

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ ЕКОЛОГІЧНОЇ БЕЗПЕКИ, ІНЖЕНЕРІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЙ
КАФЕДРА БІОТЕХНОЛОГІЇ

ДОПУСТИТИ ДО ЗАХИСТУ
Завідувач випускової кафедри
_____ М. М. Барановський
«___» _____ 2021 р.

ДИПЛОМНА РОБОТА
(ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА)

ЗДОБУВАЧА ВИЩОЇ ОСВІТИ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ «БАКАЛАВР»

СПЕЦІАЛЬНІСТЬ 162 «БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА БІОІНЖЕНЕРІЯ»

ОСВІТНЬО-ПРОФЕСІЙНА ПРОГРАМА «ФАРМАЦЕВТИЧНА БІОТЕХНОЛОГІЯ»

Тема: «Мікробіологічний метод отримання хітину з екзоскелету *Diptera sp.*»

Виконавець: студентка ФБ-402

Данько Я. П.

Керівник: д.т.н., професор

Таширев О. Б.

Нормоконтролер:

Дражнікова А. В.

КИЇВ 2021

НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет екологічної безпеки, інженерії та технологій

Кафедра біотехнології

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

ОПП «Фармацевтична біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ М.М. Барановський

« ___ » _____ 2021 р.

ЗАВДАННЯ

на виконання дипломної роботи

Данько Яніна Павлівна

1.Тема дипломної роботи: «Мікробіологічний метод отримання хітину з екзоскелету *Diptera sp.*» затверджена наказом ректора від 11 травня 2021р., № 715/ст.

2.Термін виконання роботи: з 10 травня по 14 червня 2021 р.

3.Вихідні дані до роботи: експериментальні дані отриманні на базі Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного Національної академії наук України, аналітичний огляд літератури підготовлено шляхом системного вивчення науково-технічної літератури, методи дослідження виконані на базі Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного; препарат сухих комах наданий для експерименту професором Аксарайського університету, факультету наук та літератури, кафедри біотехнології та молекулярної біології Муратом Кая.

4. Зміст пояснювальної записки: ВСТУП; РОЗДІЛ 1. АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД НАУКОВО-ТЕХНІЧНОЇ ЛІТЕРАТУРИ; 1.1. Загальна інформація про хітин та хітозан; 1.2. Способи отримання хітину; 1.2.1. Недоліки способів отримання хітину;

1.3. Сировина для отримання хітину; 1.4. Застосування хітину та хітозану у біотехнології; 1.4.1. Застосування хітину та хітозану при очищенні стічних вод; 1.4.2. Застосування хітину та хітозану у виробництві біоплівки; 1.4.3. Застосування хітину та хітозану у медицині та фармацевтичній промисловості; 1.5. Промислово-перспективні комахи та їх застосування; 1.6. Висновок до розділу; РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ; 2.1. Підготовка матеріалу до експерименту; 2.2. Методи дослідження; 2.2.1. Потенціометричне визначення показників рН та Eh; 2.2.2. Газохроматографічний метод визначення газової фази; 2.2.3. Визначення загального вмісту органічних сполук методом перманганатометрії; 2.3. Висновок до розділу; РОЗДІЛ 3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА ТА РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ; 3.1. Загальна характеристика зброженого осаду метантенка; 3.2. Отримання очищеного хітину з членистоногих шляхом гідролізу анаеробним мікробним угрупованням зброженого осаду метантенку; 3.3. Результати дослідження; 3.4. Оцінка ефективності застосування мікробіологічного методу отримання очищеного хітину; 3.5. Висновок до розділу; ВИСНОВКИ; СПИСОК БІБЛОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ; Додаток.

5. Перелік обов'язкового графічного (ілюстративного) матеріалу: рисунків, таблиць.

6. Календарний план-графік

№	Завдання	Термін виконання	Підпис керівника
1	Складання змісту бакалаврської дипломної роботи	10.05.21	
2	Збір інформації за темою дипломної роботи: «Мікробіологічний метод отримання хітину з екзоскелету <i>Diptera sp.</i> »	11.05.21-15.05.21	
3	Оформлення літературного огляду	16.05.21-19.05.21	
4	Розгляд методів, використаних у дипломній роботі	20.05.21-22.05.21	
5	Аналіз та обробка результатів досліджень	23.05.21-28.05.21	
6	Побудова графіків до дипломної роботи	29.05.21-30.05.21	
7	Формулювання висновків	31.05.21	
8	Оформлення дипломної роботи	1.06.21-2.06.21	
9	Перевірка дипломної роботи керівником	2.06.21	
9	Підготовка презентації	4.06.21	
10	Попередній захист дипломної роботи	01.06.21	
11	Захист дипломної роботи	15.06.21	

7. Дата видачі завдання: « 10 » травня 2021р.

Керівник дипломної роботи _____ Таширев О.Б.

(підпис керівника)

Завдання прийняв до виконання _____ Данько Я.П.

РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка до дипломної роботи «Мікробіологічний метод отримання хітину з екзоскелету *Diptera sp.*»: 47 сторінок, 10 рисунків, 4 таблиці, 46 використаних джерел, 1 додаток.

Об'єкт дослідження – динаміка та закономірність депротейнізація хітину комах.

Предмет дослідження – хітин з екзоскелету *Diptera sp.*

Мета дипломної роботи – довести ефективність мікробіологічного методу отримання очищеного хітину з екзоскелету комах двокрилих.

Методи дослідження – мікробіологічні, аналітичні, біотехнологічні.

Вперше досліджено мікробіологічний метод отримання хітину з екзоскелету *Diptera sp.* з використанням, в якості інокуляту, мікробного угруповання збродженого осаду метантенку. Зброджений осад метантенку містить протеолітичні бактерії, які здатні розкладати білкові сполуки, з яких складається екзоскелет комах *Diptera sp.* Мікробну деструкцію проводили за температури 30 °C протягом 145 діб.

Отримані результати експерименту можна використовувати для подальшої оптимізації процесу мікробної деструкції внутрішніх тканин членистоногих. Використання комах, як хітин-вмісної сировини, скоротить кількість відходів та покращить якість очищеного хітину, адже при мікробному гідролізі не використовуються агресивні реагенти. Даний експеримент може бути корисний в сфері біотехнології для очищення стічних вод від катіонів металів, у виробництві біоплівки харчового призначення та у фармації для виготовлення мазей, гелів на основі хітозану.

ХІТИН, ХІТОЗАН, ДЕСТРУКЦІЯ, ЕКЗОСКЕЛЕТ, ГІДРОЛІЗ, КОМАХИ, ЧЛЕНИСТОНОГІ, МЕТАНТЕНК, ЗБРОДЖЕНИЙ ОСАД, ПРОТЕОЛІТИЧНІ БАКТЕРІЇ, *DIPTERA SP.*, БІОТЕХНОЛОГІЯ, МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ МЕТОД.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	9
РОЗДІЛ 1. АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД НАУКОВО-ТЕХНІЧНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	11
1.1. Загальна інформація про хітин та хітозан	11
1.2. Способи отримання хітину.....	12
1.2.1. Недоліки способів отримання хітину.....	14
1.3. Сировина для отримання хітину.....	14
1.4. Застосування хітину та хітозану у біотехнології	17
1.4.1. Застосування хітину та хітозану при очищенні стічних вод	18
1.4.2. Застосування хітину та хітозану у виробництві біоплівок	19
1.4.3.Застосування хітину та хітозану у медицині та фармацевтичній промисловості	20
1.5. Промислово-перспективні комахи та їх застосування.....	21
1.6. Висновки до розділу	23
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	24
2.1. Підготовка матеріалу до експерименту	24
2.2. Методи дослідження.....	25
2.2.1. Потенціометричне визначення показників рН та Eh.....	26
2.2.2. Газохроматографічний метод визначення газової фази.....	27
2.2.3.Визначення загального вмісту органічних сполук методом перманганатометрії	28
2.3. Висновки до розділу	29
РОЗДІЛ 3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА ТА РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ	31
3.1. Загальна характеристика зброженого осаду метантенка	31
3.2. Отримання очищеного хітину з членистоногих шляхом гідролізу анаеробним мікробним угрупованням зброженого осаду метантенку.....	32

3.3. Результати досліджень.....	35
3.4. Оцінка ефективності застосування мікробіологічного методу отримання очищеного хітину	38
3.5. Висновки до розділу	38
ВИСНОВКИ.....	40
СПИСОК БІБЛОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	42
Додаток.....	47

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ

- ЗОМ – зброджений осад метантенка;
- Eh або ОВП – окисно-відновний потенціал (редокс-потенціал);
- МУ – мікробне угруповання;
- МФ – мінеральний фон;

ВСТУП

Актуальність теми. Пошуки альтернативних джерел і способів отримання промислово-перспективних сполук та речовин - одна із головних задач ХХІ століття. Одною з таких сполук є хітин завдяки своїм унікальним властивостям та широкому спектру застосування. Учені з усього світу зацікавлені в пошуках ефективних способів отримання цього природного полімеру.

