

人工培植冬虫夏草僵虫颜色变化初探*

邓小书** 卫秋阳 贺元川 石 萍 邢康康 陈仕江***

(重庆市中药研究院, 重庆 400065)

摘 要 【目的】分析人工培植冬虫夏草 *Ophiocordyceps sinensis* 颜色变化的成因, 为提升人工培植冬虫夏草商品规格等级奠定基础。【方法】以野生冬虫夏草僵虫、人工培植冬虫夏草僵虫为试验材料, 利用苏木精-伊红染色法 (Hematoxylin-eosin staining, HE) 结合光学显微镜观察组织细胞学变化, 采用 ELISA 方法测定冬虫夏草僵虫的丙二醛 (MDA)、过氧化氢 (H_2O_2) 含量以及多酚氧化酶 (PPO)、过氧化物酶 (POD)、过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD)、胰蛋白酶 (TRY)、淀粉酶 (AMY)、蔗糖酶 (INV)、脂肪酶 (LIP)、抗菌肽 (ATT) 酶活性变化。【结果】组织细胞学鉴定发现, 与野生虫草僵虫 (WT) 相比, 重庆室内培植虫草僵虫 (CQ) 和饲喂胡萝卜虫草僵虫 (H) 的组织细胞及细胞密度均变大。人工培植虫草活性氧代谢相关酶活性、免疫耐受力相关酶活性及 MDA 和 H_2O_2 含量变化具有显著差异。与野生虫草僵虫 (WT) 相比, 重庆室内培植虫草僵虫 (CQ) 和饲喂胡萝卜虫草僵虫 (H) 的 PPO、SOD、POD 酶活性增加, 而 CAT 酶活性降低, 其中 SOD 酶活力显著增加; H 的活性氧代谢相关酶活性变化最显著, 尤其是 PPO 与 SOD 酶活性分别增加 37.19%、23.98%; CQ 和 H 的 MDA 和 H_2O_2 含量显著降低; CQ 和 H 的 TRY、AMY、INV、LIP、ATT 酶活性均增加, 其中 AMY 与 LIP 酶活力显著增加。【结论】人工培植冬虫夏草僵虫颜色变化与活性氧代谢、免疫耐受力代谢相关, 为提高人工培植冬虫夏草的商品规格等级提供了理论指导。

关键词 冬虫夏草; 僵虫; 活性氧; 免疫耐受力; 色素沉积; 褐变

Color formation in artificially cultivated *Ophiocordyceps sinensis*

DENG Xiao-Shu** WEI Qiu-Yang HE Yuan-Chuan SHI Ping
XING Kang-Kang CHEN Shi-Jiang***

(Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China)

Abstract 【Objectives】Color formation in artificially cultivated *Ophiocordyceps sinensis* was investigated in order to improve the quality of this economically important product. 【Methods】The sclerotium of wild and artificially cultivated *O. sinensis* were observed before stroma development with HE staining, and tested to determine its malondialdehyde (MDA) and hydrogen peroxide (H_2O_2) content. In addition, polyphenol oxidase (PPO), peroxidase (POD), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), trypsin (TRY), amylase (AMY), invertase (INV), lipase (LIP) and attacin (ATT) activity levels, were assessed using ELISA-based methods. 【Results】Before the stroma development stage, sclerotium cell size and cell density were highest in Chongqing artificially cultivated *O. sinensis* (CQ), followed by carrot fed *O. sinensis* (H), and lowest in wild type *O. sinensis* (WT). In artificially cultivated *O. sinensis*, significant differences were observed in the activity of enzymes involved in the reactive oxygen metabolism, immune tolerance metabolism and MDA and H_2O_2 content regulation. Compared to the WT, PPO, SOD and POD activities were higher in the CQ and H treatment groups, whereas CAT activity was lower. However, of these changes, only the increase in SOD activity was significant. The activities of enzymes involved in reactive oxygen metabolism in the H group underwent significant changes, especially PPO and SOD activity, which increased by

*资助项目 Supported projects: 重庆市基本科研业务费 (cstc2020jxjl-jbky00004); 重庆市社会事业与民生保障科技创新专项 (cstc2017shmsA130117)

**第一作者 First author, E-mail: dengxss520@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: shijiangchen@163.com

收稿日期 Received: 2021-06-23; 接受日期 Accepted: 2021-09-16

37.19%, and 23.98%, respectively. MDA and H_2O_2 content in the CQ and H groups decreased significantly, whereas the TRY, AMY, INV, LIP, and ATT activity increased, although only the increases in AMY and LIP were significant. **[Conclusion]** Color formation in artificially-cultivated *O. sinensis* is related to the reactive oxygen metabolism and immune tolerance metabolism. These findings provide information that can improve the quality of artificially cultivated *O. sinensis*.

