DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20251020.001
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/46.1089.R.20251020.1002.002

黄芪-蝉拟青霉双向固体发酵工艺优化及活性成分动态变化研究

王淑萍[1,2],崔议方[1,2],王 红[3],赵莉莉[1],刘新华[1],尹志成[1],崔智峰[4],张加余[1,2]✉
(1.山东中医药大学药学院,山东 济南 250300;2.滨州医学院中医学院,山东 烟台 264003;3.山东农业大学生命科学学院,山东 泰安 271018;4.滨州医学院附属中医医院,山东 滨州 256600)

[摘要] **目的**:优化黄芪-蝉拟青霉双向固体发酵工艺参数,并探究发酵过程中活性成分的动态变化规律。**方法**:采用单因素试验结合正交试验优化发酵工艺参数;运用紫外分光光度法(UV)和高效液相色谱法(HPLC)测定不同发酵时间点总多糖、皂苷类、核苷类及黄酮类成分的含量变化。**结果**:确定最佳发酵工艺为黄芪粗粉,水料比150%,28 ℃培养。发酵过程中,各类活性成分呈现明显时间依赖性变化:(1)总多糖及4种黄酮类成分含量随发酵时间延长呈持续下降趋势;(2)皂苷类成分中,黄芪皂苷Ⅰ在发酵21 d后快速下降,而黄芪甲苷的含量则明显增加;黄芪皂苷Ⅱ含量先降后升并趋于稳定;黄芪皂苷Ⅲ则呈先降后升再下降阶段变化;(3)核苷类成分中,尿苷、鸟苷及腺苷含量呈先升后降趋势,虫草素含量则在达峰值后略有回落。**结论**:本研究成功建立了黄芪-蝉拟青霉双向固体发酵的优化工艺体系,并系统揭示了发酵过程中多类活性成分的转化规律,为基于中药发酵技术的创新药物研发提供科学依据。

[关键词] 黄芪;蝉拟青霉;双向固体发酵;工艺优化;成分动态分析
[中图分类号] TQ920.6;R283 [文献标志码] A [文章编号] 2097-5953(2026)19-1489-11

Optimization of bidirectional solid-state fermentation process of *Astragalus membranaceus* and *Paecilomyces cicadae* with dynamic monitoring of bioactive components

WANG Shuping[1,2], CUI Yifang[1,2], WANG Hong[3], ZHAO Lili[1], LIU Xinhua[1], YIN Zhicheng[1], CUI Zhifeng[4], ZHANG Jiayu[1,2]✉
(1. *School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan* 250300, *China*; 2. *School of Traditional Chinese Medicine, Binzhou Medical University, Yantai* 264003, *China*; 3. *College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Taian* 271018, *China*; 4. *Hospital of Traditional Chinese Medicine, Binzhou Medical University, Binzhou* 256600, *China*)

[*Foundation Project*]: *This study was supported by the National Natural Science Foundation of China* (82174039, 82574717); *Natural Science Foundation of Shandong Province* (*ZR*2020*MH*371); *Taishan Young Scholar Program of Shandong* (*TSQN*202103110), *Jointly Built Technology Project by the Science and Technology Department of the State Administration of Traditional Chinese Medicine* (*GZY-KJS-SD*-2023-093); *Special Project for Traditional Chinese Medicine Technological Innovation Project of Binzhou Medical University* (2024*ZYYZX*09), *Matching Support Program for Provincial and Above Leading Talents in Yantai City* (10073801)

[*Author*]: *WANG Shuping*, *E-mail*: *wsp*2053803449@163.*com*.
[*Correspondence to*]: *ZHANG Jiayu*, *Ph.D.*, *Professor*, *E-mail*: *zhangjiayu*0615@163.*com*.

Received: 2025-08-20 *Revised*: 2025-10-16 *JHMU*, 2026;32(19):1489-1499

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] **Objective**: To optimize the bidirectional solid-state fermentation parameters of *Astragalus membranaceus* and *Paecilomyces cicadae*, and investigate the dynamic variation patterns of bioactive components during the fermentation process. **Methods**: The fermentation process parameters were optimized using single-factor experiments combined with orthogonal tests, while the content changes of total polysaccharides, saponins, nucleosides, and flavonoids at different fermentation time points were de-

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82174039,82574717);山东省自然科学基金面上项目(ZR2020MH371);山东省泰山学者青年专家项目(TSQN202103110);国家中医药管理局科技司共建科技项目(GZY-KJS-SD-2023-093);滨州医学院"中医药专项"科技创新项目(2024ZYYZX09);烟台市省级及以上领军人才支持计划(10073801)

[作者简介] 王淑萍,E-mail:wsp2053803449@163.com。
[通讯作者] 张加余,博士,教授,E-mail:zhangjiayu0615@163.com。

[收稿日期] 2025-08-20 [修回日期] 2025-10-16 网络出版时间:2025-10-20 11:06:11

termined by ultraviolet spectrophotometry (UV) and high-performance liquid chromatography (HPLC). **Results**: The optimal fermentation conditions were determined as follows: crude astragalus powder, a water-to-material ratio of 150%, and cultivation at 28 ℃. The fermentation process induced significant time-dependent variations in bioactive components: (1) total polysaccharides and 4 flavonoid constituents exhibited a progressive decline throughout fermentation; (2) In saponin components, astragaloside Ⅰ decreased rapidly after 21 days of fermentation, while astragaloside increased significantly. The content of astragaloside Ⅱ first decreased, then increased and eventually stabilized. Astragaloside Ⅲ exhibited a more complex trend, characterized by an initial decrease, followed by an increase and then a subsequent decline. (3) Among nucleosides, the contents of uridine, guanosine, and adenosine all displayed an initial increase followed by a decrease. Cordycepin content peaked and then slightly declined. **Conclusions**: This study successfully established an optimized bidirectional solid-state fermentation system for *Astragalus membranaceus* and *Paecilomyces cicadae*, and systematically elucidated the transformation patterns of multiple bioactive components during the fermentation process. The findings provide a scientific foundation for innovative drug development based on traditional Chinese medicine fermentation technology.

