

蛹虫草-黄芪渣发酵产物总酚提取工艺优化及抗氧化活性

胡理运, 高嘉怡, 吴雨龙, 周峰, 华春, 李盛杰, 朱重经

Optimization of Extraction Process and Antioxidant Activity Evaluation of Total Phenolics from *Cordyceps militaris*-*Astragalus membranaceus* Residue Fermentation Products

HU Liyun, GAO Jiayi, WU Yulong, ZHOU Feng, HUA Chun, LI Shengjie, and ZHU Chongjing

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024100057>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

蛹虫草固态发酵对玉米粉加工性质及消化性的影响

Effect of Solid-state Fermentation with *Cordyceps Militaris* on Processing and Digestive Properties of Corn Flour

食品工业科技. 2021, 42(11): 122-127 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020090057>

蛹虫草固态发酵联产多糖和纤溶酶的工艺优化

Optimization of Polysaccharides and Fibrinolytic Enzyme Co-production from *Cordyceps militaris* through Solid State Fermentation

食品工业科技. 2021, 42(4): 71-76 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020040341>

固态发酵对藜麦营养成分、酚类物质含量及抗氧化活性的影响

Effects of Solid-state Fermentation on the Nutrients, Phenolics Content and Antioxidant Activity of Quinoa

食品工业科技. 2022, 43(24): 130-138 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022020088>

蛹虫草子实体抗氧化多糖的分离纯化及结构表征

Isolation, Purification, and Structural Characterization of Antioxidant Polysaccharides Isolated from the Fruiting Bodies of *Cordyceps militaris*

食品工业科技. 2025, 46(9): 31-40 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024070386>

黑曲霉固态发酵对粉葛副产物中结合态酚类物质释放及抗氧化活性的影响

Effects of Solid Fermentation of *Aspergillus niger* on Release of Bound Phenols and Antioxidant Activity of By-products of *Pueraria thomsonii*

食品工业科技. 2025, 46(5): 136-144 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024030344>

蛹虫草丝瓜络半固态发酵产虫草素的工艺优化

Process Optimization of Semisolid Fermentation of *Cordyceps militaris* with Loofah for Cordycepin Production

食品工业科技. 2021, 42(6): 118-124 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020060168>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

胡理运, 高嘉怡, 吴雨龙, 等. 蛹虫草-黄芪渣发酵产物总酚提取工艺优化及抗氧化活性 [J]. 食品工业科技, 2025, 46(19): 251–259.
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024100057

HU Liyun, GAO Jiayi, WU Yulong, et al. Optimization of Extraction Process and Antioxidant Activity Evaluation of Total Phenolics from *Cordyceps militaris*-*Astragalus membranaceus* Residue Fermentation Products[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(19): 251–259. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024100057

· 工艺技术 ·

蛹虫草-黄芪渣发酵产物总酚提取工艺优化 及抗氧化活性

胡理运^{1,2}, 高嘉怡², 吴雨龙², 周峰², 华春², 李盛杰^{2,*}, 朱重经^{3,*}

(1. 南京师范大学食品与制药工程学院, 江苏南京 210023;

2. 南京晓庄学院食品科学学院, 江苏南京 211171;

3. 江阴天江药业有限公司, 江苏无锡 214400)

摘要: 选取蛹虫草与黄芪渣进行固态发酵, 研究发酵产物中主要活性物质得率及其抗氧化作用。分别对总多糖、总黄酮、总萜类、总皂苷以及总酚的得率进行测定, 并对发酵产物总酚进行响应面优化提取。结果表明, 单位重量下发酵产物中总酚的得率显著优于黄芪渣。最佳提取工艺条件: 超声温度 80 °C、超声时间 58 min、乙醇体积分数 38.7%、pH5.4, 在此条件下总酚得率为 7.243±0.19 mg/g。抗氧化实验显示, 发酵产物和黄芪渣中总酚在 2.5 mg/mL 时对 DPPH 自由基的清除率达到最大, 分别为 94.94% 和 64.56%; 发酵产物和黄芪渣中总酚分别在 1 mg/mL 和 2.5 mg/mL 时对 ABTS⁺ 自由基的清除率达到最大, 分别为 89.51% 和 59.54%; 而发酵产物中总酚的总还原力在 10 mg/mL 时为 2.046, 显著高于黄芪渣的 1.032 ($P<0.001$)。此外, 在 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞氧化应激模型中, 发酵产物中总酚相较于黄芪渣, 在 10~10000 μg/mL 时可显著提高细胞存活率 ($P<0.05$), 经进一步分析发现发酵产物总酚使得细胞 MDA 水平降低, SOD 活性升高。这些结果表明, 相比于黄芪渣, 发酵产物中的总酚得率显著提升, 抗氧化能力显著增强。本研究为食药菌和中药渣的联合开发利用提供了理论依据。

关键词: 蛹虫草, 黄芪渣, 固态发酵, 总酚, 抗氧化

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2025)19-0251-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024100057



本文网刊:

Optimization of Extraction Process and Antioxidant Activity Evaluation of Total Phenolics from *Cordyceps militaris*-*Astragalus membranaceus* Residue Fermentation Products

HU Liyun^{1,2}, GAO Jiayi², WU Yulong², ZHOU Feng², HUA Chun², LI Shengjie^{2,*}, ZHU Chongjing^{3,*}

(1. School of Food and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China;

2. School of Food Science, Nanjing Xiaozhuang University, Nanjing 211171, China;

3. Jiangyin Tianjiang Pharmaceutical Co., Ltd., Wuxi 214400, China)

Abstract: Solid-state fermentation was conducted using *Cordyceps militaris* and *Astragalus membranaceus* residue to investigate the yield of main bioactive substances and their antioxidant effects in fermentation products. The yield of total polysaccharides, flavonoids, terpenoids, saponins and phenolics were measured respectively, and the total phenolic content of the fermentation product was extracted and optimized using response surface methodology. It was found that the total phenolic yield per unit weight in fermented products was significantly higher than that in *Astragalus membranaceus*

收稿日期: 2024-10-09

基金项目: 江苏省高等学校基础科学(自然科学)研究重大项目(24KJA180006);“食药物质资源化利用”江苏省高校重点(建设)实验室项目(苏教科[2024]3)。

作者简介: 胡理运(1999-),男,硕士研究生,研究方向:药用真菌发酵工艺与活性分析,E-mail: 222712036@njnu.edu.cn。

* 通信作者: 李盛杰(1988-),男,博士,副教授,研究方向:药用真菌资源开发与利用,E-mail: lishengjie@njxzc.edu.cn。

朱重经(1985-),男,本科,主管中药师,研究方向:中药资源配方颗粒研究,E-mail: zhuzj@tianjiang.com。

residue. The optimal extraction conditions for fermented phenolics was: Ultrasonic temperature 80 °C, duration 58 min, ethanol concentration 38.7%, pH5.4, achieving a total phenolic yield of 7.243±0.19 mg/g. Antioxidant experiments demonstrated that at 2.5 mg/mL, the maximum DPPH radical scavenging rate of total phenolics of the fermentation product was 94.94%, while that of *Astragalus membranaceus* residue was 64.56%. For ABTS⁺ radical scavenging, the maximum rate of total phenolics of the fermentation product was 89.51% at 1 mg/mL, while the maximum rate of total phenolics of *Astragalus membranaceus* residue was 59.54% at 2.5 mg/mL. Moreover, the total reducing power of total phenolics of the fermentation product was 2.046 at a concentration of 10 mg/mL, which was significantly higher than that in *Astragalus membranaceus* residue at 1.032 ($P<0.001$). In H₂O₂-induced PC12 oxidative stress models, fermented phenolics (10~10000 µg/mL) significantly enhanced cell viability compared to *Astragalus membranaceus* residue phenolics. Further analysis showed that the total phenolics of fermentation product led to a decrease in the level of MDA and an increase in SOD activity. These results indicate that solid-state fermentation significantly improves both phenolic yield and antioxidant capacity compared to unfermented *Astragalus membranaceus* residue. This study provides theoretical foundation for synergistic utilization of edible and medicinal fungi and Chinese herbal residues.

