ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E46294

LAGRE SCALE PRODUCTION OF ANTI-CHICKEN COCCIDA IgY

MR. THANASIT INTANORAT

A THESIS 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
2011

b00256176

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E46294

Large Scale Production of Anti-Chicken coccidia IgY

Mr. Thanasit Intanorat B.Sc. (Biotechnology)

A Thesis 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
2011

THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF THAILAND
RESEARCH LIBRARY

Thesis Committee

..... Chairman of Thesis Committee

(Asst. Prof. Phenjun Mekvichitsaeng, Ph.D.)

..... Member and Thesis Advisor

(Asst. Prof. Kanokwan Poomputsa, Ph.D.)

..... Member and Thesis Co-Advisor

(Lect. Saengchai Akeprathumchai, Ph.D.)

..... Member

(Lect. Somkiet Techkarnjanarak, Ph.D.)

..... Member

(Lect. Anongnat Sopanangkul, Ph.D.)

Copyright reserved

Thesis Tile	Large Scale Production of Anti - Chicken coccidia IgY
Thesis Credits	12
Candidate	Mr.Thanasit Intanorat
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Kanokwan Poomputsa
	Dr. Saengchai Akeprathumchai
Program	Master of Science
Field of Study	Biotechnology
Department	Biotechnology
Faculty	School of Bioresources and Technology
B.E.	2554

Abstract

E46294

Chicken coccidiosis is an intestinal infectious disease caused by the *Eimeria* protozoan parasite. This disease causes impaired growth rate in broilers and reduces egg production in laying hens, resulting in annual economic losses to the world's poultry industry. Due to increasing concerns with prophylactic drug use, the appearance of *Eimeria* drug resistance and high costs of vaccines, alternative control methods need to be developed. Oral administration of specific egg yolk antibodies (IgY) has been proven to successfully treat coccidiosis in chickens (Lee *et al.*, 2009).

The aims of this study are, therefore, to study large scale production of anti-chicken coccidia IgY for animal feed supplement purpose. In this study, anti-chicken coccidia IgY was produced in 855 six month old Hisex hens. Antigen that consists of various sporulated *Eimeria* spp. was used for immunization of these hens. Anti-chicken coccidia IgY in immunized hen egg yolk was detected at week 6 after first immunization. Immunofluoresence assay showed that the IgY produced specifically bind to coccidia cells at sporulated stage. The majority of the immunized hens (76%) produced a moderate level of the anti-chicken coccidia IgY and 14 % of the hens produced a high level of IgY, while 10% of the hens was found not producing the anti-chicken coccidia IgY. The anti-chicken coccidia IgY production period of immnunized hens was determined at approximately 14 weeks, from week 6 to week 19 after the first immunization.

E46294

The IgY was planned to be used as dried powder. For preparing dried IgY product, spray drying method with an air inlet temperature of 140°C and an air outlet temperature of 72°C was choosen to dry homogenized egg yolk, which was weekly collected from immunized hens. It was found that this spray drying condition did not affect IgY activities when tested by indirect ELISA. There were some pathogenic bacteria detected in the sample due to egg shell contamination. However, those pathogenic bacteria were significantly reduced after spray drying process. Thus, sterilization of egg shells should be considered in order to avoid the contamination altogether. The dried anti-chicken coccidia IgY product was stored at 4°C and 30°C, and retained its activities for around 16 and 12 months, respectively. Because of its stability at 30°C, this dried IgY powder is ideal for use in chicken feed. Not only as a supplement in the animal dried feed, the dried IgY powder was also tested as a supplement in drinking water. It was revealed by sedimentation analysis that the dried IgY particles remained in water suspension for 1 hour and 2 hours when 0.1% and 0.3% Tween 80 were added, respectively.

In summary, strategies for large scale production of anti-chicken coccidia IgY were revealed in this study. The anti-chicken coccidia IgY was found specific to the parasite and dried IgY product is suitable to be used in both chicken feed and drinking water.

