(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2020 年 9 月 10 日 (10.09.2020)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2020/177420 A1

(51) 国际专利分类号:
*C08B 37/00* (2006.01) *C07H 1/08* (2006.01)
*C07H 19/16* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/123517

(22) 国际申请日: 2019 年 12 月 6 日 (06.12.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201910156401.9 2019年3月1日 (01.03.2019) CN

(71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省无锡市蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。

(72) 发明人: 张 憋 (ZHANG, Min); 中国江苏省无锡市蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。 石浩 (SHI, Hao); 中国江苏省无锡市蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。 易思富(YI, Sifu); 中国江苏省无锡市蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。 郭小玲(GUO, Xiaoling); 中国江苏省无锡市蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。 侯丽华(HOU, Lihua); 中国江苏省无锡市蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。 阳武雄(YANG, Wuxiong); 中国江苏省无锡市蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(54) **Title:** ULTRASONIC COMPOSITE ACIDIC WATER EXTRACTION METHOD FOR CORDYCEPS POLYSACCHARIDE AND CORDYCEPIN IN CORDYCEPS MILITARIS

(54) 发明名称: 一种蛹虫草中虫草多糖和虫草素的超声波复合酸性水提取方法

(57) **Abstract:** Disclosed is an ultrasonic composite acidic water extraction method for a Cordyceps polysaccharide and cordycepin in Cordyceps militaris, which falls within the technical field of food processing. The method comprises: picking, washing, drying, pulverizing and degreasing Cordyceps militaris fruiting bodies to obtain a Cordyceps militaris dry powder; then immersing same in a prepared diluted hydrochloric acid solution to perform three cycles of ultra-low temperature freezing and microwave defrosting, and at the same time using low-frequency ultrasonic waves to carry out assisted stirring and extraction; then subjecting an extraction solution to evaporation and concentration treatments; and finally, performing freeze-drying on the extraction solution to collect a dry powder of a water extraction product. The amount of an additive used in the method meets domestic and foreign usage requirements of food additives, and the operation is simple and practical and uses a combination of chemical and physical methods, thereby saving time and being highly efficient.

(57) 摘要: 一种蛹虫草中虫草多糖和虫草素的超声波复合酸性水提取方法，属于食品加工技术领域。将蛹虫草子实体通过采摘、清洗、干燥、粉碎、脱脂得到蛹虫草干粉，然后再将其浸入配置好的稀盐酸溶液中，超低温冷冻-微波解冻循环3次，同时采用低频超声波辅助搅拌提取，再对提取液进行蒸发浓缩处理，最后对其冷冻干燥收集水提产物干粉。所述的方法中使用的添加剂用量符合国内外食品添加剂的使用要求，操作简便易行，采用化学与物理方法相结合，省时高效。

WO 2020/177420 A1

# 一种蛹虫草中虫草多糖和虫草素的超声波复合酸性水提取方法

## 技术领域

[0001] 本发明涉及一种蛹虫草中虫草多糖和虫草素的超声波复合酸性水提取方法，属于食品加工技术领域。

## 背景技术

[0002] 蛹虫草(Cordyceps militaris，CM)是中国传统的食用药用蘑菇，俗称北冬虫夏草，属子囊菌门和拟除虫菊科真菌，已被证明具有与冬虫夏草相似的药理作用。蛹虫草在亚洲许多国家，特别是中国已应用数百年，它含有丰富的具有生物和药理活性的特殊天然成分，如虫草素(3′-脱氧腺苷)、腺苷、虫草酸、SOD酶和虫草多糖。中医学认为，中药水提物具有滋养肺肾，缓解腰膝疼痛，帮助患者病后康复等功效。近年来的研究也证实了这些观点，在这些天然活性化合物中，虫草素是影响免疫细胞和细胞因子网络作用的重要免疫调节活性化合物，具有抗缺血再灌注损伤的作用。虫草素可以抑制小鼠黑色素瘤细胞的生长以及改善睾丸损伤而没有副作用。虫草多糖通过保护机体免受氧化应激而有效地改善免疫功能，其降血糖作用甚至比冬虫夏草多糖更强。

[0003] 在大部分草本植物活性成分提取工艺中，经常采用的提取技术主要包括热水回流提取、超声波辅助提取、微波辅助提取、酶解提取以及超高压提取和超临界液体提取等多种方法。其中影响虫草水提物（主要是虫草素和虫草多糖）的主要因素包括提取剂种类，提取时间，提取温度，料液比，提取次数和辅助技术参数等。大部分研究采取一种或两种提取方法得到虫草素或者虫草多糖活性成分较为单一，且提取得率较低。同时在分离纯化过程中会引入氯仿、正丁醇、乙酸乙酯、非食品级化学试剂等杂质，给蛹虫草活性成分的除杂带来麻烦，同时给食用安全带来较大隐患。