Key words *Ophiocordyceps sinensis*; sclerotium before stroma development; reactive oxygen species; immunity; pigmentation; browning

冬虫夏草 *Ophiocordyceps sinensis* 是名贵中药材, 含有多种活性成分, 如核苷、多糖、甾醇、蛋白质及氨基酸等 (Zhao *et al.*, 2014; 钱正明等, 2016)。由于冬虫夏草具有独特的药用价值, 因而备受我国消费者的推崇。目前, 市场对虫草的需求仍然旺盛, 导致其价格居高不下。长期以来, 由于人们对野生虫草资源的疯狂攫取, 导致天然虫草资源日渐匮乏, 市场上的虫草需求缺口也越来越大 (Li *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2021)。随着室内人工培植虫草技术的进步, 能培植并诱导出有子实体的冬虫夏草, 但人工培植虫草虫体颜色明显异于野生型天然虫草, 影响了人工培植冬虫夏草的外观性状和商品规格等级 (Wei *et al.*, 2021)。因此, 研究人工培植冬虫夏草虫体颜色变化的成因对提升冬虫夏草的外观品质具有重要的指导意义。

冬虫夏草为虫菌复合体, 对于虫而言, 与颜色变化相关的研究主要是鳞翅目昆虫体色变化, 根据颜色产生的原因, 其体色可分为色素色和结构色 (Shamim *et al.*, 2014; 高云等, 2020); 对于菌而言, 截止目前, 尚未有关于冬虫夏草颜色变化的相关文献报道, 仅涉及食药菌 (如双孢蘑菇、金针菇、猴头菇等菇类) 的褐变导致菌颜色变化 (Magae and Sunagawa, 2010; Dokhaniehand Aghdam, 2016; Kim, 2020), 褐变主要分为两类, 酶促褐变和非酶促褐变。研究表明, 活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 在黑色素生成过程中起着重要作用 (Cunha *et al.*, 2012; Jenkins and Grossman, 2013), 而黑色素是昆虫体色多样性形成过程中至关重要的色素, 黑色素的合成是通过酚氧化酶激活系统实现的, 在许多生物过程中都是至关重要的, 包括先天免疫、硬化和色素沉积途径 (Zhan *et al.*, 2010)。影响 ROS 的酶类主要有: 多酚氧化酶 (Polyphenol oxidase,

PPO)、过氧化物酶 (Peroxidase, POD)、过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 和超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) (Marusek *et al.*, 2006)。其中, PPO 在黑化过程中具有重要作用, 它包含 3 种酶: 酪氨酸酶、漆酶、儿茶酚酶。对于食药菌的褐变主要表现为酶促褐变, 底物 (酚类物质)、酶和 ROS 是酶促褐变形成的 3 个关键因素。与酶促褐变相关的酶类主要有 PPO、POD、CAT、SOD (Khettal *et al.*, 2017; Moon *et al.*, 2020)。此外, 丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 和过氧化氢 (H_2O_2) 也影响活性氧代谢及酚类物质代谢, H_2O_2 是影响细胞膜透性的主要因子, 而 MDA 含量通常作为脂质过氧化的指标, 是氧化应激引起的, 反映膜结构损伤和组织衰老水平。由于冬虫夏草为虫菌共同体, 因此昆虫免疫耐受力相关酶也可能影响冬虫夏草虫体颜色变化。其中, 昆虫免疫耐受力相关酶主要有胰蛋白酶 (Trypsin, TRY)、淀粉酶 (Amylase, AMY)、蔗糖酶 (Invertase, INV)、脂肪酶 (Lipase, LIP)、抗菌肽 (Attacin, ATT)。本研究通过对人工培植冬虫夏草僵虫进行组织细胞学观察、活性氧代谢相关酶活性及昆虫免疫耐受力相关酶活性的检测, 探究冬虫夏草僵虫颜色变化相关生理指标变化, 为进一步解析冬虫夏草虫体颜色变化成因和解决人工培植过程中的品质问题提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 供试材料

野生冬虫夏草僵虫 (WT), 于四川康定采集获得。重庆常规人工培植冬虫夏草僵虫 (CQ) 和重庆人工培植饲喂胡萝卜冬虫夏草僵虫 (H), 均由重庆市中药研究院冬虫夏草研究所实验室

冬虫夏草人工培植提供, 饲养温度为 $(8 \pm 1) ^\circ\text{C}$, 湿度为 $50\% \pm 5\%$, 无光照。重庆常规人工培植冬虫夏草僵虫 (CQ) 是重庆室内人工模拟天然冬虫夏草产区环境所培植, 重庆人工培植饲喂胡萝卜冬虫夏草僵虫 (H) 是重庆室内人工模拟天然冬虫夏草产区环境用胡萝卜饲喂所培植。

