

ГАУ ДО Брянской области «Детский технопарк «Кванториум»

ИНДИВИДУАЛЬНЫЙ ПРОЕКТ

«Утилизация пищевых отходов при помощи протеолитических ферментов»

**Работу выполнила: Сильченко Е. В.,
ученица 11 класса**

Руководитель: Игнатъичев Г. М.

г. Брянск, 2023

СОДЕРЖАНИЕ

1. Введение	3
2. Актуальность	3
3. Гипотеза	3
4. Объект и предмет исследования	3
5. Цель	3
6. Задачи	3
7. Обзор литературы	4
1.1. Протеолитические ферменты	4
1.1.1. Что такое протеолитические ферменты и где они находятся	4
1.1.2. Роль протеолитических ферментов	4
1.1.3. Использование протеолитических ферментов.....	4
1.2. Пищевые отходы	4
1.2.1. Что такое пищевые отходы и их накопление	4
1.2.2 Проблема утилизации пищевых отходов	5
8. Практическая часть	5
1.1. Отбор почв методом конверта	5
1.2. Культивирование протеобактерий в изготовленной базовой среде	6
1.3. Микроскопическое исследование	8
1.4. Проверка протеолитической активности	9
1.5. Проверка расщепления отходов при помощи бактерий, синтезирующих протеолитические ферменты	9
1.6. Создание микробиологического препарата	10
Выводы	11
Список литературы	11

Введение

В наше время на поверхности земли располагается огромное количество отходов пищевого происхождения, что усиливает загрязнение окружающей среды. В связи с большим количеством различных производств и промышленных центров количество отходов данного типа только растет.

Также в нашей стране происходит развитие малого и среднего бизнеса, что поддерживается правительством страны [3]. Часть из них связана с фермерством и животноводством, утилизация же отходов с данных предприятий строго регулируется статьями Федерального Закона [1, 2, 4].

В связи с неэкологичностью и сложностью данной утилизации возможно рассмотрение осуществления данного процесса при помощи протеолитических ферментов, расщепляющих белки до аминокислот.

Актуальность

В современном мире основным способом утилизации пищевых отходов является создание свалок, после долгого нахождения на которых, отходы могут начать выделять вещества, пагубно сказывающиеся на жизни человека и окружающей среде.

Для предотвращения данных процессов возможно утилизирование отходов при помощи препарата на основе микроорганизмов, синтезирующих протеолитические ферменты, что будет обладать большей экологичностью. Так же будет возможно повторное использование аминокислот, выделившихся при разложении мусора.

Проблема:

Накопление пищевых отходов в связи с отсутствием единых экологических методов переработки.

Объект исследования: микроорганизмы, синтезирующие протеолитические ферменты

Предмет исследования: расщепляемость пищевых и животных отходов протеазами

Цель:

Создание микробиологического препарата для утилизации пищевых отходов

Задачи:

1. Анализ литературы по данной теме
2. Отбор проб почвы
3. Выделение и культивирование микроорганизмов, синтезирующих протеолитические ферменты из почвы
4. Проверка выделенных культур организмов на протеолитическую активность

5. Проверка расщепления отходов при помощи бактерий, синтезирующих протеолитические ферменты

Обзор литературы

1. Протеолитические ферменты

1.1. Что такое протеолитические ферменты и где они находятся

Протеолитические ферменты (протеазы) – ферменты, расщепляющие пептидную связь между аминокислотами в белках.

Они присутствуют в организме животных, а именно в желудочном соке, панкреатическом секрете и содержимом кишечника, активируются в просвете двенадцатиперстной кишки. Также данные ферменты синтезируются некоторыми микроорганизмами в процессе их жизнедеятельности.

Микроорганизмы, способные синтезировать протеолитические ферменты, называют протеобактериями.

1.2. Роль протеолитических ферментов

Протеолитические ферменты в организме животных отвечают за расщепление белков до аминокислот, которые всасываются в кровь и распределяются в организме, для дальнейшего белкового биосинтеза. 8 из 20 аминокислот не синтезируются в теле животных, в связи с чем их получение возможно только после расщепления белков, поступивших в организм с пищей. Выделение протеолитических ферментов из микроорганизмов позволяет использовать их в различных целях, таких как создание препаратов для улучшения пищеварения, без вреда более развитым формам жизни [6].