Key words: *Cordyceps militaris*; *Astragalus membranaceus* residue; solid-state fermentation; total phenolics; antioxidant

蛹虫草(*Cordyceps militaris*), 也称北冬虫夏草、北虫草, 属于子囊菌门, 肉座目, 麦角菌科^[1], 其主要活性成分包括虫草素、腺苷、虫草酸和虫草多糖等^[2], 具有抗氧化、抗肿瘤、免疫调节及抗炎等药理作用^[3-8]。在蛹虫草生长过程中, 培养基质组成及外界环境条件对蛹虫草的生长及活性物质积累都有极大的影响。目前, 影响蛹虫草有关活性物质产生的相关机理未明, 进一步研究不同培养基质对于调控蛹虫草生长及活性物质积累具有重要价值。我国中药资源丰富, 经过规模化加工后产生的药渣具有食用菌生长所需的大量碳源、纤维素和活性物质。据估计我国每年的中药渣产量有 3000~7000 万吨^[9], 其中黄芪渣是中药加工后最大的副产物之一, 如果直接视为废弃物, 利用填埋、焚烧等方式处理, 不仅占用土地, 还会造成环境污染和资源浪费^[10]。而通过食用菌对中药渣进行固态发酵, 不仅能够解决中药渣带来的环境污染和资源浪费问题, 还可以进一步提高食用菌的功能价值, 实现经济与资源可持续发展。

固态发酵是一种利用不溶性固体基质培养微生物的工艺, 真菌在不同的基质上生长可通过生物转化提高相关活性成分含量, 增强功效并减少毒副作用, 也可能产生新的活性成分^[11-13]。唐敏等^[14]研究发现, 人参通过猴头菌固态发酵, 药效活性成分含量与体外抗氧化能力均显著提升。孙琳等^[15]研究发现, 刺五加经灵芝固态发酵后, 抗氧化活性显著提高。金兴聪等^[16]研究发现, 黄芪-茯苓固态发酵组合通过下调高尿酸血症模型小鼠血清中炎症因子水平, 显著改善高尿酸血症小鼠的病理状态。当前, 通过固态发酵手段提升蛹虫草药用价值的研究也不断取得进展。李慧星等^[17]利用蛹虫草与山药固态发酵, 发酵后抗氧化活性显著提高, 并证实蛹虫草代谢了山药中的多糖、纤维素等碳源物质, 生成了多酚类物质, 表明发酵后成分的种类和含量变化是产生抗氧化活性增效的主要原因之一。闫梅霞等^[18]以人参为基质, 利用蛹虫草菌株固态发酵, 发现发酵产物中多糖、蛋白和总皂苷含量均高于发酵前。贺晓玉等^[19]以五味子药

渣为蛹虫草基质进行了固态发酵, 经响应面提取优化后虫草素含量高达 5.1202 mg/g, 提高了五味子药渣的利用价值。虽然有关蛹虫草的固态发酵研究受到越来越多的关注, 但大多直接选用药性植物作为培养基质, 且功能研究多集中在多糖、虫草素和虫草酸等活性物质, 而对于选用大宗药渣作为培养基质, 并针对酚类活性物质的含量和作用的研究较少。

有研究表明, 黄芪、蛹虫草中的酚类活性物质具有抗氧化作用, 能够减轻神经炎症和抑制神经氧化损伤^[20-23]。本研究选用黄芪渣作为蛹虫草的固态发酵基质, 通过测定发酵前后不同活性物质的变化, 进一步对发酵产物中总酚的提取工艺进行了优化, 然后对 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基的清除能力及总还原力进行了测定, 最后对比了发酵产物和黄芪渣中总酚在 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞氧化应激模型中的保护作用。本研究为改进蛹虫草固态发酵方式以及进一步开发利用其酚类活性物质提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

蛹虫草菌种 南京晓庄学院药用菌物研究所保藏; 黄芪渣 作为单味中药配方颗粒制备的原料, 经水煎后晾干获得, 江阴天江药业有限公司提供; PC12 细胞 南京师范大学食品与制药工程学院; 2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐 (ABTS)、1,1-二苯基-2-苦基肼 (DPPH) 上海麦克林生化科技股份有限公司; 植物总酚 (TP) 含量检测试剂盒、丙二醛 (MDA) 含量检测试剂盒、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性检测试剂盒 北京索莱宝科技有限公司; CCK8 试剂盒 上海碧云天生物技术股份有限公司; 浓硫酸、九水合硝酸铝、香草醛、高氯酸、氢氧化钠、浓硫酸、L-抗坏血酸、过硫酸钾、铁氰化钾、三氯乙酸、三氯化铁 均为国产分析纯。

RE-2000 B 旋转蒸发器、SHZ-III 型循环式多用真空泵 上海亚荣生化仪器厂; SB-5200DTD 型超声波清洗器 宁波新芝生物科技股份有限公司; HWS-24 电热恒温水浴锅 上海慧泰仪器制造有限

公司; LDZH-100L 高压蒸汽灭菌锅 上海申安医疗器械厂。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种培养 将保存于 4 ℃ 冰箱的蛹虫草菌种在无菌条件下转接到 PDA 固体培养基中,待蛹虫草菌丝长满转接于 PDA 液体培养基中,在 26 ℃、150 r/min 的黑暗条件下培养 7 d,至培养基中含有大量白色菌球时,终止液体发酵。

1.2.2 固态发酵及其发酵产物的制备 将晒干后黄芪渣进行粉碎,以液料比 2:1(mL/g)将蒸馏水与粉碎后的黄芪渣混匀,装入菌袋,每袋 150 g,121 ℃ 灭菌 1 h,冷却后转移至超净台。用移液枪将发酵好的蛹虫草菌液吹散,得到菌丝在培养基中均匀分布的菌液。取上述菌液 25 mL 接入装好基质的菌袋中进行发酵,另取装好基质的菌袋并加入 25 mL 无菌水作为对照,26 ℃ 避光培养至第 60 d 左右,蛹虫草菌丝布满整个药渣基质且形成了明显的菌蕾结构,作为发酵终点。取出对照组黄芪渣和发酵产物,40 ℃ 烘干后,4 ℃ 密封保存。

1.2.3 发酵前后活性成分的检测 将烘干后的黄芪渣和发酵产物分别称取 1 g,以液料比 15:1(mL/g),用 75% 乙醇进行超声辅助提取,超声结束后,用抽滤装置滤掉残渣,得到的滤液用 75% 乙醇定容至 15 mL。得到两者的粗提液,4 ℃ 保存备用。

