17 MAY 2002

OPTIMIZATION OF *BACILLUS THURINGIENSIS* SUBSP. *KURSTAKI* PRODUCTION FOR BIOPESTICIDE USE

KHATTIYA SONSANAM

With compliments
of
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2002

ISBN 974-04-1279-3

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
K450
2002
C.2

Copyright by Mahidol University

4136669 SCBT/M :MAJOR: BIOTECHNOLOGY; M. Sc. (BIOTECHNOLOGY)
KEY WORDS : *BACILLUS THURINGIENSIS* SUBSP. *KURSTAKI*/ HIGH CELL DENSITY/ FED-BATCH CULTIVATION/ FISH SOLUBLE.

KHATTIYA SONSANAM: OPTIMIZATION OF *BACILLUS THURINGIENSIS* SUBSP. *KURSTAKI* PRODUCTION FOR BIOPESTICIDE USE. THESIS ADVISORS; SOMCHAI CHAUVATCHARIN, Ph. D., AMARET BHUMIRATANA, Ph. D., CORNEL VERDUYN, Ph. D. VITTHAYA MEEVOODHISOM, Ph. D., 151 P. ISBN 974-04-1279-3

Bacillus thuringiensis (Bt) is a widely used bacterium as biopesticide. For industrial scale production, optimization of *Bt* production is required. In this study medium and process optimization were made to obtain high cells density and insecticidal activity.

Firstly, fish soluble (FS), a cheap alternative nitrogen source, was introduced and effect of nutrient (i.e. glucose, FS, phosphate) concentrations on cell and sporulation efficiency were investigated. The results suggested that FS could be used to replace the costly yeast extract. Biomass was promoted at high concentrations of glucose, FS as well as phosphate. However, spore formation was delayed with increasing concentrations of glucose, FS or phosphate. The cultivation of *Btk* in bioreactor have also been conducted since the better control and high aeration could be performed and hence high cell density and rapid spore formation could be gained. Next, several culture techniques such as batch and fed-batch with different feeding strategies were carried out to elucidate the suitable condition and optimal process for *Btk* cell production. Exponential fed-batch technique using combination of glucose and FS solution as feed medium can provide high cell density and early spores formation at high productivity.

The results suggest that to avoid catabolite repression in the culture, the level of glucose should be controlled at low level. FS concentration should be balanced with glucose concentration to reduce spore formation time. Moreover, the optimal ratio of glucose and FS feeding medium for exponential fed-batch cultivation, which gave highest cell density (157.5 (OD_{660})) with high cell and high spore productivity (4.63 OD/h and 2.92 OD/h, respectively), is the ratio at 1:1.24 (w/w). Furthermore, bioassay was performed to test the toxicity of *Btk* spore/crystal mixtures. Toxicity as well as toxin protein of *Btk* was decreased when sporulation was delayed. This would be due to effect of protease activity in later stage of longer cultivation.

According to the above results, it can be concluded that high cell density insecticidal activity was obtained with rapid cell growth and spore formation using exponential fed-batch strategy at proper ratio of glucose and FS solution as the feeding medium. Optimizations of *Bt* were obtained in this study. However, further research in this field is recommended.

Copyright by Mahidol University

4136669 SCBT/M : สาขาวิชา:เทคโนโลยีชีวภาพ; วท. ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ขัตติยา สอนสนาม : การพัฒนากระบวนการผลิต *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* ที่มีประสิทธิภาพเพื่อใช้เป็นสารฆ่าแมลงศัตรูพืช (OPTIMIZATION OF *BACILLUS THURINGIENSIS* SUBSP. *KURSTAKI* PRODUCTION FOR BIOPESTICIDE USE.) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : สมชาย เชื้อวัชรินทร์, Ph. D., อมเรศ ภูมิรัตน, Ph. D., คอเนล เวอร์-เดิน, Ph. D., วิทยา มีวุฒิสม, Ph. D. 151 หน้า. ISBN 974-04-1279-3

แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) เป็นเชื้อที่มีการใช้อย่างกว้างขวางเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช ดังนั้นการพัฒนาสูตรอาหารและกระบวนการผลิตเพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงจึงมีความจำเป็นในการผลิตระดับอุตสาหกรรม ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจะพัฒนาสูตรอาหารและกระบวนการเลี้ยงเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เซลล์ที่มีความเข้มข้นสูงทั้งมีประสิทธิภาพในการฆ่าแมลง (Insecticidal activity) สูงไปพร้อมกัน

โดยในการศึกษาได้มีการทดสอบการใช้น้ำสกัดจากปลา (FS) เป็นแหล่งอาหารไนโตรเจนทางเลือกที่ราคาถูก รวมทั้งศึกษาอิทธิพล และความเข้มข้นของสารอาหาร (น้ำตาลกลูโคส, น้ำสกัดจากปลา (FS) ตลอดจนฟอสเฟต) ที่มีต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อ ผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่า FS สามารถใช้แทน yeast extract ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาแพงได้ และพบว่าความเข้มข้นเซลล์จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกลูโคส และ FS ในขณะที่การสร้างสปอร์จะช้าลงที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส หรือ FS ตลอดจนฟอสเฟตความเข้มข้นสูง การศึกษาการเลี้ยง *Btk* ในถังปฏิกรณ์พบว่าสามารถเลี้ยงให้ได้ความเข้มข้นสูง และมีการสร้างสปอร์ที่เร็วเนื่องจากในถังปฏิกรณ์สามารถควบคุมสภาวะและมีการให้อากาศได้ดี ต่อจากนั้นได้มีการศึกษาการใช้เทคนิคการเลี้ยงแบบต่าง ๆ ได้แก่ batch และ fed-batch ที่มีการเติมอาหารในรูปแบบต่างๆ

ผลการศึกษาพบว่าการเลี้ยงแบบ exponential fed-batch ที่มีการให้ทั้งน้ำตาลกลูโคส และ FS สามารถให้ความเข้มข้นเซลล์สูง และมีการสร้างสปอร์เร็วที่สุด เนื่องจากวิธีนี้สามารถลดการเกิด catabolite repression โดยการควบคุมระดับน้ำตาลให้อยู่ในระดับต่ำตลอดการทดลอง นอกจากนี้ความความเข้มข้นของ FS ควรใช้ในระดับที่สมดุลกับน้ำตาลกลูโคสเพื่อลดระยะเวลาการสร้างสปอร์ นอกจากนี้ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าสัดส่วนของอาหารสำหรับใช้เติมใน fed-batch ที่เหมาะสมของน้ำตาลกลูโคสและFS คือ 1:1.24 (w/w) สามารถให้ความเข้มข้นเซลล์สูงที่สุด คือ 157.5 (OD_{660}) รวมทั้งให้ผลิตผลของเซลล์ และ สปอร์สูงที่สุด คือ 4.63 OD/h และ 2.92 OD/h ตามลำดับ นอกจากนี้ผลของการทดสอบความเป็นพิษของสารผสมระหว่าง สปอร์และคริสตัลของเชื้อ *Btk* พบว่าปริมาณ toxin protein และความเป็นพิษจะลดลงในการเลี้ยงที่มีการสร้าง สปอร์ใช้เวลายาวนาน ทั้งนี้น่าจะเป็นผลมาจากเอนไซม์โปรตีเอสที่พบในขั้นตอนสุดท้ายของการเลี้ยงที่ยาวนานขึ้น

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเทคนิค exponential fed-batch ที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคส และ FS ในสัดส่วนที่เหมาะสม จึงเป็นกระบวนการที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้นสูงและมีการสร้างสารควบคุมแมลงที่มีประสิทธิภาพสูง ถึงแม้ในการศึกษานี้จะได้กระบวนการที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *Bt* แต่อย่างไรก็ตามควรที่จะมีการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมต่อไป

Copyright by Mahidol University