

参赛学生姓名: 蒋忻倬

中学: 江苏省天一中学

省份: 江苏省

国家/地区: 中国/内地

指导老师姓名: 蒋建东, 曾陈姘

指导老师单位: 南京农业大学, 江苏省天一中学

论文题目: L-多巴降解菌株 *Burkholderia* sp. Z-3 的分离鉴定及降解机制研究

L-多巴降解菌株 *Burkholderia* sp. Z-3 的分离鉴定及降解机制研究

江苏省天一中学 蒋忻倬

摘要

左旋多巴 (L-多巴, L-dopa) 是治疗帕金森病的重要药物, 全球年产量超过 10 万吨。在 L-多巴生产过程中, 约 0.25% 的原料药流入环境中; 在使用过程中, 约 5% 的 L-多巴随人体尿液排出, 在环境中造成残留。研究表明, L-多巴在环境中易氧化产生活性自由基, 损伤细胞膜和线粒体, 诱导细胞凋亡, 表现出对水生生物及哺乳动物细胞的高度毒性, 对生态系统的稳定和人类健康构成严重威胁。现有的物理化学降解 L-多巴方法存在诸多局限, 如无法矿化成 CO_2 、成本昂贵且使用场景受限等。微生物降解技术作为一种绿色、高效的修复方法, 被认为是环境污染修复最具潜力的方法。因此, 研究微生物降解 L-多巴的必要性愈发凸显。论文主要取得以下进展:

从医疗废水中分离筛选出一株 L-多巴降解菌株 *Burkholderia* sp. Z-3。菌株 Z-3 的最适生长条件为 30°C 、 pH 5.0, 但其在 37°C 、 pH 7.0 时表现出最高的 L-多巴降解活性。在 8 小时内, 高接种量 ($\text{OD}_{600}=0.8$) 的菌株 Z-3 可完全降解 0.5 mM 的 L-多巴, 并将 L-多巴矿化为 CO_2 , 且降解速率与接种量显著相关。其最大底物耐受浓度为 2.5 mM, 在 28 小时内可实现完全降解。通过 LC-MS 分析菌株 Z-3 以及其粗酶的降解产物, 发现 L-多巴通过脱氨途径生成中间产物 3,4-二羟基苯基乳酸 (DHPPA), 随后自发氧化为终产物 3,4-二羟基苯乙酸, 推测介导脱氨降解的关键酶为磷酸吡哆醛 (PLP) 依赖型转氨酶。

结合代谢途径并通过全基因组测序以及 KEGG 注释, 推测出三个酪氨酸转氨酶基因 (*tyrB1*、*tyrB2*、*tyrB3*), 均属于酪氨酸代谢核心通路。通过构建 pET29a 过表达载体, 在 *E. coli* BL21 中成功异源表达并纯化三种酪氨酸转氨酶 TyrB1、TyrB2、TyrB3 (分子量约 43 kDa)。酶活实验表明, 三种酶均依赖磷酸吡哆醛 (PLP) 和 α -酮戊二酸催化 L-多巴降解。三种酶具有相似的最适反应条件, 具体为: α -酮戊二酸浓度为 0.6 mM, PLP 浓度为 120 μM , 温度为 $40\text{--}45^\circ\text{C}$, pH 为 7.0-7.5。手性选择性实验表明, 这三种酶均仅能降解 L-多巴, 对 D-多巴 (L-多巴的对映异构体) 底物无活性, 表现出严格的手性选择性。

进化关系分析显示, 菌株 Z-3 的 TyrB 转氨酶与厌氧菌来源的 L-多巴降解酶 (如 *Clostridium sporogenes*, EDU38870.1; *Bifidobacterium longum*, WP 162491401.1) 进化关系较远, 表明好氧与厌氧微生物中 L-多巴代谢通路独立演

化。AlphaFold 结构预测表明, 本文中三种酪氨酸转氨酶与 PDB 数据库中的酪氨酸转氨酶 (3TAT) 高度相似 ($\text{RMSD} < 2 \text{ \AA}$), 其催化口袋中的 Lys-246、Glu-131 和 Arg-374 高度保守。

分子对接结果表明, L-多巴与 L-酪氨酸共享结合位点 (Glu-131、Arg-374), 但 L-酪氨酸由于苯环羟基形成了更强的氢键网络, L-多巴与 L-酪氨酸结合能分别为 -8.368 kJ/mol 和 -14.058 kJ/mol , 解释了酪氨酸转氨酶 TyrB1 对 L-酪氨酸具有更高亲和力 (K_m : L-酪氨酸 = $107.87 \pm 13.57 \text{ }\mu\text{M}$; L-多巴 = $265.26 \pm 116.01 \text{ }\mu\text{M}$)。分子对接预测催化位点 Lys-246 与底物活性基团的间距为 $4.3\text{--}4.6 \text{ \AA}$, 其侧链氨基可能作为催化碱夺取 α -氨基质子, 从而驱动 PLP 依赖的转氨反应。D-多巴由于其活性基团朝向与 L-多巴不同导致活性基团与 Lys-246 距离增至 $7.3 \text{ \AA}$, 阻碍转氨反应, 使得酶无法降解 D-多巴。

通过定点突变将 Lys-246 替换为 Ala-246, 酶完全失去降解活性。突变体蛋白的分子对接结果显示, Ala-246 侧链的缩短导致 L-多巴与催化位点的距离增加至 $9.1 \text{ \AA}$, 并且由于催化基团的改变, 导致降解活性完全丧失。该结果与 PLP 依赖酶中保守 Lys 残基的功能研究一致, 并在 L-多巴降解过程中得到了验证。

本文深入揭示了分离获得的好氧微生物 *Burkholderia* sp. Z-3 中 TyrB 转氨酶介导的 L-多巴降解途径, 为 L-多巴污染环境的修复提供了新的菌株及基因资源, 具有重要的应用前景。

关键词: 生物降解; L-多巴; 伯克霍尔德菌属; 芳香族氨基酸转氨酶

Abstract

Levodopa (L-dopa) is an important drug for the treatment of Parkinson's disease, with an annual global production of over 100,000 tons. During the production of L-dopa, approximately 0.25% of the raw drug is released into the environment; additionally, about 5% of L-dopa is excreted in human urine, resulting in environmental residue. Toxicological studies have shown that L-dopa residues are toxic to aquatic organisms, causing damage to animal cells and mitochondria, and posing a severe threat to human health and the ecological environment. Existing physical and chemical methods for L-dopa degradation have numerous limitations, such as the inability to mineralize the drug to CO₂, high costs, and limited applicability. Microbial degradation technology, as a green and efficient remediation method, is considered one of the most promising approaches for environmental pollution restoration. Therefore, the need for research on microbial degradation of L-dopa has become increasingly apparent. This study presents the following major findings:

A strain of L-dopa-degrading bacterium, *Burkholderia* sp. Z-3, was isolated from medical wastewater. The optimal growth conditions for strain Z-3 were 30°C and pH 5.0, but it exhibited the highest L-dopa degradation activity at 37°C and pH 7.0. Within 8 hours, Z-3, with a high inoculum density (OD₆₀₀=0.8), completely degraded 0.5 mM L-dopa and mineralized L-dopa to CO₂, with the degradation rate being significantly correlated to the inoculum concentration. The maximum substrate tolerance concentration was 2.5 mM, and complete degradation occurred within 28 hours. LC-MS analysis of the degradation products from strain Z-3 and its crude enzyme revealed that L-dopa was degraded via a deamination pathway to produce the intermediate 3,4-dihydroxyphenyl-lactic acid (DHPPA), which subsequently spontaneously oxidized to the final product, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid. The key enzyme mediating this deamination pathway was hypothesized to be a pyridoxal phosphate (PLP)-dependent transaminase.

Through metabolic pathway analysis and whole-genome sequencing with KEGG annotation, three tyrosine transaminase genes (*tyrB1*, *tyrB2*, *tyrB3*) were identified, all of which belong to the core pathway of tyrosine metabolism. The pET29a overexpression vector was constructed, and the three tyrosine transaminases, TyrB1, TyrB2, and TyrB3 (approximately 43 kDa), were successfully expressed and purified in *E. coli* BL21. Enzyme activity assays showed that all three enzymes were PLP- and

α -ketoglutarate-dependent in catalyzing L-dopa degradation. The three enzymes had similar optimal reaction conditions: 0.6 mM α -ketoglutarate, 120 μ M PLP, temperature of 40-45°C, and pH 7.0-7.5. Chiral selectivity experiments demonstrated that all three enzymes could degrade L-dopa, but had no activity toward D-dopa (enantiomer of L-dopa.) , exhibiting strict chiral selectivity.

Phylogenetic analysis revealed that the TyrB transaminases from strain Z-3 were distantly related to L-dopa-degrading enzymes from anaerobic bacteria (e.g., *Clostridium sporogenes*, EDU38870.1; *Bifidobacterium longum*, WP_162491401.1), indicating independent evolution of L-dopa metabolism pathways in aerobic and anaerobic microorganisms. AlphaFold structural predictions showed that the three tyrosine transaminases were highly similar to the tyrosine transaminase (3TAT) in the PDB database (RMSD < 2 Å), with the catalytic pocket residues Lys-246, Glu-131, and Arg-374 being highly conserved.

Molecular docking results showed that L-dopa and L-tyrosine share binding sites (Glu-131, Arg-374); however, L-tyrosine formed a stronger hydrogen bond network due to the hydroxyl group on the phenyl ring. The binding energies of L-dopa and L-tyrosine were -8.368 kJ/mol and -14.058 kJ/mol, respectively, explaining the higher affinity of TyrB1 for L-tyrosine (K_m : L-tyrosine = $107.87 \pm 13.57 \mu$ M; L-dopa = $265.26 \pm 116.01 \mu$ M). Molecular docking predicted that the distance between the catalytic residue Lys-246 and the substrate's active group was 4.3–4.6 Å, suggesting that the side-chain amine group could act as a catalytic base to abstract the α -amino proton, driving the PLP-dependent transamination reaction. The active site of D-dopa was positioned 7.3 Å away from Lys-246, preventing the transamination reaction, thus explaining the enzyme's inability to degrade D-dopa.

Site-directed mutagenesis of Lys-246 to Ala-246 completely abolished the enzyme's degradation activity. Molecular docking results for the mutant protein showed that the shortened side chain of Ala-246 increased the distance between L-dopa and the catalytic site to 9.1 Å, and the change in the catalytic group fully explained the loss of activity. This result is consistent with functional studies of conserved Lys residues in PLP-dependent enzymes and was validated in the L-dopa degradation process.

This study provides an in-depth understanding of the TyrB transaminase-mediated L-dopa degradation pathway in the aerobic microorganism *Burkholderia sp.* Z-3, offering new strains and genetic resources for the remediation

摘要

of L-dopa-contaminated environments, with significant potential for practical applications.

Keywords: Biodegradation; L- dopa; Burkholderia sp.; Aromatic amino acid transaminase

2026 S.-T. Yau High School Science Award
仅用于2026丘成桐中学科学奖论文公示

目录

第一章 文献综述	1
1. 国内外研究进展	1
1.1 左旋多巴简介	1
1.2 L-多巴的环境危害与对人体毒性	1
1.3 L-多巴污染情况	2
1.4 物理化学方法对 L-多巴降解的缺点	2
1.5 与 L-多巴降解相关的微生物	3
1.6 L-多巴的代谢途径	3
1.7 本研究的目的和意义	3
1.8 技术路线	4
第二章 L-多巴降解菌株的分离与鉴定	5
2.1 L-多巴降解菌株的筛选	5
2.2 菌株 Z-3 的菌落形态学特征及生理生化特性	6
2.3 菌株 Z-3 基因组 DNA 提取与 16S rRNA 基因鉴定	7
2.4 菌株 Z-3 对于不同抗生素抗性检测	8
2.5 温度对菌株 Z-3 生长的影响	8
2.6 初始 pH 对菌株 Z-3 生长的影响	9
第三章 菌株 Z-3 对 L-多巴的降解特性与代谢途径解析	10
3.1 菌株利用 L-多巴为唯一碳源生长能力测定	10
3.2 菌株 Z-3 不同接种量对降解 L-多巴的影响	10
3.3 初始 L-多巴浓度对菌株 Z-3 降解 L-多巴的影响	11
3.4 初始 pH 对菌株 Z-3 降解 L-多巴的影响	12
3.5 不同温度对菌株 Z-3 降解 L-多巴的影响	12
3.6 菌株 Z-3 诱导降解实验	13
3.7 菌株 Z-3 降解产物分析	14
3.8 菌株 Z-3 粗酶反应产物分析	15
3.9 菌株 Z-3 降解 L-多巴途径推测	17
第四章 菌株 Z-3 的降解基因克隆表达与降解酶的酶学特性探究	19
4.1 降解基因的推测	19
4.2 降解酶载体的构建	20
4.3 质粒载体诱导表达与蛋白纯化	21

目录

4.4 HPLC 方法对降解酶功能验证	22
4.5 降解酶的手性选择性	23
4.6 降解酶的最适降解条件	24
4.7 降解酶的动力学参数	27
4.8 降解酶的一级序列比对	28
4.9 降解酶的结构预测与蛋白结构比对	29
4.10 降解酶与底物的分子对接	31
4.11 降解酶 TyrB1 催化位点的定点突变	34
全文总结	37
全文讨论	38
创新点	40
研究展望	40
参考文献	41
致谢	45

第一章 文献综述

1. 国内外研究进展

1.1 左旋多巴简介

左旋多巴 (L-多巴, L-dopa), 即 3,4-二羟基苯丙氨酸的天然 L-异构体 (图 1-1), 化学式: $C_9H_{11}NO_4$, 分子量为 197.190。L-多巴是帕金森病 (Parkinson's disease) 的一线治疗药物。随着全球老龄化的加剧帕金森患者数量不断增加, L-多巴的使用量显著增加。

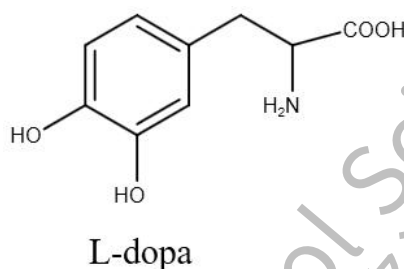


图 1-1 L-多巴结构式

Fig 1-1 The structural formula of L- dopa

L-多巴的发现历史可追溯至 1910-1911 年, 当时 Torquato Torquati 首次从蚕豆中分离出这一化合物(Hornykiewicz, 2010)。后来, Holtz 首次报道了 L-多巴在啮齿动物中的中枢兴奋作用(Karoum et al., 1988), 并提出多巴胺是大脑中活性 L-多巴的代谢产物。

L-多巴的药用价值可追溯至 1963 年, Hornykiewicz 等人发表了关于帕金森病治疗的关键研究。帕金森病是一种神经退行性疾病, L-多巴作为多巴胺的前体, 能够有效补充帕金森病患者大脑中由于黑质损伤而缺失的多巴胺水平。

1967 年, Cotzias 引入了慢性高剂量口服 L-多巴疗法(Cotzias et al., 1967), 并迅速得到了验证, 成为帕金森病治疗的标准方案。此疗法至今仍在临床中得到广泛应用(Fahn, 2008, Poewe et al., 2010, Pezzoli and Zini, 2010)。

1.2 L-多巴的环境危害与对人体毒性

药物活性成分 (Active Pharmaceutical Ingredient, API) 是指用于制药中的物质或物质混合物, 在药品制造过程中作为药品的主要活性成分。这些物质具有药理活性或其他直接作用, 能够在诊断、治疗、症状缓解、处理或预防疾病过程中发挥作用, 或对机体的功能或结构产生影响。

包括L-多巴在内的API释放进入水体可能引发严重的环境问题, 其对生态环境和人类健康的影响已引起国际社会的广泛关注(Hignite and Azarnoff, 1977)。

API还可能导致生物的抗药性,例如,某些病原体在污水处理厂、受纳水体或饮用水源中暴露于耐药的API时,可能发生变异,导致饮用水污染、污水处理效果下降等问题,进而对人类健康造成危害(Länge et al., 2001, Schwartz et al., 2003, Crane et al., 2006)。

此外,许多体外研究表明,L-多巴对各种培养的神经元和非神经元细胞具有强效毒性,且表现为致命性(De Andres et al., 2009)。其毒性主要与L-多巴的自动氧化作用有关,氧化过程中会产生多种有害的自由基,包括超氧化物、过氧化氢和羟基自由基,以及通过多巴黑色素代谢途径产生的半醌和醌。这些毒性效应可以通过与抗氧化剂,特别是含硫醇化合物的共同治疗来阻断(Švitel et al., 1998)。研究表明,L-多巴通过引发细胞凋亡杀死细胞,其氧化产物的强氧化性可破坏细胞膜和线粒体膜上的脂质,导致细胞和线粒体受损。当培养的神经元暴露于L-多巴时,会诱导典型的细胞凋亡级联反应,包括细胞收缩、膜起泡、细胞核和DNA断裂等现象。此外,由于L-多巴与L-酪氨酸的结构相似,它可能替代蛋白质中的L-酪氨酸,导致蛋白质错误折叠(Giannopoulos et al., 2019)。此外,L-多巴还作为抗营养因子,食用后可能引起呕吐、恶心、腹胀、运动障碍等不良反应(Eisenman et al., 2007)。

1.3 L-多巴污染情况

L-多巴及其他API进入水体的主要途径包括:(1)制药企业的生产废水排放及固体废弃物处置;(2)未完全吸收的API及其代谢产物通过排泄物进入水体;(3)过期药物的不当处置。

L-多巴在治疗帕金森病的同时,也暴露了许多问题。由于较低的药物利用率,使用L-多巴治疗帕金森病时,通常需要长期且大剂量服药,病人每天需要服用3000-6000mg的L-多巴才能维持治疗效果(Melamed et al., 1998, Guan et al., 2016)。根据相关药代动力学研究,L-多巴在人体内的代谢途径显示,绝大部分会转化为高香草酸(VMA),并通过尿液排出体外,而约5%的L-多巴则以未代谢的形式直接通过尿液排出(Calne et al., 1969, Borud et al., 1972)。

由于L-多巴对生物具有毒性,含有L-多巴的废水必须经过处理,才能安全排放至自然环境中(Kaakkola et al., 1985, Min et al., 2015, Pappert et al., 1996, Polanowska et al., 2020)。

1.4 物理化学方法对L-多巴降解的缺点

目前,药物污染物的降解修复技术主要包括化学和物理方法。已有多篇文献提出利用物理、化学等方法降解制药废水中的L-多巴。研究表明,臭氧氧化技术可有效去除污水中的L-多巴(鱼杰, 2013),但需要注意的是,L-多巴的降解产物并未得到有效降解,处理后的废水中的化学需氧量(Chemical Oxygen Demand,

COD) 去除率不足 60%。

Isariebel Quesada-Peñate 等人研究了利用活性炭吸附技术和超声溶解技术去除废水中的 L-多巴(Quesada-Penate et al., 2009 , Isariebel et al., 2009b , Isariebel et al., 2009a)。使用超声溶解技术去除水中的 L-多巴时, 水体中的 COD 未得到有效降解, 只能部分氧化, 并产生有机酸和芳香族化合物等中间产物。

1.5 与 L-多巴降解相关的微生物

在帕金森病的治疗过程中, L-多巴通常需要大剂量服用才能达到显著疗效。初期研究认为, L-多巴在人体外周内被芳香族氨基酸脱羧酶 (Aromatic Amino Acid Decarboxylase, AADC) 降解, 导致药物无法有效穿越血脑屏障发挥作用 (Maini Rekdal et al., 2019)。因此, 为了减少外周代谢, 通常将 L-多巴与 AADC 抑制剂 (如卡比多巴) 联合使用。然而, 尽管如此, 仍有约 56% 的 L-多巴在外周代谢, 导致患者体内药物浓度波动较大, 并且随着时间的推移, 疗效逐渐减弱。与此同时, 越来越多的证据表明, 肠道微生物群与 L-多巴的代谢相互作用, 可能显著影响治疗效果。研究发现, 广谱抗生素的使用能够改善 L-多巴的治疗效果, 这提示肠道微生物可能在药物代谢过程中发挥了重要作用 (Sampson et al., 2016 , Tsai et al., 2022 , Xu et al., 2023 , O'Neill, 2019): 粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*), 埃格特菌 (*Eggerthella lenta*), 生孢梭菌 (*Clostridium sporogenes*), 双歧杆菌属 (*Bifidobacterium sp.*), 幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*)。

1.6 L-多巴的代谢途径

尽管 L-多巴的生物降解研究尚未广泛应用, 但已有多项研究在人类和动物实验中发现了多条与 L-多巴代谢相关的途径及基因 (Ranjith et al., 2007)。由于 L-多巴的结构与部分氨基酸相似 (Contin and Martinelli, 2010), 人体内主要依赖芳香族氨基酸脱羧酶 (AADC) 对其进行脱羧作用, 将其转化为多巴胺。此外, 药代动力学研究表明, 人体代谢 L-多巴的最终产物为高香草酸。然而, 近年来的研究发现, 除了人体自身的代谢机制, 肠道微生物也能够降解 L-多巴, 并且其代谢途径更加多样化 (图 1-2) (Abrams et al., 1971 , Rivera-Calimlim et al., 1970 , LeWitt, 2015)。