1.3. Использование протеолитических ферментов

Протеазы рассматриваются во многих научных исследованиях в сфере медицины на протяжении долгого времени. Они присутствуют в работах и статьях, посвященных усовершенствованию кормов для домашних животных, использованию их человеком в целях улучшения пищеварения [10], а так же для борьбы с некоторыми заболеваниями, такими как опухоли [9]. Таким образом, все исследования, проводившиеся с протеазами, были сконцентрированы в области здравоохранения и при этом не рассматривали методы нахождения решения других проблем, например, таких как загрязнение планеты пищевыми отходами.

2. Пищевые отходы

2.1. Что такое пищевые отходы и их накопление

Пищевые отходы – пищевые продукты, ставшие непригодными для употребления по тем или иным причинам, 17% произведенной для человека пищи в конечном итоге выбрасывается.

Данные отходы сортируются и необеззараженные накапливаются и хранятся длительное время [8].

2.2. Проблема утилизации пищевых отходов

Наиболее часто используемый способ утилизации пищевых отходов – создание свалок и их сжигание, в связи с чем пищевые отходы становятся причиной выброса в атмосферу более трех миллиардов тонн парниковых газов, среди которых не только углекислый газ, но и более опасный метан. Так же происходит загрязнение подземных вод различными веществами, выделяющимися из пищевых отходов [1, 2, 4].

Практическая часть

1. Отбор почв методом конверта

Материалы: Перчатки технические резиновые, Zip-Lock пакеты стерильные, лопата.

В почве содержится огромное количество различных микроорганизмов, многие из которых способны проявлять различные свойства. В связи с этим было решено проверить почву с различных участков на протеолитическую активность.

Данный метод заключается в том, что на участке по диагонали или по «конверту» (четыре точки по углам и одна в центре) отбирают пробы почвы, затем смешивая их. Использование данного метода обусловлено получением в образце среднего количества микроорганизмов, которые характерны местности взятия проб земли. Это необходимо для выделения из образца среднего количества протеобактерий, обитающих в месте взятия проб почвы [5].

Пробы почвы были взяты на территории г. Брянска в нескольких курятниках, на дачном участке, в месте обитания парнокопытных животных (Таблица 1). Данные участки были выбраны, в связи с наличием в почве большого количества белковых структур, обусловленных кормлением животных, которые необходимы для питания микроорганизмов, синтезирующих протеолитические ферменты, а также с выведением из организма животных протеолитических ферментов вместе с остатками пищи.

Таблица 1

Номер пробы	Место взятия пробы
1	Курятник №1
2	Курятник №2
3	Огород

4	Место обитания парнокопытных животных
5	Дачный участок

2. Культивирование протеобактерий в изготовленной базовой среде (Рис.1 и рис.2)

Материалы: Перчатки технические резиновые, лабораторный халат, Zip-Lock пакеты с образцами почвы, аналитические весы, 1 г пептона, 0.6 г дрожжевого экстракта, 1 г натрия хлористого, 3,6 г агар-агара и 2 г сухого обезжиренного молока, 450 мл дистиллированной воды, 5 пипеток Пастера, стерильный зонд, 14 чашек Петри одноразовых стерильных, лабораторная нагревательная плита.

После взятия проб почвы, необходимо культивировать микроорганизмы на селективной питательной среде для выделения микроорганизмов, синтезирующих протеолитические ферменты, состоящей из 1 г пептона, 0.6 г дрожжевого экстракта, 1 г натрия хлористого, 3,6 г агар-агара, 2 г сухого обезжиренного молока и 200 мл дистиллированной воды. Для этого необходимо очистить землю и изготовить вытяжку, затем налить по 1 мл вытяжки при помощи пипетки Пастера в чашки Петри с примерно 20 мл ранее созданной среды в каждую и распределить капли стерильным зондом для дальнейшей культивации в темном месте при комнатной температуре. Для каждой вытяжки провести данный процесс в 3 повторностях. Так же был заложен контрольный образец без заселения микроорганизмами для проверки стерильности питательной среды.

Больше всего микроорганизмов в почве, расположенной в курятнике, в связи с обилием белковых структур, вызванным высокой численностью кур и обилием корма (Диаграммы 1, 2, 3, 4,5).

