

УДК 579.852.11.24

Бойко М.В.

аспірант

кафедра екобіотехнології та екобіорізноманіття

Національний університет біоресурсів

і природокористування України

Київ, Україна

E-mail: maryaulina@gmail.com

ОПТИМІЗАЦІЯ СКЛАДУ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ ЕНТОМОПАТОГЕНІВ *BACILLUS* *THURINGIENSIS* 87/3

Анотація

Дослідження присвячене розробці оптимального складу рідкого поживного середовища для культивування в лабораторних умовах штаму бактерій *B. thuringiensis* 87/3 – біоагента-продуцента ентомотоксичних метаболітів.

За допомогою повнофакторного експерименту за планом Бокса-Бенкіна (3^3) оптимізоване поживне середовище на основі капустияного гідролізату для культивування штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3. В процесі активного експерименту досліджували вплив різного складу поживного середовища на ріст мікроорганізмів. Поживне середовище для вироцвання посівного матеріалу оптимізували за вмістом джерел вуглецевого і азотного живлення, а також за вмістом мікроелементів. Для збільшення виходу термостійких спор і кількості ендотоксину збагатили живильне середовище кукурудзяним екстрактом, АК та мінеральними солями (Mg, Mn, діаммоній фосфат). Оптимізацію поживного середовища проводили в чергуванні вмісту в середовищах максимальних і мінімальних значень складових компонентів.

Визначено раціональні межі і відповідні оптимальні значення речовин (факторів), які складають поживне середовище. Оптимальні концентрації в середовищі джерел вуглецю (15г/л глюкози), азоту (10г/л кукурудзяного екстракту) та фосфоровмісних неорганічних солей (1,5г/л діамонію фосфату). При культивуванні даного штаму в періодичних умовах при $t^{\circ}=30^{\circ}\text{C}$ кількість життєздатних клітин досягала $4,4 \times 10^9$ КУО/мл, при цьому спостерігалось синхронне спороутворення. Оптимальний варіант компонентів знаходиться на перетині максимального значення функції бажаності в зазначеному інтервалі кожного фактору. При цьому визначено раціональні межі і відповідні оптимальні значення факторів які складають поживне середовище. Оптимізоване середовище можна рекомендувати для культивування штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3 як в лабораторних, так і в промислових умовах.

Ключові слова: оптимізація; культивування; *B. thuringiensis* var. *thuringiensis*; середовище для культивування.

Вступ. На сьогодні актуальними є дослідження в напрямку біозахисту рослин, які мають за мету створення та впровадження сучасних біотехнологічних систем контролю шкідників за участю ентомопатогенних мікроорганізмів, спрямованого на відновлення та підтримку біоценотичної рівноваги агроценозів. Домінантне положення серед комплексу ентомопатогенних мікроорганізмів, відомих в світі та які використовуються в захисті рослин, займають ентомопатогени виду *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) [1,2]. Серологічні варіанти *Bt* продукують різні ентомотоксини, їх синтез багато в чому залежить від умов культивування культури. Токсигенність мікроорганізмів можна змінювати біотехнологічними процедурами (мінати умови культивування) та впливати, таким чином, на метаболізм в цілому. Найважливішою стадією у виробництві бактеріальних препаратів є отримання максимуму біомаси їх компонентів за мінімальний час культивування з досягненням максимального економічного ефекту [3, 4].

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Удосконалення технологічного процесу створення біологічного препарату на основі *Bt* передбачає пошук нових більш дешевих, ефективних субстратів і оптимізацію поживного середовища по джерелам вуглецевого і азотного живлення. Більшість досліджень метаболізму *Bt* проведено на різних формах простих середовищ. Особливо сприятливим виявилось поживне середовище, що містить 0,1% глюкози, 0,2% екстракту дріжджів, 0,2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,05% K_2HPO_4 та мінеральні солі [5].

Промислове виробництво препаративних форм вимагає більш дешевих середовищ для глибинної ферментації, які можна застосувати для культивування *Bt*. Використовують такі дешеві субстрати, як патока, кукурудзяний екстракт, рибне борошно і сою, які забезпечують швидкий ріст і споруючість мікроорганізму. Ріст *Bt* на поживних середовищах можна посилити додаванням амінокислот або гідролізату казеїну, але якщо не збалансувати вміст азоту в середовищі з відповідним джерелом вуглецю та енергії, таким, як глюкоза, то споруючість залишиться на низькому рівні [6].

