

二酪氨酸层赋予酵母孢子抗氧化活性

MUKAMA Omar, LEO Bemena, 王晓文, 高晓冬, 中西秀树*

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)孢子壁是一个多层结构,其最外层为二酪氨酸层,由酚类化合物 *NN'*-二甲酰基二酪氨酸组成。二酪氨酸层是酵母孢子壁独有的结构,在酵母营养细胞的细胞壁中不存在。因为许多细胞酚类化合物能够清除自由基,我们猜测 *NN'*-二甲酰基二酪氨酸可以作为一种抗氧化剂。为了研究孢子的抗氧化性,将营养细胞、野生型孢子和 *dit1Δ* 孢子培养在强氧化剂 H_2O_2 中,观察现象。本研究发现相对于酵母营养细胞,含有二酪氨酸层的野生型孢子具有抗自由基的能力使孢子具有抗氧化活性,同时二酪氨酸层缺陷型菌株 *dit1Δ* 孢子对自由基敏感。另外,本研究发现 *NN'*-二甲酰基二酪氨酸能够清除自由基。因此,*NN'*-二甲酰基二酪氨酸可在未来用作一种新型的抗氧化材料。

关键词: 酿酒酵母;孢子;二酪氨酸层;*NN'*-二甲酰基二酪氨酸;抗氧化

中图分类号:Q 786 文章编号:1673-1689(2019)10-0119-07 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.10.017

Dityrosine Layer Endows Spores with Resistance to Oxidative Stresses

MUKAMA Omar, LEO Bemena, WANG Xiaowen, GAO Xiaodong, NAKANISHI Hideki*

(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The spore wall of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* has a multilaminar structure and its outermost layer, termed the dityrosine layer, is mainly composed of a phenolic compound, *N,N'*-bisformyl dityrosine. Since many cellular phenolic compounds are capable of scavenging free radicals, we hypothesized that *N,N'*-bisformyl dityrosine could work as an antioxidant. Thus, we investigated whether the dityrosine layer could protect cells from oxidative stresses and *N,N'*-bisformyl dityrosine have antioxidant activity. Yeast spores with or without the dityrosine layer were treated with reactive oxygen species and their sensitivities to the stresses were assessed. Additionally, *N,N'*-bisformyl dityrosine was produced by using vegetative cells and its antioxidant activity was measured. Compared to wild-type spores, *dit1Δ* spores, which lack the dityrosine layer, were sensitive to free radicals. Thus, the dityrosine layer can protect spores from oxidative stresses. Furthermore, we found that *N,N'*-bisformyl dityrosine can scavenge free radicals. The results suggest that *N,N'*-bisformyl dityrosine is an intriguing material as an antioxidant.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae* spores, dityrosine layer, *N,N'*-bisformyl dityrosine, antioxidant activity

收稿日期: 2017-03-13

基金项目: 国家“111 计划”资助项目(111-2-06); 江南大学自主科研项目(JUSRP311A02);。

* 通信作者: 中西秀树(1973—), 男, 博士, 教授, 主要从事分子生物学、酵母遗传学、细胞生物学和糖生物学方面的研究。

E-mail: hidekinakanishi@hotmail.com

引用本文: Mukama Omar, Leo Bemena, 王晓文, 等. 二酪氨酸层赋予酵母孢子抗氧化活性[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(10): 119-125.

酿酒酵母的产孢过程是在碳源以及氮源匮乏等饥饿条件下引起的一个连续的过程。在此过程中,酿酒酵母营养细胞的细胞膜转化为孢子膜^[1],最终在二倍体细胞中形成四个单倍体孢子。孢子壁由四层结构组成,从内到外依次为:甘露糖层、葡聚糖层、壳聚糖层和二酪氨酸层。相较于营养细胞,孢子可以有效抵抗外界的恶劣环境,该特性主要是由于壳聚糖层和二酪氨酸层的保护作用。孢子壁结构是由内到外依次合成,在壳聚糖层形成后,二酪氨酸层才开始合成^[2]。二酪氨酸层主要是由酵母细胞质中两个 L-酪氨酸交联形成的二肽 (LL-二甲酰基-N,N'-二酪氨酸)为主体的结构,该形成过程分为两步:L-酪氨酸的 N-甲酰化以及 L-甲酰酪氨酸的二聚化^[3]。这两个步骤分别由 Dlt1 和 Dlt2 两个蛋白调控完成^[4]。随后,LL-二甲酰基-N,N'-二酪氨酸分子通过包括 Dtr1 在内的多个转运蛋白协助下,运送到形成过程中的孢子壁上^[5],且二酪氨酸层的组装机制目前尚不清楚。

