

γ 射线辐照结合球磨处理灵芝孢子粉破壁新工艺研究

齐 慧 陈 亮 武小芬 张 勇 邓 明 王克勤

(湖南省农业科学院 湖南省核农学与航天育种研究所 长沙 410125)

摘要 采用 γ 射线辐照与球磨技术相结合处理灵芝孢子粉, 期望提高其破壁率 and 多糖含量, 以吸收剂量、球磨时间为试验因子进行双因素试验, 并结合扫描电子显微镜、傅里叶红外光谱对不同处理条件下灵芝孢子粉的外观形态及分子结构进行表征。试验结果显示: 吸收剂量大于 4.892 kGy 或球磨时间大于 1 min 时, 两者均会对灵芝孢子粉破壁率和灵芝多糖含量产生显著影响, 其中球磨预处理的影响程度更大; 另外, 辐照与球磨两种处理方式间存在交互作用, 且交互作用对灵芝孢子粉的破壁率 and 多糖含量的影响具有显著性。试验最优工艺条件为吸收剂量 15.231 kGy, 结合球磨处理 5 min, 此时灵芝孢子粉破壁率达到 97.18%, 多糖含量达 13.230 mg/g; 灵芝孢子的完整结构几乎完全消失, 破碎十分彻底。在 $1\ 456\ \text{cm}^{-1}$ 出现小尖峰, $1\ 652\ \text{cm}^{-1}$ 处出现双峰, 完全区别于未破壁孢子。

关键词 γ 射线辐照, 球磨, 灵芝孢子粉, 破壁新工艺

中图分类号 TL99

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2020.rj.38.050404

Study on a new technique for the treatment of *Ganoderma lucidum* spore powders using ball milling and γ ray irradiation

QI Hui CHEN Liang WU Xiaofen ZHANG Yong DENG Ming WANG Keqin

(Hunan Institute of Nuclear Agricultural Science and Space Mutation Breeding,

Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, China)

ABSTRACT To improve the wall-broken rate and polysaccharide content of *Ganoderma lucidum* spore powders, a combined treatment of γ ray irradiation and ball milling technique was used. Two-factor tests were conducted using the absorbed dose and the ball milling time as the test factors. The morphology and molecular structure of the *Ganoderma lucidum* spores were characterized using scanning electron microscope and Fourier transform infrared spectrometer tests under different treatment conditions. The results showed that when the absorbed dose was higher than 4.892 kGy, or the ball milling time was higher than 1 minute, the absorbed dose and ball milling time had significant effects on the wall-broken rate and the polysaccharide content of the *Ganoderma lucidum* spore powders, with the ball milling time having a greater effect. In addition, there was an interaction between the two pretreatment methods, which significantly affected the wall-broken rates and the polysaccharide contents of the *Ganoderma*

基金资助: 湖南农业科技创新基金项目 (2019JG03) 资助

第一作者: 齐慧, 女, 1988 年 12 月出生, 2013 年获中国农业科学院农产品质量与食物安全专业农学硕士学位, 现从事辐照技术在农业上的应用研究, 助理研究员

通信作者: 王克勤, 研究员, E-mail: wkq6412@163.com

收稿日期: 初稿 2020-04-26; 修回 2020-06-04

Supported by Hunan Agricultural Science and Technology Innovation Fund Project (2019JG03)

First author: QI Hui (female) was born in December 1988, and obtained her master's degree in quality of agricultural products and food safety from Chinese Academy of Agricultural Sciences in 2013. She is an assistant researcher engaging in the application of irradiation technology in agricultural

Corresponding author: WANG Keqin, professor, E-mail: wkq6412@163.com

Received 26 April 2020; accepted 04 June 2020

lucidum spore powders. Furthermore, the optimal wall-broken rate of 97.18% and polysaccharide mass fraction of 13.230 mg/g were achieved when the *Ganoderma lucidum* spore powders were irradiated at 15.231 kGy with a ball milling time of 5 min. In addition, under these treatment conditions, the complete oval structure of the *Ganoderma lucidum* spores was almost completely broken. A small spike was observed at $1\,456\text{ cm}^{-1}$, and a double peak was observed at $1\,652\text{ cm}^{-1}$, which were completely different from the unbroken wall spores.

KEYWORDS γ ray irradiation, Ball milling, *Ganoderma lucidum* spore powder, New technology of wall-broken
CLC TL99

灵芝 (*Ganoderma lucidum*) 为多孔菌科灵芝属药食两用真菌。灵芝孢子是灵芝子实体发育成熟后释放出来的种子, 是灵芝的生殖细胞。灵芝孢子中含有丰富的多糖、萜类、有机锗等多种活性成分, 常被作为保健食品或药品^[1-2]用于延缓衰老, 调节免疫甚至抗辐射^[3-4]。灵芝孢子极其细微, 呈卵形双壁结构, 最外层为几丁质纤维素, 能够阻碍人体消化吸收, 因此需要对灵芝孢子进行破壁处理, 促进活性功能成分的释放, 提升其食用及药用价值^[5-7]。

破壁效果直接影响破壁率, 也决定了人体对灵芝孢子内有效成分的吸收率, 因此选择好的破壁方式显得尤为重要。传统采用的破壁方法主要有物理法、机械法、生物法、化学法、综合法等。(1) 物理法包括低温、冷冻脆化、超声、微波^[8-9]等, 此类方法的破坏能力有限, 无法满足破壁率高的要求; 另外 CO_2 超临界破壁虽然破壁率高, 但是灵芝孢子粉的有效成分会因瞬间高压释放到大气中而丧失^[10-11]。(2) 机械法包括高能纳米冲击磨法、超高压超级临界流体撞击流法、高压脉冲电场处理技术法、机械研磨法、均质法等, 诸多机械方法虽能大大提高破壁率, 但由于对设备要求高, 目前大多停留在实验室阶段, 难以用于大规模生产^[12]。相比较而言, 机械研磨法、均质法较为简便易行^[13]。(3) 生物法多采用酶法处理, 此法具有针对性强, 效果优越等特点, 但是作用时间较长, 去除产品中加入的酶较困难, 加之酶的价格昂贵, 造成处理成本高, 因此不适合大规模生产^[14]。(4) 化学法采用化学试剂浸泡处理。由于具有化学成分掺入、残留物质处理不完全且耗时耗力等缺点, 较少应用于生产^[15-16]。(5) 综合法主要包括机械法与物理法联合、物理法与生物法联合、机械法与化学法联合3大类, 综合法可以克服单一破壁方法的缺点, 但工序较为繁琐^[17-18]。因此, 亟需探求新的、低能高效、环保的破壁方法。

