

一种冬虫夏草发酵组合物

5 本发明要求于 2023 年 06 月 15 日提交中国专利局、申请号为 202310716796X、
发明名称为“一种冬虫夏草发酵组合物”的中国专利申请的优先权，其全部内容
通过引用结合在本发明中。

技术领域

本发明涉及一种冬虫夏草发酵组合物，属于微生物发酵技术领域。

背景技术

10 赤藓醇也即赤藓糖醇是一种四碳多元醇，其化学名称为 1,2,3,4-丁四醇，分子
式为 $C_4H_{10}O_4$ ，相对分子质量为 122.12。作为一种天然甜味剂，赤藓糖醇广泛存在
于自然界中，它天然少量存在于梨、葡萄、蘑菇等蔬菜水果中，在发酵食品如葡
萄酒、啤酒、酱油、清酒中也有少量存在，同时也少量存在于动物血清、眼球中。

15 赤藓醇分子量小、亲水性强，赤藓糖醇不含有还原性醛基，对热和酸的稳定
性高；易溶于水，在 25℃ 下的溶解度为 37%，溶于水并吸热，以固体形式食用时
会产生清凉感；结晶性好，吸湿性低，在 20℃、相对湿度 90% 的环境中仍不吸潮；
是蔗糖甜度的 60%~80%，且甜味纯正爽净无不良苦味。

20 低能量与特殊代谢途径是赤藓醇代谢特性之一。赤藓醇能量系数为 0.88 kJ/g，
是目前使用的多元醇甜味剂中能量最低的一种。当人体摄入赤藓糖醇后，约 80%~
90% 的赤藓糖醇通过被动扩散被小肠吸收，剩余的 10% 则进入大肠作为碳源发酵。
并且随着赤藓糖醇摄入剂量的增加，进入到大肠的赤藓糖醇比率也会增加。其中，
经小肠被人体吸收的赤藓糖醇在组织中广泛分布，约 5%~10% 的赤藓糖醇在血液
中被氧化成赤藓糖，随后迅速地被进一步氧化生成赤藓糖酯，最后从尿液中排出。
其余未被氧化的赤藓糖醇因不能被机体内的酶系统所分解，只能透过肾脏从血液
中滤过，经尿液排出体外。而进入大肠的赤藓糖醇则会经过肠道菌群的发酵转化
25 为短链脂肪酸(Short-chain fatty acids, SCFAs)，SCFAs 被吸收入肠道后可以通过其
抗炎效应改善饮食诱导代谢紊乱，对肥胖和炎症性肠道疾病具有保护作用。

30 肠道耐受性好是赤藓糖醇的另一特性。与其它糖醇相比，赤藓糖醇的最大非
致泻剂量(Maximum non-laxative dose)为 0.66~1.0+ g/kgbw，明显高于其它糖醇。
有关人体肠道耐受情况的研究显示，18~24 岁健康志愿者以液体形式摄入 20~35 g
赤藓糖醇时，肠道耐受良好，无不良症状；当赤藓糖醇摄入量达到 50 g 时，可观
察到腹泻和恶心等情况。同时，临床研究显示，4~6 岁儿童摄入含 15 g 赤藓糖醇

的饮料后，未观察到腹泻和/或严重肠道症状。此外，需要注意的是，过量摄入糖醇引起的腹泻并不是一种疾病，而是对肠腔中缓慢吸收碳水化合物的简单渗透反应，即在小肠中未被吸收的糖醇由于渗透作用可能导致腹胀、腹泻和胀气。部分人在食用 1 次后会出现这种症状，随着持续食用，多数人会对糖醇产生一定程度的耐受性，相关胃肠症状也会减弱或消失。此外，赤藓糖醇在口腔保护方面也有积极意义。研究表明，赤藓糖醇在口腔中不仅不会被变形链球菌利用，还可抑制其在口腔中的生长和黏附，从而发挥对口腔的有益作用。在一项为期 3 年的临床试验中，接受赤藓糖醇治疗的受试者牙菌斑中乙酸和丙酸水平、斑块变形链球菌计数均显著低于接受木糖醇或山梨糖醇治疗的受试者。

目前，赤藓糖醇主要通过微生物发酵法进行工业化生产。自然界中可以合成赤藓糖醇的微生物很多，如丛梗孢酵母 (*Moniliella pollinis*)、三角酵母、丝孢酵母、解脂耶氏酵母等嗜高渗酵母和酒类酒球菌、酒明串珠菌、乳杆菌等细菌。赤藓糖醇在酵母和细菌中的合成路径有所不同。在酵母中，赤藓糖醇通过磷酸戊糖途径合成，该途径产生的赤藓糖-4-磷酸经脱磷酸形成赤藓糖，而后在赤藓糖还原酶的作用下形成赤藓糖醇；在细菌中，通过磷酸乙酰醇酶途径中的还原型辅酶 II (NADPH) 再生环节可生成赤藓糖醇。

甘露醇，又称 D-甘露糖醇，己六醇，木蜜醇，和山梨醇是同分异构体。甘露醇既存在于天然冬虫夏草中也存在于发酵冬虫夏草菌粉中，但是含量不同。甘露醇作为典型的六元糖醇，溶解吸热，被人体消化吸收后，甘露醇首先与 NAD⁺ 反应，先生成乙酰辅酶 A 与果糖，通过果糖激酶的作用，生成两种磷酸果糖，进入三羧酸循环，完成其甘露醇的生理代谢过程，可以看出甘露醇的代谢过程比较特殊，整个过程都不需要胰岛素的参与，所以自然也就不会引起血糖浓度大幅度的波动，因此，甘露醇可以看做是低热量的食品添加剂。

甘露醇还是一种低热值低糖的口感清凉的甜味剂，甜度相当于蔗糖的 60%，木糖醇的 76%，因为其独特的代谢过程，还可作为糖尿病人、肥胖病人食用；在口香糖上，可以用作甜味剂与矫味剂；作为无糖是低甜味剂、添加剂用于各种视力的生产加工、水果香味的储备及干果的想滑稽。

甘露醇可以用于防止蛀牙或改善龋齿的食品和日化品，因为甘露醇作为甜味剂在口腔中不会为微生物提供营养，更加可抑制链球菌的生长、繁殖。

甘露醇还是一种作用型强的自由基清除剂，能较快清除自由基连锁反应中的部分羟自由基，两者作用时可形成毒性低的甘露醇自由基，经歧化而解毒，以此来防止半暗区组织不可逆性损伤，因而可以减轻神经功能损害，可作为神经保护剂应用于临床；且对氧自由基的生成有抑制作用；能有效地清除脑组织、心肌细胞及肢体肌肉组织内缺氧时产生的自由基，并可降低血液浓度，减少红细胞聚集和脑血管阻力，改善微循环，增加脏器组织的灌注。

麦角硫因 (Ergothioneine, EGT 或 ERG) 是 1909 年在真菌 *Claviceps purpurea* 中首次发现的一种天然稀有的手性氨基酸类强抗氧化剂, 是一种水溶性、天然存在的硫醇化合物, 已被公认为体内抗氧化物质和帮助细胞抵抗氧化应激的保护因子, 具有抗氧化、清除自由基、螯合金属离子、防止紫外线辐射损伤、调节细胞内的氧化还原反应、参与细胞内能量调节以及细胞生理保护剂等多种功能, 是机

5 体内的重要活性物质。

麦角硫因分布于哺乳动物的某些组织、器官中, 主要存在于红血球和某些动物的精液中, 麦角硫因在人类和哺乳动物组织中的含量为 1-2 mM (相当于 229.3-458.6 mg/L) (Melville, 1959; Hartman, 1990 或 The Natural Antioxidant Ergothioneine, Lipid Oxidation, 2013), 这表明麦角硫因可能在体内作为一种无

10 毒的抗氧化剂, 细胞缺乏麦角硫因很容易受到氧化应激的影响, 从而导致线粒体 DNA 损伤、蛋白质氧化和脂质过氧化增加。但是, 到目前为止, 还没有实验研究表明有动物能合成该物质, 动物细胞内肯定存在吸收和保留麦角硫因的途径。麦角硫因以其独特的生物学、药理特性以及安全性、稳定性等优点, 在化妆品、功能食

15 品、制药和生物医学等领域展现出良好的应用前景, 受到国内外学者的广泛关注。

麦角硫因主要存在于蘑菇当中, Melville.D.B 和 Eich.S 研究发现谷类植物也有麦角硫因存在。Melville.D.B 和 Genghof.D.S 等随后的研究表明麦角硫因是许多微生物细胞的普遍成分, 且在几种真菌内能够合成, 但不能在细菌内合成。由于蘑菇是包括麦角硫因等抗氧化剂的丰富来源, 这是将蘑菇纳入人类饮食的另一个原因, 例如 Shin-Yu Chen 等 (Contents of lovastatin, g-aminobutyric acid and ergothioneine in mushroom fruiting bodies and mycelia, Food Science and Technology, 2012(47):274-278) 报道在蘑菇子实体中, *Pleurotus citrinopileatus*、*P. ostreatus* (韩国)、*P. ostreatus* (中国台湾) 和 *Pleurotus salteostramineus* 的麦角硫因含量最高 (分别为 2850.7、1829.4、1458.4 和 1245.0 mg/kg), 而在菌丝体中, 杏鲍菇最高

20 (1514.6mg/kg)。为了进一步增强蘑菇中麦角硫因的含量, Wi Yong Lee 等 (Ergothioneine Contents in Fruiting Bodies and Their Enhancement in Mycelial Cultures by the Addition of Methionine, Mycobiology, 2009(37)1:43-7) 报道了通过添加蛋氨酸在菌丝体培养中的增强蘑菇子实体中麦角硫因的含量, 麦角硫因蘑菇和蘑菇之间的差异高达 92.3 倍, 向菌丝体培养基中添加 2 mM 蛋氨酸 (Met) 可增加测试的蘑菇物种中的麦角硫因含量, 表明蛋氨酸对蘑菇产麦角硫因是一种有

25 益的添加剂。

蛹虫草又名北冬虫夏草, 蛹虫草的学名: *Cordyceps militaris* (Vuill) Fr, 英文名: Pupa insect grass, 无性型为轮枝菌 (*Verticillium*), 梁宗琦 (1990) 认为是一种头孢霉 (*Cheilosporium*)。专利文献 WO2014/055035 公开了一种蛹虫草菌株 cbs

30 132098 和具有生物活性的子实体、菌丝体生物物质及其提取物, 其蛹虫草菌丝体生

物量中的麦角硫因为 130.65 mg/kg (0.013%), 对应于 Chen 等的第四级分级 (Chang 等, 2012 年)。Bai-Xiong 等 (Enhancement of ergothioneine production by discovering and regulating its metabolic pathway in *Cordyceps militaris*. Bai-Xiong Chen et al, 《Microb Cell Fact》. 2022 Aug 23;21(1):169) 构建了一条新的麦角硫因合成途径, 通过将该途径进一步引入蛹虫草基因组, 成功地提高了工程菌株的成分产量, 麦角硫因的最高含量高达 2.5 g/kg 干重。

冬虫夏草 (*Cordyceps sinensis*(Borkeler)sacc.) 与蛹虫草为两种不同物种, 冬虫夏草菌寄主的专一性很强, 只能寄生于蝙蝠蛾 (*Hepialus armoricanus* Oberthur) 的幼虫体, 冬虫夏草学名: *Cordyceps sinensis* (Berk) Sacc, 英文名: Chinese caterpillar fungus, 无性型名称由学者专家确认为中国被毛孢 (*Hirsutella sinensis*)。Hui-Chen Lo 等 (A Systematic Review of the Mysterious Caterpillar Fungus *Ophiocordyceps sinensis* in DongChongXiaCao (冬虫夏草 Dōng Chóng Xià Cǎo) and Related Bioactive Ingredients, Journal of Traditional and Complementary Medicine 2013(3)1:16-32) 认为野生冬虫夏草子实体含有可检测到的麦角硫因, 这其中的麦角硫因被认为是真菌生长的次生代谢产物, 并非是其生长发育正常运行所必需的小分子有机化合物, 虽然 Shin-Yu Chen 等报道了冬虫夏草菌丝体中含有 142.0 ± 38.5 IJK 麦角硫因, 但是 Shin-Yi Lin 等 (Comparative Study of Contents of Several Bioactive Components in Fruiting Bodies and Mycelia of Culinary-Medicinal Mushrooms, International Journal of Medicinal Mushrooms, 2013(15)3: 315–323) 报道冬虫夏草 (*Ophiocordyceps sinensis*) 菌丝体中麦角硫因的含量只有 35.70 ± 1.28 K, 其子实体含量更低, 只有 12.20 ± 1.51 E, Nachshol Cohen 等 (Chemical Composition and Nutritional and Medicinal Value of Fruit Bodies and Submerged Cultured Mycelia of Culinary-Medicinal Higher Basidiomycetes Mushrooms, International Journal of Medicinal Mushrooms, 2014(16)3: 273–291) 报道了冬虫夏草 (*Ophiocordyceps sinensis*) 菌丝体中麦角硫因含量为 52.18 ± 2.75 μ g/g, 因此至今未有稳定含有较高麦角硫因的野生冬虫夏草或者天然的冬虫夏草, 也没有稳定含有较高麦角硫因的野生冬虫夏草或者天然的冬虫夏草的菌丝体。而且, 冬虫夏草菌属于子囊菌门粪壳菌纲肉座菌目线性虫草科 *Ophiocordycipitaceae* 线性虫草属 *Ophiocondyceps*, *Ophiocondyceps sinensis* (中药材无公害栽培生产技术规范, 2018), 天然冬虫夏草药源紧缺并且价格昂贵, 利用冬虫夏草的菌丝作为天然冬虫夏草的代用品是技术发展的趋势, 几十年以来, 研究人员从各个产地采集的冬虫夏草中分离出的真菌涉及 10 个属 30 多种, 如蝙蝠蛾拟青霉、中国拟青霉、蝙蝠蛾被孢霉、虫草头孢霉、中国被毛孢、中国弯颈霉、中国金孢霉等, 冬虫夏草不同生长阶段的代谢组研究中 (张洲, 安徽农业大学, 2018), 表明冬虫夏草不同部位之间的代谢物存在明显差异, 且同一部位在不同发育阶段也存在显著的差异, 这种差异在发育初期

更为明显。

因此，冬虫夏草发酵及其有益成分的组合，仍然是需要解决的技术问题。

发明内容

发明人意外地发现，通过工艺的优化，所提供的冬虫夏草发酵组合物含有 1% 以上（重量百分比）的赤藓醇，优选 1%-6%（重量百分比），进一步优选 2-5%（重量百分比），再进一步，优选 2.5-4%。而且，本领域技术人员通常认为赤藓醇仅仅是作为一种甜味剂，但是本发明通过研究意外发现，赤藓醇和腺苷的组合共同表现出羟自由基清除率协同作用，从而增强了冬虫夏草发酵组合物的整体作用，尤其是赤藓醇在本发明限定的范围内时，与腺苷的组合能够表现出优异的羟自由基清除率协同作用。

本发明一方面通过冬虫夏草菌的筛选，获得可产赤藓醇的冬虫夏草菌，进而通过发酵获得含有赤藓醇的发酵组合物，本发明另一方面通过低温液体发酵技术实现冬虫夏草菌丝体或菌粉中赤藓醇得以足量稳定存在，本发明另一方面通过低温发酵工艺实现赤藓醇与腺苷等有效成分的合理存在，不仅使发酵冬虫夏草的组合物更加稳定，而且提供了发酵冬虫夏草菌粉的新的利用方向。

具体而言，本发明一方面通过冬虫夏草菌种的筛选，发明人从天然冬虫夏草的菌中筛选出中国被毛孢(*Hirsutella sinensis*) 具有产赤藓醇的功能，另一方面，发明人通过中国被毛孢发酵获得能够稳定存在的、含有较高含量赤藓醇的发酵菌丝体或菌粉。本发明通过液体发酵培养首次获得具有天然冬虫夏草含量水平赤藓醇，发挥冬虫夏草发酵组合物更广泛的功能。

中国被毛孢(*Hirsutella sinensis*)菌种是从青藏高原新鲜冬虫夏草中分离得到的麦角菌科真菌---冬虫夏草[*cordyceps sinensis*(Berk.)Sacc.]的无性世代，本发明所述的中国被毛孢可以为任意的中国被毛孢菌株，例如可以通过市售平台购买，也可以通过自主筛选分离获得，只要根据微生物分子遗传学等鉴定原则可鉴定为中国被毛孢(*Hirsutella sinensis*)，市售途径包括但不限于中国典型培养物保藏中心（CCTCC）或中国普通微生物菌种保藏管理中心（CGMCC）获得中国被毛孢(*Hirsutella sinensis*)，例如从中国典型培养物保藏中心（CCTCC）获得的包括但不限于中国被毛孢(*Hirsutella sinensis*) CCTCC No: M 2011278，例如从中国普通微生物菌种保藏管理中心（CGMCC）获得的包括但不限于中华被毛孢（*Hirsutella sinensis*）CGMCC 3.14240 和中华被毛孢（*Hirsutella sinensis*）CGMCC3.14243，例如从中国工业微生物菌种保藏管理中心（CICC）购买的冬虫夏草（蝙蝠蛾被毛孢，中华被毛孢）*Ophiocordyceps sinensis* 或冬虫夏草（蝙蝠蛾被毛孢，中华被毛孢）*Cordyceps sinensis* 标准菌株包括但不限于菌株编号为：CICC 14016、CICC 14017、CICC 14088、CICC 14089、CICC 14090、CICC 14094、CICC 14096、CICC 14091、CICC 14092、