氧化剂可以通过自由基的介导来催化反应,其氧化性会对生物大分子(核酸,蛋白质,糖类和脂类)造成伤害,因此,氧化剂在生物体内有很大的危害。 H_2O_2 作为氧化剂,进入细胞后,主要通过抑制 ATP 的合成(GAPDH 失活)影响糖酵解途径,并且通过引起氧化应激影响线粒体的氧化磷酸化途径^[6]。在过渡金属存在时,即使低浓度的 H_2O_2 (20~80 $\mu\text{mol/L}$) 也可以影响烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+)的活性, NAD^+ 对于 DNA 修复酶(多-ADP 核糖聚合酶)的活性是十分重要的。羟基自由基会造成不可逆的 DNA 链断裂^[2,7],以及碱基的羟基化。因此,氧化剂最终会造成细胞的损伤或者死亡。酚类

化合物可以通过抑制自由基(如 H_2O_2)与金属离子(如 Fe^{2+})的螯合从而抑制氧化性。在该机制中,自由基夺走酚基的一个氢原子,而酚基可以从抗氧化剂上得到一个电子转变为自由基阳离子^[8]。酵母孢子的二酪氨酸是一种酚类化合物。过去的研究显示,相较于营养细胞,酵母孢子对消化酶、乙醚处理、部分有机溶剂及高温等特殊条件具有抵抗能力^[9]。本研究目的是研究孢子对外源活性氧的抵抗能力,以及通过酿酒酵母营养细胞合成 NN'-二 NN'甲酰基二酪氨酸并研究-二甲酰基二酪氨酸的抗氧化特性。

1 材料与方法

1.1 菌株与生长条件

除了另外标注的技术外,本文所提到的基因操作参考文献[10]。所用到的酵母菌株见表 1,引物序列列表 2。

在克隆过程中,大肠杆菌在加入氨苄青霉素(100 $\mu\text{L/mL}$)的 LB 培养基(1%酵母提取物,2%蛋白胨,2%NaCl)中培养。酵母营养细胞是在 YPAD(1%酵母提取物,2%蛋白胨,2%葡萄糖,0.033%腺嘌呤)和/或去除某一或某几种特殊氨基酸的氨基酸混合物的完全培养基(营养缺陷型选择培养基)中培养。酵母产孢细胞的培养是在 YPACe 培养基(1%酵母提取物,2%蛋白胨,2%乙酸钾)。

为了敲除 *DIT1*,以 pFA6a-HIS3MX6^[11]为模板,以 BLD1 和 BLD2 为引物,通过 PCR 技术扩增得到一条 DNA 片段,将该片段分别融合进单倍体 AN117-4B 和 AN117-16D,然后将二者融合,得到 *dit1Δ* 二倍体菌株。

表 1 本实验所用到的酿酒酵母菌株
Table 1 *S.cerevisiae* strains used in this study

菌株	基因型	来源
AN120 (野生型,二倍体)	MAT α /MATaARG4/arg4 -NspIhis3 Δ SK/ his3 Δ SKho::LYS2/ho::LYS2leu2/leu2lys2/lys2RME1/rme1::LEU2trp1::hisG/trp1::hisG ura3/ura3	文献[12]
HW3 (<i>dit1Δ/dit1Δ</i>)	MAT α /MATaARG4/arg4-NspIhis3 Δ SK/ his3 Δ SKho::LYS2/ho::LYS2leu2/leu2lys2/lys2RME1/rme1::LEU2trp1::hisG/trp1::hisGura3dit1 Δ ::his5/dit1 Δ ::his5	文献[13]
YPH499	MATaura3-52lys2-801_amberade2-101_ochre trp1- Δ 63 his3- Δ 200 leu2- Δ 1	文献[14]
YPH499(DIT1/DIT2)	MATaura3-52lys2-801_amberade2-101_ochre trp1- Δ 63 his3- Δ 200 leu2- Δ 1	本研究
YPH499(DIT1/DIT2&DTR1)	MATaura3-52lys2-801_amberade2-101_ochre trp1- Δ 63 his3- Δ 200 leu2- Δ 1	本研究