辐照能破坏纤维素的内部结构, 达到降解目

的^[19-20]。辐照具有杀菌效果, 且当吸收剂量超过一定范围时, 会影响灵芝孢子粉的灵芝多糖含量^[21]。球磨处理属于机械粉碎的一种, 常用来作为制备纳米级材料的一种手段, 具有粉碎能力强劲、产物粒径均匀等优点^[22-23]。到目前为止, 关于 γ 射线辐照结合球磨处理灵芝孢子粉的相关报道较少, γ 射线辐照结合球磨处理对灵芝孢子粉破壁率及灵芝多糖含量是否有影响需要进一步探讨。本文将以破壁率和灵芝多糖含量为指标, 结合灵芝孢子的微观结构, 对比 γ 射线辐照处理、球磨处理、 γ 射线辐照联合球磨处理对灵芝孢子粉破壁的效果, 旨在为灵芝孢子粉破壁利用提供技术支撑和理论基础。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

灵芝孢子粉由湖南省宜章县福城生物科技开发有限公司提供, 水分含量约12%。

无水乙醇、苯酚、七水合硫酸锌、葡萄糖(均为分析纯)、石油醚、冰乙酸、三氯甲烷、可溶性淀粉、无水硫酸钠: 国药集团化学试剂有限公司; 浓硫酸(分析纯): 成都市科隆化学用品有限公司; 硫代硫酸钠标准溶液(0.01 mol/L): 深圳市博林达科技有限公司; 碘化钾: 广东光华科技股份有限公司。

1.2 仪器与设备

^{60}Co γ 辐照装置: 湖南省核农学与航天育种研究所; DZ400/2D真空包装机: 温州市鹿城区黄龙华机械厂; Eco-S15纯水机: 上海和泰仪器有限公司; KQ5200DE型数控超声清洗器: 昆山市超声仪器有限公司; XQM-4球磨粉碎机; & KL-1空冷机: 长沙天创粉末技术有限公司; 真空干燥器300G型: 日本Asone; SHB-III循环水式多用真空泵: 郑州长城科工贸有限公司; 万能高能粉碎机

DE-100g: 浙江红景天工贸有限公司; XSP-10CA 显微镜: 上海佑科仪器仪表有限公司; Nicolet iS5 傅里叶变换红外 (FTIR) 光谱仪: 美国赛默飞世尔科技公司; JSM-6380LV 扫描电子显微镜 (SEM) 光谱仪: 日本电子株式会社; BlueStar A 紫外分光光度计: 北京莱伯泰科仪器股份有限公司; TG16-WS 离心机: 湖南迈克实验仪器科技有限公司; XH-C 涡旋混合器: 江苏金怡仪器科技有限公司; GZX-6246 MBE 电热恒温鼓风干燥箱: 上海博讯实业有限公司; FA 2004 C 电子天平: 上海佑科仪器仪表有限公司; DL-1 万用电炉: 北京市永光明医疗仪器有限公司; RE-2000B 旋转蒸发器: 上海亚荣生化仪器厂。

1.3 处理及测定方法

1.3.1 灵芝孢子粉 γ 射线辐照处理

灵芝孢子粉装入包装袋内, 真空包装机抽真空并封口后, 于室温下用 ^{60}Co γ 射线进行动态辐照处理, 剂量率 1.25 kGy/h, 吸收剂量设定为 0 kGy、5 kGy、10 kGy、15 kGy、20 kGy, 实际吸收剂量分别为 0 kGy、4.892 kGy、9.957 kGy、15.231 kGy、19.913 kGy (采用重铬酸银剂量计跟踪检测), 备用。

1.3.2 灵芝孢子粉球磨处理

取辐照后的灵芝孢子粉 10 g 置于球磨粉碎机中 (每次粉碎前, 将球磨罐体内的残留物、钢珠等清洗干净, 60 °C 烘干后再使用), 空冷机设置温度 10 °C, 待达到设定温度, 启动球磨仪开关, 待达到设定转速时开始计时。取球磨处理 1 min、2 min、5 min、10 min 的样品, 备用。

1.3.3 灵芝多糖提取及测定

采用苯酚-硫酸法测定灵芝多糖含量。准确称取经不同处理方式处理后的灵芝孢子粉 (经不同吸收剂量的辐照处理结合不同时间的球磨处理, 其中吸收剂量分别为 0 kGy、4.892 kGy、9.957 kGy、15.231 kGy、19.913 kGy, 球磨处理时间分别为 1 min、2 min、5 min、10 min, 共 25 种组合处理方式, 共 25 个样品) 1.0 g 置于 50 mL 容量瓶中, 加入 12 mL 双重蒸馏水, 浸泡 24 h, 超声波加热提取 60 min, 取出, 放冷, 用双重蒸馏水定容至 50 mL, 摇匀后过滤, 弃去初滤液, 吸取滤液 10 mL, 加入 40 mL 无水乙醇, 混匀, 3 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 残渣用 80% 乙醇洗涤, 离心 (重复此过程 2 次), 剩余残渣用 2 mol/L 硫酸 10 mL 溶解后加水定

容至 25 mL。

每组 3 次平行试验, 吸取 1 mL 上述溶液于 20 mL 比色管中, 加水至 2 mL, 加入 5% 苯酚溶液 1 mL, 浓硫酸 10 mL, 沸水浴放置 2 min 冷却至室温, 在 489 nm 波长处测定吸光度值。依据标准曲线计算多糖含量 (葡萄糖对照)。

