

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
55 (8) :1018 – 1025; 4 August 2015  
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140609

## 溶氧影响土壤杆菌 ATCC 31749 发酵生产热凝胶的蛋白质组学

戴小萌<sup>1</sup>, 杨利博<sup>1</sup>, 郑志永<sup>1\*</sup>, 陈海琴<sup>2</sup>, 詹晓北<sup>1</sup>

<sup>1</sup>糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122

<sup>2</sup>江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122

**摘要:** 【目的】土壤杆菌 (*Agrobacterium* sp.) ATCC 31749 在氮源限制条件下生物合成热凝胶是一个专性好氧过程, 在微氧和缺氧条件下, 热凝胶的合成受到严重限制。为探寻溶氧影响微生物多糖合成的代谢途径和调控机制, 本研究比较了不同溶氧条件下 (75%, 50%, 25%, 5%) 土壤杆菌发酵生产热凝胶的蛋白质组差异。【方法】利用蛋白质二维电泳技术, 分离出不同溶氧水平下土壤杆菌显著表达差异的胞内蛋白, 利用质谱 MALDI-TOF/TOF 鉴定二维电泳表达差异蛋白点, 并分析热凝胶合成过程中溶氧对相关蛋白表达的影响。【结果】在 4 个溶氧水平下成功鉴定出 15 个显著差异蛋白, 主要参与多糖合成、脂肪酸合成、氨基酸合成等途径。其中葡萄糖磷酸变位酶和乳清昔 5-磷酸脱羧酶直接参与调控热凝胶合成。【结论】溶氧可显著影响与热凝胶合成途径相关蛋白的表达, 高溶氧水平可增加热凝胶前体物质 UDP-葡萄糖的积累, 使更多的 UDP-葡萄糖用来合成热凝胶。

**关键词:** 土壤杆菌, 热凝胶, 溶氧, 蛋白质组学

**中图分类号:** Q935      **文章编号:** 0001-6209 (2015) 08-1018-08

热凝胶是一种水不溶性  $\beta$ -1,3-葡聚糖, 由土壤杆菌 (*Agrobacterium* sp.) 等微生物在氮源限制条件下好氧发酵产生<sup>[1]</sup>。其独特的流变性和热成胶性被广泛用于生产混凝土添加剂、膳食纤维、固定化载体、新型减肥食品等<sup>[2]</sup>。近几年, 随着糖生物学的迅猛发展, 热凝胶寡糖及其衍生物的制备和应用逐渐成为研究热点, 如生产药物缓释剂、高温增塑剂等<sup>[3-4]</sup>; 热凝胶硫酸化衍生物表现出的高 HIV 病毒抗性使其成为抗艾滋病病毒的备选用药之一<sup>[5]</sup>。

氧作为营养物质与信号分子在微生物生长及产物合成过程中具有重要作用。热凝胶合成是专性好氧过程, 但是由于热凝胶的水不溶性, 使多糖包裹在

菌体周围从而限制了氧气从培养环境到细菌胞内的传递过程。在微氧和缺氧条件下, 热凝胶合成受到严重限制<sup>[6]</sup>, 但微生物对氧信号的响应机制及氧如何调控热凝胶合成的机理尚未明确。土壤杆菌 (*Agrobacterium* sp.) ATCC 31749 的全基因组测序已完成<sup>[7]</sup>, 这为全面理解以土壤杆菌为模式微生物的代谢途径和细胞生理学提供了新的途径。蛋白质组学是以蛋白质组为研究对象, 大规模、系统地研究蛋白质的特征及结构, 包括蛋白质的表达水平、翻译后修饰、蛋白质间的相互作用等。应用比较蛋白质组学技术可以准确地研究微生物在环境胁迫下产生的差异表达蛋白, 从整体和动态的蛋白质水平了解微

**基金项目:** 国家自然科学基金 (31271888, 31171640); 国家科技支撑计划 (2011BAD23B04)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-510-85918299; E-mail: zhiyong@jiangnan.edu.cn

**作者简介:** 戴小萌 (1989-), 女, 山东省潍坊人, 硕士研究生, 主要从事蛋白质组学方面的研究。E-mail: dxm07222@163.com

**收稿日期:** 2014-12-23; **修回日期:** 2015-03-08

生物响应环境变化的生理机制<sup>[8]</sup>。

本研究利用蛋白质组学技术,通过研究不同溶氧水平对土壤杆菌胞内蛋白表达水平的影响,探寻在不同溶氧条件下与热凝胶合成相关的调控蛋白和酶分子表达,并分析其代谢途径及调控机理,以期初步阐明溶氧水平差异影响热凝胶合成的机理,从而为进一步提高热凝胶发酵过程中胞外多糖的合成速率提供理论依据。尽管土壤杆菌响应一些选择胁迫下(如热休克、氧化应激和弱酸条件)的蛋白质组学已有一些报道<sup>[9]</sup>,建立一个定量的动态分析土壤杆菌代谢合成途径的蛋白质组学方法尚处于早期阶段。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:** *Agrobacterium* sp. ATCC 31749, 由江南大学生化工程与生物反应器研究室保藏<sup>[10]</sup>。

