches at O-2.	Tri-helix branched	19–1000	Immunomodulatory Hepatoprotective Antihyperglycaemic Hypolipidemic
<i>Lentinula edodes</i>	Lentinan (β -glucan)	Backbone ((1 → 3)- β , each the five Glc possess two (1 → 6)- β -branches	Tri-helix branched	300–800	Prebiotic Antimicrobial Anti- Allergic
<i>Agaricus bisporus</i> <i>Cordyceps sinensis</i> <i>Flammulina velutipes</i>	Glycogen (α -glucan)	There is a linear chain with (1 → 4)- Dand branches with (1 → 6)-D.	Spiral branch	200–400	Antioxidant Immunomodulatory Antiviral
<i>Grifola frondosa</i> (maitake)	Grifolan (β -glucan)	Oligosaccharides consist of three glutamate units and one side chain, which are linked by a (1 → 6)- glycosidic bond.	Tri-helix branched	300–1000	Prebiotic Antitumour Antidiabetes
<i>Ganoderma lucidum</i> (Curtis) P. Karst.	Ganoderan A, B, C (β -glucan)	(1 → 3)- β backbone, branched at C-6 with (1 → 6)- β Glc units.	Branched coiled or helical	5.8–4400	Hypoglycemic Immunomodulatory Antiviral
<i>Schizophyllum</i> <i>commune</i>	Schizophyllan (sizofran; β -glucan)	(1 → 3)- β Glucosidic bonding links three glucose molecules, possessing one Glc side chain connected with the main chain by (1 → 6)- β glycosidic bonds.	Tri-helix branched	100–200	Prebiotic Antimicrobial Antitumor
<i>Trametes versicolor</i> (L.) Lloyd	Krestin (β -glucan)	Heteroglycan consists of a main chain ((1 → 4)- β) and side chains ((1 → 3)- β and (1 → 6)- β), each of which is linked to a protein.	Tri-helix branched	100	Antitumor Antioxidant Neuroprotective reinforcement
<i>Cryptococcus</i> spp. <i>Agaricus</i> <i>Cylindracea</i> <i>Ganoderma</i> spp. <i>Lentinus</i>	Pseudonigeran (α -glucan)	Units that make up (1 → 3)-D.	Linear	9–560	Prebiotic
<i>Pleurotus ostreatus</i> (oyster)	Pleuran (β -glucan)	Four Glc connected by (1 → 3)- β glycosidic linkages, (1 → 6)- β Glycosidic bonds attach every Glc unit apart from chain.	Helicor coils with branches	600–700	Anti-inflammatory Antimicrobial/Antiviral Immunesystem reinforce

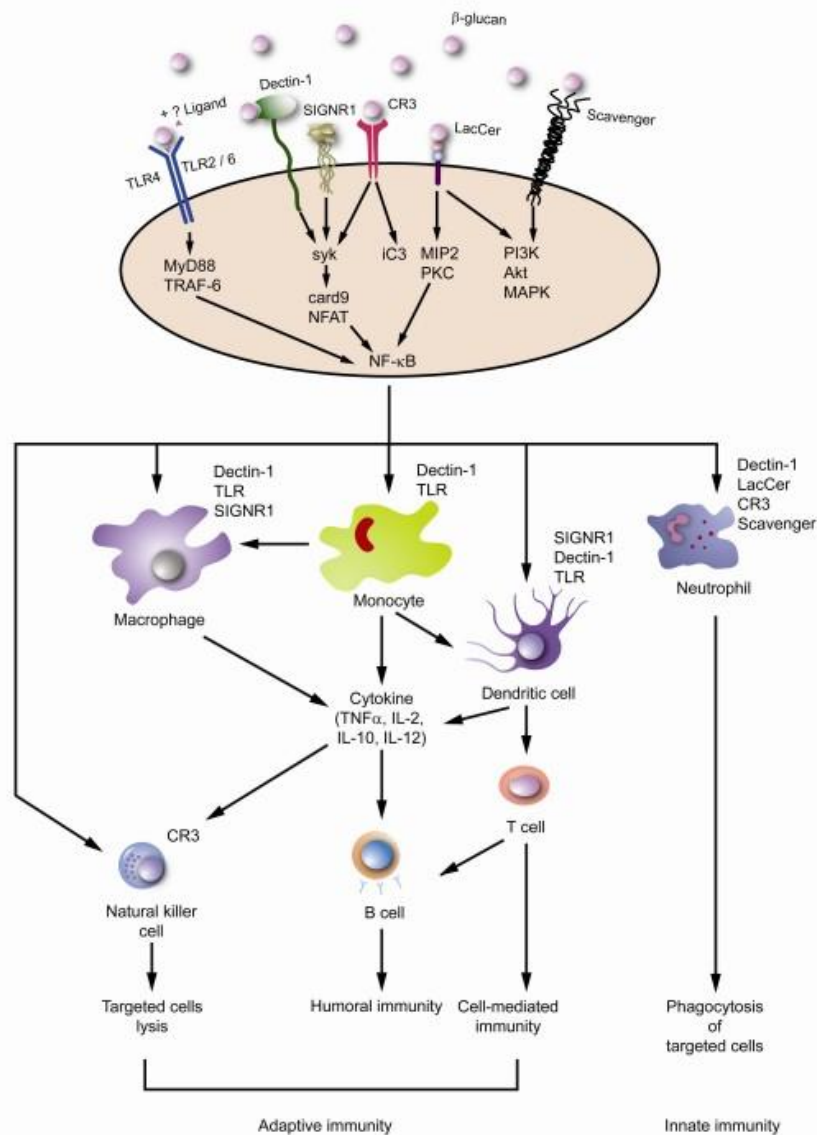


圖 2-3、菇類多醣體之免疫調節機制 (Chan et al., 2009)

Figure 2-3. Mechanisms of immunomodulation induced by fungal polysaccharides (Chan et al., 2009).

2.3. 硫磺菌

2.3.1. 硫磺菌簡介

硫磺菌的學名為 *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill，又名雞冠菌、鮭肉菌、硫色絢孔菌或硫磺多孔菌，屬於擔子菌門 (Basidiomycota) 白肉迷孔菌科 (Fomitopsidaceae) 的真菌。硫磺菌的子實體呈現橘紅色，其菌傘寬度最大可達 30 公分，呈現半圓或扇形，彼此如瓦片般互相疊生 (圖 2-4)。

硫磺菌常見於中低海拔的闊葉林中，喜好生長於枯木上，其族群分布廣泛，在歐洲、亞洲與美洲等地皆有發現，而在臺灣的中低海拔山區也有其分布。硫磺菌具有特殊的香氣，幼嫩時的子實體在煮熟後味道鮮美，而老後的子實體口感較差，但其含有豐富的胺基酸、脂肪酸、碳水化合物、維生素與礦物質等成分，可調節身體機能，是一種高營養價值的食用藥用菇類 (Khatua et al., 2017)。

2.3.2. 硫磺菌多醣體的結構與生物活性

多醣體是硫磺菌中最主要的活性成分之一。Alquini 等人 (2004) 在硫磺菌子實體中萃取出兩種不同的多醣體，其中一種為直鏈的 β -葡聚糖，構形為 $\rightarrow 3$)- β -Glc-(1 $\rightarrow$ ；另一種則是以 α -(1 $\rightarrow$ 6) 半乳糖為主鏈的異質半乳聚糖，其岩藻糖、甘露糖、半乳糖與葡萄糖之比例為 18:35:41:6，在主鏈上的 2-*O* 處具有甘露糖與岩藻糖的取代 (圖 2-5)。另外，根據 Jen (2024) 的研究，硫磺菌的蛋白聚糖 F2 以 β -(1 $\rightarrow$ 6) 葡聚糖與 α -(1 $\rightarrow$ 6) 半乳聚糖作為多醣體主鏈，並且在葡萄糖的 3-*O* 處與半乳糖的 2-*O* 處由葡萄糖、甘露糖與岩藻糖等支鏈取代。

研究發現，硫磺菌的多醣體中有硫酸根基團存在，這樣的特性使得多醣體呈現高度負電，對於水的溶解度更佳，進而容易與細胞產生交互作用；例如硫磺菌的硫化多醣體 SPS 可抑制 TNF- α 、IL-6 和 TGF β 的分泌，具有良好的抗發炎效果 (Lu et al., 2023)；硫磺菌的 SPS 多醣體也可使細胞週期停止於 G0/G1 期進而抑制乳癌細胞的增生，且能夠阻止乳癌細胞遷徙與增強巨噬細胞毒殺乳癌細胞的活性 (Jen et al., 2024; 任，2024)。



圖 2-4、硫磺菌子實體型態 (Andreas Eichler, 2017)

Figure 2-4. Fruiting bodies of *Laetiporus sulphureus*

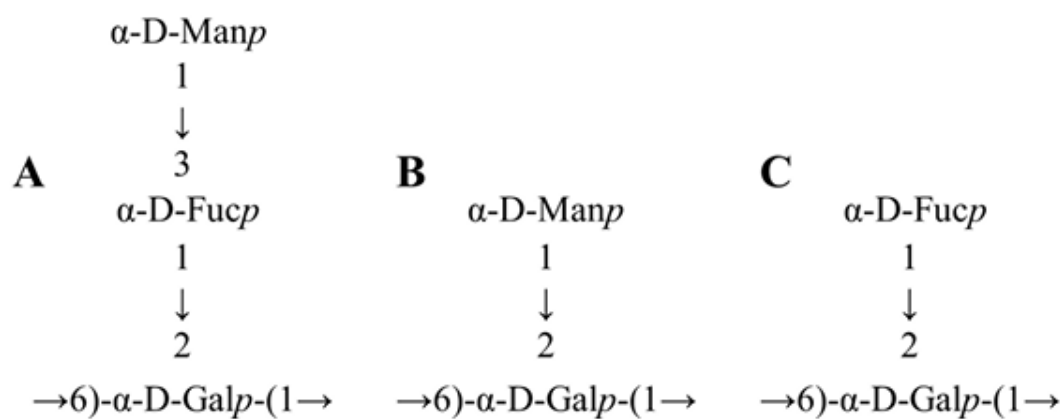


圖 2-5、硫磺菌多醣體之重複單元的鍵結模式 (Alquini et al., 2004)

Figure 2-5. Linkage pattern of the repeating unit in *Laetiporus sulphureus* polysaccharides (Alquini et al., 2004).

2.4. 巨噬細胞與抗發炎

2.4.1. 巨噬細胞

巨噬細胞為白血球之一，由單核球細胞轉變而成，當組織受到損傷或是病原體入侵時，會釋放組織胺促使單核球離開血管往受損處移動，並轉變為巨噬細胞，這些巨噬細胞在組織中除了吞噬病原體外，也會向外分泌細胞因子，促使更多免疫細胞參與發炎反應，是身體抵禦外來入侵的重要一環 (Belboul et al., 2025)。

在發炎的相關研究中，小鼠巨噬細胞 RAW 264.7 是最常被使用的免疫細胞之一，根據文獻，其最早是在 BALB/c 的小鼠中注入 A-MuLV 病毒，使其細胞癌化後取得 (Raschke et al., 1978)，因此 RAW 264.7 同時具有持續分裂、吞噬作用與免疫反應等特性，相較於先前研究使用的原代免疫細胞 (例如: BMDMs、腹腔巨噬細胞與肝臟巨噬細胞等) 更加穩定。目前 RAW 264.7 細胞被廣泛應用於需要模擬發炎的研究中，例如抗發炎藥物的測試、天然物抗發炎活性評估與發炎路徑分析等，對於發炎相關的研究十分重要。

2.4.2. 脂多醣與發炎

脂多醣 (Lipopolysaccharide, LPS) 是一種由脂質與多醣體組成之大分子，是許多革蘭氏陰性菌細胞壁的重要組成部分，為一種細菌毒素，因此脂多醣也被稱作內毒素 (endotoxin)。脂多醣主要由脂質 A (lipid A)、核心寡醣 (core oligosaccharide) 與 O-抗原多醣 (O-antigen polysaccharides) 等結構所組成 (Di Lorenzo, 2017)，其中核心寡醣還可以再區分成 inner core 與 outer core，整體結構可參考圖 2-6。由於脂多醣的毒性主要來自於結構保守的脂質 A (Rietschel et al., 1987)，因此免疫細胞能藉由此結構得知革蘭氏陰性細菌的存在，並啟動相對應的免疫反應。

當身體受到革蘭氏陰性菌感染時，脂多醣會刺激巨噬細胞、嗜中性球或淋巴細胞產生多種發炎因子，例如 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 與一氧化氮等，促使免疫反應啟動，但過量的脂多醣可能會造成免疫細胞分泌過多發炎因子，進而造成類風溼關節炎、粥狀動脈硬化或是敗血症等，因此脂多醣在發炎相關的研究中時常作為刺激巨噬細胞發炎的物質 (Page et al., 2022)。

2.4.3. 一氧化氮與 iNOS

一氧化氮 (nitric oxide, NO) 是一種含有一個氮原子與一個氧原子的氣態分子，由於其電子在結合時並不成對，因此是一個不穩定的自由基，其半衰期僅有幾秒鐘。在身體中，一氧化氮主要由一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 與精胺酸作用所產生，由於其在脂質與水中皆有良好的溶解度，因此可以做為訊號傳遞物質穿越細胞膜。一氧化氮在身體中能調控多種發炎相關的功能，包含擴張血管、傳遞訊號與調節免疫反應，其對於血管的舒張效果最早在乙醯膽鹼對於兔的動脈收縮與舒張的研究中被注意 (Furchgott & Zawadzki, 1980)，且在幾年後在肺動脈與靜脈內皮細胞研究中被確認為一氧化氮 (Ignarro et al., 1987)。

一氧化氮合酶 (NOS) 是一類可將 L-精胺酸氧化為一氧化氮與 L-瓜胺酸的蛋白質，其種類有神經型 (neuronal NOS, nNOS)、誘導型 (inducible NOS, iNOS) 與內皮型 (endothelial NOS, eNOS)，其中 iNOS 產生的一氧化氮數量最多。iNOS 一般存在於巨噬細胞、單核球、嗜中性球、內皮細胞與平滑細胞中，當接收到如 LPS 或 IL-1 β 等因子的刺激時，iNOS 便會活化並產生大量的一氧化氮，以調節免疫反應與傳遞發炎訊號 (Ahmad et al., 2020)。

2.4.4. TNF- α 與 IL-6

在發炎反應中，巨噬細胞除了分泌一氧化氮外，也會分泌一系列的細胞激素，例如 TNF- α 與 IL-6 等，這類的蛋白可藉由專一性受體辨認並調控細胞內的基因表現與下游產物的生成，進而對細胞的行為產生影響，是控制免疫反應的重要因子。

腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor alpha, TNF- α) 也被稱為惡液質素 (cachectin)，是一種急性反應蛋白 (acute phase protein)。TNF- α 在釋放前為一組 26 kDa 之跨膜蛋白質，在經過切割後的水溶性蛋白分子量約為 17 kDa。TNF- α 可破壞腫瘤中的血管並促使腫瘤細胞凋亡，也可以促使細胞分泌 iNOS、IL-1 β 或是 IL-6 等蛋白質，有助於發炎反應擴大。

介白素-6 (interleukin-6, IL-6) 為白血球介素的成員之一，其同樣也是一種急性反應蛋白。巨噬細胞的受體在接受病原刺激後會大量分泌 IL-6，調節 T 細胞分化與活化 B 細胞產生抗體，進而啟動發炎反應 (Hirano et al., 1986)。IL-6 的分子量約在 21-28 kDa，在 1978 年針對 T 細胞的研究中發現 T 細胞會分泌一種物質

促使 B 細胞產生 IgG (Kishimoto et al., 1978)，並且在 1986 年由此物質的 cDNA 分析確認其為細胞激素的一種 (Hirano et al., 1986)。



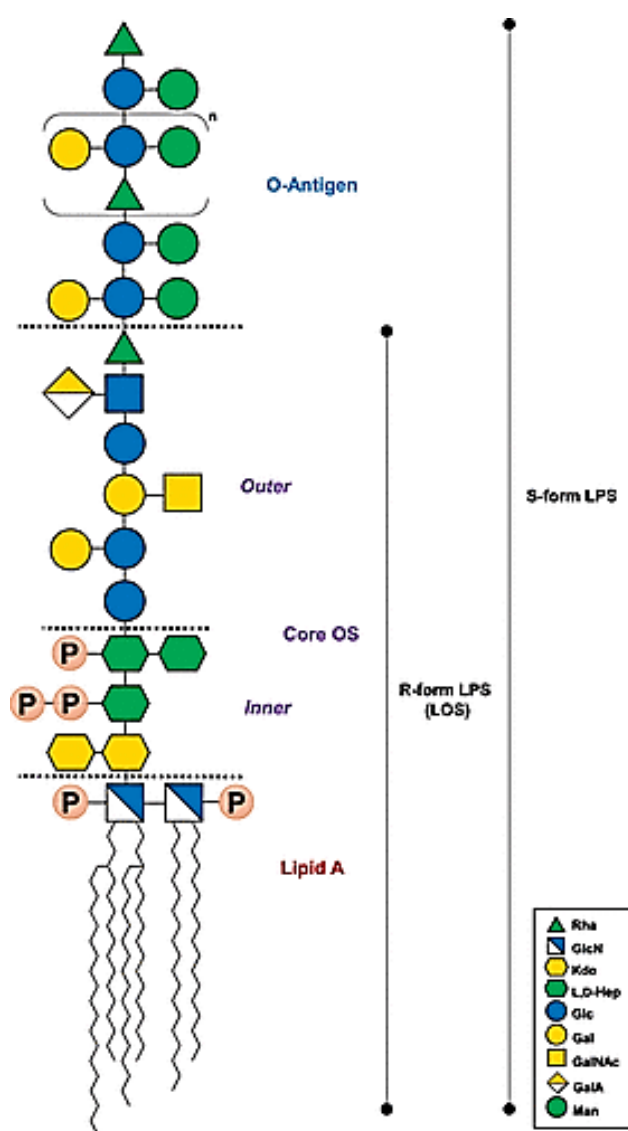


圖 2-6、脂多醣的化學結構示意圖 (Di Lorenzo et al., 2022)

Figure 2-6. Schematic diagram of the chemical structure of lipopolysaccharide (Di Lorenzo et al., 2022).

第三章、研究動機與目的

因來自於不同菇類種類、萃取方法或是不同產地的多醣體在物化性質上可能會有差異，使得它們的生物活性可能有所不同，因此研究多醣體的物化性質對於其生物活性分析十分重要。目前尚缺少不同產地硫磺菌多醣體的物化性質與抗發炎活性分析報告，因此本研究擬用南投 (NT)、雲南 (YN)、東勢 (DS) 與豐丘 (FQ) 等產地和硫化多醣體 (Sulfate polysaccharides, SPS) 及一般多醣體 (Polysaccharides, PS) 的萃取方法所取得的硫磺菌多醣體，進行物化性質與抗發炎活性的差異評估，接著再取活性最佳的多醣體進一步分析其化學結構，嘗試探討造成其產生生物活性的因素。

第四章、材料與方法

4.1. 材料及化學試劑

本研究所使用之人工栽培硫磺菌子實體均由康建生物科技股份有限公司（南投縣草屯鎮雙冬里中正路 97 號）生產提供，其種源分別為臺灣南投、東勢、豐丘與中國雲南。牛血清蛋白 (bovine serum albumin, BSA)、脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS)、 α -澱粉酶 (α -amylase) 及 α -葡萄糖苷酶 (α -glucosidase) 購自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。DMEM 培養液 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 及胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 購自 Gibco (Grand Island, NY, USA)。磷酸鹽緩衝液 (phosphate buffered saline, PBS) 購自 HyClone (Logan, UT, USA)。ELISA kit 購自 BD Bioscience (USA)。其餘使用之化學藥劑皆為試藥級。



4.2. 含硫多醣體 (SPS) 與純化多醣體 (PS) 之製備

4.2.1. 含硫多醣體 (SPS) 之萃取與純化

含硫多醣體的萃取方法參照等 Lu 等人 (2023) 的實驗步驟進行。

1. 取 1 g 之硫磺菌子實體粉末，並加入 40 mL 之萃取緩衝液 (含 0.1 M 醋酸鈉、5 mM 半胱胺酸、100 mg 木瓜酵素與 5 mM EDTA，pH 值 5.5)。
2. 放置於 60°C 水浴下萃取 24 小時，接著以 2000 ×g 離心 10 分鐘 (CN-6000; HsiangTai Machinery Industry Co., New Taipei City, Taiwan)，收集上清液。
3. 重複上述步驟再次萃取沉澱物，完成後合併收集兩次萃取之上清液。
4. 取上清液體積 3.75 倍的 95% 乙醇，緩慢滴入上清液，接著在 4°C 下靜置隔夜。
5. 以 9000 ×g 離心 10 分鐘 (Avanti J-26S XP; Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA)，取得沉澱物並以 100 mL 去離子水回溶，接著裝入透析袋 (molecular weight cut-off: 12-14 kDa; Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA, USA) 於 4°C 下透析 72 小時，每 6 到 8 小時替換一次超純水。
6. 取透析完成之溶液以 9000 ×g 離心 10 分鐘 (Avanti J-26S XP; Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA)，接著取上清液進行冷凍乾燥 48 小時，最後將含硫多醣體粉末 (SPS) 收集秤重，並以下列算式計算產率。所有樣品均保存於防潮箱中備用。

$$\text{產率 (\%)} = \frac{\text{含硫多醣體粉末 (g)}}{\text{子實體粉末 (g)}} \times 100\%$$

4.2.2. 純化多醣體 (PS) 之萃取與純化

硫磺菌之純化多醣體的萃取與純化參照 Su 等人 (2017) 的實驗步驟進行。

1. 取 3 g 硫磺菌子實體粉末，加入去離子水 150 mL 後置於 100°C 下萃取 3 小時。
2. 以濾紙過濾並收集已降溫的溶液，接著將過濾完成的澄清液體進行減壓濃縮，直到體積減少至 40 mL 以下。
3. 以 4 倍體積之 95% 乙醇將多醣體沉澱析出，並於 4°C 下靜置隔夜。
4. 取出靜置的溶液以 3500 rpm 離心 10 分鐘，取得的沉澱物以 95% 乙醇潤洗 3 次，最後可獲得粗多醣沉澱物。
5. 將沉澱物以去離子水回溶，置於 -20°C 下冷凍，接著再進行冷凍乾燥 48 小時，

完成後取得的粉末即為水溶性粗多醣粉末 (crude polysaccharides)。

6. 取粗多醣粉末以 0.5 mg/mL 的比例溶於去離子水中，調整 pH 至中性後，放入透析袋 (molecular weight cut-off: 12-14 kDa; Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA, USA)，並加入 100 μ L 之 α -澱粉酶溶液 (2 mg/mL; 60 U/mL) 與 α -葡萄糖苷酶溶液 (2 mg/mL; 60 U/mL)。
7. 將透析袋置於超純水中 72 小時，每 6 到 8 小時替換一次超純水。
8. 將溶液移入分液漏斗，並加入多醣溶液體積 1/3 倍的 Sevag 試劑 (氯仿:正丁醇 = 4:1, v/v)，劇烈搖晃後在室溫下靜置 10 分鐘等待其分層，接著移除下層的試劑與蛋白質。此步驟重複三次。
9. 將完成去蛋白的溶液體積減壓濃縮至 40 mL 以下，接著將其放置於 -20°C 下冷凍。
10. 最後進行冷凍乾燥 48 小時取得純化多醣體粉末 (PS)，並以下列算式計算產率。所有樣品均保存於防潮箱中備用。

$$\text{產率 (\%)} = \frac{\text{粗多醣或純化多醣體粉末 (g)}}{\text{子實體粉末 (g)}} \times 100\%$$

4.3. 總醣含量分析

本分析參照 DuBois 等人 (1956) 與 Masuko 等人 (2005) 的方法進行硫磺菌多醣體總醣含量分析。



4.3.1. 原理

濃硫酸具有脫水的效果，因此碳水化合物在濃硫酸的作用下會脫水形成呋喃 (furan) 衍生物，而這些衍生物再與苯酚縮合後會產生具 UV-Vis 吸光的複合物，因此可藉由測量特定波長的吸光值來推測總碳水化合物含量。根據研究，其最大吸光值出現在 490 nm，因此使用 490 nm 作為偵測波長。。

4.3.2. 測定方法

1. 取各產地之硫磺菌含硫多醣體 (SPS) 與純化多醣體 (PS)，以去離子水配製成溶液，濃度為 100 µg/mL (100 ppm)。
2. 將樣品溶液與葡萄糖標準品 (0、20、40、60、80 及 100 µg/mL，溶於去離子水) 加入 96 孔盤中。
3. 加入 30 µL 之 5% 苯酚 (phenol) 溶液，混和均勻後再加入濃硫酸 150 µL。
4. 置於 90°C 水浴下反應 5 分鐘，完成後取出冷卻至室溫。
5. 使用 ELISA plate reader (Infinite M200 PRO, Tecan, Switzerland) 在 490 nm 下測量樣品與葡萄糖標準品之吸光值，完成後建立標準曲線，並帶入樣品測值以取得濃度。總醣含量 (%) 的計算以樣品溶液的濃度為分母，總醣濃度為分子。

$$\text{總醣含量 (\%)} = \frac{\text{總醣濃度 (\mu\text{g/mL})}}{\text{樣品溶液濃度 (\mu\text{g/mL})}} \times 100\%$$

4.4. 多醣體物化性質分析

4.4.1. 蛋白質含量分析 (Bradford, 1976)

1. 取 2 mg 多醣體粉末以 500 µg/mL 的濃度比例溶於 4 mL 的 PBS 中，接著取 50 µL 的樣品溶液與 BSA 標準品 (0、20、40、60、80 與 100 µg/mL，溶於 PBS) 加入 96 孔盤。
2. 加入 200 µL 的 dye reagent (Coomassie Brilliant Blue G-250) 並充分混和，接著放置於室溫下避光反應 10 分鐘。
3. 以 ELISA plate reader (Infinite M200 PRO, Tecan, Switzerland) 在 595 nm 的波長下測量樣品與標準品之吸光值。
4. 取 BSA 標準品的吸光值建立標準曲線，並計算多醣體樣品之蛋白質含量。

4.4.2. 硫酸根含量分析 (Zhu et al., 2018)

1. 取 1 mg 多醣體粉末加入 1 mL 之 2 M TFA (trifluoroacetic acid)，接著置於 120°C 下水解 1 小時。
2. 將 TFA 抽乾後以超純水回溶，接著以 3 : 7 之比例與 BaCl₂-明膠溶液混和。
3. 靜置 10 分鐘後以 360 nm 波長測量樣品與硫酸鎂標準品的吸光值，建立標準曲線後計算硫酸根含量。

4.4.3. 多醣體分子量分析 (Escarnot et al., 2011)

1. 取 2 mg 多醣體粉末與移動相溶液配製成濃度為 2 mg/mL 的樣品，接著以 0.45 µm 的濾膜過濾。
2. 使用高效液相層析儀 (high performance liquid chromatography, HPLC) 分析樣品之分子量分布。
3. 分析條件：
 - (1) 儀器：Agilent 1100 系列 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) 搭配 G1362A 折射率偵測器 (refractive index detector, RI)。
 - (2) 管柱：TSK gel GMPW_{XL} 管柱 (7.8 mm × 300 mm, 13 µm, Tosoh, Tokyo, Japan)。
 - (3) 移動相溶液：50 mM 硝酸鈉溶液，含 0.05% 疊氮化鈉。
 - (4) 標準品：多醣體的分子量分析使用 dextran 標準品 (5、25、150、270、670 與 1100 kDa) 作為標準品，並利用不同分子量的標準品在管柱內的滯留時間建

立標準曲線。

(5) 分析時的樣品體積為 20 μL ，移動相流速為 0.6 mL/min，分析時間如表 4-1 所示。



表 4-1、多醣體分子量之 HPLC 分析條件

Table 4-1. The HPLC analysis conditions for the molecular weight of polysaccharides.