1.3.4 灵芝孢子粉破壁率测定^[24]

参照标准《NY/T 1677—2008 破壁灵芝孢子粉破壁率的测定》。孢子粉预处理: 孢子粉置于 0.15 mm 筛上, 100 mL 超纯水冲洗, 500 mL 锥形瓶收集孢子粉悬浮液。定性滤纸过滤, 滤渣 60 °C 烘干至恒重, 备用。

孢子计数及标准曲线绘制: 分别精确称取 0.010 g、0.020 g、0.030 g、0.040 g、0.050 g (精确至 0.001 g) 于 25 mL 容量瓶中, 加入孢子粉悬浮液 ($v_{70\text{g/L 磷酸锌溶液}} : v_{\text{无水乙醇}} = 10 : 1$ 现配现用) 10 mL, 涡旋振荡, 使结块孢子粉散开。再超声处理 1 h, 每隔 15 min 摇匀一次, 再用悬浮液定容至 25 mL。再采用血球计数板 (25 中格 $\times$ 16 小格) 在光学显微镜 400 倍放大率下依次对该系列悬浮液中的灵芝孢子进行计数, 按对角线法取 4 个角和最中间共 5 个中格为 1 个计数单位, 每个样品观察计数时应去掉离群较大的值, 观察计数不少于 6 次, 然后取其平均值。最后以灵芝孢子粉称样量为横坐标, 以每个计数单位孢子平均数为纵坐标, 用 Excel 2010 回归做标准曲线。

试验样品准确称量 0.040 g, 按以上步骤进行孢子粉计数试验, 每组试验 3 个平行, 结果取平均值。

1.3.5 过氧化值测定

参照标准《GB 5009.227—2016 食品安全国家标准 食品中过氧化值的测定》。

孢子粉预处理: 孢子粉样品置于广口瓶中, 加入 2~3 倍体积的石油醚, 摇匀, 充分混合后静置浸提 12 h 以上, 经装有无水硫酸钠的漏斗过滤, 取滤液, 在低于 40 °C 的水浴中, 用旋转蒸发器加压蒸干石油醚, 残留物即为待测试样。

试样的测定: 应避免在阳光直射下进行试样测定。称取待测试样 2.000 g (精确至 0.001 g) 置于 250 mL 碘量瓶中, 加入 30 mL 三氯甲烷-冰乙酸混合液, 轻轻振摇使试样完全溶解。准确加入 1 mL 饱和碘化钾溶液, 塞紧瓶塞, 并轻轻振摇 0.5 min, 在暗处放置 3 min。取出, 加入 100 mL 水, 摇匀后立即用硫代硫酸钠标准溶液滴定析出的碘, 滴定

至淡黄色,加1 mL 淀粉指示剂,继续滴定并强烈振摇至蓝色消失为终点。同时进行空白试验。

1.3.6 SEM 分析测定

将经过不同处理(0 kGy、15.231 kGy 辐照处理;0 kGy、15.231 kGy 辐照处理结合5 min 球磨处理)后的灵芝孢子粉于65 °C 下烘干,将干燥后的样品采用导电的双面胶带粘在样品台上,然后将样品放于真空罩内,在真空状态下喷镀一层金属导电膜后进行扫描电子显微镜观察,检测电压为20 kV。

1.3.7 FTIR 光谱分析

将不同处理后(0 kGy、15.231 kGy 辐照处理;0 kGy、15.231 kGy 辐照处理结合5 min 球磨处理)的灵芝孢子粉于65 °C 下烘干,取适量粉末样品与KBr 研磨均匀后压片,在4 000~500 cm^{-1} 区间进行红外扫描分析。

1.3.8 数据分析

数据统计分析用SAS 和Microsoft Excel 2010,多图线绘制用Origin 8.0(图2)软件。

2 结果与分析

2.1 球磨结合 γ 射线辐照对灵芝孢子粉破壁率的影响

表1列出了 γ 射线辐照不同剂量结合不同时间的球磨处理后的灵芝孢子粉的破壁率。由表1可

知,单一辐照处理条件下,吸收剂量在0~19.913 kGy 范围内,灵芝孢子粉破壁率随着吸收剂量的增大逐渐增大,但增长速率不明显,吸收剂量19.913 kGy 孢子粉,其破壁率较吸收剂量4.892 kGy 的孢子粉增加40.64%。单一球磨处理条件下,球磨时间0~10 min 范围内,随着球磨时间的增加,灵芝孢子粉破壁率增加明显,10 min 球磨处理后的灵芝孢子粉其破壁率较1 min 球磨处理的孢子粉增加982.18%。当吸收剂量为15.231 kGy,球磨处理5 min 后的灵芝孢子粉,其破壁率达到97.18%,较单一吸收剂量15.231 kGy 孢子粉的破壁率增长1 365.84%,较单一球磨处理5 min 孢子粉的破壁率增长96.97%,说明辐照处理与球磨处理对灵芝孢子粉破壁率具有协同作用,两者协同处理破壁率有较大的提升,原因可能是辐照能量作用于孢子粉外壁几丁质纤维素结构,由于能量限制无法直接造成破壁,但是能量的聚集使得后续球磨破壁的效果更大程度地显现,使得破壁率显著性提升。继续增大吸收剂量或球磨时间,均对灵芝孢子粉破壁率的影响不显著。有研究表明辐照能破坏物质的内部结构,使得粉碎能耗大幅度降低^[25]。由表1可知,在达到相同破壁率的情况下,选择辐照结合球磨处理,可以减少球磨时间,如球磨处理10 min,破壁率达82.57%,而吸收剂量9.957 kGy 结合球磨5 min,破壁率即可达到81.68%。

表1 γ 射线辐照结合球磨处理对灵芝孢子粉破壁率的影响
Table 1 Effects of γ ray irradiation collaborated with ball milling on the wall-broken rate of *Ganoderma lucidum* spore powders

