

中药现代化技术

## 蚕蛹虫草生物活性肽的制备及其性能分析

郭尚, 徐莉娜, 李艳婷, 郭伟伟, 郭霄飞, 洪沙沙

(山西农业大学 山西功能食品研究院, 山西 太原 030031)

**摘要:** 以蚕蛹虫草子实体干粉为材料, 采用碱溶酸沉法提取蚕蛹虫草蛋白质, 通过正交实验优化提取条件; 通过蛋白质复合酶酶解蚕蛹虫草蛋白质, 超滤法分离获得蚕蛹虫草小分子多肽液; 通过测定抑菌圈和细胞毒性实验评价蚕蛹虫草多肽的抗菌及抗癌活性。结果显示, 蚕蛹虫草蛋白质最佳提取条件为: pH 8.5、料液比(g : mL) 为 1 : 28、提取时间 3.5 h、提取 3 次, 蚕蛹虫草蛋白质含量最高为 45.06%; 蚕蛹虫草多肽最佳酶解工艺为: 碱性蛋白酶与木瓜蛋白酶活力比 4 : 3、酶解最佳 pH 7.2、温度 55 °C、酶加量 7000 U/mL、酶解时间为 3.5 h。在此条件下制备的蚕蛹虫草多肽含量为 16.73%, 其相对分子质量  $< 3.0 \times 10^3$  Da 组分对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌及金黄色葡萄球菌均表现出较好的抑菌效果, 其抑菌圈分别为(12.08±0.22)、(6.67±0.12)和(10.32±0.23) mm; 对骨肉瘤 Sao-S 细胞 [半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 为 0.49 mg/L] 和膀胱癌 T24 细胞 (IC<sub>50</sub> 为 0.23 mg/L) 有很好的抑制作用。

**关键词:** 蚕蛹虫草; 酶解; 多肽; 抗菌性; 抗癌作用; 中药现代化技术

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2022) 12-2481-11

## Preparation and property analysis of polypeptides in *Cordyceps militaris*

GUO Shang, XU Lina, LI Yanting, GUO Weiwei, GUO Xiaofei, HONG Shasha

(Shanxi Institute for Functional Food, Shanxi Agricultural University, Taiyuan 030031, Shanxi, China)

**Abstract:** *Cordyceps militaris* protein was firstly extracted from *Cordyceps militaris* fruiting body dry powder by alkali solution and acid precipitation method, of which the conditions were optimized by orthogonal experiment. *Cordyceps militaris* protein was then digested by protein complex enzyme, and small molecule polypeptide solution was obtained by ultrafiltration. The antibacterial and anticancer performances of *Cordyceps militaris* polypeptide were further evaluated via bacteriostatic circle measurement and cytotoxicity test. The results showed that the protein content could reach 45.06% under optimized extraction conditions of pH 8.5, material-liquid ratio (g : mL) 1 : 28, and extraction time 3.5 h with the solution being extracted three times. Meanwhile, the optimum enzymatic hydrolysis process of *Cordyceps militaris* polypeptide was as follows: enzyme activity of alkaline protease to papain 4 : 3, enzymolysis temperature 55 °C, pH 7.2, enzyme dosage 7000 U/mL, and enzymolysis time 3.5 h. Under these conditions, the prepared polypeptides from *Cordyceps militaris* had 16.73% content, and that with relative molecule mass  $< 3.0 \times 10^3$  Da generated bacteriostatic circles of (12.08±0.22), (6.67±0.12) and (10.32±0.23) mm against *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*, respectively, showed good antibacterial activity. Moreover, the osteosarcoma SAO-S [median inhibition concentration (IC<sub>50</sub>) =0.49 mg/L] and human bladder cancer cells (IC<sub>50</sub>=0.23 mg/L) were significantly inhibited by *Cordyceps militaris* polypeptide.

**Key words:** *Cordyceps militaris*; enzymolysis; polypeptide; antibacterial property; anticancer effect; modernization technology of traditional Chinese medicine

蛹虫草 (*Cordyceps militaris*), 俗称北冬虫夏草、座菌目 (*Hypocreales*), 天然资源较少<sup>[1-4]</sup>。中国是北虫草、蚕蛹虫草、蛹草, 与野生冬虫夏草同属肉世界上第一个用昆虫蛹人工大批量培养蛹虫草子实

收稿日期: 2022-06-24; 定用日期: 2022-10-24; DOI: 10.13550/j.jxhg.20220587

基金项目: 山西省青年科学研究项目 (202103021223160); 山西农业大学博士科研启动项目 (2021BQ45); 山西省来晋奖励博士科研启动项目 (SXBYKY2021086); 山西省农业科学院科研创新团队专项 (YGC2019TD03)

作者简介: 郭尚 (1967—), 男, 研究员, E-mail: gs0351@sohu.com。

体的国家,因蛹虫草营养丰富、药食兼备,于2006年获得了国家卫生部“新资源食品”批文<sup>[5]</sup>。目前,蛹虫草子实体已作为新食品原料应用到很多行业,如虫草饮料、虫草酸奶等<sup>[6]</sup>。

蛹虫草生物活性成分种类多、含量丰富,既包含蛋白质、糖和脂肪等基本营养成分,又含有多种功能成分,如虫草素、虫草酸、虫草多糖等;此外,还含有18种氨基酸、多种维生素和30多种微量元素<sup>[6]</sup>。SINGPOONGA等<sup>[3]</sup>研究发现,蛹虫草能抗疲劳、提高机体免疫力、抗炎、抗肿瘤,可作为一种新兴的中药材。生物活性肽来源广泛、易消化利用、安全性高,且具有降胆固醇、降血压、抗菌、抗氧化等众多生物活性,因而成为食品领域研究的热点<sup>[7]</sup>。宗静<sup>[8]</sup>分别采用水提醇沉法和酶解法得到了蛹虫草子实体多肽(质量分数达到8%),对其组分进行了分离纯化,并通过部分体外抗氧化活性实验证明此多肽具有一定的抗氧化活性。钱卫文等<sup>[9]</sup>以蚕蛹为基质栽培了蛹虫草,经过脱脂、粉碎、加酶水解、酶灭活、成品等步骤制得了一种可应用在功能性食品和农用生物制品等方面的虫草多肽。徐鸿雁等<sup>[10]</sup>以蛹虫草子座热水浸提虫草素后的剩余物为原料,没有经过蛋白质的提取,直接酶解分离得到了生物活性肽。JAKE等<sup>[11]</sup>用液氮研磨蛹虫草,分别经过浸提、凝胶柱分离纯化等方法,最后从蛹虫草中分离提取到了天然活性肽 Cordymin,其具有广谱抗菌的能力以及不受某些矿质元素离子(如 $Mg^{2+}$ 和 $Zn^{2+}$ )影响的功能。综上所述,蛹虫草多肽具有多种生理功能,不仅有比蛋白质和氨基酸更好的消化吸收性能,还有促进虫草素、多糖等功效成分的吸收与转化,调节人体生理机能、预防疾病、增强机体抵抗力、清除自由基、改善氮素吸收关系、促进矿物质运输吸收,以及调节食品风味与质地等作用<sup>[12]</sup>。本课题组多年来从事蛹虫草菌种选育与功能因子挖掘研究,已获得多项成果<sup>[13-14]</sup>。自培育所得蛹虫草菌株GS-8(现保存于山西农业大学山西功能食品研究院菌种保藏室),蛹虫草子实体颜色橘黄,菌柄粗细均匀,生长期短,子囊头大,生物学特性稳定遗传,与辽宁省现行的5个主要生产品种(9906、抗大、988、青一和582)相比较,主要营养成分均高于后者<sup>[15]</sup>,其中蛋白质含量高达68%,氨基酸结构合理,根据联合国粮农组织/世界卫生组织(FAO/WHO)推荐的较理想蛋白质要求,该蛹虫草属优质蛋白质来源,对其进一步开发利用很有必要。

因此,本课题以自培育所得蚕蛹虫草子实体为研究对象,先提取蛋白质,再采用酶解法获得多肽,

从影响蛋白质含量的提取方法、提取时间、pH、温度、提取次数以及影响多肽含量的酶、酶解时间、温度、pH条件入手,研究主要影响因素与目标产物含量之间的关系,对目标活性多肽进行初步分离和抗氧化功能验证,为进一步研究蚕蛹虫草多肽及其作为药物和功能性食品原料提供一定的理论基础。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

