

BACTERIAL UTILIZATION OF SPENT SULFITE LIQUOR AND

SINGLE CELL PROTEIN PRODUCTION

BY

SIRINDA YUNCHALARD

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF

THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE

(MICROBIOLOGY)

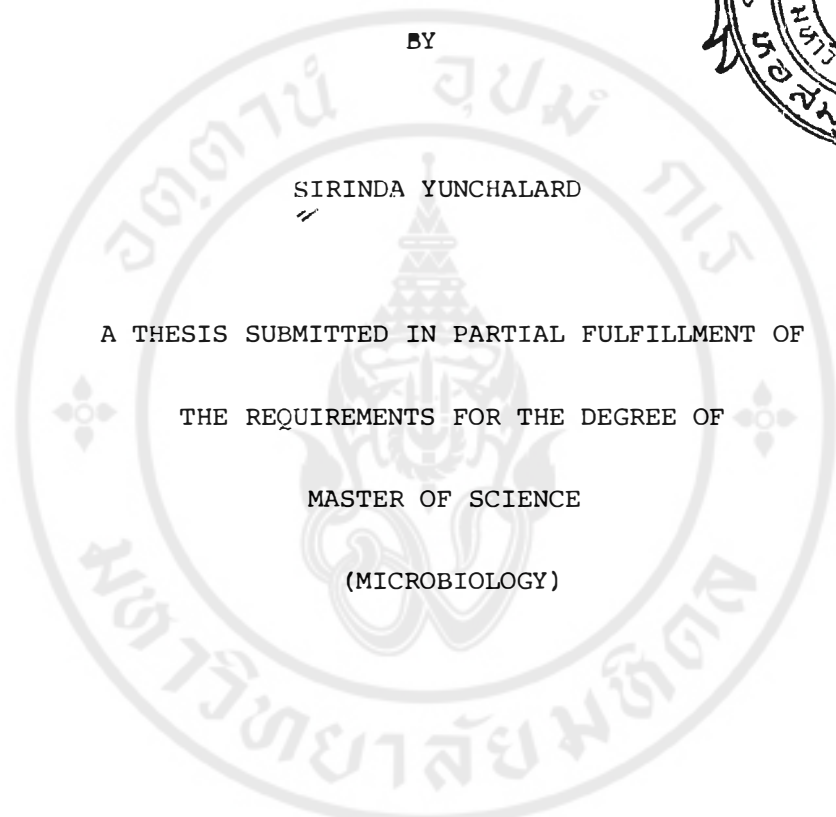
IN THE

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

OF

MAHIDOL UNIVERSITY

1984



Copyright by Mahidol University

อธิบดีมหาวิทยาลัย

จาก

นางสิริจินดา ยุนชาลาร์ด

Thesis Title: BACTERIAL UTILIZATION OF SPENT SULFITE LIQUOR  
AND SINGLE CELL PROTEIN PRODUCTION

Author: Ms. Sirinda Yunchalard

Degree: Master degree of Science (Microbiology)

Major Advisor: Timothy William Flegel, Ph.D.

Department: Microbiology

Faculty: Science

University: Mahidol

Date of Graduation: April 30th, 1984

#### ABSTRACT

This study was undertaken to isolate ligninolytic bacteria to utilize not only lignin but also hemicellulose content contained in spent sulfite liquor (SSL), the main liquid waste at Bang-Pa-In Paper Mill, Ayudthaya, Thailand. As a result, the cell mass obtained could serve as single cell protein (SCP). It was able to serve as feedstuffs and feed supplements. Another purpose of this study was to find out the possibility of combining this bacteria with the yeast, Candida tropicalis as well as to seek a method to eliminate the acid hydrolysis step of the SCP production process using this waste as substrate by adding another strain of bacteria which possessed the hemicellulase activity into the process.

The major characteristics of this waste were the presence of lignin and hemicellulose in rather high quantity (i.e., 30-40 g lignin and 25-30 g hemicellulose per litre) and high in alkalinity (i.e., about pH 8-9). To produce SCP, the SSL had to be supplemented with 0.125%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.15%  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0.32%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.10%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.10% yeast extract and pH was adjusted to 7.0 using HCl. The cultivation conditions were batch process at 30°C.

A group of ligninolytic bacteria had been isolated mostly from soil samples around the Bang-Pa-In Paper Mill. Among these isolates only two strains possessed highest in ligninolytic activity and were identified to be a Pseudomonas sp. and a Micrococcus sp. The Micrococcus sp. was subjected to SCP production process in both pure and mixed culture with the yeast C. tropicalis. In the mixed culture, there was another isolate that contained hemicellulase activity and was found to be a member of Coryneform bacteria. It provided xylose monomer from the hemicellulose contained in SSL for the yeast and the bacteria.