1.2 试验方法

1.2.1 组织细胞学鉴定 取野生冬虫夏草僵虫 (WT)、重庆常规人工培植冬虫夏草僵虫 (CQ) 和重庆人工培植饲喂胡萝卜冬虫夏草僵虫 (H) 经 1 mol 几丁质酶浸泡降解表皮角质层、几丁质层 30 min, 置于 2% 戊二醛固定液中固定 24 h, 经梯度酒精 (70%、75%、85%、90% 和 100% 酒精各 30 min) 脱水, 再放入酒精与二甲苯混合液 (体积比 1:1) 中浸泡 15 min, 随后放入二甲苯中浸泡 30 min。待样品完全透明后, 将其放入二甲苯与石蜡混合液中浸泡 10 min, 最后放入软蜡和硬蜡中各 30 min, 冷却凝固。将石蜡包埋的样品经石蜡切片机进行切片, 每个组织切片厚度为 5-7 μm , 放于载玻片制片、37 $^\circ\text{C}$ 过夜烤片、HE 染色, 树胶封片、光学显微镜 (Nikon microscope) 下观察样品的组织细胞学结构并拍照。

1.2.2 待测液提取 将 -80 $^\circ\text{C}$ 保存的待测僵虫置于已用液氮预冷过的研钵中, 加入液氮研磨成粉末状, 准确称取 0.1 g 粉末, 加入 900 μL PBS 缓冲液进行匀浆, 8 000 g 4 $^\circ\text{C}$ 离心 10 min, 取上清液用于酶活性及相关含量分析, 置冰上待测。

1.2.3 抗氧化酶活性、免疫耐受力相关酶活性、MDA 及 H_2O_2 含量测定 PPO 酶活性、SOD 酶活性、CAT 酶活性、POD 酶活性、TRY 酶活性、AMY 酶活性、INV 酶活性、LIP 酶活性、ATT 活性、MDA 含量及 H_2O_2 含量测定, 均按照上海臻科生物科技有限公司 ELISA 检测试剂盒说明书进行。即按照试剂盒说明书步骤检测待测上清液样品的酶活性、MDA 及 H_2O_2 含量, 重复 3 次, 在 Excel 工作表中, 以标准品浓度为横坐标, 对应 OD 值为纵坐标, 绘制出标准品线性回归曲线, 根据样品的 OD 值由标准曲线获得相应的浓度, 再乘以稀释倍数, 即为样品的实际浓度。

1.3 数据分析

采用 Microsoft Excel 2020 进行数据整理及作图, 运用 SPSS19.0 软件对数据进行显著性分析。统计分析采用 Student's *T*-test, 数据值为平均值 $\pm$ 标准误。

2 结果与分析

2.1 人工培植虫草僵虫组织细胞学分析

对重庆室内不同饲喂方式培植的虫草僵虫和四川康定采集到的野生僵虫进行组织细胞学鉴定, 重庆室内培植虫草僵虫颜色深于野生僵虫和饲喂胡萝卜虫草僵虫 (图 1: A)。对僵虫纵切, 经 HE 染色后发现, 与 WT 相比, CQ 和 H 的细胞间隙增大、组织结构更加松散 (图 1: B, D, F)。对 WT、CQ 和 H 的虫体浅表层细胞组织 HE 染色发现, 与 WT 相比, CQ 和 H 的细胞组织密度变大 (图 1: C, E, G)。

2.2 人工培植虫草僵虫活性氧代谢相关酶活性变化

对重庆室内不同饲喂方式培植的虫草僵虫和四川康定采集到的野生僵虫体内活性氧代谢相关酶活性 (PPO、SOD、CAT、POD) 进行检测。结果表明, 与野生虫草僵虫相比, 重庆室内培植虫草僵虫和饲喂胡萝卜虫草僵虫的 PPO、SOD、POD 酶活性增加, 而 CAT 含量降低, 其中 SOD 酶活力显著增加 (图 2)。与野生虫草僵虫活性氧代谢相关酶活性相比, 重庆人工培植饲喂胡萝卜冬虫夏草僵虫活性氧代谢相关酶活性变化最显著, PPO 与 SOD 酶活性分别增加 37.19% 和 23.98% (图 2: B, C)。由此表明, 不同饲喂方式的虫草僵虫活性氧代谢相关酶活性变化具有显著差异 ($P < 0.01$)。

2.3 人工培植虫草僵虫 MDA 和 H_2O_2 含量变化

重庆室内不同饲喂方式培植的虫草僵虫及四川康定采集到的野生僵虫的 MDA 和 H_2O_2 含量如图 3 所示。与野生虫草僵虫相比, 重庆室内培植虫草僵虫和饲喂胡萝卜虫草僵虫的 MDA 和 H_2O_2 含量显著降低。