蚕蛹虫草子实体干粉,由山西农业大学山西功能食品研究院食用菌资源收集及开发利用创新团队提供;酶(碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶和胃蛋白酶),食品级,青岛海维森科技有限公司;DMEM培养基、四甲基偶氮唑蓝(MTT),北京索莱宝科技有限公司;McCoy's 5A培养基,武汉 Procell 生命科技有限公司;胎牛血清,美国 Gibco 公司;细胞用二甲基亚砜(DMSO),天津市天力化学试剂有限公司;96孔细胞培养板,美国 Corning 公司;3种细菌(金黄色葡萄球菌 ATCC 12600、枯草芽孢杆菌 ATCC 29056、大肠杆菌 ATCC 23815),山西大学生命科学学院菌种保藏中心;骨肉瘤 Sao-S 细胞株和膀胱癌 T24 细胞株,山西医科大学附属肿瘤医院比较医学部。

TU-1810 紫外-可见分光光度计,北京普析通用仪器有限公司;AXTGL 16M 台式高速冷冻离心机,盐城市安信实验仪器有限公司;HR40-II A2 型生物安全柜,青岛海尔医用低温科技有限公司;311 CO<sub>2</sub> 培养箱,德国 Thermo 公司;S433D 氨基酸分析仪,德国 sykam 公司;DSA100-SK2-4L 数控超声波清洗器,深圳德森精密设备有限公司;SunRise 酶标仪,奥地利 Tecan 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 蛋白质含量的测定

参照 GB 5009.5—2016 进行蛋白质含量的测定。

#### 1.2.2 多肽含量的测定

利用双缩脲法进行测定<sup>[16]</sup>。

#### 1.2.3 氨基酸的测定

参照 GB 5009.3—2016 进行氨基酸的测定。

#### 1.2.4 蚕蛹虫草蛋白质提取液的制备

##### 1.2.4.1 提取方法选择

分别称取5g蚕蛹虫草子实体干粉于250mL三角瓶中,按料液比1:20(g:mL,下同)加入蒸馏水,浸泡0.5h,然后缓慢加入NaOH溶液(0.1mol/L)调节溶液pH至8.0,分别置于超声波清洗器(功率100W)和热回流提取装置,温度均为50℃,提取时间0.5h,提取3次,合并提取液,用0.5mol/L盐

酸调节溶液 pH 至 5.0, 静置 0.5 h, 在 5000 r/min 下离心 10 min, 收集上清液, 按照 1.2.1 节方法进行蚕蛹蛋白质含量 (质量分数, 下同) 的测定。

#### 1.2.4.2 超声法提取蚕蛹虫草蛋白质的单因素实验

按照 1.2.4.1 节实验方法, 超声法提取蚕蛹虫草蛋白质的条件为 pH 8.0、提取温度 50 °C、提取时间 0.5 h、料液比 1:20、超声功率 100 W。固定其他条件, 分别考察 pH (5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 和 9.0)、料液比 (1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30 和 1:35)、提取时间 (0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 和 3.5 h)、超声提取次数 (1、2、3、4 次) 这 4 个因素对提取液中蛋白质含量的影响。

#### 1.2.4.3 超声法制备蛋白质提取液正交优化

根据单因素实验结果, 再以 pH (8.0、8.5、9.0)、料液比 (1:25、1:28、1:30)、提取时间 (3.0、3.2、3.5 h) 和提取次数 (2、3、4) 4 个因素, 以蛋白质含量为指标设计正交实验。

#### 1.2.5 蚕蛹虫草蛋白质的酶解

##### 1.2.5.1 水解酶种类

将 1.2.4 节所得蚕蛹虫草蛋白质提取液真空冷冻干燥, 将得到粗蛋白质粉末, 溶于蒸馏水中, 得到质量浓度为 20 g/L 的水溶液, 选用碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶和胃蛋白酶 5 种蛋白酶, 加酶量均为 3000 U/mL, 依据不同酶的最佳反应条件, 调节溶液 pH 和温度进行酶解, 得到最佳蛋白酶。

##### 1.2.5.2 蚕蛹虫草蛋白质酶解单因素实验

将质量浓度为 20 g/L 的粗蛋白质水溶液在 pH 7.0、温度 50 °C、加酶量 6000 U/mL、酶解时间 1 h 条件下进行酶解。固定其他反应条件, 分别考察 pH (5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)、加酶量 (2000、4000、6000、8000、10000 U/mL)、酶解温度 (45、50、55、60、65、70 °C)、酶解时间 (1、2、3、4、5 h) 对蚕蛹虫草多肽含量的影响。加入蛋白酶充分振荡后, 置水浴中进行酶解, 酶解完成后, 置沸水浴中酶灭活 10 min, 酶解液在 3500 r/min 下离心 15 min, 收集上清液, 利用三氯乙酸 (TCA) 沉淀上清液中未水解的蛋白质, 在 3500 r/min 下离心 15 min, 收集上清液, 待测。

##### 1.2.5.3 酶解法制备蚕蛹虫草多肽正交优化

选取上述单因素条件, 选择 pH、酶解温度、加酶量和酶解时间 4 个因素作为实验因子, 以酶解后酶解液中蚕蛹虫草多肽含量作为指标, 进行正交实验, 实验因素及水平见表 1。

表 1 蚕蛹虫草多肽酶解正交实验因素水平表

Table 1 Table of factor level in orthogonal experiment of enzymatic hydrolysis on *Cordyceps militaris*

水平	pH	温度/°C	加酶量/(U/mL)	酶解时间/h
1	7.2	54	6000	3.0
2	7.5	55	7000	3.5
3	7.8	56	8000	4.0

#### 1.2.6 超滤法分离蚕蛹虫草多肽

采用超滤膜 (相对分子质量分别为  $3.0 \times 10^4$ 、 $1.0 \times 10^4$ 、 $3.0 \times 10^3$  Da) 依次对蚕蛹虫草蛋白质酶解液进行分离, 收集滤液 (相对分子质量  $< 3.0 \times 10^3$  Da), 冷冻干燥后粉碎, 过 40 目筛, 得到蚕蛹虫草多肽粉末。

#### 1.2.7 蚕蛹虫草多肽生物学活性的测定

##### 1.2.7.1 抗氧化活性的测定

参考文献[17-19]的研究方法进行检测。

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 自由基清除活性测定: 将 1.2.6 节中所得蚕蛹虫草多肽粉末 100  $\mu$ g 放入 10 mL 试管中, 接着加入 4 mL DPPH (体积分数 0.004%) 甲醇溶液, 剧烈摇动, 摇匀后置于黑暗处反应 30 min, 5000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 采用紫外-可见分光光度计在 517 nm 处测定溶液的吸光度, 按式 (1) 对 DPPH 自由基清除率进行计算:

$$R_1 / \% = \left( 1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \right) \times 100 \quad (1)$$

式中:  $R_1$  为 DPPH 自由基清除率, %;  $A_1$  为样品吸光度;  $A_2$  为不加 DPPH 自由基的吸光度;  $A_0$  为空白对照组吸光度。

羟自由基清除活性的测定: 采用水杨酸法<sup>[20-21]</sup>。准确配制一系列质量浓度梯度 (0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 g/L) 的蚕蛹虫草多肽水溶液 (相对分子质量  $< 3.0 \times 10^3$  Da), 向试管中分别加入 9 mmol/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  溶液 1.0 mL、9 mmol/L 水杨酸乙醇溶液 1.0 mL, 最后加入 2 mL 8.8 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  启动反应, 在 37 °C 恒温反应 30 min, 在 510 nm 波长下测定溶液的吸光度, 按式 (2) 对羟自由基的清除率进行计算:

$$R_2 / \% = \left( 1 - \frac{A_3 - A_4}{A_0} \right) \times 100 \quad (2)$$

式中:  $R_2$  为羟自由基清除率, %;  $A_3$  为样品吸光度;  $A_4$  为不加羟自由基的吸光度;  $A_0$  为空白对照组吸光度。

##### 1.2.7.2 抗菌活性的测定

采用纸片扩散法测定其抑菌效果<sup>[16]</sup>。首先, 通过涂布法将细菌接种到平板上 (使细菌在平板上能够形成一层均匀的菌膜); 然后, 将浸有 20  $\mu$ L 质量浓度为 100 mg/L 蚕蛹虫草多肽水溶液 (相对分子质量  $< 3 \times 10^3$  Da) 的滤纸片 (0.5 mm  $\times$  0.5 mm) 贴在平

板上, 蚕蛹虫草多肽质量浓度在一定的范围内会抑制细菌的生长, 形成一个无细菌生长的透明圈(抑菌圈), 抑菌圈越大, 表明抑菌效果越好; 以头孢克肟作为阳性对照药。加完样品的平板置于 37 °C 恒温培养箱培养 24 h, 取出平板, 测量抑菌圈大小, 平行实验 3 次, 取平均值。

