

基于二维凝胶电泳和质谱分析微泡菌 ALW1 代谢 三种海带多糖的蛋白质组

李鹤宾^{1*}, 吴婷², 洪璇¹, 黄秀梅¹, 熊维德¹, 倪辉², 朱艳冰²

(1. 厦门医学院药理学系, 福建厦门 361023) (2. 集美大学海洋食品与生物工程学院, 福建厦门 361021)

摘要: 为了阐明海带降解微泡菌 ALW1 代谢海带多糖的分子机理, 本研究进行 ALW1 菌株代谢海带多糖的蛋白质组研究, 利用二维凝胶电泳 (2-DE) 和质谱 (MS) 技术鉴定菌株 ALW1 代谢三种多糖 (昆布多糖、岩藻多糖和果胶) 的差异蛋白质。二维凝胶电泳显示了 202 个差异表达的蛋白质斑点, 利用质谱最终鉴定了 161 个蛋白质。聚类分析结果表明, 以昆布多糖为碳源培养的细胞内蛋白, 与岩藻多糖和果胶培养的细胞内蛋白相比, 共鉴定出 35 种上调蛋白; 以岩藻多糖为碳源培养的细胞内蛋白与其他两种蛋白样品相比, 共鉴定出 88 种上调蛋白; 以果胶为碳源培养的细胞内蛋白与其他两种蛋白样品相比, 共鉴定出 68 种上调蛋白。GO 分析表明, 差异表达蛋白质在细胞成分上主要集中在细胞和细胞组成部分, 在分子功能上主要集中在催化活性和结合功能上, 并且主要参与细胞过程和生物体中的代谢过程。微泡菌 ALW1 代谢不同海带多糖的蛋白质组研究为该菌株代谢多糖的分子机理, 以及利用该菌株生产海带低聚糖和寡糖奠定理论基础。

关键词: 比较蛋白质组学; 微泡菌 ALW1; 海带多糖; 二维凝胶电泳

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.11.1266

Proteomic Analysis of Three Kelp Polysaccharides Metabolized by *Microbulbifer* sp. ALW1 Based on Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry

LI Hebin^{1*}, WU Ting², HONG Xuan¹, HUANG Xiumei¹, XIONG Weide¹, NI Hui², ZHU Yanbing²

(1. Department of Pharmacy, Xiamen Medical College, Xiamen 361023, China)

(2. School of Marine Food and Bioengineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: In order to elucidate the molecular mechanism of kelp polysaccharides metabolism by *Microbulbifer* sp. ALW1 with kelp-degrading ability, the proteome of kelp polysaccharides metabolism by this strain was studied in this study. Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and mass spectrometry (MS) were utilized to identify the differential proteins of strain ALW1 metabolizing three kelp polysaccharides (laminarin, fucoidan, and pectin). The results of two-dimensional gel electrophoresis revealed 202 differentially expressed protein spots, and 161 proteins were finally identified using mass spectrometry. Cluster analysis showed that a total of 35 up-regulated proteins were identified in intracellular proteins cultured with laminarin as a carbon source compared to those cultured with fucoidan and pectin. A total of 88 up-regulated proteins were identified in intracellular proteins cultured with fucoidan as a carbon source compared to the other two protein samples. A total of 68 up-regulated proteins were identified in intracellular proteins cultured with pectin as a carbon source compared to the other two protein samples. GO analysis showed that differentially expressed proteins were mainly concentrated in cell and cell part in terms of cellular component, mainly concentrated in catalytic activity and binding function in terms of molecular function, and mainly involved in cellular process and metabolic process in terms of biological process. The proteomic study on the metabolism of different kelp polysaccharides by *Microbulbifer* sp. ALW1 lays a theoretical foundation for the molecular mechanism of polysaccharides metabolism by this strain and the production of kelp low molecular weight polysaccharides and oligosaccharides using this strain.

Keywords: comparative proteomics; *Microbulbifer* sp. ALW1; kelp polysaccharides; 2-DE

收稿日期: 2024-08-26; 修回日期: 2024-10-22; 接受日期: 2024-10-22

基金项目: 福建省自然科学基金计划项目 (2023J011652); 福建省科技计划高校产学研合作项目 (2023Y4009)

作者简介: 李鹤宾 (1974-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品生物化学, E-mail: lhb@xmmc.edu.cn

海带是一种重要的经济藻类,其细胞壁中含有多种功能性结构多糖,包括昆布多糖、岩藻多糖、褐藻胶和果胶等^[1]。与这些多糖相比,海带多糖的降解产物海带低聚糖和寡糖具备更低的分子量、更好的水溶性、易于吸收以及更高的生物活性等优点^[2-4]。海带低聚糖和寡糖的生物活性包括抗氧化、抗菌、抗肿瘤、抗凝血、降血压、降血脂、降血糖、免疫调节、改善肠道功能等^[5-7]。

目前,海带多糖可以通过不同的方法加工成低聚糖和寡糖,包括化学降解法^[6]、物理降解法^[7]、酶解法^[8]和发酵法^[9]。化学和物理法低聚糖和寡糖产率较低,反应剧烈,且存在一定的污染。酶解法较其他方法具有操作简单、污染小等优势,但也存在一些问题,例如降解效率低,对热和机械干扰敏感。利用海带降解微生物可以从海带中制备低聚糖和寡糖,另一方面,这些微生物还可以降解海带加工和养殖过程中产生的海带废弃物,减少环境污染。因此,利用降解海带微生物及其海带多糖降解酶是海带及其多糖降解的有效方法,对海带资源的综合利用具有重要意义。在先前的文献报道中,Zhu等^[10]发现了 *Bacillus weihaiensis* 中藻类多糖降解的关键酶和途径,并解释了该海洋细菌对褐藻的降解过程。Gao等^[11]从深海细菌 *Flammeovirga pacifica* WPAGA1 的基因组序列推导了该菌株的海藻多糖代谢途径,为该菌株在工业生产中的应用提供了理论依据。在先前的研究中,从腐烂的海带样品中分离出海洋微泡菌 ALW1 (*Microbulbifer* sp. ALW1)^[12],基因组分析显示,该菌株含有海带多糖(昆布多糖、岩藻多糖、果胶、褐藻胶、纤维素等)降解的关键酶和途径^[12]。

