

УДК 663.15

DOI: 10.20535/1810-0546.2016.3.67428

М.В. Молочко, Н.В. Дехтяренко

Національний технічний університет України “КПІ”, Київ, Україна

## ФЕРМЕНТ ПУЛЛУЛАЗА: АНАЛІЗ РІЗНИХ ТИПІВ ПУЛЛУЛАЗ, ЇХ ПРОДУЦЕНТІВ, ГАЛУЗЕЙ ВИКОРИСТАННЯ

**Background.** The work is dedicated to critical analysis of literature covering the main aspects of pullulanase enzymes.

**Objective.** The aim is to determine promising areas of research in the field of pullulanase enzymes.

**Methods.** The analysis and synthesis of information about the use, sources, mechanism of action, pullulanase enzyme properties and methods of cultivation and methods of isolation and purification of enzyme, immobilization techniques and methods of determining the activity of the enzyme were made.

**Results.** The analysis of the literature identified the existence of a large number of laboratory developments receiving pullulanase enzyme and lack of industrial production, both in our country and in neighboring countries.

**Conclusions.** A list of areas in which there is the successful use of pullulanase enzyme is outlined. A patent search of the contemporary producers of pullulanase was made, and characteristics of their cultivation were identified. The most common ways to obtain purified pullulanase and modern methods of immobilization have been revealed. Methods of determining the activity of pullulanase enzyme relatively pullulan substrate were established. Pullulanase enzymes word producers range is specified.

**Keywords:** pullulanase; enzyme; industry; mechanism of action; producer; property; activity; purification; manufacturers; strain.

### Вступ

На сьогодні у світі інтенсивно збільшується виробництво ферментів для використання їх у різноманітних ланках людської діяльності. Не є винятком і амілолітичні ферментні препарати – пуллулазази. Завдяки своїй особливості – каталізу реакцій гідролізу пуллулану й амілопектину – пуллулазази широко використовуються в харчовій та легкій промисловості.

Широке коло продуцентів та можливість застосування ферменту в комплексі з іншими ферментними препаратами дають змогу використовувати пуллулазази при отриманні замінників цукру, хлібобіскупки, пивоварінні та виробництві синтетичних мийних засобів.

Пуллулазази викликають великий інтерес у науковців у зв'язку з наявністю різноманітних їх типів та, відповідно, різних продуцентів. Пуллулаза I типу гідролізує  $\alpha$ -1-6-гліколітичні зв'язки в пуллулані та розгалужених полісахаридах з отриманням мальтотріози. Пуллулаза II типу використовується більш широко завдяки своїй властивості гідролізувати  $\alpha$ -1-4- і  $\alpha$ -1-6-гліколітичні зв'язки в амілопектині, що є одним із головних компонентів крохмалю [1].

Продуцентами різних типів пуллулаз виступає велика кількість мікроорганізмів, найбільш поширеними є штами роду *Bacillus*, деякі з яких отримані методами генетичної інженерії, що і зумовлює більший вихід цільового про-

дукту порівняно з іншими штамми. Також перспективним продуцентом є культура *Micrococcus amylofaciens*, технології з її використанням наразі оптимізуються для промислового застосування [2].

На сьогодні існує велика кількість лабораторних розробок отримання цього ферменту, в той же час промислове виробництво пуллулази відсутнє як у нашій країні, так і у країнах близького зарубіжжя. Причиною цього може бути відсутність стабільних високоактивних промислових продуцентів з властивостями, необхідними для тієї чи іншої галузі.

### Постановка задачі

Метою роботи є аналіз і узагальнення інформації щодо галузей використання, джерел одержання, механізму дії та властивостей ферменту пуллулази, опис сучасних технологій отримання пуллулаз, методів іммобілізації ферменту, способів визначення цільової активності та окреслення кола виробників ферментних препаратів пуллулаз.

