

基于混料设计的蛹虫草谷物培养基优化 及发酵动力学模型建立

张馨韦^{1,2}, 范秀芝^{1*}, 胡然³, 张乐^{1,2}, 高虹¹, 史德芳¹, 殷朝敏¹, 黄志成¹, 胡国元²

(1. 湖北省农业科学院农产品加工与核农技术研究所, 农业农村部农产品冷链物流技术重点实验室, 特色农产品资源挖掘与高质利用湖北省重点实验室, 湖北武汉 430064) (2. 武汉工程大学环境生态与生物工程学院, 湖北武汉 430205) (3. 湖北工业大学生命科学与健康工程学院, 湖北武汉 430000)

摘要: 蛹虫草中虫草素和麦角甾醇在抑制黄嘌呤氧化酶和环氧化酶-2、降尿酸等方面具有协同作用。固态发酵可提高蛹虫草中活性物质积累, 但无虫草素、腺苷和麦角甾醇协同富集的报道。为提高蛹虫草菌丝体中虫草素、腺苷和麦角甾醇的协同积累水平并阐明其富集规律, 本研究以7种常见谷物为候选基质, 以3种活性成分含量为评价指标, 通过混料设计优化基质配比, 并采用 Logistic 与 Boltzmann 模型对菌体生长、底物消耗及产物生成过程进行动力学拟合分析。结果表明, 最优培养基组合为荞麦 12.90 g、燕麦 5.60 g 和小麦 1.50 g, 在该条件下虫草素、腺苷和麦角甾醇含量分别为 1 448.87 mg kg⁻¹、554.50 mg kg⁻¹ 和 1 019.33 mg kg⁻¹。动力学分析显示, 各指标均呈阶段性变化, 模型拟合良好 ($R^2>0.98$), 3 种活性成分积累曲线均呈 S 型, 且发酵 27 d 时达到理论最大值的 99% 以上。通过混料设计与动力学建模相结合的方法, 可实现蛹虫草多活性成分的协同提升, 并为发酵过程优化及蛹虫草功能性食品的开发提供理论依据。

关键词: 蛹虫草; 固态发酵; 活性成分; 混料设计; 动力学模型

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2027.5.0395

Optimization of Grain Substrates for *Cordyceps Militaris* Using Mixture Design and Development of Fermentation Kinetic Model

ZHANG Xinwei^{1,2}, FAN Xiuzhi^{1*}, HU Ran³, ZHANG Le^{1,2}, GAO Hong¹, SHI Defang¹, YIN Chaomin¹, HUANG Zhicheng¹, HU Guoyuan²

(1. Institute of Agricultural Products Processing and Nuclear Agriculture Technology, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Cold Chain Logistics Technology for Agro-product, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Hubei Key Laboratory of Characteristic Resources and Utilization, Wuhan 430064, China)

(2. School of Environmental Ecology and Biological Engineering, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430205, China)

(3. School of Life Science and Health Engineering, Hubei University of Technology, Wuhan 430000, China)

Abstract: Cordycepin and ergosterol in *Cordyceps militaris* have synergistic effects in inhibiting xanthine oxidase and cyclooxygenase-2, as well as lowering uric acid in mice. Solid state fermentation can increase the accumulation of active substances in *C. militaris*, but there are no reports of synergistic enrichment of cordycepin, adenosine, and ergosterol. Therefore, to enhance the synergistic accumulation levels of cordycepin, adenosine and ergosterol in the mycelia of *Cordyceps militaris* and elucidate their enrichment patterns, seven grains were selected as candidate substrates in this study. With the contents of the three active components as evaluation indices, the substrate proportion was optimized by mixture design. Meanwhile, Logistic and Boltzmann models were employed to fit the kinetics of mycelial growth, substrate consumption, and product formation. The results showed that the optimal medium consisted of 12.90 g buckwheat, 5.60 g oat, and 1.50 g wheat. Under this condition, the contents of cordycepin, adenosine and ergosterol reached 1 448.87 mg kg⁻¹, 554.50 mg kg⁻¹ and 1 019.33 mg kg⁻¹, respectively. Kinetic analysis indicated that all parameters exhibited distinct phase characteristics, with satisfactory model fitting ($R^2>0.98$), and the accumulation curves of the three active compounds followed typical S-shaped patterns. The predicted values suggested that more than 99% of

收稿日期: 2026-03-13; 修回日期: 2026-05-15; 接受日期: 2026-05-15

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2024YFD2100800)

作者简介: 张馨韦 (2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食用菌活性成分分析研究, E-mail: zhangxinw2025@163.com

通讯作者: 范秀芝 (1984-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 食用菌活性物质合成调控及精深加工, E-mail: xzhfan@163.com

the theoretical maximum levels of the three components were achieved at 27 days of fermentation. In conclusion, the combined application of mixture design and kinetic modeling could enable the synergistic enhancement of multiple active components, and provide a theoretical basis for the optimization of fermentation processes and the development of functional foods derived from *C. militaris*.

Key words: *Cordyceps militaris*; solid-state fermentation; bioactive components; mixture design; kinetic model

蛹虫草 (*Cordyceps militaris*) 是一种具有较高开发价值的药食两用真菌, 隶属于子囊菌亚门、麦角菌科^[1], 具有生产周期短、培养条件稳定、产量高及人工规模化培养可控性强等优势, 被认为是冬虫夏草 (*Cordyceps sinensis*) 的重要替代资源^[2,3]。蛹虫草中富含虫草素、腺苷、麦角甾醇、多糖及多种氨基酸等活性成分^[4-7], 在抗氧化、抗肿瘤、抗炎、免疫调节和抗衰老等方面表现出良好的生物活性^[8-10]。其中, 虫草素、腺苷和麦角甾醇是蛹虫草功能评价和产品开发中受到广泛关注的代表性活性物质。已有研究表明, 虫草素与麦角甾醇在抑制黄嘌呤氧化酶 (Xanthine Oxidase, XO) 和环氧合酶-2 (Cyclooxygenase-2, COX-2)、降尿酸等方面具有一定协同作用^[11], 提示蛹虫草中多种活性成分的共同积累可能比单一成分富集更有利于提升其综合利用价值。因此, 通过调控实现蛹虫草多种活性成分的同步提升, 将成为其高值化开发的新途径。