### 1.2.8 蚕蛹虫草多肽对骨肉瘤 Sao-S 和膀胱癌 T24 细胞增殖的影响

采用 MTT 法进行抗癌细胞实验<sup>[22]</sup>。Sao-S 细胞分别以  $5 \times 10^3$  个/孔 (24 h)、 $3 \times 10^3$  个/孔 (48 h) 的接种密度接种于 96 孔板中, T24 细胞分别以  $7 \times 10^3$  个/孔 (24 h)、 $4 \times 10^3$  个/孔 (48 h) 的接种密度接种于 96 孔板中, 每孔加入培养基 100  $\mu$ L, 置于 37 °C、体积分数为 5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 细胞贴壁后弃去原培养基, 实验组加入含有不同质量浓度多肽液 (相对分子质量  $< 3 \times 10^3$  Da) 的培养基, 阴性对照组加入等量培养基, 5-氟尿嘧啶注射液 (质量浓度 50 mg/L) 作为阳性对照组, 并设立无细胞的培养基为调零组, 每组设 5 个复孔。分别于加药 24、48 h 后, 弃上清液, 每孔加入 100  $\mu$ L 质量浓度为 0.5 g/L MTT 的培养基继续培养 4 h。采用酶标仪在 490 nm 波长下测定吸光度 (OD 值)。按式 (3)、(4) 分别计算蚕蛹虫草多肽对 Sao-S、T24 细胞 24、48 h 的生长抑制率及半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>):

$$R_3 / \% = \left( 1 - \frac{A_5 - A_6}{A_0} \right) \times 100 \quad (3)$$

$$IC_{50} = \rho - \rho \left( P - \frac{3 - P_m - P_n}{4} \right) \quad (4)$$

式中:  $R_3$  为细胞生长抑制率, %;  $A_5$  为实验组平均 OD 值;  $A_6$  为对照组平均 OD 值;  $A_0$  为空白对照组 OD 值; IC<sub>50</sub> 为半数抑制浓度, mg/L;  $\rho$  为最大剂量, mg/L;  $P$  为阳性反应率之和, %;  $P_m$  为最大阳性反应率, %;  $P_n$  为最小阳性反应率, %。

### 1.2.9 数据分析

所有实验重复 3 次, 以“平均值 $\pm$ 标准偏差”表示, 实验数据采用 SPSS 16.0 软件进行偏相关分析, 使用 Origin 2021 软件作图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 蚕蛹虫草子实体氨基酸分析

食用菌富含多种营养物质, 其蛋白质含量高于一般的蔬菜与水果, 食用菌在人体食用后, 蛋白质会分解为氨基酸, 被人体直接吸收<sup>[23]</sup>。人们熟知的高蛋白质含量的食用菌有羊肚菌、马鞍菌、香菇、牛肝菌等。其中, 羊肚菌粗蛋白质质量分数达到 20%<sup>[24]</sup>, 牛肝菌蛋白质质量分数达到 28%<sup>[25]</sup>, 本课题

组培育所得蚕蛹虫草子实体营养丰富, 生物活性较高, 蛋白质质量分数高达 68.44%。由此看来, 蚕蛹虫草子实体可以作为优质蛋白质来源, 为人体补充一些必要的氨基酸。

表 2 为蚕蛹虫草子实体水解氨基酸的组成及含量。由表 2 可知, 蚕蛹虫草子实体共测得 17 种水解氨基酸 (色氨酸未测), 水解氨基酸总含量为 33.20%, 其中, 必需氨基酸为 11.42%, 占水解氨基酸总含量的 34.40%, 非必需氨基酸含量 21.78%, 占水解氨基酸总含量的 65.60%。组成药用的氨基酸有 10 种, 分别为天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、精氨酸, 占水解氨基酸总量的 66.72%, 药用氨基酸维持着人体机能的碳平衡, 某些氨基酸只能通过食物的摄取才能得到补充, 说明蚕蛹虫草具有良好的开发利用价值, 其中, 谷氨酸含量最高 (4.39% $\pm$ 0.001%)。

表 2 蚕蛹虫草子实体水解氨基酸的组成及含量  
Table 2 Composition and content of hydrolyzed amino acids in *Cordyceps militaris*

编号	名称	含量/%
1	天冬氨酸	3.63 $\pm$ 0.102*
2	苏氨酸	1.84 $\pm$ 0.113*
3	丝氨酸	1.70 $\pm$ 0.081*
4	谷氨酸	4.39 $\pm$ 0.001*
5	甘氨酸	4.31 $\pm$ 0.001*
6	丙氨酸	2.04 $\pm$ 0.001*
7	半胱氨酸	0.007 $\pm$ 0.001*
8	缬氨酸	1.96 $\pm$ 0.001*
9	甲硫氨酸	0.58 $\pm$ 0.001*
10	异亮氨酸	1.33 $\pm$ 0.001*
11	亮氨酸	2.02 $\pm$ 0.021*
12	酪氨酸	2.06 $\pm$ 0.021*
13	苯丙氨酸	1.32 $\pm$ 0.011*
14	组氨酸	1.51 $\pm$ 0.011*
15	赖氨酸	2.37 $\pm$ 0.021*
16	精氨酸	0.14 $\pm$ 0.021*
17	脯氨酸	1.99 $\pm$ 0.011*
	必需氨基酸	11.42
	非必需氨基酸	21.78
	水解氨基酸总量	33.20
	药用氨基酸总量	22.15

注: \*与对照组比较,  $P < 0.05$ 。

谷氨酸是一种神经递质, 对改善人体肠道功能、脑功能、神经功能和治疗精神性疾病具有重要的作

用<sup>[26]</sup>。其次是甘氨酸(含量  $4.31\% \pm 0.001\%$ ), 甘氨酸是氨基酸种类中结构最简单的氨基酸, 传统营养学中属非必需氨基酸, 甘氨酸还是还原性谷胱甘肽的组成成分之一, 机体发生严重应激时常外源补充甘氨酸, 所以, 也被认为是半必需氨基酸。目前, 研究表明, 甘氨酸对机体多种生理病理反应具有调节保护作用、典型的如休克、缺血再灌注损伤、细胞膜损伤、氧化应激、酒精性肝炎、肝纤维化、药物中毒和肿瘤转移、抗炎作用等<sup>[27]</sup>。此外, 天冬氨酸含量  $3.63\% \pm 0.102\%$ , 说明蚕蛹虫草可能在保护心肌、消除疲劳等方面有调节意义<sup>[28]</sup>。天冬酰胺和谷氨酰胺在水解过程中会产生天冬氨酸和谷氨酸<sup>[29]</sup>。赖氨酸含量  $2.37\% \pm 0.021\%$ , 赖氨酸作为一种必需氨基酸, 动物机体不能自身合成, 需要从食物中摄取。酪氨酸含量  $2.06\% \pm 0.021\%$ , 酪氨酸是一种重要的营养必需氨基酸, 在生物机体的新陈代谢、生长、发育均起着关键作用, 广泛应用于医药、食品、日化、化工等领域<sup>[30]</sup>。近年来, 酪氨酸常被作为苯丙酮尿症患者的营养补充剂, 以及多肽类激素、抗生素等药品的制备原料。同时, 酪氨酸是氨基酸输液及氨基酸复合制剂的重要成分, 作营养增补剂<sup>[31]</sup>。由此看来, 蚕蛹虫草子实体营养丰富、氨基酸含量高、种类多, 可作为功能食品研发的储备材料。

对蚕蛹虫草子实体水解氨基酸结构进行了分析, 结果见表 3。

表 3 蚕蛹虫草子实体中人体必需氨基酸的含量及化学评分

Table 3 Content and chemical scores of human essential amino acids of *Cordyceps militaris*

氨基酸	在蚕蛹虫草子实体中含量*/%	FAO/WHO 模式推荐值/%	RAA	RC	AAS
苏氨酸	5.54	4.00	1.39	1.22	139
缬氨酸	5.90	5.00	1.18	1.04	118
甲硫氨酸+半胱氨酸	1.77	3.50	0.51	0.45	51
异亮氨酸	4.01	4.00	1.00	1.01	100
亮氨酸	6.08	7.00	0.87	0.88	87
苯丙氨酸+酪氨酸	10.18	6.00	1.70	1.49	170
赖氨酸	7.14	5.50	1.30	1.14	130
人体必需氨基酸	40.62	35.00	1.16	1.02	116

注: \*为各氨基酸含量占水解氨基酸总含量的百分比; 氨基酸比值 (RAA) 为样品中某种必需氨基酸 (EAA) 含量与 WHO/FAO 模式中相应 EAA 推荐值的比值; 氨基酸比值系数 (RC) 为待评估必需氨基酸的 RAA 值与 RAA 均数的比值; 氨基酸评分 (AAS) 为样品中某种 EAA 含量与 WHO/FAO 模式中相应 EAA 推荐值的比值乘以 100。