CICC 14093、CICC 14095、CICC 14097、CICC 14098、CICC 14099、CICC 14100、
CICC 14101、CICC 14102、CICC 14103、CICC 14104、CICC 14105、CICC 14106、
CICC 14107、CICC 14108、CICC 14109、CICC 14110、CICC 14111、CICC 14112、
CICC 14113、CICC 14114、CICC 14115、CICC 14117、CICC 14118、CICC 14119、
5 CICC 14120、CICC 50002，例如从泰斯拓生物购买的冬虫夏草（蝙蝠蛾被毛孢，
中华被毛孢）*Ophiocordyceps sinensis* 或冬虫夏草（蝙蝠蛾被毛孢，中华被毛孢）
Cordyceps sinensis 或中华被毛孢（*Hirsutella sinensis*）包括不限于货号为 TS324838、
TS325049、TS325054、TS326189、TS326195、TS326196、TS326197、TS326198、
TS326199、TS326200、TS326201、TS326202、TS326203、TS326204、TS326205、
10 TS326206、TS326207、TS326210、TS326212、TS326213、TS326214、TS326408、
TS326410、TS326412、TS342791、TS342792、TS342793、TS342794、TS342795、
TS342796、TS342797、TS342798、TS342800、TS342809、TS361737、TS392986。

中国被毛孢的生长周期长于绝大多数真菌，一般生长于 14-20°C 的环境中，属
于中低温菌。在固体培养基上培养，直径可达 1.5 cm，菌落质地如皮胶，呈肉色、
15 乳白色，在生长初期表面有气生菌丝，随着时间的延长，菌落表面会呈现光滑沟
壑状，气生菌丝逐渐减少。在液体培养基中培养，菌丝体呈丝状或灰色球状，大
小不一，随着培养会有褐色分泌至培养基中，菌丝球质地坚韧不散，有弹性，
内中空。已知中国被毛孢经液体发酵培养所得菌丝体干燥后即发酵冬虫夏草菌粉，
可以获得多种活性物质，包括多糖、氨基酸、核苷类物质、甾醇类物质、甘露醇
20 及微量金属等。其中标志性成分为腺苷、甘露醇、多糖、氨基酸等。发酵冬虫夏
草菌粉具有增强免疫功能、抗纤维化、保护肾功能、抗肿瘤、抗炎等作用，对肾
脏、肺脏、肝脏等脏器有保护作用。

本发明中的发酵是指将现有中国冬虫夏草无性世代菌种，即中国被毛孢经过
斜面培养、种瓶/摇瓶培养、发酵培养的过程。

25 本发明所述的斜面培养是使中国被毛孢在固体培养基的倾斜表面上生长，将
中国被毛孢接种涂布于斜面上，在低温条件下，例如 8~18°C 条件下培养 20~60
天，优选 10~16°C 条件下培养 30~50 天，其中斜面培养基主要原料为葡萄糖、土
豆汁（粉）、玉米粉、琼脂（粉）、酵母膏（粉）、麦麸（皮）、蚕蛹粉、蛋白胨、
NaCl、MgCl₂（氯化镁或其水合物）、MgSO₄（硫酸镁或其水合物）、KCl、CaCl₂
30 （氯化钙或其水合物）、KH₂PO₄（磷酸二氢钾或其水合物）中的一种或多种；例如，
所述的斜面培养基可以是（以下%为重量体积比 g/100 mL）：

蛋白胨 0.05~2.0%、酵母膏 0.05~2.0%、葡萄糖 1.0~5.0%、琼脂 1.0~3.0%、
麦麸 2.0~10%、KH₂PO₄ 0.02~0.2%、MgSO₄ 0.01~0.1%，其余为水；

或

35 蚕蛹粉 1.0~2.0%，玉米粉 1.0~2.0%，葡萄糖 2.0~5.0%，MgSO₄ 0.01~0.1%，

KH_2PO_4 0.01~0.1%，麦片 1.0~3.0g/60 mL，琼脂粉 0.5-1%，其余为水；

或

蚕蛹粉 1.8%，玉米粉 1.5%，葡萄糖 2.0%， MgSO_4 0.01%， KH_2PO_4 0.02%，
麦片 1.0~3.0g/60 mL，琼脂粉 0.65%，其余为水；

5 或

蛋白胨 0.1%、酵母膏 0.1%、葡萄糖 2.0%、 KH_2PO_4 0.1%、 MgSO_4 0.05%、琼脂 1.0~2.0%、麦麸 5.0%，加水煮沸 30 分钟，分装；

或

蛋白胨 0.5~2.0%、蚕豆粉 2.0~5.0%、玉米粉 1.0~4.0%、葡萄糖 2.0~5.0%、
10 琼脂 0.5~2.0%、麸皮 0.5~4%、 KH_2PO_4 0.01~1.0%， MgSO_4 0.01~1.0%、其余为水；

或

葡萄糖 2.0%、玉米粉 1.0%、土豆汁 0.5%、糊精 0.5%、酵母粉 0.5%、麸皮 1.0%、
蚕蛹粉 2.0%、蛋白胨 1.0%、 MgSO_4 0.05%、 KH_2PO_4 0.05%、琼脂粉 1.0%，溶剂为
15 水；

或

蚕蛹粉 2.0~3.0%、玉米粉 1.5%、麸皮 1.0~5.0%、葡萄糖 2.0%、琼脂 1.8%、
 KH_2PO_4 0.02%、 MgSO_4 0.01%，其余为水；

本领域技术人员会理解，上述所列举的具体斜面培养基仅是对本发明的说明，
20 而非解释为限制本发明，同时，本领域技术人员会理解，其可以包括其他常用的中国被毛孢发酵用斜面培养基，或者现有技术已知的中国被毛孢发酵用斜面培养基。

本发明中的摇瓶/种瓶培养菌种从斜面接种到种瓶后，振荡培养，或将试管菌种接入已杀（灭）菌冷却的三角瓶培养液中，置于摇床上振荡培养，例如，种量
25 为 2~6 支斜面，优选 2~3 支斜面，培养温度 10~18°C，优选培养温度 12~16°C，培养时间 8~16 天，优选培养时间 9~14 天。在大规模生产时，摇瓶培养的菌丝体可接入种子罐作为菌种。在摇瓶液体培养中，要求菌丝生长快、得率高，形成的菌球小，如果菌球越大，菌球中心的菌丝体会呈现缺氧及营养的饥饿状态，不利菌丝增殖及次生代谢产物的产生，影响发酵质量及菌丝产量。其中种瓶/摇瓶培养基
30 主要原料为蛋白胨、鱼肝油、牛肉膏、蚕蛹粉、葡萄糖、玉米粉、糊精、酵母膏（粉）、麦麸（皮）、 NaCl 、 MgCl_2 （氯化镁或其水合物）、 MgSO_4 （硫酸镁或其水合物）、 KCl 、 CaCl_2 （氯化钙或其水合物）、 KH_2PO_4 （磷酸二氢钾或其水合物）中的一种或多种；例如，所述的摇瓶/种瓶培养基可以是（以下%为重量体积比 g/100 mL）：

蚕蛹粉 2.0~3.0%，玉米粉 2.0~3.0%，麸皮 2.0~3.0%，鱼肝油 0.1~0.5%，蛋白胨 0.1~1%， KH_2PO_4 0.01%~0.1%，葡萄糖 2.0~5.0%， MgSO_4 0.01%~0.1%，
35

其余为水；

或

蚕蛹粉 2.0~3.0%、玉米粉 1.5%、麸皮 1.0~5.0%、葡萄糖 2.0%、 KH_2PO_4 0.02%、 MgSO_4 0.01%，其余为水；

5

或

蚕蛹粉 2.0%，玉米粉 2.5%，麸皮 2.5%，鱼肝 0.25%，蛋白胨 0.75%， KH_2PO_4 0.02%，葡萄糖 3.0%， MgSO_4 0.01%，其余为水；

或

10 葡萄糖 2.0%、玉米粉 1.0%、糊精 0.5%、酵母粉 0.5%、麸皮 1.0%、蚕蛹粉 2.0%、蛋白胨 1.0%、 MgSO_4 0.05%、 KH_2PO_4 0.05%、溶剂为水；

或

蛋白胨 5.0%、葡萄糖 2.0%、 KH_2PO_4 0.1%、 MgSO_4 0.05%、麦麸 5.0%，溶剂为水；

或

15 鱼肝 0.5%、蛋白胨 0.5%、葡萄糖 2.0%、 KH_2PO_4 0.1%、 MgSO_4 0.05%、麦麸 5%，其余为水；

或

20 葡萄糖 2.0~4.5%、牛肉膏 2.0~4.5%、土豆粉 1.0~2.5%、蛋白胨 1.0~2.5%、 KH_2PO_4 0.02~0.25%、 MgSO_4 0.01~0.05%、菊粉 0.2~1.5%、维生素 B1 0.05~0.15%、醋酸锌 0.01~0.06%，其余为水；

本领域技术人员会理解，上述所列举的具体摇瓶/种瓶培养基仅是对本发明的说明，而非解释为限制本发明，同时，本领域技术人员会理解，其可以包括其他常用的中国被毛孢发酵用摇瓶/种瓶培养基，或者现有技术已知的中国被毛孢发酵用摇瓶/种瓶培养基。

25

本发明中的发酵培养是指用于微生物积累大量代谢产物的培养基。本发明所述的发酵包括使用发酵培养基，深层发酵是指纯种微生物细胞在液体深层培养基中进行需氧或厌氧培养的方法，深层发酵一般是在大型发酵罐中进行，可以自动化、机械化生产。中国被毛孢的发酵罐深层培养工艺流程可以是：一级种子罐→二级种子罐→发酵罐；也可以是：种子罐→发酵罐；亦可以采用连续发酵法。例如，培养温度为 10~18℃，优选培养温度为 12~16℃，培养时间 6~20 天，优选培养时间 7~15 天，优选培养时间 10~15 天。发酵培养基主要原料包括如下中的一种或多种：蚕蛹粉、葡萄糖、玉米粉（浆）、酵母浸出物（浸出膏或粉）、 NaCl 、 MgCl_2 （氯化镁或其水合物）、 MgSO_4 （硫酸镁或其水合物）、 KCl 、 CaCl_2 （氯化钙或其水合物）、 KH_2PO_4 （磷酸二氢钾或其水合物）、多肽粉系列（如多肽粉 101、多肽粉 102、多肽粉 203、多肽粉 305、多肽粉 308、多肽粉 607、多肽粉 702、多肽粉

35

705) (所述多肽粉系列购自成都市文峰生物科技有限公司)。

本发明所述的发酵培养基包括使用新型微生物发酵用有机氮源，如多肽粉“1”系列，多肽粉“1”系列是以大米蛋白、玉米蛋白及其水解产物为主要原料。采用多种水解法分段水解的工艺，经分离、精制浓缩、干燥制成的粉状产品。多肽粉“1”系列包括多肽粉 101、多肽粉 102。多肽粉“2”系列，如多肽粉 203 是以玉米蛋白为主要原料，采用多种水解法分段水解的工艺(该工艺使产品拥有不同大小分子量，肽、肽分布合理，利于微生物的持续利用)，经分离、精制浓缩、喷雾干燥制成的粉状产品。

本发明所述的发酵培养基包括使用新型微生物发酵用有机氮源的蛋白胨系列(非动物源性)，如多肽粉 305、多肽粉 308、多肽粉 607，该蛋白胨系列是以玉米蛋白、酵母为主要原料。采用多种水解法分段水解的工艺(该工艺使产品拥有不同大小分子量，肽、肽分布合理，利于微生物的持续利用)，经分离、精制浓缩、喷雾干燥制成的粉状产品。

本发明所述的发酵培养基包括使用新型微生物发酵用有机氮源的蛋白胨系列(非动物源性)，如多肽粉 702、多肽粉 705，多肽粉“7”系列是以大米蛋白、玉米蛋白为主要原料。采用现代生物法与多种水解法分段水解的工艺(该工艺使产品拥有不同大小分子量，肽、肽分布合理，利于微生物的持续利用)，经分离、精制浓缩、喷雾干燥制成的粉状产品。

本发明所述的发酵培养基可以是(以下%为重量体积比)：

葡萄糖 1~5%、酵母膏 0.5~5%、 KH_2PO_4 0.01~0.1%、 MgSO_4 0.01~0.1%、上述多肽粉 0.5~5%，其余为水；

优选为，

葡萄糖 2.8%、酵母膏 1%、 KH_2PO_4 0.02%、 MgSO_4 0.01%、上述多肽粉 1%，其余为水；

或者

葡萄糖 2.8%、酵母膏 1%、 KH_2PO_4 0.02%、 MgSO_4 0.01%、多肽粉 203 1%，其余为水；

葡萄糖 2.8%、酵母膏 1%、 KH_2PO_4 0.02%、 MgSO_4 0.01%、多肽粉 305 1%，其余为水；

葡萄糖 2.8%、酵母膏 1%、 KH_2PO_4 0.02%、 MgSO_4 0.01%、多肽粉 702 1%，其余为水；

葡萄糖 2.8%、酵母膏 1%、 KH_2PO_4 0.02%、 MgSO_4 0.01%、多肽粉 705 1%，其余为水；

葡萄糖 2.8%、酵母膏 1%、 KH_2PO_4 0.02%、 MgSO_4 0.01%、多肽粉 607 1%，其余为水。

本发明所述的冬虫夏草发酵组合物是指经中国被毛孢斜面培养、种瓶/摇瓶培养、发酵培养所获得的菌丝体、湿菌片、菌丝体的干燥菌粉、或者菌丝体与发酵滤液的干燥菌粉，优选菌丝体干燥菌粉、菌丝体与发酵滤液的干燥菌粉。所述的发酵滤液包括经溶媒分离和色层柱分离（含膜分离）得到的发酵滤液、或其有效部位、有效成分、或各种代谢产物。

本发明通过优化发酵工艺，所得到的冬虫夏草发酵组合物冬虫夏草发酵组合物，菌丝体和代谢产物的量均有明显提高，其中，赤藓醇的含量在 1%以上（重量百分比），优选 1-6%（重量百分比），进一步优选 1.5-5%（重量百分比），1.5-4%（重量百分比），2-5%（重量百分比），再进一步优选 2.5-4%（重量百分比）。

本发明意外地发现，冬虫夏草发酵组合物中 1%以上（重量百分比），优选 1-6%（重量百分比），进一步优选 1.5-5%（重量百分比），1.5-4%（重量百分比），进一步优选 2-5%（重量百分比），再进一步优选 2.5-4%（重量百分比）赤藓醇的存在，不仅是首个具有稳定赤藓醇含量的冬虫夏草发酵产品，而且增强了腺苷的作用，发明人意外发现，赤藓醇与腺苷的组合表现出明显的羟自由基清除率协同效果。

即，本发明在保证所获得的冬虫夏草发酵组合物的赤藓醇在 1%以上（重量百分比），优选 1-6%（重量百分比），进一步优选 1.5-5%（重量百分比），1.5-4%（重量百分比），进一步优选 2-5%（重量百分比），再进一步优选 2.5-4%（重量百分比）足量稳定存在的同时，尤其优选腺苷含量在 0.02%以上（重量百分比），0.03%以上（重量百分比），优选腺苷含量在 0.03%以上（重量百分比），优选 0.03-1.00%（重量百分比）、优选 0.03-0.80%（重量百分比）、优选 0.03-0.60%（重量百分比）、优选 0.03-0.40%（重量百分比）、优选 0.03-0.20%（重量百分比）、优选 0.03-0.10%（重量百分比）、优选 0.03-0.08%（重量百分比）。

进一步地，由于既往研究表明腺苷可能从三磷酸腺苷、二磷酸腺苷、单磷酸腺苷得到转化，但是三磷酸腺苷、二磷酸腺苷、单磷酸腺苷为代表的核苷类物质同样也具有重要的生理活性作用，如钱佳等（5'-酸腺苷（5'-AMP）体外抗氧化作用的研究，食品与机械，第 24 卷第 1 期 2008 年 1 月）表明，AMP 具有较强的清除羟基自由基的活性，因此，在保障赤藓醇与腺苷的稳定存在具有协同技术效果的基础上，本发明对腺苷的转化量进行了一定程度的控制，使冬虫夏草发酵组合物整体表现出更优异的技术效果。既往如陈家明等（不同碳源、氮源对中国被毛孢固体发酵工艺的影响，中国食用菌 2017，37 (1):55~60）研究表明，不同碳源、氮源对中国被毛孢 (*Hirsutella sinensis*) 固体发酵工艺的影响，通过固体发酵方法获得的腺苷最高仅为配方 G7 中的 $63.76 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ，而张萍等（虫草发酵类产品质量评价与控制研究进展，中国药学杂志 2021 年 7 月第 56 卷第 14 期）记载表明中国被毛孢液体发酵培养条件进行优化，优化后的中国被毛孢菌丝体干重提高了 36.2%，腺苷含量提高了 46.8%。发酵过程中氨基氮是菌体生长的最主要的限制性基质，因

此液化的过程中得到氨基氮对于提升虫草产量和原材料的有效利用很重要 (CN103444434A), 但是也有研究表明在碳源和氮源浓度低的情况下, 菌体的生长速率最快, 随着碳氮源浓度的增加, 菌体的生长速率降低, 表明较高的碳源和氮源浓度不利于菌体的生长 (CN103430777A)。