级别		球磨时间 Ball milling time / min				
Levers		0	1	2	5	10
吸收剂量	0	0.000±0.000 ^e	7.630±2.267 ^c	38.670±0.272 ^d	49.340±2.730 ^d	82.570±9.904 ^{ab}
Absorbed dose / kGy	4.892	4.643±1.124 ^b	9.195±0.388 ^c	47.050±3.193 ^c	66.395±1.806 ^c	83.325±4.471 ^{ab}
	9.957	4.507±0.361 ^b	12.700±0.523 ^b	46.260±2.170 ^c	81.680±3.394 ^b	87.330±4.055 ^b
	15.231	6.630±0.406 ^a	16.500±0.352 ^a	73.140±2.162 ^b	97.185±0.809 ^a	98.840±0.373 ^a
	19.913	6.530±1.835 ^a	15.780±0.422 ^a	77.825±3.084 ^a	96.825±3.681 ^a	99.337±1.148 ^a

注:同列不同小写字母表示不同吸收剂量下差异显著($p<0.05$)。下同。

Note: different lowercase letters in the same column mean significant difference at 0.05 level under different irradiation dose. The same follow.

表2为灵芝孢子粉破壁率的双因素方差试验结果,通过查询 F -分布表, $F_{0.01}(4, 50)=3.720$, $F_{0.01}(16, 50)=2.380$,表明吸收剂量、球磨时间

均对灵芝孢子粉破壁率有极显著性影响,且两者存在交互作用,交互作用对灵芝孢子粉破壁率也有极显著性影响,其中球磨的贡献率最大。

表2 灵芝孢子粉破壁率双因素方差分析表
Table 2 Two factors (absorbed dose and the time of milling) variance analysis of the wall-broken rates of *Ganoderma lucidum* spore powders

方差来源	方差和	自由度	F 值	显著性差异
Source of variation	Sum of square of deviation	df	F values	Statistical significance
吸收剂量 Absorbed dose	6 192.774	4	181.877	**
球磨时间 Milling time	88 443.370	4	2 597.517	**
交互作用 Interaction effect	3 564.616	16	26.184	**
误差 Error	425.615	50	-	-

注: **表示该因素变化引起差异极显著($p < 0.01$)。下同。

Note: ** mean that the variation of this factor causes significant difference at 0.01 level. The same as follow.

2.2 球磨结合 γ 射线辐照对灵芝孢子粉灵芝多糖含量的影响

表3列出了 γ 射线辐照不同剂量结合不同时间的球磨处理后的灵芝孢子粉经提取、测定所得的多糖含量。陈志军等^[21]研究发现 γ 射线辐照处理对灵芝多糖含量的增加有一定的促进作用,且剂量超过一定范围时,会对多糖含量产生显著性影响,与本试验结果一致。由表3可知,单一辐照处理条件下,当吸收剂量0~19.913 kGy范围内,随着吸收剂量的增加,孢子粉灵芝多糖含量有一定增加,吸收剂量为19.913 kGy孢子粉灵芝多糖含量较未辐照样品增加19.32%。原因可能是辐照对灵芝孢子粉的外壁几丁质纤维素结构有一定的破坏作用,使得孢内物质更好地释放出来,从而灵芝多糖含量有所增加。在单一球磨处理条件下,

当球磨时间在0~5 min范围内,随着球磨时间的增加,灵芝多糖的含量有明显地提高,当球磨时间进一步增加,对多糖含量的影响不显著,且球磨时间过长,造成腔体发热,影响灵芝孢子粉的色泽和品质。原因可能是随着球磨时间的增加,球磨作用充分,灵芝孢子粉破壁率提升,使得更多的孢内物质释放,从而多糖含量增加。当辐照结合球磨处理灵芝孢子粉时,灵芝多糖含量变化显著。试验范围内,灵芝多糖的最大值在灵芝孢子粉吸收剂量15.231 kGy结合球磨处理5 min后得到,其多糖含量达到13.230 mg/g,较未进行任何处理的灵芝孢子粉,多糖含量增加了139.50%;较单一辐照处理且吸收剂量为15.231 kGy孢子粉,多糖含量增加了103.88%;较单一球磨处理5 min孢子粉,多糖含量增加了53.62%,说明辐照与球磨具有协同效应,大大提升了灵芝多糖的含量。

表3 γ 射线辐照结合球磨处理对灵芝孢子粉灵芝多糖的影响
Table 3 Effects of γ ray irradiation collaborated with ball milling on the polysaccharide contents of *Ganoderma lucidum* spore powders

级别		球磨时间 Ball milling time / min					(mg/g)
Levers		0	1	2	5	10	
吸收剂量	0	5.524±0.313 ^c	6.589±0.056 ^c	7.202±0.051 ^d	8.612±0.118 ^c	8.633±0.127 ^d	
Absorbed dose / kGy	4.892	5.971±0.242 ^b	6.829±0.131 ^c	7.878±0.138 ^c	8.885±0.012 ^c	8.853±0.106 ^d	
	9.957	6.070±0.284 ^b	8.304±0.480 ^b	8.737±0.130 ^b	10.000±0.164 ^b	10.096±0.133 ^c	
	15.231	6.489±0.069 ^a	9.830±0.025 ^a	10.102±0.132 ^a	13.230±0.282 ^a	12.687±0.393 ^a	
	19.913	6.591±0.143 ^a	9.485±0.217 ^a	10.175±0.249 ^a	12.915±0.821 ^a	12.214±0.157 ^a	

表4列出了 γ 射线辐照不同剂量结合不同时间的球磨处理后的灵芝孢子粉中的过氧化值含量。在0~19.913 kGy范围内 γ 射线辐照处理,对灵芝孢子粉过氧化值的影响不大,均小于0.01%。在0~10 min范围内的球磨处理,随着球磨时间的增加,对灵芝孢子粉过氧化值变化显著,10 min球磨处理样品较1 min球磨处理样品,过氧化值增加了24

倍。原因可能是球磨过程中产生热量,导致孢子油等物质氧化,过氧化值增加。辐照协同球磨处理会加速油脂氧化,超过一定量后会形成蛤味,影响产品的品质^[26]。试验过程中,连续球磨处理10 min的孢子粉,过氧化值较高,有一定的蛤味,且随着辐照剂量的增大而加重。

