



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102987408 B

(45) 授权公告日 2014. 01. 15

(21) 申请号 201210394932. X

CN 102379421 A, 2012. 03. 21,

(22) 申请日 2012. 10. 17

刘春泉等. 北冬虫夏草多糖组分的分离纯化及结构研究进展.《食品科学》. 2007, 第 28 卷(第 1 期), 370-373.

(73) 专利权人 徐州鸿宇农业科技有限公司

地址 221200 江苏省徐州市睢宁县睢宁现代农业示范区环宇西路 99 号

谢红旗等. 酶法提取蛹虫草中虫草素的研究.《时珍国医国药》. 2011, 第 22 卷(第 9 期), 2145-2147.

(72) 发明人 杨杰 李祥麟 张海燕 石玉洁

王春梅等. 蛹虫草培养基的酶水解研究.《食品工业科技》. 2005, (第 9 期), 132-133, 及 136.

(51) Int. Cl.

A23L 1/305(2006. 01)

A23L 1/30(2006. 01)

A23L 1/00(2006. 01)

A23J 1/00(2006. 01)

陈力宏等. 酶法制备蚕茧层抗氧化多肽水解液的研究.《蚕业科学》. 2006, 第 32 卷(第 3 期),

审查员 姜维

(56) 对比文件

CN 1218636 A, 1999. 06. 09,

CN 1724682 A, 2006. 01. 25,

CN 101104860 A, 2008. 01. 16,

CN 101469338 A, 2009. 07. 01,

CN 102000121 A, 2011. 04. 06,

CN 102389072 A, 2012. 03. 28,

权利要求书1页 说明书11页

(54) 发明名称

从蛹虫草废茧中提取游离氨基酸等营养成分的方法

(57) 摘要

从蛹虫草废茧中提取游离氨基酸等营养成分的方法,目的就是从小虫草废茧中提取多种保持天然活性的营养物质,提高蛹虫草及茧的利用率,供制不同类型的营养保健品使用.其特征是通过冻融,组合酶解,和水提醇沉淀分步提取法,其中的酶一般以 2 种酶配合使用,其水解温度分别为:木瓜蛋白酶的水解温度为 45℃ ±2℃,溶菌酶,果胶酶,淀粉酶,胃蛋白酶,胰蛋白酶的水解温度为 37±2℃;菠萝酶,糖化酶,红曲霉,纤维素酶的水解温度为 35±2℃;酶的用量为:每酶解 1 公斤蛹虫草茧粉时,加入食品用的溶菌酶 1 克,淀粉酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶各 2 克,菠萝酶、糖化酶、红曲霉、纤维素酶各 3 克,果胶酶 4 克。

1. 从蛹虫草和蛹虫草混合粉中提取营养物的方法,其特征包括如下步骤:

A. 取蛹虫草和蛹虫草混合粉在蒸馏水中浸泡,蛹虫草/虫草/水为 1:0.5:1.5,室温下过夜, -20°C 环境下反复冻融 2-4 次,6000g 离心 15 分钟取上清液;

B. 组合酶解提取,冻融后的蛹虫草和虫草渣加蒸馏水 5~10 倍,加溶菌酶和果胶酶水解 2-3 小时,再分别加淀粉酶,木瓜蛋白酶,胃蛋白酶,胰蛋白酶,菠萝酶,糖化酶,红曲霉,纤维素酶,各水解 0.5~1.0 小时,离心取上清液;

C. 酶解后的蛹虫草和虫草渣加蒸馏水 5~10 倍,在 80°C 搅拌提取 2 次,离心合并上清液;

随后,将上述流程 A、B、C 中获得的上清液合并后置不锈钢或玻璃容器内,大火煮沸,小火维持 3-4 小时,然后过滤,滤液继续加热浓缩至体积量的 $1/4 \sim 1/5$,倒入洁净容器内计量,冷却,沉淀;

取冷却后浓缩液,勿将沉淀残渣带入,缓慢加入普通酒精,其中酒精加入量(ml)= $75 \times$ 浓缩液(ml),当混合液中酒精浓度为 75% 时,多糖成絮状物下沉;

静置过夜后,待多糖等物全部沉至底部时,先用虹吸去掉部分上清液,沉淀液 3500g 离心 15 分钟得到粘稠膏状物,真空干燥后呈咖啡棕色块状物,粉碎即蛹虫草的营养提取物;

其中,所述的流程 B 中所述的酶的用量为:每酶解 1 公斤蛹虫草和蛹虫草混合粉时,加入食品用的溶菌酶 1 克,淀粉酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶各 2 克,菠萝酶、糖化酶、红曲霉、纤维素酶各 3 克,果胶酶 4 克。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,所述的流程 B 中的酶的水解温度分别为:木瓜蛋白酶的水解温度为 $45^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$,溶菌酶,果胶酶,淀粉酶,胃蛋白酶,胰蛋白酶的水解温度为 $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$;菠萝酶,糖化酶,红曲霉,纤维素酶的水解温度为 $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