由表 3 可知, 蚕蛹虫草子实体中甲硫氨酸+半胱氨酸占总水解氨基酸含量低于模式谱标准。从必需氨基酸的氨基酸比值、氨基酸比值系数 (RC) 及氨基酸评分的计算结果可以看出, 蚕蛹虫草子实体中甲硫氨酸+半胱氨酸含量较低, RC 为 0.45, 说明其为蚕蛹虫草子实体的第一限制氨基酸。在 FAO/WHO 模式中, 除亮氨酸和甲硫氨酸+半胱氨酸外, 蚕蛹虫草子实体其他必需氨基酸含量均高于氨基酸模式谱的推荐值, 表明蚕蛹虫草蛋白质氨基酸组成符合人体需求模式, 是一种理想天然的蛋白质来源。

## 2.2 蚕蛹虫草蛋白质提取工艺优化

为了得到最佳蚕蛹虫草蛋白质 (简称蛋白质) 提取工艺, 按照 1.2.4.1 节实验方法考察了蛋白质提取方法, 结果见图 1。

由图 1 可知, 利用超声波提取法与传统的加热回流提取法在相同的提取条件下提取蚕蛹虫草蛋白质, 超声波提取法效果较好, 可能是因为超声波提取法能够在短时间内使蚕蛹虫草细胞破壁, 使蛋白质更好地提取出来, 蛋白质含量较加热提取法提升 19% 以上, 而且超声波提取法比加热回流提取法操作简单、提取时间短、副产物少, 较大程度地节约了生产成本。

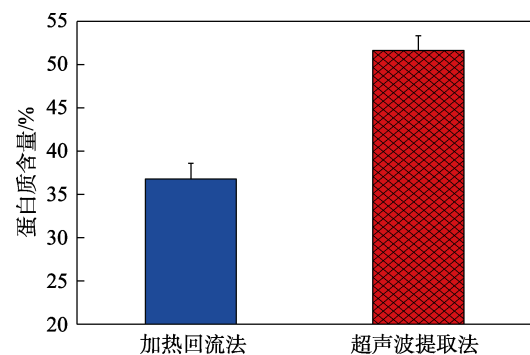
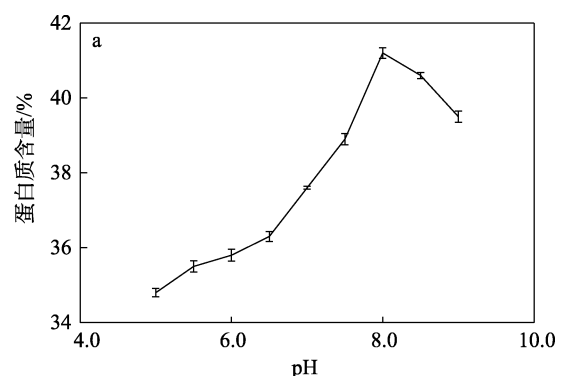


图 1 不同提取方法对蛋白质含量的影响

Fig. 1 Effects of extraction method on extraction rate of contents of protein

按照 1.2.4.2 节实验方法, 固定其他反应条件, 考察了超声条件下 pH、料液比、提取时间、提取次数对蛋白质含量的影响, 结果见图 2a~d。



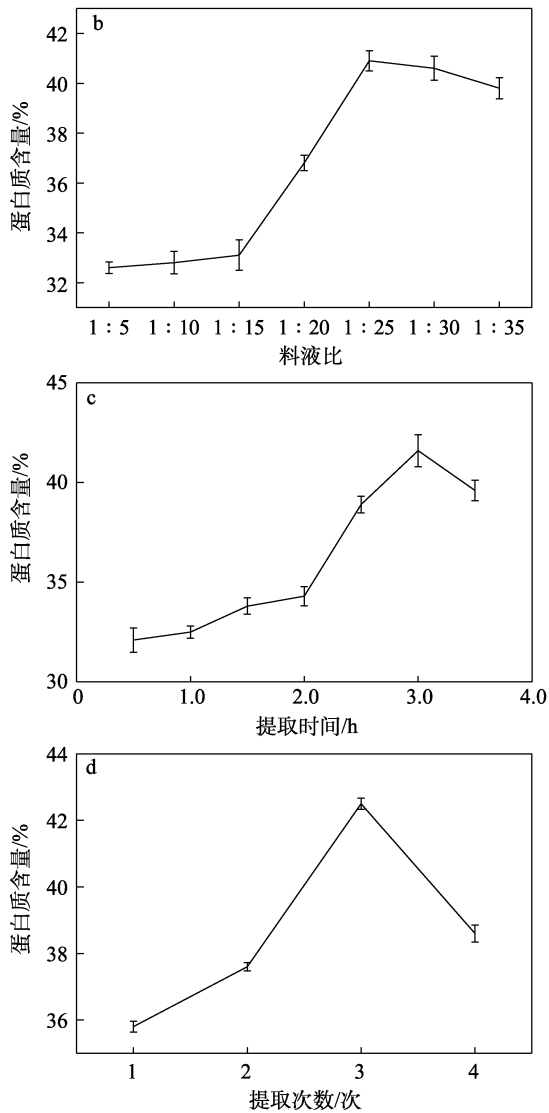


图 2 提取因素对蛋白质含量的影响  
Fig. 2 Effects of extraction factors on protein content

由图 2a 可以看出, pH 对蛋白质含量影响很大, 开始时随着 pH 的升高, 蛋白质含量升高, 当 pH=8.0 时, 蛋白质含量达到最高值 (41.2%), 而当 pH>8.0 时, 蛋白质含量呈下降趋势; 原因可能有 2 个: 一是因为蛋白质在碱性溶液中易发生酸式水解, 能增加蛋白质的溶解性, 而 pH 过高会使蛋白质出现脱氨基、脱羧基、肽键断裂及蛋白质分子间发生缩合反应等问题使蛋白质变性, 并产生一些有毒有害的物质。二是因为蚕蛹虫草蛋白质本身属于碱性蛋白质, 提取液偏碱有利于蛋白质的溶出。因此, 最佳提取 pH 为 8.0。由图 2b 可知, 随着料液比的增加, 蛋白质含量先升高后下降。当液料比在 1:15~1:25 之间时, 蛋白质含量增长幅度较大, 当液料比为 1:25 时, 蛋白质含量可达 40.90%, 之后增长幅度逐渐降低。因此, 料液比 1:25 为最佳料液比。提取中, 随着时间的延长, 蛋白质含量先增高后降低 (图 2c), 在 0.5~3.0 h 内蚕蛹虫草蛋白质含量升高

得幅度较大, 当提取 3.0 h 时, 蛋白质含量可达 41.60%, 之后随着提取时间的延长, 蛋白质含量下降。原因是超声波提取时在 1.5 h 时细胞完全破壁, 蛋白质溶出率较高, 随着时间的延长, 溶解度达到饱和状态, 有效成分的溶出逐渐减少, 含量增加幅度逐渐降低。因此, 最佳提取时间为 3.0 h。这与崔晓瑞等<sup>[32]</sup>采用超声辅助碱法提取米糠蛋白质中超声时间对含量的影响趋势一致。超声波提取蚕蛹虫草蛋白质时, 蛋白质含量还随着提取次数的增加呈先增大后下降的趋势 (图 2d), 当提取第 2 次时, 蛋白质含量明显高于提取 1 次的, 当提取次数为 3 次时, 蛋白质含量达到最高 (42.50%)。因此, 最佳提取次数为 3 次。

表 4 为超声波提取蚕蛹虫草蛋白质正交实验结果。

表 4 超声波提取蚕蛹虫草蛋白质正交实验结果  
Table 4 Orthogonal optimization results of *Cordyceps militaris* protein extraction

编号	A (PH)	B(料液比)/(g/mL)	C(提取时间)/h	D(提取次数)/次	蛋白质含量/%
1	1	1	1	1	37.02±0.73*
2	1	2	2	2	42.01±0.85*
3	1	3	3	3	42.02±0.82*
4	2	1	2	3	43.04±0.56*
5	2	2	3	1	43.01±0.23*
6	2	3	1	2	39.88±0.22*
7	2	2	3	2	44.62±0.01*
8	3	2	1	3	42.18±0.41*
9	3	3	2	1	44.31±0.31*
K1	121.23	32.31	26.72	33.18	
K2	125.93	31.92	36.32	31.18	
K3	131.11	32.51	39.42	32.19	
k1	8.11	12.13	9.34	10.32	
k2	11.22	12.03	12.16	11.98	
k3	13.32	12.19	13.09	12.11	
极差 R	5.01	0.13	4.19	0.67	
主次顺序	A>C>D>B				
优水平	A2	B2	C3	D2	
优化组合	A2B2C3D2				