总酚的得率通过总酚检测试剂盒测定。

$$\text{总酚得率}(\text{mg/g}) = \frac{cV}{M}$$

式中, c 为溶液浓度(mg/mL), V 为溶液体积(mL), M 为样品质量(g)。

黄酮的得率采用亚硝酸钠-硝酸铝比色法^[24]测定。吸取 200 μL 粗提液和 0.4 mL 的 5% 亚硝酸钠至 5 mL 离心管中,摇匀后放置 5 min,再分别加入 0.4 mL 10% 硝酸铝,摇匀后放置 5 min,再分别加入 5% 氢氧化钠 3 mL 摇匀后,放置 10 min,在 510 nm 波长处测定吸光度。

$$\text{总黄酮得率}(\text{mg/g}) = \frac{cVN}{M}$$

式中, N 为稀释倍数, c 为溶液浓度(mg/mL), V 为溶液体积(mL), M 为样品质量(g)。

总多糖的得率采用苯酚-硫酸法^[25]测定。取 100 μL 粗提液 5 mL 于离心管中,再分别加入 400 μL 的 5% 苯酚溶液和 2 mL 浓硫酸,混匀,记录反应 30 min 后在 490 nm 处的吸光度值。

$$\text{总多糖得率}(\text{mg/g}) = \frac{cVN}{M}$$

式中, N 为稀释倍数, c 为溶液浓度(mg/mL), V 为溶液体积(mL), M 为样品质量(g)。

总皂苷的得率采用香草醛-浓硫酸比色法^[26]测定。吸取粗提液 200 μL 于 10 mL 离心管中,水浴蒸干,再加入 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL 和高氯酸

溶液 0.8 mL 至试管中,摇匀,在 60 ℃ 水浴中加热 15 min,取出,迅速冷却后加入 4 mL 冰醋酸,混合均匀后在 560 nm 处测定吸光度。

$$\text{总皂苷得率}(\text{mg/g}) = \frac{cVN}{M}$$

式中, N 为稀释倍数, c 为溶液浓度(mg/mL), V 为溶液体积(mL), M 为样品质量(g)。

总萜类的得率采用香草醛-浓硫酸比色法^[27]测定。吸取粗提液 200 μL 于 10 mL 离心管中,水浴蒸干,再加入 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL 和高氯酸溶液 0.8 mL 至试管中,摇匀,在 60 ℃ 水浴中加热 15 min,取出,迅速冷却后加入 4 mL 冰醋酸,混合均匀后在 560 nm 处测定吸光度。

$$\text{总萜类得率}(\text{mg/g}) = \frac{cVN}{M}$$

式中, N 为稀释倍数, c 溶液浓度(mg/mL), V 为溶液体积(mL), M 为样品质量(g)。

1.2.4 单因素实验 采用控制变量法,固定因素水平为乙醇体积分数 40%、超声功率 288 W、pH6、液料比 50:1 mL/g、超声温度 60 ℃、超声时间 70 min,分别考察了不同乙醇体积分数(30%、40%、50%、60%、70%)、超声功率(216、252、288、324、360 W)、pH(4、5、6、7、8)、液料比(30:1、40:1、50:1、60:1、70:1、80:1、90:1 mL/g)、超声温度(40、50、60、70、80 ℃)、超声时间(30、50、70、90、110 min)对超声辅助提取发酵产物中总酚得率的影响。

1.2.5 响应面试验设计 根据单因素实验结果,以超声温度(A)、超声时间(B)、乙醇体积分数(C)、pH(D)为自变量,发酵产物中总酚得率为响应值,设计了四因素三水平的响应面优化试验,试验因素水平见表 1。

表 1 Box-Behnken 实验设计因素水平
Table 1 Box-Behnken experimental design factor level

编码	A: 超声温度(℃)	B: 超声时间(min)	C: 乙醇体积分数(%)	D: pH
-1	60	50	30	4
0	70	70	40	5
1	80	90	50	6

1.2.6 总酚粗提液抗氧化活性研究 将发酵产物与黄芪渣中的总酚粗提液蒸发浓缩至干,复溶于水,至浓度为 10 mg/mL。以 V_C 为对照,以 IC_{50} 值(自由基清除率 50% 时所对应的样品浓度,mg/mL)判断样品抗氧化性强弱, IC_{50} 值越高,抗氧化性越弱。

DPPH·清除率的测定方法参考 RIBEIRO 等^[28]。取不同浓度的样品溶液和 DPPH 各 100 μL 于 96 孔板中混合均匀,25 ℃ 室温条件下避光反应 2 min,测定其在 517 nm 处的吸光度。

$$\text{DPPH自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100$$

式中, A_0 为只有 DPPH 溶液的吸光度, A_1 为

DPPH 和样品混合液的吸光度, A_2 为只有样品溶液的吸光度。

ABTS⁺清除率的测定方法参考 KETNAWA 等^[29]。将 40 μL 不同浓度的样品溶液与 160 μL ABTS 工作液混合, 于室温下反应 20 min 后, 在 734 nm 波长处测定吸光度。

$$\text{ABTS}^+ \text{ 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100$$

式中, A_0 为只有 ABTS 工作液的吸光度, A_1 为 ABTS 工作液和样品混合液的吸光度, A_2 为只有样品溶液的吸光度。

总还原力的测定方法参考 LI 等^[30]。还原力的大小与吸光值成正比。取 0.5 mL 样品于 5 mL 离心管中, 依次加入磷酸缓冲液 (pH6.6, 0.2 mol/L) 和 10 g/L 铁氰化钾溶液各 1 mL, 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min 后, 迅速冷却。再加入 100 g/L 三氯乙酸 1 mL, 静置 15 min。取上清液 0.5 mL, 加 0.5 mL 纯水和 100 μL 1 g/L 三氯化铁, 避光反应 15 min, 在 700 nm 处测定吸光度。

1.2.7 发酵产物中总酚对于 H_2O_2 诱导 PC12 细胞氧化应激损伤的改善作用 总酚粗提液初步提纯: 参考 XIA 等^[31] 的提取方法, 将黄芪渣与发酵产物中的总酚粗提液蒸发浓缩, 所得浓缩滤液用 6 mol/L HCl 调 pH 至 2, 抽滤。所得滤液与正己烷按体积比 1:1 混合萃取 3 次, 去掉正己烷相, 剩下的水相用等体积 (水相: 混合溶剂=1:1) 的乙酸乙酯和无水乙醚混合液 (乙酸乙酯: 无水乙醚=1:1) 混合, 萃取 3 次, 加入无水硫酸钠, 用旋转蒸发仪 40 $^{\circ}\text{C}$ 浓缩干燥, 最后加入 1 mL DMSO, 0.22 μm 过滤除菌。得到提纯后的总酚, 用于后续细胞实验。

细胞毒性检测: 参考 HUANG 等^[32] 方法, 探究不同浓度黄芪渣和发酵产物的总酚对 PC12 细胞的毒性影响。用 CCK8 法检测细胞增殖活性, 对照组: 只加 DMEM 完全培养基培养 24 h; 给药组: 含不同浓度黄芪渣和发酵产物的总酚 (1、10、100、1000、10000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 DMEM 完全培养基培养 24 h。

细胞活性检测: 参考 WU 等^[33] 方法, 探究不同浓度的总酚 (1、10、100、1000、10000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 对 H_2O_2 诱导 PC12 氧化应激损伤细胞的保护作用。用 CCK8 法检测细胞增殖活性。对照组: 只加 DMEM 完全培养基培养 24 h 后, 再加入 10 μL PBS 培养 3 h; 模型组: 加入 DMEM 完全培养基培养 24 h 后, 再加入 10 μL 1000 $\mu\text{mol}/\text{L}$ H_2O_2 培养 3 h。给药组: 含不同浓度黄芪渣和发酵产物的总酚 (1、10、100、1000、10000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 完全培养基培养 24 h 后, 再加入 10 μL 1000 $\mu\text{mol}/\text{L}$ H_2O_2 培养 3 h。

MDA 及 SOD 活性测定: 对照组: 只加 DMEM 完全培养基培养 24 h, 再加入 10 μL PBS 培养 3 h; 模型组: 加入 DMEM 完全培养基培养 24 h 后, 再加入 200 μL 1000 $\mu\text{mol}/\text{L}$ H_2O_2 培养 3 h; 黄芪渣组: 含

浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 黄芪渣总酚的完全培养基培养 24 h 后, 再加入 200 μL 1000 $\mu\text{mol}/\text{L}$ H_2O_2 培养 3 h。发酵产物组: 含浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 发酵产物总酚的完全培养基培养 24 h 后, 再加入 200 μL 1000 $\mu\text{mol}/\text{L}$ H_2O_2 培养 3 h。

1.3 数据处理

利用软件 Design-Expert13.0 进行试验设计与方差分析; 采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行 IC_{50} 单因素差异分析 (ANOVA); 采用 Origin 2021 软件对实验数据和结果进行可视化作图处理。所有实验均重复 3 次, 实验结果以平均值 \pm 标准误差表示。

2 结果与分析

2.1 发酵前后活性物质得率比较

为了探究发酵前后黄芪渣和发酵产物中主要活性物质变化情况, 分别对不同组别中总酚、总黄酮、总多糖、总萜类以及总皂苷得率进行测定。结果显示, 发酵产物中总酚和黄酮得率显著升高 ($P<0.001$, $P<0.05$), 相比于黄芪渣组分别增加了 106.63% 和 27.35% (图 1A、B)。发酵产物中总多糖得率显著下降 ($P<0.05$), 相比于黄芪渣组下降了 31.45% (图 1C)。猜测发酵产物中总酚得率大量增加的原因可能是蛹虫草在代谢过程中利用不同活性物质产生的协同效应^[34]。而发酵产物中总多糖得率的下降暗示蛹虫草通过代谢重组利用多糖碳源, 间接促进酚类物质的积累, 具体机制需进一步验证。

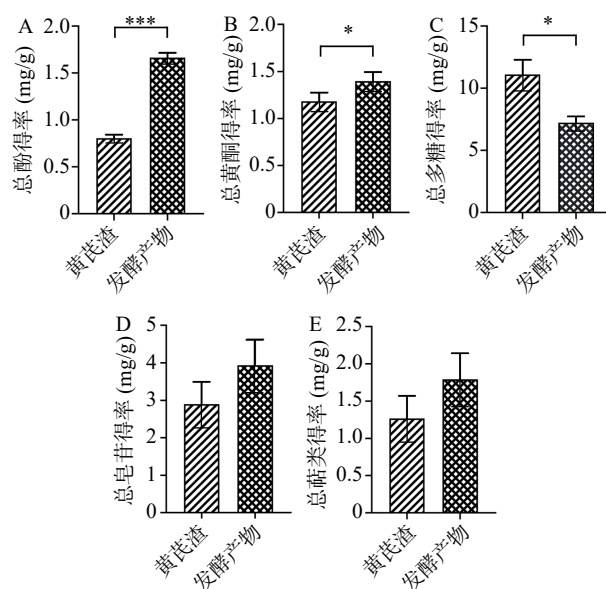


图1 发酵前后总酚、总黄酮、总多糖、总皂苷和总萜类得率变化

Fig.1 Changes in total phenolics, total flavonoids, total polysaccharides, total saponins, and total terpenes before and after fermentation

注: *, **, ***分别表示显著性差异 ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$)。

2.2 发酵产物中总酚提取工艺的单因素实验

如图 2A 所示, 发酵产物中总酚得率随乙醇体积

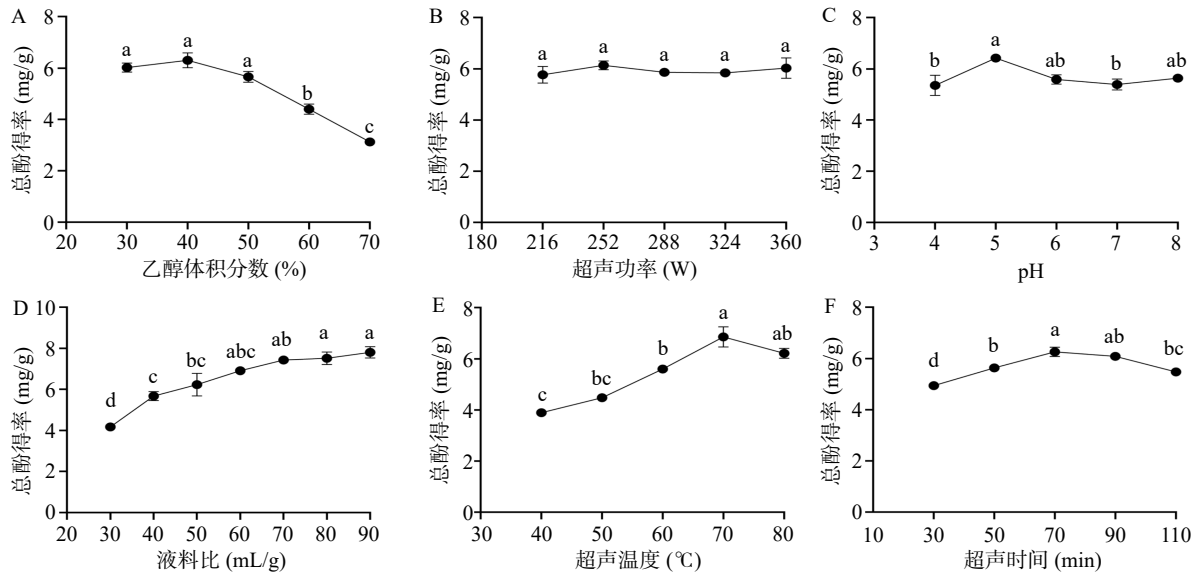


图 2 乙醇体积分数、超声功率、pH、液料比、超声温度、超声时间对总酚得率影响

Fig.2 Effects of ethanol volume fraction, ultrasonic power, pH, liquid to material ratio, ultrasonic temperature, and ultrasonic time on total phenolic yield

注: 图中不同小写字母表示显著差异($P<0.05$)。

分数先增加后减少。在乙醇浓度达到 40% 之前, 随着乙醇浓度的增加, 总酚得率持续增大, 且当乙醇浓度为 40% 时, 总酚得率最高, 但随着乙醇浓度的继续增加, 总酚得率反而下降, 这是因为当乙醇浓度过高时, 提取剂极性降低会抑制酚类物质的释放^[35], 且乙醇浓度越高, 成本越高。因此最终确定乙醇提取剂的最适浓度为 40%。

如图 2B 所示, 超声功率对发酵产物中总酚得率影响不大, 一方面可能是超声波在提取体系中所产生的空化效应和机械作用加速植物细胞的破碎和酚类物质的溶出^[36], 另一方面超声功率的不断增强, 使得一些杂质过多溶解以及某些酚类物质被降解, 以致总酚得率随功率的变化不大。

如图 2C 所示, pH 对发酵产物中总酚得率也具有一定的影响。pH 在 4~5 范围内, 总酚得率随 pH 的增加而显著上升($P<0.05$), 在 pH 到达 5 之后开始下降。酚类物质在偏酸环境下较稳定, 不容易氧化。因此选择 pH 为 5 为最适酸碱度。

如图 2D 所示, 发酵产物中总酚得率与液料比之间呈现出明显的正相关, 总酚得率随着液料比的增大而快速升高后趋于平稳。虽然不断提高液料比有助于促进酚类物质的溶出, 但过高的液料比也会导致提取饱和。

如图 2E 所示, 超声温度对发酵产物中总酚得率影响显著, 温度的升高显著提高总酚得率($P<0.05$), 当超声温度在 70 °C 时, 总酚得率达到最大值。但此温度之后, 总酚得率却有所下降。过高的超声温度会导致酚类物质被分解或氧化, 破坏酚类物质的空间结构^[37], 从而导致发酵产物的总酚得率降低。因此 70 °C 为最佳超声温度。