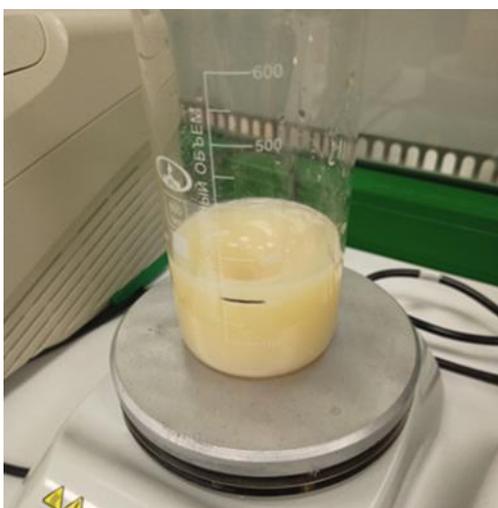


Рис.1 базовая среда

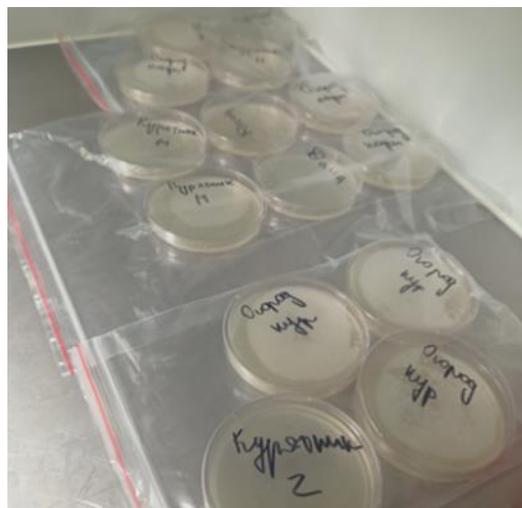


Рис. 2 культивирование микроорганизмов

Диаграмма 1

Соотношение площади засева в 1 образце

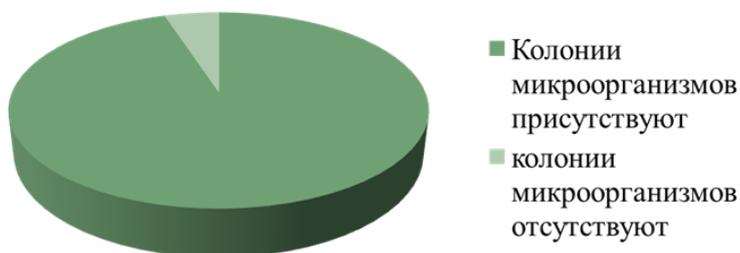


Диаграмма 2

Соотношение площади засева во 2 образце

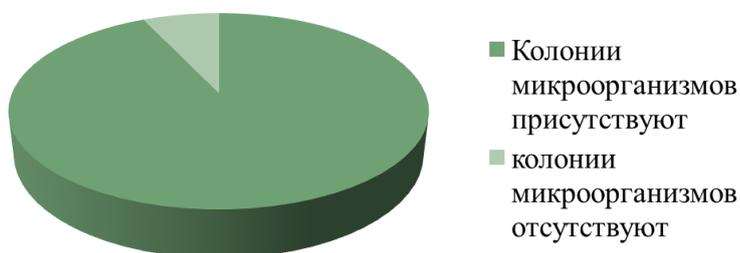


Диаграмма 3

Соотношение площади засева в 3 образце

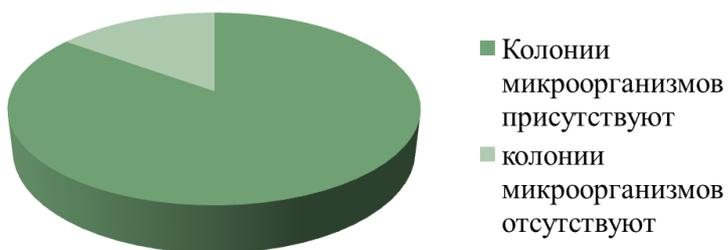
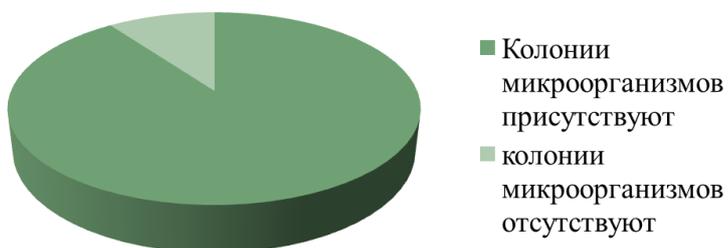
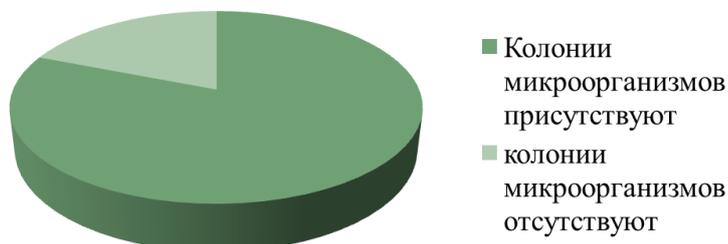