从蛹虫草废茧中提取游离氨基酸等营养成分的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种从蛹虫草废茧中提取游离氨基酸等营养成分的方法。

背景技术

[0002] 目前世界上有很多国家已风行食蚕蛹；美国人用蚕蛹做夹心巧克力，澳大利亚普遍使用蚕蛹，法国人把蚕蛹视为高蛋白美味珍品，售价昂贵。欧洲很多国家也有食蚕蛹的，因此市场上出现多种蚕蛹食品如：蚕蛹饼干，蚕蛹奶，蚕蛹酒，蚕蛹罐头等等。

[0003] 研究表明：每公斤蚕蛹干品含蛋白质约 60 克，脂肪 30 克，甲壳素 1 克，18 种氨基酸，其中有 8 种是人体必需的，而且含量的比例适宜。符合联合国粮食组织 (FAO) 和世界卫生组织 (WHO) 标准，还有 Ca、P、Fe 等多种矿物质及丰富的维生素 B1、B2 和 E 及微量元素硒，亚油酸，亚麻酸等，其营养价值超过鸡蛋 14.7%，鲜牛奶 4%。

[0004] 蚕蛹在我国应用与食疗保健已有悠久历史。《太平御览》记载“碟元极肥美”，明代《本草纲目》把蚕蛹列为滋补药；《东医宝鉴》称“蚕蛹性平，味甘无毒，治小儿疳积，劳瘦，消渴”。其中“疳积”相当于现代小儿营养不良而导致的疾病。所谓“劳瘦”是由于营养不良，免疫功能低下而导致精神萎靡不振，体虚羸瘦，衰弱多病。由此可见我们祖先早就对蚕蛹的营养价值有了认识。我国很多地方都有食蚕蛹和将它作为饲料养猪或做畜牧水产的饲料。

[0005] 冬虫夏草 *Cordyceps Sinensis* (Beck) Sacc. ? 通过深入研究发现“中华被毛孢 *Hirsutella*

[0006] *Licc, Guo, Yu et Zong*”是冬虫夏草的真正无性型。(梁家琦 2003) 是我国特有的物种。早在公元 1590 年李时珍著《本草纲目》将冬虫夏草命名为“雪蚕”，说明其味极甘美。1964 年汪昂之著《本草备要》，1756 年赵学敏著《本草纲目拾遗》，1757 年吴仪洛著《本草从新》，都论述其有强壮、滋补、解毒、化痰等功能。徐岷在其著《柳崖外编》中说，虫草和鸭炖食，大补。《桔园小识》中也述：“凡病后调养及虚损人，每服一(虫草)鸭，可抵参一两。”由此可见古人对虫草的药用价值评价很高。(胡昭庚 1999. 2)

[0007] 现代医理研究表明，冬虫夏草中含有虫草酸、虫草素、氨基酸、维生素、矿物元素及多种生物活性物质，具有提高免疫力、抗肿瘤及延缓衰老等功能，因此用量大增，甚至导致掠夺性的采挖，其生长又需特殊的生态环境，促使该物种已濒临灭绝(李祥麟、黄檀溪 2004)。因此，寻找其新品(资源)，已受到国内外很大的重视。

[0008] 蛹虫草(又称北冬虫夏草，北虫草) *Cordyceps milotaris* (Lex. Fr.) Link, 它是虫草属中的又一种真菌。寄生在鳞翅目等多种昆虫的蛹体发育而成的复合体，它遍布于全球各地，我国吉林、河北、陕西、安徽、广西、云南、甘肃等省都有发现。该虫草原为野生，也具有药用滋补功效，但产量极少。据《新华本草纲要》载“蛹虫草味甘、性平，有益肝肾、补精髓、止血化痰”的功能；《全国中草药汇编》记载，蛹虫草的子实体及虫体也可作为冬虫夏草入药。由此可见，蛹虫草与冬虫夏草有相同的药理功能及临床效果。

[0009] 蛹虫草的人工培育：

[0010] 国内外的试验研究结果表明，蛹虫草内含有有效成分，有些已经超过天然野生的冬

虫夏草,它们可以部分代替已濒临灭绝的冬虫夏草。由于蛹虫草的使用,需求量日益增大,其自身资源日趋减少。但是为了满足人们日益增长的保健、医药研发的需求,人们竞相对其进行人工培养的试验。

[0011] 自 1983 年起,我们先后在安徽黄山,甘肃马鞘岭等地采集到野生的蛹虫草,经 7 年反复试验,终于在 1990 年将采自甘肃马鞘岭的蛹虫草菌种经驯育培养成功,各项测试结果均优于其他地点的菌种(株)。在此基础上扩大培育成功,并能批量生产完整的蛹虫草复合体,供各项试验、应用。至此我们将乌鞘岭的菌种命名为 *Cordyceps militaris*-LS901 菌株,详见附件 1:菌种。该菌株得到南京大学生物系,台湾中央研究院植物研究所及日本河北泻湖沼研究所等认同。