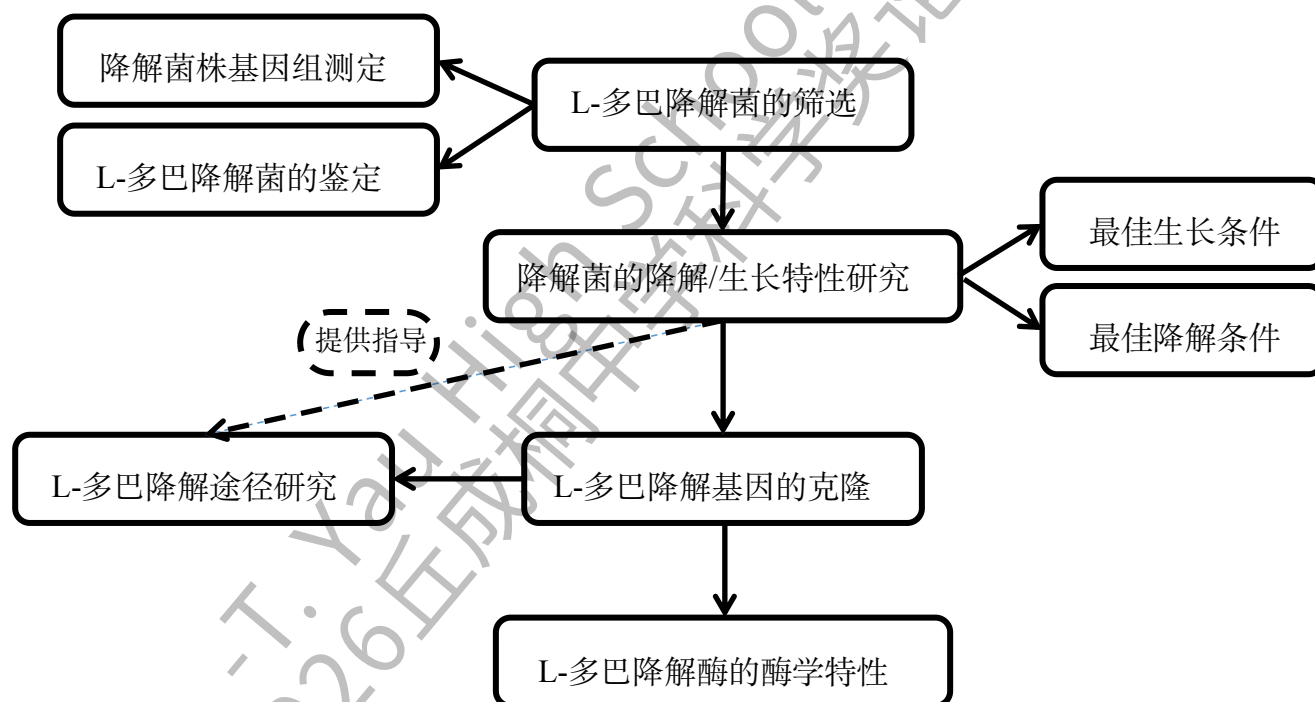
1.7 本研究的目的是和意义

L-多巴是帕金森病治疗的核心药物, 全球年产量超过 10 万吨, 覆盖广泛的群体, 且药物消耗量巨大。然而, 约 5% 的 L-多巴未在人体内反应, 直接随尿液排出。在药物生产过程中, 约 0.25% 的原料药流入环境中, 这些残留的 L-多巴可能通过水体污染对生态系统产生神经毒性效应, 造成了日益严重的环境污染问题。

现有的物理化学降解方法存在诸多局限，如无法完全矿化药物、设备昂贵及使用受限等。而微生物降解因其高效性和环境友好性，已成为解决此类污染的首选策略。然而，目前尚未有利用微生物降解 L-多巴的报道。相关 L-多巴代谢的研究主要集中于肠道中的厌氧微生物，少有好氧微生物降解报道。虽然有多项研究表明氨基酸转氨酶可以在 L-多巴的代谢中发挥作用，但多集中于推测，缺少相关分子生物学证据。

本研究旨在利用生物技术降解环境中的 L-多巴，并研究降解过程中的关键基因以及阐明微生物降解 L-多巴的代谢途径。实验室分离出一株好氧 L-多巴降解菌，命名为 *Burkholderia* sp. Z-3。利用分子生物学与微生物学方法研究菌株 Z-3 的生长特性，降解特性，以及转氨途径的代谢通路和降解酶的相关特性。本研究丰富了好氧菌降解 L-多巴的相关研究。

1.8 技术路线



第二章 L-多巴降解菌株的分离与鉴定

2.1 L-多巴降解菌株的筛选

L-多巴的吸收峰在 280 nm 处变得平缓 (图 2-1)，初步判断 L-多巴被降解了。

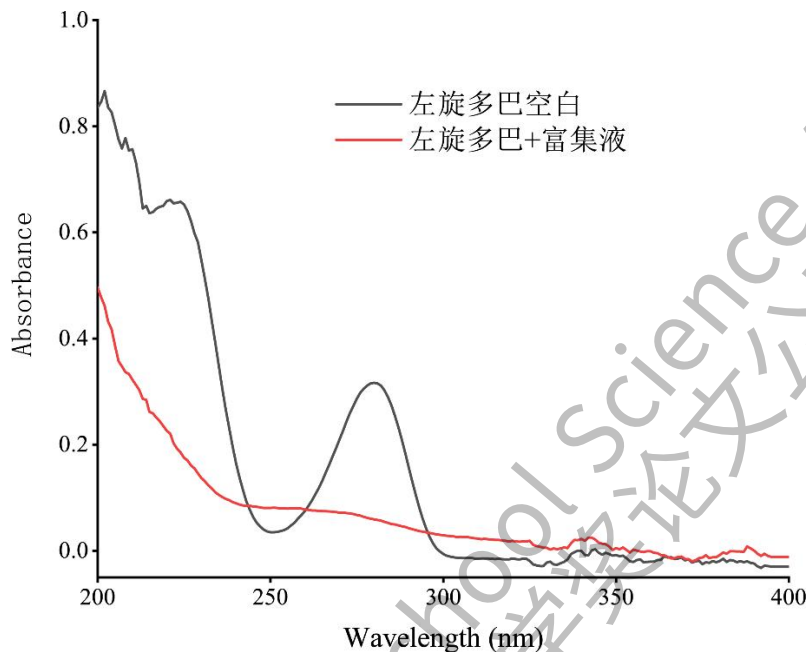


图 2-1 富集液降解L-多巴的紫外扫描图

Fig. 2-1 UV-Vis spectrum of L-dopa degradation by enrichment

将具有降解效果的富集液进行稀释涂布后, 将不同形态的菌株进行纯化培养后进一步验证菌株对于L-多巴的降解能力。最终获得一株L-多巴降解菌, 命名为 Z-3。

将菌株Z-3 接种, 检测后发现, Z-3 在 24 h 内可以完全降解 0.5 mM 的 L-多巴 (图 2-2)。但未在液相图中发现明显的产物峰。

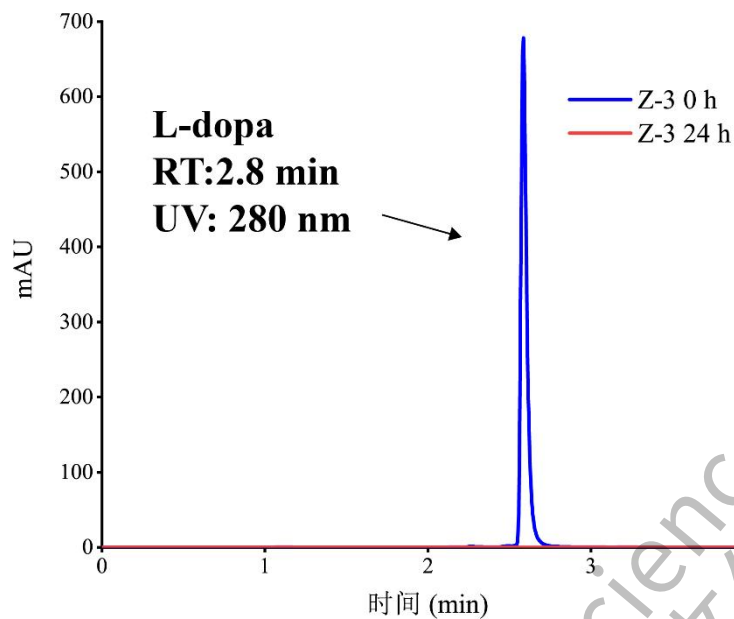


图 2-2 菌株 Z-3 降解 L-多巴液相图

Fig 2-2 HPLC of L-dopa degradation by strain Z-3

2.2 菌株 Z-3 的菌落形态学特征及生理生化特性

对菌株Z-3，对其进行形态学观察，LB平板上生长时菌落呈淡黄色，圆形，小而凸起，表面湿润光滑，边缘整齐，不透明（图 2-3 A）。Z-3 呈短棒状（ $0.5\ \mu\text{m} \times 1.1\ \mu\text{m}$ ）（图 2-3 B），无鞭毛。

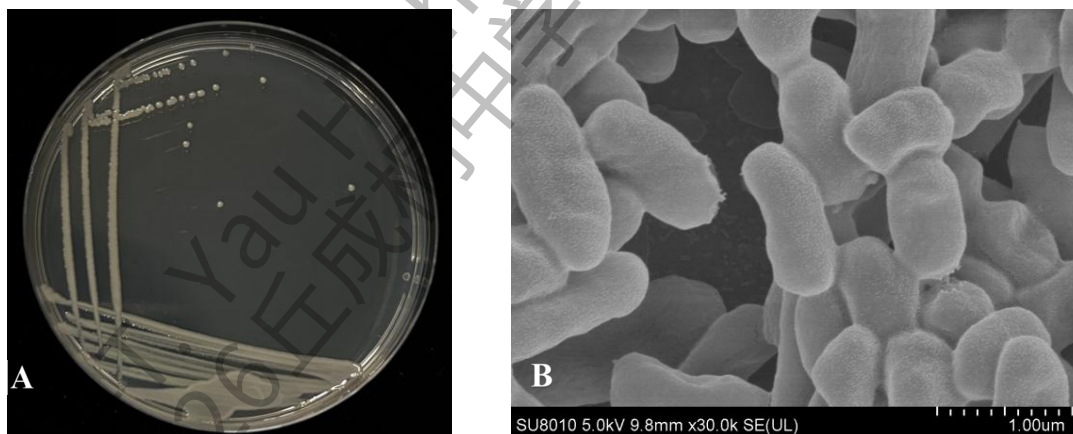


图 2-3 降解菌 Z-3 的菌落形态 (A) 与扫描电镜图 (B)

Fig2-3 Colony morphology (A) and scanning electron micrograph (B) of the degrading bacterium

Z-3

菌株 Z-3 的生理生化特征为：需氧，V-P 反应无变化，为阴性；吲哚反应阴性；不能水解淀粉，氧化葡萄糖产酸，甲基红反应变黄。这些特征符合已报到的 *Burkholderia* sp. 菌株的基本特征。

2.3 菌株 Z-3 基因组 DNA 提取与 16S rRNA 基因鉴定

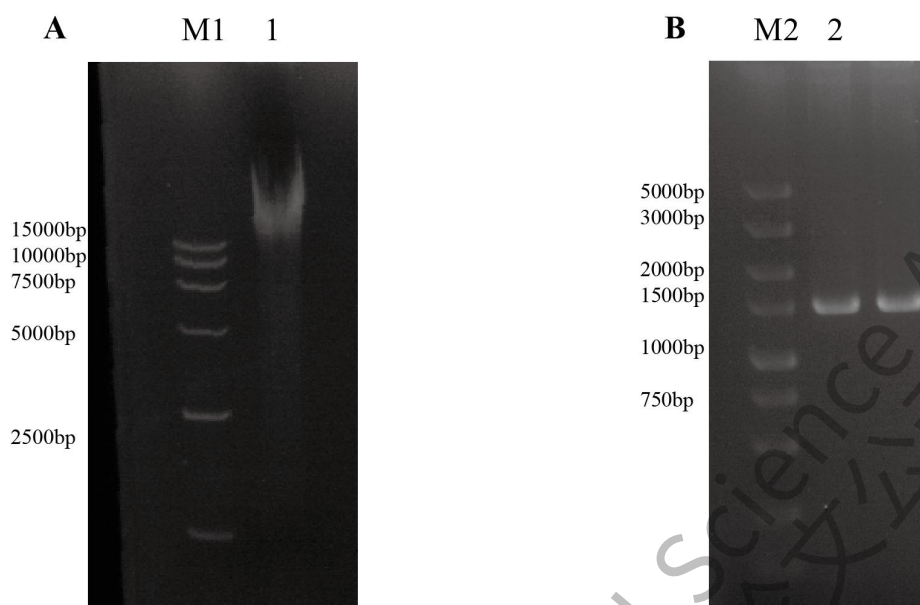


图 2-4 菌株基因组 DNA (A) 与 16S rRNA 琼脂糖凝胶电泳图(B)

Fig 2-4 Agarose gel electrophoresis images of genomic DNA (A) 16S rRNA of the strain(B)

M1:DL 15000 marker; 1:total DNA of stain Z-3; M2:DL 5000 marker; 2:16S rRNA gene of stain Z-3

降解菌株的基因组 DNA 提取电泳结果如图所示 (图 2-4 A)。将菌株 Z-3 的 16S rRNA 基因序列在数据库 EzBilCloud 中比对分析, 结果显示菌株 Z-3 与属亲缘关系最近, 其中与 *Burkholderia seminalis* R-24196T 相似性达 99.79%, 与 *Burkholderia paludis* MSh1^T 相似性达 99.73%。结合菌落形态特性、生理生化特征以及 16S rRNA 基因系统发育分析, 菌株 Z-3 初步鉴定为 *Burkholderia* sp.(图 2-5)。

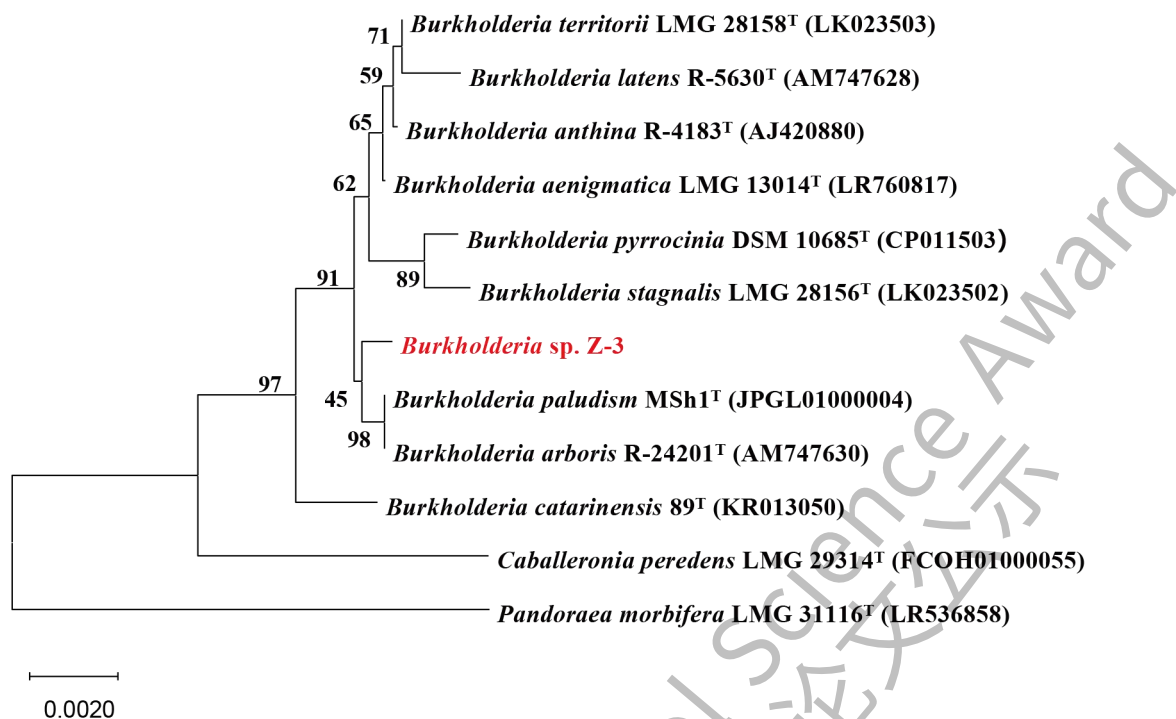


图 2-5 基于 16S rRNA 基因构建的菌株 Z-3 系统发育树

Fig2-5 Phylogenetic tree of strain Z-3 based on 16S rRNA gene

2.4 菌株 Z-3 对于不同抗生素抗性检测

将 Z-3 菌株徒步后并贴有药敏片的 LB 固体培养基观察，以药敏片周围含有明显抑菌圈的视为缺乏相关抗性，不存在明显抑菌圈的视为拥有抗性。结果如下（表 2-1），该菌株对于庆大霉素，青霉素，氨苄青霉素，与红霉素具有抗性，对其他抗生素均不具备抗性。

表 2-1 菌株 Z-3 对于不同抗生素抗性

Table2-1 Strain Z-3 was resistant to different antibiotics

抗生素名称	抗性	抗生素名称	抗性
庆大霉素	+	氨苄青霉素	+
卡那霉素	-	氯霉素	-
壮观霉素	-	红霉素	+
青霉素	+		

有抗性：+ 无抗性：-

2.5 温度对菌株 Z-3 生长的影响

降解菌 Z-3 在不同的温度条件下，生长状态如下如图所示（图 2-6），在 25℃ 时生长较为缓慢，在 30℃ 时可以达到最大的较高的菌体浓度，且速率与 37℃ 时

具有相近的增长速率，在 37℃ 时具有最快的生长速率，但在 42℃ 时则无法生长。综上所述 Z-3 最适生长温度为 30℃。

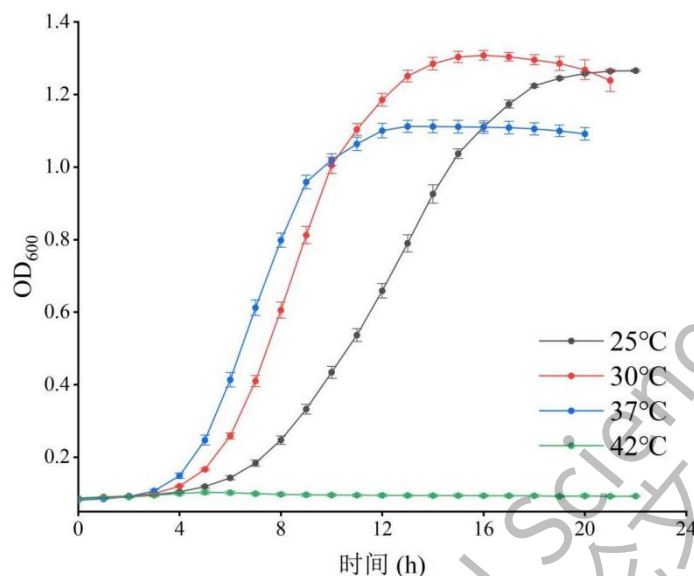


图 2-6 温度对 Z-3 生长的影响

Fig2-6 Effect of temperature on Z-3 growth

2.6 初始 pH 对菌株 Z-3 生长的影响

降解菌 Z-3 在不同的 pH 条件下，生长状态如下如图所示（图 2-7），菌株在低 pH 时，生长速率更快，说明该菌株在低 pH 条件下具有很强的生长活性。在 pH 9.0 时则生长最慢。综上所述 Z-3 最适生长 pH 为 5.0。

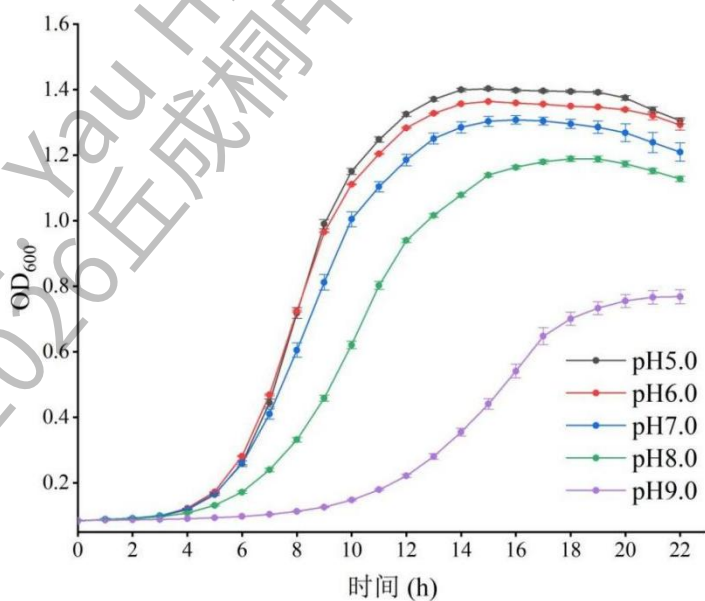


图 2-7 pH 对 Z-3 生长的影响

Fig2-7 Effect of pH on the growth of Z-3

第三章 菌株 Z-3 对 L-多巴的降解特性与代谢途径解析

3.1 菌株利用 L-多巴为唯一碳源生长能力测定

如图所示（图 3-1）降解菌 Z-3 可以利用 L-多巴作为唯一碳源生长。因此推断出菌株在代谢 L-多巴时将底物转化为自身可利用的能量物质。菌株在刚刚接入 MM 时生长缓慢，可能是由于菌株没有完全适应只存在 L-多巴的寡营养环境，但随着时间的增加在菌株适应环境之后，菌株利用 L-多巴及其代谢物开始快速生长，并在 48 h 时由于 L-多巴消耗殆尽而停止生长。同时 L-多巴的减少趋势也与菌株的生长趋势相一致。

