

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(6):725-731; 4 June 2011
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

普鲁兰酶及其分泌相关蛋白的研究进展

姜楠, 宋谈, 王萍

中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

摘要:普鲁兰酶对于以淀粉为原料的食品加工以及生物能源等工业具有重要的作用。近年来对于该工业酶的开发已经不仅仅停留于简单的新菌种筛选过程, 为了完成菌株的分子改造从而提高产量以及酶学性质, 对其编码基因的调控及其分泌等相关蛋白的研究则显得尤为重要。本文对这一内容的研究进展进行了系统的综述。

关键词:普鲁兰酶, 分泌, 蛋白质相互作用

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011)06-0725-07

大部分淀粉原料含有 75% - 85% 的支链淀粉, 支链淀粉中含有 4 - 5% 的 α -1,6-糖苷键。因此, 研究开发去分枝酶-普鲁兰酶是工业上降低生产成本、提高效益的有效途径。普鲁兰酶 (EC 3.2.1.41) 属于淀粉水解酶, 可水解普鲁兰糖、支链淀粉、葡聚糖以及支链淀粉/葡聚糖中 α/β -极限糊精内的 (1 \rightarrow 6)- α -D-糖苷键。与 α -淀粉酶、 β -淀粉酶或葡糖淀粉酶共同作用水解淀粉支链, 产生小分子量的糖^[2], 广泛应用于以淀粉为原料的食品深加工和生物质能源等工业部门。根据水解的糖苷键差异分为 I 型 (专一性水解普鲁兰的 α -1,6-糖苷键) 和 II 型 (可水解普鲁兰的 α -1,6-糖苷键以及其他多聚糖的 α -1,4-糖苷键) 两种^[1-2]。

1943 年 Myrback 首次对普鲁兰酶进行报道^[3]。1961 年 Bender 和 Wallenfels 通过产气气杆菌 *Klebsiella aerogenes* (开始称为 *Aerobacter aerogenes*) 发酵获得该酶, 掀起了开发热潮^[1]。普鲁兰酶主要来源于植物和微生物, 前者被称为 R-酶。迄今为止,

已经发现许多微生物可产生普鲁兰酶, 主要包括 *Bacillus cereus* Var. *mycoides*, *Bacillus acidopullulyticus*, *Bacillus subtilis* 和 *Clostridium Thermosulfurogenes* 等棒杆菌^[1]; 随后, 人们意识到在通常的自然条件下, 很难筛选到极端的产酶菌种, 便逐渐把目光转移到温泉嗜热细菌, 并获得了较多的成果, 如 *Bacillus flavorcaldarius*, *Thermotoga maritima*, *Fenidobacterion pernnavoran* 和 *Thermococcus hydrothermalis* 等^[4]。不同菌种产生的普鲁兰酶具有必然有着不尽相同的酶学特性, 包括最适作用温度、pH, 酸碱稳定性, 温度稳定性, 金属离子影响, 甚至分子量等。

普鲁兰酶的定位、遗传控制等在国外有一定的研究, *Klebsiella pneumonia* 全基因组测序的完成对普鲁兰酶调控以及转运等领域提供了新的依据^[5-6]。本文主要综述了普鲁兰酶的基因与结构, 及其分泌相关蛋白在分子水平的研究内容, 为优良菌种的改造与开发提供了理论依据, 从而利于工业化应用。

基金项目: 中国科学院生物制造重要方向性项目 (KSCXZ-YW-G-075-21)

作者简介: 姜楠 (1982 -), 女, 天津市人, 助理研究员, 博士, 主要从事基因组学暨分子生物学相关领域的研究。Tel: +86-22-84861991; E-mail: jiangnan82@yahoo.cn

