สภาวะที่เหมาะสมในการขจัดโปรตีนจากน้ำยางธรรมชาติโดยเอนไซม์

นาย วรรณพ วิเศษสงวน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ.2535

ISBN 974-581-656-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

019284 i 14838321

OPTIMIZATION OF NATURAL RUBBER LATEX DEPROTEINIZATION BY ENZYMES

Mr. Wonnop Visessanguan

A Thesis Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1992

ISBN 974-581-656-6

Thesis Title	Optimization of natural rubber latex deproteinization by enzymes
By	Mr. Wonnop Visessanguan
Department	Biochemistry
Thesis Advisor	Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.
	Assistant Professor Vinich Khamviwath, M.Sc.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

Thavorn Vajrabhaya

..... Dean of Graduate School

(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee

Sanha Panichajakul

..... Chairman

(Associate Professor Sanha Panichajakul, Ph.D.)

Jariya Boonjawat

..... Thesis Advisor

(Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.)

V. Kham

..... Thesis Coadvisor

(Assistant Professor Vinich Khamviwath, M.Sc.)

P. Tasakorn

..... Member

(Mr. Pienpak Tasakorn, Ph.D.)

Prateep Bumroongvittyapan

..... Member

(Mr. Prateep Bumrungvittyapan)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

วรรณพ วิเศษสงวน : สภาวะที่เหมาะสมในการขจัดโปรตีนจากน้ำยางธรรมชาติโดยเอนไซม์ (OPTIMIZATION OF NATURAL RUBBER LATEX DEPROTEINIZATION BY ENZYMES) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.จริยา บุญญวัฒน์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.วินิจ ขำวิวรรธน์, 101 หน้า. ISBN 974-581-656-6

ยางโปรตีนต่ำหรือ DPNR เป็นยางที่ได้จากการทำน้ำยางพาราให้บริสุทธิ์โดยการสกัดโปรตีนและส่วนประกอบอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ยางออก ซึ่งทำให้ยางมีคุณสมบัติสม่ำเสมอเหมาะกับการประยุกต์ใช้งานต่าง ๆ โดยเฉพาะทางวิศวกรรมและทางการแพทย์ วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้ คือทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการขจัดโปรตีนออกจากน้ำยางขัน 60% และน้ำยางสดโดยใช้เอนไซม์สองชนิดคือ ปาเปน และอัลคาเลส และศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของยาง DPNR ที่ผลิตได้ในระดับยางดิบ ยางผสมสารเคมี และยางวัลคาไนซ์เปรียบเทียบกับยางควบคุมที่ไม่ได้ผ่านการขจัดโปรตีนออก และยางแท่งทีทีอาร์ ยางเครปที่ใช้อยู่ในอุตสาหกรรม ผลการทดลองพบว่าในสภาวะที่เหมาะสมเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีศักยภาพสูงในการลดปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในยางได้ร้อยละ 70-75 ของปริมาณเริ่มต้น น้ำยางขัน 60% เป็นสารตั้งต้นที่ดีกว่าน้ำยางสดเนื่องจากมีปริมาณไนโตรเจนตั้งต้นต่ำคงที่และให้ผลผลิตที่มีคุณสมบัติของยางดิบเป็นที่น่าพอใจเมื่อเทียบกับมาตรฐานระดับนานาชาติ คือ ประกอบด้วย ไนโตรเจน 0.05-0.06 g% เถ้า 0.02-0.04 g% ฝุ่นผงต่าง ๆ 0.006 g% และสิ่งระเหยอื่น ๆ 0.07-0.10 g% มีค่าความอ่อนตัวเริ่มต้น 54-57 ค่าดัชนีความอ่อนตัว 65-77 มีสีอ่อนและมีความสามารถในการรักษาค่าความหนืดให้คงที่ ยาง DPNR ที่ผลิตจากน้ำยางสด 3 พันธุ์ คือ PB 5/51 GT 1 และ RRIM 600 มีปริมาณสารต่าง ๆ ปนเปื้อนเหลืออยู่มากกว่า ซึ่งใน 3 พันธุ์ที่ทดลองนี้น้ำยางสดพันธุ์ PB 5/51 เป็นพันธุ์ที่มีความเหมาะสมมากที่สุดที่จะใช้เป็นน้ำยางวัตถุดิบในการผลิตยาง DPNR เนื่องจากมีปริมาณไนโตรเจนตั้งต้นต่ำที่สุด จึงทำให้ยางที่ผลิตได้มีคุณสมบัติยางดิบที่ดีและมีสีอ่อนตั้งแต่ต้นจนจบกระบวนการ จากการศึกษาลักษณะการสุกของยางผสมสารเคมีโดยสูตรยางที่ใช้ทำยางพื้นรองเท้าเปรียบเทียบยาง DPNR กับยางควบคุม พบว่าไม่มีความแตกต่างกันโดยไม่ขึ้นอยู่กับชนิดและพันธุ์ของน้ำยางเริ่มต้น และพบว่ายางที่มีไนโตรเจนต่ำ ($\leq$0.12 g%) มีแนวโน้มที่จะมีอัตราการสุกเร็วกว่ายางที่มีไนโตรเจนมาก โดยปริมาณไนโตรเจน 0.12 g% เป็นปริมาณมากที่สุดที่จะเอื้อต่อการมีอัตราการสุกสูง จากการศึกษาสมบัติทางฟิสิกส์ของยางวัลคาไนซ์ พบว่ายาง DPNR จะมีค่าแรงดึงและเปอร์เซนต์การยืดตัวสูงขึ้น ในขณะที่มีค่าความแข็งและค่าโมดูลัส 300% ลดลง เมื่อเทียบกับยางที่ไม่ได้สกัดโปรตีนออก