目前, 蛹虫草的人工栽培以固态发酵为主。中药渣^[12,13]、麸皮^[14]、谷物粉与麸皮混合物^[15,16]及其他复合农副产品^[17]等是蛹虫草固态发酵的常用基质。已有研究表明, 固态发酵基质类型、组成及培养条件可显著影响蛹虫草菌丝生长和代谢产物形成, 通过调控发酵基质组成及培养条件, 可有效促进虫草素等活性物质的合成与积累^[18-21]。但现有研究多集中于虫草素等单一活性物质的提升, 鲜有利用谷物培养基对虫草素、腺苷和麦角甾醇等多种活性成分同步富集的报道。

因此, 本研究选择 7 种谷物 (红米、荞麦、小麦、燕麦、高粱、玉米和大麦) 为候选基质, 以虫草素、腺苷和麦角甾醇为指标, 通过混料设计优化培养基配比, 并建立发酵动力学模型, 明确活性物质富集规律, 为发酵时间的选择以及单一或多种活性物质的开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

红米、荞麦、小麦、燕麦、高粱、玉米、大麦: 郑州朵麦典商贸有限公司; 蛹虫草 6 号: 华中农业大学。

葡萄糖、酵母提取物、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、七水硫酸镁均为食品级, 乙腈、甲醇均为色谱纯, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 无水乙醇为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司。虫草素、腺苷、麦角甾醇标准品, 上海源叶生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

LDZX-50KBS 立式高压蒸汽灭菌锅, 上海申安医疗器械厂; JH-150F 生化培养箱, 上海简户仪器设备有限公司; FD5-3P 真空冷冻干燥机, 美国金西盟公司; KQ-5200DE 超声波清洗仪, 昆山市超声波仪器有限公司; 3K15 高速冷冻离心机, 美国 Sigma 公司; D2510-01 玻璃组织研磨器, 上海精密仪器仪表有限公司; RE-52AA 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; LC-20A 高效液相色谱仪, 日本岛津公司。

1.3 实验方法

1.3.1 培养基制备

液体完全培养基 (Liquid Complete Medium, LCM): 20 g 葡萄糖、2 g 蛋白胨、2 g 酵母膏、0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1 g K_2HPO_4 、0.46 g KH_2PO_4 、1 L 蒸馏水, 121 °C 灭菌 30 min^[22]。

完全培养基 (Complete Medium, CM): 1 L 液体完全培养基加 20 g 琼脂, 121 °C 灭菌 30 min。

固态发酵培养基: 150 mL 罐头瓶中加入 20 g 谷物、30 mL 蒸馏水, 121 °C 灭菌 30 min。

1.3.2 菌株活化和种子液制备

将蛹虫草菌株接种于含 CM 的平板中, 25 °C 恒温培养活化。待菌丝长满平板后, 用 8 mm 打孔器打孔, 取菌块接入 LCM 中, 25 °C、120 r min⁻¹ 振荡培养 7 d。培养结束用玻璃匀浆器将菌丝体匀浆制备种子液备用。

1.3.3 固态发酵

按 10% (ϕ) 的接种量吸取 2 mL 种子液均匀接种到谷物培养基中, 以 2 mL 灭菌水为空白对照组, 25 °C 静置培养 15 d, 培养完成后菌质冻干, 粉碎过 80 目筛后置 -20 °C 保存备用。

1.3.4 谷物初筛

分别以红米、荞麦、小麦、燕麦、高粱、玉米和大麦为单一基质配制固态发酵培养基, 按 1.3.3 所述方法接种并发酵, 发酵过程中定时观察、拍照记录不同谷物基质上蛹虫草菌丝生长状况, 记录菌丝生长速率、色泽及浓密程度等生长性状; 发酵周期结束后, 收集各组发酵菌质, 测定虫草素、腺苷和麦角甾醇含量。

1.3.5 D-最优混料设计优化试验

基于单一谷物基质发酵结果, 选取荞麦、燕麦和小麦作为复合培养基质。依据各谷物的添加范围 (表 1), 在保持基质总量为 20 g 的条件下, 采用 D-最优混料设计 (D-optimal design) 对各组分添加量进行优化。以荞麦 (A)、燕麦 (B) 和小麦 (C) 的添加量为自变量, 以发酵菌质中虫草素、腺苷和麦角甾醇含量为响应值。

表 1 混料设计试验因素及水平

Table 1 Factors and levels of the mixture design experiment

因素	质量/g	
	最低值	最高值
A/荞麦	5	20
B/燕麦	0	12
C/小麦	0	3

1.3.6 虫草素和腺苷的测定

参考标准 NY/T 2116-2012 《虫草制品中虫草素和腺苷的测定 高效液相色谱法》测定发酵菌质中虫草素和腺苷含量。精确称取 0.5 g 样品于 100 mL 容量瓶中, 加入 80 mL 超纯水, 在 400 W 条件下超声提取 3 h, 取出后用超纯水定容至 100 mL, 摇匀, 取 1 mL 样液离心后, 将上清液过 0.22 μm 滤膜, 滤液供 HPLC 分析。色谱条件为: 乙腈: 水=5:95 (V/V) 为流动相, 流速为 1.0 mL min^{-1} , 柱温 35 °C, 进样体积 10 μL , 检测波长 260 nm。

采用外标法定量, 虫草素和腺苷标准溶液的质量浓度在 1~50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好, 其标准曲线方程分别为 $y_{\text{虫草素}}=71\,240x+47\,341$ ($R^2=0.999\,2$); $y_{\text{腺苷}}=37\,324x+21\,264$ ($R^2=0.999\,3$)。样品中虫草素和腺苷含量按标准方法计算 (mg kg^{-1})。

1.3.7 麦角甾醇的测定

利用国标方法 GB/T 25221-2010 《粮油检验 粮食中麦角甾醇的测定正相高效液相色谱法》在 7 种谷物中均未检测到麦角甾醇, 表明原料无真菌污染, 安全可用。

称取 0.5 g 发酵菌质样品, 加入 50 mL 95% 乙醇, 85 °C 水浴 3 h, 残渣重复提取 2 次, 合并滤液, 8 000 r min^{-1} , 4 °C 离心 10 min, 上清液 50 °C 减压浓缩后用甲醇定容至 10 mL, 得麦角甾醇提取液。取 2 mL 提取液过 0.22 μm 微孔滤膜后进行麦角甾醇含量的测定。测定条件: 100% (ϕ) 甲醇为流动相, 流速为 1.0 mL min^{-1} , 柱温 30 °C, 进样体积 10 μL , 检测波长 282 nm。麦角甾醇标准溶液质量浓度为 20~640 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 标准曲线方程 $y_{\text{麦角甾醇}}=11\,961x+34\,852$ ($R^2=0.999\,5$), 据此计算样品中麦角甾醇含量 (mg kg^{-1})。

