การพัฒนายางธรรมชาติโปรตีนแอลเลอเจนต่ำโดยกระบวนการสะพอนิฟิเคชัน

นางสาวศิริวัลย์ บุญสุข

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-334-083-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I19017120 16 พ.ค. 2546

DEVELOPMENT OF NATURAL RUBBER WITH LOW ALLERGENIC PROTEINS BY SAPONIFICATION PROCESS

Miss Siriwan Boonsook

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Department of Biochemistry
Faculty of Science
Chulalongkorn University

Academic Year 1999
ISBN 974-334-083-1

Thesis Title	Development of rubber with low allergenic proteins by saponification process
By	Siriwan Boonsook
Department	Biochemistry
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Jariya Boonjawat
Thesis Co-advisor	Prof. Dr. Yasuyuki Tanaka

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

..... Dean of Faculty of Science

(Associate Professor Wanchai Phothiphichitr, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Assistant Professor Tipaporn Limpaseni, Ph.D)

..... Thesis Advisor

(Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D)

..... Thesis Co-advisor

(Professor Yasuyuki Tanaka, Ph.D)

..... Member

(Pienpak Tasakorn, Ph.D)

..... Member

(Suwirakorn Ophaswonge, M.D)

นางสาวศิริวัลย์ บุญสุข: การพัฒนายางธรรมชาติโปรตีนแอลเลอเจนต่ำโดยกระบวนการสะพอนิฟิเคชัน (DEVELOPMENT OF NATURAL RUBBER WITH LOW ALLERGENIC PROTEINS BY SAPONIFICATION PROCESS) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.จริยา บุญญวัฒน์ อ.ที่ปรึกษาร่วม : Prof. Yasuyuki Tanaka. 124 หน้า. ISBN 974-334-083-1

โปรตีนแอลเลอเจนซึ่งอยู่ในน้ำยางธรรมชาติมีผลทำให้คนที่ใช้ผลิตภัณฑ์ยางเกิดอาการแพ้ประเภท 1 ที่มีอันตรายถึงชีวิตได้ในคนประเภทภูมิไวเกิน ดังนั้นการพัฒนายางธรรมชาติโปรตีนแอลเลอเจนต่ำจึงเป็นวัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้ วิธีการที่ใช้คือการสะพอนิฟิเคชันในสภาวะที่เหมาะสมและศึกษาคุณสมบัติต่างๆของยางที่ผ่านการสะพอนิไฟด์หรือ SAP-NR ที่ผลิตได้ในระดับยางดิบและคุณสมบัติของยางวัลคาไนซ์โดยเปรียบเทียบกับยาง STR5L และเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนแอลเลอเจนในยางก่อนและหลังการสะพอนิไฟด์ นอกจากนี้ยังทดสอบการแพ้ต่อโปรตีนในยาง SAP-NR และยางที่ไม่ได้สะพอนิไฟด์ ผลการวิจัยพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสะพอนิไฟด์น้ำยางสด 30 %DRC คือใช้ 5% โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ 70 องศาเซลเซียสนาน 3 ชั่วโมงจากนั้นเจือจางน้ำยางเป็น 15 % DRCและจับก้อนด้วยกรด ได้ยางสะพอนิไฟด์ที่มีปริมาณไนโตรเจนลดลง23% แต่ยังมีปริมาณเถ้าสูงเกินมาตรฐานยางแท่ง STR5L ดังนั้นจึงพัฒนาวิธีการสะพอนิไฟด์ยางก้อนซึ่งได้จากการจับกรดก่อนแล้วจึงแช่ใน 5% โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ 70 องศาเซลเซียสนาน 3 ชั่วโมง วิธีการพัฒนาใหม่นี้สามารถประหยัดโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์และน้ำทิ้งในกระบวนการโดยการนำสารละลายด่างไปใช้ซ้ำได้ 7 รอบในยางก้อนที่มีแอมโมเนีย (AL) และ 5 ครั้งในยางก้อนที่เตรียมจากน้ำยางสกิม (SK) ผลการวิจัยพบว่ายางสะพอนิไฟด์สกิม SAP-SK มีคุณภาพดีกว่ายางสะพอนิไฟด์แอมโมเนีย SAP-AL เนื่องจากมีปริมาณไนโตรเจนต่ำกว่าและมีสมบัติยางดิบใกล้เคียงกับ STR5L แต่มีปริมาณเถ้าและปริมาณสิ่งระเหยสูงกว่ามาตรฐานในขณะที่ค่าความอ่อนตัวเริ่มต้นต่ำกว่ามาตรฐาน สมบัติทางฟิสิกส์ของยางวัลคาไนซ์ของ SAP-NR มีค่าโมดูลัสลดลงเมื่อเทียบกับยางไม่ได้ผ่านการสะพอนิไฟด์ รูปแบบโปรตีนที่สกัดด้วยน้ำของยาง SAP-NR มีโปรตีนขนาด 45 kD ในขณะที่ยางไม่ได้ผ่านการสะพอนิไฟด์พบโปรตีนหลายชนิดน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 14.2-45 kD ผลการศึกษาความชุกของการแพ้ยางในกลุ่มผู้บริจาคโลหิต 100 คน โดยวิธีเอนไซม์อัลเลอโกซอบเบนท์ (EAST) พบผู้มีโอกาสแพ้ยาง 5% ในขณะที่ 4/6 ของบุคลากรที่ทำงานในโรงพยาบาลและมีประวัติเป็นโรคภูมิแพ้แสดงผลบวกต่อโปรตีนจากยางสกิมปกติ แต่เมื่อสกัดโปรตีนจากยาง SAP-AL และ SAP-SK ไม่พบโปรตีนแอลเลอเจนโดยวิธี EAST ในผู้แพ้ยาง 5 คน และยืนยันโดยวิธี Skin prick ในผู้แพ้ยาง 1 คน ผลสรุปจากงานวิจัยนี้คือการสะพอนิฟิเคชันสามารถลดปริมาณและชนิดของโปรตีนในยางก้อน SAP-AL และ SAP-SK ให้อยู่ในระดับที่ปลอดภัยสำหรับกลุ่มคนไทยที่มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดการภูมิแพ้ต่อโปรตีนในยางธรรมชาติและกลุ่มคนที่มีสุขภาพดี