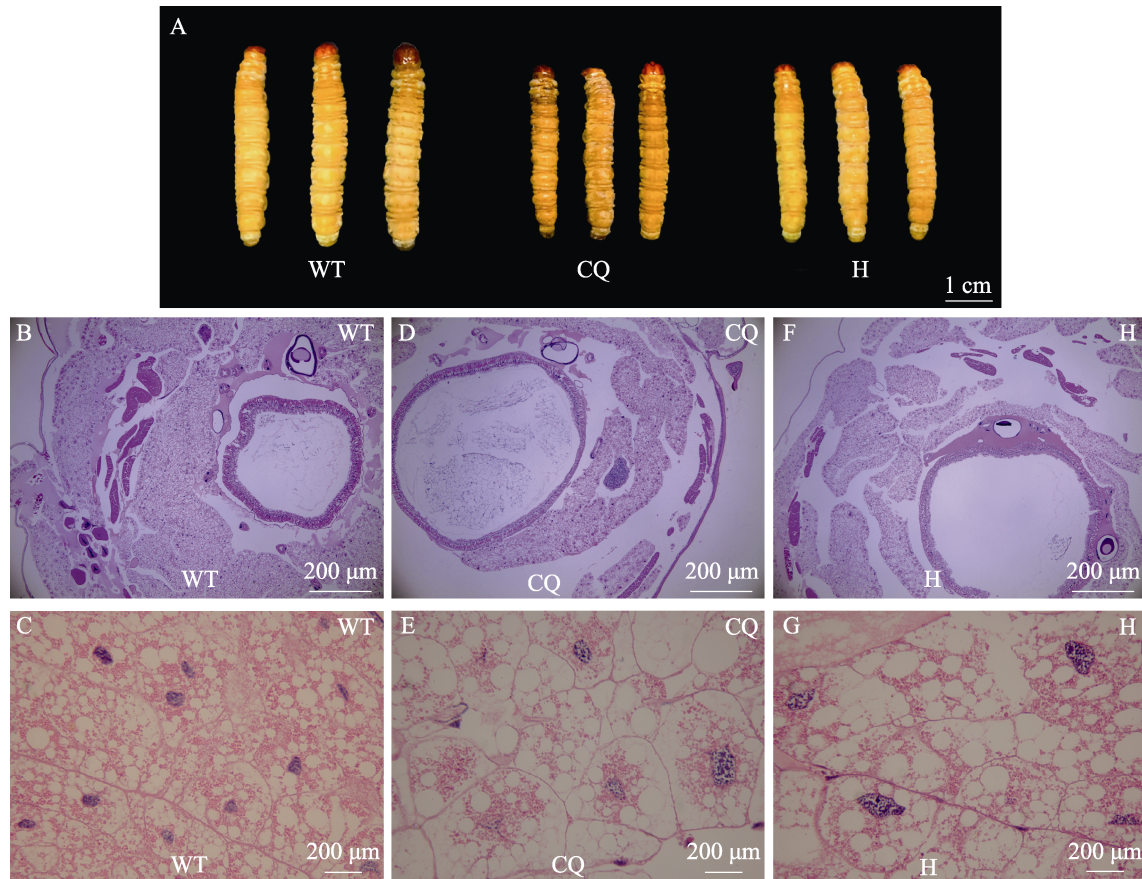


图 1 人工培植虫草僵虫组织细胞学分析

Fig. 1 Histological analysis of the artificially-cultivated *Ophiocordyceps sinensis* at the sclerotium before stroma development stage

A. 人工培植虫草僵虫表型鉴定; B. WT 组织纵切 HE 染色; C. WT 虫体浅表层细胞组织 HE 染色; D. CQ 组织纵切 HE 染色; E. CQ 虫体浅表层细胞组织 HE 染色; F. H 组织纵切 HE 染色; G. H 虫体浅表层细胞组织 HE 染色。

WT: 野生冬虫夏草僵虫; CQ: 重庆常规人工培植冬虫夏草僵虫; H: 重庆人工培植饲喂胡萝卜冬虫夏草僵虫。下图同。

A. Phenotypic analysis of the artificially-cultivated *Ophiocordyceps sinensis* at the sclerotium before stroma development stage; B. Longitudinal sections (HE staining) of WT; C. The HE staining of body wall surface of WT; D. Longitudinal sections (HE staining) of CQ; E. The HE staining of body wall surface of CQ; F. Longitudinal sections (HE staining) of H; G. The HE staining of body wall surface of H.

WT: The sclerotium before stroma development of wild *Ophiocordyceps sinensis*; CQ: The sclerotium before stroma development of Chongqing artificially cultivated *Ophiocordyceps sinensis*; H: The sclerotium before stroma development of carrot fed Chongqing artificially cultivated *Ophiocordyceps sinensis*. The same below.

2.4 人工培植虫草僵虫免疫耐受力相关酶活性变化

利用 ELISA 方法检测重庆室内不同饲喂方式培植的虫草僵虫及四川康定采集到的野生僵虫的昆虫免疫耐受力相关酶活性 (TRY、AMY、INV、LIP、ATT)。研究发现, 与野生虫草僵虫相比, 重庆室内培植虫草僵虫和饲喂胡萝卜虫草僵虫的 TRY、AMY、INV、LIP、ATT 酶活性均增加, 其中 AMY 与 LIP 酶活力显著增加(图 4)。

由此表明, 人工室内培植的虫草僵虫的免疫耐受力有所提高。

3 讨论

冬虫夏草是一种富含多种营养和活性成分的珍稀食药真菌, 而人工培植的冬虫夏草颜色呈棕褐色, 其颜色变化问题亟待解决。由于冬虫夏草为虫菌共同体, 其颜色变化可能受虫和菌共同调控 (Moon *et al.*, 2020; 高云等, 2020)。目