Найбільш доступними і масштабними джерелами отримання хітину є панцирі ракоподібних, кальмарів, біомаса міцеліальних і вищих грибів, але альтернативним джерелом хітину є комахи. За рахунок швидкого розмноження комах можна за короткі терміни отримати значну кількість хітин-вмісної біомаси, саме тому тема моєї дипломної роботи є актуальною.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи є довести ефективність мікробіологічного методу отримання очищеного хітину з екзоскелету комах двокрилих.

Для досягнення поставленої мети необхідно виконати наступні завдання:

- провести аналіз літературних даних щодо способів отримання та використання хітину і хітозану;
- оцінити доцільність використання хітозану у подоланні екологічних проблем;
- розглянути комах, як перспективне джерело для використання у біотехнології;
- провести аналіз отриманих даних по експериментальній частині дипломної роботи;
- оцінити доцільність використаних методів по результатам роботи;
- довести ефективність мікробіологічного методу отримання хітину.

Об'єктом дослідження є динаміка та закономірність депротейнізація хітину комах.

Предметом дослідження слугував хітин екзоскелету *Diptera sp.*

Методи дослідження: аналітичний, мікробіологічний та біотехнологічний.

Наукова новизна роботи. Вперше було використано зброджений осад метантенку для отримання депротеїнізованого (деполімеризованого) хітину з екзоскелету *Diptera sp.* мікробіологічним методом.

Особисті внески. Експериментальну роботу, аналіз літературних джерел, обробка результатів дослідження та опис зроблені випускником під керівництвом професора, д.т.н. О.Б. Таширева на базі Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

Публікації. За матеріалом моєї дипломної роботи були написані тези:

Danko Y. Microbial destruction of arthropoda tissues to obtain chitin/ Y.Danko, O.Navryliuk, V.Hovorukha, O.Tashyrev, L.Yastremska // Conference materials of the II young scientists conference “Youth and modern problems of microbiology and virology” (23-26 November, 2020), Abstr. – Kyiv. – IMV NASU – Ukraine, 2020. – P. 12.

РОЗДІЛ 1

АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД НАУКОВО-ТЕХНІЧНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна інформація про хітин та хітозан

Хітин – це біополімер, найбільш поширений у природі після целюлози. Він входить до складу екзоскелету та інших скелетних елементів членистоногих, клітинної стінки грибів, водоростей і ін. Хітин являє собою лінійний полісахарид, що складається з N-ацетил-2-аміно-2-дезоксид-D-глюкопіранози, пов'язаної 1-4 глікозидними зв'язками. У виділеному з природних джерел хітині, як правило, міститься від 5 до 10% залишків 2-аміно-2-дезоксид-D-глюкози [1, 2].

Хітин в організмах знаходиться у складі комплексів з білками. Біосинтез хітину відбувається за участю ферменту хітинсинтази в спеціальних клітинних органелах – хітосомах [3].

Хітин не розчиняється у воді, лугах, розведених кислотах, спиртах, інших органічних розчинниках, проте він розчиняється у концентрованих соляній, сірчаній та мурашиній кислотах, а також в деяких сольових розчинах при нагріванні, причому при розчиненні він істотно деполімеризується [4]. Хітин здатний утворювати комплекси з органічними речовинами, такими як холестерин, білки, пептиди, а також має високу сорбційну ємкість по відношенню до важких металів та радіонуклідів.

Хітин не розкладається під дією ферментів ссавців, але гідролізується деякими ферментами комах, грибів і бактерій, що відповідають за розпад хітину в природі [5].

Хітозан є диацетильованою похідною хітину, що представляє собою полімер з β -D-глюкозамінових ланок. Хітозан отримують (рис. 1.1.) за реакцією відщеплення від структурної одиниці хітина ацетильного угруповання. Реакція має назву дезацетильовання і супроводжується одночасним розривом глікозидних зв'язків полімеру. Особливістю хітозану є його структурна неоднорідність [1].

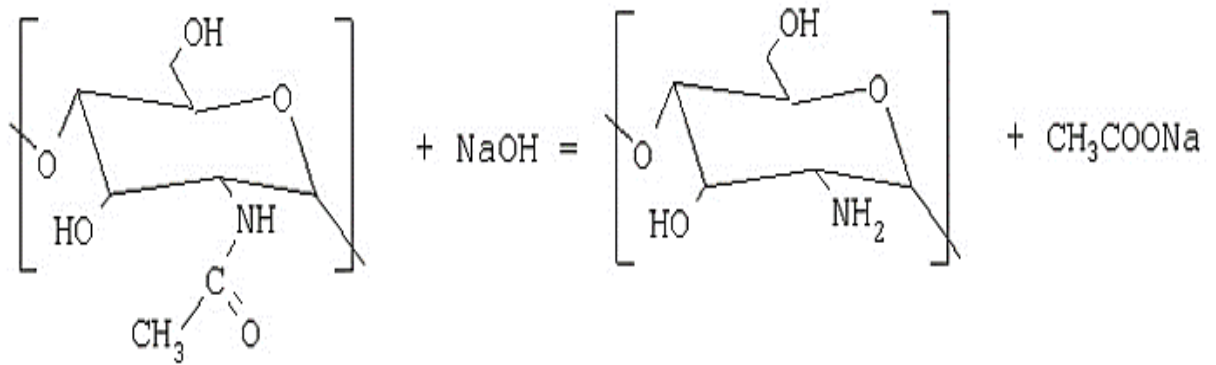


Рис. 1.1. Реакція отримання хітозану з хітину [7]

На даний момент відсутні загальноприйняті критерії для розрізнення хітозану і хітину в залежності від вмісту N-ацетильних груп. Для зручності ця умовна межа може бути проведена за ступенем ацетилювання. У хітина ступень ацетилювання становить понад 50%, а у хітозана – менша [1].

На відміну від практично нерозчинного хітину, хітозан розчинний в розведених неорганічних кислотах (соляної, азотної) і органічних (мурашиної, оцтової, янтарної, молочної, яблучної), але не розчиняється в лимонній і винній кислотах [6].

Хітозан має додаткову функціональну групу (аміногрупа NH_2), тому крім простих і складних ефірів з хітозану можна отримати N-похідні різного типу, що істотно розширює можливості його застосування [2].

1.2. Способи отримання хітину

Існують різні методи виділення хітину з сировини і його перетворення в хітозан. Найбільш ефективними є хімічний, біотехнологічний та електрохімічний методи.

Хімічний метод є одним з найбільш старих способів отримання хітозану. Цей метод полягає у послідовній обробці сировини лугами і кислотами. Процес видалення білків (депротеїнізація) здійснює за допомогою обробки подрібненої

хітинвмісної сировини розчином лугу. Як правило, застосовується гідроксид натрію. Далі слідує процес демінералізації, який проводиться в розчині соляної кислоти, до повного видалення мінеральних солей з сировини. Процес знебарвлення (депігментації) проводять з використанням окислювачів, наприклад, перекису водню. Процес деацетилювання здійснюють нагріванням сировини у концентрованому розчині лугу. Отриманий хітозан далі послідовно промивають водою і метанолом.

Альтернативним способом отримання хітину і його подальшого перетворення в хітозан є проведення спочатку стадії демінералізації, а потім - стадії депротейнізації. Отриманий за цією схемою продукт є більш якісним у порівнянні з хітином, отриманим за схемою «депротейнізація – демінералізація».

До переваг хімічного способу отримання хітину можна віднести високу ступінь депротейнізації і демінералізації хітину, невеликий час обробки сировини і відносну доступність а також дешевизну реагентів [8-10].

Біотехнологічний спосіб передбачає використання ферментів для депротейнізації сировини, продуктів молочнокислого або оцтовокислого бродіння для демінералізації і хімічних реагентів для депігментації. Для досягнення високого ступеня депротейнізації найбільш ефективними є застосування ферментів і ферментних препаратів мікробіологічного і тваринного походження, таких, як панкреатин, кислі протеїнази Г10Х, лужні протеїнази Г20Х [11, 12].

Цей спосіб реалізується в м'яких з хімічної точки зору умовах, при суміщенні в одному процесі декількох операцій - депротейнізації і демінералізації, що спрощує процес і призводить до підвищення якості готового продукту, максимально зберігаючи функціональні властивості хітозану [13].

