

การลดปริมาณลิโมนินในน้ำส้มเขียวหวาน *Citrus reticulata* Blanco  
ด้วยบีตาไซโคลเดกซ์ทรินพอลิเมอร์



นางสาว พริยา รอดอาตม์

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ


คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-03-0523-7

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

REDUCTION OF LIMONIN IN TANGERINE *Citrus reticulata* Blanco JUICE BY  
BETA-CYCLODEXTRIN POLYMER



Miss Piriya Rodart

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Program of Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-03-0523-7



พริษา รอดอาตม์ : การลดปริมาณลิโมนินในน้ำส้มเขียวหวาน *Citrus reticulata* Blanco ด้วยปีตาไซโคลเดกซ์ทรินพอลิเมอร์

(REDUCTION OF LIMONIN IN TANGERINE *Citrus reticulata* Blanco JUICE BY BETA-CYCLODEXTRIN POLYMER)

อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. พีรดา มงคลกุล, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ดร. รมณี สงวนดีกุล

164 หน้า. ISBN 974-03-0523-7

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการลดปริมาณลิโมนินในน้ำส้มเขียวหวานด้วยปีตาไซโคลเดกซ์ทรินพอลิเมอร์ ( $\beta$ -CD polymer) และเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดปริมาณลิโมนินในกระบวนการแบบกะและแบบคอลัมน์ ในการทดลองใช้น้ำส้มเขียวหวานจากสวนใน จ.ปทุมธานีนำมาคั้นและผ่านการให้ความร้อนที่  $70^{\circ}\text{C}$  นาน 10 นาทีก่อนนำไปศึกษา การวิเคราะห์ลิโมนินทำโดยอาศัยเทคนิค solid phase extraction โดยใช้ Extra Sep C-18 คอลัมน์ ในการแยกลิโมนินจากน้ำส้มตัวอย่างและหาปริมาณด้วย reverse phase HPLC จากการศึกษาพบว่าความไวของวิธีตรวจวัดปริมาณลิโมนิน คือ 0.3 ppm ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรผัน 3.70 % มีค่าความถูกต้อง 83% และมีความแม่นยำ  $\pm 0.94$  พบว่าค่าความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์นี้แปรผันตามอัตราการไหลและปริมาณลิโมนินเริ่มต้นแต่ไม่มีผลต่อค่าความเชื่อมั่นของวิธีวิเคราะห์ เมื่อเริ่มต้นที่ความเข้มข้นของลิโมนิน 7.76 ppm ในกระบวนการลดความขมแบบกะ พบว่าภาวะที่ทำให้ปริมาณลิโมนินลดลงมากที่สุด (81%) คือ 5 g%  $\beta$ -CD polymer นาน 60 นาที ที่  $6^{\circ}\text{C}$  เมื่อศึกษาผลกระทบของแรงกวนต่อการลดปริมาณลิโมนินพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างการกวนที่ระดับ 3 และ 5 (magnetic stirrer, Heidolph MR3003) ภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการแบบกะโดยยังมีผลให้ปริมาณลิโมนินอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ คือ 3 g%  $\beta$ -CD polymer นาน 30 นาที ณ อุณหภูมิห้อง (ประมาณ  $30^{\circ}\text{C}$ ) กระบวนการลดความขมแบบคอลัมน์มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณลิโมนินดีกว่าแบบกะ (94% และ 68% ตามลำดับ) ภาวะที่ใช้คือ 3 g%  $\beta$ -CD polymer ปริมาตรเรซิน 10 มล. และมีอัตราการไหลเท่ากับ 0.35 มล./นาที ณ อุณหภูมิห้อง (ประมาณ  $30^{\circ}\text{C}$ ) ประสิทธิภาพของการดูดซับลิโมนินในกระบวนการแบบกะและ คอลัมน์ เท่ากับ 0.17 และ 0.27 มก.ลิโมนิน/กรัม  $\beta$ -CD polymer ตามลำดับ ส่วนปริมาณน้ำส้มสูงสุดที่คอลัมน์ดังกล่าวสามารถรับได้คือ 0.81 มก.ลิโมนิน/กรัม  $\beta$ -CD polymer ทั้งนี้พบว่ากระบวนการลดความขมนี้ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสีของน้ำส้มแต่อย่างใด การใช้ XAD-16 เรซินปริมาณ 5.6 g% ที่ภาวะเดียวกับ  $\beta$ -CD polymer ในกระบวนการลดความขมแบบคอลัมน์ให้ค่าประสิทธิภาพในการดูดซับลิโมนิน 0.18 มก.ลิโมนิน/ กรัม XAD-16

หลักสูตร เทคโนโลยีทางชีวภาพ  
สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ  
ปีการศึกษา 2544

ลายมือชื่อนิสิต .....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

## 4172379023: MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD : BETA-CYCLODEXTRIN POLYMER/ THAI TANGERINES/ DEBITTERING/ LIMONIN

PIRIYA RODART: REDUCTION OF LIMONIN IN TANGERINE *Citrus reticulata*

Blanco JUICE BY BETA-CYCLODEXTRIN POLYMER

THESIS ADVISOR: ASSISTANT PROFESSOR PEERADA MONGKOLKUL, Ph.D.

