



E46980



CULTIVATION OF BACILLUS IN BIO-REACTOR: *B. subtilis* KMP-BCD-1,  
*B. subtilis* KMP-N001, *B. pumilus* KMP-T061, *B. polymyxa* KBS-9 AND  
*B. licheniformis* KMP-N5091

MISS MONRAT TORAKSA

A SPECIAL PROJECT STUDY SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE  
(BIOTECHNOLOGY)

SCHOOL OF BIORESOURCES AND TECHNOLOGY  
KING MONGKUT'S UNIVERSITY OF TECHNOLOGY THONBURI

2010



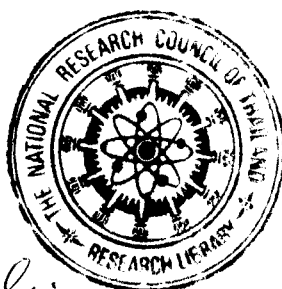


E46980

Cultivation of Bacillus in Bio-reactor: *B. subtilis* KMP-BCD-1, *B. subtilis* KMP-N001,  
*B. pumilus* KMP-T061, *B. polymyxa* KBS-9 and  
*B. licheniformis* KMP-N5001

Miss Monrat Toraksa B.Sc. (Biotechnology)

A Special Project Study Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the  
Degree of Master of Science (Biotechnology)  
School of Bioresources and Technology  
King Mongkut's University of Technology Thonburi  
2010



Project Committee

Saengchai Akeprathumchai  
.....  
(Lect. Saengchai Akeprathumchai, Ph.D.)

Chairman of project committee

Yuwapin Dandusitapunth  
.....  
(Assoc. Prof. Yuwapin Dandusitapunth, Ph.D.)

Member and project advisor

Pairat Thitisak  
.....  
(Mr. Pairat Thitisak, D.V.M., M.B.A.)

Member

T. Chalermchaikit  
....., Member  
(Assoc. Prof. Thongchai Chalermchaikit, D.V.M., Ph.D.)

Special Project Study Title	Cultivation of Bacillus in Bio-reactor: <i>B. subtilis</i> KMP-BCD-1, <i>B. subtilis</i> KMP-N001, <i>B. pumilus</i> KMP-T061, <i>B. polymyxa</i> KBS-9 and <i>B. licheniformis</i> KMP-N5001
Credits	6
Candidate	Miss Monrat Toraksa
Advisor	Assoc. Prof. Dr. Yuwapin Dandusitapunth
Program	Master of Science
Field of Study	Biotechnology (Biotechnology Practice School)
Division	Biotechnology
Faculty	School of Bioresources and Technology
B.E.	2553

### Abstract

**E46980**

The objective of the research was to gain more insight into characteristics of culture under submerged fermentation in a 2L fermentor using Factory's medium. The 5 strains of Bacilli were adopted: *Bacillus subtilis* KMP-BCD-1, *B. subtilis* KMP-N001, *B. pumilus* KMP-T061, *B. polymyxa* KBS-9 and *B. licheniformis* KMP-N5001. The inoculum transferring time in Tryptic Soy Broth (TSB) medium of each strain was determined before inoculated into the 2L fermentor.

After cultivation of each strain in TSB for growth curve study, under shaking condition with a magnetic stirrer at room temperature, it was concluded that most of the strain reached late logarithmic phase by 12 hours of cultivation in TSB medium under Factory's protocol, excepted *B. licheniformis* KMP-T061 which entered to late logarithmic phase at 14 hours. Therefore, the optimal transferring time for 4 strains, *B. subtilis* KMP-BCD-1, *B. subtilis* KMP-N001, *B. pumilus* KMP-T061, *B. polymyxa* KBS-9 were 12 hours, except for *B. licheniformis* KMP-T061 which was suggested to transfer the inoculum at 14 hours, instead of 12 hours of cultivation.

The cultivation of all strains in the 2L fermentor was performed at 350 rpm, 2 vvm and 30°C with uncontrolled pH throughout the cultivation process. The cultivation condition of temperature, pH, agitation and aeration was selected available in literature which provided a good condition for Bacillus's growth. The results were found that total viable cells of all five strains were around  $10^9$  cfu/ml, excepted in *B. subtilis* KMP-N001 which was about  $10^8$  cfu/ml, at 48 hours. The culture formed spores after 12 hours cultivation, and reached up to 80% at 24 hours and turned to almost 100% spore formation at 48 hours. The spore formation was about 95-100 % for all tested strains.

