

D-氨基酸诱导的酿酒酵母细胞内活性氧的累积^{*}

刘庆菊,何裕建,吴 丽[†],李向军[†]
(中国科学院大学化学科学学院,北京 101408)
(2017 年 3 月 20 日收稿;2017 年 5 月 16 日收修改稿)

Liu Q J, He Y J, Wu L, et al. Reactive oxygen species accumulation induced by D-amino acid in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of University of Chinese Academy of Sciences, 2018,35(4):473-480.

摘 要 D-氨基酸在食品中广泛存在。研究 D-氨基酸诱导的酿酒酵母细胞内的活性氧的累积及其生物损伤。实验结果显示 D-氨基酸抑制细胞生长,引起细胞内 H₂O₂ 含量的升高,导致细胞内过氧化氢酶和过氧化物酶的活性增强。该结果表明 H₂O₂ 是 D-氨基酸诱导产生的活性氧的主要类型,氧化损伤是 D-氨基酸对酿酒细胞毒性的主要机制。
关键词 D-氨基酸;酿酒酵母;活性氧;过氧化氢
中图分类号:TS201.3 **文献标志码**:A **doi**:10. 7523/j. issn. 2095-6134. 2018. 04. 008

Reactive oxygen species accumulation induced by D-amino acid in *Saccharomyces cerevisiae*

LIU Qingju, HE Yujian, WU Li, LI Xiangjun
(School of Chemical Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101408, China)

Abstract D-amino acids occur widely in food. Reactive oxygen species accumulation and biochemical damage caused by D-amino acids to *Saccharomyces cerevisiae* are evaluated. The results show that cell growth is inhibited and level of H₂O₂ increases after exposure to D-amino acids, which leads to high levels of catalase and peroxidase activities. All these facts suggest that hydrogen peroxide is the main ROS induced by D-amino acids and oxidative damage is the primary mechanism by which D-amino acids exert toxic effect on *Saccharomyces cerevisiae* cells.
Keywords D-amino acid; *Saccharomyces cerevisiae*; reactive oxygen species; hydrogen peroxide

活性氧(ROS)是细胞代谢的副产物^[1]。内外条件的急剧变化都会使生物体内产生大量的活性氧,形成氧化损伤^[2]。ROS 包括超氧化物阴离子(O₂⁻),过氧化氢(H₂O₂)和羟自由基(HO[·])等。生理条件下,低水平的 ROS 在免疫应答、信号转导、基因表达等生物学功能中起到重要作用。但是高水平的 ROS 能够引起蛋白质、脂质和核酸的损伤^[3]。

由于具有真核细胞生命活动的基本特征,又具有微生物实验过程中的优势,如样品易得、生长周期短、易于操作等;因此,酿酒酵母(*S. cerevisiae*)是一种理想生物研究模型^[1,3]。实验研究表明营养和环境因素的刺激能够诱导发酵中的酵母产生 ROS。与此同时,酵母细胞具有一系列

^{*} 国家自然科学基金(21272263)资助
[†] 通信作者,E-mail:wuli@ucas.ac.cn;lixiangj@ucas.ac.cn

应对 ROS 的酶和非酶系统^[4-5]。

食品中大多数氨基酸是以 L-氨基酸的形式存在。作为肽链和蛋白质的合成原料,L-氨基酸是生物体内的关键代谢中间体^[6]。然而,研究表明食品中存在着大量的 D-氨基酸。食品中的 D-氨基酸来自食品加工过程及微生物代谢^[7-9]。由于其结构的相似性,D-氨基酸能够模拟 L-氨基酸的细胞功能,抑制细胞生长^[10]。事实上,大量研究对 D-氨基酸对细胞生长的抑制作用进行了报道^[11-13]。生物体内,D-氨基酸的代谢是由消旋酶/异构酶和 D-氨基酸氧化酶/D-天冬氨酸氧化酶来完成的^[14]。作为 D-氨基酸的主要代谢途径,D-氨基酸氧化酶/D-天冬氨酸氧化酶能够将 D-氨基酸的氨基氧化生成相应的 α -酮酸、 NH_3 和 H_2O_2 ^[15]。而 H_2O_2 是一种常见的 ROS。

综上所述,尽管研究者们对 D-氨基酸进行了大量研究,但是 D-氨基酸细胞毒性的分子机制的研究仍然缺乏。D-氨基酸诱导的酵母细胞中活性氧的累积和清除,及其对细胞组分的损伤并未见报道。因此,本文研究 D-氨基酸的生物化学毒性。我们检测活性氧的含量、脂质过氧化程度、抗氧化酶的活性及抗氧化物的含量以评估 D-氨基酸氧化酶的细胞毒性。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

实验所用的试剂是分析纯。所有溶液用超纯水配制。葡萄糖购自北京化工厂,YNB(无氨基酸酵母氮源)购自 BD Difco,马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA),酵母抽提物和胰蛋白胍购自 OXID。所有的氨基酸购自 J&K Chemical。还原型谷胱甘肽、NADPH 和谷胱甘肽还原酶(GR)购自北京索莱宝公司。其他试剂从 Macklin 公司购买。