THESIS CO-ADVISOR: ROMANEE SANGUANDEEKUL, Ph.D.

164 pp. ISBN 974-03-0523-7.

This study aims to use  $\beta$ -cyclodextrin polymer ( $\beta$ -CD polymer) as an absorbent for the reduction of limonin in Thai tangerine juice and to compare its effectiveness in the batch and column processes. The juice of tangerine fruits from an orchard in Prathumtani province, were extracted and preheated at 70°C for 10 minutes. The limonin was separated from the juice by means of solid phase extraction (SPE) technique using Extra Sep C-18 column, eluted with acetonitrile, and quantitated by reverse phase HPLC. The sensitivity of the method was 0.3 ppm limonin at C.V. 3.70 %. The accuracy was 83% and precision  $\pm 0.94$ . Accuracy of the method, however, varied with the flow rate and limonin load, but had no effect on precision of the data. In the batch debittering process, using initial limonin concentration of 7.76 ppm, the highest % limonin reduction was 81 at the condition of 5 g%  $\beta$ -CD polymer, 60 minutes and 6°C. There was no significant difference of % limonin reduction using No.3 and No.5 mixing speed (magnetic stirrer, Heidolph MR3003). Acceptable level of limonin was observed with 3 g%  $\beta$ -CD polymer for 30 minutes at room temperature ( $\sim 30^\circ\text{C}$ ). Greater limonin reduction (94%) was observed in the column process with 3 g%  $\beta$ -CD polymer, 10 ml bed volume, flow rate 0.35 ml/min, and room temperature ( $\sim 30^\circ\text{C}$ ). In term of limonin adsorption capacities, the batch and column process were 0.17 and 0.27 mg limonin/g  $\beta$ -CD polymer respectively. The practical maximum load of the column was 0.81 mg limonin/g  $\beta$ -CD polymer. In addition, the debittering process did not cause apparent change of the juice. Using 5.6 g% XAD-16 in column debittering at the same condition of  $\beta$ -CD polymer column, the limonin adsorption capacity was 0.18 mg limonin/g XAD-16.

Program Biotechnology

Student's signature

*Priya Rodart*

Field of study Biotechnology

Advisor's signature

*Peerada Mongkolkul*

Academic year 2001

Co-advisor's signature

*Romane Sanguandeekul*

## ACKNOWLEDGEMENTS

The author would like to express her greatly appreciation to her advisor, Assistant Professor Peerada Mongkolkul, and co-advisor, Dr. Romanee Sanguandeekul, for their continuous and close supervision. The faithfulness is also grateful to Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Associate Professor Patcharee Pankul and Dr. Kanoktip Pakdibamrung for their enrollment as committee of this examination.

This study could not be succeeded without kind help from Cerestar U.S.A. Inc., for their  $\beta$ -cyclodextrin polymer, using in this work, Amani Corporation Limited for their Vacuum Manifold and The Graduate School for the grant. Lots of thank for everyone in the laboratory who is always behind the author.

Above all, the author would like to give special thanks for her beloved father, mother, brothers, uncle, aunt, grandfather and grandmother, for their financial support, understanding and real love.

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LISTS OF TABLES.....	xi
LIST OF FIGURES.....	xii
ABBREVIATIONS.....	xv
CHAPTER I: INTRODUCTION.....	1
CHAPTER II: MATERIALS & METHODS.....	42
2.1 Equipments.....	42
2.2 Chemicals.....	43
2.3 Sample preparation.....	44
2.4 Determination of naringin and limonin content in Thai tangerine juice.....	44
2.4.1 Determination of naringin content by HPLC.....	44
2.4.1.1 Standard curve of naringin.....	44
2.4.1.2 Preparation of naringin extract by solid phase extraction(SPE) technique.....	45
2.4.2 Determination of limonin content by HPLC.....	45

2.4.2.1 Standard Curve of Limonin.....	47
2.4.2.2 Preparation of limonin extract.....	47
2.4.2.2.1 Limonin extraction by solid phase extraction (SPE).....	47
2.4.2.2.2 Limonin extraction by solvent extraction (SE).....	50
2.5 Evaluation of reliability of limonin determination.....	50
2.5.1 Efficiency of initial and reused Extra Sep C-18 column in limonin separation .....	50
2.5.2 Reliability of the method for limonin determination.....	50
2.6 Optimization of juice preparation for the study of limonin reduction.....	51
2.6.1 Limonin content in juice kept at consumption conditions.....	51
2.6.2 Effect of temperature on limonin content in Thai tangerine juice.....	51
2.6.3 Effect of heating time on limonin content in Thai tangerine juice.....	52
2.7 Reduction of limonin by $\beta$ -CD polymer .....	52
2.7.1 Preparation of $\beta$ -CD polymer .....	52
2.7.2 Procedures for debittering.....	52
2.7.2.1 Batch process.....	52
2.7.2.2 Column process.....	53