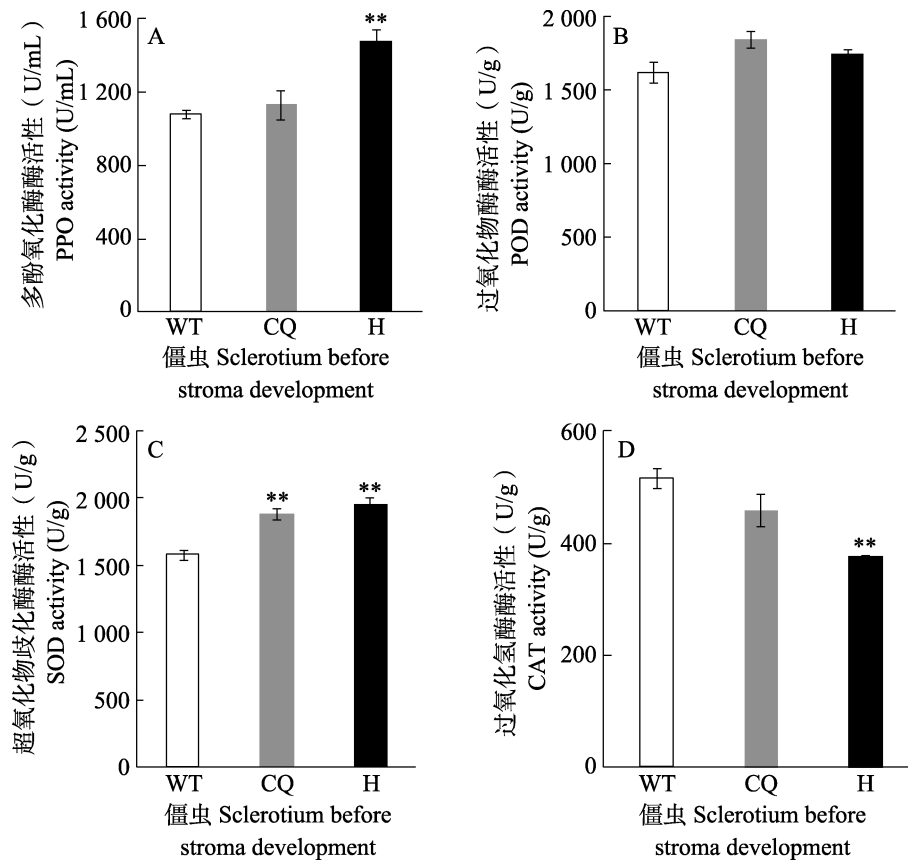


图2 人工培植虫草僵虫活性氧化代谢相关酶活性变化

Fig. 2 Changes of the enzyme activity related to reactive active oxygen metabolism of the artificially cultivated *Ophiocordyceps sinensis* at the sclerotium before stroma development stage

A. 多酚氧化酶 (PPO); B. 过氧化物酶 (POD); C. 超氧化物歧化酶 (SOD);

D. 过氧化氢酶 (CAT)。**代表差异极显著 ($P < 0.01$)。

A. Polyphenol oxidase (PPO); B. Peroxidase (POD); C. Superoxide dismutase (SOD);

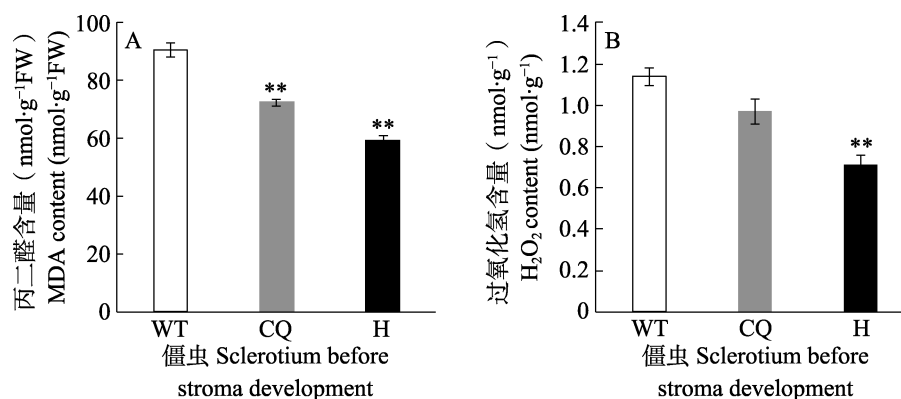
D. Catalase (CAT). ** stands for extremely significant difference ($P < 0.01$).

图3 人工培植虫草僵虫丙二醛和过氧化氢含量变化

Fig. 3 MDA and H₂O₂ content of the artificially-cultivated *Ophiocordyceps sinensis* at the sclerotium before stroma development stageA. 丙二醛 (MDA); B. 过氧化氢 (H₂O₂)。**代表差异极显著 ($P < 0.01$)。A. Malondialdehyde, (MDA); B. Hydrogen peroxide, (H₂O₂).** stands for extremely significant difference ($P < 0.01$).