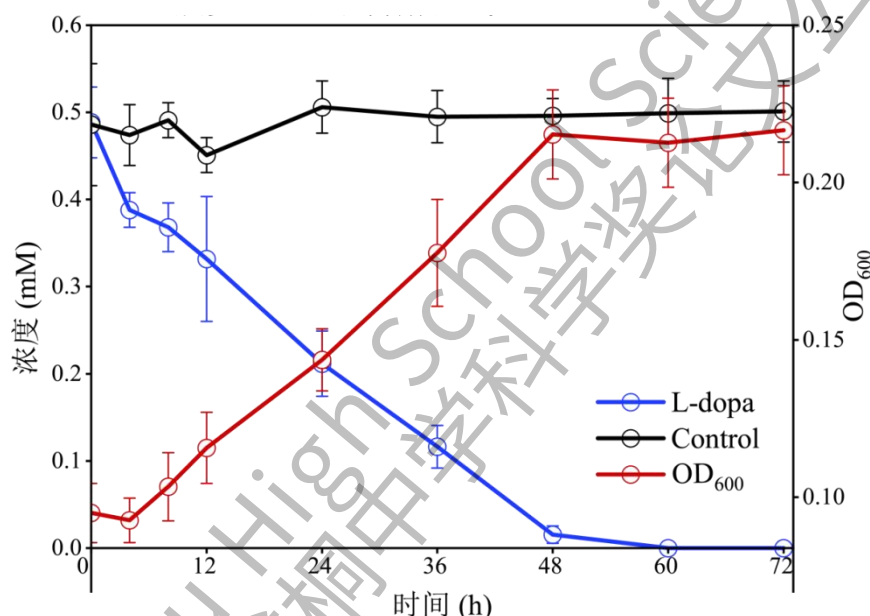


图 3-1 菌株 Z-3 以 L-多巴为唯一碳源生长降解曲线

Fig3-1 Z-3 took L-dopa as the only carbon source

3.2 菌株 Z-3 不同接种量对降解 L-多巴的影响

如（图 3-4）所示，菌株 Z-3 可在菌体浓度为 0.2、0.6、0.8、1.0 时，在 8 小时内完全降解 0.5 mM 的 L-多巴。降解速率与接种量呈正相关，即随着菌体浓度的增大，降解速率加快。在 4 小时时，菌体浓度（OD₆₀₀ 值）为 1.0 时降解率最高，达到 79.76%。

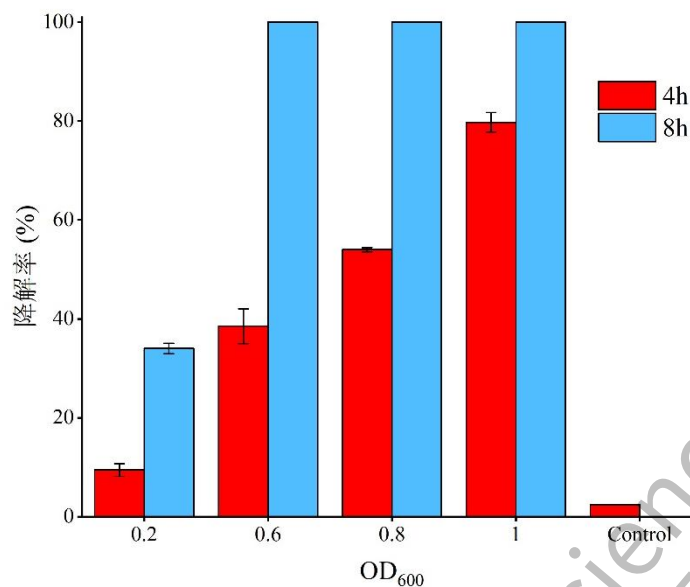


图 3-2 菌株 Z-3 不同接种量对 L-多巴降解的影响

Fig3-2 Effects of different inoculations of Z-3 on L-dopa degradation

3.3 初始 L-多巴浓度对菌株 Z-3 降解 L-多巴的影响

如 (图 3-3) 所示, 无论 L-多巴的初始浓度如何, Z-3 菌株均可在前期快速降解不同浓度的 L-多巴, 且降解趋势相似, 不受药物浓度的显著干扰。这表明菌株 Z-3 对 L-多巴具有较强的耐受性。在 0.5 mM 浓度下, Z-3 可在 8 小时内完全降解; 在 2.5 mM 浓度下, 28 小时内也能完全降解 L-多巴。

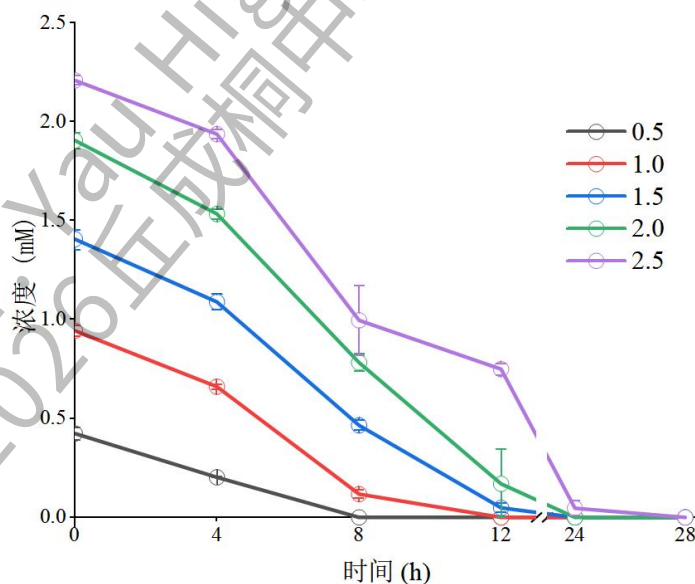


图 3-3 菌株 Z-3 不同接种量对 L-多巴降解的影响

Fig3-3 Effects of different dose of Z-3 on L-dopa degradation

3.4 初始 pH 对菌株 Z-3 降解 L-多巴的影响

初始 pH 对菌株 Z-3 降解 L-多巴的影响如 (图 3-6) 所示。在 pH 5.0 至 9.0 范围内, 12 小时降解率均超过 60%, 表明 pH 对菌株 Z-3 的降解活性影响不大, 菌株表现出较好的环境适应性。在 pH 7.0 时, 降解速率最快。尽管这一结果与菌株的最适生长 pH 不完全一致 (pH 5.0), 但在 pH 5.0 和 pH 7.0 时, 菌株的生长差异不显著。可能的原因是, L-多巴的关键降解酶的最适反应 pH 接近 7.0。

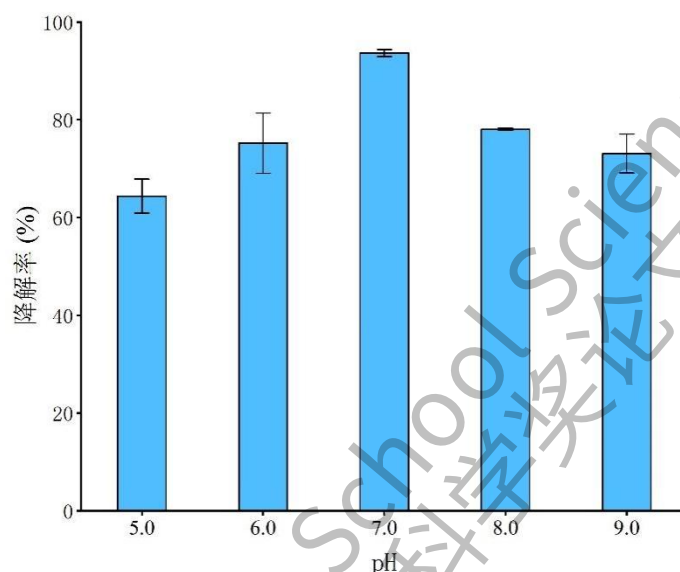


图 3-4 菌株 Z-3 对不同 pH L-多巴降解的影响

Fig3-4 Effects of Z-3 on L-dopa degradation at different pH

3.5 不同温度对菌株 Z-3 降解 L-多巴的影响

如 (图 3-5) 所示, 在 30-35℃ 范围内, 菌株 Z-3 对 L-多巴的降解率在 12 小时内均高于 90%。在 37℃ 时, 降解速率最快, 达到 100%, 这与菌株在 37℃ 时表现出的最快生长速率一致 (图 2-6)。随着温度降低, 菌株对 L-多巴的降解速率减慢, 可能是由于降解酶在低温下活性不足, 且菌株在低温下生长缓慢所致。42℃ 时, 菌株无法降解 L-多巴, 这与先前实验中发现菌株在 42℃ 时无法生长的结果相符 (图 2-6)。

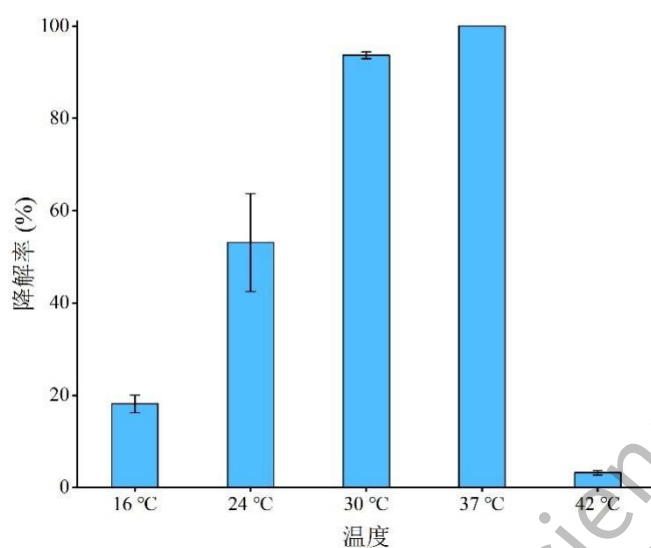


图 3-5 菌株 Z-3 对不同温度 L-多巴降解的影响

Fig3-5 Effects of Z-3 on L-dopa degradation at different temperatures

3.6 菌株 Z-3 诱导降解实验

由于组成型启动子不受外界条件的影响，若 L-多巴降解酶的启动子为组成型，则诱导组与非诱导组的降解曲线应非常相似。而若为诱导型启动子，由于诱导型启动子需要特定诱导物的结合才能启动基因表达，非诱导组与诱导组相比，降解速率应先低后高，并且非诱导组的降解曲线会出现明显的延滞期，即底物浓度变化缓慢。通过比较诱导组与非诱导组的降解曲线差异，可以判断降解基因的启动子类型。

如 (图 3-6) 所示，诱导组和非诱导组的降解速率相似，且非诱导组未出现明显的延滞期，因此可以推测菌株 Z-3 的降解机制为组成型，而非诱导型。因此，我们无法通过分析诱导组与非诱导组的转录组差异来确定降解基因，需要通过其他方法来确认。

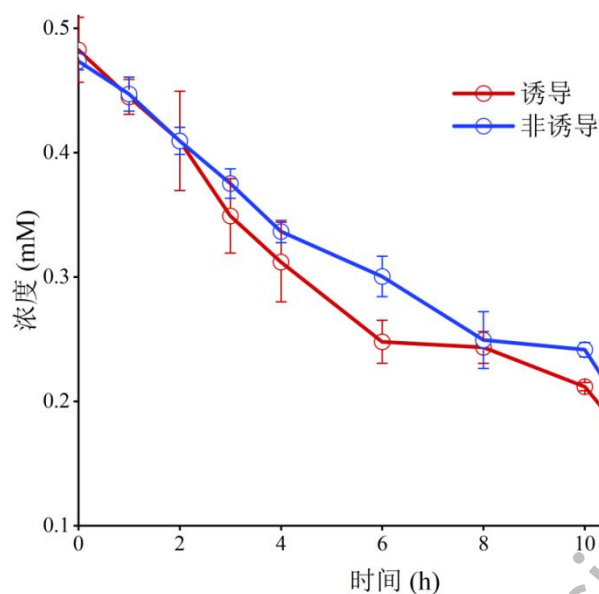


图 3-6 菌株 Z-3 诱导降解实验

Fig3-6 Induced degradation experiment of Z-3

3.7 菌株 Z-3 降解产物分析

LC-MS 分析结果 (图 3-7) 显示, Z-3 的降解产物包括 3,4-二羟基苯基乳酸 (DHPLA), 这一产物已在先前的研究中报道, 属于脱氨途径的特征产物。相比之下, 脱羧途径的特征产物 (如多巴胺、酪氨) 及 COMT 途径的产物 (如 3-OMD、VPA、VLA) 未在反应中检测到。因此, 初步推断 Z-3 的降解途径为脱氨途径。

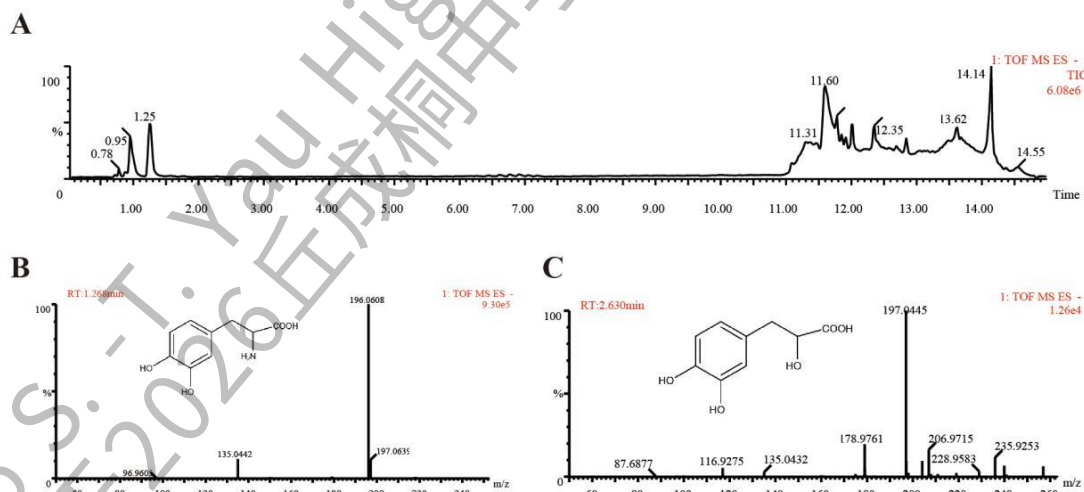


图 3-7 LC-MS 总离子流图 (A) 底物 L-多巴 (B) 反应产物 DHPLA(C)

Fig3-7 LC-MS total ion flow diagram (A) substrate L-dopa (B) reaction product DHPLA(C)

3.8 菌株 Z-3 粗酶反应产物分析

如图所示 (图 3-8)，只有在添加 PLP 和 α -酮戊二酸后，降解酶才能有效催化底物反应，未添加时，底物降解效果显著降低。这表明，Z-3 菌株的关键降解酶可能是 PLP 依赖型转氨酶，并且以 α -酮戊二酸作为氨基受体。这为确定关键降解基因提供了线索。

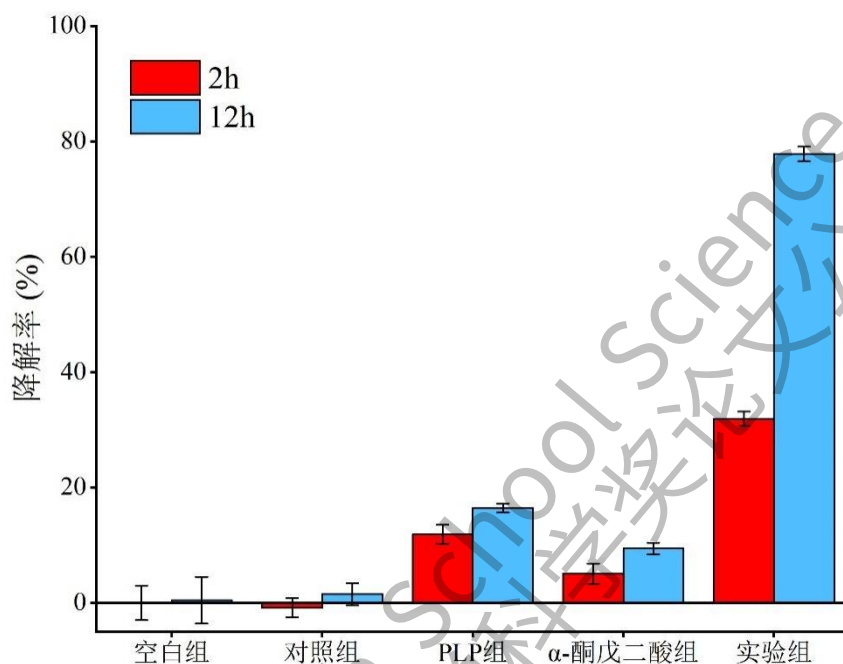


图 3-8 菌株 Z-3 粗酶不同体系中的降解率

Fig3-8 Degradation rate of Z-3 crude enzyme reaction

根据前人的研究和 Z-3 菌株降解产物的推测，以及对其对两种辅因子 (PLP 和 α -酮戊二酸) 依赖性的分析，Z-3 菌株的降解酶的第一步反应由一种 PLP 依赖型转氨酶催化。基因组分析显示，Z-3 菌株中存在三个由 *tyrB* 基因编码的 PLP 依赖型转氨酶，这些酶能够将 L-多巴转化为 DHPPA。然而，由于 DHPPA 分子中含有 α -酮基酸的不稳定结构，这使得产物易于氧化脱羧，生成醛和羧酸。LC-MS 分析结果显示，降解产物包括 3,4-二羟基苯乙醛 (2-(3,4-dihydroxyphenyl)acetaldehyde) 和 3,4-二羟基苯乙酸 (2-(3,4-dihydroxyphenyl)acetic acid) (见图 3-9B,C)。其中，3,4-二羟基苯乙醛会继续氧化，最终转化为 3,4-二羟基苯乙酸。这一变化解释了在 LC-MS 中，3,4-二羟基苯乙醛的响应值较低，并且随着时间的推移，更多结构稳定的 3,4-二羟基苯乙酸逐渐累积(Wada and Fellman, 1973)。

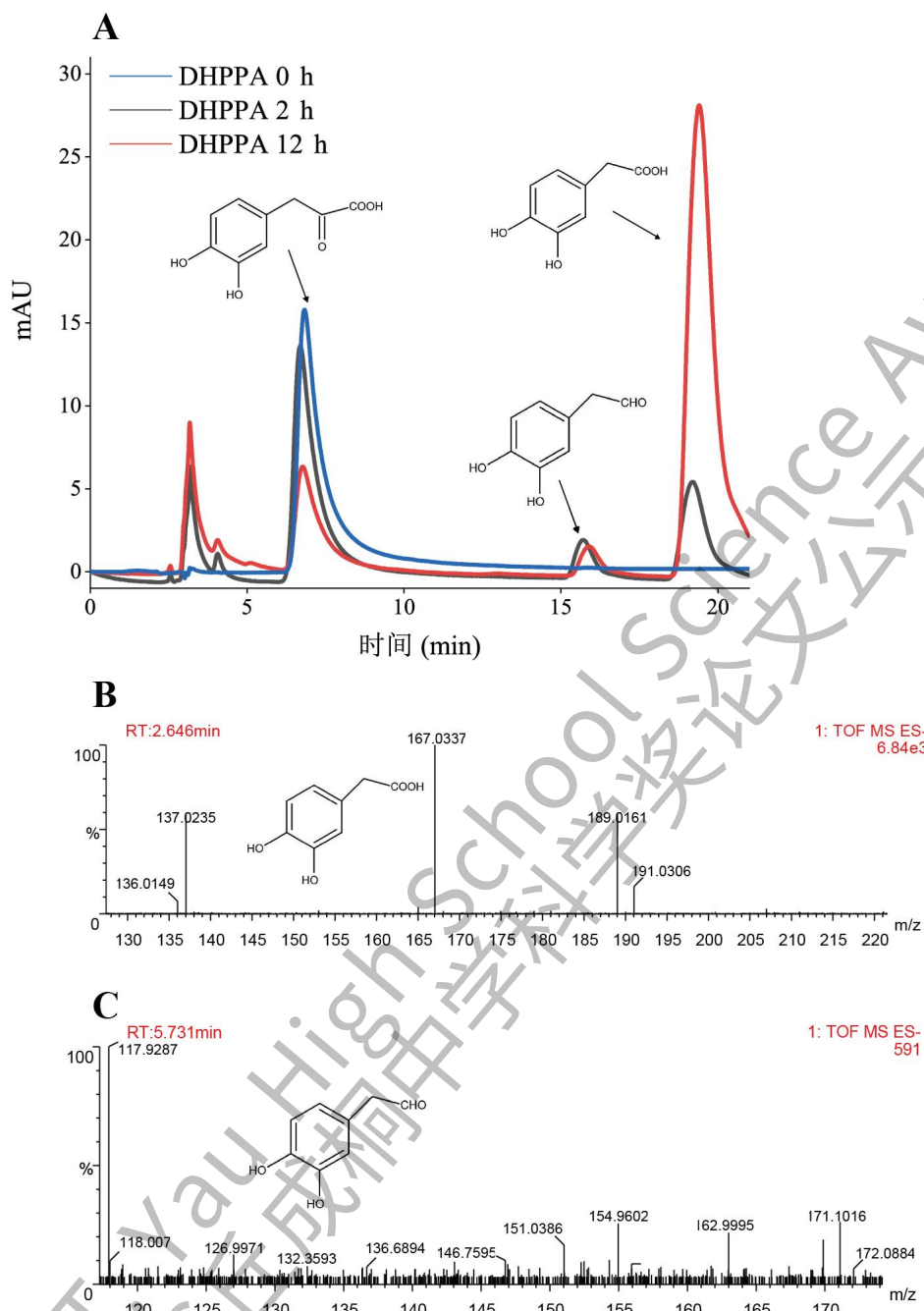


图 3-9 DHPPA 自然降解液相图 (A) 反应产物质谱图 (B) (C)