[0004] 从文献报道来看，在蛹虫草子实体提取剂选取上主要用到乙醇、去离子水、石油醚、三氯甲烷、PEG、正丁醇等溶剂，这些提取剂各有优缺点。利用石油醚做

提取剂时会导致虫草中的脂溶性物质大量析出而难以分离虫草素虫草多糖等极性物质；三氯甲烷等有机溶剂具有毒性，影响操作者的身体健康同时对防护措施要求更高，配套设施成本增加，故一般采用去离子水或者乙醇水溶液做提取剂，在获取单一成分时由于溶出物质中成分较复杂需要后续进行分离纯化工作，工艺繁复且成本较高，但对于获取蛹虫草中水溶性物质用水或醇作溶剂恰恰能提高子实体中活性成分析出。研究发现与酸热提取法、微波提取法、酸热微波提取法、丙酮提取法相比，酸热超声波提取法提取蛹虫草中的胡萝卜素等物质得率最高。根据相似相容及等电点原理，利用酸溶液提取蛹虫草子实体能通过增加极性水溶性物质在提取溶剂中的溶解度来提高最终水溶活性物质的得率。

[0005] 冻融提取技术是一种利用物理冷冻-溶解过程破坏细胞结构增加有效成分溶出的提取方法。物料在低温条件下，细胞内溶液尤其是水溶液形成胞内冰晶导致细胞体积增大，引起细胞膜疏水键结构破裂，进而导致细胞膜和细胞壁破裂；解冻时细胞壁内外两侧产生较大温差，产生冲击热应力，再次使得细胞壁破裂。多次冷冻-溶解过程循环进行造成物料细胞壁等结构严重破坏，最终增加了胞内物质的释放扩散和溶解，促进活性水溶性成分溶出。

[0006] 超声波提取技术主要利用超声波的机械破碎和空化作用破坏组织结构，加速提取物质从原料向溶剂扩散。当超声波在液体介质中传播时，液体介质不断收到拉伸和压缩作用形成空化泡，空化泡继续增大直至破裂，瞬间产生空化效应、高剪切力、破碎以及搅拌等多重效应。其中空化效应除了会对细胞壁产生损伤外同时使细胞内部的微流产生剪切力，另外空化效应还能在水介质中又到产生H·自由基和·OH自由基攻击细胞壁化学结构从而降低其机械强度更易破碎使内容物流出。同时联合冻融循环提取技术，有效提升物料体内活性成分的溶解和获取。

[0007] 邓华（专利申请号201410199236.2）公开了一种从蛹虫草中提取虫草素的工艺方法，通过醇提、浓缩、脱蜡、纯化、液膜萃取、精制和干燥。与现有技术相比，本发明工艺最为简单、生产周期短，有机溶剂用量少且可重复使用，产品得率高。与本发明相比，该提取方法较为复杂，液膜制备成本较高，且对提取

操作人员有一定要求，且生产过程中设备维护成本较高。

[0008] 张耀洲等人（201410041853.X）提供一种从蛹虫草中提取虫草素组分的方法，它包括以下步骤：取蛹虫草子实体超微粉碎，得到超微粉；超微粉用超纯水进行水提后取上清液干燥，然后用乙醇进行醇沉处理，离心，收集醇沉上清液，将醇沉上清液旋蒸后干燥，得到粗提物；将粗提物用15%甲醇-水溶液溶解至100 mg/mL，经制备液相DAC反相色谱柱进行分离，反相分离填料为C18，洗脱方式为先5%-15%甲醇-水溶液梯度洗脱、再15%甲醇-水溶液等度洗脱，检测波长260 nm，得到各组分经体外抗肿瘤活性筛选后，选取活性最强的组分即为目的虫草素组分。该方法简单可控，重复性好，提取得到的组分中虫草素含量高，批次稳定，但在分离纯化过程中会引入甲醇试剂且经制备色谱洗脱分离后并未做后一步结晶处理，所得溶液不易储存。而本方法中经冷冻干燥后水提液结晶成粉，便于包装成品。

[0009] 张耀洲等人（201410041854.4）提供一种从蛹虫草中提取抗肿瘤活性组分的方法：蛹虫草子实体超低温粉碎；得到超微粉水煮提取，沉淀再丙酮提取；得到沉淀溶解后过液相色谱，洗脱试剂为100%正己烷、25%乙酸乙酯-正己烷、100%乙酸乙酯；选取活性最强组分过液相色谱，洗脱试剂为100%正己烷、10%乙酸乙酯-正己烷、15%乙酸乙酯-正己烷、30%乙酸乙酯-正己烷、60%乙酸乙酯-正己烷；选取活性最强组分过液相色谱，洗脱试剂为100%二氯甲烷、25%二氯甲烷-甲醇，选取活性最强组分过液相色谱，洗脱试剂为100%正己烷、5%乙醇-正己烷，选取活性最强组分即为本发明目的组分。该方法重复性虽好但在提取和洗脱过程中引入了正己烷、乙酸乙酯等有机试剂，为接下来的除杂增加难度。

[0010] 寇克明和彭艳梅（201310592568.2）发明了一种利用大孔吸附树脂从蛹虫草中提取虫草素及虫草多糖的方法，包括将蛹虫草子实体粉碎、用水提取，将提取液浓缩，然后加入乙醇静置析出虫草多糖并得到上清液，将上清液过大孔吸附树脂柱得洗脱液，将洗脱液浓缩干燥得虫草素浸膏。本发明方法所得产品有害溶剂残留少，但在大孔树脂洗脱过程中并未研究树脂填料的解吸附能力，在大孔树脂重复利用过程中存在填料堵塞老化问题，影响树脂寿命。而本方法中对提取容器要求较低，适宜于工业生产。