**1.1.2 培养基:** 配制方法参见文献 [10]。

**1.1.3 主要试剂和仪器:** 24 cm 预制干胶条 (pH 3 - 10 NL)、CHAPS、尿素、溴酚蓝、二硫苏糖醇、碘乙酰胺、IPG 缓冲液均为 GE Healthcare Biosciences 公司产品; 7 L 机械搅拌发酵罐 (BioFlo 115) 为 New Brunswick Scientific 公司产品; Ettan IPGphor 等电聚焦仪、Ettan Daltsix 垂直电泳系统、Image Master LabScan 凝胶扫描仪均为 GE Healthcare Biosciences 公司产品; 质谱板、Ultraflex MALDI-TOF/TOF 质谱仪为 Bruker-Daltonics 公司产品。

### 1.2 培养方法

种子液制备及发酵罐分批发酵实验参照文献 [11] 方法改进如下: 采用 7 L 机械搅拌发酵罐, 装液量 3 L, 接种量 5% (V/V), 通气量 1.0 vvm, 培养温度 30 °C。菌体生长阶段控制转速 400 r/min, 自动流加 NaOH 溶液 (3 mol/L) 使 pH 恒定在 7.0, 培养 16 - 18 h。然后进入热凝胶合成阶段, 恒定 pH 在 5.6, 并通过溶氧与搅拌转速偶联 (发酵罐自动控制) 分别控制溶氧为 5%、25%、50% 和 75%。培养 20 h 时取样用于蛋白质组学分析, 此时已进入产胶期且发酵液中热凝胶多糖含量较少, 对后期蛋白提取及双向电泳分析的影响较小<sup>[11]</sup>。

### 1.3 分析方法

**1.3.1 菌体浓度和热凝胶浓度测定方法:** 参见文献 [11]。

**1.3.2 蛋白样品制备:** 收集菌体细胞, 用预冷的

Tris 缓冲液 (50 mmol/L, pH7.4) 洗涤菌体后置于液氮中充分研磨, 加入与发酵液等体积预冷的 10% (W/V) 的三氯乙酸 (TCA) - 丙酮沉淀蛋白, -20 °C 放置过夜。16000 × g 离心 20 min 取蛋白沉淀, 用预冷丙酮洗涤蛋白沉淀 3 次充分去除残留的 TCA, 将蛋白沉淀分装于 2 mL 离心管中, 低温冷冻干燥至白色粉末。每管蛋白粉末加入 1.25 mL 蛋白裂解液 [8 mol/L 尿素, 2% (W/V) CHAPS, 1% IPG 缓冲液, 0.002% 溴酚蓝, 2.8 g/L 二硫苏糖醇], 25 °C 水浴溶解蛋白 1 h, 16000 × g 离心 30 min 取上清, 并再次离心取上清, 上清即为提取的总蛋白。考马斯亮蓝法<sup>[12]</sup>测定蛋白浓度后可直接用于双向电泳或 -80 °C 保存备用。

**1.3.3 等电聚焦:** 采用 24 cm、pH3 - 10 的 NL 预制干胶条, 蛋白上样量为 550 μg, 20 °C 水化 12 - 14 h, 然后置于 Ettan IPGphor 等电聚焦仪上进行等电聚焦。聚焦程序为: 100 V Step 2 h; 250 V Step 2 h; 500 V Step 2 h; 500 - 1000 V Gradient 2 h; 1000 - 5000 V Gradient 2 h; 5000 - 10000 V Gradient 2 h; 10000 V Step 100000 Vh; 500 V 保持至结束, 聚焦完成。

**1.3.4 SDS-PAGE:** 将聚焦后的胶条分别置于 SDS 平衡缓冲液 I [50 mmol/L Tris-HCl, pH8.8, 6 mol/L 尿素, 30% (W/V) 甘油, 2% (W/V) SDS, 0.002% (W/V) 溴酚蓝, 10 mg/mL 二硫苏糖醇] 和平衡缓冲液 II (成分同平衡缓冲液 I, 将二硫苏糖醇换为 25 mg/mL 碘乙酰胺) 中平衡 15 min 后进行第二向电泳。配制 12.5% 的聚丙烯酰胺凝胶, 使用 Ettan Daltsix 垂直电泳系统, 恒定功率 2 W/胶条, 电泳 45 - 60 min, 然后切换功率为 14 W/胶条, 电泳 4 - 5 h, 待溴酚蓝指示剂到达凝胶底部时终止电泳。将二向凝胶用蛋白固定液 [甲醇: 乙酸 = 4: 1 (V/V)] 固定 1 h, 然后用考马斯亮蓝 G250<sup>[13]</sup> 染色过夜。