Fig3-9 Natural degradation of DHPPA in liquid phase (A) spectrum of reaction products (B) (C)

在 Z-3 的粗酶反应样品中未能检测到 DHPPA (图 3-x)。这一现象可能是由于在终止酶反应时的加热加速了 DHPPA 的分解。然而，我们仍然能够检测到由 DHPPA 自然分解产生的两种产物 (图 3-10)，这为 Z-3 通过脱氨途径降解 L-多巴提供了证据。

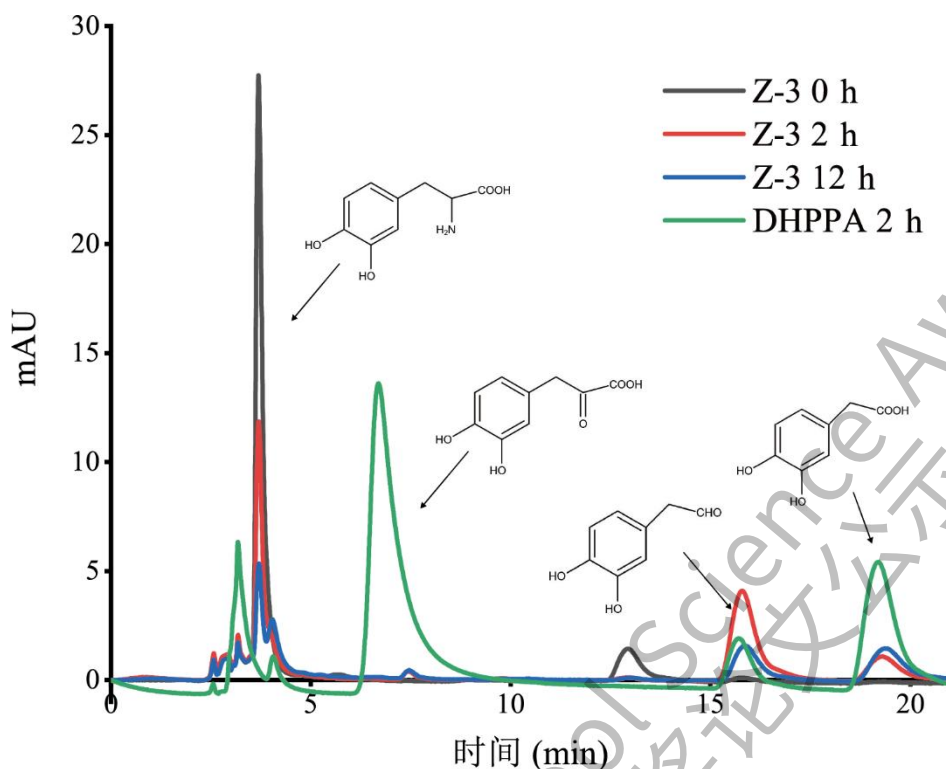


图 3-10 Z-3 粗酶反应液相图

Fig3-10 Z-3 crude enzyme reaction liquid phase diagram

3.9 菌株 Z-3 降解 L-多巴途径推测

根据已有研究(Cirstea et al., 2023), L-多巴在微生物中的代谢途径与 L-酪氨酸相似。L-多巴和 L-酪氨酸在化学结构上具有相似性, 且常由底物特异性较弱的酶共同催化。通过 KEGG 酪氨酸代谢通路和 Z-3 基因组分析, 发现 Z-3 中具有完整的酪氨酸代谢基因, 推测 L-多巴的代谢也可以通过相似的路径进行 (图 3-11)。

第三章 菌株 Z-3 对 L-多巴的降解特性与代谢途径解析

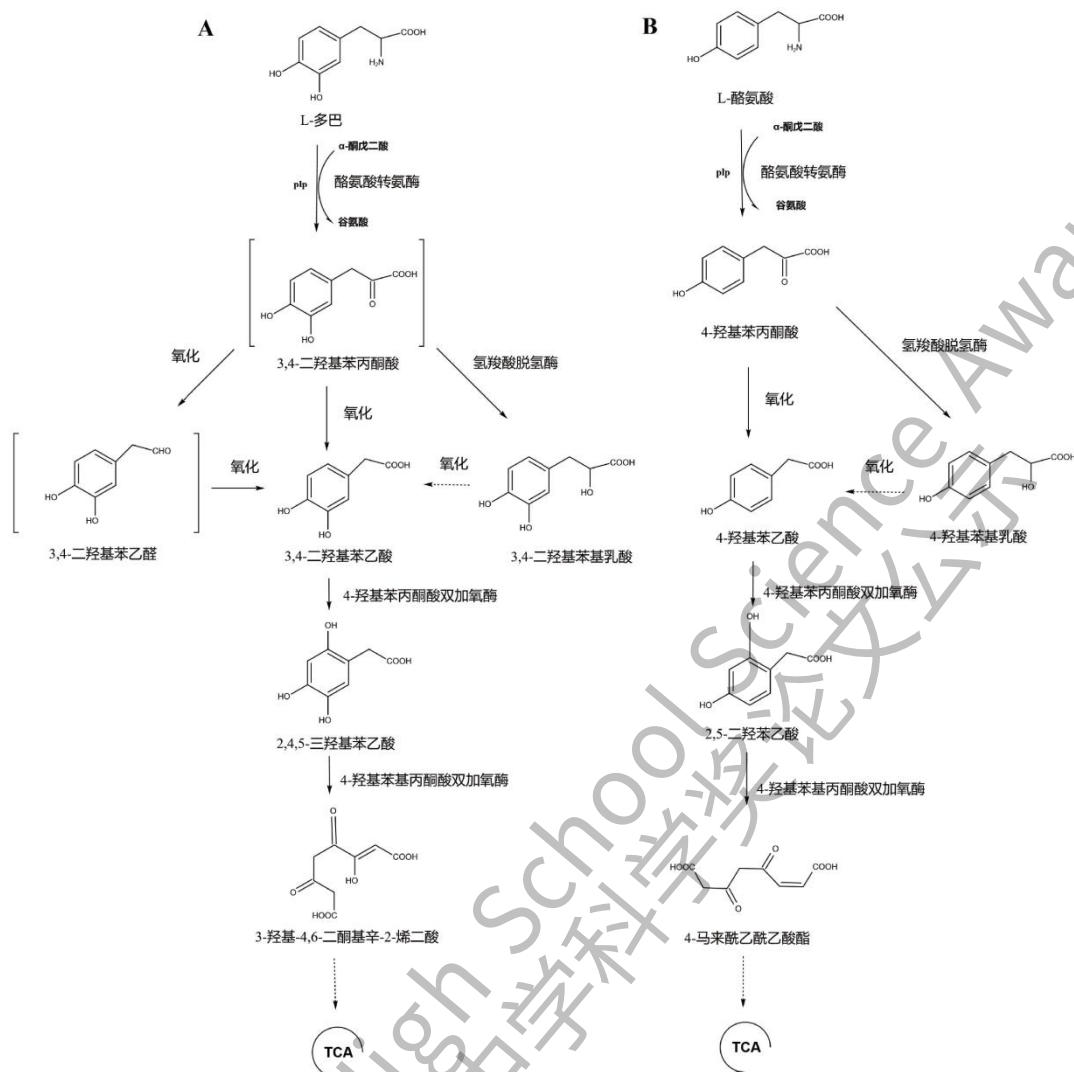


图 3-11 L-多巴代谢途径 (A) 和酪氨酸代谢途径 (B)

Fig3-11 L-dopa metabolic pathway (A) and tyrosine metabolic pathway (B)

第四章 菌株 Z-3 的降解基因克隆表达与降解酶的酶学特性探究

4.1 降解基因的推测

根据全基因组测序结果的标注, 推测在菌株 Z-3 中三个基因 *orf-2339*, *orf-5869*, *orf-5957* (分别命名为 *tyrB1*, *tyrB2*, *tyrB3*) 编码菌株 Z-3 中的三个转氨酶 (分别命名为 TyrB1, TyrB2, TyrB3)。根据全基因组的测序结果与 KEGG 标注发现, 这三个转氨酶都涉及酪氨酸合成与分解中的关键酶即 TyrB 型转氨酶。TyrB 蛋白是一种磷酸吡哆醛 (PLP) 依赖的转氨酶, 主要参与芳香族氨基酸 (如酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸) 的生物合成与分解。它催化 α -酮酸与氨基酸之间的氨基转移反应, 生成相应的氨基酸, 也会通过相似的反应去分解芳香族氨基酸。

根据 InterPro 数据库中的比对结果, 发现这三个 TyrB 酶属于归属于 PLP 依赖的转氨酶 (Pyridoxal Phosphate-Dependent Aminotransferase) 家族, 具体为芳香族氨基酸转氨酶 (Aromatic-amino-acid transaminase) 亚家族 (EC:2.6.1.57) 并且。由于 L-多巴代谢与酪氨酸代谢的相似性, 并且在 Z-3 的粗酶反应中, 降解酶表现出来 PLP 的依赖型。所以推测菌株 Z-3 是通过这三个基因所编码的酶降解 L-多巴。

收集了多种报道过的与 L-多巴降解脱氨途径有关的第一步降解酶, 其中蛋白 EDU38870.1 是菌株 *Clostridium sporogemes* ATCC 1579 中的一种转氨酶, 可以在厌氧条件下通过转氨途径代谢 L-多巴。而 WP 162491401.1 (*Bifidobacterium longum*), 根据作者推测, 也可以在厌氧条件下代谢 L-多巴, 这两种酶都可以将 L-多巴转化为 DHPPA, 与 TyrB 代谢 L-多巴的作用相同。然而序列比对结果发现(图 4-1), 菌株 Z-3 的 TyrB 降解酶与这两种厌氧菌来源的 L-多巴降解酶在进化上具有较远的亲缘关系。此外, TyrB 为好氧酶, 与这两种厌氧酶在代谢环境和催化机制上存在显著差异, 这表明 L-多巴降解途径可能在好氧与厌氧微生物中经历了独立演化。(van Kessel et al., 2020, Laursen et al., 2021)。

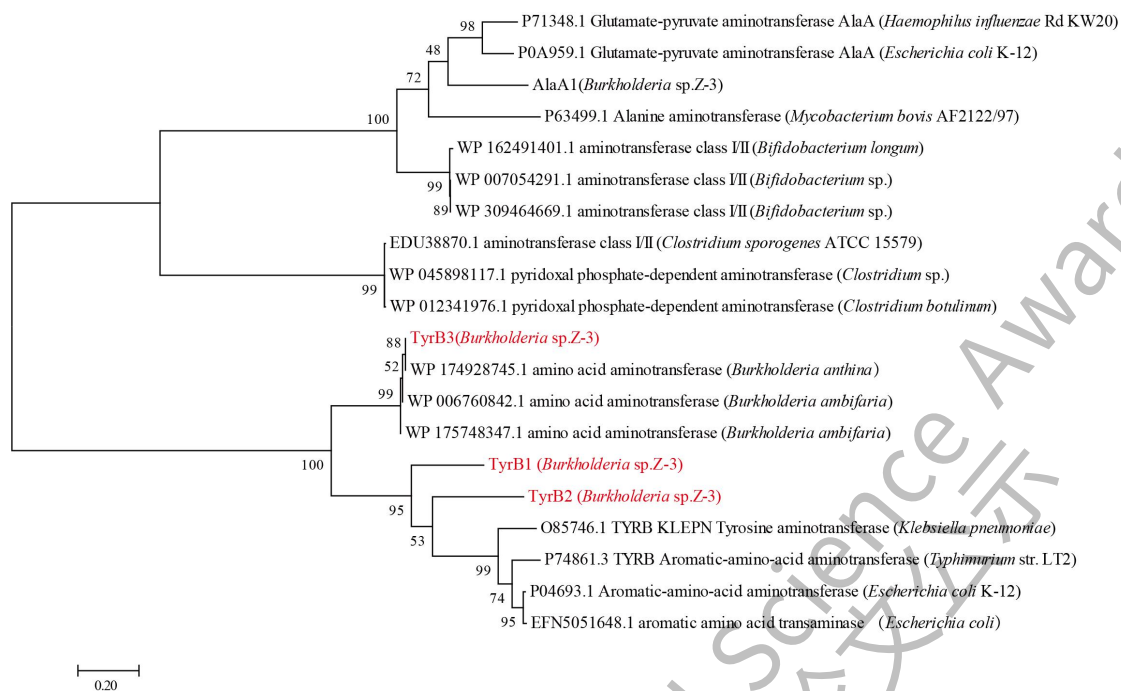


图 4-1 脱氨途径下与 L-多巴降解相关的酶进化树

Fig4-1 Evolutionary tree of enzymes related to L-dopa degradation under deamination pathway

4.2 降解酶载体的构建

从菌株 Z-3 基因组中扩增出 *tyrB1*, *tyrB2*, *tyrB3* 三个基因片，经胶回收后与酶切后的 pET-29a 进行同源重组，导入到 *E.coli* BL21(DE3) 中，构建 TyrB1, TyrB2, TyrB3 的异源表达菌株 *E.coli* BL21(pET-*tyrB1*), *E.coli* BL21(pET-*tyrB2*), *E.coli* BL21(pET-*tyrB3*)，使用 T7-T7t 引物扩增验证三种表达载体（图 4-2），并选取测序验证无误的表达菌株，用于后续的 TyrB1, TyrB2, TyrB3 的表达与纯化。

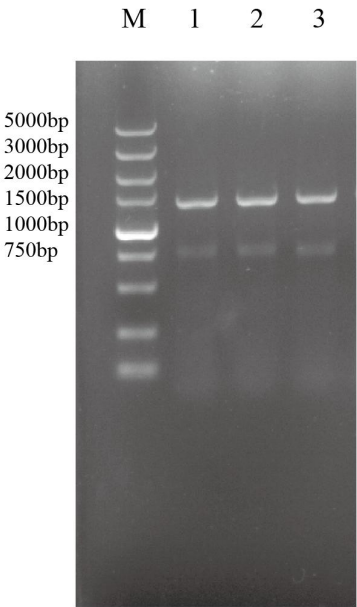


图 4-2 质粒载体 PCR 验证

Fig4-2 Plasmid vector PCR validation

M:DL5000 marker; 1:*tyrB1* gene; 2:*tyrB2* gene; 3:*tyrB3* gene

4.3 质粒载体诱导表达与蛋白纯化

经过 IPTG 诱导培养后,对细胞进行破碎处理,收集上清液,并通过 Co-NTA 亲和层析柱进行纯化。结果显示,三种 TyrB 转氨酶均形成单一蛋白条带,表明其纯度较高。SDS-PAGE 分析显示,这三种 TyrB 酶的分子量相近,约为 43 kDa (图 4-3)。

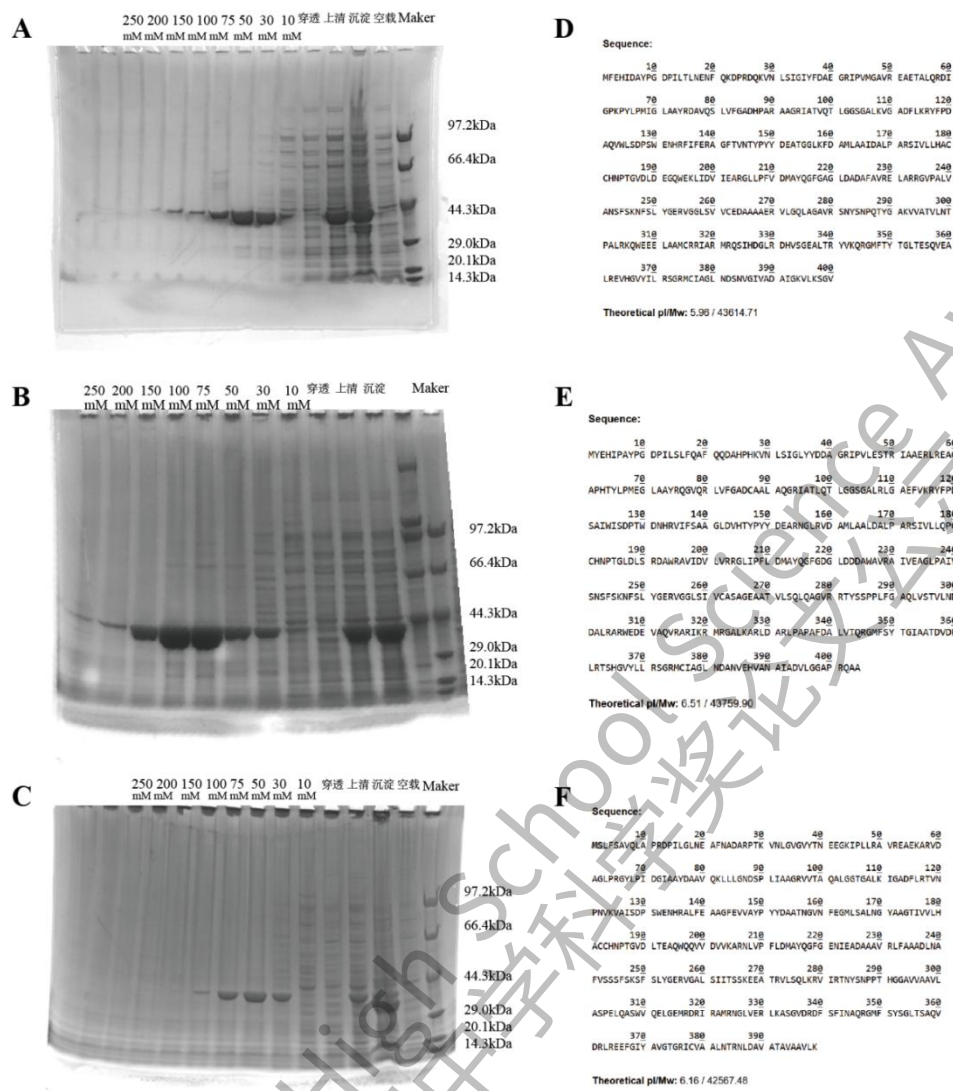


图 4-3 降解酶 TyrB1, TyrB2, TyrB3, 3 蛋白纯化胶图(A,B,C), 降解酶相应序列及预测蛋白沉降系数数据 (D,E,F)

Fig4-3 Degrading enzyme TyrB1, TyrB2, TyrB3, protein purification gel diagram (A,B,C), corresponding sequence of degrading enzyme and predicted protein sedimentation coefficient data (D,E,F)

4.4 HPLC 方法对降解酶功能验证

如 (图 4-4) 所示, pET29a-BL21 菌株在诱导培养并进行细胞破碎后, 离心取上清液作为空载对照组进行反应。结果显示, 空载对照组的 L-多巴浓度略有下降, 但未检测到任何代谢产物。相比之下, 三种纯化的 TyrB 转氨酶均能降解 L-多巴, 并产生相同的产物——3,4-二羟基苯乙醛和 3,4-二羟基苯乙酸, 这两种产物与 Z-3 粗酶液降解 L-多巴的产物一致, 进一步验证了这三种酶是菌株 Z-3 降解 L-多巴的关键酶。由于纯化的 TyrB3 蛋白浓度较低, 其产物产生量相对较少, 但仍可通过较小的纵坐标观察到产物的吸收峰 (图 4-4D)。

