

# 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

胡龙<sup>1</sup>, 范秀芝<sup>2,3\*</sup>, 姚芬<sup>2,3</sup>, 殷朝敏<sup>2,3</sup>, 史德芳<sup>2,4</sup>, 高虹<sup>2,4</sup>, 胡中泽<sup>1\*</sup>

(1. 武汉轻工大学食品科学与工程学院, 湖北武汉 430023) (2. 湖北省农业科学院农产品加工与核农技术研究所, 湖北武汉 430064) (3. 国家食用菌加工技术研发分中心, 湖北武汉 430064)

(4. 林下经济湖北省工程研究中心, 湖北武汉 430064)

**摘要:** 为获得活性物质含量较高且血糖指数 (glycemic index, GI) 较低的蛹虫草发酵菌质, 以发酵菌质的预估血糖指数 (expected glycemic index, eGI)、虫草素和喷司他丁含量为评价指标, 通过单因素及正交试验对固体发酵培养基配方进行优化, 并确定最佳培养时间。结果表明, 蛹虫草固体发酵培养基的最优配方包括 70% 的主料和 30% 的辅料, 其中主料由质量比为 4:6 的大米和燕麦混合组成, 辅料为豆粕, 二者混合后按料液比 ( $m/V$ ) 1:0.9 添加含 10 g/L 甘氨酸的液体完全培养基为营养液, 25 °C 避光培养 18 d。此条件下得到的发酵菌质 eGI 值为 53.86, 与初始配方相比, eGI 值降低了 9.39%, 达到了低 GI 水平; 虫草素含量为 12204.55 mg/kg, 喷司他丁含量为 1021.48 mg/kg, 分别比初始配方提高了 348.13% 和 81.79%。优化所得低 GI 值、高虫草素和喷司他丁含量的蛹虫草发酵菌质为低 GI 功能食品的开发提供了原料。

**关键词:** 蛹虫草; 固体发酵; 喷司他丁; 血糖指数

文章编号: 1673-9078(2022)01-143-150

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.1.0525

## Optimization of Solid Fermentation Conditions for *Cordyceps militaris* with Low GI, High Content of Cordycepin and Pinastatin

HU Long<sup>1</sup>, FAN Xiuzhi<sup>2,3\*</sup>, YAO Fen<sup>2,3</sup>, YIN Chaomin<sup>2,3</sup>, SHI Defang<sup>2,4</sup>, GAO Hong<sup>2,4</sup>, HU Zhongze<sup>1\*</sup>

(1. School of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

(2. Institute of Agro-Products Processing and Nuclear-Agricultural Technology, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, China) (3. National Research and Development Center for Edible Fungi Processing, Wuhan 430064, China)

(4. Hubei Provincial Engineering Research Center of Under-forest Economy, Wuhan 430064, China)

**Abstract:** In order to obtain the fermentation substance of *Cordyceps militaris* with high active components and low glycemic index (GI), the solid fermentation medium formula was optimized by single factor and orthogonal test, and the optimal culture time was determined using the expected glycemic index (eGI), cordycepin and pinastatin content of fermentation medium as evaluation indexes. The results showed that the optimal formulation of *C. militaris* solid fermentation medium consisted of 70% main materials and 30% auxiliary materials. The main materials were composed of rice and oat with mass ratio of 4:6, and the auxiliary materials were soybean meal. After mixing, a liquid complete medium containing 10 g/L glycine was added at the ratio of material to liquid ( $m:V$ ) of 1:0.9, and the mycelia was cultured at 25 °C in dark for 18 days. Under these conditions, the eGI value of fermentation substance was 53.86, which decreased by 9.39% compared with the initial formula and

引文格式:

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

HU Long, FAN Xiuzhi, YAO Fen, et al. Optimization of solid fermentation conditions for *Cordyceps militaris* with low GI, high content of cordycepin and pinastatin [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(1): 143-150

收稿日期: 2021-05-19

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (31601806)

作者简介: 胡龙 (1994-), 男, 硕士生, 研究方向: 谷物加工, E-mail: hl32116@163.com

通讯作者: 胡中泽 (1968-), 男, 教授, 研究方向: 谷物加工, E-mail: huzz1968@126.com; 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功能食品开发, E-mail: xzhfan@163.com

reached the low GI level. The contents of cordycepin and pinastatin were 12204.55 mg/kg and 1021.48 mg/kg, respectively, which were increased by 348.13% and 81.79% compared with the initial formula. The optimized fermentation substance of *C. militaris* with low GI value, high cordycepin and pinastatin content provided raw materials for the development of functional food with low GI value.