**1.3.5 图像扫描与数据分析:** 将染色后的凝胶置于扫描仪 Image Master LabScan 上进行扫描, 分辨率为 300 dpi, 并利用 PDQuest 8.0 软件分析双向电泳图谱。

**1.3.6 质谱 (MALDI-TOF/TOF) 和数据库检索:** 将凝胶上选定的差异蛋白点手工切取, 用 100 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> /30% 乙腈脱色, 再用乙腈脱水 2 次, 得到的白色胶粒, 加入适量 10 ng/μL 胰蛋白酶溶液, 在 4 °C 下溶胀 60 min, 然后加入 25 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 缓冲液 (pH8.0) 于 37 °C 水浴酶解 20 h, 吸出酶解液真空浓缩至 3 μL, 取 1 μL 点样于质谱

板后置于 Ultraflex MALDI-TOF/TOF 质谱仪上分析。在 Mascot 网站 (<http://www.matrixscience.com>) 检索蛋白点的肽数据, 数据库为 NCBI nr。

## 2 结果和分析

### 2.1 不同溶氧水平下热凝胶发酵过程特性

分别对土壤杆菌在 4 个不同溶氧水平下发酵

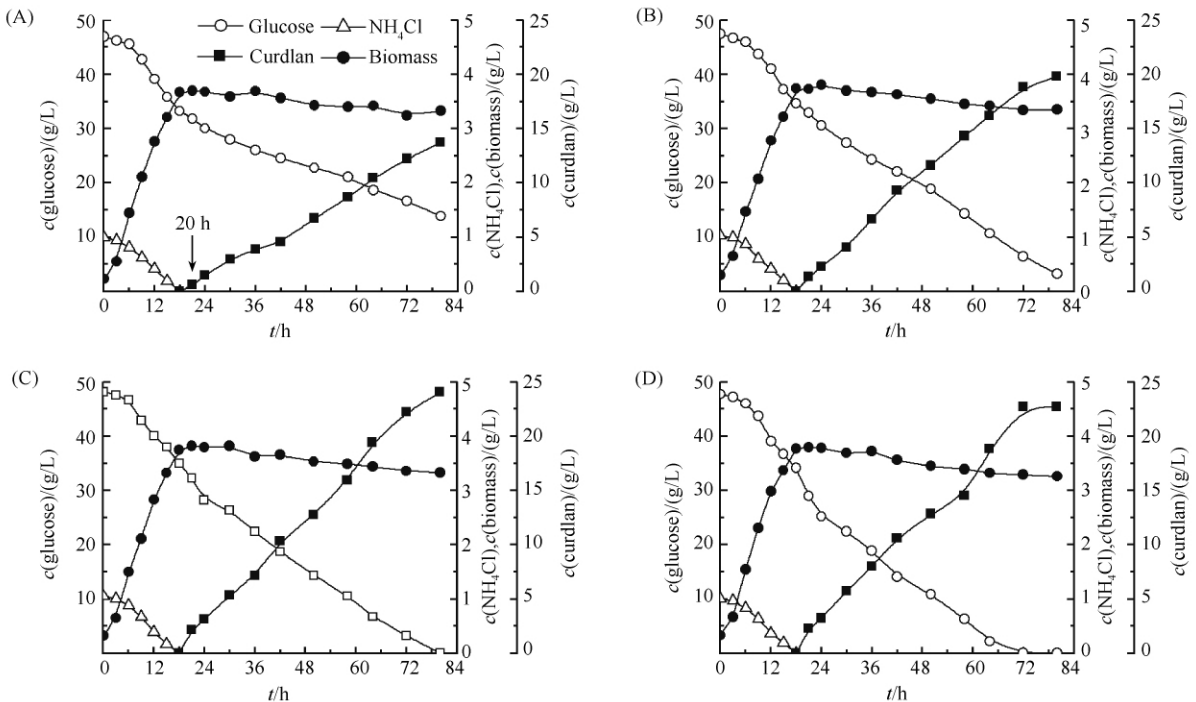


图 1. 不同溶氧条件下热凝胶发酵过程曲线

Figure 1. Fermentation processes under various dissolved oxygen levels. A: DO 5%; B: DO 25%; C: DO 50%; D: DO 75%.

当 DO 为 5% 时, 热凝胶产量最低。但是热凝胶的合成是一个专性好氧过程, 缺氧会使热凝胶的合成速率低下, 导致热凝胶合成量较少。随着溶氧水平的提高, 由于细胞利用高效的呼吸链产能, 胞内酶活也相应提高, 胞内的代谢活动旺盛, 凝胶的产量也随之增加。

### 2.2 不同溶氧条件下土壤杆菌胞内总蛋白的二维电泳图谱

图 2 为 4 种溶氧水平下的菌体胞内蛋白 2-DE 图谱, 经 PDQuest 8.0.1 软件分析, 每块凝胶可检测到 750 个左右的可识别蛋白点。比较 4 个溶氧水平下的蛋白样品图谱, 发现有 112 个蛋白点超过 1.5 倍的表达差异, 但大多数的低丰度的蛋白点表达量太低不能鉴定出。对其中表达差异显著且表达量较