蛋白质组学可用于研究复杂生物过程,解析基因表达调控机制^[13]。通过蛋白质组学分析鉴定了藻类降解菌 *Paradendryphiella salina* 中多糖裂解酶家族 7 (PL7) 和 8 (PL8) 的酶,降解细胞壁中的海藻酸盐以促进该菌株在海洋宿主上的定殖^[14]。二维电泳图谱分析揭示了 *Butyrivibrio proteoclasticus* 细胞响应多糖碳供应的蛋白质组学动力学,突出了多糖降解酶、碳水化合物结合蛋白 (CBPs)、ATP 结合盒式蛋白 (ABC) 和底物结合蛋白 (SBPs) 在多糖降解和寡糖摄取中的意义^[15]。在本研究中,采用二维凝胶电泳 (2-DE) 和质谱 (MS) 分析微泡菌 ALW1 在昆布多糖、岩藻多糖和果胶为唯一碳源条件下代谢多糖的差异蛋白,促进菌株 ALW1 代谢三种多糖的分子机理研究,为利用微泡菌 ALW1 进行海带低聚糖和寡糖生产奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

微泡菌 ALW1 (*Microbulbifer* sp. ALW1) 由本实验室保存。昆布多糖、岩藻多糖、果胶购自上海源叶生物科技有限公司,BCA 工作液购自北京全式金生物技术有限公司,胰蛋白酶购自 Sigma 公司,其余试剂均为国产分析纯产品。

1.2 仪器与设备

UV-160 分光光度计,日本岛津公司;AB 5800 MALDI-TOF/TOF 质谱仪,美国 AB SCIEX 公司;RHZ-39A/S 摇床,北京海天仪器有限公司。

1.3 微泡菌 ALW1 在三种多糖碳源条件下的培养

菌株 ALW1 在 50 mL 培养基 A (0.5% (m/V) 海带粉、3.0% (m/V) NaCl, 0.2% (m/V) K₂HPO₄、0.1% (m/V) MgSO₄·7H₂O, 0.001% (m/V) FeSO₄·7H₂O) 中活化,25 °C、180 r/min 摇动培养 24 h。将 1 mL 的菌悬液接种到 50 mL 培养基 B (含 0.5% (m/V) 蛋白胨的缓冲液 A),缓冲液 A 成分如下:3.0% (m/V) NaCl、0.5% (m/V) (NH₄)₂SO₄、0.2% (m/V) K₂HPO₄、0.1% (m/V) MgSO₄·7H₂O、0.001% (m/V) FeSO₄·7H₂O, pH 值 7.5,在 25 °C、180 r/min 摇动培养 12 h。将 20 mL 菌悬液分别接种到 1 000 mL 三种多糖培养基 (含 0.2% (m/V) 昆布多糖的缓冲液 A、含 0.2% (m/V) 岩藻多糖的缓冲液 A、含 0.2% (m/V) 果胶的缓冲液 A) 中,在 25 °C、180 r/min 摇动培养 30 h,期间通过测量 OD₆₀₀ 值来监测微泡菌 ALW1 菌株以不同多糖为碳源条件下的生长,利用 Microsoft Excel 2019 进行菌株生长数据的整理和绘图。

1.4 蛋白质提取和双向聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

分别取 1 000 mL 不同多糖碳源条件下培养 30 h 的细胞培养物, 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min, 收集细胞。细胞内总蛋白利用改良苯酚法^[16]提取。蛋白质浓度的测定使用 Bradford 法^[17], 以牛血清白蛋白作为蛋白质标准品。取 1.3 mg 样品, 参考文献^[18,19]的方法进行双向聚丙烯酰胺凝胶电泳 (2-DE) 分析。每个样品重复 3 次, 利用改良的考马斯亮蓝 G-250 染色法^[18]将凝胶可视化。

1.5 二维聚丙烯酰胺凝胶的图像分析

使用 ImageMaster 2D Platinum 5.0 双向电泳图像分析软件 (GE Healthcare, 美国) 对样品的图像进行分析。在斑点检测和背景扣除后, 将蛋白质斑点对准并匹配, 比较不同样品间的差异, 计算不同样品间 VOL% 的倍数关系, 倍数大于 2 或者小于 0.5 的认为是差异点, 切下目标斑点。

1.6 MALDI TOF/TOF 质谱分析

参照文献^[20]的方法, 将目标蛋白质用胰蛋白酶消化。参照文献^[21]的方法, 使用 AB 5800 MALDI-TOF/TOF 质谱仪进行蛋白质分析鉴定。将测得的胰蛋白酶肽质量利用 ProteinPilot™ 软件 (AB SCIEX, 美国) 在 NCBI nr 数据库中进行细菌的 BLAST 搜索, 同时对每种蛋白质参考 UniProtKB 数据库进行 BLAST 搜索, 以鉴定其同源性。

1.7 生物信息学分析

根据 Agebase 搜索识别的蛋白序列, 获取蛋白质的 GO 信息, 使用 WEGO Web 服务器 (<http://wego.genomics.org.cn>) 对蛋白质进行 GO 功能注释^[22]。使用 STRING 数据库进一步分析鉴定蛋白质的相互作用^[23]。使用 MultiExperiment Viewer 软件进行基于自组织树算法的聚类分析^[24]。