Диаграмма 4

Соотношение площади засева в 4 образце



Соотношение площади засева в 5 образце



3. Микроскопическое исследование (Рис. 3 и рис.4)

Материалы: Перчатки технические резиновые, лабораторный халат, 20 предметных стекол, 20 нетканых салфеток, спиртовка лабораторная, микробиологическая петля, 1 мл фуксина, 20 мл иммерсионного масла.

Через несколько суток на поверхности чашек Петри образуются плотные колонии бактерий. Для подтверждения нахождения микроорганизмов необходимо провести микроскопию.

Для этого нужно обработать предметное стекло, а затем создать мазок, содержащий одну из колоний микроорганизмов. Затем для улучшения их распознавания следует окрасить микропрепарат при помощи фуксина. После этого, с помощью иммерсионного масла, возможно его рассмотрение под микроскопом.

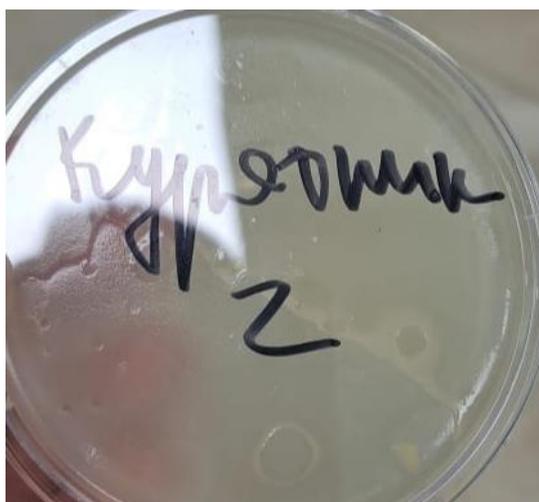


Рис. 3 чашка Петри с колониями микроорганизмов

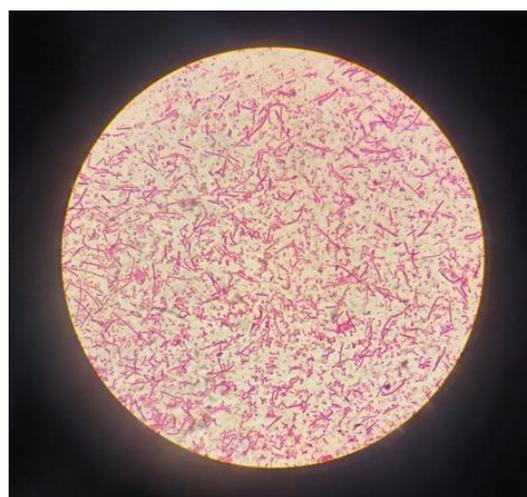


Рис.4 микроскопия одной из колоний микроорганизмов с объективом 100х/1,25

4. Проверка протеолитической активности

Материалы: Перчатки технические резиновые, лабораторный халат, 2,5 г пептического перевара животной ткани, 1,5 г мясного экстракта, 60 г желатина, 500 мл дистиллированной воды, 20 пробирок, 2 штатива для пробирок, игла микробиологическая, спиртовка лабораторная.

Необходимо проверить активность микроорганизмов, синтезирующих протеолитические ферменты, для подтверждения их свойств, это возможно осуществить при помощи среды с желатином в связи с высоким содержанием в нем белков, обусловленным созданием желатина из соединительных тканей животных, которые будут расщепляться под действием протеолитических ферментов [11].