[0012] 蛹虫草人工培育的成功,为医疗保健食品行业提供了广阔的发展空间,满足了市场的需求。但是对于蛹虫草工业加工后废弃的蛹虫草体,由于技术瓶颈,大多不再进一步加以利用。

发明内容

[0013] 从蛹虫草废茧中提取游离氨基酸等营养成分的方法,目的就是蛹虫草废茧中提取多种保持天然活性的营养物质,提高蛹虫草及茧的利用率,供制不同类型的营养保健品使用。

[0014] 我们将蛹虫草培育成功后,向相关检测部门提交了样品,检测结果如下:

[0015] 一、蛹虫草与冬虫草的有效成分比较

[0016] 表 1. SOD 活性及虫草素,腺嘌呤的比较

[0017]

样品	SOD 活性	虫草素 mg. g ⁻¹	腺嘌呤
蛹虫草	57 μ . ml ⁻¹	3.08	0.542
冬虫夏草	14 μ . ml ⁻¹	1.04	0.138

[0018] 表 2. 元素含量比较(PPm) 检出元素 30 种,现仅列部分

[0019]

样品	元素									
	Ni	Ca	Fe	Cu	Mn	Zn	P	K	Sc	Mg
冬虫夏草	5.68	153	986	18.8	74.0	98.6	38.6	28000	0.5	39.2
蛹虫草	6.78	648	541	23.0	31.5	258	44.3	36000	—	17.4

[0020] 表 3. 氨基酸含量比较:

[0021]

氨基酸	样品	
	蛹虫草	冬虫夏草
色氨酸	0.38	—
精氨酸	1.56	1.46
苯胺酸	1.36	0.98
丙氨酸	1.86	1.36
蛋氨酸	1.03	0.68
异亮氨酸	0.98	0.73
酪氨酸	1.56	0.78
天冬氨酸	2.43	1.95
苯丙氨酸	0.86	0.79
脯氨酸	2.35	1.86
组氨酸	—	0.68
谷氨酸	2.78	3.84
丝氨酸	1.46	1.04
脯氨酸	1.04	2.33
甘氨酸	1.84	1.63
胱氨酸	0.38	0.30
缬氨酸	1.34	1.25
甲硫氨酸	0.~8	0.15
亮氨酸	2.01	2.25
总含量	25.5	24.05

[0022] 除上列物质外,尚含有:

[0023] 珂肽类:含多种脯环二肽,亮环二肽,缬环二肽等。其中 L- β -L-亮环二肽具有抗癌和增加(强)免疫力的作用。

[0024] 核苷类:尿嘧啶,腺嘌呤,尿苷,腺苷,虫草素等。

[0025] 固醇类:胡萝卜苷,菜油固醇,麦角固醇, β -谷固醇等。

[0026] 有机酸:脂肪酸,油酸,亚油酸,亚麻酸,棕榈酸,硬脂酸,软脂酸等。

[0027] 生物碱及多胺类:烟酸,烟酰胺,酚性化合物等。

[0028] 二、蚕蛹虫草的药理作用及其保健功能

[0029] A、对免疫功能的影响

[0030] 1. 对单核-巨噬细胞系统及免疫器官功能的影响

[0031] 蛹虫草水提液能促进机体巨噬细胞的增殖,且对巨噬细胞系统的吞噬活性可能有激活作用,原理可能是虫草素(3-脱氧腺嘌呤核苷)促进脾脏 DNA 合成,加速脾细胞的分裂和增殖;据试验表明,蛹虫草还具有抗辐射作用。