[0011] 李福泉等人（201210014073.7）发明了一种提取蛹虫草中虫草素和虫草多糖的方法，包括水提、醇提、柱提上清液和柱提沉淀物步骤。该种方法在水提步骤中，水的温度设置在55－58℃之间，即能让虫草中的活性成份尽量充分溶解，同时也可避免虫草素分解，所以，采用该种水温提取虫草素和虫草多糖不会造成资源浪费。本方法同时提取了虫草素和虫草多糖两种物质，对蛹虫草活性物质利用率较高具有借鉴意义，相比于本发明该方法提取时间较长，提取工艺繁琐，有待进一步优化。

[0012] 华春等人（201410002259.X）提出了一种从废弃蛹虫草培养基质中提取草基质多糖的方法以及提取物的应用。本发明通过酶解、微波、离心分离后加乙醇沉淀，然后再经过除淀粉、除蛋白、凝胶柱纯化等实验步骤实现从废弃蛹虫草培养基质中提取虫草基质多糖。所得多糖提取物纯度较高且对于蛹虫草废弃培养基是一种有效废物利用，但在提取过程中也损失了率虫草素等活性物质，相较于本方法在废弃物利用程度上有进一步提升的空间。

[0013] 仇颖超等人（201610123035.3）本发明公开了一种从废弃蛹虫草培养基中酶解辅助提取虫草素的方法，发明以废弃蛹虫草培养基为原料，首先经高压处理后经中性蛋白酶酶解，再加热水灭酶浸提，通过树脂吸附除杂后透析浓缩，冰浴结晶后冻干，从而得到从蛹虫草培养基中酶解辅助提取虫草素的方法。该发明对废弃培养基进行了再利用，节约了生产成本，与本发明相比该方法对于蛋白酶的利用程度不高，因此会增加另一部分原料成本。

[0014] 高兆建等人（201710009796.0）本发明公开了一种从蛹虫草培养基中提取及连续富集多糖的方法，步骤包括蛹虫草大米残余培养基的干燥、超微粉碎、生物多酶体系酶法水解、离心过滤、回流控制、多功能膜浓缩富集、喷雾干燥、定性定量，建立了一条虫草多糖的快速、高效、经济的分离方法。该发明有效的利用了废弃的蛹虫草培养基，节约了资源和成本。本发明适合大规模工业化生产。且超微粉碎和膜分离技术的应用在有效物质溶出和虫草素组分收集上作用巨大，对于本发明的改进具有参考价值。

[0015] 苏刘花（201210353679.3）公开了一种从蛹虫草提取虫草素和多糖的方法。将蛹虫草原料粉碎后装入亚临界萃取釜，通入去离子水，在温度100~200℃、压力

1~15MPa条件，逆流提取10-60分钟，得提取液；提取液浓缩后，加入5-6倍体积95%乙醇，充分搅拌充分沉淀，沉淀物再次用水溶解，加入浓度3%-10%的三氯乙酸除去蛋白，再次醇沉，干燥即得虫草多糖；合并两次醇沉液，减压浓缩至无醇，加入活性炭柱吸附，乙醇溶液洗脱，洗脱液减压浓缩，放置结晶，结晶物干燥即得虫草素。该发明对于蛹虫草利用率较高，虫草多糖和虫草素得率得到提升，与本发明相比，亚临界萃取技术对提取设备以及操作人员要求较高，会在一定程度上增加生产成本。

[0016] 董超（201610605098.2）公开了一种从蛹虫草中提取虫草素的方法，其主要步骤为：石油醚脱脂，高浓度乙醇提取，乙酸乙酯萃取，D1400树脂两次纯化，就可以获得≥95%纯度虫草素。该发明具有操作简便、虫草素提取率高的优点，但只提取了蛹虫草中的虫草素而对于虫草多糖及其他物质损失较大。

[0017] 刘宏非（201610082656.1）公开了一种富含生物活性物质的蛹虫草提取物制备方法，属于功能食品领域。通过制备含有超氧化物歧化酶、糖苷酶、转移酶、水解酶、异构酶等生物酶的蛹虫草生物转化复合酶系，进行蛹虫草复合酶系水解反应，再通过蛹虫草生物活性物质高效动态循环提取，微孔滤膜过滤，真空减压浓缩等步骤，得到富含生物活性物质的蛹虫草提取物。与目前已公开的蛹虫草提取物制备方法相比，该方法大幅提高提取物中虫草素、虫草酸、虫草多糖、腺苷等生物活性物质的含量。但与本发明相比，该发明中制备的复合酶系统工艺复杂且对环境要求苛刻，因此会大大增加提取设备制造成本和酶制剂的成本。

[0018] 唐庆九等人（201510585474.1）公开了一种蛹虫草活性多糖制备方法：蛹虫草子实体超细粉碎后用沸水提取，收集上清液；上清液浓缩后加入乙醇沉淀，沉淀部位过DEAE-sepharose柱，0-0.5N的部位脱盐后冷冻干燥获得。该方法操作过程简便具有参考价值。