2 结果与讨论

2.1 微泡菌 ALW1 在三种多糖碳源条件下的生长曲线

分别在以昆布多糖、岩藻多糖和果胶为唯一碳源的培养基中, 研究菌株 ALW1 的生长动态。菌株 ALW1 在含有昆布多糖和岩藻多糖的培养基中, 在 24 h 时进入早期稳定阶段, 而在含有果胶的培养基中则在 54 h 时进入稳定阶段 (图 1)。选择 30 h 的培养时间进行微泡菌 ALW1 代谢不同海带多糖的蛋白质组分析。

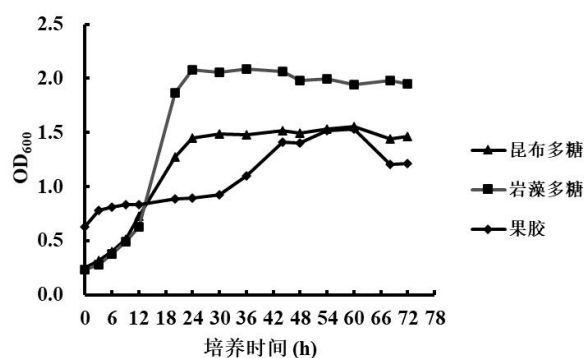


图 1 微泡菌 ALW1 在三种不同海带多糖培养基中的生长状况

Fig.1 Growth of *Microbulbifer* sp. ALW1 in three different kelp polysaccharide media

2.2 差异表达蛋白质分析

在蛋白质组学研究中, 2-DE 方法是一种普遍应用的蛋白质分离技术, 特别适用于通过直接视觉变化检测高丰度蛋白质^[25]。本研究分别以昆布多糖、岩藻多糖和果胶为唯一碳源培养微泡菌 ALW1, 采用二维电泳法对该菌株的蛋白质组进行比较分析, 结果分别如图 2A~C 所示。对上述三种不同培养条件下的样品进行比较蛋白质组学分析, 共有 202 个蛋白点出现 2 倍以上的变化, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。利用 MALDI TOF/TOF MS 进一步对这些差异蛋白质进行鉴定, 最终鉴定了 161 个差异表达蛋白质 (图 2D)。蛋白质的等电点位于 4.02 至 9.98 之间。

Jiang 等^[26]从两种海草 *Zostera muelleri* 和 *Posidonia australis* 中提取蛋白质, 利用 LC-MS/MS 鉴定了 26 个差异表达蛋白质, 2-DE 分析显示这些蛋白质的等电点为 5~8。在先前的研究中, 利用 LC-MS/MS 分析了微泡菌 ALW1 代谢褐藻胶多糖的蛋白质组, 对细胞外和细胞内样品分别鉴定出 156 个和 1047 个蛋白质^[27]。