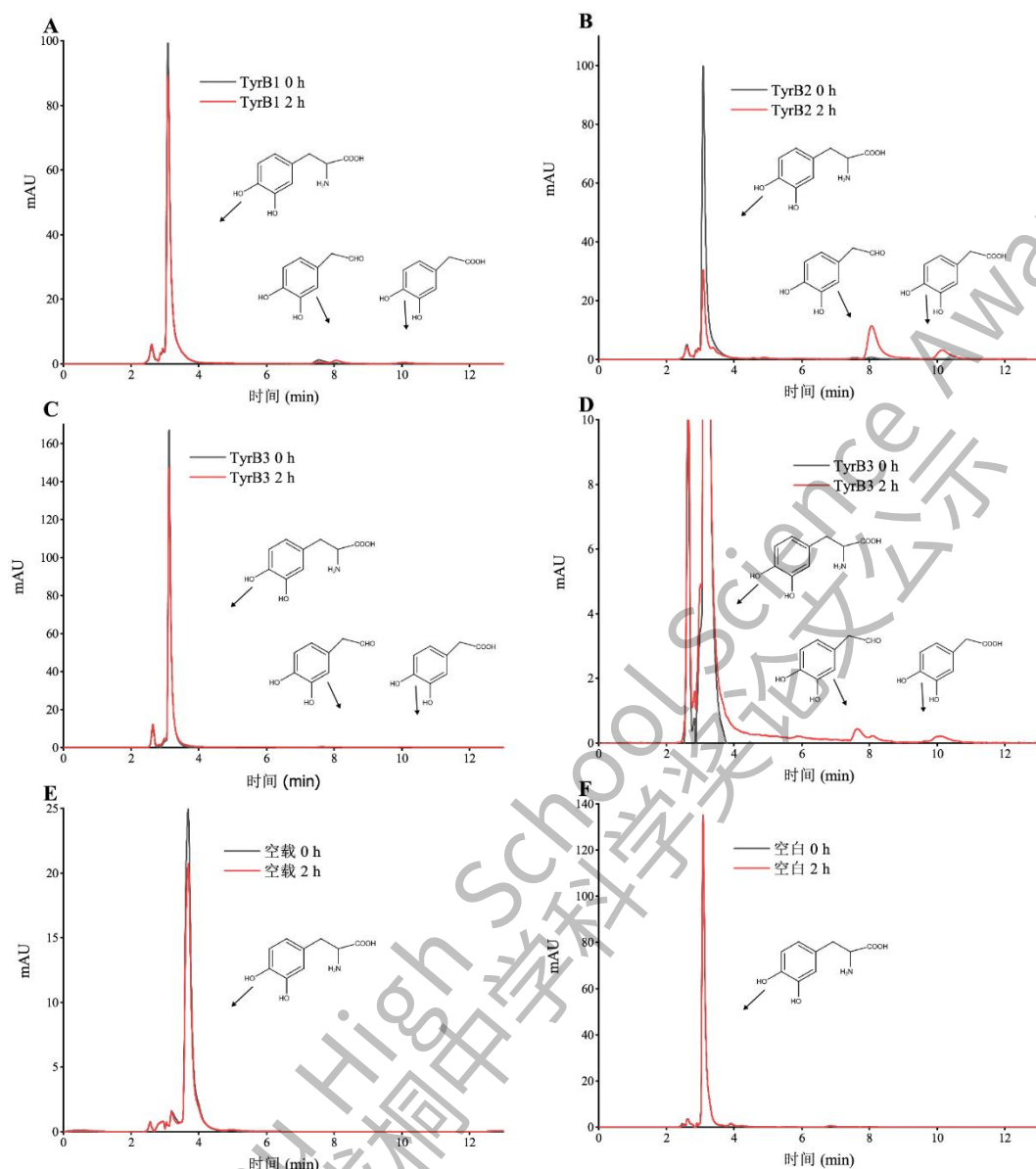


图 4-4 纯酶降解 L-多巴的液相图。TyrB1 降解 L-多巴液相图(A); TyrB2 降解 L-多巴液相图(B), TyrB3 降解 L-多巴液相图 (C,D);pET29a-BL21 空载粗酶降解 L-多巴液相图(E);空白组降解 L-多巴液相图(F)。

Fig 4-4 Liquid phase of L-dopa degradation by pure enzyme. TyrB1 degradation of L-dopa liquid phase diagram (A); Liquid phase diagram of L-dopa degradation by TyrB2 (B), liquid phase diagram of L-dopa degradation by TyrB3 (C,D); Degradation of L-dopa by no-load crude enzyme in pET29a-BL21 (E); Liquid phase diagram of L-dopa degradation in blank group (F).

4.5 降解酶的手性选择性

降解酶的手性选择性如图所示 (图 4-5), 三种 TyrB 酶都对 L-多巴都有一定的降解能力, 在 2 h 降解率都高于 10%。而对 L-多巴的旋光异构体 D-多巴则

没有降解能力。说明这三种 TyrB 转氨酶都具有很强的手性选择性，只能降解 L-多巴，无法降解 D-多巴。

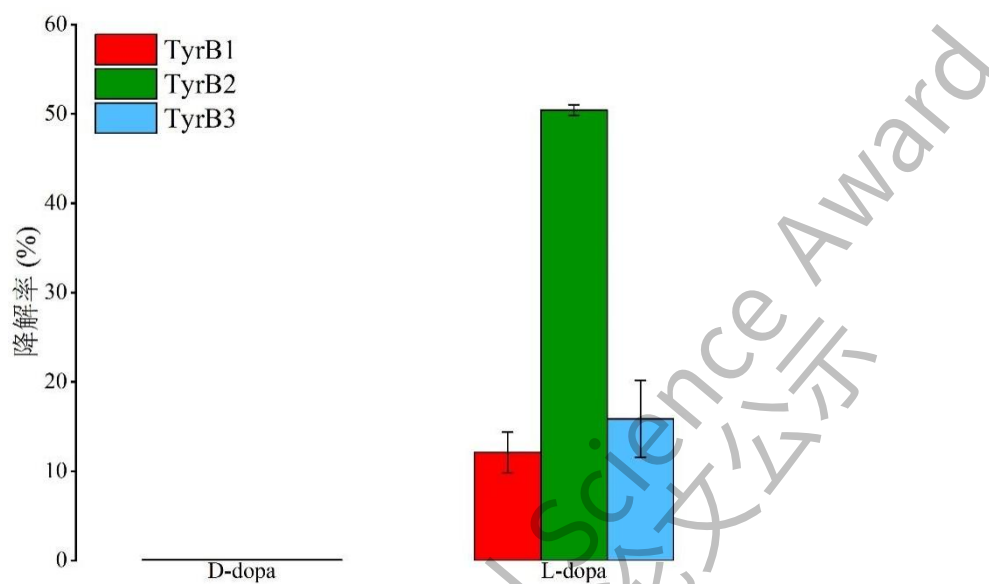


图 4-5 降解酶对 L-多巴与 D-多巴的降解能力

Fig 4-5 The ability of degrading enzyme to degrade L-dopa and D-dopa

4.6 降解酶的最适降解条件

三个 TyrB 降解酶的最适降解条件如图所示 (图 4-6, 图 4-7), 降解酶 TyrB1 最适降解条件为 α -酮戊二酸浓度为 0.6 mM, PLP 浓度为 120 μ M, 温度为 45 $^{\circ}$ C, pH 为 7.0。降解酶 TyrB2 最适降解条件为 α -酮戊二酸浓度为 0.6 mM, PLP 浓度为 120 μ M, 温度为 40 $^{\circ}$ C, pH 为 7.0。降解酶 TyrB3 最适降解条件为 α -酮戊二酸浓度为 0.6 mM, PLP 浓度为 120 μ M, 温度为 45 $^{\circ}$ C, pH 为 7.5。由于底物 L-多巴在高 pH 时并不稳定, 所以放弃在高 pH 下的降解率测定。可以发现三种降解酶的最适辅因子浓度是一致的都为 α -酮戊二酸浓度为 0.6 mM, PLP 浓度为 120 μ M, 并且在高浓度的辅因子存在时降解率都会显著下降, 推测其原因是由于过量的辅因子加入, 改变了缓冲液的 pH, 使得降解率发生下降。

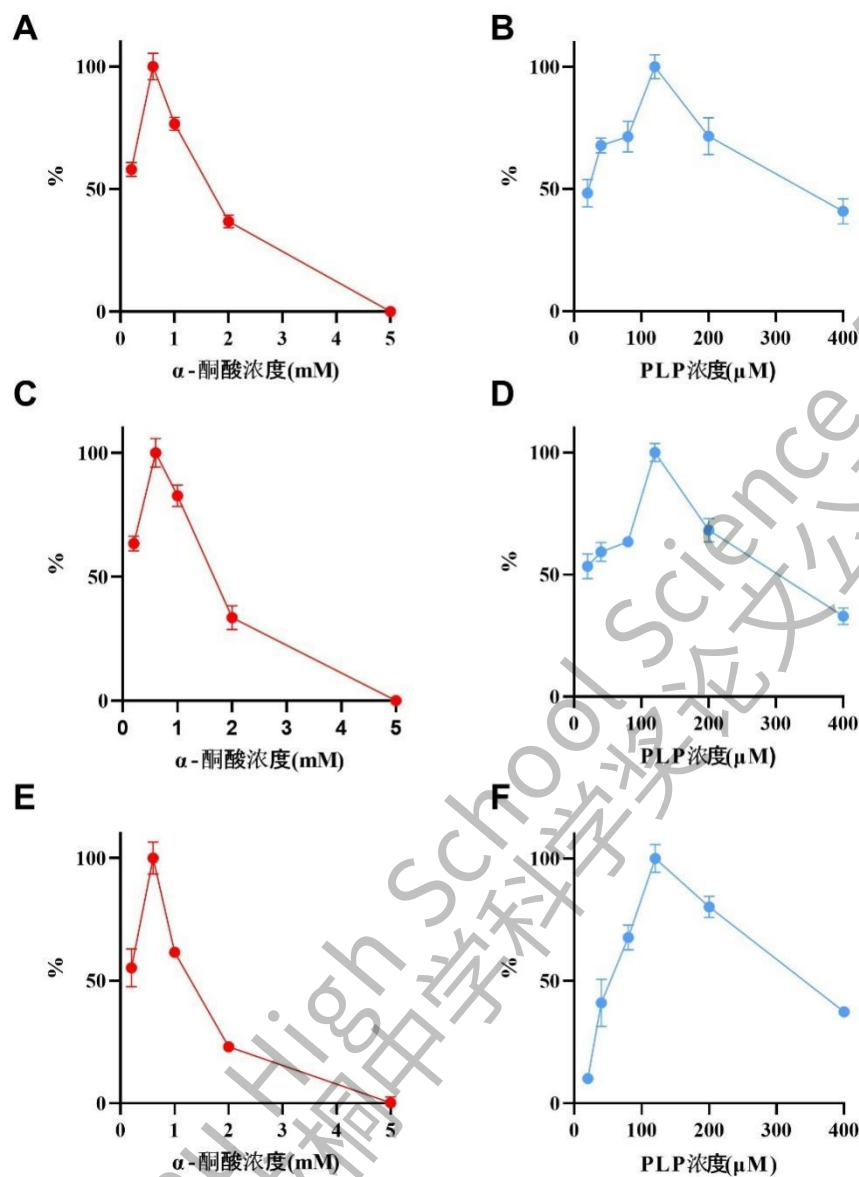


图 4-6 降解酶最适辅因子浓度测试。TyrB1 在不同辅因子浓度下降解率变化(A,B)； TyrB2 在不同辅因子浓度下降解率变化(C,D)； TyrB3 在不同辅因子浓度下降解率变化(E,F)。

Fig 4-6 Determination of optimum cofactor concentration of degrading enzyme. The solution rate of TyrB1 decreased with different cofactor concentrations (A,B);The solution rate of TyrB2 decreased with different cofactor concentrations (C,D); TyrB3 The solution rate changes at different cofactor concentrations (E,F).

在酶的最适降解物理条件的测试下发现，三种 TyrB 酶的最适反应温度在 40-45℃，最适 pH 在 7.0-7.5，并且三种酶在 pH=5.0 以下时均无活力。结合菌株 Z-3 的最适生长条件（图 2-6；图 2-7）pH=5.0，温度 30℃，与最适降解条件（图 3-4；图 3-5）pH=7.0,温度 37℃。其中菌株 Z-3 的最适降解 pH，与三种 TyrB 降

解酶的最适 pH 十分接近。三种 TyrB 降解酶的降解速率随着温度的升高而升高直到达到最适的降解温度 40-45℃后下降，而菌株 Z-3 在 42℃时则停止生长，所以菌株的最适降解温度为 37℃。通过对于 TyrB 降解酶最适反应条件的探索，很好的解释了为何菌株 Z-3 的最适生长条件与最适降解条件之间存在差异。

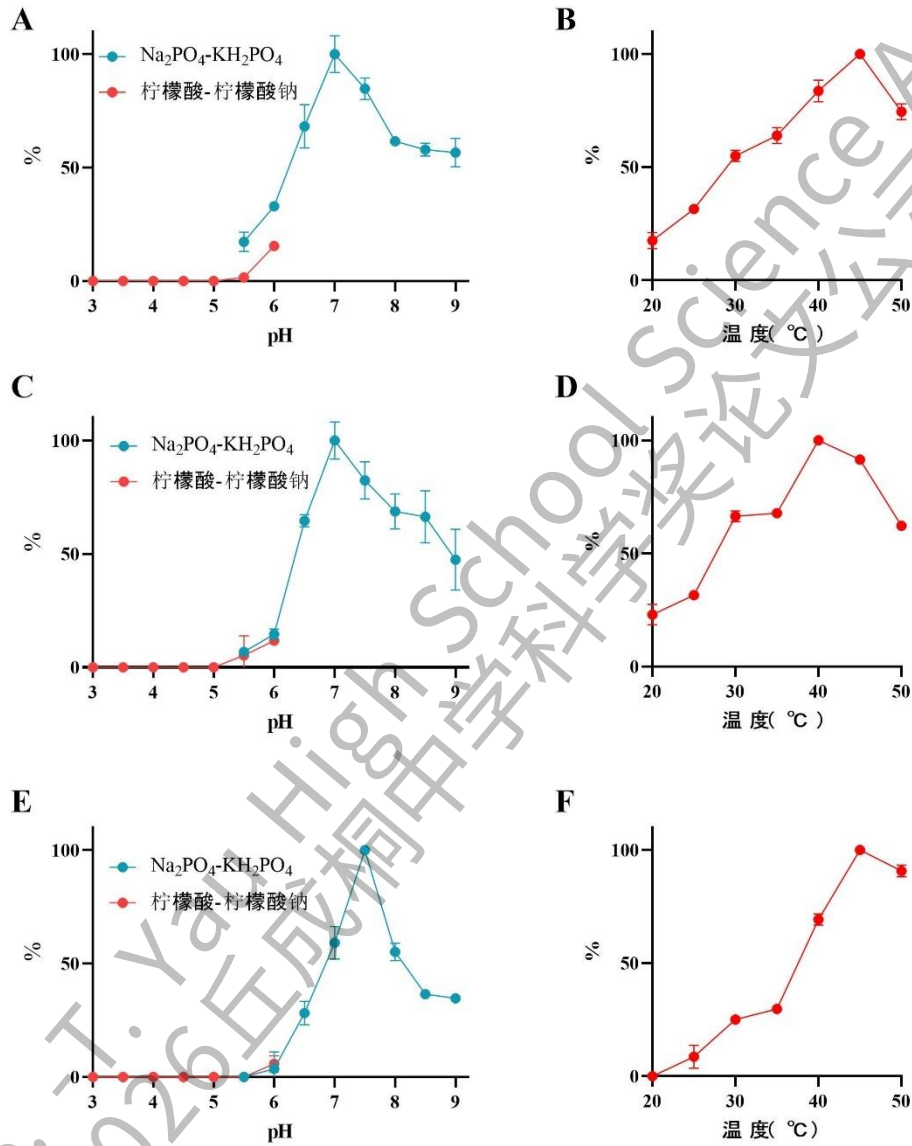


图 4-7 酶最适降解条件测试。TyrB1 在不同温度，pH 下降解率变化(A,B)；TyrB2,在不同温度，pH 下降解率变化(C,D)；TyrB3 在不同在温度，pH 下降解率变化(E,F)。

Fig4-7 Test of optimal degradation conditions for enzymes. TyrB1 At different temperatures, the pH drops and the solution rate changes (A,B); At TyrB2, the solution rate of pH decreased at different temperatures (C,D); TyrB3 at different temperature, pH decreases with the solution rate varying (E,F).

4.7 降解酶的动力学参数

根据米氏方程, 对所测各个数据点进行拟合, 绘制三种 TyrB 降解酶对于 L-多巴与 L-酪氨酸的动力学曲线。降解酶的动力学方程如图所示 (图 4-8), 3 种 TyrB 降解酶都可以降解酪氨酸与 L-多巴, 且与降解 L-多巴相比, 在降解 L-酪氨酸时, K_m 更小, 说明 3 种酶对酪氨酸的亲和力更大, 三种 TyrB 酶的最适底物为 L-酪氨酸。

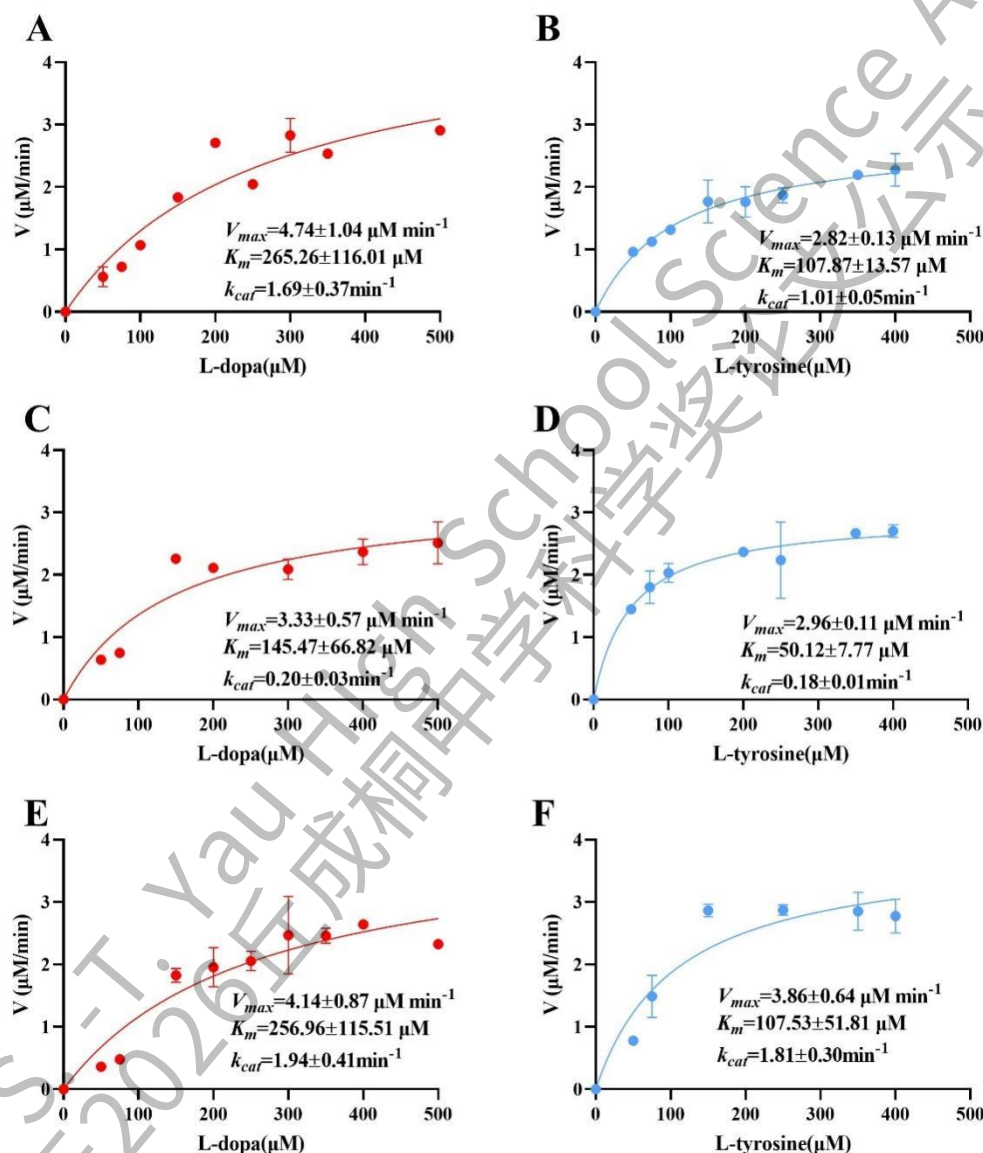


图 4-8 酶动力学曲线。TyrB1 降解 L-多巴, 酪氨酸动力学曲线(A,B); TyrB2 降解 L-多巴, 酪氨酸动力学曲线(C,D); TyrB3 降解 L-多巴, 酪氨酸动力学曲线(E,F)。

Fig 4-8 Enzyme kinetics curve. TyrB1 degradation of L- dopa, tyrosine kinetics curve (A,B); TyrB2 degradation of L- dopa, tyrosine kinetics curve (C,D); TyrB3 Degradation of L- dopa, tyrosine kinetics curve (E,F).