Електрохімічний метод отримання хітозану дозволяє в одному технологічному процесі отримувати хітин досить високого ступеня очищення та цінні в харчовому відношенні білки і ліпіди. Сутність технології отримання хітину електрохімічним способом полягає в проведенні стадій депротейнізації, демінералізації і знебарвлення хітинвмісної сировини у водно-сольовій суспензії в електролізерах під дією

електромагнітного поля, спрямованого потоку іонів (H^+ та OH^-), що утворюються в результаті електролізу води і ряду низькомолекулярних продуктів, які обумовлюють кислу або лужну реакцію середовища, а також її окисно-відновний потенціал [14]. Серед переваг даного методу є відсутність необхідності в застосуванні токсичних хімічних реагентів. Отриманий у такий спосіб хітозан має значну сорбційну ємкість та є біологічно-активною речовиною.

1.2.1. Недоліки способів отримання хітину

Недоліком хімічного способу отримання хітину є велика кількість відходів та використання агресивних реагентів, що призводить до небажаних наслідків. Це - деструкція хітину, гідроліз та модифікація білка і ліпідів, і як наслідок - погіршення якості цільових продуктів і зменшення молекулярної маси хітозану [5].

Обмежує біотехнологічний метод отримання хітину також застосування дорогих ферментів, невисока ступінь депротейнізації хітину навіть при застосуванні декількох послідовних операцій у ферментерах, а також необхідність забезпечення стерильності виробництва. Тому в даний час цей метод є недосконалим і поки що не знайшов широкого застосування в промисловості [12].

Недоліком електрохімічного методу отримання хітину є також велика енерговитратність [14].

1.3. Сировина для отримання хітину

Хітин присутній в екзоскелеті членистоногих (ракоподібні, комахи), скелетних елементах морського зоопланктону, клітинної стінки грибів і дріжджів [15]. Даний полімер також міститься у стінках цист інфузорій, голках діатомових, клітинах зелених, золотистих і гаптофітових водоростей. Він відсутній у прокариотів і рослин [16].

Ракоподібні. В даний час основним джерелом для отримання хітину і хітозану є такі членистоногі, як ракоподібні. Найбільш доступними промисловими сировинними об'єктами для отримання хітозану є відходи переробки крабів, креветок, лобстерів та ін. Головною особливістю такої сировини є відсутність витрат на її отримання [17-19].

В панцирах ракоподібних присутня α -форма хітину, який утворює нанофібрилли діаметром 3 нм, що містять по 19 молекулярних ланцюжків довжиною близько 0,3 мкм [18]. Хітин утворює комплекси з білками (до 50%), при взаємодії з аспарагіновою кислотою і залишками гістидину, мінералами (аморфні карбонати і фосфати кальцію) і пігментами (лютеїн, β -каротин, астаксантин), що додають хітину механічну міцність і пружність [19].

Природний хітин крабів не буває повністю ацетильованим і містить до 82,5% ацетилглюкозоаміна, 12,4% глюкозоаміна і 5% води [1].

Найбільш масово видобувається рачок-бокоплав *Gammarus (Rivulogammarus) lacustris*. Його запаси обчислюються тисячами тон, а вилов не призводить до небажаних змін біологічної рівноваги у водоймах. Відносно високий вміст хітину (25-30 %) і мала товщина панцира (100-500 мкм) полегшують процес його переробки для отримання хітину і хітозану [20].

Ще одним з перспективних джерел є антарктичний криль (*Euphausia superba*), який мешкає в Атлантичному, Тихоокеанському і Індоокеанському секторах Антарктики. Його запаси складають 50 млн. тон, а вихід хітину після обробки криля-сирцю є достатньо високим, - близько 1% [21].

Гриби. Доступним джерелом отримання хітину і хітозану є гриби. Клітинна стінка майже всіх грибів, за винятком *Acrasiales*, містить хітин. Вміст хітину відрізняється у грибів різних таксонів і коливається в залежності від умов культивування і систематичного положення організму (від 0,2% до 26% від сухої маси). Наприклад, вміст хітину у *Aspergillaceae* становить 20-22%, у *Penicillium* – 4,0 -5,5%, вищих грибів - від 3 до 5%, в плодових тілах білого гриба - 6,7%. Вміст хітину різний навіть у грибів, що відносяться до одного роду. Наприклад, серед

мікроміцетів сімейства *Aspergillaceae* вміст хітину у *A. flavus* містить до 22% від сухої маси, а у *A. parasiticus* - 15,7%. Вміст хітину у деяких грибів значно варіює в межах виду різних штамів, наприклад у *A. niger*, - від 11,7% до 24% від сухої маси [22].

Клітинна стінка грибів являє собою систему мікрофібрилл, вбудованих в аморфний матрикс. Такі фібрили або скелетні компоненти в залежності від видової приналежності грибів можуть бути побудовані з целюлози, глюкана і хітину. Решта полісахаридів, білків, пігментів, ліпідів служать «цементними» речовинами, що утворюють хімічні зв'язки з мікрофібрилярною частиною клітинної стінки. Сполука β -1,3-глюкан утворює найбільш міцний комплекс з хітином за рахунок ковалентних зв'язків, хітин-глюкановим комплексом (ХГК), який становить «скелет» грибної клітини.

Хітин з грибів можна отримувати двома способами: шляхом цілеспрямованої ферментації і з відходів виробництв органічних кислот, ферментів, антибіотиків. Відділити глюкани від хітину важко, тому доцільніше отримання хітин-глюканових і хітозан-глюканових комплексів. Також можна виділяти безпосередньо хітозан, який входить до складу клітинної стінки деяких міцеліальних грибів, таких як *Mucor spp.*, *Rhizopus spp.*, *Absidia coerulea*, *A. glauca*, *A. orchidis* [23, 24].

Комахи. Комахи є найчисленнішим класом тваринного світу, що нараховує понад мільйон видів. Покрив тіла комах складаються з двох структур - живих клітин епідермісу і неклітинної кутикули. Кутикула утворює зовнішній скелет, що покриває все тіло, і підрозділяється на два шари. Товстий внутрішній шар прокутикули (товщиною до 200 мкм) відрізняється високим вмістом води (30-40%) і складається з хітинових волокон, вбудованих в білкову матрицю. Тонкий зовнішній шар епікутикули позбавлений хітину (товщиною 1-3 мкм) [24]. Проникна для води прокутикула виконує функцію механічного захисту тканин і клітин, а водонепроникна епікутикула - захисту від висихання. Прокутикулу ділять на м'яку ендокуютикулу, що примикає до епідермісу, і розташовану над нею більш міцну екзуютикулу. В області ендокуютикули процеси затвердіння і пігментації не

виражені. Полімерні молекули хітин-протеїнового комплексу утворюють шари, складені з найтонших пластинок - ламел. В області екзокутикули цей комплекс стабілізується хінонами і просочується меланіновими пігментами. Кутикула членистоногих в просторової геометрії є одним з кращих прикладів холестеринових рідких кристалів. Утворення позаклітинного матриксу йде за принципом самовпорядкування типу рідких кристалів [25].

Частка хітину в кутикулі комах висока і досягає у деяких видів 50%. Хітин також міститься і в вистиланні великих трахей, одноклітинних залозах, в перитрофічній оболонці [25].

Також до складу екзоскелету членистоногих, крім хітину, входять білки, які складають від 25 до 50% сухого матеріалу кутикули, і ліпіди (3,5-22%) [26, 27]. З неорганічних речовин найчастіше присутні нейтральні солі кальцію (карбонати, фосфати), які утворюють комплекси з білком. Вміст мінеральних речовин невеликий і не перевищує 1-3% [24].

1.4. Застосування хітину та хітозану у біотехнології

Хітин є відносно новим полімером для використання у біотехнології. Його властивості та застосування тільки вивчаються вченими на дослідницькому рівні. Вивчена ефективність застосування хітину та хітозану у медицині. Але використання біоплімерів для подолання екологічних проблем людства є актуальним питанням сьогодення.

1.4.1. Застосування хітину та хітозану в очищенні стічних вод

Хітозан ефективно поглинає пестициди, білки та барвники [31]. Хітозан здатний хелатувати іони металів завдяки наявності лабільної аміногрупи. Здатність хітозану хелатувати метали використовується для очищення стічних вод від металів.

Для очищення металовмісних стічних вод використовують фізичні, хімічні та біологічні методи [9].

Для очищення стічних вод використовують осадження іонів металів лугами або сульфідами, окислення або відновлення, іонообмін, поділ на фракції «рідка - тверда фаза», метод «декантування-флотації» та мембранне фільтрування. Але головним недоліком цих методів є утворення великих об'ємів вторинних токсичних відходів. Тому для вилучення з розчинів іонів металів були розроблені більш ефективні методи очищення за використання синтетичних або природних полімерів, таких як хітозан[30].

