	МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ	ЗСУ СМЯ НУБіП України 7.5 - 02
	НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ	Введено в дію: Наказ № _____
	«Положення про робочу програму навчальної практики у Національному університеті біоресурсів і природокористування України»	від _____

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

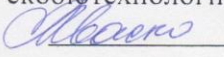
Кафедра екобіотехнології та біорізноманіття

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

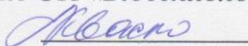


Декан факультету захисту рослин,
біотехнологій та екології
ЮЛІЯ КОЛОМІЄЦЬ
_____ 2024 р.

« СХВАЛЕНО »

на засіданні кафедри екобіотехнології
та біорізноманіття
Протокол № 5 від "13" травня 2024 р.
Завідувач кафедри
екобіотехнології та біорізноманіття
 **ОЛЕНА КВАСКО**


«РОЗГЛЯНУТО»

Гарант ОП «Біотехнології та біоінженерія»
 **ОЛЕНА КВАСКО**

**РОБОЧА ПРОГРАМА
НАВЧАЛЬНОЇ ПРАКТИКИ З ДИСЦИПЛІНИ
“ ПРОМИСЛОВА БІОТЕХНОЛОГІЯ ”**

спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
освітня програма Біотехнології та біоінженерія
Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології
Розробники: д.с.-г.н., доцент Бородай В.В.

Київ – 2024 р.

	НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ	СУ СМЯ НУБіП України 7.5 – 021 - 006
	<i>«Положення про робочу програму навчальної практики у Національному університеті біоресурсів і природокористування України»</i>	

Вступ

Мета практики ознайомлення студентів із принципами застосування біологічних знань для вирішення конкретних завдань сучасного сільськогосподарського виробництва й захисту навколишнього середовища.

Завдання практики набуття умінь застосовувати одержані знання для виконання стандартних фахових функцій.

Набуття компетентностей:

Інтегральна компетентність (ІК): Здатність розв'язувати складні спеціалізовані задачі та практичні проблеми, що характеризуються комплексністю та невизначеністю у біотехнології та біоінженерії, або у процесі навчання, що передбачає застосування теорій та методів біотехнології та біоінженерії.

Загальні компетентності (ЗК):

K01. Здатність застосовувати знання у практичних ситуаціях

K05. Здатність вчитися і оволодівати сучасними знаннями

Спеціальні (фахові, предметні) компетентності (СК):

K13. Здатність працювати з біологічними агентами, використовуваними у біотехнологічних процесах (мікроорганізми, гриби, рослини, тварини, віруси, окремі їхні компоненти).

K16. Врахування комерційного та економічного контексту при проектуванні виробництв біотехнологічних продуктів різного призначення (промислового, харчового, фармацевтичного, сільськогосподарського тощо).

K18. Здатність обирати і використовувати відповідне обладнання, інструменти та методи для реалізації та контролю виробництв біотехнологічних продуктів різного призначення.

K19. Здатність складати технологічні схеми виробництв біотехнологічних продуктів різного призначення.

K22. Здатність оцінювати ефективність біотехнологічного процесу.

K24. Здатність дотримуватися вимог біобезпеки, біозахисту та біоетики

Програмні результати навчання (ПР):

ПР03. Вміти розраховувати склад поживних середовищ, визначати особливості їх приготування та стерилізації, здійснювати контроль якості сировини та готової продукції на основі знань про фізико-хімічні властивості органічних та неорганічних речовин.

ПР04. Вміти застосовувати положення нормативних документів, що регламентують порядок проведення сертифікації продукції, атестації виробництва, вимоги до організації систем управління якістю на підприємствах, правила оформлення технічної документації та ведення технологічного процесу, базуючись на знаннях, одержаних під час практичної підготовки.

ПР08. Вміти виділяти з природних субстратів та ідентифікувати мікроорганізми різних систематичних груп. Визначати морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні властивості різних біологічних агентів.

ПР09. Вміти складати базові поживні середовища для вирощування різних біологічних агентів. Оцінювати особливості росту біологічних агентів на середовищах різного складу.



**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

*«Положення про робочу програму навчальної
практики у Національному університеті біоресурсів і
природокористування України»*

**СУ СМЯ НУБіП України 7.5 –
021 - 006**

ПР12. Використовуючи мікробіологічні, хімічні, фізичні, фізико-хімічні та біохімічні методи, вміти здійснювати хімічний контроль (визначення концентрації розчинів дезінфікувальних засобів, титрувальних агентів, концентрації компонентів поживного середовища тощо), технологічний контроль (концентрації джерел вуглецю та азоту у культуральній рідині упродовж процесу; концентрації цільового продукту); мікробіологічний контроль (визначення мікробіологічної чистоти поживних середовищ після стерилізації, мікробіологічної чистоти біологічного агента тощо), мікробіологічної чистоти та стерильності біотехнологічних продуктів різного призначення.