1.2 菌株及培养条件

ATCC4126 酵母菌接种到 YPD 培养基(10 g/L 酵母抽提物; 20 g/L 胰蛋白胍; 20 g/L 葡萄糖)中培养,30 ℃ 培养到指数生长期。将指数生长期的菌液接种到含有不同浓度 L-氨基酸和 D-氨基酸的合成培养基(6.7 g/L YNB 和 20 g/L glucose)上培养。所有的培养基在 121 ℃ 下灭菌 20 min。葡萄糖 115 ℃ 下单独灭菌 20 min 后加入。L-氨基酸和 D-氨基酸用 0.25 μm 滤膜(Sartorius Stedim Biotech S. A., Aubagne, France)过滤后加入到培

养基中。细胞置于摇床(30 ℃, 200 rpm, SPH-110A)中培养 24 h 后收集酵母细胞,测定 600 nm 处的吸光度。

菌液离心(4 ℃, 12 000 g)10 min 后收集细胞,用灭菌水冲洗细胞两次,低温储存备用。

1.3 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的含量

$\text{O}_2^{\cdot-}$ 含量的检测基于亚硝酸盐的生成量^[16]。将细胞悬浮在含 1 mmol/L EDTA,相对体积质量为 1% 的聚乙烯吡咯烷酮(PVP)的磷酸缓冲溶液(50 mmol/L, pH 7.8)中。12 000 g 离心 10 min 后,弃沉淀,依次向上清液中加入 0.5 mL 磷酸缓冲溶液(50 mmol/L, pH 7.8),0.1 mL 盐酸羟胺(10 mmol/L)。反应物在 25 ℃ 水浴 10 min 后,加入 1 mL α -萘胺(7 mmol/L)和 1 mL 磺胺(58 mmol/L)。25 ℃ 孵育 30 min 后,使用紫外分光光度计(Shimazu, UV-2550)测定 530 nm 处的吸光度。

$$\text{O}_2^{\cdot-} \text{ 含量 } (\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}) = \frac{A_{\text{样}} - A_{\text{对}}}{0.001 \times \text{加样量} \times \text{蛋白浓度} \times 1 \text{ min}}$$

1.4 H_2O_2 含量测定

H_2O_2 的检测方法参照文献^[16]。将细胞悬浮在 2.5 mL 相对体积质量为 3% 的三氯乙酸溶液中,破碎,离心(4 ℃, 12 000 g)10 min 后,将 1 mL 上清液加入到 1 mL 磷酸缓冲溶液中,加入 2 mL 1 mol/L 碘化钾。测定 390 nm 处的吸光度,根据之前测得标准曲线计算 H_2O_2 的含量。

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 含量 } (\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}) = \frac{\text{H}_2\text{O}_2 (\text{nmol})}{\text{细胞鲜重} (\text{mg}) \times 1 \text{ min}}$$

1.5 脂质过氧化分析

脂质过氧化水平是通过检测 MDA 的生成量完成的^[1]。将细胞悬浮在相对体积质量为 10% 的三氯乙酸中,超声破碎,保护温度为 4 ℃。离心(4 ℃, 12 000 g)10 min 后,向上清中加入同等体积相对体积质量为 0.5% 的硫代巴比妥酸。样品沸水浴 15 min 后,迅速置于冰上终止反应。冷却后,分别记录 450、532 和 600 nm 处的吸光度。MDA 的浓度表示为 $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ 。

$$\text{MDA} (\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}) = [6.452 \times (A_{532} - A_{600}) - 0.559 \times A_{450}] \times \frac{V_1/V_s}{\text{FW}},$$

式中: A_{450} 为 450 nm 处的吸光度; A_{532} 为 532 nm 处

的吸光度; A_{600} 为 600 nm 处的吸光度; V_t (mL) 为总体积; V_s (mL) 为样品体积;FW 为细胞鲜重。

1.6 抗氧化酶活性测定

细胞重悬于含 1 mmol/L EDTA 和 1% PVP 的磷酸缓冲溶液(50 mmol/L, pH 7.8)中,超声破碎。离心(4 ℃, 12 000 g)10 min 后,上清即为粗酶液。蛋白质含量的测定是采用 Bradford 法,用牛血清白蛋白作为标准。

超氧化物歧化酶(SOD)活性测定采用的是邻苯三酚自氧化法^[17]。向 5.0 mL Tris-HCl 缓冲液(10 mmol/L, pH 8.1)加入 100 μ L 酶提取液后,25 ℃ 孵育 20 min。向反应体系加入 100 μ L 邻苯三酚(8.14 mmol/L,用盐酸溶解),迅速混匀后,记录 3 min 内间隔 30 s 的 325 nm 处的吸光度。一个 SOD 活力单位(U)定义为 SOD 自氧化抑制率为 50% 时,所对应的 SOD 量,表示为 $U \cdot mg^{-1} \cdot FW^{-1}$ 。

$$SOD \text{ 活性}(U \cdot mg^{-1} \cdot FW^{-1}) = \frac{\text{自氧化速率} - \text{样品速率}}{50\% \times \text{加酶量} \times \text{蛋白浓度}}$$