- 5 本发明意外发现, 腺苷的含量并不是越高越好, 本发明的冬虫夏草发酵组合物在赤藓醇含量 1% 以上的基础上, 优选腺苷含量 0.02% 以上 (重量百分比), 0.03% 以上 (重量百分比), 优选 0.03-1.00% (重量百分比)、优选 0.03-0.80% (重量百分比)、优选 0.03-0.60% (重量百分比)、优选 0.03-0.40% (重量百分比)、优选 0.03-0.20% (重量百分比)、优选 0.03-0.10% (重量百分比)、优选 0.03-0.08% (重量百分比)。
- 10 更具体而言, 本发明在赤藓醇含量 1% 以上的基础上, 优选腺苷含量 0.02% 以上 (重量百分比); 或者,
 更具体而言, 本发明在赤藓醇含量 1~6% 的基础上, 优选腺苷含量 0.02%-1.00% (重量百分比); 或者,
 更具体而言, 本发明在赤藓醇含量 1-6% 的基础上, 优选腺苷含量 0.03%-0.80%
15 (重量百分比); 或者,
 更具体而言, 本发明在赤藓醇含量 1.5-5% (重量百分比) 的基础上, 优选腺苷含量 0.02%-1.00% (重量百分比); 或者,
 更具体而言, 本发明在赤藓醇含量 1.5-4% (重量百分比) 的基础上, 优选腺苷含量 0.02%-1.00% (重量百分比); 或者,
20 更具体而言, 本发明在赤藓醇含量 2-5% 的基础上, 优选腺苷含量 0.02%-1.00% (重量百分比); 或者,
 更具体而言, 本发明在赤藓醇含量 2-5% 的基础上, 优选腺苷含量 0.03%-0.80% 以上 (重量百分比); 或者,
 更具体而言, 本发明在赤藓醇含量 2.5-4% 以上的基础上, 优选腺苷含量
25 0.02%-1.00% (重量百分比)。
 更具体而言, 本发明在赤藓醇含量 2.5-4% 以上的基础上, 优选腺苷含量 0.03%-0.80% (重量百分比)。
- 本领域技术人员会理解, 上述所列举仅是对本发明的说明, 而非解释为限制本申请。由于对赤藓醇和腺苷含量的研究, 所述范围内所获得的发酵组合物具有
30 非常优异的抗氧化作用, 尤其是羟自由基清除率的协同技术效果。
 因此, 本发明还在于提供的冬虫夏草发酵组合物, 所述的发酵组合物中还包
 括甘露醇、多糖、氨基酸中的一种或多种。
 进一步地, 所述冬虫夏草发酵组合物, 其甘露醇含量在 4% 以上 (重量百分比),
 优选 5% 以上 (重量百分比), 优选 6% 以上 (重量百分比), 优选 7% 以上 (重量百
35 分比)。

更具体而言，本发明在赤藓醇含量 1% 以上的基础上，优选甘露醇含量在 4% 以上（重量百分比）；或者，

更具体而言，本发明在赤藓醇含量 1% 的基础上，优选甘露醇含量在 5% 以上（重量百分比）；或者，

5 更具体而言，本发明在赤藓醇含量 1% 的基础上，优选甘露醇含量在 6% 以上（重量百分比）；或者，

更具体而言，本发明在赤藓醇含量 1% 的基础上，优选甘露醇含量在 7% 以上（重量百分比）；或者，

10 更具体而言，本发明在赤藓醇含量 1~6% 的基础上，优选甘露醇含量在 4% 以上（重量百分比）；或者，

更具体而言，本发明在赤藓醇含量 1~6% 的基础上，优选甘露醇含量在 5% 以上（重量百分比）；或者，

更具体而言，本发明在赤藓醇含量 1-6% 的基础上，优选甘露醇含量在 6% 以上（重量百分比）；或者，

15 更具体而言，本发明在赤藓醇含量 1-6% 的基础上，优选甘露醇含量在 7% 以上（重量百分比）；或者，

更具体而言，本发明在赤藓醇含量 1.5-5% 的基础上，优选甘露醇含量在 4% 以上（重量百分比）；或者，

20 更具体而言，本发明在赤藓醇含量 1.5-5% 的基础上，优选甘露醇含量在 5% 以上（重量百分比）；或者，

更具体而言，本发明在赤藓醇含量 1.5-5% 的基础上，优选甘露醇含量在 6% 以上（重量百分比）；或者，

更具体而言，本发明在赤藓醇含量 1.5-5% 的基础上，优选甘露醇含量在 7% 以上（重量百分比）；或者，

25 更具体而言，本发明在赤藓醇含量 2-4% 的基础上，优选甘露醇含量在 4% 以上（重量百分比）；或者，

更具体而言，本发明在赤藓醇含量 2-4% 的基础上，优选甘露醇含量在 5% 以上（重量百分比）；或者，

30 更具体而言，本发明在赤藓醇含量 2-4% 的基础上，优选甘露醇含量在 6% 以上（重量百分比）；或者，

更具体而言，本发明在赤藓醇含量 2-4% 的基础上，优选甘露醇含量在 7% 以上（重量百分比）；或者，

更具体而言，本发明在赤藓醇含量 2.5-4% 的基础上，优选甘露醇含量在 4% 以上（重量百分比）；或者，

35 更具体而言，本发明在赤藓醇含量 2.5-4% 的基础上，优选甘露醇含量在 5% 以

上（重量百分比）；或者，

更具体而言，本发明在赤藓醇含量 2.5-4%的基础上，优选甘露醇含量在 6%以上（重量百分比）；或者，

更具体而言，本发明在赤藓醇含量 2.5-4%的基础上，优选甘露醇含量在 7%以上（重量百分比）。5

进一步地，所述冬虫夏草发酵组合物，其多糖含量 2%以上（重量百分比），优选 3%以上（重量百分比）、优选 4%以上（重量百分比）、优选 2-10%（重量百分比）。10

进一步地，总氨基酸的含量在 20%以上（重量百分比），优选为 25-50%（重量百分比）。10

本领域技术人员会理解，上述所列举仅是对本发明的说明，而非解释为限制本发明。由于对赤藓醇、腺苷含量、甘露醇、多糖的研究，所述范围内所获得的发酵组合物具有非常优异的技术效果。

本发明另一方面，还在于提供的冬虫夏草发酵组合物，赤藓醇的含量在 1%以上（重量百分比），优选 1-6%（重量百分比），进一步优选 1.5-5%（重量百分比），1.5-4%（重量百分比），进一步优选 2-5%（重量百分比），再进一步优选 2.5-4%（重量百分比），腺苷含量在 0.02%以上（重量百分比），甘露醇含量在 4%以上（重量百分比）。15

进一步地，本发明的冬虫夏草发酵组合物，赤藓醇的含量在 1%以上（重量百分比），优选 1-6%（重量百分比），进一步优选 1.5-5%（重量百分比），1.5-4%（重量百分比），进一步优选 2-5%（重量百分比），再进一步优选 2.5-4%（重量百分比），腺苷含量在 0.02%以上（重量百分比），甘露醇含量在 4%以上（重量百分比），多糖含量 2%以上（重量百分比）。20

进一步地，本发明的冬虫夏草发酵组合物，赤藓醇的含量在 1%以上（重量百分比），优选 1-6%（重量百分比），进一步优选 1.5-5%（重量百分比），1.5-4%（重量百分比），进一步优选 2-5%（重量百分比），再进一步优选 2.5-4%（重量百分比），腺苷含量在 0.02%以上（重量百分比），甘露醇含量在 4%以上（重量百分比），总氨基酸的含量在 20%以上（重量百分比），优选为 25-50%（重量百分比）。25

进一步地，本发明的冬虫夏草发酵组合物，赤藓醇的含量在 1%以上（重量百分比），优选 1-6%（重量百分比），进一步优选 1.5-5%（重量百分比），1.5-4%（重量百分比），进一步优选 2-5%（重量百分比），再进一步优选 2.5-4%（重量百分比），腺苷含量在 0.02%以上（重量百分比），甘露醇含量在 4%以上（重量百分比），多糖含量 2%以上（重量百分比），总氨基酸的含量在 20%以上（重量百分比），优选为 25-50%（重量百分比）。30

更具体而言，本发明冬虫夏草发酵组合物在赤藓醇的含量在 1%以上（重量百35

分比), 优选 1-6% (重量百分比), 进一步优选 1.5-5% (重量百分比), 1.5-4% (重量百分比), 进一步优选 2-5% (重量百分比), 再进一步优选 2.5-4% (重量百分比), 优选腺苷含量在 0.02% 以上 (重量百分比), 甘露醇含量在 5% 以上 (重量百分比); 或者,

- 5 更具体而言, 本发明冬虫夏草发酵组合物在赤藓醇的含量在 1% 以上 (重量百分比), 优选 1-6% (重量百分比), 进一步优选 1.5-5% (重量百分比), 1.5-4% (重量百分比), 进一步优选 2-5% (重量百分比), 再进一步优选 2.5-4% (重量百分比), 优选腺苷含量在 0.03% 以上 (重量百分比), 甘露醇含量在 5% 以上 (重量百分比); 或者,
- 10 更具体而言, 本发明冬虫夏草发酵组合物在赤藓醇的含量在 1% 以上 (重量百分比), 优选 1-6% (重量百分比), 进一步优选 1.5-5% (重量百分比), 1.5-4% (重量百分比), 进一步优选 2-5% (重量百分比), 再进一步优选 2.5-4% (重量百分比), 优选腺苷含量在 0.02% 以上 (重量百分比), 甘露醇含量在 5% 以上 (重量百分比), 多糖含量在 2% 以上 (重量百分比); 或者,
- 15 更具体而言, 本发明冬虫夏草发酵组合物在赤藓醇的含量在 1% 以上 (重量百分比), 优选 1-6% (重量百分比), 进一步优选 1.5-5% (重量百分比), 1.5-4% (重量百分比), 进一步优选 2-5% (重量百分比), 再进一步优选 2.5-4% (重量百分比), 优选腺苷含量在 0.02% 以上 (重量百分比), 甘露醇含量在 5% 以上 (重量百分比), 总氨基酸的含量在 20% 以上 (重量百分比); 或者,
- 20 更具体而言, 本发明冬虫夏草发酵组合物在赤藓醇的含量在 1% 以上 (重量百分比), 优选 1-6% (重量百分比), 进一步优选 1.5-5% (重量百分比), 1.5-4% (重量百分比), 进一步优选 2-5% (重量百分比), 再进一步优选 2.5-4% (重量百分比), 优选腺苷含量在 0.02%-1.0% (重量百分比), 甘露醇含量在 5% 以上 (重量百分比); 或者,
- 25 更具体而言, 本发明冬虫夏草发酵组合物在赤藓醇的含量在 1% 以上 (重量百分比), 优选 1-6% (重量百分比), 进一步优选 1.5-5% (重量百分比), 1.5-4% (重量百分比), 进一步优选 2-5% (重量百分比), 再进一步优选 2.5-4% (重量百分比), 优选腺苷含量在 0.02%-1.0% (重量百分比), 甘露醇含量在 5% 以上 (重量百分比), 多糖含量在 2% 以上 (重量百分比); 或者,
- 30 更具体而言, 本发明冬虫夏草发酵组合物在赤藓醇的含量在 1% 以上 (重量百分比), 优选 1-6% (重量百分比), 进一步优选 1.5-5% (重量百分比), 1.5-4% (重量百分比), 进一步优选 2-5% (重量百分比), 再进一步优选 2.5-4% (重量百分比), 优选腺苷含量在 0.02%-1.0% (重量百分比), 甘露醇含量在 5% 以上 (重量百分比), 总氨基酸的含量在 20% 以上 (重量百分比); 或者,
- 35 更具体而言, 本发明冬虫夏草发酵组合物在赤藓醇的含量在 1% 以上 (重量百

分比), 优选 1-6% (重量百分比), 进一步优选 1.5-5% (重量百分比), 1.5-4% (重量百分比), 进一步优选 2-5% (重量百分比), 再进一步优选 2.5-4% (重量百分比), 优选腺苷含量在 0.02%-1.0% (重量百分比), 甘露醇含量在 5%以上 (重量百分比), 多糖含量在 2%以上 (重量百分比), 总氨基酸的含量在 20%以上 (重量百分比)。

5 本发明所述的冬虫夏草发酵组合物, 可直接制备成各种剂型, 包括粉剂、颗粒剂、片剂、丸剂、胶囊剂、或者混合所述部分并将混合物装入胶囊或将混合物制成片剂形式来获得单个制剂。也可以用可接受的载体制备成各种剂型, 就口服给药组合物 (例如片剂和胶囊剂) 而言, 术语“可接受的载体”包括这样的载体, 例如普通的赋形剂, 例如粘合剂, 例如糖浆、阿拉伯胶、明胶、山梨糖醇、黄蓍
10 胶、聚乙烯吡咯烷酮 (聚维酮)、甲基纤维素、乙基纤维素、羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素、蔗糖和淀粉; 填充剂和载体例如玉米淀粉、明胶、乳糖、蔗糖、微晶纤维素; 润滑剂例如硬脂酸镁、硬脂酸钠与其他硬脂酸盐、甘油硬脂酸酯、硬脂酸、硅酮液、滑石、蜡、油和胶体二氧化硅。也可以使用矫味剂, 例如薄荷、冬青油、樱桃调料等。可能需要加入着色剂, 以便区分剂型。片剂也可以借助本
15 领域熟知的方法加以包衣。片剂可以是压制或模制的, 可选地有一种或多种附属成分。压制片可以这样制备, 即在适合的机械中压制活性成分的自由流动形式, 例如粉末或颗粒, 可选地混合有一种或多种粘合剂、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、表面活性剂或分散剂。

综上所述, 本发明所述的冬虫夏草发酵组合物不仅是首个含有稳定含量赤藓
20 醇的冬虫夏草发酵产品, 而且, 由于对赤藓醇和腺苷含量的研究, 所述范围内所获得的发酵组合物具有非常优异的抗氧化作用, 使本发明的冬虫夏草发酵组合物在整体上表现出较现有技术更优异的技术效果。

本发明所述的药物组合物, 可直接制备成各种剂型, 包括粉剂、颗粒剂、片剂、丸剂、胶囊剂、或者混合所述部分并将混合物装入胶囊或将混合物制成片剂
25 形式来获得单个制剂。也可以用可接受的载体制备成各种剂型。

本发明所述的药物组合物具有优异的抗氧化作用, 具有协同技术效果。

本发明另外一方面通过冬虫夏草菌的筛选, 对冬虫夏草发酵及其有益成分组合的研究, 同时获得可产麦角硫因的冬虫夏草菌, 通过发酵获得含有麦角硫因的
30 发酵组合物, 即, 通过低温液体发酵技术实现冬虫夏草菌丝体或菌粉中麦角硫因得以足量稳定存在, 通过低温发酵工艺实现麦角硫因与腺苷等有效成分的合理存在, 不仅使发酵冬虫夏草的组合物更加稳定, 而且提供了发酵冬虫夏草菌粉新的利用方向。

具体而言, 本发明一方面通过冬虫夏草菌种的筛选, 发明人从天然冬虫夏草的菌中筛选出中国被毛孢(*Hirsutella sinensis*) 具有产赤藓醇的功能, 而且具有产麦
35 角硫因的功能, 另一方面, 发明人通过中国被毛孢发酵获得能够稳定存在的、含

有较高含量麦角硫因的发酵菌丝体或菌粉。本发明通过液体发酵培养首次获得具有天然冬虫夏草含量水平麦角硫因或高于天然冬虫夏草含量水平麦角硫因的发酵组合物，发挥冬虫夏草发酵组合物更广泛的功能。

- 中国被毛孢(*Hirsutella sinensis*)菌种是从青藏高原新鲜冬虫夏草中分离得到的
- 5 麦角菌科真菌—冬虫夏草[*Cordyceps sinensis*(Berk.)Sacc.]的无性世代，本发明所述的中国被毛孢可以为任意的中国被毛孢菌株，例如可以通过市售平台购买，也可以通过自主筛选分离获得，只要根据微生物分子遗传学等鉴定原则可鉴定为中国被毛孢(*Hirsutella sinensis*)，市售途径包括但不限于中国典型培养物保藏中心(CCTCC)或中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC)获得中国被毛孢
- 10 (*Hirsutella sinensis*)，例如从中国典型培养物保藏中心(CCTCC)获得的包括但不限于中国被毛孢(*Hirsutella sinensis*) CCTCC No: M 2011278，例如从中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC)获得的包括但不限于中华被毛孢(*Hirsutella sinensis*) CGMCC 3.14240 和中华被毛孢(*Hirsutella sinensis*) CGMCC3.14243，例如从中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC)购买的冬虫夏草(蝙蝠蛾被毛孢，中华被毛孢)
- 15 *Ophiocordyceps sinensis* 或冬虫夏草(蝙蝠蛾被毛孢，中华被毛孢) *Cordyceps sinensis* 标准菌株包括但不限于菌株编号为：CICC 14016、CICC 14017、CICC 14088、CICC 14089、CICC 14090、CICC 14094、CICC 14096、CICC 14091、CICC 14092、CICC 14093、CICC 14095、CICC 14097、CICC 14098、CICC 14099、CICC 14100、CICC 14101、CICC 14102、CICC 14103、CICC 14104、CICC 14105、CICC 14106、
- 20 CICC 14107、CICC 14108、CICC 14109、CICC 14110、CICC 14111、CICC 14112、CICC 14113、CICC 14114、CICC 14115、CICC 14117、CICC 14118、CICC 14119、CICC 14120、CICC 50002，例如从泰斯拓生物购买的冬虫夏草(蝙蝠蛾被毛孢，中华被毛孢) *Ophiocordyceps sinensis* 或冬虫夏草(蝙蝠蛾被毛孢，中华被毛孢) *Cordyceps sinensis* 或中华被毛孢(*Hirsutella sinensis*)包括不限于货号为 TS324838、
- 25 TS325049、TS325054、TS326189、TS326195、TS326196、TS326197、TS326198、TS326199、TS326200、TS326201、TS326202、TS326203、TS326204、TS326205、TS326206、TS326207、TS326210、TS326212、TS326213、TS326214、TS326408、TS326410、TS326412、TS342791、TS342792、TS342793、TS342794、TS342795、TS342796、TS342797、TS342798、TS342800、TS342809、TS361737、TS392986。
- 30 中国被毛孢的生长周期长于绝大多数真菌，一般生长于 14-20℃ 的环境中，属于中低温菌。在固体培养基上培养，直径可达 1.5 cm，菌落质地如皮胶，呈肉色、乳白色，在生长初期表面有气生菌丝，随着时间的延长，菌落表面会呈现光滑沟壑状，气生菌丝逐渐减少。在液体培养基中培养，菌丝体呈丝状或灰色球状，大小不一，随着培养会有褐色分泌至培养基中，菌丝球质地坚韧不松散，有弹性，
- 35 内中空。已知中国被毛孢经液体发酵培养所得菌丝体干燥后即发酵冬虫夏草菌粉，