[**Key words**] *Astragalus membranaceus*; *Paecilomyces cicadae*; Bidirectional solid-state fermentation; Process optimization; Dynamic component analysis

双向固体发酵是指将具有一定活性成分的中药材或药渣作为药性基质，与发酵菌种进行共培养的过程[1-3]。例如，唐敏等[4]采用猴头菌与人参进行双向固体发酵后，菌质中总糖、蛋白质等活性成分含量明显增加，且抗氧化能力明显增强；刘佳等[5]利用桑黄菌对昆布进行双向发酵后，菌质中总糖、总酚的含量明显增加，其水提物对人结肠癌细胞HCT-116的增殖抑制作用也进一步增强。这表明，双向固体发酵可明显提升药用基质的生物活性。

作为药食同源的传统补气药，黄芪富含黄酮类、皂苷类、多糖类等多种生物活性成分[6-10]，具有补气升阳、益气固表、利水消肿、行滞通痹等功效[11-13]，在医药、食品、保健品、畜牧种植业等领域具有极大的开发及应用价值[14-18]。蝉拟青霉是麦角菌科真菌蝉花的无性型阶段产物，首载于南北朝时期的《雷公炮制论》，在我国已有1 000多年的药用历史[19,20]。研究证实，蝉拟青霉具有解热镇痛、镇静催眠、抗疲劳、改善肾功能等多重药理作用[21-24]。本研究团队前期已对黄芪开展全面研究[25-30]，后聚焦其发酵改性技术，初步构建“黄芪-蝉拟青霉”双向固体发酵体系，成功制备菌质并完成其化学表征[31]。后续功效评价结果表明，该发酵菌质在高尿酸血症干预[32,33]、机体抗氧化活性增强[31]等方面作用明显。经长期研究证实，该体系通过二者协同作用，可明显提高有效成分含量并增强其生物活性，是一类具有明显降尿酸功效的发酵系统[32,33]。传统的发酵工艺优化通常以活性成分的含量为参考指标，然而发酵过程会造成黄芪中多种成分发生转化，且含量随之改变，并不能代表整体的发酵水平。

为了进一步优化黄芪-蝉拟青霉双向固体发酵工艺参数并初步揭示成分转化规律，本文通过系统考察不同因素对菌丝满袋时间的影响以及发酵过程中各类成分的含量变化，从而为深入探究黄芪-蝉拟青霉双向发酵的作用规律提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 仪器

MQD-B3S振荡培养箱（上海旻泉仪器有限公司）；LDAM-80KCS-Ⅱ立式压力蒸汽灭菌器（上海申安医疗器械厂）；LC-20AT高效液相色谱仪（岛津国际贸易上海有限公司）；KQ-500V型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；电热鼓风干燥箱（上海一恒科学仪器有限公司）。

1.2 试剂与药品

黄芪饮片（批号：SX20191101）购于山西浑源万生黄芪开发有限公司，经滨州医学院林莺副教授鉴定为蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao的干燥根；蝉拟青霉 *Paecilomyces cicadae* (Miquel.) Samson（编号：cfcc81169）由中国林业微生物保藏中心提供。

对照品葡萄糖（批号：3588）购于大茂化学试剂有限公司；黄芪皂苷Ⅰ（批号：MUST-22050606）、黄芪皂苷Ⅱ（批号：MUST-22051608）、黄芪皂苷Ⅲ（批号：MUST-21072213）、黄芪甲苷（批号：MUST-21031508）、虫草素（批号：MUST-21072310）、毛蕊异黄酮葡萄糖苷（批号：MUST-22040920）、毛蕊异黄酮（批号：MUST-21101117）、芒柄花苷（批号：MUST-21080311）、芒柄花素（批号：MUST-21033005）购于成都曼思特科技有限公司；尿苷（批号：N10M11W109430）、腺苷（批号：N24D11W135689）购于上海源叶生物科技有限公司；鸟苷（批号：G11950）购于西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司；以上对照品纯度不低于98%。

马铃薯液体培养基（含氯霉素）（编号：HB0233-8）购于海博生物科技有限公司；马铃薯葡萄糖琼脂

(含抗生素)(编号:20220418)购于北京奥博星生物技术有限责任公司;色谱级乙腈和甲醇购于Fisher Scientific公司;水为去离子水;其余试剂为分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 菌种活化与液体培养 无菌条件下,将蝉拟青霉接种于马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)平板上,于28 ℃培养箱中活化培养5~7 d,随后,用接种环挑取适量活化菌丝,转接至经灭菌处理的马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB)中,置于28 ℃、150 r/min条件下振荡培养3~5 d,即为蝉拟青霉种子液。

1.3.2 黄芪发酵菌质的制备 将黄芪饮片粉碎至规定粒径,称取30 g粉末于发酵袋中,按一定比例加入蒸馏水,混匀,121 ℃高压蒸汽灭菌25 min,冷却后,于无菌条件下接种30 mL蝉拟青霉种子液,置特定发酵温度的恒温恒湿培养箱中培养,待菌丝满袋后取出,60 ℃干燥,粉碎,过四号筛,备用。

1.3.3 单因素试验

1.3.3.1 黄芪粉碎程度对发酵结果的影响 按"1.3.2"项进行操作,设定发酵温度28 ℃、水料比150%,考察不同粉碎粒度(粗粉、中粉、超微粉)对发酵结果的影响,记录菌丝满袋时间及满袋时内部菌丝生长状态。

1.3.3.2 发酵温度对发酵结果的影响 按"1.3.2"项进行操作,设定粉碎粒度粗粉、水料比150%,考察不同发酵温度(23 ℃、28 ℃、33 ℃)对发酵结果的影响,记录菌丝满袋时间及满袋时内部菌丝生长状态。

1.3.3.3 水料比对发酵结果的影响 按"1.3.2"项进行操作,设定粉碎粒度粗粉、发酵温度28 ℃,考察水料比(100%、150%、200%、250%,即加水量分别为0、15、30、45 mL)对发酵结果的影响,记录菌丝满袋时间及满袋时内部菌丝生长状态。

1.3.4 正交试验设计 基于单因素试验结果,采用$L_9(3^4)$正交试验设计,以温度(A)、粉碎程度(B)、水料比(C)为考察因素,每个因素设置3个水平(表1),以菌丝满袋时间与满袋时内部菌丝生长状态为评价指标,优选发酵工艺。

1.3.5 验证试验 按照最优工艺条件进行3次重复验证试验,记录菌丝满袋时间并观察满袋时菌丝生长状态。

1.3.6 发酵过程中总多糖含量变化

1.3.6.1 对照品溶液制备 精密称取10.01 mg葡萄糖标准品,蒸馏水溶解并定容至100 mL,制得葡萄糖对照品溶液。

1.3.6.2 供试品溶液制备 分别精密称取发酵7、14、21、28、35 d的菌质粉末与黄芪饮片粉末各2 g,加蒸馏水30 mL,回流提取2次,每次1.5 h,合并滤液,浓缩,向浓缩液中加入3倍量无水乙醇,4 ℃静置16 h,5 000 r/min离心10 min,沉淀物于60 ℃水浴干燥,加蒸馏水定容至10 mL,备用。

表1 正交试验因素与水平表$L_9(3^4)$

Tab 1 Factors and Levels of the Orthogonal Test $L_9(3^4)$

水平	因素		
	温度(A)	粉碎程度(B)	水料比(C)
1	23 ℃	粗粉	100%
2	28 ℃	中粉	150%
3	33 ℃	超微粉	200%

1.3.6.3 标准曲线绘制 取"1.3.6.1"项下葡萄糖对照品溶液,梯度稀释至0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08 mg/mL。分别精密量取各稀释液1 mL,加入5%苯酚溶液1 mL,摇匀,加入浓硫酸5 mL,摇匀,置沸水浴反应20 min,冷却后于紫外分光光度计490 nm测定吸光度。