ПР13. Вміти здійснювати техніко-економічне обґрунтування виробництва біотехнологічних продуктів різного призначення (визначення потреби у цільовому продукті і розрахунок потужності виробництва).

ПР14. Вміти обґрунтувати вибір біологічного агента, складу поживного середовища і способу культивування, необхідних допоміжних робіт та основних стадій технологічного процесу.

ПР16. Базуючись на знаннях, одержаних під час практики на підприємствах та установах, вміти здійснювати продуктивний розрахунок і розрахунок технологічного обладнання.

ПР22. Вміти враховувати соціальні, екологічні, етичні, економічні аспекти, вимоги охорони праці, виробничої санітарії і пожежної безпеки під час формування технічних рішень. Вміти використовувати різні види та форми рухової активності для активного відпочинку та ведення здорового способу життя.

Бази практики навчальна лабораторія промислової біотехнології НУБіП

Організація проведення практики

Практика студентів проводиться під безпосереднім контролем керівників практики від університету. *Керівники практики:*

- забезпечують проведення всіх організаційних заходів перед початком та впродовж практики;
- керують поточною роботою студентів під час практики;
- видають завдання для самостійних навчально-дослідних робіт;
- контролюють дотримання дисципліни студентів під час практики;
- перевіряють звіти студентів з практики, приймають залік;
- надають завідувачу кафедри письмовий звіт про проведення практики із зауваженнями і пропозиціями щодо вдосконалення практики.

Зміст практики

Тема 1. Техніка культивування мікроорганізмів - продуцентів
1.1. Отримання накопичувальної та чистої культур бактерій
Тема 2 . Кількісний облік мікроорганізмів
2.1. Визначення концентрації бактеріальної суспензії висівом на щільні поживні середовища
Тема 3. Культуральні та фізіолого-біохімічні властивості мікроорганізмів.
3.1. Визначення біохімічних властивостей <i>Bacillus subtilis</i>
Тема 4. Ріст мікроорганізмів в періодичній культурі
4.1. Вивчення кінетики росту дріжджів при глибинній ферментації

	НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ	СУ СМЯ НУБіП України 7.5 – 021 - 006
	<i>«Положення про робочу програму навчальної практики у Національному університеті біоресурсів і природокористування України»</i>	

Тема 5. Типи ферментаційних процесів

5.1. Класичні технології біотехнологічних виробництв

Таблиця 1

Орієнтовний тематичний план

Назва теми	Кількість годин		
	Всього	із них	
		аудиторні	самостійна робота
Тема 1. Техніка культивування мікроорганізмів - продуцентів	6	6	
Тема 2. Кількісний облік мікроорганізмів	6	6	
Тема 3. Культуральні та фізіолого-біохімічні властивості мікроорганізмів.	6	6	
Тема 4. Ріст мікроорганізмів в періодичній культурі	6	6	
Тема 5. Типи ферментаційних процесів	6	6	
Всього	30	30	

Індивідуальні завдання

Завдання 1. Отримання накопичувальної та чистої культур бактерій

Завдання 2. Визначення концентрації бактеріальної суспензії висівом на щільні поживні середовища.

Завдання 3. Визначення біохімічних властивостей *Bacillus subtilis*

Завдання 4. Вивчення кінетики росту дріжджів при глибинній ферментації

Завдання 5. Вивчення типів ферментаційних процесів

Методичні рекомендації

ТЕМА 1. ТЕХНІКА КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ-ПРОДУЦЕНТІВ

Місце проведення: лабораторія промислової біотехнології НУБіП.

Завдання 1. Отримання накопичувальної та чистої культур бактерій

Мета роботи. Освоїти метод накопичувальних культур і виділення чистих культур бактерій (по Коху).

Матеріали та обладнання. 1 г сіна або трави, 20 - 30 мл водопровідної води, електрична плитка або водяна баня, стерильні пробірки, пробірки з МПБ і скошеним МПА (косяки) і чашки Петрі з МПА; культури бактерій, вирощені на МПА в чашках Петрі; бактеріологічні петлі; спиртівка; термостат з температурою 37°C.



**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

*«Положення про робочу програму навчальної
практики у Національному університеті біоресурсів і
природокористування України»*