如图 2F 所示, 超声时间也对发酵产物中总酚得

率影响显著, 从 30 min 至 70 min, 总酚得率显著上升($P<0.05$), 在 70 min 达到最大, 之后有所下降。延长超声时间, 发酵产物与提取剂接触更加充分, 使得总酚更加有效释放, 因此总酚得率上升, 但继续延长超声时间, 会导致酚类物质与空气接触被破坏^[38], 导致总酚得率降低。因此 70 min 为最佳超声时间。

综上所述, 考虑到液料比的增大虽能够提高总酚得率, 但过大的液料比同样会增加提取成本和能源消耗, 且超声功率对总酚得率的影响不显著, 因此本研究最终选取超声温度、超声时间、乙醇体积分数、pH 这 4 个因素为 Box-Behnken 响应面法优化提取试验的影响因素。

2.3 响应面优化

2.3.1 响应面试验设计与结果 综合单因素实验结果, 选择超声温度(A)、超声时间(B)、乙醇体积分数(C)、pH(D)4 个因素作为自变量, 以总酚得率为响应值, 根据 Box-Behnken 试验设计原理设计响应面试验优化发酵产物中总酚的提取工艺参数, 试验设计及结果见表 2。对试验结果进行分析与拟合, 建立了总酚得率(Y)与各因素变量之间关系的二次回归方程模型: 总酚得率=6.84+0.3025A+0.0517B-0.5533C-0.0225D-0.3250AB+0.3700AC+0.0175AD-0.0600BC-0.060BD+0.0500CD+0.0243A²-0.1819B²-0.4994C²-0.1082D²。

由表 3 的回归方程方差分析可以看出, 该回归模型的 $F=7.97$, $P=0.0002$, 表明该回归模型极显著($P<0.01$), 失拟项 $P=0.2186>0.05$, 表示失拟不显著, 拟合程度好。 $R^2=0.9438$, 能解释 94.38% 的响应值变化, 且 $AdjR^2$ 的值为 0.8967, 与 R^2 差值小于 0.2, 说明模型可信度高, 与结果具有良好的一致性。变异系数 $CV=4.01\%$, 表明模型精准度高、可重复。

表 2 响应面设计及结果
Table 2 Response surface design and results

试验号	A 超声温度	B 超声时间	C 乙醇体积分数	D pH	总酚得率 (mg/g)
1	0	0	-1	1	6.64
2	1	1	0	0	5.76
3	0	0	0	0	6.78
4	0	-1	0	1	7.17
5	0	1	0	-1	6.67
6	1	0	1	0	5.32
7	0	0	0	0	5.74
8	0	0	-1	-1	6.97
9	0	0	0	0	6.37
10	-1	1	0	0	7.04
11	-1	-1	0	0	6.88
12	0	0	1	-1	6.98
13	0	1	1	0	6.93
14	0	0	1	1	6.54
15	1	0	0	1	7.00
16	0	0	0	0	6.60
17	0	-1	-1	0	6.40
18	0	0	0	0	5.62
19	-1	0	1	0	6.21
20	0	-1	0	-1	6.69
21	-1	0	0	1	6.45
22	-1	0	0	-1	5.65
23	1	-1	0	0	6.48
24	1	0	0	-1	5.22
25	1	0	-1	0	6.75
26	0	1	0	1	7.23
27	0	-1	1	0	6.69
28	-1	0	-1	0	6.58
29	0	1	-1	0	6.81

表 3 总酚提取量回归方差分析
Table 3 Regression analysis of variance for total phenol extraction

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	7.61	14	0.5438	7.97	0.0002	**
A	1.1	1	1.1	16.09	0.0013	**
B	0.032	1	0.032	0.4695	0.5044	
C	3.67	1	3.67	53.85	<0.0001	**
D	0.0061	1	0.0061	0.089	0.7698	
AB	0.4225	1	0.4225	6.19	0.026	*
AC	0.5476	1	0.5476	8.03	0.0133	*
AD	0.0012	1	0.0012	0.018	0.8953	
BC	0.0144	1	0.0144	0.2111	0.653	
BD	0.0144	1	0.0144	0.2111	0.653	
CD	0.01	1	0.01	0.1466	0.7076	
A ²	0.0038	1	0.0038	0.0563	0.8159	
B ²	0.2147	1	0.2147	3.15	0.0978	
C ²	1.62	1	1.62	23.71	0.0002	**
D ²	0.0759	1	0.0759	1.11	0.3094	
残差	0.9552	14	0.0682			
失拟项	0.8139	10	0.0814	2.3	0.2186	
纯误差	0.1413	4	0.0353			
总和	8.57	28				
R ²	0.9438	AdjR ²	0.8967	PredR ²	0.7726	

注: *表示差异显著(P<0.05); **表示差异极显著(P<0.01)。

2.3.2 响应面分析 各交互作用的响应曲面和等高线如图 3 所示。响应曲面和等高线图直观地反映了两两因素交互作用对发酵产物中总酚得率的影响,响

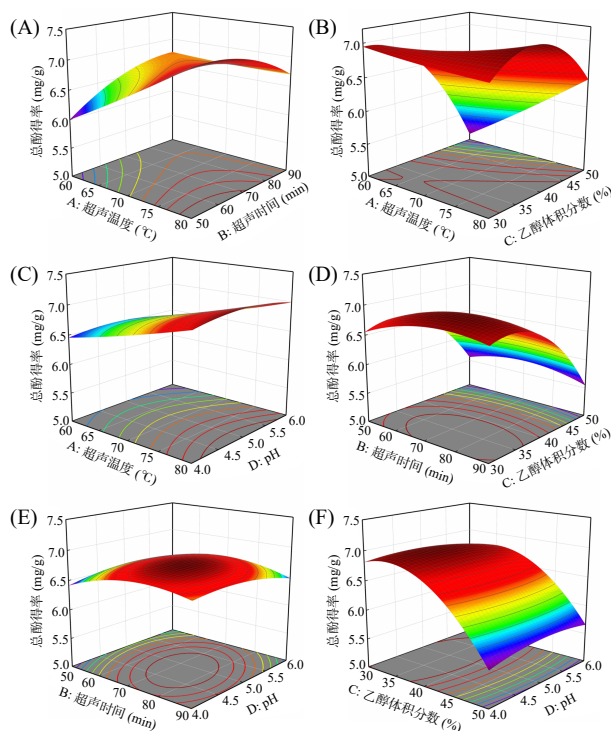


图 3 发酵产物中总酚提取变量及其相互作用的响应面图

Fig.3 Response surface plot of total phenolics extraction variables and their interactions in fermentation products

应曲面的坡度越陡峭、等高线越密集,说明研究因素对发酵产物中总酚得率的影响越大,等高线图为椭圆则表明两因素之间存在交互作用,越接近于圆,交互作用越小。因此图 3 中 A 与 B 的交互作用、A 与 C 的交互作用对发酵产物中总酚的提取影响较为显著,其他因素存在交互作用但并不显著。

2.3.3 最优提取工艺参数的确定 根据模型分析,最佳提取工艺条件为:超声温度 79.478 °C、超声时间 58.177 min、乙醇体积分数 38.658%、pH 为 5.437,预测发酵产物总酚得率为 7.237 mg/g。结合实际条件,最佳提取工艺调整为:超声温度 80 °C、超声时间 58 min、乙醇体积分数 38.7%、pH 为 5.4。按此工艺条件进行了 5 次平行实验,测得发酵产物中总酚得率为 7.243±0.19 mg/g,与模型给出的预测值接近,故模型具有可行性,优化的工艺参数准确可靠。