1.3.6.4 方法学考察 精密度试验:取同一浓度的对照品溶液,按"1.3.6.3"项下条件连续测定6次,计算RSD值。稳定性试验:取"1.3.6.2"项下供试品溶液,于0、10、20、30、40、50、60 min按"1.3.6.3"项下条件测定,计算RSD值。重复性试验:取菌质与饮片粉末各6份,按"1.3.6.2"项下方法制备供试品溶液,按"1.3.6.3"项下条件测定,计算RSD值。加样回收试验:取含量已知的菌质与饮片粉末各6份,精密加入一倍量的对照品,按"1.3.6.2项"下方法制备供试品溶液,按"1.3.6.3"项下条件测定,计算RSD值。

1.3.6.5 样品中总多糖含量 供试品溶液稀释500倍后,按照"1.3.6.3"项下方法进行检测。根据葡萄糖标准曲线线性方程,计算样品中多糖浓度。

1.3.7 发酵过程中皂苷类成分含量变化

1.3.7.1 对照品溶液制备 分别精密称取黄芪皂苷Ⅰ(9.84 mg)、黄芪皂苷Ⅱ(9.25 mg)、黄芪皂苷Ⅲ(9.41 mg)以及黄芪甲苷(9.81 mg)对照品,甲醇溶解并定容至10 mL,制成各对照品母液。精密量取各对照品母液,经甲醇梯度稀释,制备成6个浓度点的系列标准曲线工作溶液,其浓度范围分别为:黄芪皂苷Ⅰ 30.50~1 525.08 μg/mL;黄芪皂苷Ⅱ 18.50~370.00 μg/mL;黄芪皂苷Ⅲ 4.71~141.15 μg/mL;黄芪甲苷 14.16~708.16 μg/mL。

1.3.7.2 供试品溶液制备 分别精密称取发酵7、14、21、28、35 d的菌质粉末与黄芪饮片粉末各4 g,加80%甲醇100 mL,称定重量,回流提取3 h,冷却后补足失重,摇匀过滤,取续滤液50 mL,蒸干,残渣

用80%甲醇复溶并定容至5 mL，过0.22 μm微孔滤膜备用。

1.3.7.3 色谱条件 LC-20AT岛津高效液相色谱仪，色谱柱Kromasil 100-5-C_{18}（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相乙腈（A）-水（B），梯度洗脱：0～20 min，96%～80%B；20～40 min，80%～70%B；40～65 min，70%～40%B；65～70 min，40%～96%B；70～80 min，96%B。柱温箱30 ℃，检测器ELSD，流速1 mL/min，进样量10 μL。漂移管温度55 ℃，流速2.5 mL/min。

1.3.7.4 方法学考察 线性关系考察：取“1.3.7.1”项下对照品溶液，按“1.3.7.3”项下条件进样，测定峰面积。因蒸发光检测器响应特性，以对照品色谱峰面积对数为纵坐标（Y）与对照品浓度对数为横坐标（X）做线性回归方程。

稳定性试验：取“1.3.7.2”项下供试品溶液，于0、2、4、6、8、12、24 h按“1.3.7.3”项下条件进样，记录峰面积，计算RSD值。

精密度、重复性及加样回收试验方法同“1.3.6.4”项，分别按“1.3.7.2”和“1.3.7.3”项下方法制备样品和进样分析，记录峰面积，计算RSD值。

1.3.8 发酵过程中核苷类成分含量变化

1.3.8.1 对照品溶液制备 分别精密称取尿苷（4.78 mg）、鸟苷（5.14 mg）、腺苷（4.96 mg）以及虫草素（5.05 mg）对照品，蒸馏水溶解并定容至10 mL，制成各对照品母液。

精密量取各对照品母液，经蒸馏水梯度稀释，制备成系列标准曲线工作溶液，其浓度点数量及范围分别为：尿苷（8个点）0.10～23.90 μg/mL；鸟苷（8个点）0.10～25.70 μg/mL；腺苷（8个点）0.10～24.80 μg/mL；虫草素（9个点）0.10～45.45 μg/mL。

1.3.8.2 供试品溶液制备 分别精密称取发酵7、14、21、28、35 d的菌质粉末与黄芪饮片粉末各1 g，加蒸馏水25 mL，超声提取60 min，离心，取上清液过0.22 μm微孔滤膜备用。

1.3.8.3 色谱条件 LC-20AT岛津高效液相色谱仪，色谱柱ZORBAX SB-Aq（4.6 mm×250 mm，5 μm），流动相乙腈（A）-1.5 mmol/L NaH_2PO_4-Na_2HPO_4（B），梯度洗脱：0～20 min，100%～98%B；20～45 min，98%～80%B；45～55 min，80%～100%B；55～60 min，100%B。柱温箱25 ℃，波长260 nm，流速0.8 mL/min。

1.3.8.4 方法学考察 线性关系考察：取“1.3.8.1”项下对照品溶液，按“1.3.8.3”项下条件进样，测定峰面积。以对照品色谱峰面积（Y）与对照品浓度（X）做线性回归方程。精密度、稳定性、重复性及加样回收试验方法同“1.3.6.4”项，分别按“1.3.8.2”和“1.3.8.3”项下方法制备样品和进样分析，记录峰面积，计算RSD值。

1.3.9 发酵过程中黄酮类成分含量变化

1.3.9.1 对照品溶液制备 分别精密称取毛蕊异黄酮葡萄糖苷（10.68 mg）、毛蕊异黄酮（9.97 mg）、芒柄花苷（10.65 mg）以及芒柄花素（5.16 mg）对照品，甲醇溶解并定容至10 mL，制成各对照品母液。

精密量取各对照品母液，经甲醇梯度稀释，制备成系列标准曲线工作溶液其浓度点数量及范围分别为：毛蕊异黄酮葡萄糖苷（9个点）0.10～403.47 μg/mL；毛蕊异黄酮（9个点）0.08～308.50 μg/mL；芒柄花苷（9个点）0.11～420.39 μg/mL；芒柄花素（8个点）0.05～104.30 μg/mL。

1.3.9.2 供试品溶液制备 分别精密称取发酵7、14、21、28、35 d的菌质粉末与黄芪饮片粉末各4 g，加甲醇100 mL，称定重量，回流提取2 h，冷却后补足失重，摇匀过滤，取续滤液25 mL，蒸干，残渣用甲醇复溶并定容至5 mL，过0.22 μm微孔滤膜备用。

1.3.9.3 色谱条件 LC-20AT岛津高效液相色谱仪，色谱柱Kromasil 100-5-C_{18}（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相乙腈（A）-0.2%甲酸水（B），梯度洗脱：0～20 min，80%～60%B；20～30 min，60%B。柱温箱30 ℃，检测波长260 nm，流速1 mL/min，进样量10 μL。

1.3.9.4 方法学考察 线性关系考察：取“1.3.9.1”项下对照品溶液，按“1.3.9.3”项下条件进样，测定峰面积。以对照品色谱峰面积（Y）与对照品浓度（X）做线性回归方程。稳定性试验：取“1.3.9.2”项下供试品溶液，于0、2、4、6、8、12、24、30 h按“1.3.9.3”项下条件进样，记录峰面积，计算RSD值。精密度、重复性及加样回收试验方法同“1.3.6.4”项，分别按“1.3.9.2”和“1.3.9.3”项下方法制备样品和进样分析，记录峰面积，计算RSD值。