**Key words:** *Cordyceps militaris*; solid fermentation; pentostatin; glycemic index

蛹虫草 (*Cordyceps militaris*), 又名北冬虫夏草, 含有与冬虫夏草相似的生物活性成分<sup>[1-4]</sup>, 但其子实体的核苷类成分含量与抗氧化活性高于冬虫夏草<sup>[5,6]</sup>, 且冬虫夏草不能合成虫草素和喷司他丁<sup>[7]</sup>。与冬虫夏草相比, 蛹虫草具有明显的价格优势, 因此, 它是冬虫夏草理想的替代品<sup>[8-10]</sup>。但蛹虫草子实体栽培周期长, 栽培过程需要对温度、光照、湿度等多因素严格控制, 生产成本高<sup>[11,12]</sup>。近年来, 有报道指出蛹虫草菌丝体发酵谷物所得到的发酵菌质中也含有虫草多糖、虫草素等, 且与子实体中的功效相同<sup>[13-15]</sup>, 因此可考虑用发酵菌质来替代蛹虫草子实体用于产品开发, 以缩短生产周期、节约生产成本<sup>[12]</sup>。

虫草素 (cordycepin), 化学名为 3'-脱氧腺苷 (3'-deoxyadenosine), 具有抗肿瘤、增强免疫力、抑菌抗炎、保护肝脏心脏、抗肺纤维化等多种功效<sup>[16]</sup>, 其作为腺苷受体的激活剂, 在新冠肺炎防治中起到积极作用<sup>[17]</sup>。但在使用过程中, 纯化后的虫草素在人体内易受腺苷脱氨酶 (adenosine deaminase, ADA) 的脱氨基作用快速降解, 形成无生物活性的 3'-脱氧肌苷 (3'-deoxyinosine) 而失效<sup>[18,19]</sup>。2017 年, Xia 等<sup>[7]</sup>发现了虫草素的保护分子-喷司他丁 (pentostatin), 其分子中的脱氧核苷结构, 能与 ADA 紧密结合并抑制其活性, 保护虫草素结构的稳定性, 从而有效防止虫草素的降解。

血糖指数 (glycemic index, GI) 是衡量碳水化合物对血糖反应的一种有效指标<sup>[20]</sup>。根据 GI 值的高低, 分为高 GI (GI>70)、中 GI (55≤GI≤70) 和低 GI (GI<55) 食品<sup>[21]</sup>。按照国家标准 WS/T 652-2019 食物血糖生成指数测定方法的规定<sup>[22]</sup>, 食品的 GI 值需要通过测定人体餐后血糖变化量而得, 检测过程复杂且费用昂贵, 目前我国具备检测能力的机构很少。因此, 研究者们大都通过体外消化这一简单有效的方法来测定食品的 GI 值。为与人体试验测定 GI 值相区分, 研究人员多用预估血糖指数 (expected glycemic index, eGI) 来表示<sup>[23-25]</sup>。

前期研究证实了利用蛹虫草对大米发酵, 能有效降低大米的 eGI 值<sup>[26]</sup>。为进一步降低发酵菌质的 eGI 值, 并提高发酵菌质中虫草素和喷司他丁活性物质的含量, 本研究在前期筛选获得蛹虫草菌株基础上以发酵菌质 eGI 值、虫草素和喷司他丁含量为评价指标,

对固体发酵培养基配方及培养时间进行优化, 以期为后续直接利用发酵菌质开发营养及功能食品奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

蛹虫草菌株为全虫草, 购自华中农业大学菌种试验中心。

大米, 湖北国宝桥米有限公司; 燕麦, 悦联商业管理有限公司; 豆粕, 石家庄银亿科技有限公司; 虫草素, 标准品上海源叶生物科技有限公司; 喷司他丁标准品, 上海麦克林生化科技有限公司; 猪胰  $\alpha$ -淀粉酶、色谱级乙腈, 美国 Sigma 公司; 色谱级甲醇、乙酸铵, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 可消化淀粉及抗性淀粉试剂盒、淀粉葡萄糖苷酶, 爱尔兰 Megazyme 公司; 甘氨酸、葡萄糖、蛋白胨、酵母膏、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾等均为食品级。

### 1.2 仪器与设备

FD5-3P 真空冷冻干燥机, 美国金西盟公司; KQ-5200 DE 超声波清洗器, 昆山市超声波仪器公司; 3K15 高速冷冻离心机, 德国 Sigma 公司; UV-1800 紫外可见分光光度计, 日本岛津公司; LC-20AT 高效液相色谱仪, 日本岛津公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 培养基配置

马铃薯固体培养基 (potato dextrose agar, PDA): 土豆 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 加蒸馏水定容至 1 L, pH 自然。

液体完全培养基 (liquid complete yeast medium, LCYM): 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 2 g, 酵母膏 2 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.50 g,  $K_2HPO_4$  1.00 g,  $KH_2PO_4$  0.46 g, 加蒸馏水定容至 1 L, 50 mL 分装。

固体发酵培养基: 由固体培养料和营养液按一定比例混匀装入罐头瓶, 121 °C 灭菌 30 min 制成。其中, 固体培养料又可分为主料和辅料。初始固体培养基包括: 80%主料-20 g 大米, 20%辅料-5 g 豆粕, 营养液-35 mL LCYM, 料液比 1:1.4 (m/V)。

### 1.3.2 液体菌种制备

取一菌丝块转接到 PDA 平板培养基上进行活化, 25 °C 恒温培养 5 d 后, 8 mm 打孔器打孔, 接入 50 mL 的 LCYM 培养基, 每瓶接种 6 个菌丝块, 25 °C 恒温避光培养 5 d。

### 1.3.3 固体发酵培养

将液体菌种匀浆后按 3 mL/罐接种到冷却的固体发酵培养基中, 5 °C 避光培养 13 d。培养结束后收集发酵菌质, 冷冻干燥、粉碎后, 检测其 eGI 值、虫草素和喷司他丁含量。