### Галузі використання пуллулаз

Широке застосування пуллулаз на сьогодні спостерігається у двох галузях промисловості – харчовій та легкій. Проте саме харчова промисловість є найперспективнішою галуззю



### Культивування продуцентів пуллулаз

Для пуллулазних ферментних препаратів найпоширенішим є спосіб отримання з глибинних культур, при цьому умови проведення біосинтезу залежать від фізіології продуцента.

1. Штам *Bacillus licheniformis* ВКМ В-2184 Д. Посівний матеріал отримують вирощуванням штаму на рідкому живильному середовищі складу: крохмаль розчинний – 1 %; м'ясо-пептонний бульйон і солодове сусло у співвідношенні 1:1, рН середовища 7,5. Культивування проводять у колбах, що містять 50 мл стерильного середовища, на качалці при 240 об/хв, за температури 40 °С протягом 36–48 год.

Отриманий посівний матеріал у кількості 0,3 % до об'єму середовища вносять у качалкові колби об'ємом 750 мл і продовжують культивування у середовищі такого складу, г/л: кукурудзяне борошно – 120; сухі кормові дріжджі – 20; CaCO<sub>3</sub> – 2,5; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 2,5; рН середовища 7,5–7 [8].

2. Штам *Micrococcus amylofaciens*. Як посівний матеріал використовується 24-годинна глибинна культура. Оптимальна кількість посівного матеріалу – 0,9–1,1 %. Вирощування культури проводиться в качалкових колбах й у ферментері об'ємом 5 дм<sup>3</sup>. Накопичення максимуму ферменту в культуральній рідині в качалкових колбах відбувається на 70–74-ту годину росту, а у ферментрі – на 48–54-ту годину росту. Режим аерації – 30 дм<sup>3</sup>/дм<sup>3</sup> середовища за годину. Оптимальна температура для росту та біосинтезу становить 50 °С, рН живильного середовища 7,0 [13].

3. Штам *Bacillus cereus*. Культивування відбувається протягом 48 год, при рН 7,5 та за оптимальної температури 37 °С за наявності 1 % розчинного пуллулану як джерела вуглецю і 0,5 % триптонну [14].

### Виділення й очистка пуллулаз

Залежно від продуцента та кількості отриманого ферменту способи отримання очищеної пуллулази можуть дещо різнитися. Проте до найбільш поширених способів можна віднести осадження сульфатом амонію, центрифугування, концентрування за допомогою ультрафільтрації з подальшим очищенням за допомогою діалізу, іонообмінної хроматографії та гель-фільтраційної хроматографії з Sephadex.

1. Штам *Micrococcus amylofaciens*. Очистка ферменту здійснюється після діалізу методом хроматографії з використанням смоли DEAE Toyopearl 650M кооперативного механізму дії, що включає іонообмінну хроматографію та гель-фільтрацію [13].

2. Штам *Lactococcus lactis* IBV 500. Виділення відбувається за допомогою фракціонування сульфатом амонію та подальшого очищення за допомогою діалізу й іонообмінної хроматографії з CM Sepharose FF з подальшою гель-фільтраційною хроматографією з Sephadex G-150 на кінцевій стадії [15].

3. Штам *Bacillus subtilis*. Перше фракціонування проводять сульфатом амонію. Далі суміш центрифугують і супернатант фракціонують сульфатом амонію до кінцевої насиченості 60 %. Після центрифугування супернатант видаляють, осад збирають і розчиняють у тому ж буфері до кінцевої насиченості 20 %. Після цього білковий розчин наносять на колонку Toyopearl 650M, попередньо врівноважену тим же буфером, що містить 20 % сульфату амонію. Білки елюють зі зменшенням градієнта концентрації сульфату амонію від 20 до 0 %. Фракції, що демонструють пуллулазну активність, далі піддають діалізу проти 20 мМ Тріс-НСІ буфера. Отриманий розчин наносять на колонку, попередньо врівноважену Niload з Q-сефарозою. Білки елюють лінійним градієнтом NaCl від 0 до 0,5 М. Активні фракції збирають та піддають діалізу проти того ж буфера, щоб видалити сіль. Знесолений білковий розчин наносять на колонку Mono-Q, яку попередньо врівноважують тим же буфером, що використовувався на попередньому етапі [16].