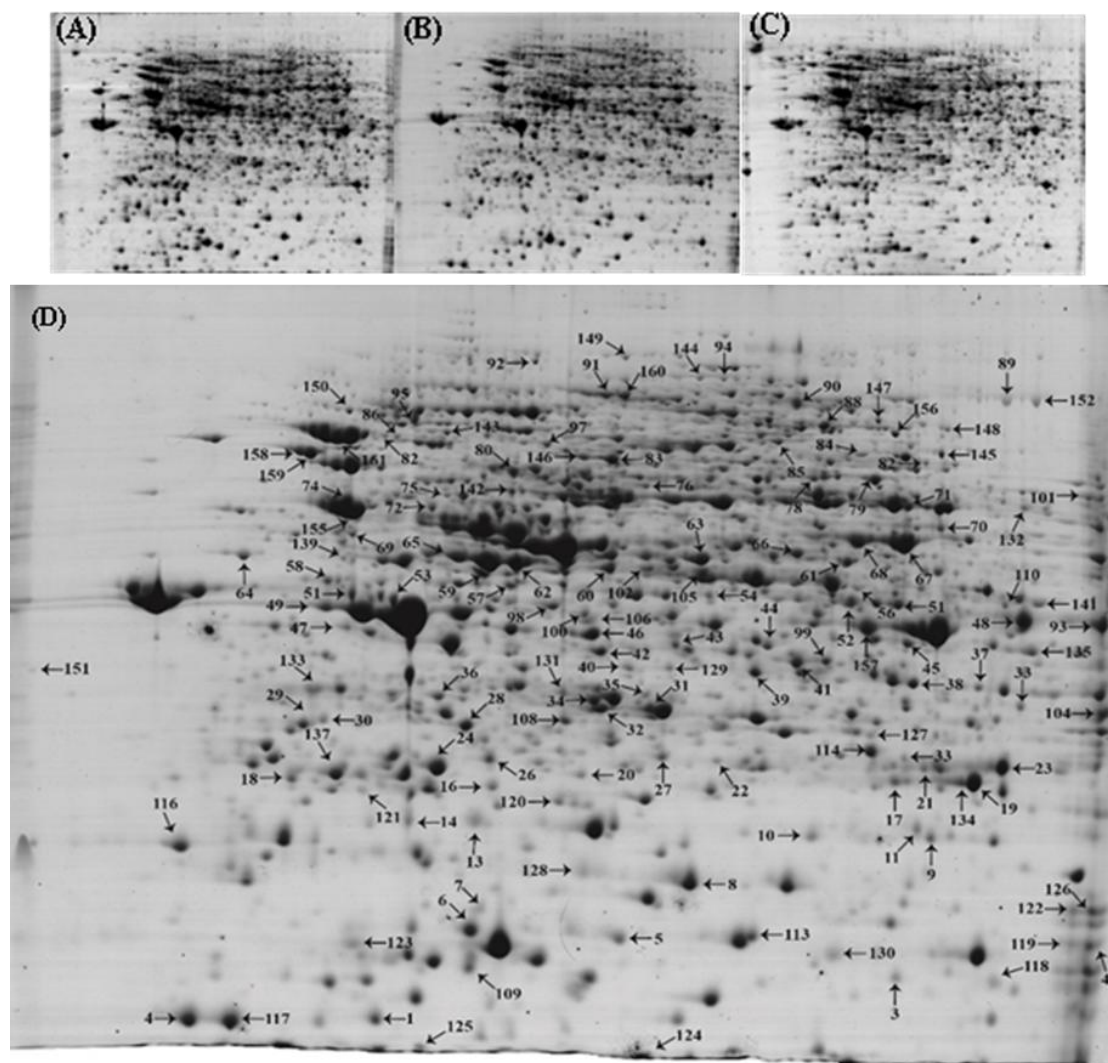


图2 微泡菌 ALW1 代谢三种海带多糖的蛋白质组的 2-DE 分析

Fig.2 2-DE analysis of proteomes of three kelp polysaccharides metabolized by *Microbulbifer* sp. ALW1

注: (A) 以昆布多糖为唯一碳源培养条件下的 2-DE 图; (B) 以岩藻多糖为唯一碳源培养条件下的 2-DE 图; (C) 以果胶为唯一碳源培养条件下的 2-DE 图; (D) 三种样品的差异表达蛋白质。

2.3 差异表达蛋白质的 GO 功能分析

为研究昆布多糖、岩藻多糖和果胶作为唯一碳源培养的样品中差异表达蛋白质的功能, 进行 GO 分析, 研究这 161 种差异表达蛋白在细胞成分、分子功能和生物学过程中的分类。图 3 显示, 161 种差异表达蛋白质中有 122 种蛋白质显示 GO 信息, 根据功能注释将其分为三大类, 每个大类包含 31 个亚类。就细胞成分而言, 最多的部分 (包括 108 种蛋白质) 位于细胞组成部分 (GO: 0044464) 和细胞 (GO: 0005623)。另外 33 种蛋白质存在于膜 (GO: 0016020) 中, 其余的存在于含蛋白质的复合物 (GO: 0032991)、细胞器 (GO: 0043226)、膜部分 (GO: 0044425) 和细胞器部分 (GO: 0044422) 中 (图 3)。膜是细菌的一种特殊结构, 在 GO 的聚类分析中, 该条目包括脂质双层以及嵌入其中并附着在其上的所有蛋白质和蛋白质复合物^[28]。据报道, 环二鸟苷酸 (c-di-GMP) 是在细菌中广泛发现的第二信使, 高浓度的 c-diGMP 可以增加细菌的表面粘附和聚集, 并促进膜的形成^[29]。关于分

子功能,分配了八个子类别,最多的部分是结合功能(GO: 0005488),其次是催化活性(GO: 0003824),还有抗氧化活性(GO: 0016209)、结构分子活性(GO: 0005198)、转运蛋白活性(GO: 0005215)、转录调节子活性(GO: 0140110)、分子转导子活性(GO: 0060089)和分子功能调节子(GO: 0098772)(图3)。酶是细菌中主要的生物催化剂,细胞中的代谢过程需要酶的催化进行以维持基本生命活动。本研究以昆布多糖、岩藻多糖和果胶为唯一碳源培养菌株 ALW1,酶蛋白丰度发生了变化,影响了该菌株的生命活动。在生物过程中,最多的部分与细胞过程有关(GO: 0009987),其次与代谢过程有关(GO: 0008152),其他重要的生物过程包括对刺激的反应(GO: 0050896)、生物调节(GO: 0065007)、细胞成分组织或生物发生(GO: 0071840)、定位(GO: 0051179)、生物过程调控(GO: 0050789)、生物过程的负调控(GO: 0048519)、多生物过程(GO: 0051704)、生物过程的正调控(GO: 0048518)、信号传递(GO: 0023052)、排毒(GO: 0098754)、生殖过程(GO: 0022414)、生殖(GO: 0000003)、运动(GO: 0040011)和发育过程(GO: 0032502)(图3)。对于生物学过程,不同碳源的培养条件触发了与细胞和代谢过程有关的蛋白质丰度的显著变化。在细胞水平上进行的这些过程包括化学反应和途径,例如合成代谢和分解代谢,生物体通过这些反应和途径转化化学物质。研究表明,菌体培养环境发生变化时,参与能量代谢的差异蛋白占比和优先级较高,如低温胁迫下的菌体参与不同代谢途径的蛋白表现出明显差异化,如参与线粒体呼吸链、糖酵解等多种代谢途径的关键蛋白表现出差异化^[30]。在先前的研究中,基于 GO 分析发现微泡菌 ALW1 代谢褐藻胶多糖的蛋白质在催化活性和代谢过程中占主导地位,特别是细胞内蛋白质,证实了菌株 ALW1 在褐藻胶分解中的生物学相关性^[27]。Nishitsuji 等^[31]对四种褐藻株(S、K、O 和 C)的差异蛋白质进行 GO 分析,发现生物过程占主导的是细胞过程及代谢过程。另外,基于 GO 分析,发现红藻 *Asparagopsis taxiformis* 的蛋白质主要参与细胞代谢过程、有机物质代谢过程和初级代谢过程^[32],表明海藻中大多数差异表达蛋白都参与细胞代谢相关活动。