1.4 统计学处理

每组实验至少重复3次，采用Excel、SPSS 27.0软件进行相关数据的统计分析，采用GraphPad Prism 9软件进行作图分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 黄芪粉碎程度对黄芪发酵结果的影响 蝉拟青霉在黄芪粗粉中生长最快，内部菌丝生长完全；中粉次之；超微粉至发酵后期菌丝仍未满袋（表2、图1）。因此，优选粗粉为最佳粉碎程度。

2.1.2 发酵温度对黄芪发酵结果的影响 28 ℃时菌丝生长速度略快于23 ℃,且菌丝满袋时内部生长状态良好;33 ℃下菌丝未长出,表明该温度不适合蝉拟青霉生长(表2、图1)。因此,最终选择28 ℃作为最适发酵温度。

2.1.3 水料比对黄芪发酵结果的影响 水料比(包含种子液含水量)200%和250%时,菌丝满袋较快但内部渗透程度差;水料比150%的满袋时间短于100%,且内部菌丝生长程度更优(表2、图1)。因此,选择150%作为最佳水料比。

2.2 正交试验结果

2.2.1 正交试验及方差分析结果 极差分析显示(表3),各因素影响程度排序为:A(温度)>B(粉碎程度)>C(水料比)>D(空白),最佳组合为$A_2B_1C_2$(28 ℃,粗粉,水料比150%)。方差分析结果表明(表4),温度、粉碎程度和水料比对结果的影响差异无统计学意义($P>0.05$)。结合菌丝满袋后其内部生长状态(图2),确认$A_2B_1C_2$为最佳组合。

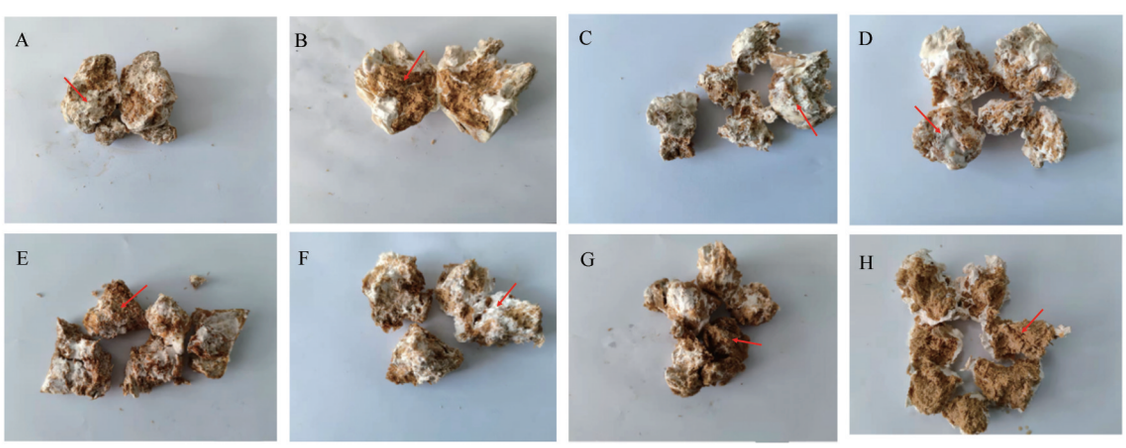
2.2.2 验证试验结果 借鉴传统中药发酵终点的判定方法——菌丝长满,选择最为直观的菌丝生长速度与菌丝生长状态为指标,按照最优工艺进行3次平行发酵试验,菌丝满袋时间分别为20、20、21 d,且内部菌丝生长状态良好。因此,该工艺可靠、稳定。

表2 不同因素对菌丝满袋时间影响的单因素试验

Tab 2 Single-factor experiment on the influence of different factors on mycelium filling time

因素		菌丝满袋时间(d)
粉碎程度	粗粉	21
	中粉	23
	超微粉	-
温度(℃)	23	22
	28	20
	33	-
水料比(%)	100	22
	150	20
	200	18
	250	17

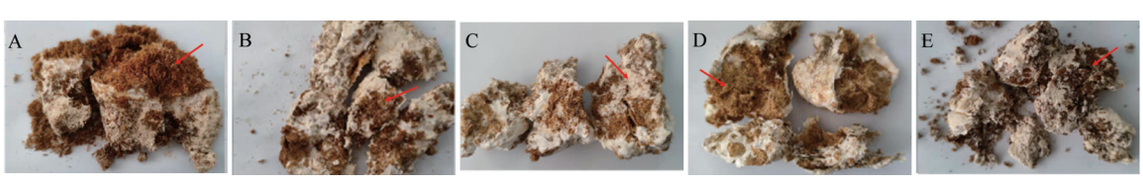
注:"-"代表菌丝不能满袋。



A:粗粉;B:中粉;C:23 ℃;D:28 ℃;E:100%;F:150%,G:200%;H:250%;红色箭头:基质内部菌丝生长区域,表征菌丝在基质中的生长与渗透状态

图1 不同粉碎程度、温度、水料比下菌丝满袋时内部状态

Fig 1 Internal State of Mycelium at Full Colonization Under Different Grinding Degrees, Temperatures, and Water-to-Material Ratios



A:23 ℃,粗粉,水料比100%;B:23 ℃,中粉,水料比150%;C:28 ℃,粗粉,水料比150%;D:28 ℃,中粉,水料比200%;E:28 ℃,超微粉,水料比100%;红色箭头:基质内部菌丝生长区域,表征菌丝在基质中的生长与渗透状态

图2 正交试验不同组合菌丝满袋后内部生长状态

Fig 2 Internal Growth Status of Mycelium After Full Colonization Under Different Combinations of Orthogonal Experiment

表3 基于$L_9(3^4)$正交表的试验设计和结果

Tab 3 Experimental Design and Results of $L_9(3^4)$ Orthogonal Array

试验方案	因素				菌丝满袋时间(d)
	温度(℃)(A)	粉碎程度(B)	水料比(%)(C)	空白(D)	
1	A_1	B_1	C_1	1	30
2	A_1	B_2	C_2	2	29
3	A_1	B_3	C_3	3	100
4	A_2	B_1	C_2	3	20
5	A_2	B_2	C_3	1	29
6	A_2	B_3	C_1	2	39
7	A_3	B_1	C_3	2	100
8	A_3	B_2	C_1	3	100
9	A_3	B_3	C_2	1	100
K_1	159	150	169	159	-
K_2	88	158	149	168	-
K_3	300	239	229	220	-
Range R	70.67	29.67	26.67	20.33	-
Order	$R_A > R_B > R_C > R_D$				

注:为方便计算,未能长出菌丝或菌丝不能满袋的情况按满袋时间100 d计。

2.3 不同发酵点各类成分的含量变化

前期工艺优化阶段以传统的“菌丝长满”为发酵终点,但此时菌丝生长旺盛,故推测可能存在后续转化过程,因此,将发酵时间进一步扩大至“菌丝衰落”阶段(约为35 d),间隔7 d取样,以进行后续研究。