[0032] 2. 对体液免疫的影响

[0033] 蛹虫草水提液能促进 B 细胞增殖和抗体的形成。

[0034] 3. 对细胞免疫的影响

[0035] 蛹虫草对 T 淋巴细胞转化有促进作用,虫草多糖是调节免疫功能的有效成分;蛹虫草对移植排斥反应有显著的抑制作用。

[0036] 蛹虫草对免疫系统的功能既有促进作用,也有抑制作用,呈现双向调节的特征。

- [0037] B、对中枢神经系统的影响
- [0038] 1. 镇静作用
- [0039] 蛹虫草水煎液能明显延长睡眠时间,有明显的镇静作用。
- [0040] 2. 抗惊厥作用
- [0041] 醇提物能明显延长惊厥发生的潜伏期。
- [0042] 3. 降温作用
- [0043] 4. 对脑内单胺氧化酶活性的影响
- [0044] 单胺氧化酶活性是衰老的标志,蛹虫草能抑制单胺氧化酶活性,延缓衰老。
- [0045] 5. 对大脑血流量的影响
- [0046] 蛹虫草醇提物能增加脑组织的营养性血流量。
- [0047] C、对心血管系统的影响
- [0048] 1. 对心脏的作用
- [0049] 蛹虫草水煎液能明显对抗各种心律失常及心肌缺氧,具明显的耐缺氧能力。
- [0050] 2. 扩张血管的作用
- [0051] 蛹虫草醇提物具降压作用。
- [0052] 3. 抗血小板作用
- [0053] 蛹虫草醇提物对血小板聚集有明显抑制作用,是较有希望的血栓防治剂。
- [0054] D、对呼吸系统的影响
- [0055] 1. 扩张支气管
- [0056] 蛹虫草水煎液能显著增强肾上腺素的做用。
- [0057] 2. 祛痰平喘作用
- [0058] 3. 防治肺气肿
- [0059] E、对代谢的影响
- [0060] 1. 糖代谢
- [0061] 蛹虫草水煎液具有显著降血糖作用,对胰岛的 β -细胞具有一定的保护作用。(预防和治疗糖尿病)
- [0062] 2. 脂代谢
- [0063] 蛹虫草水煎液能明显降低胆固醇、血浆 β -脂蛋白含量。
- [0064] 3. 能量代谢
- [0065] 蛹虫草水煎液能促进红细胞糖酵解途径生成 ATP;增高肝细胞能荷值;激活肌肉胞浆 CPK 活性,使 ADP 接受 CP 能量生成 ATP。
- [0066] F、对内分泌的影响
- [0067] 蛹虫草水煎液显示有雄激素样作用。
- [0068] G、对血小板生成的作用
- [0069] 蛹虫草水煎液肌肉注射,能使脾系数增加,脾巨核细胞增加,血中血小板升高;并对血小板数量和质量均有一定的保护作用。
- [0070] H、对应激反应的影响
- [0071] 1. 抗疲劳试验
- [0072] 2. 耐缺氧试验

[0073] 蛹虫草醇提物具有抗常压缺氧作用。

[0074] I、抗炎作用

[0075] 具明显的抗炎作用

[0076] J、抗病原微生物作用

[0077] 无明显的抗菌作用,有一定的抗阿米巴作用

[0078] K、抗肿瘤作用

[0079] 蚕蛹虫草有明显的抗肿瘤作用,主要原理是:肿瘤细胞 DNA 合成的一种前导物是 2-脱氧腺嘌呤核苷,而蛹虫草的活性成分虫草素(3-脱氧腺嘌呤核苷)能竞争性的结合(可逆性反应)肿瘤细胞 DNA 合成酶,从而影响肿瘤细胞的繁殖。

[0080] L、对肾脏的影响

[0081] 1. 对实验性肾炎的作用

[0082] 蚕蛹虫草对肾炎有很好的疗效,特别是早期治疗疗效更为显著,主要原理:蚕蛹虫草中的虫草多糖通过体液免疫调节,可以干扰原位免疫复合物形成,可使肾小球基底膜负电荷屏障得以保存,减少负电荷的丢失或排列紊乱,从而使蛋白尿减轻。

[0083] 2. 对实验性慢性肾功能衰竭的作用

[0084] 蚕蛹虫草醇提物能缓解氮质血症,减轻蛋白尿,纠正脂质代谢紊乱,促进肝脏蛋白合成,改善贫血,延缓慢性肾衰竭的进展。原理:能补充缺乏的必需氨基酸,特别是支链氨基酸,纠正细胞内外的氨基酸代谢紊乱,抑制肌蛋白的“净分解”,促进肝脏的蛋白质合成,从而改善蛋白质更新,缓解氮质血症。

[0085] 3. 药物性防护

[0086] M、保健功能

[0087] 自上世纪 50 年代加拿大科学家 Cuninghame 从蛹虫草中提取出虫草素后,各国的学者对蛹虫草及其内含物进行了深入的研究,人们发现蛹虫草内含多种氨基酸,维生素,微量元素, SOD, 虫草素, 虫草酸, 虫草多糖等生物活性物质,这些生物活性物质各具功能。

[0088] 1. 虫草素

[0089] 虫草素是种新型的广谱抗菌素,不仅对病毒,细菌,真菌都有明显的抑制作用,而且能够降低冠状动脉的血管阻力,增加冠状动脉血流,改善心肌的血液供应,降低心脏耗氧量,抗心律失常,降低血胆固醇和低密度脂蛋白,提高高密度脂蛋白,缓解血脂过高和动脉硬化,还具有调节胰岛素分泌降低血糖的作用更。从而间接地发挥预防血脂异常和动脉硬化。

[0090] 虫草素更能够阻断肿瘤细胞繁殖所必须依赖的物质——鸟苷酸的合成,破坏肿瘤细胞的代谢和营养,从而抑制肿瘤细胞的转移和增生。如将其与抗肿瘤药物(如环磷酰胺)联合使用,其抗肿瘤作用明显增强。虫草素还能增强大脑中—— 一元胺氧化酶活性。研究表明:老年人食用蛹虫草后,简易智能状态评分(MMSD)明显改善。试验用 D-半乳糖皮下注射小鼠,会引起小鼠快速衰老,而给予蛹虫草提取物则可以明显对抗这种衰老。