收稿日期: 2010-10-09; **修回日期:** 2011-01-05

1 普鲁兰酶

1.1 普鲁兰酶的结构基因

许多细菌和古菌的整个细胞循环均可以检测到普鲁兰酶活性,并且当麦芽糖或者淀粉存在时呈上调趋势^[7]。早在1983年,Cornelis P等人将*K. pneumoniae* (ATCC 15050)普鲁兰酶的编码基因克隆至 λ 噬菌体,长度约为6.1 kb^[8]。1985年,Michaelis S等人实验确定了该基因的完整性,即包含普鲁兰酶结构基因的编码区和启动子区;并指出基因的表达受到malT控制^[9-10]。Chapon C等人又通过系列缺失互补实验对该基因序列进行功能性分析,确定其开放阅读框长度约为3.8kb,编码一个约145KDa的蛋白^[10]。在预测的氨基酸序列中发现,起始的19个氨基酸残基具有典型细菌脂蛋白前体信号序列的特征^[10]。Pugsley AP等人通过同位素特异性标记等实验,证实普鲁兰酶确为脂蛋白:首先合成带有fMet-Leu-Arg-Try-Thr-Cys-Asn-Ala-Leu-Phe-Leu-Gly-Ser-Leu-Ile-Leu-Leu-Ser-Gly信号肽的前体蛋白,其后的半胱氨酸氨基与甘油酯共价结合形成脂酰基,当信号序列被切割后该半胱氨酸成为蛋白质的氨基端^[11]。

本实验室也对高温热泉土壤进行菌种的筛选,获得了5株耐热普鲁兰酶高产菌株,并对其结构基因进行克隆与分析,期望获得更为广泛有效的应用价值。

1.2 普鲁兰酶的结构

不同微生物来源的普鲁兰酶大小略有差异,从76-85 kDa不等,个别大于150kDa。但都含有几个保守区包括细菌普鲁兰酶相关区域、普鲁兰酶N-端区域以及 α -淀粉酶亚家族等,使形成特定的空间结构以行使其水解功能^[12]。

2006年,日本科学家Bunzo Mikami等人用SPring-8同步加速器辐射源和多对同晶置换法测定了普鲁兰酶的晶体结构,诠释了结构与功能的关系^[13]。普鲁兰酶蛋白的尺寸为102 Å × 65 Å × 71 Å,共分为5个区域:具有流动性的N1区(39-172氨基酸),含有8个反向平行的 β -折叠以及一个 α -螺旋,其中存在1个钙结合位点以及特异性的碳水化合物结合位点;N2区为蛋白的N-末端(32-38氨基酸)以及第173-287氨基酸残基,含有双 β -折叠

结构和 α -螺旋,与N1区的 α -螺旋相互衔接,构成普鲁兰酶特征性的结构域;N3区(288-395氨基酸);A区(396-966氨基酸),靠近普鲁兰酶的活性中心,环以及与N2区的交界处分别含有3个钙离子结合位点;C区(967-1083氨基酸),含有双 β -折叠结构以及 α -螺旋,在靠近A区交界处含有1个钙离子结合位点。其中,N1、N2和A结构域围成一个直径为25 Å的环,面向A区域的活性中心以及N1区域的碳水化合物结合位点。除了N1区以外,其余4个结构域通过氢键和范德华作用力紧密结合,N2与N3、N2与A、N3与A及A与C间分别存在10、8、6和15个氢键,形成了稳定的空间结构。此外,*Streptococcus*和*Bacillus subtilis*等菌株产生的普鲁兰酶也进行了晶体结构的分析^[14-16],能够清晰的了解普鲁兰酶的结构及其功能在菌株之间存在较高的相似性。

2 普鲁兰酶的定位与分泌

2.1 普鲁兰酶的定位

大多数革兰氏阴性菌主要将蛋白质分泌到周质空间,其水解酶与外膜结合或者分泌到细胞外,能够水解环境中的大分子底物,反应产物被转运至细胞质以供细胞利用。1970年,Bender从*K. pneumoniae*中分离获得了普鲁兰酶-脂多糖-磷脂复合物,首次提出了普鲁兰酶与外膜相连接的定位假说^[17]。1976年,Wober G将其划归为分支 α -葡聚糖水解酶的成员^[18]。随后,Brandt CJ等人发现蛋白酶可以将与细胞结合的普鲁兰酶释放到胞外,Wohner G和Wober G在细胞外膜组分中检测到普鲁兰酶的存在^[19-20]。换句话说,*Klebsiella*在可溶性淀粉上生长到对数期,在细胞边缘产生普鲁兰酶,作用于环境中与外膜相接触的大分子底物,从而参与分支 α -葡聚糖的利用。d'Enfert C等人通过蛋白酶底物可及性和免疫荧光实验证实普鲁兰酶的确位于外膜外表面,此外还检测出的确存在胞质可溶性的以及胞外游离的普鲁兰酶^[21]。