4. Штам *Desulfurococcus mucosus*. Культуральну рідину центрифугують при 12000 обертах протягом 30 хв при 4 °С, а супернатант концентрують у 100 разів з використанням системи ультрафільтрації Amicon. Клітинний осад ресуспендують у 50 мМ натрій-ацетатного буфера з рН 5,5 і тричі оброблюють ультразвуком протягом 3 хв в ультразвуковому дезінтеграторі Branson 450 [9].

### Імобілізація пуллулаз

У 2015 р. учені Китаю розробили простий метод іммобілізації пуллулази на гібридних магнітних наночастинках за участю в місці синтезу магнітних наночастинок каррагінану. Цей

метод іммобілізації показав себе як стабільний, демонструючи, що витік ферменту під час каталізу реакції ефективно знижується. Крім того, активність іммобілізованої пуллулази була значно вищою, ніж у вільної пуллулази в діапазоні низьких значень рН ( $\text{pH} < 3,0$ ) і за температури вище  $60\text{ }^\circ\text{C}$ . Також іммобілізований фермент зберігає 45 % вихідної активності після 5 год використання при  $60\text{ }^\circ\text{C}$ , порівняно з 21 % неіммобілізованого ферменту [17].

З 2001 р. відомий метод іммобілізації пуллулази на двох різних полімерах: агарозі, активованій епіхлоргідрином і трихлортриазином, та казеїні, активованому епіхлоргідрином. Показано, що фермент, іммобілізований на агарозі, яка активована епіхлоргідрином та трихлортриазином, має погану міцність і відносну активність, що різко знижується через витік після повторної промивки, в той час як ферменти, іммобілізовані за допомогою казеїну, активованого епіхлоргідрином, мали незначне зниження відносної активності (близько 20 %) після того, як використовувалися більше 10 разів [18].

#### Методики визначення активності пуллулази

Активність пуллулази може бути визначена відносно субстрату пуллулану. Одна нова пуллулазна одиниця Novo (NPUN) є одиницею активності ендопуллулази і вимірюється відносно стандарту від Novozymes A/S Promozyme D. Стандартними умовами є час реакції 30 хв; температура  $40\text{ }^\circ\text{C}$ ; рН 4,5; 0,7 % пуллулану як субстрату. Кількість червоного продукту розкладання субстрату вимірюється спектрофотометрично при довжині хвилі 510 нм і пропорційна активності ендопуллулази в зразку.

У стандартних умовах одна NPUN приблизно дорівнює кількості ферменту, який вивільняє вуглевод з відновлювальною здатністю, еквівалентною 2,86 мкМ глюкози на хвилину [19].

Також пуллулазна активність може бути виміряна в 0,1 М ацетатному буфері з рН 5,4 відповідно до методики Бернфельда з незначною модифікацією з використанням як субстрату пуллулану. Суміш 500 мкл 1 %-ного пуллулану і 450 мкл 0,2 М ацетатного буфера з рН 5,4 врівноважують. Потім додають 50 мкл розчину ферменту і суміш інкубують ще протягом 4 хв. Реакцію зупиняють додаванням 1 мл 3,5-динітросаліцилової кислоти, суміш нагрівають протягом ще 5 хв на киплячій водяній бані.

Потім суміш поміщають у холодну баню. Поглинання вимірюють за довжини хвилі 540 нм.

Одна одиниця активності пуллулази визначається як кількість ферменту, необхідна для вивільнення редуруючого цукру, що еквівалентний 1 мкМ мальтотріози на хвилину [16].