2.3.1 方法学考察 根据FDA的相关指导原则[34],对上述各类成分的分析方法进行了系统验证,包括线性、精密度、稳定性、重复性和回收率等指标。结果表明:13种目标成分在考察浓度范围内均呈现良好的线性关系($R^2 \geqslant 0.999$);精密度、重复性、稳定性及加样回收试验的相对标准偏差(RSD)<5%,证明所建立的分析方法准确可靠、重现性好,见表5。

2.3.2 发酵过程中总多糖含量的变化 发酵前多糖总量初始值为142.56 mg/g,菌体在发酵7 d内处于生长适应期,整个发酵体系的多糖含量保持相对稳定;随发酵时间的延长,总多糖含量明显下降,发酵21 d时含量降至79.58 mg/g,之后下降速度减缓,整个过程呈阶段性下降(图3A)。

上述结果表明,蝉拟青霉的生长代谢与多糖降解过程明显相关,菌丝生长对数期(7~21 d)对应多糖的快速分解阶段。菌丝旺盛生长需要大量利用多糖作为碳源,21 d后易降解的多糖组分已基本消耗完毕或菌体代谢转向其他物质。这种动态变化规律为优化发酵工艺提供了重要依据:若以保留多糖活性为目标,建议控制发酵时间在7 d以内;若以获得最大菌丝产量为目标,则可延长至21 d左右。

2.3.3 发酵过程中皂苷类成分含量的变化 4种皂苷成分在发酵过程中呈现明显差异的代谢特征(图3B)。黄芪皂苷Ⅰ呈现持续下降趋势,初始含量为422.55 μg/g,发酵7 d内明显降低,7~21 d基本稳定,21 d时菌丝满袋,此后含量快速下降,最终降至56.31 μg/g。与此同时,黄芪甲苷在发酵21 d后含量明显增加,终含量达252.96 μg/g,与黄芪皂苷Ⅰ的变化趋势呈明显负相关。黄芪皂苷Ⅱ含量变化为先降低后升高,发酵21 d时达最大值207.20 μg/g后趋于稳定。黄芪皂苷Ⅲ含量则呈先降低、再升高后降低趋势,整体波动幅度较小,推测其受发酵影响较小,分子结构相对稳定。

综合分析表明,发酵21 d(菌丝满袋)是皂苷类成分转化的关键节点,此时合成与降解并存。结合文献[35-37],推测黄芪皂苷Ⅰ、Ⅱ可能通过酯键水解转化成黄芪甲苷,该过程与微生物转化机制一致。然而,黄芪皂苷Ⅰ、Ⅱ转化为黄芪甲苷的过程也可在碱性条件下自发进行,因此,该转化过程的发生是否源于蝉拟青霉还需进一步的对照试验验证。

2.3.4 发酵过程中核苷类成分含量的变化 尿苷和鸟苷含量变化趋势相似,在发酵14 d达最大值436.49、513.15 μg/g,35 d至最低值分别为107.14、199.02 μg/g;相比之下,腺苷含量变化较平缓,发酵21 d达最大值228.26 μg/g,35 d至最低值105.10 μg/g。三者整体上呈现先升高后降低的趋势。此外,虫草素的含量变化与其他3种不同,发酵前21 d内含量持续升高至650.87 μg/g,后续略有降低(图3C)。

研究结果表明,在发酵21 d(菌丝长满)前,尿

表4 正交试验方差分析结果

Tab 4 Results of Variance Analysis for Orthogonal Experiment

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	P
A	7 762.89	2	3 881.44	10.74	>0.05
B	1 616.23	2	808.11	2.24	>0.05
C	1 155.56	2	577.78	1.60	>0.05
D(误差)	722.89	2	361.44	-	-

苷、鸟苷及腺苷含量的上升趋势可能与蝉拟青霉体内合成遗传物质以满足自身生长繁殖的需求相关，而21 d后含量的下降则可能为蝉拟青霉开始衰亡，相关核苷类成分开始被分解。除此之外，虫草素的含量变化特征也值得深入探讨。目前已有文献[38-40]对虫草素的合成途径进行了深入研究，表明腺苷是虫草素合成途径的必要代谢产物之一。但本研究结果发现，在发酵7～21 d虫草素大量合成阶段，腺苷含量变化却不大，说明其合成途径可能不止腺苷一条途径。此外，根据发酵后期虫草素含量下降趋势推测虫草素含量的增长并不存在于整个发酵过程，因此，若以生产虫草素为目的进行发酵时应多加注意发酵时间的调控。

2.3.5 发酵过程中黄酮类成分含量的变化 4种黄酮类成分含量随发酵时间延长持续降低（图3D）。毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷、芒柄花素含量分别从初始的589.05、195.73、235.06、125.49 μg/g降低至6.67、5.20、6.15、1.83 μg/g，终含量降至10 μg/g以下。由此可见，在发酵过程中，这4种成分发生了大量转化。

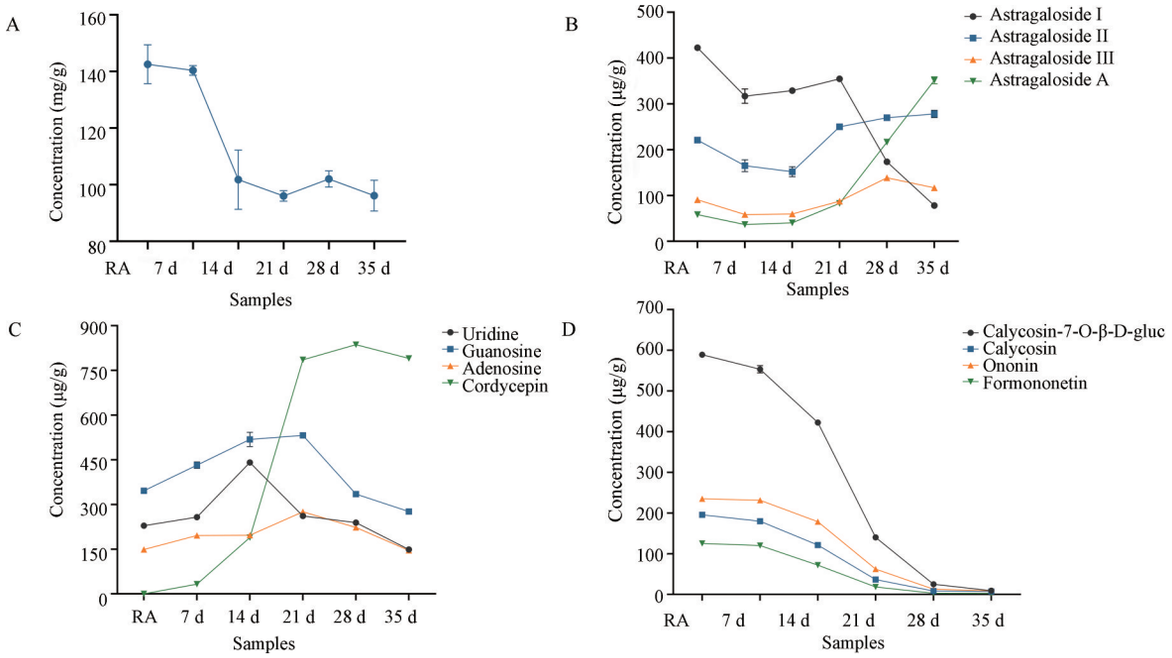
目前对发酵过程中黄酮类成分变化进行的相关报道[41-43]，多数黄酮类成分发生的转化体现在黄酮苷类转化为苷元，本研究结果表明，发酵过程中黄酮苷类成分转化为苷元的过程并不明显，例如毛蕊异黄酮葡萄糖苷与毛蕊异黄酮的含量下降趋势基本一致。因此，推测在该发酵体系中这4种成分可能转化为了其他化合物。