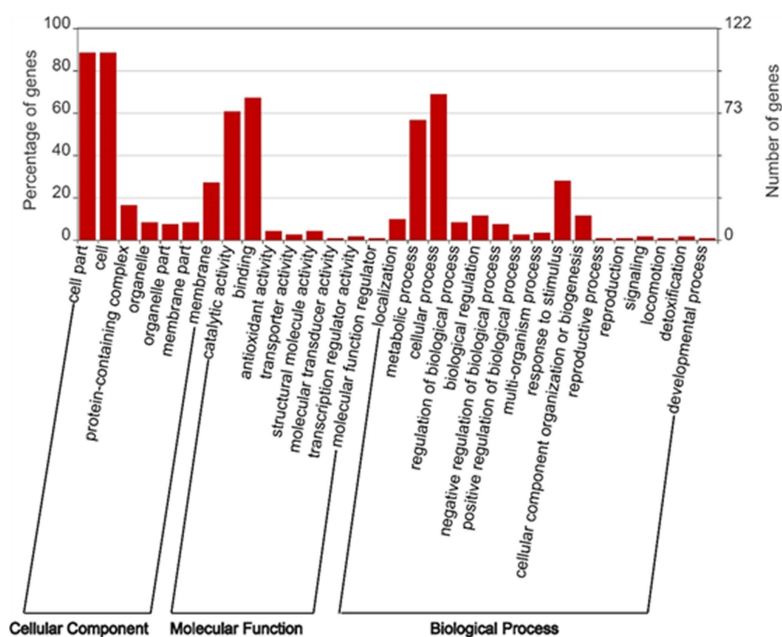


图3 差异表达蛋白质的GO分类

Fig.3 GO classification of the differentially expressed proteins

2.4 差异表达蛋白质的聚类分析

在以昆布多糖与岩藻多糖为碳源培养的细胞内蛋白之间鉴定出 83 种差异表达蛋白质(图 4A),在以果胶与岩藻多糖培养的细胞内蛋白之间鉴定出 68 种差异表达蛋白质(图 4B),在以果胶和昆布多糖培养的细胞内蛋白之间鉴定出 40 种差异表达蛋白质(图 4C)。聚类分析结果表明,以昆布多糖为碳源培养的细胞内蛋白,与岩藻多糖和果胶培养的细胞内蛋白相比,共鉴定出 35 种上调蛋白;以岩藻多糖为碳源培养的细胞内蛋白与其他两种蛋白样品相比,共鉴定出 88 种上调蛋白;以果胶为碳源培养的细胞内蛋白与其他两种蛋白样品相比,共鉴定出 68 种上调蛋白。Kalenborn 等^[33]在培养基中添加昆布多糖,进行 *Maribacter forsetii* 菌株的培养,鉴定出该菌株 53 种特有表达的差异蛋白。以上研究进一步证明了微生物在不同碳源培养条件下,蛋白质组的差异性。

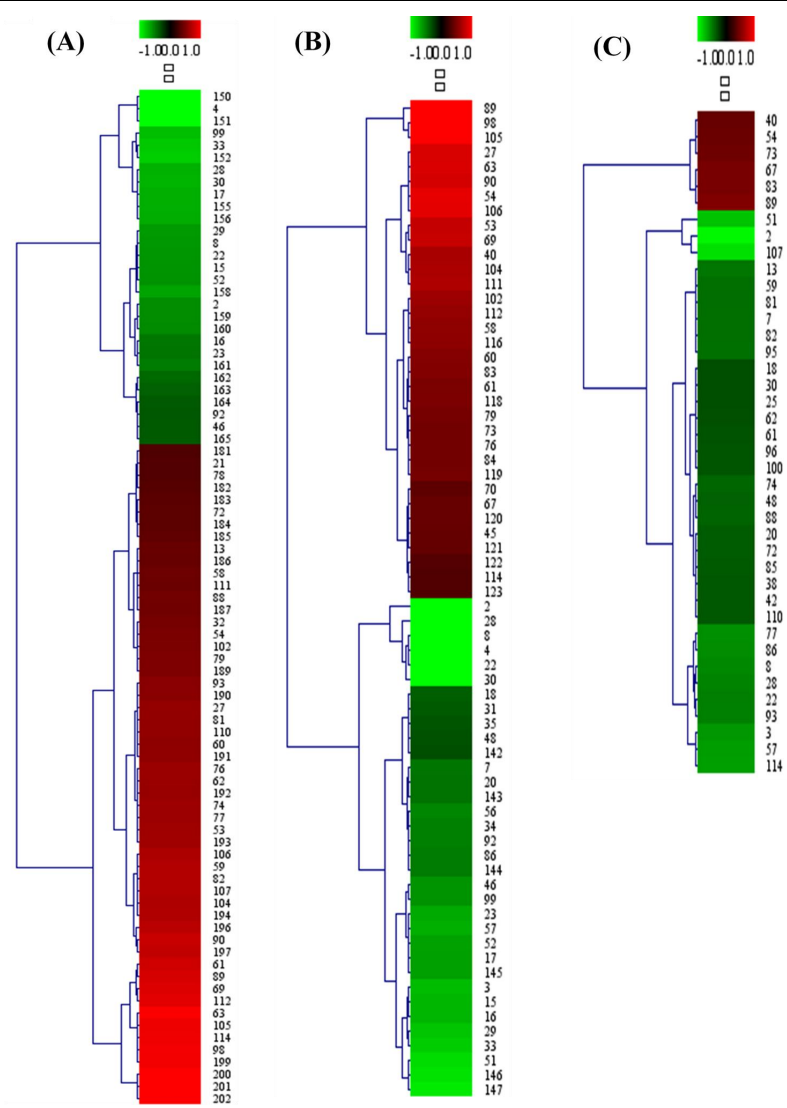


图 4 差异表达蛋白质的聚类分析。以昆布多糖和岩藻多糖为碳源培养的细胞内蛋白之间 (A)，以果胶和岩藻多糖培养的细胞内蛋白之间 (B)，以果胶和昆布多糖为碳源培养的细胞内蛋白之间 (C)

Fig.4 Cluster analysis of differentially expressed proteins. (A) Between the intracellular proteins cultured with laminarin and fucoidan as carbon sources. (B) Between the intracellular proteins cultured with pectin and fucoidan as carbon sources. (C) Between the intracellular proteins cultured with pectin and laminarin as carbon sources.