**СУ СМЯ НУБІП України 7.5 –
021 - 006**

Хід виконання роботи


1. Для отримання накопичувальної культури спороутворюючих бактерій 1 г сіна або трави помістіть в колбу об'ємом 100 - 150 мл, налейте 20 - 30 мл водопровідної води, підігрітої до 40 - 50 °С і залиште на 30 хв при кімнатній температурі.
3. Через 30 хв воду відокремте від сіна, зробіть посіви на чашки Петрі з МПА, воду, що залишилася розлийте в 3 - 4 пробірки по 5 - 7 мл, закриткуйте ватно-марлевими (або ватяними) пробками, прогрійте в киплячій водяній бані 15 - 20 хв, охолодіть до кімнатної температури і після цього помістіть чашки Петрі і пробірки в термостат з температурою 37 °С на 3 - 7 діб.
4. Через 3 - 7 діб з вмісту пробірок приготуйте фіксовані мазки і пофарбуйте їх по Граму і методом забарвлення спор. Перегляньте приготовлений Вами препарат з імерсійною системою і замалуйте в альбом грам-позитивні палички (*Bacillus subtilis*) і ендоспори всередині бактеріальних клітин.
5. Уважно розгляньте ріст культури в чашці Петрі. Виберіть будь-яку ізольовану колонію на чашці з МПА. Охарактеризуйте її: за величиною (велика - діаметром більше 4 - 6, середня - 2 - 4, дрібна - 1 - 2, точкова - менше 1 мм); формі (округла, амебоїдна, ризоїдна); оптичними властивостями (прозора, матова, флуоресцентна, напівпрозора, непрозора, блискуча); кольором; поверхні (гладка, шорстка, складчаста, горбиста); профілю (плоска, випукла, кратероподібна, врастають в агар); краю колонії (рівний, хвилястий, лопатевий, ризоїдний); структурі (однорідна, дрібно-або крупно-зерниста); консистенції (масляниста, тістоподібна, в'язка, плівчаста).
6. Характеристики колонії запишіть і замалуйте колонію в альбом.
6. Пересійте обрані колонії в пробірки з МПА, МПБ і чашку Петрі з МПА.
7. Поставте в термостат з температурою 37 °С.
8. Через 24 - 48 год перегляньте посіви на МПА. При правильному посіві всі колонії повинні бути однорідними і за характеристиками відповідати вихідній (материнській) колонії.
9. Приготуйте фіксований забарвлений препарат з колонії на МПБ і МПА і пофарбуйте його по Граму.
10. Перегляньте приготований Вами препарат з імерсійною системою і теж замалуйте в альбом. Якщо в мазках з вирощеними посівами на МПБ і МПА бактерії однорідні по морфології і забарвленням, то відокремлена культура є чистою.

ТЕМА 2. КІЛЬКІСНИЙ ОБЛІК МІКРООРГАНІЗМІВ

Місце проведення: лабораторія промислової біотехнології НУБіП.

Завдання 2. Визначення концентрації бактеріальної суспензії висівом на щільні поживні середовища.

В основі методу лежить принцип Коха, згідно з яким кожна колонія є потомством однієї клітини. Це дозволяє на підставі числа колоній, які вирости після посіву на щільне ПС певного обсягу досліджуваної суспензії, судити про вихідному вмісту в ній клітин мікроорганізмів. Результати кількісного обліку мікроорганізмів, проведеного методом Коха,

	НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ	СУ СМЯ НУБіП України 7.5 – 021 - 006
	<i>«Положення про робочу програму навчальної практики у Національному університеті біоресурсів і природокористування України»</i>	

часто виражають не в числі клітин, а в умовних одиницях - так званих колонієутворюючих одиницях (КУО).

Визначення числа мікроорганізмів цим методом включає три етапи: приготування розведень, посів на щільну середу в чашки Петрі і підрахунок вирослих колоній.

Посів. Висівати суспензію можна поверхневим або глибинним способом. Перед посівом поверхневим способом розливають розплавлене, найчастіше агаризоване живильне середовище в ряд стерильних чашок Петрі по 15 - 20 мл в кожну. Чашки залишають на горизонтальній поверхні, поки середовище не застигне. Поверхню агаризованих середовищ перед посівом рекомендується підсушувати для видалення конденсаційної води.

Після того як середовище готове, на його поверхню стерильною піпеткою наносять точно виміряний об'єм (0,05 або 0,1 мл) відповідного розведення і рівномірно розподіляють по поверхні середовища.

При глибинному посіві точно виміряний об'єм (як правило, 0,1 та 0,5 або 1,0 мл) вихідної суспензії або розведення вносять в розплавлене і охолоджене до 48 - 50°C агаризоване середовище, ретельно перемішують і потім негайно виливають в чашку Петрі. Середовищу дають застигнути. Підрахунок вирослих колоній.

Колонії мікроорганізмів в залежності від швидкості росту підраховують через 2 - 15 діб інкубації. Підрахунок, як правило, проводять, не відкриваючи чашок Петрі. Для зручності кожну прораховану колонію відзначають точкою на зовнішній стороні дна чашки. При великій кількості колоній дно чашки Петрі ділять на сектори, прораховують колонії в кожному секторі і підсумовують результати.

Результати враховують на тих чашках Петрі, на яких виростає від 30 - 50 до 100 - 150 колоній. Якщо число вирослих колоній виявилось менше 10, то ці результати для розрахунку кількості клітин у вихідному матеріалі не використовують.

Кількість клітин в 1 мл досліджуваного субстрату обчислюють за формулою:

$$M = a \times 10^n / V$$

де M - кількість клітин в 1 мл;

a - середнє число колоній на чашці Петрі;

V - об'єм суспензії, взятий для посіву, мл;


10^n - коефіцієнт розведення.