表 2 本实验所用的引物
Table 2 Primers used in this study

引物	序列	来源
HXO599	GTGTACTAGTAAAATGACATTTACTAGCAA	本研究
HXO600	GTGTCTCGAGTTAAGAGATTTTCTTGATAA	本研究
HXO601	GTGTACTAGTCAAATGGAGTTGTTAAAGCT	本研究
HXO602	GTGTCTCGAGTTATTCATTATATTCTCGT	本研究
HXO603	GTGTACTAGTGAATGGGAAGCGAACCCTT	本研究
HXO604	GTGTCTCGAGTTAAAATTCCTTTGGCAGTAT	本研究
BLD1	AATTTGTTAATATCCTAATTCGGTAAAGCTTTGTCGAGACATTAACAAAACGGATCCCCGGGTAAATTAA	文献[15]
BLD2	GTTTAAGTAAAAGAACAAAAGGTAGACCAATGTAGCGCTTACTTTATGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	文献[15]

1.2 质粒

本文所用的质粒见表 3。pRS424-GAL-DIT1, pRS426-GAL-DIT2 and pRS424-TEF-DTR1 三个质粒是按如下方法构建的。

首先, DIT1, DIT2 和 DTR1 三个基因是以 AN120 酵母菌株的基因组 DNA 为模板^[12]分别用引物 HXO599 和 HXO600, HXO601 和 HXO602,

HXO603 和 HXO604 通过 PCR 扩增的。得到的扩增片段用 *Spe*I 和 *Xho*I 进行切割, 然后将其连接到以同样酶切位点切割的质粒 pRS424-GAL, pRS426-GAL 或 pRS425-TEF。用醋酸锂转化法将目的质粒转化到酵母 YH499 菌株中进行表达^[16]。所有构建的质粒均由基因测序确认(BGI, China, Beijing)。

表 3 本实验所用到的质粒
Table 3 Plasmids used in this study

质粒名	描述	来源
pRS424-GAL-DIT1	TRP1 标记, 二倍体, 带有 TEF2 启动子带有基因 DIT1 的表达质粒	本研究
pRS426-GAL-DIT2	URA3 标记, 二倍体, 带有 GAL2 启动子带有基因 DIT2 的表达质粒	本研究
pRS425-TEF-DTR1	LEU2 标记, 二倍体, 带有 TEF2 启动子带有基因 DTR1 的表达质粒	本研究

1.3 酵母产孢

取单菌落在 5 mL 的 YPAD 中培养过夜, 然后将 1 mL 菌液转接到 200 mL 的 YPA 培养基中培养 24 h。离心(5 600 g, 30 s)收集细胞, 并用去离子水洗, 然后将其转移到 2%的醋酸钾培养 24 h。产孢后, 离心(5 600 g, 30 s)收集孢子, 并用 6 mol/L NaCl 溶液洗涤 2 次。

1.4 点板实验

氧化剂的处理实验是根据文献[17]稍作调整后进行的。当细胞生长到稳定期后, 收集菌体处理到 10^5 cells/mL, 用 1 μ L 的氧化剂(2 mmol/L FeSO₄/2 mmol/L H₂O₂ 或者 2 mmol/L FeCl₃/2 mmol/L H₂O₂)处理。混合液在 30 ℃培养 1 h, 依次按梯度稀释 10 倍后震荡混匀后分别取 5 μ L 点板到 YPAD 培养基上, 重复上述实验一次。同样的细胞用去离子水稀释 100 倍, 分别涂于两块相同的平板上, 对生长的菌落计数, 取两板的平均值。实验图片是用 Image Quant LAS 4 000(GE Healthcare, USA)拍摄的。