[0091] 2. 虫草酸

[0092] 虫草酸, D-甘露醇,能渗入肿瘤细胞 DNA,抑制肿瘤细胞 DNA 的复制。具有抗自由基,抗氧化,扩张血管,降低血小板聚集,防止心脑血管形成的作用;并有利尿,排除毒素,促进新陈代谢等功能。临床上用于治疗脑血栓,脑栓塞,血管痉挛,肾功能衰竭。

[0093] 3. 虫草多糖

[0094] 虫草多糖能促进 B 细胞, T 淋巴细胞增殖, 对单核巨噬细胞系统和 NK 细胞等有明显的激活作用, 能促进细胞转化, 激活机体的免疫活性细胞, 尤以淋巴细胞核淋巴因子, 增强免疫功能和提高机体免疫系统杀伤肿瘤细胞的能力。对老年慢性支气管炎, 肺原性心脏病有明显疗效, 并能提高肝脏的解毒能力, 起到护肝作用。

[0095] 蛹虫草还有:

[0096] ◇ 综合抗氧化作用, 氧自由基是人类新陈代谢过程中产生的一类基团, 它们非常活跃, 能破坏人体细胞膜甚至很多蛋白酶, 随着人体年龄的增大, 体内对抗自由基的物质也越来越少, 而蛹虫草含有的 SOD 可以从外部和内部增强人体抗氧自由基的能力。

[0097] ◇ 对中枢神经系统的调节作用: 蛹虫草的提取物能稳定中枢神经系统, 具有一定的镇静作用, 改善老年人的睡眠。

[0098] ◇ 蛹虫草提取物能提高人体细胞线粒体中的能量, 因而具有提高体能, 抗疲劳的功效, 增强抗寒能力, 因此, 蛹虫草具有明显的抗衰老功能。

[0099] 为提供更广泛和更深入的综合应用, 我们在培育蚕虫草时, 对过去丢弃的蚕茧等也予以研发应用。并进行一系列的毒性试验, 以消除食用的疑虑, 使人们对其优异的营养保健性能有所再认识。

[0100] 三、理论研究及药理分析

[0101] 试验研究表明, 蚕茧含水 1.04%, 灰分 1.14%, 蛋白质 97.31%, 纤维 0.39%, 醚溶性浸出物 0.26%, 而蚕丝只要由 70% 纤维蛋白(Fibroin) 和 22% 丝胶蛋白(Seriein) 粘结而成, 并含少量的油脂类、色素、无机物等形成茧。

[0102] 丝胶蛋白为一种角蛋白, 其组成以甘氨酸、丙氨酸为多。10g 丝纤蛋白中含甘氨酸的克分子数为 578, 丙氨酸 381, 缬氨酸 67, 亮氨酸 7, 异亮氨酸 9, 丝氨酸 157, 苏氨酸 12, 酪氨酸 67, 苯丙氨酸 8, 脯氨酸 5, 色氨酸 2, 赖氨酸 4, 组氨酸 2, 精氨酸 6, 天门冬氨酸 17, 谷氨酸 13, 共有克分子 1297 个。

[0103] 茧含游离氨基酸 50mg%(以甘氨酸计), 又含油蜡状物质, 该物质由伯醇类($C_{26}-C_{32}$), 固体脂肪酸($C_{26}-C_{32}$), 石蜡($C_{25}-C_{31}$) 及液体脂肪酸组成, 及谷甾醇或葡萄糖甙和蛇麻脂醇(Lupeol)。

[0104] 茧有时呈黄橙, 粉红, 灰棕色, 绿色等颜色。主要是因为色素含各种胡萝卜素衍生物; 绿茧的色素由黄酮类或叶绿素, 尤以野生蚕为多。有人从绿色茧中分离出 7 种黄绿色荧光的色素及 2 种黄棕色荧光色素; 又有人分离出 9 种黄色荧光素, 它们都是黄酮类的葡萄糖甙, 从而具有特殊的医学检验价值。

[0105] 茧内含有 Mn 7.06mg / kg, Zn 3.19mg / kg, 而黄茧的 Mn 含量为 8.48mg / kg, Zn 3.67mg / kg, 并具有拟胆碱作用。

[0106] 据《本草纲目》记载, 蚕茧性甘, 温, 无毒。被用于治疗便血, 尿血, 血崩, 消渴, 反胃, 疔疮, 痈肿, 口腔糜烂。

[0107] 中国专利申请 ZL00124887.1 国际主分类号: C12N1 / 14 公开了利用蛹虫草粉制成胶囊的方法, 但是该胶囊中仅有单一的蛹虫草, 因此其中的营养、活性物质也较单一, 而且是直接以蛹虫草为原料。该蛹虫草没经生物工程技术酶处理, 所以实际吸收利用率较低; 更没有各种营养活性物质之间彼此的相辅协同作用。