**Keywords:** *B. subtilis* / *B. licheniformis* / *B. pumilus* / *B. polymyxa* / spore formation

หัวข้อโครงการวิจัยพิเศษ

การเจริญเติบโตของแบซิลลัสในถังปฏิกรณ์: *B. subtilis* KMP-BCD-1, *B. subtilis* KMP-N001, *B. pumilus* KMP-T061, *B. polymyxa* KBS-9 และ *B. licheniformis* KMP-N5001

หน่วยกิต

6

ผู้เขียน

นางสาวมนรัตน์ โครักษา

อาจารย์ที่ปรึกษา

รองศาสตราจารย์ ดร. ยุกพิน ด้านคุสิตาพันธ์

หลักสูตร

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

สาขาวิชา

เทคโนโลยีชีวภาพ (ทักษะเทคโนโลยีชีวภาพ)

สายวิชา

เทคโนโลยีชีวภาพ

คณะ

ทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี

พ.ศ.

2553

บทคัดย่อ

**E46980**

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาข้อมูลในเชิงลึกสำหรับการเพาะเลี้ยงแบซิลลัสในถังปฏิกรณ์ขนาด 2 ลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลวสูตรของโรงงาน ศึกษาแบซิลลัสทั้งหมด 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus subtilis* KMP-BCD-1, *B. subtilis* KMP-N001, *B. pumilus* KMP-T061, *B. polymyxa* KBS-9 และ *B. licheniformis* KMP-N5001 และศึกษาอายุหัวเชื้อที่เหมาะสมในอาหารเหลว Tryptic Soy Broth (TSB) เพื่อนำไปใช้ในถังปฏิกรณ์ต่อไป

ในการศึกษารูปแบบการเจริญของแบซิลลัสทั้ง 5 สายพันธุ์ในอาหารเหลว TSB เพื่อศึกษารูปแบบการเจริญเติบโต ภายใต้สภาวะที่มีการกวนด้วยแท่งแม่เหล็ก อุณหภูมิห้อง สรุปได้ว่า แบซิลลัสทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ : *B. subtilis* KMP-BCD-1, *B. subtilis* KMP-N001, *B. pumilus* KMP-T061 และ *B. polymyxa* KBS-9 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร TSB ตามขั้นตอนของโรงงาน จะเข้าสู่ปลายระยะการเจริญแบบทวีคูณ ภายใน 12 ชั่วโมง ยกเว้น *B. licheniformis* KMP-T061 เพียงสายพันธุ์เดียวเท่านั้นที่เข้าสู่ปลายระยะการเจริญแบบทวีคูณ ที่ชั่วโมงที่ 14 ดังนั้น อายุหัวเชื้อที่เหมาะสมทั้ง 4 สายพันธุ์ดังกล่าว คือ 12 ชั่วโมง ยกเว้น *B. licheniformis* KMP-T061 ที่ควรเลือกที่ 14 ชั่วโมง ในการนำไปใช้เป็นหัวเชื้อในถังปฏิกรณ์ต่อไป

สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในถังปฏิกรณ์ขนาด 2 ลิตร คือ 350 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 2 vvm ที่ 30 องศาเซลเซียส และไม่มีการควบคุมพีเอชตลอดกระบวนการหมัก ซึ่งสภาวะเหล่านี้ ได้คัดเลือกมาจากรายงานวิจัยสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย และจากผลการทดลองภายใต้สภาวะดังกล่าวในถังปฏิกรณ์ขนาด 2 ลิตร โดยใช้สูตรอาหารของโรงงาน พบ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้ง 5 สายพันธุ์ มีค่าประมาณ  $10^9$  cfu/ml ภายใน 48 ชั่วโมง ยกเว้น *B. subtilis* KMP-N001 ซึ่งมีจำนวนเซลล์มีชีวิตประมาณ  $10^8$  cfu/ml และพบว่า เซลล์เริ่มสร้างสปอร์เมื่อเข้าสู่กระบวนการหมักเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และมีการสร้างสปอร์มากถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 24 ชั่วโมง และเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของสปอร์ทั้งหมดที่เวลา 48 ชั่วโมง หรือโดยทั่วไป คิดเป็นการสร้างสปอร์ประมาณ 95 – 100 เปอร์เซ็นต์ ในสายพันธุ์ที่ทดสอบ

คำสำคัญ: *B. subtilis* / *B. licheniformis* / *B. pumilus* / *B. polymyxa* / การสร้างสปอร์

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere and grateful appreciation to my advisor, Assoc. Prof. Dr. Yuwapin Dandusitapunth at King Mongkut's University of Technology Thonburi (KMUTT) for her kindness, guidance, and assistance throughout my study.

I am also very grateful to my advisory committee, Dr. Saengchai Akeprathumchai at KMUTT and Assoc. Prof. Dr. Thongchai Chalermchaikit (D.V.M., Ph.D.) from Chulalongkorn University for their constructive comments.