1.3.8 方法验证

为验证蛹虫草发酵菌质中虫草素、腺苷和麦角甾醇含量测定方法的可靠性, 进行了精密度、重复性和稳定性考察。精密度测定: 按照 1.3.6 和 1.3.7 中的方法制备样品提取液, 供试样品连续进样 6 次, 每次进样 10 μL , 依据各自色谱条件进行检测, 根据峰面积计算虫草素、腺苷和麦角甾醇含量和相对标准偏差 (Relative standard deviation, RSD); 重复性测定: 取按 1.3.6 和 1.3.7 中所述方法制备的提取液 6 份, 每份进样 10 μL , 依据各自色谱条件测定 3 种活性物质含量, 并计算 RSD; 稳定性测定: 取 1.3.6 和 1.3.7 中制备的提取液, 分别取避光保存 0、2、4、8、12、24 h 后的样品进样, 每次 10 μL , 依据各自色谱条件测定 3 种活性物质含量, 并计算 RSD。

1.3.9 生物量测定

采用呼吸量测定法, 以 CO_2 释放率间接表征菌体生物量^[23]。通过比较样品组与空白组在相邻两次称量间的质量变化, 按公式 (1) 计算 CO_2 的释放速率:

$$Y = (M_1 - M_2) - (M_3 - M_4) \quad (1)$$

式中：
Y——为 CO₂ 释放率，g d⁻¹；
M₁ 和 M₂——分别为样品组前后两次测量的重量，g；
M₃ 和 M₄——分别为空白组前后两次测量的重量，g。

1.3.10 底物消耗量的测定

参考申春莉的方法^[24]，采用 DNS 法测定基质中还原糖含量，以计算底物消耗量。以葡萄糖为标准品绘制标准曲线，回归方程为 $y_{\text{还原糖}}=1.463\ 54x-0.084\ 1$ ($R^2=0.993\ 5$)，根据标准曲线计算菌质中的还原糖含量 (mg g⁻¹)。

1.3.11 发酵动力学研究

利用优化的培养基质进行 21 d 蛹虫草固体发酵，期间分别于发酵第 0、3、6、9、12、15、18 和 21 天测定菌丝生物量、还原糖含量以及虫草素、腺苷和麦角甾醇含量。为避免连续取样破坏固态发酵体系的完整性，各时间点样品均独立培养，并设置 3 个平行。取样时，将对应时间点培养瓶内的全部基质及菌丝体一次性取出，充分混匀，经冷冻干燥、粉碎并过 80 目筛后，于 -20 ℃ 保存备用。根据实验数据变化特征，采用 Logistic 方程和 Boltzmann 方程分别对菌丝生物量、还原糖消耗及活性成分生成过程进行动力学建模^[25-27]。

1.3.12 数据分析

所有实验至少重复 3 次，采用 Design-Expert 10.0 软件 D-optimal Mixture design 模块对混料试验进行设计和数据拟合分析。采用 Origin 2021 软件绘制图表和非线性拟合，建立发酵动力学模型。

2 结果与讨论

2.1 菌丝生长情况

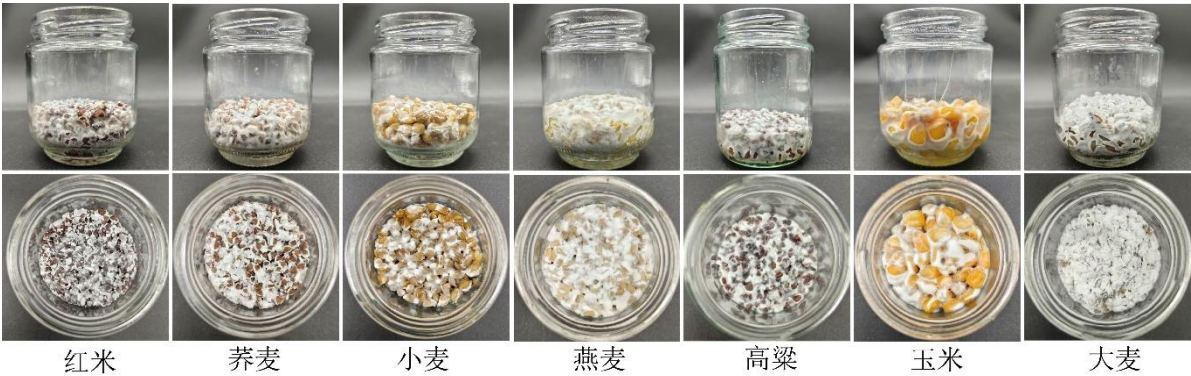


图 1 不同谷物基质上蛹虫草菌丝生长状况

Fig.1 Growth status of Cordyceps militaris mycelia on different grain substrates

表 2 不同谷物基质上蛹虫草菌丝生长情况比较

Table 2 Comparison of mycelial status of Cordyceps militaris on different grain substrates

谷物基质	菌丝体色泽描述	菌丝浓密程度	菌丝生长速度
红米	菌丝洁白均匀，无黄化或杂色污染	++++	++++
荞麦	菌丝洁白，除基质未覆盖部分呈少量浅褐色，整体色泽均匀明亮	+++	+++
小麦	菌丝为浅白色带乳白光泽，色泽均匀	++	++
燕麦	菌丝呈均匀亮白色，色泽纯净无杂色，洁白度最佳	+++++	+++++
高粱	菌丝均匀洁白色，无黄化、发灰现象	+++	+++
玉米	菌丝纯白色，无污染斑点，色泽均匀	++	+
大麦	菌丝呈均匀亮白色，色泽纯净无发黄发暗	+++++	++++

注：+，表示菌丝浓密程度或生长速度，符号数量越多，代表菌丝致密程度越高、生长速度越快。

不同谷物基质上培养 15 d 的蛹虫草菌丝体生长状态如图 1 所示。采用分级法对菌丝色泽、浓密及生长速度进行量化评价，结果如表 2 所示。各基质上蛹虫草菌丝色泽均呈洁白或亮白色，无黄化及杂菌污染现象。其中，燕麦与大麦基质上菌丝色泽最为纯净亮白，浓密程度最高，生长速度最快；红米基质上菌丝洁白均匀，浓密程度与