Мета роботи – розробити оптимальний склад рідкого поживного середовища для культивування в лабораторних умовах штаму бактерій *B. thuringiensis* 87/3 – біоагента-продуцента ентомотоксичних метаболітів.

Методологія дослідження. Дослідження проводились на базі Національного університету біоресурсів і природокористування України, кафедри екобіотехнології та біорізноманіття; Інституту харчової біотехнології та геноміки (ІХБГ) НАН України, відділу промислової та харчової біотехнології. Об'єктом дослідження був штам ентомопатогенних бактерій *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* (*Bt* H₁) №87/3, виділений з личинок природних популяцій листогризухих комах *Leptinotarsa decemlineata* Say. старшого віку (L₄) в природно-кліматичній зоні Чернігівського Полісся. Після аналітичної селекції даний штам зберігається в робочій колекції непатогенних мікроорганізмів кафедри екобіотехнології та біорізноманіття НУБіП. Якісний та кількісний склад компонентів для поживного середовища визначали на основі аналізу апріорної інформації.

Завдання активного повнофакторного експерименту за планом Бокса-Бенкіна (3^3) формується на основі отримання математичної моделі процесу розвитку *Bt* 87/3 та подальшого її використання під час оптимізації поживного середовища. Оптимізація можлива за допомогою методів крутого сходження, а також дослідження функції бажаності результуючого фактору. В процесі активного експерименту досліджували вплив різного складу поживного середовища на ріст мікроорганізмів. За середній рівень для культивування штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3 приймали кукурудзяний екстракт 10г/л, діамоній фосфат 1,5г/л, глюкоза 15г/л (табл.1).

Культивування бактерій проводили в емностях 300 мл на мікробіологічній качалці з частотою обертів 220 об/хв при температурі 30°C, тривалість – 72 години. Робочий об'єм поживного середовища складав 50 мл. Критерієм оптимізації слугувала чисельність життєздатних бактерій в культуральній рідині (КЧО / мл), кількість яких визначали шляхом глибинного посіву в агаризоване середовище, а також за допомогою камери Горяєва.

Для проведення експерименту було прийнято досліджувати три фактори та їх три рівні. При цьому кількість експериментів, які повинні проводитись можливо розрахувати за формулою:

$$N_e = \prod_{\phi}^p, \quad (1)$$

де N_e – кількість експериментів, p – кількість рівнів факторів.

Таблиця 1. Формування факторів та їх рівнів для експерименту

Фактори	Рівні			Крок варіації
	Нижній	Основний	Верхній	
X1 – кукурудзяний екстракт, г/л	5	10	15	5
X2 – діамоній фосфат, г/л	0,5	1,5	2,5	1
X3 – глюкоза, г/л	5	15	25	10

Сформовано план повнофакторного експерименту із зазначенням рівнів та факторів, а також функцією відгуку експерименту. З метою зменшення впливу на результати відгуку, експерименти виконували у випадковій послідовності. Обробка результатів експерименту починали з регресійного аналізу, тобто будували модель та визначали невідомі коефіцієнти:

$$Y = (b_0 + b_1 \cdot X1 + b_2 \cdot (X1)^2 + b_3 \cdot X2 + b_4 \cdot (X2)^2 + b_5 \cdot X3 + b_6 \cdot (X3)^2) \cdot 10^9, \quad (2)$$

Було визначено, що ефекти взаємодії факторів практично відсутні, а тому вони не були включені в загальний вигляд моделі (2). Визначення невідомих сталих коефіцієнтів проводили за методом найменших квадратів. Коефіцієнти отриманої моделі розраховували за наступними формулами:

$$b_0 = \sum_{i=1}^N Y_i / N; \quad b_j = \sum_{i=1}^N Y_i X_{ji} / N; \quad b_{j^2} = \sum_{i=1}^N Y_i (X_{ji}^2) / N, \quad (3)$$

Опис факторів та відгуку за допомогою математичної моделі (2) характеризується коефіцієнтом детермінації, який повинен бути не менше 0,95, для якісного опису об'єкту дослідження, цей коефіцієнт розраховується за формулою:

$$R^2 = 1 - \frac{\sigma_{з.р.}^2}{\sigma_Y^2} = 1 - \left(\frac{\sum_{i=1}^N (Y_i - \hat{Y}_i)^2}{\sum_{i=1}^N (Y_i - \bar{Y})^2} \right), \quad (4)$$

де $\sigma_{з.р.}^2$, σ_Y^2 – дисперсії залишків регресії, відгуку; Y_i , \bar{Y} , \hat{Y}_i – фактичне, середнє, розрахункове значення відгуку.