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2534 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C225749 : MAJOR BIOCHEMISTRY
KEY WORD : NATURAL RUBBER, DEPROTEINIZATION, ENZYME
WANNOP VISESSANGUAN : OPTIMIZATION OF NATURAL RUBBER LATEX DEPROTEINIZATION BY ENZYMES. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. JARIYA BOONJAWAT, Ph.D. THESIS COADVISOR : ASSIST. PROF. VINICH KHAMVIWATH, M.Sc. 101 pp. ISBN 974-581-656-6

Deproteinized natural rubber or DPNR is the purified form of natural rubber which contains proteins and other non-rubber impurities and posses the good processibilities in many applications especially engineering and medical application. The purpose of this study is to optimize the condition for DPNR production from both; concentrated latex 60%, and clonal field latex by commercially available enzymes, Papain and Alcalase and also study the properties of DPNR obtained in the step of raw rubber, compound and vulcanizate comparing with the non-treated rubber and industrail used rubber, TTR5L and crepe rubber. The results show that both of Papain and Alcalase exhibit high potential in deproteinization by removing total nitrogen approximately 70-75% of initial content at optimal condition. Concentrated latex 60% is a better starting material than field latex in its consistent and lower nitrogen content resulting in the lower and satisfactory high quality raw rubber compositions : 0.05-0.06 g%N, 0.02-0.04 g% ash, 0.006 g% dirt, 0.07-0.10 g% volatile matter, 54-57 Po and 65-77 PRI with light color and the acceptable processibilities according to international specification. While the DPNR produced from field latex posses higher but acceptable amount of nitrogen and other impurities in raw rubber composition. For field latex, among 3 clones; PB 5/51, GT 1, RRIM 600 tested, PB 5/51 is the most suitable clone for DPNR production because it contains the lowest nitrogen content and lighter color at the initial step throughout the process. Cure characteristic of DPNR under the compounding formulation used for footwear outsole are not significantly different from non-treated rubber and seem to be independent on the clonal effect. This noted that cure rate of low-nitrogen rubbers apparently increase when the retained %N $\leq$ 0.12 g% which implies the maximum value needed for the high cure rate property of DPNR. The typical characteristic of DPNR vulcanizate are their higher stress-strain properties but slightly lower in hardness and 30% modulus.

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2534 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พ.ศ. ๒๕๔๓ สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENT

The first of all, I would like to express my keen gratitude to Asso.Prof.Dr. Jariya Boonjawat, my impressive advisor and Assist. Prof. Vinich Khamviwath, thesis coadvisor, for their initiation, valuable guidance and suggestions throughout this thesis.

My appreciation is also expressed to Asso.Prof.Dr. Sanha Panichajakul ,Dr. Pienpak Tasakorn and Mr.Prateep Bumrungvittyapan for serving as thesis committee.

I would like to send my sincerely thanks to all people in the associated institutions and companies for their kind assistance and collaboration :

- Miss Vipa Savetanit and all staff members of the Rubber Research Institute of Bangkok for providing equipments in raw rubber testing.

- Dr. Krisada Suchiva of the Department of Chemistry, Mahidol University for providing facilities for study on cure characteristics.

- All staff members of Banpan Research Laboratory Co. Ltd. for their helps and providing equipments in vulcanizate properties testing.

- Bangkok Rubber Co. Ltd. for their supplying the rubber materials.

I would like to thank the Science and Technology Development Board (STDB) for the financial support throughout this research.

And last but not least, I would like to extend my deepest gratitude to my family, all teachers and friends who always give me warmest love, knowledge, understanding and friendship.