Мета роботи. Освоїти метод кількісного обліку мікроорганізмів висівом на щільні поживні середовища (метод Коха).

Матеріали та обладнання. Бактеріологічні петлі, спиртівка, стерильна дистильована вода, чисті культури дріжджів, стерильні піпетки на 1 - 2 мл, МПА в чашках Петрі, термостат з температурою 37 °С.

Хід виконання роботи

1. Приготуйте послідовні 10-кратні розведення вихідної

	НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ	СУ СМЯ НУБіП України 7.5 – 021 - 006
	<i>«Положення про робочу програму навчальної практики у Національному університеті біоресурсів і природокористування України»</i>	

суспензії дріжджів: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} (до 4,5 мл дистильованої води додайте 0,5 мл суспензії дріжджів).

2. Отримані розведення суспензії мікроорганізмів ретельно перемішайте (струсність) і висійте на поверхню агару в чашці Петрі (0,1 або 0,2 мл). Посів проводите, починаючи з найбільшого розведення (10^{-5}).

3. Рівномірно розподіліть на поверхні агару висіяні суспензії, повільно обертаючи чашки Петрі, і залиште їх при кімнатній температурі на 30 хв для адсорбції мікробів на поверхні агару.

4. Засіяні чашки Петрі помістіть в термостат з температурою 37°C та інкубують 24 - 48 год (в залежності від виду мікроорганізмів). Після цього зробіть облік виросли колоній. Враховувати необхідно ті чашки, на яких число колоній знаходиться в діапазоні від 10 до 150 і загальне число підрахованих колоній при посіві з даного розведення повинно бути не менше 300. При дотриманні цих умов облік результатів буде правильним.

5. Результати роботи оформіть у вигляді табл. 2

Таблиця 2

Визначення концентрації бактеріальної суспензії

Розведення	Кількість колоній, що виросли на чашці Петрі	Середнє значення, а	Кількість мікроорганізмів в 1 мл досліджуваної суспензії, М
10^{-3}			
10^{-4}			
10^{-5}			

ТЕМА 3. КУЛЬТУРАЛЬНІ ТА ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ

Місце проведення: лабораторія промислової біотехнології НУБіП.

Характеристика культуральних і фізіолого-біохімічних особливостей мікроорганізмів включає опис їх здатності рости на різноманітних поживних середовищах і викликати певні перетворення речовин, що входять до складу цих середовищ.

1. Ріст на щільних живильних середовищах.

На поверхні щільних поживних середовищ в залежності від посіву мікроорганізми можуть рости у вигляді колонії, штриха або суцільного газону. Колонією називають ізольоване скупчення клітин одного виду, виросли в більшості випадків з однієї клітини. При їх описі враховуються наступні ознаки:

- Форму колонії - округла, амєбовидних, неправильна, ризоїдна і т. д.;

- Розмір (діаметр) колонії, вимірюють в міліметрах; якщо розміри колонії не перевищують 1 мм, то їх називають точковими;

- Поверхня колонії - гладка, шорстка, бороздчата, складчаста; зморшкувата, з концентричними колами або радіально складчаста;

- Профіль колонії - плоский, опуклий, кратероподібний, конусоподібний;

- Блиск і прозорість - колонія блискуча, матова, тьмяна, мучниста, прозора;



НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

«Положення про робочу програму навчальної
практики у Національному університеті біоресурсів і
природокористування України»

СУ СМЯ НУБІП України 7.5 –
021 - 006

Колір колонії - безбарвна (брудно-білі колонії відносять до безбарвних) або пігментована - біла, жовта, золотава, помаранчева, бузкова, червона, чорна. Особливо відзначають виділення пігменту в субстрат.

Ріст в рідких поживних середовищах. Характеризуючи ріст мікроорганізмів в рідкому середовищі, відзначають ступінь помутніння - слабка, помірна або сильна, особливості плівки - тонка, щільна або пухка, гладка або складчаста, а при утворенні осаду вказують, невелика кількість його чи велика, щільний, пухкий, слизистий або хлоп'єподібний. Нерідко ріст мікроорганізмів супроводжується появою запаху, пігментацією середовища, виділенням газу.

Крохмаль-йодна реакція на нітрити заснована на тому, що нітрити в кислому середовищі окислюють йодистий цинк з виділенням йоду, присутність якого виявляють за допомогою крохмалю. Для проведення реакції до краплі культуральної рідини додають краплю розчину, що містить $ZnCl_2$, KI і крохмаль, і краплю розчину HCl. При наявності в середовищі нітритів з'являється сине забарвлення.

Протеолітична активність визначається наявністю ферментів (протеази), які каталізують розщеплення білків на полі-і олігопептиди. Протеази виділяються різними видами бацил, актиноміцетів, міцеліальних грибів та іншими мікроорганізмами. Активність позаклітинних протеаз визначають, використовуючи як субстрат желатину, казеїн або інші білки.

Визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотичних речовин. Чутливість мікроорганізмів до антибіотиків зручно визначати за допомогою паперових дисків, просочених певними антибіотиками. Концентрація антибіотиків в дисках підібрана з таким розрахунком, щоб діаметри затримки росту стандартних тест-організмів були 28 - 32 мм. Якщо досліджувані мікроорганізми чутливі до даних антибіотиків, то навколо дисків утворюються зони відсутності росту. Діаметр зони вимірюють міліметровою лінійкою. Зона більше 30 мм свідчить про високу чутливість мікроорганізму до антибіотика, а менше 12 мм - про слабку чутливість.


Завдання 3. Визначення біохімічних властивостей *Bacillus subtilis*

Мета роботи. Освоїти методики проведення біохімічних тестів для визначення ферментативних властивостей та ідентифікації бактерій.

Матеріали та обладнання. Чиста культура *Bacillus subtilis* в чашках Петрі з МПА, бактеріологічні петлі, спиртівки, стерильні пробірки, предметні скла, перекис водню, середовища з моно-, ди-, пополісахаридів і спиртами, що містять індикатори; пробірки з МПБ; пробірки з 2 - 3%-ною пептонною водою; розчини цистину і цистеїну, лакмусовий папір; стерильний фізіологічний розчин, термостат з температурою 37°C.

Хід виконання роботи

1. Розлийте стерильний фізіологічний розчин в стерильні пробірки по 0,3 мл (по дві пробірки на один тест: одна контрольна, інкубується без бактерій, а друга - дослідна), внесіть в ряд дослідних пробірок однакову кількість (одна петля агарової культури або 0,1 мл бульйонної культури) досліджуваної культури бактерій.
3. Відповідно до інструкції внесіть в пробірки паперові диски тестів та інкубуйте пробірки при температурі 37°C.

	НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ	СУ СМЯ НУБіП України 7.5 – 021 - 006
	<i>«Положення про робочу програму навчальної практики у Національному університеті біоресурсів і природокористування України»</i>	

4. Засійте чисту культуру досліджуваних бактерій бактеріологічною петлею на середовища з моно-, ди-, полісахаридами та спиртами, наданих викладачем, і інкубуйте їх протягом 18 -24 год при температурі 37°C.

5. Для визначення каталазної активності на предметне скло нанесіть краплю 3%-ного розчину перекису водню, внесіть в неї петлю досліджуваної агарової або бульйонної культури бактерій і ретельно перемішайте. При позитивній реакції (наявності каталази) перекис водню буде розкладатися з утворенням води і кисню в вигляді бульбашок.

6. Через 24 год уважно перегляньте всі контрольні та дослідні пробірки з тестами СІП і посіви на середовища з цукрами і спиртами. Результати визначення ферментативних властивостей *Bacillus subtilis* оформите у вигляді табл.

Таблиця

Ферментативні властивості *Bacillus subtilis*

Сахаролітичні властивості				Протеолітичні властивості			Наявність каталази
Глюкоза	Лактоза	Манніт	Сорбіт	Індол	H ₂ S	NH ₃	

Ідентифікація мікроорганізмів базується на вивченні морфологічних, цитологічних, культуральних і фізіолого-біохімічних властивостей. У роботі з ідентифікації мікроорганізмів необхідно дотримуватись наступних правил: використовувати чисті культури, застосовувати при вивченні стандартні методи, використовувати для інокуляції діагностичних середовищ культури, що знаходяться в активному фізіологічному стані.

ТЕМА 4. РІСТ МІКРООРГАНІЗМІВ В ПЕРІОДИЧНІЙ КУЛЬТУРІ

Місце проведення: лабораторія промислової біотехнології НУБіП.

Завдання 4. Вивчення кінетики росту дріжджів при глибинній ферментації

Мета роботи: визначення основних технологічних характеристик періодичного процесу глибинної ферментації дріжджів.

Хід роботи

Ферментація є визначальною стадією в біотехнологічних виробництвах, протягом якої мікроорганізми ростуть і розмножуються, забезпечуючи накопичення біомаси продуцента і біологічно цінних метаболітів у культуральній рідині.

Існує два способи культивування популяції мікроорганізмів у глибині рідкого середовища: періодичний і безперервний. При періодичному способі культивування популяції мікроорганізмів проходить шість фаз розмноження: лаг-фазу, перехідну фазу, фазу експоненційного або прискореного росту, фазу уповільненого росту, стаціонарну фазу, фазу відмирання.



НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

«Положення про роботу програму навчальної
практики у Національному університеті біоресурсів і
природокористування України»

СУ СМЯ НУБІП України 7.5 –
021 - 006

Вид кривої росту дріжджів змінюється в залежності від умов культивування, але послідовність фаз залишається незмінною.

Для кількісної характеристики культивування мікроорганізмів користуються 2 показниками – середньою та питомою швидкістю росту. Середня швидкість росту V характеризується приростом біомаси за одиницю часу

$$V = \frac{x - x_0}{\tau - \tau_0},$$

де x_0 , – кількість біомаси на початку культивування, $\text{кг}/\text{м}^3$; x – біомаса за час культивування, $\text{кг}/\text{м}^3$; t_0 , t – початковий та кінцевий час відліку, год.