Широко вивчалася адсорбція металів активованим вугіллям. Крім того, проведено дослідження з пошуку більш ефективних та дешевих сорбентів. Вивчалася адсорбція металів живими організмами (бактеріями, грибами, морськими водоростями тощо) або хімічними речовинами, вилученими з цих організмів. Досліджено ефективність вилучення металів такими природними сполуками, як буре вугілля, торф та хітозан.

Здатність хітозану утворювати комплекси з іонами металів викликала інтерес у дослідників [38, 39]. Важко порівняти різні дослідження через велику мінливість експериментальних умов. Показано, що на процес хелатування та стабільність комплексу «метал-хітозан» може впливати змішування (механічне чи ультразвукове)[41]. Здатність хелатувати може також залежати від агрегатного стану хітозану (порошку, гелю, клітковини або плівки) [31].

Основними забруднювачами природних екосистем є пестициди, вуглеводні та важкі метали.

Джерела забруднення дуже різні. Головними джерелами забруднення докілья металами є промислові стічні води гірничо-видобувних та переробних комплексів[38]. Метали присутні у міських стічних водах (у відходах фармацевтичних препаратів, косметики, пральних порошків, тощо) та у відходах таких виробництв, як паперові фабрики, комбінати з синтезу барвників, консервна промисловість, тощо. Автомобілі також можуть забруднювати поверхневі води та

грунти внаслідок спалювання палива, що містить добавки свинцю. Доведена наявність у стічних водах промислових районів токсичних металів, таких як цинк, кадмій, свинець, хром та ртуть.

Показано, що очищення стічних вод від катіонів важких металів з використанням хітозану є ефективним та відбувається у короткі терміни. Ефективність очищення стоків від іонів важких металів за допомогою хітозану, отриманого з хітину, становить від 50 до 80%. Ефективність залежить від хімічних властивостей катіону металу. Найкраще очищення стоків досягається щодо катіонів кадмію [37].

1.4.2. Застосування хітину та хітозану у виробництві біоплівок

В останні роки виробництво плівок із природних полімерів значно зросло у харчовій промисловості як альтернатива синтетичним плівкам на нафтовій основі. Хітозан є одним з найбільш перспективних біополімерів для виробництва плівки на біологічній основі завдяки своїй біосумісності, біодеградабельності, антиоксидантній активності та антимікробним властивостям [29, 30].

Такі біоплівки відносять до хімічної і біотехнологічної технології, точніше до плівкових матеріалів харчового призначення на основі хітозану. Плівкові матеріали харчового призначення на основі хітозану можуть бути використані в харчовій промисловості і сільському господарстві, а також у медицині, фармакології, косметології [29].

Завдяки тому, що хітозан характеризується біосумісністю, нетоксичністю, біодеградабельністю, вологостійкістю, міцністю, високою антибактеріальною і антигрибковою активністю, спосіб отримання плівкового матеріалу харчового призначення включає в себе розчинення хітозану в органічній кислоті, в якості якої використовують 2-4% оцтову кислоту. В отриманий розчин хітозану вводять антибактеріальну і антифунгальну добавки у вигляді нанокластерного срібла. Після інтенсивного механічного перемішування отриману суміш наносять на підкладку з

подальшою витримкою на підкладці до досягнення плівкової структури. Обробку отриманої плівки нейтралізують реагентом з наступним промиванням плівки дистильованою водою.

Нейтралізований і промитий плівковий матеріал відокремлюють від підкладки і сушать при температурі 20 °С протягом 72 годин, або при температурі 50 °С протягом 24 годин.

Винахід дозволяє отримати плівковий матеріал харчового призначення на основі хітозану, що характеризується вологостійкістю і не розчиняється у воді та має величину руйнівної напруги при розриві не менше 40 МПа [30].

Отже, новим перспективним напрямом біотехнології є виготовлення біоплівки харчового призначення. Біоплівки призначені для широкого спектру застосування в різних сферах суспільства. Створення біоплівки харчового призначення є актуальним питанням сьогодення. Вчені зацікавлені у створенні екологічного пластикового посуду, плівок, пакетів та іншого приладдя, а хітин отриманий з комах може стати чудовою сировиною для цього.

1.4.3. Застосування хітину та хітозану у медицині та фармацевтичній промисловості

У медицині та фармацевтичній промисловості біополімери використовуються у вигляді порошків, мазей, гелів, присипок, пов'язок, губок, штучної шкіри для лікування і усунення дефектів, поразок і опіків слизової оболонки порожнини рота і зубів [18], репарації дефектів і регенерації кісткової тканини, а також для загоєння ран, забезпечуючи механічний захист і стимулюючи процеси регенерації пошкоджених тканин (забезпечується прискорення загоєння в 3-4 рази) [19].

Сульфат хітозану, що характеризується антикоагулянтною активністю використовується в якості аналога гепарину, який уповільнює згортання крові і перешкоджає виникненню тромбів [22]. Завдяки біосумісності і малої токсичності, хітозан використовується як функціональний матеріал у вигляді основи для

створення мембран, що мають адгезивні властивості, плівок, наночастинок і наносистем для транспорту вітамінів, білків, пептидів і лікарських засобів, що вводяться різними методами (перорально, нозально, парентерально), з пролонгованою дією [20, 21].

1.5. Промислово–перспективні комахи та їх застосування

Комахи – це клас безхребетних членистоногих тварин, які згідно класифікації відносяться до трахейнодихаючих. З промислово - перспективних членистоногих виділяють цвіркунів, коників, саранчу, комах-двокрилих, хрущів та лялечок.

Приклади промислово культивованих комах та сфери їх використання представлені у таблиці 1.1 [42].

Таблиця 1.1

Промислово-перспективні комахи та їх застосування в світі

Промислово-перспективні комахи	Назва латинською	Сфера та країна застосування
Цвіркуни		
Польового цвіркуна	<i>Gryllus assimilis</i>	застосовується в Азії в якості живого корму для тварин
Двуп'ятнистий цвіркун	<i>Gryllus bimaculatus</i>	широко культивується в Таїланді, а також в Лаосі і Камбоджі для споживання в їжу людиною
Тропічного цвіркуна	<i>Gryllodus sigillatus</i>	вирощують в якості живого корму для тварин
Коричневого цвіркуна	<i>Teloegryllus testaceus</i>	культивують в Північній і Південній Америці для споживання в їжу людиною
Домового цвіркуна	<i>Acheta domesticus</i>	вирощують в якості живого корму для домашніх тварин в багатьох країнах. У Нідерландах вирощують для споживання людиною та широко вирощують в Таїланді і сусідніх країнах

Хрущі		
Борошняного хруща	<i>Alphitobius diaperinus</i>	вирощують як корм для домашніх тварин, а в деяких країнах також для споживання людиною
Хрущак борошняний гігант	<i>Zophobas morio</i>	виробляється на корм тваринам
Мухи		
Домова муха	<i>Musca domestica</i>	личинки якої, відомі як опариші, виробляються в промислових масштабах в Південній Африці і Китаї. Вирощуються на корм сільськогосподарським тваринам
М'ясна муха	<i>Chrysomya chloropyga</i>	є експериментальною у виробництві в Південній Африці на корм тваринам

1.6. Висновки до розділу

Завдяки унікальним властивостям, хітин та хітозан ціняться в усьому світі. Доведена необхідність пошуків нових способів отримання біополімерів. Мікробіологічний метод, на відміну від інших представлених методів, легкий у виконанні і не потребує великих затрат.

У світі існує багато різновидів промислово-перспективних комах, яких вирощують, в основному, в якості їжі людям або на корм тваринам. Але також можливе використання хітину, отриманого з комах для вирішення більш глобальних проблем, наприклад для очищення стічних вод або виготовлення біоплівок.

Використання комах, як джерела отримання хітину, більш ефективно, на відміну від грибів та ракоподібних. Значення членистоногих в наш час недооцінене,

адже за рахунок швидкого, дешевого та безвідходного вирощування цей напрямок є перспективним.

Відкриття ферм на території України по розведенню комах може скласти значну конкуренцію вилову чорноморського криля, який використовують для отримання очищеного хітину, але не порушуючи баланс екосистеми моря.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Підготовка матеріалу до експерименту

Для дослідження закономірностей та динаміки депротейнізації хітину комах з екзоскелету *Diptera sp.* (рис. 2.1.) були використані скляні флакони об'ємом 50 мл, що закривали гумовими пробками та фіксували гвинтовими затворами.