产热凝胶的特性进行了比较。为确保菌体进入产胶期时具有相同的生物量, 菌体生长期 (0 - 16 h) 采用了相同的发酵条件。比较图 1 可见, 尽管发酵结束时 (80 h) 的生物量水平相近, 但不同溶氧条件下热凝胶的产量存在明显差异, 在一定溶氧范围内 (从 5% 到 50%), DO 值越高, 产胶量越高, 生产强度也相应提高, 产胶过程中葡萄糖消耗量也增多。

高的 15 个差异点进行质谱鉴定, 质谱鉴定结果总结于表 1, 并将这些差异蛋白点标注在 2-DE 凝胶上 (图 2-A)。部分差异蛋白点的局部放大图见图 3。生物信息学分析发现, 这些蛋白主要与多糖合成途径、能量代谢、脂肪酸合成、氨基酸合成、应激反应及氧化还原等功能相关。

## 3 讨论

### 3.1 溶氧对热凝胶合成途径相关蛋白的影响

UDP-葡萄糖是合成热凝胶的重要前体物质, 也是合成大多数多糖的前体物质<sup>[14]</sup>。葡萄糖磷酸变位酶 (图 3, 点 1) 催化葡萄糖-6-磷酸为葡萄糖-1-磷酸, 葡萄糖-1-磷酸可进一步合成 UDP-葡萄糖, 用于

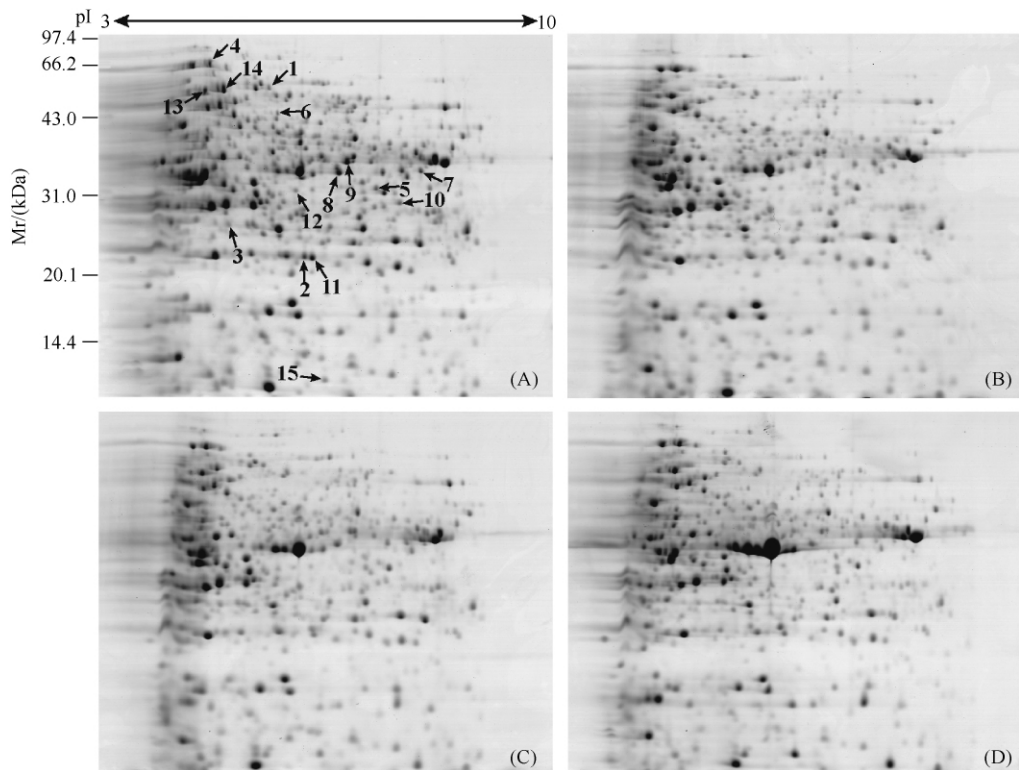


图 2. 不同溶氧水平下土壤杆菌 ATCC 31749 菌体总蛋白 2-DE 图谱

Figure 2. Two-dimensional gel electrophoresis maps of *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 proteins under various dissolved oxygen levels. A: DO 75%; B: DO 50%; C: DO 25%; D: DO 5%.

热凝胶的合成。糖核苷酸是多糖合成的糖基供体,核苷酸在糖核苷酸合成中起重要作用<sup>[15]</sup>。乳清苷 5-磷酸脱羧酶(图 3,点 3)涉及核苷酸的生物合成,催化 OMP(乳清苷一磷酸)合成 UMP(鸟苷一磷酸)。UMP 是合成 UTP 和 UDP-葡萄糖的关键前体<sup>[5,14]</sup>。本研究中,在 DO 5%–50% 内,随着溶氧水平的提高,葡萄糖磷酸变位酶和乳清苷 5-磷酸脱羧酶的表达量也逐渐提高,UDP-葡萄糖也随之积累,从而导致热凝胶生物合成途径代谢通量的增加。在 DO 75% 水平下,上述两个酶的表达量均降低,减少了 UDP-葡萄糖的积累量,但同时,用于分解 UDP-葡萄糖的 5'-核苷酸酶(图 3,点 4)的表达量显著降低,从而使 UDP-葡萄糖的积累量得以补偿,这可能是导致热凝胶产量与 DO 50% 相近的原因。