过氧化氢酶(CAT)活性检测采用的是钼酸铵比色法^[18]。含 1 mL 60 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH 7.0),1 mmol/L H_2O_2 和 0.2 mL 粗酶液的反应体系 25 ℃ 孵育 1 min 后,加入 1.0 mL 32.4 mmol/L 钼酸铵,定容到 10 mL 后测定 405 nm 处的吸光度。

$$CAT \text{ 活性}(U \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}) = \frac{A_{\text{标}} - A_{\text{测}}}{\text{蛋白质浓度} \times 1 \text{ min}} \times \frac{C(H_2O_2) \times V(H_2O_2)}{\text{加酶量} \times 1 \mu mol}$$

过氧化物酶(POD)活性的检测采用的是愈创木酚法^[19]。向含有 0.02 mL 愈创木酚和 0.01 mL 过氧化氢和磷酸缓冲溶液(pH 7.0)的 3 mL 反应体系中加入 0.02 mL 的酶提取液,记录 5 min 之内 470 nm 处的吸光度。

$$POD \text{ 活性}(U \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}) = \frac{\Delta A_{470}}{0.01 \times \text{加酶量} \times \text{蛋白浓度} \times 1 \text{ min}}$$

1.7 抗氧化剂含量测定

细胞重悬于含 5% 三氯乙酸溶液,离心(4 ℃, 12 000 g)10 min 后进行抗坏血酸(ASA)和谷胱甘肽(GSH)含量的测定。

ASA 含量的测定采用之前报道的方法^[20]。反应体系(3 mL)含 200 mmol/L NaAc-HAc 缓冲溶液(pH 4.75),200 μ L 上清液,0.75 mL 100 mg/

L $FeCl_3$,1 mL 相对体积质量为 1% 的 2,2-联吡啶和 0.5 mL 相对体积质量为 1% 的 NaF。37 ℃ 反应 1 h 后测定 525 nm 处的吸光度,根据之前建立好的标准曲线计算样品中 ASA 的含量。

$$ASA \text{ 含量}(mg \cdot g^{-1}) = \frac{ASA(mg)}{\text{细胞鲜重}(g)}$$

还原型谷胱甘肽含量采用 Teare 报道的方法^[21]。1 mL 的反应体系中包含磷酸缓冲溶液(100 mmol/L, pH 7.4)100 μ L 上清液,50 μ L 0.1 mmol/L DTNB,100 μ L NADPH(10 mg/mL),50 μ L 1 U/ μ L 谷胱甘肽还原酶。30 ℃ 反应 10 min 后测定 412 nm 处的吸光度,根据之前建立好的标准曲线计算样品中 GSH 的含量。

$$GSH \text{ 含量}(mg \cdot g^{-1}) = \frac{GSH(mg)}{\text{细胞鲜重}(g)}$$

2 结果与讨论

2.1 D-氨基酸的细胞毒性

为了评估 D-氨基酸对酵母细胞生长的影响,酵母细胞在含有不同浓度纯 L-氨基酸和 D-氨基酸的培养基上进行培养。如图 1 所示,向培养基中加入不同浓度的 L-氨基酸和 D-氨基酸,酵母细胞的生长出现了很大的差异。对 L-精氨酸和 D-精氨酸而言,随着浓度的改变,酵母细胞的生长没有出现明显的改变。L-谷氨酸对酵母细胞的生长有轻微的促进作用,而 D-谷氨酸浓度的增加会对细胞的生长产生较强的抑制作用。与对照相比,随着 L-谷氨酰胺和 D-谷氨酰胺浓度的增加,二者

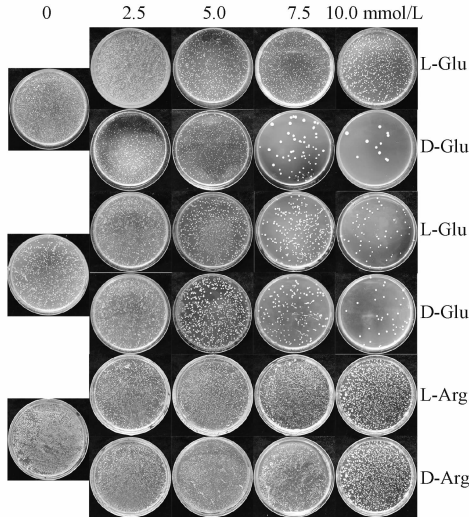


图 1 L-氨基酸和 D-氨基酸对酵母细胞生长的影响
Fig.1 Effects of L-and D-amino acids on cell growth of *Saccharomyces cerevisiae*

都能够明显地抑制酵母细胞生长的生长,并且 D-谷氨酰胺的抑制作用要远远强于 L-谷氨酰胺。总而言之,实验结果表明与 L-氨基酸相比,D-氨基酸能够明显抑制细胞的生长。