Рис. 2.1. Висушені комахи *Diptera sp.*

У дослідах були використані два градуйовані флакони об'ємом 50 мл, які закривали гумовими пробками та загвинчували пластиковими затворами з отворами для відбору проб. Гумові пробки стерилізували кип'ятінням протягом 20 хв. у дистильованій воді. Пластикові затвори стерилізували дезінфікуючими засобами, такими як етиловий спирт з розчином йодом.

Водопровідну воду стерилізували при 1,5 атм. протягом 20 хв.

Для гідролізу нутроців комах двокрилих необхідно було фрагментувати субстрат. Процес подрібнення проводили на кавомолці фірми «Saturn» з дотриманням заходів безпеки. Ефективність подрібнення контролювали за використання мікроскопу «МИКМЕД-2», об'єктив $\times 100$, загальне збільшення у 1000 разів.

Для приготування середовища використовували базові концентровані розчини NH_4Cl , KH_2PO_4 та Na_2SO_4 . Концентрація NH_4Cl становила 200 г/л, KH_2PO_4 з концентрацією 200 г/л, Na_2SO_4 з концентрацією 100 г/л готували шляхом розчинення зважених кристалів солей у дистильованій воді. Флакони закривали ватно – марлевими пробками та стерилізували при 1,5 атм протягом 20 хв. Після стерилізації розведені розчини вносили до флаконів в якості МФ.

2.2. Методи дослідження

Предметом дослідження слугував хітин з екзоскелету *Diptera sp.*, об'єктом дослідження є закономірності та динаміка депротейнізація хітину комах.

Показниками ефективності депротейнізації хітину слугувала зміна рН, Eh, вмісту загального [C] та склад газу (H_2 , O_2 , N_2 , CH_4 , CO_2).

Кислотність середовища є важливим фактором, що визначає існування в ній мікроорганізмів. При анаеробному процесі рН середовища знаходиться в межах від 6,9 до 7,5. Зміна значення Eh, є критерієм напряму та ефективності метаболічного процесу. При активному рості мікроорганізмів відбувається зниження Eh до негативних значень, це свідчить про анаеробний процес деструкції внутрішніх тканин комах, і насамперед – білкових сполук.

Зі зниженням Eh зростає концентрація розчинних органічних сполук у водній фазі, що є характерним для початку депротейнізації (гідролізу твердих білкових полімерів). Подальше зниження концентрації розчинних органічних сполук відбувається через деструкцію мікроорганізмами продуктів гідролізу білкових полімерів. Параметри вимірювалися один раз на добу.

2.2.1. Потенціометричне визначення рН та Eh

Потенціометричне визначення рН і Eh проводили за допомогою комбінованого іоніміру універсального «MP103» (рис. 2.2.). Прилад використовують для оцінки кислотності, окисно-відновного потенціалу та температури розчинів.



Рис. 2.2. Іонімір фірми «EZODO» для вимірювання рН і Eh

Для вимірювання рН використовували скляний електрод РУ41. Діапазон визначення кислотності сягає від -2.00 до 16.00 рН.

Eh (редокс-потенціал) визначають за допомогою платиного електроду з діапазоном визначення від -1999.0 до 1999.0 mV.

Електроди калібрували за допомогою буферних розчинів. Точність визначення показників дорівнює ± 0.01 рН та ± 2 mV.

Зразки рідини з флаконів відбирали, використовуючи пластикові шприци об'ємом 5,0 мл (фірми «Medicare»).

2.2.2. Газохроматографічний метод визначення газової фази

В процесі мікробної деструкції органічних сполук визначали склад газової фази методом газової хроматографії (рис. 2.3.).



Рис. 2.3. Газовий хроматограф з Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного

Відбір проб газової фази здійснювали пластиковими стерильними шприцами об'ємом 2,5 мл. Проби відбирали, проколюючи голкою отвір у затворі з гумовою пробкою флакону.

Склад газової фази визначали за стандартною методикою на газовому хроматографі ЛХМ-8-МД [46]. Використовували дві колонки – перша (I) для аналізу H_2 , O_2 , N_2 і CH_4 , друга (II) – для аналізу CO_2 . Параметри колонок: I – $l = 3$ м, $d = 3$ мм, сорбент 13X (NaX); II – $l = 2$ м, $d = 3$ мм, сорбент Porapak-Q; температура колонок, випарника і детектора $+ 50$ °C, струм детектора – 50 мА. Аргон – газ-носіє; швидкість потоку газу – 30 мл/хв. Вміст газів (у %) розраховували за площиною піків, що реєструвались самописцем полярографа використовуючи формулу:

$$C = K \cdot S \cdot M, \quad (2.1)$$

де C – концентрація газу, %;

K – коефіцієнт, який показує піки вимірювання одного газу при різній чутливості, % /мм². Коефіцієнт визначається при калібруванні приладу;

S – площа піку, мм²;

M – чутливість детектора, при якій проба газової фази проходила через колонку.

2.2.3. Визначення загального вмісту органічних сполук методом перманганатометрії

Загальний вміст органічних сполук [C] визначали за допомогою перманганатного методу [40]. Відбирали аліквоту (2 мл) досліджуваної культуральної рідини та центрифугували на стаціонарній центрифугі ОРп-8 у режимі 5000 об/хв протягом 15 хв. У хімічно чисту пробірку вносили 1 мл досліджуваної рідини та 0,1 мл розведеної сірчаної кислоти (H₂SO₄). Суміш нагрівали на водяній бані до кипіння. Після цього додавали 0,05 мл стандартного 0,1% розчину KMnO₄.

Розчин титрували до появи світло-фіолетового кольору, типового для перманганат-аніону. Концентрація вуглецю в зразку є прямо пропорційною кількості окисника KMnO₄, необхідного для завершення реакції окиснення органічних сполук аніоном MnO₄⁻. Нижня межа чутливості перманганатного титрування становила 25 мг С/л розчину. Діапазон визначення – 25 – 500 мг/л (рис. 2.4.). За перевищення максимальної межі культуральну рідину потрібно розводити.

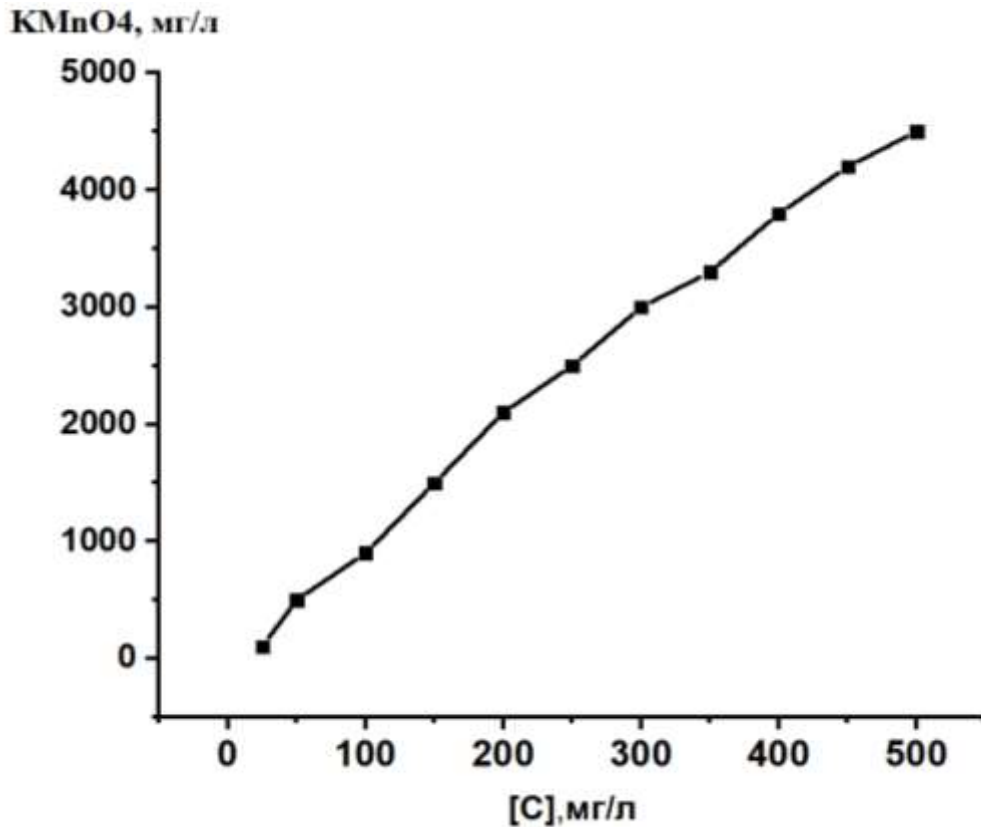


Рис. 2.4. Калібрувальна крива для визначення загального вмісту органічних сполук у розчинах

Вміст загального вуглецю (мг/л) розраховували за формулою:

$$[C] = 0,11 \cdot V_{\text{KMnO}_4} - 12,168 \quad (2.2)$$

2.3. Висновки до розділу

При виконанні експериментальної частини моєї дипломної роботи були використані висушені тканини комах *Diptera sp.*, які подрібнювали перед гідролізом. Інтенсивність та динаміку деструкції тканин членистоногих вивчали, використовуюючи потенціометричні методи (зміну рН та Eh), газохроматографічний метод та перманганатометричний метод дослідження. Встановлена закономірність зміни показників та необхідність визначення всіх параметрів. Також зазначені такі

методи дослідження, як мікробіологічні (процес культивування), фізико-хімічні (приготування мінеральних солей, середовища, стерилізація, центрифугування, подрібнення а також вимірювання рН і Eh) та статистичні методи дослідження (розрахункова частина та систематизація отриманих даних).