生长速度等级均较高，整体表现良好；荞麦与高粱基质上菌丝长势均匀、致密性良好，可满足菌丝正常生长需求；小麦和玉米基质上菌丝浓密程度较低，生长速度偏缓。

2.2 方法验证结果

精密度试验结果显示，虫草素、腺苷和麦角甾醇含量的 RSD 分别为 1.95%、0.82%和 0.55%，表明仪器精密度良好。重复性试验结果显示，6 个样品中虫草素、腺苷和麦角甾醇测定含量的 RSD 分别为 2.04%、1.20%和 0.98%，表明该方法具有良好的重复性。稳定性试验结果显示，供试品溶液在室温放置 0~24 h 内，虫草素、腺苷和麦角甾醇测定结果的 RSD 分别为 1.31%、2.32%和 1.03%，说明供试品溶液在 24 h 内稳定。综上，该方法可满足蛹虫草发酵菌质中三种活性成分的定量分析要求。

2.3 谷物筛选结果

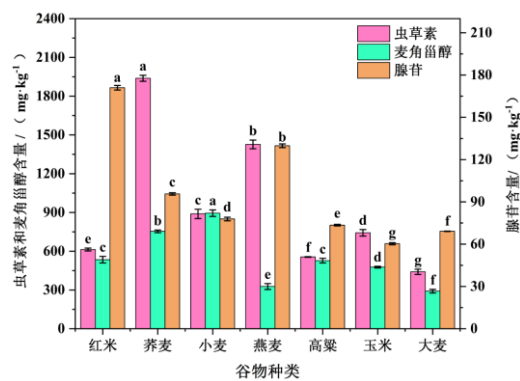


图 2 发酵菌质中虫草素、腺苷和麦角甾醇的含量

Fig.2 Content of cordycepin, adenosine, and ergosterol in fermented grain substrates

注：不同小写字母表示显著差异（ $P<0.05$ ）。

由图 2 可知，不同谷物基质对蛹虫草发酵菌丝体中活性成分的积累具有显著影响。以荞麦为基质时，虫草素含量最高为 $1\,938.52\text{ mg kg}^{-1}$ ，且麦角甾醇含量亦处于较高水平（ 753.53 mg kg^{-1} ）；以小麦为基质时，麦角甾醇含量最高（ 894.51 mg kg^{-1} ），虫草素和腺苷含量亦较高。燕麦基质下三种活性成分均保持较高水平，而红米虽有利于腺苷积累，但虫草素产量偏低；高粱、玉米和大麦基质下三种活性成分含量均相对较低。以上结果表明不同谷物基质在促进活性成分积累方面存在明显差异，但该结果与图 1、表 2 所示存在一定差异，表明菌丝生长状态不能直接反映其活性物质含量。综合 3 种活性成分的含量，选取荞麦、燕麦和小麦作为混料实验的发酵基质。

2.4 混料设计优化模型及预测回归方程

混料设计基质组成及发酵菌质中虫草素、腺苷和麦角甾醇的含量如表 3 所示。

表 3 谷物培养基混料设计及实验数据

Table 3 Design and experimental data of grain culture medium

处理	A 荞麦/g	B 燕麦/g	C 小麦/g	虫草素含量/(mg kg ⁻¹)	腺苷含量/(mg kg ⁻¹)	麦角甾醇含量/(mg kg ⁻¹)
1	17.34	0.00	2.66	1 271.68±36.68	494.73±6.55	770.76±1.46
2	12.93	5.59	1.49	1 494.63±25.80	603.09±6.39	1 023.37±16.43
3	12.93	5.59	1.49	1 465.33±19.62	570.11±3.53	1 039.28±26.81
4	15.33	4.67	0.00	1 221.90±5.62	263.62±8.77	808.33±13.06
5	9.17	10.83	0.00	957.94±25.15	302.37±10.43	770.74±15.49
6	19.79	0.00	0.21	1 342.63±23.59	298.76±5.61	596.88±2.19
7	8.37	8.63	3.00	928.142±19.62	330.56±8.71	894.39±3.50
8	12.93	5.59	1.49	1 325.38±34.44	508.40±9.02	984.31±10.68
9	6.59	12.00	1.41	694.142±16.64	275.27±5.24	825.16±1.91

10	11.51	8.49	0.00	1 102.59±17.17	300.39±4.43	906.25±1.01
11	6.59	12.00	1.41	645.99±8.46	388.33±9.57	841.47±11.38
12	10.54	6.46	3.00	855.60±13.10	249.68±6.28	970.09±5.47
13	17.61	2.39	0.00	1 262.70±29.76	218.61±6.99	678.85±15.30
14	8.37	8.63	3.00	786.26±17.42	245.38±7.43	811.45±2.69
15	12.93	5.59	1.49	1 597.90±25.05	575.75±11.16	994.59±1.93
16	14.35	2.65	3.00	1 274.22±14.13	480.30±10.37	966.17±10.69

采用 Design-Expert 软件中的二次回归模型对实验数据进行分析,建立虫草素、腺苷和麦角甾醇含量的预测回归方程(表4)。根据 Design-Expert 软件的模型推荐结果,3种活性成分的响应值均适宜采用二次回归模型进行分析。基于所建立的回归模型,可在实验范围内直接获得三种活性成分预测含量达到最大值的对应混料配方。模型及各回归项的显著性通过 P 值进行检验,其中 $P<0.05$ 表示模型或因素影响显著, $P<0.01$ 表示影响极显著。

表4 虫草素、腺苷和麦角甾醇含量预测方程

Table 4 Prediction equations for cordycepin, adenosine, and ergosterol content

指标	模型类型	预测方程	P	R^2
虫草素	二次方程	$Y_1=1\,204.8A+148.34B-18\,666.3C+2\,068.99AB+24\,894.97AC+24\,105.57BC$	$>0.000\,1$	0.901 2
腺苷	二次方程	$Y_2=184.41A+185.36B-17\,447.2C+472.63AB+23\,816.18AC+21\,118.63BC$	$>0.000\,1$	0.938 4
麦角甾醇	二次方程	$Y_3=517.62A+525.42B-7\,369.2C+1\,395.43AB+11\,587.44AC+10\,692.05BC$	$>0.000\,1$	0.933 5

