

การขยายส่วนการลดความขมในน้ำส้มเขียวหวาน *Citrus reticulata* Blanco
ด้วยบีตาไซโคลเดกซ์ทรินพอลิเมอร์โดยกระบวนการฟลูอิดไอเซชัน



นางสาว ตวิษา พิพัฒน์ฐิติกร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-17-5457-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SCALE-UP OF DEBITTERING TANGERINE *Citrus reticulata* Blanco JUICE BY
FLUIDIZED β -CYCLODEXTRIN POLYMER PROCESS

Miss Tawisa Pipatthitikorn

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN 974-17-5457-4

Thesis Title SCALE-UP OF DEBITTERING TANGERINE *Citrus reticulata* Blanco
JUICE WITH β -CYCLODEXTRIN POLYMER BY FLUIDIZATION PROCESS


By MISS TAWISA PIPATTHITIKORN

Field of Study Biotechnology

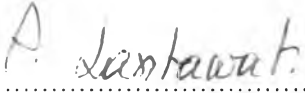
Thesis Advisor Assistant Professor Romanee Sanguandeeikul, Ph.D.


Thesis Co-advisor Assistant Professor Peerada Mongkolkul, Ph.D.
Associate Professor Lursuang Mekasut, Dr. Ing.

Accepted by the Faculty of science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of
the Requirements for the Master 's Degree



..... Dean of the Faculty of Science
(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)


THESIS COMMITTEE


..... Chairman
(Associate Professor Pantipa Jantawat, Ph.D.)


..... Thesis Advisor
(Assistant Professor Romanee Sanguandeeikul, Ph.D.)


..... Thesis Co-advisor
(Assistant Professor Peerada Mongkolkul, Ph.D.)


..... Thesis Co-advisor
(Associate Professor Lursuang Mekasut, Dr. Ing.)


..... Member
(Assistant Professor Supat Chareonpornwattana, Ph.D.)

ตติวิชา พิพัฒน์วิจิตร : การขยายส่วนการลดความขมในน้ำส้มเขียวหวาน *Citrus reticulata* Blanco ด้วยบีตาไซโคลเดกซ์ทรินโดยกระบวนการฟลูอิดิเซชัน