1.5 LL-二甲酰基-N,N'-二酪氨酸生物合成

含有空载(对照)和质粒 pRS424-GAL-DIT1, pRS426-GAL-DIT2 和 pRS424-TEF-DTR1 的 YPH499 单菌落在含 2%葡萄糖的 SD 培养基上培养到指数期, 离心(8 560 g, 2 min)收集菌体, 去离子水洗 2 次, 然后转入含有 2%半乳糖的 SD 培养基上培养 48 h。培养后含有 LL-二甲酰基-N,N'-二酪氨酸的培养基(4 mg/mL)将用于下一步的实验。

1.6 LL-二酪氨酸和 LL-二甲酰基-N,N'-二酪氨酸的化学合成

LL-二酪氨酸和 LL-二甲酰基-N,N'-二酪氨酸通过^[18]所描述的用 L-酪氨酸或者 N-甲酰基-L-酪氨酸(Sigma-Aldrich)进行氧化反应从而合成。反应过程如下: 2 mL 的 Tris-HCl (0.3 mmol/L, pH 8.5), 1.5 mL 的 L-tyrosine 或者 N-甲酰基-L-酪氨酸(2 mg/mL), 0.1 mL 的过氧化氢 (8.82×10^{-5} mol/L), 0.5 mL 的过氧化物酶(1 mg/mL, Sangon, Shanghai, China), 混合, 20 ℃培养 1 h。然后进行 LC-MS 分

析, 确认LL-二酪氨酸和 LL-二甲酰基-N,N'-二酪氨酸是否合成。

1.7 二酪氨酸的高效液相色谱(HPLC)分析

该样品是用 Discovery C18 柱(150 mm×4.6 mm ID, 5 μm particles)(Sigma Aldrich, U.S.A)在 Waters 分离模块 e2695 HPLCs 系统(Wexford, UK)进行分析。每组加入 10 μL 样品。柱子经过含有 100% CH₃CN 的 0.01 M 三氟乙酸梯度洗脱 (0~50% 的 CH₃CN, 55 min)。样品流速为 1 mL/min, 紫外荧光检测条件为: 激发波长 285 nm, 发射波长 425 nm。

1.8 抗氧化剂实验

DPPH 和 ABTS 溶液被用来检测二甲酰基-二酪氨酸的自由基清除能力。DPPH 的用法是根据^[19-20]中所描述的方法进行的。在 99% 甲醇溶液中, 加入 3.5 mL 的 60 mol/L 的 DPPH, 然后分别加入 10, 20, 50 μL 的含有培养基的 LL-二甲酰基-N,N'-二酪氨酸, 空质粒, 单独的培养基和合成的 LL-二甲酰基-N,N'-二酪氨酸。混合溶液在黑暗中室温培养 20 min, 然后在 517 nm(吸光度)下用 Ultrospec 2100 pro UV/Visible Spectrophotometer (GE healthcare, Fairfield, USA)读数。清除力的计算如下:

$$\text{清除力}(\%) = [(\Delta A_{517 \text{ 对照}} - \Delta A_{517 \text{ 样品}}) / \Delta A_{517 \text{ 对照}}] \times 100$$

(1)

ABTS 工作溶液的制备过程是按照^[21-22]中的描

述。本实验中, 在 99% 甲醇溶液中, 加入 3.5 mL 的 60 mol/L 的 ABTS, 然后分别加入 10, 20, 50 μL 的含有培养基的 LL-二甲酰基-N,N'-二酪氨酸, 空质粒, 单独的培养基和合成的 LL-二甲酰基-N,N'-二酪氨酸。混合溶液在黑暗中室温培养 16 h, 然后在 734 nm(吸光度)下用 Ultrospec 2100 pro UV/Visible Spectrophotometer (GE healthcare, Fairfield, USA)读数。