[0108] 四、本发明的技术工艺：

[0109] 从蛹虫草废茧中提取游离氨基酸等营养成分的方法，其特征是通过冻融，组合酶解，和水提醇沉淀分步提取法：

[0110] A. 取蛹虫草，茧混合粉在蒸馏水中浸泡，蛹虫草 / 茧 / 水为 1:0.5:1.5，室温下过夜，-20℃环境下反复冻融 2-4 次，离心(6000g / 15 分钟)取上清液；

[0111] B. 组合酶解提取，冻融后的蛹虫草和茧渣加蒸馏水 5~10 倍，加溶菌酶和果胶酶水解 2-3 小时，再分别加淀粉酶，木瓜蛋白酶，胃蛋白酶，胰蛋白酶，菠萝酶，糖化酶，红曲霉，纤维素酶，各水解 0.5~1.0 小时，离心取上清液；

[0112] C. 酶解后的蛹虫草和茧渣加蒸馏水 5~10 倍，在 80℃搅拌提取 2 次，离心合并上清液；

[0113] D. 将上列(A. B. C)的上清液合并后置不锈钢或玻璃容器内，大火煮沸，小火维持 3-4 小时→过滤→滤液继续加热浓缩至体积量的 1 / 4 ~ 1 / 5，倒入洁净容器内计量，冷却，沉淀；

[0114] E. 取冷却后浓缩液，勿将沉淀残渣带入，缓慢加入普通酒精；

[0115] 酒精加入量(ml) = 75 × 浓缩液(ml)

[0116] 当混合液中酒精浓度约为 75% 时，多糖成絮状物下沉；

[0117] F. 静置过夜后，待多糖等物全部沉至底部时，先用虹吸去掉部分上清液，沉淀液离心(3500g / 15 分钟)得到粘稠膏状物→真空干燥后呈咖啡棕色块状物→粉碎，即蛹虫草茧的营养提取物。

[0118] 流程 B 中的酶一般以 2 种酶配合使用，其水解温度分别为：木瓜蛋白酶的水解温度为 45℃ ± 2℃，溶菌酶，果胶酶，淀粉酶，胃蛋白酶，胰蛋白酶的水解温度为 37 ± 2℃；菠萝酶，糖化酶，红曲霉，纤维素酶的水解温度为 35 ± 2℃；酶的用量为：每酶解 1 公斤蛹虫草茧粉时，加入食品用的溶菌酶 1 克，淀粉酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶各 2 克，菠萝酶、糖化酶、红曲霉、纤维素酶各 3 克，果胶酶 4 克。

[0119] 本发明的有益效果主要有：

[0120] 1. 由于采取了分步提取技术，使蛹虫草、茧中的营养成分被充分提取出来；

[0121] 2. 用酶解法提取时，使用不同的酶组合酶解，既提高了提取效果，又使蛋白质充分转化为游离氨基酸；

[0122] 3. 提取过程中不用酸和碱和任何有机溶剂等后处理，这既保持了天然活性，又不污染环境；

[0123] 4. 根据后产品的加工及其品质的不同，各步提取物既可分别使用，又可配合使用，从而使后产品的质量更进一步提高，效果更突出。

[0124] 5. 工艺简单，易于操作，可用于工业化生产。

具体实施方式

[0125] 按照本发明的工艺流程，将蛹虫草和茧混合均匀粉碎后，再经生物工程酶处理(分离，萃取，合成)提取其中的有效成分，经化验其主要成分为：游离氨基酸、活性多糖虫草素、蛋白质等。

[0126] 临床试验及结果分析

[0127] 一、毒性试验

[0128] 1. 小鼠急性毒性试验：

[0129] 选择体重 18~22g 健康小鼠 40 只雌雄各半。取蛹虫草粉按 20g / kg. bw 的剂量经口空腹一次灌胃，观察二周，记录中毒症状及死亡情况。

[0130] 结果在 14 天的观察期内，未见有任何中毒现象，无一只小鼠死亡。表明该蛹虫草茧粉对雌雄小鼠经口 LD₅₀ 均大于 10g / kg. bw。按急性毒性剂量分级标准属实际无毒级物质。

[0131] 2. 大鼠 30 天喂养试验

[0132] ①设三个剂量组，分别为 0.63g / kg. bw, 1.25g / kg. bw, 2.5g / kg. bw, 最高剂量已相当于成年人使用 150g / D, 达到了一般蔬菜的食用水品。

[0133] ②喂养方式：以大鼠体重的 10% 作为每天的摄入量，按计量配成不同蛹虫草·茧粉含量的粉状饲料，对照组给基础饲料自由摄入。

[0134] ③试验方法：选择 55~70g 断乳大鼠 40 只，雌雄各半，按体重随机分成 4 组，即对照组和 3 个剂量组。笼连续喂养 30d, 自由摄食和饮水，每天观察记录，每周称一次体重。第 30d 取尾血测血红蛋白，红、白细胞计数及白细胞分类等血液学指标；禁食 16h, 第 31d 断头取血，测 GPT, GOT, BUN, CRE, GLUC, TRIG, CHOL, TPRO, 和蛋白质等生化指标；解剖大鼠取心，肝，脾，肾，睾丸（卵巢）等脏器，观察变化并称重，计算脏器比；主要脏器进行病理检查。