表5 各类成分方法学考察结果 $\bar{x}\pm s$

Tab 5 Results of Methodological Investigation for Various Components

类别	成分	线性关系			精密度（RSD%）	稳定性（RSD%）		重复性（RSD%）		加样回收率（%，$\bar{x}\pm s$）	
		回归方程	R^2	线性范围(μg/mL)		RA	RPF	RA	RPF	RA	RPF
多糖类	总多糖	Y=9.09X+0.092 4	0.999 0	20～80	3.57	3.03	3.90	3.37	3.35	93.65±4.81	93.17±4.96
皂苷类	黄芪皂苷Ⅰ	Y=1.539 5X+1.164 9	0.999 1	7.86～1 525.08	2.85	4.92	4.47	2.92	1.96	100.18±4.11	102.68±1.96
	黄芪皂苷Ⅱ	Y=1.605 3X+1.348 1	0.999 0	18.50～370.00	2.18	4.28	4.96	2.01	1.70	99.23±4.68	98.59±4.39
	黄芪皂苷Ⅲ	Y=1.200 1X+1.889 2	0.999 1	4.71～141.15	1.20	4.72	4.80	2.49	2.91	98.23±4.32	96.54±3.65
	黄芪甲苷	Y=1.542 8X+1.592 9	0.999 6	3.65～708.16	2.21	3.79	3.22	2.05	1.86	97.93±2.81	101.47±2.84
核苷类	尿苷	Y=31 876X−1 278	0.999 9	0.10～23.90	0.46	2.08	1.72	1.83	3.72	98.52±3.34	100.54±3.77
	鸟苷	Y=32 825X−3 280	0.999 9	0.10～25.70	0.17	3.36	2.98	1.50	1.20	102.14±2.27	103.38±1.77
	腺苷	Y=44 190X−2 660	0.999 7	0.10～24.80	0.27	1.02	1.58	2.30	1.81	100.54±4.15	101.65±4.96
	虫草素	Y=47 034X+1 935	0.999 9	0.10～25.25	0.32	-	2.18	-	1.91	-	100.43±3.67
黄酮类	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	Y=39 010X−45 242	0.999 9	0.10～403.47	0.97	1.31	1.23	1.79	2.54	102.79±1.38	103.59±2.75
	毛蕊异黄酮	Y=57 464X−47 846	0.999 9	0.08～308.50	1.00	1.09	0.78	2.08	1.75	99.80±1.18	100.58±0.63
	芒柄花苷	Y=49 516X−61 727	0.999 9	0.11～420.39	0.92	1.25	1.28	2.00	2.49	101.72±1.35	102.04±2.12
	芒柄花素	Y=67 748X−16 131	0.999 7	0.05～104.30	1.01	0.89	0.63	1.98	2.39	99.93±1.08	99.09±1.57

注：RA：黄芪，RPF：菌质。



A：总多糖；B：皂苷类；C：核苷类；D：黄酮类

图3 发酵过程中各类成分的含量变化

Fig 3 Changes in contents of various components during fermentation

3 讨论

基于课题组前期发现的黄芪-蝉拟青霉双向固体发酵体系的优异降尿酸活性，本研究深入开展了工艺优化和成分转化规律研究。与已有研究相比[4,5]，本研究不仅聚焦于发酵条件的优化，更深入解析了活性成分的动态变化规律，为阐释药用真菌与中药材的相互作用机制提供了新视角。

在工艺优化方面，本研究发现粉碎程度对发酵效果的影响具有特殊性。与常规认知不同，过细的粉碎反而不利于菌丝生长，这可能是由于过度粉碎导致基质孔隙率降低，影响了气体交换和菌丝扩展[44]。这一发现为中药固体发酵的基质处理提供了重要参考。温度影响的研究结果与文献报道一致[45]，进一步证明了28 ℃是蝉拟青霉最适生长温度。水料比研究表明，发酵中水分过高或过低会影响发酵结果，过高会导致基质过湿而缺氧，过低则无法满足菌丝生长所需[46]。

在成分转化方面，研究发现多糖的消耗规律与菌体生长曲线高度吻合，这证明其是菌体生长的主要碳源[47]。皂苷类成分变化较为明显，其中黄芪皂苷Ⅰ向黄芪甲苷的定向转化尤为突出，这不仅提高了产物的药用价值，也表明蝉拟青霉可能具有独特的皂苷转化酶系统。这一发现与唐敏等[4]的报道相似，但转化方向有所不同，体现了菌种特异性的代谢特征。核苷类中，尿苷、鸟苷、腺苷含量变化与菌体生长周期高度吻合；虫草素代谢特征则与典型核苷酸代谢[48]差异明显，尤其合成高峰期与腺苷含量变化不同步，这与腺苷依赖合成理论[38,40]不相符。因此推测，虫草素可能存在多条生物合成途径。黄酮类成分的转化模式与传统“苷-苷元”转化理论[41-43]不同，表现为苷类和苷元同步降解，这一现象表明可能存在全新的代谢途径，并与蝉拟青霉特有的酶系统有关。

综上所述，本研究成功建立了黄芪-蝉拟青霉双向固体发酵的优化工艺体系，并系统阐明了发酵过程中多类活性成分的动态转化规律。研究成果不仅为该发酵体系的进一步深入解析提供了坚实的理论依据和技术支撑，而且对基于黄芪等传统中药的创新药物研发具有重要推动作用。后续还需对发酵过程中关键成分转化的分子机制进行研究，为中药现代化和产业化发展奠定坚实基础。

作者贡献度说明：

王淑萍、崔议方：设计实验，王淑萍、崔议方、王红：完成实验，赵莉莉、刘新华、尹志成：协助实验设计优化、数据统计，王淑萍：撰写论文，张加余、崔智峰：修改论文，张加余：校审论文。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

1 董凡，李浩然，王少平，等. 中药发酵的现代研究进展与展望[J]. 中华中医药杂志，2021，36(2)：628-633.

Dong F, Li HR, Wang SP, et al. Progress and prospect of modern research on fermented Chinese materia medica [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 36(2): 628-633.

2 Li L, Wang L, Fan W, et al. The application of fermentation technology in traditional Chinese medicine: A review[J]. Am J Chin Med, 2020, 48(4): 899-921.