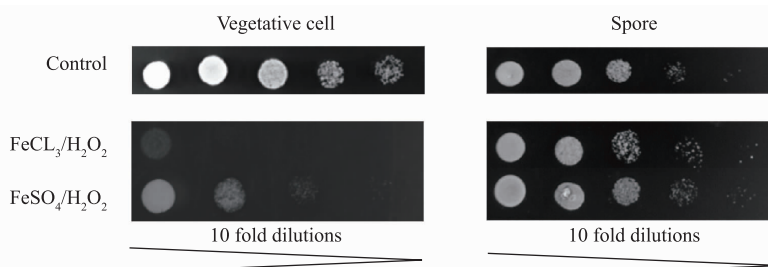
1.9 统计学分析

本研究至少做了 3 次的独立实验, 如±SE 所显示的。

2 结果与讨论

2.1 孢子的抗氧化性相对于营养细胞更强

为了测试孢子是否具有抗氧化能力, 将营养细胞和孢子分别用 2 mmol/L FeCl₃/2 mmol/L H₂O₂ 或 2 mmol/L FeSO₄/2 mmol/L H₂O₂ 处理。通过氧化反应, FeCl₃ 可以与 H₂O₂ 反应并产生带超氧阴离子。Fe²⁺与 H₂O₂ 反应产生羟基自由基。将细胞在该溶液中培养 1 h 后在 YPAD 上点板。如图 1 所示, 用 FeCl₃/H₂O₂ 或 FeSO₄/H₂O₂ 处理的孢子与未处理的孢子生长状况相似。然而, 处理后的营养细胞的生存力显著降低。这些结果表明, 与营养细胞相比, 孢子具有抗氧化能力。



营养细胞或孢子在 FeCl₃/H₂O₂ 或者 FeSO₄/H₂O₂ 反应液中培养 1 h, 然后将其连续稀释并点板于 YPAD 上

图 1 营养细胞和孢子对氧化应激的敏感性

Fig. 1 Susceptibility of vegetative cells and spores toward oxidative stress

2.2 二酪氨酸层赋予孢子抗氧化能力

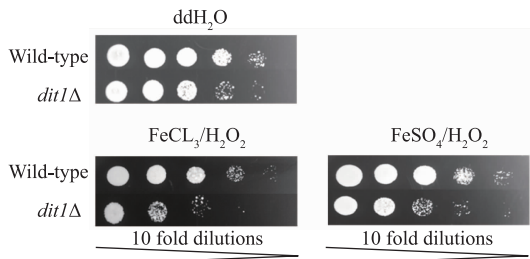
本研究评估了二酪氨酸层是否具有抗氧化性。由于 DIT1 基因控制合成二酪氨酸, 其突变导致二酪氨酸层缺失。如图 2(a)所示, *dit1Δ* 突变株孢子对 FeCl₃/H₂O₂ 和 FeSO₄/H₂O₂ 比野生型孢子更敏感。

如图 2(b)所示, 经 FeCl₃/H₂O₂ 处理后, *dit1Δ* 的孢子, 野生型孢子和营养细胞的存活率分别降低到 28.55%, 60% 和 0, 经过 FeSO₄/H₂O₂ 处理, *dit1Δ* 的孢

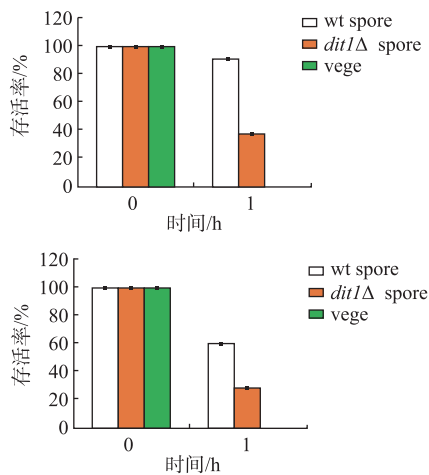
子, 野生型孢子和营养细胞的存活率分别降低到 37.43%, 90.84% 和 0。该结果表面二酪氨酸层赋予孢子抗氧化的能力。

2.3 二甲酰基二酪氨酸能够分泌到培养基中

二酪氨酸层主要由二甲酰基二酪氨酸组成。本研究检测了二甲酰基二酪氨酸是否显示出抗氧化活性。为了获得大量的二甲酰基二酪氨酸, 本研究采用生物法合成二甲酰基二酪氨酸。



(a)野生型或 $dit1\Delta$ 突变型孢子在 $\text{FeCl}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ 或者 $\text{FeSO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ 反应液中培养1 h, 然后将其连续稀释并点板于YPAD上。