Keywords: Anti-chicken coccidia IgY / Coccidiosis / *Eimeria* / Large scale production

หัวข้อโครงการวิจัยพิเศษ	การผลิตอิมมูโนโกลบูลิน Y ที่ต้านเชื้อบิดในไก่ ในระดับกึ่งอุตสาหกรรม
หน่วยกิต	12
ผู้เขียน	นายธนาสิทธิ์ อินทะโนรัตน์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. กนกวรรณ พุ่มพุทรา
	ดร. แสงชัย เอกประทุมชัย
หลักสูตร	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
สายวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
คณะ	ทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี
พ.ศ.	2554

บทคัดย่อ

E46294

โรคบิดไก่เป็นโรคติดเชื้อในลำไส้ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อปรสิตจำพวกโปรโตซัวในตระกูล *Eimeria* โรคดังกล่าวเป็นสาเหตุให้มีการลดอัตราการเติบโตของไก่เนื้อ และลดการผลิตไข่ในไก่ไข่ ส่งผลให้มีการสูญเสียทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมสัตว์ปีกทั่วโลก เนื่องจากมีการเพิ่มขึ้นของความกังวลเกี่ยวกับสารเคมีตกค้างจากการใช้ยารักษา การดื้อยาของเชื้อ *Eimeria* รวมไปถึงวัคซีนที่มีราคาสูง ทำให้มีความจำเป็นต้องพัฒนาทางเลือกใหม่สำหรับใช้ในการควบคุมโรค โดยมีรายงานว่าการใช้แอนติบอดีในไข่แดง (อิมมูโนโกลบูลิน Y, IgY) ที่จำเพาะต่อเชื้อบิดผสมอาหารสามารถควบคุมโรคบิดไก่ได้ (Lee *et al.*, 2009)

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ เพื่อผลิตอิมมูโนโกลบูลิน Y (IgY) ที่ต้านต่อเชื้อบิดไก่ในระดับกึ่งอุตสาหกรรม และ ตรวจสอบคุณลักษณะของ IgY ที่ผลิต เพื่อตรวจสอบความเหมาะสมในการนำไปใช้เสริมในอาหารสัตว์ IgY ที่จำเพาะต่อเชื้อบิดไก่ในการศึกษาครั้งนี้ถูกผลิตโดยใช้ไก่ไข่สายพันธุ์ Hisex อายุ 6 เดือน จำนวน 855 ตัว และ ใช้เชื้อบิดไก่ (Eimeria *spp.*) หลายสายพันธุ์เป็นแอนติเจนในการฉีดกระตุ้น ผลการศึกษาพบว่า หลังจากการฉีดกระตุ้นครั้งแรก ไตเตอร์ของ IgY ที่ต้านต่อเชื้อบิดไก่สามารถถูกตรวจพบในไข่แดงของไก่ที่ถูกฉีดกระตุ้นที่ระดับ 2560 ในสัปดาห์ที่หก เมื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิค Immunofluorescence แสดงให้เห็นว่า IgY ที่ผลิตขึ้นสามารถจับอย่างจำเพาะเจาะจงกับเชื้อบิดไก่ในระยะสร้างสปอร์ จากการสุ่มตรวจไข่พบว่าไก่ที่ถูกฉีดกระตุ้นให้ผลผลิต IgY ที่ต้านต่อเชื้อบิดไก่ในระดับสูง ปานกลาง และไม่มีการผลิต IgY คิดเป็นร้อยละ 76, 14 และ

E46294

10 ตามลำดับ ไก่ที่ถูกฉีดกระตุ้นมีช่วงระยะในการผลิต IgY ที่ต้านต่อเชื้อบิดไก่ จากสัปดาห์ที่ 6 ถึง 19 หลังจากการฉีดกระตุ้นครั้งแรกรวมระยะเวลาประมาณ14 สัปดาห์