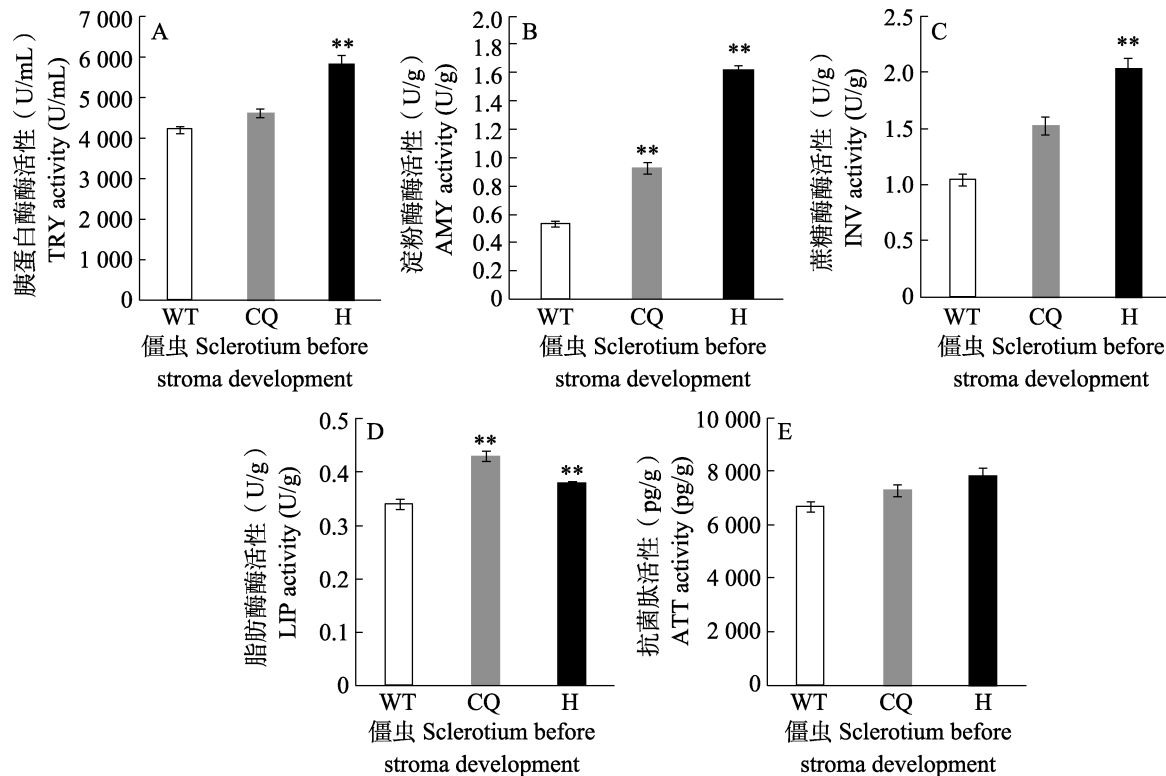


图4 人工培植虫草僵虫免疫耐受力相关酶活性变化

Fig. 4 Changes of the enzyme activity related to immune tolerance of the artificially-cultivated *Ophiocordyceps sinensis* at the sclerotium before stroma development stage

A. 胰蛋白酶 (TRY); B. 淀粉酶 (AMY); C. 蔗糖酶 (INV); D. 脂肪酶 (LIP);

E. 抗菌肽 (ATT)。**代表差异极显著 ($P < 0.01$)。

A. Trypsin, (TRY); B. Amylase, (AMY); C. Ivertase, (INV); D. Lipase, (LIP); E. Attacin, (ATT).

** stands for extremely significant difference ($P < 0.01$).

前关于昆虫体色研究机制的解释较为清楚的是鳞翅目家蚕 *Bombyx mori*。家蚕作为鳞翅目昆虫的代表,已有多个黑色素合成信号通路基因的功能被报道,如 *TH* (酪氨酸羟化酶)、*DDC* (多巴脱羧酶)、*yellow/laccase2* (漆酶)、*AA-NAT* (芳基烷基胺-N-乙酰基转移酶)等 (Hiruma and Riddiford, 2009; Liu *et al.*, 2010; 高云等, 2020)。对于食药菌 (如双孢蘑菇、金针菇、猴头菇等菇类) 褐变的解释为酶促褐变,酶促褐变是组织中的酚类物质在 PPO 的作用下氧化形成醌类,醌类聚合形成褐色物质从而导致组织变色 (Moon *et al.*, 2020)。PPO 属于含有 2 个铜原子的氧化还原酶,当氧分子存在时,它作为底物催化酚类化合物, PPO 催化 2 种不同的反应,一种是单酚羟基化反应生成邻苯二酚,另一种是邻苯二酚氧化生成邻醌,从而形成黑色或棕色的色