ภาควิชา ชีวเคมี
สาขาวิชา ชีวเคมี
ปีการศึกษา 2542

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4072484023 : MAJOR BIOCHEMISTRY
KEY WORD : NATURAL RUBBER/LATEX ALLERGY/SAPONIFICATION
SIRIWAN BOONSOOK : DEVELOPMENT OF NATURAL RUBBER WITH LOW ALLERGENIC PROTEINS BY SAPONIFICATION PROCESS
THESIS ADVISOR: ASSO.PROF. JARIYA BOONJAWAT, Ph.D.
THESIS CO-ADVISOR: Prof. Yasuyuki Tanaka. 124 pp. ISBN 974-334-083-1

Protein allergens in natural rubber latex (NRL) and NRL products may cause life threatening allergenic hypersensitivity type I in hypersensitive users. The development of natural rubber with low allergenic proteins is thus the purpose of this study. Saponification is the method selected for deproteinization. Physical properties of saponifeid NR were studied at the level of raw rubber and vulcanized rubber by comparing with STR5L. Nitrogen content characteristics of protein allergens and allergenic response were compared between control and saponified rubber. The optimal conditions for saponification of field latex at 30%DRC resulted from using 5% KOH at 70 °C for 3 h, then diluted to 15% DRC and coagulated by formic acid. The saponified rubber obtained has decreased nitrogen content 23% from control, but the ash content is higher than STR5L specification. Thus, saponification by using coagulated crumb rubber (C-NR) has been developed by soaking C-NR in 5% KOH at 70 °C for 3 h. This new method can reduce KOH and wastewater during the process by recycling of alkali solution 7 cycles for ammoniated crumb rubber and 5 cycles for skim crumb rubber. Saponified skim rubber (SAP-SK), has better quality than saponified ammoniated crumb rubber (SAP-AL) and STR5L in lower nitrogen content, and more or less similar physical properties to STR5L except slightly high content of ash, volatile matter and too lower initial plasticity. Vulcanized SAP-NR shows a small decrease in 300% modulus comparing to its control NR. Nitrogen content and water extractable protein content in SAP-AL and SAP-SK are slightly decrease after saponification. Protein allergens pattern of SAP-NR is dominated by protein molecular weight of 45 kD when comparing to non-saponified rubber that have molecular weight in the range of 45-14.2 kD and lower. Enzyme allergosorbent test (EAST) was used to study the prevalence of latex allergy in 100 blood donors where 5% positive EAST was observed. Four out of six (4/6) health care workers with allergic history showed positive EAST to water extractable protein from normal skim rubber. There is no protein allergenic response of SAP-AL and SAP-SK determined by EAST in 5 persons with latex allergy and confirmed in one person by skin prick test. In conclusion, saponification can reduce the amount of and variety of protein allergens in SAP-AL and SAP-SK to the level, which are safe for high-risk allergic Thai people and healthy people.