表4 γ 射线辐照结合球磨处理对灵芝孢子粉过氧化值的影响Table 4 Effects of γ ray irradiation collaborated with ball milling on the peroxide value of ganoderma spore powders (%)

级别		球磨时间 Ball milling time / min				
Lever		0	1	2	5	10
吸收剂量	0	<0.010	0.010±0.000 ^c	0.053±0.001 ^b	0.094±0.003 ^c	0.243±0.003 ^d
Absorbed dose / kGy	4.892	<0.010	0.010±0.001 ^c	0.052±0.003 ^b	0.114±0.004 ^d	0.264±0.001 ^c
	9.957	<0.010	0.021±0.000 ^b	0.062±0.002 ^a	0.120±0.004 ^c	0.334±0.013 ^b
	15.231	<0.010	0.031±0.001 ^a	0.062±0.014 ^a	0.154±0.003 ^b	0.351±0.011 ^a
	19.913	<0.010	0.032±0.000 ^a	0.062±0.004 ^a	0.162±0.001 ^a	0.352±0.010 ^a

表5为影响灵芝孢子粉多糖含量的双因素方差试验结果,通过查询 F -分布表, $F_{0.05}(4, 50) = 2.250$ 、 $F_{0.05}(16, 50) = 1.850$ 、 $F_{0.01}(4, 50) = 3.720$ 、 $F_{0.01}(16, 50) = 2.380$,表明吸收剂量、球

磨时间均对灵芝孢子粉破壁率有极显著性影响,且两者存在交互左右,交互作用对灵芝孢子粉破壁率也有极显著性影响,其中球磨的贡献率最大。

表5 灵芝孢子粉多糖含量双因素方差分析表

Table 5 Two factors (irradiation doses and the time of milling) variance analysis of the polysaccharide contents of *Ganoderma lucidum* spore powders

方差来源	方差和	自由度	F 值	显著性差异
Source of variation	Sum of square of deviation	df	F value	Statistical significance
吸收剂量 Absorbed dose	125.949	4	459.667	**
球磨时间 Milling time	210.946	4	769.876	**
交互作用 Interaction effect	24.213	16	22.092	**
误差 Error	3.424	50	—	—

2.3 球磨结合 γ 射线辐照对灵芝孢子粉外观形态的影响

由图1(a),未经过任何处理的灵芝孢子,其孢子外壁保存完好,呈椭圆形卵状结构,且表面有诸多均匀分布的小孔,有个别破碎现象,这可

能是在灵芝孢子粉收集过程中造成的自然现象。对比图1(a)和(b),球磨处理5 min后,许多灵芝孢子的完整结构被破坏,能较清晰地看到内孢壁和外孢壁,表层小孔多被覆盖,出现较多的碎片结构,说明球磨处理能提升灵芝孢子粉破壁率,破坏孢子孢壁结构。

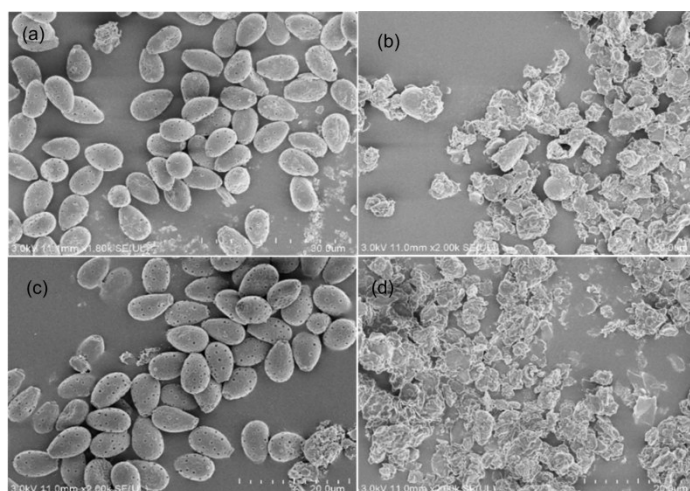


图1 不同处理条件下灵芝孢子粉扫描电镜图谱:(a) 0 kGy; (b) 0 kGy, 球磨5 min; (c) 15.231 kGy; (d) 15.231 kGy, 球磨5 min

Fig.1 Pictures of *Ganoderma lucidum* spore powders by electron microscope with four different treatments:

(a) 0 kGy; (b) 0 kGy, ball milling for 5 min; (c) 15.231 kGy; (d) 15.231 kGy, ball milling for 5 min

对比图1(a)和(c), 15.231 kGy辐照处理灵芝孢子较未处理样品, 扫描电镜图显示结构相差并不大, 孢子粉结构均较完整, 呈椭圆形卵状结构, 顶端呈断面结构, 且孢子表面有许多小孔结构^[27]。对比图1(c)和(d), 当 γ 射线辐照结合球磨处理灵芝孢子粉, 孢子的完整结构几乎完全消失, 碎片较单一球磨处理的样品也更多更细, 说明破碎更彻底。扫描电镜试验结果进一步证明辐照处理与球磨处理之间具有协同效应。

2.4 球磨结合辐照 γ 射线处理对灵芝孢子分子结构的影响

不同处理条件下灵芝孢子粉红外光谱见图2。

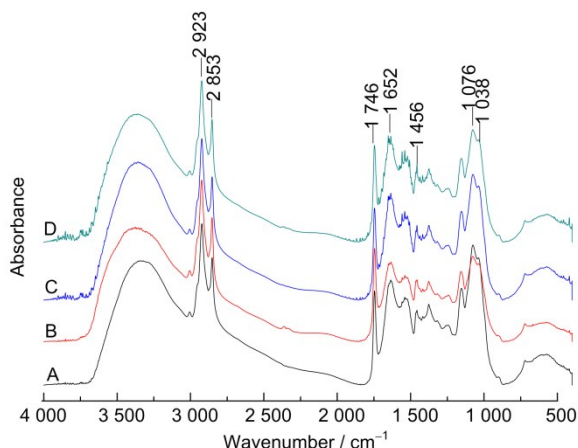


图2 不同处理条件下灵芝孢子粉红外光谱图: A, 0 kGy; B, 15.231 kGy; C, 0 kGy, 球磨 5 min; D, 15.231 kGy, 球磨 5 min
Fig.2 FTIR spectra of *Ganoderma lucidum* spore powders with four different treatments: A, 0 kGy; B, 15.231 kGy; C, 0 kGy, ball milling for 5 min; D, 15.231 kGy, ball milling for 5 min