2.4 发酵产物中总酚体外抗氧化活性测定

发酵产物和黄芪渣对 DPPH 自由基清除率测定结果如图 4A 所示,在实验浓度范围内,黄芪渣和发酵产物中的总酚对 DPPH 自由基的清除能力随浓度增加而增强,均在 2.5 mg/mL 时清除率达到最大,分别为 64.56% 和 94.94%,IC₅₀ 值分别为 1.108 mg/mL 和 0.1765 mg/mL,对照品 V_C 的 IC₅₀ 值为 0.0079 mg/mL。这表明发酵产物总酚清除 DPPH 自由基能力显著大于黄芪渣组(P<0.001),但都低于 V_C。发酵产物和黄芪渣对 ABTS⁺自由基清除率测定结果如图 4B 所示,发酵产物中总酚对 ABTS⁺自由基的清除率随着浓度增加先增大后趋于平稳,总酚在 1.0 mg/mL 时清除率达到最大,清除率为 89.51%,IC₅₀ 值为

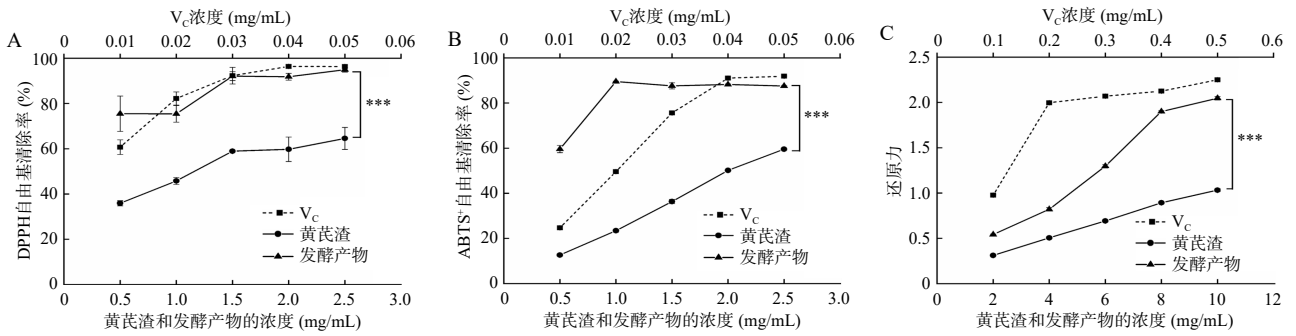


图 4 体外抗氧化能力测定

Fig.4 Determination of *in vitro* antioxidant capacity

注: *, **, ***分别表示黄芪渣和发酵产物的显著性差异($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$)。

0.3371 mg/mL。而黄芪渣中总酚对 ABTS⁺自由基的清除率则线性增加, 在 2.5 mg/mL 时达到最大, 清除率为 59.54%, IC₅₀ 值为 2.022 mg/mL。结果表明, 发酵产物总酚对 ABTS⁺自由基的清除能力显著高于黄芪渣 ($P < 0.001$), 但低于 V_C (IC₅₀ 值为 0.01823 mg/mL)。发酵产物和黄芪渣的总还原力测定结果如图 4C 所示, 黄芪渣和发酵产物中总酚的还原力随浓度增加而上升, 均在 10 mg/mL 时达到最大, 吸光度分别为 1.032 和 2.046, 表明发酵产物中总酚的还原力显著大于黄芪渣组 ($P < 0.001$), 但低于 V_C (0.5 mg/mL 时吸光度为 2.250)。

发酵产物中总酚无论在对 DPPH 和 ABTS⁺自由基的清除率还是总还原力方面均显著高于黄芪渣组 ($P < 0.001$), 这可能是由于发酵过程中受蛹虫草相关代谢途径的影响, 其他物质转化成为酚类物质, 导致总酚含量和种类的改变, 提高了发酵产物中总酚的抗氧化活性^[39]。

2.5 发酵产物总酚对神经细胞氧化损伤的保护作用

PC12 细胞是大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤的细胞系, 常被用作构建氧化应激损伤模型, 在神经科学和相关研究领域中具有广泛的应用^[40-41]。如图 5A、B 所示, 与对照组相比, 黄芪渣和发酵产物中总酚浓度在 1、10、100、1000、10000 μg/mL 时对 PC12 细胞均无毒性, 且黄芪渣和发酵产物分别在 10000 μg/mL 和 1000、10000 μg/mL 显著促进了 PC12 细胞的

增殖 ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。在 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞造成氧化应激损伤模型中, 与模型组相比, 黄芪渣 (图 5C) 中总酚浓度在 1、10、100、1000 μg/mL 对细胞存活率无显著影响, 但当浓度达到 10000 μg/mL 时, 可能是高浓度改变培养基的渗透压, 细胞存活率显著降低 ($P < 0.001$), 而发酵产物 (图 5D) 中总酚浓度在 10、100、1000、10000 μg/mL 时显著提高了细胞存活率 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.01$)。这些结果表明, 发酵产物中总酚对氧化应激损伤的 PC12 细胞的保护作用显著优于黄芪渣组。

2.6 发酵产物总酚对 H₂O₂ 损伤 PC12 细胞氧化应激相关指标的影响

MDA 是脂质过氧化物的产物, 是反映机体抗氧化潜能的重要参数^[42-43], SOD 是细胞内部抗氧化防线的关键酶之一, 可消除在氧化应激状态下产生的过量自由基, 防止自由基对细胞造成损伤, 因此 MDA 和 SOD 是反映机体氧化应激程度的重要指标^[42-45]。如表 4 所示, 模型组与对照组相比, MDA 水平显著上升 ($P < 0.05$), SOD 活性显著下降 ($P < 0.05$)。发酵产物组与模型组相比, MDA 水平显著下降 ($P < 0.05$), SOD 活性显著上升 ($P < 0.05$), 而黄芪渣组与模型组相比, MDA 水平与 SOD 活性没有表现出显著差异。这些结果表明发酵产物中的总酚相比黄芪渣组, 可以显著减轻氧化应激的程度, 修复氧化损伤, 从而提高细胞的存活率。

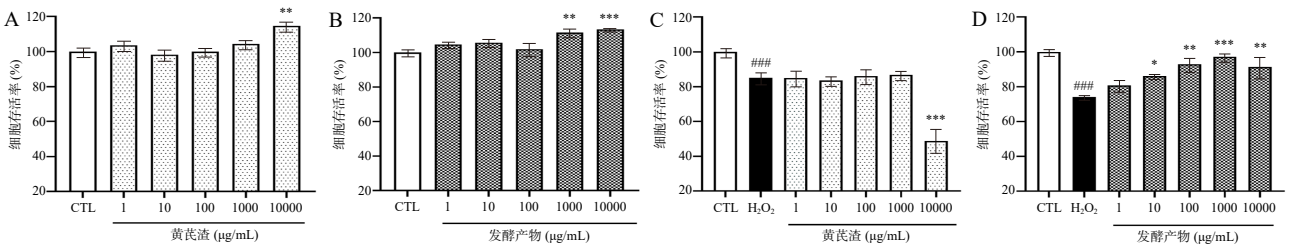


图 5 黄芪渣和发酵产物中的总酚对 PC12 细胞存活率的影响

Fig.5 Effect of total phenolics of *Astragalus* residue and fermentation products on the survival rate of PC12 cells