[0019] 殷铭等人（201710788899.1）公开了一种蛹虫草中虫草素的提取方法，包括以下内容：先将蛹虫草经过柠檬酸水溶液浸泡35-40分钟，再微波烘干，然后与适量的纯净水以及纤维素酶混合酶解，过滤取滤液；最后经酸化、醇提、喷雾干燥即得。该发明采用柠檬酸浸泡及微波烘干，在提高虫草素的提取率提高蛹虫

草活性物质溶出方面与本发明类似，但酶解过程温度压力等环境条件要求严格，有待进一步优化。

[0020] 康文艺（201710033639.3）公开了一种蛹虫草多糖的提取方法，其将蛹虫草用水煎煮，过滤，滤液中加入无水乙醇至乙醇终浓度为70±5V%，静置，固液分离，所得沉淀即为蛹虫草多糖。该发明消耗乙醇体积巨大且仅用沸水浴提取耗时长效率低，提取产物除虫草多糖外其他成分含量较高，多糖纯度偏低。

[0021] 孙君社和裴海生（申请号：201710322120.7）公开了一种酸性电解水提取纯化核桃青皮多酚的方法，主要包含以下步骤：将鲜核桃青皮与酸性电解水混合打浆，均质，得浆料液；将浆料液搅拌浸提，得搅拌提取液；将搅拌提取液进行渣液分离，分离后的固体渣料再次加入酸性电解水进行第二次搅拌浸提；将两次搅拌浸提分离后的液相混合后通过大孔吸附树脂，控制流速，经过大孔吸附树脂后用乙醇溶液将吸附在树脂上的多酚洗脱，洗脱液随后蒸馏回收乙醇，即可得到高纯度的核桃多酚。该发明针对核桃多酚进行提取和纯化工作，所得产物纯度较高。与该发明相比，本研究中酸性水提取蛹虫草活性成分丰富，减少了针对单一活性成分的纯化除杂工艺，适宜于工厂大规模粗虫草水提物提取，为后续下游加工降低成本。

[0022] 丁占生（申请号：201110365289.3）等人公开了一种杨梅多酚的高效分离提取及稳定贮藏的方法，该发明以pH3.5-4.0的酸性水为提取液，对杨梅原料经多次打浆、离心，从杨梅果渣、原汁中提取多酚。主要包括大孔吸附树脂吸附，蒸发浓缩去醇，添加麦芽糊精，冷冻干燥等步骤。该发明以水为提取液，降低了后续纯化工程中的除杂成本。与该发明相比，本成果中利用酸性水溶液提取所得水提物中活性提取物质例如虫草素和虫草多糖提取率较高，且操作工艺简单，生产成本较低。

[0023] 杨捷（申请号：201711021626.0）等人提供了一种酸性缓冲溶液提取银耳多糖的方法，包括以下步骤：在加热条件下，采用酸性缓冲溶液对银耳粉进行浸提，得到浸提料液；将所述浸提料液进行固液分离，得到液体组分，所述液体组分中含有银耳多糖；将所述液体组分进行醇沉，得到的沉淀为银耳多糖。该发明提取银耳多糖含量较高，因此也佐证了利用酸性水溶液提取草本植物或食用

菌类中多糖成分的可行性，本发明正是采用酸性水溶液结合超声波辅助提取蛹虫草中的虫草素和虫草多糖等水溶性活性成分，工艺简便，适宜工业范围内应用。

[0024] 朱洲（申请号：201710126525.3）等人公开了一种马铃薯花青素的提取方法，包括如下步骤：a）在抗坏血酸存在下，将马铃薯与第一酸性溶液混合制成马铃薯浆液；b）将马铃薯浆液依次进行第一次过滤、添加酶制剂降低粘性处理、第一次离心去除沉淀、及第二次过滤；c）将花青素粗提液经过大孔吸附树脂吸附，分别用水和乙醇洗脱；以及d）对所得解吸液依次进行浓缩和干燥以获得花青素。该发明中采用抗坏血酸作为酸溶剂提取马铃薯中的花青素成分，提高了马铃薯花青素在混合提取液中的稳定性，与之相比，本发明中利用柠檬酸或食用盐酸作为酸提取剂，在生产成本上更加节约，且在国家标准范围内添加，对人体无任何副作用。

## 发明概述

### 技术问题

[0025] 本发明的目的是提供一种蛹虫草子实体水提物的超声波复合酸性水提取方法，以解决现有技术存在的问题。

### 问题的解决方案

### 技术解决方案

[0026] 本发明的技术方案：

[0027] 一种蛹虫草中虫草多糖和虫草素的超声波复合酸性水提取方法，将蛹虫草子实体通过采摘、清洗、干燥、粉碎、脱脂得到蛹虫草下脚料干粉，然后再将其浸入配置好的稀酸溶液中，超低温冷冻结合微波解冻多次冻融循环，同时采用低频超声波辅助搅拌提取，再对提取液进行蒸发浓缩处理，最后对其冷冻干燥收集水提产物干粉；具体过程如下：