2.2 普鲁兰酶的分泌

普鲁兰酶主要通过共价结合在细胞表面聚集,这一现象不利于工业化生产与纯化,因此对普鲁兰酶转运与分泌的研究势在必行。到目前为止,已经鉴定出15个基因与普鲁兰酶的分泌相关,分别为

pulS, *pulB*, *pulC*, *pulD*, *pulE*, *pulF*, *pulG*, *pulH*, *pulI*, *pulJ*, *pulK*, *pulL*, *pulM*, *pulN* 和 *pulO*。构建一条庞大的信号通路进行严格的调控, 从而阻止胞内蛋白质的外泄以及外周环境中毒性分子进入细胞。双向活动门操控能够同时完成对转运蛋白明确的识别以及普鲁兰酶转运复合物的形成: 在特定的时间面向胞质开启, 允许普鲁兰酶进入形成复合物; 或向外界开启, 完成普鲁兰酶的分泌^[22]。这种从一种状态向另一状态的转换必定涉及构象的改变甚至整个通路复合物全盘改变, 并可能伴随能量的转换^[22]。这种复杂性可能还与普鲁兰酶折叠后再转运相关^[22]。

1997年, Pugsley AP 等人提出 *Klebsiella* 普鲁兰酶转运模型(图1)^[22]。细胞质内的 SecB 蛋白识别普鲁兰酶前体并与其结合, 起始了普鲁兰酶的分泌, 这一过程可能与蛋白质的翻译同时发生。随后, SecB 与 SecA 蛋白结合, 后者可以介导识别细胞质膜(CM)上其他 Sec 蛋白组成的转运因子结合复合物。再经过脂蛋白信号肽酶(LspA)的加工, 以及二酯酰甘油脂肪酰氨基转移酶的作用发生脂酰化, 成熟的普鲁兰酶暂时锚定于细胞外表面, 可能是细胞质膜或相关的亚结构域。如果不存在其他分泌相关的组分, 普鲁兰酶会始终保持在这一过渡位置。在转运过程中或转运完成很短时间内, 二硫键氧化还原

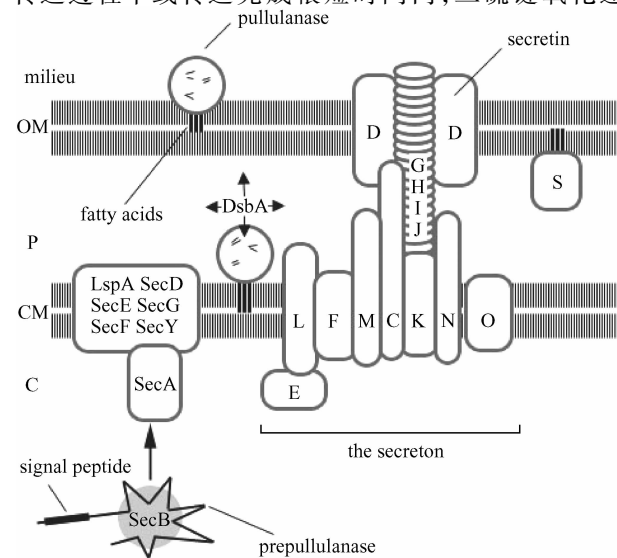


图1 普鲁兰酶分泌不同阶段以及分泌复合物不同组分间的相互作用模型^[22]。

Fig. 1 Model representing secretion of pullulanase through different stages of the GSP and possible interactions between components of the secretin^[22].

