

Antioxidant and Hypoglycemic Effect of Chromium Enriched *Ganoderma lucidum* Fermented Rice Flour

Po-Syun Lin, Su-Der Chen*, Hui-Huang Chen

Department of Food Science, National Ilan University, Ilan City
Email: *sdchen@niu.edu.tw

Received: Aug. 8th, 2013; revised: Aug. 29th, 2013; accepted: Sep. 15th, 2013

Copyright © 2013 Po-Syun Lin et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract: *Ganoderma lucidum* is one of the most important Chinese medicinal and edible mushrooms. The most important active components of *G. lucidum* were polysaccharides and triterpenoids. They have been proven to possess many pharmacological functions such as antioxidant, anti-hepatitis, hypoglycemic activity, anti-inflammation and hypocholesterolemia. Trivalent chromium for diabetes can improve blood sugar control and glucose tolerance. Therefore, the different chromium concentrations (0, 100 and 200 ppm) were added in brown rice medium with 50% moisture content for 14-day solid-state fermentation of *Ganoderma lucidum* at 30°C. Further the *Ganoderma lucidum* fermented brown rice products were extracted by microwave to analyze the antioxidant activities and hypoglycemic effects. The 200 ppm chromium addition level in *Ganoderma lucidum* fermented brown rice product had higher polysaccharides, total phenol, ferrous ions and reducing power. The different ethanol concentrations (0%, 25%, 50%, 75% and 95%) were used for extracting chromium enriched *Ganoderma lucidum* fermented rice products by 300 W microwave for 10 min, and 25% ethanol obtained more active compounds, such as 19.75% crude polysaccharides, 0.34% crude triterpenoids, and 0.0026% total chromium. The mice were divided to normal group, Streptozotocin (STZ)-induced mice groups containing control group and 50 ppm *Ganoderma lucidum* (GL) extracts group. After 4-week feeding, water intake, feed intake and plasma glucose of mice were analyzed. The feed intake and water intake significantly decreased at STZ-induced mice groups with 50 ppm GL extracts by 25% ethanol after 2-week and 3-week, respectively; and the hypoglycemic effects were appeared after 4-week feeding.

Keywords: Chromium; *Ganoderma lucidum*; Antioxidant; Hypoglycemic

富铬灵芝发酵米谷粉之抗氧化和降血糖研究

林伯勳, 陈淑德*, 陈辉煌

国立宜兰大学食品科学系, 宜兰市
Email: *sdchen@niu.edu.tw

收稿日期: 2013年8月8日; 修回日期: 2013年8月29日; 录用日期: 2013年9月15日

摘要: 灵芝是华人重要的药用和食用菇蕈类, 灵芝最主要的活性成分为多糖和三萜, 具有抗氧化、抗肝炎、降血糖、抗发炎和降胆固醇的活性; 三价铬对于糖尿病有血糖控制与葡萄糖耐受性有改善的作用。添加不同三价铬浓度(0, 100 and 200 ppm)于水分含量为 50%的糙米基质中, 并在 30°C下, 灵芝发酵 14 天, 进一步分析抗氧化成分和微波萃取物的降血糖效果。添加 200 ppm 的三价铬会有较佳的多糖和总多酚含量、螯合亚铁能力及还原力。分别以 0%、25%、50%、75%、95%酒精以 300 W 微波萃取富铬灵芝发酵糙米产物 10 min, 其中 25%酒精比例可以获得较多的有效成分, 其中粗多糖含量 19.75%, 粗三萜 0.34%, 总铬 0.0026%。在以小鼠动物模式分别以正常组、糖尿病(STZ)对照组、糖尿病管喂 50 ppm 灵芝萃取物四周, 记录采水量及采食量, 并每周测量空腹血糖, 在饮食及饮水部分则是在第二周及第三周开始即有显著降低, 在四周后可以发现空腹血糖值有显著*通讯作者。

降低。

关键词：铬；灵芝；抗氧化；降血糖

1. 引言

灵芝为我国珍贵的中草药，在分类学上的地位为：真菌界(Fungi)、担子菌门(Basidiomycota)、伞菌纲(Agaricomycetes)、多孔菌目(Polyporales)、灵芝科(Ganodermataceae)、灵芝属(*Ganoderma*)，学名为 *Ganoderma lucidum*，是一种药用价值很高的名贵真菌。但野生灵芝资源缺乏，人工栽培周期长(2~3个月以上)，产量低，又受季节限制，进而影响灵芝的产量^[1]。故目前利用液态发酵和固态发酵，周期短，成本低，产量大，此可提高灵芝的生产量。固态发酵技术已利用在饲料、燃料、食品、医药产品及化学等产业，灵芝的固态发酵大多是利用在太空包或是椴木培养的子实体居多，若以可食性的谷类作为基质培养基来培养真菌的菌丝体^[2]，可完整的利用于食品加工，提升谷物的保健营养功能，提升产品的竞争力。