[0028] （1）培养及采集：蛹虫草子实体通过固体培养基培养而成，培育40-45天后进行采集，采集后的新鲜子实体在4℃下冷藏储存；

[0029] （2）清洗干燥：将采集的蛹虫草子实体置于60-65℃热风干燥箱中干燥5h，干燥过程中蛹虫草子实体排布均匀保持通风，待干燥至恒重后收集并储藏于阴凉

干燥处；

[0030] （3）粉碎；取蛹虫草干样进行破碎，过60目筛；

[0031] （4）脱脂：将粉碎好的样品置于回流装置中，用95%乙醇按料液比1:5（w:v）沸水浴下回流提取3h，离心，收集沉淀，60-65℃下烘干至恒重，获得脱脂虫草粉；

[0032] （5）超低温冷冻-微波解冻循环：按照料液比1:40（w:v）向脱脂虫草粉中加入蒸馏水，得到提取液，通过搅拌滴定1mol/L的稀酸溶液使提取液pH达到4.8±0.2，将提取液置于-80℃条件下冷冻2h，取出后在300~400W功率微波条件下解冻2min，重复冻融操作3次，得到蛹虫草初提混合液；

[0033] （6）超声波辅助提取：获得蛹虫草初提混合液后，辅以频率为20-30KHz，功率为300-400W的超声波，在65-70℃下提取35-40min。提取结束后4000r/min条件下离心15min，取上清液过滤得蛹虫草子实体水提物粗液；

[0034] （7）蒸发浓缩：将蛹虫草子实体水提物粗液在60-65℃，0.095MPa条件下旋转蒸发浓缩至原体积的1%，最后呈现粘稠浓浆状后，收集浓缩液，-70℃下冷冻24h；

[0035] （8）冷冻干燥制粉：将冷冻的蛹虫草浓缩液在冷阱温度-55℃条件下冻干3h，得到水提蛹虫草干粉。

[0036] 所述步骤（1）中，固体培养基成分包括大米、小麦、葡萄糖、磷酸二氢钾、七水硫酸镁、维生素B1和维生素B2。

[0037] 所述步骤（1）中，采集蛹虫草子实体的高度≥7cm。

[0038] 所述步骤（3）中，破碎时先切割成3-4cm段状，再粉碎。

[0039] 所述步骤（4）中，离心的转速为4000r/min，离心时间为20min。

[0040] 所述步骤（6）中，稀酸溶液为稀盐酸溶液、柠檬酸酸溶液或醋酸溶液。

[0041] 原理：本方法采取食品级盐酸稀溶液调节提取剂pH值，根据研究获取远离蛹虫草中虫草素及虫草多糖的最适溶解等电点的溶液条件，增大相同温度条件下蛹虫草水溶性活性成分的溶解度。适当次数冻融能使细胞膜的疏水键结构破裂破坏细胞膜和细胞壁，另外由于细胞内水结晶体积增大而引起细胞膨胀破裂，解冻后细胞内物质溶出，从而提高了蛹虫草细胞内水溶性成分的溶出率。辅以低

频超声波技术更能增加提取过程中粉末的破壁效应，并且能够有效降低粉末在溶剂中的聚合效应，从而提升最终蛹虫草子实体中活性水提物的得率，且有效节约提取时间。最后冷冻干燥制得蛹虫草水提物干粉能有效防止某些热敏性活性成分的分解变性，从而保留提取产物的生物活性。本发明改进了一般中草药或药用菌类的提取方法，相较于热水回流提取法，缩短提取时间约33%，虫草多糖和虫草素提取得率分别从8.72g/100g，4.422mg/g,提升至10.13g/100g，5.794 mg/g，同时减少了蛹虫草水提过程中的粉末聚集问题，且有效保留虫草中活性成分。

## 发明的有益效果

### 有益效果

[0042] 本发明的有益效果：本发明中主要采用超声波结合酸性水提取蛹虫草中虫草素、虫草多糖等水溶性物质。相较于传统有机溶剂提取能减少水提产物中有机杂质的掺入以及降低后续除杂工序中的人力物力成本；利用超低温冷冻-微波解冻技术增加虫草细胞结构破坏作用，增加活性成分溶出；冻融破壁联合超声波辅助提取技术，多重机械物理作用，有效避免有机化学试剂的引入与残留。对于解决目前蛹虫草水提工艺中存在的提取率低，提取物杂质成分多等不足具有借鉴意义。

## 发明实施例

### 本发明的实施方式

[0043] 下面将结合具体实施例对本发明的技术方案进行进一步的说明。

[0044] 实施例1：以稀盐酸溶液为提取剂联合超低温冻融及低频超声波技术辅助提取蛹虫草子实体中的虫草多糖和虫草素

[0045] 将蛹虫草子实体通过采摘、清洗、干燥、粉碎、脱脂得到蛹虫草下脚料干粉，然后再将其浸入配置好的稀盐酸溶液（pH=4.8）中，超低温冷冻（-80℃）-微波（400W，2min）解冻循环3次，同时采用低频超声波（频率为20-30KHz，功率为350W）辅助，在65℃下搅拌提取40min，再对提取液在60℃，0.095MPa条件下旋转蒸发浓缩至原体积的1%，收集浓缩液-70℃下冷冻24h，最后对其冷冻干燥收集水提产物干粉。最终蛹虫草子实体中虫草多糖和虫草素提取得率分别为1

