b10794194

CITRIC ACID PRODUCTION FROM TAPIOCA STARCH IN STIRRED TANK BIOREACTOR BY *ASPERGILLUS NIGER*

CHINAWUT WONGWIJITKAESORN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(BIOTECHNOLOGY)

With compliments
of
.....

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1997

Copyright by Mahidol University

TH
C039c
1997

ชื่อวิทยานิพนธ์	การผลิตกรดมะนาวจากแป้งมันสำปะหลังในถังหมักแบบกวน โดย *Aspergillus niger*
ผู้วิจัย	ชินวุธ วงศ์วิจิตรเกษร
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์	
	อภิญญา อัศวนิก, Ph.D
	ไสยวิชญ์ วรวินิต, Dr. Ing
	มานพ สุพรรณธริกา, Ph.D
วันที่สำเร็จการศึกษา	28 พฤษภาคม พ.ศ. 2540

บทคัดย่อ

Aspergillus niger 5 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ C1, Ck, DSM 821, DSM 823, และ DSM 872 ถูกนำมาศึกษาเพื่อหาสายพันธุ์ที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตกรดมะนาว (citric acid) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิดแข็งที่มี bromocresol green (BCG) และ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่มีแป้งมันสำปะหลัง ผลปรากฏว่า สายพันธุ์ C1 ให้ความแตกต่างของเส้นผ่านศูนย์กลางสูงสุดระหว่าง acid zone หรือ clear zone กับเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี โดยพบว่ามีความแตกต่างเท่ากับ 3.8 ± 0.2 ซ.ม. บนอาหาร BCG และ 1.7 ± 0.2 ซ.ม. บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่มีแป้งมันสำปะหลัง หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37^0 ซ. นาน 3 วัน และ 4 วันตามลำดับ เมื่อทำการศึกษายืนยันในขวดรูปชมพู่ก้นจีบขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยเลี้ยง *A. niger* 5 สายพันธุ์ แบบเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30^0ซ. นาน 8 วัน พบว่า *A. niger* C1 ให้กรดมะนาวความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 39.5 กรัมต่อลิตร และ glucoamylase activity สูงสุดเท่ากับ 3.42 หน่วยต่อมิลลิลิตรในวันที่ 2 เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง 12 % ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ α-amylase เป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้น *A. niger* C1 ถูกคัดเลือกเป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวจากแป้งมันสำปะหลัง และพบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อ การผลิตกรดมะนาวได้ดีที่สุดคือ แป้งมันสำปะหลังที่ถูกย่อย 12% และ pH เริ่มต้นเท่ากับ 2.5 นอกจากนี้ได้ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของไนโตรเจนต่อ การผลิตกรดมะนาวพบว่า แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.2 % ให้กรดมะนาวความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 60.0 กรัมต่อลิตร หรือเทียบเท่ากับผลได้ของผลิตภัณฑ์ (yield) 64.9 % ในวันที่ 8 ของการหมัก จากการศึกษาผลของ pH ต่อการผลิตกรดมะนาวในถังหมักแบบกวน พบว่าค่า pH เท่ากับ 2.5 ตลอดกระบวนการหมัก เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อ การผลิตกรดมะนาวเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงที่ pH 4.0 ใน 2 วันแรก และ ลดลงจนถึง 2.5 การผลิตกรดมะนาวในระบบควบคุมค่าการละลายของออกซิเจนไม่ให้ต่ำกว่า 30 % air saturation พบว่า กรดมะนาวเพิ่มขึ้นเป็น 80.2 กรัมต่อลิตรในวันที่ 10 ของการหมัก เทียบเท่ากับผลได้ของผลิตภัณฑ์ 69.5 % ซึ่งการผลิตกรดมะนาวโดยไม่ควบคุมค่าการละลายของออกซิเจน กรดมะนาวได้ถูกผลิตเพียง 76.0 กรัมต่อลิตร เทียบเท่ากับผลได้ของ