泛醌-细胞色素 C 还原酶(图 3,点 2)是电子传递链复合物 III 的重要组成部分,在好氧呼吸和 ATP 合成中起关键作用。溶氧愈充分,该酶的表达水平愈高,两者呈现直接正相关关系。细胞生

长、代谢维持和热凝胶合成均需要好氧呼吸活动的参与,保持较高的溶氧水平对热凝胶合成过程是必要的<sup>[16]</sup>,但并不意味着溶氧越高就越有利于其合成。该酶的表达量在 DO 75% 水平下,是 DO 50% 的 1.51 倍,但此时热凝胶合成量与 DO 50% 相近,推测可能原因是此时 ATP 已不是热凝胶合成的限制性因素,或存在其它因素共同影响产物的合成过程。

在氮限制的条件下,多糖合成与脂质载体的作用密切相关<sup>[14]</sup>。乙酰辅酶 A 羧化酶亚基  $\alpha$ (图 3,点 5)是乙酰辅酶 A 羧化酶的组成部分,在脂肪酸合成中起调控作用。3-氧酰基-酰基载体蛋白合酶 fabF(图 3,点 6)是脂肪酸合成途径的重要蛋白,主要功能是调节长链脂肪酸的碳链延伸,而多糖合成的起始过程与酰基载体相关。本研究中,在 DO 5% 水平下未检测到 3-氧酰基-酰基载体蛋白合酶,而在溶氧达到一定水平之后( $\geq 25%$ ),该酶的表达水平显著升高,表明该酶对溶氧比较敏感。