图 2 显示培养基中含 10 mmol/L L-氨基酸和 D-氨基酸中酵母细胞的生长情况。与对照相比,丙氨酸、丝氨酸、精氨酸、酪氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸和脯氨酸的 L-构型和 D-构型对细胞生长的影响差异微小。天冬氨酸、天冬酰胺和亮氨酸的 L-异构体和 D-异构体略有差别(小于 20%):L-异构体略微改善细胞生长而 D-异构体明显抑制细胞生长。L-谷氨酸、L-谷氨酰胺、L-色氨酸、L-组氨酸和 L-缬氨酸能够显著促进细胞生长(与对照组相比提高 10%),而在含有其对映异构体的培养基中,酵母细胞的数量则急剧减少(与对照组相比降低 30%)。值得一提的是,L-赖氨酸和 D-赖

氨酸中,OD₆₀₀ 分别下降到 0.04 和 0.03。出乎意料的是,L-半胱氨酸和 D-半胱氨酸培养后细胞的 OD₆₀₀ 分别为 0.112 和 1.868,这表明 L-半胱氨酸对酵母细胞的生长具有极强的抑制作用。通过以上结果可以发现,对于大多数氨基酸而言,L-氨基酸对细胞的生长有益,而 D-氨基酸对细胞生长有害。

2.2 D-氨基酸对细胞内 O₂^{·-} 累积和 H₂O₂ 含量的影响

如图 3(a) 所示,L-氨基酸和 D-氨基酸培养后细胞内 O₂^{·-} 的累积速率趋势不同。大多数氨基酸并没有引起细胞内 O₂^{·-} 含量的增加。然而,D-组氨酸、D-缬氨酸和 D-苏氨酸引起细胞内 O₂^{·-} 的含量大量增加。需要指出的是,L-苏氨酸和 D-苏氨酸都引起细胞内 O₂^{·-} 含量增加。我们推测,D-组氨酸、D-缬氨酸、L-和 D-苏氨酸出现 O₂^{·-} 含量的增加可能是因为除被 D-氨基酸氧化酶氧化脱氨基外,这些氨基酸还存在着其他的代谢途径,如组氨酸通透酶/组氨酸脱氢酶^[22]、二羟基脱水酶/乙酰乳酸合成酶^[23]、苏氨酸脱氢酶^[24] 等,这些代谢途径能够导致 O₂^{·-} 的累积。如图 3(b) 所示,对大多数氨基酸而言,L-异构体培养的细胞内 H₂O₂ 含量与对照组差别不大。与此相反,D-氨基酸处理后,细胞内 H₂O₂ 明显高于 L-氨基酸处理组。例如,L-丙氨酸处理组 H₂O₂ 含量 (nmol⁻¹ · min⁻¹ · mg⁻¹ · FW) 为 0.433,而 D-丙氨酸处理组则达到 1.359。以上数据表明,D-氨基酸培养后细胞内 O₂^{·-} 含量未发生明显改变,而 H₂O₂ 含量则急剧增加,也表明细胞内 ROS 产生-消除机制被

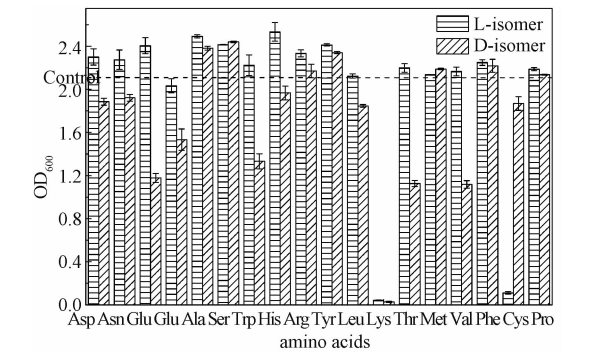


图 2 L-氨基酸和 D-氨基酸 (10 mmol/L) 对酵母细胞生长的影响

Fig. 2 Effects of L-amino acid and D-amino acid (10 mmol/L) on the growth of *Saccharomyces cerevisiae*