其中 TyrB2 降解酶的 K_m , k_{cat} 最小 (K_m (L-多巴) = $145.47 \pm 66.82 \mu\text{M}$; K_m (L-酪氨酸) = $50.12 \pm 7.77 \mu\text{M}$; k_{cat} (L-多巴) = $0.20 \pm 0.03 \text{ min}^{-1}$; k_{cat} (L-酪氨酸) = $0.18 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$) , 表明其与底物的亲和力最强, 但催化效率较低, 反应速率最慢。相较之下, TyrB3 降解酶的数据如下 (K_m (L-多巴) = $256.96 \pm 115.51 \mu\text{M}$; K_m (L-酪氨酸) = $107.53 \pm 51.81 \mu\text{M}$; k_{cat} (L-多巴) = $1.94 \pm 0.41 \text{ min}^{-1}$; k_{cat} (L-酪氨酸) = $1.81 \pm 0.30 \text{ min}^{-1}$) 其底物亲和力较低, 但催化效率最高, 反应速率最快。

4.8 降解酶的一级序列比对

表达的三种目的蛋白与 NCBI 数据库中通过 BLAST 搜索得到的相似芳香族氨基酸转氨酶进行了一次一级序列比对, 结果如图所示 (图 4-9)。这些转氨酶之间具有较高的相似性, 并且存在多个保守位点。值得注意的是, 依据 NCBI 对 TyrB1 的保守结构域分析, TyrB1 在第 246 位的氨基酸 Lys-246 被认为是催化位点。通过一级序列比对, 我们发现 Lys-246 在这些转氨酶中是高度保守的。此外, NCBI 显示这类转氨酶通常为同源二聚体酶 (Bertoldi et al., 2002), 这一信息为后续蛋白结构预测提供了重要的参考依据。

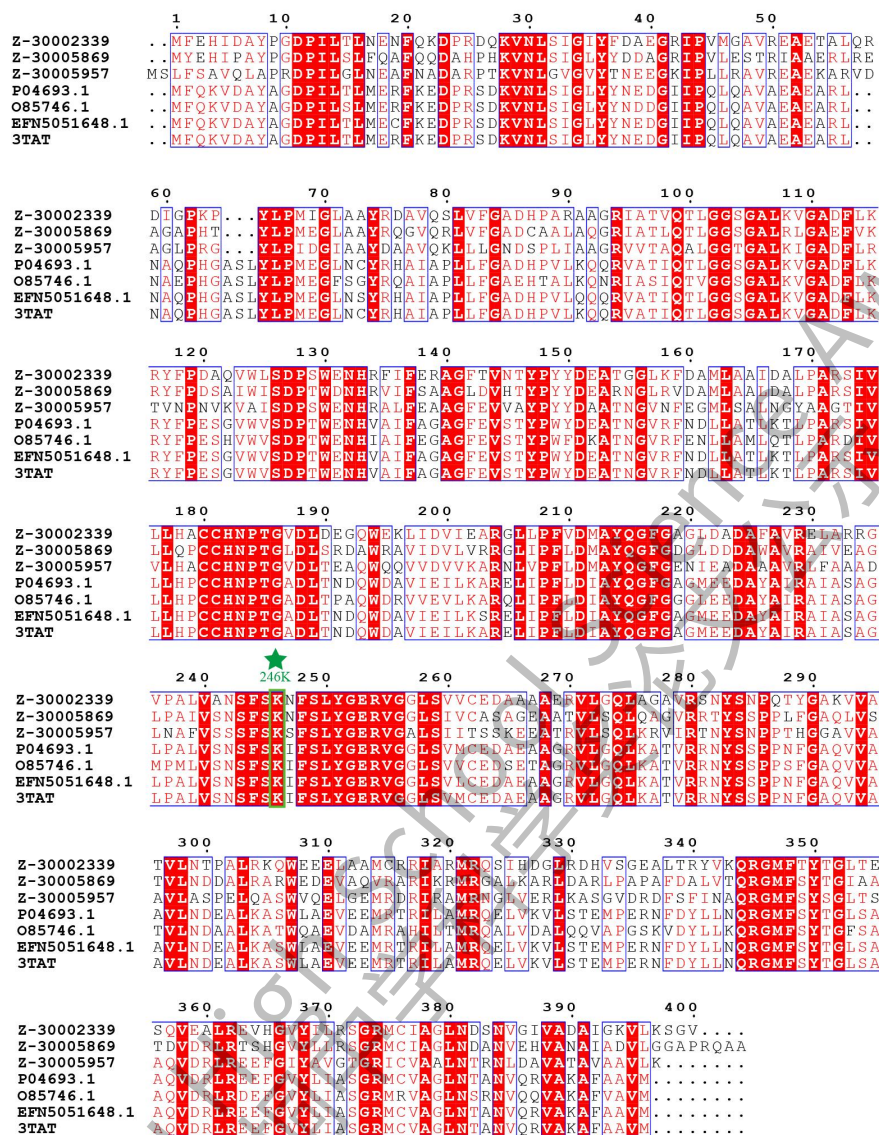


图 4-9 三种降解与其他转氨酶一级序列比对图

Fig 4-9 Primary sequence comparison of three degradations and other aminotransferases

4.9 降解酶的结构预测与蛋白结构比对

降解酶的结构预测与蛋白结构比对结果如（图 4-10）所示。其中，橙色蛋白源自 PDB 数据库中的 3TAT 蛋白晶体衍射结构。3TAT 蛋白与 TyrB 蛋白同属于芳香族氨基酸转氨酶亚家族，并且与 3 种 TyrB 转氨酶具有极高的序列相似性，因此选取其晶体衍射结构作为参考，以验证 AlphaFold 预测的 TyrB 转氨酶结构的准确性。

比对结果表明，三种降解酶的预测结构均与 3TAT 结构高度相似，且 RMSD 值均小于 2 Å，说明 AlphaFold3 预测的 TyrB 蛋白结构高度准确，可用于进一步的功能研究。

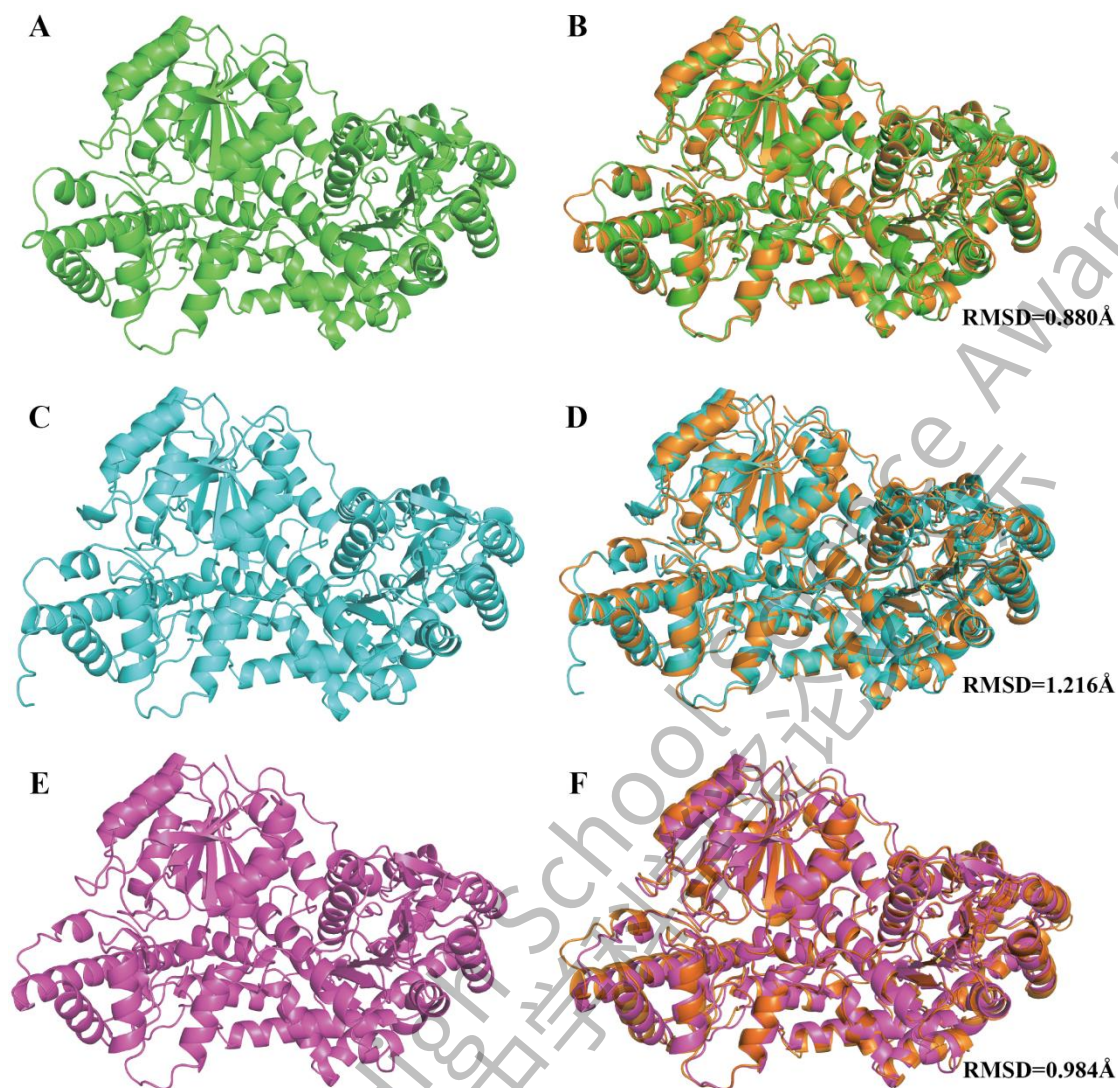


图 4-10 三种降解酶的结构预测与比对结果。TyrB1 降解酶结构与比对结果(A,B)。TyrB2 降解酶结构与比对结果(图 C,D)。TyrB3 降解酶结构与比对结果(E,F)。

Fig 4-10 Structural prediction and comparison results of three degrading enzymes. Structure and comparison results of TyrB1 degrading enzyme (A,B). Structure and comparison results of TyrB2 degrading enzyme (C,D). TyrB3 degradation enzyme structure and comparison results (E,F).

4.10 降解酶与底物的分子对接

降解酶 TyrB1 与 L-多巴的分子对接如图所示(图 4-11),展示了降解酶 TyrB1 与 L-多巴的结合模型。在该模型中, L-多巴在结合位点与蛋白分子结合后, 预测的催化位点 Lys-246 与底物的反应基团之间的距离为 4.6 Å, 这一距离足以支持转氨反应的发生。结合能为-8.368 kJ/mol, 低于-5 kJ/mol, 表明该结果具有较高的可信度。

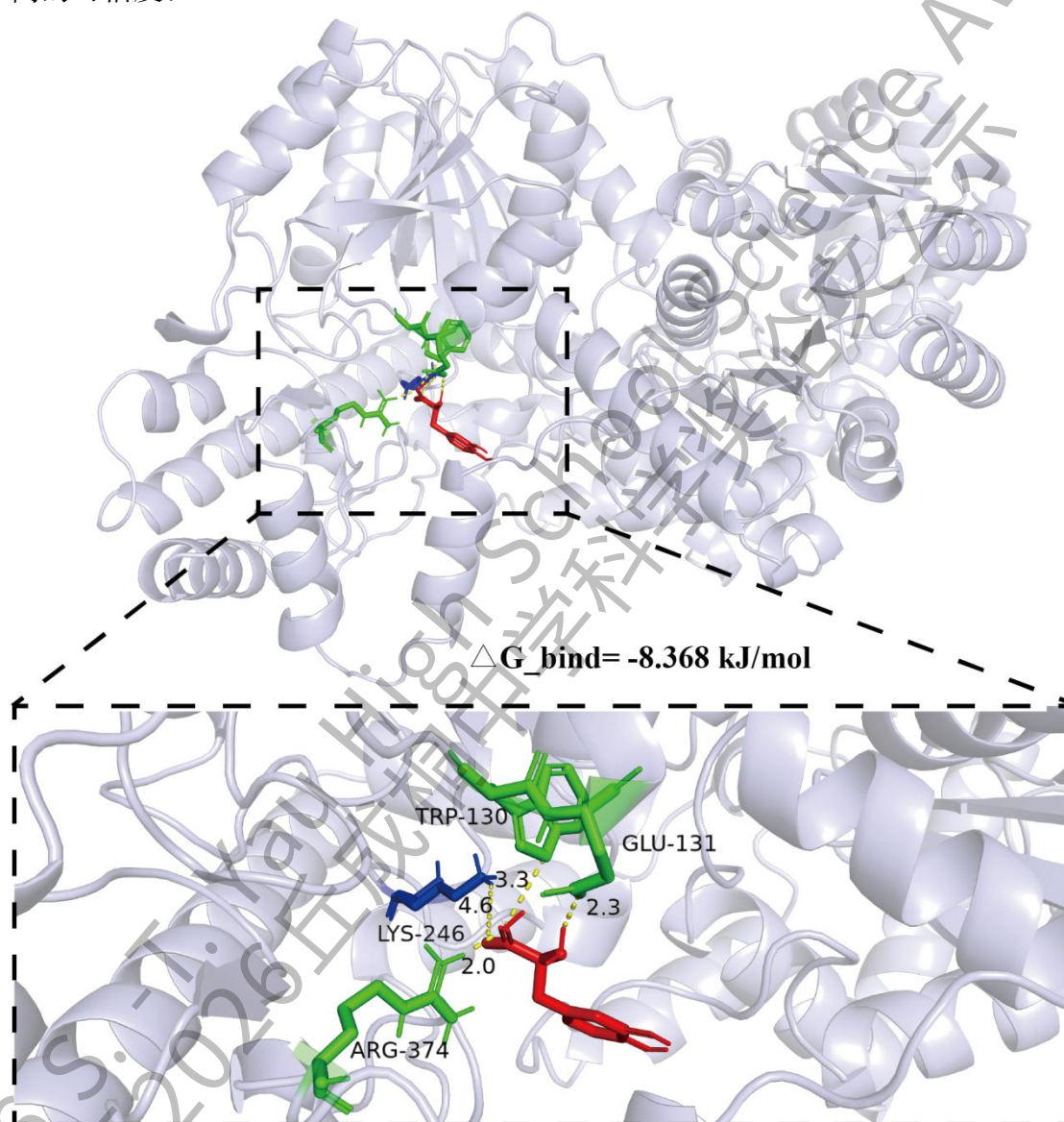


图 4-11 降解酶 TyrB1 与 L-多巴分子对接结果。绿色：结合位点；蓝色：催化位点；红色：底物。

Fig 4-11 Results of molecular docking between degrading enzyme TyrB1 and L-dopa. Green: binding site; blue: catalytic site; Red: substrate.

降解酶 TyrB1 与 L-酪氨酸的分子对接如图所示 (图 4-12) , 在此模型中,底物 L-酪氨酸有与 L-多巴相似的结合位点包括 Glu-131,Arg-374,并且此 L-酪氨酸与

L-多巴处于同样的底物口袋中。在此基础上, 催化位点 Lys-246,与底物基团的距离更短达到 4.3Å, 同时根据 Autodock 对接时计算的结合能分析, L-酪氨酸与酶的结合能更高, 达到-14.058 kJ/mol。而更加高的结合能代表着更加强的亲和能力, 通常会使得酶在催化此底物时的 K_m 更小, 这与先前的结果 TyrB1 (图 4-8) 即降解酶 TyrB1 催化酪氨酸的 $K_m=107.87\pm13.57 \mu\text{M}$ 明显低于催化 L-多巴时的 $K_m=265.26\pm116.01 \mu\text{M}$ 的结果相一致。

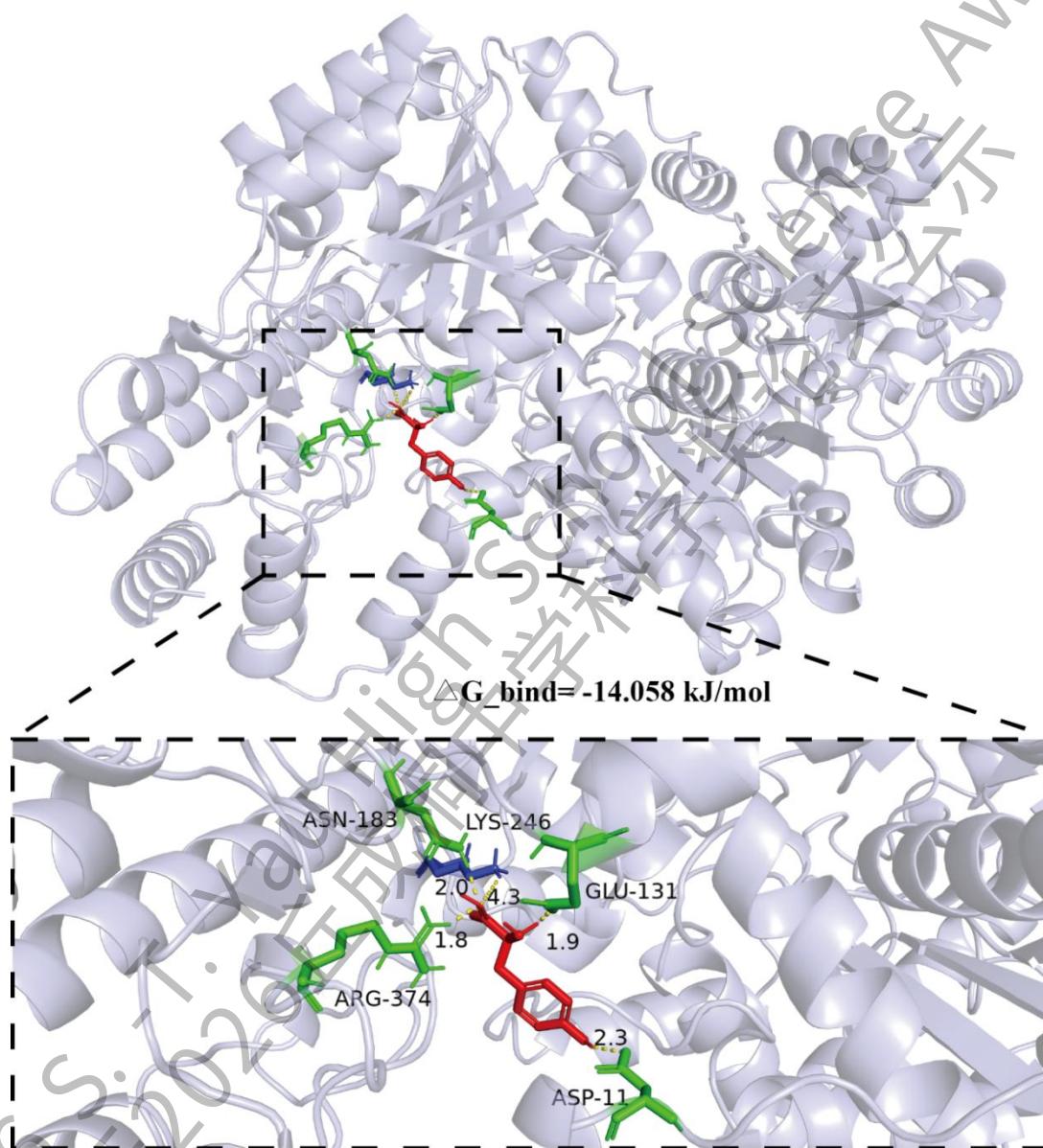


图 4-12 降解酶 TyrB1 与 L-酪氨酸分子对接结果。绿色：结合位点，蓝色：催化位点；红色：底物。

Fig 4-12 The results of the docking of degrading enzyme TyrB1 with L-tyrosine molecule. Green: binding site; blue: catalytic site; Red: substrate.

降解酶 TyrB1 与 D-多巴的分子对接如图所示 (图 4-12), 与 TyrB1 结合 L-多巴相比, 在与 D-多巴结合时, 与 L-多巴处于同一个底物口袋, 同时除了共同

4.11 降解酶 TyrB1 催化位点的定点突变

由于丙氨酸的侧链仅含有一个甲基（-CH₃），缺乏羟基、氨基和羧基等活性基团，因此将目标残基突变为丙氨酸可以消除原始残基的特定化学特性（如氢键供体/受体、电荷相互作用）。这一策略有助于直接评估该位点是否参与酶的催化、底物结合或构象调节。此外，由于丙氨酸的小侧链对蛋白质整体构象的干扰较小，可避免因引入大体积或极性侧链（如赖氨酸或谷氨酸）导致的结构畸变，从而帮助区分“功能丧失”是由化学基团缺失引起的，还是由于突变导致结构破坏。相比之下，甘氨酸（Gly）侧链仅由一个氢原子组成，其尺寸更小且具有较强的柔性，可能会影响主链构象，例如允许更灵活的转角变化。因此，选择丙氨酸而非甘氨酸进行突变，可避免由于主链柔韧性增加而引起的非特异性效应（Rose, 1985, Cunningham and Wells, 1989, Kunkel, 1985）。

如图所示（图 4-14），构建的定点突变载体 pET-*tyrB1*/K246A，与原质粒 pET-*tyrB1*，大小相一致约为 5500 bp，并且该定点突变蛋白 TyrB1/K246A 约为 43kDa 与原 TyrB1 降解酶大小一致，纯化后可以得到单一的条带，说明该目的蛋白可以得到很好的纯化。

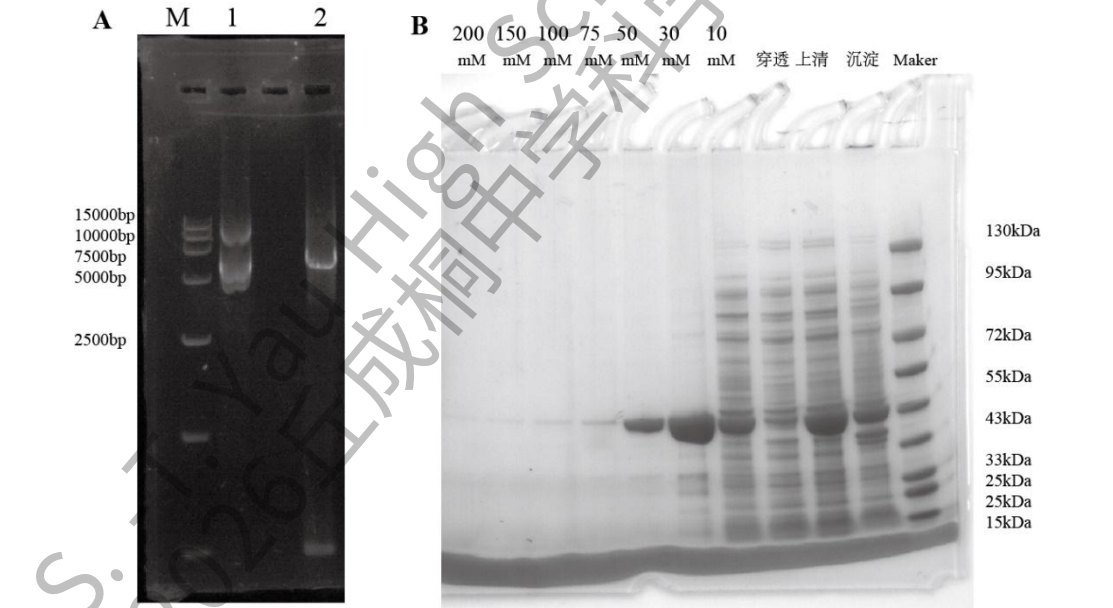


图 4-14 定点突变载体与蛋白纯化图，质粒 pET-*tyrB1*/K246A 的 DNA 电泳图(A)，与定点突变降解酶 TyrB1/K246A 蛋白纯化图(B)。

Fig 4-14 Site-specific mutation vector and protein purification diagram, DNA electrophoresis diagram of plasmid pET-*tyrB1*/K246A, and site-specific mutation degrading enzyme TyrB1/K246A protein purification diagram (B).