可以获得多种活性物质,包括多糖、氨基酸、核苷类物质、甾醇类物质、甘露醇及微量金属等。其中标志性成分为腺苷、甘露醇、多糖、氨基酸等。发酵冬虫夏草菌粉具有增强免疫功能、抗纤维化、保护肾功能、抗肿瘤、抗炎等作用,对肾脏、肺脏、肝脏等脏器有保护作用。

- 5 本发明中的发酵是指将现有中国冬虫夏草无性世代菌种,即中国被毛孢经过斜面培养、种瓶/摇瓶培养、发酵培养的过程。

本发明所述的斜面培养是使中国被毛孢在固体培养基的倾斜表面上生长,将中国被毛孢接种涂布于斜面上,在低温条件下,例如 8~18℃条件下培养 20~60 天,优选 10~16℃条件下培养 30~50 天,其中斜面培养基主要原料为葡萄糖、土豆汁(粉)、玉米粉、琼脂(粉)、酵母膏(粉)、麦麸(皮)、蚕蛹粉、蛋白胨、
10 NaCl、MgCl₂(氯化镁或其水合物)、MgSO₄(硫酸镁或其水合物)、KCl、CaCl₂(氯化钙或其水合物)、KH₂PO₄(磷酸二氢钾或其水合物)中的一种或多种;例如,所述的斜面培养基可以是(以下%为重量体积比 g/100 mL):

- 蛋白胨 0.05~2.0%、酵母膏 0.05~2.0%、葡萄糖 1.0~5.0%、琼脂 1.0~3.0%、
15 麦麸 2.0~10%、KH₂PO₄ 0.02~0.2%、MgSO₄ 0.01~0.1%,其余为水;

或

蚕蛹粉 1.0~2.0%,玉米粉 1.0~2.0%,葡萄糖 2.0~5.0%,MgSO₄ 0.01~0.1%,
KH₂PO₄ 0.01~0.1%,麦片 1.0~3.0g/60 mL,琼脂粉 0.5-1%,其余为水;

或

- 20 蚕蛹粉 1.8%,玉米粉 1.5%,葡萄糖 2.0%,MgSO₄ 0.01%,KH₂PO₄ 0.02%,
麦片 1.0~3.0g/60 mL,琼脂粉 0.65%,其余为水;

或

蛋白胨 0.1%、酵母膏 0.1%、葡萄糖 2.0%、KH₂PO₄ 0.1%、MgSO₄ 0.05%、琼
脂 1.0~2.0%、麦麸 5.0%,加水煮沸 30 分钟,分装;

- 25 或

蛋白胨 0.5~2.0%、蚕豆粉 2.0~5.0%、玉米粉 1.0~4.0%、葡萄糖 2.0~5.0%、
琼脂 0.5~2.0%、麸皮 0.5~4%、KH₂PO₄ 0.01~1.0%,MgSO₄ 0.01~1.0%、其余为
水;

或

- 30 葡萄糖 2.0%、玉米粉 1.0%、土豆汁 0.5%、糊精 0.5%、酵母粉 0.5%、麸皮 1.0%、
蚕蛹粉 2.0%、蛋白胨 1.0%、MgSO₄ 0.05%、KH₂PO₄ 0.05%、琼脂粉 1.0%,溶剂为
水;

或

- 蚕蛹粉 2.0~3.0%、玉米粉 1.5%、麸皮 1.0~5.0%、葡萄糖 2.0%、琼脂 1.8%、
35 KH₂PO₄ 0.02%、MgSO₄ 0.01%,其余为水;

本领域技术人员会理解，上述所列举的具体斜面培养基仅是对本发明的说明，而非解释为限制本发明，同时，本领域技术人员会理解，其可以包括其他常用的中国被毛孢发酵用斜面培养基，或者现有技术已知的中国被毛孢发酵用斜面培养基。

- 5 本发明中的摇瓶/种瓶培养菌种从斜面接种到种瓶后，振荡培养，或将试管菌种接入已杀（灭）菌冷却的三角瓶培养液中，置于摇床上振荡培养，例如，种量为 2~6 支斜面，优选 2~3 支斜面，培养温度 10~18℃，优选培养温度 12~16℃，培养时间 8~16 天，优选培养时间 9~14 天。在大规模生产时，摇瓶培养的菌丝体可接入种子罐作为菌种。在摇瓶液体培养中，要求菌丝生长快、得率高，形成的
- 10 菌球小，如果菌球越大，菌球中心的菌丝体会呈现缺氧及营养的饥饿状态，不利菌丝增殖及次生代谢产物的产生，影响发酵质量及菌丝产量。其中种瓶/摇瓶培养基主要原料为蛋白胨、鱼胨、牛肉膏、蚕蛹粉、葡萄糖、玉米粉、糊精、酵母膏（粉）、麦麸（皮）、NaCl、MgCl₂（氯化镁或其水合物）、MgSO₄（硫酸镁或其水合物）、KCl、CaCl₂（氯化钙或其水合物）、KH₂PO₄（磷酸二氢钾或其水合物）中
- 15 的一种或多种；例如，所述的摇瓶/种瓶培养基可以是（以下%为重量体积比 g/100mL）：
蚕蛹粉 2.0~3.0%，玉米粉 2.0~3.0%，麸皮 2.0~3.0%，鱼胨 0.1~0.5%，蛋白胨 0.1~1%，KH₂PO₄ 0.01%~0.1%，葡萄糖 2.0~5.0%，MgSO₄ 0.01%~0.1%，其余为水；
- 20 或
蚕蛹粉 2.0~3.0%、玉米粉 1.5%、麸皮 1.0~5.0%、葡萄糖 2.0%、KH₂PO₄ 0.02%、MgSO₄ 0.01%，其余为水；
或
蚕蛹粉 2.0%，玉米粉 2.5%，麸皮 2.5%，鱼胨 0.25%，蛋白胨 0.75%，KH₂PO₄
- 25 0.02%，葡萄糖 3.0%，MgSO₄ 0.01%，其余为水；
或
葡萄糖 2.0%、玉米粉 1.0%、糊精 0.5%、酵母粉 0.5%、麸皮 1.0%、蚕蛹粉 2.0%、蛋白胨 1.0%、MgSO₄ 0.05%、KH₂PO₄ 0.05%、溶剂为水；
或
- 30 蛋白胨 5.0%、葡萄糖 2.0%、KH₂PO₄ 0.1%、MgSO₄ 0.05%、麦麸 5.0%，溶剂为水；
或
鱼胨 0.5%、蛋白胨 0.5%、葡萄糖 2.0%、KH₂PO₄ 0.1%、MgSO₄ 0.05%、麦麸 5%，其余为水；
- 35 或

葡萄糖 2.0~4.5%、牛肉膏 2.0~4.5%、土豆粉 1.0~2.5%、蛋白胨 1.0~2.5%、
 KH_2PO_4 0.02~0.25%、 MgSO_4 0.01~0.05%、菊粉 0.2~1.5%、维生素 B1 0.05~
 0.15%、醋酸锌 0.01~0.06%，其余为水；

本领域技术人员会理解，上述所列举的具体摇瓶/种瓶培养基仅是对本发明的
 说明，而非解释为限制本发明，同时，本领域技术人员会理解，其可以包括其他
 常用的中国被毛孢发酵用摇瓶/种瓶培养基，或者现有技术已知的中国被毛孢发酵
 用摇瓶/种瓶培养基。

本发明中的发酵培养是指用于微生物积累大量代谢产物的培养基。本发明所
 述的发酵包括使用发酵培养基，深层发酵是指纯种微生物细胞在液体深层培养基
 中进行需氧或厌氧培养的方法，深层发酵一般是在大型发酵罐中进行，可以自动
 化、机械化生产。中国被毛孢的发酵罐深层培养工艺流程可以是：一级种子罐→
 二级种子罐→发酵罐；也可以是：种子罐→发酵罐；亦可以采用连续发酵法。例
 如，培养温度为 10~18℃，优选培养温度为 12~16℃，培养时间 6~20 天，优选
 培养时间 7~15 天，优选培养时间 10~15 天。发酵培养基主要原料包括如下中的一
 种或多种：蚕蛹粉、葡萄糖、玉米粉（浆）、酵母浸出物（浸出膏或粉）、 NaCl 、
 MgCl_2 （氯化镁或其水合物）、 MgSO_4 （硫酸镁或其水合物）、 KCl 、 CaCl_2 （氯化钙
 或其水合物）、 KH_2PO_4 （磷酸二氢钾或其水合物）、多肽粉系列（如多肽粉 101、
 多肽粉 102、多肽粉 203、多肽粉 305、多肽粉 308、多肽粉 607、多肽粉 702、多
 肽粉 705）（所述多肽粉系列购自成都市文峰生物科技有限公司）。

本发明所述的发酵培养基包括使用新型微生物发酵用有机氮源，如多肽粉
 “1”系列，多肽粉“1”系列是以大米蛋白、玉米蛋白及其水解产物为主要原料。
 采用多种水解法分段水解的工艺，经分离、精制浓缩、干燥制成的粉状产品。多
 肽粉“1”系列包括多肽粉 101、多肽粉 102。多肽粉“2”系列，如多肽粉 203 是
 以玉米蛋白为主要原料，采用多种水解法分段水解的工艺（该工艺使产品拥有不同
 大小分子量，肽、肽分布合理，利于微生物的持续利用），经分离、精制浓缩、喷
 雾干燥制成的粉状产品。

本发明所述的发酵培养基包括使用新型微生物发酵用有机氮源的蛋白胨系列
 （非动物源性），如多肽粉 305、多肽粉 308、多肽粉 607，该蛋白胨系列是以玉米
 蛋白、酵母为主要原料。采用多种水解法分段水解的工艺（该工艺使产品拥有不同
 大小分子量，肽、肽分布合理，利于微生物的持续利用），经分离、精制浓缩、喷
 雾干燥制成的粉状产品。

本发明所述的发酵培养基包括使用新型微生物发酵用有机氮源的蛋白胨系列
 （非动物源性），如多肽粉 702、多肽粉 705，多肽粉“7”系列是以大米蛋白、玉
 米蛋白为主要原料。采用现代生物法与多种水解法分段水解的工艺（该工艺使产品
 拥有不同大小分子量，肽、肽分布合理，利于微生物的持续利用），经分离、精制

浓缩、喷雾干燥制成的粉状产品。

本发明所述的发酵培养基可以是（以下%为重量体积比）：

葡萄糖 1~5%、酵母膏 0.5~5%、 KH_2PO_4 0.01~0.1%、 MgSO_4 0.01~0.1%、上述多肽粉 0.5~5%，其余为水；

5 优选为，

葡萄糖 2.8%、酵母膏 1%、 KH_2PO_4 0.02%、 MgSO_4 0.01%、上述多肽粉 1%，其余为水；

或者

10 葡萄糖 2.8%、酵母膏 1%、 KH_2PO_4 0.02%、 MgSO_4 0.01%、多肽粉 203 1%，其余为水；

葡萄糖 2.8%、酵母膏 1%、 KH_2PO_4 0.02%、 MgSO_4 0.01%、多肽粉 305 1%，其余为水；

葡萄糖 2.8%、酵母膏 1%、 KH_2PO_4 0.02%、 MgSO_4 0.01%、多肽粉 702 1%，其余为水；

15 葡萄糖 2.8%、酵母膏 1%、 KH_2PO_4 0.02%、 MgSO_4 0.01%、多肽粉 705 1%，其余为水；

葡萄糖 2.8%、酵母膏 1%、 KH_2PO_4 0.02%、 MgSO_4 0.01%、多肽粉 607 1%，其余为水。

20 本发明所述的冬虫夏草发酵组合物是指经中国被毛孢斜面培养、种瓶/摇瓶培养、发酵培养所获得的菌丝体、湿菌片、菌丝体的干燥菌粉、或者菌丝体与发酵滤液的干燥菌粉，优选菌丝体干燥菌粉、菌丝体与发酵滤液的干燥菌粉。所述的发酵滤液包括经溶媒分离和色层柱分离（含膜分离）得到的发酵滤液、或其有效部位、有效成分、或各种代谢产物。

25 本发明通过优化发酵工艺，所得到的冬虫夏草发酵组合物，菌丝体和代谢产物的量均有明显提高，其中，麦角硫因的含量在 0.004%以上（重量百分比），优选 0.006%以上（重量百分比），优选 0.008%以上（重量百分比），优选 0.01%以上（重量百分比），优选 0.01-0.10%（重量百分比），优选 0.01-0.08%（重量百分比），或优选 0.02%以上（重量百分比），优选 0.02-0.10%（重量百分比），优选 0.02-0.08%（重量百分比）；腺苷的含量在 0.02%以上（重量百分比），0.03%以上（重量百分比），
30 比），优选 0.03-1.00%（重量百分比）、优选 0.03-0.80%（重量百分比）、优选 0.03-0.60%（重量百分比）、优选 0.03-0.40%（重量百分比）、优选 0.03-0.20%（重量百分比）、优选 0.03-0.10%（重量百分比）、优选 0.03-0.08%（重量百分比）；

35 麦角硫因与腺苷含量的比例为 1:1-1:20、优选 1:1-1:15、优选 1:1-1:10、优选 1:1-1:8、优选 1:1-1:7、优选 1:1-1:6、优选 1:1-1:5、优选 1:1-1:4、优选 1:1-1:3、优选 1:1-1:2。

进一步地,所述冬虫夏草发酵组合物,其赤藓醇含量在 1%以上(重量百分比),优选 1-6% (重量百分比),进一步优选 1.5-5% (重量百分比), 1.5-4% (重量百分比),进一步优选 2-5% (重量百分比),再进一步优选 2.5-4% (重量百分比);

进一步地,所述冬虫夏草发酵组合物,其甘露醇含量在 4%以上(重量百分比),
5 优选 5%以上 (重量百分比), 优选 6%以上 (重量百分比), 优选 7%以上 (重量百分比); 麦角硫因与甘露醇含量的比例为 1:1-1:1200、优选 1:1-1:1100、优选 1:1-1:1000、优选 1:1-1:900、优选 1:1-1:800、优选 1:1-1:700、优选 1:1-1:600、优选 1:1-1:500、优选 1:1-1:400、优选 1:1-1:300。

进一步地,所述冬虫夏草发酵组合物,其多糖含量 2%以上 (重量百分比),
10 优选 3%以上 (重量百分比)、优选 4%以上 (重量百分比)、优选 2-10% (重量百分比); 麦角硫因与多糖含量的比例为 1:1-1:500、优选 1:1-1:400、优选 1:1-1:300、优选 1:1-1:200、优选 1:1-1:100、优选 1:1-1:50。

进一步地,总氨基酸的含量在 20%以上 (重量百分比), 优选为 25-50% (重量百分比)。

15 本发明提供的冬虫夏草发酵组合物中含有的组分在上述优选范围内时,整体具有较优异的抗氧化、美白效果。

因此,本发明一方面在于通过低温发酵技术实现冬虫夏草菌丝体或菌粉中麦角硫因得以足量稳定存在,至少 0.004%以上 (重量百分比)。

麦角硫因(ergothioneine, EGT)在固态下是一种白色无味、无色结晶粉末。
20 而且在这种固态下,只有硫酮形式存在,麦角硫因易溶于水,在溶液中存在互变异构体(硫酮 thiol 和硫醇 thione 形式),但是麦角硫因的热稳定性非常高,其分解温度高达 262-265℃。麦角硫因不能由动物机体自身合成,只能从食物中摄取,属于稀有氨基酸,哺乳动物和人主要通过膳食获取,人体摄食麦角硫因后能被高度吸收,麦角硫因具有很强的抗氧化性,在机体细胞合成过程中发挥着独特的作用,
25 在预防糖尿病、肾脏疾病、组织纤维化、眼部疾病和癌症,抗紫外损伤、抗炎症、抗氧化、促进神经元分化,以及增强记忆力和学习能力等方面均有良好的作用,欧洲食品安全局和美国食品药品监督管理局均肯定了麦角硫因在新型功能食品中的重要地位,并且认可了通过发酵生产麦角硫因的安全性,甚至认为可以将麦角硫因添加到妊娠期妇女膳食和母婴食品中。麦角硫因的抗氧化性至少和四
30 种分子活性有关:直接清除活性氧;螯合各种二价金属阳离子;激活抗氧化酶,如谷胱甘肽过氧化物酶和锰超氧化物歧化酶,并抑制超级氧化激酶,如细胞色素 C 还原酶(NADPH);影响各种血红素蛋白的氧化作用,如血红素和肌红蛋白。