РОЗДІЛ 3

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА ТА РЕЗУЛЬТАТИ ДОСІДЖЕННЯ

3.1. Загальна характеристика зброженого осаду метантенка

В якості інокуляту використовували не пастеризоване нативне анаеробне мікробне угруповання зброженого осаду метантенку, привезеного з Бортницької станції аерації у 2019 році (рис. 3.1.).



Рис. 3.1. Метантенк на Бортницькій станції аерації

ЗОМ містить гідролізуючі мікроорганізми, що розкладають білки, жири і вуглеводи, за рахунок чого йде активне виділення CH_4 , що є свідченням деструкції продуктів гідролізу полімерів. Також присутні багато інших фізіологічних груп бактерій (метаногени, воденьсинтезуючі, азотфіксуючі) [43].

Більшість гідролітичних, у тому числі і протеолітичних бактерій метантенків є клостридії. Виявлено також протеолітичну активність бактерій родів *Peptococcus*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*.

Основними технологічними характеристиками, що визначають ефективність процесу анаеробного зброджування осаду метантенка, є хімічний склад, температура, тривалість зброджування, концентрація органічних сполук, а також режим завантаження і перемішування вмісту камери зброджування.

Одним із найважливіших факторів, що впливають на швидкість росту анаеробних мікроорганізмів і ефективність зброджування осаду, є температура. Виділяють три основні температурні зони життєдіяльності мікроорганізмів: психофіли – до 20 °С, мезофіли – від 20 до 40 °С і термофіли – від 50 до 70 °С [45].

Структура осаду, зброженого в метантенках, двоярусних відстійниках і інших спорудах анаеробного зброджування, дрібна і однорідна, колір - майже чорний або темно-сірий. Осади характеризуються високою плинністю та виділенням різкого характерного запаху. У метантенках розпад органічних сполук супроводжується виділенням великої кількості газу - метану.

Вологість осаду, що вивантажується з метантенків, залежить від співвідношення активного мулу по сухій речовині і розпаду беззольної речовини. При зброджуванні суміші осаду з первинних відстійників і ущільнення надлишкового активного мулу, середня вологість осаду, що вивантажується з метантенків дорівнює 97%, а з двоступеневих метантенків - 93% [44].

3.2. Отримання очищеного хітину з членистоногих шляхом гідролізу анаеробним мікробним угрупованням зброженого осаду метантенку

Для дослідження мікробіологічного гідролізу використовували висушені комахи. Тканини ретельно подрібнювали до порошку перед руйнуванням (рис. 3.2.).



Рис. 3.2. Фрагментований субстрат (сухі комахи *Diptera sp.*) перед початком експерименту

Мікробну деструкцію протеїнівмісних сполук проводили у герметичних флаконах об'ємом 120 мл. До флаконів вносили субстрат - по 2 г попередньо фрагментованих комах, 50 мл стерильної водопровідної води та 1 г інокуляту (ЗОМ), а також мінеральний фон - стерильні джерела N, P та S до таких кінцевих концентрацій: 1,0 г/л NH_4Cl , 1,0 г/л KH_2PO_4 0,2 г/л Na_2SO_4 .

В якості інокуляту використали отриманий із зброженого осаду метантенку спеціалізований мікробіом протеолітичних бактерій, як деструктора білкових та інших полімерів.

Флакони закривали еластичними гумовими пробками та пластиковими затворами з отворами для відбору проб із флаконів (рис. 3.3.). Культивування проводили на качалках за постійного перемішування за температури 30 °C протягом 145 діб.



Рис. 3.3. Герметичний флакон для мікробного гідролізу тканин комах

Для вимірювання рН та ОВП використовували потенціометричний метод. Концентрацію розчинних органічних сполук визначали перманганатним методом.

Мікробна деструкція тканин *Diptera sp.* відбувалася у чотири етапи протягом 145 діб (див.дод.). Перший етап тривав від внесення субстрату у флакони до 57 доби. Під час цього етапу контролювалися зазначені параметри. На 57 добу рідину з субстратом відбирали із флаконів та центрифугували. Отриману рідку фазу із залишками органічних сполук зливали, а осад субстрату заливали новою стерильною водопровідною водою. Культивування продовжували при постійному перемішуванні і сталій температурі.

Другий етап тривав з 57 доби до 120 доби, та третій етап з 120 доби до 145 доби деструкції. Після кожного з цих етапів вміст флаконів відбирали, центрифугували, зливали рідку фазу та знову заливали водою.

На четвертому етапі проводили кінцеве центрифугування, надосад зливали, тверду фазу, що залишилася, висушували за кімнатної температури.

Процес деструкції білкових тканин супроводжувався активним виділенням газу за перші два тижні експерименту та характерним запахом розкладання органічних сполук, включно до третього етапу депротеїнізації екзоскелету.

3.3. Результати дослідження

Мікробний гідроліз нутрощів комах тривав 145 днів. Результати дослідження ефективності процесу представлені у таблицях 3.1-3.3.

Таблиця 3.1

Отримані дані по першому етапу мікробіологічної деструкції тканин членистоногих

Доба	pH	Eh	H ₂ %	O ₂ %	N ₂ %	CO ₂ %	[C], мг/л
1	7,00	237,2	5,37	0	43,6	17,16	734
2	7,21	143,3	9,56	0	61,17	20,8	641
7	6,86	78,5	0,114	0,116	45,1	20,28	1131
13	7,11	-82	2,52	0,232	34,56	27,3	897
14	6,92	-197	2,97	0,35	57,7	40,56	1853
19	7	-214	1,73	0,46	40,22	31,2	891
22	7,03	-154	1,88	0,93	50	45,63	862
27	7,26	182,8	1,67	1,86	51,1	31,2	11,63
36	6,26	72	0,228	4,76	30,15	50,44	134
43	6,35	156	0	2,32	25,4	45,63	57,7
50	6,41	193	0,052	4,65	32,1	30,4	58,5
57	6,51	271	0	2,14	52,1	6,2	22

Таблиця 3.2

Отримані дані по другому етапу мікробіологічної деструкції тканин членистоногих

Доба	pH	Eh	H ₂ %	O ₂ %	N ₂ %	CO ₂ %	[C], мг/л
57	6,51	271	0	2,14	52,1	6,2	22
72	6,2	380	0,057	2,77	28,37	8,28	63
85	6,37	389	0	1,5	37	6,4	64
89	6,8	379	0,25	1	26,5	7,3	70
92	7,02	390	0	2	36	5,3	11
97	6,62	50	0,5	3,5	70	4	116
106	6,73	97	0,3	4,5	49	4,2	70
117	7,04	378	0,3	2,6	38	3,6	35
120	5,82	212	0	2,9	50	0	35