由表5可知,以虫草素含量为响应值,模型 $P<0.000\,1$,说明该二次分析模型显著,失拟项 $P=0.305\,2>0.100\,0$,表明实验结果与数学模型拟合良好,可以采用该数学模型推测试验结果。方程相关系数 $R^2=0.901\,2$,说明变量 Y 的变异中有 90.12%是由变量 (A 、 B 、 C) 引起,即 90.12%的数据可以运用此方程解释。本试验变异系数为 9.95%,表明该模型方程可以较好反映真实试验值,可以运用此模型分析虫草素含量的变化。此外,从表5中还可以看出 AB 、 AC 、 BC 影响极显著。

表5 虫草素含量方差分析

Table 5 Variance analysis of cordycepin content

项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	1.17E+06	5	2.35E+05	18.25	$<0.000\,1$	**
LM	7.08E+05	2	3.54E+05	27.51	$<0.000\,1$	**
AB	2.66E+05	1	2.66E+05	20.72	0.001 1	**
AC	2.05E+05	1	2.05E+05	15.95	0.002 5	**
BC	1.77E+05	1	1.77E+05	13.79	0.004	**
残差	1.29E+05	10	12 859.34			
失拟项	79 471.01	5	15 894.2	1.62	0.305 2	
净误差	49 122.44	5	9 824.49			
总误差	1.30E+06	15				
$R^2=0.901\,2$						

注: **模型项对响应值影响极显著 ($P<0.01$)。

由表6可知,以腺苷含量为响应值,模型 $P<0.000\,1$,说明该二次分析模型显著,失拟项 $P=0.173\,3<0.05$,表明实验结果与数学模型拟合良好,可以采用该数学模型推测试验结果。方程相关系数 $R^2=0.938\,4$,即模型解释了 93.84%的响应变异,拟合效果非常强。此外,从表6中还可以看出 AC 和 BC 的影响极显著, AB 的影响显著。

表6 腺苷含量方差分析

Table 6 Variance analysis of adenosine content

项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	2.63E+05	5	52 547.88	30.47	$<0.000\,1$	**
LM	17 963.07	2	8 981.54	5.21	0.028 2	*

AB	13 901.11	1	13 901.11	8.06	0.017 6	*
AC	1.88E+05	1	1.88E+05	108.88	<0.000 1	**
BC	1.36E+05	1	1.36E+05	78.93	<0.000 1	**
残差	17 244.12	10	1 724.41			
失拟项	12 254.02	5	2 450.8	2.46	0.173 3	
净误差	4 990.1	5	998.02			
总误差	2.80E+05	15				
$R^2=0.938\ 4$						

注：*模型项对响应值影响显著（ $P<0.05$ ）；**模型项对响应值影响极显著（ $P<0.01$ ）。下表同。

由表 7 可知，该混料模型在显著性水平下具有良好的拟合性能（ $P<0.000\ 1$ ），其中线性项（ LM ）及其二阶交互作用项 AB 、 AC 、 BC 均显著影响麦角甾醇含量（ $P<0.001$ ）。模型的决定系数 $R^2=0.933\ 5$ ，调整后 $R^2=0.900\ 3$ ，说明模型具有良好的拟合能力，该模型可有效用于麦角甾醇产量的预测与优化分析。

表 7 麦角甾醇含量方差分析

Table 7 Analysis of variance for ergosterol content

项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	2.27E+05	5	45 320.41	28.08	<0.000 1	**
LM	55 032.55	2	27 516.27	17.05	0.000 6	**
AB	1.21E+05	1	1.21E+05	75.08	<0.000 1	**
AC	44 443.11	1	44 443.11	27.54	0.000 4	**
BC	34 887.19	1	34 887.19	21.62	0.000 9	**
残差	16 139.17	10	1 613.92			
失拟项	10 633.21	5	2 126.64	1.93	0.243 7	
净误差	5 505.96	5	1 101.19			
总误差	2.43E+05	15				
$R^2=0.900\ 3$						

2.5 谷物不同比例组合对虫草素、腺苷、麦角甾醇含量的影响

荞麦、燕麦和小麦三种谷物对发酵菌质中虫草素含量影响的 3D 效应面和等高线如图 3 所示。其中，响应面为曲面，表明三种谷物间存在交互作用。当荞麦（A）比例在 15~20 g 区间内时，虫草素含量显著升高，但燕麦（B）和小麦（C）与荞麦存在协同或拮抗的交互作用，对响应值有调节作用。

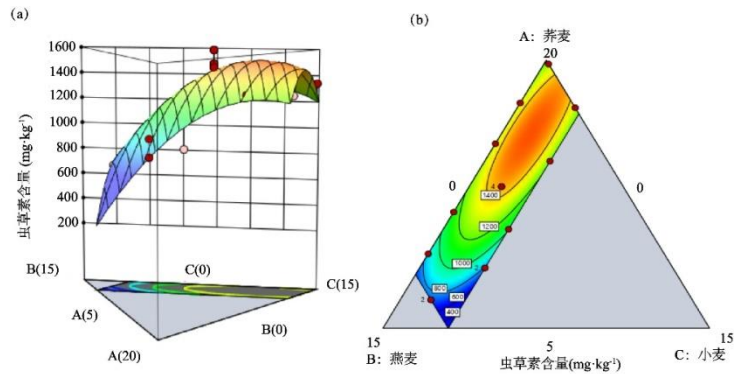


图 3 谷物比例对虫草素含量影响的 3D 效应面图谱及等高线图

Fig.3 3D response surface and contour plot of the effect of grain proportion on cordycepin content

注：（a）-3D 效应面图，（b）-等高线图。

图 4 描述了 3 种谷物对腺苷含量的影响，3D 效应面为曲面，说明荞麦、燕麦和小麦三者之间存在交互作用。随着荞麦（A）水平的增加，响应面整体呈上升趋势，腺苷水平也增加，特别是在燕麦（B）和小麦（C）处于低