原酶(DsbA)在普鲁兰酶多肽中催化产生1个或更多跨膜二硫键, 然后便进入第2阶段, 多数组分构成一个大的复合物。在分泌过程的最后, 普鲁兰酶被锚定于细胞表面。

3 分泌复合物重要组分

3.1 PulC

1985年, Chapon C 等人发现, 在 *pul* 基因中, 存在一个方向与 *pulA* 的启动子相反, 依赖 *MalT* 的启动子, 将其产物称为 *malX*^[10]。1989年, d'Enfert 等人发现该蛋白与普鲁兰酶分泌相关, 并将该未知基因重新命名为 *pulC*^[25]。在其N-端第28-46氨基酸残基之间存在1个功能性的疏水区, 推测除该区域跨过细胞内膜, 其余部分存在于外周胞质中^[26]。且外周胞质部分与普鲁兰酶(PulA)信号肽起始的4个氨基酸相融合, 认为PulC锚定于细胞质膜周质一侧是具有功能的^[28]。尽管PulC蛋白主要存在于细胞内膜, 在外膜蛋白组分中也发现少量的PulC, 说明PulC可能与外膜蛋白聚集或存在某些相互作用, 如与PulD蛋白存在化学交联等, 参与能量的转运, 形成内外膜之间的桥梁^[26-28]。

3.2 PulD(分泌素)和PulS

对成熟PulD蛋白质序列分析发现, 含有7组12个氨基酸残基重复的伸展区, 从而形成牢固的两性 β 折叠(分别为56-77, 309-320, 335-346, 452-463, 484-495, 498-509和518-529氨基酸残基区域), 主要在于外膜^[26]。然而, 仅有很短的肽链跨过外膜内部, 其余部分可能延伸至外膜双分子层边界外, 形成集中的紧密通道, 穿过周质空间一侧的肽聚糖以及脂多糖和荚膜层, 与分泌复合物中其他组分相互作用^[26]。此外, 在内膜组分中也发现该蛋白的存在; 由于PulD氨基酸序列不含有零电荷且高度疏水等内膜锚定区域, 推测可能因为外膜潜在的插入位点饱和, 导致PulD与分泌途经中其他完整内膜蛋白组分结合或聚集, 从而相互作用产生间接联系^[26, 29]。

1989年, d'Enfert 和 Pugsley AP 通过对普鲁兰酶分泌突变株的分析, 在 *pulA* 上游发现了分泌所必须的、并且独立存在的转录单元 *pulS*, 编码一个12kDa 外膜脂蛋白。与分泌素PulD的C-端65氨基酸残基结合, 阻止蛋白酶的水解作用, 保护其完整

性,同时涉及 PulD 在外膜的正确定位,从而保证蛋白质分泌的效率^[32]。

当 PulS 处于低水平时,PulD 则以单体的形式存在于细胞内膜;PulS 诱导 PulD 在细胞外膜形成对 SDS 敏感的十二聚体,当 PulD 正确组装至外膜后,以 PulD-PulS 复合物的形式存在,形成普鲁兰酶分泌复合物的通道^[29-31, 33]。PulD-PulS 复合物中空圆筒状辐射结构,两者摩尔比为 1:1,在脂双分子层形成通道,内侧可能与待分泌的普鲁兰酶形成对接位点^[31-33]。此外,PulD 的 C-端产生的塞子结构,既可保证复合物与周边建立很好的联系,同时阻断普鲁兰酶的分泌^[29]。由此可以看出,PulD 多聚体复合物对该分泌系统十分重要。

3.3 PulG

假菌毛 PulG 是普鲁兰酶分泌系统重要的组分,其前体 N-端 25 个氨基酸是疏水性的,与 IV 型菌毛蛋白相应区域非常相似^[35]。前体在细胞内膜聚集,均匀分布,可以在周质空间延长收缩,作为动力活塞启动普鲁兰酶的分泌。PulG 表达量较大,蛋白的 N-端疏水区存在信号肽切割点(VLA)^[21]。信号识别颗粒(SRP)与 Sec 转运酶作用于 PulG 前体 N-端跨膜处下游的高疏水性信号肽,启动转运,将未组装的 PulG 锚定至细胞内膜。随后,通过高保守性的启动子相邻信号序列间精确的相互作用促使亚基组装至假菌毛^[34],N-端有长的 α -螺旋和 4 个 β -片层结构^[35]。根据“正电荷居内的规则”,PulG 前体带正电荷 N-端的信号序列和酶切割位点面向胞质,而 C-端球状区域在周质空间,可被二硫键氧化还原酶(DsbA)催化形成分子内二硫键^[34]。