对比图2中线条A和D, 说明破壁与未破壁灵芝孢子在峰型、峰数、峰位有较高程度的一致性。2 923 cm^{-1} 、2 853 cm^{-1} 处出现的较强尖峰, 是甲基- CH_3 和亚甲基- CH_2 的C-H伸缩振动吸收峰^[27]; 1 746 cm^{-1} 附近的有强吸收峰, 是脂肪酸中C=O伸缩振动, 峰强度越高说明脂肪酸含量高, 破壁率高的样品, 此处峰强度高, 说明破壁使得更多的孢子油释放; 1 652 cm^{-1} 为糖醛酸的伸缩振动吸收峰^[28], 峰强度越高, 说明多糖含量高, 与2.2节研究结果相一致; 1 076 cm^{-1} 、1 038 cm^{-1} 处是糖环内酯C-O-C强极性吸收峰, 破壁率高的样品, 此处峰强度相对高。破壁率较高的灵芝孢子样品在1 456 cm^{-1} 处出现了小尖峰, 在1 652 cm^{-1} 处, 出现双峰, 与刘有菊等^[29]研究结果一致, 破壁率不同的样品, 在此处有较明显差异, 说明破壁前后化学成分上

有差异。因此, 可以尝试通过红外光谱的测定结果, 科学地快速以甄别市场上良莠不齐的破壁孢子粉产品^[30-31]。

表6为不同处理条件下部分峰强度比率。

表6 不同处理条件下部分峰强度比率
Table 6 Mean Ratios of absorption peak intensity at four different treatments

比率	4种不同处理后样品			
Ratios	Samples at four different pretreatments			
	0 kGy	15.231 kGy	5 min	15.231 kGy + 5 min
A_{1635}/A_{1746}	0.865	1.093	1.097	1.115
A_{1076}/A_{1635}	1.059	1.069	1.175	1.333
A_{1076}/A_{1746}	0.915	1.162	1.367	1.486

由表6, 4种不同处理在 A_{1635}/A_{1746} 、 A_{1076}/A_{1635} 、 A_{1076}/A_{1746} 的峰强度比率上具有一定的规律性。对比在吸收剂量0 kGy、吸收剂量15.231 kGy、球磨5 min、吸收剂量15.231 kGy辐照结合5 min球磨处理条件下的 A_{1635}/A_{1746} 、 A_{1076}/A_{1635} 、 A_{1076}/A_{1746} 的峰强度比率, 此几处峰强度比率逐渐增大; 而此几种条件下, 灵芝孢子粉的破壁率和多糖含量也是逐渐增大的趋势; 此结果与Chen等^[30]研究一致。因此可以从 A_{1635}/A_{1746} 、 A_{1076}/A_{1635} 、 A_{1076}/A_{1746} 的峰强度比率较直观地了解灵芝孢子粉的破壁情况。

3 结论

在一定吸收剂量范围内的辐照处理和一定球磨时间范围内球磨处理对灵芝孢子粉的破壁率和多糖含量均有显著性的影响, 其中球磨处理的影响程度更大; 且两种处理方式间存在交互作用, 且交互作用对灵芝孢子粉的破壁率和多糖含量的影响均具有显著性, 因此两种处理方式协同处理灵芝孢子粉, 既能满足破壁率的要求, 提高灵芝多糖含量, 又能很好地维持灵芝孢子粉的品质。试验最佳工艺参数为: 吸收剂量15.231 kGy, 结合球磨处理5 min, 灵芝孢子粉破壁率达到97.18%; 多糖含量达到13.230 mg/g, 较未经处理的灵芝孢子粉样品增加了139.50%。另外扫描电镜结果显示, 灵芝孢子的完整结构几乎完全消失, 破碎十分彻底; 红外光谱结果显示在1 456 cm^{-1} 出现小尖峰, 1 652 cm^{-1} 处出现双峰, 完全区别于未破壁孢子, 进一步验证了辐照处理与球磨处理的协同效应。