M:DL 15000 marker; 1: plasmid pET-*tyrB1*;2: recombinant plasmid pET-*tyrB1*/K246A

如图所示 (图 4-14), 由于定点突变蛋白 TyrB1/K246A 的位点 Lys-246 变成 Ala-246, 所以无法降解底物 L-多巴与 L-酪氨酸, 与 TyrB1 降解酶相比, 底物浓度没有降低, 且无相应的底物 3,4-二羟基苯乙醛和 3,4-二羟基苯乙酸产生。证明原降解酶 TyrB1 的 Lys-246 为关键的催化位点。

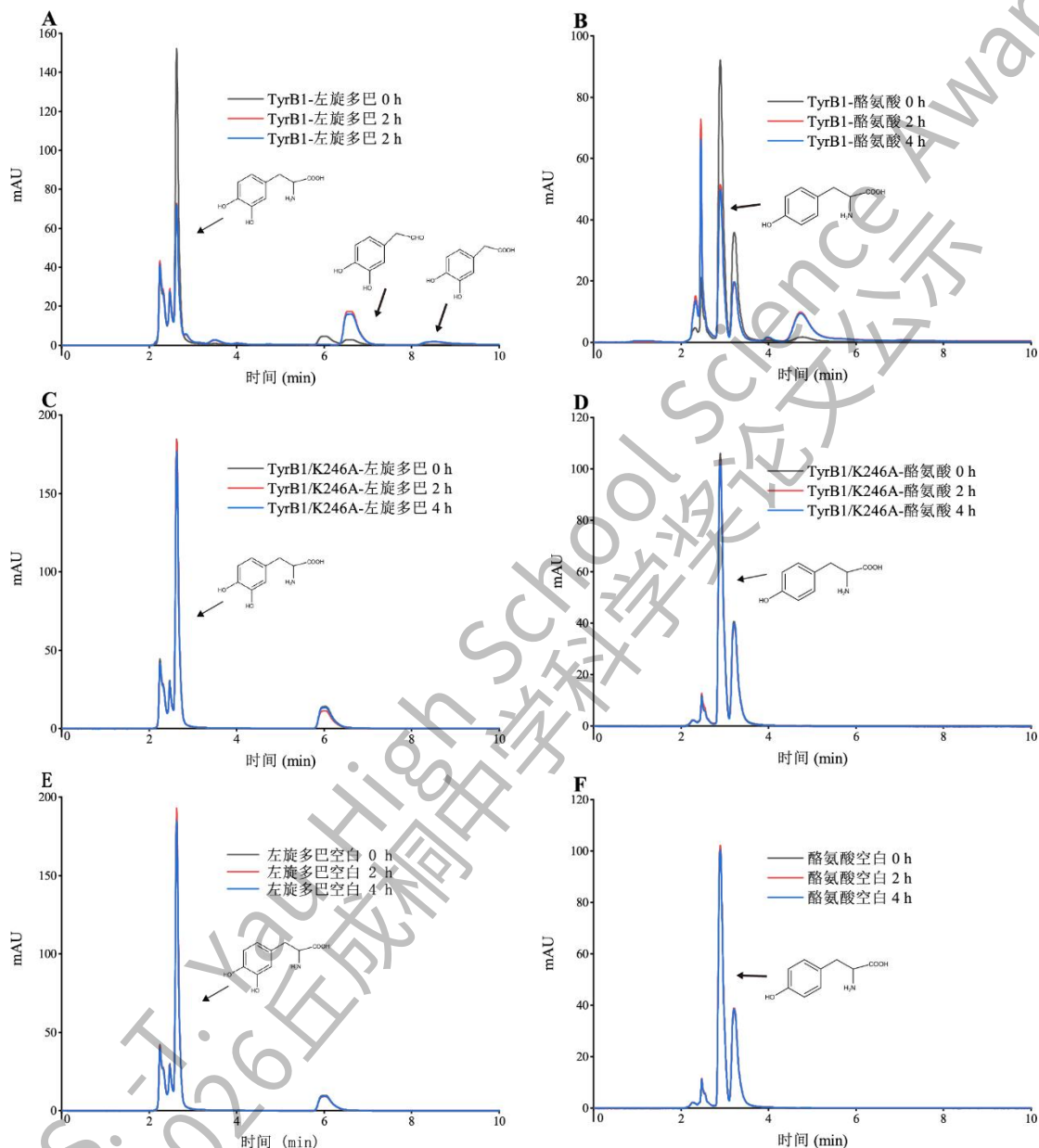


图 4-15 定点突变蛋白 TyrB1/K246A 的降解能力测试。TyrB1 降解酶降解 L-多巴与酪氨酸液相图(A,B); 定点突变蛋白 TyrB1/K246A 降解 L-与酪氨酸液相图(C,D); 空白组液相图(E,F)。

Fig 4-15 Degradation capacity of site-mutated protein TyrB1/K246A. Liquid phase diagram of L-dopa and tyrosine degradation by TyrB1 degrading enzyme (A,B); Degradation of L- dopa and tyrosine by site-mutated protein TyrB1/K246A (C,D); Blank group liquid phase diagram (E,F).

如图所示 (图 4-16), 赖氨酸具有一个很长的侧链, 可以跟底物进行结合并催化相关反应, 而由于丙氨酸的侧链甲基很短, 且没有相应的反应基团以供反应。

由于将 Lys-246 突变为 Ala-246 使得底物 L-多巴距离催化位点的距离由 4.6Å 增加为 9.1Å。与 L-酪氨酸的距离由 4.3Å 增加为 8.8Å。此分子对接结果可以很好的解释在定点突变后失去酶活的原因，且与实验结果相一致。

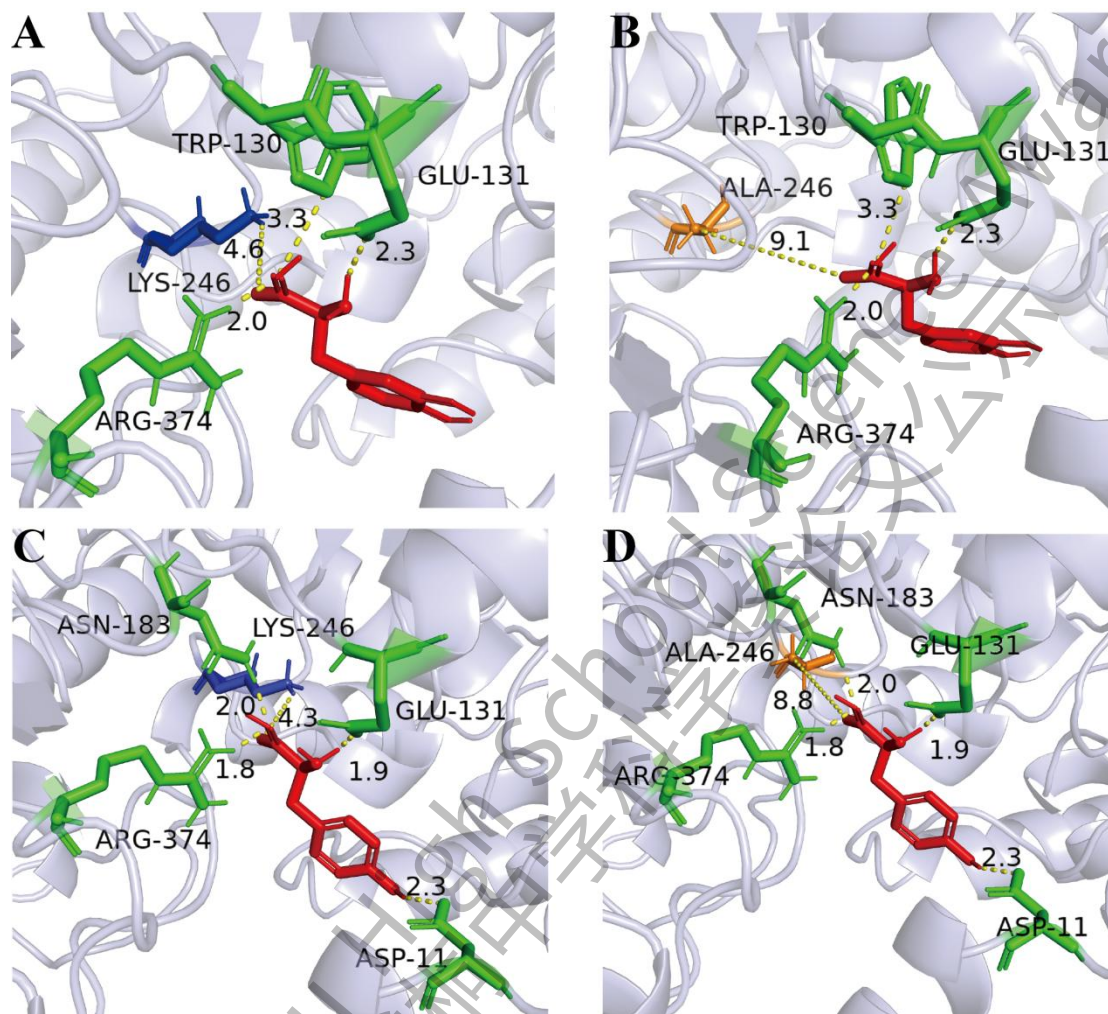


图 4-16 定点突变蛋白 TyrB1/K246A 的分子对接结果。降解酶 TyrB1 和 TyrB1/K246A 与 L-多巴的分子对接结果(A,B)；降解酶 TyrB1 和 TyrB1/K246A 与 L-酪氨酸的分子对接结果(C,D)。绿色：结合位点；蓝色：催化位点；红色：底物，橙色：突变位点。

Fig 4-16 Molecular docking results of site-mutant protein TyrB1/K246A. Molecular docking results of degrading enzymes TyrB1 and TyrB1/K246A with L- dopa (A,B); Molecular docking results of degradation enzymes TyrB1 and TyrB1/K246A with L-tyrosine (C,D). Green: binding site; Blue: catalytic site; Red: substrate, orange: mutation site.

全文总结

本研究成功分离并鉴定了一株 *Burkholderia* sp.Z-3, 研究了其的降解特性, 利用 LC-MS 分析了降解产物并推测了降解途径, 采用分子生物学手段克隆了其 3 个降解基因, 研究了 3 个降解酶的降解特性, 并对降解酶进行结构预测以及分子对接揭示了其底物口袋中的关键的氨基酸位点, 解释了其对不同底物降解差异的原因, 并通过定点突变技术确定了关键的催化位点。

1.菌株 Z-3 可在高生物量($OD_{600}=0.8$)情况下 8 小时内完全矿化 0.5 mM L-多巴, 且在 2.5 mM 高浓度下仍保持高效降解活性, 展现了其在制药废水处理中的应用潜力。菌株最适生长条件为 30℃、pH 5.0, 但其降解活性在 37℃、pH 7.0 时达到峰值。三种降解酶的最适反应条件为 α -酮戊二酸浓度为 0.6 mM, PLP 浓度为 120 μ M, 温度为 40-45℃, pH 为 7.0-7.5。说明了菌株的最适降解条件与最适生长条件存在差异的原因。

2.通过基因组比对与产物分析, Z-3 通过 PLP 依赖的转氨酶启动脱氨途径, 将 L-多巴转化为 DHPPA, 并进一步氧化为 3,4-二羟基苯乙酸以及无毒终产物。通过异源表达与纯化, 证实三种关键降解酶 TyrB1, TyrB2, TyrB3 均能以 PLP 为辅因子催化 L-多巴脱氨, 并且产物与 Z-3 粗酶反应产物相一致。酪氨酸代谢通路的基因可能通过“代谢通路的可塑性”演化出对 L-多巴的降解能力。为微生物降解新污染物的进化机制提供了新证据。

3.降解酶对 L-多巴具有严格手性选择性, D-多巴因反应基团朝向导致反应基团距离 Lys-246 达 7.3 Å, 阻碍催化无法降解。L-酪氨酸通过更强的氢键网络 (结合能-14.058 kJ/mol) 占据优势, 与 L-多巴相比, 降解酶对天然底物 L-酪氨酸的亲和力更高 (K_m (L-酪氨酸)=107.87 $\pm$ 13.57 μ M; K_m (L-多巴)=265.26 $\pm$ 116.01 μ M)。Z-3 的 TyrB 转氨酶与厌氧菌来源的 L-多巴脱氨酶 (如 *Clostridium sporogenes*, EDU38870.1 和 *Bifidobacterium longum*, WP 162491401.1) 进化关系较远, 首次报道了好氧菌中 TyrB 转氨酶对该底物的高效降解, 拓展了代谢多样性认知。降解酶保守位点突变 Lys-246 突变为 Ala-246, 完全消除酶活性, 证实了在 TyrB 转氨酶中 Lys-246 的不可或缺性。

全文讨论

本文研究了好氧菌株 Z-3 降解 L-多巴的分子机制及其环境修复应用潜力。L-多巴作为帕金森病的核心治疗药物，其全球年产量超过 10 万吨，但约 5% 的药物未被人体吸收，直接随尿液排出，且药物生产过程中有约 0.25% 的 L-多巴流入环境，导致了日益严重的水体污染问题。现有的物理化学降解方法存在无法有效矿化药物、设备昂贵且使用受限等局限，而微生物降解因其高效性和环境友好性，已成为解决此类污染的首选策略。

然而，目前尚未有关于微生物降解 L-多巴废水的研究报道。现有文献中，能够降解 L-多巴的微生物聚焦于肠道中的厌氧微生物(Cirstea et al., 2023)，有报道 *Bifidobacterium* sp.能够在厌氧环境中降解 L-多巴，但其降解速率较低，在 48 小时内仅约 1% 的 L-多巴转化为 DHPLA。造成这一现象的原因之一是 L-多巴转化为 DHPPA 的第一步反应在厌氧环境中是可逆的。鉴于这种较低的反应速度和反应条件，*Bifidobacterium* sp.在 L-多巴环境降解中的应用受到限制。

在前期研究中，Z-3 被从医疗废水中分离，并鉴定为 *Burkholderia* sp.。该菌株能够在高生物量条件下 ($OD_{600}=0.8$) 8 小时内完全矿化 0.5 mM L-多巴，并且在高达 2.5 mM 的浓度下仍表现出较高的降解活性。由于 L-多巴含量较高的废水多为酸性，Z-3 在酸性环境下具有较快的生长速率，因此显示了其在制药废水处理中广泛的应用潜力。

通过 LC-MS 分析 Z-3 降解产物，鉴定出 DHPLA、3,4-二羟基苯乙醛和 3,4-二羟基苯乙酸，这些产物为已知的 L-多巴脱氨途径中的标志性产物。结合基因组数据和酶学分析，推测 Z-3 通过 PLP 依赖的转氨酶启动脱氨途径代谢 L-多巴。在基因组比对中，Z-3 的酪氨酸代谢途径与 L-多巴降解途径具有明显的基因同源性，暗示 Z-3 可能通过“代谢通路的可塑性”演化出了对 L-多巴的降解能力(Tawfik and biochemistry, 2010)，PLP 依赖型转氨酶的底物宽泛性可归因于其特殊的底物结合口袋结构。转氨酶催化的反应需要两种不同的底物（氨基酸与 α -酮酸）依次结合到同一个辅因子（PLP）上的活性位点。由于活性位点的结构灵活性，酶能够容纳并正确定位这两种底物，从而实现氨基的转移。活性位点的这种适应性和灵活性是其能够识别并高效催化多种底物反应的主要原因(Eliot and Kirsch, 2004)。

利用分子生物学技术成功克隆了菌株 Z-3 中三个芳香族氨基酸转氨酶 TyrB1、TyrB2、TyrB3。通过异源表达、酶学分析及分子对接实验，证实三者均通过 PLP 依赖的转氨反应催化 L-多巴并产生与 Z-3 粗酶相一致的产物。根据酶学特性的研究发现三种转氨酶对 L-酪氨酸具有最高的亲和力，对 L-多巴亲和力较低，并缺乏对于 D-多巴的降解能力。

进化分析表明, Z-3 的 TyrB 转氨酶与已报道的厌氧菌来源 L-多巴降解酶 (如 *Clostridium sporogenes* EDU38870.1 和 *Bifidobacterium longum* WP 162491401.1) 进化关系较远 (图 4-1)。这种分歧可能反映了不同氧环境下的代谢适应性: 本研究首次报道了好氧菌中 TyrB 降解酶对 L-多巴的高效降解, 拓展了该底物的代谢多样性认知。

通过对酶的结构预测与分子对接发现, 三种底物都在酶的同一个人底物口袋中结合, 并拥有共享结合位点 (Glu-131、Arg-374), 以及同一个人保守的催化位点 Lys-246。虽然 TyrB1 能够催化 L-多巴和 L-酪氨酸的转氨反应, 但由于 L-酪氨酸的苯环羟基结构与 L-多巴不同, 这使得 L-酪氨酸能够与酶形成更强的氢键网络, L-酪氨酸的结合能为 -14.058 kJ/mol, 而 L-多巴的结合能为 -8.368 kJ/mol (图 4-12) 这一差异很好地解释了 TyrB1 酶动力学参数中的亲和力差异。TyrB1 对 L-酪氨酸的亲和力较强, 其 K_m 为 $107.87 \pm 13.57 \mu\text{M}$, 而对 L-多巴的亲和力较弱, 其 K_m 值为 $265.26 \pm 116.01 \mu\text{M}$ 。这一结果表明, L-酪氨酸通过更强的氢键相互作用, 能够更有效地与 TyrB1 结合, 从而提高其催化效率。

虽然 D-多巴结合能更高 -14.351 kJ/mol 但是由于 D-多巴的氨基与 L-多巴的朝向不同, 导致关键催化位点 Lys-246 远离了 D-多巴的反应基团, 阻碍了相关转氨反应的发生。通过定点突变的技术将保守的催化位点 Lys-246 成功突变为 Ala-246, 完全消除了酶活性, 验证了其在催化中的核心作用。填补了 TyrB 降解酶在 L-多巴降解场景中的机制空白。与厌氧菌 (如 *Clostridium sporogenes*, EDU38870.1 和 *Bifidobacterium longum*, WP 162491401.1) 依赖的脱氨酶不同, Z-3 的 PLP 依赖转氨反应在好氧条件下通过氧化路径实现高效矿化, 揭示了氧环境对代谢途径分化的深远影响。

在分子对接的过程中发现除了共享的结合点位以外, 与 L-酪氨酸的结合位点还包括 (Asn-183, Asp-11), 与 L-多巴的结合位点包括 (Trp-130), 可以为理性设计广谱降解酶提供了靶点, 以扩展降解酶的底物谱。

尽管本研究为 Z-3 降解 L-多巴的分子机制提供了深入的理解, 但也存在一些不足之处。首先, 由于三个 TyrB 转氨酶基因具有高度同源性, 且均能独立降解 L-多巴, 进行单基因敲除的传统方法无法完全消除降解活性, 且多重基因敲除可能会导致代谢网络的扰动, 产生不可预见的表型变化 (Baba et al., 2006)。其次, 实验室条件下的降解能力测试虽然表明 Z-3 具备较好的 L-多巴降解能力, 但尚未在复杂的废水处理等实际环境中进行验证。最后, 缺乏对 Z-3 菌株底物谱的扩展分析, 这可能限制了其在污染物降解中的潜在应用 (Perez-Pantoja et al., 2012)。

综上所述, 本研究系统地结合微生物学、酶学与计算生物学手段, 揭示了 Z-3 降解 L-多巴的分子机制, 并为环境修复技术的开发与酶工程改造提供了理论依据与技术储备。未来的研究应致力于跨学科的合作, 推动这一研究成果从基础研究向实际应用转化, 特别是在废水处理与污染物降解等领域的应用。

创新点

1. 本研究成功分离并鉴定了一株伯克霍尔德菌属 (*Burkholderia* sp.) 菌株 Z-3, 其可以对 L-多巴高效降解。
2. 本研究阐明了好氧 *Burkholderia* sp 通过 TyrB 转氨酶介导的脱氨途径降解 L-多巴的过程, 拓展了该底物的代谢多样性认知。
3. 揭示了 TyrB 转氨酶对三种底物 (L-多巴, L-酪氨酸, D-多巴) 产生底物选择性的原因。