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT.....iv

ENGLISH ABSTRACT.....v

ACKNOWLEDGEMENT.....vi

CONTENTS.....vii

LISTS OF TABLES.....ix

LISTS OF FIGURES.....x

ABBREVIATION.....xii

CHAPTER I INTRODUCTION.....1

CHAPTER II MATERIALS AND METHODS.....15

1 Biological materials.....15

2 Chemicals.....17

3 Apparatus.....17

4 Assay of Alcalase activity.....18

5 Optimum condition for Alcalase activity.....19

6 Assay of Papain activity.....20

7 Optimum condition for Papain.....20

8 Preparation of latex for deproteinization.....21

9 Deproteinization of latex.....22

10 Optimum processing for DPNR production.....23

11 DPNR production.....25

12 Raw rubber testing.....25

13 Testing of the rubber vulcanizates.....31

Page

CHAPTER III RESULTS.....36

1 Optimum condition for enzyme activity with casein substrate.....36

2 Optimum condition for deproteinization of concentrated latex.....36

3 Optimum condition for deproteinization of field latex.....47

4 Addition of non-ionic detergent as protein solubilizer and stabilizer.....50

5 Quality of deproteinized raw rubber.....52

6 Processibility of deproteinized rubber.....59

CHAPTER IV DISCUSSION.....71

1 The condition of latex deproteinization by Papain and Alcalase.....71

2 Choice of starting material.....72

3 Choice of enzyme.....74

4 The processibility of deproteinized rubber.....74

CHAPTER V SUMMARY.....80

REFERENCE.....82

APPENDIX.....88

BIOGRAPHY.....101

LIST OF TABLES

Table Page

1.1 Average molecular weight, Wallace plasticity, Mooney viscosity, Molecular weight distribution of some clonal crepe rubber.....5

1.2 Typical properties of DPNR.....11

1.3 Developements in the manufacture of DPNR.....12

2.1 The compounding formulation chosen for assessing the cure behavior of natural rubber.....31

3.1 Effect of ammonia evaporation on raw rubber properties.....43

3.2 Effect of dilution and coagulant on raw rubber properties.....45

3.3 Tracing the raw rubber properties along steps in DPNR production scheme.....46

3.4 Optimal concentration of Triton X-100 for latex deproteinization.....51

3.5 Raw rubber properties of DPNR from concentrated latex 60 %.....54

3.6 Raw rubber properties of DPNR from clonal field latex.....56

4.1 Process economics of DPNR.....79

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure — Page

1.1 The chemical structure of Hevea latex.....2

1.2 Natural rubber production process in Thailand.....3

1.3 Types of molecular weight distribution curves of natural rubber.....6

1.4 DPNR production and sales.....14

2.1 DPNR production scheme.....24

2.2 Illustration of testpiece punching from rubber sheet.....28

2.3 Rheometer curing curve.....33

2.4 Shape of dumbbell test piece.....35

3.1 Optimum condition for Alcalase activity.....37

3.2 Optimum condition for Papain activity.....38

3.3 Optimum condition for deproteinization of concentrated latex 60%.....40

3.4 Effect of pH on concentrated latex deproteinization by Papain..41

3.5 Optimal condition for concentrated latex deproteinization by Alcalase.....42

3.6 Optimal condition for deproteinization of field latex.....48

3.7 Optimization of fresh field latex deproteinization.....49

3.8 Optimal incubation time for deproteinization of field latex ...53

3.9 Color comparison among raw DPNR and non-deproteinized rubber from various sources.....60

3.10 Correlation between total nitrogen and the Mooney viscosity....57

Figure Page

3.11 Correlation between total nitrogen reduction and the Mooney viscosity reduction.....58

3.12 Rheograph of a typical sample of compounded rubber and DPNR....61

3.13 Rheological properties of DPNR.....63

3.14 Scattered plot between total nitrogen and cure rate.....64

3.15 Scattered plot between total nitrogen and torque rise.....65

3.16 Color of rubber compound.....67

3.17 Vulcanizate properties of DPNR.....68

3.18 Color of rubber vulcanizate.....69

ABBREVIATION

DPNR	Deproteinized natural rubber
CDU	Casein digestion unit
°C	Degree Celcius
min	Minute
h	Hour
nm	Nanometre
µm	Micrometre
mm	Millimetre
cm	Centrimetre
in	Inch
g	Gram
wt	Weight
g %	Gram per cent
lb	Pound
ml	Millilitre (10^{-3} litre)
l	Litre
M	Molarity
A_{280}	Absorbance at 280 nm
p.h.r.	Part per hundred rubber
NR	Natural Rubber
DRC	Dry Rubber Content
Po	Initial plasticity
PRI	Plasticity Retention Index
ASHT	Accelerated storage hardening test