水平时，腺苷含量达到峰值。当荞麦比例在 12~20 g 区间，腺苷含量逐渐升高。

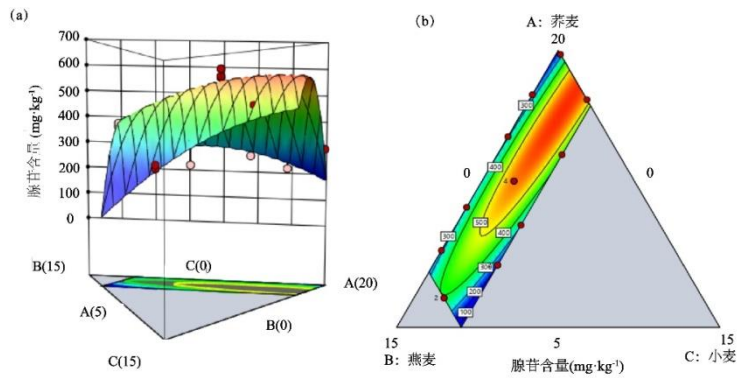


图 4 谷物比例对腺苷含量影响的 3D 效应面图谱及等高线图

Fig.4 3D response surface and contour plot of the effect of grain proportion on adenosine content

注：（a）-3D 效应面图，（b）-等高线图。

从图 5 可以看出，3 种谷物比例对麦角甾醇含量影响的 3D 效应面呈坡度较大曲面，表明 3 种基质原料配比对菌质中麦角甾醇含量显著影响，且三者之间存在较强相互作用，且麦角甾醇含量在 3D 效应面中呈现典型的抛物面分布，响应峰值位于三组分比例相对均衡的区域，表明其合成过程依赖于多因素之间的协同调控。

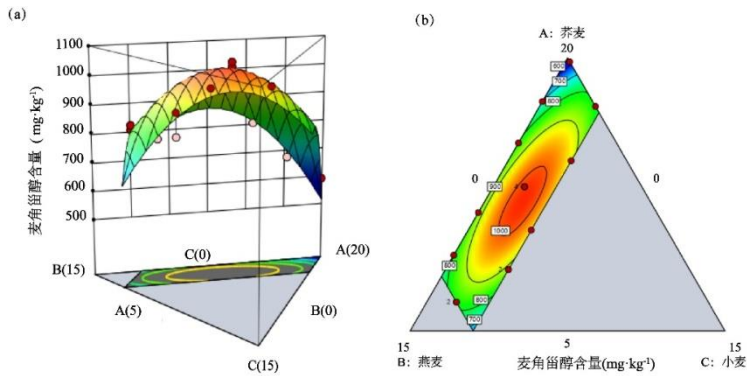


图 5 谷物比例对麦角甾醇含量影响的 3D 效应面图谱及等高线图

Fig.5 3D response surface and contour plot of the effect of grain proportion on ergosterol content

注：（a）-3D 效应面图，（b）-等高线图。

基于表 4 中预测方程及各指标 3D 效应图，软件给出的 4 个配方及响应值如表 8 所示。其中，配方 1 预测虫草素、腺苷和麦角甾醇含量均为最优，因此确定配方 1 为最优方案。为方便操作，将配方 1 调整为荞麦 12.90 g、燕麦 5.60 g、小麦 1.50 g。经验证，优化基质发酵 15 d 得到菌质中虫草素含量为 1 448.87 mg kg⁻¹，腺苷含量为 554.50 mg kg⁻¹，麦角甾醇含量为 1 019.33 mg kg⁻¹，均与预测值（表 8）差异不显著。

本研究进一步证实，通过合理复配不同谷物基质，可有效提升蛹虫草中虫草素、腺苷及麦角甾醇等活性物质的合成与积累，其可能原因在于，不同谷物基质在碳源结构、蛋白质含量及物理结构等方面具有一定互补性，从而调节营养物质释放速率并优化代谢通量分配，为虫草素、腺苷及麦角甾醇等多种活性成分的协同形成提供更加稳定的发酵环境^[28]。

表 8 最优配方及预测响应值

Table 8 Optimal formulation and predicted response value

配方	A 荞麦/g	B 燕麦/g	C 小麦/g	虫草素含量/(mg kg ⁻¹)	腺苷含量/(mg kg ⁻¹)	麦角甾醇含量/(mg kg ⁻¹)
1	12.926	5.588	1.486	1 442.761	557.177	1 015.035
2	15.333	4.667	0	1 319.550	286.003	819.121
3	17.61	2.39	0	1 313.599	247.861	705.748
4	6.588	12	1.412	727.727	393.187	820.284