2.5 蛋白质相互作用分析

为了揭示差异表达蛋白质的相互作用，将三种样品的差异表达蛋白质（共计 161 个）的序列输入到 STRING 数据库中进行分析，利用相互作用网络预测分析三种多糖碳源代谢的差异表达蛋白质的联系。本研究选择高置信度（置信度 0.9）视图来展示蛋白质网络，网络节点代表蛋白质，边缘代表两种蛋白质之间的预测功能关联。在鉴定出的差异表达蛋白质中，有 65 个参与蛋白质-蛋白质相互作用，并以 6 个簇的形式呈现（图 5）。65 个差异表达蛋白在网络中具有很强的关联作用，表明不同海带多糖条件下碳源代谢在调控能量代谢、部分氨基酸的合成以及 mRNA 的翻译中具有综合作用^[34,35]。蛋白质-蛋白质相互作用的最大簇（簇 1）主要与能量代谢有关，能量代谢涉及细菌生命活动的各个方面。蛋白质-蛋白质相互作用的簇 1 包括 34 种蛋白质，它们是 adhP（酒精脱氢酶）、ahpC（烷基过氧化物还原酶）、argG（精氨酸琥珀酸合酶）、aspC（芳族氨基酸氨基转移酶）、atpA（ATP 合酶 F0F1 α -亚基）、atpD（ATP 合酶 F0F1 β -亚基）、btuE（过氧化物酶）、carA（氨基甲酸酯磷酸合酶小亚基）、ECP_4118（超氧化物歧化酶）、ECP_4498（鸟氨酸氨基甲酰转移酶）、fruB（双功能果糖特异性 PTS IIA/HPr 蛋白）、gltA（II 型

柠檬酸合酶)、gpmA (磷酸甘油酯)、guaB (肌苷 5'-单磷酸脱氢酶)、hisG (ATP 磷酸核糖基转移酶)、hldD (ADP-L-甘油-D-甘露庚糖 6-表异构酶)、hldE (D-甘油- β -D-甘露-庚糖-1,7-二磷酸激酶)、luxS (S-核糖基半胱氨酸酶)、mdh (苹果酸脱氢酶)、metE (5-甲基四氢蝶酰基三谷氨酸/同型半胱氨酸 S-甲基转移酶)、metF (5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶)、mtlD (甘露糖醇-1-磷酸-5-脱氢酶)、pgk (磷酸甘油酸激酶)、ptsI (磷酸烯醇丙酮酸蛋白磷酸转移酶)、purD (磷酸核糖胺-甘氨酸连接酶)、purM (磷酸核糖氨基咪唑合成酶)、rbfA (核糖体结合因子 A)、rplI (50S 核糖体蛋白 L9A)、sodB (超氧化物歧化酶)、trxB (硫氧还蛋白还原酶)、tyrB (芳香族氨基酸转氨酶)、yeaD (醛糖 1-表异构酶)、yohF (乙醛酸脱氢酶)。ATP 是内源性存在的三磷酸核苷酸,在所有细胞类型中无处不在,因为它是生物合成、水解、转运和信号转导过程中的主要能量载体^[36]。ATP 合酶 FOF1 亚基 α 和 β 参与氧化磷酸化蛋白的合成和功能调控^[37]。ADP-L-甘油-D-甘露庚糖-6-表异构酶可以通过差向异构酶催化 ADP-D-甘油- β -D-甘露糖庚糖与 ADP-L-甘油- β -D-甘露糖庚糖之间的相互转化,在庚糖的碳 6 位上 7-磷酸激酶/庚糖 1-磷酸腺苷转移酶可以催化 ADP 从 ATP 转移到 D-甘油- β -D-甘露糖庚糖 1-磷酸,产生 ADP-D-甘油- β -D-甘露糖庚糖。簇 2 包括 9 种蛋白质,它们是 ECP_3431 (30S 核糖体蛋白 S7)、fusA (延伸因子 G)、infB (翻译起始因子 IF-2)、rplA (50S 核糖体蛋白 L1)、rplJ (50S 核糖体蛋白 L10)、rplL (50S 核糖体蛋白 L7/L12)、rpsA (30S 核糖体蛋白 S1)、tig (触发因子)、tuf (延伸因子 Tu)。簇 2 的蛋白质主要参与翻译。翻译起始因子 IF-2 是翻译起始的关键蛋白,能够保护甲酰甲硫氨酰-tRNA 免于自发水解并促进其与 30S 核糖体亚基的结合^[38],它也参与了 70S 核糖体复合物形成过程中 GTP 的水解^[39]。50S 核糖体蛋白 L7/L12 对于准确翻译至关重要,它可以构成核糖体茎的一部分,有助于核糖体与 GTP 结合的翻译因子相互作用^[40]。在簇 3 中,7 种蛋白分别是 deoC (脱氧核糖磷酸醛缩酶)、ECs2488 (甘油醛 3-磷酸脱氢酶 A)、fbp (果糖-1,6-双磷酸酶)、pfkB (6-磷酸果糖激酶)、tal2 (转醛缩酶 B)、talA (转醛醇酶 A)、tktB (转酮醇酶),这些蛋白主要参与糖酵解、糖异生和磷酸戊糖途径。在簇 4 中,有 5 种蛋白,即 aceE (丙酮酸脱氢酶亚基 E1)、aceF (二氢脂酰胺乙酰基转移酶)、dsbA (蛋白质二硫键异构酶 I)、glyA (丝氨酸羟甲基转移酶)、lpd (二氢硫辛酸脱氢酶),主要功能包括脂肪酸和丙酮酸代谢、蛋白质二硫键的合成和断裂。簇 5 包括 5 种蛋白质,即 adhE (双功能乙醛-CoA/乙醇脱氢酶)、ilvD (二羧酸脱水酶)、leuA (2-异丙基苹果酸合酶)、leuC (异丙基苹果酸异构酶大亚基)、leuD (异丙基苹果酸异构酶小亚基),主要参与亮氨酸的合成。在簇 6 中,有 5 种蛋白,即 hisH (咪唑甘油磷酸合酶亚基 HisH)、trpA (色氨酸合酶 α 亚基)、trpB (色氨酸合酶 β 亚基)、trpD (双功能谷氨酰胺转移酶/邻氨基苯甲酸磷酸核糖基转移酶)、trpE (邻氨基苯甲酸合酶),这些蛋白质主要参与色氨酸、组氨酸的合成。综上,以昆布多糖、岩藻多糖和果胶为唯一碳源分别对微泡菌 ALW1 进行培养,不同碳源在影响菌种生长的同时会调控菌株不同部位的蛋白表达,这些差异表达蛋白质调控能量代谢、部分氨基酸的合成以及 mRNA 的翻译。本研究为进一步探究微泡菌 ALW1 代谢昆布多糖、岩藻多糖和果胶的分子机理提供了理论依据。