### 1.3.4 eGI 值的测定

参照文献<sup>[26]</sup>, 采用体外消化法测定蛹虫草发酵菌质 eGI 值。

### 1.3.5 虫草素的测定

按照 NY/T 2116-2012<sup>[27]</sup> 高效液相色谱法测定蛹虫草发酵菌质中虫草素的含量。

色谱条件为: 色谱柱 Inertsil ODS-SP (C18) 柱 250 nm×4.6 nm, 5 μm; 流动相为乙腈-水 (5:95), 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 35 °C, 进样量 10 μL。

### 1.3.6 喷司他丁的测定

喷司他丁的测定参考文献稍作修改<sup>[28]</sup>, 取 1.00 g 于 50 mL 容量瓶中, 加水约 40 mL, 超声处理 10 min, 用水定容, 取 2 mL 样液 8000 r/min 离心 10 min 后, 将上清液过 0.45 μm 微孔滤膜, 进行高效液相色谱检测。

色谱条件为: 色谱柱 Inertsil ODS-SP (C18) 柱 250 nm×4.6 nm, 5 μm, 流动相为 2.5 g/L 乙酸铵溶液-甲醇-乙腈 (96:2:2), 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 30 °C, 进样量 10 μL, 检测波长为 282 nm。

## 1.4 单因素实验设计

在 1.3.1 的初始固体发酵培养基中, 添加一定比例燕麦替代大米作主料, LCYM 中添加甘氨酸作营养液, 辅料组成不变, 采用单因素实验, 对大米和燕麦质量配比、豆粕添加量、营养液中甘氨酸浓度、料液比四个因素进行优化。

### 1.4.1 大米与燕麦配比单因素试验

在 1.3.1 的固体发酵培养基中, 保持主料总重量为 20 g, 分别称取质量比值为 10:0、9:1、3:7、5:5、7:3、1:9 的大米与燕麦作为主料, 装入 200 mL 罐头瓶, 辅料与料液比不变配制培养基, 灭菌冷却后按 1.3.3 所述方法接种和培养, 制备发酵菌质。

### 1.4.2 豆粕添加量单因素试验

在 1.3.1 固体培养基中, 固定固体培养料总量为 25 g, 调节豆粕添加量分别为 5%、10%、15%、20%、25%、30%, 料液比不变, 灭菌冷却后按 1.3.3 所述方

法接种和培养, 制备发酵菌质。

### 1.4.3 营养液中甘氨酸浓度单因素试验

在 1.3.1 固体培养基中, 主料和辅料不变, 分别配置 0、1、4、8、16、20 g/L 甘氨酸与 LCYM 混合营养液, 料液比不变, 灭菌冷却后按 1.3.3 所述方法接种和培养, 制备发酵菌质。

### 1.4.4 料液比单因素试验

分别按照 1:0.8、1:1.1、1:1.4、1:1.7、1:2.0 比例取新鲜配置的 LCYM 加入到装有 20 g 大米、5 g 豆粕的 200 mL 罐头瓶中, 混合均匀, 灭菌冷却后按 1.3.3 所述方法接种和培养, 制备发酵菌质。

## 1.5 正交优化实验设计

在单因素的基础上, 进行大米与燕麦质量配比 (A)、豆粕添加量 (B)、营养液中甘氨酸浓度 (C)、料液比 (D) 四因素三水平正交实验 (表 1), 按 1.3.3 所述方法接种和培养, 制备发酵菌质后, 测定其 eGI 值、虫草素和喷司他丁含量。

表 1 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交实验因素和水平

Table 1 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) factors and levels of orthogonal experimental

水平	因素			
	A (大米:燕麦)	B(豆粕 添加量)/%	C(甘氨酸 浓度)/(g/L)	D (料液比)
1	2:8	20	6	1:0.9
2	3:7	25	8	1:1.1
3	4:6	30	10	1:1.3

## 1.6 发酵时间的确定

为进一步获得 eGI 值低、虫草素和喷司他丁含量高的发酵菌质, 对优化培养基中蛹虫草菌丝体的最佳培养时间进行优化。设定培养周期为 60 d, 每 3 d 取样, 测定发酵菌质 eGI 值、虫草素和喷司他丁含量。

## 1.7 扩大实验

以 500 mL 罐头瓶为培养容器, 将正交优化所得培养基按等比例扩大 (2.5 倍) 加入罐头瓶中制备固体发酵培养基。将液体菌种匀浆后按 7.5 mL/罐接种到冷却后的固体发酵培养基中, 在 25 °C 避光培养 18 d, 培养结束后收集发酵菌质, 测定 eGI 值、虫草素和喷司他丁含量。

## 1.8 数据处理

每个实验 3 次重复。采用 SPSS 25 和 Origin 8.5 软件进行数据差异显著性分析和作图。差异显著水平为  $p < 0.05$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 单因素实验结果