(b)对经过 $\text{FeCl}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ (左边的平板)和 $\text{FeSO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ (右边的平板)中培养1小时后, 野生型孢子, $dit1\Delta$ 孢子和营养细胞分别用去离子水稀释100倍后, 涂于YPAD板上, 用于存活菌株的计数用水作为处理液培养。1 h后的细胞数作为全部的细胞数。

图2 二酪氨酸层的缺失对细胞抗氧化性的影响

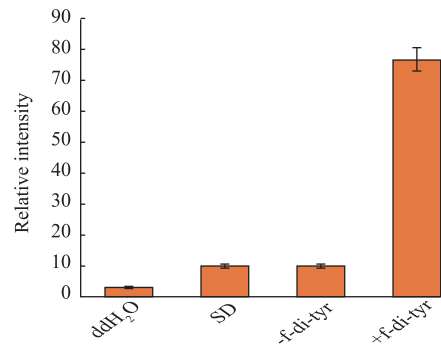
Fig. 2 Effect of the loss of the dityrosine layer on oxidative stress resistance

之前研究表明, 即使在增殖期营养细胞中, 二甲酰基二酪氨酸也可由 *DIT1*, *DIT2* 和 *DTR1* 三个基因控制合成的^[3-5]。因此, 分别构建了在 *GAL1* 启动子下游含有 *DIT1*, *DIT2* 及 *DTR1* 的质粒。在 *GAL1* 启动子调控下, 在含有葡萄糖的培养基中抑制基因表达, 并通过含半乳糖的培养基来诱导基因表达。

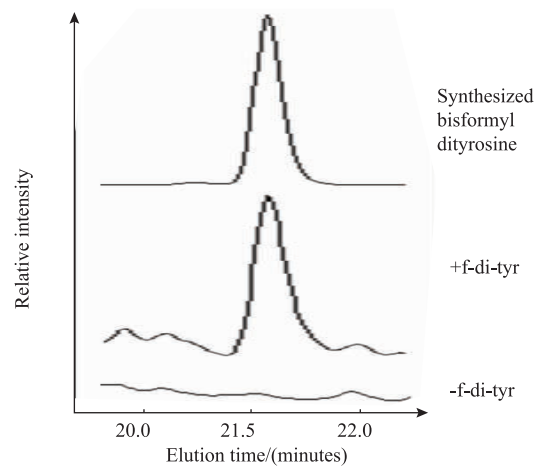
转化构建得到的3种质粒到酵母菌株 *YPH499* 中, 挑取单个转化子在含有葡萄糖或半乳糖的培养基中培养48 h。离心除去细胞并将培养基浓缩10倍。二酪氨酸是一种荧光分子: 激发波长为380 nm, 发射波长为475 nm。在半乳糖培养基中, 检测到强烈的二酪氨酸荧光信号。在葡萄糖培养基中, 未检测到强烈的荧光信号。表达了空载体的培养基中, 未检测到荧光信号。

为了进一步验证培养了表达 *Dit1*, *Dit2* 和 *Dtr1*

细胞的培养基中含有二甲酰基二酪氨酸, 本实验进行了 HPLC 验证。在表达 *Dit1*, *Dit2* 和 *Dtr1* 细胞用过的培养基中检测到二甲酰基二酪氨酸峰, 但在含有空载体的细胞的培养基中没有检测到(图3)因此, 实验用过的培养基中含有二甲酰基二酪氨酸。



(a)在以下溶液中分别对二甲酰基二酪氨酸进行荧光检测: 水、SD培养基、培养过空质粒的培养基(-f-di-Tyr)、培养DIT1, DIT2和DTR1细胞用过的培养基(+f-di-Tyr)。