(SCALE-UP OF DEBITTERING TANGERINE *Citrus reticulata* Blanco JUICE BY FLUIDIZED β -CYCLODEXTRIN POLYMER PROCESS) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. รมณี สงวนดีกุล, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร. พิศดา มงคลกุล และ รศ.ดร. เลอสรวง เมฆสุด; 156 หน้า, ISBN 974-17-5457-4.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการลดปริมาณลิโมนินในน้ำส้มเขียวหวานด้วย บีตาไซโคลเดกซ์ทรินพอลิเมอร์ (β -CD polymer) โดยกระบวนการฟลูอิดิเซชันในระดับขยายส่วน และเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ β -CD polymer ทางการค้ากับ XAD-16 เรซิน ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ใช้ในอุตสาหกรรม และ β -CD polymer ที่เตรียมขึ้นเอง โดยในการทดลองนำน้ำส้มเขียวหวานที่มีรสขมมาผ่านการให้ความร้อนที่ 70^oซ นาน 15 นาที วิเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ ได้แก่ สี, ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด และวิตามินซี ส่วนการวิเคราะห์ลิโมนินทำโดยอาศัยเทคนิค solid phase extraction โดยใช้ HyperSEP C-18 คอลัมน์ในการแยกลิโมนินจากน้ำส้มด้วยอย่างและหาปริมาณด้วย HPLC ซึ่งพบว่าความไวของวิธีการตรวจวัดปริมาณลิโมนิน คือ 2.4 ppm ที่สัมประสิทธิ์ความแปรผัน 3.03% โดยการใช้ HyperSEP C-18 คอลัมน์ในการสกัดลิโมนินซ้ำ 3 ครั้ง พบว่าในแต่ละครั้งสามารถสกัดลิโมนินได้ 83.95 \pm 2.6%, 80.29 \pm 0.26% และ 76.89 \pm 1.07% ตามลำดับ ถึงแม้ว่าค่าการสกัดลิโมนินที่ได้ในแต่ละครั้งของการสกัดจะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับค่าความเชื่อมั่นที่ 95% แต่เนื่องจาก HyperSEP C18 คอลัมน์ มีราคาค่อนข้างสูง ดังนั้นจึงยอมรับค่าความถูกต้องเหล่านี้ได้ เมื่อเริ่มต้นที่ความเข้มข้นของลิโมนิน 12 ppm ในกระบวนการลดความขมโดยใช้ฟลูอิดิเซชันคอลัมน์ขนาด 3 ซม. สูง 50 ซม. พบว่าภาวะที่ปริมาณลิโมนินลดลงมากที่สุด (50-80%) คือ 1.25g β -CD polymer อัตราการไหลของน้ำส้มเท่ากับ 100 มล./นาที ที่อุณหภูมิห้อง (27 $^{\circ}$ C) มีประสิทธิภาพในการดูดซับลิโมนินเท่ากับ 0.47 มก.ลิโมนิน/กรัม β -CD polymer และเมื่อนำบีตาไซโคลเดกซ์ทรินพอลิเมอร์กลับมาใช้ซ้ำพบว่า ประสิทธิภาพในการดูดซับลิโมนินลดลงถึง 60% ส่วนการใช้ XAD-16 เรซิน และ β -CD polymer ที่เตรียมขึ้นเองลดความขมที่ภาวะเดียวกันกับ β -CD polymer ให้ค่าประสิทธิภาพในการดูดซับลิโมนินเท่ากับ 1.58 และ 0.028 มก.ลิโมนิน/กรัม ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่ากระบวนการลดความขมนี้ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสี ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด และปริมาณวิตามินซีในน้ำส้มเขียวหวาน

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2548

ลายมือชื่อนิสิต..... *ตติวิชา พิพัฒน์วิจิตร*

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... *อ. รมณี สงวนดีกุล*

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... *อ. พิศดา มงคลกุล*

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... *อ. เลอสรวง เมฆสุด*

4572302023: MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORDS : β -CYCLODEXTRIN POLYMER/ TANGERINE JUICE/ DEBITTERING/
LIMONIN/ FLUIDIZATION

TAWISA PIPATTHITIKORN: SCALE-UP OF DEBITTERING TANGERINE *Citrus*

reticulata Blanco JUICE BY FLUIDIZED β -CYCLODEXTRIN POLYMER PROCESS

THESIS ADVISOR: ASST. PROF. ROMANEE SANGUANDEEKUL, Ph.D.

THESIS CO-ADVISOR: ASST. PROF. PEERADA MONGKOLKUL, Ph.D.

ASSOC. PROF. LURSUANG MEKASUT, Dr. Ing. 156 pp. ISBN 974-17-5457-4.

This study aims to scale-up of debittering Thai tangerine juice with β -cyclodextrin polymer (β -CD polymer) by fluidization process and to compare its effectiveness with XAD-16 resin and prepared β -CD polymer. The bitter tangerine juice was preheated at 70°C for 15 minutes and analyzed juice compositions such as color, total soluble solids and vitamin C. The limonin was separated from the juice by solid phase extraction (SPE) technique using HyperSEP C-18 cartridge and quantitated by reverse phase HPLC. The sensitivity of the method was 2.4 ppm limonin at C.V. 3.03%. The %recovery of limonin extraction of reused HyperSEP C-18 cartridge was 83.95±2.6%, 80.29±0.26% and 76.89±1.07% respectively. Although, there was a significant difference in the %recovery of limonin extraction between three times of reused HyperSEP C-18 cartridge at confidential level of 95%. The difference of reusing HyperSEP C-18 cartridge in three times was acceptable when compare with the high cost of them. In fluidized debittering process, with initial limonin concentration of 12 ppm, the highest % limonin reduction was around 50-80% at the condition of 50 x 3 cm i.d. fluidized column, 1.25g% β -CD polymer with the juice flow rate of 100 ml/min at room temperature (27 °C). In term of limonin adsorption capacities, this process was 0.47 mg limonin/g β -CD polymer. When β -CD polymer was regenerated, the adsorption capacity of debittering was decreased 60%. Using XAD-16 resin and prepared β -CD polymer at the same condition of β -CD polymer, the limonin adsorption capacity was 1.58 and 0.028 mg limonin/g respectively. In addition, the debittering process did not cause the change in color, total soluble solids and vitamin C.