Стандартна помилка, яка характеризує стандартне відхилення досліджуваних коефіцієнтів регресії від середнього значення, розраховується за формулою:

$$S_{b_{j^r}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (Y_i - \hat{Y}_i)^2}{\sum_{i=1}^N (X_{ij} - \bar{X}_j)^2} \cdot \frac{1}{n-2}}, \quad (5)$$

де n – об'єм вибірки.

Статистичне значення коефіцієнта регресії оцінюється за критерієм Стюдента. При цьому порівнюють розрахункове значення з табличним при заданому довірчому рівні значущості 0,05 та розрахованими ступенями вільності:

$$|t_{\alpha, f}| = \left| \frac{b_{j^r}}{S_{b_{j^r}}} \right| \geq t_{\alpha/2, f, \text{таб}}, \quad (6)$$

де b_{j^r} – оціночні коефіцієнти регресії, α – довірчої ймовірності 0,95, f – ступінь вільності. При значимому коефіцієнті регресії розрахунковий критерій Стюдента більше за табличний.

Розрахунок граничної похибки відхилення встановлювали з наступних розрахунків:

$$\Delta_{j^r} = t_{\alpha, f, \text{таб}} \cdot S_{b_{j^r}}. \quad (7)$$

Визначення довірчого інтервалу для кожного коефіцієнту регресії проводили

згідно нерівності:

$$b_{j'} - \Delta_{j'} \leq b_{j'} \leq b_{j'} + \Delta_{j'} \quad (8)$$

Відповідність математичній моделі до експериментальних даних, тобто її адекватність визначали за критерієм Фішера F . При цьому розрахунковий критерій повинен бути більший за табличний:

$$F = \frac{\sigma_X^2}{\sigma_Y^2} = \frac{R^2}{1-R^2} \cdot \frac{f_2}{f_1} \geq F_{\alpha, f, \text{табл}}, \quad (9)$$

де $\sigma_X^2 = \left(\sum_{i=1}^N \left(\epsilon_i - \bar{X} \right)^2 \right) / f_1$ – дисперсія фактору; $f_1 = k_b$ – ступінь вільності; k_b –

кількість коефіцієнтів моделі регресії; $\sigma_Y^2 = \left(\sum_{i=1}^N \left(\epsilon_i - \bar{Y} \right)^2 \right) / (N - f_1 - 1)$ – дисперсія відгуку, N

– кількість експериментів, R^2 – коефіцієнт детермінації.

Для вирішення завдання оптимізації використовували метод аналізу функції бажаності Е.К.Харрінгтона [7].

Аналіз даного плану експерименту виконували з використанням портативного програмного забезпечення (Statistica 10.0.1011.0, CD-key 42347678921334567692).

Результати. Оптимізацію умов культивування здійснювали на основі поєднання експериментального і математичного моделювання з проведенням обчислювального експерименту, який містить важливий етап – визначення математичної моделі, тобто рівняння регресії, що характеризує зв'язок параметра оптимізації з основними факторами.

Поживне середовище для вирощування посівного матеріалу оптимізували за вмістом джерел вуглецевого і азотного живлення, а також за вмістом мікроелементів [8]. В якості основи для приготування поживного середовища ми використовували відвар капусти. Для збільшення виходу терmostійких спор і кількості ендотоксину збагатили живильне середовище кукурудзяним екстрактом, АК та мінеральними солями (Mg, Mn, діаммоній фосфат).

Використовуючи метод математичного планування експерименту оптимізовано поживне середовище для культивування нового технологічного штаму бактерії *Bt* 87/3 в умовах малотоннажного виробництва біолабораторій. Оптимізацію поживного середовища проводили в чергуванні вмісту в середовищах максимальних і мінімальних значень складових компонентів [9-11]. Регресійний аналіз експериментальних результатів відобразили в таблиці 2.