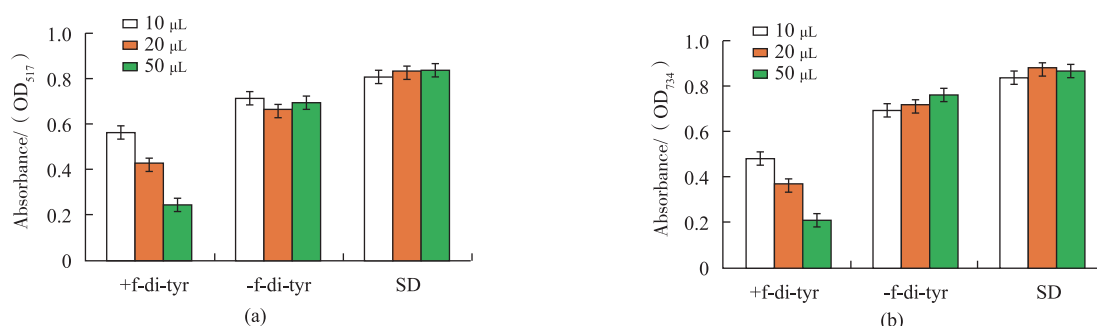
(b)培养过空质粒的培养基 (-f-di-Tyr)、培养DIT1、DIT2和DTR1细胞用过的培养基 (+f-di-Tyr) 注射到HPLC中检测二甲酰基二酪氨酸。使用合成的二甲酰基二酪氨酸用作标准对照。

图3 在表达 *DIT1*, *DIT2* 和 *DTR1* 细胞用过的培养基中检测二甲酰基二酪氨酸

Fig. 3 Detection of bisformyl dityrosine in spent media cultured *DIT1*, *DIT2*, and *DTR1* expressing cells

2.4 二甲酰基二酪氨酸具有抗氧化活性

通过使用 DPPH 和 ABTS 测定, 本研究检测了二甲酰基二酪氨酸是否具有抗氧化活性。如图4所示, 两种方法测定显示含二甲酰基二酪氨酸的培养基具有抗氧化活性, 而在表达了空载体的细胞培养基中没有观察到这种活性。



进行 DPPH(A) 和 ABTS(B) 实验去检测含培养基的二甲酰基二酪氨酸(+f-di-Tyr)、培养过空质粒的培养基(-f-di-Tyr)、含半乳糖的 SD 培养基三者的二甲酰基二酪氨酸含量。每个数据至少有 3 个平行样本,每个实验至少需要做三次。样品与 DPPH(A) 和 ABTS(B) 混合后的分光光度测量。只含有 DPPH 或者 ABTS 时,吸光度为 0.700

图 4 二甲基二酪氨酸的抗氧化活性

Fig. 4 Antioxidant activity of bisformyl dityrosine

3 结 语

孢子具有对外界环境的抵抗能力。本研究证实了孢子的抗氧化性比营养细胞更强。由于二酪氨酸层的存在,孢子展示出了部分的抗氧化性。根据实验结果,可证实二甲酰基二酪氨酸对强氧化剂有清

除能力,因此具有抗氧化活性。在酿酒酵母中异源表达 *DIT1*, *DIT2* 和 *DTR1* 可证实二甲酰基二酪氨酸会分泌到培养基中,也可被用作抗氧化剂。因此,二甲酰基二酪氨酸的生产十分便捷。二甲酰基二酪氨酸和孢子未来可以被用作相关的抗氧化材料。

参考文献:

