

การเตรียมยางธรรมชาติโปรตีนต่ำโดยสะพานีพีเคชัน

นางสาวกนกวรรณ อินสองใจ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ หลักสูตรปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2543

ISBN 974-346-425-5

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I10471142

PREPARATION OF DEPROTEINIZED NATURAL RUBBER BY SAPONIFICATION

Miss Kanokwan Insongjai

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Petrochemistry and Polymer Science

Program of Petrochemistry and Polymer Science

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2000

ISBN 974-346-425-5

Thesis Title PREPARATION OF DEPROTEINIZED NATURAL RUBBER BY
SAPONIFICATION

By Miss Kanokwan Insongjai

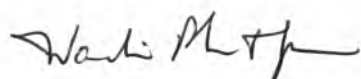
Program Petrochemistry and Polymer Science

Thesis Advisor Prof. Pattarapan Prasassarakich, Ph.D.

Thesis Co-advisor Prof. Yasuyuki Tanaka, Ph.D.

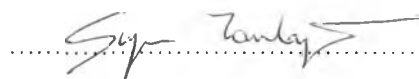
Prof. Suda Kiatkamjornwong, Ph.D.

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



..... Dean of Faculty of Science
(Associate Professor Wanchai Phothiphichitr, Ph.D.)

Thesis Committee



..... Chairman
(Associate Professor Supawan Tantayanon, Ph.D.)



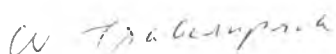
..... Thesis Advisor
(Professor Pattarapan Prasassarakich, Ph.D.)



..... Thesis Co-advisor
(Professor Yasuyuki Tanaka, Ph.D.)



..... Thesis Co-advisor
(Professor Suda Kiatkamjornwong, Ph.D.)



..... Member
(Associate Professor Wimonrat Trakarnpruk, Ph.D.)

กนกวรรณ อินสองใจ: การเตรียมยางธรรมชาติโปรตีนต่ำโดยสะพอนิฟิเคชัน (PREPARATION OF DEPROTEINIZED NATURAL RUBBER BY SAPONIFICATION) อ. ที่ปรึกษา : ศ.ดร.ภัทรพรรณ ประศาสน์สาร
กิจ; อ. ที่ปรึกษาร่วม : ศ.ดร.ยาสุยูกิ ทานากะ และ ศ.ดร.สุดา เกียรติกำจรวงศ์; 84 หน้า, ISBN 974-346-425-5

ยางธรรมชาติจากน้ำยางเฮเวีย บราซิลเลียนซิส ประกอบด้วยองค์ประกอบที่ไม่ใช่ยาง 6% เช่น โปรตีน ไชมัน คาร์โบไฮเดรต สารประกอบอนินทรีย์ และอื่นๆ โปรตีนบางส่วน (1-2%) ทำหน้าที่เป็นสารลดแรงตึงผิวให้น้ำยางเสถียร อย่างไรก็ตามโปรตีนที่สามารถสกัดได้ในผลิตภัณฑ์จากน้ำยางเป็นสาเหตุของอาการแพ้ชนิดที่ 1 จึงจำเป็นต้องหาวิธีการใหม่สำหรับการผลิตยางแห้งที่ปราศจากโปรตีน(DPNR)หรือมีปริมาณไนโตรเจนที่เหลืออยู่หรือโปรตีนที่สามารถสกัดได้น้อยกว่า 0.02% และ 20 มิลลิกรัมต่อกรัมยางตามลำดับ