Field of Study Biotechnology

Academic year 2005

Student's signature *Tawisa Pipatthitikorn*

Advisor's signature *Romane Sanguandeeikul*

Co-advisor's signature *Peerada Mongkolkul*

Co-advisor's signature *L. Mekasut*

ACKNOWLEDGEMENTS

The author would like to express her sincere thanks and greatly gratitude to her advisor, Assistant Professor Romanee Sanguandeeikul, and co-advisor, Assistant Professor Peerada Mongkolkul and Associate Professor Lursuang Mekasut, for their continuously guidance and encouragement. The faithfulness is also extended to Associate Professor Pantipa Jantawat and Assistant Professor Supat Charoenpornwattana for their enrollment as committee of this examination and their valuable and useful comments and suggestions.

This study could not be succeeded without kind help from Tipco Foods Thailand Public Company Limited for their tangerine juice, using in this work and The Graduate School for the grant. Sincere thanks for everyone in the laboratory and Starch and Cyclodextrin Research Unit who is always behind the author.

Finally, the special thanks is expressed to the beloved family of the author for their support, understanding and unlimited love.

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	xi
LIST OF FIGURES.....	xii
ABBREVIATIONS.....	xv
CHAPTER I: INTRODUCTION.....	1
CHAPTER II: LITERATURE REVIEW.....	4
CHAPTER III: MATERIALS & METHODS.....	44
Materials.....	44
Equipments.....	44
Chemicals.....	45
3.1 Limonin extraction by solid phase extraction (SPE) and determination by reverse phase HPLC.....	46
3.1.1 Extraction of limonin by solid phase extraction (SPE).....	46
3.1.2 Determination of limonin content by reverse phase HPLC.....	47
3.1.3 Standard curve of limonin.....	48

3.2 Evaluation of reliability of the method for limonin determination.....	49
3.2.1 Efficiency of HyperSEP C-18 cartridge in limonin separation.....	49
3.2.2 Sensitivity and reliability of the method for limonin determination.....	49
3.3 Reduction of limonin by fluidized β -CD polymer process.....	50
3.3.1 Optimization of fluidized process.....	50
3.3.1.1 Size of fluidized column.....	50
3.3.1.2 Minimum fluidization velocity.....	53
3.3.1.3 Flow rate of tangerine juice.....	54
3.3.1.4 Amount of β -CD polymer.....	54
3.3.2 Practical maximum load of β -CD polymer fluidized column for juice debittering process.....	55
3.3.3 Comparison of limonin reduction efficiency using new β -CD polymer with regenerated β -CD polymer fluidized column.....	56
3.4 Reduction of limonin by fluidized XAD-16 resin process.....	56
3.4.1 Activation of XAD-16 resin.....	56
3.4.2 Comparison of limonin reduction efficiency using β -CD polymer with XAD-16 resin fluidized column.....	57
3.5 Reduction of limonin with self-prepared β -CD polymer fluidized column.....	57
3.5.1 Preparation of β -CD polymer.....	57
3.5.2 Determination of residual epichlorohydrin.....	59