Для вивчення кінетики росту мікробної популяції в умовах глибинної ферментації використовують

дріжджі роду *Saccharomyces*. Експериментальні дані для визначення технологічних показників процесу культивування отримують на лабораторній установці.

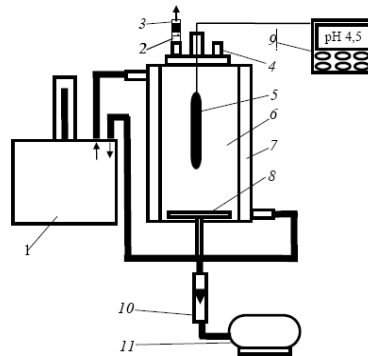


Рис. Схема лабораторної установки для вирощування дріжджів:

1 – ультратермостат, 2 – фільтр очищення повітря; 3 – штуцер виходу повітря, 4- штуцер введення середовища та відбирання проб, 5 – електрод рН-метра, 6 – ємність культиватора, 7 – рубашка, 8 – барботер, 9 – іонометр, 10 – ротаметр, 11- компресор.

Установка складається з ємності об'ємом 1 л для вирощування дріжджів 6, забезпеченою барботером 8 для рівномірного розподілу повітря, що нагнітається компресором 11. Відпрацьоване повітря очищається, проходячи систему фільтрів 2. Ємність культиватора забезпечена сорочкою 7, в яку подається вода від ультратермостата 1 для підтримки температури процесу вирощування. Рівні рН і температура середовища вимірюється електродом 5 іонометра 9. Витрата повітря встановлюється ротаметром 10.

Хід роботи

1. Приготувати 1 л живильного середовища, наступного складу: цукор - 9%; діаммоній фосфат - 0,3%; аммоній сірчаноокислий - 0,16%; хлористий калій - 0,06%; магній сірчаноокислий - 0,02%. Заміряти величину рН розчину на іонометр і довести при необхідності до 4,5 70%-ною ортофосфорною кислотою або аміачною водою.



**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

*«Положення про робочу програму навчальної
практики у Національному університеті біоресурсів і
природокористування України»*

**СУ СМЯ НУБІП України 7.5 –
021 - 006**

2. Провести асептичну обробку ємності культиватора етанолом. Після чого заповнити його живильним середовищем, відібравши в пробірку 15 мл вихідної суміші для визначення в ній вмісту цукру.
3. Включити ультратермостат і нагріти живильний розчин до температури 30-31°C. Після чого через штуцер 8 ввести через воронку суспензію засівну: дріжджів (посівного матеріалу) в кількості 12% до об'єму живильного середовища. Температура середовища протягом процесу, також як і рН середу контролюється за допомогою іонометра, електрод якого постійно знаходиться в рідині.
4. Включити компресор 3 і встановити витрати повітря з розрахунку 5 - 10 м³/м³ч за допомогою ротаметра 10. Відпрацьоване повітря видаляється через штуцер 3, забезпечений фільтром 2 з активованого вугілля і скловати для затримки крапель середовища і клітин дріжджів.
5. Відлік часу культивування слід починати з моменту внесення в живильне середовище дріжджів. Першу пробу для визначення початкової концентрації дріжджових клітин x_0 відбирають в кількості 1 мл стерильною піпеткою через штуцер 4 через 1 - 3 хв після початку процесу. Потім відбір проб проводять через кожну годину для визначення x_n - кількості вирослої біомаси.
6. Провести підрахунок кількості дріжджових клітин, використовуючи камеру Горяєва, результати внести в табл. Для підрахунку дріжджів невелику краплю живильного середовища з біомасою клітин відібрати піпеткою або скляною паличкою, нанести її на поверхню лічильної камери і накрити шліфувальним склом, і притерти покривне скло до сторін камери до появи райдужних кілець. Камеру помістити на предметний столик і з об'єктивом 8 × знайти зображення сітки, а потім замінити об'єктив на 40 ×. Вести підрахунок через 3 - 5 хв від моменту заповнення. Підрахувати кількість клітин в 10 великих або 20 малих квадратах сітки, розкладених по діагоналі. Врахувати всі клітини, що лежать в квадратику сітки і перетинають верхню і праву сторони квадрата. Визначити середнє число n_{cp} дріжджів в квадраті (табл.). Число дріжджів в одному квадраті не повинно бути більше 20, в іншому випадку вихідну суспензію розбавляють і повторюють розрахунок. Кількість клітин в 1 мл суспензії обчислити за формулою :

$$x = \frac{N_{cp} \cdot 1000}{hS},$$

де N_{cp} - середнє число дріжджів у квадраті, шт.; h - глибина камери; S - площа квадрата сітки, мм (площа великого квадрату 1/25 мм²; малого – 1/400 мм²).