0.13g/100g 和5.794. mg/g。

[0046] 实施例1对比例：以稀盐酸溶液为提取剂联合超低温冻融提取蛹虫草子实体中的虫草多糖和虫草素

[0047] 将蛹虫草子实体通过采摘、清洗、干燥、粉碎、脱脂得到蛹虫草下脚料干粉，然后再将其浸入配置好的稀盐酸溶液（pH=4.8）中，超低温冷冻（-80℃）-微波（400W，2min）解冻循环3次，再在65℃下搅拌提取40min，再对提取液在60℃，0.095MPa条件下旋转蒸发浓缩至原体积的1%，收集浓缩液-70℃下冷冻24h，最后对其冷冻干燥收集水提产物干粉。最终蛹虫草自实体中虫草多糖和虫草素提取得率分别为9.09g/100g和4.854mg/g，效果显著低于实施例1活性成分得率。

[0048] 实施例2：以柠檬酸酸溶液为提取剂联合超低温冻融及低频超声波技术提取蛹虫草子实体中的虫草多糖和虫草素

[0049] 将蛹虫草子实体通过采摘、清洗、干燥、粉碎、脱脂得到蛹虫草下脚料干粉，然后再将其浸入配置好的柠檬酸溶液（pH=4.8）中，超低温冷冻（-80℃）-微波（400W，2min）解冻循环3次，同时采用低频超声波（频率为20-30KHz，功率为350W）辅助，在65℃下搅拌提取40min，再对提取液在60℃，0.095MPa条件下旋转蒸发浓缩至原体积的1%，收集浓缩液-70℃下冷冻24h，最后对其冷冻干燥收集水提产物干粉。最终蛹虫草子实体中虫草多糖和虫草素提取得率分别为10.09g/100g 和5.721. mg/g。

[0050] 实施例2对比例：以柠檬酸酸溶液为提取剂联合低频超声波技术提取蛹虫草子实体中的虫草多糖和虫草素

[0051] 将蛹虫草子实体通过采摘、清洗、干燥、粉碎、脱脂得到蛹虫草下脚料干粉，然后再将其浸入配置好的柠檬酸溶液（pH=4.8）中，采用低频超声波（频率为20-30KHz，功率为350W）辅助，在65℃下搅拌提取40min，再对提取液在60℃，0.095MPa条件下旋转蒸发浓缩至原体积的1%，收集浓缩液-70℃下冷冻24h，最后对其冷冻干燥收集水提产物干粉。最终蛹虫草子实体中虫草多糖和虫草素提取得率分别为9.17g/100g 和4.911mg/g，明显低于实例2中虫草多糖和虫草素提取得率。

[0052] 实施例3：以醋酸溶液为提取剂联合超低温冻融及低频超声波技术提取蛹虫草

子实体中的虫草多糖和虫草素

[0053] 将蛹虫草子实体通过采摘、清洗、干燥、粉碎、脱脂得到蛹虫草下脚料干粉，然后再将其浸入配置好的醋酸溶液（pH=4.9）中，超低温冷冻（-80℃）-微波（300W，3min）解冻循环3次，同时采用低频超声波（频率为20-30KHz，功率为350W）辅助，在在65℃下搅拌提取40min，再对提取液在60℃，0.095MPa条件下旋转蒸发浓缩至原体积的1%，收集浓缩液-70℃下冷冻24h，最后对其冷冻干燥收集水提产物干粉。最终蛹虫草子实体中虫草多糖和虫草素提取得率分别为10.17g/100g 和5.682 mg/g。

[0054] 实施例3对比例：以醋酸溶液为提取剂联合低频超声波技术提取蛹虫草子实体中的虫草多糖和虫草素

[0055] 将蛹虫草子实体通过采摘、清洗、干燥、粉碎、脱脂得到蛹虫草下脚料干粉，然后再将其浸入配置好的醋酸溶液（pH=4.9）中，采用低频超声波（频率为20-30KHz，功率为350W）辅助，在在65℃下搅拌提取40min，再对提取液在60℃，0.095MPa条件下旋转蒸发浓缩至原体积的1%，收集浓缩液-70℃下冷冻24h，最后对其冷冻干燥收集水提产物干粉。最终蛹虫草子实体中虫草多糖和虫草素提取得率分别为9.08g/100g 和4.782 mg/g，明显低于实例3中各活性成分得率。