Time (min)	Flow rate (mL/min)	50 mM NaNO ₃ with 0.05% NaN ₃ (%)
0	0.6	100
25	0.6	100

4.4.4. 單醣組成分析 (Dai et al., 2010; Wu et al., 2012)

4.4.4.1. TFA 酸水解

1. 取樣品 2 mg 進入水解管中，加入 1 mL 之 2 M TFA (trifluoroacetic acid)，於 120°C 下進行水解 1 小時。
2. 水解完成後將水解液倒入樣品瓶，並使用甲醇將剩餘的產物潤洗至樣品瓶。
3. 進行減壓濃縮抽乾液體，完成後加入 2 mL 50% 甲醇並再次抽乾。此步驟需反覆進行至無 TFA 殘留。
4. 以超純水回溶樣品 (回溶樣品濃度 5 mg/mL)，在經過 0.45 μm nylon 濾膜過濾後避光儲存於 -20°C。

4.4.4.2. 衍生化

1. 取 100 μL 之樣品與標準品加入 100 μL 0.6 M NaOH，混和均勻後再取 50 μL 至微量離心管中。
2. 加入 50 μL 0.5 M PMP (1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone；溶於甲醇) 並將其置於 70°C 下反應 100 分鐘。
3. 取出冷卻後加入 50 μL 0.3 M HCl 終止反應，接著再加入 200 μL 的超純水。
4. 加入 500 μL 氯仿並劇烈震盪以去除未反應的試劑，接著抽出氯仿層。此步驟需重複三次。
5. 剩餘的水溶液以 0.45 μm nylon 濾膜過濾，保存於 4°C 下備用。

4.4.4.3. HPLC 分析

1. 所有樣品與標準品以逆相高效液相層析儀 (reverse phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC) 進行分析。
2. 分析條件：
 - (1) 儀器：Agilent 1100 系列 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) 搭配 G1379A 除氣裝置、G1311A 四相幫浦與 G1314A 紫外光及可見光偵測器。
 - (2) 管柱：Mightysil RP-18 GP 管柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm, Kanto Chemical, Japan)。
 - (3) 移動相溶液：溶液 A 為磷酸鹽緩衝液 (pH 6.7)，溶液 B 為乙腈。
 - (4) 標準品：由葡萄糖 (glucose)、半乳糖 (galactose)、岩藻糖 (fucose)、甘露糖 (mannose)、核糖 (ribose)、鼠李糖 (rhamose)、木糖 (xylose)、阿拉伯糖 (arabinose)、葡萄糖醛酸 (glucuronic acid) 與半乳糖醛酸 (galacturonic acid) 等十種單糖的 PMP 衍生物組成。由於每種單糖在管柱內的滯留時間不同，因此可與樣品進行比對，再將不同濃度 (50、100、500、1000 與 2000 μg/mL) 標準品所得到的波峰積分，即可建立標準曲線。
 - (5) 分析時的樣品體積為 20 μL，移動相流速為 1.0 mL/min，偵測波長為 245 nm，流洗液條件為 A : B = 82.5 : 17.5 (v/v)，如表 4-2 所示。

表 4-2、多醣體單糖組成之 HPLC 分析條件

Table 4-2. The HPLC analysis conditions for the monosaccharide composition of polysaccharides.

Time (min)	Flow rate (mL/min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
0	1.0	82.5	17.5
60	1.0	82.5	17.5

4.4.5. 醣苷鍵種類分析 (Peng et al., 2010)

1. 所有樣品均以傅立葉轉換紅外光譜儀 (Fourier-transform infrared spectroscopy, FT-IR) 進行分析。
2. 儀器：Thermo Scientific Nicolet iS50 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)，分析範圍為 4000 至 400 cm⁻¹。

3. 分析方法：取樣品粉末放置於儀器上並完全覆蓋偵測器，完成後壓實樣品分析 10 分鐘，最後移除樣品粉末，確保儀器完全乾淨後放上下一個樣品。



4.5. 細胞培養

4.5.1. 細胞種類與培養條件

本研究使用之小鼠巨噬細胞 RAW 264.7 (ATCC TIB-71) 來自食品工業發展研究所 (Bioresource Collection and Research Center, BCRC, Hsinchu, Taiwan)，其生長於 DMEM 培養基 (Dulbecco's Modified Eagle Medium)，且培養條件為 37°C 及 5% CO₂。DMEM 培養基含 90% DMEM 培養液與 10% 胎牛血清。

4.5.2. 細胞活化與繼代培養

4.5.2.1. 細胞活化

1. 將 DMEM 培養基放置於 37°C 水浴中回溫，完成後以 70% 乙醇擦拭並移入生物安全櫃中備用。
2. 取出含有細胞之冷凍保存管放入 37°C 水浴槽中快速回溫，待其融化後以 70% 乙醇擦拭並移入生物安全櫃中備用。
3. 將 4 mL DMEM 培養基與 1 mL 細胞懸浮液加入離心管，接著以 1000 rpm 離心 5 分鐘，完成後去除上清液並加入 1 mL 之新鮮 DMEM 培養基。
4. 均勻混和細胞後將其取出加入含有 4 mL 新鮮 DMEM 培養基的 25 T 培養瓶，接著搖晃培養瓶使細胞混和均勻後放入培養箱培養。
5. 培養一日後需更換培養液，接著每隔 2 至 3 日需進行繼代。

4.5.2.2. 細胞繼代培養

1. 當細胞生長至容器底面積的 80% 時需進行繼代。首先將舊的培養液移除，以 PBS 緩衝液 (phosphate-buffered saline, 含 6.7 mM PO₄³⁻) 清洗細胞兩次。
2. 加入 3 mL 之新鮮培養基至培養瓶，接著以細胞刮勺輕輕取下附著在瓶底的細胞，完成後沖散細胞使其均勻懸浮。
3. 取特定體積之細胞液加入新的培養瓶中，接著以 DMEM 培養基將溶液體積調整為 5 mL，最後將培養瓶放置於培養箱中培養。

4.5.3. 細胞冷凍保存

1. 當細胞成長至容器底面積的 80%，且處於指數生長期 (log phase) 時即可進行冷凍保存。首先將細胞以繼代培養的步驟收集，接著取 20 μ L 細胞懸浮液

與 20 μ L 染劑混和後注入細胞計數器。

2. 計算出細胞濃度後取細胞懸浮液進入離心管，以 1000 rpm 離心 5 分鐘並去除上清液。
3. 加入冷凍保存液 (DMSO : FBS = 1 : 9 (v/v)) 並將細胞濃度調整為 1×10^6 cells/mL，接著以每管 1 mL 的比例加入冷凍保存管。
4. 將冷凍保存管冰入 -80°C 冰箱一天，接著馬上移入液態氮中保存。



4.6. 細胞存活率分析 (MTT assay)

本分析參照 Mosmann (1983) 與 Shan 等人 (2009) 的方法進行，用於了解不同濃度下硫磺菌含硫多醣體 (SPS) 與純化多醣體 (PS) 對 LPS 誘導小鼠巨噬細胞的存活率影響。



4.6.1. 原理

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 是一種水溶性黃色化合物，此化合物在經過細胞粒線體中的細胞色素 c (cytochrome c) 與琥珀酸去氫酶 (succinate dehydrogenase, SDH) 的作用後會轉變成紫色的脂溶性甲臍 (formazan) 結晶，因此在經過 DMSO (Dimethyl sulfoxide) 溶解後可在 570 nm 波長下測定吸光值。由於琥珀酸脫氫酶只出現於活細胞內，因此紫色結晶越多即代表細胞存活率越高。

4.6.2. 實驗步驟

1. 收集細胞並使用 DMEM 調整其濃度至 4×10^5 cells/mL，接著取 100 μ L 細胞懸浮液加入 96 孔盤中，並培養 24 小時。
2. 吸除舊培養基，接著加入經過 0.22 μ m PES 濾膜過濾之不同濃度的 SPS 與 PS 多醣體樣品 (0、25、50、100 μ g/mL，溶於 DMEM) 並反應一小時。
3. 除控制組之外，所有處理組均加入 1 μ g/mL LPS (以 DMEM 稀釋) 誘導細胞發炎。
4. 24 小時後，移除所有培養基並以 PBS 清洗細胞，接著加入 100 μ L 0.5 mg/mL 之 MTT (溶於 DMEM)，避光反應 2 小時。
5. 移除上清液後加入 150 μ L DMSO，待紫色結晶完全溶解後，以 ELISA plate reader (Infinite M200 PRO, Tecan, Switzerland) 於 570 nm 波長下測量吸光值，並將 630 nm 波長作為矯正吸光值。
6. 取控制組結果作為分母，各個處理樣品作為分子，計算出 RAW 264.7 細胞在不同處理下之存活率。

4.7. 一氧化氮 (nitric oxide, NO) 產量分析

本研究參照 Su 等人 (2017) 的方法進行，用於了解不同濃度下的硫磺菌含硫多醣體 (SPS) 與純化多醣體 (PS) 對 LPS 誘導小鼠巨噬細胞的 NO 產生量影響。



4.7.1. 原理

NO 為重要的發炎因子之一，因此測定細胞之 NO 產生量可以了解細胞的發炎程度，但 NO 的穩定性低，很容易轉變成硝酸離子 (nitrate, NO_3^-) 與亞硝酸根離子 (nitrite, NO_2^-)，因此測定 NO 產生量時會以 NO_2^- 作為測量標的。進行測定時會使用 Griess reagent 試劑，此試劑主要由磺胺 (sulfanilamide) 與 *N*-(1-奈基)-乙二胺二鹽酸鹽 (*N*-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride, NED) 組成，磺胺首先會與 NO_2^- 離子進行重氮化反應並產生重氮鹽 (diazonium salt)，接著再與 NED 試劑產生耦合反應形成粉色偶氮化合物 (azo compound)，此時使用 540 nm 波長測定吸光值即可估算 NO 生成量。

4.7.2. 實驗步驟

1. 收集 RAW 264.7 細胞，並使用 DMEM 調整其濃度至 4×10^5 cells/mL，接著取 100 μL 細胞懸浮液加入 96 孔盤中，並培養 24 小時。
2. 吸除舊培養基，接著加入經過 0.22 μm PES 濾膜過濾之不同濃度的 SPS 與 PS 多醣體樣品 (0、25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ ，溶於 DMEM) 並反應一小時。
3. 除控制組之外，所有處理組均加入 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS (以 DMEM 稀釋) 誘導細胞發炎。
4. 24 小時後，取 50 μL 細胞上清液與標準品 (0、3.125、6.25、12.5、25、50 與 100 μM 之 NaNO_2 ，溶於 DMEM) 加入 96 孔盤，接著加入 50 μL Griess reagent 試劑避光反應 15 分鐘，最後以 ELISA plate reader (Infinite M200 PRO, Tecan, Switzerland) 於 540 nm 波長下測量吸光值。
5. 將測值代入標準曲線以計算不同產地與濃度之 SPS 與 PS 多醣體處理後，LPS 誘導 RAW 264.7 細胞的 NO 生成量，藉此推測樣品之抗發炎能力。

4.8. TNF- α 與 IL-6 激素定量分析

本研究依據 OptEIA™ Mouse ELISA set (BD Bioscience, USA) 所提供的步驟進行，用於了解不同濃度下的硫磺菌含硫多醣體 (SPS) 與純化多醣體 (PS) 對 LPS 誘導小鼠巨噬細胞的 TNF- α 與 IL-6 激素產生量影響。



4.8.1. 樣品製備

1. 收集 RAW 264.7 細胞，並使用 DMEM 調整其濃度至 4×10^5 cells/mL，接著取 100 μ L 細胞懸浮液加入 96 孔盤中，並培養 24 小時。
2. 吸除舊培養基，接著加入經過 0.22 μ m PES 濾膜過濾之不同濃度的 SPS 與 PS 多醣體樣品 (0、25、50、100 μ g/mL，溶於 DMEM) 並反應一小時。
3. 除控制組之外，所有處理組均加入 1 μ g/mL LPS (以 DMEM 稀釋) 誘導細胞發炎。
4. 24 小時後，收集細胞上清液並保存於 -20°C 下備用。

4.8.2. 分析步驟

1. 取 50 μ L capture antibody 依照推薦比例以 coating buffer 稀釋，接著加入具有特殊塗層之 96 孔盤，並於 4°C 下反應 8 小時。
2. 移除抗體溶液，以 washing buffer (PBS，含 0.05% Tween-20) 清洗 3 次後，加入 300 μ L 之 1% 脫脂牛奶 (溶於 PBS) blocking 1 小時，填補孔盤中未被抗體附著的空隙。
3. 移除脫脂牛奶，以 washing buffer 清洗 3 次後，加入 50 μ L 樣品與標準品 (以含有 0.5% BSA 之 PBS 稀釋) 反應 2 小時。
4. 移除樣品溶液，以 washing buffer 清洗 3 次後，加入 50 μ L detection antibody 反應 1 小時。
5. 移除抗體溶液，以 washing buffer 清洗 3 次後，加入 50 μ L 含鏈黴親和素之辣根過氧化酶 (horseradish peroxidase-streptavidin, Sav-HRP)，並置於暗處反應 30 分鐘。
6. 移除 Sav-HRP，以 washing buffer 清洗 3 次後，加入 50 μ L TMB (3,3', 5,5' - tetramethylbenzidine)，放置於暗處反應 15 分鐘後，以 0.1 M 磷酸溶液停止反應。

7. 以 ELISA plate reader (Infinite M200 PRO, Tecan, Switzerland) 於 450 nm 波長下測定吸光值，最後代入兩個激素的標準品所建立之標準曲線，即可計算經過不同產地與濃度之 SPS 與 PS 多醣體處理後 LPS 誘導 RAW 264.7 細胞的 TNF- α 與 IL-6 生成量。



4.9. 多醣體化學結構鑑定分析

4.9.1. 核磁共振 (nuclear magnetic resonance, NMR) 光譜分析

1. 取 10 mg 多醣體粉末溶於 0.6 mL D₂O，待樣品完全溶解後，裝入 NMR 分析專用玻璃管。
2. 使用 Bruker Advance III 800 MHz NMR 光譜儀 (Bruker BioSpin, Billerica, MA, USA) 進行分析 SPS 與 PS 之 ¹H、¹³C、COSY (correlation spectroscopy)、TOCSY (total correlation spectroscopy)、ROESY (rotating-frame nuclear overhauser effect correlation spectroscopy)、HSQC (heteronuclear single quantum correlation) 與 HMBC (heteronuclear multiple-bond correlation) 等光譜。



4.10. 統計分析

數據以平均值 $\pm$ 標準差表示，並且以統計軟體 SAS 進行單因子變方分析(one-way analysis of variance, one-way ANOVA) 與鄧氏新多重差距檢定 (Duncan's new multiple range test)。P 值小於 0.05 代表組間具有顯著差異。



第五章、結果與討論

5.1. 含硫多醣體 (SPS) 與純化多醣體 (PS) 之產率

表 5-1 為各產地與兩種萃取方法的產率結果。在相同產地下，所有 SPS 的產率均高於 PS，以 NT 為例，其 SPS 與 PS 的產率分別為 7.54% 與 1.11%，本結果與 Jen 等人 (2023) 的實驗結果相似。

在相同萃取方法下，結果顯示不同產地之多醣體的產率呈現差異。SPS 的產率以 YN 最高 (9.46%)，接著為 NT (7.54%)，而 DS (4.12%) 與 FQ (3.48%) 的產率則是最低且兩者在統計上不具顯著差異，顯示出不同產地對 SPS 的產率有影響；各產地 PS 的產率約為 1% 至 1.5%，在統計上並沒有顯著差異，呈現較為一致的結果。



表 5-1、各產地硫磺菌的 SPS 與 PS 多醣體之產率

Table 5-1. Yields of SPS and PS polysaccharides from *L. sulphureus* of different origins.

Samples	Yield (% DW)	
	SPS	PS
NT	7.54 ± 0.88 ^b	1.11 ± 0.07 ^a
YN	9.46 ± 0.52 ^a	1.14 ± 0.19 ^a
DS	4.12 ± 0.88 ^c	1.52 ± 0.44 ^a
FQ	3.48 ± 0.29 ^c	1.36 ± 0.27 ^a

Data are presented as mean ± SD (n = 3). Values followed by the different letter in the same column are significantly different as analyzed by Duncan's new multiple range test (p < 0.05).

5.2. 含硫多醣體 (SPS) 與純化多醣體 (PS) 之物化性質差異

5.2.1. 總醣、總蛋白與硫酸根含量

表 5-2 顯示，各產地 SPS 的總醣含量低，其中含量最高者為 FQS 的 17.81% 最高，接著為 DSS 的 13.95%，NTS 與 YNS 為總醣含量最低之組別，兩者分別為 9.36% 與 10.82% 且在統計上不具有顯著差異，。

各產地的 SPS 總蛋白含量具有較明顯的差異，從結果中可發現所有產地之總蛋白含量皆高於 PS，並且其中含量最高的產地為 NTS 與 YNS，分別為 17.20% 與 18.35%，而 DSS 與 FQS 的含量較少，分別為 11.67% 與 9.59%，此結果代表 SPS 多醣體中的蛋白質無法有效地被木瓜酵素去除，與 Jen 等人 (2024) 針對豐丘產地之 SPS 的分析結果大致相符。另外根據先前研究指出，部分菇類多醣體會與胜肽等蛋白結合，如雲芝醣肽的蛋白質含量可達 28-35% 且可以抵抗蛋白酶的水解作用 (Cui & Chisti, 2003)，因此推測 SPS 可能屬於蛋白聚醣 (proteoglycan) 或是醣蛋白 (glycoprotein)。由於 SPS 中含有較高的蛋白質，根據前人的研究指出，蛋白質等物質可能會影響酚硫酸法的靈敏度，進而使得醣類含量的結果可能被低估 (Saha & Brewer, 1994)，因此蛋白質含量的結果也能解釋 SPS 多醣體總醣含量偏低的情況。

總而言之，由總醣與總蛋白含量結果可發現各產地 SPS 之組成皆有所不同，顯示出產地的差異會影響 SPS 多醣體的總醣與總蛋白含量。

與 SPS 相比，各產地 PS 的醣類含量明顯較高，表 5-3 顯示 FQP 具有最高的總醣含量 (59.34%)，而 NTP (40.03%)、YNP (35.78%) 與 DSP (41.38%) 等組別的醣類含量稍低，彼此在統計上不具有顯著差異。另外所有 PS 的蛋白質含量都很低，其中最高者為 NTP 之 0.12%，顯示去蛋白步驟能有效去除 PS 多醣體之蛋白質。依據前述之結果可發現各產地之 PS 的醣類與蛋白質含量相較於 SPS 差異較小，整體而言較為相似。

另外值得注意的是 SPS 與 PS 的硫酸根含量，因為根據 Jen 等人 (2023) 與 Lu 等人 (2023) 的實驗結果顯示，豐丘產地硫磺菌的 SPS 在硫酸根含量上會高於 PS，但本研究發現除了豐丘產地之 SPS 多醣體外，其餘產地之 SPS 硫酸根含量皆低於 PS，推測可能是因為這些菌株的部分基因序列有所不同，使得各產地之子實體所萃取出之 SPS 與 PS 在硫酸根含量上有所差異。

表 5-2、各產地硫磺菌的 SPS 多醣體之總糖、總蛋白與硫酸根含量百分比

Table 5-2. Total sugar, protein, and sulfate content of SPS polysaccharides from *L. sulphureus* of different origins.

Samples	Total sugar content (%)	Total protein content (%)	Sulfate content (%)
NTS	9.36 ± 0.90 ^b	17.20 ± 2.35 ^a	2.33 ± 0.12 ^b
YNS	10.82 ± 1.69 ^b	18.35 ± 4.26 ^a	1.81 ± 0.06 ^b
DSS	13.95 ± 4.17 ^{ab}	11.67 ± 2.40 ^b	3.64 ± 0.61 ^a
FQS	17.81 ± 1.09 ^a	9.59 ± 1.52 ^b	2.35 ± 0.19 ^b

Data are presented as mean ± SD (n = 3). Values followed by the different letter in the same column are significantly different as analyzed by Duncan's new multiple range test (p < 0.05).

表 5-3、各產地硫磺菌的 PS 多醣體之總糖、總蛋白與硫酸根含量百分比

Table 5-3. Total sugar, protein, and sulfate content of PS polysaccharides from *L. sulphureus* of different origins.

Sample	Total sugar content (%)	Total protein content (%)	Sulfate content (%)
NTP	40.03 ± 4.89 ^b	0.12 ± 0.07 ^a	2.44 ± 0.19 ^b
YNP	35.78 ± 3.41 ^b	0.02 ± 0.04 ^b	2.85 ± 0.42 ^b
DSP	41.38 ± 4.06 ^b	0.09 ± 0.04 ^{ab}	5.38 ± 1.92 ^a
FQP	59.34 ± 9.54 ^a	0.02 ± 0.03 ^b	1.62 ± 0.26 ^b

Data are presented as mean ± SD (n = 3). Values followed by the different letter in the same column are significantly different as analyzed by Duncan's new multiple range test (p < 0.05).

5.2.2. 分子量分布

根據表 5-4 所示，不同產地間 SPS 的分子量群分布有很大的差異。首先 YNS 與 FQS 具有較大的分子量群分布，分別為 691.00 kDa 與 478.66 kDa，且 FQS 的分子量群分布較廣，整體而言複雜度較高；而 NTS 與 DSS 的分子量分析則顯示兩者的 SPS 之分子量分布較小，其中 DSS 所含有之多醣體片段皆小於透析膜之孔隙 (12 kDa)，根據研究顯示，萃取過程中的溫度或是溶液 pH 值等因素會影響多醣體的分子量分布 (Cui et al., 2023)，因此推測這些小分子量片段可能來自於透析後的萃取流程或是樣品處理。研究指出，較大的多醣體分子量對於生物活性的表現較佳，但本研究之硫磺菌 SPS 多醣體的分子量較小，這樣的結果是否會對生物活性產生影響仍未知，但可以確定的是各產地之 SPS 在分子量分布上具有較明顯的差異，可以說明產地會影響 SPS 多醣體的分子量分布。

表 5-5 顯示，PS 多醣體的分子量分布皆位於 500-600 kDa 與 5-20 kDa 左右，整體而言各產地間相似性較高，代表產地差異對於 PS 的分子量分布影響較小，另外從結果中發現除了 YNP 與 FQP 之外，其餘產地在經過透析後沒有出現小於 12 kDa 的片段，顯示 PS 多醣體相較於 SPS 較不容易發生斷裂。

表 5-4、各產地硫磺菌 SPS 多醣體之分子量分布

Table 5-4. Molecular weight distribution of SPS polysaccharides from *L. sulphureus* of different origins.

	NTS	YNS	DSS	FQS
SPS	24.60 ± 0.71	691.00 ± 17.72	8.56 ± 0.47	478.66 ± 32.82
	2.94 ± 0.06	2.87 ± 0.02	2.82 ± 0.01	23.09 ± 0.71
				6.16 ± 0.15
				2.80 ± 0.06
				1.08 ± 0.01

Data are presented as mean ± SD (n = 3).

表 5-5、各產地硫磺菌 PS 多醣體之分子量分布

Table 5-5. Molecular weight distribution of PS polysaccharides from *L. sulphureus* of different origins.