В твердую среду с желатином, состоящую из желатина, сухого молока, мясного экстракта и воды, разлитую по 15 мл в пробирки, методом прокалывания были помещены ранее культивированные микроорганизмы. В ходе их жизнедеятельности через неделю в среде появились лунки, что связано с расщеплением белка до аминокислот и воды.

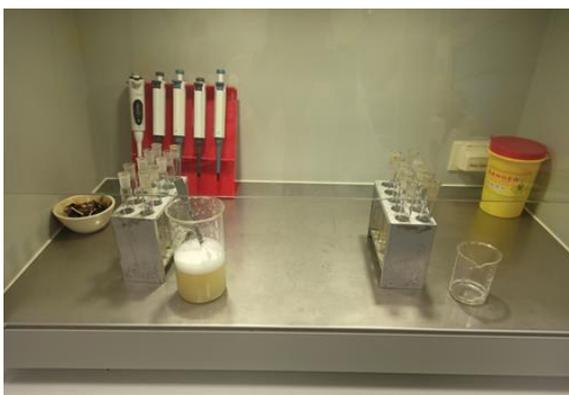


Рис.5 помещение питательной среды с желатином в пробирки

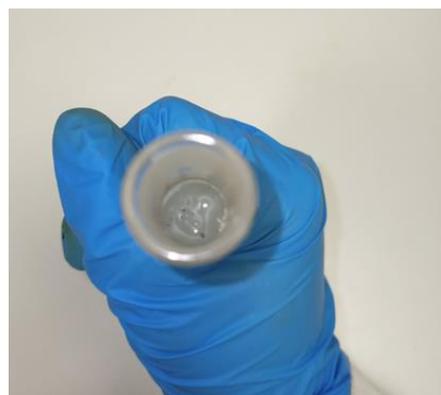


Рис.6 проявление протеолитической активности

5. Проверка расщепления отходов при помощи бактерий, синтезирующих протеолитические ферменты (Рис.5 и рис.6)

Материалы: Перчатки технические резиновые, лабораторный халат, 10 пробирок, 1 штатив для пробирок, 20 г колбасы.

Для проверки ожидаемых свойств, обуславливающих расщепление белковых структур, в пробирку, содержащую колонию микроорганизмов и изотонический раствор, для исключения расщепления других белковых структур, был помещен кусочек колбасы заранее измеренного размера, весом 1 г, торговой марки «Вязанка» содержащей 0,2 г жиров, 0,12 г белков. В течении 2 недель колония микроорганизмов стала больше, что обуславливалось изменением цвета раствора, а кусочек колбасы был расщеплен в процессе выделения микроорганизмами протеолитических ферментов. Так же были

сделаны контроли, где бралась дистиллированная вода и так же помещались такие же по размеру куски колбасы, в которых не наблюдалось повышение активности микроорганизмов. Данный процесс производился в нескольких повторностях. Так же мы сфотографировали пробирки, как только туда был помещен кусочек колбасы, и по прошествии определенного времени.



Рис. 7 до расщепления
протеолитическими ферментами



Рис. 8 после расщепления
протеолитическими ферментами

6. Создание микробиологического препарата

Материалы: Перчатки технические резиновые, лабораторный халат, 10 пробирок.в связи

После проведения всех ранее представленных методик возможно создание препарата на основе микроорганизмов, синтезирующих протеолитические ферменты. Нами был изготовлен препарат, содержащий живые культуры данных микроорганизмов, находящихся в изотоническом растворе, что связано со сложностью образования и сохранения их в состоянии спор. В связи с этим, срок годности данного препарата ограничен и составляет около 4 недель, что обусловлено различными фазами роста микроорганизмов.