本发明意外发现,冬虫夏草发酵组合物中 0.004%以上 (重量百分比), 优选 0.006%以上 (重量百分比), 优选 0.008%以上 (重量百分比), 优选 0.01%以上 (重量百分比) 麦角硫因的存在,不仅是首个具有麦角硫因的冬虫夏草发酵产品,而

且极大地增强了腺苷的作用，本发明通过研究实验表明冬虫夏草发酵组合中麦角硫因有助于增强腺苷的抗氧化作用，使麦角硫因与腺苷产生协同的效果，而且通过腺苷含量范围的优化，发明人同时意外发现，所述的中国被毛孢发酵产品或发酵组合物整体表现出更优异的技术效果。

5 因此，本发明另一方面，在保证所获得的发酵冬虫夏草组合物的麦角硫因在 0.004%以上（重量百分比），优选 0.006%以上（重量百分比），优选 0.008%以上（重量百分比），优选 0.01%以上（重量百分比）足量稳定存在的同时，尤其优选腺苷含量在 0.02%以上（重量百分比），0.03%以上（重量百分比），优选 0.03-1.00%（重量百分比）、优选 0.03-0.80%（重量百分比）、优选 0.03-0.60%（重量百分比）、优选 0.03-0.40%（重量百分比）、优选 0.03-0.20%（重量百分比）、优选 0.03-0.10%（重量百分比）、优选 0.03-0.08%（重量百分比）；麦角硫因与腺苷含量的比例为 1:1-1:20、优选 1:1-1:15、优选 1:1-1:10、优选 1:1-1:8、优选 1:1-1:7、优选 1:1-1:6、优选 1:1-1:5、优选 1:1-1:4、优选 1:1-1:3、优选 1:1-1:2。

腺苷微溶于冷水，溶于常温水，易溶于热水，不溶于醇，有研究表明，如李赫宇等（虫草类产品中 5 种核苷类成分的测定及蛹虫草质量分析，中草药，2018(49)22: 5410-5417），说明鸟苷、尿苷和腺苷提取过程中可能存在转化，如三磷酸腺苷、二磷酸腺苷、单磷酸腺苷在用水或者水含量高的混合试剂超声提取过程中可转化成腺苷。以及，例如，钱正明等（冬虫夏草水提取过程中腺苷转化途径研究，世界中医药，2016(11)5:758-762），发现冬虫夏草室温水提取条件下单磷酸腺苷转化为腺苷，腺苷转化为肌苷，也发现在室温水提条件下还存在三磷酸腺苷和二磷酸腺苷向腺苷转化的结论，其中，ATP 高度溶于水，在 pH 值 6.8 和 7.4 之间的溶液中非常稳定，但在极端 pH 值下会迅速水解。腺苷在心血管疾病中具有活性，如冯艳红等（腺苷对大鼠离体心脏功能及心肌细胞凋亡的影响，山东医药 2013 年第 53 卷第 46 期）研究表明，SOD 是最重要的抗氧化酶，可有效清除机体内多余的自由基，腺苷组心肌组织中 SOD 活性指标优于缺血-再灌注组。

本发明意外地发现，冬虫夏草发酵组合物中 0.004%以上（重量百分比），优选 0.006%以上（重量百分比），优选 0.008%以上（重量百分比），优选 0.01%以上（重量百分比）麦角硫因的存在，不仅是首个具有麦角硫因的冬虫夏草发酵产品，而且增强了腺苷的作用，发明人意外发现，麦角硫因与腺苷的组合表现出明显的羟自由基清除率协同效果。即，本发明在保证所获得的冬虫夏草发酵组合物的麦角硫因在 0.004%以上（重量百分比），优选 0.006%以上（重量百分比），优选 0.008%以上（重量百分比），优选 0.01%以上（重量百分比）足量稳定存在的同时，尤其优选腺苷含量在 0.02%以上（重量百分比），0.03%以上（重量百分比），优选腺苷含量在 0.03%以上（重量百分比），优选 0.03-1.00%（重量百分比）、优选 0.03-0.80%（重量百分比）、优选 0.03-0.60%（重量百分比）、优选 0.03-0.40%（重量百分比）、

优选 0.03-0.20% (重量百分比)、优选 0.03-0.10% (重量百分比)、优选 0.03-0.08% (重量百分比); 麦角硫因与腺苷含量的比例为 1:1-1:20、优选 1:1-1:15、优选 1:1-1:10、优选 1:1-1:8、优选 1:1-1:7、优选 1:1-1:6、优选 1:1-1:5、优选 1:1-1:4、优选 1:1-1:3、优选 1:1-1:2。

- 5 进一步地, 由于既往研究表明腺苷可能从三磷酸腺苷、二磷酸腺苷、单磷酸腺苷得到转化, 但是三磷酸腺苷、二磷酸腺苷、单磷酸腺苷为代表的核苷类物质同样也具有重要的生理活性作用, 如钱佳等 (5'-酸腺苷 (5'-AMP) 体外抗氧化作用的研究, 食品与机械, 第 24 卷第 1 期 2008 年 1 月) 表明, AMP 具有较强的清除羟基自由基的活性, 因此, 在保障麦角硫因与腺苷的稳定存在具有协同技术效果的基础上, 本发明对腺苷的转化量进行了一定程度的控制, 使冬虫夏草发酵组合物整体表现出更优异的技术效果。既往如陈家明等 (不同碳源、氮源对中国被毛孢固体发酵工艺的影响, 中国食用菌 2017, 37 (1):55~60) 研究表明, 不同碳源、氮源对中国被毛孢 (*Hirsutella sinensis*) 固体发酵工艺的影响, 通过固体发酵方法获得的腺苷最高仅为配方 G7 中的 $63.76 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 而张萍等 (虫草发酵类产品质量评价与控制研究进展, 中国药学杂志 2021 年 7 月第 56 卷第 14 期) 记载表明中国被毛孢液体发酵培养条件进行优化, 优化后的中国被毛孢菌丝体干重提高了 36.2%, 腺苷含量提高了 46.8%。发酵过程中氨基氮是菌体生长的最主要的限制性基质, 因此液化的过程中得到氨基氮对于提升虫草产量和原材料的有效利用很重要 (CN103444434A), 但是也有研究表明在碳源和氮源浓度低的情况下, 菌体的生长速率最快, 随着碳氮源浓度的增加, 菌体的生长速率降低, 表明较高的碳源和氮源浓度不利于菌体的生长 (CN103430777A)。
- 10
15
20

- 本发明意外发现, 腺苷的含量并不是越高越好, 本发明的冬虫夏草发酵组合物在麦角硫因含量 0.004% 以上的基础上, 优选腺苷含量 0.02% 以上 (重量百分比), 0.03% 以上 (重量百分比), 优选 0.03-1.00% (重量百分比)、优选 0.03-0.80% (重量百分比)、优选 0.03-0.60% (重量百分比)、优选 0.03-0.40% (重量百分比)、优选 0.03-0.20% (重量百分比)、优选 0.03-0.10% (重量百分比)、优选 0.03-0.08% (重量百分比); 麦角硫因与腺苷含量的比例为 1:1-1:20、优选 1:1-1:15、优选 1:1-1:10、优选 1:1-1:8、优选 1:1-1:7、优选 1:1-1:6、优选 1:1-1:5、优选 1:1-1:4、优选 1:1-1:3、优选 1:1-1:2。在本发明中, 腺苷以及麦角硫因的含量在上述优选范围内时, 能够使得冬虫夏草发酵组合物整体具有优异的抗氧化作用, 很好的满足应用要求。
- 25
30

更具体而言, 本发明在麦角硫因含量 0.01% 以上的基础上, 优选腺苷含量 0.02% 以上 (重量百分比), 麦角硫因与腺苷含量的比例为 1:1-1:20; 或者,

更具体而言, 本发明在麦角硫因含量 0.01% 以上的基础上, 优选腺苷含量 0.02% 以上 (重量百分比), 麦角硫因与腺苷含量的比例为 1:1-1:15; 或者,

- 35 更具体而言, 本发明在麦角硫因含量 0.01% 以上的基础上, 优选腺苷含量 0.02%

以上(重量百分比), 麦角硫因与腺苷含量的比例为 1:1-1:10; 或者,

更具体而言,本发明在麦角硫因含量0.01%以上的基础上,优选腺苷含量0.02%以上(重量百分比),麦角硫因与腺苷含量的比例为1:1-1.8;或者,

5 更具体而言,本发明在麦角硫因含量0.01%以上的基础上,优选腺苷含量0.02%以上(重量百分比),麦角硫因与腺苷含量的比例为1:1-1:7;或者,

更具体而言,本发明在麦角硫因含量0.01%以上的基础上,优选腺苷含量0.02%以上(重量百分比),麦角硫因与腺苷含量的比例为1:1-1:6;或者,

更具体而言,本发明在麦角硫因含量0.01%以上的基础上,优选腺苷含量0.02%以上(重量百分比),麦角硫因与腺苷含量的比例为1:1-1.5;或者,

10 更具体而言,本发明在麦角硫因含量0.01%以上的基础上,优选腺苷含量0.02%以上(重量百分比),麦角硫因与腺苷含量的比例为1:1-1:4;或者,

更具体而言,本发明在麦角硫因含量0.01%以上的基础上,优选腺苷含量0.02%以上(重量百分比),麦角硫因与腺苷含量的比例为1:1-1.3;或者,

15 更具体而言,本发明在麦角硫因含量0.01%以上的基础上,优选腺苷含量0.02%以上(重量百分比),麦角硫因与腺苷含量的比例为1:1-1:2;或者,

更具体而言，本发明在麦角硫因含量 0.01% 以上的基础上，优选腺苷含量 0.03%-0.08%（重量百分比），麦角硫因与腺苷含量的比例为 1:1-1:20；或者，

更具体而言，本发明在麦角硫因含量 0.01% 以上的基础上，优选腺苷含量 0.03%-0.08%（重量百分比），麦角硫因与腺苷含量的比例为 1:1-1:15；或者，

20 更具体而言, 本发明在麦角硫因含量 0.01% 以上的基础上, 优选腺苷含量 0.03%-0.08% (重量百分比), 麦角硫因与腺苷含量的比例为 1:1-1:10; 或者,

更具体而言，本发明在麦角硫因含量 0.01% 以上的基础上，优选腺苷含量 0.03%-0.08%（重量百分比），麦角硫因与腺苷含量的比例为 1:1-1:8；或者，

更具体而言，本发明在麦角硫因含量 0.01% 以上的基础上，优选腺苷含量 0.03%-0.08%（重量百分比），麦角硫因与腺苷含量的比例为 1:1-1:7；或者，

更具体而言，本发明在麦角硫因含量 0.01% 以上的基础上，优选腺苷含量 0.03%-0.08%（重量百分比），麦角硫因与腺苷含量的比例为 1:1-1:6；或者，

更具体而言，本发明在麦角硫因含量 0.01% 以上的基础上，优选腺苷含量 0.03%-0.08%（重量百分比），麦角硫因与腺苷含量的比例为 1:1-1:5；或者，

30 更具体而言, 本发明在麦角硫因含量 0.01% 以上的基础上, 优选腺苷含量 0.03%-0.08% (重量百分比), 麦角硫因与腺苷含量的比例为 1:1-1:4; 或者,

更具体而言，本发明在麦角硫因含量 0.01% 以上的基础上，优选腺苷含量 0.03%-0.08%（重量百分比），麦角硫因与腺苷含量的比例为 1:1-1:3；或者，

更具体而言，本发明在麦角硫因含量 0.01% 以上的基础上，优选腺苷含量 0.03%-0.08%（重量百分比），麦角硫因与腺苷含量的比例为 1:1-1.2；或者，

更具体而言,本发明在麦角硫因含量0.02%以上的基础上,优选腺苷含量0.02%以上(重量百分比),麦角硫因与腺苷含量的比例为1:1-1:20;或者,

更具体而言,本发明在麦角硫因含量0.02%以上的基础上,优选腺苷含量0.02%以上(重量百分比),麦角硫因与腺苷含量的比例为1:1-1:15;或者,

5 更具体而言,本发明在麦角硫因含量0.02%以上的基础上,优选腺苷含量0.02%以上(重量百分比),麦角硫因与腺苷含量的比例为1:1-1:10;或者,

更具体而言,本发明在麦角硫因含量0.02%以上的基础上,优选腺苷含量0.02%以上(重量百分比),麦角硫因与腺苷含量的比例为1:1-1:8;或者,

10 更具体而言,本发明在麦角硫因含量0.02%以上的基础上,优选腺苷含量0.02%以上(重量百分比),麦角硫因与腺苷含量的比例为1:1-1:7;或者,

更具体而言,本发明在麦角硫因含量0.02%以上的基础上,优选腺苷含量0.02%以上(重量百分比),麦角硫因与腺苷含量的比例为1:1-1:6;或者,

更具体而言,本发明在麦角硫因含量0.02%以上的基础上,优选腺苷含量0.02%以上(重量百分比),麦角硫因与腺苷含量的比例为1:1-1:5;或者,

15 更具体而言,本发明在麦角硫因含量0.02%以上的基础上,优选腺苷含量0.02%以上(重量百分比),麦角硫因与腺苷含量的比例为1:1-1:4;或者,

更具体而言,本发明在麦角硫因含量0.02%以上的基础上,优选腺苷含量0.02%以上(重量百分比),麦角硫因与腺苷含量的比例为1:1-1:3;或者,

20 更具体而言,本发明在麦角硫因含量0.02%以上的基础上,优选腺苷含量0.02%以上(重量百分比),麦角硫因与腺苷含量的比例为1:1-1:2;或者,

更具体而言,本发明在麦角硫因含量0.02%以上的基础上,优选腺苷含量0.03%-0.08%(重量百分比),麦角硫因与腺苷含量的比例为1:1-1:20;或者,

更具体而言,本发明在麦角硫因含量0.02%以上的基础上,优选腺苷含量0.03%-0.08%(重量百分比),麦角硫因与腺苷含量的比例为1:1-1:15;或者,

25 更具体而言,本发明在麦角硫因含量0.02%以上的基础上,优选腺苷含量0.03%-0.08%(重量百分比),麦角硫因与腺苷含量的比例为1:1-1:10;或者,

更具体而言,本发明在麦角硫因含量0.02%以上的基础上,优选腺苷含量0.03%-0.08%(重量百分比),麦角硫因与腺苷含量的比例为1:1-1:8;或者,

30 更具体而言,本发明在麦角硫因含量0.02%以上的基础上,优选腺苷含量0.03%-0.08%(重量百分比),麦角硫因与腺苷含量的比例为1:1-1:7;或者,

更具体而言,本发明在麦角硫因含量0.02%以上的基础上,优选腺苷含量0.03%-0.08%(重量百分比),麦角硫因与腺苷含量的比例为1:1-1:6;或者,

更具体而言,本发明在麦角硫因含量0.02%以上的基础上,优选腺苷含量0.03%-0.08%(重量百分比),麦角硫因与腺苷含量的比例为1:1-1:5;或者,

35 更具体而言,本发明在麦角硫因含量0.02%以上的基础上,优选腺苷含量

0.03%-0.08%（重量百分比），麦角硫因与腺苷含量的比例为 1:1-1:4；或者，

更具体而言，本发明在麦角硫因含量 0.02%以上的基础上，优选腺苷含量 0.03%-0.08%（重量百分比），麦角硫因与腺苷含量的比例为 1:1-1:3；或者，

更具体而言，本发明在麦角硫因含量 0.02%以上的基础上，优选腺苷含量
5 0.03%-0.08%（重量百分比），麦角硫因与腺苷含量的比例为 1:1-1:2。

本领域技术人员会理解，上述所列举仅是对本发明的说明，而非解释为限制本申请。由于对麦角硫因和腺苷含量的研究，所述范围内所获得的发酵组合物具有非常优异的抗氧化作用，尤其是羟自由基清除率的协同技术效果。

本发明另一方面，结合麦角硫因的含量、腺苷存在的转化行为，在麦角硫因、
10 赤藓醇、腺苷含量的基础上，进一步研究菌丝体干重的得率等，即，发明人在保证麦角硫因、赤藓醇、腺苷含量的基础上，进一步通过发酵工艺的优化，获得了菌丝体得率较高的冬虫夏草发酵组合物，菌丝体发酵得率在 7 g/L 以上，优选 7g/L-15 g/L、7 g/L-20 g/L、8 g/L-15 g/L、8 g/L-20 g/L，菌丝体干重含水量 8%以下，优选含水量 7%以下、优选含水量 6%以下。

更具体而言，本发明冬虫夏草发酵组合物在麦角硫因含量 0.01%以上的基础上，
15 优选腺苷含量 0.02%以上（重量百分比），麦角硫因与腺苷含量的比例为 1:1-1:20，且菌丝体干重含水量 7%以下；或者，

更具体而言，本发明冬虫夏草发酵组合物在麦角硫因含量 0.01%以上的基础上，
20 优选腺苷含量 0.02%以上（重量百分比），麦角硫因与腺苷含量的比例为 1:1-1:20，且菌丝体发酵得率在 7 g/L 以上；或者，