	NTP	YNP	DSP	FQP
PS	572.80 ± 18.83	507.31 ± 7.69	461.28 ± 11.92	540.03 ± 6.11
	21.06 ± 0.52	18.99 ± 0.14	15.13 ± 2.83	24.70 ± 0.43
		9.24 ± 0.28		5.78 ± 0.02

Data are presented as mean ± SD (n = 3).

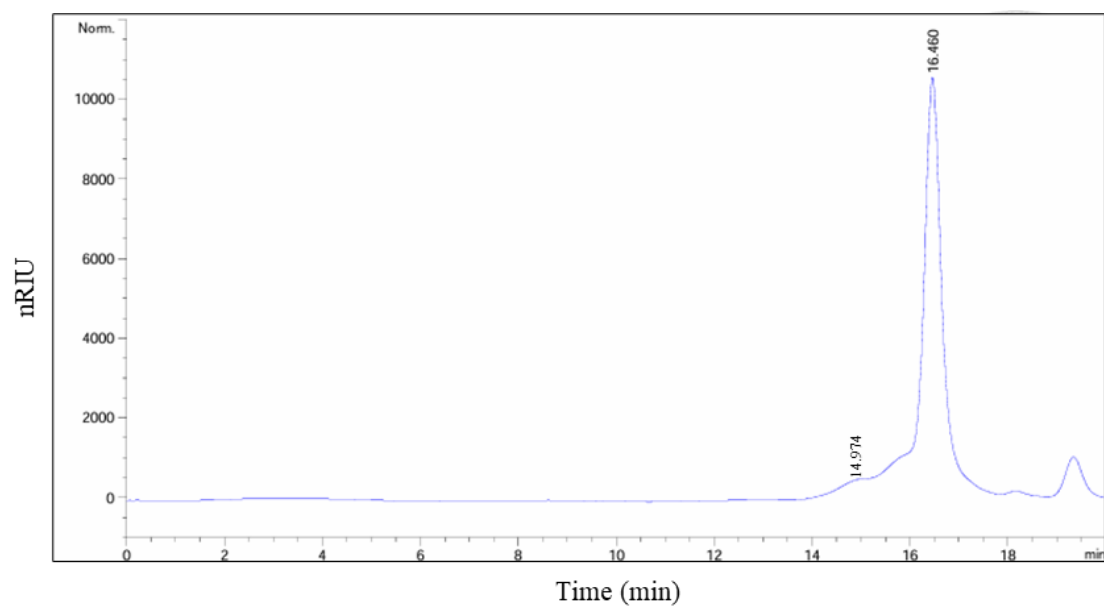


圖 5-1、NTS 的高效液相層析圖譜

Figure 5-1. The HPLC chromatogram of NTS.

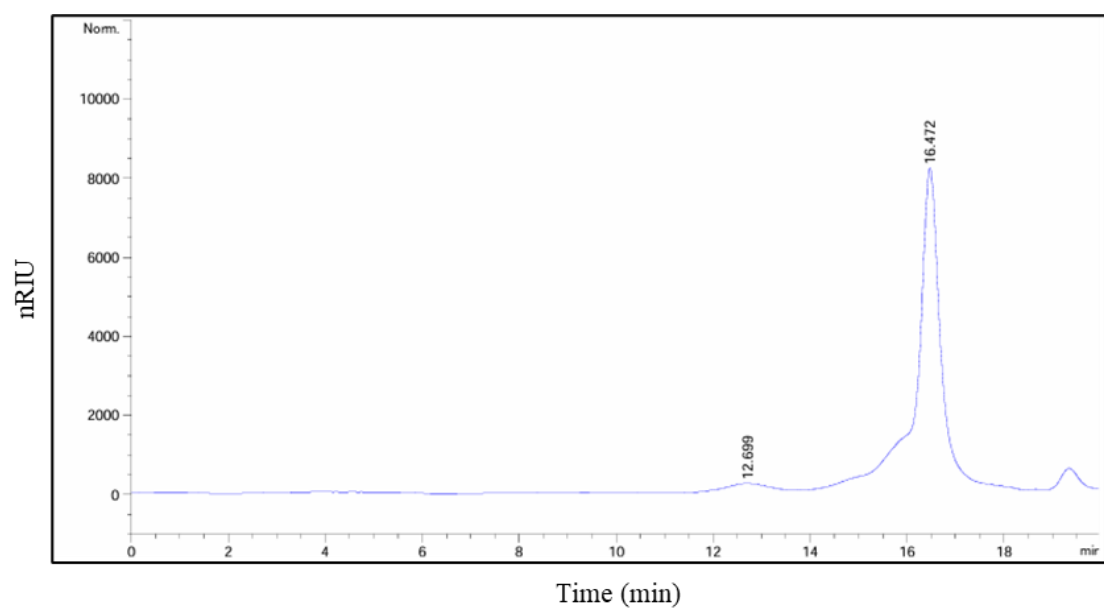


圖 5-2、YNS 的高效液相層析圖譜

Figure 5-2. The HPLC chromatogram of YNS.

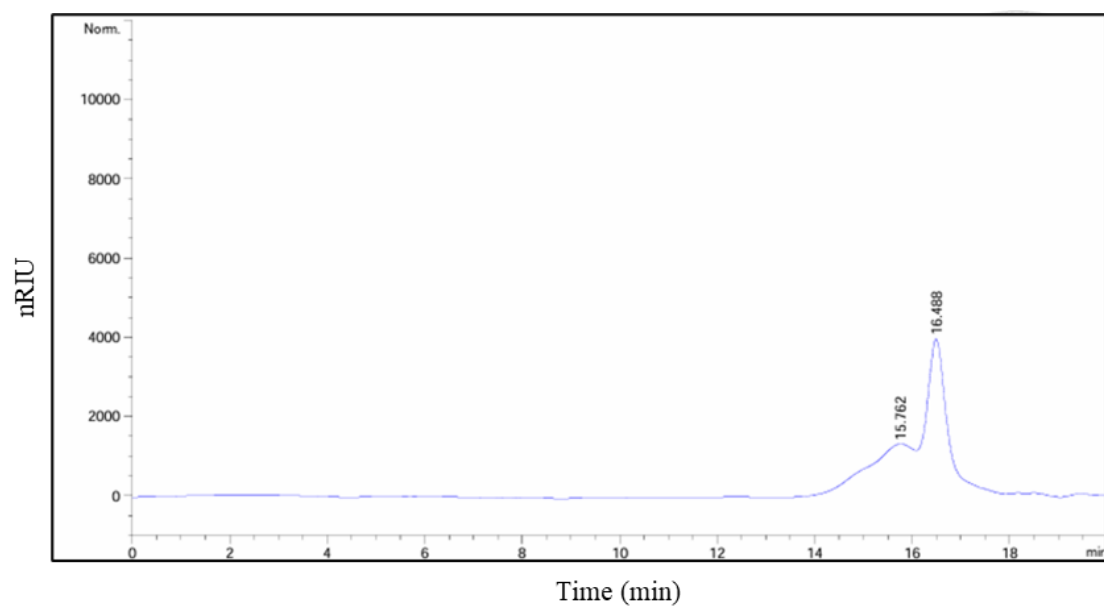


圖 5-3、DSS 的高效液相層析圖譜

Figure 5-3. The HPLC chromatogram of DSS.

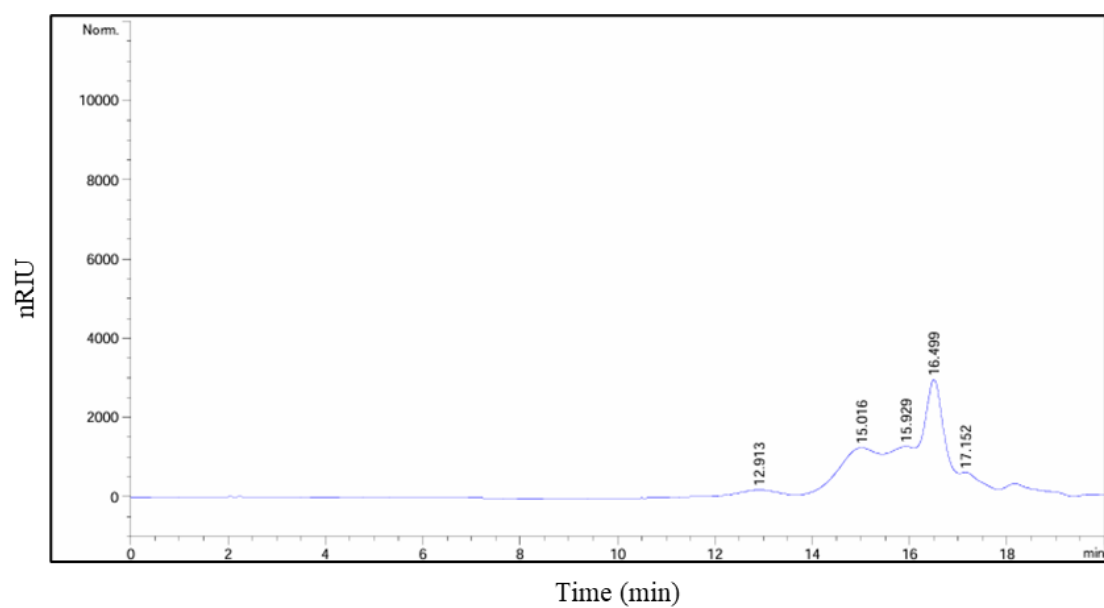


圖 5-4、FQS 的高效液相層析圖譜

Figure 5-4. The HPLC chromatogram of FQS.

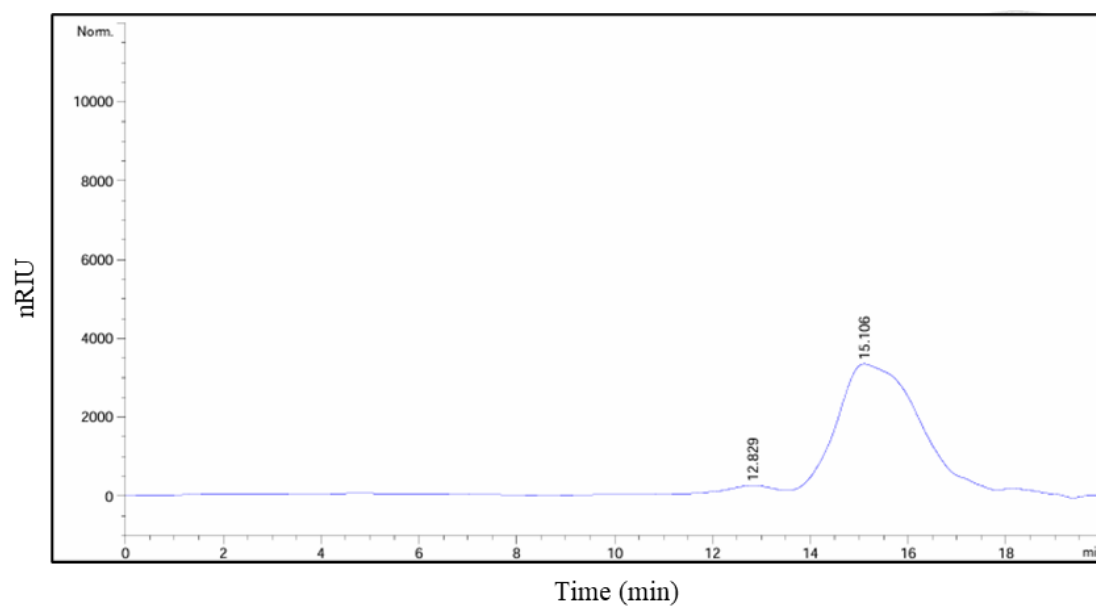


圖 5-5、NTP 的高效液相層析圖譜

Figure 5-5. The HPLC chromatogram of NTP.

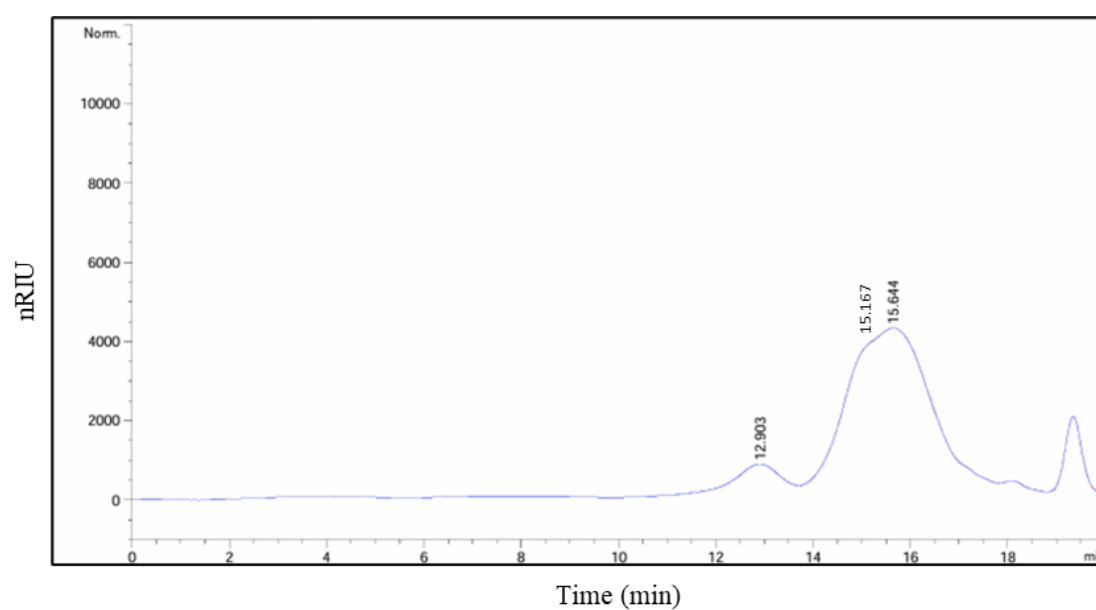


圖 5-6、YNP 的高效液相層析圖譜

Figure 5-6. The HPLC chromatogram of YNP.

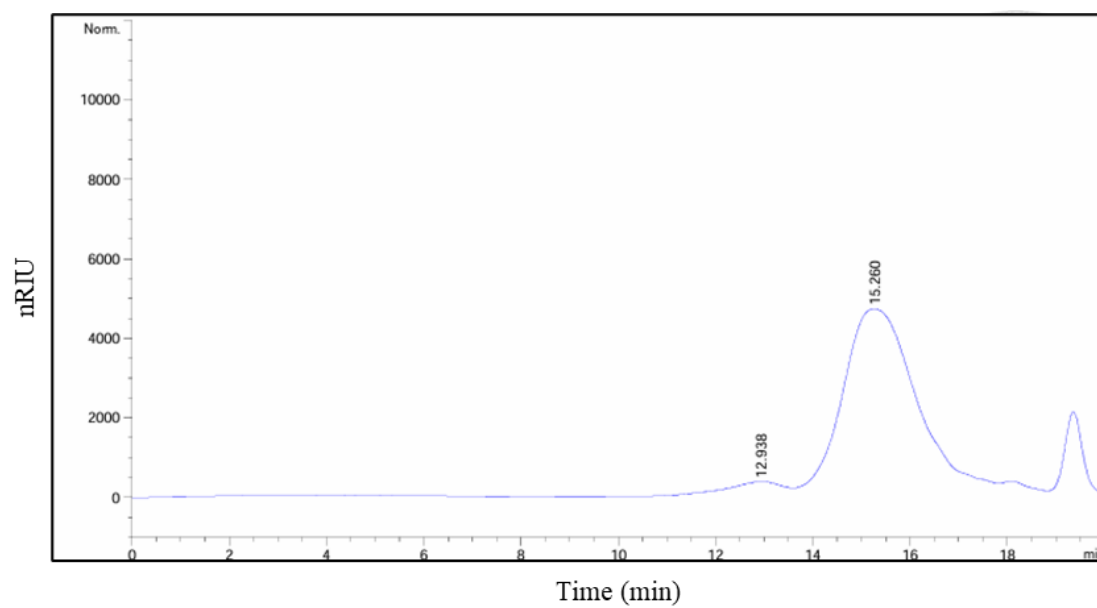


圖 5-7、DSP 的高效液相層析圖譜

Figure 5-7. The HPLC chromatogram of DSP.

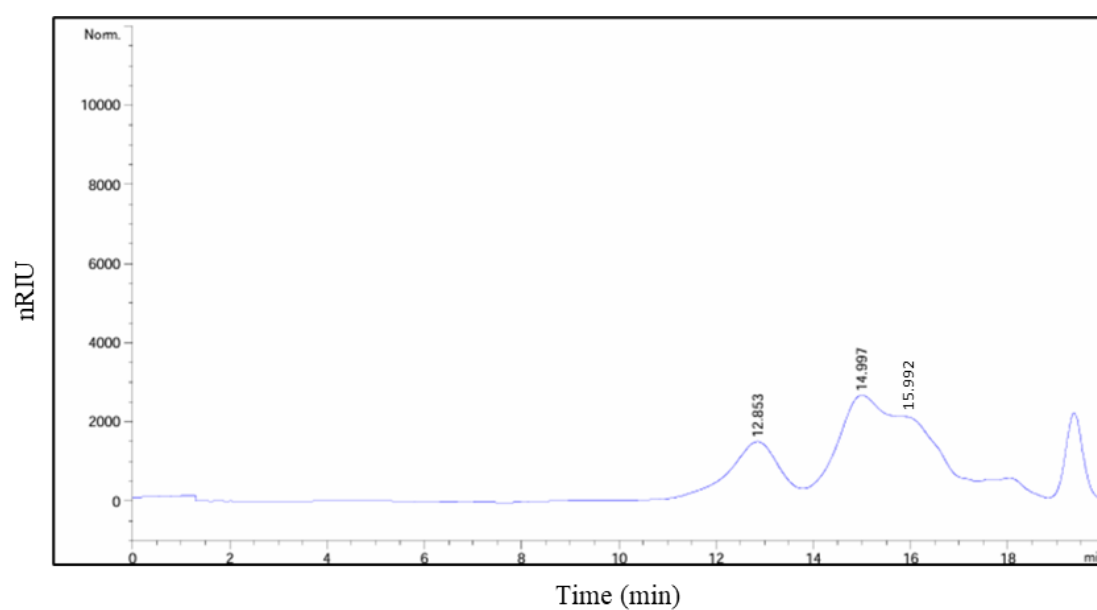


圖 5-8、FQP 的高效液相層析圖譜

Figure 5-8. The HPLC chromatogram of FQP.

5.2.3. 單醣組成

根據標準品的分析結果 (圖 5-9)，所有單醣依照滯留時間依序為甘露糖 (mannose, Man)、核糖 (ribose, Rib)、鼠李糖 (rhamnose, Rha)、葡萄糖醛酸 (glucuronic acid, GlcUA)、半乳糖醛酸 (galacturonic acid, GalUA)、葡萄糖 (glucose, Glc)、半乳糖 (galactose, Gal)、木糖 (xylose, Xyl)、阿拉伯糖 (arabinose, Ara) 與岩藻糖 (fucose, Fuc)。各產地多醣體的單醣組成結果如表 5-6 與表 5-7 所示。

結果顯示，各產地的 SPS 皆發現多種單醣的吸收峰，代表這些多醣體屬於異質多醣，且在經過對照後得知 SPS 多醣體主要由葡萄糖、甘露糖、半乳糖及岩藻糖所組成，且含有少量的核糖、木糖與阿拉伯糖。在 YNS 組別中，另發現葡萄糖醛酸的吸收峰。經過比較後，發現各產地之 SPS 大多具有相似的單醣組成趨勢，但在某些單醣的莫爾百分比上各產地還是具有差異，例如 FQS 與 YNS 的葡萄糖占比較其他組別高 (30.02%與 50.25%)，而 YNS 的甘露糖 (13.47%)、推測為產地差異所造成。

PS 多醣體的單醣組成同樣也以葡萄糖、甘露糖、半乳糖及岩藻糖為主，並含有核糖、木糖與阿拉伯糖，整體來說與 SPS 相似。但有些產地之 PS 在單醣的莫爾百分比上同樣也出現明顯不同，例如 FQP 與其他產地的 PS 相比具有較高占比的葡萄糖 (46.95%) 與木糖 (3.00%)，而甘露糖 (16.85%) 與核糖 (1.05%) 的占比則明顯較低。

總而言之，SPS 與 PS 皆為異質多醣，其單醣組成主要為葡萄糖、甘露糖、半乳糖與岩藻糖，並且除了 FQ 與 YN 的多醣體之外，其他產地多醣體的各單醣占比在各產地間大致相似。先前研究顯示，葡萄糖為牛樟芝、雲芝、靈芝、舞菇及桑黃最主要的單醣 (Su et al., 2016)，且由前人研究發現由甘露糖、葡萄糖與半乳糖所組成的冬蟲夏草多醣體表現出促進免疫細胞吞噬的活性 (Yi et al., 2025a)。但本研究發現部分產地的多醣體以半乳糖占比最多，顯示不同產地來源的硫磺菌多醣體在單醣組成上會有所不同。

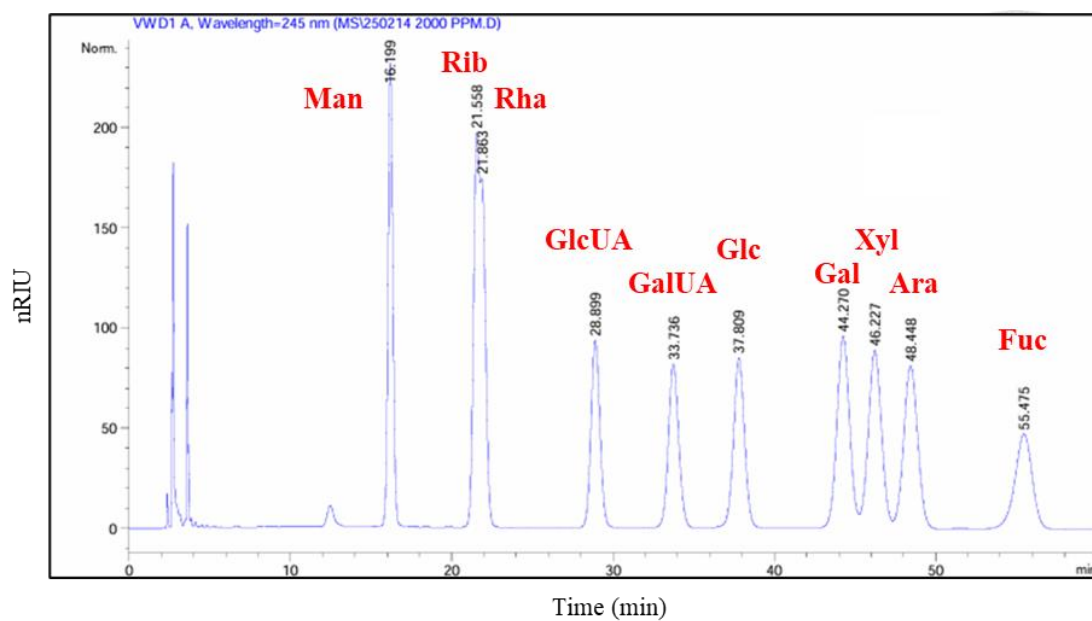


圖 5-9、單糖標準品波峰分布圖

Figure 5-9. A representative chromatogram of monosaccharide standards. Man: mannose; Rib: ribose; Rha: Rhamnose; GlcUA: Glucuronic acid; GalUA: Galacturonic acid; Glc: glucose; Gal: galactose; Xyl: xylose; Ara: arabinose; Fuc: fucose.

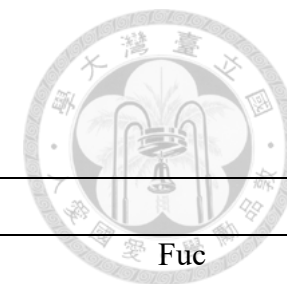


表 5-6、各產地硫磺菌 SPS 多醣體之單醣組成

Table 5-6. Monosaccharide compositions of SPS polysaccharides from *L. sulphureus* of different origins.

Samples	Monosaccharides composition (molar %)							
	Man	Rib	GlcUA	Glc	Gal	Xyl	Ara	Fuc
NTS	25.98 ± 1.94 ^a	3.23 ± 0.64 ^a	ND	23.12 ± 4.45 ^{bc}	27.34 ± 1.29 ^b	2.35 ± 0.29 ^a	4.22 ± 0.29 ^a	13.77 ± 2.04 ^a
YNS	13.47 ± 1.15 ^c	2.68 ± 0.72 ^{ab}	6.83 ± 3.57 ^a	50.25 ± 3.30 ^a	14.19 ± 0.74 ^c	2.53 ± 0.92 ^a	3.71 ± 2.15 ^a	6.35 ± 0.35 ^b
DSS	25.11 ± 0.82 ^{ab}	2.63 ± 0.41 ^{ab}	ND	21.51 ± 4.16 ^c	31.52 ± 2.64 ^a	2.29 ± 0.12 ^a	2.90 ± 0.13 ^a	14.04 ± 1.73 ^a
FQS	22.95 ± 1.78 ^b	1.78 ± 0.37 ^b	ND	30.02 ± 3.47 ^b	27.41 ± 1.01 ^b	2.75 ± 0.31 ^a	2.91 ± 0.54 ^a	15.18 ± 2.98 ^a

Data are presented as mean ± SD (n = 3). Man: mannose; Rib: ribose; GlcUA: Glucuronic acid; Glc: glucose; Gal: galactose; Xyl: xylose; Ara: arabinose; Fuc: fucose. Values followed by the different letter in the same column are significantly different as analyzed by Duncan's new multiple range test (p < 0.05).