#### 2.1.1 大米与燕麦配比对评价指标的影响

阮元等<sup>[29]</sup>发现维生素 B<sub>1</sub> 的分解产物对虫草素合成具有促进作用, 当添加量为 0.83 g/L 的维生素 B<sub>1</sub> 时, 发酵液中虫草素的产量最高, 较未添加维生素 B<sub>1</sub> 的空白组提高了 75%。而燕麦中含有丰富的维生素, 其中维生素 B<sub>1</sub> 较大米含量高, 且与其他谷物(如小麦、玉米、大米)相比, 其 GI 值较低<sup>[30]</sup>, 因此选用燕麦代替部分大米。由图 1 可知, 随着燕麦比例的增加, 发酵菌质 eGI 值显著降低, 虫草素和喷司他丁含量都显著增加 ( $p < 0.05$ )。结果表明, 与大米相比, 燕麦确实有利于蛹虫草菌株合成虫草素, 这与已有报道一致。刘红等<sup>[31]</sup>发现选用燕麦与燕麦复合培养基所得子实体中虫草素含量均较高其他培养基; 胡景霞等<sup>[32]</sup>分别以早籼米、小米、玉米、燕麦、小麦这五种谷物为基质, 所得谷物发酵菌质中燕麦组虫草素含量最高。当主料中大米与燕麦配比为 3:7 时, eGI 值达到最低为 57.25, 虫草素含量达到最高为 4092.60 mg/kg, 喷司他丁含量为 601.79 mg/kg, 当燕麦在主料中占比超过 70%时, eGI 值反而升高, 这可能是由大米和燕麦淀粉含量与种类差异造成的。因此, 选取大米与燕麦配比为 3:7 进行后续实验。

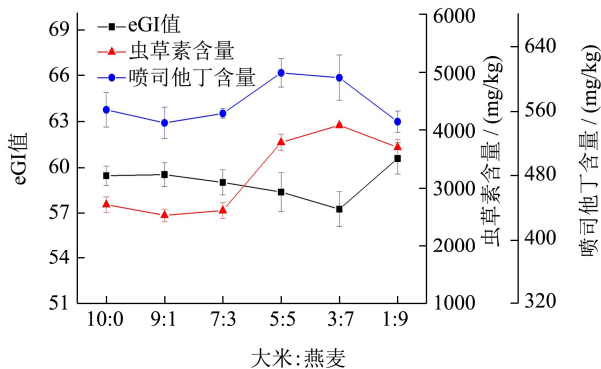


图 1 大米与燕麦配比对评价指标的影响

Fig.1 Effects of rice and oat ratio on evaluation index

#### 2.1.2 豆粕添加量对评价指标的影响

豆粕作为辅料为蛹虫草菌种提供氮源, 俞海峰<sup>[33]</sup>选用豆粕、大豆粉、棉籽粉、酵母粉、花生粉及麸皮作为氮源, 以发酵液中虫草素含量和菌饼干重为指标, 确定豆粕为最适氮源, 有利于蛹虫草菌株合成虫草素, 因此本研究选用豆粕作为蛹虫草固体发酵培养基辅料。由图 2 可知, 随着豆粕添加量上升, 发酵菌质 eGI 值显著降低, 虫草素含量与喷司他丁含量都显著增加 ( $p < 0.05$ )。当豆粕添加量为 20%时, 喷司他丁含量达

到最高, 为 561.90 mg/kg, 当豆粕添加量为 25%时, eGI 值达到最低 58.57, 喷司他丁含量略微下降。综合考虑, 选取豆粕添加量为 25%进行后续实验。

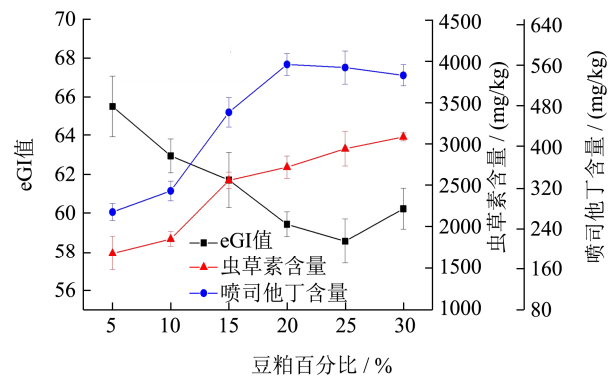


图 2 豆粕添加量对评价指标的影响

Fig.2 Effects of soybean meal additive amount on evaluation index

#### 2.1.3 营养液中甘氨酸浓度对评价指标的影响

甘氨酸作为虫草素的前体物质, 有利于蛹虫草菌种合成虫草素<sup>[34]</sup>。由图 3 可知, 当营养液中甘氨酸浓度为 0~8 g/L 时, 随着甘氨酸浓度升高, eGI 值显著降低, 虫草素含量与喷司他丁含量都呈上升趋势 ( $p < 0.05$ )。当营养液中甘氨酸浓度为 8 g/L 时, eGI 值降到最低为 56.19, 虫草素含量与喷司他丁含量都接近最大值, 分别为 7009.49 mg/kg、632.78 mg/kg, 当甘氨酸浓度继续升高时, 虫草素含量与喷司他丁含量的上升趋势变缓。因此, 选取营养液中甘氨酸浓度为 8 g/L 进行后续实验。