研究展望

本研究利用传统分子生物学和微生物学的实验方法, 研究菌株 *Burkholderia* sp. Z-3 降解 L-多巴的相关特性。在未来的研究中可能需要研究, 降解菌株与多种污染物共同降解的研究, 例如制药废水中的重金属 (如 Cu^{2+}) 可能通过竞争 PLP 结合抑制酶活, 在未来需通过固定化技术增强耐受性, 以增强菌株 Z-3 对 L-多巴的降解能力。同时降低代谢副产物风险, DHPPA 的自发氧化可能生成醌类中间体, 需结合转录组学筛选下游氧化酶以确保降低中间有毒产物的积累。通过全基因组测序筛查毒力因子, 确保 Z-3 在环境释放中的生物安全性。在降解酶方面, 解析转氨酶-底物复合物结构, 明确结合口袋的立体化学特征, 并指导突变体设计, 确定相关结合位点功能以及增强酶与底物的结合强度, 获得更高降解能力的酶。同时可以突变一些关键氨基酸位点, 以改变酶的结合口袋, 从而扩展转氨酶的底物谱, 例如降解 D-多巴 (Svedendahl et al., 2010)

参考文献

- [1] 周振, 吴志超, 王志伟, 等. 2010. 污水中溶解性惰性有机物含量的测定方法及其研究进展 工业水处理. 30: 17-20.
- [2] 鱼杰. 2013. 常见药物左旋多巴的臭氧氧化降解技术 浙江水利科技. 41: 37-40.
- [3] 孟妮, 王峰, 周振. 2011. 制药废水药物活性成分的环境影响评价与管理初探 广东化工. 38: 217-218+216.
- [4] 廖延雄. 1992. 《伯杰氏鉴定细菌学手册》与《伯杰氏分类细菌学手册》 微生物学通报. 249.
- [5] 黄培堂. 2008. 分子克隆实验指南精编版 生物技术通讯. 865.
- [6] ZHONG Z, YE M, YAN F. 2023. A review of studies on gut microbiota and levodopa metabolism. *Front Neurol [J]*, 14: 1046910.
- [7] XU K, SHENG S, ZHANG F. 2023. Relationship Between Gut Bacteria and Levodopa Metabolism. *Curr Neuropharmacol [J]*, 21: 1536-1547.
- [8] WADA G H, FELLMAN J H. 1973. 2,4,5-Trihydroxyphenylacetic acid: Metabolite of L-3,4-dihydroxyphenylalanine. *Biochemistry [J]*, 12: 5212-5217.
- [9] VAN KESSEL S P, FRYE A K, EL-GENDY A O, et al. 2019. Gut bacterial tyrosine decarboxylases restrict levels of levodopa in the treatment of Parkinson's disease. *Nat Commun [J]*, 10: 310.
- [10] VAN KESSEL S P, DE JONG H R, WINKEL S L, et al. 2020. Gut bacterial deamination of residual levodopa medication for Parkinson's disease. *BMC Biol [J]*, 18: 137.
- [11] TSAI C F, CHUANG C H, WANG Y P, et al. 2022. Differences in gut microbiota correlate with symptoms and regional brain volumes in patients with late-life depression. *Front Aging Neurosci [J]*, 14: 885393.
- [12] TAWFIK O K, BIOCHEMISTRY D S J A R O. 2010. Enzyme promiscuity: a mechanistic and evolutionary perspective. 79: 471-505.
- [13] ŠVITEL J, MIERTUŠ S J E S, TECHNOLOGY. 1998. Development of tyrosinase-based biosensor and its application for monitoring of bioremediation of phenol and phenolic compounds. 32: 828-832.
- [14] SVEDENDAHL M, BRANNEBY C, LINDBERG L, et al. 2010. Reversed Enantioselectivity of an ω -Transaminase by a Single-Point Mutation. *ChemCatChem [J]*, 2: 976-980.
- [15] SCHWARTZ T, KOHNEN W, JANSEN B, et al. 2003. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. 43: 325-335.
- [16] SANDLER M, JOHNSON R, RUTHVEN C, et al. 1974. Transamination is a major pathway of L-多巴 metabolism following peripheral decarboxylase inhibition. 247: 364-366.
- [17] SAMPSON T R, DEBELIUS J W, THRON T, et al. 2016. Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell [J]*, 167: 1469-1480 e1412.
- [18] ROSE I A. 1985. Enzyme structure and mechanism (2nd edn): by Alan Fersht, WH Freeman & Co., 1985. £ 14.95 pbk, £ 28.95 hbk (xxi+ 475 pages) ISBN 0 7167 1615 1 [M]. Elsevier Current Trends.
- [19] RIVERA-CALIMLIM L, DUJOVNE C, MORGAN J, et al. 1970. L-多巴 treatment failure: explanation and correction. 4: 93.
- [20] RANJITH N K, SASIKALA C, RAMANA CH V. 2007. Catabolism of L-phenylalanine and

- L-tyrosine by *Rhodobacter sphaeroides* OU5 occurs through 3,4-dihydroxyphenylalanine. *Res Microbiol* [J], 158: 506-511.
- [21] QUESADA-PENATE I, JULCOUR-LEBIGUE C, JÁUREGUI-HAZA U-J, et al. 2009. Comparative adsorption of levodopa from aqueous solution on different activated carbons. 152: 183-188.
- [22] QUESADA-PENATE I, JULCOUR-LEBIGUE C, JÁUREGUI-HAZA U-J, et al. 2009. Comparative adsorption of levodopa from aqueous solution on different activated carbons. *Chemical Engineering Journal* [J], 152: 183-188.
- [23] PULIKKALPURA H, KURUP R, MATHEW P J, et al. 2015. Levodopa in *Mucuna pruriens* and its degradation. *Sci Rep* [J], 5: 11078.
- [24] POTTER C F, RUSSELL N R, MCNAMARA M 2006. Spectroscopic Characterisation of Metallo-Cyclodextrins for Potential Chiral Separation of Amino Acids and L/D-DOPA. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* [J], 56: 395-403.
- [25] POLANOWSKA K, SZWENGIEL A, KULIGOWSKI M, et al. 2020. Degradation of pyrimidine glycosides and L-多巴 in the faba bean by *Rhizopus oligosporus*. *Lwt* [J], 127.
- [26] POEWE W, ANTONINI A, ZIJLMANS J C, et al. 2010. Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: an old drug still going strong. *Clin Interv Aging* [J], 5: 229-238.
- [27] PEZZOLI G, ZINI M J E O O P 2010. Levodopa in Parkinson's disease: from the past to the future. 11: 627-635.
- [28] PAPPERT E J, BUHRFIEND C, LIPTON J W, et al. 1996. Levodopa stability in solution: time course, environmental effects, and practical recommendations for clinical use. *Mov Disord* [J], 11: 24-26.
- [29] OGAWA M, MURAE M, GEMBA R, et al. 2022. L-多巴, a treatment for Parkinson's disease, and its enantiomer D-DOPA inhibit severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection in vitro. 28: 373-376.
- [30] O'NEILL C J S 2019. Gut microbes metabolize Parkinson's disease drug. 364: 1030-1031.
- [31] NUTL J G, FELLMAN J H J C N 1984. Pharmacokinetics of levodopa. 7: 35-50.
- [32] MUESER T C, DRAGO V, KOVALEVSKY A, et al. 2020. Pyridoxal 5'-phosphate dependent reactions: Analyzing the mechanism of aspartate aminotransferase. *Methods Enzymol* [J], 634: 333-359.
- [33] MOORE P S, DOMINICI P, BORRI VOLTATTORNI C J B J 1996. Cloning and expression of pig kidney dopa decarboxylase: comparison of the naturally occurring and recombinant enzymes. 315: 249-256.
- [34] MIN K, PARK K, PARK D H, et al. 2015. Overview on the biotechnological production of L-多巴. *Appl Microbiol Biotechnol* [J], 99: 575-584.
- [35] MELAMED E, OFFEN D, SHIRVAN A, et al. 1998. Levodopa toxicity and apoptosis. *Ann Neurol* [J], 44: S149-154.
- [36] MARITAN M, AUTIN L, KARR J, et al. 2022. Building Structural Models of a Whole Mycoplasma Cell. *Journal of Molecular Biology* [J], 434: 167351.
- [37] MAINI REKDAL V, BESS E N, BISANZ J E, et al. 2019. Discovery and inhibition of an interspecies gut bacterial pathway for Levodopa metabolism. *Science* [J], 364.
- [38] LEWITT P A J M D 2015. Levodopa therapy for Parkinson's disease: pharmacokinetics and pharmacodynamics. 30: 64-72.
- [39] LEDETI A, OLARIU T, CAUNII A, et al. 2017. Evaluation of thermal stability and kinetic of

- degradation for levodopa in non-isothermal conditions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* [J], 131: 1881-1888.
- [40] LAURSEN M F, SAKANAKA M, VON BURG N, et al. 2021. Bifidobacterium species associated with breastfeeding produce aromatic lactic acids in the infant gut. *Nat Microbiol* [J], 6: 1367-1382.
- [41] LÄNGE R, HUTCHINSON T H, CROUDACE C P, et al. 2001. Effects of the synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). 20: 1216-1227.
- [42] KUNKEL T A J P O T N A O S 1985. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. 82: 488-492.
- [43] KOYANAGI T, KATAYAMA T, SUZUKI H, et al. 2005. Effective production of 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-多巴) with *Erwinia herbicola* cells carrying a mutant transcriptional regulator TyrR. *J Biotechnol* [J], 115: 303-306.
- [44] KAROUM F, FREED W J, CHUANG L-W, et al. 1988. D-dopa and L-多巴 similarly elevate brain dopamine and produce turning behavior in rats. 440: 190-194.
- [45] KAAKKOLA S, MANNISTO P T, NISSINEN E, et al. 1985. The effect of an increased ratio of carbidopa to levodopa on the pharmacokinetics of levodopa. *Acta Neurol Scand* [J], 72: 385-391.
- [46] JIM T Y, BOUWER E J, COELHAN M J A W M 2006. Occurrence and biodegradability studies of selected pharmaceuticals and personal care products in sewage effluent. 86: 72-80.
- [47] ISARIEBEL Q P, CARINE J L, ULISES-JAVIER J H, et al. 2009a. Sonolysis of levodopa and paracetamol in aqueous solutions. *Ultrason Sonochem* [J], 16: 610-616.
- [48] ISARIEBEL Q-P, CARINE J-L, ULISES-JAVIER J-H, et al. 2009b. Sonolysis of levodopa and paracetamol in aqueous solutions. 16: 610-616.
- [49] HORNYKIEWICZ O 2010. A brief history of levodopa. *J Neurol* [J], 257: S249-252.
- [50] HIGNITE C, AZARNOFF D L 1977. Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: Chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. *Life Sciences* [J], 20: 337-341.
- [51] HAYASHI H, INOUE K, NAGATA T, et al. 1993. *Escherichia coli* aromatic amino acid aminotransferase: characterization and comparison with aspartate aminotransferase. 32: 12229-12239.
- [52] GUAN Y, LIU L, CHEN C, et al. 2016. Effective immobilization of tyrosinase via enzyme catalytic polymerization of L-多巴 for highly sensitive phenol and atrazine sensing. *Talanta* [J], 160: 125-132.
- [53] GIANNOPOULOS S, SAMARDZIC K, RAYMOND B B A, et al. 2019. L-多巴 causes mitochondrial dysfunction in vitro: A novel mechanism of L-多巴 toxicity uncovered. *Int J Biochem Cell Biol* [J], 117: 105624.
- [54] FINDRIK Z, VASIĆ-RAČKI Đ J A M-B 2009. Environment and pharmaceutical products case study: Biocatalysis of L-多巴. 2: 9-18.
- [55] FAHN S 2008. The history of dopamine and levodopa in the treatment of Parkinson's disease. *Mov Disord* [J], 23 Suppl 3: S497-508.
- [56] ELIOT A C, KIRSCH J F 2004. Pyridoxal Phosphate Enzymes: Mechanistic, Structural, and Evolutionary Considerations. 73: 383-415.
- [57] ELBARBRY F, NGUYEN V, MIRKA A, et al. 2019. A new validated HPLC method for the

- determination of levodopa: Application to study the impact of ketogenic diet on the pharmacokinetics of levodopa in Parkinson's participants. *Biomed Chromatogr* [J], 33: e4382.
- [58] EISENMAN H C, MUES M, WEBER S E, et al. 2007. *Cryptococcus neoformans* laccase catalyses melanin synthesis from both D- and L-多巴. *Microbiology (Reading)* [J], 153: 3954-3962.
- [59] DE ANDRES F, CASTANEDA G, RIOS A 2009. Use of toxicity assays for enantiomeric discrimination of pharmaceutical substances. *Chirality* [J], 21: 751-759.
- [60] CUNNINGHAM B C, WELLS J A J S 1989. High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. 244: 1081-1085.
- [61] CRANE M, WATTS C, BOUCARD T J S O T T E 2006. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. 367: 23-41.
- [62] COTZIAS G C, VAN WOERT M H, SCHIFFER L M J N E J O M 1967. Aromatic amino acids and modification of parkinsonism. 276: 374-379.
- [63] CONTIN M, MARTINELLI P J J O N 2010. Pharmacokinetics of levodopa. 257: 253-261.
- [64] CIRSTE A M S, CREUS-CUADROS A, LO C, et al. 2023. A novel pathway of levodopa metabolism by commensal *Bifidobacteria*. *Sci Rep* [J], 13: 19155.
- [65] CALNE D B, KAROUM F, RUTHVEN C R, et al. 1969. The metabolism of orally administered L-多巴 in Parkinsonism. *Br J Pharmacol* [J], 37: 57-68.
- [66] BORUD O, MIDTVEDT T, GJESSING L J A P E T 1972. Urinary Metabolites from Rats Given L-DOPA 1. 31: 540-549.
- [67] BONIFATI V, MECO G J P, THERAPEUTICS 1999. New, selective catechol-O-methyltransferase inhibitors as therapeutic agents in Parkinson's disease. 81: 1-36.
- [68] BERTOLDI M, GONSALVI M, CONTESTABILE R, et al. 2002. Mutation of tyrosine 332 to phenylalanine converts dopa decarboxylase into a decarboxylation-dependent oxidative deaminase. *J Biol Chem* [J], 277: 36357-36362.
- [69] ALEXANDER T, SORTWELL C, SLADEK C, et al. 1997. Comparison of neurotoxicity following repeated administration of L-多巴, D-DOPA, and dopamine to embryonic mesencephalic dopamine neurons in cultures derived from Fisher 344 and Sprague-dawley donors. 6: 309-315.
- [70] ABRAMS W B, COUTINHO C B, LEON A S, et al. 1971. Absorption and metabolism of levodopa. 218: 1912-1914.

致谢

我如何将学科知识转化为创新，将创新融入科研成果，用科研成果改善人们的生活？这是我在中学生英才计划开幕式上发言时的第一句话。两年前的我，正是带着这样的问题，开始在中学生英才计划（中学生科技创新后备人才培养计划）中寻找答案。

之所以选择申请英才计划并加入蒋建东教授的团队，是因为我四年前遗留下的一个设想。由于父亲的公司从事耐火材料制造业，并且周围围绕着村庄和农田。从初中起我一直在研究一种能够减少水体污染的烧制方法，从而减少周围的土壤污染。后来，我的制备方法获批国家发明专利。可我又提出了一个这样的疑问，本就存在的水体污染该如何解决呢？

我由衷感谢英才计划，让这个四年前的疑问在今天得到了解答。两次入选英才计划，我收获的不仅仅是完整的科研项目，更是解决问题的能力 and 看待问题的眼界。时至今日我总能笃定地说，是英才彻底改写了我的求学轨迹，因为它给我提供了人生最宝贵的东西之一，叫做机会。在这里，我细碎的热爱终于被看见。生物不再只是试卷上占比寥寥的学科，而且我对待这个世界上人和事的另一种方式。

在这篇论文的完成之际，我也即将步入高中的最后一年，开启我的申请季。在此，我想向所有引路人和同行者致以我最真挚的感谢。

由衷感谢我的校内指导老师--江苏省天一中学国际部科学部主任曾陈姘老师，她同时也是我 AP 生物和 AP 环境科学的老师。正是因为她在校内扎实的教学，给予我充分的鼓励与支持，引导我向跨学科领域发展，将基础学科知识转化为对创新的探索。毕业于美国密歇根大学安娜堡分校的她为我论文的英文部分进行了指导与修改。也正是在她的推荐下，我才有机会参加中学生英才计划的选拔。

特别感谢我的英才计划导师--南京农业大学生命科学学院院长蒋建东教授。蒋教授在微生物领域的深厚造诣，为本课题的顺利推进提供了坚实保障。从设计实验到实验真正落地，从获得数据到剖析数据结果，蒋教授始终用饱满的热情和耐心给予我指导与帮助。他渊博的学识、宽阔的视野、严谨的科研态度是我前进的目标。

一路走来，感谢一直陪伴和支持我的朋友们。这个项目见证了因为兴趣而相遇的我们，产生再也扯不断的联系。是你们的关心和鼓励，让我在科研路上见到那么多纯粹的热爱与力量。

本项目的指导均为无偿。

当然，本项目的成果并非一撮而就。在验证 TyrB1 催化位点的定点突变实验里，Lys 突变为无极性短甲基 Ala 后可溶性极差、酶活检测出现假阳性，模

拟预测与实验数据矛盾。我通过融合促溶标签、分步纯化与辅因子补充分层优化，最终厘清氨基酸突变同时影响蛋白折叠与催化功能，完善了酶活验证体系。

之后，我将继续研究 L-多巴在人体中的代谢机制，希望解决它在人体内的代谢问题，因为“以人为本”一直是我科研路上的目标。感谢在我困顿时帮助和鼓励我的大家，是你们构成了我科研之路的具体。

个人简历

姓名：蒋忻倬

教育经历：江苏省天一中学（2024 年至今）

职位与获奖经历：

江苏省天一中学生化社 创始人&主席

英国奥林匹克生物竞赛 全球金奖

美国奥林匹克生物竞赛 全国银奖

澳大利亚奥林匹克生物竞赛 全球金奖

美国数学竞赛 12 年级组 全球前 10%

中学生英才计划 优秀学员

Kaggle BirdCLEF+ 2026 全球银奖（第 66 名）

江苏省青少年科技创新大赛 高中组一等奖

HOSA 青年公益影响力展 全国铜奖

江苏省天一中学 凌云奖

作为第一作者撰写论文《The imagos of the mayfly *Vietnamella chebalingensis* Tong, 2020 from China (Ephemeroptera: Vietnamellidae)》发表于 SCI 检索期刊 *Oriental Insects* (IF: 0.7).

指导老师介绍

1. 蒋建东教授

教育与访学经历:

南京农业大学 微生物学学士, 博士
美国康奈尔大学微生物系 访问学者

行政任职:

2018.12-至今 生命科学学院院长

2019.01-至今 生命科学学院党委副书记

国家农业环境微生物种质资源库 常务副主任

研究方向:

农业环境微生物资源发掘、功能解析与种质保藏
农药、有机污染物微生物降解机制与土壤生物修复
根际微生物组、有益菌全球分布与作物抗逆调控
农业绿色微生物制剂开发与面源污染防控

获奖经历:

国家优秀青年科学基金
教育部新世纪优秀人才
江苏省杰出青年基金
国家科技进步二等奖
江苏省科学技术一等奖 (2 项)
教育部技术发明二等奖
中国发明创业奖一等奖
江苏省教学成果二等奖 (生物类创新人才培养)

主持主要科研项目 (国家级):

国家重点研发计划课题: 水环境有机污染物降解元件挖掘、农业微生物种质资源

学术成果:

以通讯作者在 Nature Food、Nature Communications、ISME Journal、Microbiome、Advanced Science、AEM 等期刊发表 SCI 论文 100 余篇; 1 项成果入选 2025 中国农业科学十大进展。

代表性工作:

全球植物病原 / 有益微生物组分布图谱 (Nature Food)

超微寄生细菌 *Patescibacteriota* 共生代谢机制 (Advanced Science)

根际微生物提升作物干旱抗逆评述 (Nature Food)

2. 曾陈娅老师

教育经历:

美国密歇根大学安娜堡分校 微生物与免疫学硕士

苏州大学 生物技术理学学士

行政任职:

江苏省天一中学 AP 课程中心科学部主任

2023–2024 迪邦教育集团理科学科委员会委员

科研经历:

Role of the Notch Co-factor Zmiz1 in ETP-ALL

USP7-mediated Deubiquitination of EZH2 and Type I Interferon Responses

PD-L1 Expression on CD14⁺ Monocytes and CD19⁺ B Cells in HBV Infection

获奖经历:

2025-2026 年度迪邦理科竞赛优秀指导教师

苏州大学优秀毕业生

2015、2016 年苏州大学生物实验技能大赛一等奖

论文发表:

Zeng, C., et al. "USP7 Small-Molecule Inhibitors Enhance Type I Interferon Antiviral Efficacy by Destabilizing SOCS1." *Cellular & Molecular Immunology*, 2019.

Zeng, C., et al. "Clinical Significance of the Dynamics of Programmed Death Ligand-1 Expression on Circulating CD14⁺ Monocytes and CD19⁺ B Cells with the Progression of Hepatitis B Virus Infection." *Viral Immunology*, 2016.