ในงานวิจัยนี้ได้พยายามผลิตยางธรรมชาติโปรตีนต่ำโดยการทำให้โปรตีนต่ำโดยการทำปฏิกิริยาสะพอนิฟิเคชัน น้ำยางสดและน้ำยางแอมโมเนียสูงถูกต้มกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ (1-5 % น้ำหนักโดยปริมาตร) ร่วมกับสารลดแรงตึงผิวที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง น้ำยางที่ได้หลังทำปฏิกิริยาจะถูกจัดการโดย 2 วิธี คือ วิธีที่ 1 ล้างโปรตีนที่ย่อยสลายด้วยการปั่นแยก 1 หรือ 2 ครั้ง น้ำยางที่มีเนื้อยาง 10 เปอร์เซนต์ เสถียรได้ในขั้นตอนสะพอนิฟิเคชันและการปั่นแยกด้วยไททรอนเอ็กซ์-100 และเกิดการจับก้อนบางส่วนเมื่อใช้โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต สารลดแรงตึงผิว (ไททรอนเอ็กซ์-100) ร่วมกับโซเดียมไฮดรอกไซด์แสดงผลอย่างมากในการลดปริมาณไนโตรเจนในยางธรรมชาติโปรตีนต่ำ การเติมไททรอนเอ็กซ์-100 ปริมาณ 0.2 เปอร์เซนต์น้ำหนักโดยปริมาตรในปฏิกิริยาสะพอนิฟิเคชันและก่อนการล้างครั้งที่ 2 ทำให้น้ำยางเสถียรระหว่างขั้นตอนการปั่นแยก ในกรณีนี้ปริมาณไนโตรเจนลดลงได้ถึง 0.0036 เปอร์เซนต์ และปริมาณเก่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย โซเดียมไฮดรอกไซด์มากกว่า 4 เปอร์เซนต์ภายใต้ภาวะที่กล่าวมาสามารถลดปริมาณไนโตรเจนลงเหลือน้อยกว่า 0.02 เปอร์เซนต์ วิธีที่ 2 โปรตีนที่ถูกย่อยสลายถูกล้างด้วยน้ำหลังการจับก้อนของน้ำยางโดยตรงด้วย แคลเซียมไนเตรต โซเดียมคลอไรด์ หรือ กรดซัลฟิวริก โดยใช้เครื่องกวนความเร็วสูง วิธีการจับก้อนโดยตรงของน้ำยางที่ทำปฏิกิริยาสะพอนิฟิเคชันโดยกรดซัลฟิวริกร่วมกับโซเดียมสเตียเรตทำให้ได้ยางธรรมชาติโปรตีนต่ำที่มีปริมาณไนโตรเจนและเก่าต่ำ ความแข็งแรงของยางดิบของยางธรรมชาติโปรตีนต่ำนั้นลดลงเล็กน้อยจากค่าเริ่มต้น สารต้านทานอนุมูลอิสระทั่วไปสามารถใช้กับยางธรรมชาติโปรตีนต่ำเพื่อแทนที่สารต้านทานอนุมูลอิสระตามธรรมชาติได้

ภาควิชา.....
สาขาวิชา..... ปีโทรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์
ปีการศึกษา..... 2543

ลายมือชื่ออนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4172204823 : MAJOR POLYMER SCIENCE

KEY WORD: PURIFICATION / FIELD LATEX / SAPONIFICATION / DEPROTEINIZATION / NATURAL RUBBER

KANOKWAN INSONGJAI : PREPARATION OF DEPROTEINIZED NATURAL RUBBER BY SAPONIFICATION
THESIS ADVISOR : PROF. PATTARAPAN PRASASSARAKICH, Ph.D.,
THESIS COADVISOR : PROF. YASUYUKI TANAKA, Ph.D. and PROF. SUDA KIATKAMJORNWONG, Ph.D., 84 pp. ISBN 974-346-425-5

Natural rubber from *Hevea Brasiliensis* latex contains about 6% non-rubber components such as proteins, lipids, carbohydrates, inorganic constituents and etc. Some of proteins (1-2%) act as a surfactant to stabilize latex. However, extractable proteins in latex-product are responsible for the Type I allergic reaction. It is necessary to establish a new method for commercial production of solid deproteinized natural rubber (DPNR) of protein-free or containing the residual nitrogen or extractable protein less than 0.02% and 20 mg/g rubber, respectively.

In this paper, an attempt was made to produce solid DPNR by saponification. Fresh latex (FL) and HA-latex was incubated with NaOH (1-5% w/v) in the presence of surfactant at 70 °C for 3 hrs. The resulting latex was treated in two ways: Method 1: Decomposed proteins were washed by single or double centrifugation. Triton X-100 (isooctylphenoxypolyethoxyethanol) stabilized 10% DRC latex and partial coagulation was observed for SDS (Sodium dodecyl sulfate). The addition of Triton X-100 showed a synergistic effect with NaOH to decrease the nitrogen content in DPNR. The addition of 0.2% Triton X-100 in the saponification reaction and before the second washing, stabilizes the latex during centrifugation step. In this case, the nitrogen content decreases to 0.0036% with a slight increase in the ash content. The nitrogen content lower than 0.02% can be achieved at NaOH concentration higher than 4% under these conditions. Method 2: Decomposed proteins were washed with water after coagulation of latex with $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, NaCl or H_2SO_4 by using a high speed mechanical stirrer. The direct coagulation of saponified latex by H_2SO_4 in the presence of sodium stearate produced low nitrogen and ash content solid DPNR. Green strength of DPNR decreases slightly from original value. Ordinary antioxidant able to applied to DPNR to replace natural antioxidant.