IgY ที่ผลิตได้ถูกนำไปใช้ในการออกแบบให้อยู่ในรูปผลิตภัณฑ์ไข่ผง โดยใช้วิธีการ spray dry ในการแปรรูปไข่แดงสดให้เป็น IgY ในรูปผงแห้ง ที่อุณหภูมิขาเข้า 140 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิขาออก 72 องศาเซลเซียส เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA พบว่าสภาวะดังกล่าวไม่ส่งผลกระทบต่อกิจกรรมของ IgY ในการจับจำเพาะต่อแอนติเจน จากการตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในไข่แดงพบว่ามีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งน่าจะปนเปื้อนมากับเปลือกไข่ อย่างไรก็ตามพบว่าการใช้วิธี spray dry ช่วยทำให้จำนวนของแบคทีเรียก่อโรคลดลงได้บางส่วน เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนไปยังผลิตภัณฑ์ ในกระบวนการผลิตควรต้องคำนึงถึงการทำให้เปลือกไข่ปลอดเชื้อ เมื่อศึกษาอายุการใช้งานของผลิตภัณฑ์ IgY ผงแห้ง พบว่าผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียสมีอายุการใช้งานประมาณ 16 และ 12 เดือนตามลำดับ การที่ IgY ผงคงสภาพได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บ่งบอกถึงความสามารถในการนำไปผสมในอาหารสัตว์ ไม่เพียงแต่ความคาดหวังที่จะนำไปผสมอาหารแห้งเท่านั้น ผลิตภัณฑ์ IgY ยังได้รับการตรวจสอบการแขวนลอยในน้ำ จากการทดสอบพบว่าอนุภาคผลิตภัณฑ์ IgY สามารถคงตัวอยู่ในน้ำได้ 1 ชั่วโมงหรือ 2 ชั่วโมง เมื่อทำการเติม Tween 80 ร้อยละ 0.1 หรือ 0.3 ตามลำดับ

การตรวจวัดขนาดอนุภาคของผลิตภัณฑ์ IgY พบว่ามีขนาดเล็กกว่า 200 ไมครอนซึ่งเป็นขนาดที่อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้แขวนลอยในน้ำดื่ม นอกจากนี้การทดสอบการตกตะกอนของผลิตภัณฑ์ IgY พบว่า การเติม Tween 80 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 ลงไปในสารแขวงลอยของผลิตภัณฑ์ IgY สามารถยืดระยะเวลาในการการตกตะกอนของผง IgY ได้ประมาณ 2 ชั่วโมง

กล่าวโดยสรุป งานวิทยานิพนธ์นี้ได้ทำการศึกษาแนวทางในการผลิต IgY ที่ต้านต่อเชื้อบิดไก่ในระดับกึ่งอุตสาหกรรม IgY ซึ่งสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ IgY ที่ต้องการได้ โดยผลิตภัณฑ์แอนติบอดีนี้มีความจำเพาะกับเชื้อบิดไก่และสามารถนำไปใช้ผสมได้ทั้งในอาหารแห้งและน้ำดื่ม

คำสำคัญ: อิมมูโนโกลบูลิน Y (IgY) ที่ต้านต่อเชื้อบิดไก่ / โรคบิด / *Eimeria* / การผลิตในระดับกึ่งอุตสาหกรรม

ACKNOWLEDGMENTS

I am sincerely grateful to my main advisor, Asst. Prof. Dr. Kanokwan Poomputsa, for her continuously guidance and excellent support. I am also gratefully thank to Dr. Saengchai Akeprathumchai, my co-advisor who always indeedly supports me with new ideas to overcome my problems. My deep appreciations are also delivered to Dr. Phenjun Mekvichitsaeng, Dr. Somkiet Techkarnjanarak, and Dr. Anongnat Sopanangkul as members of the supervisory committee, for their valuable advices and support for this thesis.

I would also like to thank all of my colleagues at Animal cell Culture (ACC) laboratory, for their advises, kind motivation, and warm friendship during my study. Special thanks are expressed to my whole family, my parents, and my sister for their endless love, care, support, and encouragement for me.

Last but not least, I wish to express my sincere thanks to all those who have one way or another helped me in making this study a success, as well as expressing my apology that I could not mention personally one by one.