3 李莉, 马佳荣, 王玉辉, 等. 双向固体发酵应用于中药的研究进展[J]. 华西药学杂志, 2024, 39(4): 483-487.
Li L, Ma JR, Wang YH, et al. Research progress on bidirectional solid fermentation applied to traditional Chinese medicine[J]. West Chin J Pharmaceutical Sci, 2024, 39(4): 483-487.

4 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 M, Leng Y, Wang SM, et al. *In vitro* antioxidant activity analysis of the bi-directional solid fermentation plasm of *hericium erinaceus* and ginseng[J]. Sci Technol Food Ind, 2023, 44(1): 154-161.

5 刘佳, 魏宝红, 毕旺华, 等. 桑黄-昆布双向发酵菌质化学成分及抗肿瘤活性[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(19): 61-67.
Liu J, Wei BH, Bi WH, et al. Chemical components and antitumor activity of inonotus-eckloniae thallus bidirectional fermentation product[J]. Food Res Dev, 2023, 44(19): 61-67.

6 张淑娟, 张育贵, 牛江涛, 等. 黄芪的研究进展及其质量标志物预测分析[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(2): 151-155.
Zhang SJ, Zhang YG, Niu JT, et al. Research progress of Huangqi(astragali radix) and prediction of its quality markers[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2022, 40(2): 151-155.

7 王祥, 王育朋, 安佳, 等. 不同生长年限蒙古黄芪转录组学分析及三萜皂苷合成关键基因挖掘[J]. 中草药, 2023, 54(3): 915-925.
Wang X, Wang YP, An J, et al. Transcriptomic analysis of astragalus mongolicum from different years and mining of key genes for synthesis of active components[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(3): 915-925.

8 司晶晶, 赵霞, 赵鲲鹏, 等. 黄芪主要化学成分及光谱技术在其质量评价中的应用研究进展[J]. 甘肃中医药大学学报, 2022, 39(3): 98-105.
Si JJ, Zhao X, Zhao KP, et al. Application progress of spectroscopic technique in quality assessment of astragali radix[J]. J Gansu Univ Chin Med, 2022, 39(3): 98-105.

9 王帅, 高世勇, 李婉秋. 黄芪多糖的提取、分离纯化及药理活性研究进展[J]. 特产研究, 2024, 46(1): 142-149.
Wang S, Gao SY, Li WQ. Study on the extraction, purification and pharmacological activity of astragalus polysaccharide[J]. Spec Wild Econ Anim Plant Res, 2024, 46(1): 142-149.

10 李博, 耿刚. 黄芪的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中西医结合研究, 2022, 14(4): 262-264.
Li B, Geng G. Research advances on the chemical constituents and pharmacological activities of astragali radix (*astragalus membranaceus*)[J]. Res Integr Tradit Chin West Med, 2022, 14(4): 262-264.

11 邵长鑫, 林欢欢, 靳晓杰, 等. 黄芪的炮制历史沿革及现代研究进展[J]. 中草药, 2023, 54(15): 5057-5074.
Shao CX, Lin HH, Jin XJ, et al. Historical evolution and modern research progress of astragali radix processing[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(15): 5057-5074.

12 Liu Y, Song X, Dan L, et al. Astragali radix: Comprehensive review of its botany, phytochemistry, pharmacology and clinical application[J]. Arch Pharm Res, 2024, 47(3): 165-218.

13 Fu J, Wang Z, Huang L, et al. Review of the botanical characteristics, phytochemistry, and pharmacology of astragalus membranaceus (Huangqi)[J]. Phytother Res, 2014, 28(9): 1275-1283.

14 Zhang X, Lin B, Wang X, et al. Research progress on the treatment of related diseases with *astragalus*[J]. Drug Des Devel Ther, 2025, 19: 2845-2862.

15 Li J, Niu Y, Yuan L, et al. Research progress in the medicine-food dual use of astragalus for gastrointestinal tumors[J]. J Med Food, 2024, 27(12): 1145-1157.

16 Tamang B, Liang Q, Balakrishnan B, et al. *Astragalus* shiitake-a novel functional food with high polysaccharide content and anti-proliferative activity in a colorectal carcinoma cell line[J]. Nutrients, 2022, 14(11): 2333.

17 马伟, 李洪源, 何旭, 等. 黄芪抗衰老作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(4): 21-24.
Ma W, Li HY, He X, et al. Research progress of anti-aging effect of astragalus membranaceus[J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2020, 22(4): 21-24.

18 张召彬. 黄芪多糖在畜禽养殖中的应用分析[J]. 中国动物保健, 2025, 27(3): 181-182.
Zhang ZB. Application analysis of astragalus polysaccharides in livestock and poultry production[J]. China Anim Health, 2025, 27(3): 181-182.

19 Li C, Wang Y, Cheng W, et al. Review on research progress and prospects of cicada flower, isaria cicadae (ascomycetes)[J]. Int J Med Mushrooms, 2021, 23(4): 81-91.

20 艾仁丽, 谭艾娟, 吕世明. 蝉拟青霉液体培养条件优化

[J]. 生物技术, 2020, 30(4): 397-403.
Ai RL, Tan AJ, Lv SM. Optimization of liquid culture conditions of paecilomyces cicadae[J]. Biotechnology, 2020, 30(4): 397-403.

21 Tian J, Zhao X, Tang C, et al. Protective effect of paecilomyces cicadae TJJ11213 exopolysaccharide on intestinal mucosa and regulation of gut microbiota in immunosuppressed mice[J]. Food Res Int, 2023, 165: 112477.

22 Zhou Q, Yang F, Li Z, et al. *Paecilomyces cicadae*-fermented *radix astragali* ameliorate diabetic nephropathy in mice by modulating the gut microbiota[J]. J Med Microbiol, 2022, 71: 5.

23 艾仁丽, 谭艾娟, 罗钰嘉, 等. 蝉拟青霉菌丝体降血糖组分确证[J]. 生物技术, 2022, 32(5): 576-581,586.
Ai RL, Tan AJ, Luo YJ, et al. Confirmation of hypoglycemic components of paecilomyces cicadae mycelium [J]. Biotechnology, 2022, 32 (5): 576-581,586.

24 罗钰嘉, 陈波利, 谭艾娟, 等. 蝉拟青霉产镇痛组分的培养条件优化[J]. 生物技术, 2021, 31(4): 377-384.
Luo YJ, Chen BL, Tan AJ, et al. Optimization of culture conditions for analgesic components produced by paecilomyces cicadae[J]. Biotechnology, 2021, 31(4): 377-384.

25 刘子菡, 王喻淇, 杨爱琳, 等. 基于网络药理学研究黄芪增强免疫功能的机制[J]. 中南药学, 2020, 18(10): 1661-1667.
Liu ZH, Wang YQ, Yang AL, et al. Mechanism of immunity enhancement of astragali radix based on network pharmacological study[J]. Cent South Pharm, 2020, 18(10): 1661-1667.

26 董萍萍, 岑帅, 刘子菡, 等. 基于网络药理学的黄芪抗心力衰竭作用机制[J]. 滨州医学院学报, 2020, 43(5): 367-372.
Dong PP, Cen S, Liu ZH, et al. Study on treatment mechanism of heart failure for astragali radix based on network pharmacology[J]. J Binzhou Med Univ, 2020, 43(5): 367-372.