- [1] MITCHELL A P. Control of meiotic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Microbiol Rev**, 1994, 58(1): 56-70.
- [2] NEIMAN A M. Ascospore formation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 2005, 69(4): 565-584.
- [3] BRIZA P, BREITENBACH M, ELLINGER A, et al. Isolation of two developmentally regulated genes involved in spore wall maturation in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Genes & Development**, 1990, 4(10): 1775-1789.
- [4] BRIZA P, ECKERSTORFER M, BREITENBACH M. The sporulation-specific enzymes encoded by the DIT1 and DIT2 genes catalyze a two-step reaction leading to a soluble LL-dityrosine-containing precursor of the yeast spore wall[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1994, 91(10): 4524-4528.
- [5] FELDER T, BOGENGRUBER E, TENREIRO S, et al. Dtrlp, a multidrug resistance transporter of the major facilitator superfamily, plays an essential role in spore wall maturation in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. **Eukaryot Cell**, 2002, 1(5): 799-810.
- [6] COLUSSI M C A, S. COPPOLA, S. ROVIDATI, F. GALLI, AND, GHIBELLI L. H₂O₂-induced block of glycolysis as an active ADP-ribosylation reaction protecting cells from apoptosis[J]. **FASEB J**, 2000, 14(14): 2276-2276.
- [7] WARD J F, BLAKELY W F, JONER E I. Mammalian cells are not killed by DNA single-strand breaks caused by hydroxyl radicals from hydrogen peroxide[J]. **Radiation Research**, 1985, 103(3): 383-392.
- [8] WRIGHT J S, JOHNSON E R, DILABIO G A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants [J]. **Journal of the American Chemical Society**, 2001, 123(6): 1173-1183.
- [9] COLUCCIO A, BOGENGRUBER E, CONRAD M N, et al. Morphogenetic pathway of spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Eukaryot Cell**, 2004, 3(6): 1464-1475.
- [10] JAMIESON D J. A course on yeast genetics[J]. **Trends in Biotechnology**, 1991, 9(1): 364.
- [11] LONGTINE M S, A M K I, D J D, et al. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Yeast**, 1998, 14: 953-961.

- [12] NEIMAN A M, KATZ L, BRENNWALD P J. Identification of domains required for developmentally regulated SNARE function in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Genetics**, 2000, 155(4): 1643-1655.
- [13] SHI L, LI Z, TACHIKAWA H, et al. Use of yeast spores for microencapsulation of enzymes [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2014, 80(15): 4502-4510.
- [14] SIKORSKI R S, HIETER P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Genetics**, 1989, 122(1): 19-27.
- [15] ZHANG H, TACHIKAWA H, GAO X D, et al. Applied usage of yeast spores as chitosan beads[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2014, 80(16): 5098-5105.
- [16] GIETZ R D, SCHIESTL R H. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method [J]. **Nat Protocols**, 2007, 2(1): 31-34.
- [17] BENAROUDJ N, LEE D H, GOLDBERG A L. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals[J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 2001, 276(26): 24261-24267.
- [18] DEAN A. MALENCIK J F S, CHRIS A. SWANSON, SONIA R. ANDERSON. Dityrosine: preparation, isolation, and analysis[J]. **Analytical Biochemistry**, 1996, 242: 202-213.
- [19] RASHED M M, TONG Q, ABDELHAI M H, et al. Effect of ultrasonic treatment on total phenolic extraction from *Lavandula pubescens* and its application in palm olein oil industry[J]. **Ultrasonics Sonochemistry**, 2016, 29: 39-47.
- [20] CUI Hongjun, XU Baocai, WANG Li, et al. Antioxidant activity of the alkali and alcohol soluble extracts from the defatted rice bran[J]. **Food Science and Biotechnology**, 2016, 35(1): 35-41. (in Chinese)
- [21] CHEN G L, CHEN S G, XIE Y Q, et al. Total phenolic, flavonoid and antioxidant activity of 23 edible flowers subjected to in vitro digestion[J]. **Journal of Functional Foods**, 2015, 17: 243-259.
- [22] RASHED M M A, TONG Q, NAGI A, et al. Isolation of essential oil from *Lavandula angustifolia* by using ultrasonic-microwave assisted method preceded by enzymolysis treatment, and assessment of its biological activities [J]. **Industrial Crops and Products**, 2017, 100: 236-245.

科技信息

美国拟批准维生素 D3 作为营养补充剂在早餐谷物和谷物营养棒使用

据美国联邦公报消息, 2019 年 8 月 12 日, 美国食品药品监督管理局(FDA)发布 2019-17056 号文件, 拟将维生素 D3 作为营养补充剂在早餐谷物和谷物营养棒使用。

据了解此次申请由 Kellogg Company 于 2019 年 6 月 25 日提交。

[信息来源] 食品伙伴网. 美国拟批准维生素 D3 作为营养补充剂在早餐谷物和谷物营养棒使用[EB/OL]. (2019-8-12). <http://news.foodmate.net/2019/08/529640.html>