素 (Marusek *et al.*, 2006; Gawlik-Dziki *et al.*, 2007)。根据前人研究发现,无论是探究昆虫颜色变化涉及的色素沉积,还是探究食药菌颜色变化涉及的酶促褐变,这些都与活性氧代谢密切相关 (Marusek *et al.*, 2006; Cunha *et al.*, 2012; Jenkins and Grossman, 2013)。本研究利用 ELISA 方法检测人工培植冬虫夏草僵虫活性氧代谢相关酶活性、MDA 及 H_2O_2 含量,与野生虫草僵虫相比,重庆室内培植虫草僵虫和饲喂胡萝卜虫草僵虫的 PPO、SOD、POD 酶活性增加,而 CAT 含量降低,其中 SOD 酶活力显著增加,由此表明人工培植虫草僵虫的褐变程度高于野生虫草僵虫, SOD 可能是人工培植冬虫夏草僵虫褐变的关键酶; MDA 和 H_2O_2 含量显著降低,由此表明,人工室内培植虫草僵虫的氧化应激反应更弱,反映出的膜结构损伤和组织衰老水平更低。

冬虫夏草为虫菌共生体, 昆虫免疫耐受力相关酶也可能影响冬虫夏草褐变 (Zhan *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2019)。本研究以胰蛋白酶 (TRY)、淀粉酶 (AMY)、蔗糖酶 (INV)、脂肪酶 (LIP)、抗菌肽 (ATT) 作为评价僵虫免疫耐受性指标。胰蛋白酶是蛋白水解酶, 属于丝氨酸蛋白酶家族, 胰蛋白酶专一作用于精氨酸赖氨酸的羧基所形成的肽键, 研究表明胰蛋白酶对类黄酮 (酚类物质) 清除自由基能力的削弱作用, 可能也会引起其他相关生物活性的减弱 (赵红辉, 2012)。淀粉酶和蔗糖酶均是将糖类大分子物质分解为易于吸收的葡萄糖小分子, 淀粉酶和蔗糖酶活性的变化影响酶促反应的效率 (孙文颖等, 2019)。脂肪酶是催化甘油酯水解的一类酶的总称, 大部分脂肪酶的活性部位是由一个丝氨酸、一个组氨酸和一个天冬氨酸的残基 (Ser-His-Asp) 组成的“催化三联体” (Houde *et al.*, 2004)。抗菌肽可作为免疫效应分子来启动、调节宿主免疫防御体系, 发挥免疫功能, 抗菌肽能够提抗氧化能力的报道很多。抗菌肽发挥其作用主要通过 2 种途径, 一种是胞膜渗透作用, 形成跨膜孔道, 破坏细胞膜的完整性; 另一种是抗菌肽直接进入细菌胞内, 作用于胞内的特定靶点 (Chen *et al.*, 2006; 康媛媛等, 2021)。利用 ELISA 方法检测人工培植冬虫夏草僵虫免疫耐受力相关酶活性, 研究发现, 人工室内培植虫草僵虫免疫耐受力相关酶的酶活性均增加, 其中 AMY 与 LIP 酶活力显著增加, 由此表明人工室内培植的虫草夏草僵虫的免疫耐受力有所提高, 进而影响酶促反应效率, 改变虫草颜色。综合分析, 人工培植冬虫夏草僵虫褐变与活性氧代谢、免疫耐受力代谢相关。

参考文献 (References)