有许多研究报告指出，自由基在癌症、心血管等疾病及老化上，均扮演极重要之角色，人体在代谢过程中会产生自由基与活性氧，在正常状态下，生体之抗氧化系统会与自由基取得平衡，以维持生体正常生理，唯当此平衡遭到破坏时，自由基与活性氧就会攻击细胞组织、细胞膜及危害基因物质，造成细胞变异、伤害，甚至死亡，而此平衡之破坏亦可能导致多种疾病之发生。抗氧化剂可以协助人类抵抗因为活性氧所造成的伤害^[3]，而糖尿病的高血糖会生成活性氧物质(ROS)，导致脂质过氧化和细胞膜损伤，并产生后续的并发症，而抗氧化剂能通过抑制过氧化链反应，防止胰岛 β 细胞被破坏，减缓糖尿病发生^[4]。灵芝子实体萃取物的抗氧化活性分为两部分，乙醇溶性和水溶性两种，乙醇溶性物质为灵芝孢子油，其中脂肪酸占70%左右，三萜类物质占20%左右，而热水溶性物质主要为多醣^[5]。分析以50%乙醇萃取之灵芝乙醇萃取液，当浓度达到20 mg/mL具有与抗坏血酸相当之抑制亚麻油酸自氧化能力，抑制率会随着浓度的增加而增强之，最高可达到91.4%抑制效果。当以共轭二烯法测定其抗氧化活性，其抗氧化效果亦会随浓度之增加而增强，最高可达到74.2%^[6]，比起抗坏血酸来得

高。Tseng 等曾针对灵芝成熟和幼小子实体及发酵菌丝和发酵上清液之热水和热碱萃取液的多醣作抗氧化分析试验，结果显示萃取的多醣呈现很好的抗氧化活性并有很低的 EC_{50} 值(<0.1 mg/mL)^[7]。

铬是人体内重要的必需的微量元素，三价铬是葡萄糖耐受因子(glucose tolerance factor, GTF)的中心活性成分，能协助胰岛素维持正常糖耐受量。三价铬可以促使小鼠 3T3-L1 脂肪细胞胆固醇流失，增加细胞膜的流动性，使细胞膜表面 GLUT-4 蛋白质表现增加，进而降低血糖^[8]。

微波是指频率范围在 300~300,000 MHz 的电磁波，其萃取原理为利用高频电磁波可穿透萃取介质到达细胞内，细胞内水分吸收微波能后迅速升温，使其内部压力超过细胞壁能膨胀的能力，而让细胞破裂，使细胞内物质流出达到萃取目的，且有萃取时间短、溶剂消耗少的主要优点^[9]，但微波萃取时，多醣结构可能会在微波加热过程中发生降解，使萃取率下降，故须找到最适萃取条件。

故本研究先制备富铬灵芝发酵米谷粉，并分析其抗氧化成分和性质，进一步利用不同乙醇浓度进行富铬灵芝米谷粉的微波萃取，分析其三萜和多醣含量，并评估管喂 50 ppm 萃取物对糖尿病 STZ 小鼠的饮食量、饮水量和空腹血糖值的影响。

2. 材料与方法

2.1. 灵芝菌种培养及固态发酵

本实验菌种为灵芝菌 *Ganoderma lucidum* BCRC 36123 (ATCC 32471)购自食品工业发展研究所生物资源保存及研究中心(新竹，台湾)，以固态 PDA 培养基制成之斜面进行活化培养 7 天后保存于 4℃ 下，并每 30 天继代一次以维持活性。灵芝菌的预活化方式是切下 3 块 1 cm² 大小之菌块，放入装有 150 mL PDB (Potato Dextrose Broth)培养基的 500 mL 具有挡板的三角摇瓶中，在 30℃ 以 150 rpm 培养 7 天后作为发酵菌种。进一步使用粳糙米(米和水比例为 1:1)，并以添加三氯化铬控制基质的三价铬浓度分别为 0、100 和