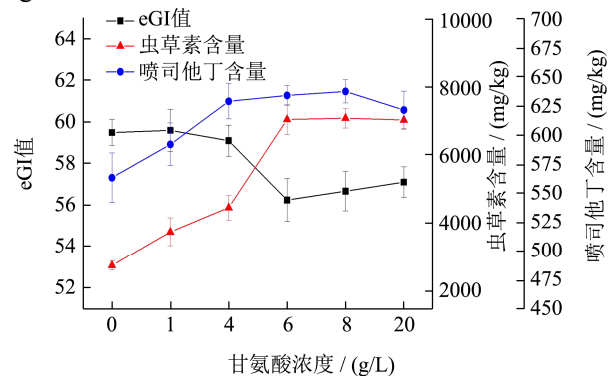


图 3 甘氨酸浓度对评价指标的影响

Fig.3 Effects of glycine concentration on evaluation index

#### 2.1.4 料液比对评价指标的影响

营养液为蛹虫草菌种提供营养物质, 但过多的营养液使培养基质的透气性与含氧量降低, 不利于菌丝的生长<sup>[35]</sup>。由图 4 可知, 随着营养液的增加, eGI 值呈上升趋势, 虫草素与喷司他丁含量均呈下降趋势, 当料液比为 1:1.1 时, eGI 值达到最低为 54.83, 虫草素与喷司他丁含量都达到最大值, 分别为 4725.65、621.10 mg/kg。因此, 选取料液比为 1:1.1 进行后续实验。

表 2  $L_9(3^4)$  正交实验结果

Table 2 Results of  $L_9(3^4)$  orthogonal experimental

试验号	因素				eGI 值	虫草素含量/(mg/kg)	喷司他丁含量/(mg/kg)
	大米与燕麦配比 A	豆粕添加量 B	甘氨酸浓度 C	料液比 D			
1	1	1	1	1	60.64	4971.38	563.81
2	1	2	2	2	58.72	4989.03	559.82
3	1	3	3	3	52.43	6893.90	600.27
4	2	1	2	3	58.67	4901.40	513.06
5	2	2	3	1	53.99	6327.95	553.61
6	2	3	1	2	54.05	6604.75	552.66
7	3	1	3	2	58.79	4605.56	540.15
8	3	2	1	3	54.17	5291.29	569.93
9	3	3	2	1	52.92	8085.62	622.28
$k_{e1}$	57.27	59.37	56.29	55.85			
$k_{e2}$	55.57	55.63	56.77	57.19			
$k_{e3}$	55.29	53.14	55.07	55.09			
$R_e$	5.92	18.69	5.10	6.29			
$k_{c1}$	5618.10	4826.11	5622.47	6461.65			
$k_{c2}$	5944.70	5536.09	5992.02	5399.78			
$k_{c3}$	5994.16	7194.76	5942.47	5695.53			
$R_c$	1128.17	7105.94	1108.63	3185.61			
$k_{p1}$	574.63	539.01	562.13	579.90			
$k_{p2}$	539.78	561.12	565.05	550.88			
$k_{p3}$	577.46	591.74	564.68	561.09			
$R_p$	113.04	158.20	8.76	87.07			

注:  $k_e$ 、 $k_c$ 、 $k_p$ 分别为 eGI 值 (e)、虫草素含量 (c)、喷司他丁含量 (p) 指标的各因素各水平平均值;  $R_e$ 、 $R_c$ 、 $R_p$  分别表示 eGI 值 (e)、虫草素含量 (c)、喷司他丁含量 (p) 指标的各因素极差。

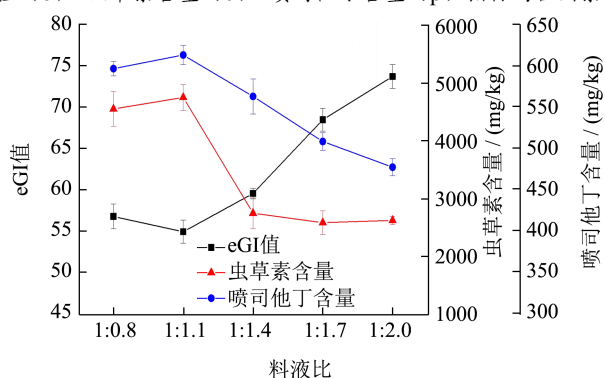


图 4 料液比对评价指标的影响

Fig.4 Effect of solid-liquid ratio on evaluation index

## 2.2 正交实验结果

采用  $L_9(3^4)$  正交实验优化培养配方, 正交实验结果见表 2。由极差分析可知, 四个因素对 eGI 值和虫草素含量的影响顺序为  $B>D>A>C$ , 对喷司他丁含量的影响顺序为  $B>A>D>C$ , 表明豆粕添加量对三个评价指标都具有重要影响。其中 eGI 值最优组合为

$A_3B_3C_3D_3$ , 虫草素和喷司他丁含量的最优组合均为  $A_3B_3C_2D_1$ 。差异显著性分析发现, 甘氨酸浓度在  $C_2$  和  $C_3$  水平时虫草素含量及喷司他丁含量差异不显著, 此外, 考虑料液比 D 对三个评价指标的综合影响, 选择  $A_3B_3C_3D_1$  为发酵培养最优配方, 即大米与燕麦配比为 4:6 作主料占 70%, 豆粕 30%, 营养液中甘氨酸浓度为 10 g/L, 料液比为 1:0.9。以此配方进行蛹虫草固体发酵, 25 °C 培养 13 d 后所得到的发酵菌质 eGI 值为 53.81, 达到低 GI 水平; 虫草素含量为 8656.04 mg/kg, 喷司他丁含量为 776.62 mg/kg。