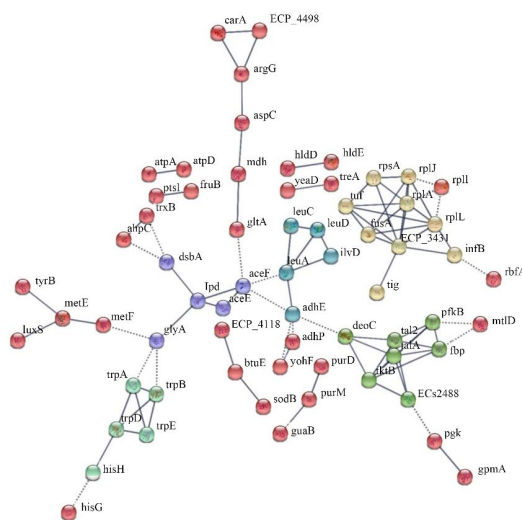


图5 差异表达蛋白质的相互作用分析

Fig.5 Protein interaction analysis of differentially expressed proteins

注: 簇1由红色表示; 簇2由黄色表示; 簇3由绿色表示; 簇4由紫色表示; 簇5由浅蓝色表示; 簇6由青色表示。

3 结论

本研究基于 2-DE 和 MS 技术鉴定了微泡菌 ALW1 代谢三种海带多糖（昆布多糖、岩藻多糖和果胶）的 161 个细胞内差异蛋白质。GO 分析表明，差异表达蛋白质主要参与细胞成分中的细胞组成部分和细胞，在分子功能上主要集中在催化活性和结合功能上，并主要参与细胞过程和生物体中的代谢过程。微泡菌 ALW1 代谢不同海带多糖的蛋白质组研究为该菌株代谢多糖的分子机理、海带多糖降解酶生产菌株的改造以及利用微生物发酵产生海带低聚糖和寡糖的代谢控制奠定理论基础，有助于推动海带精深加工的发展和海带产品增值利用的实现，发展壮大海带产业。

参考文献

- [1] KADAM S U, TIWARI B K, O'DONNELL C P. Extraction, structure and biofunctional activities of laminarin from brown algae [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2015, 50(1): 24-31.
- [2] STEFANOWSKA K, WOZNIAK M, MAJKA J, et al. A new approach to obtain chitosan films-Characteristics of films prepared with tea and coffee kombucha as natural chitosan solvents [J]. Industrial Crops and Products, 2023, 197: 116634.
- [3] QI Y H, WANG L L, YOU Y, et al. Preparation of low-molecular-weight fucoidan with anticoagulant activity by photocatalytic degradation method [J]. Foods, 2022, 11(6): 822.
- [4] LI J, PENG C, MAO A H, et al. An overview of microbial enzymatic approaches for pectin degradation [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 254(Pt 1): 127804.
- [5] LEAL J M, SUÁREZ L V, JAYABALAN R, et al. A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites [J]. Cyta-Journal of Food, 2018, 16(1): 390-399.
- [6] PEASURA N, LAOHAKUNJIT N, KERDCHOECHUEN O, et al. Characteristics and antioxidant of *Ulva intestinalis* sulphated polysaccharides extracted with different solvents [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 81: 912-919.
- [7] WU Q Q, ZHANG M, WU K, et al. Purification and characteristics of fucoidanase obtained from *Dendryphiella arenaria* TM94 [J]. Journal of Applied Phycology, 2011, 23(2): 197-203.
- [8] Li Z P, WANG J, CHEN J F, et al. Characteristics and mechanisms of sustainable recovery of perlite from carrageenan residue by green technology and its application in carrageenan extraction [J]. Journal of Cleaner Production, 2024, 434: 140131.
- [9] LI M M, SHANG Q S, LI G S, et al. Degradation of marine algae-derived carbohydrates by bacteroidetes isolated from human gut microbiota [J]. Marine Drugs, 2017, 15(4): 92.
- [10] ZHU Y M, CHEN P, BAO Y J, et al. Complete genome sequence and transcriptomic analysis of a novel marine strain *Bacillus weihaiensis* reveals the mechanism of brown algae degradation [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 38248.
- [11] GAO B L, JIN M, LI L, et al. Genome sequencing reveals the complex polysaccharide-degrading ability of novel deep-sea bacterium *Flammeovirga pacifica* WPAGA1 [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 600.
- [12] LI Z P, DU Z P, LI H B, et al. Characterisation of marine bacterium *Microbulbifer* sp. ALW1 with *Laminaria japonica* degradation capability [J]. AMB EXPRESS, 2022, 12(1): 139.
- [13] ASLAM B, BASIT M, NISAR M A, et al. Proteomics: technologies and their applications [J]. Journal of Chromatographic Science, 2017, 55(2): 182-196.
- [14] PILGAARD B, WILKENS C, HERBST F, et al. Proteomic enzyme analysis of the marine fungus *Paradendryphiella salina* reveals alginate lyase as a minimal adaptation strategy for brown algae degradation [J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 12338.
- [15] DUNNE J C, LI D, KELLY W J, et al. Extracellular polysaccharide-degrading proteome of *Butyrivibrio proteoclasticus* [J]. Journal of Proteome Research, 2012, 11(1): 131-142.
- [16] WANG X C, LI X F, DENG X, et al. A protein extraction method compatible with proteomic analysis for the eukaryote *Salicornia europaea* [J]. Electrophoresis, 2007, 28(21): 3976-3987.
- [17] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.
- [18] WANG X C, CHANG L L, WANG B C, et al. Comparative proteomics of *Thellungiella halophila* leaves from plants subjected to salinity reveals the importance of chloroplastic starch and soluble sugars in halophyte salt tolerance [J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2013, 12(8): 2174-2195.