I appreciate to my industry advisors, Mr. Pairat Thitisak (D.V.M.), Ms. Sarocha Jirawatthanapong, Ms. Nongnuch Sirisukhodom and Mr. Anurak Roopchom, at K.M.P. BIOTECH CO., LTD. for their technical support and helpful suggestion in this work.

Special thanks to my friends at King Mongkut's University of Technology Thonburi, particularly at Microbial Fermentation Technology Laboratory for their support and encouragement.

I am grateful to the "Partnership of Innovation and Knowledge Project" supported by Bangkok Bank Public Company Limited and The Thailand Research Fund for financial support during my study.

Finally, I would like to express my deepest appreciation and gratitude to my parents and family for their care, support, understanding and encouragement throughout my study.

## CONTENTS

	PAGE
ENGLISH ABSTRACT	ii
THAI ABSTRACT	iii
ACKNOWLEDGEMENTS	v
CONTENTS	vi
LIST OF TABLES	viii
LIST OF FIGURES	ix
LIST OF SYMBOLS AND ABBREVIATIONS	x
 <b>CHAPTER</b>	
<b>1. INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
1.1 Research Background	1
1.2 Objectives	1
1.3 Scope of work	1
1.4 Expected outcome	1
<b>2. LITERATURE REVIEWS</b>	<b>2</b>
2.1 Microorganism used as probiotics	2
2.1.1 Lactic acid bacteria	2
2.1.2 Bacillus	3
2.1.3 Yeast	4
2.2 Factors Affecting growth of Bacillus	11
2.2.1 Temperature	11
2.2.2 pH	11
2.2.3 Carbon sources	11
2.2.4 Nitrogen sources	12
2.2.5 Agitation	12
2.2.6 Aeration	12
<b>3. MATERIALS AND METHODS</b>	<b>15</b>
3.1 Equipments	15
3.2 Chemical agents	15
3.3 Biological medium	15
3.4 Microorganisms	15
3.5 Inoculum preparation	16
3.6 Preparation of Fermentor for Bacterial Cultivation Process	16
3.6.1 Vessel and six control modules	16
3.6.2 Fermentation protocol	16
3.7 Cultivation in Bio-reactor	17
3.8 Analytical Methods	17
3.8.1 Determination of total sugar	17
3.8.2 Determination of reducing sugar	17
3.9 Cell determinations	17
3.9.1 Determination of viable cells	17
3.9.2 Determination of spore numbers	17
<b>4. RESULTS AND DISCUSSIONS</b>	<b>18</b>
4.1 Optimum transferring hours of culture for use as inoculum in TSB medium: growth curve pattern	18



4.2	Reviews of <i>Bacillus</i> growth conditions for growing in 2L fermentor	22
4.3	The cultivation of <i>Bacillus spp.</i> in a 2L fermentor using KMP medium	25
<b>5.</b>	<b>CONCLUSION AND SUGGESTION</b>	<b>36</b>
5.1	Conclusion	36
5.1.1	Optimum transferring hours of culture for use as inoculum in TSB medium: growth curve pattern	36
5.1.2	Reviews of <i>Bacillus</i> growth conditions for growing in 2L fermentor	36
5.1.3	The cultivation of <i>Bacillus spp.</i> in a 2L fermentor using KMP medium	36
5.2	Suggestion	36
	<b>REFERENCES</b>	<b>37</b>
	<b>APPENDICES</b>	<b>46</b>
	<b>CURRUCULUM VITAE</b>	<b>59</b>

## LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
2.1	Probiotics Research and Producer Information	6
2.2	Condition for product and growth of <i>Bacillus</i> from reports	13
4.1	Condition for product and growth of <i>Bacillus</i> from reports	23
4.2	Viable cells and spore numbers of <i>B. subtilis</i> KMP-BCD-1 in KMP medium in a 2L fermentor	27
4.3	Viable cells and spore numbers of <i>B. subtilis</i> KMP-N001 in KMP medium in a 2L fermentor	29
4.4	Viable cells and spore numbers of <i>B. pumilus</i> KMP-T061 in KMP medium in a 2L fermentor	31
4.5	Viable cells and spore numbers of <i>B. polymyxa</i> KBS-9 in KMP medium in a 2L fermentor	33
4.6	Viable cells and spore numbers of <i>B. licheniformis</i> KMP-N5001 in KMP medium in a 2L fermentor	35
C1	The growth of <i>B. subtilis</i> KMP-BCD-1 and total sugar in TSB medium under shaking condition at room temperature	53
C2	The growth of <i>B. subtilis</i> KMP-N001 and reducing sugar in TSB medium under shaking condition at room temperature	54
C3	The growth of <i>B. pumilus</i> KMP-T061 and reducing sugar in TSB medium under shaking condition at room temperature	54
C4	The growth of <i>B. polymyxa</i> KBS-9 and reducing sugar in TSB medium under shaking condition at room temperature	55
C5	The growth of <i>B. licheniformis</i> KMP-N5001 and reducing sugar in TSB medium under shaking condition at room temperature	55
C6	The time course of viable cells, spore numbers and total sugar during batch fermentation of <i>B. subtilis</i> KMP-BCD-1 in KMP medium in a 2L fermentor at 30°C, 250 rpm, 2 vvm, not controlled pH	56
C7	The time course of viable cells, spore numbers and total sugar during batch fermentation of <i>B. subtilis</i> KMP-N001 in KMP medium in a 2L fermentor at 30°C, 250 rpm, 2 vvm, not controlled pH	56
C8	The time course of viable cells, spore numbers and total sugar during batch fermentation of <i>B. pumilus</i> KMP-T061 in KMP medium in a 2L fermentor at 30°C, 250 rpm, 2 vvm, not controlled pH	57
C9	The time course of viable cells, spore numbers and total sugar during batch fermentation of <i>B. polymyxa</i> KBS-9 in KMP medium in a 2L fermentor at 30°C, 250 rpm, 2 vvm, not controlled pH	57
C10	The time course of viable cells, spore numbers and total sugar during batch fermentation of <i>B. licheniformis</i> KMP-N5001 in KMP medium in a 2L fermentor at 30°C, 250 rpm, 2 vvm, not controlled pH	58

## LIST OF FIGURES

FIGURES	PAGE
2.1	Lactic acid bacteria under the electron microscope 3
2.2	Bacillus in vegetative cells and spores form as seen in a light microscope 4
2.3	Yeasts under an electron microscope 4
3.1	The BioFlo 110 with water-jacketed vessel 16
4.1	The growth of <i>B. subtilis</i> KMP-BCD-1 and total sugar consumption in TSB medium under shaking condition, room temperature 19
4.2	The growth of <i>B. subtilis</i> KMP-N001 and total sugar consumption in TSB medium under shaking condition, room temperature 19
4.3	The growth of <i>B. pumilus</i> KMP-T061 and total sugar consumption in TSB medium under shaking condition, room temperature 20
4.4	The growth of <i>B. polymyxa</i> KBS-9 and total sugar consumption in TSB medium under shaking condition, room temperature 21
4.5	The growth of <i>B. licheniformis</i> KMP-N5001 and total sugar consumption in TSB medium under shaking condition, room temperature 21
4.6	The time course of viable cells, spore numbers and total sugar during batch fermentation of <i>B. subtilis</i> KMP-BCD-1 in KMP medium in a 2L fermentor at 30°C, 250 rpm, 2 vvm, uncontrolled pH 26
4.7	The time course of viable cells, spore numbers and total sugar during batch fermentation of <i>B. subtilis</i> KMP-N001 in KMP medium in a 2L fermentor at 30°C, 250 rpm, 2 vvm, uncontrolled pH 28
4.8	The time course of viable cells, spore numbers and total sugar during batch fermentation of <i>B. pumilus</i> KMP-T061 in KMP medium in a 2L fermentor at 30°C, 250 rpm, 2 vvm, uncontrolled pH 30
4.9	The time course of viable cells, spore numbers and total sugar during batch fermentation of <i>B. polymyxa</i> KBS-9 in KMP medium in a 2L fermentor at 30°C, 250 rpm, 2 vvm, uncontrolled pH 32
4.10	The time course of viable cells, spore numbers and total sugar during batch fermentation of <i>B. licheniformis</i> KMP-N5001 in KMP medium in a 2L fermentor at 30°C, 250 rpm, 2 vvm, uncontrolled pH 34
B1	Standard curve of glucose concentration (g/L) at optical density 570 nm for reducing sugar determination 51
B2	Standard curve of glucose concentration (g/L) at optical density 485 nm for total sugar determination 52

**LIST OF SYMBOLS AND ABBREVIATIONS**

%	=	Percent
°C	=	Degree Celsius
cfu	=	Colony forming units
DC	=	Dry cell
DO	=	Dissolved Oxygen
g	=	Gram
g/l	=	Gram per liter
hrs	=	Hour
kg	=	Kilogram
L	=	Liter
mg	=	Milligram
ml	=	Milliliter
min	=	Minute
nm	=	Nanometer
N	=	Normal
rpm	=	Round per minute
v/v	=	Volume to volume ratio
v/w	=	Volume to weight ratio
vvm	=	Volumes of air per Volume of batch per Minute