200 ppm, 杀菌、冷却后, 接入前述预活化 7 天之灵芝菌液(10%), 于 30°C 恒温培养 14 天。

2.2. 富铬灵芝米谷粉的萃取物制备及分析方法

2.2.1. 富铬灵芝米谷粉的萃取物制备

富铬灵芝固态发酵产物先于 121°C 灭菌后, 以 60°C 热风干燥 5 小时, 并以磨粉均质机磨成粉末。在热水萃取物制备方面, 是取 3 g 发酵产物粉末添加 40 mL 蒸馏水进行 100°C 热水萃取 30 min 冷却后, 离心分离取上清液即为热水萃取物, 再将热水萃取物配制成 20 mg/mL 进行抗氧化分析。另外在酒精萃取物之制备方面, 是将 3 g 发酵产物粉末添加 40 mL 85% 酒精后, 进行超音波萃取 45 min, 离心分离取上清液此为酒精萃取物, 进一步将酒精萃取物配制成 20 mg/mL 以进行抗氧化分析。

2.2.2. 铬分析方法^[10]

取 1 g 干燥固态发酵产物粉末加入 25 mL 试管中, 再加入 10 mL 去离子水于 100°C 下萃取 30 min, 萃取液经离心 10 min 后, 取 1 mL 上清液即可用于原子吸收光谱(AA, Z-6100 HITACHI)分析样品之总铬含量。再取 1 mL 上清液加入 1 mL NH₄OH 及 8 mL 乙醇震荡混合后, 再以离心 10 min, 取上清液稀释 10 倍即可以 AA 分析有机铬含量。并以 0.1、0.3、0.5、1、3 和 5 ppm 的三价铬离子的标准液, 以 AA 测定其吸收值, 以制作标准曲线。

2.2.3. 灵芝发酵产物之粗多醣测定方法^[11]

称取 2.5 g 灵芝发酵粉末并加入蒸馏水 50 mL, 以微波功率 300 W 萃取 10 min, 萃取、离心后取上清液加入 4 倍 95% 酒精使多醣沉淀, 干浴去除溶剂后, 再以 1 N NaOH 于 60°C 下溶解多醣, 将多醣溶液适当稀释后取 1 mL, 加入 1 mL 5% 酚(Phenol)和 5 mL 浓硫酸进行呈色反应, 在分光光度计于 488 nm 波长下可测吸收值, 另外配制 0、10、25 和 50 ppm 的葡萄糖标准溶液以制备标准曲线。

2.2.4. 灵芝发酵产物之菌丝量测定方法^[12]

发酵之菌丝生长状况系以发酵产物之麦角固醇含量间接分析基质中菌丝生长量。称取 0.25 g 之干燥样品于 15 mL 离心管, 加入 5 mL 99% 甲醇, 并于 60°C 下萃取 1 小时。萃取后离心 10 min, 取上清液以 0.22

μm 孔径滤膜过滤后即可用于 HPLC 分析。另外配制 50、25、10 灵芝菌丝 mg/mL 作为标准曲线。HPLC 分析以 99% 甲醇为移动相、C-18 管柱为固定相、移动相流速为 1 mL/min、光源波长为 282 nm、分析时间为 20 min。

2.2.5. 灵芝发酵产物之粗三萜分析^[13]

取 0.5 g 灵芝发酵粉末并加入 95% 酒精 50 mL 以微波功率 300 W 萃取 10 min, 萃取后, 离心去除沉淀不溶物, 取 0.1 mL 的上清液于 80°C 干浴中挥发, 加入 0.4 mL 5% 香草醛(Vanillin, Sigma)-醋酸溶液和 1 mL 过氯酸, 于 60°C 干浴加热 15 min 后冰浴至室温, 再加入 5 mL 醋酸混合均匀, 15 min 后于 548 nm 测吸光。另外配制 0、0.1、0.2、0.4 齐墩果酸(Oleanolic acid, Sigma)标准溶液以制备标准曲线。

2.2.6. 总多酚类化合物分析^[14]

取 0.2 mL 灵芝酒精萃取液, 加入 1 mL 磷钼酸酚试剂 I (Folin-Ciocalteu's phenol reagent)及 0.8 mL 7.5% 的碳酸钠(Na₂CO₃), 混匀后于室温静置 30 min, 反应时要避光, 并在波长 765 nm 测吸光值并以没食子酸(gallic acid)为标准品制作检量线, 再将样品的吸光值代入标准检量线的回归方程式, 以计算样品之总多酚之含量。

2.2.7. 类黄酮含量分析^[15]