3.5.3 Comparison of limonin reduction efficiency using β -CD polymer with prepared β -CD polymer fluidized column	59
3.6 Analysis of Thai tangerine juice compositions.....	59
3.6.1 Measurement of color.....	59
3.6.2 Determination of total soluble solids.....	60
3.6.3 Determination of vitamin C content.....	61
3.6.3.1 Reagent preparation.....	61
3.6.3.2 Standardization of dye solution.....	62
3.6.3.3 Determination of vitamin C.....	62
3.7 Statistical analysis.....	63
CHAPTER IV: RESULTS.....	64
4.1 Limonin extraction by solid phase extraction (SPE) and determination by reverse phase HPLC.....	64
4.1.1 Extraction of limonin by solid phase extraction (SPE).....	64
4.1.2 Determination of limonin content by reverse phase HPLC.....	65
4.2 Evaluation of reliability of the method for limonin determination.....	67
4.2.1 Efficiency of HyperSEP C-18 cartridge in limonin separation.....	67
4.2.2 Sensitivity and reliability of the method for limonin determination.....	69
4.3 Reduction of limonin by fluidized β -CD polymer process.....	71
4.3.1 Optimization of fluidized process.....	71

4.3.1.1	Size of fluidized column.....	71
4.3.1.2	Minimum fluidization velocity.....	71
4.3.1.3	Flow rate of tangerine juice.....	73
4.3.1.4	Amount of β -CD polymer.....	75
4.3.2	Practical maximum load of β -CD polymer fluidized column for juice debittering process.....	79
4.3.3	Comparison of limonin reduction efficiency using new β -CD polymer with regenerated β -CD polymer fluidized column	81
4.4	Reduction of limonin by fluidized XAD-16 resin process.....	84
4.4.1	Scanning electron microscope of XAD-16 resin.....	84
4.4.2	Comparison of limonin reduction efficiency using β -CD polymer with XAD-16 resin fluidized column	85
4.5	Reduction of limonin with self-prepared β -CD polymer by fluidized process.....	87
4.5.1	Scanning electron microscope of prepared β -CD polymer.....	87
4.5.2	Determination of residual epichlorohydrin.....	88
4.5.3	Comparison of limonin reduction efficiency between β -CD polymer and prepared β -CD polymer fluidized column	92
4.5.4	Comparison of limonin reduction efficiency among new β -CD polymer, regenerated β -CD polymer, XAD-16 resin and self-prepared β -CD polymer.....	94

4.6 Analysis of Thai tangerine juice compositions.....	95
4.6.1 Measurement of color.....	95
4.6.2 Determination of total soluble solids.....	96
4.6.3 Determination of vitamin C content.....	97
4.7 Evaluation of debittering cost.....	98
CHAPTER V: DISCUSSION.....	99
CHAPTER VI: CONCLUSION.....	119
REFERENCES.....	120
APPENDICES.....	134
BIOGRAPHY.....	156

LIST OF TABLES

Table	Page
2.1 Quantity and value of citrus fruits production in Thailand	5
2.2 Chemical compounds of flavonoids and limonoids.....	12
2.3 Physical properties of α , β , and γ - CD.....	28
2.4 Industrial applications of cyclodextrins.....	30
2.5 Limitations of using β -CD as a food additive.....	32
4.1 Limitation of limonin determination using HyperSEP C18 column and HPLC.....	70
4.2 Peak areas of 2.4 ppm standard limonin for 5 replications.....	70
4.3 Comparison of limonin reduction efficiency between β -CD polymer, XAD-16 resin and prepared β -CD polymer fluidized column.....	94
4.4 Color value of fresh juice, clarified juice and debittered juice	95
4.5 Total soluble solids of fresh juice, clarified juice and debittered juice.....	96
4.6 Vitamin C content comparison between clarified juice and debittered juice.....	97