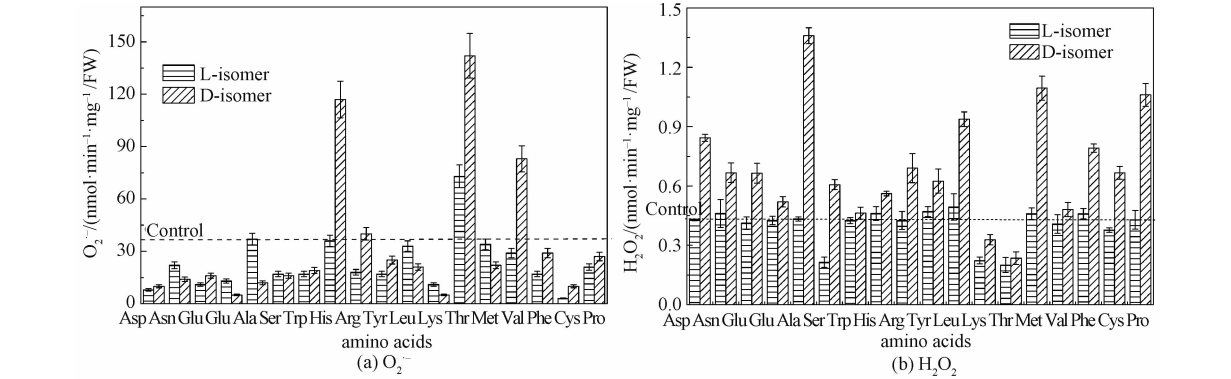


图 3 L-氨基酸和 D-氨基酸 (10 mmol/L) 对酵母细胞内 O₂^{·-} (a) 和 H₂O₂ (b) 含量的影响

Fig. 3 Effects of L-amino acid and D-amino acid (10 mmol/L) on the contents of O₂^{·-} (a) and H₂O₂ (b) in *Saccharomyces cerevisiae*

D-氨基酸破坏。

2.3 D-氨基酸对脂质过氧化的影响

MDA 是脂质过氧化的副产物,能够反映 ROS 导致脂质氧化损伤的程度^[4]。10 mmol/L L-氨基酸和 D-氨基酸培养后细胞内的丙二醛含量见图 4。L-氨基酸处理组的丙二醛含量与对照组无显著差异。然而,随着 D-氨基酸浓度的增加,酵母细胞内的丙二醛含量逐渐增加。以天冬氨酸为例,L-天冬氨酸组的丙二醛含量 ($\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{FW}$) 为 6.30,而 D-天冬氨酸组的丙二醛含量则飙升到 28.73。这表

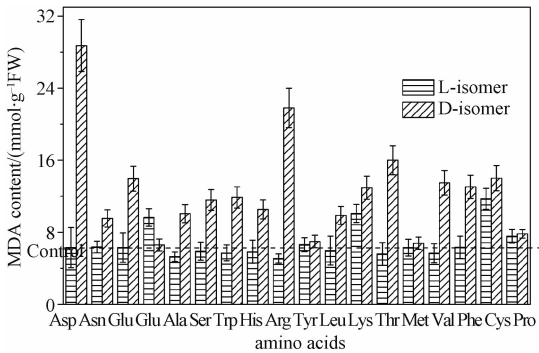


图 4 L-氨基酸和 D-氨基酸 (10 mmol/L) 对酵母细胞内脂质过氧化水平的影响
Fig. 4 Effects of L-amino acid and D-amino acid (10 mmol/L) on the level of lipid peroxidation in *Saccharomyces Cerevisiae*

明 D-氨基酸导致细胞内脂质过氧化程度增加。生理条件下,抗氧化系统能够通过清除 ROS 减少氧化损伤带来的危害,但是过量的未被及时清除的 H_2O_2 能够损伤细胞膜上的脂质^[25]。由于含有大量不饱和脂肪酸,并且疏水膜对氧原子的高溶解性,因此,膜磷脂最易受到自由基攻击^[26]。

2.4 抗氧化酶活性

细胞内存在酶系统来减缓活性氧的损害,维持细胞正常的氧化还原状态。已知在活性氧消除中具有重要作用的酶包括 SOD、POD 和 CAT^[27]。为了进一步评估细胞内 ROS 的积累,我们对酵母细胞内这些酶的活性进行检测。

尽管 L-构型与 D-构型之间存在差异,大多数氨基酸培养后细胞内 SOD 活性与对照组差别不大。然而,L-谷氨酰胺、D-谷氨酰胺、L-丝氨酸、L-组氨酸、D-精氨酸和 D-蛋氨酸的加入改善了 SOD 的活性(图 5(a))。

与此相反,L-氨基酸和 D-氨基酸处理后,酵母细胞内 CAT 的活性差异很大。与 SOD 不同,D-氨基酸培养后酵母细胞内 CAT 活性比 L-氨基酸培养强得多(图 5(b))。D-氨基酸处理后 CAT 的活性大大增强。