[0135] 结果如下表 1、2、3、4

[0136] 表 1. 蛹虫草·茧粉对大鼠血液指标的影响

[0137]

性别	剂量 (g / kg)	动物数 (只)	红蛋白 (g / L)	红细胞数 (x10 ¹² / L)	白细胞数 (x10 ⁹ / L)	淋巴细胞 (%)	中性粒细胞 (%)
雌	对照	10	147.3±10.6	7.5±0.9	17.2±2.8	79.8±3.0	18.1±2.5
雌	0.63	10	139.6±8.8	6.7±0.8	19.2±3.7	81.3±2.9	17.6±2.6
雌	1.25	10	142.9±8.1	6.9±0.8	19.2±5.5	82.1±3.4	16.4±3.3
雌	2.50	10	141.7±7.2	6.6±0.8	19.4±3.9	80.8±5.8	18.0±5.3
	P 值		0.2649	0.1081	0.6020	0.6300	0.7058
雄	对照	10	148.2±9.8	7.3±0.8	16.2±3.4	79.0±5.1	18.5±4.7
雄	0.63	10	151.0±10.8	6.6±0.5	18.2±2.9	78.9±5.5	19.5±4.7
雄	1.25	10	148.3±11.8	7.0±0.7	18.7±4.0	80.0±5.0	18.0±4.0
雄	2.50	10	148.5±7.2	6.7±0.7	19.0±3.5	81.2±6.8	17.8±6.2
	P 值		0.9092	0.1083	0.2646	0.7807	0.8511

[0138] 表 2. 蛹虫草·茧粉对大鼠生化指标的影响(1)

[0139]

性别	剂量(g / kg)	动物数(只)	GPT (u / L)	GOT (u / L)	BUN (mmol / L)	CRE (μmol / L)	GLUC (mmol / L)
雌	对照	10	45.87±11.14	104.79±8.21	6.57±1.86	93.88±9.93	4.02±0.72
雌	0.63	10	46.21±21.55	112.16±14.73	6.36±1.96	95.93±14.00	4.55±1.00
雌	1.25	10	45.64±10.51	102.89±8.65	6.93±1.82	92.65±10.93	3.99±0.68
雌	2.50	10	55.80±6.63	110.54±10.35	6.78±1.79	92.24±15.02	5.00±1.33
	P 值		0.2828	0.1857	0.9100	0.9143	0.0752
雄	对照	10	60.45±4.99	99.26±16.06	6.77±2.17	97.17±12.40	4.31±0.42
雄	0.63	10	55.97±12.81	108.24±19.73	6.52±1.54	103.95±16.69	5.17±0.84
雄	1.25	10	58.15±11.17	111.37±15.51	6.75±1.51	78.58±28.83	4.78±1.22
雄	2.50	10	55.91±15.27	109.90±19.76	6.57±1.37	91.83±14.50	4.86±0.72
	P 值		0.7970	0.4383	0.9814	0.1271	0.0767

[0140] 表 3. 蛹虫草·茧粉对大鼠生化指标的影响(2)

[0141]

性别	剂量(g / kg)	动物数(只)	TRIG (mmol / L)	CHOL (mmol / L)	TPRO (g / L)	ALB (g / L)	A / G
雌	对照	10	0.73±0.15	1.76±0.41	73.98±8.77	35.52±2.69	1.04±0.30
雌	0.63	10	0.63±0.12	1.44±0.36	77.82±4.57	37.73±3.23	0.95±0.15
雌	1.25	10	0.59±0.16	1.76±0.27	71.80±5.84	36.31±2.64	1.12±0.23
雌	2.50	10	0.72±0.18	1.57±0.24	77.66±9.29	38.51±2.78	1.04±0.30
	P值		0.1498	0.0893	0.2079	0.0995	0.5206
雄	对照	10	0.73±0.23	1.87±0.34	76.20±4.17	36.85±2.63	1.03±0.17
雄	0.63	10	0.64±0.32	1.45±0.45	79.73±3.35	38.20±3.16	0.93±0.17
雄	1.25	10	0.71±0.19	1.54±0.29	77.87±3.17	72±2.67	0.97±0.25
雄	2.50	10	0.64±0.24	1.72±0.39	79.46±4.08	38.73±3.48	0.98±0.23
	P值		0.8135	0.0860	0.1429	0.5579	0.8018

[0142] 从表中结果分析可见,各剂量组与对照组以及各剂量组之间的血液学及血液生化指标均无显著差异,表明该蛹虫草·茧粉对大鼠的红细胞数、白细胞数及分类、血红蛋白含量以及肝、肾功能、脂代谢、蛋白质代谢、糖代谢均无不良影响。