3.4 PulE

Klebsiella 的 *pulE* 基因编码 1 个 55kDa 的核酸结合蛋白,通过疏水和亲水相互作用,以同源二聚体的结构主要锚定于细胞质膜,其中 2 个区域对普鲁兰酶的分泌非常重要。其一为天门冬氨酸(Asp)的富集区域,Asp 残基缺失会导致分泌减弱。这一结构在其他核苷酸结合蛋白中并不存在,因此 PulE 可能是核苷酸结合蛋白的 1 个新家族^[36-37]。其二为 4 个半胱氨酸重复序列(4Cys),与腺苷酸激酶等其他蛋白的锌结合模序相似,可以形成分子内和分子间混合的二硫键。仅当至少 2 个相邻的 Cys 被 Ser 取代,才会影响分子间二硫键的形成^[38]。此外,PulE 存在保守的 ATP-结合模

序,并且与其他 ATP 转运酶结构具有一定的同源性,活性表现为浓度依赖,可能以六寡聚体形式存在,具有自激酶活性。

3.5 其他

pulO 基因编码一个完整的细胞质膜蛋白,约 24 kDa,具有内肽酶和 N-甲基转移酶活性,可切割 PulH、PulG、PulI、PulJ、PulK 等蛋白的信号肽序列,产生成熟多肽^[22, 24]。

PulM 和 PulL 蛋白分别有 161 和 398 个氨基酸,与普鲁兰酶的分泌密切相关^[39]。荧光显微镜观察 GFP 标记的融合蛋白以及细胞组分分离检测发现两蛋白均覆盖于细胞外膜,且呈现球极聚集的现象^[39]。

另外,在近 10 余种分泌相关蛋白中,Possot OM 等人发现 *pulB*、*pulH* 和 *pulN* 单一基因缺失并不影响蛋白的分泌,因此并非普鲁兰酶分泌过程的必要条件^[27]。尽管,*pulB* 与 *pulN* 编码蛋白的功能至今还不十分清楚。*pulH* 位于 *pulG* 基因后,编码一个约 17 kDa 的内膜蛋白,表达量较低。*pulI* 与 *pulH* 有一个碱基的重叠,编码一个 N-端存在疏水区的蛋白,约 13.6 kDa。*pulJ* 与 *pulI* 同样存在一个碱基的重叠,编码一个约 22 kDa 的多肽,具有 N-端疏水区以及原核生物 N-端甲基化模序,定位于细胞内膜。*pulK* 与 *pulJ* 有一个碱基的重叠,编码一个 36.2kDa 的蛋白,N-端存在唯一的疏水区,作为信号序列,行使膜锚定的功能^[23]。*pulF* 编码一个多次跨膜的蛋白多肽,分子量约为 44 kDa,主要参与 PulE 在细胞膜的靶向^[37-38]。

3.6 蛋白质间的相互作用

免疫共沉淀实验发现, PulM、PulL、PulC 和 PulE 以四聚体的形式存在,PulE、PulL 和 PulM 先形成亚复合物,再与 PulC 和 PulG 相互作用^[27]。PulE 的 N-端具有 ATP 酶活性以及质子运动能力,通过与 PulL 的 N-端直接相互作用实现与其他组分的联系,从而为分泌提供能量^[39]。PulL 的 C-端与 PulM 结合。PulC 可能在分泌复合物的内膜部分和分泌素 PulD 形成的外膜通道之间构成桥梁^[27]。PulG 聚集在细胞极,构成的 IV 型菌毛类似结构通过扩张与伸缩起始通过分泌素通道的分泌^[34]。总之,这些蛋白之间存在着直接或者间接的联系,从而完成复杂的普鲁兰酶转运过程。