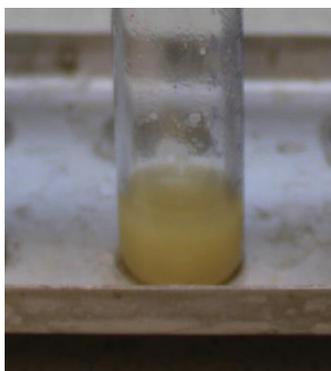


Рис.9 пробирка
с микробиологическим препаратом

Выводы

1. В ходе работы был проведен анализ литературы по данной теме для определения методов выделения микроорганизмов, синтезирующих протеолитические ферменты, создания сред, на которых возможно их культивирование, и проверка способностей к расщеплению белковых структур.
2. Для проведения работы были взяты пробы почвы с различных биоценозов. Содержание микроорганизмов, синтезирующих протеолитические ферменты, было выше на участках, где проводилась животноводческая деятельность. Это связано с тем, что в земле данной местности находилось наибольшее количество белковых структур, обусловленных кормлением животных. Данные компоненты необходимы для питания микроорганизмов, синтезирующих протеолитические ферменты. Также их обилие обусловлено выводом протеобактерий из организма животных вместе с остатками пищи.
3. В дальнейшем из данных проб почвы были выделены необходимые микроорганизмы и культивированы.
4. Микроорганизмы, синтезирующие протеолитические ферменты, были проверены на ожидаемые свойства при помощи питательной среды с желатином.
5. В ходе работы был создан препарат на основе живых культур микроорганизмов, синтезирующих протеолитические ферменты. Поскольку данный препарат состоит из живых микроорганизмов, он обладает ограниченным сроком годности, ориентировочно в 4 недели, что связано с фазами роста микроорганизмов.
6. В работе был рассмотрен иной способ использования протеаз по сравнению с исследованиями, проводившимися ранее.
7. В дальнейшем планируется усовершенствование данного препарата с целью увеличения его срока хранения, при помощи микроорганизмов в состоянии спор. Также возможно усиление его действия при помощи добавления вспомогательных компонентов.

Список литературы

Ссылки на федеральные законы:

1. Федеральный закон от 14.05.1993 № 4979-1 «О ветеринарии» (ред. Федерального закона от 14.07.2022) // СПС КонсультантПлюс
2. Федеральный закон от 10.01.2002 № 7-ФЗ «Об охране окружающей среды» // СПС КонсультантПлюс
3. Федеральный закон от 24.07.2007 № 209-ФЗ «О развитии малого и среднего предпринимательства в Российской Федерации» // СПС КонсультантПлюс
4. Федеральный закон от 30.03.1999 № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» // СПС КонсультантПлюс

Ссылки на ГОСТы:

5. ГОСТ 17.4.4.02-84 «Отбор проб почвы для химического анализа» : дата введения 1984-12-19. – Москва : Стандартинформ, 2008. – 10 с.

Ссылки на авторефераты:

6. Троицкий А. В. Разработка способа получения лекарственных препаратов на основе иммобилизованных протеаз *Bac. subtilis*: автореф. дис. биохим. наук: 03.00.04. - Новосибирск, 1998. – 23 с.

Ссылки на статьи:

7. Азизов Д.Т., Мирзаев К.К., Алейник В.А., Бабич С.М. Особенности изменения содержания протеаз и ингибиторов протеаз в хронических гнойных ранах // Экономика и социум. – 2021 – №11 (90). – С. 672-679
8. Антюшина А. В., Антюшин И. А., Ковалева Л. И. Исследование проблемы утилизации пищевых отходов / А. В. Антюшина, И. А. Антюшин, Л. И. Ковалева // III лужские научные чтения. Современное научное знание: теория и практика. – 2015.– С. 18-22.
9. Герштейн Е. С., Кушлинский Н. Е. Ассоциированные с опухолью протеазы — прогностические маркеры колоректального рака / Е. С. Герштейн, Н. Е. Кушлинский // Клиническая лабораторная диагностика. – 2013. – № 5. – С. 16-37.
10. Комаров А. Роль протеазы в кормлении животных / А. Комаров // Эффективное животноводство. – 2020. – № 1. – С. 78.

Электронные ресурсы:

11. Питательный желатин : сайт. – URL:
<http://www.himedialabs.ru/m060#:~:text=%D0%9F%D0%B8%D1%82%D0%B0%D1%82%D0%B5%D0%BB%D1%8C%D0%BD%D1%8B%D0%B9%20%D0%B6%D0%B5%D0%BB%D0%B0%D1%82%D0%B8%D0%BD%20%D0%B3%D0%BE%D1%82%D0%BE%D0%B2%D1%8F%D1%82%20%D0%BF%D0%BE%20%D0%BF%D1%80%D0%BE%D0%BF%D0%B8%D1%81%D0%B8,%D0%BC%D0%B8%D0%BA%D1%80%D0%BE%D0%BE%D1%80%D> (дата обращения: 20.10.2022)