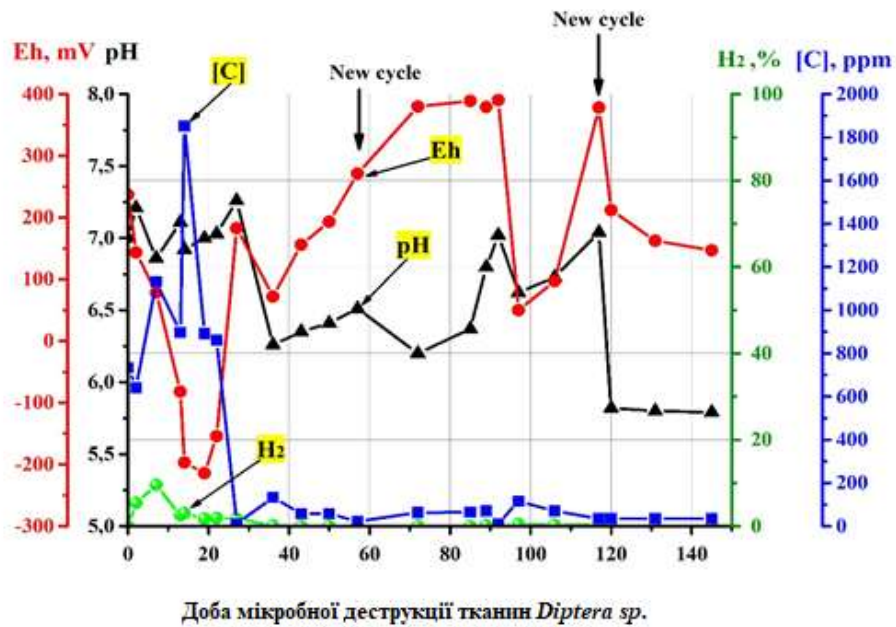
Таблиця 3.3

Отримані дані по третьому етапу мікробіологічної деструкції тканин членистоногих

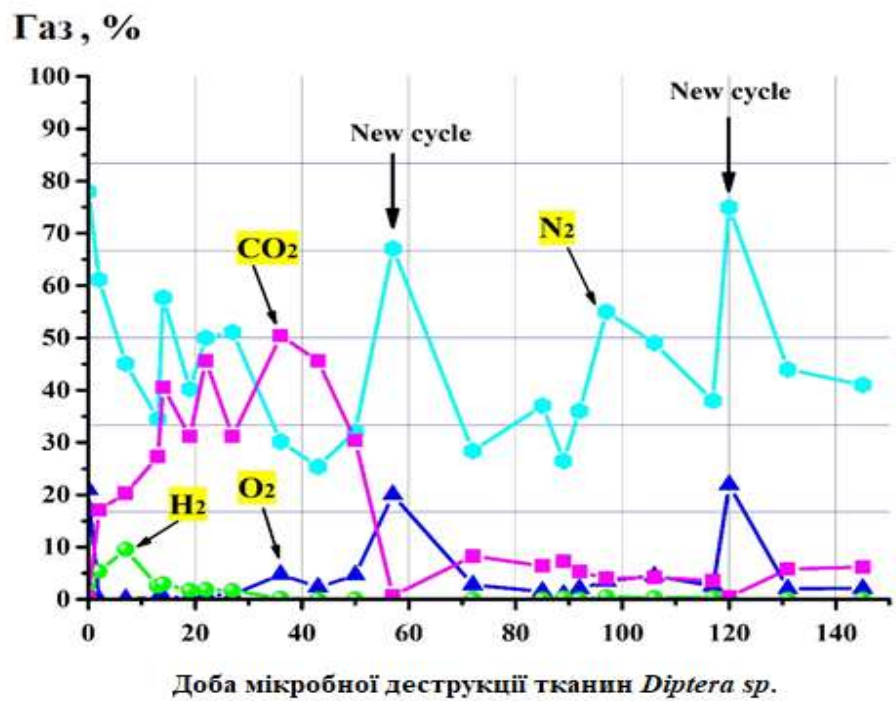
Доба	pH	Eh	H ₂ %	O ₂ %	N ₂ %	CO ₂ %	[C]мг/л
120	5,82	212	0	2,9	50	0	35
131	5,8	162,6	0	2,02	44	5,8	35
145	5,79	146,8	0	2,1	41	6,2	35

Показано мікробну деструкцію тканин членистоногих. Початкова концентрація розчинних органічних сполук становила 734 мг/л. Очевидно, що гідроліз твердих білкових сполук (що містяться в тканинах членистоногих) відбувся під час процесу деструкції. Про це свідчило збільшення концентрації розчинених органічних сполук з 734 мг/л до 1850 мг/л за 14 днів.

Концентрація органічних сполук становила 11 мг/л після 27 днів деструкції. Це свідчить про те, що основний процес деструкції тривав 27 днів. Дані дослідження зображено на рисунку 3.4.



А



Б

Рис. 3.4. Динаміка показників мікробної деструкції органічних сполук за період проведення експерименту: А - рН, Eh та концентрація органічних сполук; Б – газової фази

3.3.1. Оцінка ефективності застосування мікробіологічного методу отримання очищеного хітину

Досліджене нами отримання очищеного хітину з екзоскелету *Diptera sp.* за використання анаеробного мікробіому не є досконалим, але перспективним напрямком для подальших досліджень. У порівнянні з іншими методами отримання очищеного хітину, мікробіологічний метод у виконанні не потребує складних зусиль, великих витрат, але потребує часу. Основний процес деструкції білкових молекул з використанням спеціалізованого мікробіому протеолітичних бактерій тривав 27 діб. З 4,0 г подрібнених тканин членистоногих отримано 0,36 г частково очищеного хітину. За отриманими даними встановлена ефективність процесу деструкції, яка складає 91%.

Ефективність мікробіологічного методу доведена – це було головною метою експерименту.

3.4. Висновки до розділу

Для дослідження мікробіологічного методу отримання хітину шляхом деструкції тканин членистоногих були використані комахи *Diptera sp.* Як деструктор білкових полімерів був використаний мікробіом протеолітичних бактерій зброженого осаду метантенку. Розглянуто склад, властивості та переваги використання зброженого осаду для очищення хітину з комах *Diptera sp.*

Встановлено, що процес деструкції тканин найактивніше відбувався у перші 27 діб експерименту. У цей період активно синтезувався газ (перші два тижні), відбувався гідроліз білкових сполук та закономірна зміна значень рН та Eh. Встановлена концентрація органічних сполук на 27 добу дослідження, що складає 11 мг/л.

Серед існуючих методів очищення хітину від органічних сполук, мікробіологічний метод є більш перспективним за рахунок дешевої сировини та

ефективності процесу. Після 145 діб культивування ефективність деструкції складає 91%, що дає підстави для подальшого дослідження та вдосконалення запропонованого нами методу.

Отримані данні є підставою для подальшого вивчення та вдосконалення процесу мікробної деструкції тканин комах і впровадження мікробіологічного методу в промислову біотехнологію.

ВИСНОВКИ

1. Отримання хітину та хітозану є перспективним напрямом досліджень для промислового застосування. Унікальність та універсальність властивостей цього природного полімеру визначає його застосування у біотехнології полімерів, медицині та фармакології.

2. Хітозан, отриманий з хітину хімічним методом, має широкий спектр застосування. Для подолання екологічних проблем забруднення навколишнього середовища з хітозана, виготовляють біоплівки харчового призначення. Також хітозан використовують для очищення стічних вод від катіонів різних металів. Ефективність такого способу очищення складає від 50 до 80%.

3. Найчастіше, промислове вирощування комах здійснюється на корм тваринам або для вживання людиною в їжу. Але розглядаючи комах, кутикула яких на 50% складається з хітину, як перспективне джерело подолання глобальних проблем людства, видно необхідність створення ферм, для вирощування комах, на території України. Це дасть змогу більш детально вивчити промислово-перспективні види комах та сфери їх застосування, виводити нові гібридні форми та забезпечити Україні передове місце у подоланні світових проблем в сфері екології, медицини та біотехнології.

4. Отримані нами експериментальні дані свідчать про те, що спеціалізований мікробіом гідролітичних (у тому числі протеолітичних) бактерій зброженого осаду метантенків забезпечує деструкцію твердих полімерних білкових сполук членистоногих. Про це свідчить накопичення розчинних органічних сполук у культуральній рідині протягом перших 14 днів. Після цього накопичені, у рідкій фазі, розчинні органічні сполуки були ферментовані мікроорганізмами до кінцевих продуктів - CO_2 і H_2O .

5. У результаті гідролізу 4 г фрагментованих комах отримано 0,36 г частково очищеного хітину.

6. Отримані результати дали змогу встановити ефективність деструкції тканинних полімерів комах, яка складає 91%.

7. Мікробний метод може бути у подальшому використаний для розробки промислових біотехнологій отримання хітину.

СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Хитин и хитозан: получение, свойства и применение / под ред. К.Г. Скрыбина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. – М.: Наука, 2002. – 368 с.
2. Немцев С.В. Комплексная технология хитина и хитозана из панциря ракообразных. / С.В. Немцев – М: Изд-во ВНИРО, 2006. – 134 с.
3. Majeti, N.V. A review of chitin and chitosan applications. / N. Majeti., R. Kumar // *Reactive & Functional Polymers*. – 2000. – Vol.46, №1. – P. 1–27.
4. Muzzarelli R. The discovery of chitin / R. Muzzarelli, C. Muzzarelli. // *Chitosan in pharmacy and chemistry*. – 2002. – Vol.11, №3. – P. 1–8.
5. Данилов С.Н. Изучение хитина. I. Действие на хитин кислот и щелочей. / С.Н. Данилов, Е.А Плиско // *Журнал общей химии*. – 1954. – № 24. – С. 1761–1769.
6. Domard A. Some physicochemical and structural basis for applicability of chitin and chitosan. / F. Stevens, M. Rao, S. Chandrkrchang // *Proc. Asia Pacific Symposium Chitin and chitosan*. – 1996. – P. 1–12.
7. Способ определения полимерных молекул хитозана: пат. № 2295127 Россия, / В.Б.Хабаров, А.Я. Пронин, А.Я. Самуйленко. – №G01N30/02; заявл. 2005; опуб. 2007.
8. Байдалининова Л.С. Биотехнология морепродуктов./ Байдалининова Л.С., Лысова А.С., Мезенова О.Я. и др. – М.: Мир, 2006. – 560 с.
9. Франченко Е.С., Получение и использование хитина и хитозана из ракообразных / Е.С. Франченко, М.Ю. Тамова // Краснодар: КубГТУ, 2005.– С. 156.
10. Majeti N. A review of chitin and chitosan applications. / N.V. Majeti, R. Kumar // *Reactive & Functional Polymers*. – 2000. – Vol.46, №1. – P.1–27.
11. Younes I. Chitin and chitosan preparation from shrimp shells using optimized enzymatic deproteinization / I. Younes, O. Ghorbel-Bellaaj, R. Nasri // *Process Biochemistry*. – Vol.7, №12. – P. 2032. – 2039.

12. Holanda D. Recovery of components from shrimps (*Xiphopenaeus kroyeri*) processing waste by enzymatic hydrolysis / D. Holanda, F.M. Netto // *Journal of Food Science*. – 2006. – №71. – P. 298 – 303.
13. Takeshi H. Enzymatic synthesis of an α – chitin- like substance via lysozymemediate transglycosylation / H. Takeshi, S. Yoko // *Carbohydr. Res*, – 2012. – №1.– P. 16–22.
14. Куприна Е.Э. Особенности получения хитинсодержащих материалов электрохимическим способом / Е.Э. Куприна, К.Г. Тимофеева, С.В. Водолажская // *Журнал прикладной химии*. – 2002.– №5. – С. 840–846.
15. Muzzarelli R. Chitin. / *International series of monographs in analytical chemistry* // Oxford: Pergamon Press, 1977. – 309 p.
16. Cauchie H. Chitin production by arthropods in the hydrosphere / H-M. Cauchie // *Hydrobiologia*. – 2002. – Vol. 470, № 13. – P. 63–95.
17. Красавцев В.Е. Техничко-экономические перспективы производства хитина и хитозана из антарктического криля / Красавцев В.Е. // *Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана: материалы VII Международной конференции, Москва: ВНИРО, 2003. – 7–9 с.*
18. Vincent J. Arthropod cuticle: a natural composite shell system / J.V. Vincent // *Composites: Part A*. – 2002. – Vol.33, №10. – P.1311–1315.
19. Stankiewicz B. Biodegradation of the chitin-protein complex in crustacean cuticle / B. Stankiewicz, M. Mastalerz, C. J. Hof // *Org. Geochem*. – 1998. – V.28, № 12. – P. 67–76.
20. Мезенова О.Я. Гаммарус балтийский – потенциальный источник получения хитина и хитозана / О.Я. Мезенова, А.С. Лысова, Е.В. Григорьева // *Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана: материалы VII Международной конференции. – М.: ВНИРО, 2003. – 32.–33 с.*
21. Антарктический криль: Справочник / Под ред. В.М. Быковой. – М: ВНИРО, 2001. – 207 с.

22. Lipke P. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges / P.N. Lipke, R. Ovalle // *Journal of Bacteriology*. – 1998. – Vol.180, №15. – P.3735–3740.
23. Унрод В.И. Хитин и хитозансодержащие комплексы из мицелиальных грибов: получение, свойства, применение / В.И. Унрод, Т.В. Солодовник // *Биополимеры и клетка*. – 2001. – Т. 17, № 6. – С.526–533.
24. Способ получения глюкан-хитозанового комплекса: пат. № 2043995 Россия, / А.Я. Тесленко, И.Н. Воеводина. А.В. Галкин, Е.Б. Львова и др. №178933489; заявл. 1995; опубл. 1995.
25. Тыщенко В.П. Физиология насекомых / В.П. Тыщенко. – М: Высш.шк, 1986. – 303 с.
26. Giraud-Guille M. Chitin-protein supramolecular order in arthropod cuticles: analogies with liquid crystals / M. Giraud-Guille // *Chitin in life science*. – 1996. – P. 1–10.
27. Tellam R. Chitin is only a minor component of the peritrophic matrix from larvae of *Lucilia cuprina* / R.L. Tellam, C. Eisemann // *Insect biochemistry and molecular biology*. – 2000. – Vol. 30, №12. – P.1189–1201.
28. Харсун А.И. Биохимия насекомых / А.И Харсун. – Кишинев: Карта, 1976. – 170–181 с.
29. Chatelet C. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films / C. Chatelet., O. Damour, A. Domard // *Biomaterials*. – 2001. –Vol.22, №3. – P. 261–268.
30. Kaya M. Use of sea urchin spines with chitosan gel for biodegradable film production // *International journal of biological macromolecules*. – 2020. – № 7. – P. 102–108.
31. Rhazi M. Influence of the nature of the metal ions on the complexation with chitosan. Application to the treatment of liquid waste / M. Rhazi, J. Desbrieres, A. Tolaimate // *European Polymer Journal*. – 2002. – Vol.38, №8. – P.1523–1530.
32. Cho N. Water-soluble chitin as a wound healing accelerator / N. Cho, H. Chung, G. Yoo // *Biomaterials*. – 1999. – Vol.20, №22. – P. 2139–2145.

33. Jagur-Grodzinski J. Biomedical application of functional polymers / J. Jagur-Grodzinski // *Reactive & Functional Polymers*. – 1999. – Vol.39, №2. – P.99–138.
34. Khora E. Implantable applications of chitin and chitosan / E. Khora, L. Lim // *Biomaterials*. – 2003. – Vol.24, №13. – P.2339–2349.
35. Способ получения низкомолекулярного хитозана для противолучевых препаратов: пат. № 2188829 РФ, Россия / В.П. Варламов, А.В. Ильина, Г.Е. Банникова; заявл. 2002.
36. Illum L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient / L. Illum // *Pharmaceutical Research*. – 1998. – Vol.15, №9. – P. 1326.–1331.
37. Тарановская Е.А. Очистка сточных вод с применением хитозана / Е. А. Тарановская, Н. А. Собгайда, И. Н. Алферов // *Вестник Оренбургского государственного университета*. – 2015. – № 10. – С. 322 – 325.
38. Hauer H. First int conf chitin and chitosan // R.A. Muzzarelli, E.R. Pariser // *Proc,MIT Sea Grant Program*. – 1978. – № 6. – P. 263.
39. Muzzarelli R. In: Natural chelating polymers / International series of monographs in analytical chemistry // Oxford (UK): Pergamon Press. – 1973. – vol. 55. – P. 169.
40. Ермакова Л.А. Лабораторный практикум по химии / Л.А. Ермакова, М.В. Воронкова, А.А. Шабельский // *Международный журнал экспериментального образования*. – 2010. – №12. – С. 83–84.
41. Muzzarelli R. Chitin / International series of monographs in analytical chemistry //Oxford (UK): Pergamon Press. – 1977. – vol.59. – P. 142.
42. Курченко В. П. Технологические основы получения хитина и хитозана / В. П. Курченко, С. В. Буга, Н. В. Петрашкевич и др. // *Труды БГУ*. – 2016. – №11. – С. 110–126.
43. СНиП 32.13330.2012. Канализация. Наружные сети и сооружения. – Введ. 01.01.2013. – М.: Минрегион России. 2012. – 97 с.
44. Канализация населенных мест и промышленных предприятий: Справочник проектировщика / [под ред. В.Н. Самохина]. – М.: Стройиздат. 1981. – 629 с.

45. Рубчак И. Ю. Сооружения для обработки городских сточных вод. Проектирование, строительство и эксплуатация / И. Ю. Рубчак, М. Н. Сирота. – М.: Строй-издат, 1978. – 116 с.

46. Другов Ю. С. Газохроматографический анализ загрязненного воздуха: 6-е изд. / Ю. С. Другов, А. А. Родин. – М.: Лаборатория знаний, 2020. – 531 с.

Технологічна схема отримання хітину мікробіологічним методом