Таблиця 12

Результати розрахунку дріжджових клітин

Час росту	Кількість клітин в одному квадраті сітки, шт.					Середня кількість клітин, шт.	Кількість клітин в 1 мл
	1	2	3	4	5		

	НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ	СУ СМЯ НУБіП України 7.5 – 021 - 006
	<i>«Положення про робочу програму навчальної практики у Національному університеті біоресурсів і природокористування України»</i>	

7. В кожній пробі, починаючи з вихідного моменту культивування, визначити вміст цукру в середовищі, як основного вуглецевмісного субстрату, а також вимірюють кількість розчиненого азоту.

8. Побудувати графічну залежність концентрації біомаси дріжджових клітин у часі, а також зміни концентрації цукру і засвоюваного азоту.

Таблиця 13

Технологічна характеристика росту дріжджів в умовах глибинної ферментації при періодичному культивуванні

Час відбору проб	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Концентрація дріжджових клітин, х, млн кл/мл										
pH середовища										
Температура середовища, °C										
Концентрація цукру, S _c , %										
Кількість розчиненого азоту										

ТЕМА 5. ТИПИ ФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ

Місце проведення. лабораторія промислової біотехнології НУБіП.

Завдання 1. Апаратурні схеми культивування мікроорганізмів. Ознайомитись з методами культивування мікроорганізмів.

Стадія ферментації є основною стадією в біотехнологічному процесі. На цій стадії відбувається взаємодія продуцента з субстратом і утворення цільових продуктів (біомаси, ендо-та екзопродуктів). Ця стадія здійснюється в біохімічному реакторі (ферментері) і може бути організована в залежності від особливостей використовуваного продукту та вимог до типу і якості кінцевого продукту різними способами. Ферментація може проходити в строго асептичних умовах або без дотримання правил стерильності (так звана «незахищена» ферментація). Ферментація може здійснюватися на рідких (рідкофазна) і на твердих (твердофазна) середовищах; анаеробно і аеробно.

Аеробна ферментація може протікати поверхово або глибинно (у всій товщі живильного середовища). Забезпечення процесу ферментації зводиться дозованим додаванням в ферментер потоків (інокуляту, повітря (або газових сумішей), живильних речовин, піногасників) і відводу з нього тепла, відпрацьованого повітря, культуральної рідини, а також вимірювання та стабілізації основних параметрів



**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

*«Положення про робочу програму навчальної
практики у Національному університеті біоресурсів і
природокористування України»*

**СУ СМЯ НУБіП України 7.5 –
021 - 006**

процесу на рівні, необхідному для оптимального розвитку продуцента і утворення цільового продукту.

Хід роботи:

1. Проведення екскурсії та знайомство з типами ферментаційних процесів:
 - Періодичним аеробним рідкофазним;
 - Проточному в лабораторному ферментері на різних субстратах.
 - Відвідування досвідного виробництва.
2. Підписати основні апаратурні компоненти схеми.

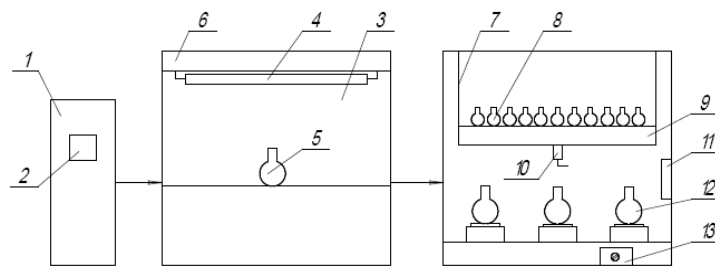


Рис. 3. Апаратурна схема культивування мікроорганізмів в періодичному режимі

3. Описати будову ферментеру.

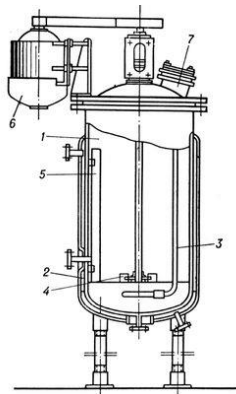



Рис.4. Ферментер для культивування мікроорганізмів

Орієнтовний тематичний план екскурсій (виїзних занять)

Назва теми	База проведення занять	Кількість годин
Технологія пивоваріння	Завод Карлсберг	3

Матеріально-технічне та навчально-методичне забезпечення практики студентів

Навчально-лабораторна база дозволяє організувати та проводити навчальну практику на задовільному рівні. Лабораторія оснащена обладнанням для проведення практичних занять з відпрацювання одержання біологічно активних речовин. Лабораторія має усе необхідне обладнання і прилади для проведення занять, а саме: мікроскопи, рН-метри,

	НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ	СУ СМЯ НУБіП України 7.5 – 021 - 006
	<i>«Положення про роботу програму навчальної практики у Національному університеті біоресурсів і природокористування України»</i>	

електронні ваги, сушильні шафи, термостати, ламінар бокси, автоклав, електронні ваги Radwag. Науково-методичне забезпечення навчального процесу передбачає: програми навчальної практики; підручники і навчальні посібники; інструктивно-методичні матеріали до лабораторних занять; індивідуальні навчально-дослідні завдання. Навчально- методичне забезпечення дозволяє застосовувати одержані знання студентами із принципів застосування біологічних знань для вирішення конкретних завдань сучасного біотехнологічного виробництва і набути умінь для виконання стандартних фахових функцій.