取 1 mL 灵芝热水萃取液并加入 1 mL 2% methanolic (AlCl₃·6H₂O), 在室温下混匀静置 10 min, 反应时要避光, 并在波长 430 nm 测吸光值并以槲黄素(quercetin)作为标准品制作检量线, 再将样品的吸光值代入标准检量线的回归方程式, 以计算样品之类黄酮之含量。

2.2.8. 捕捉 1,1-二苯基-2-苦味基团(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl, DPPH)之能力测定^[16]

取 2 mL 酒精萃取液并加入 2 mL 0.2 mM DPPH-MeOH, 将其混匀静置于室温 30 min, 并在波长 517 nm 测吸光值, 以 ascorbic acid 和 BHA(Sigma)为样品之对照组。公式如下:

$$\text{Scavenging effect (\%)} = \frac{[(A_{517\text{nm}} \text{ of control}) - (A_{517\text{nm}} \text{ of sampel})]}{(A_{517\text{nm}} \text{ of control})} \times 100$$

2.2.9. 螯合亚铁离子能力测定^[17]

取 2 mL 酒精萃取液并加入 0.1 mL 1 mM FeCl₂·4H₂O, 经 30 秒反应后, 加入 0.2 mL 0.25 mM ferrozine, 再室温下混合反应 10 min, 并在波长 562 nm 测吸光值并以 citric acid 和 EDTA 为样品之对照组, 吸光值越低表示样品螯合金属能力越强。公式如下:

$$\text{Chelating effect (\%)} = \frac{[(A_{562\text{nm}} \text{ of control}) - (A_{562\text{nm}} \text{ of sample})]}{(A_{562\text{nm}} \text{ of control})} \times 100$$

2.2.10. 还原能力测定^[18]

取 2.5 mL 酒精萃取液并加入 2.5 mL 0.2 M 磷酸缓冲溶液和 2.5 mL 1% 赤血盐, 于 50°C 水浴 20 min 后并快速冷却后, 再加入 2.5 mL 10% 三氯醋酸(TCA)混匀后以转速 3000 rpm 10 min 后, 取其上清液 5 mL, 并依序加入 5 mL H₂O 及 1 mL 0.1% 氯化铁混合均匀, 在 10 min 反应后, 在波长 700 nm 测吸光值并以 ascorbic acid 和 BHA 作为样品之正对照组。吸光值越高表示样品螯合金属能力越强。

2.3. 动物实验

实验动物为六周龄 B57CL/6J 小鼠购自国家动物实验中心(台湾, 台北), 实验地点为国立宜兰大学实验动物房, 经一周适应后, 以罗氏全活力 ACCU-CHEK Active 血糖仪测定实验动物之空腹血糖值。除正常组外, 其于实验动物腹腔以注射 Streptozotocin (STZ) 65 mg/kg, 一周后测定实验动物之空腹血糖值, 空腹血糖值高于 180 mg/dL 视为诱导为高血糖模型并将之分为控制组、灌食富铬灵芝米谷粉萃取液(此样品为含 50 ppm 灵芝粗三萜, 277 ppm 灵芝粗多醣, 0.036 ppm 三价铬), 另以正常小鼠为对照组, 每组三重。并于每周以血糖计(罗氏)测定空腹血糖值共四周, 并纪录各组摄食及采水变化。

2.4. 统计分析

实验结果三重, 并以平均值 ± 标准偏差表示, 所得之数据使用 Statistical Package For Social Science (SPSS 12.0)之统计软件包进行统计分析, 以单因子变异数分析比较各组间之差异, 并以 Duncan's test 进行事后检定分析, 显著水平为 α = 0.05 比较差异之显著性。

3. 结果与讨论

3.1. 富铬灵芝米谷粉之抗氧化性质分析

灵芝接种于 500 g 糙米基质并添加 0、100 及 200 ppm 铬于 30°C 进行 14 天固态发酵培养, 分析富铬灵芝发酵米谷粉之菌丝、有机铬及总铬含量的变化如表 1, 在菌丝含量的部份, 在 0 ppm 时为 3.81%, 100 ppm 为 3.4%, 200 ppm 为 3.22%, 可能是铬离子浓度过高会稍微抑制灵芝菌丝生长, 在有机铬及总铬含量的部份, 在 100 及 200 ppm 分别为有机铬 26.49 及 47.69 mg/kg, 总铬 60.33 及 65.22 mg/kg, 故有机铬含量随着无机铬的添加量增加会在富铬灵芝发酵米谷粉显著增加。