注: \*与对照组比较, P<0.05。

由表 4 可以看出, 以蛋白质含量为评价指标, 极差大小依次为 A>C>D>B, 表明 pH(A) 对蛋白质含量影响最大, 其次是提取时间 (C), 影响较小的是料液比 (B) 和提取次数 (D), 而且 pH(A) 和提取时间 (C) 对蛋白质含量的影响较为显著, 料液比 (B) 和提取次数 (D) 的影响不显著。结合正交实验结果与单因素实验的结果, 确定超声法提取蚕蛹虫草蛋白质最佳的条件为 A2B2C3D2, 即 pH=8.5, 料液比=1:28, 提取时间 3.5 h, 提取 3 次。此

时蛋白质含量为 44.62%±0.01%。按照此最优条件进行验证实验, 蛋白质含量为 45.06%, 高于正交实验中任一批次, 表明正交实验取得了预期的效果。

蛋白质提取方法常有渗透法、浸渍法、冻融法、均质法和溶剂萃取、超声破碎和纤维素酶法等<sup>[33]</sup>。本文将超声辅助碱提酸沉法运用在蚕蛹虫草蛋白质的提取上, 具有操作便利、提取时间短、溶剂消耗小, 产物含量高等优势。

### 2.3 酶解法制备蚕蛹虫草多肽工艺优化

#### 2.3.1 蛋白酶的选择

按照 1.2.5.1 节实验方法, 5 种蛋白酶在各自的最适反应条件下对蚕蛹虫草蛋白质溶液进行了酶解, 结果见图 3。由图 3 可以看出, 5 种酶对蚕蛹虫草蛋白质的酶解效果有显著差异, 对于蚕蛹虫草蛋白质, 碱性蛋白酶的酶解效果最好, 蚕蛹虫草多肽含量最高。考虑到单一酶解位点少, 所以, 采用水解完多肽含量最高的 2 种酶进行复合酶水解, 其中, 碱性蛋白酶和中性蛋白酶活力比为 1:1 记为碱性蛋白酶: 中性蛋白酶=1:1, 下同。由图 3 可见, 碱性蛋白酶: 木瓜蛋白酶=4:3 时, 蚕蛹虫草多肽(简称为多肽)含量最高, 为 15.68%, 与孙崇臻<sup>[34]</sup>报道的结果一致。

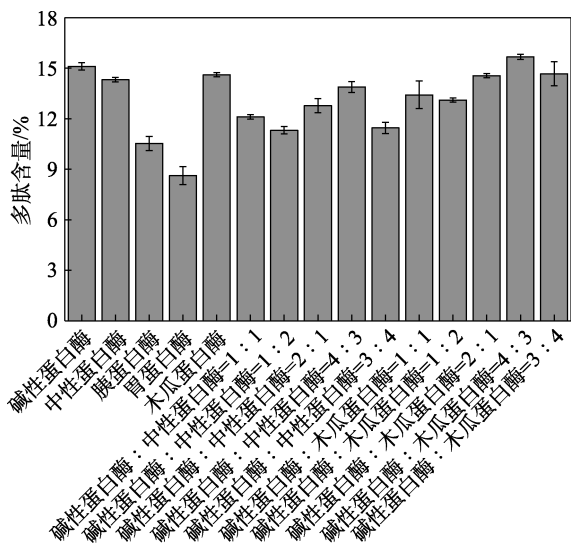


图 3 不同蛋白酶水解对多肽含量的影响

Fig. 3 Effect of different protease hydrolysis on polypeptide content

#### 2.3.2 酶解单因素实验结果

蚕蛹虫草蛋白质酶解单因素实验结果如图 4a~b 所示。由图 4a 可知, pH 会对蚕蛹虫草蛋白质酶解效果产生影响, 在 pH 为 7.5 时, 蚕蛹虫草蛋白质酶解效果最好, 多肽含量达到 16.70%, 随着 pH 的继续升高, 多肽含量呈降低趋势, 其主要原因是 pH 过高或过低会导致酶失活, 从而影响活性位点的基团解离和底物的解离。多肽含量与加酶量也有关系,

结果见图 4b, 其中, 选取碱性蛋白酶: 木瓜蛋白酶=4:3 为复合蛋白酶。由图 4b 可见, 随着加酶量的增大, 多肽含量也不断增加, 当加酶量增至 6000 U/mL 时, 多肽含量达到最大, 为 15.30%; 但当加酶量继续增加时, 多肽含量开始降低, 可能是因为继续增大加酶量会导致酶相互附着, 降低酶与底物的传质效率, 反而降低反应效率。

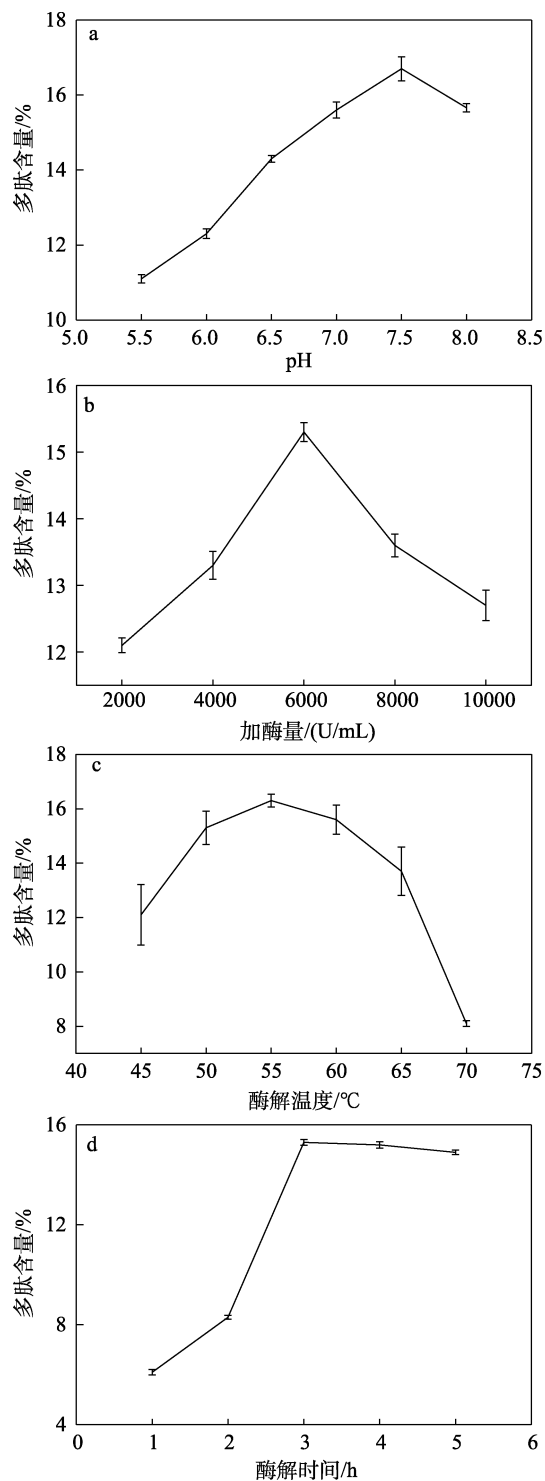


图 4 单因素实验结果

Fig. 4 Single factor analysis results of peptide in *Cordyceps militaris*

多肽含量和酶解的温度有很大的关系(图 4c),当酶解温度为 55 °C 时,多肽含量最高(16.30%),当温度继续升高时,多肽含量呈下降趋势,其原因可能与酶的本质是蛋白质有关,当温度升高到一定水平,酶活力会降低甚至失活。

在酶解的初始阶段,多肽含量随着酶解时间的延长而升高(图 4d),当酶解时间达到 3 h 时,多肽含量达到最高值(15.30%),但随着时间的继续延长,多肽含量反而呈下降趋势,可能与底物酶解完全有关。

因此,蚕蛹虫草蛋白质酶解的最佳条件为:最佳 pH 为 7.5、最佳加酶量为 6000 U/mL、最佳温度为 55 °C、最佳时间为 3 h。

### 2.3.3 蚕蛹虫草多肽酶解正交实验结果

根据上述单因素考察结果,对 pH(A)、酶解温度(B)、酶解时间(C)和加酶量(D)4 个因素进行了正交实验优化,结果见表 5。

表 5 蚕蛹虫草多肽酶解正交实验结果与分析  
Table 5 Results and analysis of orthogonal experiment of *Cordyceps militaris* polypeptides