27 陶雨凡, 董凡, 兀琦, 等.《中国药典》2020年版含黄芪成方制剂分析及其现代研究进展[J]. 中国现代中药, 2023, 25(1): 202-209.
Tao YF, Dong F, Wu Q, et al. Analysis and modern research progress of formulas containing astragali radix in Chinese Pharmacopoeia (2020 Edition)[J]. Mod Chin Med, 2023, 25(1): 202-209.

28 Song S, Li Y, Liu X, et al. Study on the biotransformation and activities of astragalosides from astragali radix *in vitro* and *in vivo*[J]. J Agric Food Chem, 2023, 71(46): 17924-17946.

29 Zhang W, Cui Y, Liu Z, et al. *Astragalus membranaceus* ultrafine powder alleviates hyperuricemia by regulating the gut microbiome and reversing bile acid and adrenal hormone biosynthesis dysregulation [J]. Arab J Chem, 2022, 15(9): 103970.

30 Zhang W, Cui Y, Zhang J. Multi metabolomics-based analysis of application of *astragalus membranaceus* in the treatment of hyperuricemia[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 948939.

31 Liu Z, Wang S, Li Q, et al. Diagnostic product ions-based chemical characterization and antioxidative activity evaluation of solid fermentation for *astragali radix* produced by *paecilomyces cicadae*[J]. Arab J Chem, 2021, 14(1): 102908.

32 Wang H, Tao Y, Cui Y, et al. Integrated metabolomics and transcriptomics to study mechanisms of *paecilomyces cicadae*-fermented *radix astragali* in the treatment of hyperuricemia[J]. Food Biosci, 2024, 59: 104136.

33 王喻淇, 刘子菡, 王少平, 等. 蝉拟青霉/黄芪双向发酵菌质化学成分及抗高尿酸血症活性研究[J]. 中国现代中药, 2020, 22(10): 1638-1643.
Wang YQ, Liu ZH, Wang SP, et al. Effect of bidirectional fermentation system of *paecilomyces cicadae/astragalus membranaceus* in hyperuricemia models and its components[J]. Mod Chin Med, 2020, 22(10): 1638-1643.

34 U.S. Food and Drug Administration. Bioanalytical method validation: guidance for industry [EB/OL]. (2018-05-24) [2025-08-15]. https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf.

35 李倩, 于丹, 国立东, 等. 微生物发酵转化皂苷类化合物机制的研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(22): 7264-7278.
Li Q, Yu D, Guo LD, et al. Research progress on mechanism of transformation of saponins by microbial fermentation [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(22): 7264-7278.

36 肖亦菽, 王如锋, 赵淑娟. 中药黄芪皂苷类成分生物合成研究进展[J]. 上海中医药大学学报, 2021, 35(5): 80-88,96.
Xiao YJ, Wang RF, Zhao SJ. Research progress on biosynthesis of saponins of astragali radix[J]. Acad J Shanghai Univ Tradit Chin Med, 2021, 35(5): 80-88,96.

37 Dong M, Li J, Yang D, et al. Biosynthesis and pharmacological activities of flavonoids, triterpene saponins and polysaccharides derived from *astragalus membranaceus* [J]. Molecules, 2023, 28(13): 5018.

38 Yang L, Li G, Chai Z, et al. Synthesis of cordycepin: Current scenario and future perspectives[J]. Fungal Genet Biol, 2020, 143: 103431.

39 张虎成, 邓丽娜, 章宇宁, 等. 基于蛹虫草转录物组学的虫草素生物合成相关基因的表达和功能分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2023, 39(3): 448-461.
Zhang HC, Deng LN, Zhang YN, et al. Expression and functional changes of genes related to cordycepin biosynthesis in *cordyceps militaris* through transcriptome analysis[J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2023, 39(3): 448-461.

40 刘桂君, 乔宇琛, 周思静, 等. 基于代谢组学的蛹虫草菌株虫草素合成途径研究[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(7): 16-25.
Liu GJ, Qiao YC, Zhou SJ, et al. Biosynthesis pathway of cordycepin in *cordyceps militaris* based on metabonomics[J]. Food Ferment Ind, 2023, 49(7): 16-25.

41 秦楠, 杨金梅, 王辉敏, 等. 响应曲面法优化四君子汤发酵工艺及有效成分含量变化初步研究[J]. 饲料研究, 2022, 45(18): 86-91.
Qin N, Yang JM, Wang HM, et al. Optimization of fermentation process and changes of effective components content of Sijunzi decoction by response surface methodology[J]. Feed Res, 2022, 45(18): 86-91.

42 Wang X, Li N, Chen S, et al. MS-FINDER assisted in understanding the profile of flavonoids in temporal dimension during the fermentation of Pu-erh tea[J]. J Agric Food Chem, 2022, 70(23): 7085-7094.

43 Yang T, Huang Y, Li Q, et al. Determination of ten flavonoids in the raw and fermented fructus aurantii by quantitative analysis of multicomponents *via* a single marker (QAMS) based on UPLC[J]. J Anal Methods Chem, 2023, 2023: 6067647.

44 董玉玮, 周洁, 苗敬芝, 等. 灵芝在牛蒡固体培养基中发酵工艺优化及菌丝多糖的体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2019, 40(10): 149-156.
Dong YW, Zhou J, Miao JZ, et al. Production and *in vitro* antioxidant activity of mycelial polysaccharide from *ganoderma lucidum* utilizing burdock (*Arctium lappa* L.) root under optimized solid-state fermentation conditions[J]. Food Science, 2019, 40(10): 149-156.

45 高鹏飞. 蝉拟青霉/黄芪双向发酵体系的建立[D]. 北京:北京中医药大学, 2016.
Gao PF. Establishment of bidirectional fermentation system of *paecilomyces cicadae/astragalus membranaceus* [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2016.

46 董玉玮, 高甜惠, 潘文艺, 等. 响应面法优化甘草固体发酵灵芝产三萜工艺及体外抗氧化活性研究[J]. 食品科技, 2016, 41(1): 7-14.
Dong YW, Gao TH, Pan WY, et al. Optimization of glycyrrhiza uralensis solid fermented ganoderma lucidum using response surface methodology and assessment of their antioxidant activity *in vitro*[J]. Food Sci Technol, 2016, 41(1): 7-14.

47 赵崇妍, 杨芳, 屈青松, 等. 蝉拟青霉/黄芪双向发酵体系建立及成分研究[J]. 世界中医药, 2018, 13(12): 3195-3198.
Zhao CY, Yang F, Qu QS, et al. Establishment of bidirectional fermentation system of *paecilomyces cicadae/astragalus membranaceus* and study on its components[J]. World Chin Med, 2018, 13(12): 3195-3198.

48 Antipova TV, Zhelifonova VP, Baskunov BP, et al. Formation of biologically active compounds by Siberian *Cordyceps militaris* (L.) Fr. Strains[J]. Microbiology, 2024, 93(6): 837-846.

[本文编辑] 朱 昊