Пуллулазну активність також можна визначити вимірюванням кількості редуруючих цукрів, вивільнених у ході дії ферменту на субстрат пуллулан. Пуллулазну активність вимірюють у реакційній суміші, що складається з 0,46 мл 1 %-ного пуллулану в 0,05 М фосфатному буфері (рН 7) і відповідної концентрації неочищеного позаклітинного ферменту (0,04 мл), яку інкубують при  $40\text{ }^\circ\text{C}$  протягом 10 хв. Після інкубації реакцію зупиняють охолодженням безпосередньо на бані з льодом. Одиниця активності ферменту пуллулази визначається як його кількість, що необхідна для каталізу вивільненого відновлюючого цукру, еквівалентного 1 мкМ D-глюкози за хвилину в умовах аналізу [14].

#### Виробники пуллулазних препаратів

На сьогодні пуллулаза випускається компаніями "Novozymes", Данія (ферментні препарати "Promozyme 400L" і "Promozyme D2") та "Genencor International", США (препарат "Optimax L-1000") [1, 20].

#### Висновки

Ферментний препарат пуллулаза набув широкого використання в багатьох галузях харчової промисловості, а також при виробництві мийних засобів. На сьогодні перспективним є використання пуллулази в комплексах з іншими ферментами.

Продуцентами різних типів пуллулаз виступає велика кількість мікроорганізмів — *Bacillus licheniformis*, *Micrococcus amylofaciens*, *Klebsiella planticola* тощо. Найчастіше використовуються штами роду *Bacillus*, отримані методами генетичної інженерії, що зумовлює більший вихід цільового продукту порівняно з іншими штамами. Також перспективним продуцентом є культура *Micrococcus amylofaciens*, технології з її використанням наразі оптимізуються для промислового використання.

Фермент пуллулаза здатний діяти на пуллулан, глікоген і амілопектин та гідролізувати в них  $\alpha$ -1,6-зв'язки. Дія ферменту на суб-

страти відбувається за механізмом гідролізу з утворенням мальтози або мальтотріози.

Оптимальна активність пуллулази, залежно від джерел отримання, спостерігається в діапазоні рН 4,5–7,5, за температури 55–100 °С. На активність пуллулази впливають йони  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  та  $\text{Ca}^{2+}$ .

Єдиним можливим способом культивування продуцентів пуллулази є глибинний спосіб культивування в качалкових колбах або ферментері за температури 37–50 °С та рН 7,0–7,8 залежно від продуцента.

Найбільш поширеними способами отримання очищеної пуллулази є осадження сульфатом амонію, центрифугування, концентрування за допомогою ультрафільтрації з подальшим очищенням за допомогою діалізу, іонообмінної хроматографії та гель-фільтраційної хроматографії.

Для іммобілізації ферменту пуллулази перспективними є способи з використанням магнітних наночастинок каррагінану або казеїну, активованого епіхлоргідрином.

Активність ферменту пуллулази може бути встановлена кількома методами, що ґрунтуються на визначенні кількості ферменту, яка необхідна для вивільнення відповідного редуруючого цукру. Вимірювання активності за цими методами відбувається відносно субстрату пуллулану.

Нині у світі виробниками ферментних препаратів пуллулази є “Novozymes”, Данія, та “Genencor International”, США.

Проведений огляд дає можливість у подальшому виділити основні можливі напрями розробки технології ферментного препарату пуллулази в умовах лабораторії та виробництва.