Department

Field of Study Petrochemistry and Polymer Science

Academic year 2000

Student's signature 

Advisor's signature 

Co-advisor's signature 

Co-advisor's signature 

ACKNOWLEDGMENTS



The author would like to acknowledge heartfelt gratitude and appreciation to her advisor, Prof. Dr. Pattarapan Prasassarakitch, and her co-advisor, Prof. Dr. Yasuyuki Tanaka and Prof. Dr. Suda Kaitkamjornwong, for their kind supervision, invaluable guidance and generous encouragement throughout the course of this research.

The author is also sincerely thankful to the chairman and members of the thesis committee for their comments and suggestions.

Many thanks also go to the Department of Chemical Technology, the Department of Biochemistry and the Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, the Rubber Research Institute of Thailand and TJTTP-OECF for providing research facilities throughout the research.

Special thank are expressed to N.Y. Rubber co., Ltd. for material supply and to the Graduate School of Chulalongkorn University for partial financial research grants.

The author also would like to especially thank the following: Asst. Prof. Dr. Jitladda Sakdapipanich, Dr. Seiichi Kawahara, Ms. Tippawon Kowitteerawut, and her friends whose names are not mentioned here, but contributed their assistance, suggestions, advice concerning the experimental techniques and encouragement during the period of this study.

Finally, and most of all, the author would like to express her deep gratitude to her family for their love, inspiration, and endless encouragement throughout this entire study.

CONTENTS

	PAGE
ABSTRACTS (IN THAI).....	iv
ABSTRACTS (IN ENGLISH)	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	xi
LIST OF FIGURES.....	xiii
CHAPTER 1 : INTRODUCTION.....	1
1.1 Scientific Rationale.....	1
1.2 Objectives of the Research Work.....	2
1.3 Scope of the Research Work.....	2
CHAPTER 2 : THEORETICAL CONSIDERATION AND LITERATURE REVIEWS..	3
2.1 Constitution of Fresh and Ammonia-preserved Natural Rubber...	3
2.1.1 The Rubber Phase.....	4
2.1.1.1 Shape, Size, Size Distribution and Physical Structure of the Rubber Particles in Natural Rubber Latex.....	4
2.1.1.2 Chemical Constitution and Structure of the Particles in Natural Rubber Latex.....	10
2.1.2 The Aqueous Phase.....	13
2.1.2.1 Carbohydrates.....	13
2.1.2.2 Protein and Amino Acid.....	14
2.2 Biosynthesis of Natural Polyisoprene	19
2.2.1 Occurrence of Natural Cis- and Trans-Polyisoprene.....	19
2.2.2 Biosynthesis Process.....	20
2.2.2.1 Formation of Isopentenyl Pyrophosphate.....	20
2.2.2.2 Initiation of Polymerization.....	22
2.2.2.3 Chain Elongation Step.....	23

CONTENTS (continued)

	PAGE
2.2.2.4 Termination of Polymerization.....	25
2.3 Molecular Weight of Natural Polyisoprene.....	26
2.3.1 Molecular Weight Distribution in Freshly Tapped Latex.....	26
2.3.2 Effect of Mastication, Sunlight and Heat on Molecular Weight..	28
2.3.2.1 Mastication.....	28
2.3.2.2 Sunlight and Heat.....	29
2.4 Literature Reviews.....	31
CHAPTER 3 : EXPERIMENTAL.....	34
3.1 Materials and Chemicals.....	34
3.1.1 Raw Materials.....	34
3.1.2 Chemicals.....	34
3.2 Equipment and Instruments.....	35
3.3 Purification of Natural Rubber Latex by Saponification.....	35
3.3.1 Enzymatic Deproteinization	35
3.3.2 Saponification Deproteinization.....	36
3.3.2.1 Saponification of Latex and Washing by Centrifugation Followed by Coagulation.....	37
1. Stability of Latex During Saponification and Washing Step.....	37
2. Effect of Number of Centrifugation on Washing Efficiency.....	37
3. Effect of Surfactant on Saponification.....	37
4. Effect of Surfactant Concentration on Saponification and Washing Efficiency.....	37
5. Effect of NaOH Concentration on Saponification Efficiency.....	37