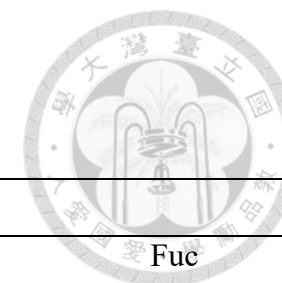


表 5-7、各產地硫磺菌 PS 多醣體之單醣組成

Table 5-7. Monosaccharide compositions of PS polysaccharides from *L. sulphureus* of different origins.

Samples	Monosaccharides composition (molar %)							
	Man	Rib	GlcUA	Glc	Gal	Xyl	Ara	Fuc
NTP	23.21 ± 1.32 ^a	2.21 ± 1.17 ^a	2.75 ± 0.73 ^a	23.92 ± 1.04 ^c	28.15 ± 2.03 ^a	1.94 ± 1.33 ^a	1.82 ± 1.19 ^a	16.00 ± 1.78 ^a
YNP	22.34 ± 1.66 ^a	1.76 ± 0.34 ^a	0.66 ± 0.15 ^b	36.73 ± 1.46 ^b	20.62 ± 1.02 ^b	1.30 ± 0.31 ^a	2.00 ± 1.18 ^a	14.59 ± 2.00 ^{ab}
DSP	24.58 ± 0.85 ^a	1.72 ± 0.22 ^a	ND	29.39 ± 0.23 ^c	29.24 ± 0.43 ^a	1.32 ± 0.10 ^a	1.11 ± 0.09 ^a	12.64 ± 0.76 ^{ab}
FQP	16.85 ± 0.84 ^b	1.05 ± 0.14 ^b	ND	46.95 ± 6.85 ^a	19.74 ± 3.09 ^b	3.00 ± 1.13 ^a	1.79 ± 0.37 ^a	10.62 ± 3.88 ^b

Data are presented as mean ± SD (n = 3). Man: mannose; Rib: ribose; GlcUA: Glucuronic acid; Glc: glucose; Gal: galactose; Xyl: xylose; Ara: arabinose; Fuc: fucose. Values followed by the different letter in the same column are significantly different as analyzed by Duncan's new multiple range test (p < 0.05).

5.2.4. 官能基組成

傅立葉紅外線光譜 (Fourier-transform infrared spectroscopy, FT-IR) 為分析多醣體各官能基與鍵結的方法，藉由偵測各種鍵結在伸縮、轉動或振動時的能量吸收可了解多醣體的官能基組成。多醣體中的單醣可以分為 α 與 β 兩種構形，其差異主要來自於單醣分子在經過半縮醛反應後，形成的環狀構造以及一號碳與六號碳上羥基的相對位置，此特性最早在 1894 年針對多醣體立體結構與環狀構造形成研究中被發現 (Fischer, 1894)。 α 構型的為一號碳上的羥基與六號碳位於不同側，而一號碳上的羥基與六號碳位置若位於同側則為 β 構形 (陳, 2015)。

Lu 等人 (2023) 指出硫磺菌 SPS 多醣體具有羥基、烷基、CHO 與 C=O 振動、C-H、S=O、C-O-C 與 C-O-H 等鍵結，而本實驗的結果顯示各產地 SPS 同樣具有這些基團，顯示出較為一致的結果。由圖 5-10 可知，在約 3300 cm^{-1} 處有羥基 (-OH) 的振動； $2900\text{-}2950\text{ cm}^{-1}$ 間出現烷基 (C-H) 訊號； $1600\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ 處為 CHO 與 C=O 的振動； 1400 cm^{-1} 附近為 C-H 鍵結； 1200 cm^{-1} 處附近屬於 S=O 鍵結； 1020 cm^{-1} 附近則是 C-O-C 與 C-O-H 的訊號；位於 $700\text{-}950\text{ cm}^{-1}$ 之變旋異構區 (anomeric region) 中的訊號可判斷 SPS 具有 α 與 β 兩種構形，其中 α 構形的訊號大約出現在 900 cm^{-1} ，而 β 構形的訊號則位於 800 至 850 cm^{-1} 間。

由圖 5-11 可知，各產地的 PS 多醣體在官能基組成上與 SPS 相似，皆具有羥基、烷基、CHO 與 C=O 振動、C-H、C-O-C 與 C-O-H 等鍵結，並且在 1200 cm^{-1} 處同樣也具有 S=O 之訊號，顯示 PS 多醣體中確實具有硫酸根存在。在構形上 PS 多醣體同樣也具有 α 與 β 兩種，其波峰位置分別位於 900 cm^{-1} 與 800 至 850 cm^{-1} 間。

總結來說，SPS 與 PS 的吸收峰位置顯示其為典型的醣類 FT-IR 圖譜，並且相同種類之多醣體具有相似的吸收峰位置與趨勢，顯示在相同萃取方法下不同產地的官能基與鍵結差異不明顯。另外在構形上所有 SPS 與 PS 皆具有 α 與 β 兩種構形，兩者較為相似。

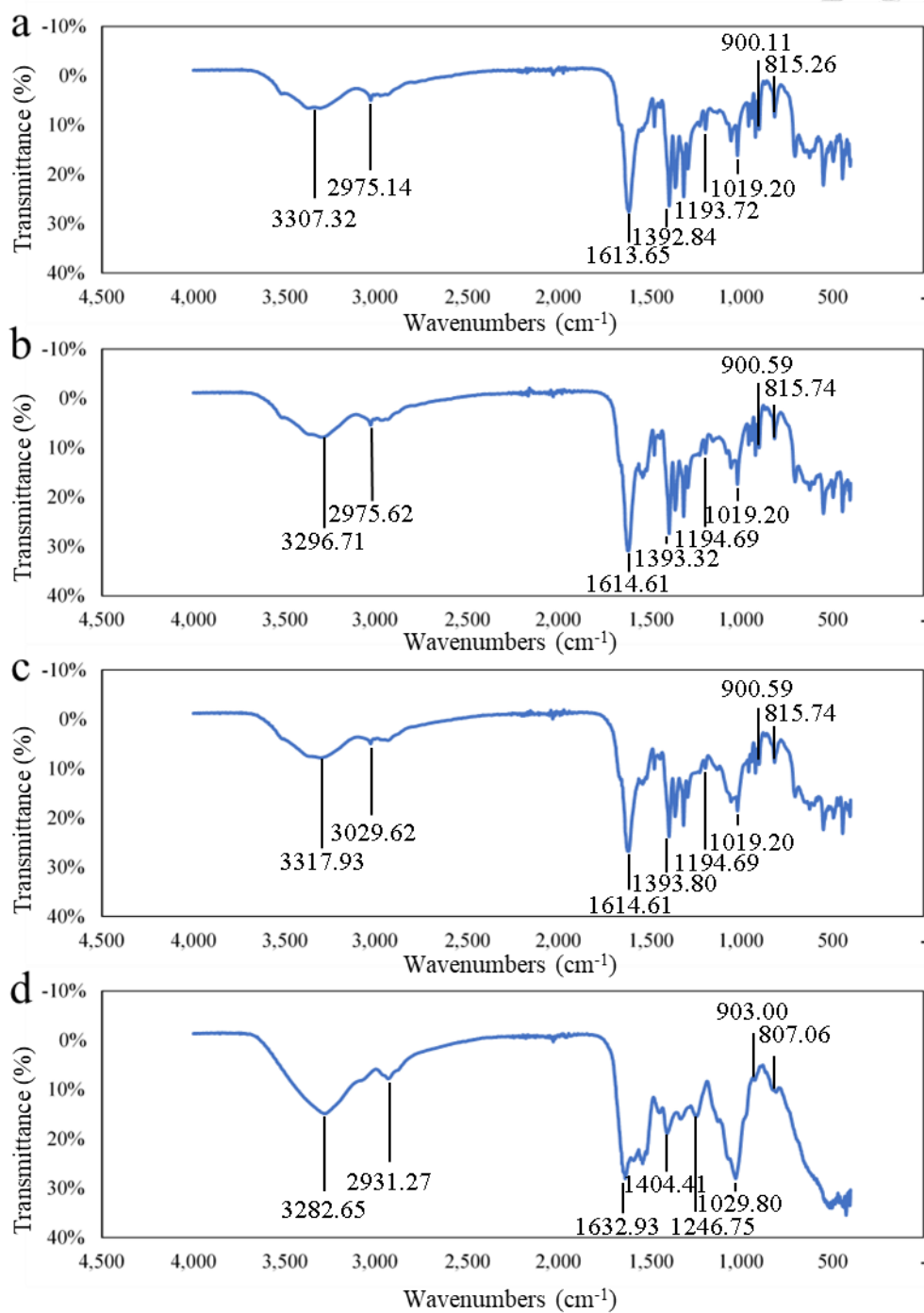


圖 5-10、各產地之 SPS 多醣體之傅立葉轉換紅外光譜

Figure 5-10. Fourier-transform infrared (FTIR) spectra of SPS polysaccharides from different origins. a: NTS; b: YNS; c: DSS; d: FQS.

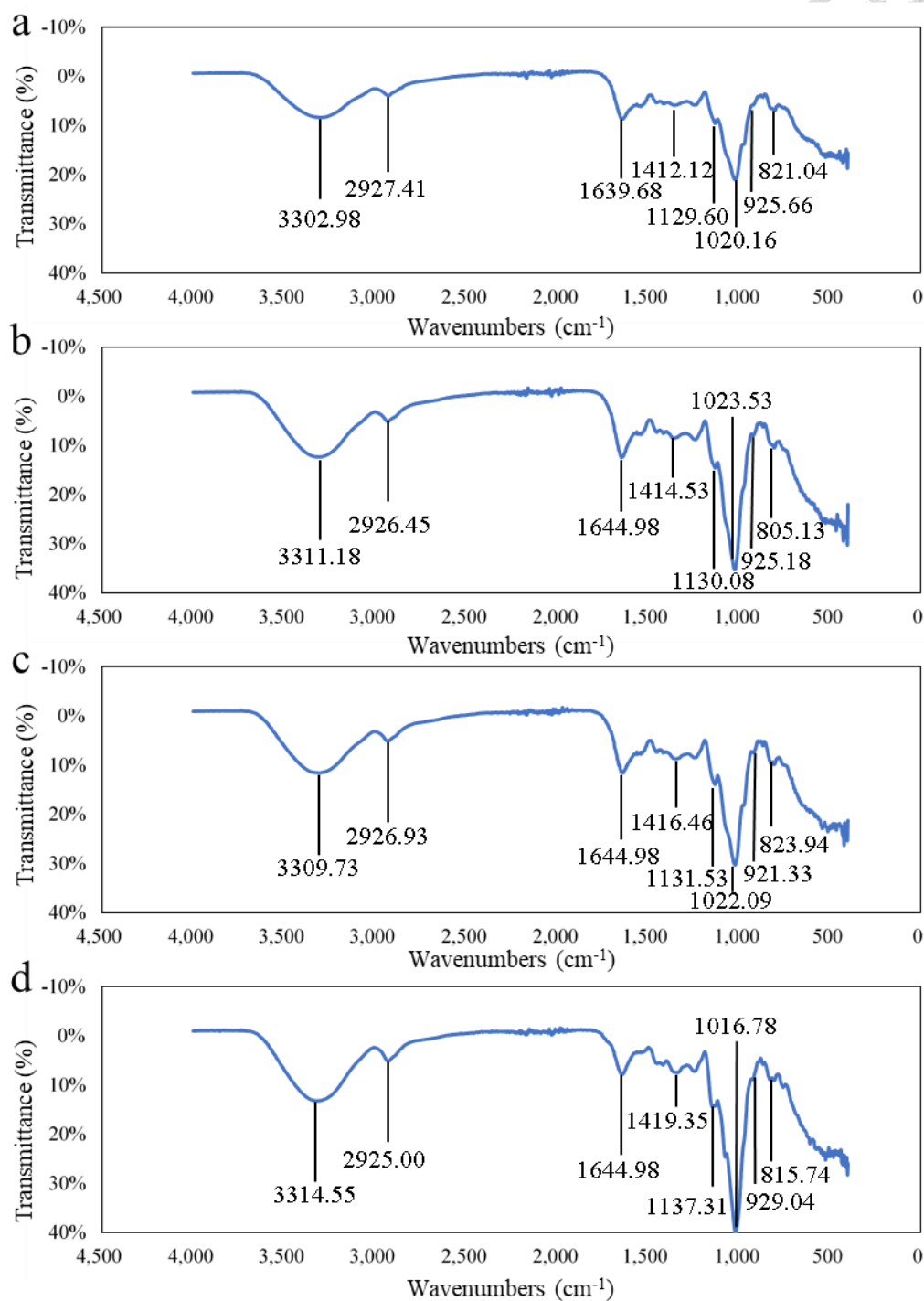


圖 5-11、各產地之 PS 多醣體之傅立葉轉換紅外光譜

Figure 5-11. Fourier-transform infrared (FTIR) spectra of PS polysaccharides from different origins. a: NTP; b: YNP; c: DSP; d: FQP.

5.3. 含硫多醣體 (SPS) 與純化多醣體 (PS) 之抗發炎活性

5.3.1. 細胞存活率

為了瞭解 SPS 與 PS 的藥理活性安全濃度，試驗在進行生物活性分析前預先評估 SPS 與 PS 對於細胞存活率的影響，作為確認其最適合之安全濃度範圍的依據。

由圖 5-12 與圖 5-13 可知，在加入不同濃度樣品與 LPS 誘導細胞發炎後，各產地的 SPS 與 PS 在濃度 25 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 與 100 $\mu\text{g/mL}$ 下皆不會對細胞數量造成明顯影響，代表在此濃度下所有產地之多醣體不會造成細胞毒性，因此這些濃度可以作為後續試驗生物活性之評估。

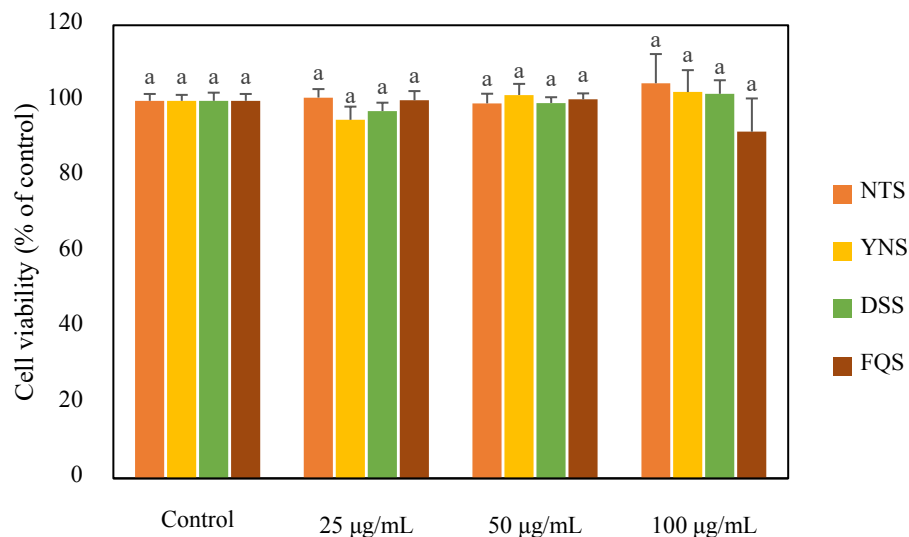


圖 5-12、不同產地與濃度之 SPS 對 LPS 誘導 RAW 264.7 細胞的存活率影響

Figure 5-12. Cell viability of LPS-induced RAW264.7 cells treated with different concentrations of SPS from various regions. The bars having different letters are significantly different ($p < 0.05$) as analyzed by Duncan's new multiple range test.

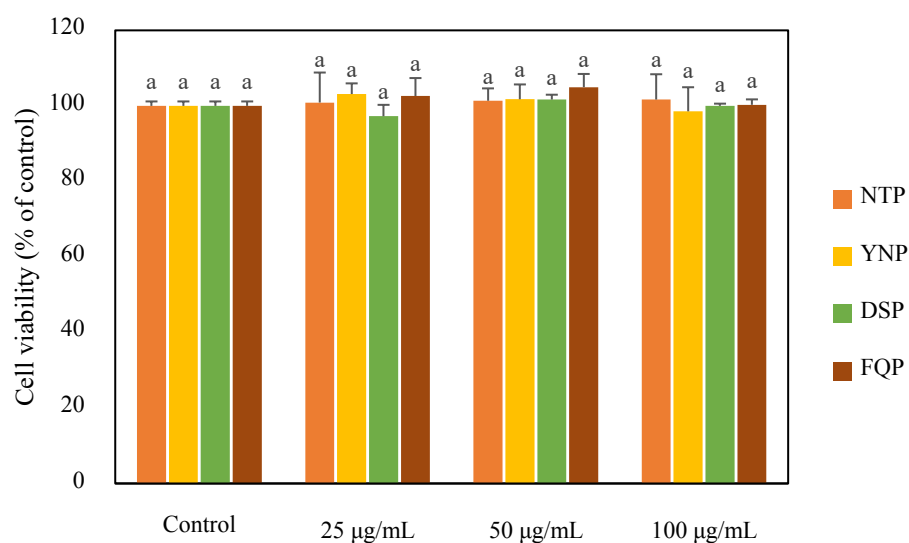


圖 5-13、不同產地與濃度之 PS 對 LPS 誘導 RAW 264.7 細胞的存活率影響

Figure 5-13. Cell viability of LPS-induced RAW264.7 cells treated with different concentrations of PS from various regions. The bars having different letters are significantly different ($p < 0.05$) as analyzed by Duncan's new multiple range test.

5.3.2. 一氧化氮的抑制

在發炎反應中一氧化氮是重要的訊號分子之一，其可促進血管擴張並參與抑制發炎反應，因此分析一氧化氮的產生量可初步評估藥物之抗發炎活性。

根據圖 5-14 與 5-15 的結果，RAW264.7 巨噬細胞在加入 LPS 後，一氧化氮的生成量皆顯著上升。在 SPS 多醣體的處理下 (圖 5-14)，除了 NTS 之外，其餘產地處理組在統計上與 LPS 處理組相比均不具顯著差異，而將各產地相同濃度一起比較 (圖 5-15) 後則發現在統計上各組別具有差異，但與控制組之 IC_{50} (24.99 $\mu\text{g/mL}$) 相比後發現，不同濃度處理組的抑制效果均與控制組 IC_{50} 的抑制效果相差 45% 以上，顯示出 SPS 對於一氧化氮產生量的抑制效果不明顯。

圖 5-16 與圖 5-17 為 PS 多醣體處理的結果，各產地的一氧化氮生成量在統計上出現顯著差異。FQP 在 100 $\mu\text{g/mL}$ 下之一氧化氮產生量為 88.63%，且隨著濃度下降抑制效果也隨之變差，呈現出劑量效應。而 NTP、YNP 與 DSP 的各濃度處理間，雖然在統計上具有顯著差異，但其具有明顯的抑制效果之濃度皆為 25 與 50 $\mu\text{g/mL}$ ，不具劑量效應。此外，各濃度處理與控制組 L-NMMA 的 IC_{50} (23.83 $\mu\text{g/mL}$) 進行比較後發現，各處理組的濃度雖然高於控制組的半抑制濃度，但其抑制效果與控制組 IC_{50} 的抑制效果相比皆具有 30% 以上的差異，因此 PS 對於一氧化氮產生量的抑制效果也較為微弱。

根據前人研究，硫磺菌之胞外多醣體可以在 LPS 誘導的模式下抑制 BV2 小膠質細胞分泌一氧化氮、 PGE_2 以及 $\text{TNF-}\alpha$ (Jayasooriya et al., 2011)，這樣的結果與本研究之硫磺菌多醣體 SPS 與 PS 對於一氧化氮分泌的抑制效果具有差異，因此仍需要分析其他發炎因子的含量才能確認 SPS 與 PS 之抗發炎活性。

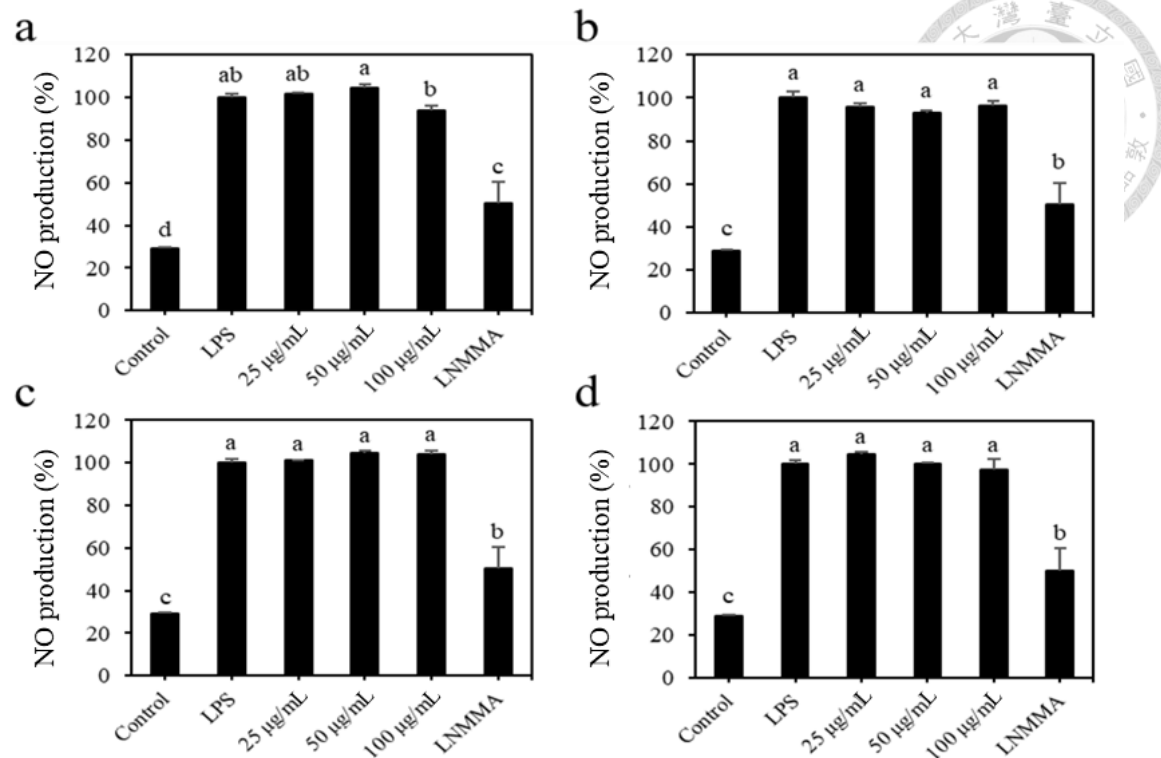


圖 5-14、各產地之 SPS 對 LPS 誘導小鼠巨噬細胞之一氧化氮產生抑制效果

Figure 5-14. Inhibitory effects of SPS from different regions on nitric oxide production in LPS-induced RAW264.7 macrophages. a: NTS; b: YNS; c: DSS; d: FQS. LNMMA: N^G -monomethyl-L-arginine. The bars having different letters are significantly different ($p < 0.05$) as analyzed by Duncan's new multiple range test.

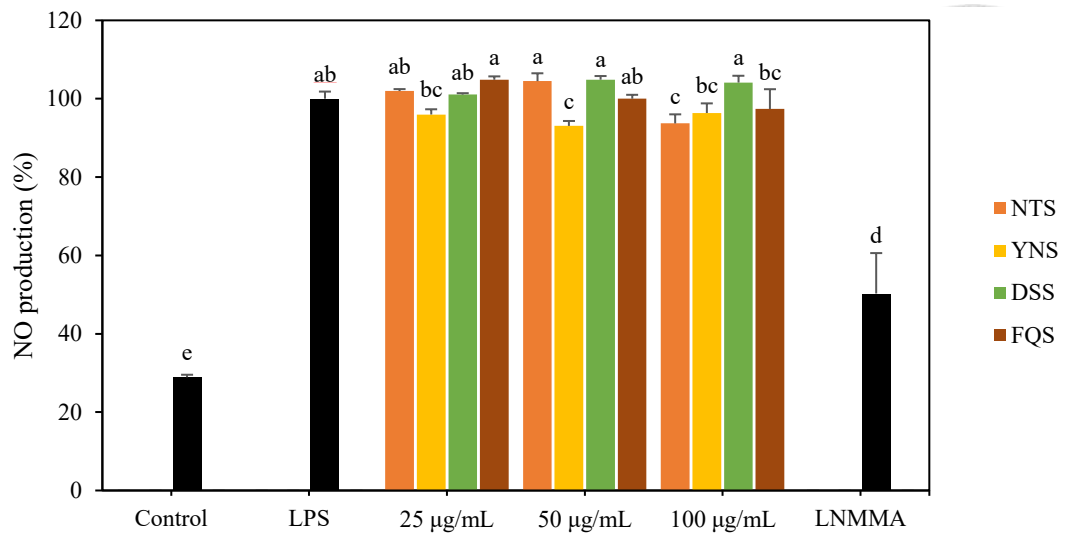


圖 5-15、各產地間 SPS 對 LPS 誘導小鼠巨噬細胞之一氧化氮產生抑制效果比較
 Figure 5-15. Comparison of the inhibitory effects of SPS from different regions on nitric oxide production in LPS-induced RAW264.7 macrophages. LNMMA: N^G -monomethyl-L-arginine. The bars having different letters are significantly different ($p < 0.05$) as analyzed by Duncan's new multiple range test.