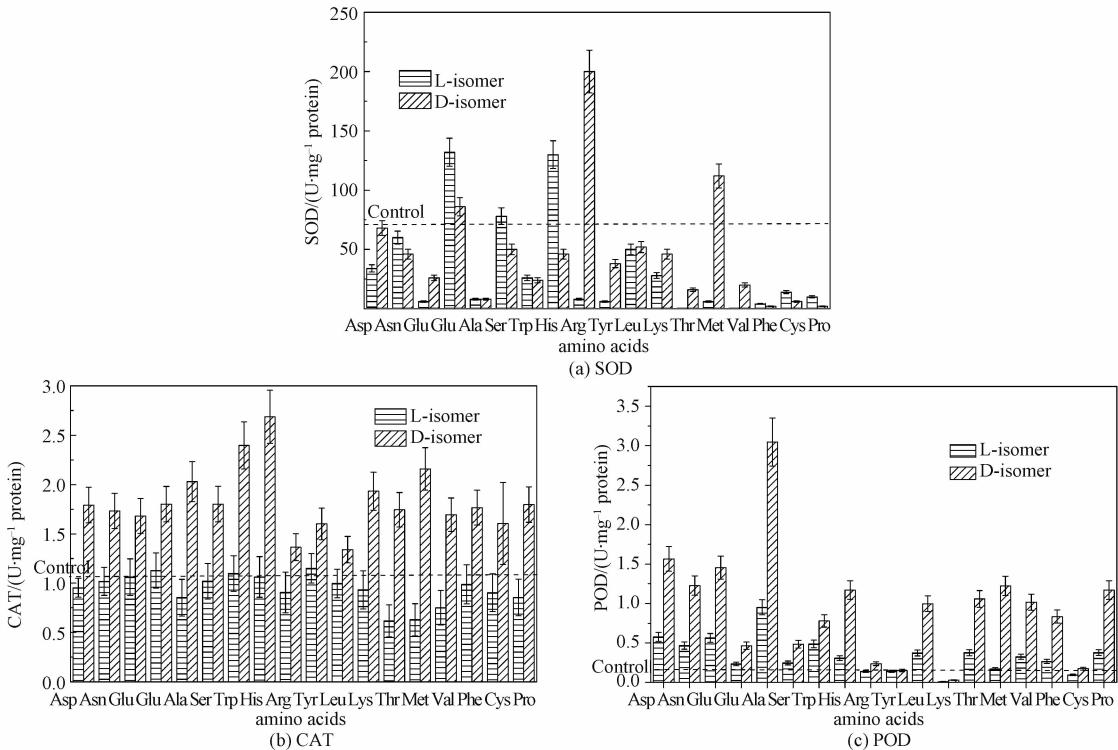


图 5 L-氨基酸和 D-氨基酸 (10 mmol/L) 对酵母细胞内 SOD(a), CAT(b) 和 POD(c) 活性的影响
Fig. 5 Effects of L-amino acid and D-amino acid (10 mmol/L) on activities of SOD (a), CAT (b), and POD (c) in *Saccharomyces Cerevisiae*

更为有趣的是,D-氨基酸处理后细胞内 POD 的活性变化与 CAT 活性变化趋势相似。L-氨基酸处理组 POD 的活性没有增强(图 5(c))。D-氨基酸处理组 POD 的活性显著高于 L-氨基酸组,这表明 D-氨基酸激活 POD 的活性。

CAT 和 POD 活性增加,SOD 活性未增加,这暗示 D-氨基酸诱导酿酒酵母细胞内产生的 ROS 的主要类型是 H_2O_2 。CAT 和 POD 活性的增加可能是由于含量猛增的 H_2O_2 将其激活。

2.5 抗氧化剂含量

ASA 是一种水溶性的可食用抗氧化剂,在抵御活性氧中起到至关重要的作用^[28-29]。GSH 也能够抵御 ROS 引起的氧化损伤^[30]。此外,ASA 和 GSH 能够通过 ASA-GSH 循环的协同作用来消除活性氧^[16]。为此,我们比较氨基酸处理后细胞内这两种抗氧化剂的含量(见图 6)。除苏氨酸、赖氨酸和半胱氨酸外,L-氨基酸和 D-氨基酸处理后细胞内 ASA 的含量都与对照组差别不大。经

10 mol/L 赖氨酸处理后,ASA 的含量随着 L-赖氨酸浓度的增加而升高。L-半胱氨酸处理后,ASA 含量明显增加。同样地,GSH 含量变化与 ASA 趋势相似。即便将氨基酸浓度增加到 10 mmol/L, GSH 含量也未显著增加。赖氨酸处理后细胞内的 ASA 和 GSH 含量增加可能是因为培养基中赖氨酸含量的增加激活了赖氨酸羟化酶,而 ASA 是它的辅酶^[31],因而 ASA 含量随之增加;ASA 是一种强还原剂,可以使氧化型的 GSH 转变成为还原型 GSH,因而导致 GSH 含量增加。L-半胱氨酸是 ASA 的稳定剂,二者之间存在协同效应^[32],因此培养基中 L-半胱氨酸含量的增加导致 ASA 含量的增加。有文献报道,向培养基中添加 L-半胱氨酸能够增加酵母细胞中 GSH 的含量^[33],因此 L-半胱氨酸处理后的细胞中 GSH 含量增加。