- Cunha ES, Kawahara R, Kadowaki MK, Amstaldena HG, Noletoa GR, Cadenaa SM, Winnischofera SM, Martinez GR, 2012. Melanogenesis stimulation in B16-F10 melanoma cells induces cell cycle alterations, increased ROS levels and a differential expression of proteins as revealed by proteomic analysis. *Experimental Cell Research*, 318(15): 1913–1925.
- Chen X, Niyonsaba F, Ushio H, Nagaoka I, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H, 2006. Human cathelicidin LL-37 increases vascular permeability in the skin via mast cell activation, and phosphorylates MAP kinases p38 and ERK in mast cells. *Journal of Dermatological Science*, 43(1): 63–66.
- Dokhanieh AY, Aghdam MS, 2016. Postharvest browning alleviation of *Agaricus bisporus* using salicylic acid treatment. *Scientia Horticulturae*, 207(10): 146–151.
- Gao Y, Liang YT, Liu YQ, Xu YS, Wang HB, 2020. Research progress in pigmentation and the formation mechanisms of black stripes and spots on the body in insects. *Acta Entomologica Sinica*, 63(10): 112–119. [高云, 梁燕婷, 留怡勤, 徐豫松, 王华兵, 2020. 昆虫着色及体表黑色斑纹和斑点形成机制研究进展. *昆虫学报*, 63(10): 112–119.]
- Gawlik-Dziki U, Szymanowska U, Baraniak B, 2007. Characterization of polyphenol oxidase from broccoli (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*) florets. *Food Chemistry*, 105(3): 1047–1053.
- Hiruma K, Riddiford LM, 2009. The molecular mechanisms of cuticular melanization: The ecdysone cascade leading to dopa decarboxylase expression in *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(4): 245–253.
- Houde A, Kademi A, Leblanc D, 2004. Lipase their biochemistry and applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 118(3): 155–170.
- Jenkins NC, Grossman D, 2013. Role of melanin in melanocyte dysregulation of reactive oxygen species. *BioMed Research International*, 2013(22): 908797.
- Kang YY, Meng J, Wang YY, Zhang SB, 2021. Research progress on functional characteristics and mechanism of antimicrobial peptides. *Food Science and Technology*, 46(1): 265–270. [康媛媛, 孟珺, 王艳阳, 章绍兵, 2021. 抗菌肽功能特性与作用机制的研究进展. *食品科技*, 46(1): 265–270.]
- Khettal B, Kadri N, Tighilet K, Adjebl A, Dahmoune F, Maiza-Benabdeslam F, 2017. Phenolic compounds from Citrus leaves: Antioxidant activity and enzymatic browning inhibition. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 14(1): 1–13.
- Kim S, 2020. Antioxidant compounds for the inhibition of enzymatic browning by polyphenol oxidases in the fruiting body extract of the edible mushroom. *Hericium erinaceus*. *Foods*, 9(7): 951.
- Li Y, Wang XL, Jiao L, Jiang Y, Li H, Jiang SP, Lhosumtseiring N, Fu SZ, Dong CH, Zhan Y, Yao YJ, 2011. A survey of the geographic distribution of *Ophiocordyceps sinensis*. *Journal of Microbiology*, 49(6): 913–919.
- Liu C, Yamamoto K, Cheng TC, Kadono K, Narukawa J, Liu SP, Han Y, Futahashi R, Kidokoro Ku, Noda H, Kobayashi I, Tamura T, Ohnuma A, Banno Y, Dai FY, Xiang ZH, Goldsmith MR, Mita K, Xia QY, 2010. Repression of tyrosine hydroxylase is

- responsible for the sex-linked chocolate mutation of the silkworm, *Bombyx mori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(29): 12980–12985.
- Magae Y, Sunagawa M, 2010. Characterization of a mycovirus associated with the brown discoloration of edible mushroom, *Flammulina velutipes*. *Virology Journal*, 7(1): 342.
- Marusek CM, Trobaugh NM, Flurkey WH, Inlow JK, 2006. Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100(1): 108–123.
- Moon KM, Kwon EB, Lee B, Kim CY, 2020. Recent trends in controlling the enzymatic browning of fruit and vegetable products. *Molecules*, 25(12): 2754.
- Qian ZM, Li WQ, Sun MT, Liu XZ, Liu EW, Li WJ, 2016. Analysis of chemical compounds in Chinese cordyceps. *Mycosystema*, 35(4): 476–490. [钱正明, 李文庆, 孙敏甜, 刘杏忠, 李二伟, 李文佳, 2016. 冬虫夏草化学成分分析. 菌物学报, 35(4): 476–490.]
- Shamim G, Ranjan SK, Pandey DM, Ramani R, 2014. Biochemistry and biosynthesis of insect pigments. *European Journal of Entomology*, 11(1): 149–164.
- Sun WY, Ma WW, Li G, Wu JQ, Xu YZ, 2019. Dynamic characteristics of soil sucrase and amylase activities during vegetation degradation in Gahai wetland. *Acta Agrestia Sinica*, 27(1): 88–96. [孙文颖, 马维伟, 李广, 吴江琪, 许延昭, 2019. 尕海湿地植被退化过程中土壤蔗糖酶和淀粉酶活性的动态特征. 草地学报, 27(1): 88–96.]
- Wei YQ, Zhang L, Wang WW, Niyati N, Guo YL, Wang XF, 2021. Chinese caterpillar fungus (*Ophiocordyceps sinensis*) in China: Current distribution, trading, and futures under climate change and overexploitation. *Science of the Total Environment*, 755(1): 142548.
- Wei L, Jiang QY, Cai ZQ, Yu WC, He C, Guo W, Wang XT, 2019. Immune-related molecular and physiological differences between black-shelled and white-shelled Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Fish & Shellfish Immunology*, 92(9): 64–71.
- Zhao J, Xie J, Wang LY, Li SP, 2014. Advanced development in chemical analysis of *Cordyceps*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87(1): 271–289.
- Zhan S, Guo QH, Li MH, Li MW, Li JY, Miao XX, Huang YP, 2010. Disruption of an N-acetyltransferase gene in the silkworm reveals a novel role in pigmentation. *Development*, 137(23): 4083–4090.
- Zhao HH, 2012. Research on the interaction between flavonoids and trypsin. Master dissertation. Guangzhou: South China University of Technology. [赵红辉, 2012. 类黄酮与胰蛋白酶相互作用特性的研究. 硕士学位论文. 广州: 华南理工大学.]