编号	A (PH)	B(温度) /°C	C(时间) /h	D(加酶量) /(U/mL)	多肽含 量/%
1	1	1	1	1	13.46±0.05*
2	1	2	2	2	16.42±0.08*
3	1	3	3	3	12.31±0.08*
4	2	1	2	3	15.46±0.05*
5	2	2	3	1	15.03±0.12*
6	2	3	1	2	14.98±0.11*
7	3	1	3	2	15.66±0.32*
8	3	2	1	3	16.12±0.13*
9	3	3	2	1	15.09±0.09*
K1	47.70	48.92	47.66	46.79	
K2	47.78	49.04	48.77	48.76	
K3	48.01	50.01	49.93	49.09	
k1	16.13	15.66	16.23	15.77	
k2	15.96	15.98	15.88	13.82	
K3	15.99	14.98	14.97	16.01	
极差 R	0.26	2.01	2.13	1.09	
主次顺序	C>B>D>A				
优水平	A1	B2	C2	D2	
优组合	A1B2C2D2				

注: \*与对照组比较, P<0.05。

从表 5 得到的最优组合 A1B2C2D2(最佳酶解条件为: pH=7.2、温度 55 °C、加酶量 7000 U/mL、酶解时间 3.5 h)进行验证实验,多肽含量为 16.73%,

高于正交实验中任一批次,表明正交实验取得了预期的效果。这一结果同时表明,碱性蛋白酶与木瓜蛋白酶(酶活力比 4:3)对蚕蛹虫草蛋白质的水解具有一定的协同效应,在一定的条件下两种酶的复合作用效果明显优于其单独酶解效果<sup>[35-36]</sup>。

### 2.4 超滤法分离

将最佳提取条件下酶解得到的蚕蛹虫草多肽液通过分子切割量为相对分子质量 3.0×10<sup>4</sup>、1.0×10<sup>4</sup>、3.0×10<sup>3</sup> Da 的 3 种超滤膜分别对蚕蛹虫草多肽进行分离,可获得 4 个组分:组分 I 相对分子质量>3.0×10<sup>4</sup> Da,1.0×10<sup>4</sup> Da<组分 II 相对分子质量<3.0×10<sup>4</sup> Da、3.0×10<sup>3</sup> Da<组分 III 相对分子质量<1.0×10<sup>4</sup> Da 和组分 IV 相对分子质量<3.0×10<sup>3</sup> Da,分别冷冻干燥,置于干燥器中保存,备用。JOEN 等<sup>[37]</sup>采用复合酶解技术酶解鳕鱼蛋白质,并用超滤技术对鳕鱼蛋白质水解物进行分离纯化,获得 3 个肽片段,分离效果较好。由此看来,超滤可以有效地分离多肽。

### 2.5 蚕蛹虫草多肽的抗氧化活性

DPPH 自由基清除法是在体外条件下检测抗氧化剂清除自由基最常用的方法。DPPH 自由基结构简单、反应易控制,在 517 nm 波长处有特征吸收峰,已广泛用于检测天然物质抗氧化能力。DPPH 自由基具有单个且结构相对稳定的自由基,当其与清除剂相互作用时,溶液的颜色会发生改变<sup>[22]</sup>。羟自由基是一种活性氧,其毒性极强,对人体会产生非常大的危害,在机体内,其可造成多种生物大分子被破坏,最后导致细胞坏死或突变<sup>[38]</sup>,进而引起疾病。如果在反应体系中加入具有清除羟自由基能力的物质,便会与水杨酸竞争羟自由基,使有色物质生成量减少。蚕蛹虫草多肽(相对分子质量<3.0×10<sup>3</sup> Da)清除 DPPH 自由基和羟自由基的活性见图 5a、b。

由图 5a 可知,在质量浓度 0~0.8 g/L 范围内,蚕蛹虫草多肽与抗坏血酸(V<sub>C</sub>)对 DPPH 自由基的清除作用均随样品质量浓度的增加呈上升趋势,之后随着质量浓度增加,抗氧化性增长趋势缓慢直至平稳。尽管多肽与 V<sub>C</sub>对 DPPH 自由基的清除作用存在一定的差距,但蚕蛹虫草多肽对 DPPH 自由基有显著的清除作用。

如图 5b 所示,在 0~3 g/L 质量浓度范围内,羟自由基的清除能力与样品质量浓度呈正相关。当样品质量浓度为 3 g/L 时,蚕蛹虫草多肽与 V<sub>C</sub>的羟自由基清除率分别为 50.42%和 92.67%,尽管两者清除羟自由基的能力存在一定的差距,但也表明,蚕蛹虫草多肽具有较强的提供电子或者氢原子能力。



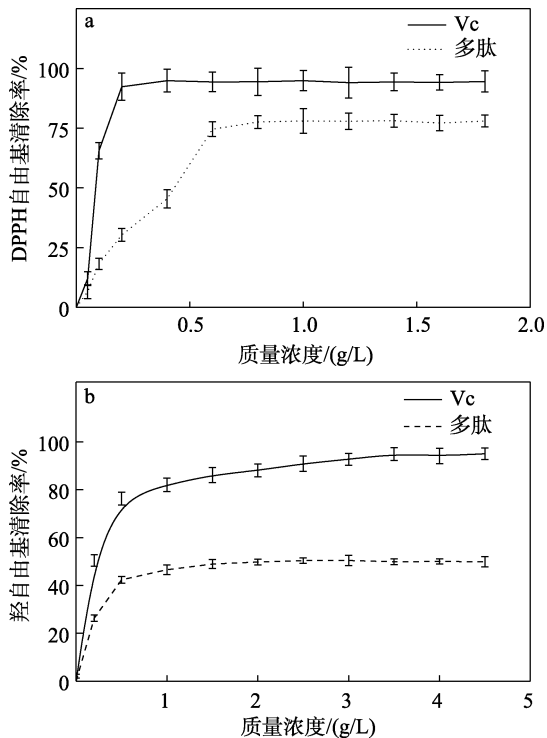


图 5 蚕蛹虫草多肽对 DPPH 自由基 (a) 和羟自由基 (b) 的清除作用  
Fig. 5 Scavenging rates of polypeptide in *Cordyceps militaris* to DPPH radicals (a) and OH radicals (b)

2.6 蚕蛹虫草多肽的抗菌活性

表 6 为蚕蛹虫草多肽对 3 种细菌的抑制效果。从表 6 可以看出, 蚕蛹虫草多肽 (相对分子质量 $<3.0 \times 10^3$  Da) 对 3 种细菌 (大肠杆菌、枯草芽孢杆菌及金黄色葡萄球菌) 均表现出较好的抑菌效果, 其抑菌圈分别为  $(12.08 \pm 0.22)$ 、 $(6.67 \pm 0.12)$  和  $(10.32 \pm 0.23)$  mm; 对于枯草芽孢杆菌的抑制作用较差, 这可能与枯草芽孢杆菌的结构及较强的抵抗力有关系, 这与宗静等<sup>[39]</sup>的研究结果一致。

表 6 蚕蛹虫草多肽的抑菌效果

Table 6 Bacteriostatic effect of *Cordyceps militaris* polypeptide

供试菌株	抑菌直径/mm
金黄色葡萄球菌 (革兰氏阳性)	$10.32 \pm 0.23^*$
枯草芽孢杆菌 (革兰氏阳性)	$6.67 \pm 0.12^*$
大肠杆菌 (革兰氏阴性菌)	$12.08 \pm 0.22^*$
头孢克肟	$10.86 \pm 0.22^*$

注: \*与对照组比较,  $P < 0.05$ 。

蚕蛹虫草多肽 (相对分子质量 $<3.0 \times 10^3$  Da) 对大肠杆菌的抑制效果高于阳性对照组 (头孢克肟), 原因可能与大肠杆菌属于革兰氏阴性菌有关, 革兰氏阴性菌的细胞壁一般比较薄。因此, 蚕蛹虫草多肽更容易透过细胞壁进入细胞, 从而干扰细菌的生理功能<sup>[40-41]</sup>。虽然蚕蛹虫草多肽对受试菌株的抑制效