#### Список літератури

1. Velhal C., Sant M., Das S. Production of pullulanase using novel organic substrates // Int. J. Sci. Technol. Res. – 2014. – № 3. – P. 94–97.
2. Сабадаш Н.І. Удосконалення технології високомальтозних сиропів із кукурудзяного крохмалю: Автореф. дис. ... к.т.н: спец. 05.18.05 “Харчова технологія”. – К., 2009. – 20 с.
3. Malakar R., Tiwari A., Malviya S. Pullulanase: a potential enzyme for industrial application // Int. J. Biomed. Res. – 2010. – № 2. – P. 10–20.
4. Спосіб виробництва мальтозних сиропів: Пат. 57627 Україна, МПК С13К 7/00 / Сабадаш Н.І.; власник Національний університет харчових технологій. – № 201008828; Заявл. 15.07.2010; Опубл. 10.03.2011, Бюл. № 5.
5. Закирова А.Ш., Канарский А.В., Канарская З.А. Ферментативная модификация амилопектина // Вестник Казанского технолог. ун-та. – 2013. – № 7. – С. 164–167.
6. Годулян І.М. Актуальність використання ферментних препаратів для підвищення колоїдної стабільності пива в умовах модернізованого виробництва з використанням несоложеної сировини // Зб. наук. праць молодих учених, аспірантів та студентів. – Одеса: Одеська нац. академія харчових технологій, 2014. – С. 12–13.
7. База даних “The Comprehensive Enzyme Information System” [Електронний ресурс]. – URL: <http://www.brenda-enzymes.info>
8. Штамм бактерій *Bacillus licheniformis* – продуцент комплексу термостабільних амілолитических и протеолитических ферментов: Пат. 2177995 РФ, МПК С12N1/20, С12N9/28, С12N9/44, С12N9/56, С12N1/20, С12R1:10 / Н.В. Цурикова; заявитель и патентообладатель Научно-производственная компания “Фермтек”. – № 98102082/13; Заявл. 05.02.98; Опубл. 10.01.02, Бюл. № 1.
9. Duffner F., Bertoldo C., Andersen J.T. A new thermoactive pullulanase from *Desulfurococcus mucosus*: cloning, sequencing, purification, and characterization of the recombinant enzyme after expression in *Bacillus subtilis* // J. Bacteriology. – 2000. – № 22. – P. 6331–6338.
10. Ismaya W.T., Hasan K., Subroto T. Chromatography as the major tool in the identification and the structure-function relationship study of amylolytic enzymes from *Saccharomycopsis fibuligera* R64 [Online] // Chromatography – The Most Versatile Method of Chemical Analysis. – 2012. – URL: <http://www.intechopen.com/books/chromatography-the-most-versatile-method-of-chemical-analysis>
11. Drummond G.S., Smith E.E., Whelan W.J. Mechanism of action of pullulanase // FEBS Lett. – 1969. – № 5. – P. 85–88.
12. Галкін О.Ю. Сучасні теоретичні методи вивчення антигенної структури білків // Вісник Запорізького нац. ун-ту. Сер. Біологічні науки. – 2013. – № 3. – С. 69–77.
13. Кривова И.А. Разработка биотехнологического процесса получения комплексного ферментного препарата пуллулазы и использование его для крахмалопаточной промышленности: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук: спец. 03.00.04 “Биохимия”. – М., 2006. – 28 с.

14. Waleed M., Faiza A.A., Nizar I. Production optimization of pullulanase enzyme produced by *Bacillus cereus* isolated from Syrian sources // *Int. Food Res. J.* – 2015. – № 5. – P. 1824–1830.
15. Wasko A., Polak-Berecka M., Targonski Z. Purification and characterization of pullulanase from *Lactococcus lactis* // *Prep. Biochem. Biotechnol.* – 2011. – № 4. – P. 73–78.
16. Malle D., Itoh T., Hashimoto W. Overexpression, purification and preliminary X-ray analysis of pullulanase from *Bacillus subtilis* strain 168 // *Structural Biology and Crystallization Commun.* – 2006. – № 4. – P. 381–384.
17. Long J., Wu Z., Li X. New method for the immobilization of pullulanase onto hybrid magnetic ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -κ-carrageenan) nanoparticles by electrostatic coupling with pullulanase/chitosan complex // *J. Agricultural Food Chem.* – 2015. – № 13. – P. 34–42.
18. Dessouki A., Issa G., Atia K. Pullulanase immobilization on natural and synthetic polymers // *J. Technol. Biotechnol.* – 2001. – № 7. – P. 700–706.
19. Способ обработки крахмала: Пат. 2315811 РФ, МПК C12P19/22, C12P19/20, C12P19/18, C12P19/14 / С. Педерсен; заявитель и патентообладатель Новозимс А/С. – № 20098348/11; Заявл. 10.02.03; Оpubл. 27.01.08, Бюл. № 3.
20. Офіційний сайт компанії Novozymes [Електронний ресурс]. – URL: <http://www.novozymes.com>