- [19] YI X P, SUN Y, YANG Q, et al. Quantitative proteomics of *Sesuvium portulacastrum* leaves revealed that ion transportation by V-ATPase and sugar accumulation in chloroplast played crucial roles in halophyte salt tolerance [J]. Journal of Proteomics, 2014, 99: 84-100.
- [20] WANG X C, FAN P X, SONG H M, et al. Comparative proteomic analysis of differentially expressed proteins in shoots of *Salicornia europaea* under different salinity [J]. Journal of Proteome Research, 2009, 8(7): 3331-3345.
- [21] WANG D Z, LI C, XIE Z X, et al. Homology-driven proteomics of dinoflagellates with unsequenced genomes using MALDI-TOF/TOF and automated *De Novo* sequencing [J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2011, 2011: 471020.
- [22] YE J, ZHANG Y, CUI H H, et al. WEGO 2.0: a web tool for analyzing and plotting GO annotations, 2018 update [J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(W1): W71-W75.
- [23] COOK H V, DONCHEVA N T, SZKLARCZYK D, et al. Viruses.STRING: a virus-host protein-protein interaction database [J]. Viruses, 2018, 10(10): 519.
- [24] KATAYAMA M L H, VIEIRA R A C, ANDRADE V P, et al. Stromal cell signature associated with response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer [J]. Cells, 2019, 8(12): 1566.
- [25] KWIATKOWSKI M, HOTZE M, SCHUMACHER J, et al. Protein speciation is likely to increase the chance of proteins to be determined in 2-DE/MS [J]. Electrophoresis, 2022, 43(11): 1203-1214.
- [26] JIANG Z J, KUMAR M, PADULA M P, et al. Development of an efficient protein extraction method compatible with LC-MS/MS for proteome mapping in two Australian seagrasses *Zostera muelleri* and *Posidonia australis* [J]. Frontiers in plant science, 2017, 8: 1416.
- [27] LI Z P, HUANG X Y, GUO Y X, et al. Toward understanding the alginate catabolism in *Microbulbifer* sp. ALW1 by proteomics profiling [J]. Frontiers in bioengineering and biotechnology, 2022, 10: 829428.
- [28] TRAN F, GANGAN M S, WEAVER B P, et al. Membrane-binding biomolecules influence the rate of vesicle exchange between bacteria [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2022, 88(23): e0134622.
- [29] HALTE M, WORMANN M, BOGISCH M, et al. BldD-based bimolecular fluorescence complementation for in vivo detection of the second messenger cyclic di-GMP [J]. Molecular Microbiology, 2022, 117(3): 705-713.
- [30] 吴志亮,黄莹,王则金.草菇响应低温胁迫的差异蛋白质组学分析[J].食品科学,2020,41(19):212-220.
- [31] NISHITSUJI K, ARIMOTO A, YONASHIRO Y, et al. Comparative genomics of four strains of the edible brown alga, *Cladosiphon okamuranus* [J]. BMC Genomics, 2020, 21(1): 422.
- [32] PATWARY Z P, ZHAO M, WANG T F, et al. A proteomic analysis for the red seaweed *Asparagopsis taxiformis* [J]. Biology (Basel), 2023, 12(2): 167.
- [33] KALENBORN S, ZUHLKE D, REINTJES G, et al. Genes for laminarin degradation are dispersed in the genomes of particle-associated *Maribacter* species [J]. Frontiers in Microbiology, 2024, 15: 1393588.
- [34] QI Z, YUAN S, ZHOU X, et al. Isobaric tags for relative and absolute quantitation-based quantitative serum proteomics analysis in ischemic stroke patients with hemorrhagic transformation [J]. Frontiers in Cellular Neuroscience, 2021, 15: 710129.
- [35] QAYYUM S, SHARMA D, BISHT D, et al. Identification of factors involved in *Enterococcus faecalis* biofilm under quercetin stress [J]. Microbial Pathogenesis, 2019, 126: 205-211.
- [36] XIAO J Q, ZHOU Y J, XIE Y Y, et al. ATP homeostasis and signaling in plants [J]. Plant Communications, 2024, 5(4): 100834.
- [37] SCARPULLA R C. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network [J]. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research, 2011, 1813(7): 1269-1278.
- [38] MILÓN P, MARACCI C, FILONAVA L, et al. Real-time assembly landscape of bacterial 30S translation initiation complex [J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2012, 19(6): 609-615.
- [39] LING C, ERMOLENKO D N. Initiation factor 2 stabilizes the ribosome in a semirotated conformation [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(52): 15874-15879.
- [40] HUY T X N, NGUYEN T T, REYES A W B, et al. Immunization with a combination of four recombinant *Brucella abortus* proteins Omp16, Omp19, Omp28, and L7/L12 induces T helper 1 immune response against virulent *B. abortus* 544 infection in BALB/c mice [J]. Frontiers in Veterinary Science, 2021, 7: 577026.