分析富铬灵芝发酵米谷粉之抗氧化成分变化, 表 2 在总多酚、粗多醣及粗三萜含量皆随着铬的含量增加而升高。在总多酚的部份, 糙米基质为 1.3 mg/g, 添加 200 ppm 铬灵芝发酵米为 2.93 mg/g, 表示灵芝发酵会提升总多酚含量为 1.63 mg/g。粗多醣的则是从糙米基质的 26.33% 上升到灵芝发酵米的 51.47%, 而粗三萜则是从糙米基质的 0.34% 上升到灵芝发酵米的 0.43%。在类黄酮含量变化的部份则是在铬含量 100 ppm 时为最高达 240.59 μg/g, 但是在 200 ppm 时则类黄酮含量下降为 220.53 μg/g。

表 3 为添加不同铬含量对富铬灵芝发酵糙米萃取物 20 mg/mL 之抗氧化活性影响, 在清除 DPPH 能力,

Table 1. Effect of chromium addition on biomass, organic chromium and total chromium of chromium enriched *Ganoderma lucidum* fermented brown rice products

表 1. 添加铬对富铬灵芝发酵糙米产物之生物质量、有机铬及总铬含量的影响

<i>Ganoderma lucidum</i> rice product	0 ppm Cr ³⁺	100 ppm Cr ³⁺	200 ppm Cr ³⁺
Biomass (%)	3.81 ± 0.11 ^a	3.4 ± 0.14 ^b	3.22 ± 0 ^c
Organic chromium (mg/L)	0	26.49 ± 5.45 ^b	47.69 ± 2.41 ^b
Total chromium (mg/L)	0	60.33 ± 1.27 ^b	65.22 ± 3.15 ^b

Values are expressed as mean ± SD (n = 3). ^{a-b}Means with different superscript letters in the same row are significantly different (p < 0.05).

Table 2. Effect of chromium addition on antioxidant of chromium enriched *Ganoderma lucidum* fermented brown rice products
表 2. 添加铬对富铬灵芝发酵糙米产物之抗氧化物质的影响

Antioxidant	Flavonoid ($\mu\text{g/g}$)	Total phenol (mg/g)	Polysaccharide (%)	Triterpenoid (%)
Brown rice substrate	198.97 \pm 4.13 ^c	1.30 \pm 0.05 ^d	26.33 \pm 0.06 ^c	0.34 \pm 0.01 ^c
0 ppm Cr ³⁺	234.97 \pm 0.76 ^b	1.96 \pm 0.05 ^c	43.53 \pm 0.25 ^b	0.38 \pm 0.01 ^b
100 ppm Cr ³⁺	240.59 \pm 3.24 ^b	2.17 \pm 0.11 ^b	42.47 \pm 0.16 ^b	0.39 \pm 0.02 ^b
200 ppm Cr ³⁺	220.53 \pm 3.16 ^a	2.93 \pm 0.05 ^a	51.47 \pm 0.76 ^a	0.43 \pm 0.02 ^a

Values are expressed as mean \pm SD (n = 3). ^{a-d}Means with different superscript letters in the same column are significantly different (p < 0.05).

Table 3. Effect of chromium addition on antioxidant activities of chromium enriched *Ganoderma lucidum* fermented brown rice products
表 3. 添加铬对富铬灵芝发酵糙米产物之抗氧化活性的影响

Antioxidant activities	DPPH ability (%)	Ferrous ions (%)	Reducing power (ABS at 700 nm)
Brown rice substrate	81.56 \pm 1.05 ^d	54.26 \pm 2.95 ^b	0.590 \pm 0.004 ^d
0 ppm Cr ³⁺	91.51 \pm 0.97 ^a	56.12 \pm 1.78 ^b	0.628 \pm 0.008 ^c
100 ppm Cr ³⁺	83.89 \pm 0.11 ^c	57.50 \pm 1.13 ^b	0.636 \pm 0.005 ^b
200 ppm Cr ³⁺	88.88 \pm 0.38 ^b	68.05 \pm 1.31 ^a	0.659 \pm 0.006 ^a

Values are expressed as mean \pm SD (n = 3). ^{a-d}Means with different superscript letters in the same column are significantly different (p < 0.05).