LIST OF FIGURES

Figure	Page
2.1 Cross-section of citrus fruit	6
2.2 Chemical structure of naringin.....	13
2.3 Chemical structure of limonin.....	13
2.4 Conversion of LARL (a non-bitter precursor) to limonin (a bitter end product).....	14
2.5 Catabolic pathways for the conversion of limonin to its nonbitter metabolites.....	15
2.6 Schematic flow of commercial debittering process.....	25
2.7 Chemical structure of α , β , and γ - CD.....	27
2.8 Structure of β -CD.....	27
2.9 The inclusion complex formation of β -CD.....	29
2.10 Distribution of the 1706 CD relevant abstract published in 1996 by Cyclodextrin News.....	29
2.11 The predicted structure of many kinds of β -CD polymer.....	33
2.12 Reaction scheme of the polycondensation of β -CD with epichlorohydrin.....	34
2.13 Flow pattern in fluidized bed.....	36
3.1 Limonin extraction using HyperSEP C-18 cartridge.....	47

3.2 HPLC Hewlett Packard series 1050.....	48
3.3 The experimental equipment of debittering fluidized column	52
3.4 Experimental determination of U_{mf}	53
3.5 β -cyclodextrin polymer preparation.....	58
3.6 Minolta chroma meter.....	60
3.7 Hand refractometer.....	61
4.1 Limonin extraction by 3 ml acetonitrile	64
4.2 Chromatogram of standard limonin	65
4.3 Chromatogram of limonin sample extracted by SPE method.....	66
4.4 Chromatogram of spiked limonin sample prepared by SPE method.....	66
4.5 % Recovery of limonin of initial and reused HyperSEP C18 column.....	68
4.6 Experimental determination of minimum fluidization velocity (U_{mf}).....	72
4.7 Residual limonin in debittered juice with flow rate of 75, 100 and 120 ml/min, 15 g β -CD polymer.....	74
4.8 Debittering of tangerine juice by the slurry of 15, 20 and 25 g of β -CD polymer, at the flow rate of 100 ml/min.....	76
4.9 Debittering of tangerine juice by the slurry of 8, 11 and 15 g of regenerated β -CD polymer, at the flow rate of 100 ml/min.....	78
4.10 Residual limonin of debittered tangerine juice by 15 g β -CD polymer and 15 g regenerated β -CD polymer fluidized column.....	80

4.11 %Limonin reduction of debittering process by 15 g β -CD polymer and 15 g regenerated β -CD polymer fluidized column.....	82
4.12 Scanning electron micrograph of β -CD polymer and regenerated β -CD polymer.....	83
4.13 Scanning electron micrograph of XAD-16 resin.....	84
4.14 Debittering of tangerine juice by 11 g of XAD-16 resin and 11 g regenerated β -CD polymer fluidized column.....	86
4.15 Scanning electron micrograph of prepared β -CD polymer.....	87
4.16 Chromatogram of standard 100 ppm epichlorohydrin.....	89
4.17 Chromatogram of the second cycle of ethanol wash solution.....	90
4.18 Chromatogram of the third cycle of ethanol wash solution.....	91
4.19 Debittering of tangerine juice by 11 g of prepared β -CD polymer and 11 g regenerated β -CD polymer fluidized column.....	93

ABBREVIATIONS

α	Alpha
ϵ	Bed voidage
β	Beta
γ	Gamma
CD	Cyclodextrin
cm	Centrimeter
C.V.	Coefficient of variation
$^{\circ}\text{C}$	Degree celsius
ρ_f	Density of fluid
ρ_s	Density of solid
DOAE	Department of Agricultural Extention
ECH	Epichlorohydrin
g	Gram
HPLC	High performance liquid chromatography
hr	Hour
i.d.	Internal diameter
mA	Milliampere
min	Minute
μg	Microgram
μl	Microlitre
μm	Micrometer
U_{mf}	Mininum fluidization velocity
ml	Millilitre
N	Normal
nm	Nanomater
no.	Number
ppm	Part per million
ΔP	Pressure drop