Таблиця 2. Регресійний аналіз експериментальних результатів

$R^2 = 0,98081$ - коефіцієнт детермінації регресійної моделі експериментальних даних						
Коефіцієнти регресії (фактори)	Регресійні коефіцієнти	Стандартна помилка	Коефіцієнт Стюдента	Рівень значимості p, (p<0,05)	Довірчий інтервал - 95%	Довірчий інтервал - 95%
b ₀	1,006898	0,096511	10,4330	0,000015	0,805579	1,208217
X ₁	0,092667	0,017812	5,2025	0,000043	0,055511	0,129822
(X ₁) ²	-0,002444	0,000881	-2,7731	0,011733	-0,004283	-0,000606
X ₂	1,667778	0,067323	24,7727	0,000028	1,527344	1,808212
(X ₂) ²	-0,494444	0,022037	-22,4373	0,000011	-0,540412	-0,448477
X ₃	0,161000	0,006732	23,9145	0,000034	0,146957	0,175043
(X ₃) ²	-0,005494	0,000220	-24,9331	0,000016	-0,005954	-0,005035

Для більш точного відображення результатів експерименту математичну регресійну модель ускладнювали до другого порядку залежності факторів без взаємодії, при умові що коефіцієнт детермінації повинен бути не нижче значення 0,95. Аналізуючи дані таблиці 2 можливо зробити висновок, що всі включені фактори є статистично значимі, про що свідчить рівень їх значимості, модель, що описує процес розвитку бактерій *Bt* 87/3 з використанням досліджуваних компонентів. Підставляємо дані таблиці у загальний вигляд регресійного рівняння маємо:

$$Y = (b_0 + b_1 \cdot X1 + b_2 \cdot (X1)^2 + b_3 \cdot X2 + b_4 \cdot (X2)^2 + b_5 \cdot X3 + b_6 \cdot (X3)^2) \cdot 10^9 =$$

$$= (1,006898 + 0,092667 \cdot X1 - 0,002444 \cdot (X1)^2 + 1,66778 \cdot X2 -$$

$$- 0,49444 \cdot (X2)^2 + 0,161 \cdot X3 - 0,005494 \cdot (X3)^2) \cdot 10^9, \text{ КУО/мл} \quad (10)$$

Для оцінки адекватності цієї моделі проводили дисперсійний аналіз експериментальних даних та оцінку критерій Фішера. Реалізація дисперсійного аналізу відображена в таблиці 3.

Таблиця 3. Дисперсійний аналіз експериментальних результатів

Фактори	Середньоквадратичне відхилення	Ступінь вільності	Дисперсія	Критерій Фішера	Рівень значимості p, (p<0,05)
X1	0,884830	2	0,442415	218,0776	0,000010
X2	2,079207	2	1,039604	512,4473	0,000035
X3	1,837785	2	0,918893	452,9457	0,000019

З таблиці 3 можна зробити висновок, що включені фактори в математичну модель (1) адекватно описують досліджуваний процес оптимізації складу поживного середовища, оскільки рівень значимості p, для кожного фактору є нижче допустимого рівня.

Візуально додатково оцінимо викиди залишків між отриманими та спрогнозованими значеннями за отриманою модулю (10). Значні викиди в розмірі 10% від максимальних прогнозних значень не повинні бути присутніми в аналізованих даних експерименту. Даний графік представлено на рисунку 1.

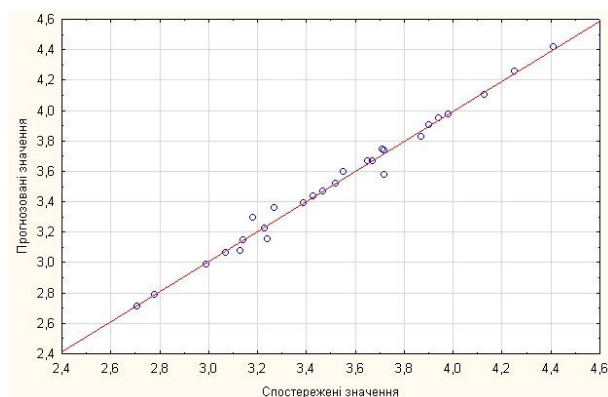


Рис. 1. Графік прогнозованих та спостережених залишків

З даного графіка візуально видно, що значних викидів даних немає тому математичну модель можна прийняти як достовірну або адекватну. Поверхні відгуку розвитку колоній бактерій за титруванням досліджуваного процесу з відображеннями значень факторів та за шкалою бажаності мають ідентичний характер і представлені на

рисунку 2.