以 200 ppm 富铬灵芝发酵糙米为 88.88%略低于未富铬灵芝发酵糙米的 91.51%。

不过在螯合亚铁能力及还原力,则是随着铬含量增加而抗氧化能力增加,以 200 ppm 富铬灵芝发酵糙米的螯合亚铁能力 68.05%和还原力 0.65 最高,分别比纯糙米基质的 54.26%和 0.59 还要高出 11.93%和 3.96%。

分析成熟和幼小灵芝子实体及发酵菌丝和发酵上清液之热水和热碱萃取液的多糖呈现很好的抗氧化活性。20 mg/mL 的菌丝多糖还原力达 0.41~0.52,而其他灵芝萃取液的多糖还原力在 0.87~1.14。在 20 mg/mL 的四种灵芝萃取液的多糖,除发酵液之清除 DPPH 能力只有 74.9%,其他三种则高达 93.7%~100%。在 10 mg/mL 成熟、幼小灵芝子实体及发酵菌丝和发酵上清液之金属螯合剂分别为 93.9%~100%、97.6%~100%、85.1%~88.0%和 51.2%^[7]。

3.2. 以不同酒精浓度微波萃取富铬灵芝米谷粉之有效成分

由于分析灵芝萃取物中抗氧化活性成分确定分

为热水萃取的多糖和乙醇萃取物两种,故此次欲利用 0%、25%、50%、75%、95%的酒精来达到获取不同粗多醣和粗三萜比例的效果。在表 4 显示,富铬灵芝发酵米谷粉随着酒精浓度增加则萃取粗多醣的含量会呈现下降的趋势,以热水萃取可以得到粗多醣高达 37.17%,在 25%和 95%的酒精萃取物中粗多醣变为 19.75%和 2.79%。在总铬部分,随着酒精浓度增加,则总铬含量呈现下降的趋势,且在酒精含量 75%以上,则萃取不到总铬的含量,以热水萃取总铬含量为 0.004%,以 25%酒精萃取的总铬含量为 0.0026%。在粗三萜部分,结果显示在 25%到 95%酒精萃取下,其粗三萜含量约为 0.32%~0.36%并没有很大的差异,故基于考虑萃取有效成分:粗多醣、粗三萜及总铬含量,即选择以 25%酒精以获得富铬灵芝发酵米谷粉的粗多醣含量 19.75%,粗三萜 0.34%,总铬 0.0026%,以进行后续的 STZ 糖尿病小鼠降血糖研究。

3.3. 富铬灵芝固态发酵之降血糖

在萃取制备管喂糖尿病小鼠的萃取物时,以 25%酒精微波萃取,STZ 小鼠治疗组获得粗三萜 50 ppm、粗多醣 277 ppm 及总铬 0.0036 ppm。如图 1 及 2 所示,正常组在实验期间皆采水量约为 3 mL 及采食量约为 3 g 并无显著的变化。STZ 小鼠对照组则是在诱导后显著增加采水量约为 18 mL 及采食量约为 5 g,此符合糖尿病的症状。在 STZ 小鼠治疗组管喂富铬灵芝萃取物,分别在治疗二周及三周后的采食量和采水量分别有显著的下落现象,采食量部分在治疗四周后已降到 4 g,采水的部分则是降到 16 mL,故喂食富铬灵芝米谷粉萃取物能够改善糖尿病鼠的采食及采水量增多的现象。

在图 3 的空腹血糖的结果表示,正常组在实验期

Table 4. Active compounds in chromium enriched *Ganoderma lucidum* fermented brown rice product by microwave extracting with different ethanol concentration

表 4. 不同酒精浓度下微波萃取富铬灵芝米谷粉的有效成分含量

Ethanol (%)	Crude Polysaccharide (%)	Crude Triterpenoid (%)	Total Cr ³⁺ (%)
0	37.17 ± 0.83 ^a	0	0.004 ^a
25	19.75 ± 3.91 ^b	0.34 ± 0.006 ^a	0.002 ^b
50	5.85 ± 0.28 ^c	0.33 ± 0.002 ^b	0.0005 ^c
75	3.15 ± 0.37 ^d	0.36 ± 0.008 ^c	0
95	2.79 ± 0.25 ^e	0.32 ± 0.015 ^b	0

Values are expressed as mean ± SD (n = 3). ^{a-c}Means with different superscript letters in the same column are significantly different (p < 0.05).