3.5.2.1 Effects of temperature, amount of $\beta$ -CD polymer used and processing time on % limonin reduction.....	82
3.5.2.2 Effect of mixing speed on % limonin reduction.....	86
3.5.3 Column process.....	81
3.5.3.1 Practical maximum load of $\beta$ -CD polymer column for debittering process.....	87
3.5.3.2 Visual comparison of juice color.....	90
3.5.3.3 Regeneration of $\beta$ -CD polymer.....	95
3.6 Comparison of limonin reduction in Thai tangerine juice between batch and column process.....	102
3.7 Column debittering process using XAD-16 resin.....	103
3.8 Evaluation of debittering cost .....	105
CHAPTER IV: DISCUSSION.....	106
CHAPTER V: CONCLUSION.....	121
REFERENCES.....	122
APPENDICES.....	135
BIOGRAPHY.....	162

# LIST OF TABLES

Table	Page
1. Quantity and value of citrus fruits and juice export.....	2
2. Physical properties of $\alpha$ , $\beta$ , and $\gamma$ - CD .....	31
3. Limitation of limonin determination using Extra Sep C-18 column and HPLC.....	71
4. Peak areas of 0.3 ppm standard limonin for 5 replications.....	72
5. % Limonin reduction for batch process at each processing time, temperature and $\beta$ -CD polymer concentration.....	83
6. Limonin content (ppm) in debittered juice for batch process at each processing time, temperature and $\beta$ -CD polymer concentration.....	85
7. Effect of stirrer speed on % limonin reduction.....	86
8. Limonin content in debittered tangerine juice fractions .....	89
9. Limonin content and % limonin reduction of 350 ml load by $\beta$ -CD polymer column.....	94
10. Comparison of limonin reduction efficiency between batch and column processes.....	102
11. Limonin reduction efficiency using XAD-16 resin column.....	104

# LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Cross-section of citrus fruit.....	3
2. Chemical structure of naringin.....	10
3. Limonin structure.....	11
4. Conversion of LARL (a non-bitter precursor) to limonin (a bitter end product).....	13
5. Catabolic pathways for the conversion of limonin to its nonbitter metabolites.....	14
6. Ultrafiltration (UF) membrane performance in citrus process.....	26
7. Schematic flow of the commercial debittering process .....	27
8. Molecular model of $\beta$ - CD.....	29
9. Structure of $\beta$ -CD.....	30
10. Chemical structure of $\alpha$ , $\beta$ , and $\gamma$ - CD.....	30
11. The complexation process .....	32
12. Snapshots of the equilibrium configuration of $\beta$ - CD-pyrethroid complex .....	33
13. Distribution of the 1706 CD relevant abstract published in 1996 by Cyclodextrin News.....	35
14. The predicted structure of many kinds of cyclodextrin polymers.....	38

15. Reaction scheme of the polycondensation of $\beta$ -CD with Epichlorohydrin.....	40
16. HPLC (Hewlett Packard Series 1050 with 4 pumps).....	46
17. Limonin separation using Extra Sep C-18 and vacuum manifold (12 ports).....	49
18. Batch and column processes.....	54
19. % Recovery of naringin of initial and reused Extra Sep C-18 cartridge.....	58
20. Chromatogram of standard naringin.....	59
21. Chromatogram of naringin extract.....	60
22. Chromatogram of spiked naringin sample.....	61
23. Chromatogram of standard limonin.....	63
24. Chromatogram of limonin sample extracted by SPE method.....	64
25. Chromatogram of limonin sample extracted by SE method.....	65
26. Chromatogram of limonin prepared by SPE method.....	66
27. Chromatogram of spiked limonin sample prepared by SPE method chromatogram.....	67
28. % Recovery of limonin of initial and reused Extra Sep C-18 column.....	69
29. Limonin content in sample juice at various conditions.....	74
30. Effect of heating temperature on limonin contents in juice.....	77
31. Effect of heating time on limonin contents in juice.....	80
32. Pre-washed and washed $\beta$ - CD polymer .....	81
33. Limonin content in debittered juice with 100- 200 ml load.....	91

34. Debittering of 350 ml juice load by $\beta$ - CD polymer column.....	93
35. Color comparison between debittered juice and fresh juice.....	96
36. Color comparison of each NaOH washed fractions.....	98
37. Absorption spectra of 2% NaOH wash fraction .....	99
38. Absorption profile of 2% NaOH washed fraction at 275 and 360 nm .....	101



ศูนย์วิจัยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ABBREVIATIONS

$\alpha$	alpha
$\beta$	beta
$\gamma$	gamma
CD	cyclodextrin
cm	centimeter
C.V.	coefficient of variation
$^{\circ}\text{C}$	degree Celsius
DOAE	Department of Agricultural Extension
ECH	epichlorohydrin
g	gram
HPLC	high performance liquid chromatography
hr	hour
i.d.	internal diameter
mA	milliampere
min	minute
$\mu\text{g}$	microgram
$\mu\text{l}$	microliter
$\mu\text{m}$	micrometer
ml	milliliter
N	Normal
nm	nanometer
no.	number
ppm	part per million