4 结语

普鲁兰酶对于淀粉支链的水解具有重要作用,然而由于其特殊定位以及复杂的分泌系统,为工业化生产带来障碍。国内研究工作主要集中在普鲁兰酶产生菌株的筛选等内容,对基因调控、结构功能以及转运分泌途径等相关内容较少,且研究菌种单一,因此我国在普鲁兰酶的研究上距离欧美国家有很大的差距,工业普鲁兰酶完全依赖进口,定价权掌握在少数外国公司手中,近乎垄断的市场供应导致了国内普鲁兰酶高昂的销售价格,极大的限制了国内相关产业的发展。进一步的研究更清楚的揭示普鲁兰酶分泌调控网络等相关内容,这些答案不仅增加我们对其理论机制的了解,而且会使我们在工业菌株的改造优化领域具有更清晰的方向,尽快摆脱普鲁兰酶对进口的依赖,具有重要的经济和战略意义。

参考文献

[1] 陆健, 金冲, 顾国贤. 普鲁兰酶及其生产菌种. 酿酒 (*Liquor Making*), 1998, 98(5): 1-6.

[2] 张晓宇, 艾志录, 李梦琴, 李建威, 李辉尚. 极限糊精酶的研究进展及展望. 中国食品添加剂 (*China Food Additives*), 2004, 3: 32-35.

[3] Myrback K. Enzymic degradation of starch and the structure of the starch macromolecule. *Journal for praktische Chemical*, 1943, 162: 29-62.

[4] Fogarty WM. Debranching Enzymes. *Microbial Enzymes and Biotechnology*. 1st ed. New York: Applied Science Publishers. 1983: 41-47.

[5] Fouts DE, Tyler HL, DeBoy RT, Daugherty S, Ren Q, Badger JH, Durkin AS, Huot H, Shrivastava S, Kothari S, Dodson RJ, Monhamoud Y, Khouri H, Roesch LFW, Krogfelt KA, Struve C, Triplett EW, Methe BA. Complete genome sequence of the N₂-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice. *PLoS Genetics*, 2008, 4(7): e1000141.

[6] Wu KM, Li LH, Yan JJ, Tsao N, Liao TL, Tsai HC, Fung CP, Chen HJ, Liu YM, Wang JT, Fang CT, Chang SC, Shu HY, Liu TT, Chen YT, Shiau YR, Lauderdale TL, Su IJ, Kirby R, Tsai SF. Genome sequencing and comparative analysis of *Klebsiella*

pneumonia NTUH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(14): 4492-4501.

[7] Shim JH, Park JT, Hong JS, Kim KW, Kim MJ, Auh JH, Kim YW, Park CS, Boos W, Kim JW, Park KH. Role of maltogenic amylase and pullulanase in maltodextrin and glycogen metabolism of *Bacillus subtilis* 168. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(15): 4835-4844.

[8] Hohn B, Murray K. Packaging recombinant DNA molecules into bacteriophage particles *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1977, 74(8): 3259-3263.

[9] Michaelis S, Chapon C, d'Enfert C, Pugsley AP, Schwartz M. Characterization and expression of the structural gene for pullulanase, a maltose-inducible secreted protein of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 1985, 164(2): 633-638.

[10] Chapon C, Raibaud O. Structure of two divergent promoters located in front of the gene encoding pullulanase in *Klebsiella pneumoniae* and positively regulated by the *malT* product. *Journal of Bacteriology*, 1985, 164(2): 639-645.

[11] Pugsley AP, Chapon C, Schwartz M. Extracellular pullulanase of *Klebsiella pneumoniae* is a lipoprotein. *Journal of Bacteriology*, 1986, 166(3): 1083-1088.

[12] Marchler-Bauer A, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, Deweese-Scott C, Fong JH, Geer LY, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Lu F, Lu S, Marchler GH, Mullokkandov M, Song JS, Tasneem A, Thanki N, Yamashita RA, Zhang D, Zhang N, Bryant SH. CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37: D205-D210.

[13] Mikami B, Iwamoto H, Malle D, Yoon HJ, Demirkan-Sarikaya E, Mezaki Y, Katsuya Y. Crystal structure of pullulanase: evidence for parallel binding of oligosaccharides in the active site. *Journal of molecular biology*, 2006, 359(3): 690-707.

[14] Gourlay LJ, Santi I, Pezzicoli A, Grandi G, Soriani M, Bolognesi M. Group B *Streptococcus* pullulanase crystal structures in the context of a novel strategy for vaccine development. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(11): 3544-3552.