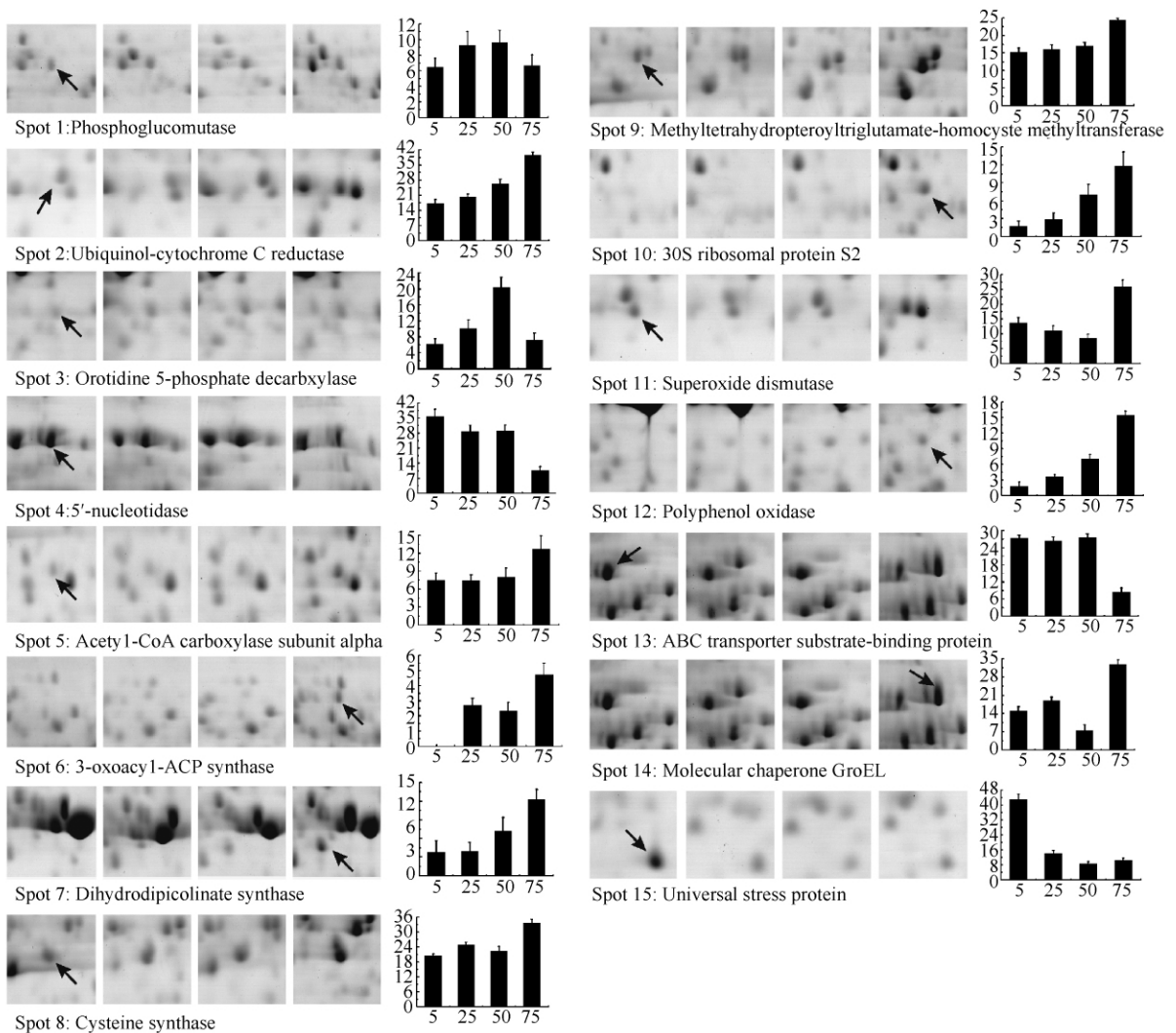


图 3. 不同溶氧水平下土壤杆菌 ATCC 31749 差异蛋白点 2-DE 局部放大图

Figure 3. Close-up views of 2-DE maps of *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 proteins under various dissolved oxygen levels. Graphs showed the normalized amount of each protein spot under DO 5%, 25%, 50%, 75%, respectively.

表 1. 差异蛋白鉴定结果

Table 1. Identification of 15 differentially expressed protein spots

No.	Accession number	Protein name	pI	MW (kDa)	Score <sup>a</sup>	Protein levels ratio <sup>b</sup>			
						5%	25%	50%	75%
1	gi1493357229	Phosphoglucomutase	5.30	57.80	272	0.70	0.95	1.00	0.72
2	gi1493354565	Ubiquinol-cytochrome C reductase	5.68	20.56	373	0.65	0.77	1.00	1.51
3	gi120139402	Orotidine 5-phosphatedecarboxylase	5.18	25.05	156	0.30	0.49	1.00	0.35
4	gi1493356896	5'-Nucleotidase	5.10	67.10	459	1.24	0.99	1.00	0.36
5	gi1493353713	Acetyl-CoA carboxylase subunit alpha	5.95	34.58	370	0.93	0.92	1.00	1.58
6	gi1489592373	3-oxoacyl-ACP synthase	5.28	42.53	120	-	1.16	1.00	2.02
7	gi1489592515	Dihydrodipicolinate synthase	6.00	31.32	291	0.53	0.58	1.00	1.72
8	gi1493353511	Cysteine synthase	5.68	33.60	559	0.91	1.11	1.00	1.53
9	gi1493356829	5-Methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	5.60	38.46	440	0.90	0.94	1.00	1.44
10	gi1489591797	30S ribosomal protein S2	6.01	28.32	368	0.25	0.41	1.00	1.69
11	gi1489604878	Superoxide dismutase	5.69	22.60	488	1.62	1.31	1.00	3.07
12	gi1493354517	Polyphenol oxidase	5.49	28.86	504	0.25	0.51	1.00	2.21
13	gi1493359515	ABC transporter substrate-binding protein	5.08	58.80	471	0.99	0.95	1.00	0.31
14	gi1493356595	Molecular chaperone GroEL	5.08	57.64	669	1.99	2.51	1.00	4.34
15	gi1493360145	Universal stress protein	5.62	14.84	274	5.01	1.66	1.00	1.22

<sup>a</sup>: The scores >60 indicate identity or extensive homology ( $p < 0.05$ ). <sup>b</sup>: Protein expression level under each dissolved oxygen level compared with DO 50%. Expression level under DO 50% was set at 1.00.

### 3.2 溶氧对细胞合成相关蛋白的影响

二氢吡啶二羧酸合成酶 DapA (图 3, 点 7) 是赖氨酸合成途径的关键酶, 在消耗 ATP 及 NAD(P)H 的情况下催化底物二氨基庚二酸 (DAP) 合成赖氨酸。DAP 不仅作为细菌合成赖氨酸的重要前体物质, 还是细胞壁肽聚糖的重要组成成分。从图 3 和表 1 可以看出, 溶氧水平与 DapA 的表达水平呈现比较明显的正相关性, 这表明改变溶氧条件会影响到细菌体内蛋白质的合成过程。

半胱氨酸广泛存在于生物体内, 且具有一系列的生理功能, 主要包括合成铁硫簇, 含硫化合物及谷胱甘肽, 并可调节催化蛋白质的活性、结构及稳定性。半胱氨酸在细胞增殖、附着及抗环境胁迫方面也具有重要作用<sup>[17]</sup>。在氧化胁迫下, 还原剂谷胱甘肽需要大量合成用以抵御氧化破坏。因此, 作为合成谷胱甘肽的前体物质, 半胱氨酸在半胱氨酸合成酶 (图 3, 点 8) 的诱导下被合成。本研究中该酶在 DO 75% 水平下的表达量显著增加, 这与 *Mycobacterium tuberculosis* 在氧化胁迫下半胱氨酸合成酶显著上调结果基本一致<sup>[18]</sup>。*met6* 基因编码 5-甲基四氢蝶酰三谷氨酸-高半胱氨酸甲基转移酶 (图 3, 点 9), 催化甲基基团从 5-甲基四氢叶酸转移到同型半胱氨酸, 形成甲基蛋氨酸<sup>[19]</sup>。本研究中, 该蛋白的表达趋势与半胱氨酸合成酶类似, 在 DO 75% 水平下的表达量有所上升, 这与两者调节细胞内氧化还原平衡的功能相符合。