参考文献

- Wang G H, Li X, Cao W H, *et al.* A retrospective study of *Ganoderma lucidum* spore powder for patients with epilepsy[J]. *Medicine*, 2018, **97**(23): e10941. DOI: 10.1097/md.00000000000010941.
- 林志彬, 王鹏云. 灵芝孢子及其活性成分的药理研究[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2006, **38**(5): 541-547. DOI: 10.3321/j.issn:1671-167X.2006.05.024.
LIN Zhibin, WANG Pengyun. The pharmacological study of *Ganoderma* spores and their active components[J]. *Journal of Peking University (Health Sciences)*, 2006, **38**(5): 541-547. DOI: 10.3321/j.issn: 1671-167X. 2006.0 5.024.
- Zhu L F, Yao Y F, Ahmad Z, *et al.* Development of *Ganoderma lucidum* spore powder based proteoglycan and its application in hyperglycemic, antitumor and antioxidant function[J]. *Process Biochemistry*, 2019, **84**: 103-111. DOI: 10.1016/j.procbio.2019.05.025.
- Kim K C, Kim I G. *Ganoderma lucidum* extract protects DNA from strand breakage caused by hydroxyl radical and UV irradiation[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 1999, **4**(3): 273-277. DOI: 10.3892/ijmm.4.3.273.
- 王方, 麻红太, 胡德, 等. 灵芝孢子粉破壁前后质量对比研究[J]. *特产研究*, 2020, **1**: 17-53. DOI: 10.16720/j.cnki.tcyj.2020.01.010.
WANG Fang, MA Hongtai, HU De, *et al.* Study on quality comparison before and after the breakage of *Ganoderma lucidum* spore powder[J]. *Special Wild Economic Animal and Plant Research*, 2020, **1**: 17-53. DOI: 10.16720/j.cnki.tcyj.2020.01.010.
- Liu X, Yuan J P, Chung C K, *et al.* Antitumor activity of the sporoderm-broken germinating spores of *Ganoderma lucidum*[J]. *Cancer Letters*, 2002, **182**(2): 155-161. DOI: 10.1016/s0304-3835(02)00080-0.
- 杨杭, 刘凤, 练心洁, 等. 灵芝孢子粉破壁方法及其药理作用研究进展[J]. *成都大学学报(自然科学版)*, 2017, **4**: 364-368. DOI: 10.3969/j.issn.1004-5422.2017.04.008.
YANG Hang, LIU Feng, LIAN Xinjie, *et al.* Research progress on wall-broken methods of *Ganoderma lucidum* spores and its pharmacological effects[J]. *Journal of Chengdu university (Natural science edition)*, 2017, **4**: 364-368. DOI: 10.3969/j.issn.1004-5422.2017.04.008.
- Alzorqi I, Singh A, Manickam S, *et al.* Optimization of ultrasound assisted extraction (UAE) of β -D-glucan polysaccharides from *Ganoderma lucidum* for prospective scale-up[J]. *Resource-Efficient Technologies*, 2017, **3**(1): 46-54. DOI: 10.1016/j.reffit.2016.12.006.
- 吴映明, 陈爱葵, 彭锦红, 等. 超声波-超低温冻融处理对灵芝孢子粉多糖提取的影响[J]. *中国食用菌*, 2008, **27**(3): 34-35. DOI: 10.3969/j.issn.1003-8310.2008.03.012.
WU Yingming, CHEN Aikui, PENG Jinhong, *et al.* Effect on the distill of polysaccharides in *Ganoderma lucidum* spore powder treated with ultrasonic and thawing and freezing test of ultra-low temperature[J]. *Edible Fungi of China*, 2008, **27**(3): 34-35. DOI: 10.3969/j.issn.1003-8310.2008.03.012.
- Li L, Guo H J, Zhu L Y, *et al.* A supercritical-CO₂ extract of *Ganoderma lucidum* spores inhibits cholangiocarcinoma cell migration by reversing the epithelial-mesenchymal transition[J]. *Phytomedicine*, 2016, **23**(5): 491-497. DOI: 10.1016/j.phymed.2016.02.019.
- 薛艳华, 史权, 庞海河, 等. 灵芝孢子几种破壁方法比较分析[J]. *植物研究*, 2005, **25**(2): 216-218. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5102.2005.02.023.
XUE Yanhua, SHI Quan, PANG Haihe, *et al.* Comparing analysis on several wall-cracking methods of *Ganoderma lucidum* spore[J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2005, **25**(2): 216-218. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5102.2005.02.023.
- 刘俊丽, 崔清亮, 冯彩霞, 等. 响应面法优化灵芝孢子粉高压脉冲电场破壁工艺[J]. *食品工业科技*, 2020, **41**(5): 169-174. DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020.05.028.
LIU Junli, CUI Qingliang, FENG Caixia, *et al.* Optimization of the high voltage pulsed electric field wall breaking technology of *Ganoderma* spores powder by response surface method[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, **41**(5): 169-174. DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020.05.028.
- 刘春延, 张国财, 程方志, 等. 灵芝孢子粉破壁工艺优化及其抗肿瘤作用[J]. *食品科学*, 2016, **37**(14): 51-55. DOI: 10.7506/spkx1002-6630-201614009.
LIU Chunyan, ZHANG Guocai, CHENG Fangzhi, *et al.* Optimization of disruption of *Ganoderma lucidum* spores and antitumor effect of the broken spores[J]. *Food Science*, 2016, **37**(14): 51-55. DOI: 10.7506/spkx1002-6630-201614009.
- 谢永芳, 梁亦龙, 曾垂省, 等. 一种新复合酶处理的灵芝孢子粉破壁研究[J]. *江苏农业科学*, 2012, **40**(9): 61-63. DOI: 10.3969/j.issn.1002-1302.2012.09.021.