果与阳性对照组差别不是很大, 但酶法获得的蚕蛹虫草多肽毒性较低, 生物相容性高, 比直接使用抗生素要安全。因此, 蚕蛹虫草多肽比常规抗生素更具有临床应用的优势。

2.7 蚕蛹虫草多肽的抗癌活性

蚕蛹虫草多肽 (相对分子质量 $<3.0 \times 10^3$  Da) 对骨肉瘤 Sao-S 细胞和膀胱癌 T24 细胞的细胞毒性作用见图 6。

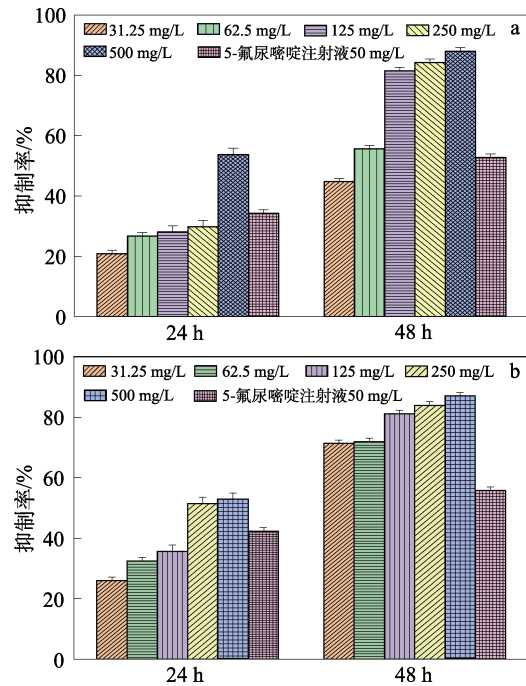


图 6 蚕蛹虫草多肽对骨肉瘤 Sao-S (a) 和膀胱癌 T24 细胞 (b) 的抑制率  
Fig. 6 Inhibition rates of *Cordyceps smilitaris* polypeptide on osteosarcoma cancer Sao-S cells (a) and bladder cancer T24 cells (b) at different mass concentrations

由图 6a 可知, 不同质量浓度的蚕蛹虫草多肽对骨肉瘤 Sao-S 细胞分别作用 24、48 h, 结果显示, 随蚕蛹虫草多肽质量浓度的增加以及作用时间的延长, Sao-S 细胞增殖抑制率逐渐增加, 半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 为  $0.49$  mg/L。不同质量浓度的蚕蛹虫草多肽对膀胱癌 T24 细胞分别作用 24、48 h, 结果显示, 随着蚕蛹虫草多肽质量浓度的增加以及作用时间的延长, T24 细胞增殖抑制率逐渐增加 (图 6b),  $IC_{50}$  为  $0.23$  mg/L。由此看来, 蚕蛹虫草多肽 (相对分子质量 $<3.0 \times 10^3$  Da) 和阳性对照组可以有效抑制肿瘤细胞的生长, 并且对不同肿瘤细胞系的抑制作用效果不一致。这可能由于不同癌细胞对蚕蛹虫草多肽的敏感程度不同。在本实验中蚕蛹虫草多肽对两种癌细胞均有非常好的抑制效果。原因可能是蚕蛹虫草多肽相对分子质量小, 进入癌细胞后可以激活细胞内凋亡因子, 从而诱发细胞凋亡, 可以通过改变

线粒体膜电位增加细胞内活性氧簇的产生, 导致细胞的氧化损伤死亡; 除此之外, 小分子肽也可以与细胞内的一些蛋白质和酶结合, 进而影响它们的功能和活性, 甚至可以破坏 DNA 双链结构或者直接结合 DNA 来干扰其复制<sup>[41]</sup>。因此, 具有小相对分子质量的蚕蛹虫草多肽可以进入癌细胞, 影响癌细胞正常的结构和功能, 最终导致癌细胞死亡。

### 3 结论

(1) 通过单因素结合正交实验的方法对蚕蛹虫草蛋白质的提取工艺条件进行优化, 当提取条件为: pH 8.5、料液比 1:28、提取时间 3.5 h、提取 3 次; 蛋白质含量最高, 可达到 45.06%。

(2) 通过单因素结合正交实验的方法对蚕蛹虫草多肽的制备工艺条件进行优化, 最佳工艺为: 碱性蛋白酶与木瓜蛋白酶活力比 4:3、酶解最佳 pH 7.2、温度 55 °C、加酶量 7000 U/mL、酶解时间 3.5 h, 多肽含量为 16.73%。

(3) 在此酶解条件下制备所得蚕蛹虫草多肽(相对分子质量 $<3.0 \times 10^3$  Da)对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌及金黄色葡萄球菌均表现出较好的抑菌效果; 同时, 对骨肉瘤 Sao-S 细胞和膀胱癌 T24 细胞有很好的增殖抑制作用。

(4) 在本文所建立的复合酶解条件下, 所制备的蚕蛹虫草多肽具有良好的生物活性和较强的抗菌抗癌活性, 具有潜在的医药应用价值。

### 参考文献:

- [1] NXUMALO W, ELATEEQ A A, SUN Y F. Can *Cordyceps cicadae* be used as an alternative to *Cordyceps militaris* and *Cordyceps sinensis*?—A review[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 257: 112879.
- [2] YANG X Q, LIN P, WANG J, et al. Purification, characterization and anti-atherosclerotic effects of the polysaccharides from the fruiting body of *Cordyceps militaris*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 181: 890-904.
- [3] SINGPOONGAN, RITTIRON R, SEANG-ON B, et al. Determination of adenosine and cordycepin concentrations in *Cordyceps militaris* fruiting bodies using near-infrared spectroscopy[J]. ACS Omega, 2020, 5(42): 27235-27244.
- [4] LIU Y T (刘元涛), WANG J R (王建瑞), LI H (李虹), et al. Effects of enriching chromium ion on biomass and chemical composition of fruit body of *Cordyceps militaris*[J]. Mycosystema (菌物学报), 2022, 3(25): 1-11.
- [5] GUO J K (郭静科), YU X W (俞晓卫), LIU S T (刘树滔), et al. Antioxidant properties of powders of *Cordyceps militaris* fungus, sporophore and mycelium and their effect on body surface along acupuncture meridians[J]. Journal of Food Science and Technology (食品科学技术学报), 2022, 40(1): 93-99.
- [6] ZUO J H (左锦辉), GONG X Y (贡晓燕), DONG Y M (董银卯), et al. Research achievements in bioactive components, pharmacological effects and applications of *Cordyceps militaris*[J]. Food Science (食品科学), 2018, 39(21): 330-339.
- [7] XIE B (谢博), FU H (傅红), YANG F (杨方). Research progress on preparation purification, identification and structure-activity relationship of bioactive peptides[J]. Science and Technology of Food Industry (食品工业科技), 2021, 42(5): 383-391.
- [8] ZONG J (宗静). Studies on extraction and separation and some biological activities of peptides from fruiting bodies of *Cordyceps militaris*[D]. Chongqing: Southwest University (西南大学), 2012.
- [9] QIAN W W (钱卫文), QIAN K N (钱康南), ZHANG T B (张天宝). The preparation methods and applications of *Cordyceps* polypeptide: CN1314813C[P]. 2007-05-09.
- [10] XU H Y (徐鸿雁), MENG S N (孟胜楠), ZHANG S Y (张疏雨), et al. Study on the technology of protein degradation of *Cordyceps militaris*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology (中国食品学报), 2014, 14(4): 127-135.
- [11] JACK H, WONG J H, NG T B, et al. Cordymin, an antifungal peptide from the medicinal fungus *Cordyceps militaris*[J]. Phytomedicine, 2011, 18: 387-392.
- [12] JIANG H P (蒋海萍), LIAO D K (廖丹葵), TONG Z F (童张法). Research progress of antioxidative peptides[J]. Guangxi Sciences (广西科学), 2015, 22(1): 60-64.
- [13] GUO S (郭尚), XU L N (徐莉娜), LI Y T (李艳婷), et al. Screening of excellent strains of *Cordyceps militaris*[J]. Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition) (山西农业大学学报: 自然科学版), 2020, 40(1): 17-21.
- [14] GUO S (郭尚), XU L N (徐莉娜), LI Y T (李艳婷), et al. High efficient cultivation techniques of silkworm *Cordyceps militaris*[J]. Edible Fungi (食用菌), 2019, 41(3): 46-48.
- [15] ZHANG Y, LI Y J, HUANG J Y, et al. Comparison of characteristics and contents of *Cordyceps militaris* cultivated with pupae of different tussah silkworm varieties[J]. North Sericulture (北方蚕业), 2022, 43(2): 7-11.
- [16] ZHANG N (张囡). Study on preparation, separation and biological activity of *Lentinus Edodes* stalk polypeptide[D]. Xi'an: Northwest University (西北大学), 2019.
- [17] XU L N, GUO S, ZHANG S W. Effects of solid-state fermentation on the nutritional components and antioxidant properties from quinoa[J]. Emirates Journal of Food and Agriculture, 2019, 31(1): 39-45.
- [18] XU L N, GUO S, ZHANG S W. Effects of solid-state fermentation with three higher fungi on the total phenol contents and antioxidant properties of diverse cereal grains[J]. Fems Microbiology Letter, 2018, 365(16): 132-140.
- [19] WU Q (吴淇), ZOU L H (邹亮华), HU X Y (胡学一), et al. Synthesis and antioxidant and bacteriostatic properties of cannabidiol analogs[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2022, 39(3): 584-591.
- [20] GAO L (高莉), LIU L L (刘琳琳), WANG R Q (王瑞琪), et al. Preparation and property of amino acid modified melanin derived from apricot kernel shells[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2022, 39(7): 1393-1401.
- [21] CHENG S (程爽), HE F (贺斐), FU L Y (付龙洋), et al. Preparation of selenium polysaccharide from *Rabdosia rubescens* and analysis of its antioxidant activity[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2021, 38(10): 2064-2071.
- [22] LIANG Y Q (梁永琴), YANG X H (杨喜花), ZHAO L L (赵莉莉), et al. Screening of antibreast cancer active components and effect of *Sappanl* L.[J]. Journal of Shanxi University (National Science Edition) (山西大学学报: 自然科学版), 2022, 45(2): 465-472.
- [23] ZHANG J F (张建锋). Analysis of nutritional components and health care function of edible fungi[J]. Edible Fungus of China (中国食用菌), 2020, 39(7): 185-187.
- [24] LI S (李思), MENG M (孟萌), MA Y H (马彦华), et al. Optimization of protein extraction from *Morchella* by response surface methodology[J].