Copyright by Mahidol University

ควบคุมค่าการละลายของออกซิเจน กรดมะนาวได้ถูกผลิตเพียง 76.0 กรัมต่อลิตร เทียบเท่ากับผลได้ของผลิตภัณฑ์ 68.2% การผลิตกรดมะนาวแบบ fed batch โดยให้สารจำกัดการเจริญเติบโต ซึ่งได้แก่ ไนโตรเจนในรูปสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต ตั้งแต่วันที่ 3 ถึงวันที่ 5 ของกระบวนการหมักก่อนที่ไนโตรเจนจะหมด ผลปรากฏว่าระยะเวลาของการผลิตกรดมะนาวสูงสุด (84.5 กรัมต่อลิตร) ลดลงเหลือ 8 วัน ทำให้ค่าของอัตราการผลิตกรดมะนาว (volumetric citric acid production rate) เท่ากับ 440 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าแบบ conventional batch เป็น 1.3 เท่า จากการวิเคราะห์กรดมะนาวในน้ำหมักด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และ UV test kit พบว่ากรดมะนาว ถูกผลิตเป็นส่วนใหญ่

Copyright by Mahidol University

Thesis Title	Citric Acid Production from Tapioca Starch in Stirred Tank Bioreactor by *Aspergillus niger*
Name	Chinawut Wongwijitkaesorn
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Thesis Supervirory committee	
	Apinya Assavanig, Ph.D.
	Saiyavit Varavinit, Dr. Ing.
	Manop Suphantharika, Ph.D.
Date of Graduation	28 May B.E. 2540 (1997)

ABSTRACT

Five strains of *Aspergillus niger*, C1, Ck, DSM 821, DSM 823, and DSM 872, were screened for the highest citric acid production on both bromocresol green (BCG) agar plates and tapioca starch agar plates. It was found that *Aspergillus niger* C1 gave the greatest differences in diameter between acid or clear zone and colony diameter on both types of plates. The differences were 3.8±0.2 cm in BCG plates and 1.7±0.2 cm in tapioca starch agar plates, after incubation at 37°C for 3 days and 4 days, respectively. Confirmatory studies were carried out in 500 ml baffle flasks containing 100 ml fermentation medium, and using the same 5 strains of *Aspergillus niger*. The cultures were incubated at 30°C. The highest citric acid concentration of 39.5 g/l at day 8 and the highest glucoamylase activity of 3.42 U/ml at day 2 were obtained from shake flask culture of *A. niger* C1 using 12% tapioca starch liquefied with α-amylase as a sole carbon source. Therefore, *A. niger* C1 was chosen as the appropriate strain to produce citric acid from tapioca starch. Various initial concentrations of liquefied tapioca starch and initial pH were studied. It was observed that 12% liquefied tapioca starch and an initial pH of

© Copyright by Mahidol University

2.5 were suitable for the maximum citric acid production. The effect of type and concentration of nitrogen source on citric acid fermentation was also investigated. Citric acid reached a maximum amount of 60.0 g/l (representing 64.9% yield) at day 8 when 0.2% ammonium sulfate [$(NH_4)_2SO_4$] was used. Effect of pH on citric acid production was examined in a stirred tank bioreactor. A pH value at 2.5 maintained throughout the whole fermentation process gave better production of citric acid than maintenance at pH 4.0 for the first 2 days followed by a natural lowering to pH 2.5. Citric acid production was carried out by controlling the dissolved oxygen tension (DOT) at not less than 30% air saturation. The citric acid content increased to 80.2 g/l on day 10 (69.5% yield) compared to 76.0 g/l (68.2% yield) with uncontrolled DOT. Fed batch cultivation was subsequently examined. A growth-limiting substrate (nitrogen in the form of ammonium sulfate) was continuously fed to the fermentation medium from days 3 to 5 during the interval of citric acid production, prior to nitrogen exhaustion. The cultivation time for producing the highest citric acid (84.5 g/l) was reduced to 8 days and this led to an increase in the volumetric citric acid production rate to 440 mg/l h. This was 1.3 times higher than that for conventional batch fermentation. High performance liquid chromatography (HPLC) and UV-test kit analyses were employed to investigate the acid profile of fermentation filtrates It was obviously shown that citric acid was mostly produced.

Copyright by Mahidol University