- XIE Yongfang, LIANG Yilong, ZENG Chuisheng, *et al.* Study on the breaking of *Ganoderma lucidum* spore powder treated with a new complex enzyme[J]. Jiangsu Agricultural Science, 2012, **40**(9): 61-63. DOI: 10.3969/j.issn.1002-1302.2012.09.021.
- 15 安翠翠. 灵芝孢子粉/环糊精超分子体研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2009. DOI: 10.7666/d.d182957.
- AN Cuicui. *Ganoderma lucidum* spore powder/supramolecular study of cyclodextrin[D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2009. DOI: 10.7666/d.d182957.
- 16 王欣宇, 车成来, 林花, 等. 灵芝孢子粉破壁技术的研究进展[J]. 中国林副特产, 2017(6): 93-94. DOI: 10.13268/j.cnki.fbsic.2017.06.034.
- WANG Xinyu, CHE Chenglai, LIN Hua, *et al.* Research progress of *Ganoderma lucidum* spore powder wall breaking technique[J]. Forest by-Product and Speciality in China, 2017(6): 93-94. DOI: 10.13268/j.cnki.fbsic.2017.06.034.
- 17 周萍, 安东, 王朝川, 等. 变温压差脆化破壁灵芝孢子技术考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, **18**(20): 16-19.
- ZHOU Ping, AN Dong, WANG Chaochuan, *et al.* Investigation of wall-broken technology for *Ganoderma lucidum* by embrittlement with difference temperature and pressure[J]. China Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2012, **18**(20): 16-19.
- 18 Wang J J, Ke R, Zhang S Y. Breaking the sporoderm of *Ganoderma lucidum* spores by combining chemical reaction with physical actuation[J]. Natural Product Research, 2017, **31**(20): 2428-2434. DOI: 10.1080/14786419.2017.1312394.
- 19 Liu Y, Chen J P, Wu X F, *et al.* Insights into the effects of γ -irradiation on the microstructure, thermal stability and irradiation-derived degradation components of microcrystalline cellulose (MCC) [J]. RSC Advances, 2015, **5**(43): 34353-34363. DOI: 10.1039/c5ra03300d.
- 20 陈亮, 武小芬, 陈静萍, 等. γ 射线辐照降解微晶纤维素的研究[J]. 核农学报, 2016, **30**(9): 1731-1737. DOI: 10.11869/j.issn.100-8551.2016.09.1731.
- CHEN Liang, WU Xiaofen, CHEN Jingping, *et al.* Study on the degradation of microcrystalline cellulose irradiated by γ rays[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2016, **30**(9): 1731-1737. DOI: 10.11869/j.issn.100-8551.2016.09.1731.
- 21 陈志军, 岳玲, 孔秋莲, 等. 两种辐照方式对灵芝孢子粉灭菌效果及品质影响的比较[J]. 食品与生物技术学报, 2015, **34**(11): 1212-1218. DOI: 10.3969/j.issn.1673-1689.2015.11.015.
- CHEN Zhijun, YUE Ling, KONG Qiulian, *et al.* Comparative study on sterilization effects and quality of *Ganoderma lucidum* spore powder by two irradiation modes[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2015, **34**(11): 1212-1218. DOI: 10.3969/j.issn.1673-1689.2015.11.015.
- 22 黎博, 刘巧娥, 高向东, 等. 机械球磨法制备纳米HATO及其性能测试[J]. 火炸药学报, 2019, **42**(1): 97-102. DOI: 10.14077/j.issn.1007-7812.2019.01.017.
- LI Bo, LIU Qiaoe, GAO Xiangdong, *et al.* Preparation of nano-HATO by mechanical milling method and its performance test[J]. Chinese Journal of Explosives & Propellants, 2019, **42**(1): 97-102. DOI: 10.14077/j.issn.1007-7812.2019.01.017.
- 23 李全, 刘祖铭, 彭凯, 等. 机械球磨 Y_2O_3 粉末的组织结构演变[J]. 粉末冶金材料科学与工程, 2019, **24**(3): 226-231. DOI: 10.3969/j.issn.1673-0224.2019.03.004.
- LI Quan, LIU Zuming, PENG Kai, *et al.* Microstructure evolution of Y_2O_3 powder during mechanical milling[J]. Materials Science and Engineering of Powder Metallurgy, 2019, **24**(3): 226-231. DOI: 10.3969/j.issn.1673-0224.2019.03.004.
- 24 卢敬慈, 梁启文, 莫惠凤. 灵芝孢子粉破壁率分析方法的测量不确定度评估及方法改良与优化[J]. 药物分析杂志, 2014, **34**(3): 554-559.
- LU Jingci, LIANG Qiwen, MO Huifeng. Evaluation of measurement uncertainty of sporoderm-broken rate of *Ganoderma* spores, method modification and optimization[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2014, **34**(3): 554-559.
- 25 武小芬, 陈亮, 齐慧, 等. 钴-60伽马射线辐照对甲酸分离玉米芯成分的影响[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2018, **36**(1): 010402. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2018.rrj.36.010402.
- WU Xiaofen, CHEN Liang, QI Hui, *et al.* Effect of cobalt-60 gamma-ray irradiation on separation of components from corncob by formic acid[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2018, **36**(1): 010402. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2018.rrj.36.010402.
- 26 赵晓燕, 倪伟锋, 邢增涛, 等. 破壁处理对灵芝孢子粉质量的影响[J]. 食用菌学报, 2011, **3**: 71-73. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2018.rrj.36.010402.
- ZHAO Xiaoyan, NI Weifeng, XING Zengtao, *et al.*

- Effect of aporoderm breakage on the quality of *Ganoderma lucidum* spore powders[J]. *Acta Edulis Fungi*, 2011, **3**: 71-73. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2018.rrj.36.010402.
- 27 Ma J J, Fu Z Y, Ma P Y, *et al.* Breaking and characteristics of *Ganoderma lucidum* spores by high speed entrifugal shearing pulverizer[J]. *Journal of Wuhan University of Technology-Mater: Science Edition*, 2007, **22**(4): 617-621. DOI: 10.1007/s11595-006-4617-6.
- 28 黄生权, 李进伟, 宁正祥. 微波-超声协同辅助提取灵芝多糖工艺 [J]. *食品科学*, 2010, **31**(16): 52-55. DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00266.
HUANG Shengquan, LI Jinwei, NING Zhengxiang. Ultrasonic-microwave synergistic extraction of polysaccharides from cultivated *Ganoderma lucidum*[J]. *Food Science*, 2010, **31**(16): 52-55. DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00266.
- 29 刘有菊, 杨庆辞, 杨增刚. 破壁和没有破壁灵芝孢子粉的红外光谱对比分析[J]. *中国科技信息*, 2017, **24**: 50-51. DOI: 10.3969/j.issn.1001-8972.2017.24.019.
- LIU Youju, YANG Qingci, YANG Zenggang. Comparative analysis of broken and unbroken *Ganoderma* spores by fourier transform infrared spectra [J]. *China Science and Technology Information*, 2017, **24**: 50-51. DOI: 10.3969/j.issn.1001-8972.2017.24.019.
- 30 Chen X L, Liu X C, Sheng D P, *et al.* Distinction of broken cellular wall *Ganoderma lucidum* spores and *G. lucidum* spores using FTIR microspectroscopy[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2012, **97**: 667-672. DOI: 10.1016/j.saa.2012.07.046.
- 31 励炯, 宋旭峰, 朱健, 等. 破壁灵芝孢子粉重金属含量、破壁率及杂质掺混情况研究[J]. *中药材*, 2014, **37**(12): 2171-2174. DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2014.12.011.
LI Jiong, SONG Xufeng, ZHU Jian, *et al.* Study on heavy metal content, wall-broken rate and impurity mixing of the broken *Ganoderma lucidum* spores[J]. *Jorunal of Chinese Medicinal Materials*, 2014, **37**(12): 2171-2174. DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2014.12.011.