CONTENTS

	PAGE
ENGLISH ABSTRACT	ii
THAI ABSTRACT	iv
ACKNOWLEDGEMENT	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	x
LIST OF FIGURES	xi
LIST OF ABBREVIATIONS	xiii
CHAPTER	
1 INTRODUCTION	**1**
1.1 Background	1
1.2 Objectives	2
1.3 Research Outline	2
2 LITERATURE REVIEW	**3**
2.1 Chicken Coccidiosis	3
2.1.1 Characteristic of chicken coccidia	3
2.1.2 General life cycle of coccidia	6
2.1.3 Infectious feature and clinical sign of chicken coccidiosis	8
2.1.4 Control of chicken coccidiosis	11
2.2 Chicken Egg	16
2.2.1 Structure and chemical composition of hen egg	16
2.2.2 Egg yolk	18
2.3 Chicken egg yolk immunoglobulin (IgY)	18
2.3.1 Antibody	18
2.3.2 Antibody structure and class	19
2.3.3 Immunoglubolin Y (IgY)	21
2.3.4 Chicken IgY production	22
2.3.5 Large yield and scaleable production of IgY	30
2.3.6 Stability of IgY	31

2.3.7 Storability of IgY 33
2.4 IgY used for passive immunization 34
2.4.1 Passive immunization of anti-chicken coccidia IgY 36
2.5 Techniques use for characterization and determination of IgY 37
2.5.1 Indirect ELISA 37
2.5.2 Immunofluorescence 39
2.6 Quality control of egg product 40

3 MATERIALS AND METHODS 44
3.1 Instruments and Chemicals 44
3.1.1 Instruments 44
3.1.2 Chemicals 44
3.2 Production of anti-chicken coccidia IgY at large scale 45
3.2.1 Antigen preparation 45
3.2.2 Immunization of chickens 46
3.2.3 Sample preparation for IgY detection 46
3.2.4 Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for detection of anti-chicken coccidia IgY 46
3.2.5 Determination of anti-chicken coccidia IgY immunization efficiency 47
3.2.6 Determination of IgY production period 47
3.2.7 Extraction of anti-chicken coccidia IgY 48
3.2.8 Excystation of sporulated oocyst 48
3.2.9 Specificity of anti-chicken coccidia IgY 49
3.3 Spray drying process of anti-chicken coccidia IgY 50
3.4 Characterization of anti-chicken coccidia IgY produced at large scale 50
3.4.1 Effect of spraying dry process on IgY activity 50
3.4.2 Determination of particle size distribution of dried IgY product 51
3.4.3 Sedimentation of IgY yolk powder 51
3.4.4 Detection of bacterial contamination in fresh egg yolk and dried IgY product 51
3.4.5 Shelf life determination of dried anti-chicken coccidia IgY product 51