# 权利要求书

[权利要求 1] 一种蛹虫草中虫草多糖和虫草素的超声波复合酸性水提取方法，其特征在于，具体过程如下：

（1）培养及采集：蛹虫草子实体通过固体培养基培养而成，培育40-45天后进行采集，采集后的新鲜子实体在4℃下冷藏储存；

（2）清洗干燥：将采集的蛹虫草子实体置于60-65℃热风干燥箱中干燥5h，干燥过程中蛹虫草子实体排布均匀保持通风，待干燥至恒重后收集并储藏于阴凉干燥处；

（3）粉碎；取蛹虫草干样进行破碎，过60目筛；

（4）脱脂：将粉碎好的样品置于回流装置中，沸水浴下用95%乙醇按料液比1:5（w:v）回流提取3h，离心，收集沉淀，60-65℃下烘干至恒重，获得脱脂虫草粉；

（5）超低温冷冻-微波解冻循环：按照料液比1:40（w:v）向脱脂虫草粉中加入蒸馏水，得到提取液，用1mol/L的稀酸溶液搅拌滴定，使提取液pH达到4.8±0.2，将提取液置于-80℃条件下冷冻2h，取出后在300~400W功率微波条件下解冻2-3min，重复冻融操作3次，得到蛹虫草初提混合液；

（6）超声波辅助提取：获得蛹虫草初提混合液后，辅以频率为20-30KHz，功率为300-400W的超声波，在65-70℃下提取35-40min；提取结束后4000r/min条件下离心15min，取上清液过滤得蛹虫草子实体水提物粗液；

（7）蒸发浓缩：将蛹虫草子实体水提物粗液在60-65℃，0.095MPa条件下旋转蒸发浓缩至原体积的1%，最后呈现粘稠浓浆状后，收集浓缩液，-70℃下冷冻24h；

（8）冷冻干燥制粉：将冷冻的蛹虫草浓缩液在冷阱温度-55℃条件下冻干3h，得到水提蛹虫草干粉。

[权利要求 2] 根据权利要求1所述的一种蛹虫草中虫草多糖和虫草素的超声波复合酸性水提取方法，其特征在于，所述步骤（1）中，固体培养基成分

包括大米、小麦、葡萄糖、磷酸二氢钾、七水硫酸镁、维生素B1和维生素B2。

[权利要求 3] 根据权利要求1或2所述的一种蛹虫草中虫草多糖和虫草素的超声波复合酸性水提取方法，其特征在于，所述步骤（1）中，采集蛹虫草子实体的高度≥7cm。

[权利要求 4] 根据权利要求1或2所述的一种蛹虫草中虫草多糖和虫草素的超声波复合酸性水提取方法，其特征在于，所述步骤（3）中，破碎时先切割成3-4cm段状，再粉碎。

[权利要求 5] 根据权利要求3所述的一种蛹虫草中虫草多糖和虫草素的超声波复合酸性水提取方法，其特征在于，所述步骤（3）中，破碎时先切割成3-4cm段状，再粉碎。

[权利要求 6] 根据权利要求1、2或5所述的一种蛹虫草中虫草多糖和虫草素的超声波复合酸性水提取方法，其特征在于，所述步骤（4）中，离心的转速为4000r/min，离心时间为20min。

[权利要求 7] 根据权利要求3所述的一种蛹虫草中虫草多糖和虫草素的超声波复合酸性水提取方法，其特征在于，所述步骤（4）中，离心的转速为4000r/min，离心时间为20min。

[权利要求 8] 根据权利要求4所述的一种蛹虫草中虫草多糖和虫草素的超声波复合酸性水提取方法，其特征在于，所述步骤（4）中，离心的转速为4000r/min，离心时间为20min。

[权利要求 9] 根据权利要求1、2、5、7或8所述的一种蛹虫草中虫草多糖和虫草素的超声波复合酸性水提取方法，其特征在于，所述步骤（6）中，稀酸溶液为稀盐酸溶液、柠檬酸酸溶液或醋酸溶液。

[权利要求 10] 根据权利要求6所述的一种蛹虫草中虫草多糖和虫草素的超声波复合酸性水提取方法，其特征在于，所述步骤（6）中，稀酸溶液为稀盐酸溶液、柠檬酸酸溶液或醋酸溶液。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
**PCT/CN2019/123517**

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C08B 37/00(2006.01)i; C07H 19/16(2006.01)i; C07H 1/08(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C08B 37/-; C07H 19/-; C07H 1/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT, CNKI, WPI, EPODOC, ISI Web of Knowledge, STN(CAPLUS): 张**憨**, 石浩, 易思富, 郭小玲, 侯丽华, 阳武雄, 蛹虫草, 北冬虫夏草, 北虫草, 蛹草, 虫草素, 虫草多糖, 冻融, 冷冻解冻, 脱脂, cordyceps militaris, cordyceps polysaccharide, cordycepin, freeze, drying

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| Y | CN 105273024 A (WUYI UNIVERSITY) 27 January 2016 (2016-01-27)<br>description, paragraphs [0005]-[0007] | 1-10 |
| Y | CN 104694616 A (CHINA AGRICULTURAL UNIVERSITY) 10 June 2015 (2015-06-10)<br>description, paragraphs [0006]-[0010] | 1-10 |
| Y | CN 105504085 A (TAISHAN MEDICAL UNIVERSITY) 20 April 2016 (2016-04-20)<br>description, paragraph [0007] | 1-10 |
| Y | CN 108926580 A (JIANGSU GUOZHEN BIOLOGICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 04 December 2018 (2018-12-04)<br>description, paragraphs [0004]-[0013] | 1-10 |
| Y | 杨帆 (YANG, Fan). "固态发酵产虫草素及其分离纯化 (Production and Isolation of Cordycepin from Solid State Fermentation)"<br>*中国优秀硕士学位论文全文数据库工程科技I辑 (China Master's Theses Full-text Database, Engineering Technology),* No. 2, 15 February 2018 (2018-02-15),<br>ISSN: 1674-0246,<br>B018-110, and pp. 25 and 26 | 1-10 |