30S 核糖体蛋白 S2 (图 3, 点 10) 参与翻译起始复合物的形成, 在限氧和限制氮源的情况下, 核糖体蛋白 S1 的表达量会降低<sup>[20]</sup>。本研究中, 该蛋白的表达量随溶氧水平的增加而增加, 受溶氧水平变化的影响显著。其表达趋势与二氢吡啶二羧酸合成酶 DapA 相似, 两者都与蛋白质的合成过程密切相关。

### 3.3 溶氧对胁迫响应蛋白的影响

超氧化物歧化酶 SOD (图 3, 点 11) 和多酚氧化酶 PPO (图 3, 点 12) 都是重要的抗氧化胁迫响应蛋白, 保护细胞免于氧化破坏。ATP 结合盒转运蛋白 (图 3, 点 13) 和分子伴侣 GroEL (图 3, 点 14) 是协助多种底物跨膜转运、帮助蛋白质正确折叠所必须的。其中分子伴侣通过阻止蛋白发生不可逆的变性, 可增强细胞在胁迫条件下的生存能力, 并促进未折叠多肽的再折叠和正确组装<sup>[21]</sup>。通用应激蛋白 USP

(图 3, 点 15) 是一类小分子胞质蛋白, 在环境胁迫刺激下, 其表达水平显著增加<sup>[22]</sup>。它在维持细胞生长停滞时的生存具有重要作用, 但 USP 的确切生理功能尚未明确。已有研究报道, UspA 和 UspD 在提升大肠杆菌抵抗氧化胁迫 (如 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、超氧化物) 方面具有重要作用<sup>[23]</sup>。本研究中, DO 处于较高水平 (≥25%) 时, USP 的表达水平受溶氧水平的影响较小, 而受低溶氧 (5%) 条件的影响更为显著, 推测原因是: 土壤杆菌在产胶期需要较多能量以支撑热凝胶合成和维持细胞活性, 但较低的溶氧水平不利于微生物快速产生能量, 而 USP 在维持细胞生长停滞时的细胞活性方面具有重要作用, 因此 USP 可能在低氧情况下被诱导激活, 蛋白表达量显著增加。

本研究利用双向电泳技术结合质谱鉴定和生物信息学方法, 初步分析了溶氧影响土壤杆菌发酵生产热凝胶过程的蛋白质组学。完成鉴定的蛋白主要涉及胞外多糖合成、能量代谢、脂肪酸合成、氨基酸合成、应激反应及氧化还原等功能, 其中葡萄糖磷酸变位酶和乳清昔 5-磷酸脱羧酶直接参与热凝胶合成途径。通过研究溶氧对土壤杆菌产热凝胶影响的蛋白组学研究, 有助于进一步认识土壤杆菌的生理生化过程, 理解多糖合成过程中微生物对氧信号的响应和调控过程, 提高微生物利用氧的效率, 强化微生物多糖的发酵生产水平。

### 参考文献

- [1] Zhan XB, Lin CC, Zhang HT. Recent advances in curdlan biosynthesis, biotechnological production and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 93 (2): 525-531.
- [2] Harada T. Production, properties, and application of curdlan. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 1997: 265-283.
- [3] Kanke M, Tanabe E, Katayama H, Koda Y, Yoshitomi H. Application of curdlan to controlled drug-delivery 3 drug-release from sustained-release suppositories *in vitro*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 1995, 18 (8): 1154-1158.
- [4] Haze A, Yamamoto Y, Miyahara K. Preparation of a segregation-reducing agent for hydraulic composition. *European Patent*, 1994, 588665.
- [5] McIntosh M, Stone BA, Stanisich VA. Curdlan and other