[0143] 脏器重量及病理组织学检查 结果见表 5。

[0144] 表 4. 蛹虫草·茧粉对大鼠脏体比的影响

[0145]

性别	剂量(g / kg)	动物数(只)	心 / 体(%)	肝 / 体(%)	脾 / 体(%)	肾 / 体(%)	卵巢(孳丸) / 体(%)
雌	对照	10	0.36±0.05	3.42±0.21	0.28±0.05	0.74±0.04	0.058±0.015
雌	0.63	10	0.37±0.03	3.26±0.27	0.30±0.04	0.72±0.04	0.058±0.006
雌	1.25	10	0.33±0.04	3.20±0.31	0.28±0.08	0.71±0.07	0.059±0.007
雌	2.50	10	0.34±0.05	3.21±0.26	0.27±0.07	0.72±0.14	0.058±0.007
	P 值		0.1400	0.2300	0.8101	0.8998	0.9895
雄	对照	10	0.30±0.07	3.21±0.22	0.26±0.05	0.67±0.04	1.24±0.15
雄	0.63	10	0.33±0.05	3.31±0.19	0.29±0.03	0.71±0.06	1.27±0.11
雄	1.25	10	0.31±0.05	3.36±0.22	0.27±0.05	0.68±0.09	1.26±0.10
雄	2.50	10	0.32±0.05	3.33±0.28	0.28±0.05	0.71±0.09	1.29±0.12
	P 值		0.5061	0.4889	0.6879	0.4131	0.8289

[0146] 从表 4 可以看出,各量组与对照组以及各剂量组之间的脏器比无显著性的差异。表明该蛹虫草·茧粉对动物各脏器的生长发育无明显影响。病理检查均未见特异性病理改变。

[0147] 3. 大鼠致畸试验:选未交配过的 12 周大鼠,雌雄为 2:1,同笼,次晨检查阴栓和精子,发现阴栓和精子者定为受孕 0 天。将孕鼠随机分成 4 组,其中 3 组分别喂蛹虫草·茧粉 1.25g / kg. bw,0.63g / kg. bw,0.32g / kg. bw,对照组给蒸馏水,自由摄食饮水,每天添加一次花生以改善和增加营养。受孕的第 7-16 天经口灌胃蛹虫草·茧粉。受孕的第 0、7、12、16、20 天称其体重,观察孕鼠生长情况,视体重变化调整蛹虫草·茧粉的给喂量。怀孕 20 天,颈椎脱臼处死,取出子宫称重,辨认并记录胚胎着床,活胎,死胎及吸收胎数。对活胎鼠逐一称重,测量体长,检查外观畸形情况,结果见下表 5、6:

[0148] 表 5. 蛹虫草·茧粉对孕鼠体重的影响(X±SD)

[0149]

剂量(g / kg)	孕鼠数(只)	0 天(g)	7 天(g)	12 天(g)	16 天(g)	20 天(g)
阴性组	11	269.3±17.3	292.6±19.8	314.7±22.2	340.7±21.6	382.8±26.8
0.32	10	265.8±12.8	281.3±12.5	304.9±12.5	332.1±12.8	384.7±13.8
0.63	10	264.7±19.2	282.6±17.3	307.9±19.9	342.4±21.1	390.2±20.6
1.25	12	265.5±27.1	293.9±23.5	317.6±22.0	344.6±22.6	389.9±26.7
P 值		0.5705	0.2685	0.4022	0.4830	0.8287

[0150] 经检验,各剂量组与对照组比较,无明显差异,表明该蛹虫草·茧粉对孕鼠无毒性作用。

[0151] 表 6. 蛹虫草·茧粉对大鼠胚胎形成及胎鼠生长发育的影响

[0152]

剂量(g / kg)	受精鼠(只)	胎仔数(只)	孕鼠数(只)	均胎仔(只)	吸收胎(只)	死胎(只)	胎仔均体重(g)	胎仔均身长(cm)
阴性组	13	11	140	12.73	0	0	3.60±0.25	3.79±0.40
0.32	13	10	131	13.10	1	0	3.68±0.24	3.80±0.11
0.63	13	10	102	10.20	0	1	3.67±0.30	3.77±0.13
1.25	13	12	143	11.92	2	0	3.67±0.36	3.79±0.19
P 值							0.9830	0.8484

[0153] 由此可见,各剂量组与对照组比较无明显差异,表明对胎鼠形成及生长发育无明显不良影响。另外,经外观畸形检查、内脏检查、骨骼检查均未发现异常。

[0154] 二、结论:综上所述,人工培育的蛹虫草纯子实体和茧作为食品用于人体是安全的,完全可以广泛用于保健食品、保健膳食和其它滋补类食品。同时也表明了本发明对蛹虫草、茧的深加工及相关保健药食两用食品的生产具有独创性的贡献。