## References

1. C. Velhal *et al.*, “Production of pullulanase using novel organic substrates”, *Int. J. Sci. Technol. Res.*, no. 3, pp. 94–97, 2014.
2. N.I. Sabadash, “Improving technology high maltose syrups from corn starch”, Ph.D. thesis, National University of Food Technology, Ukraine, 2009 (in Ukrainian).
3. R. Malakar *et al.*, “Pullulanase: a potential enzyme for industrial application”, *Int. J. Biomed. Res.*, no. 2, pp. 10–20, 2010.
4. N.I. Sabadash, “Method of manufacturing a maltose syrup”, Ukraine Patent 57627, IPC S13K 7/00, July 15, 2010 (in Ukrainian).
5. A.S. Zakirova *et al.*, “Enzymatic modification of the amylopectin”, *Vestnik Kazanskogo Tehnologicheskogo Universiteta*, no. 7, pp. 164–167, 2013 (in Russian).
6. I.M. Hodulyan, “Relevance of using enzymes to improve the colloidal stability of beer under the modernized production using unmalted raw materials”, in *Sci. Works Collection of the Odessa National Academy of Food Technologies*, pp. 12–13, 2014 (in Ukrainian).
7. The Comprehensive Enzyme Information System [Online]. Available: <http://www.brenda-enzymes.info>
8. N.V. Tsurikova, “The strain *Bacillus licheniformis* bacteria – producing complex thermostable amylolytic and proteolytic enzymes”, Russian Federation Patent 2177995, IPC C12N1/20, C12N9/28, C12N9/44, C12N9/56, C12N1/20, C12R1:10, Feb. 5, 1998 (in Russian).
9. F. Duffner *et al.*, “A new thermoactive pullulanase from *Desulfurococcus mucosus*: cloning, sequencing, purification, and characterization of the recombinant enzyme after expression in *Bacillus subtilis*”, *J. Bacteriology*, no. 22, pp. 6331–6338, 2000.
10. W.T. Ismaya *et al.* (2012). Chromatography as the Major Tool in the Identification and the Structure-Function Relationship Study of Amylolytic Enzymes from *Saccharomyopsis Fibuligera* R64 [Online]. Available: <http://www.intechopen.com/books/chromatography-the-most-versatile-method-of-chemical-analysis>
11. G.S. Drummond *et al.*, “Mechanism of action of pullulanase”, *FEBS Lett.*, no. 5, pp. 85–88, 1969.
12. O.Yu. Galkin, “Modern theoretical methods of studying the antigenic structure of proteins”, *Visnyk Zaporiz'koho Natsional'noho Universytetu. Ser. Biologichni Nauky*, no. 3, pp. 69–77, 2013 (in Ukrainian).
13. I.A. Krivova, “Development of a biotechnological process of obtaining comprehensive pullulanase enzyme preparation and its use for starch industry”, Ph.D. thesis, Moscow State University of Food Production, Russia, 2006 (in Russian).
14. M. Waleed *et al.*, “Production optimization of pullulanase enzyme produced by *Bacillus cereus* isolated from Syrian sources”, *Int. Food Res. J.*, no. 5, pp. 1824–1830, 2015.
15. A. Wasko *et al.*, “Purification and characterization of pullulanase from *Lactococcus lactis*”, *Prep. Biochem. Biotechnol.*, no. 4, pp. 73–78, 2011.
16. D. Malle *et al.*, “Overexpression, purification and preliminary X-ray analysis of pullulanase from *Bacillus subtilis* strain 168”, *Structural Biology and Crystallization Commun.*, no. 4, pp. 381–384, 2006.
17. J. Long *et al.*, “New method for the immobilization of pullulanase onto hybrid magnetic ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -κ-carrageenan) nanoparticles by electrostatic coupling with pullulanase/chitosan complex”, *J. Agricultural Food Chem.*, no. 13, pp. 34–42, 2015.
18. A. Dessouki *et al.*, “Pullulanase immobilization on natural and synthetic polymers”, *J. Technol. Biotechnol.*, no. 7, pp. 700–706, 2001.
19. C. Pedersen, “The process of starch processing”, Russian Federation Patent 2315811, IPC C12P19/22, C12P19/20, C12P19/18, C12P19/14, Feb. 10, 2003 (in Russian).
20. The Official Website of Novozymes [Online]. Available: <http://www.novozymes.com>