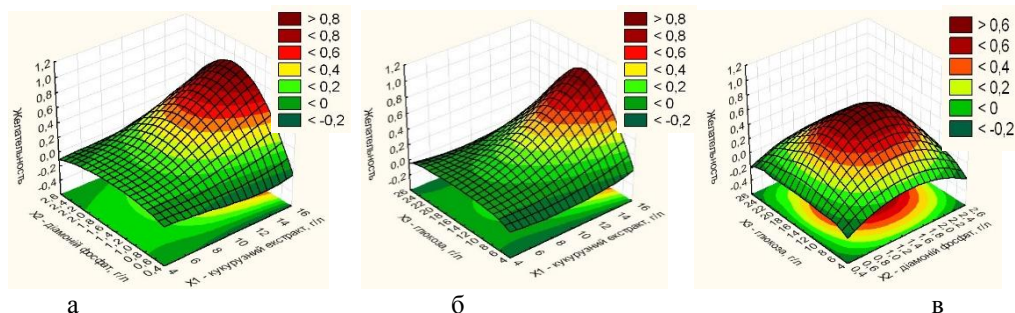


Рис. 2. Графік поверхонь відгуку за шкалою бажаності досліджуваного процесу: а – $Y_d(X1, X2)$; б – $Y_d(X1, X3)$; в – $Y_d(X2, X3)$

Рівні відгуку функції за шкалою бажаності наведено на рисунку 3. Візуально аналізуючи дані графіки, можливо однозначно зазначити, що оптимальний склад поживного середовища присутній в досліджуваних діапазонах значень факторів X1, X2, X3. Реалізація оптимізації поживного середовища, за розробленою моделлю можлива за допомогою функції бажаності. Для визначення оптимального складу поживного середовища сформуємо інтервал максимуму досліджуваного відгуку. Для цього встановлюємо вузькі межі в які він зможе потрапити, При цьому враховуються поверхні відгуку (рис.2) та її максимальні рівні, нульовий рівень значення встановлюємо 4.11×10^9 , КУО/мл, а максимальний 4.41×10^9 , КУО/мл. За таких умов можливо знайти необхідні максимальні значення відгуку за функцією бажаності.

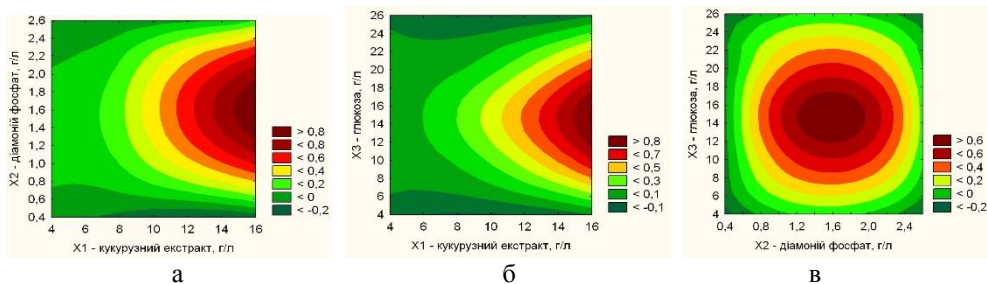


Рис. 3. Графік рівня відгуку досліджуваного процесу: а – $Y_d(X1, X2) = \text{const}$; б – $Y_d(X1, X3) = \text{const}$; в – $Y_d(X2, X3) = \text{const}$

Розглянемо зазначене для кожного фактору та функції відгуку. Реалізацію процедури визначення оптимізації представлено на рисунку 4.

З рисунку 4. можна бачити, що оптимальний варіант компонентів знаходиться на перетині максимального значення функції бажаності в зазначеному інтервалі кожного фактору. При цьому визначено раціональні межі і відповідні оптимальні значення факторів які складають поживне середовище. Для кукурудзяного екстракту це проміжок [8,75...11,25 г/л], а оптимум - 10г/л; для діамонію фосфату це проміжок [1.4...2,0 г/л], а оптимум 1,5г/л; для глюкози це проміжок [12,5...17,5], а оптимум – 15г/л.