[15] Malle D, Itoh T, Wataru Hashimoto, Murata K, Utsumi

- S, Mikami B. Overexpression, purification and preliminary X-ray analysis of pullulanase from *Bacillus subtilis* strain 168. *Acta Crystallographica*, 2006, 62 (Pt 4) : 381-384.
- [16] Turkenburg JP, Brzozowski AM, Svendsen A, Borchert TV, Davies GJ, Wilson KS. Structure of a pullulanase from *Bacillus acidopullulyticus*. *Proteins*, 2009, 76(2) : 516-9.
- [17] Bender H. Pullulanase from *Aerobacter aerogenes*. Localization of the enzyme bound to continuously grown cells possible association with the outer membrane system of the cells. *Archives of Mikrobiology*, 1970, 71(4) : 331-352.
- [18] Wober G. Pullulanase is a characteristic of many *Klebsiella* species and functions in the degradation of starch. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1976, 3(1) : 71-80.
- [19] Wohner G, Wober G. Pullulanase, an enzyme of starch catabolism, is associated with the outer membrane of *Klebsiella*. *Archives of Mikrobiology*, 1978, 116(3) : 303-310.
- [20] Wohner G, Wober G. Subcellular distribution of enzymes involved in-glucan utilization in *Klebsiella pneumonia* proteins of cytoplasm, periplasm, cytoplasmic and outer membrane. *Archives of Mikrobiology*, 1978, 116(3) : 311-316.
- [21] d'Enfert C, Chapon C, Pugsley AP. Export and secretion of the lipoprotein pullulanase by *Klebsiella pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 1987, 1(1) : 107-116.
- [22] Pugsley AP, Francetic O, Hardie K, Possot OM, Sauvonnet N, Seydel A. Pullulanase: Model protein substrate for the general secretory pathway of gram-negative bacteria. *Folia Microbiologica*, 1997, 42(3) : 184-192.
- [23] Reyss I, Pugsley AP. Five additional genes in the *pulC-O* operon of the gram-negative bacterium *Klebsiella oxytoca* UNF5023 which are required for pullulanase secretion. *Molecular and General Genetics*, 1990, 222(2-3) : 176-184.
- [24] Pugsley AP, Reyss I. Five genes at the 3' end of the *Klebsiella pneumoniae pulC* operon are required for pullulanase secretion. *Molecular Microbiology*, 1990, 4(3) : 365-379.
- [25] Kornacker MG, A Boyd, Pugsley AP, Plastow GS. A new regulatory locus of the maltose regulon of *Klebsiella pneumoniae* strain K21 identified by the study of pullulanase secretion mutants. *Journal of General Microbiology*, 1989, 135(Pt 2) : 397-408.
- [26] d'Enfert C, Reyss I, Wandersman C, Pugsley AP. Protein secretion by gram-negative bacteria. Characterization of two membrane proteins required for pullulanase secretion by *Escherichia coli* K-12. *The Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264(29) : 17462-17468.
- [27] Possot OM, Vignon G, Bomchil N, Ebel F, Pugsley AP. Multiple interactions between pullulanase secretion components involved in stabilization and cytoplasmic membrane association of PulE. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(8) : 2142-2152.
- [28] Possot OM, Gerard-Vincent M, Pugsley AP. Membrane association and multimerization of secretion component PulC. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(13) : 4004-4011.
- [29] Chami M, Guilvout I, Gregorini M, Remigy HW, Muller S, Valerio M, Engel A, Pugsley AP, Bayan N. Structural insights into the secretin PulD and its trypsin resistant core. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(45) : 37732-37741.
- [30] Guilvout I, Chami M, Engel A, Pugsley AP, Bayan N. Bacterial outer membrane secretin PulD assembles and inserts into the inner membrane in the absence of its pilotin. *The EMBO Journal*, 2006, 25(22) : 5241-5249.
- [31] Nouwen N, Ranson N, Saibil H, Wolpensinger B, Engel A, Ghazi A, Pugsley AP. Secretin PulD; association with pilot PulS, structure, and ion-conducting channel formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, 96(14) : 8173-8177.
- [32] Daefer S, Guilvout I, Hardie KR, Pugsley AP, Russel M. The C-terminal domain of the secretin PulD contains the binding site for its cognate chaperone, PulS, and confers PulS dependence on pIVfl function. *Molecular Microbiology*, 1997, 24(3) : 465-75.
- [33] Buddelmeijer N, Krehenbrink M, Frédéric Pecorari, Pugsley AP. Type II secretion system secretin PulD localizes in clusters in the *Escherichia coli* outer membrane. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(1) : 161-168.
- [34] Francetic O, Buddelmeijer N, Lewenza S, Kumamoto CA, Pugsley AP. Signal recognition particle-dependent inner membrane targeting of the PulG pseudopilin component of a Type II secretion system. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(5) : 1783-1793.