М.В. Молочко, Н.В. Дехтяренко

#### ФЕРМЕНТ ПУЛЛУЛАНАЗА: АНАЛІЗ РІЗНИХ ТИПІВ ПУЛЛУЛАНАЗ, ЇХ ПРОДУЦЕНТІВ, ГАЛУЗЕЙ ВИКОРИСТАННЯ

**Проблематика.** Роботу присвячено критичному аналізу літератури, що охоплює головні аспекти створення ферментних препаратів пуллуланази.

**Мета дослідження.** Метою роботи є визначення перспективних напрямів досліджень у галузі створення пуллуланичних ферментних препаратів.

**Методика реалізації.** Проведено аналіз і узагальнення інформації щодо галузей використання, джерел одержання, механізму дії, властивостей ферменту пуллуланази, а також способів культивування та методів виділення й очистки ферментного препарату, методів іммобілізації та способів визначення активності ферменту.

**Результати дослідження.** В результаті аналізу літературних джерел визначено існування великої кількості лабораторних розробок отримання ферменту пуллуланази і встановлено, що його промислове виробництво як у нашій країні, так і у країнах близького зарубіжжя відсутнє.

**Висновки.** Окреслено перелік галузей, у яких спостерігається успішне використання пуллуланази. Проведено патентний пошук сучасних продуцентів пуллуланичних ферментів та визначено особливості їх культивування. Встановлено найпоширеніші способи отримання очищеної пуллуланази та сучасні методи її іммобілізації, а також способи визначення активності пуллуланази відносно субстрату пуллулану. Зазначено коло світових виробників пуллуланичних ферментних препаратів.

**Ключові слова:** пуллуланаза; фермент; промисловість; механізм дії; продуцент; властивість; активність; очистка; виробники; штам.

М.В. Молочко, Н.В. Дехтяренко

#### ФЕРМЕНТ ПУЛЛУЛАНАЗА: АНАЛИЗ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ ПУЛЛУЛАНАЗ, ИХ ПРОДУЦЕНТОВ, ОТРАСЛЕЙ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

**Проблематика.** Работа посвящена критическому анализу литературы, охватывающей основные аспекты создания ферментных препаратов пуллуланы.

**Цель исследования.** Целью работы является определение перспективных направлений исследований в области создания пуллуланических ферментных препаратов.

**Методика реализации.** Проведены анализ и обобщение информации об отраслях использования, источниках получения, механизме действия, свойствах фермента пуллуланаза, а также о способах культивирования и методах выделения и очистки ферментного препарата, методах иммобилизации и способах определения активности фермента.

**Результаты исследования.** В результате анализа литературных источников определено существование большого количества лабораторных разработок получения фермента пуллуланаза и установлено, что его промышленное производство как в нашей стране, так и в странах ближнего зарубежья отсутствует.

**Выводы.** Определен перечень отраслей, в которых наблюдается успешное использование пуллуланы. Проведен патентный поиск современных продуцентов пуллуланы и определены особенности их культивирования. Установлены распространенные способы получения очищенной пуллуланы и современные методы ее иммобилизации, а также способы определения активности пуллуланы относительно субстрата пуллулан. Указан круг мировых производителей пуллуланических ферментных препаратов.

**Ключевые слова:** пуллуланаза; фермент; промышленность; механизм действия; продуцент; свойство; активность; очистка; производители; штамм.

Рекомендована Радою  
факультету біотехнології і біотехніки  
НТУУ "КПІ"

Надійшла до редакції  
9 лютого 2016 року