4 RESULTS AND DISCUSSION **52**

4.1 Anti-chicken coccidia IgY production and its specificity 52

4.1.1 Detection of anti-chicken coccidia IgY 52

4.1.2 Determination of extracted anti- chicken coccidia IgY titer 53

4.1.3 Specificity of anti-chicken coccidia IgY 54

4.2 Large scale production of anti-chicken coccidia IgY 57

4.2.1 Immunization efficiency 57

4.2.2 Productivity of IgY egg yolk powder 58

4.2.3 Determination of anti-chicken coccidia IgY production period 59

4.2.4 Detection of bacterial contamination of the dried anti-chicken coccidia IgY product 61

4.3 Characterization of dried anti-chicken coccidia IgY product 64

4.3.1 Anti-chicken coccidia IgY activity after spray drying 64

4.3.2 Particle size distribution of dried anti-chicken coccidia IgY product 65

4.3.3 Sedimentation of dried anti-chicken coccidia IgY product in water suspension 66

4.3.4 Shelf life determination of dried anti-chicken coccidia IgY product 67

5 CONCLUSION AND SUGGESTIONS **69**

5.1 Conclusion 69

5.2 Suggestions 70

REFERENCES **71**

APPENDICES **94**

A. CHEMICAL PREPARATION 95

B. EXPERIMENTAL RESULTS 97

CURRICULUM VITAE **102**

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
2.1	Characteristics of chicken *Eimeria spp.*	5
2.2	Chemical composition of hen egg	17
2.3	Antibody isotypes and its function	21
2.4	Effect of passive immunization by enteric pathogen-specific IgY	35
2.5	Comparison of the microflora on the surface of the egg shell and within spoiled eggs	42
4.1	Extracted IgY titer determined in fresh yolk sample collected at 13 weeks after the first immunization	54
4.2	Classification of 200 eggs from coccidia immunized hens using indirect ELISA	57
4.3	Numbers of egg, weight of fresh yolk and yolk powder derived from 855 immunized hens each week after immunization	58
4.4	The number of pathogenic microorganism in fresh yolk samples	62
4.5	The number of pathogenic microorganism in dried yolk powder after spray drying process	63
4.6	Particle size distribution of dried IgY product	65
4.7	Sedimentation of dried IgY product in 0.1% and 0.3% Tween 80 solution	66
4.4	The number of pathogenic microorganism in fresh yolk samples	62
4.5	The number of pathogenic microorganism in dried yolk powder after spray drying process	63
4.6	Particle size distribution of dried IgY product	65
B.1	Titer determination of extracted IgY in pooled fresh egg from week 13 after first immunization	97
B.2	Titer determination of anti-chicken coccidia IgY in pooled fresh yolk from week 14 -21 after first immunization	98
B.3	Titer determination of anti-chicken coccidia IgY in pooled dried yolk from week 14 -21 after first immunization	100

LIST OF FIGURES

FIGURE		PAGE
2.1	Unsporulated (a) and sporulated (b) coccidia oocyst	4
2.2	Morphology of *Eimeria* oocyst	4
2.3	General life cycle of coccidia (*Eimeria* spp.)	7
2.4	Location of the lesions caused by different *Eimeria* species in the gastrointestinal tract	9
2.5	The digestive system of poultry	10
2.6	Structural components of the eggshell, eggshell membrane, albumen, and yolk	17
2.7	The basic structural molecule of an antibody	20
2.8	The structural molecule of IgG and IgY	20
2.9	Indirect ELISA schematic	38
2.10	Immunofluorescence schematic	39
4.1	Anti-chicken coccidia IgY determination from 200 fresh yolk samples using indirect ELISA (Solid line indicated average OD at 450 of negative control samples)	53
4.2	Immunofluorescence showing specific binding of anti-chicken coccidia IgY (at dilution 320) to coccidia cells at sporulated stage. (a) Unsporulated oocysts (b) Sporulated oocysts (c) Extracted sporulated oocysts (1) Negative control using PBS as primary antibody (2) Negative control using IgY against adipocyte membrane proteins as primary antibody (3) Anti-chicken coccidia IgY as primary antibody	56
4.3	IgY titer of pooled fresh yolk monitored weekly after the third immunization (arrow indicate the time of immunization)	60
4.4	IgY titer of pooled dried yolk monitored weekly after third immunization (arrow indicate the time of immunization)	60
4.5	Comparison of IgY titer of pooled (▨) fresh yolk and (▦) dried yolk powder from week 15 to 17 after first immunization	64
4.6	Particle size distribution of dried IgY product	65

4.7 Anti-chicken coccidia IgY titer of dried IgY product from spray drying process stored at 4°C (▧) and 30°C (▤) a - c showed anti-chicken coccidia IgY titer of three samples of the dried IgY products 68

B.1 Standard curve for Bradford protein assay 97

LIST OF ABBREVIATION

°C	= Degree centrigrade or Celcius
%	= Percentage
µg	= Microgram
µL	= Microliter
µm	= Micrometer
Av	= Average
BSA	= Bovine serum albumin
cfu	= Colony forming unit
ELISA	= Enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	= Fetal bovine serum
FITC	= Fluorescein isothiocyanate
g	= Gravity force
IgY	= Immunoglobulin Y
kg	= Kilogram
L	= Liter
M	= Molar (mole/ liter)
mg	= Milligram
min	= Minute
ml	= Milliliter
mM	= Millimolar
nm	= Nanometer
No	= Number
OD	= Optical density
PBS	= Phosphate buffer saline
PEG	= Polyethylene glycol
PMSF	= Phenyl Methyl solfonyl Fluoride
REP	= Replicate
rpm	= Resolution per minute
w/v	= Weight/Volume