更具体而言，本发明冬虫夏草发酵组合物在麦角硫因含量 0.01%以上的基础上，
优选腺苷含量 0.02%-0.2%（重量百分比），麦角硫因与腺苷含量的比例为 1:1-1:20，且菌丝体干重含水量 7%以下；或者，

更具体而言，本发明冬虫夏草发酵组合物在麦角硫因含量 0.01%以上的基础上，
25 优选腺苷含量 0.02%-0.2%（重量百分比），麦角硫因与腺苷含量的比例为 1:1-1:20，且菌丝体发酵得率在 7 g/L 以上。

进一步地，通过发明人深入的研究，在麦角硫因 0.004%以上（重量百分比），
优选 0.006%以上（重量百分比），优选 0.008%以上（重量百分比），优选 0.01%以上含量存在的基础上，本发明意外发现，冬虫夏草发酵组合物中 0.004%以上麦角
30 硫因的存在，不仅是首个具有麦角硫因的冬虫夏草发酵产品，而且极大地增强了其他有益成分的作用，本发明通过研究实验表明冬虫夏草发酵组合物中麦角硫因有助于增强腺苷等作用，并产生协同效果，尤其是在抗氧化效果方面，使冬虫夏草发酵组合物整体表现出更优异的技术效果。

因此，本发明另一方面，还在于提供的冬虫夏草发酵组合物，麦角硫因含量
35 在 0.004%以上（重量百分比），优选 0.006%以上（重量百分比），优选 0.008%以

上(重量百分比),优选0.01%以上(重量百分比),所述的发酵组合物中还包括腺苷、甘露醇、氨基酸、多糖、赤藓醇中的一种或多种。

进一步地,所述冬虫夏草发酵组合物,其赤藓醇的含量在1%以上(重量百分比),优选1-6%(重量百分比),进一步优选1.5-5%(重量百分比),1.5-4%(重量百分比),进一步优选2-5%(重量百分比),再进一步优选2.5-4%(重量百分比)。

进一步地,所述冬虫夏草发酵组合物,其甘露醇含量在4%以上(重量百分比),优选5%以上,优选6%以上,优选7%以上。

更具体而言,本发明冬虫夏草发酵组合物在麦角硫因含量0.01%以上的基础上,赤藓醇的含量在1%以上(重量百分比);或者,

更具体而言,本发明冬虫夏草发酵组合物在麦角硫因含量0.01%以上的基础上,赤藓醇的含量在1%以上(重量百分比)、腺苷含量0.02%(重量百分比)以上;或者,

更具体而言,本发明冬虫夏草发酵组合物在麦角硫因含量0.01%以上的基础上,赤藓醇的含量在1%以上(重量百分比)、腺苷含量0.02%(重量百分比)以上、甘露醇含量5%以上(重量百分比);或者,

更具体而言,本发明冬虫夏草发酵组合物在麦角硫因含量0.01%以上的基础上,腺苷含量0.02%(重量百分比)以上,甘露醇含量5%以上(重量百分比);或者,

更具体而言,本发明冬虫夏草发酵组合物在麦角硫因含量0.01%以上的基础上,腺苷含量0.02%(重量百分比)以上,甘露醇含量6%以上(重量百分比);或者,

更具体而言,本发明冬虫夏草发酵组合物在麦角硫因含量0.01%以上的基础上,腺苷含量0.02%(重量百分比)以上,甘露醇含量7%以上(重量百分比)。

本发明另一方面,还在于提供的冬虫夏草发酵组合物,麦角硫因含量在0.004%以上(重量百分比),优选0.006%以上(重量百分比),优选0.008%以上(重量百分比),优选0.01%以上(重量百分比),优选多糖含量2%以上(重量百分比);或者,

进一步地,所述冬虫夏草发酵组合物,其多糖含量2%以上(重量百分比),优选3%以上(重量百分比)、优选2-10%(重量百分比)。

进一步地,本发明冬虫夏草发酵组合物在麦角硫因含量0.01%以上的基础上,优选多糖含量2%以上(重量百分比),总氨基酸在20%以上;

更具体而言,本发明冬虫夏草发酵组合物在麦角硫因含量0.01%以上的基础上,优选多糖含量2%-10%(重量百分比),总氨基酸在25-50%。

本领域技术人员会理解,上述所列举仅是对本发明的说明,而非解释为限制本发明。由于对麦角硫因、腺苷含量、甘露醇、多糖、赤藓醇的研究,所述范围

内所获得的发酵组合物具有非常优异的技术效果。

本发明另一方面,还在于提供的冬虫夏草发酵组合物,麦角硫因含量在 0.004% 以上(重量百分比),优选 0.006%以上(重量百分比),优选 0.008%以上(重量百分比),优选 0.01%以上(重量百分比),赤藓醇含量在 1%以上(重量百分比),优选 1-6%(重量百分比),进一步优选 2-5%(重量百分比),当本发明提供的冬虫夏草发酵组合物中含有的麦角硫因和赤藓醇在本发明优选的限定范围内时,二者的组合表现出羟自由基清除率协同作用,进而增强了冬虫夏草发酵组合物整体的抗氧化性。

本发明另一方面,还在于提供的冬虫夏草发酵组合物,麦角硫因含量在 0.004% 以上(重量百分比),优选 0.006%以上(重量百分比),优选 0.008%以上(重量百分比),优选 0.01%以上(重量百分比),腺苷含量在 0.02%以上(重量百分比),甘露醇含量在 4%以上(重量百分比)。

进一步地,本发明的冬虫夏草发酵组合物,麦角硫因含量在 0.01%以上(重量百分比),腺苷含量在 0.02%以上(重量百分比),甘露醇含量在 4%以上(重量百分比),多糖含量 2%以上(重量百分比)。

进一步地,本发明的冬虫夏草发酵组合物,麦角硫因含量在 0.01%以上(重量百分比),腺苷含量在 0.02%以上(重量百分比),甘露醇含量在 4%以上(重量百分比),总氨基酸的含量在 20%以上(重量百分比),优选为 25-50%(重量百分比)。

进一步地,本发明的冬虫夏草发酵组合物,麦角硫因含量在 0.01%以上(重量百分比),腺苷含量在 0.02%以上(重量百分比),甘露醇含量在 4%以上(重量百分比),多糖含量 2%以上(重量百分比),总氨基酸的含量在 20%以上(重量百分比),优选为 25-50%(重量百分比)。

更具体而言,本发明冬虫夏草发酵组合物在麦角硫因含量 0.01%以上的基础上,优选腺苷含量在 0.02%以上(重量百分比),麦角硫因与腺苷含量的比例为 1: 1-1: 20,甘露醇含量在 5%以上(重量百分比);或者,

更具体而言,本发明冬虫夏草发酵组合物在麦角硫因含量 0.01%以上的基础上,优选腺苷含量在 0.03%以上(重量百分比),麦角硫因与腺苷含量的比例为 1: 1-1: 20,甘露醇含量在 5%以上(重量百分比);或者,

更具体而言,本发明冬虫夏草发酵组合物在麦角硫因含量 0.01%以上的基础上,优选腺苷含量在 0.02%以上(重量百分比),麦角硫因与腺苷含量的比例为 1: 1-1: 20,甘露醇含量在 5%以上(重量百分比),多糖含量在 2%以上(重量百分比);或者,

更具体而言,本发明冬虫夏草发酵组合物在麦角硫因含量 0.01%以上的基础上,优选腺苷含量在 0.02%以上(重量百分比),麦角硫因与腺苷含量的比例为 1: 1-1: 20,甘露醇含量在 5%以上(重量百分比),总氨基酸的含量在 20%以上(重

量百分比);或者,

更具体而言,本发明冬虫夏草发酵组合物在麦角硫因含量 0.01%以上的基础上,优选腺苷含量在 0.02%-1.0% (重量百分比),麦角硫因与腺苷含量的比例为 1:1-1:20,甘露醇含量在 5%以上 (重量百分比);或者,

5 更具体而言,本发明冬虫夏草发酵组合物在麦角硫因含量 0.01%以上的基础上,优选腺苷含量在 0.02%-1.0% (重量百分比),麦角硫因与腺苷含量的比例为 1:1-1:20,甘露醇含量在 5%以上 (重量百分比),多糖含量在 2%以上 (重量百分比);或者,

更具体而言,本发明冬虫夏草发酵组合物在麦角硫因含量 0.01%以上的基础上,优选腺苷含量在 0.02%-1.0% (重量百分比),麦角硫因与腺苷含量的比例为 1:1-1:20,甘露醇含量在 5%以上 (重量百分比),总氨基酸的含量在 20%以上 (重量百分比);或者,

更具体而言,本发明冬虫夏草发酵组合物在麦角硫因含量 0.01%以上的基础上,优选腺苷含量在 0.02%-1.0% (重量百分比),麦角硫因与腺苷含量的比例为 1:1-1:20,甘露醇含量在 5%以上 (重量百分比),多糖含量在 2%以上 (重量百分比),总氨基酸的含量在 20%以上 (重量百分比)。

本发明另一方面,还在于提供一种冬虫夏草发酵组合物,包括腺苷,其中,所述发酵组合物还包括麦角硫因,且麦角硫因的含量 (重量百分比) 在 0.01%以上。

进一步地,所述一种冬虫夏草发酵组合物,包括腺苷和甘露醇,其中,所述发酵组合物还包括麦角硫因,且麦角硫因的含量 (重量百分比) 在 0.01%以上。

进一步地,所述一种冬虫夏草发酵组合物,包括腺苷、甘露醇和多糖,其中,所述发酵组合物还包括麦角硫因,且麦角硫因的含量 (重量百分比) 在 0.01%以上。

进一步地,所述一种冬虫夏草发酵组合物,包括腺苷、甘露醇、多糖和氨基酸,其中,所述发酵组合物还包括麦角硫因,且麦角硫因的含量 (重量百分比) 在 0.01%以上。

进一步地,所述一种冬虫夏草发酵组合物,包括腺苷,其中,所述发酵组合物还包括麦角硫因,且麦角硫因的含量 (重量百分比) 在 0.01%以上,腺苷含量 0.02-1.0% (重量百分比)。

进一步地,所述一种冬虫夏草发酵组合物,包括腺苷,其中,所述发酵组合物还包括麦角硫因,且麦角硫因的含量 (重量百分比) 在 0.01%以上,麦角硫因与腺苷含量的比例为 1:1-1:20。

进一步地,所述一种冬虫夏草发酵组合物,包括腺苷,其中,所述发酵组合物还包括麦角硫因,且麦角硫因的含量 (重量百分比) 在 0.01%以上,腺苷含量 0.02-1.0% (重量百分比),麦角硫因与腺苷含量的比例为 1:1-1:20。

进一步地,所述一种冬虫夏草发酵组合物,包括腺苷和甘露醇,其中,所述

发酵组合物还包括麦角硫因，且麦角硫因的含量（重量百分比）在 0.01% 以上，腺苷含量 0.02-1.0%（重量百分比），甘露醇含量 4% 以上（重量百分比）。

进一步地，所述一种冬虫夏草发酵组合物，包括腺苷和甘露醇，其中，所述发酵组合物还包括麦角硫因，且麦角硫因的含量（重量百分比）在 0.01% 以上，腺苷含量 0.02-1.0%（重量百分比），麦角硫因与腺苷含量的比例为 1:1-1:20，甘露醇含量 4% 以上（重量百分比）。

因此，本发明另一方面，还在于提供一种冬虫夏草发酵组合物，麦角硫因的含量 0.004% 以上（重量百分比），优选 0.006% 以上（重量百分比），优选 0.008% 以上（重量百分比），优选 0.01% 以上（重量百分比）、腺苷含量在 0.02% 以上（重量百分比），赤藓醇在 1.0% 以上（重量百分比）。

更具体而言，本发明冬虫夏草发酵组合物在麦角硫因含 0.01% 以上的基础上，优选腺苷含量 0.02% 以上（重量百分比），麦角硫因与腺苷含量的比例为 1:1-1:20，赤藓醇 1.0% 以上（重量百分比）；或者，

更具体而言，本发明冬虫夏草发酵组合物在麦角硫因含量 0.01% 以上的基础上，优选腺苷含量 0.02%-1.0%（重量百分比），赤藓醇 1.0% 以上（重量百分比）。

本发明另一方面，还在于提供一种冬虫夏草发酵组合物，包括腺苷，其中，所述发酵组合物还包括麦角硫因和赤藓醇，且麦角硫因的含量（重量百分比）在 0.01% 以上。

进一步地，所述一种冬虫夏草发酵组合物，包括腺苷和甘露醇，其中，所述发酵组合物还包括麦角硫因和赤藓醇，且麦角硫因的含量（重量百分比）在 0.01% 以上。

进一步地，所述一种冬虫夏草发酵组合物，包括腺苷、甘露醇和多糖，其中，所述发酵组合物还包括麦角硫因和赤藓醇，且麦角硫因的含量（重量百分比）在 0.01% 以上。

进一步地，所述一种冬虫夏草发酵组合物，包括腺苷、甘露醇、多糖和氨基酸，其中，所述发酵组合物还包括麦角硫因和赤藓醇，且麦角硫因的含量（重量百分比）在 0.01% 以上。

进一步地，所述一种冬虫夏草发酵组合物，包括腺苷，其中，所述发酵组合物还包括麦角硫因和赤藓醇，且麦角硫因的含量（重量百分比）在 0.01% 以上，腺苷含量 0.02-1.0%（重量百分比）。

进一步地，所述一种冬虫夏草发酵组合物，包括腺苷，其中，所述发酵组合物还包括麦角硫因和赤藓醇，且麦角硫因的含量（重量百分比）在 0.01% 以上，麦角硫因与腺苷含量的比例为 1:1-1:20。

进一步地，所述一种冬虫夏草发酵组合物，包括腺苷，其中，所述发酵组合物还包括麦角硫因和赤藓醇，且麦角硫因的含量（重量百分比）在 0.01% 以上，腺

苷含量 0.02-1.0% (重量百分比), 麦角硫因与腺苷含量的比例为 1:1-1:20。

进一步地, 所述一种冬虫夏草发酵组合物, 包括腺苷和甘露醇, 其中, 所述发酵组合物还包括麦角硫因和赤藓醇, 且麦角硫因的含量 (重量百分比) 在 0.01% 以上, 腺苷含量 0.02-1.0% (重量百分比), 甘露醇含量 4% 以上 (重量百分比)。

5 进一步地, 所述一种冬虫夏草发酵组合物, 包括腺苷和甘露醇, 其中, 所述发酵组合物还包括麦角硫因和赤藓醇, 且麦角硫因的含量 (重量百分比) 在 0.01% 以上, 腺苷含量 0.02-1.0% (重量百分比), 麦角硫因与腺苷含量的比例为 1:1-1:20, 甘露醇含量 4% 以上 (重量百分比)。

本发明另一方面, 还在于提供一种冬虫夏草发酵组合物, 包括腺苷, 其中,
10 所述发酵组合物还包括麦角硫因和赤藓醇, 且赤藓醇在 1% (重量百分比) 以上。

进一步地, 所述一种冬虫夏草发酵组合物, 包括腺苷和甘露醇, 其中, 所述发酵组合物还包括麦角硫因和赤藓醇, 且赤藓醇在 1% (重量百分比) 以上。

进一步地, 所述一种冬虫夏草发酵组合物, 包括腺苷、甘露醇和多糖, 其中, 所述发酵组合物还包括麦角硫因和赤藓醇, 且赤藓醇在 1% (重量百分比) 以上。

15 进一步地, 所述一种冬虫夏草发酵组合物, 包括腺苷、甘露醇、多糖和氨基酸, 其中, 所述发酵组合物还包括麦角硫因和赤藓醇, 且赤藓醇在 1% (重量百分比) 以上。

进一步地, 所述一种冬虫夏草发酵组合物, 包括腺苷, 其中, 所述发酵组合物还包括麦角硫因和赤藓醇, 且赤藓醇在 1% (重量百分比) 以上, 腺苷含量
20 0.02-1.0% (重量百分比)。

进一步地, 所述一种冬虫夏草发酵组合物, 包括腺苷, 其中, 所述发酵组合物还包括麦角硫因和赤藓醇, 且麦角硫因的含量 (重量百分比) 在 0.01% 以上, 赤藓醇在 1% (重量百分比) 以上。

进一步地, 所述一种冬虫夏草发酵组合物, 包括腺苷, 其中, 所述发酵组合物还包括麦角硫因和赤藓醇, 且麦角硫因的含量 (重量百分比) 在 0.01% 以上, 赤藓醇在 1% 以上 (重量百分比), 腺苷含量 0.02-1.0% (重量百分比)。
25

进一步地, 所述一种冬虫夏草发酵组合物, 包括腺苷和甘露醇, 其中, 所述发酵组合物还包括麦角硫因和赤藓醇, 且麦角硫因的含量 (重量百分比) 在 0.01% 以上, 赤藓醇在 1% 以上 (重量百分比), 腺苷含量 0.02-1.0% (重量百分比), 甘露醇含量 4% 以上 (重量百分比)。
30

本发明另一方面, 还在于提供一种冬虫夏草发酵组合物, 所述一种冬虫夏草发酵组合物, 包括赤藓醇和甘露醇, 且所述的甘露醇的含量在 1% 以上 (重量百分比), 优选 1-6% (重量百分比), 进一步优选 1.5-5% (重量百分比), 1.5-4% (重量百分比), 进一步优选 2-5% (重量百分比), 再进一步优选 2.5-4% (重量百分比),
35 所述冬虫夏草发酵组合物, 其甘露醇含量在 4% 以上 (重量百分比), 优选 5% 以上,