## 2.3 发酵时间的确定

发酵菌质的 eGI 值、虫草素和喷司他丁含量在 0~60 d 期间的变化趋势如图 5 所示, eGI 值在 0~12 d 内显著下降 ( $p<0.05$ ), 在 12~60 d 期间略微上升, 可能是由于虫草菌丝持续生长对发酵菌质中淀粉种类的比例产生了变化。发酵菌质的虫草素在 0~60 d 培养周期内, 随着发酵时间的增加不断累积, 到 18 d 时达到

峰值,其后随着培养时间的延长含量基本稳定,这一现象与 Wen 等<sup>[36]</sup>的报道类似,他们发现蛹虫草子实体中虫草素含量在 15~60 d 内快速上升,当到达一定数值后,虫草素含量基本稳定。而发酵菌质中喷司他丁含量变化趋势与虫草素的有所不同,在 0~18 d 培养期内,随着培养时间的延长,喷司他丁含量逐渐增加,在第 18 d 达到峰值,其后逐渐下降,并在第 36 d 时基本稳定。目前并无不同培养时间蛹虫草中喷司他丁含量的报道,因此出现此现象的原因还有待进一步研究。综合三个指标确定最佳发酵时间为 18 d,此时发酵菌质中虫草素和喷司他丁含量分别为 12161.28 mg/kg、1033.23 mg/kg。

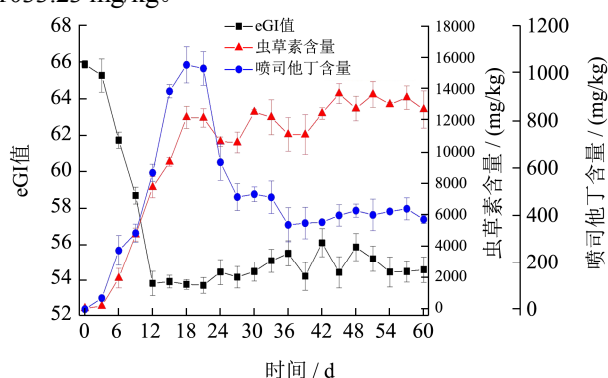


图5 60 d 培养周期内评价指标变化趋势

Fig.5 The trend of evaluation index during 60 days culture period

## 2.4 扩大验证实验结果

为验证本研究所获得培养基配方和培养时间的有效性,在 500 mL 罐头瓶中接种蛹虫草菌丝培养 18 d 后,测定发酵菌质 eGI 值为 53.86,虫草素含量为 12204.55 mg/kg,喷司他丁含量为 1021.48 mg/kg。扩大验证实验结果与优化试验中所得结果差异不显著,表明本研究所得培养基和培养时间是可靠的,可应用于蛹虫草发酵菌质的规模生产中。

## 3 结论

本研究以燕麦部分替代大米为主料,豆粕为辅料,LCYM 添加甘氨酸为营养液,通过单因素和正交优化实验确定了蛹虫草固体配方为:配比为 4:6 的大米和燕麦用量占 70%,豆粕添加量为 30%,含 10 g/L 甘氨酸的 LCYM 培养基作营养液,料液比为 1:0.9。经过 60 d 发酵周期,确定出最佳培养时间为 18 d。最终经过扩大实验在 25 °C 避光培养 18 d,所得发酵菌质 eGI 值由 65.86 下降到 53.86,达到了低 GI 水平;虫草素含量为 12204.55 mg/kg,喷司他丁的含量为 1021.48 mg/kg,与初始配方相比,虫草素含量增加了 348.13%,

喷司他丁含量提高了 81.79%,为后续低 GI 功能食品的研发奠定基础。

## 参考文献

- [1] Yue G L, Lau B S, Fung K P, et al. Effects of *Cordyceps sinensis*, *Cordyceps militaris* and their isolated compounds on ion transport in Calu-3 human airway epithelial cells [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2008, 117(1): 92-101
- [2] 张姝,张永杰,Shrestha Bhushan,等.冬虫夏草菌和蛹虫草菌的研究现状、问题及展望[J].菌物学报,2013,32(4):577-597  
ZHANG Shu, ZHANG Yongjie, Shrestha Bhushan, et al. Research status, problems and prospects of *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris* [J]. Mycosystema, 2013, 32(4): 577-597
- [3] Shimada T, Hiramatsu N, Kasai A, et al. Suppression of adipocyte differentiation by *Cordyceps militaris* through activation of the aryl hydrocarbon receptor [J]. American Journal of Physiology Endocrinology & Metabolism, 2008, 295(4): E859-67
- [4] 江海涛,吴雨龙,王仁雷,等.蛹虫草基质多糖对酒精所致小鼠急性肝损伤的保护作用[J].食品科学,2014,35(13):223-227  
JIANG Haitao, WU Yulong, WANG Renlei, et al. Protective effect of matrix polysaccharide of *Cordyceps militaris* on acute liver injury induced by alcohol in mice [J]. Food Science, 2014, 35(13): 223-227
- [5] 杨昕,斯陆勤,涂秩平,等.不同产地人工蛹虫草子实体及冬虫夏草中核苷类成分的比较[J].医药导报,2009,28(10): 1354-1356  
YANG Xin, SI Luqin, TU Zhiping, et al. Comparison of nucleosides in the fruitbody of *Cordyceps militaris* and *Cordyceps sinensis* from different producing areas [J]. Herald of Medicine, 2009, 28(10): 1354-1356
- [6] 陈畅,罗珊珊,李彦,等.三种虫草抗氧化活性的化学发光法研究[J].上海中医药杂志,2004,7:53-55  
CHEN Chang, LUO Shanshan, LI Yan, et al. Study on antioxidant activity of three species of *Cordyceps sinensis* by chemiluminescence method [J]. Shanghai Journal of Traditional Chinese Medicine, 2004, 7: 53-55
- [7] Xia Y L, Luo F F, Shang Y F, et al. Fungal cordycepin biosynthesis is coupled with the production of the safeguard molecule pentostatin [J]. Cell Chemical Biology, 2017, 24(12): 1479-1489
- [8] 刘桂君,周思静,杨素玲,等.蛹虫草中虫草素的研究进展[J].食品科学,2013,34(21):408-413