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| **19 February 2020** | **27 February 2020** |

| Name and mailing address of the ISA/CN | Authorized officer |
|---|---|
| **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)**<br>**No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088**<br>**China** | |
| Facsimile No. **(86-10)62019451** | Telephone No. |

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| Y | 吴映明等 (WU, Yingming et al.). "超声波-超低温冻融处理对灵芝孢子粉多糖提取的影响 (Effect on the Distill of Polysaccharides in Ganoderma Lucidum Spore Powder Treated with Ultrasonic and Thawing and Freezing Test of Ultra-low Temperature)" *中国食用菌 (Edible Fungi of China),* Vol. 27, No. 3, 31 December 2018 (2018-12-31), ISSN: 1003-8310, pp. 34 and 35 | 1-10 |
| PX | CN 109810201 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 28 May 2019 (2019-05-28) claims 1-10 | 1-10 |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**
**Information on patent family members**

International application No.
**PCT/CN2019/123517**

| Patent document cited in search report | Publication date (day/month/year) | Patent family member(s) | Publication date (day/month/year) |
|---|---|---|---|
| CN 105273024 A | 27 January 2016 | None | |
| CN 104694616 A | 10 June 2015 | None | |
| CN 105504085 A | 20 April 2016 | CN 105504085 B | 29 December 2017 |
| CN 108926580 A | 04 December 2018 | None | |
| CN 109810201 A | 28 May 2019 | None | |

# 国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2019/123517

A. 主题的分类

C08B 37/00(2006.01)i; C07H 19/16(2006.01)i; C07H 1/08(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C08B 37/-; C07H 19/-; C07H 1/-

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNPAT, CNKI, WPI, EPODOC, ISI Web of Knowledge, STN(CAPLUS):张憨,石浩,易思富,郭小玲,侯丽华,阳武雄,蛹虫草,北冬虫夏草,北虫草,蛹草,虫草素,虫草多糖,冻融,冷冻解冻,脱脂,cordyceps militaris, cordyceps polysaccharide, cordycepin, freeze, drying

C. 相关文件

| 类 型* | 引用文件，必要时，指明相关段落 | 相关的权利要求 |
|---|---|---|
| Y | CN 105273024 A (五邑大学) 2016年 1月 27日 (2016-01-27)<br>说明书第[0005]-[0007]段 | 1-10 |
| Y | CN 104694616 A (中国农业大学) 2015年 6月 10日 (2015-06-10)<br>说明书第[0006]-[0010]段 | 1-10 |
| Y | CN 105504085 A (泰山医学院) 2016年 4月 20日 (2016-04-20)<br>说明书第[0007]段 | 1-10 |
| Y | CN 108926580 A (江苏国桢生物科技有限公司) 2018年 12月 4日 (2018-12-04)<br>说明书第[0004]-[0013]段 | 1-10 |
| Y | 杨帆. "固态发酵产虫草素及其分离纯化"<br>中国优秀硕士学位论文全文数据库工程科技I辑, 第2期, 2018年 2月 15日 (2018-02-15),<br>ISSN: 1674-0246,<br>B018-110, 第25-26页 | 1-10 |

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

| 国际检索实际完成的日期 | 国际检索报告邮寄日期 |
|---|---|
| 2020年 2月 19日 | 2020年 2月 27日 |

| ISA/CN的名称和邮寄地址 | 受权官员 |
|---|---|
| 中国国家知识产权局(ISA/CN)<br>中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 | 陈曦 |
| 传真号 (86-10)62019451 | 电话号码 86-(10)53962145 |

# 国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2019/123517

C. 相关文件

| 类 型* | 引用文件，必要时，指明相关段落 | 相关的权利要求 |
|---|---|---|
| Y | 吴映明等. "超声波-超低温冻融处理对灵芝孢子粉多糖提取的影响" 中国食用菌, 第27卷，第3期，2018年 12月 31日 (2018 - 12 - 31)，ISSN：1003-8310, 第34-35页 | 1-10 |
| PX | CN 109810201 A (江南大学) 2019年 5月 28日 (2019 - 05 - 28) 权利要求1-10 | 1-10 |

# 国际检索报告
## 关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2019/123517

| 检索报告引用的专利文件 | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利 | 公布日<br>(年/月/日) |
|---|---|---|---|
| CN 105273024 A | 2016年 1月 27日 | 无 | |
| CN 104694616 A | 2015年 6月 10日 | 无 | |
| CN 105504085 A | 2016年 4月 20日 | CN 105504085 B | 2017年 12月 29日 |
| CN 108926580 A | 2018年 12月 4日 | 无 | |
| CN 109810201 A | 2019年 5月 28日 | 无 | |