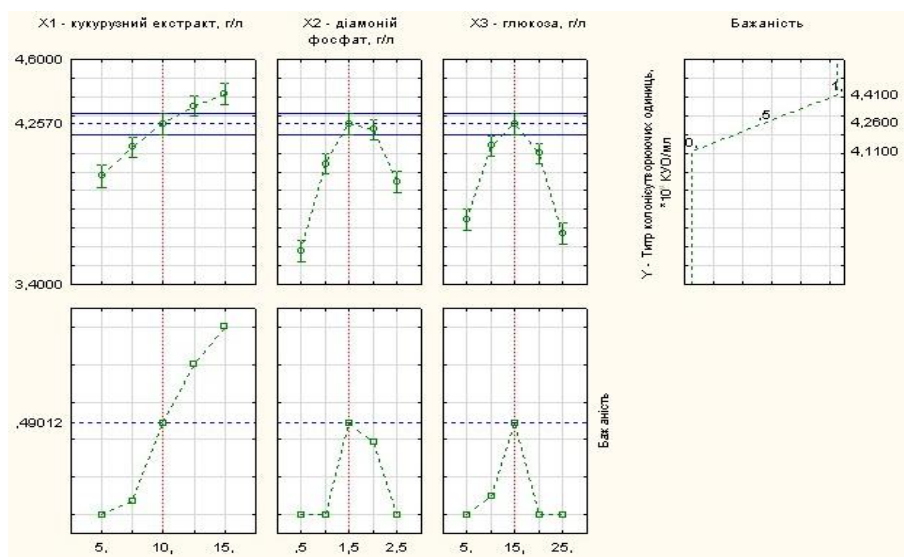


Рис. 4. Графічне відображення процедури знаходження оптимального складу поживного середовища

Висновки і перспективи. Результати досліджень свідчать, що оптимізоване середовище на основі капустиного гідролізату для культивування штаму *B. thuringiensis* 87/3 дає можливість отримати високий вихід життєздатних клітин (титр метаболітного споро-кристалічного комплексу складає до 4,4 млрд./мл культуральної рідини). Запропонований склад поживного середовища значно дешевше універсальних лабораторних середовищ, які широко використовуються для культивування мікроорганізмів цього виду і може бути рекомендований для використання як в лабораторних, так і в виробничих умовах.

Список використаних джерел

1. Кандыбин Н.В. Микробиоконтроль численности насекомых и его доминанта *Bacillus thuringiensis*. Монография. Санкт-Петербург, Пушкин: Научное издание «Инновационный центр защиты растений». 2009. 252 с.
2. Барджес, Г. Д., Хасси Н.У., пер. с англ. Емельяновой Н. А. Микроорганизмы в борьбе с вредными насекомыми и клещами. Москва : «Колос», 1976. 584 с.
3. Lamenha C., Finkler L. *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* to Insect Control: Process Development of Small Scale Production to Pilot-Plant-Fermenters. *Federal University of Pernambuco Brasil*, 2012. P.613-627.
4. Roh J.Y., Choi J.Y., Li M.S., et all. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe and effective tool for insect pest control. *J. Mol. Biol.* 2007. № 17. P. 547-559.
5. Бирюков В.В., Кантере В.М. Оптимизация периодических процессов микробиологического синтеза. Москва : Наука. 1985. 296 с.
6. Avignone-Rossa C., Arcas J., Mignone C. *Bacillus thuringiensis* growth, sporulation and δ -endotoxin production in oxygen limited and non-limited cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1992. № 8. P. 301-304.
7. Harrington E. C. The Desirability Function. *Industrial Quality Control*. April. 1965. P. 494–498.
8. Mason R., Gunst R., Hess. J. Statistical Design and Analysis of Experiments With Applications to Engineering and Science. *John Wiley & Sons, Inc.*, 2003. P. 585-586.
9. Anderson RKI, Jayaraman K. Impact of balanced substrate flux on the metabolic process

employing fuzzy logic during the cultivation of *Bacillus thuringiensis* var. *Galleriae*. *World Journal Microbiology and Biotechnology*. 2005. № 21. P. 127–133. doi: 10.1007/s11274-004-3043-1.

10. Kraemer-Schafhalter A., Moser A. Kinetic study of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in lab-scale process. *Bioproc Eng.* 1996. № 14. P. 139–144.

11. Popovic M., Liu W., Iannotti EL., Bajpai RK. A mathematical model for vegetative growth of *Bacillus thuringiensis*. *Eng Life Science*. 2001. № 2. P. 85–90.

Дата надходження статті до редакції : 16.04.2018
Рецензування 16.05.2018 Прийняття в друк: 23.05.2018

Boiko M.V.