优选 6%以上，优选 7%以上。

进一步地，所述冬虫夏草发酵组合物，其多糖含量 2%以上（重量百分比），优选 3%以上（重量百分比）、优选 2-10%（重量百分比）。

进一步地，本发明冬虫夏草发酵组合物，其腺苷含量 0.02%以上（重量百分比），
5 0.03%以上（重量百分比），优选 0.03-1.00%（重量百分比）、优选 0.03-0.80%（重量百分比）、优选 0.03-0.60%（重量百分比）、优选 0.03-0.40%（重量百分比）、优选 0.03-0.20%（重量百分比）、优选 0.03-0.10%（重量百分比）、优选 0.03-0.08%（重量百分比）。；

进一步地，所述冬虫夏草发酵组合物，其多糖含量 2%以上（重量百分比），
10 优选 3%以上（重量百分比）、优选 4%以上（重量百分比）、优选 2-10%（重量百分比）。

进一步地，总氨基酸的含量在 20%以上（重量百分比），优选为 25-50%（重量百分比）。

本发明所述的冬虫夏草发酵组合物，可直接制备成各种剂型，包括粉剂、颗粒剂、片剂、丸剂、胶囊剂、或者混合所述部分并将混合物装入胶囊或将混合物制成片剂形式来获得单个制剂。也可以用可接受的载体制备成各种剂型，就口服给药组合物（例如片剂和胶囊剂）而言，术语“可接受的载体”包括这样的载体，例如普通的赋形剂，例如粘合剂，例如糖浆、阿拉伯胶、明胶、山梨糖醇、黄耆胶、聚乙烯吡咯烷酮（聚维酮）、甲基纤维素、乙基纤维素、羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素、蔗糖和淀粉；填充剂和载体例如玉米淀粉、明胶、乳糖、蔗糖、微晶纤维素；润滑剂例如硬脂酸镁、硬脂酸钠与其他硬脂酸盐、甘油硬脂酸酯、硬脂酸、硅酮液、滑石、蜡、油和胶体二氧化硅。也可以使用矫味剂，例如薄荷、冬青油、樱桃调料等。可能需要加入着色剂，以便区分剂型。片剂也可以借助本领域熟知的方法加以包衣。片剂可以是压制或模制的，可选地有一种或多种附属成分。
15 压制片可以这样制备，即在适合的机械中压制活性成分的自由流动形式，例如粉末或颗粒，可选地混合有一种或多种粘合剂、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、表面活性剂或分散剂。
20

综上所述，本发明所述的冬虫夏草发酵组合物不仅是首个具有麦角硫因的冬虫夏草发酵产品，而且，由于对麦角硫因和腺苷含量的研究，所述范围内所获得的发酵组合物具有非常优异的抗氧化作用，使本发明的冬虫夏草发酵组合物在整体上表现出较现有技术更优异的技术效果。
30

因此，本发明还在于提供一种药物组合物，包括麦角硫因与腺苷的组合，其中麦角硫因与腺苷的组合比例为 1:1-1:20。

进一步地，麦角硫因与腺苷含量的比例优选 1:1-1:15、优选 1:1-1:10、优选 1:1-1:8、优选 1:1-1:7、优选 1:1-1:6、优选 1:1-1:5、优选 1:1-1:4、优选 1:1-1:3、优
35

选 1:1-1:2。

本发明还在提供一种药物组合物，包括麦角硫因与赤藓醇的组合，其中麦角硫因与赤藓醇的组合比例为 1:1-1:600，优选 1:1-1:500、优选 1:1-1:400、优选 1:1-1:300、优选 1:1-1:200、优选 1:1-1:100。

5 本发明所述的药物组合物，可直接制备成各种剂型，包括粉剂、颗粒剂、片剂、丸剂、胶囊剂、或者混合所述部分并将混合物装入胶囊或将混合物制成片剂形式来获得单个制剂。也可以用可接受的载体制备成各种剂型。

本发明所述的药物组合物具有优异的抗氧化作用，具有协同技术效果。

附图说明

- 10 图 1 为麦角硫因标准品 HPLC 图谱；
图 2 为 B-5 样品麦角硫因 HPLC 图谱；
图 3 为 B-7 样品麦角硫因 HPLC 图谱；
图 4 为实施例 4 CN101096641A 样品腺苷 HPLC 图谱；
图 5 为实施例 4 B-2 样品腺苷 HPLC 图谱；
- 15 图 6 为 B-2 样品赤藓醇 HPLC 图谱；
图 7 为多糖的标准曲线图。

具体实施方式

一、麦角硫因检测方法

照高效液相色谱法（中国药典 2020 年版四部通则 0512）测定。

20 色谱条件与系统适用性试验 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以 0.2%七氟丁酸为流动相 A，以甲醇为流动相 B；检测波长为 255 nm。理论板数按麦角硫因峰计算应不低于 3000。

对照品溶液的制备 麦角硫因对照品适量，精密称定，加 0.5%磷酸溶液制成每 1 mL 含 μg 的溶液，即得。按下表进行梯度洗脱：

时间（min）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0	100	0
12.5	100	0
13	40	60
18	40	60
19	100	0
33	100	0

供试品溶液的制备 取发酵冬虫夏草菌粉 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加乙醚 20 mL, 密塞, 浸泡 30 分钟, 滤过, 弃去乙醚, 残渣挥干乙醚, 连同滤纸一并置具塞锥形瓶中, 精密加入 0.5% 磷酸溶液 50 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理 30 分钟, 功率 250 W, 频率 33 kHz, 放冷, 摇匀, 离心, 取上清液, 即得。

5 测定法 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μ L, 注入液相色谱仪, 测定, 即得。

二、赤藓醇的检测方法

对照品溶液配制

10 取赤藓醇对照品适量, 精密称定, 加去离子水制成每 1 mL 含 1000 μ g 的溶液, 即得。

供试品溶液配制

取发酵冬虫夏草菌粉 0.5 g, 精密称定, 至具塞锥形瓶中, 精密加入去离子水 10 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 60 min, 放冷, 再称定重量, 用去离子水补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

15 检测方法

检测器: RID 示差检测器;

色谱柱: 型号 Agilent Hi-Plex Ca, 300 $\times$ 7.7 mm, 8 μ m;

流动相: 去离子水;

色谱柱流速: 0.6 mL/min; 柱温: 80 $^{\circ}$ C; 进样体积: 10 μ L; 检测时间 50 min;

20 流通池温度: 35 $^{\circ}$ C。

三、多糖的蒽酮-硫酸检测方法

溶液配制

硫酸蒽酮溶液: 精密称取蒽酮 0.1 g, 加硫酸溶液 100 mL 使溶解, 摇匀, 置于棕色瓶中即得。

25 标准曲线的制备

对照品溶液的制备

取无水葡萄糖对照品适量, 精密称定加水制成每 1 mL 含 0.1 mg 的溶液, 即得。

标准曲线绘制

30 精密量取对照品溶液 0、0.2、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mL, 分别置于 20 mL 的具塞试管中, 各加水至 2.0 mL, 迅速精密加入硫酸蒽酮溶液 6 mL, 立即摇匀, 放置 15 min, 立即置冰水浴中冷却 15 min, 取出后室温放置 10 min, 以相应的试剂为空白, 在 625 nm 处测定吸光度, 以吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线, 见图 7。

供试品溶液的制备

35 取发酵冬虫夏草菌粉约 2 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 加水 60 mL, 静置 30min, 加热回流 3 h, 趁热转移至离心管, 用少量热水洗涤滤器和滤渣, 5000 rpm 离心

10min, 取上清, 用少量热水将沉淀转移至圆底烧瓶中, 加水 60 mL, 加热回流 2 h, 趁热转移至离心管, 再次离心, 合并上清, 置水浴锅上蒸干, 残渣用水 5 mL 溶解, 边搅拌边缓慢加入乙醇 75 mL, 摇匀, 在 4℃ 放置 12 h, 离心, 弃去上清液, 沉淀物用热水溶解并转移至 50 mL, 放冷, 加水至刻度, 摇匀取溶液适量, 离心, 精密量取上清液 1 mL, 置 25 mL 量瓶, 加水至刻度, 摇匀, 即得。

测定

精密量取供试品溶液 2 mL, 置 10 mL 具塞试管中, 照标准曲线制备项下的方法, 自“迅速精密加入硫酸蒽酮溶液 6 mL”起, 同法操作, 测定吸光度, 从标准曲线上读出供试品溶液中无水葡萄糖的含量, 计算即得。

10 结果计算

$$W=\frac{c\times8/2\times25/2\times50}{m}\times100$$

式中:

W-多糖的含量, %;

c-从标准曲线上查的样品的多糖浓度, mg/mL;

15 m-样品质量, mg;

8/2、25/2 表示稀释倍数;

50-水提醇沉后获得的沉淀物经热水溶解定容的体积数值。

四、羟自由基清除率检测(Fenton 比色法)

检测原理

20 H₂O₂/Fe²⁺通过 Fenton 反应产生羟自由基, 并将 Fe²⁺氧化为 Fe³⁺, 导致红色的邻二氮菲-Fe²⁺氧化为无色的邻二氮菲-Fe³⁺, 使邻二氮菲-Fe²⁺在 536 nm 处的最大吸收峰消失, 可通过分光光度计测定 530~540 nm 处吸光度的变化, 据此可计算出羟自由基的含量变化, 即可计算出样品的羟自由基清除率或清除能力。

溶液配制

25 1、称取 0.2 g 菌粉, 加入 2 mL 纯化水, 混匀, 室温静置 4 h, 10000 rpm 离心 10 min, 取上清液待用。

2、其他样品为对照品溶液。

分光光度计开机预热 30 min, 调节波长 536 nm, 纯化水调零。

加样

30 按照下表设置空白管、未损伤管、损伤管、对照管、测定管, 溶液应按照顺序依次加入, 混匀后 37℃ 水浴 1 h。

加入物 (mL)	空白管 A0	未损伤管 A1	损伤管 A2	对照管 A3'	测定管 A3
邻二氮菲溶液	-	0.6	0.6	-	0.6
OH Assay buffer	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
亚铁显色液	-	0.4	0.4	-	0.4
纯化水	3.2	2.2	1.8	2.8	1.4
待测溶液	-	-	-	0.4	0.4
氧化剂	-	-	0.4	-	0.4

计算：待测样本·OH 清除率（%）=[(A3-A3')-(A2-A0)]/(A1-A2)×100%

五、腺苷、甘露醇、总氨基酸含量、水分的检测方法照国家药品标准发酵冬虫夏草菌粉项下的检测方法检测。

5 六、酪氨酸酶抑制率的检测方法

1□溶液的配制

（1）PBS 缓冲液的配制：分别称取磷酸二氢钾 3.4 022 g、磷酸氢二钾三水合物 5.7 055 g，用适量蒸馏水溶解，于 1 000 mL 容量瓶中定容，摇匀，得到 pH=6.81，0.05 mol·L⁻¹ 的 PBS 缓冲液，于冰箱 4℃避光保存。

10 （2）L-多巴溶液的配制：精密称取 L-多巴 0.0 395 g，用配好的 PBS 缓冲液溶解，转移至 100 mL 容量瓶，定容，摇匀，超声，得到 2 mmol·L⁻¹ 的 L-多巴溶液，现配现用。

（3）TYR（酪氨酸酶）溶液的配制：用少量 PBS 缓冲液将 25 KU 的 TYR 全部溶解，重复洗涤数次，将洗涤液一并转移至 100 mL 容量瓶中，用 PBS 缓冲液
15 定容，摇匀，得到 250 U·mL⁻¹ 的 TYR 溶液，再将母液稀释至 125 U·mL⁻¹，于冰箱-20℃保存备用。

2、样品的制备：250mg/ml 赤藓醇母液：称取 2.5g 赤藓醇加入 10ml 纯化水；
250mg/ml 甘露醇母液：称取 7.5g 甘露醇加入 30ml 纯化水，加热溶解，并根据各
反应体系稀释成所需浓度后加入检测体系。

20 3、样品对 TYR 抑制活性的测定

反应体系按表 4.2 中所示，以 2 mmol·L⁻¹ 的 L-多巴为底物，将 PBS 缓冲液、
样品溶液和底物依次加入到编号为 1、2、3、4 的 96 孔板中，各孔重复三次。多
功能酶标仪温度设置为 37℃，线性震板 10 min 后取出，最后加入 TYR 溶液，快
速放回，检测波长为 475 nm，反应体系的总体积为 240 μL，吸光度每隔 30 s 测量

一次，共记录 30 min，以 30 min 的吸光度为准计算抑制率。抑制率计算公式如下，当计算结果为负数时，那么负数的绝对值即为激活率。

反应液组成	反应液体积/ μL			
	A1	A2	A3	A4
PBS 缓冲液	80	160	0	80
样品溶液	0	0	80	80
底物	80	80	80	80
TYR	80	0	80	0

$$\text{抑制率} = \frac{(A_1 - A_2) - (A_3 - A_4)}{A_1 - A_2} \times 100\%$$

(4.1)

- 5
- A1：未加样品而加 TYR 的反应液在 475 nm 处测得的吸光度；

A2：未加样品且未加 TYR 的反应液在 475 nm 处测得的吸光度；

A3：加样品且加 TYR 的反应液在 475 nm 处测得的吸光度；

A4：加样品而未加 TYR 的反应液在 475 nm 处测得的吸光度。

10

实施例 1 不同菌丝体麦角硫因（EGT）、赤藓醇含量

本发明人研究表明，天然冬虫夏草的培养土壤、幼虫、蚕蛹中未检出麦角硫因，在部分新鲜虫体及干虫体中仅检出 0.008% 的麦角硫因，因此，难以从天然冬虫夏草的菌丝体中检出麦角硫因：

样品	EGT 含量 mg/g	EGT 含量 %	赤藓醇含量 %
新鲜虫体	0.06	0.006%	未检出
干虫体	0.08	0.008%	未检出
僵虫（干）	0.08	0.008%	未检出
幼虫	未检出	未检出	未检出
培养土壤	未检出	未检出	未检出

- 15
- 虽然理论上用天然冬虫夏草分离出的真菌发酵，其菌丝体内营养物质的含量及药用效果与天然虫草相似，但是冬虫夏草发酵产物的成分与天然冬虫夏草成分仍然存在差别，尤其是发酵过程中的代谢产物、次生代谢产物，不仅是与天然冬虫夏草有差异，而且不同冬虫夏草发酵产物之间差异也较大。发明人在研究天然

冬虫夏草的基础上，将多株保藏中心保藏的中国被毛孢(*Hirsutella sinensis*)如中国典型培养物保藏中心(CCTCC)中国被毛孢(*Hirsutella sinensis*),保藏编号为 CCTCC No: M 2011278, 以及从中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC) 购买的中华被毛孢 (*Hirsutella sinensis*) CGMCC 3.14240 和中华被毛孢 (*Hirsutella sinensis*)

5 CGMCC3.14243 从中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC) 购得蝙蝠蛾拟青霉菌 (*Paecilomyces hepiali*) 3.15540 、 蝙蝠蛾拟青霉菌 (*Paecilomyces hepiali*)CGMCC3.7845、蝙蝠蛾拟青霉菌(*Paecilomyces hepiali*)CGMCC3.7908, 进一步参照现有技术, 在排除了外源性麦角硫因可能性干扰的基础上 (例如培养基用蚕蛹粉末检出麦角硫因), 研究了现有的冬虫夏草发酵过程中的发酵滤液和菌丝体干燥粉, 不仅均低于天然冬虫夏草可检出的麦角硫因的量, 而且大部分均未检出, 但是发明人意外发现, 中国被毛孢发酵菌丝体能够获得微量的麦角硫因。

10

菌种	参照现有技术发酵	EGT 含量%		
		发酵滤液	干燥菌粉	
中国被毛孢(<i>Hirsutella sinensis</i>), 保藏编号为 CCTCC No: M 2011278	CN101096641A 实施例 1 CN108384726A 实施例 5 CN102373190A 实施例 1	未检出	干	
中华被毛孢 (<i>Hirsutella sinensis</i>) CGMCC 3.14240		未检出	干	
		未检出	干	
		未检出	干	
中华被毛孢 (<i>Hirsutella sinensis</i>) CGMCC3.14243		未检出	干	
		未检出	干	
		未检出	干	
蝙蝠蛾拟青霉菌(<i>Paecilomyces hepiali</i>)CGMCC3.15540		CN108553487A 实施例 1-2	未检出	未检出
蝙蝠蛾拟青霉菌(<i>Paecilomyces hepiali</i>)CGMCC3.7845			未检出	未检出
蝙蝠蛾拟青霉菌(<i>Paecilomyces hepiali</i>)CGMCC3.7908	未检出		未检出	

注：干指按照峰面积，含量仅为天然冬虫夏草的 3%-10%。

如上表所示，发明人参照现有技术公开的方法进行发酵，发酵过程中的发酵

滤液和菌丝体均未获得有意义的麦角硫因。

进一步，除了上述保藏中心可获得的菌株外，发明人对市售的多株中华被毛孢（*Hirsutella sinensis*），例如，从中国工业微生物菌种保藏管理中心（CICC）购买的冬虫夏草（蝙蝠蛾被毛孢，中华被毛孢）*Ophiocordyceps sinensis* 标准菌株 CICC 14092、CICC 14095、CICC 14097、CICC 14099，及从泰斯拓生物购买的冬虫夏草（蝙蝠蛾被毛孢，中华被毛孢）*Ophiocordyceps sinensis* 货号为 TS326189、TS326199 以及中华被毛孢（*Hirsutella sinensis*）货号为 TS361737、TS392986 的菌株，参照现有技术进行发酵，在所得到的发酵滤液和菌丝体均未获得麦角硫因。