注: A: 黄芪渣总酚对 PC12 细胞存活率的影响; B: 发酵产物总酚对 PC12 细胞存活率的影响; C: 黄芪渣总酚对 H₂O₂ 诱导后 PC12 细胞存活率影响; D: 发酵产物总酚对 H₂O₂ 诱导后 PC12 细胞存活率影响; *, **, ***分别表示总酚组与空白组 (A、B) 和总酚组与模型组 (C、D) 显著性差异 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$); #、##、###分别表示模型组与空白组 (C、D) 显著性差异 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$)。

表4 各组细胞中MDA水平和SOD活性

Table 4 Level of malonic acid and activities of superoxide dismutase in each group of cell

组别	MDA(nmol/mg)	SOD(U/mg)
对照组	1.64±0.13 ^a	454.74±55.14 ^a
模型组	2.30±0.10 ^a	119.36±52.11 ^b
黄芪渣	2.15±0.15 ^{ab}	101.04±15.89 ^b
发酵产物	1.70±0.07 ^{bc}	372.59±58.03 ^a

注: 同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

3 结论

本研究利用蛹虫草对黄芪渣进行固态发酵, 系统研究了发酵前后总多糖、总黄酮、总萜类、总皂苷和总酚等活性物质得率的变化, 相比黄芪渣组, 研究发现发酵产物中的总酚得率显著提高($P<0.001$), 说明蛹虫草利用黄芪渣作为培养基质可能在发酵过程中利用或分解了原药渣中的其他活性物质, 转化合成了酚类物质。在此基础上, 对发酵产物中总酚提取进行了工艺优化, 得到最佳提取工艺条件为: 超声温度 80 °C、超声时间 58 min、乙醇体积分数 38.7%、pH 为 5.4。在此条件下总酚得率为 7.243±0.19 mg/g, 与模型给出的预测值 7.237 mg/g 接近, 优化的工艺参数准确可靠。此外, 抗氧化实验表明, 发酵产物中总酚的体外抗氧化能力显著优于黄芪渣组($P<0.001$)。在 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞氧化应激实验中, 发酵产物中的总酚相较于黄芪渣组在 10、100、1000、10000 μg/mL 浓度范围内显著提高了细胞存活率($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$, $P<0.01$), 经进一步分析发现发酵产物总酚导致 MDA 水平降低, SOD 活性升高, 说明发酵产物中的总酚具有良好的抗氧化和细胞修复作用。本研究为蛹虫草和黄芪渣的综合开发利用提供了新的思路, 为后续在食品领域进一步深入研究与利用提供理论依据。

© The Author(s) 2025. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] MALUCKA L U, UHRINOVA A, LYSINOVA P. Medicinal mushrooms *Ophiocordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris*[J]. Ceska Slov Farm, 2022, 71(6): 259–265.
- [2] LIU J, LIU B, XUE Q, et al. Analysis of appearance and active substances of *Cordyceps militaris* stromata on *Antheraea pernyi* pupae after optimization[J]. Food Science and Technology, 2023, 43: e127022.
- [3] SANGWANNA S, SEELARAT W, PANKLAI T, et al. Air atmospheric pressure plasma jet to improve fruiting body production and enhance bioactive phytochemicals from mutant *Cordyceps militaris* (white *Cordyceps militaris*) [J]. Food and Bioprocess Technology, 2023, 16(9): 1976–1991.
- [4] ZHANG J, ZHANG W, YIN Z, et al. Procoagulant constituents from *Cordyceps militaris* [J]. Food Science and Human Wellness, 2018, 7(4): 282–286.
- [5] DAI K Y, LIU C, JI H Y, et al. Extraction, structural identifi-

cation and anti-tumor activity of two *Cordyceps militaris* polysaccharides evaluated by S180 tumor-bearing mice [J]. Industrial Crops and Products, 2024, 210: 118163.

- [6] LU H Y, TSAI W C, LIU J S, et al. Preparation and evaluation of *Cordyceps militaris* polysaccharide- and sesame oil-loaded nanoemulsion for the treatment of candidal vaginitis in mice [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2023, 167: 115506.
- [7] LI L, WANG L, FAN W, et al. The application of fermentation technology in traditional chinese medicine: A review [J]. American Journal of Chinese Medicine, 2020, 48(4): 899–921.
- [8] CUI L, ZHAO L, SHEN G, et al. Antitumor mechanism and therapeutic potential of cordycepin derivatives [J]. Molecules, 2024, 29(2): 483.
- [9] 高静静, 庄新辉, 谭雪松, 等. 中药渣资源化利用研究进展 [J]. 中成药, 2024, 46(2): 536–541. [GAO Jingjing, ZHUANG Xinhui, TAN Xuesong, et al. Research progress on resource utilization of Chinese medicine dregs [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2024, 46(2): 536–541.]
- [10] 袁琪, 李伟东, 郑艳萍, 等. 中药渣的深加工及其资源化利用 [J]. 生物加工过程, 2019, 17(2): 171–176. [YUAN Qi, LI Weidong, ZHENG Yanping, et al. Valorization of Chinese medicine residue—a review [J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2019, 17(2): 171–176.]
- [11] 罗建伟, 武琪琪, 郭雨悦, 等. 中药活性成分的药用真菌生物转化研究进展 [J]. 化学与生物工程, 2023, 40(6): 1–7. [LUO Jianwei, WU Qiqi, GUO Yuyue, et al. Research progress in biotransformation of active ingredients in traditional Chinese medicine by medicinal fungi [J]. Chemistry & Bioengineering, 2023, 40(6): 1–7.]
- [12] ZHANG Y Y, ZHANG P, LE M M, et al. Improving flavor of summer Keemun black tea by solid-state fermentation using *Cordyceps militaris* revealed by LC/MS-based metabolomics and GC/MS analysis [J]. Food Chem, 2023, 407: 135172.
- [13] 庄毅, 潘扬, 谢小梅, 等. 药用真菌“双向发酵”的起源、发展及其优势与潜力 [J]. 中国食用菌, 2007(2): 3–6. [ZHUANG Yi, PAN Yang, XIE Xiaomei, et al. The origin, development and its advantages, and potential of "the bi-directional solid fermentation" for medicinal fungi [J]. Edible Fungi of China, 2007(2): 3–6.]
- [14] 唐敏, 冷悦, 王淑敏, 等. 猴头菌与人参双向固体发酵菌质体外抗氧化活性分析 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(1): 154–161. [TANG Min, LENG Yue, WANG Shumin, et al. *In vitro* antioxidant activity analysis of bi-direction solid fermentation plasm of *Hericium erinaceus* and ginseng [J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(1): 154–161.]
- [15] 孙琳, 井长欣, 邹睿, 等. 刺五加-灵芝双向固体发酵工艺优化及抗氧化活性评价 [J]. 科学技术与工程, 2023, 23(21): 9004–9014. [SUN Lin, JING Changxin, ZOU Rui, et al. Optimization of the Bi-directional solid fermentation process of *Acanthopanax senticosus* by *Ganoderma lingzhi* and evaluation of its antioxidant activity [J]. Science Technology and Engineering, 2023, 23(21): 9004–9014.]
- [16] 金兴聪, 卢建秋, 崔议方, 等. 黄芪-茯苓双向固体发酵菌质对高尿酸血症小鼠的改善作用研究 [J]. 中国现代中药, 2023, 25(6): 1245–1251. [JIN Xingcong, LU Jianqiu, CUI Yifang, et al. Bidirectional solid-state fermentation of *Astragali Radix-Poris* treats hyperuricemia in mice [J]. Modern Chinese Medicine, 2023, 25(6): 1245–1251.]
- [17] 李慧星, 周永康, 方佩琦, 等. 山药-蛹虫草双向发酵的抗氧化活性增效性 [J]. 食品科学, 2021, 42(13): 51–56. [LI Huixing, ZHOU Yongkang, FANG Peiqi, et al. Enhancement of antioxidant activity of chinese yam by fermentation with *Cordyceps militaris*