- bacterial (1→3)-β-D-glucans. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 68 (2) : 163-173.
- [6] Zhang HT, Zhan XB, Zheng ZY, Wu JR, Yu XB, Jiang Y, Lin CC. Sequence and transcriptional analysis of the genes responsible for curdlan biosynthesis in *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 under simulated dissolved oxygen gradients conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 91 (1) : 163-175.
- [7] Ruffing AM, Castro-Melchor M, Hu WS, Chen RR. Genome sequence of the curdlan-producing *Agrobacterium* sp. strain ATCC 31749. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193 (16) : 4294-4295.
- [8] Shu LB, Ding W, Wu JH, Feng FJ, Luo LJ, Mei HM. Proteomic analysis of rice leaves shows the different regulations to osmotic stress and stress signals. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2010, 52 (11) : 981-995.
- [9] Rosen R, Ron EZ. Proteomics of a plant pathogen: *Agrobacterium tumefaciens*. *Proteomics*, 2011, 11 (15) : 3134-3142.
- [10] Zheng ZY, Jiang Y, Zhan XB, Ma LW, Wu JR, Zhang LM, Lin CC. An increase of curdlan productivity by integration of carbon/nitrogen sources control and sequencing dual fed-batch fermentors operation. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2014, 50 (1) : 35-42.
- [11] Yu LJ, Wu JR, Zheng ZZ, Lin CC, Zhan XB. Changes in gene transcription and protein expression involved in the response of *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 to nitrogen availability during curdlan production. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2011, 47 (5) : 487-493.
- [12] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72 (1-2) : 248-254.
- [13] Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 2004, 25 (9) : 1327-1333.
- [14] Kim MK, Lee IY, Ko JH, Rhee YH, Park YH. Higher intracellular levels of uridinemonomophosphate under nitrogen-limited conditions enhance metabolic flux of curdlan synthesis in *Agrobacterium* species. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, 62 (3) : 317-323.
- [15] Jin LH, Um HJ, Yin C, Kim YH, Lee JH. Proteomic analysis of curdlan-producing *Agrobacterium* sp. in response to pH downshift. *Journal of Biotechnology*, 2008, 138 (3/4) : 80-87.
- [16] Zheng ZY, Lee AW, Zhan XB, Shi ZP, Wang L, Zhu L, Wu JR, Lin CC. Effect of metabolic structures and energy requirements on curdlan production by *Alcaligenes faecalis*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2007, 12 (4) : 359-365.
- [17] Husain A, Sato D, Jeelani G, Suematsu M, Soga T, Nozaki T. Metabolome analysis revealed increase in S-methylcysteine and phosphatidylisopropanolamine synthesis upon L-Cysteine deprivation in the anaerobic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285 (50) : 39160-39170.
- [18] O'Leary SE, Jurgenson CT, Ealick SE, Begley TP. O-phospho-L-serine and the thiocarboxylated sulfur carrier protein CysO-COSH are substrates for CysM, a cysteine synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry*, 2008, 47 (44) : 11606-11615.
- [19] Masselot M, De Robichon-Szulmajster H. Methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Genetical analysis of auxotrophic mutants. *Molecular & General Genetics (MGG)*, 1975, 139 (2) : 121-132.
- [20] Al Dahouk S, Loisel-Meyer S, Scholz HC, Tomaso H, Kersten M, Harder A, Neubauer H, Köhler S, Jubier-Maurin V. Proteomic analysis of *Brucella suis* under oxygen deficiency reveals flexibility in adaptive expression of various pathways. *Proteomics*, 2009, 9 (11) : 3011-3021.
- [21] Dihazi H, Asif AR, Agarwal NK, Doncheva Y, Müller GA. Proteomic analysis of cellular response to osmotic stress in thick ascending limb of Henle's loop (TALH) cells. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2005, 4 (10) : 1445-1458.
- [22] Nystrom T, Neidhardt FC. Expression and role of the universal stress protein, USPA, of *Escherichia coli* during growth arrest. *Molecular Microbiology*, 1994, 11 (3) : 537-544.
- [23] Nachin L, Nannmark U, Nystrom T. Differential roles of the universal stress proteins of *Escherichia coli* in oxidative stress resistance, adhesion, and motility. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187 (18) : 6265-6272.

# Proteomic analysis of curdlan-producing *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 in response to dissolved oxygen

Xiaomeng Dai<sup>1</sup>, Libo Yang<sup>1</sup>, Zhiyong Zheng<sup>1\*</sup>, Haiqin Chen<sup>2</sup>, Xiaobei Zhan<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

<sup>2</sup> School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

**Abstract:** [Objective] Curdlan is produced by *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 under nitrogen limiting condition. The biosynthesis of curdlan is a typical aerobic bioprocess, and the production of curdlan would be severely restricted under micro-aerobic and anoxic conditions. Proteomic analysis of *Agrobacterium* sp. was conducted to investigate the effect of dissolved oxygen on the crucial enzymes involved in curdlan biosynthesis. [Methods] Two-dimensional gel electrophoresis was performed to separate and visualize the differential expression of the intracellular proteins extracted from *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 cultured under various dissolved oxygen levels (75%, 50%, 25% and 5%). In addition, a comparative proteomic analysis of the intracellular proteins expression level under various dissolved oxygen levels was done. Significant differently expressed proteins were identified by MALDI-TOF/TOF. [Results] Finally, we identified 15 differently expressed proteins involved in polysaccharide synthesis, fatty acid synthesis, amino acid synthesis pathway. Among these proteins, phosphoglucomutase and orotidine 5-phosphate decarboxylase were the key metabolic enzymes directing curdlan biosynthesis. [Conclusion] Oxygen could affect the expression of the proteins taking charge of curdlan synthesis significantly.

**Keywords:** *Agrobacterium* sp., curdlan, dissolved oxygen, proteomics

(本文责编:李磊,王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31271888, 31171640) and by the National Key Technologies R&D Program (2011BAD23B04)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85918299; E-mail: zhiyong@jiangnan.edu.cn

Received: 23 December 2015 / Revised: 8 March 2015