2.6 发酵动力学分析

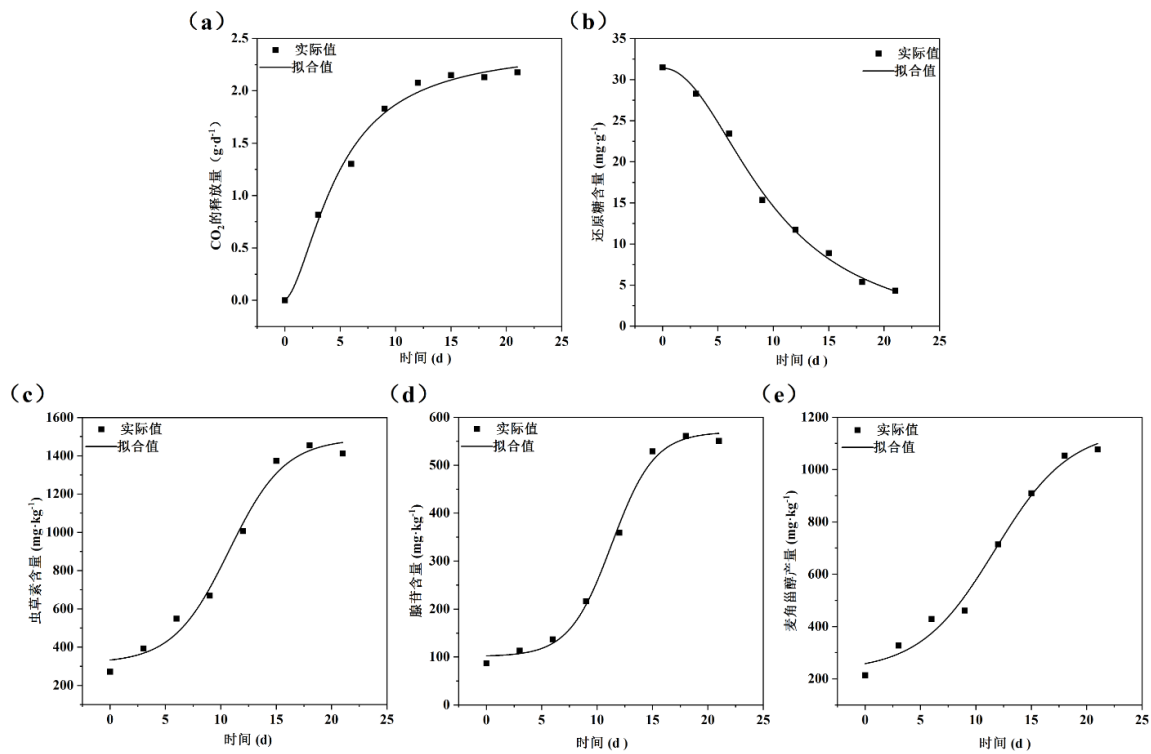


图 6 发酵动力学模型拟合曲线

Fig.6 Fitting curves of fermentation kinetic model

注：（a），菌丝生长；（b），底物消耗；（c），虫草素生成；（d），腺苷生成；（e），麦角甾醇生成。

表 9 拟合方程及其相关系数

Table 9 Fitting equations and their correlation coefficients

种类	模型	拟合方程	R^2
菌丝生长动力学	Logistic	$x_1 = 2.41887 - \frac{24.0827}{1 + (\frac{t_1}{4.826992})^{1.66543}}$	0.991 81
底物消耗动力学	Logistic	$x_2 = -1.26413 + \frac{32.64886}{1 + (\frac{t_2}{9.71547})^{2.06553}}$	0.996 45
虫草素生成动力学	Boltzmann	$x_3 = 1488.29377 - \frac{1172.26644}{1 + \exp(\frac{t_3 - 10.7265}{2.51769})}$	0.986 58
腺苷生成动力学	Boltzmann	$x_4 = 569.28138 - \frac{468.336555}{1 + \exp(\frac{t_4 - 11.31375}{1.92309})}$	0.995 48
麦角甾醇生成动力学	Boltzmann	$x_5 = 1155.48362 - \frac{925.74729}{1 + \exp(\frac{t_5 - 11.71867}{3.38818})}$	0.987 25

注： x_n 是指发酵时间 t_n 时对应的物质含量。

在 21 d 固态发酵过程中，菌丝生物量、底物消耗量及发酵菌质中虫草素、腺苷和麦角甾醇含量均呈现明显的阶段性变化特征（图 6）。发酵初期各指标变化缓慢；发酵中期菌丝体快速生长，底物消耗速率显著提高，3 种活

性成分开始快速积累;发酵后期各指标变化趋于平缓,体系进入稳定阶段。

将实验数据代入相应动力学方程,采用 Origin 进行非线性拟合,建立了菌丝体生长动力学模型(x_1)、底物消耗动力学模型(x_2)以及虫草素(x_3)、腺苷(x_4)和麦角甾醇(x_5)的生成动力学模型,各模型参数见表9。

从图 6a、b 可以看出,菌丝体生物量增长和还原糖消耗均呈现显著的非线性变化特征,动力学拟合结果显示(表9),还原糖含量在发酵中期迅速下降(图 6b)。有研究表明,固态发酵过程中还原糖含量的演变是一个复杂的过程^[29];蛹虫草菌丝在谷物基质中生长时可分泌胞外淀粉酶系将基质中的复杂淀粉类大分子逐步降解为葡萄糖等可利用的还原糖^[30],与此同时,菌丝的生长与代谢活动又在持续消耗这些还原糖。据此推测,发酵中期菌丝处于生长旺盛期,其对碳源的吸收利用速率显著高于淀粉降解生成还原糖的速率,导致体系内还原糖呈现明显的净消耗特征。采用 Logistic 模型对该变化过程进行的拟合,其决定系数 R 分别为 0.9918 和 0.9965,表明模型能够较好地描述蛹虫草的生长过程及底物消耗规律,有效表征此动态平衡下底物利用的整体演变趋势,为描述发酵全过程的底物通量变化提供了合理的量化依据。

虫草素(图 6c)、腺苷(图 6d)和麦角甾醇(图 6e)的生成过程均表现出由低速积累向快速生成转变并最终进入平台期的 S 型动态特征。采用 Boltzmann 模型对其生成动力学进行非线性拟合,其中,虫草素模型拟合决定系数为 $R^2=0.9866$,模型预测在发酵 10.7 d 时其含量出现拐点,随后进入快速积累阶段,并在 18 d 后逐渐趋于稳定,其理论最大值为 $1488.29\text{ mg kg}^{-1}$,当发酵时间达到 21.7 d 时,虫草素含量可达到其理论最大值的 99%。腺苷的模型拟合决定系数为 $R^2=0.9955$,预测其含量在 16.6 d 后趋于稳定,理论最大值为 569.28 mg kg^{-1} ,当发酵时间为 19.8 d 时,腺苷含量达到其理论最大值的 99%。Boltzmann 模型对麦角甾醇生成过程的拟合决定系数为 $R^2=0.9873$ 。预测其含量在 11.7 d 时出现拐点,于 20.8 d 逐渐趋于稳定,其理论最大值为 $1155.48\text{ mg kg}^{-1}$,当发酵时间为 26.5 d 时,其含量可达理论最大值的 99%。

基于各活性成分的生成动力学特征及模型预测结果,当发酵时间为 27 d 时,虫草素、腺苷和麦角甾醇的预测含量均达到其理论最大值的 99%以上,均与最大值差异不显著(相对偏差<1%),表明 3 种产物均已进入稳定积累平台期。因此,综合多指标协同积累特征,确定 27 d 为适宜的发酶终点。

3 结论

以虫草素、腺苷和麦角甾醇含量为评价指标,从 7 种谷物基质中筛选出荞麦、燕麦和小麦作为蛹虫草固态发酵基质配料,并通过混料设计获得了可同时富集 3 种活性成分的基质配方:在 150 mL 罐头瓶中添加荞麦 12.90 g、燕麦 5.60 g 和小麦 1.50 g。在该配方条件下,虫草素、腺苷和麦角甾醇含量分别为 1448.87 、 554.50 和 $1019.33\text{ mg kg}^{-1}$ 。与单一谷物基质相比,多基质组合表现出良好的协同积累效果。