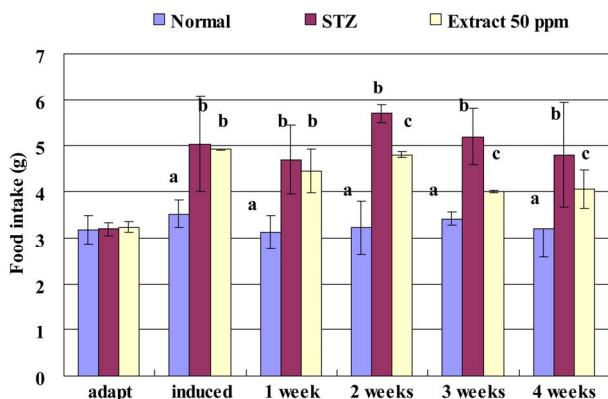


Figure 1. Food intake changes of the STZ induced and treated 28-days of mice (C57BL/6J). Data represent means ± SD. ^{a-c}Significant difference (p < 0.05), N = 3

图 1. 小鼠(C57BL/6J)于 STZ 诱导前后及处理 28 天后采食变化。数据以平均值 ± 标准偏差表示。^{a-c}表示有显著性差异(p < 0.05), N = 3

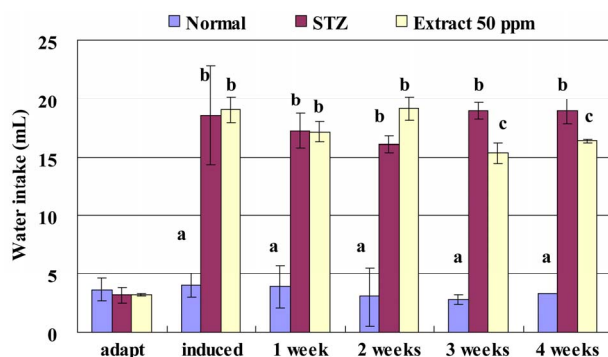


Figure 2. Water intake change in the STZ induced and treated 28-days of the mice (C57BL/6J) treated. Data represent means ± SD. ^{a-c}Significant difference (p < 0.05), N = 3

图 2. 小鼠(C57BL/6J)于 STZ 诱导前后及处理 28 天后采水变化。数据以平均值 ± 标准偏差表示。^{a-c}表示有显著性差异(p < 0.05), N = 3

间空腹血糖都维持在 68~80 mg/dL, 在 STZ 对照组在

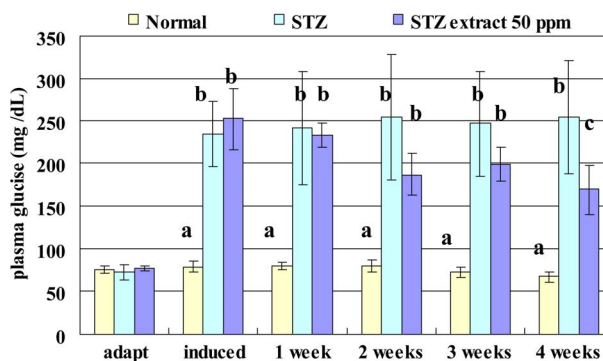


Figure 3. Fasting plasma glucose in the STZ induced and treated 28-days mice (C57BL/6J) treated. Data represent means ± SD.

^{a-c}Significant difference (p < 0.05), N = 3

图 3. 小鼠(C57BL/6J)于 STZ 诱导前后及处理 28 天后空腹血糖变化。数据以平均值±标准偏差表示。^{a-c}表示有显著性差异(p < 0.05), N = 3

诱导后空腹血糖值会升高到 234 mg/dL, 而在糖尿病管喂富铬灵芝米谷粉萃取物在第二周之空腹血糖值下降至 186 mg/dL, 跟对照组相比已有下降的趋势, 在治疗到第四周后, 空腹血糖值为 168 mg/dL, 跟对照组比较已有显著的差异。

Seto 等也用灵芝萃取物管喂糖尿病小鼠并在喂食的剂量为 0.3 以及 0.03 g/kg, 喂食到 7 天后就开始有降血糖的现象, 且剂量越高的血糖下降的效果越明显, 此推论出灵芝多糖可使糖尿病鼠血糖下降, 是抑制肝脏中的 PEPCK 基因的表达, 使肝脏的糖质新生作用增加及对外围组织对葡萄糖利用率下降^[19]。Li 等以萃取茯苓中的三萜类来管喂 STZ 小鼠, 发现以管喂剂量 50 ppm, 有显著降低糖尿病鼠的血糖值, 并增强糖尿病的鼠的胰岛素敏感性^[20]。