基于以上实验结果,为进一步阐明各个生物标记物之间的关联,图 7 给出实验所选用生物标记物之间的关系。

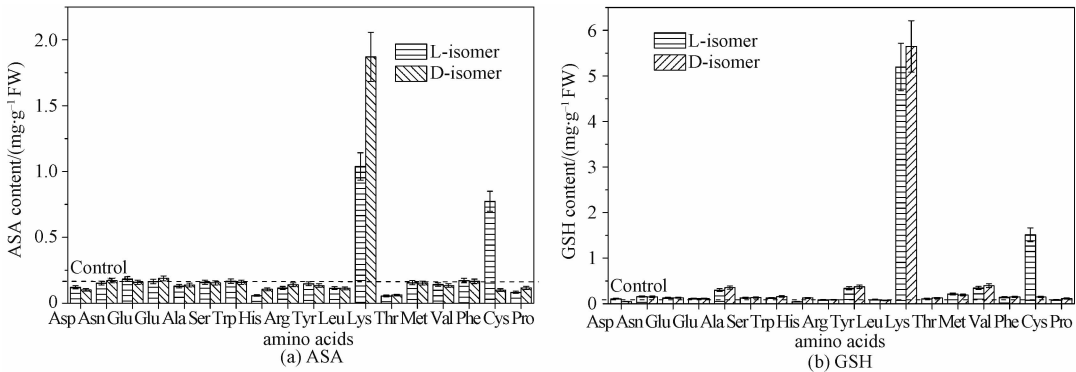


图 6 L-氨基酸和 D-氨基酸 (10 mmol/L) 对酵母细胞内 ASA (a) 和 GSH (b) 含量的影响

Fig. 6 Effects of L-amino acid and D-amino acid (10 mmol/L) on the contents of ASA (a) and GSH (b) in *Saccharomyces Cerevisiae*

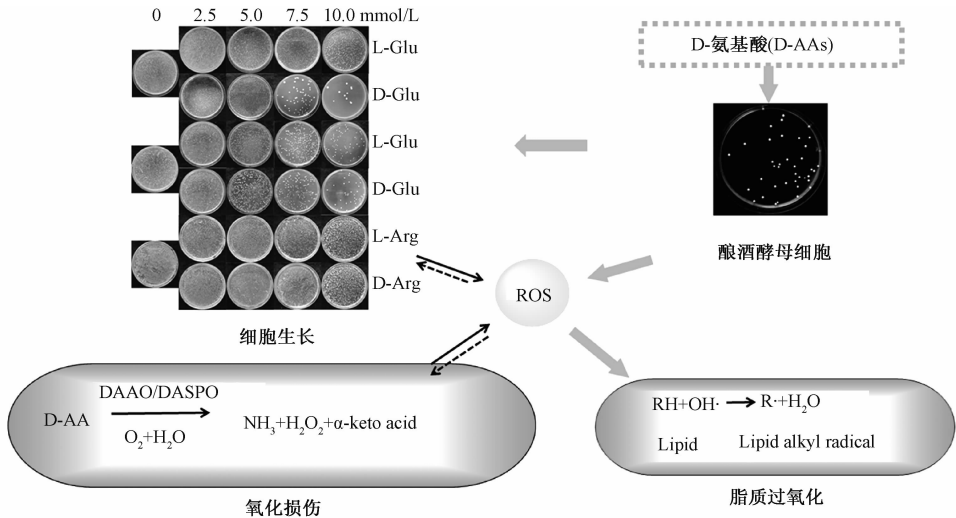


图 7 实验所用生物标记物之间的关系

Fig. 7 Relationships among these biomarkers used in this study

3 总结

ROS 是细胞代谢的副产物。环境的改变能够引起细胞内 ROS 含量的改变。本研究中,采用酿酒酵母为模型生物研究 D-氨基酸的细胞毒性及其诱导的 ROS 累积。发现 D-氨基酸能够抑制细胞的生长。低浓度时,抑制现象不明显,当浓度增加时,抑制作用增强。此外,高浓度 D-氨基酸培养的细胞内 H_2O_2 的含量增加,伴随抗氧化酶活性的激活,特别是 CAT 和 POD。生物体内的活性氧可以被抗氧化酶和抗氧化剂清除,使活性氧的水平维持正常。然而,当活性氧水平达到阈值,能够引起氧化损伤。因此我们认为氧化损伤是 D-氨基酸毒性的主要机制。