CONTENTS (continued)

	PAGE
3.3.2.2 Saponification of Latex and Coagulation Followed by Washing.....	38
1. Creaming and coagulation by Sodium Chloride...	38
2. Coagulation by Calcium Nitrate.....	38
3. Coagulation by Neutralization with Sulfuric Acid in the Presence of Sodium Stearate.....	38
3.4 Determination of Rubber Properties.....	39
3.4.1 Total Solid Content.....	39
3.4.2 Dry Rubber Content.....	39
3.4.3 Determination of Low Nitrogen Content of Purified Natural Rubber by Modified RRIM method.....	40
3.4.4 Gel Content Analysis.....	41
3.4.5 Determination of Molecular Weight and Molecular Weight Distribution by GPC.....	41
3.4.6 Ash Content.....	42
3.4.7 FTIR Analysis of Saponified Rubber.....	42
3.4.7.1 Determination of Nitrogen Content.....	42
3.4.7.2 Determination of Ester Content.....	43
3.4.8 Determination of Aqueous Extractable Protein.....	43
CHAPTER 4 : RESULTS AND DISCUSSION.....	44
4.1 Saponification of Latex and Washing with Centrifugation Followed by Coagulation.....	44
4.1.1 Stability of Latex During Saponification and Washing Step....	44
4.1.2 Effect of Number of Centrifugation on Washing Efficiency...	47
4.1.3 Effect of Surfactant on Saponification.....	49

CONTENTS (continued)

	PAGE
4.1.4 Effect of Addition Method and Surfactant Concentration on Saponification and Washing Efficiency.....	50
4.1.5 Effect of NaOH Concentration on Saponification.....	52
4.1.5.1 Effect of NaOH Concentration on Nitrogen Content.....	52
4.1.5.2 Change in Gel Content after Saponification.....	55
4.1.5.3 Change in Ester Content after Saponification Observed by FTIR and ¹³ C-NMR.....	56
4.1.5.4 Molecular Weight Change of Natural Rubber after Saponification.....	62
4.2 Saponification of Latex and Coagulation Followed by Washing.....	65
4.2.1 Creaming and Coagulation by NaCl.....	65
4.2.2 Effect of Ca(NO ₃) ₂ on Coagulation Process and Washing Efficiency.....	66
4.2.3 Effect of H ₂ SO ₄ and Sodium Stearate on Coagulation Process and Washing Efficiency	67
4.3 The Effect of Antioxidant on Thermal Oxidative Aging of DPNR....	68
4.4 Green Properties of Deproteinized Natural Rubber.....	70
CHAPTER 5: CONCLUSION	72
REFERENCES.....	74
APPENDICES.....	76
APPENDIX A.....	77
APPENDIX B.....	79
APPENDIX C.....	81
APPENDIX D.....	82
VITA.....	84

LIST OF TABLES

TABLE	PAGE
2.1 Typical composition of fresh natural rubber latex.....	4
2.2 Typical composition of rubber particles in fresh natural rubber latex.....	9
2.3 Apparent gel contents of natural rubber (pale crepe grade) as determined using various solvents.....	9
2.4 Free amino acids which have been identified in the aqueous phase of fresh natural rubber latex	17
2.5 Amino acids which have been identified in the hydrolysis products of natural rubber latex proteins.....	18
2.7 Type of molecular weight distribution and fraction of low molecular weight in clonal rubbers.....	35
2.8 Molecular weight distribution of rubber masticated for different periods.....	28
4.1 Stability of latex during saponification and washing in the presence of surfactant.....	45
4.2 MST of original and saponified latex with 5% NaOH in the presence of various surfactants (0.2%, w/v).....	46
4.3 Nitrogen content of purified rubber affected by number of centrifugation, NaOH and surfactant.....	46
4.4 Stability of saponified latex and nitrogen content of saponified rubber, saponified with 5% NaOH at 70 ^o C for 3 h. followed by double centrifugation.....	51
4.5 Nitrogen content and gel content of saponified natural rubber with 1-5% (w/v) NaOH at 70 ^o C for 3 h.....	51
4.6 Ester content from FTIR technique of saponified natural rubber with 1-5% (w/v) NaOH at 70 ^o C for 3 h.	57
4.7 Ester content of field natural rubber and deproteinized natural rubber.....	59