Вимоги до написання звіту

Результати проходження практики студент оформляє у виді письмового звіту про практику.

Обсяг звіту про ознайомчу практику, без обліку додатків, повинен складати не менше 5 сторінок тексту з інтервалом 1,5, кегля 14.

Обов'язковими складовими частинами звіту про практику є:

- титульний лист (із вказівкою факультету, даних про студента-практиканта, керівника практики від кафедри, інших відомостей);
- зміст звіту, в якому вказуються розділи звіту і відповідні сторінки; вступ;
- основна частина звіту за розділами відповідно до завдання;
- висновки містять основні результати практики.


Форми та методи контролю

Контроль знань і умінь студентів (поточний і підсумковий) з навчальної практики здійснюють згідно з кредитно-модульною системою організації навчального процесу. Рейтинг студента із засвоєння дисципліни визначається за 100 бальною шкалою.

Критерії оцінки рівня знань на заняттях навчальної практики. На заняттях кожен студент з кожної теми виконує індивідуальні завдання. Рівень знань оцінюється: “відмінно” – студент дає вичерпні, обґрунтовані, теоретично і практично вірні відповіді не менш ніж на 90% запитань, рішення задач та лабораторні вправи вірні, демонструє знання підручників, посібників, інструкцій, проводить узагальнення і висновки, акуратно оформляє завдання; “добре”– коли студент володіє знаннями матеріалу, але допускає незначні помилки у формуванні термінів, категорій і розрахунків, проте за допомогою викладача швидко орієнтується і знаходить правильні відповіді; “задовільно”– коли студент дає правильну відповідь не менше ніж на 60% питань, або на всі запитання дає недостатньо обґрунтовані, невичерпні відповіді, допускає грубі помилки, які виправляє за допомогою викладача; “незадовільно з можливістю повторного складання” – коли студент дає правильну відповідь не менше ніж на 35% питань, або на всі запитання дає необґрунтовані, невичерпні відповіді, допускає грубі помилки.

Підсумкова (загальна оцінка) навчальної практики навчальної дисципліни.

Оцінювання знань студента відбувається за 100-бальною шкалою і переводиться в національні оцінки згідно з табл. 1 «Положення про екзамени та заліки у НУБіП України» (наказ про уведення в дію від 26.04.2023. № 10)

	НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ	СУ СМЯ НУБіП України 7.5 – 021 - 006
	<i>«Положення про робочу програму навчальної практики у Національному університеті біоресурсів і природокористування України»</i>	

Рейтинг студента, бали	Оцінка національна результати складання		за
	екзаменів	заліків	
90-100	Відмінно	Зараховано	
74-89	Добре		
60-73	Задовільно		
0-59	Незадовільно	Не зараховано	

Рекомендовані джерела інформації

1. Біотехнологія мікробного синтезу: навчальний посібник. НУБіП України. Патица Т.І., Патица М.В. Вінниця: ТОВ «Нілан-ЛТД», 2018: 272.
2. Загальна (промислова) біотехнологія: навчальний посібник/ М.Д. Мельничук, О.Л.Кляченко, В.В.Бородай, Ю.В.Коломієць. – Вінниця: ТОВ «Нілан-ЛТД», 2014. - 253 с.
3. Буценко Л.М., Пенчук Ю.М., Пирог Т.П. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: навч. посіб. – К.: НУХТ, 2010.- 323 с.
4. Біотехнологія: Підручник / В.Г. Герасименко, М.О. Герасименко, М.І. Цвіліховський та ін.; Під общ. ред. В.Г. Герасименка. — К.: Фірма «ІНКОС», 2006. — 647 с.
5. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: підручник / Пирог Т.П. — К.: НУХТ, 2004. — 471 с.
6. Пирог Т.П. Загальна біотехнологія: підручник / Т.П. Пирог, О.А. Ігнатова. – К.: НУХТ, 2009. – 336 с.
7. Юлевич О. І., Ковтун С. І., Гиль М. І. Біотехнологія : навчальний посібник. - Миколаїв : МДАУ, 2012. - 476 с.
8. Пономарьов П. Х., Донцова І. В. Генетично модифікована продовольча сировина і харчові продукти, вироблені з її використанням. - К. : Центр учбової літератури, 2009. – 124 с.
9. Закон України «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів : Закон України від 31 травня 2007 р. // Відомості Верховної Ради України. - 2007. № 35. - Ст.484.
10. <https://galychyna.com.ua/>
11. <https://obolon.ua/ua>
12. <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/771/97-%D0%B2%D1%80#Text>