在混料设计优化的基础上,采用 Logistic 和 Boltzmann 模型对蛹虫草发酵动力学进行拟合分析,建立了菌丝生长(x_1)、底物消耗(x_2)、虫草素生成(x_3)、腺苷生成(x_4)和麦角甾醇生成(x_5)动力学模型,上述模型的决定系数 R^2 均大于 0.98(表9),表明模型对实验数据具有良好的拟合效果,可准确描述混合谷物体系下蛹虫草的生长特性及三种活性成分的积累规律。模型预测的适宜采收时间为 27 d,此时虫草素、腺苷和麦角甾醇的预测含量分别为 1486.47 、和 $1145.41\text{ mg kg}^{-1}$,均达到其理论最大值的 99%以上。

综上,本研究获得了可同时提高虫草素、腺苷和麦角甾醇含量的纯谷物基质及配比,结合发酵动力学分析确定了发酵时间,在此条件下获得的发酵菌质可作为功能配料应用于健康食品的开发。为实现应用,正在开展放大实验,并将对发酵工艺参数进行优化,以期进一步提升目标产物的产量或含量。

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 Y F, XIAO K, WANG Z, et al. Comparison of metabolism substances in *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris* cultivated with tussah pupa based on LC-MS [J]. Journal of Food Biochemistry, 2021, 45(6): e13735.
- [3] KRISHNA K V, BALASUBRAMANIAN B, PARK S, et al. Conservation of endangered *Cordyceps sinensis* through artificial cultivation strategies of *C. militaris*, an alternate [J]. Molecular Biotechnology, 2025, 67(4): 1382-1397.
- [4] ZHONG X, GU L, XIONG W T, et al. ¹H NMR spectroscopy-based metabolic profiling of *Ophiocordyceps sinensis* and

- Cordyceps militaris* in water-boiled and 50% ethanol-soaked extracts [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2020, 180: 113038.
- [5] ZHANG J X, WEN C T, DUAN Y Q, et al. Advance in *Cordyceps militaris* (Linn) Link polysaccharides: isolation, structure, and bioactivities: a review [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 132(9): 906-914.
- [6] PARK H J. Influence of culture conditions on bioactive compounds in *Cordyceps militaris*: A comprehensive review [J]. Foods, 2025, 14(19): 3408.
- [7] JĘDREJKO K J, LAZUR J, MUSZYŃSKA B. *Cordyceps militaris*: An overview of its chemical constituents in relation to biological activity [J]. Foods, 2021, 10(11): 2634.
- [8] ABDULLAH S, KUMAR A. A brief review on the medicinal uses of *Cordyceps militaris* [J]. Pharmacological Research Modern Chinese Medicine, 2023, 7: 100228.
- [9] KONTOGIANNATOS D, KOUTROTSIOS G, XEKALAKI S, et al. Biomass and cordycepin production by the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*-a review of various aspects and recent trends towards the exploitation of a valuable fungus [J]. Journal of Fungi, 2021, 7(11): 986.
- [10] DAS S K, MASUDA M, SAKURAI A, et al. Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: current state and prospects [J]. Fitoterapia, 2010, 81(8): 961-968.
- [11] ZHOU H B, FENG L J, WENG X H, et al. Inhibition mechanism of cordycepin and ergosterol from *Cordyceps militaris* Link. against xanthine oxidase and cyclooxygenase-2 [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 258: 128898.
- [12] 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.
- [13] 张俊玉.虫草-中药固态发酵活性物质分析及发酵过程中九州虫草转录组学研究[D].济南:山东大学,2020.
- [14] 孙举志,邹迎春,李红英,等.食用菌固态发酵对玉米发酵产物中蛋白质含量的影响[J].中国食用菌,2025,44(5):90-95.
- [15] 王明瑞,邓永平,宋青燕,等.蛹虫草固态发酵联产多糖和纤溶酶的工艺优化[J].食品工业科技,2021,42(4):71-76.
- [16] WANG M R, DENG Y P, SONG Q Y. Optimization of polysaccharides and fibrinolytic enzyme co-production from *Cordyceps militaris* through solid state fermentation [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(4): 71-76.
- [17] 王曼曼.蛹虫草固态发酵红枣及其培养物抗氧化性和斑马鱼保肝活性研究[D].济南:山东大学,2019.
- [18] ZHAO X, LI X, JIA X, et al. Multi-omics and Compositional Analysis of Bidirectional Solid Fermentation Products from *Cordyceps militaris* and *Panax quinquefolius* L [J]. Journal of Ginseng Research, 2026, 50: 100900.
- [19] BORDE M, SINGH S K. Enhanced production of cordycepin under solid-state fermentation of *Cordyceps militaris* by using combinations of grains/substrates [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2023, 54(4): 2765-2772.
- [20] KIM Y S, LIM J M, KU B H, et al. Alteration in ginsenoside and cordycepin content by solid-state fermentation of red ginseng with *Cordyceps militaris* [J]. Czech Journal of Food Sciences, 2021, 39(6): 487-492.
- [21] 胡龙,范秀芝,姚芬,等.低 GI 高虫草素和喷司他丁含量蛹虫草固体发酵条件的优化[J].现代食品科技,2022,38(1):143-150.
- [22] 范秀芝,姚芬,王世斌,等.高产多糖和麦角甾醇姬松茸菌株的诱变选育[J].食用菌学报,2021,28(3):55-62
- [23] 胡景霞.蛹虫草 BYB-08 菌株固态发酵研究及其菌质产品研制[D].武汉:华中农业大学,2011.
- [24] 申春莉.灵芝菌丝体固态发酵转化豆渣的研究[D].泰安:山东农业大学,2019.
- [25] 吴尧,孙杰,毛泽敬,等.枯草芽孢杆菌产蛋白质谷氨酰胺酶培养优化及发酵动力学研究[J].食品与发酵工业,2026,52(12):43-51.
- [26] 杨博文,吕鹏军,史梅莓,等.短乳杆菌高密度培养条件优化及其发酵动力学建立[J].中国酿造,2025,44(7):221-228.
- [27] 周明扬.果糖基转移酶高产菌株筛选、发酵优化、发酵动力学构建及细胞催化合成低聚果糖的研究[D].福州:福建师范大学,2024.
- [28] YEGIN S. Solid-state fermentation as a strategy for improvement of bioactive properties of the plant-based food resources [J]. Bioresources and bioprocessing, 2025, 12(1): 140.
- [29] 彭志妮,郭丽琼,张新超,等.蛹虫草固体发酵大豆基质的成分及抗氧化活性变化研究[J].菌物学报,2011,30(2):338-342.
- [30] 任彩侠,周广麒.碳源对虫草菌产生几种胞外酶活性的影响[J].工业微生物,2015,45(3):31-35.