In pure culture process the obtained cell mass was found to be about 4-5 g/l while about 6-7 g/l was obtained from the mixed culture process. The protein contents, nucleic acid contents and true protein contents of the cell mass obtained were 60%,11%,47% and 68%,14%,51%,on dry weight basis, respectively. Toward pollution abatement, the COD (Chemical Oxygen Demand) values in each process were reduced by 45% and 66%, respectively. Toxicity test on the SCP products are still be performed.

ชื่อวิทยานิพนธ์	การใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียในน้ำทิ้งจากโรงงานกระดาษ และการผลิตอาหารโปรตีน
ชื่อผู้วิจัย	นางสาว สิริธิดา ยุ่นฉลาด
ปริญญา	ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ดร. ทิมโมธี วิลเลียม เฟลเกล
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	มหิดล
วันที่จบการศึกษา	30 เมษายน 2527

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้มุ่งหวังในการนำเอาน้ำทิ้งจากโรงงานกระดาษบางปะอิน อ.บางปะอิน จ.อยุธยามาใช้ให้เป็นประโยชน์ในรูปของการนำไปเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เป็นอาหารโปรตีนซึ่งสามารถใช้เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์หรืออาหารเสริมได้จึงได้แยกหาแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารพวกลิกนินและสามารถใช้สารพวก เซมิ เซลลูโลสที่มีอยู่ในน้ำทิ้งไปในการเจริญเติบโตและยังได้ทำการศึกษาหาทางเพาะเลี้ยงแบคทีเรียนี้ควบคู่ไปกับยีสต์ ออึ่งในการเพาะเลี้ยงยีสต์จากน้ำทิ้งนี้จะนำเอาน้ำทิ้งนี้มาย่อยสลายด้วยกรดทางเคมีเพื่อให้ได้น้ำตาลไซโลสอิสระจาก เซมิ เซลลูโลสเพื่อให้ยีสต์ใช้เป็นอาหารได้แต่วิธีการทางเคมีค่อนข้างยุ่งยากและต้นทุนค่อนข้างสูงดังนั้นจึงได้หาทางหลีกเลี่ยงโดยหาแบคทีเรียอีกสายพันธุ์หนึ่งที่มีความสามารถย่อยสลาย เซมิ เซลลูโลสมาร่วมในขบวนการผลิตอาหารโปรตีนด้วย

แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายลิกนินนี้แยกได้จากดินบริเวณรอบโรงงาน เป็นส่วนใหญ่และพบว่ามีเพียง 2 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายลิกนินได้สูง เป็นสายพันธุ์ในสกุล *Pseudomonas* sp. กับ *Micrococcus* sp. สายพันธุ์ *Micrococcus* sp. ได้รับการคัดเลือกให้ใช้ในการเพาะเลี้ยงเป็นอาหารโปรตีน นอกจากนี้แบคทีเรียที่แยกได้นี้มีอีก 1 สายพันธุ์ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม *Corynebacterium* ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย เซมิ เซลลูโลส

น้ำทิ้งจากโรงงานกระดาษบางปะอินนี้ประกอบด้วยสารพวกกลีนินประมาณ 30-40 กรัมต่อลิตร สารพวกเคมีเซลลูโลสประมาณ 25-30 กรัมต่อลิตร และมีความเป็นด่างสูงคือมี pH ประมาณ 8-9 ส่วนสารประกอบพวกไนโตรเจนกับฟอสฟอรัสมีอยู่ในปริมาณน้อยมากดังนั้นในการผลิตอาหารโปรตีนจากน้ำทิ้งนี้จึงต้องมีการเติม  $0.125\% (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $0.15\% \text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $0.32\% \text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $0.10\% \text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $0.10\%$  yeast extract และปรับสภาพความเป็นกรดต่างให้เป็น 7.0 โดยใช้กรดเกลือ สภาพการเพาะเลี้ยงเป็นแบบครึ่งคราวที่อุณหภูมิ  $30^\circ\text{C}$  และเขย่าตลอดเวลาเป็นเวลา 7 วัน ทำการเพาะเลี้ยงทั้งแบบใช้เชื้อเดี่ยว (*Microoccus* sp.) และแบบเชื้อผสมที่นำไปพร้อมๆกัน (*Micrococcus* sp, *Candida tropicalis*, แบคทีเรียอีก 1 สายพันธุ์ในกลุ่มของ Coryneform bacterium) พบว่าได้ปริมาณเซลล์แห้ง 4-5 กรัมต่อลิตรและ 6-7 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เซลล์แห้งที่ได้มีปริมาณโปรตีน ปริมาณกรดนิวคลีอิกและปริมาณโปรตีนที่แท้จริง ประมาณ 60%, 11%, 47% จากการเพาะเลี้ยงแบบใช้เชื้อเดี่ยวและประมาณ 68%, 14%, 51% จากการเพาะเลี้ยงแบบเชื้อผสม ค่า Chemical Oxygen Demand ของน้ำทิ้งลดลงไปประมาณ 45% และ 66% ตามลำดับ ส่วนความเป็นพิษของเซลล์แห้งที่ได้ยังต้องทำการประเมินต่อไป