- [J]. *Food Science*, 2021, 42(13): 51–56.]
- [18] 闫梅霞, 张瑞, 逢世峰, 等. 蛹虫草固态发酵人参产物的有效成分含量测定[J]. *食用菌学报*, 2015, 22(1): 41–46. [YAN Meixia, ZHANG Rui, PANG Shifeng, et al. Putative bioactive compounds in *Cordyceps militaris*-fermented ginseng root cultured *C. militaris* fruit bodies and in the spent culture medium[J]. *Acta Edulis Fungi*, 2015, 22(1): 41–46.]
- [19] 贺晓玉, 罗杰, 李英伦. 响应面法优化蛹虫草菌固体发酵五味子药渣发酵条件[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(15): 166–170. [HE Xiaoyu, LUO Jie, LI Yinglun. Optimization of fermentation conditions of *Cordyceps militaris* solid-ferment Schisandra chinensis dregs by response surface methodology[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(15): 166–170.]
- [20] LIU Y, HAN X, XING F, et al. Total flavonoids of astragalus attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing the activation and inflammatory responses of microglia via JNK/AKT/NF κ B signaling pathway[J]. *Phytochemistry*, 2021, 80: 153385.
- [21] MEI H, CHAN H P, EUN J C, et al. Caterpillar medicinal mushroom, *Cordyceps militaris* (Ascomycota), attenuates A β 1-42-induced amyloidogenesis and inflammatory response by suppressing amyloid precursor protein progression and p38 MAPK/JNK activation[J]. *Pharmacology & Pharmacy*, 2021, 23(11): 71–83.
- [22] WU S, WU Q, WANG J, et al. Novel selenium peptides obtained from selenium-enriched *Cordyceps militaris* alleviate neuroinflammation and gut microbiota dysbacteriosis in LPS-injured mice[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(10): 3194–3206.
- [23] YIN Liqing, ZHANG Yongzhu, WANG Lixia, et al. Neuroprotective potency of a soy whey fermented by *Cordyceps militaris* SN-18 against hydrogen peroxide-induced oxidative injury in PC12 cells[J]. *European Journal of Nutrition*, 2021, 61(2): 779–792.
- [24] CHEN S, LI X, LIU X, et al. Investigation of chemical composition, antioxidant activity, and the effects of alfalfa flavonoids on growth performance[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 2020: 8569237.
- [25] ZENG C, YE G, LI G, et al. RID serve as a more appropriate measure than phenol sulfuric acid method for natural water-soluble polysaccharides quantification[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2022, 278: 118928.
- [26] DE AGUIAR N S, HANSEL F A, REIS C A F, et al. Optimizing the vanillin-acid sulfuric method to total saponin content in leaves of yerba mate clones[J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2024, 21(4): e202301883.
- [27] VO T P, HO T A T, HA N M H, et al. Recovering bioactive compounds from yacon (*Smallanthus sonchifolius*) using the ultrasonic-microwave-assisted extraction technique[J]. *Applied Food Research*, 2024, 4(2): 100451.
- [28] RIBEIRO D A, CAMILO C J, NONATO C D A, et al. Influence of seasonal variation on phenolic content and *in vitro* antioxidant activity of *Secundatia floribunda* A. DC. (Apocynaceae)[J]. *Food Chem*, 2020, 315: 126277.
- [29] KETNAWA S, SUWANNACHOT J, OGAWA Y. *In vitro* gastrointestinal digestion of crisphead lettuce: Changes in bioactive compounds and antioxidant potential[J]. *Food Chem*, 2020, 311: 125885.
- [30] LI H, GAO T, ZHANG Z, et al. A novel *Stauntonia leucantha* fruits arabinogalactan: And structural characterization[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2023, 303: 120481.
- [31] XIA C, YANG K, ZHU Y, et al. Distribution of free and bound phenolic compounds, β -glucan, and araboxylan in fractions of milled hullless barley[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2022, 169: 113935.
- [32] HUANG Y, LIU Y, HUANG Q, et al. Monosodium urate crystals reduce human ligament cells viability through increase of ROS production[J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2021, 80: 278.
- [33] WU S, MIAO J, ZHU S, et al. Pongamol prevents neurotoxicity via the activation of MAPKs/Nrf2 signaling pathway in H₂O₂-induced neuronal PC12 cells and prolongs the lifespan of *Caenorhabditis elegans*[J]. *Molecular Neurobiology*, 2024, 61: 8219–8233.
- [34] LOU H, YANG C, GONG Y, et al. Edible fungi efficiently degrade aflatoxin B1 in cereals and improve their nutritional composition by solid-state fermentation[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2023, 451: 131139.
- [35] WENXIA W, SHAN J, MENGMENG L, et al. Simultaneous process optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols and ellagic acid from pomegranate (*Punica granatum* L.) flowers and its biological activities[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2021, 80: 105883.
- [36] LING M, YAN C, ZHENJIA Z, et al. Ultrasound-assisted extraction of paeonol from moutan cortex: Purification and component identification of extract[J]. *Biochemistry & Molecular Biology*, 2024, 29(3): 622.
- [37] SULAIMAN I S, BASRI M, FARD MASOUMI H R, et al. Effects of temperature, time, and solvent ratio on the extraction of phenolic compounds and the anti-radical activity of *Clinacanthus nutans* Lindau leaves by response surface methodology[J]. *Chemistry Central Journal*, 2017, 11: 54.
- [38] SADY S, MATUSZAK L, BLASZCZYK A. Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of bioactive compounds from chokeberry pomace using response surface methodology[J]. *Acta Sci Polon-Technol Aliment*, 2019, 18(3): 249–256.
- [39] BONATSOU S, ILIOPOULOS V, MALLOUCHOS A, et al. Effect of osmotic dehydration of olives as pre-fermentation treatment and partial substitution of sodium chloride by monosodium glutamate in the fermentation profile of Kalamata natural black olives[J]. *Food Microbiology*, 2017, 63: 72–83.
- [40] WANG F, LIU Q, WANG W, et al. A polysaccharide isolated from *Cynomorium songaricum* Rupr. protects PC12 cells against H₂O₂-induced injury[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 87: 222–228.
- [41] DU X, WANG K, SANG X, et al. Naringin ameliorates H₂O₂-induced oxidative damage in cells and prolongs the lifespan of female *Drosophila melanogaster* via the insulin signaling pathway[J]. *Food Science and Human Wellness*, 2024, 13(3): 1231–1245.
- [42] LI F Z, SONG X, XU J X, et al. Morroniside protects OLN-93 cells against H₂O₂-induced injury through the PI3K/Akt pathway-mediated antioxidative stress and antiapoptotic activities[J]. *Cell Cycle*, 2021, 20: 661–675.
- [43] YI X, QIRUN Y, JING L, et al. Oxidative stress and endoplasmic reticulum stress are involved in the protective effect of alpha lipoic acid against heat damage in chicken testes[J]. *Agriculture, Dairy & Animal Science*, 2020, 10(3): 384.
- [44] MO Q T, FU H, ZHAO D, et al. Protective effects of mogroside V on oxidative stress induced by H₂O₂ in skin fibroblasts[J]. *Chemistry, Medicinal*, 2021, 15: 4901–4909.
- [45] CHENG Changhong, MA Hongling, LIU Guangxin, et al. Mechanism of cadmium exposure induced hepatotoxicity in the mud crab (*Scylla paramamosain*): Activation of oxidative stress and Nrf2 signaling pathway[J]. *Biochemistry & Molecular Biology*, 2022, 11(5): 978.