4. 结论

在添加三价铬于灵芝固态米基质中可增加粗多糖、总三萜及总多酚含量, 提高螯合亚铁能力及还原力的抗氧化活性。以 200 ppm 富铬灵芝米谷粉其粗多糖为 51.47%、总多酚含量为 2.93 mg/g、粗三萜为 0.43%、螯合亚铁能力为 68.05%及还原力为 0.659, 且有机铬的转换率达 74%。以 25%酒精进行 300 W 微波萃取 10 min, 可快速萃取获得有效成分, 粗多糖含量 19.75%, 粗三萜 0.34%, 总铬 0.0026%。以 25%酒精微波萃取物 0.1 mL 管喂 STZ 糖尿病小鼠, 四周后可以发现空腹血糖值和饮食量及饮水量会有显著较 STZ 小鼠的降低。

参考文献 (References)

- [1] 卢振, 陈金和, 王雨来 (2003) 灵芝的研究及应用进展. *时珍国医国药*, **9**, 577-581.
- [2] 陈淑德, 林秀芸, 郑永祥 (2009) 通湿气恒温固态发酵槽. 专利证号: M350554.
- [3] Halliwell, B., Murcia, M.A., Chirico, S. et al. (1995) Free radicals and antioxidants in food and *in vivo*: What they do and how they work. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **35**, 7-20.
- [4] Mustafa, A., Nilufer, O., Didem, D. et al. (2010) Hypoglycemic activity and antioxidant potential of some medicinal plants traditionally used in Turkey for diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, **4**, 384-389.
- [5] 洪亮, 杨开, 邵平等 (2009) 破壁灵芝孢子粉的制备及体外抗氧化活性研究. *浙江食用菌*, **4**, 55-58.
- [6] 王子庆, 沈盈贝, 林丽娟等 (2011) 灵芝乙醇萃取物抗氧化与抗致突变性评估. *大仁学报*, **39**, 17-34.
- [7] Tseng, Y.H., Yang, J.H. and Mau, J.L. (2008) Antioxidant properties of polysaccharides from *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry*, **107**, 732-738.
- [8] Pattar, G.R., Tackett, L., Liu, P. et al. (2006) Chromium picolinate positively influences the glucose transporter system via affecting cholesterol homeostasis in adipocytes cultured under hyperglycemic diabetic conditions. *Mutation Research*, **6**, 93-100.
- [9] Wang, J., Zhang, J., Wang, X. et al. (2009) A comparison study on microwave-assisted extraction of *Artemisia sphaerocephala* polysaccharides with conventional method: Molecule structure and antioxidant activities evaluation. *International Journal of Biological Macromolecules*, **45**, 483-492.
- [10] Toepfer, E.W., Mertz, W., Polansky, M.M. et al. (1977) Preparation of chromium-containing material of glucose tolerance factor activity from brewer yeast extracts and by synthesis. *Journal of Agricultural Chemistry*, **25**, 162-166.
- [11] Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K. et al. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, **28**, 350-356.
- [12] Chang, C.Y., Lue, M.Y. and Pan, T.M. (2005) Determination of adenosine, cordycepin and ergosterol contents in cultivated *Antridia camphorate* by HPLC method. *Journal of Food and Drug Analysis*, **13**, 388-342.
- [13] 孙凤, 蔡铮, 杨得坡等 (2010) 液相色谱-质谱联用定量分析威灵仙及其同属植物中4种三萜皂苷. *分析化学*, **9**, 1293-1298.
- [14] 潘书毓 (2002) 台湾产山药之酚类含量及抗氧化特性与加工影响. 私立中国文化大学生生活应用科学所, 台北.
- [15] Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T. et al. (2000) Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum Moench*) hulls and flour. *Journal of Ethnopharmacology*, **72**, 35-42.
- [16] Shimada, K., Fujikawa, K. and Nakamura, T. (1992) Anti-oxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **40**, 945-948.
- [17] Dinis, T.C., Madeira, P. and Almeida, L.M. (1994) Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-amino salicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **315**, 161-169.
- [18] Oyaizu, M. (1986) Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, **44**, 307-315.
- [19] Seto, S.W., Lam, T.Y., Tam, H.L. et al. (2009) Novel hypoglycemic effects of *Ganoderma lucidum* water-extract in obese/diabetic (+db/+db) mice. *Phytomedicine*, **16**, 426-436.
- [20] Li, T.H., Hou, C.C., Chang, L.T. et al. (2011) Anti-hyperglycemic properties of crude extract and triterpenes from *Poria cocos*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **24**, 1-8.