- Journal of Food Safety and Quality (食品安全质量检测学报), 2020, 11(7): 2090-2095.
- [25] BAO C J (鲍长俊), CHANG W D (常惟丹), ZHUANG Y L (庄永亮), *et al.* Nutritional characteristics and protein composition of fruiting bodies of *Boletus griseus*[J]. Food Science (食品科学), 2017, 38(20): 83-89.
- [26] MA L F (马利芳), LIANG J Q (梁建庆), HE J C (何建成), *et al.* Research progress on the role of glutamate transporter in the pathogenesis of Parkinson's disease[J]. Basic and Clinical Medicine (基础医学与临床), 2021, 41(12): 1813-1817.
- [27] DU R P (杜瑞平), YUN F Y (云伏雨), ZHANG X F (张兴夫), *et al.* Regulation and mechanism of glycine on mammary gland inflammatory response in dairy goats[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition (动物营养学报), 2019, 31(7): 3110-3122.
- [28] LIU Z P (刘振鹏), GUO Y Y (郭英英), LIU J J (刘京晶), *et al.* Effect of strains and parts on amino acids of *Dendrobium officinale*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica (中国中药杂志), 2015, 40(8): 1468-1472.
- [29] LU W (卢伟), LU N (陆宁). Analysis of compositions and contents of amino acids in barley leaf powder[J]. Food and Machinery (食品与机械), 2018, 34(10): 35-39.
- [30] ZHANG Q Y (张倩雯), WANG P F (王鹏飞), CONG G L (丛光雷), *et al.* Effects of selenium and tyrosine on antioxidant function, immunoglobulin, tyrosinase active and melanin deposition of lingyun black bone chicken[J]. Siliang Gongye (饲料工业), 2021, 42(14): 20-27.
- [31] ZHANG L (张乐), CHEN R H (陈润花), MEN J (门靖). Research progress in the analysis and detection of tyrosine[J]. Fine Chemical Intermediates (精细化工中间体), 2022, 52(2): 1-4.
- [32] CUI X R (崔晓瑞), WANG L (王丽), SHI F F (石菲菲), *et al.* Optimization of extraction process of *Stropharia rugosoannulata* protein by ultrasonic-assisted alkali[J]. Journal of Food Safety and Quality (食品安全质量检测学报), 2020, 11(20): 7536-7543.
- [33] LIU J (刘晶), HU X (胡晓), YANG X Q (杨贤庆), *et al.* Extraction and antioxidant activity of enzymolysis products of *Gracilaria lemaneiformis* protein[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis (浙江农业学报), 2022, 34(5): 1061-1072.
- [34] SUN C Z (孙崇臻). Enzymatic preparation, structural identification and the immunological activity of antioxidant peptides isolated from mulberry leaf protein[D]. Guangzhou: South China University of Technology (华南理工大学), 2017.
- [35] DAI D Q (戴丹琴), WENG P F (翁佩芳). Preparation of cow leather collagen polypeptide with complex enzyme [J]. Fine Chemicals (精细化工), 2013, 30(5): 561-565.
- [36] LEI L (雷蕾), ZHANG W (张炜), LIU L (刘龙), *et al.* Complex enzyme assisted ultrasonic extraction of saponins from quinoa husk and its antioxidant activity[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2019, 36(3): 469-474.
- [37] JOEN Y J. Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultra filtration membrane[J]. Process Biochemistry, 1999, (35): 471-478.
- [38] ÖZTÜRK M, AYDOĞMUŞ-ÖZTÜRK F, DURU M E, *et al.* Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant[J]. Food Chemistry, 2007, 103(2): 623-630.
- [39] ZONG J (宗静), LI J (李竞). Extraction, isolation and composition of polypeptides from *Cordyceps militaris* fruiting body[J]. Chinese Medical Guide (中国医药指南), 2011, 9(35): 315-316.
- [40] DADASHPOUR M, FIROUZI-AMANDI A, POURHASSAN M M, *et al.* Biomimetic synthesis of silver nanoparticles using *Matricaria Chamomilla* extract and their potential anticancer activity against human lung cancer cells[J]. Materials Science and Engineering C-Materials for Biological Applications, 2018, 92: 902-912.
- [41] PEI J W, FU B F, JIANG L F, *et al.* Biosynthesis, characterization, and anticancer effect of plant-mediated silver nanoparticles using *Coptis chinensis*[J]. International Journal of Nanomedicine, 2019, 14: 1969-1978.

(上接第 2473 页)

- [27] ZHI M J, YANG F, MENG F K, *et al.* Effects of pore structure on performance of an activated-carbon supercapacitor electrode recycled from scrap waste tires[J]. Sustainable Chemistry & Engineering, 2014, 2(7): 1592-1598.
- [28] CHEN L, ZHANG Y Z, LIN C H, *et al.* Hierarchically porous nitrogen-rich carbon derived from wheat straw as an ultra-high-rate anode for lithium ion batteries[J]. Journal of Materials Chemistry A, 2014, 2(25): 9684-9690.
- [29] GUO N N, LI M, SUN X K, *et al.* Enzymatic hydrolysis lignin derived hierarchically porous carbon for supercapacitors in ionic liquids with high power and energy densities[J]. Green Chemistry, 2017, 19(11): 2595-2602.
- [30] ZHANG B W, JAOHARI A E, WU X R, *et al.* Synthesis and characterization of PEDOT-MC decorated AgNPs for voltammetric detection of rutin in real samples[J]. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2020, 877: 114632-114640.
- [31] SALAHANDISH R, GHAFARINEJAD A, NAGHIB S M, *et al.* Sandwich-structured nanoparticles-grafted functionalized graphene based 3D nanocomposites for high-performance biosensors to detect ascorbic acid biomolecule[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 1226-1237.
- [32] ZHAN T R, SUN X Y, WANG X Z, *et al.* Application of ionic liquid modified carbon ceramic electrode for the sensitive voltammetric detection of rutin[J]. Talanta, 2010, 82(5): 1853-1857.
- [33] ZHANG J J, MEI Q W, DING Y P, *et al.* Ordered mesoporous NiCo<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanospheres as a novel electrocatalyst platform for 1-naphthol and 2-naphthol individual sensing application[J]. Applied Materials & Interfaces, 2017, 9(35): 29771-29781.
- [34] NIU X L, WEN Z R, LI X B, *et al.* Fabrication of graphene and gold nanoparticle modified acupuncture needle electrode and its application in rutin analysis[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2018, 255: 471-477.
- [35] JIN J (金晶). Determination of rutin based on platinum nanoparticles modified electrode[J]. Chemical Sensors (电化学传感器), 2020, 40(3): 61-65.
- [36] WANG Y H (王玉华). Electrochemical sensor for the detection of rutin based on polymethylene blue film[J]. Shandong Chemical Industry (山东化工), 2020, 49(10): 90-95.
- [37] QI Y D (齐焯迪), ZHANG S Q (张诗琪), ZHOU X Y (周鑫悦), *et al.* Construction and application of rutin electrochemical sensor based on nano-silver-TiO<sub>2</sub>-chitosan complex modified electrode[J]. Journal of Jingtangshan University (Natural Science) (井冈山大学学报: 自然科学版), 2019, 40(2): 10-14.
- [38] FENG L B (冯利彬), QI W (齐威), SU R X (苏荣欣), *et al.* Electrochemical determination of rutin based on poly-(melamine) and gold nanoparticle modified glassy carbon electrode[J]. Journal of Instrumental Analysis (分析测试学报), 2014, 33(9): 1019-1025.