同样的，发明人对市售的多株蝙蝠蛾拟青霉菌(*Paecilomyces hepiali*)，例如保藏编号为 CGMCC 3.15421、CGMCC 3.14870、CGMCC 3.12108、CGMCC 3.10157、CCTCC NF 20081231、CCTCC NF 20081239、CCTCC NF 20081244、CCTCC NF 20081250 参照现有技术进行发酵，在所得到的发酵滤液和菌丝体均未获得麦角硫因。

菌种	参照现有技术发酵	赤藓醇含量%
		干燥菌粉
中国被毛孢(<i>Hirsutella sinensis</i>)，保藏编号为 CCTCC No: M 2011278	CN108384726A 实施例 5	0.8%
中华被毛孢（ <i>Hirsutella sinensis</i> ） CGMCC 3.14240		
中华被毛孢（ <i>Hirsutella sinensis</i> ） CGMCC3.14243		
蝙蝠蛾拟青霉菌(<i>Paecilomyces hepiali</i>)CGMCC3.15540	CN108553487A 实施例 1-2	0.34%
蝙蝠蛾拟青霉菌(<i>Paecilomyces hepiali</i>)CGMCC3.7845		0.3%

如上表所示，发明人参照现有技术公开的方法进行发酵，发酵过程中的发酵滤液和菌丝体均未获得稳定有意义含量的赤藓醇。

进一步，除了上述保藏中心可获得的菌株外，发明人对市售的多株中华被毛孢（*Hirsutella sinensis*），例如，从中国工业微生物菌种保藏管理中心（CICC）购买的冬虫夏草（蝙蝠蛾被毛孢，中华被毛孢）*Ophiocordyceps sinensis* 标准菌株 CICC 14092、CICC 14095、CICC 14097、CICC 14099，及从泰斯拓生物购买的冬虫夏草

(蝙蝠蛾被毛孢, 中华被毛孢) *Ophiocordyceps sinensis* 货号为 TS326189、TS326199 以及中华被毛孢 (*Hirsutella sinensis*) 货号为 TS361737、TS392986 的菌株, 参照现有技术进行发酵, 在所得到的发酵滤液和菌丝体均未获得稳定有意义含量的赤藓醇。

5 同样的, 发明人对市售的多株蝙蝠蛾拟青霉菌(*Paecilomyces hepiali*), 例如保藏编号为 CGMCC 3.15421、CGMCC 3.14870、CGMCC 3.12108、CGMCC 3.10157、CCTCC NF 20081231、CCTCC NF 20081239、CCTCC NF 20081244、CCTCC NF 20081250 参照现有技术进行发酵, 在所得到的发酵滤液和菌丝体均未获得稳定有意义含量的赤藓醇。

10

实施例 2 具有稳定含有 0.004% 以上麦角硫因 (EGT) 的发酵产品

自中国典型培养物保藏中心 (CCTCC) 获得中国被毛孢(*Hirsutella sinensis*), 保藏编号为 CCTCC No: M 2011278, 将中国被毛孢菌种接种于斜面, 如下法进行斜面培养、摇瓶/种瓶培养、发酵培养:

15

1 斜面培养

1.1 斜面固体培养基配方: 蚕蛹粉 1.8%, 玉米粉 1.5%, 葡萄糖 2.0%, MgSO_4 0.01%, KH_2PO_4 0.02%, 麦片 1.0-3.0 g/60 mL, 琼脂粉 0.65%, Ph 6.8-7.2, 水配制, (118~122)°C 灭菌 (30±1) min。

20

1.2 在无菌条件下, 用接种铲挖去 2×2 cm 左右的菌块, 将菌丝均匀的涂布在空白固体培养基上, 置于生化培养箱中, 15°C 培养 30 天。

1.3 将培养后的斜面置于 0-8°C 的冷藏箱低温保存, 期间菌丝缓慢生长, 待斜面菌丝长满后取出, 备用。

2 摇瓶培养

25

2.1 摇瓶培养基配方: 蚕蛹粉 2.0%, 玉米粉 2.5%, 麸皮 2.5%, 鱼肝 0.25%, 蛋白胨 0.75%, KH_2PO_4 0.02%, 葡萄糖 3.0%, MgSO_4 0.01%, pH6.8-7.2;

2.2 液化: 根据液化料配制体积称取蚕蛹粉、玉米粉和麸皮, 加水后 (118~122)°C 液化 30 min, 取出液化料静置待上下分层后, 用放有 6 层纱布的滤网进行过滤, 得其滤液。

30

2.3 培养基配制: 称取相应物料后再用液化滤液溶解, 定容, 进行摇瓶分装, 装液量为 1500 mL/5000 mL, (118-122)°C, 灭菌 (30±1) min。

2.4 挖块: 将斜面切成约 1.5×2.0 cm 菌块, 利用无菌耙将切好的菌块耙入已准备好的挖块/种瓶培养基中, (13-16)°C, (120-140) rpm, 振荡培养 9-14 天。

3 发酵培养:

35

3.1 基础发酵培养基配方: 葡萄糖 2.8%, 酵母膏 1%, KH_2PO_4 0.02%, MgSO_4 0.01%, pH 7.0。

- 3.2 培养基配制：摇瓶装液量 1000 mL/5000 mL，(118-122)℃，灭菌（30±1）min。
- 3.3 发酵：接种量 10%，温度(13-16)℃，(120-140) rpm，振荡培养 7 天后放瓶。
- 3.4 量取适量体积的发酵液，真空过滤获得湿菌片，干燥得菌粉样品。

5

在上述基础发酵培养基（葡萄糖 2.8%，酵母膏 1%，KH₂PO₄ 0.02%，MgSO₄ 0.01%（%均为重量体积比））上添加不同的成分，发酵得到 A-1 至 A-8、B-1 至 B-8 的菌丝体实验编号样品，检测麦角硫因、赤藓醇结果如下表所示：

实验 编号	在葡萄糖 2.8%，酵母膏 1%， KH ₂ PO ₄ 0.02%，MgSO ₄ 0.01% 发酵培养基基础上添加氮源			EGT 含量 %	腺苷 含量 %	甘露醇 含量 %	赤藓醇 含量 %	菌丝体 干重 g/L
A-1	额外 添加 蛋氨 酸 6mM	豌豆蛋白	1%	0.009	0.038	5.8	1.86	13.35
A-2		小麦蛋白	1%	0.008	0.042	7.4	2.66	11.33
A-3		土豆蛋白	1%	0.005	0.025	4.8	0.91	11.94
A-4		马铃薯蛋白	1%	0.006	0.026	4.9	0.99	13.12
A-5		玉米蛋白粉	1%	0.003	0.042	7.6	2.63	10.00
A-6		多肽粉 101	1%	0.005	0.028	5.6	1.47	10.64
A-7		多肽粉 102	1%	0.009	0.033	7.1	2.14	12.00
A-8		多肽粉 607	1%	0.013	0.050	8.4	3.63	8.66
B-1	不额 外添 加蛋 氨酸	多肽粉 607	1%	0.014	0.046	9.1	1.03	10.22
B-2		多肽粉 705	1%	0.023	0.049	9.3	1.83	8.96
B-3		多肽粉 308	1%	0.022	0.048	9.4	1.79	7.58
B-4		多肽粉 702	1%	0.026	0.050	9.6	1.67	8.26
B-5		多肽粉 203	1%	0.018	0.047	9.3	1.34	11.36
B-6		多肽粉 305	1%	0.023	0.050	9.5	2.33	7.99
B-7		0.5%多肽粉 203+0.5%鱼 肝	1%	0.031	0.052	9.7	1.03	10.41

10 进一步，除了上述专利中公开的菌株外，发明人对市售的多株中华被毛孢

(*Hirsutella sinensis*), 例如从中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC) 购买的中华被毛孢 (*Hirsutella sinensis*) CGMCC 3.14240 和中华被毛孢 (*Hirsutella sinensis*) CGMCC3.14243, 以及从中国工业微生物菌种保藏管理中心 (CICC) 购买的冬虫夏草 (蝙蝠蛾被毛孢, 中华被毛孢) *Ophiocordyceps sinensis* 标准菌株 CICC 14092、CICC 14095、CICC 14097、CICC 14099, 及从泰斯拓生物购买的冬虫夏草 (蝙蝠蛾被毛孢, 中华被毛孢) *Ophiocordyceps sinensis* 货号为 TS326189、TS326199 以及中华被毛孢 (*Hirsutella sinensis*) 货号为 TS361737、TS392986 的菌株按照实施例 2 中国被毛孢(*Hirsutella sinensis*)保藏编号为 CCTCC No: M 2011278 的发酵方法在上表所示的不同的培养基的条件下重复实验进行发酵, 不同的中华被毛孢 (*Hirsutella sinensis*) 发酵得到的菌粉样品中 EGT 含量、腺苷含量%以及甘露醇、赤藓醇含量%均与同条件下的保藏编号为 CCTCC No: M 2011278 制备的菌粉中各组分含量无明显差异。

实施例 3 有效量麦角硫因或赤藓醇存在对中国被毛孢发酵菌粉的药效影响研究

1、麦角硫因与腺苷羟自由基清除率协同实验结果

实验样品	OH 清除率%
麦角硫因 0.4ml (0.02mg/ml)	-5.70%
腺苷 0.4ml (0.02mg/ml)	0.00%
麦角硫因 0.2ml (0.02mg/ml) + 腺苷 0.2ml (0.02mg/ml)	3.03%

2、麦角硫因与赤藓醇的羟自由基清除率协同效果实验结果

实验样品	OH 清除率%
麦角硫因 0.4ml (0.05mg/ml)	2.08%
赤藓醇 0.4ml (0.05 mg/ml)	-0.05%
麦角硫因 0.2ml (0.05 mg/ml) + 赤藓醇 0.2ml (0.05 mg/ml)	3.39%

3、赤藓醇与腺苷羟自由基清除率协同实验结果

实验样品	OH 清除率%	理论值
赤藓醇 12.5mg (6.25mg/ml)	-8.17%	-
腺苷 0.15mg (0.75mg/ml)	10.57%	-
赤藓醇 12.5mg (6.25mg/ml) + 腺苷 0.15mg (0.75mg/ml)	13.83%	2.4%

实验样品	OH 清除率%	理论值
赤藓醇 12.5mg (6.25mg/ml)	-5.8%	-
腺苷 0.15mg (2.5mg/ml)	7.17%	-
赤藓醇 12.5mg (6.25mg/ml) + 腺苷 0.15mg (2.5mg/ml)	9.06%	1.37%

表格中所述理论值为两组分的羟自由基清除率的简单叠加；

从上述数据可以看出赤藓醇和腺苷的组合物产生了显著的协同作用，两组分对于羟自由基清除效果相对于理论值至少提升了 4.76 倍。

4、赤藓醇和甘露醇的酪氨酸酶抑制率协同效果

实验样品	酪氨酸酶抑制率%
赤藓醇 1.25mg（6.25mg/ml）	1.71%
甘露醇 1.25mg（6.25 mg/ml）	2.51%
赤藓醇 1.25mg（6.25mg/ml）+ 甘露醇 1.25mg（6.25 mg/ml）	10.62%

5

实验样品	酪氨酸酶抑制率%
赤藓醇 1.75mg（8.75mg/ml）	6.39%
甘露醇 2.5mg（12.5mg/ml）	2.51%
赤藓醇 1.75mg（8.75mg/ml）+ 甘露醇 2.5mg（12.5mg/ml）	10.62%

实验样品	酪氨酸酶抑制率%
赤藓醇 0.75mg（3.75mg/ml）	-1.06%
甘露醇 1.25mg（6.25mg/ml）	3.62%
赤藓醇 0.75mg（3.75mg/ml）+ 甘露醇 1.25mg（6.25mg/ml）	5.21%

5、赤藓醇和甘露醇的羟自由基清除率协同效果实验结果

实验样品	OH 清除率%
赤藓醇 1.5mg (7.5mg/ml)	2.44%
甘露醇 2.5mg (12.5 mg/ml)	7.48%
赤藓醇 1.5mg (7.5mg/ml) + 甘露醇 2.5mg (12.5 mg/ml)	49.92%

实验样品	OH 清除率%
赤藓醇 1.75mg (8.75mg/ml)	11.76%
甘露醇 2.5mg (12.5 mg/ml)	7.48%
赤藓醇 1.75mg (8.75mg/ml) + 甘露醇 2.5mg (12.5 mg/ml)	39.54%

实验样品	OH 清除率%
赤藓醇 2mg (10mg/ml)	20.15%
甘露醇 2.5mg (12.5 mg/ml)	7.48%
赤藓醇 2mg (10mg/ml) + 甘露醇 2.5mg (12.5 mg/ml)	43.97%

实验样品	OH 清除率%
赤藓醇 2.5mg (12.5mg/ml)	11.45%
甘露醇 2.5mg (12.5 mg/ml)	7.48%
赤藓醇 2.5mg (12.5mg/ml) + 甘露醇 2.5mg (12.5 mg/ml)	23.66%

实验样品	OH 清除率%
赤藓醇 0.75mg (3.75mg/ml)	5.14%
甘露醇 2.5mg (12.5 mg/ml)	17.91%
赤藓醇 0.75mg (3.75mg/ml) + 甘露醇 2.5mg (12.5 mg/ml)	25.7%

实施例 4 本发明获得的发酵菌粉与现有技术发酵菌粉的羟自由基清除率实验结果

实验样品：

B-2、B-5、B-7 菌丝体样品的制备同前；

CN108384726A 的实施例 5 样品制备：

在实施例 1 所述的基础培养基中添加山梨糖 2.0%、海参提取物 0.1%和当归提取物 0.15%，利用该培养基发酵菌丝体。

CN101096641A 的实施例 1 样品制备：

将菌种接种于斜面，培养基配方为葡萄糖 1.5%，玉米粉 1.0%，糊精 0.5%，麸皮 1.5%，酵母粉 0.5%，蚕蛹粉 1.5%，蛋白胨 1.0%，硫酸镁 0.01%，磷酸二氢钾 0.02%，琼脂粉 0.8%，其余为水，在 12℃培养 25 天；然后将菌种接种于发酵培养基，培养基配方为葡萄糖 1.0%，糖蜜 1.0%，蚕蛹粉 0.5%，黄豆饼粉 1.0%，酵母膏 0.5%，硫酸镁 0.01%，磷酸二氢钾 0.02%，其余为水，置于摇床上，温度 14℃

培养 8 天；然后接种于一级发酵罐，温度 14℃培养 8 天，然后以培养基量的 10 倍扩大，逐级发酵，直至 30 吨罐。出罐后进行固液分离，将固体烘干、粉碎而成。

	实验样品	EGT 含量 %	腺苷 含量 %	赤藓 醇%	甘露醇 含量 %	OH 清除率 %
发明实 施例	B-2	0.023	0.049	1.83	9.3	55.89
	B-5	0.018	0.047	1.34	9.3	56.97
对比例	CN108384726A	干	0.20	0.18	8.2	-5.07
	CN101096641A	干	0.24	0.64	8.0	-5.21

本领域技术人员会理解，上述所列举的具体实施例仅是对本发明的说明，而非解释为限制本发明，同时，本领域技术人员会理解，按照本发明的精神，本领域技术人员可以实施不同的制备例，以实现相同的技术效果，其均包涵在本发明的范围内。

工业实用性

本发明提供的冬虫夏草发酵组合物不仅是首个具有麦角硫因的冬虫夏草发酵产品，而且，由于对麦角硫因和腺苷含量的研究，所述范围内所获得的发酵组合物具有非常优异的抗氧化作用，使本发明的冬虫夏草发酵组合物在整体上表现出较现有技术更优异的技术效果，具有很强的工业实用性。

权 利 要 求 书

- 1、一种冬虫夏草发酵组合物，其特征在于，所述发酵组合物含有赤藓醇，所述赤藓醇含量为 1 wt%以上，优选为 1-6 wt%，进一步优选为 2-5 wt%，再进一步优选为 2.5-4 wt%。
- 5 2、根据权利要求 1 所述的发酵组合物，其特征在于，所述发酵组合物含有腺苷，所述腺苷含量为 0.02 wt%以上，优选为 0.03 wt% - 1.0 wt%。
- 3、根据权利要求 1 或 2 所述的发酵组合物，其特征在于，所述发酵组合物含有麦角硫因，所述麦角硫因含量为 0.004 wt%以上，优选为 0.01 wt%以上。
- 10 4、根据权利要求 1-3 任一所述的发酵组合物，其特征在于，所述发酵组合物含有甘露醇、氨基酸和多糖中的一种或多种。
- 5、根据权利要求 4 所述的发酵组合物，其特征在于，所述甘露醇含量为 5 wt%以上，优选为 6 wt%以上，进一步优选为 7 wt%以上。
- 6、根据权利要求 4 或 5 所述的发酵组合物，其特征在于，所述多糖含量为 2 wt%以上，优选为 3 wt%以上，进一步优选 4 wt%以上，再进一步优选 2-10 wt%。
- 15 7、根据权利要求 4-6 任一所述的发酵组合物，其特征在于，所述氨基酸总含量为 20 wt%以上，优选为 25-50 wt%。
- 8、根据权利要求 1-7 任一所述的发酵组合物，其特征在于，所述发酵组合物由中国被毛孢（*Hirsutella sinensis*）发酵制得。
- 9、权利要求 1-8 任一所述的发酵组合物在制备药物或保健食品中的应用。