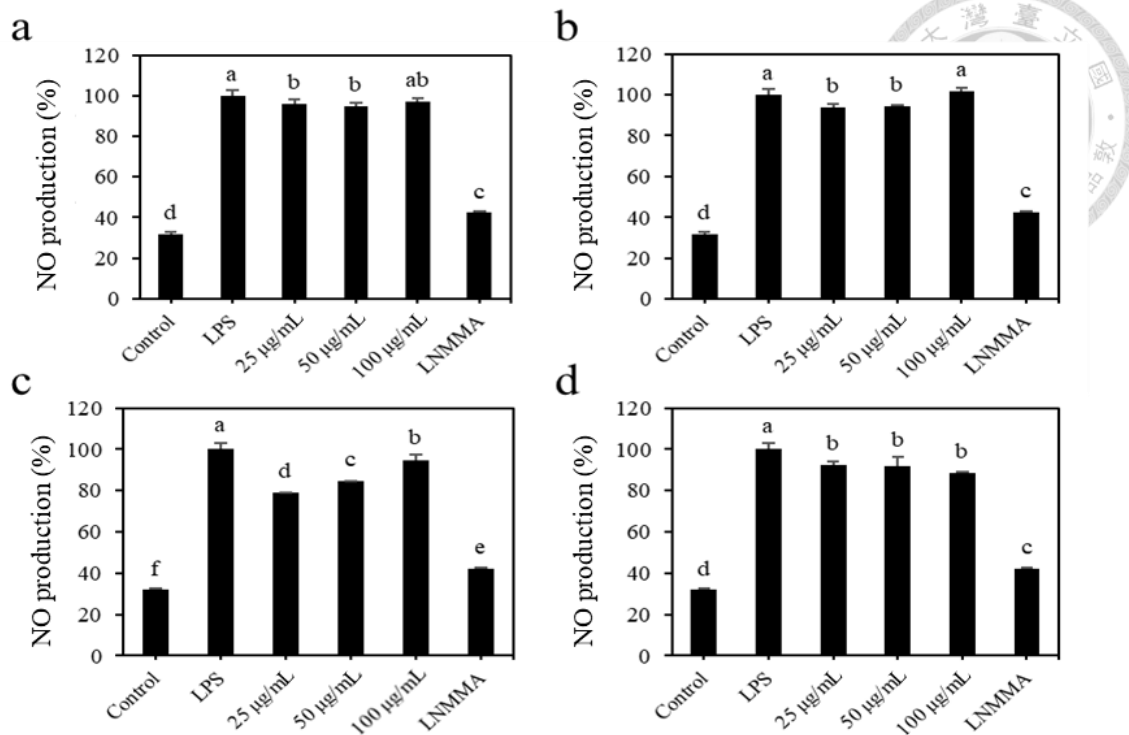


圖 5-16、各產地之 PS 對 LPS 誘導小鼠巨噬細胞之一氧化氮產生抑制效果

Figure 5-16. Inhibitory effects of PS from different regions on nitric oxide production in LPS-induced RAW264.7 macrophages. a: NTP; b: YNP; c: DSP; d: FQP. LNMMA: N^G -monomethyl-L-arginine. The bars having different letters are significantly different ($p < 0.05$) as analyzed by Duncan's new multiple range test.

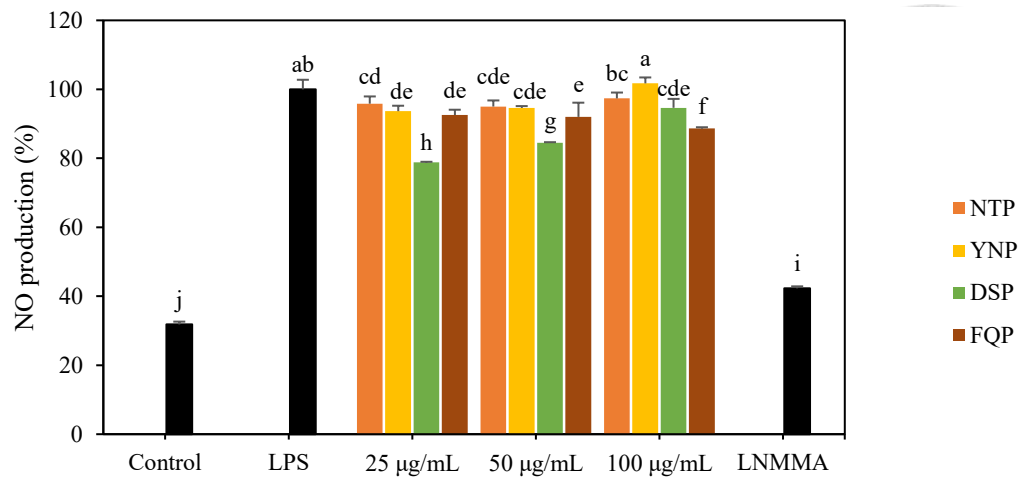


圖 5-17、各產地間 PS 對 LPS 誘導小鼠巨噬細胞一氧化氮之產生抑制效果比較

Figure 5-15. Comparison of the inhibitory effects of PS from different regions on nitric oxide production in LPS-induced RAW264.7 macrophages. LNMMA: N^G -monomethyl-L-arginine. The bars having different letters are significantly different ($p < 0.05$) as analyzed by Duncan's new multiple range test.

5.3.3. TNF- α 與 IL-6 激素的抑制

當巨噬細胞受到外來刺激時，為了讓更多免疫細胞參與抗發炎反應，會釋放 TNF- α 與 IL-6 等多種細胞激素，這些激素相較於一氧化氮更加穩定，可以更準確地測量發炎反應的效果，因此本研究進一步分析 TNF- α 與 IL-6 的分泌量作為評估 SPS 與 PS 對 LPS 誘導發炎反應的抑制效果。

如圖 5-18 與圖 5-19 所示，RAW264.7 細胞在加入 LPS 後，TNF- α 分泌量皆顯著上升，所有樣品處理組的 TNF- α 產生量百分比皆隨著濃度提高而顯著下降。根據半抑制濃度 (IC₅₀) 結果 (表 5-8)，NTS、YNS 與 FQS 的半抑制濃度皆為 55 $\mu\text{g/mL}$ 左右，而 DSS 的 IC₅₀ 雖然較差，但仍然具有約 205 $\mu\text{g/mL}$ 之半抑制水準。接著與控制組的 IC₅₀ (26.03 $\mu\text{g/mL}$) 比較後發現，NT、DS 與 FQ 三個產地 SPS 的半抑制濃度與控制組 Dexamethasone 之半抑制濃度約相差兩倍，而 DS 產地的半抑制濃度則差異較大，但此結果仍確認所有產地之 SPS 多醣體對於 TNF- α 激素具有抑制效果。

相較於 SPS，PS 多醣體對 TNF- α 之抑制效果則相對不明顯，從圖 5-20 與圖 5-21 中可發現 NTP、YNP 與 DSP 在 100 $\mu\text{g/mL}$ 處理下具有約 20% 的抑制效果，而 FQP 在 25 $\mu\text{g/mL}$ 與 100 $\mu\text{g/mL}$ 具有較低的 TNF- α ，其趨勢與其他產地有些許差異。

各產地 SPS 同樣也具有良好的抑制 IL-6 生成量效果。根據圖 5-22 與 5-23 所示，RAW264.7 細胞在加入 LPS 後，IL-6 分泌量皆顯著上升，而經過 NTS、DSS 與 FQS 處理之細胞的 IL-6 分泌量則顯著下降。另外根據 IC₅₀ 計算結果 (表 5-9)，發現 NTS 具有最佳的半抑制濃度 (23.33 $\mu\text{g/mL}$)，而 DSS 與 FQS 的半抑制濃度較高，但仍有約為 60 $\mu\text{g/mL}$ ；至於 YNS 與其他組別相比對 IL-6 的抑制幅度較小，在 25 與 50 $\mu\text{g/mL}$ 下的抑制效果在統計上與 LPS 處理無顯著差異，僅在 100 $\mu\text{g/mL}$ 下與 LPS 相比具有 30% 左右的抑制效果。與控制組的 IC₅₀ (21.28 $\mu\text{g/mL}$) 相比後發現，NT 產地的半抑制濃度與其相似，DS 與 FQ 產地的半抑制濃度則是控制組半抑制濃度的三倍，至於 YN 產地的半抑制濃度則差異較大。

根據圖 5-24，在 YNP 與 DSP 組別中樣品與 LPS 處理無明顯差異，NTP 與 FQP 雖在統計上與 LPS 處理有差異，但抑制幅度較小且無劑量效應；而圖 5-25 中顯示在所有產地與處理組共同比較後，各產地之 PS 多醣體雖也在部分處理組的統計上顯現出差異，但抑制幅度同樣較小，代表各產地 PS 多醣體對於 IL-6 的

抑制效果較差。

總結來說，各產地硫磺菌之 SPS 多醣體對 LPS 誘導 RAW 264.7 細胞的 TNF- α 與 IL-6 激素分泌皆具有較佳的抑制效果，可以顯著抑制發炎中之 RAW 264.7 細胞分泌兩種激素。各產地 PS 多醣體在 100 $\mu\text{g/mL}$ 下可抑制 TNF- α 分泌約 20%，而對於 IL-6 的抑制活性則較不明顯。根據先前的研究，利用熱水萃取之綠豆皮多醣體 H-MBP 相較於酸萃取、鹼萃取與酵素萃取等方法對於 TNF- α 與 IL-6 的抑制效果較佳 (Ding et al., 2025)，顯示出利用不同的萃取方法所取得的多醣體在抗發炎活性上確實會有不同。

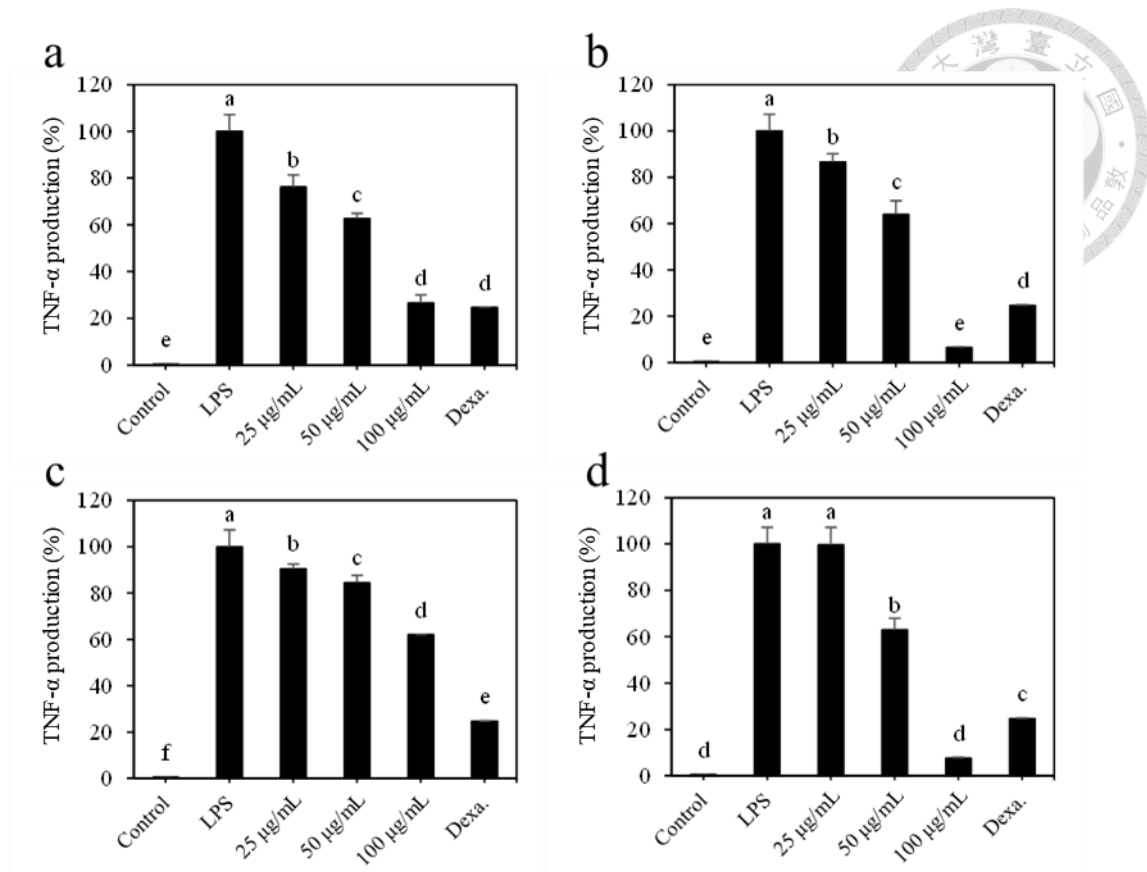


圖 5-18、各產地之 SPS 對 LPS 誘導小鼠巨噬細胞之 TNF- α 激素產生抑制效果

Figure 5-18. Inhibitory effects of SPS from different regions on TNF- α production in LPS-induced RAW264.7 macrophages. a: NTS; b: YNS; c: DSS; d: FQS. Dexa.: Dexamethasone. The bars having different letters are significantly different ($p < 0.05$) as analyzed by Duncan's new multiple range test.

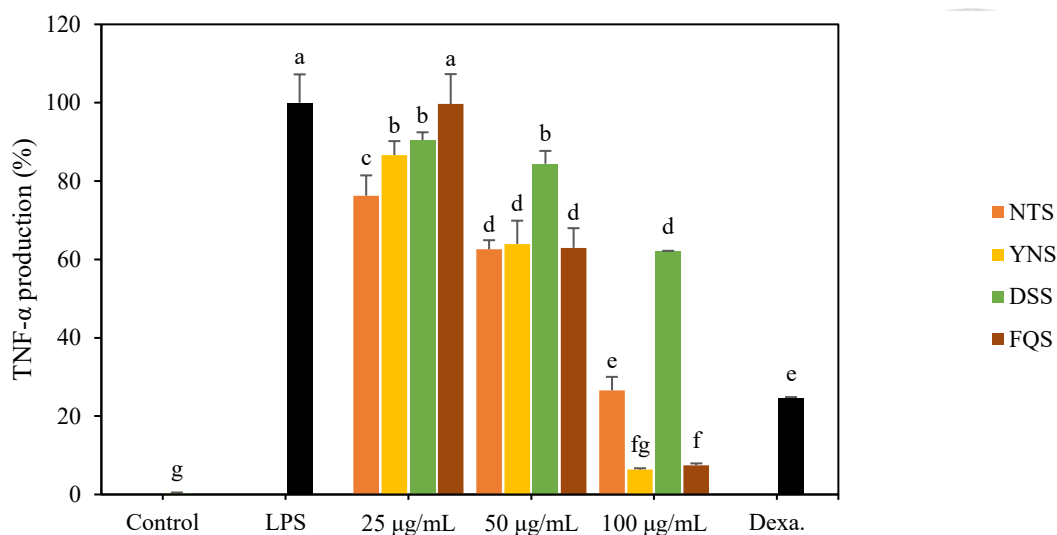


圖 5-19、各產地間 SPS 對 LPS 誘導小鼠巨噬細胞之 TNF- α 激素產生抑制效果比較

Figure 5-19. Comparison of the inhibitory effects of SPS from different regions on TNF- α production in LPS-induced RAW264.7 macrophages. Dexa.: Dexamethasone. The bars having different letters are significantly different ($p < 0.05$) as analyzed by Duncan's new multiple range test.

表 5-8、各產地 SPS 之 TNF- α 半抑制濃度

Table 5-8. Half-maximal inhibitory concentration of SPS from different regions on TNF- α production.

	IC ₅₀ (µg/mL)
NTS	57.74
YNS	52.06
DSS	205.72
FQS	55.29

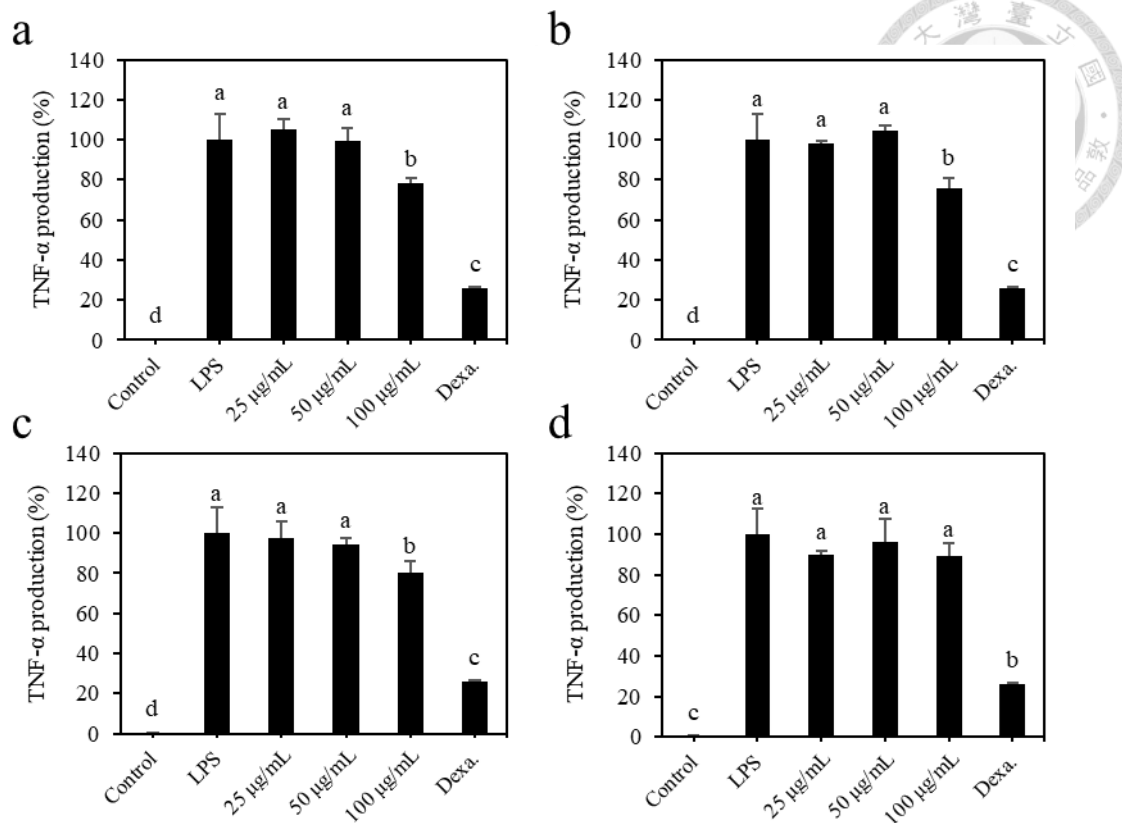


圖 5-20、各產地之 PS 對 LPS 誘導小鼠巨噬細胞之 TNF- α 激素產生抑制效果

Figure 5-20. Inhibitory effects of PS from different regions on TNF- α production in LPS-induced RAW264.7 macrophages. a: NTP; b: YNP; c: DSP; d: FQP. Dexa.: Dexamethasone. The bars having different letters are significantly different ($p < 0.05$) as analyzed by Duncan's new multiple range test.

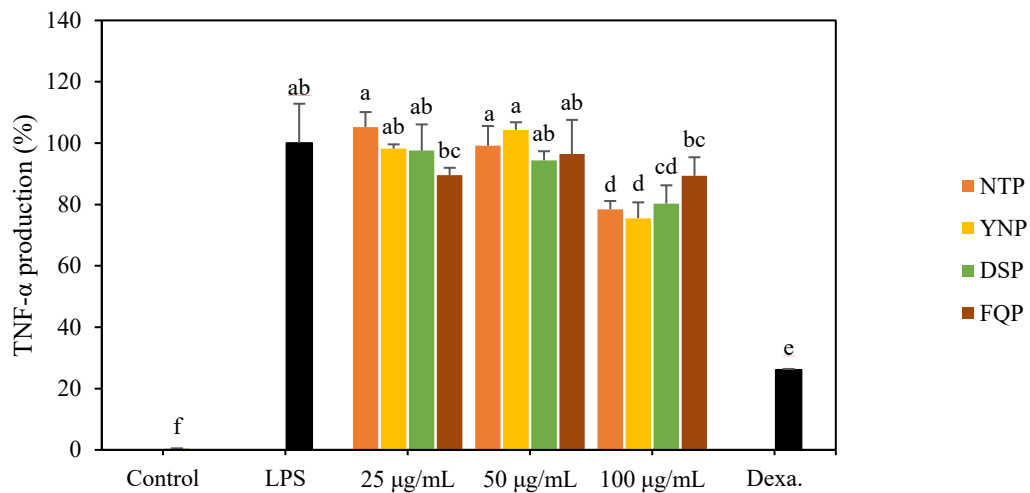


圖 5-21、各產地間 PS 對 LPS 誘導小鼠巨噬細胞之 TNF- α 激素產生抑制效果比較

Figure 5-21. Comparison of the inhibitory effects of PS from different regions on TNF- α production in LPS-induced RAW264.7 macrophages. Dexa.: Dexamethasone. The bars having different letters are significantly different ($p < 0.05$) as analyzed by Duncan's new multiple range test.

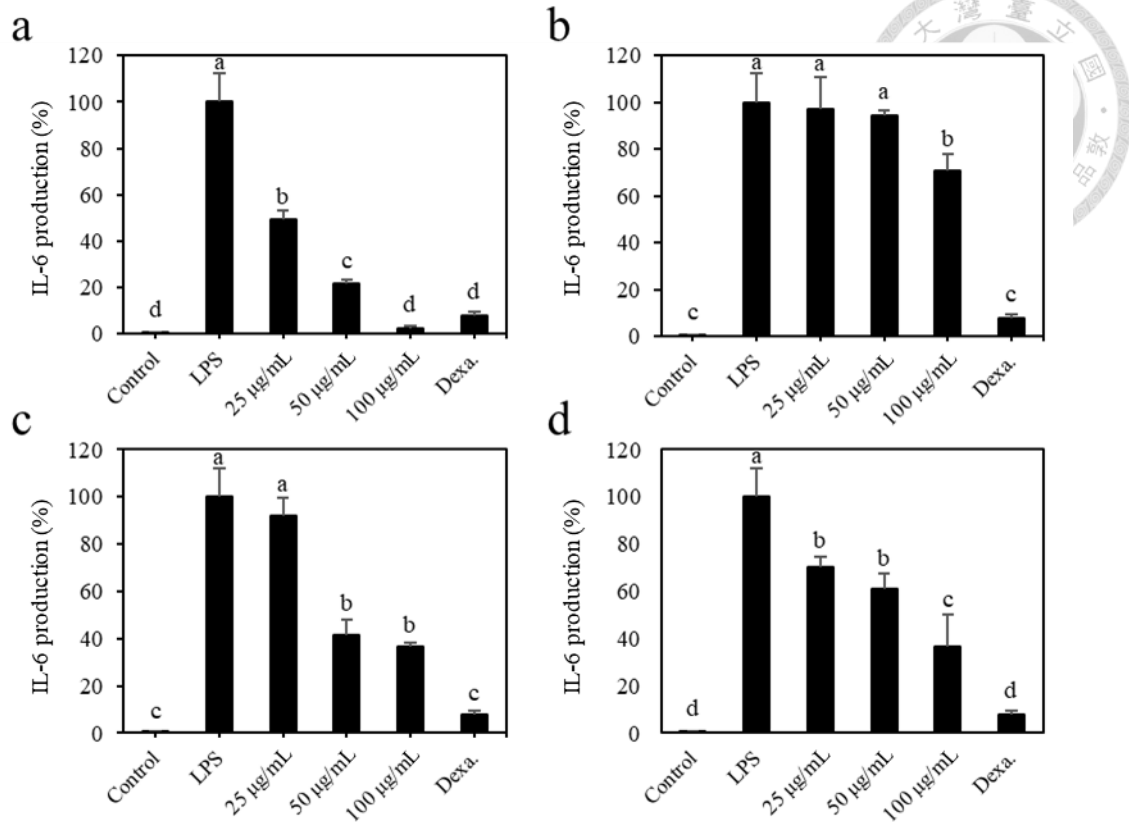


圖 5-22、各產地之 SPS 對 LPS 誘導小鼠巨噬細胞之 IL-6 激素產生抑制效果

Figure 5-22. Inhibitory effects of SPS from different regions on IL-6 production in LPS-induced RAW264.7 macrophages. a: NTS; b: YNS; c: DSS; d: FQS. Dexa.: Dexamethasone. The bars having different letters are significantly different ($p < 0.05$) as analyzed by Duncan's new multiple range test.

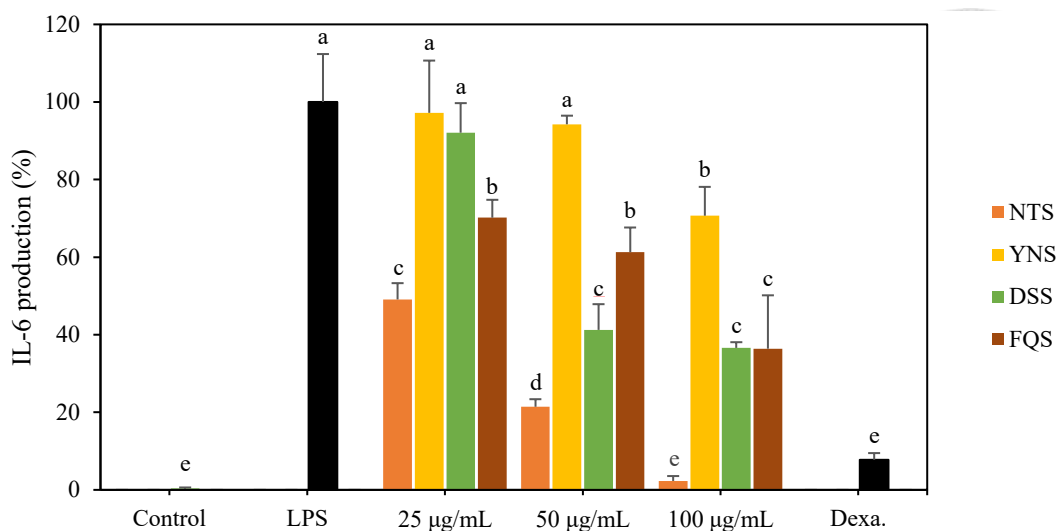


圖 5-23、各產地間 SPS 對 LPS 誘導小鼠巨噬細胞之 IL-6 激素產生抑制效果比較
Figure 5-23. Comparison of the inhibitory effects of SPS from different regions on IL-6 production in LPS-induced RAW264.7 macrophages. Dexa.: Dexamethasone. The bars having different letters are significantly different ($p < 0.05$) as analyzed by Duncan's new multiple range test.