参考文献

- [1] Steels E L, Learmonth R P, Watson K. Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces Cerevisiae* grown aerobically or anaerobically [J]. Microbiology-Uk, 1994, 140:569-576.
- [2] Landolfo S, Politi H, Angeozzi D, et al. ROS accumulation and oxidative damage to cell structures in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during fermentation of high-sugar-containing medium [J]. Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects, 2008, 1780(6): 892-898.
- [3] Ribeiro T P, Fernandes C, Melo K V, et al. Iron, copper, and manganese complexes with in vitro superoxide dismutase and/or catalase activities that keep *Saccharomyces cerevisiae* cells alive under severe oxidative stress [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2015, 80:67-76.
- [4] Qiu Z B, Liu X, Tian X J, et al. Effects of CO_2 laser pretreatment on drought stress resistance in wheat [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 2008, 90(1): 17-25.
- [5] Roehrs R, Freitas D R, Masuda A, et al. Effect of vitamin A treatment on superoxide dismutase-deficient yeast strains [J]. Archives of Microbiology, 2010, 192(3): 221-228.
- [6] Radkov A D, Moe L A. Bacterial synthesis of D-amino acids [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(12): 5363-5374.
- [7] Daniello A, Donofrio G, Pischetola M, et al. Biological role of D-amino-acid oxidase and D-aspartate oxidase: effects of D-amino acids [J]. Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(36): 26941-26949.
- [8] Friedman M. Chemistry, nutrition, and microbiology of D-amino acids [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(9): 3457-3579.
- [9] Hamase K, Morikawa A, Zaitzu K. D-Amino acids in mammals and their diagnostic value [J]. Journal of Chromatography B, 2002, 781(1/2): 73-91.
- [10] Champney W S, Jensen R A. Molecular events in the growth inhibition of *Bacillus subtilis* by D-tyrosine [J]. Journal of Bacteriology, 1970, 104(1): 107-116.
- [11] Soutourina J, Blanquet S, Plateau P. D-tyrosyl-tRNA (Tyr) metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(16): 11626-11630.
- [12] Soutourina J, Plateau P, Blanquet S. Metabolism of D-aminoacyl-tRNAs in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* cells [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(42): 32535-32542.
- [13] Yow G Y, Uo T, Yoshimura T, et al. Physiological role of D-amino acid N-acetyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae*: detoxification of D-amino acids [J]. Archives of Microbiology, 2006, 185(1): 39-46.
- [14] Friedman M, Levin C E. Nutritional and medicinal aspects of D-amino acids [J]. Amino Acids, 2012, 42(5): 1553-1582.
- [15] Matlashov M E, Belousov V V, Enikolopov G. How much H_2O_2 is produced by recombinant D-amino acid oxidase in mammalian cells? [J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2014, 20(7): 1039-1044.
- [16] Liu T, Zhu L S, Wang J H, et al. Biochemical toxicity and DNA damage of imidazolium-based ionic liquid with different anions in soil on *Vicia faba* seedlings [J]. Scientific Reports, 2015, 5:18444.
- [17] Li X C. Improved pyrogallol autoxidation method: a reliable and cheap superoxide-scavenging assay suitable for all antioxidants [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(25): 6418-6424.
- [18] Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range [J]. Clinica Chimica Acta, 1991, 196(2/3): 143-151.
- [19] Song Y, Zhu L S, Xie H, et al. Effects of atrazine on DNA damage and antioxidative enzymes in *Vicia Faba* [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2009, 28(5): 1059-1062.
- [20] Shen C H, Krishnamurthy R, Yeh K W. Decreased l-ascorbate content mediating bolting is mainly regulated by the galacturonate pathway in *oncidium* [J]. Plant Cell Physiology, 2009, 50(5): 935-946.
- [21] Teare J P, Punchard N A, Powell J J, et al. Automated spectrophotometric method for determining oxidized and reduced glutathione in liver [J]. Clinical Chemistry, 1993, 39(4): 686-689.
- [22] Hecht K, Zhang S, Klopotoski T, et al. D-histidine utilization in *Salmonella typhimurium* is controlled by the leucine-responsive regulatory protein (Lrp) [J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(2): 327-331.
- [23] Barchas J, Katz E, Weissbach H, et al. Metabolism of D-

- valine by streptomyces antibioticus: isolation of N-succinyl-D-valine [J]. *Biochemistry*, 1964, 3(11): 1 684-1 687.
- [24] Hammer V A, Rogers Q R, Freedland R A. Threonine is catabolized by L-threonine 3-dehydrogenase and threonine dehydratase in hepatocytes from domestic cats (*Felis domestica*) [J]. *Journal of Nutrition*, 1996, 126(9): 2 218-2 226.
- [25] Costa W M V, Amorim M A, Quintanilha A, et al. Hydrogen peroxide-induced carbonylation of key metabolic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*: the involvement of the oxidative stress response regulators Yap1 and Skn7 [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2002, 33(11): 1 507-1 515.
- [26] Burton G, Wayner D D M. Free-radicals in biology and medicine-Halliwel, B, Gutteridge, Jmc [J]. *Nature*, 1985, 318(6 044): 322-322.
- [27] Rowe L A, Degtyareva N, Doetsch P W. DNA damage-induced reactive oxygen species (ROS) stress response in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2008, 45(8): 1 167-1 177.
- [28] Tominaga H, Kodama S, Matsuda N, et al. Involvement of reactive oxygen species (ROS) in the induction of genetic instability by radiation [J]. *Journal of Radiation Research*, 2004, 45(2): 181-188.
- [29] Wheeler G L, Jones M A, Smirnoff N. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants [J]. *Nature*, 1998, 393(6 683): 365-369.
- [30] Li Y, Wei G, Chen J. Glutathione: a review on biotechnological production [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 66(3): 233-242.
- [31] Kivirikko K I, Pihlajaniemi T. Collagen hydroxylases and the protein disulfide isomerase subunit of prolyl 4-hydroxylases [J]. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 1998, 72:325-398.
- [32] Nakano A, Abe M, Oda A, et al. Delayed treatment with vitamin C and N-acetyl-l-cysteine protects Schwann cells without compromising the anti-myeloma activity of bortezomib [J]. *International Journal of Hematology*, 2011, 93(6): 727-735.
- [33] Wen S H, Zhang T, Tan T W. Utilization of amino acids to enhance glutathione production in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, 35(6/7): 501-507.