- LIU Guijun, ZHOU Sijing, YANG Suling, et al. Research progress of cordycepin in *Cordyceps militaris* [J]. Food Science, 2013, 34(21): 408-413
- [9] 乔宇琛,刘桂君,王平,等. 蛹虫草的分子生物学研究进展[J]. 食品科学,2018,39(23):321-328
- QIAO Yuchen, LIU Guijun, WANG Ping, et al. Advances in molecular biology of *Cordyceps militaris* [J]. Food Science, 2018, 39(23): 321-328
- [10] 吴鸿雪,王忠,王锦峰,等. 蛹虫草人工栽培及开发研究进展[J]. 福建农业科技,2019,1:66-70
- WU Hongxue, WANG Zhong, WANG Jinfeng, et al. Advances in artificial cultivation and development of *Cordyceps militaris* [J]. Fujian Agricultural Science and Technology, 2019, 1: 66-70
- [11] 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
- PENG Zhini, GUO Liqiong, ZHANG Xinchao, et al. Study on the composition and antioxidant activity of soybean substrate by solid fermentation of *Cordyceps militaris* [J]. Mycosystema, 2011, 30(2): 338-342
- [12] 刘洋,黄芳芳. 蛹虫草固态发酵生产虫草素工艺优化研究[J]. 核农学报,2014,28(11):2065-2070
- LIU Yang, HUANG Fangfang. Study on production of cordycepin by solid state fermentation of *Cordyceps militaris* [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2014, 28(11): 2065-2070
- [13] 朱振元,贾长英,孙会轻. 蛹虫草发酵大米的成分分析及体外抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技,2016,37(20):235-238, 248
- ZHU Zhenyuan, JIA Changying, SUN Huiqing. Study on the composition analysis and antioxidant activity *in vitro* of rice fermented by *Cordyceps militaris* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(20): 235-238, 248
- [14] 陈丽冰,吴光旭,程薇,等. 北虫草培养残基中虫草素的提取纯化及抗肿瘤活性[J]. 食品科学技术学报,2016,34(4):73-79
- CHEN Libing, WU Guangxu, CHENG Wei, et al. Extraction, purification and antitumor activity of cordycepin from cultured *Cordyceps militaris* residues [J]. Journal of Food Science and Technology, 2016, 34(4): 73-79
- [15] 孙叶,包建忠,刘红,等. 蛹虫草培养基多糖的提取及抗肿瘤活性研究[J]. 食品与生物技术学报,2019,38(4):118-126
- SUN Ye, BAO Jianzhong, LIU Hong, et al. Study on the extraction and antitumor activity of polysaccharide from *Cordyceps militaris* culture medium [J]. Journal of Food and Biotechnology, 2019, 38(4): 118-126
- [16] Tuli H S, Kashyap D, Sharma A K. Cordycepin: a Cordyceps Metabolite with Promising Therapeutic Potential [M] Springer International Publishing Switzerland, 2015
- [17] 杜静,阚伟京,杨健,等. 腺苷受体及蛹虫草草素在新冠肺炎防治中相关的药理机制[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2020,22(3):573-584
- DU Jing, KAN Weijing, YANG Jian, et al. Adenosine receptor and cordycepin in *Cordyceps militaris* control COVID-19 [J]. World Science and Technology - Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, 2020, 22(3): 573-584
- [18] 杨鹏,王岩,廖艳艳. 高效液相色谱-质谱法测定发酵液中的喷司他丁[J]. 色谱,2010,28(3):316-318
- YANG Peng, WANG Yan, LIAO Yanyan. Determination of pinastatin in fermentation broth by high performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2010, 28(3): 316-318
- [19] 李晓辉. 喷司他丁生物合成的发酵优化[D]. 天津:天津科技大学,2014
- LI Xiaohui. Fermentation optimization of pinastatin biosynthesis [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2014
- [20] Schakel S, Schauer R, Himes J, et al. Development of a glycemic index database for dietary assessment [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2007, 21: S50-S55
- [21] Shumoy H, Raes K. *In vitro* starch hydrolysis and estimated glycemic index of tef porridge and injera [J]. Food Chemistry, 2017, 229: 381-387
- [22] WS/T 652-2019. 食物血糖生成指数测定方法[S]
- WS/T 652-2019. Method for Determination of Glycemic Index of Food [S]
- [23] Tuaño Arvin Paul P, Barcellano Eljezwyne Clomer G, Rodriguez Myrna S. Resistant starch levels and *in vitro* starch digestibility of selected cooked Philippine brown and milled rices varying in apparent amylose content and glycemic index [J]. Food Chemistry: Molecular Sciences, 2021: 100010
- [24] Shumoy H, Bockstaele F V, Devocioglu D, et al. Effect of sourdough addition and storage time on *in vitro* starch digestibility and estimated glycemic index of tef bread [J]. Food Chemistry, 2018, 264: 34-40
- [25] Tang Z Y, Fan J, Zhang Z Z, et al. Insights into the structural characteristics and *in vitro* starch digestibility on steamed rice bread as affected by the addition of okara [J]. Food Hydrocolloids, 2021, 113: 106533
- [26] 胡龙,范秀芝,姚芬,等. 固体发酵降低大米血糖指数的蛹虫