表 5-9、各產地 SPS 之 IL-6 半抑制濃度

Table 5-9. Half-maximal inhibitory concentration of SPS from different regions on IL-6 production.

	IC ₅₀ (µg/mL)
NTS	23.33
YNS	352.6
DSS	59.02
FQS	63.83

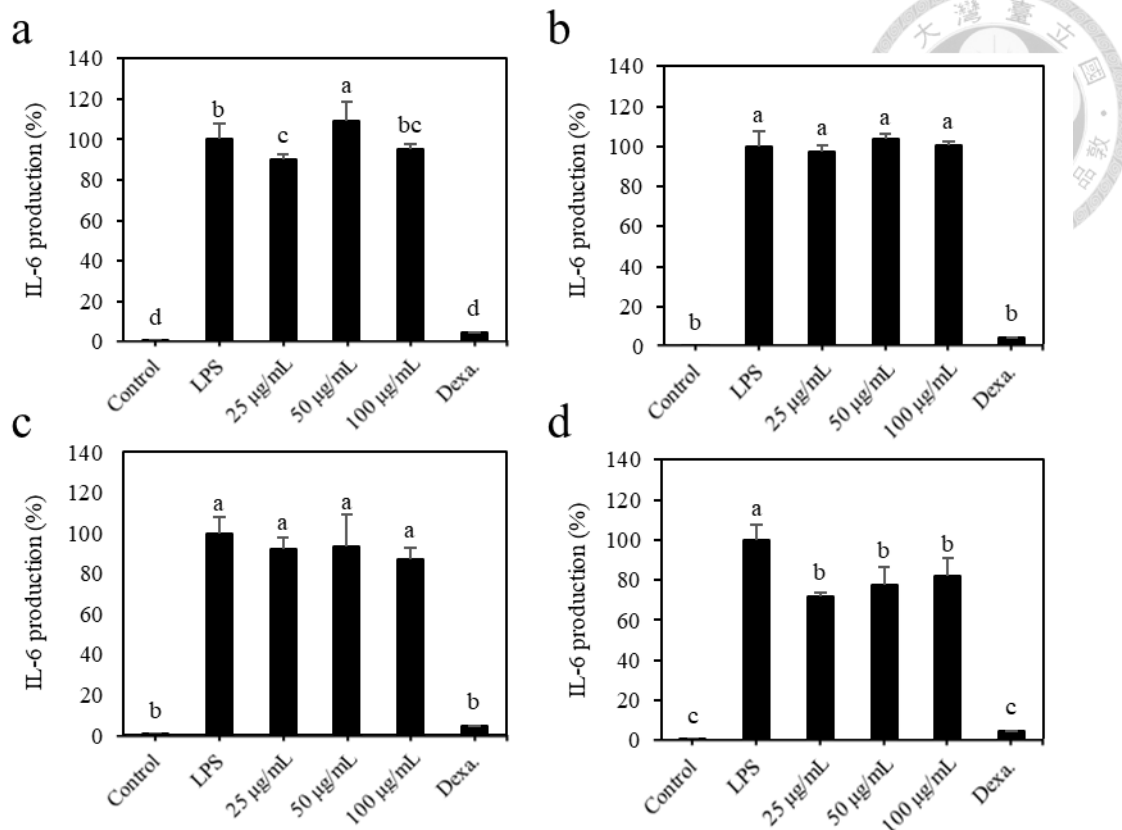


圖 5-24、各產地之 PS 對 LPS 誘導小鼠巨噬細胞之 IL-6 激素產生抑制效果

Figure 5-24. Inhibitory effects of PS from different regions on IL-6 production in LPS-induced RAW264.7 macrophages. a: NTP; b: YNP; c: DSP; d: FQP. Dexa.: Dexamethasone. The bars having different letters are significantly different ($p < 0.05$) as analyzed by Duncan's new multiple range test.

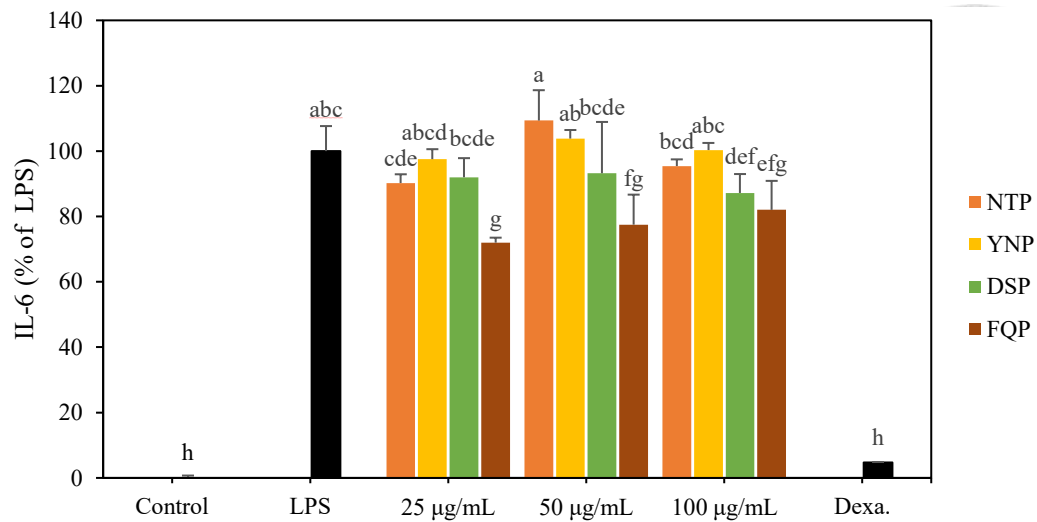


圖 5-25、各產地間 PS 對 LPS 誘導小鼠巨噬細胞之 IL-6 激素產生的抑制效果比較

Figure 5-25. Comparison of the inhibitory effects of PS from different regions on IL-6 production in LPS-induced RAW264.7 macrophages. Dexa.: Dexamethasone. The bars having different letters are significantly different ($p < 0.05$) as analyzed by Duncan's new multiple range test.

5.4. 南投產地含硫多醣體 (NTS) 之化學結構

核磁共振為分析多醣體結構之常見方法，其原理為利用原子的自旋特性給予特定波長的電磁波，原子在吸收電磁波能量後產生共振，接著當電磁波停止後原子會釋出吸收的能量並經由偵測器偵測後轉變為訊號，可協助研究者判定分子結構、官能基與鄰近原子的關係。根據上述 TNF- α 與 IL-6 等激素的分泌量結果顯示 NTS 對於這兩種激素的抑制效果最佳，因此本研究使用 NTS 進行化學結構分析，並且根據 Alquini 等人 (2004)、Nyman 等人 (2016)、Sanuelsan 等人 (2019) 與 Jen (2024) 的研究結果進行圖譜的訊號歸納，以了解 NTS 多醣體的結構。

5.4.1. ^1H NMR 圖譜

根據 ^1H 圖譜的結果，位於 δ 4.97 與 δ 4.93 為半乳糖之 H-1 訊號，分別屬於 $\rightarrow 2,6$)- α -Gal-(1 $\rightarrow$ 與 $\rightarrow 6$)- α -Gal-(1 $\rightarrow$ ，甘露糖與岩藻糖之 H-1 訊號為 δ 5.04，另外位於 δ 5.20 至 δ 5.21 處也有 $\rightarrow 2$)- α -Man-(1 $\rightarrow$ 的 H-1 訊號。葡萄糖之 ^1H 譜訊號相較於其他單醣不明顯，可能與其他訊號重疊；然而在與 Alquini 等人 (2004) 的研究比對後，推測大約位於 δ 4.50 至 δ 4.54 處為葡萄糖之 H-1 訊號，且鍵結種類為 $\rightarrow 6$)- β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 與 $\rightarrow 3,6$)- β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 。

由於試驗所使用的樣品並非純物質，其中所含有的各類分子使得圖譜的訊號重疊嚴重，讓 H-2 至 H-6 的訊號大多難以判定，但根據 H-1 訊號的解讀結果仍可初步估算單醣組成。在前述之單醣組成結果中，可知 NTS 的半乳糖、甘露糖加岩藻糖與葡萄糖的比為 27.34 : 39.75 : 23.12 $\approx$ 1.2 : 1.7 : 1，而根據 H-1 訊號峰的面積轉換結果顯示，半乳糖：甘露糖加岩藻糖：葡萄糖的比為 1.9034 : 1.8928 : 0.4814，約等於 4.0 : 3.9 : 1，此組成比例與單醣組成的結果並不相符，因此推測 ^1H 譜中的部分訊號被重疊覆蓋，需要利用後續的 NMR 圖譜確認。

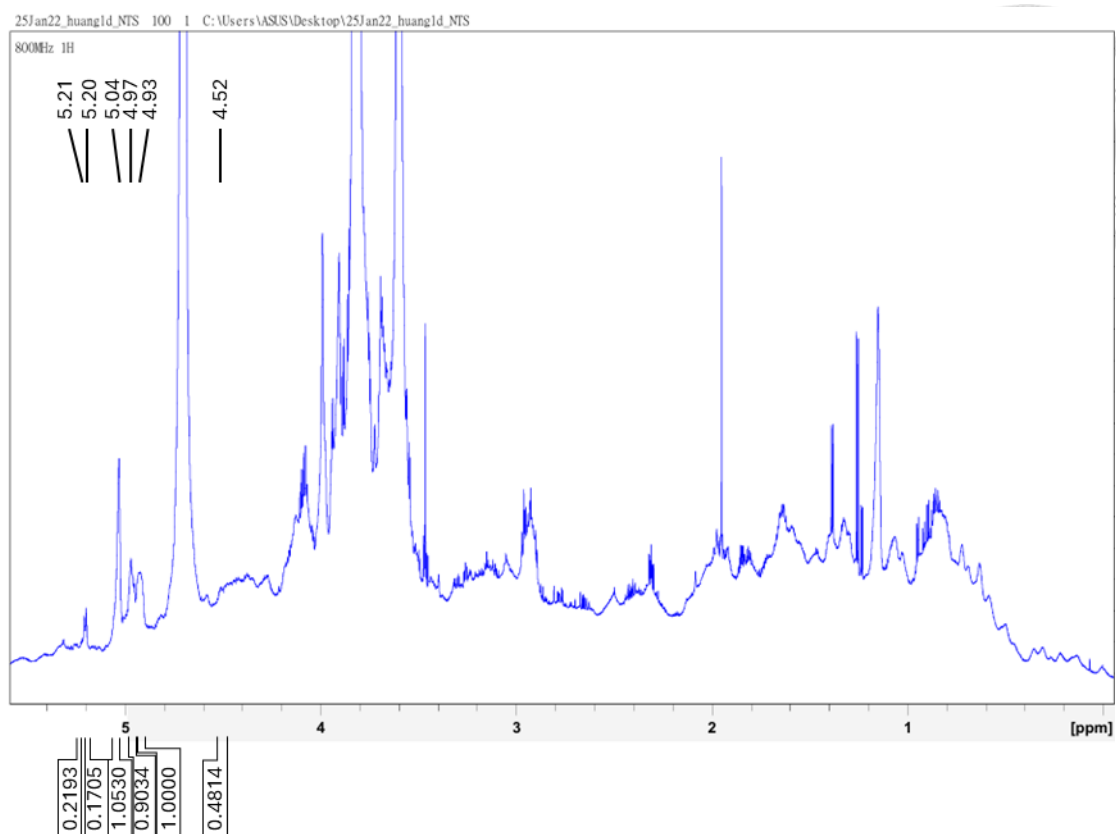


圖 5-26、NTS 多醣體之 ^1H NMR 圖譜

Figure 5-28. ^1H NMR spectrum of NTS (D_2O , 800 MHz, 25°C).

5.4.2. ^{13}C NMR 圖譜

根據 Jen (2024) 的研究結果，可將 NTS 多醣體之碳譜大致分成兩個區域，位於 δ 50 至 δ 75 間的訊號屬於 C-2 至 C-6，而 δ 98 至 δ 103 間的訊號則是單醣殘基之 C-1，兩個區域內皆具有多個峰，彼此的歸屬與分類較難在碳譜中完成，需要再以別的圖譜進行比對。此外，對比後發現在 δ 15.64 位置的訊號為 CH_3 官能基，可能屬於岩藻糖之六號碳 (C-6)。

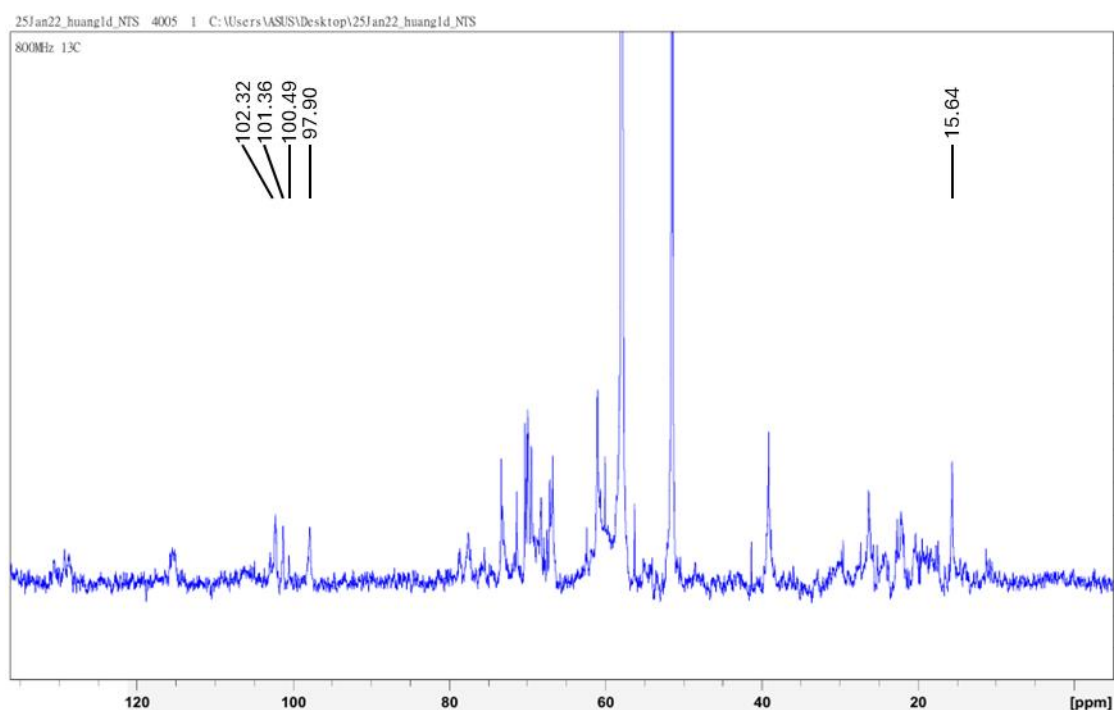


圖 5-27、NTS 多醣體之 ^{13}C NMR 圖譜

Figure 5-29. ^{13}C NMR spectrum of NTS (D_2O , 800 MHz, 25°C).

5.4.3. COSY 圖譜

COSY 圖譜可協助分析多醣體相鄰兩個氫的訊息，其測量結果可由圖 5-30 得知。在圖中總共發現 10 組 H1/H2 訊號，分別為 A (δ 4.93/ δ 3.77)、B (δ 4.97/ δ 3.77)、C1 (δ 5.03/ δ 3.82)、C2 (δ 5.04/ δ 3.83)、D (δ 5.03/ δ 3.99)、E (δ 4.95/ δ 4.14)、F (δ 5.13/ δ 4.01)、G (δ 4.44/ δ 3.24)、H (δ 4.45/ δ 3.43) 與 I (δ 4.46/ δ 3.45)。根據 Jen (2024) 與 Alquini 等人 (2004) 的分析結果比對後，確認殘基 A 與 B 皆為半乳糖，其鍵結模式分別為 $\rightarrow$ 6)- α -Gal-(1 $\rightarrow$ 與 $\rightarrow$ 2,6)- α -Gal-(1 $\rightarrow$ ；C1、C2、D 與 E 殘基的訊號推測為 α 構型之岩藻糖 (訊號 C1 與 C2) 與甘露糖 (訊號 D 與 E) (Nyman et al., 2016)。根據 Jen (2024) 的研究結果，位於 δ 5.26/ δ 4.06 附近具有兩組訊號，但本研究之圖譜僅觀察到一組 (訊號 F)，在經過比對後推測為 α -甘露糖 (Nyman et al., 2016)。

在 F2 之 δ 4.45 處具有一系列的訊號，分別為 G (δ 4.44/ δ 3.24)、H (δ 4.45/ δ 3.43) 與 I (δ 4.46/ δ 3.45)，經比對後確認此訊號應為 β -葡萄糖之 H1/H2 位置。根據前人研究結果，推測 G 訊號應該為 $\rightarrow$ 6)- α -Glc-(1 $\rightarrow$ ，H 與 I 則屬於 $\rightarrow$ 3,6)- α -Glc-(1 $\rightarrow$ (Zavadinack et al., 2024; 任, 2024)。此外，根據硫磺菌結構之相關研究顯示，COSY 圖譜中具有末端葡萄糖訊號 (任, 2024)，但本研究並未在圖譜中發現類似的訊號，需要搭配其他圖譜進行確認。

總結來說，COSY 圖譜中的訊號經過分類後分別屬於半乳糖 (訊號 A 與 B)、岩藻糖 (訊號 C1 與 C2)、甘露糖 (訊號 D、E 與 F) 和葡萄糖 (G、H 與 I)。根據前人研究推測 A 與 B 為 $\rightarrow$ 6)- α -Gal-(1 $\rightarrow$ 與 $\rightarrow$ 2,6)- α -Gal-(1 $\rightarrow$ ；C1 與 C2 屬於 $\rightarrow$ 3)- α -Fuc-(1 $\rightarrow$ 與末端 α -岩藻糖；D 為 α -Man-(1 $\rightarrow$ ；E 與 F 為 $\rightarrow$ 2)- α -Man-(1 $\rightarrow$ ；G 屬於 $\rightarrow$ 3)- α -Glc-(1 $\rightarrow$ ；H 與 I 則皆為 $\rightarrow$ 3,6)- α -Glc-(1 $\rightarrow$ (Nyman et al., 2016; Samuelsen et al., 2019; 任, 2024)。

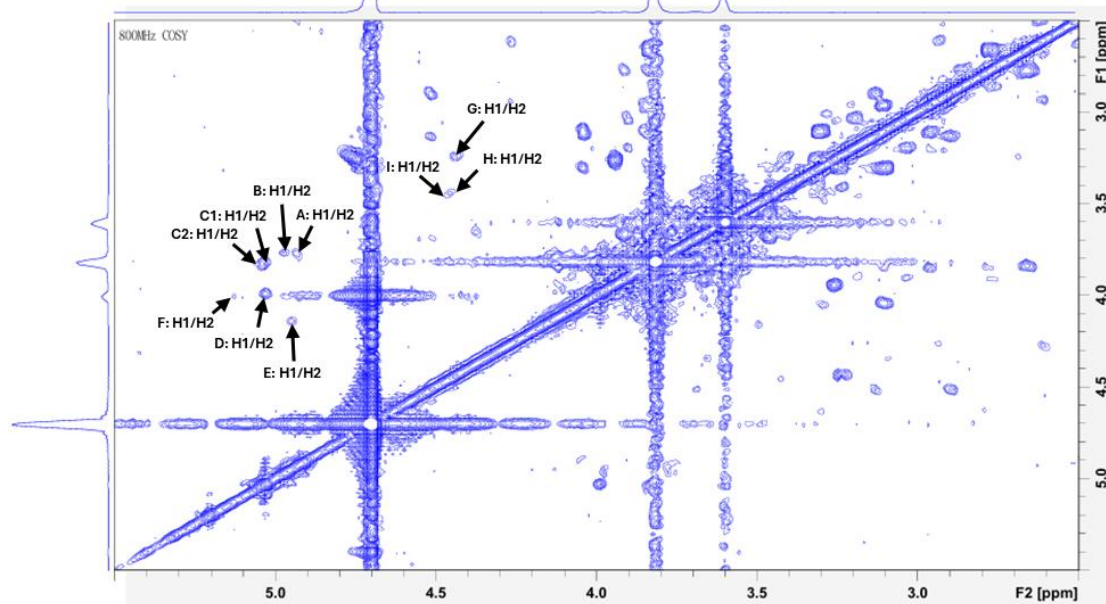


圖 5-28、NTS 多醣體之 COSY 圖譜

Figure 5-30. COSY spectrum of NTS ($F_1 = F_2 = 2.8\text{--}5.5$ ppm, D_2O , 800 MHz, 25°C).

5.4.4. TOCSY 圖譜

TOCSY 圖譜由圖 5-31 所示。根據圖譜的結果，除了訊號 E 之外，COSY 圖譜中所發現之 H1/H2 訊號皆可在 TOCSY 圖譜中發現，但訊號重疊較為嚴重，因此先以外側之 H1 尋找其他氫之訊號。

圖譜中發現，A 出現 $\delta 4.92/\delta 3.78$ 與 $\delta 4.92/\delta 3.81$ 兩組訊號，分別屬於 H1/H2 與 H1/H3；B 具有 $\delta 4.97/\delta 3.76$ 與 $\delta 4.97/\delta 3.98$ 兩組訊號，分別屬於 H1/H2 與 H1/H3；C1 具有 $\delta 5.04/\delta 3.83$ 、 $\delta 5.04/\delta 3.91$ 與 $\delta 5.04/\delta 3.91$ 三組訊號，分別屬於 H1/H2、H1/H3 與 H1/H4；C2 具有 $\delta 5.04/\delta 3.83$ 、 $\delta 5.04/\delta 3.83$ 與 $\delta 5.04/\delta 3.91$ 三組訊號，分別為 H1/H2、H1/H3 與 H1/H4；D 與 F 的訊號分別為 $\delta 5.03/\delta 4.00$ 與 $\delta 5.20/\delta 3.99$ ，皆屬於 H1/H2。另外訊號 E 並未在 TOCSY 圖譜中發現，推測可能被其他訊號覆蓋。

葡萄糖訊號 G、H 與 I 同樣也在 TOCSY 圖譜中被發現。首先 G 具有 $\delta 4.44/\delta 3.24$ 、 $\delta 4.44/\delta 3.41$ 、 $\delta 4.44/\delta 3.32$ 與 $\delta 4.44/\delta 3.55$ 四組訊號，分別屬於 H1/H2、H1/H3、H1/H4 與 H1/H5；H 與 I 具有 $\delta 4.46/\delta 3.44$ 、 $\delta 4.46/\delta 3.67$ 與 $\delta 4.46/\delta 3.57$ 三組訊號，皆屬於 H1/H2、H1/H3 與 H1/H5。經過 TOCSY 圖譜分析後，發現 NTS 各個糖類的訊號可以更明確地被確認，並且可以將 COSY 圖譜中未被觀察到的 H3 至 H6 訊號進行初步分類。

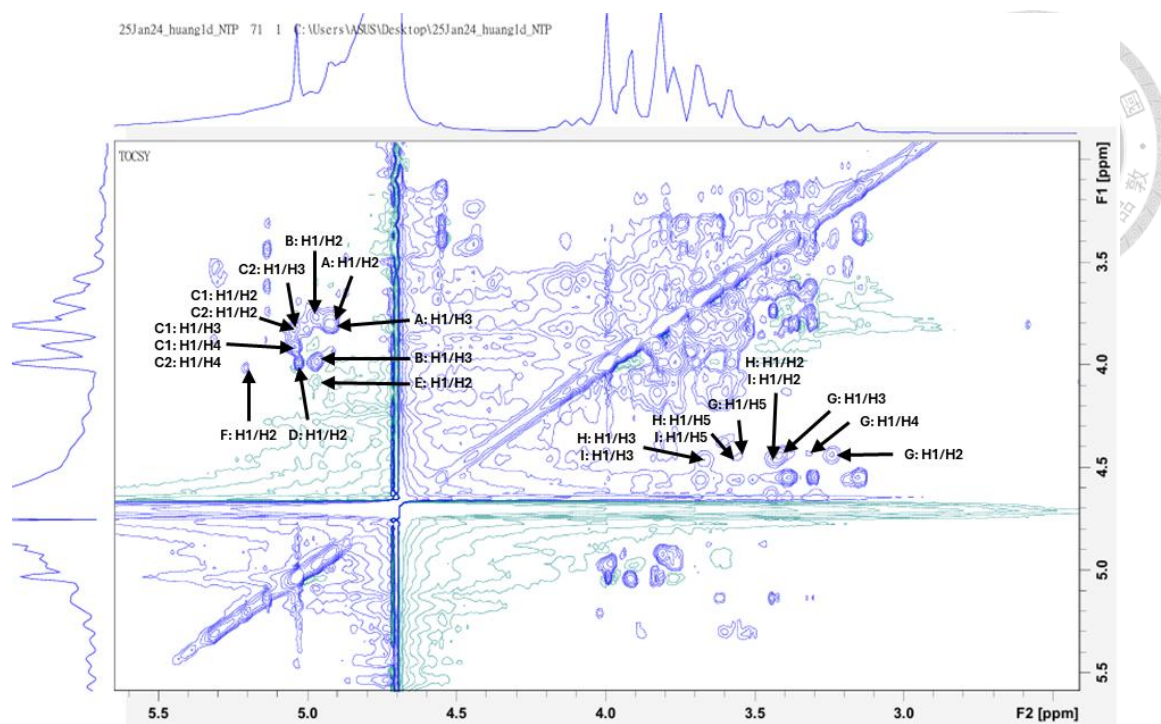


圖 5-29、NTS 多醣體之 TOCSY 圖譜

Figure 5-31. TOCSY spectrum of NTS (F1 = 2.8-5.4 ppm, F2 = 2.0-5.8 ppm, D₂O, 800 MHz, 25°C).