PhD student

*Department of ecobiotechnology and biodiversity
National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine
Kyiv, Ukraine*

E-mail: *maryaulina@gmail.com*

OPTIMIZATION OF NUTRIENT MEDIUM COMPOSITION FOR CULTIVATION OF *BACILLUS THURINGIENSIS* 87/3 ENTOMOPATHOGENS

Abstract

The aim of the research was to develop an optimal liquid medium composition for bacteria strain B. thuringiensis 87/3 which is the most favorable for the identifying the potential production of biologically active components.

Nutrient medium for cultivation of Bt 87/3 was optimized base on a full-fledged experiment, according to the Box-Behnken (3³) plan. The influence of different medium composition on the growth of microorganisms was investigated during active experiment process.

The nutrient medium for cultivation was optimized by the composition of carbon and nitrogen feed, as well as on the content of micro elements. To increase the yield of heat-resistant spores and the amount of endotoxin, the nutrient medium was enriched with corn extract, amino acids and mineral salts (Mg, Mn, diammonium phosphate). The rational limits and the corresponding optimal values of the substances (factors) that make the nutrient medium are determined. Optimum concentrations were investigated in the medium of carbon source (15 g/l of glucose), nitrogen (10 g/l of corn extract) and content of phosphorus-containing inorganic salts (1,5 g/l of diamonium phosphate). When growing this strain in periodic conditions at 30°C, the number of viable cells reached $4,4 \times 10^9$ cells/ml, while synchronous spore formation was observed.

*The optimal component variant is at the intersection of the maximum value of the desirability function in the specified interval of each factor. In this case, rational limits and corresponding optimal values factors that make up the B. thuringiensis nutrient medium are determined. Nutrient medium that was optimized can be recommended for cultivation of *Bacillus thuringiensis* 87/3 in laboratory and production conditions.*

Keywords: *optimization, cultivation, B. thuringiensis var. thuringiensis, nutrient medium.*

References

1. Kandyibin, N.V. (2009). *Mikrobiokontrol chislennosti nasekomyih i ego dominanta Bacillus thuringiensis*. Moscow : Saint-Petersburg, Pushkin: Nauchnoe izdanie «Innovatsionnyiy tsentr zaschityi rasteniy».
2. Bardzhes, G.D. & Hassi, N. U., Emelyanov, N.A. (Trans.) (1976). *Mikroorganizmyi v borbe s vrednyimi nasekomyimi i kleschami*. Moscow : «Kolos».
3. Lamenha C. (2012). *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* to Insect Control. Process Development of Small Scale Production to Pilot-Plant-Fermenters Federal University of Pernambuco Brasil.
4. Roh, J.Y., Choi, J.Y., Li, M.S., et al. (2007). *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe and effective tool for insect pest control. *J. Mol. Biol.*, 17, 547-559.

5. Biryukov, V.V., Kantere, V.M. (1985). *Optimizatsiya periodicheskikh protsessov mikrobiologicheskogo sinteza*. Moscow : Nauka.
6. Avignone-Rossa, C., Arcas, J., Mignone, C. (1992). *Bacillus thuringiensis* growth, sporulation and δ -endotoxin production in oxygen limited and non-limited cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8, 301-304.
7. Harrington, E. C. (1965). The Desirability Function. *Industrial Quality Control*, April, 494–498.
8. Mason, R., Gunst, R., & Hess, J. (2003). *Statistical Design and Analysis of Experiments With Applications to Engineering and Science*. John Wiley & Sons, Inc., 585-586.
9. Anderson, R.K.I, Jayaraman, K. (2005). Impact of balanced substrate flux on the metabolic process employing fuzzy logic during the cultivation of *Bacillus thuringiensis* var. *Galleriae*. *World Journal Microbiology and Biotechnology*. 21.doi: 10.1007/s11274-004-3043-1.
10. Kraemer-Schafhalter, A., & Moser, A. (1996). Kinetic study of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in lab-scale process. *Bioproc Eng.*, 14, 139–144.
11. Popovic, M., Liu, W., Iannotti, E.L., & Bajpai, R.K. (2001). A mathematical model for vegetative growth of *Bacillus thuriniensis*. *Eng. Life Science*, 2, 85–90.

Received: April 16, 2018

Revision: May 16, 2018 Accepted: May 23, 2018