List of tables (continued)

TABLE	PAGE
4.8 Molecular weight and molecular weight distribution change of field natural rubber and saponified natural rubber.....	62
4.9 Nitrogen and ash content of saponified rubber coagulated by $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ with high speed mechanical stirring at 50°C	66
4.10 Nitrogen and ash content of saponified rubber coagulated by H_2SO_4 in the presence of sodium stearate at 50°C with very high-speed blender.....	67
B.1 Nitrogen content of saponified rubber with 5% w/v NaOH in the presence of 0.1 and 0.2 %(w/v) Triton X-100 at 70°C for 3 h. followed by single or double centrifugation.....	79
B.2 Nitrogen content of DPNR by saponification with NaOH/Triton X-100.....	79
B.3 Nitrogen content of saponified rubber with 1-5% (w/v) NaOH.....	80
B.4 Nitrogen content of saponified rubber observed by different surfactant concentration and step of surfactant adding.....	80
C.1 Intensity ratio of ^{13}C -NMR signals at 24 and 29.71 ppm of saponified rubber with 1-5 %(w/v) NaOH.....	81
D.1 Peak height ratio of standard ester content for calibration curve.....	82
D.2 Peak height ratio of saponified rubber.....	83

LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
2.1 Particle size distribution for unconcentrated natural rubber latex.....	6
2.2 Typical particle size distributions for (a) high-ammonia and (b) LATZ low-ammonia latices.....	8
2.3 Molecular weight-size distribution.....	8
2.4 Presumed pathway for biosynthesis of rubber.....	21
2.5 Stereochemistry of rubber synthesis from mevalonic acid.....	24
2.6 Hypothetical scheme of the chain extension mechanism on the surface of a rubber particle.....	25
2.7 Types of molecular weight distribution curves of natural rubber.....	27
2.8 Molecular weight distribution of rubber masticated at 30°C.....	27
2.9 Molecular weight distribution of SMR 5 masticated to the same Mooney viscosity as SMR CV.....	30
2.10 Molecular weight distribution curves for heat and sunlight degraded rubber.....	30
3.1 Enzymatic deproteinization of natural rubber latex.....	36
3.2 Saponification deproteinization of natural rubber latex.....	36
4.1 Effect of number of centrifugation on nitrogen content.....	48
4.2 Nitrogen content of DPNR by saponification with NaOH/Triton X-100.....	49
4.3 Addition of Triton X-100 in course of saponification and washing by double centrifugation.....	51
4.4 Effect of NaOH concentration on nitrogen content of rubber saponified with NaOH and 0.2% (w/v) Triton X-100 at 70°C for 3 h and washing by double centrifugation.....	53
4.5 FTIR spectra of original rubber and purified rubber saponified with various concentration of NaOH.....	54

LIST OF FIGURES (continued)

FIGURE	PAGE
4.6 The mechanism of storage hardening in natural rubber due to abnormal groups.....	56
4.7 FTIR spectra of field latex rubber and purified rubber saponified with various concentrations of NaOH for determination of ester.....	58
4.8 ¹³ C-NMR spectra of (a) field latex natural rubber, (b) field latex natural rubber (expanded), (c) saponified natural rubber and (d) saponified natural rubber (expanded).....	60
4.9 Molecular weight distribution of natural rubber by GPC method (a) Molecular weight of field natural rubber (b)-(d) Molecular weight of purified natural rubber saponified with 1,3 and 5% (w/v) NaOH, respectively.....	63
4.10 Coagulum obtained by the addition of H ₂ SO ₄ in the presence of sodium stearate.....	68
4.11 Stress-strain curve of (a) original rubber (b) DPNR (method 1) and (c) DPNR (method 2).....	71