5.4.5. ROESY 圖譜

ROESY 圖譜中可觀察到單糖彼此間的關聯情況，有助於判斷多醣體的鍵結模式。由圖 5-32 中發現，各個訊號同樣也是重疊嚴重，因此仍然先尋找 H1 與其他氫的相關訊號。

根據解讀，A 具有六組訊號，分別是 AH1/AH2 (δ 4.92/ δ 3.77)、AH1/AH3 (δ 4.92/ δ 3.77)、AH1/GH6a (δ 4.92/ δ 3.77)、AH1/HH6a (δ 4.92/ δ 3.77)、AH1/AH6b (δ 4.92/ δ 3.60) 與 AH1/BH6b (δ 4.92/ δ 3.60)。B 具有五組訊號，分別是 BH1/BH2 (δ 4.97/ δ 3.77)、BH1/BH6b (δ 4.97/ δ 3.59)、BH1/BH3 (δ 4.97/ δ 4.00)、BH1/AH5 (δ 4.97/ δ 4.08) 與 BH1/AH6b (δ 4.97/ δ 3.59)，兩者的訊號顯示 A 與 B 應該在 6-O 位置有相連，而 A 與 G 或 H 可能也在 6-O 位置彼此連接。

C1 具有四組訊號，分別是 C1H1/C1H2 (δ 5.03/ δ 3.83)、C1H1/C1H3 (δ 5.03/ δ 3.91)、C1H1/C1H4 (δ 5.03/ δ 3.91) 與 C1H1/BH2 (δ 5.03/ δ 3.77)。C2 則具有兩組訊號，分別為 C2H1/C2H2 (δ 5.03/ δ 3.83) 與 C2H1/BH2 (δ 5.03/ δ 3.77)，顯示 C1 與 C2 皆與 B 的 O-2 相連。

D 具有六組訊號，分別是 DH1/DH2 (δ 5.03/ δ 3.99)、DH1/DH3 (δ 5.03/ δ 3.82)、DH1/DH4 (δ 5.03/ δ 3.58)、DH1/DH5 (δ 5.03/ δ 3.68)、DH1/BH2 (δ 5.03/ δ 3.77) 與 DH1/C1H3 (δ 5.03/ δ 3.91)，顯示在 B 的 2-O 與 C1 的 3-O 位置具有末端甘露糖 D 的連結。

E 與 F 共具有七組訊號，其中 F 在 ROESY 圖譜中出現了兩套相似的訊號，並且有互相連接的情況，根據 Jen (2024) 的研究結果，代表其可能為兩個不同連結方式的 α -甘露糖，因此將其中一套以 F* 表示。E 具有一組訊號，為 EH1/F*H2 (δ 4.96/ δ 4.01)。F 具有三組訊號，分別是 FH1/FH2 (δ 5.20/ δ 3.98)、FH1/FH5 (δ 5.20/ δ 3.66) 與 FH1/F*H2 (δ 5.20/ δ 3.98)。F* 具有三組訊號，分別是 F*H1/F*H2 (δ 5.20/ δ 3.99)、F*H1/F*H5 (δ 5.20/ δ 3.66) 與 F*H1/FH2 (δ 5.20/ δ 3.99)，顯示 E 與 F 皆與 F* 的 2-O 處連結，而 F* 與 F 的 2-O 位置相連。

G 具有六組訊號，分別是 GH1/GH2 (δ 4.44/ δ 3.24)、GH1/GH3 (δ 4.44/ δ 3.41)、GH1/GH4 (δ 4.44/ δ 3.37)、GH1/GH5 (δ 4.44/ δ 3.55)、GH1/GH6a (δ 4.45/ δ 3.78) 與 GH1/HH6a (δ 4.45/ δ 3.78)。H 具有六組訊號，分別是 HH1/HH2 (δ 4.44/ δ 3.41)、HH1/HH3 (δ 4.45/ δ 3.66)、HH1/HH4 (δ 4.44/ δ 3.41)、HH1/HH5 (δ 4.45/ δ 3.55)、HH1/HH6a (δ 4.45/ δ 3.78) 與 HH1/GH6a (δ 4.45/ δ 3.78)。I 具有三組訊號，分別是

IH1/IH2 (δ 4.45/ δ 3.41)、IH1/IH3 (δ 4.45/ δ 3.66) 與 IH1/HH3 (δ 4.45/ δ 3.66)。結果顯示，G 與 H 之間以 6-*O* 位置互相連接，I 則連結於 H 的 3-*O* 處。



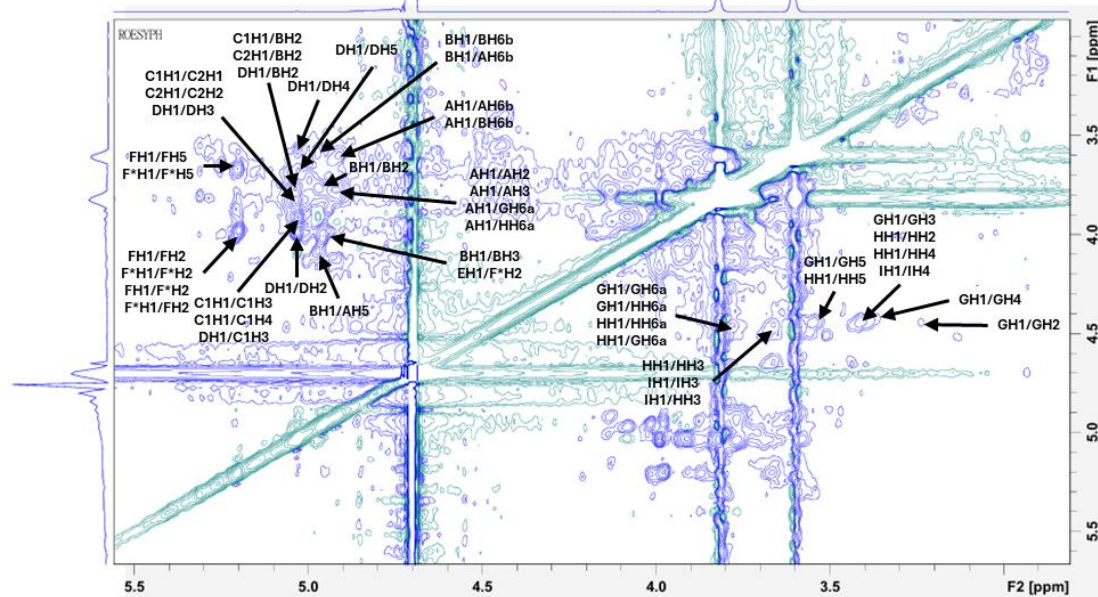


圖 5-30、NTS 多醣體之 ROESY 圖譜

Figure 5-32. ROESY spectrum of NTS (F1 = 3.0-5.6 ppm, F2 = 2.9-5.5 ppm, D₂O, 800 MHz, 25°C).

5.4.6. HSQC 圖譜

圖 5-33 為 HSQC 圖譜，可協助判斷各個單醣殘基中氫與碳的化學位移。在 F1 = 95-110 ppm 與 F2 = 4.4-5.4 ppm 具有 H1/C1 訊號，分別為 A (δ 4.92/ δ 97.87)、B (δ 4.97/ δ 97.87)、C1 (δ 5.04/ δ 101.16)、C2 (δ 5.04/ δ 101.16)、D (δ 5.03/ δ 102.28)、E (δ 4.95/ δ 102.11)、F (δ 5.20/ δ 100.55)、F* (δ 5.20/ δ 100.55)、G (δ 4.44/ δ 102.89)、H (δ 4.44/ δ 102.89) 與 I (δ 4.45/ δ 102.89)。

在 H2-H6/C2-C6 的訊號範圍中，可觀察到 B 之 H2/C2 (δ 3.76/ δ 77.57)、C1 之 H3/C3 (δ 3.91/ δ 77.49)、E 之 H2/C2 (δ 4.13/ δ 81.38)、F 之 H2/C2 (δ 3.99/ δ 78.70)、F* 之 H2/C2 (δ 4.01/ δ 78.44)、H 之 H3/C3 (δ 3.68/ δ 83.88) 與 I 之 H3/C3 (δ 3.68/ δ 83.88) 的碳化學位移處於較低場，因此推測這些位置為醣苷鍵連結的位置。另外從圖中各單醣的 C-6 位移訊號中，可發現半乳糖 A 與 B 及葡萄糖 G 與 H 位於較低場，因此推測 A、B、G 及 H 是在此位置具有醣苷鍵連結。

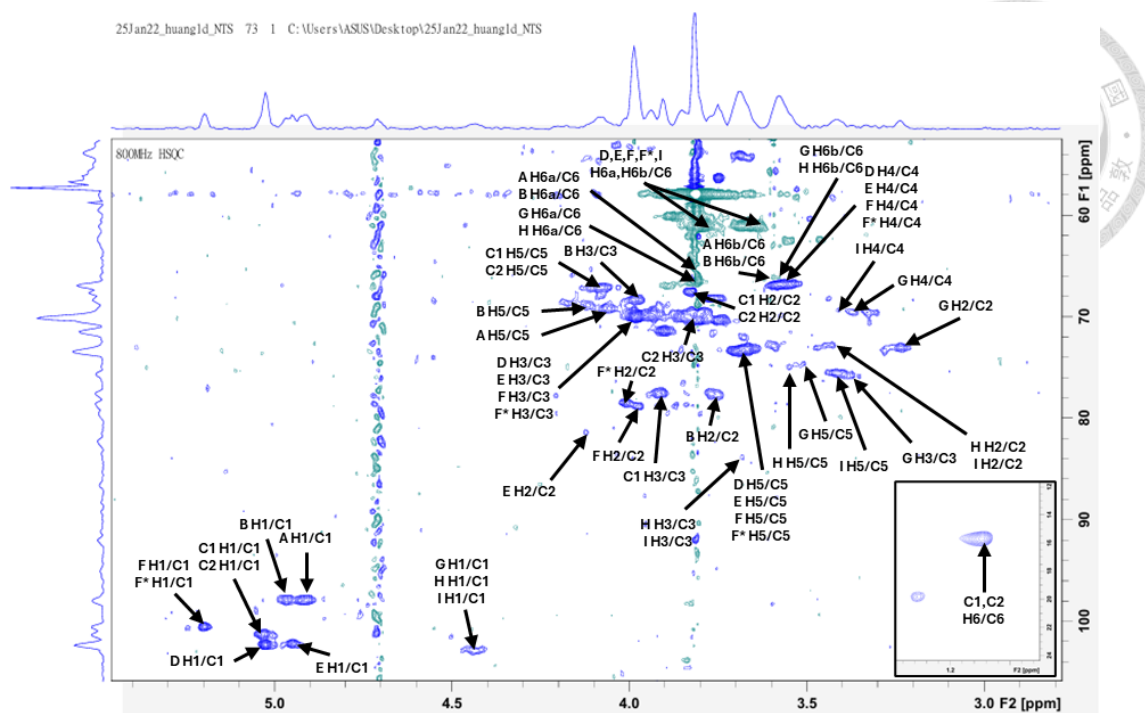


圖 5-31、NTS 多醣體之 HSQC 圖譜

Figure 5-33. HSQC spectrum of NTS (F1 = 54-140 ppm, F2 = 2.8-5.4 ppm, D₂O, 800 MHz, 25°C).

5.4.7. HMBC 圖譜

圖 5-34 為 HMBC 圖譜，可藉由氫與碳的關聯訊號確認多醣體的鍵結模式。根據結果，在 H1 訊號區域 ($F_2 = 4.4\text{--}5.4\text{ ppm}$) 可發現 C1H1/BC2 ($\delta 5.04/\delta 77.57$)、C2H1/BC2 ($\delta 5.04/\delta 77.57$)、DH1/BC2 ($\delta 5.03/\delta 77.57$)、DH1/C1C3 ($\delta 5.03/\delta 77.49$)、EH1/F*C2 ($\delta 4.95/\delta 78.44$)、FH1/F*C2 ($\delta 5.20/\delta 78.44$) 與 F*H1/FC2 ($\delta 5.20/\delta 78.70$) 之訊號，因此推測 C1、C2 與 D 連結於 B 的 2-O 上，而 D 也與 C1 的 3-O 位置相連；另外甘露糖 E、F 與 F*的鍵結模式為 E 連結於 F*的 2-O 處，而 F*與 F 在 2-O 處彼此皆有相連。

除了連結位置外，圖譜中也發現一些單醣的訊號，有助於我們再次確認其碳的位移，例如 C1H2/C1C3 ($\delta 3.83/\delta 77.49$)、C1H3/C1C3 ($\delta 3.91/\delta 77.49$)、C1H6/C1C4 ($\delta 1.15/\delta 71.48$)、C1H6/C1C5 ($\delta 1.15/\delta 67.21$)、C2H6/C2C4 ($\delta 1.15/\delta 71.48$)、C2H6/C2C5 ($\delta 1.15/\delta 67.21$)、DH1/DC2 ($\delta 5.03/\delta 69.06$)、DH1/DC3 ($\delta 5.03/\delta 69.98$)、DH1/DC3 ($\delta 5.03/\delta 73.27$)、EH1/EC3 ($\delta 4.95/\delta 69.98$)、EH1/EC5 ($\delta 4.95/73.27$)、FH1/FC3 ($\delta 5.20/\delta 69.98$)、FH1/FC5 ($\delta 5.20/\delta 73.27$)、F*H1/F*C3 ($\delta 5.20/\delta 69.98$) 以及 F*H1/F*C5 ($\delta 5.20/\delta 73.27$)。

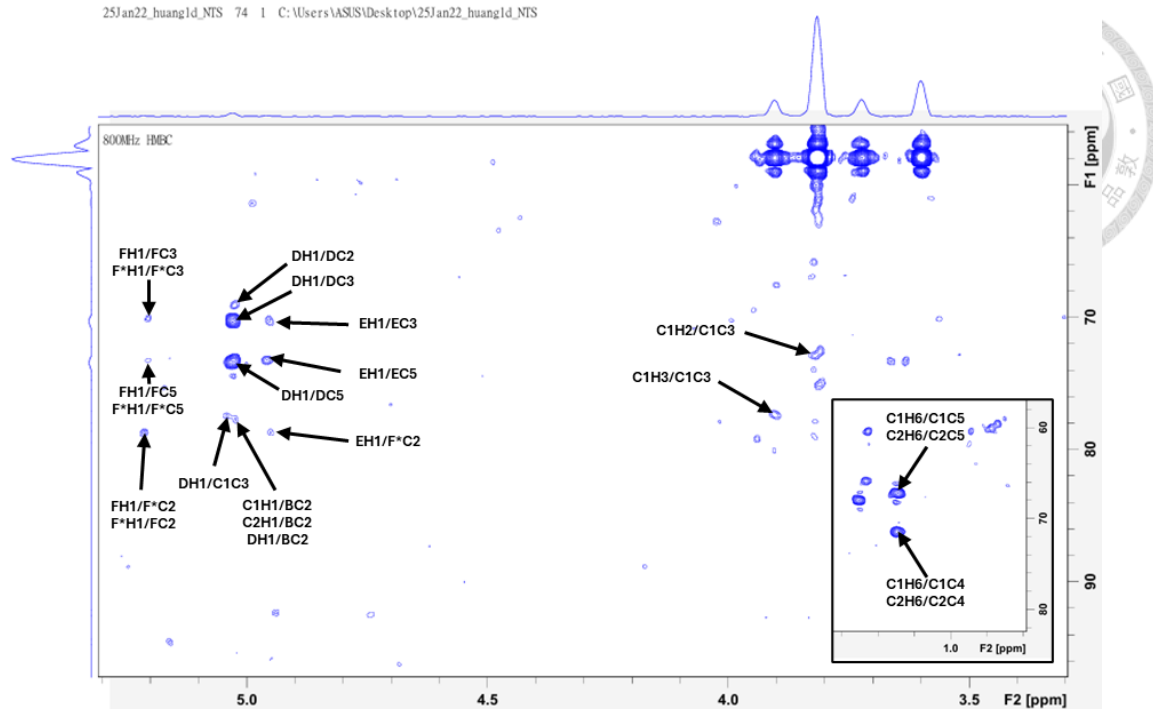


圖 5-32、NTS 多醣體之 HMBC 圖譜

Figure 5-34. HMBC spectrum of NTS (F1 = 56-96 ppm, F2 = 3.3-5.3 ppm, D₂O, 800 MHz, 25°C)

5.4.8. NTS 之結構討論

根據各個圖譜的分析結果，NTS 各訊號之 ^1H 與 ^{13}C 的化學位移可整理成表 5-10，並且經過解讀後確認 NTS 主要由五個重複單元所組成，各單元分別以 a 至 e 命名。各個重複單元根據其主鏈醣類組成可分為三類，分別以 α -半乳糖 (a、b 與 c)、 β -葡萄糖 (d) 與 α -甘露糖 (e) 所組成。單元 a 的主鏈為 $\rightarrow 6)-\alpha\text{-Gal}-(1\rightarrow$ (訊號 A 與 B)，並且在訊號 B 的 2-O 位置有一組 $\alpha\text{-Man}-(1\rightarrow 3)-\alpha\text{-Fuc}-(1\rightarrow$ 分支 (訊號 D 與 C1)。單元 b 與 c 皆以一組 $\rightarrow 6)-\alpha\text{-Gal}-(1\rightarrow$ 作為主鏈 (訊號 B)，並且分別在 2-O 位置具有 $\alpha\text{-Fuc}-(1\rightarrow$ 與 $\alpha\text{-Man}-(1\rightarrow$ 的分支 (訊號 C2 與 D)。單元 d 為一組主鏈為 $\rightarrow 3,6)-\beta\text{-Glc}-(1\rightarrow$ (訊號 H) 以及 $\rightarrow 6)-\beta\text{-Glc}-(1\rightarrow$ (訊號 G) 所組成的葡聚醣，其排列順序為 H-G-H，並且在訊號 H 上各有一組 $\rightarrow 3)-\beta\text{-Glc}-(1\rightarrow$ 分支 (訊號 I)。單元 e 為一組由 $\rightarrow 2)-\alpha\text{-Man}-(1\rightarrow$ 所組成的甘露糖鏈 (訊號 E、F 與 F*)，其排列順序為 E-F*-F-F*。

另外根據 NTS 之單醣組成結果與前人的研究結果可將各個重複單元進行排列。依據單醣的組成結果，NTS 之甘露糖、葡萄糖、半乳糖與岩藻糖之比例為 6:5:6:3，因此可推測出所有重複單元之個數，最後再綜合所有已知資訊及 Aquini 等人 (2004) 與 Jen (2024) 的研究結果進行比對後可歸納出 NTS 之鍵結模式 (圖 5-35)。

總結來說，NTS 之多醣體主要以 $\rightarrow 6)-\alpha\text{-Gal}-(1\rightarrow$ 作為主鏈，並且具有一組以 $\rightarrow 6)-\beta\text{-Glc}-(1\rightarrow$ 與 $\rightarrow 3)-\beta\text{-Glc}-(1\rightarrow$ 所組成的重複單元 a 以及一組由 $\rightarrow 2)-\alpha\text{-Man}-(1\rightarrow$ 所構成之重複單元 e，此結果與 Jen (2024) 之研究成果相似。

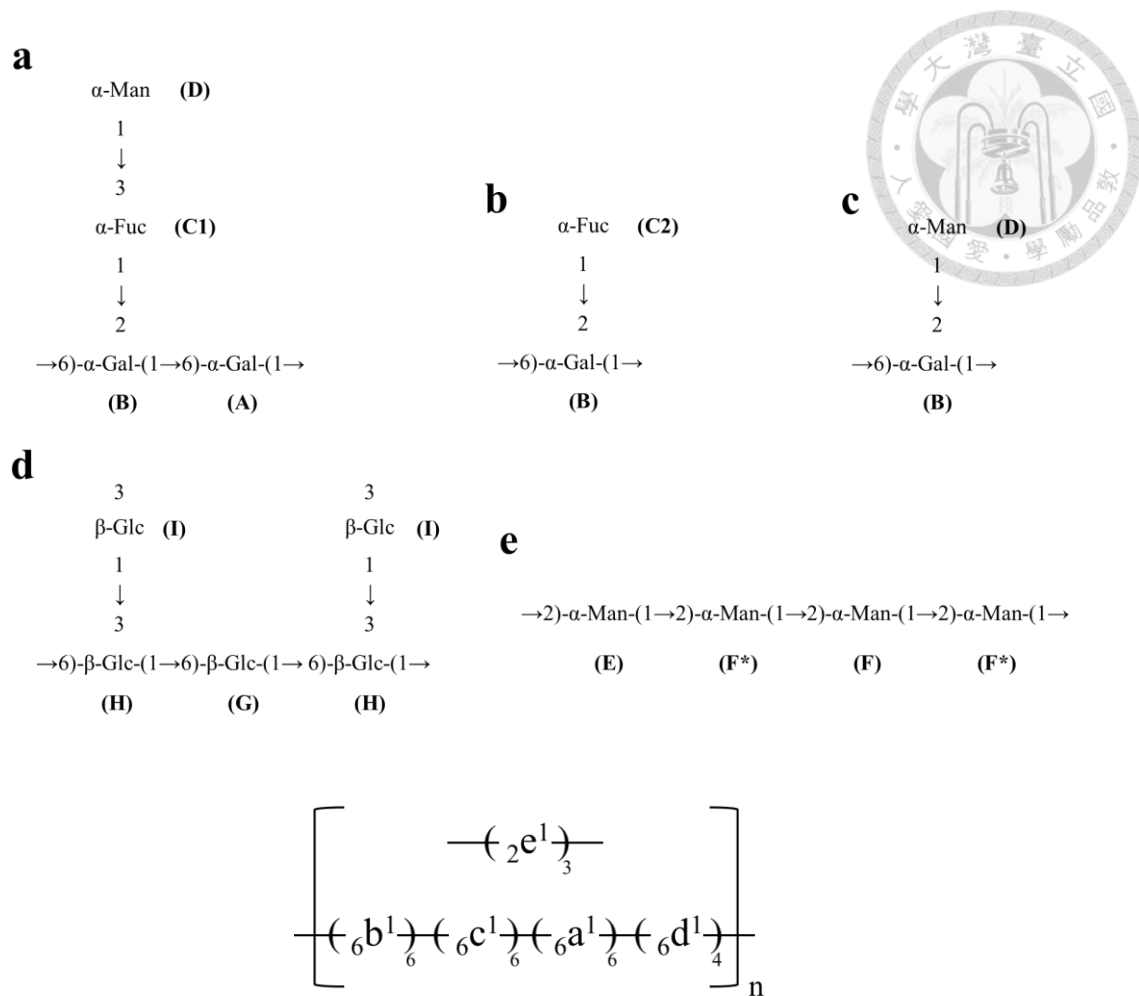


圖 5-33、NTS 多醣體之重複單元與化學結構

Figure 5-35. Putative repeat units and chemical structure of NTS.

表 5-10、NTS 多醣體之各單醣殘基之 ^1H 與 ^{13}C 的化學位移

Table 5-10. ^1H and ^{13}C NMR chemical shift of NTS.