- 草菌株筛选[J].食品工业科技,2021,42(12):119-124
- HU Long, FAN Xiuzhi, YAO Fen, et al. Screening of *Cordyceps militaris* strain by solid fermentation to reduce the glycemic index of rice [J]. Food Industry Science and Technology, 2021, 42(12): 119-124
- [27] 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[S]
- NY/T 2116-2012.Determination of Cordycepin and Adenosine in Cordycepin Products - High Performance Liquid Chromatography [S]
- [28] 张春杨,杨思广,张月,等.高效液相色谱法测定蛹虫草中喷司他丁的含量[J].国际感染杂志(电子版),2020,9(1):13
- ZHANG Chunyang, YANG Siguang, ZHANG Yue, et al. Determination of pinastatin in *Cordyceps militaris* by high performance liquid chromatography [J]. International Infections Diseases (Electronic Edition), 2020, 9(1): 13
- [29] 阮元,马进川,薛元,等.维生素 B<sub>1</sub>、B<sub>6</sub> 和生长激素 2,4-D 对蛹虫草液体发酵虫草素产量的影响[J].菌物学报,2014,33(2):477-482
- RUAN Yuan, MA Jinchuan, XUE Yuan, et al. Effects of vitamin B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub> and growth hormone 2,4-D on the yield of cordycepin by liquid fermentation of *Cordyceps militaris* [J]. Mycosystema, 2014, 33(2): 477-482
- [30] Connolly M L, Tuohy K M, Lovegrove J A. Wholegrain oat-based cereals have prebiotic potential and low glycemic index [J]. British Journal of Nutrition, 2012, 108(12): 2198-2206
- [31] 刘红,马辉,曹宏,等.不同蛹虫草杂粮培养基的生产性能及滋味物质分析[J].食品工业科技,2019,40(12):77-84
- LIU Hong, MA Hui, CAO Hong, et al. Analysis on the production performance and flavor compounds of different *Cordyceps militaris* grain media [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(12): 77-84
- [32] 胡景霞,边银丙,陈乃维,等.以固态发酵制备蛹虫草燕麦粉的研究[J].食品与发酵科技,2011,47(3):55-59
- HU Jingxia, BIAN Yinbing, CHEN Naiwei, et al. Study on preparation of *Cordyceps militaris* oat meal by solid-state fermentation [J]. Food & Fermentation Tech, 2011, 47(3): 55-59
- [33] 俞海峰.蛹虫草虫草素高产菌株的筛选及其发酵工艺研究[D].武汉:华中农业大学,2007
- YU Haifeng. Screening of high yield *Cordyceps militaris* strain and its fermentation process [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2007
- [34] Masuda M, Urabe E, Honda H, et al. Enhanced production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 40(5): 1199-1205
- [35] 杨帆,刘金彬,管政兵,等.蛹虫草固态发酵产虫草素的优化[J].食品与生物技术学报,2019,38(10):30-36
- YANG Fan, LIU Jinbin, GUAN Zhengbing, et al. Optimization of cordycepin production by solid-state fermentation of *Cordyceps militaris* [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2019, 38(10): 30-36
- [36] Wen T C, Li G R, Kang J C, et al. Optimization of solid-state fermentation for fruiting body growth and cordycepin production by *Cordyceps militaris* [J]. Chiang Mai Journal of Science, 2014, 41(4): 858-872

---

(上接第 232 页)

- [27] Salari M, Khiabani M S, Mokarram R R, et al. Development and evaluation of chitosan based active nanocomposite films containing bacterial cellulose nanocrystals and silver nanoparticles [J]. Food Hydrocolloids, 2018, 84: 414-423
- [28] Yong H, Wang X, Zhang X, et al. Effects of anthocyanin-rich purple and black eggplant extracts on the physical, antioxidant and pH-sensitive properties of chitosan film [J]. Food Hydrocolloids, 2019, 94: 93-104
- [29] Panwar R, Pemmaraju S C, Sharma A K V, et al. Efficacy of ferulic acid encapsulated chitosan nanoparticles against *Candida albicans* biofilm [J]. Microbial Pathogenesis, 2016, 95: 21-31
- [30] Gomathi T, Prasad P S, Sudha P N, et al. Size optimization and in vitro biocompatibility studies of chitosan nanoparticles [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 104: 1796-1806
- [31] Qin C Q, Li H R, Xiao Q, et al. Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity [J]. Carbohydrate Polymers, 2006, 63(3): 367-374