- [35] Kohler R, Schafer K, Muller S, Vignon G, Driedrichs K, Philippsen A, Ringler P, Pugsley AP, Engel A, Welte W. Structure and assembly of pseudopilin PulG. *Molecular Microbiology*, 2004, 54(3): 647-664.
- [36] Possot O, Pugsley AP. Molecular characterization of PulE, a protein required for pullulanase secretion. *Molecular Microbiology*, 1994, 12(2): 287-99.
- [37] Possot OM, Pugsley AP. The conserved tetracysteine motif in the general secretory pathway component PulE is required for efficient pullulanase secretion. *Gene*, 1997, 192(1): 45-50.
- [38] Camberg JL, Sandkvist M. Molecular analysis of the *Vibrio cholerae* Type II secretion ATPase EpsE. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(1): 249-256.
- [39] Buddelmeijer N, Francetic O, Pugsley AP. Green fluorescent chimeras indicate nonpolar localization of pullulanase secretion components PulL and PulM. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(8): 2928-2935.

Pullulanase and the proteins related to its secretion—A review

Nan Jiang^{*}, Hui Song, Ping Wang

Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract: Due to its ability of hydrolyzing α -1,6-linkages, pullulanase plays a significant role in the industries where starch is used as raw material, including food processing and bioenergy. Exploitation of this enzyme focuses not only on screening novel strains, but also on its molecular structure as well as its secretion pathway and improvement of the properties. Therefore, researches on the gene regulation and the proteins involved in the secretory pathway seem especially important. This review introduced the advances in the study of these fields.

Keywords: pullulanase, secretory pathway, proteins interaction

(本文责编: 王晋芳)

Supported by the Bio-Fabrication Project of CAS (KSCXZ-YW-G-075-21)

^{*} Corresponding author. Tel: +86-22-84861991; E-mail: jiangnan82@yahoo.cn

Received: 9 October 2010/ Revised: 5 January 2011

梅特勒-托利多荣获“2010年度最佳售后服务厂商”大奖

2011年4月26日,中国科学仪器行业峰会“2011中国科学仪器发展年会(ACCSI 2011)”在北京京仪大酒店隆重召开。200多位仪器企业负责人、200多位实验室负责人和仪器应用研发专家及百位来自相关政府部门、相关学会商会和投资机构的嘉宾出席了本届年会。

会上,中国仪器仪表学会分析仪器分会秘书长刘长宽先生揭晓了“最佳售后服务厂商”大奖,并为获奖厂商颁奖。梅特勒-托利多在众多国外厂商中脱颖而出,一举荣获实验室设备类“最佳售后服务国外厂商”这一殊荣。该奖项由仪器信息网从2011年1月开始,历时三个月,通过网络定向邀请,电话回访等方式对仪器行业的售后服务情况开展了广泛的调查,根据用户的投票结果评选而出。

梅特勒-托利多的再次获奖,充分反映出梅特勒-托利多的产品及服务已广泛受到中国用户的认可和称赞。作为行业的领导者,梅特勒-托利多始终致力于为全球客户提供质量卓越的精密仪器和衡器产品,以及全面细致的技术支持服务。梅特勒-托利多将继续坚定地坚持提供独特的服务解决方法,为客户创造实实在在的价值。

更多信息,请浏览梅特勒-托利多公司网站: www.mt.com