Residue	Position	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
A →6)- α -Gal-(1→	1	4.92	97.87
	2	3.78	68.15
	3	3.81	69.77
	4	-	-
	5	4.08	69.20
	6	3.80(a), 3.59(b)	65.85
B →2,6)- α -Gal-(1→	1	4.97	97.87
	2	3.76	77.57
	3	3.98	68.31
	4	-	-
	5	4.12	68.85
	6	3.80(a), 3.59(b)	65.85
C1 →3)- α -Fuc-(1→	1	5.04	101.16
	2	3.83	67.42
	3	3.91	77.49
	4	3.91	71.48
	5	4.08	67.21
	6	1.15	15.68
C2 α -Fuc-(1→	1	5.04	101.16
	2	3.83	67.42
	3	3.83	70.03
	4	3.91	71.48
	5	4.08	67.21
	6	1.15	15.68
D α -Man-(1→	1	5.03	102.28
	2	4.00	69.06
	3	3.82	69.98
	4	3.58	66.86
	5	3.68	73.27
	6	3.78(a), 3.58(b)	60.94
E →2)- α -Man-(1→	1	4.95	102.11
	2	4.14	81.38
	3	3.99	69.98
	4	3.58	66.86
	5	3.66	73.27
	6	3.78(a), 3.58(b)	60.94
F →2)- α -Man-(1→	1	5.20	100.55
	2	3.99	78.70
	3	3.99	69.98
	4	3.58	66.86

F (cont'd)	5	3.66	73.27
→2)-α-Man-(1→	6	3.78(a), 3.58(b)	60.94
F*	1	5.20	100.55
→2)-α-Man-(1→	2	4.01	78.44
	3	3.99	69.98
	4	3.58	66.86
	5	3.66	73.27
	6	3.78(a), 3.58(b)	60.94
G	1	4.44	102.89
→6)-β-Glc-(1→	2	3.24	73.13
	3	3.41	75.57
	4	3.37	69.51
	5	3.55	74.89
	6	3.78(a), 3.58(b)	66.17
H	1	4.44	102.89
→3,6)-β-Glc-(1→	2	3.41	72.70
	3	3.66	83.88
	4	3.41	69.41
	5	3.55	74.89
	6	3.78(a), 3.58(b)	66.17
I	1	4.45	102.89
→3)-β-Glc-(1→	2	3.41	72.70
	3	3.66	83.88
	4	3.41	69.41
	5	3.44	75.52
	6	3.78(a), 3.58(b)	60.94



第六章、結論

不同產地之硫磺菌子實體的含硫多醣體 (SPS) 產率分別為 7.54% (NTS)、9.46% (YNS)、4.12% (DSS) 與 3.48% (FQS)，而各產地間的純化多醣體 (PS) 產率則大約為 1.00-1.50%之間，顯示產地來源的差異對於多醣體的產率有影響。

在同產地下，PS 的總蛋白質含量極少但總醣類含量較高，而 SPS 相較於 PS 則具有較多的蛋白質含量與較少的醣類含量，代表 SPS 中的蛋白質無法有效去除，顯示其可能為蛋白多醣或是醣蛋白。在硫酸根含量上，除 FQ 產地之 SPS 外，其餘產地的含量皆小於 PS，目前推測為不同產地來源造成硫磺菌的基因序列產生差異所導致。

所有產地 SPS 之單醣組成主要以甘露糖、葡萄糖、半乳糖與岩藻糖所組成，分子量分布皆以 2.80 kDa 的小分子量片段為最多，但各產地間的其他分子量片段分布則差異較大，其中 YN 與 FQ 兩個產地還分別具有 691.00 kDa 與 478.66 kDa 之大分子量片段，顯示出各產地間 SPS 的分子量分布具有差異。PS 多醣體之單醣組成同樣也以甘露糖、葡萄糖、半乳糖與岩藻糖為主，其分子量分布為 10-25 kDa 與 500-600 kDa，整體來說各產地間較為相似。在官能基組成上，SPS 與 PS 皆含有羥基 (-OH)、烷基 (C-H)、CHO 與 C=O 振動、C-H、S=O、C-O-C 與 C-O-H 等官能基，並且具有 α 與 β 構形，說明各產地與各萃取方法間官能基組成較為相似。

在 LPS 誘導 RAW 264.7 發炎的模式下，各產地 SPS 均表現出抑制 TNF- α 與 IL-6 細胞激素的產生；根據 IC₅₀ 的結果，NTS 對於 TNF- α 與 IL-6 的分泌具有最佳的抑制效果。與 SPS 多醣體相比，PS 的抑制 TNF- α 與 IL-6 分泌效果則較弱，此說明各產地的 PS 多醣體的抗發炎效果較差。

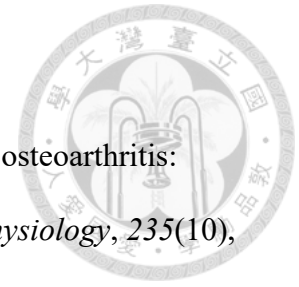
根據 NMR 的結果，NTS 多醣體主要以甘露糖、半乳糖、葡萄糖與岩藻糖所組成，此結果與單醣組成分析之結果相符。另外經過圖譜分析後，可確認 NTS 之主鏈的重複單元以 α -(1 $\rightarrow$ 6)半乳糖與 β -(1 $\rightarrow$ 6)葡萄糖所構成，部分 β -葡萄糖在 3-O 位置具有 α -(1 $\rightarrow$ 2)甘露糖殘基與 β -葡萄糖-3-O- β -葡萄糖的鍵結，而 α -半乳糖則具有 α -甘露糖、 α -岩藻糖與 α -岩藻糖-3-O- α -甘露糖等殘基連結於 2-O 位置。

總結來說，在相同萃取方法下，不同產地之硫磺菌多醣體的物化性質雖具有差異，但其抗發炎效果較為一致，這樣的結果顯現出硫磺菌多醣體在發炎抑制與

相關藥物開發的潛力，並且也確認產地來源並不是影響硫磺菌多醣體生物活性的最重要因素。



第七章、參考文獻



- Ahmad, N., Ansari, M. Y., & Haqqi, T. M. (2020). Role of iNOS in osteoarthritis: Pathological and therapeutic aspects. *Journal of Cellular Physiology*, 235(10), 6366-6376.
- Alquini, G., Carbonero, E. R., Rosado, F. R., Cosentino, C., & Iacomini, M. (2004). Polysaccharides from the fruit bodies of the basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. *FEMS Microbiology Letters*, 230(1), 47-52.
- Belboul, A., Ashworth, J., Fadel, A., McLoughlin, J., Mahmoud, A., & El Mohtadi, M. (2025). Estrogen induces the alternative activation of macrophages through binding to estrogen receptor-alpha. *Experimental and Molecular Pathology*, 143, 104971.
- Braaksma, A., & Schaap, D. J. (1996). Protein analysis of the common mushroom *Agaricus bisporus*. *Postharvest Biology and Technology*, 7(1), 119-127.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254.
- Chan, G. C., Chan, W. K., & Sze, D. M. (2009). The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. *Journal of Hematology & Oncology*, 2, 25.
- Chen, S. K., Li, Y. H., Wang, X., Guo, Y. Q., Song, X. X., Nie, S. P., & Yin, J. Y. (2023). Evaluation of the “Relative ordered structure of *Hericium erinaceus* polysaccharide” from different origins: Based on similarity and dissimilarity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(46), 17886-17898.
- Cheung, P. C. K. (1998). Plasma and hepatic cholesterol levels and fecal neutral sterol excretion are altered in a amsters and straw mushroom Diets1. *Journal of Nutrition*, 128(9), 1512-1516.

- 
- Cui, J., & Chisti, Y. (2003). Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production. *Biotechnology Advances*, 21(2), 109-122.
- Cui, Y., Xin, L., Juanjuan, Y., Qiaozhen, K., Limin, H., & and Lu, J. (2023). Cognition of polysaccharides from confusion to clarity: when the next “omic” will come? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(20), 4728-4743.
- da Silva Milhorini, S., Rutkeviski, R., Centa, A., Ribeiro Smiderle, F., Zavadinack, M., Rosado, F. R., & Iacomini, M. (2025). Different molecular weight fucogalactans from *Macrocybe titans* mushroom promote distinct effect on breast cancer cell death. *Carbohydrate Polymers*, 354, 123318.
- Dai, J., Wu, Y., Chen, S. w., Zhu, S., Yin, H. p., Wang, M., & Tang, J. (2010). Sugar compositional determination of polysaccharides from *Dunaliella salina* by modified RP-HPLC method of precolumn derivatization with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 629-635.
- Davila, M., & Du, X. (2023). Primary exploration of mushroom protein hydrolysis and cooking impact on the protein amino acid profiles of *Agaricus bisporus* and *Lentinula edodes* mushrooms. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 32, 100710.
- De Nicola, A., Soares, T. A., Santos, D. E. S., Bore, S. L., Sevink, G. J. A., Cascella, M., & Milano, G. (2021). Aggregation of lipid A variants: a hybrid particle-field model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1865, 129570.
- Di Lorenzo, F. (2017). The lipopolysaccharide lipid A structure from the marine sponge-associated bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 2A. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110, 1401.

Di Lorenzo, F., Duda, K. A., Lanzetta, R., Silipo, A., De Castro, C., & Molinaro, A.

(2022). A journey from structure to function of bacterial lipopolysaccharides.

Chemical Reviews, 122(20), 15767-15821.

Di Lorenzo, F., Pither, M. D., Martufi, M., Scarinci, I., Guzmán-Caldentey, J.,

Łakomiec, E., Jachymek, W., Bruijns, S., Santamaría, S. M., & Frick, J. S.

(2020). Pairing *Bacteroides vulgatus* LPS structure with its

immunomodulatory effects on human cellular models. *ACS Central Science*, 6, 1602.

Ding, X., Li, T., Zhao, J., Khalid, W., Fan, M., Qian, H., Li, Y., & Wang, L. (2025).

Effect of various extraction methods on the physicochemical properties, antioxidant, and anti-inflammatory activities of mung bean (*Vigna radiata* L.) skin polysaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*, 311, 143969.

DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956).

Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.

Ehren, H. L., Appels, F. V. W., Houben, K., Renault, M. A. M., Wösten, H. A. B., &

Baldus, M. (2020). Characterization of the cell wall of a mushroom forming fungus at atomic resolution using solid-state NMR spectroscopy. *Cell Surface*, 6, 100046.

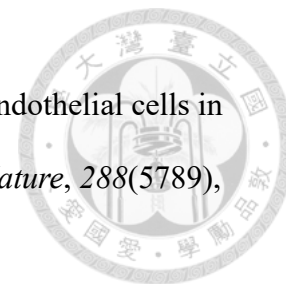
Escarnot, E., Aguedo, M., Agneessens, R., Wathelet, B., & Paquot, M. (2011).

Extraction and characterization of water-extractable and water-unextractable arabinoxylans from spelt bran: Study of the hydrolysis conditions for monosaccharides analysis. *Journal of Cereal Science*, 53(1), 45-52.

Fischer, E. (1894). Synthesen in der Zuckergruppe II. *Berichte der deutschen*

chemischen Gesellschaft, 27(3), 3189-3232.

Furchgott, R. F., & Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288(5789), 373-376.



Gao, J., Li, X., Jia, S., Zeng, H., & Zheng, B. (2023). Structural characterization and antioxidant activity of a glycoprotein isolated from shiitake mushrooms. *Food Bioscience*, 53, 102608.

Guo, D., Liu, C., Zhu, H., Cheng, Y., Guo, Y., Yao, W., Jiang, J., & Qian, H. (2025). Advanced insights into mushroom polysaccharides: Extraction methods, structure-activity, prebiotic properties, and health-promoting effects. *International Journal of Biological Macromolecules*, 308, 142319.

Han, X. Q., Yue, G. L., Yue, R. Q., Dong, C. X., Chan, C. L., Ko, C. H., Cheung, W. S., Luo, K. W., Dai, H., Wong, C. K., Leung, P. C., & Han, Q. B. (2014). Structure elucidation and immunomodulatory activity of a beta glucan from the fruiting bodies of *Ganoderma sinense*. *PLoS One*, 9(7), e100380.

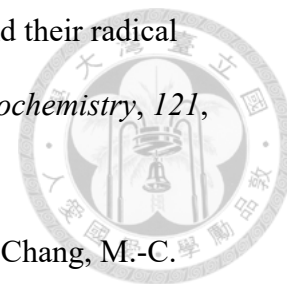
He, B. L., Zheng, Q. W., Guo, L. Q., Huang, J. Y., Yun, F., Huang, S. S., & Lin, J. F. (2020). Structural characterization and immune-enhancing activity of a novel high-molecular-weight polysaccharide from *Cordyceps militaris*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 145, 11-20.

Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., Kashiwamura, S. i., Nakajima, K., Koyama, K., Iwamatsu, A., Tsunasawa, S., Sakiyama, F., Matsui, H., Takahara, Y., Taniguchi, T., & Kishimoto, T. (1986). Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*, 324(6092), 73-76.

Ifuku, S., Nomura, R., Morimoto, M., & Saimoto, H. (2011). Preparation of chitin

- nanofibers from mushrooms. *Materials*, 4(8), 1417-1425.
- Ignarro, L. J., Byrns, R. E., Buga, G. M., & Wood, K. S. (1987). Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circulation Research*, 61(6), 866-879.
- Jayasooriya, R. G. P. T., Kang, C.-H., Seo, M.-J., Choi, Y. H., Jeong, Y.-K., & Kim, G.-Y. (2011). Exopolysaccharide of *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus* downregulates LPS-induced production of NO, PGE₂, and TNF- α in BV2 microglia cells via suppression of the NF- κ B pathway. *Food and Chemical Toxicology*, 49(11), 2758-2764.
- Jen, C. I., Lu, M. K., Lai, M. N., & Ng, L. T. (2024). Sulfated polysaccharides of *Laetiporus sulphureus* fruiting bodies exhibit anti-breast cancer activity through cell cycle arrest, apoptosis induction, and inhibiting cell migration. *Journal of Ethnopharmacology*, 321, 117546.
- Jen, C. I., & Ng, L. T. (2025). F2-sulfated polysaccharides of *Laetiporus sulphureus* suppress triple-negative breast cancer cell proliferation and metastasis through the EGFR-mediated signaling pathway. *International Journal of Biological Macromolecules*, 306, 141407.
- Khatua, S., Ghosh, S., & Acharya, K. (2017). *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. as Food as Medicine. *Pharmacognosy Journal*, 9, s1-s15.
- Kishimoto, T., Hirano, T., Kuritani, T., Yamamura, Y., Ralph, P., & Good, R. A. (1978). Induction of IgG production in human B lymphoblastoid cell lines with normal human T cells. *Nature*, 271(5647), 756-758.
- Knirel, Y. A., Knirel, Y., & Valvano, M. (2011). *Bacterial Lipopolysaccharides*.
- Krishnamoorthi, R., Srinivash, M., Mahalingam, P. U., & Malaikozhundan, B. (2022).

Dietary nutrients in edible mushroom, *Agaricus bisporus* and their radical scavenging, antibacterial, and antifungal effects. *Process Biochemistry*, 121, 10-17.

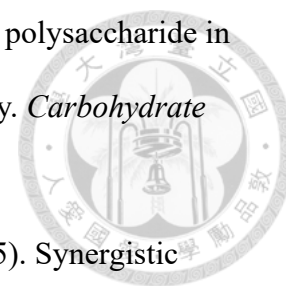


- Li, H., Feng, J., Liu, C., Hou, S., Meng, J., Liu, J.-Y., Zilong, S., & Chang, M.-C. (2024). Polysaccharides from an edible mushroom, *Hericium erinaceus*, alleviate ulcerative colitis in mice by inhibiting the NLRP3 inflammasomes and reestablish intestinal homeostasis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 267, 131251.
- Li, L., Xie, J., Zhang, Z., Xia, B., Li, Y., Lin, Y., Li, M., Wu, P., & Lin, L. (2024). Recent advances in medicinal and edible homologous plant polysaccharides: Preparation, structure and prevention and treatment of diabetes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 258, 128873.
- Lu, M. K., Jen, C. I., Chao, C. H., Hsu, Y. C., & Ng, L. T. (2023). SPS, a sulfated galactoglucan of *Laetiporus sulphureus*, exhibited anti-inflammatory activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 226, 1236-1247.
- Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S.-I., & Lee, Y. C. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*, 339(1), 69-72.
- Meng, X., Liang, H., & Luo, L. (2016). Antitumor polysaccharides from mushrooms: A review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities. *Carbohydrate Research*, 424, 30-41.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1), 55-63.

- Nyman, A. A. T., Aachmann, F. L., Rise, F., Ballance, S., & Samuelsen, A. B. C. (2016). Structural characterization of a branched (1→6)-α-mannan and β-glucans isolated from the fruiting bodies of *Cantharellus cibarius*. *Carbohydrate Polymers*, 146, 197-207.
- Okamoto, K., Kawamura, S., Tagawa, M., Mizuta, T., Zahid, H. M., & Nabika, T. (2020). Production of an antihypertensive peptide from milk by the brown rot fungus *Neolentinus lepideus*. *European Food Research and Technology*, 246(9), 1773-1782.
- Page, M. J., Kell, D. B., & Pretorius, E. (2022). The role of lipopolysaccharide-induced cell signalling in chronic inflammation. *Chronic Stress (Thousand Oaks)*, 6, 24705470221076390.
- Palacios, I., García-Lafuente, A., Guillamón, E., & Villares, A. (2012). Novel isolation of water-soluble polysaccharides from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* mushrooms. *Carbohydrate Research*, 358, 72-77.
- Park, G. S., Shin, J., Hong, S., Gopal, J., & Oh, J.-W. (2024). Anticarcinogenic potential of the mushroom polysaccharide lentinan on gastric and colon cancer cells: Antiproliferative, antitumorigenic, Mu-2-related death-inducing gene, MUDENG ramifications. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 135, 122-130.
- Paudel, E., Boom, R. M., van Haaren, E., Siccama, J., & van der Sman, R. G. M. (2016). Effects of cellular structure and cell wall components on water holding capacity of mushrooms. *Journal of Food Engineering*, 187, 106-113.
- Peng, X. B., Li, Q., Ou, L. N., Jiang, L. F., & Zeng, K. (2010). GC–MS, FT-IR analysis of black fungus polysaccharides and its inhibition against skin aging in mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47(2), 304-307.

- Raschke, W. C., Baird, S., Ralph, P., & Nakoinz, I. (1978). Functional macrophage cell lines transformed by abelson leukemia virus. *Cell*, 15(1), 261-267.
- Rietschel, E. T., Brade, L., Brandenburg, K., Flad, H.-D., de Jong-Leuveninck, J., Kawahara, K., Lindner, B., Loppnow, H., Lüderitz, T., Schade, U., Seydel, U., Sidorczyk, Z., Tacke, A., Zähringer, U., & Brade, H. (1987). Chemical structure and biologic activity of bacterial and synthetic lipid A. *Reviews of Infectious Diseases*, 9, S527-S536.
- Rijia, A., Krishnamoorthi, R., Kaviyadharshini, M., & Mahalingam, P. U. (2025). Unlocking fungal fortunes: Cutting-edge extraction techniques and therapeutic possibilities of mushroom bioactive compounds. *Food Chemistry Advances*, 6, 100895.
- Saha, A. K., & Brewer, C. F. (1994). Determination of the concentrations of oligosaccharides, complex type carbohydrates, and glycoproteins using the phenol-sulfuric acid method. *Carbohydrate Research*, 254, 157-167.
- Samuelsen, A. B. C., Rise, F., Wilkins, A. L., Teveleva, L., Nyman, A. A. T., & Aachmann, F. L. (2019). The edible mushroom *Albatrellus ovinus* contains a α -L-fuco- α -D-galactan, α -D-glucan, a branched (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucan and a branched (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan. *Carbohydrate Research*, 471, 28-38.
- Sande, D., Oliveira, G. P. d., Moura, M. A. F. e., Martins, B. d. A., Lima, M. T. N. S., & Takahashi, J. A. (2019). Edible mushrooms as a ubiquitous source of essential fatty acids. *Food Research International*, 125, 108524.
- Shan, J., Fu, J., Zhao, Z., Kong, X., Huang, H., Luo, L., & Yin, Z. (2009). Chlorogenic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 cells through suppressing NF- κ B and JNK/AP-1 activation. *International Immunopharmacology*, 9(9), 1042-1048.

- Sheng, Z., Wen, L., & Yang, B. (2022). Structure identification of a polysaccharide in mushroom Lingzhi spore and its immunomodulatory activity. *Carbohydrate Polymers*, 278, 118939.
- Shi, D., Xu, X., Wang, J., Bu, T., Sun, P., Yang, K., & Cai, M. (2025). Synergistic anti-inflammatory effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharide and ganoderic acid A on LPS-induced RAW264.7 cells by inhibition of TLR4/NF- κ B activation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 309, 143074.
- Song, X., Ren, Z., Wang, X., Jia, L., & Zhang, C. (2020). Antioxidant, anti-inflammatory and renoprotective effects of acidic-hydrolytic polysaccharides by spent mushroom compost (*Lentinula edodes*) on LPS-induced kidney injury. *International Journal of Biological Macromolecules*, 151, 1267-1276.
- Sousa, F. T. G. d., Biering, S. B., Patel, T. S., Blanc, S. F., Camelini, C. M., Venzke, D., Nunes, R. J., Romano, C. M., Beatty, P. R., Sabino, E. C., & Harris, E. (2022). Sulfated β -glucan from *Agaricus subrufescens* inhibits flavivirus infection and nonstructural protein 1-mediated pathogenesis. *Antiviral Research*, 203, 105330.
- Stojković, D. S., Barros, L., Calhelha, R. C., Glamočlija, J., Ćirić, A., van Griensven, L. J., Soković, M., & Ferreira, I. C. (2014). A detailed comparative study between chemical and bioactive properties of *Ganoderma lucidum* from different origins. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 65(1), 42-47.
- Su, C. H., Lai, M. N., & Ng, L. T. (2017). Effects of different extraction temperatures on the physicochemical properties of bioactive polysaccharides from *Grifola frondosa*. *Food Chemistry*, 220, 400-405.



Synytsya, A., & Novák, M. (2013). Structural diversity of fungal glucans.

Carbohydrate Polymers, 92(1), 792-809.

Tian, R., Zhang, Y.-Z., Cheng, X., Xu, B., Wu, H., Liang, Z.-Q., Rahman, M., Wang,

Y., & Zeng, N.-K. (2023). Structural characterization, and in vitro

hypoglycemic activity of a polysaccharide from the mushroom *Cantharellus*

yunnanensis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 253,

127200.

Venturella, G., Ferraro, V., Cirilincione, F., & Gargano, M. L. (2021). Medicinal

mushrooms: Bioactive compounds, use, and clinical trials. *International*

Journal of Molecular Sciences, 22(2), 634.

Wang, H., Ma, S., Mariga, A. M., Hu, Q., Xu, Q., Su, A., Ma, N., & Ma, G. (2024).

Structural characterization and anti-inflammatory activities of novel

polysaccharides obtained from *Pleurotus eryngii*. *Food Science and Human*

Wellness, 13(5), 3031-3042.

Wang, J., Wu, C., Chen, Y., Chen, C., Hu, S., & Chang, S. (2014). Antihyperglycemic

activity of exopolysaccharide produced by mushroom *pleurotus ferulae* with

submerged liquid culture on streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of*

Food and Nutrition Research, 2(7), 419-424.

Wang, K. F., Sui, K. y., Guo, C., & Liu, C. Z. (2017). Improved production and

antitumor activity of intracellular protein-polysaccharide from *Trametes*

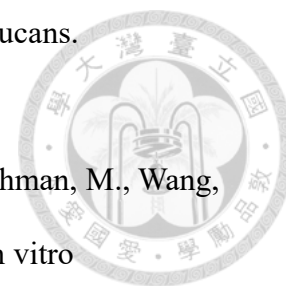
versicolor by the quorum sensing molecule-tyrosol. *Journal of Functional*

Foods, 37, 90-96.

Wu, B., Cui, J., Zhang, C., & Li, Z. (2012). A polysaccharide from *Agaricus blazei*

inhibits proliferation and promotes apoptosis of osteosarcoma cells.

International Journal of Biological Macromolecules, 50(4), 1116-1120.



- Yang, B., Luo, Y., Sang, Y., & Kan, J. (2022). Isolation, purification, structural characterization, and hypoglycemic activity assessment of polysaccharides from *Hovenia dulcis* (Guai Zao). *International Journal of Biological Macromolecules*, 208, 1106-1115.
- Yi, X., Liu, C.-y., Yang, S.-T., Zhu, H., Zhang, Y.-y., Lv, G.-p., & Huang, H. (2025a). Decoding the difference of four species of *Cordyceps* based on polysaccharides and immunomodulation activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 294, 139424.
- Yi, X., Liu, C. y., Yang, S. T., Zhu, H., Zhang, Y. y., Lv, G. p., & Huang, H. (2025b). Decoding the difference of four species of *Cordyceps* based on polysaccharides and immunomodulation activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 294, 139424.
- Zavadinack, M., de Lima Bellan, D., Fernandes Bonaldi, M. P., da Silva Milhorini, S., Cordeiro, L. M. C., Fogagnoli Simas, F., & Iacomini, M. (2024). Polysaccharide fractions extracted from *Lactarius quieticolor* mushroom exhibit immune stimulatory activities on macrophages. *Food Research International*, 197, 115205.
- Zdorovenko, E. L., Valueva, O. A., Kachala, V. V., Shashkov, A. S., Knirel, Y. A., Komaniecka, I., & Choma, A. (2012). Structure of the O-polysaccharide of *Azorhizobium caulinodans* HAMBI 216; identification of 3-C-methyl-D-rhamnose as a component of bacterial polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 358, 106.
- Zhang, X., Cai, Z., Mao, H., Hu, P., & Li, X. (2021). Isolation and structure elucidation of polysaccharides from fruiting bodies of mushroom *Coriolus versicolor* and evaluation of their immunomodulatory effects. *International*

Journal of Biological Macromolecules, 166, 1387-1395.

Zheng, D., Liwinski, T., & Elinav, E. (2020). Inflammasome activation and regulation: toward a better understanding of complex mechanisms. *Cell Discovery*, 6, 36.

Zhu, Z., Zhu, B., Sun, Y., Ai, C., Wu, S., Wang, L., Song, S., & Liu, X. (2018). Sulfated polysaccharide from sea cucumber modulates the gut microbiota and its metabolites in normal mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 502-512.

任家宜，2018。不同物化性質之水溶性多醣體的抗發炎活研究。臺灣大學碩士論文。110 頁。

任家宜，2024。本土產硫磺菌含硫多醣體之物化性質、化學結構及抗乳癌活性研究。臺灣大學博士論文。181 頁。

陳勁甫，2015。人工培養烏苓參之基源、多醣物化性質及免疫調節活性研究。臺灣大學碩士論文。100 頁。