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา 2542 ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ACKNOWLEDGEMENT

First of all, I wish to express my keen gratitude to Asso. Prof.Dr. Jariya Boonjawat, my impressive advisor for her encouragement, suggestion, financial supports and helpful guidance throughout this study. I would like to acknowledge Prof. Yasuyuki Tanaka, my thesis co-advisor, for his initiation, valuable guidance and suggestions throughout this thesis and also would like to acknowledge my thesis committee Assist. Prof.Dr. Tipaporn Limpaseni, Dr. Peinpak Tassakorn and Dr. Suwirakorn Ophaswongse.

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

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

All staff member of Rayong Bangkok Rubber Co. Ltd. for their helps and supplying the rubber materials.

I wish to acknowledge Thailand Red Cross for supplying the normal' s sera. Special thanks to all latex allergy patients of Chulalongkorn Hospital and Ministry of Public Health for their sera.

I would like to thank the National Research Council of Thailand, The Graduate School of Chulalongkorn University, Thailand-Japan Technology Transfer Project and OECF for their financial support and the scholarship throughout this research. Also, I would like to thank the Department of Biochemistry Faculty of Science, Chulalongkorn University and the staffs for providing the facilities in laboratory, chemicals and equipment.

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, and friendship.

CONTENTS

		Page
Thai abstract		I
English abstract		II
Acknowledgement		III
Contents		IV
List of Table		V
List of Figure		VI
Abbreviation		IX
Chapter I	Introduction	1
Chapter II	Materials and methods	25
1	Biological materials	25
2	Apparatus	26
3	Method for preparation of latex for deproteinization	26
4	Saponification of latex	27
5	Saponfication of solid rubber	28
6	Production of saponified natural rubber (SAP-NR)	28
7	Raw rubber testing	28
8	Molecular characteristics of natural rubber by GPC	32
9	Determination of non-rubber content of natural rubber	32
10	Fourier Transform Infrared (FT-IR) analysis of amino groups and ester groups in NR	33
11	Testing of rubber vulcanizates	33
12	Preparation of latex proteins	36
13	Human serum samples	38
14	Specific anti-latex IgE antibody detection	39
15	Allergen detection by Skin Prick test (SPT)	40
Chapter III	Result	41
Chapter IV	Discussion	79
Chapter V	Conclusion	88
References		93
Appendices		101
Biography		124

LIST OF TABLE

Table		Page
1.1	Composition of acid coagulated NR	5
1.2	Latex sensitivity in atopic and general patients, health care workers and blood donor	14
1.3	Identified latex antigens	15
2.1	The compounding formulation chosen for assessing the cure behavior of natural rubber	34
3.1	Effect of dilution on latex saponification	45
3.2	Raw rubber properties of saponified latex (SAP-L)	46
3.3	Raw rubber properties of saponified rubber, produced from ammoniated crumb rubber	50
3.4	Raw rubber properties of saponified rubber, produced from skim crumb rubber	51
3.5	The weight average and number average of rubber before and after saponification	54
3.6	Gel content and acetone soluble content of rubber before and after saponification	56
3.7	The nitrogen content and water extractable protein prepared from saponified and non-saponified rubber	68
3.8	EAST positive result from the general population with diffent levels of risk factors	75
3.9	Evidence of risk factors and history atopic patients with latex allergy..	76
3.10	Allergen detection by Skin Prick test	77
3.11	Allergenic response by EAST test	79
4.1	Effect of saponification on molecular characteristic of SAP-SK	88
A1	Effect of KOH concentration	101
A2	Effect of isopropanol concentration	101
A3	Effect of temperature	102
A4	Effect of time	102
A21	Efficiency of alkali solution for saponification of ammoniated crumb rubber	103
A22	Efficiency of alkali solution for saponification of skim crumb rubber	104
A5	Summary of cure parameters of compound rubber from SAP-NR	105

Table		Page
A6	Physical properties of valcanizate rubber from SAP-NR	106
A7	The absorbance $O.D_{750}$ of protein sample	110
A8	Statistical calculation	115
A9	The cost of saponified latex (SAP-L)	122
A10	The cost of saponified solid rubber	123

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURE

Figure		Page
1.1	Natural rubber production of Thailand	1
1.2	Values of exported rubber products (million Bath) of Thailand in 1998	2
1.3	Presumed structure of solid rubber particle	3
1.4	The chemical structure of natural rubber	3
1.5	Presumed structure of natural rubber	4
1.6	High-speed centrifugation of natural rubber latex	5
1.7	Types of molecular weight distribution curves of natural rubber	7
1.8	Schematic representation of gel phase in latex and in rubber	8
1.9	Infrared spectra of natural rubber	9
1.10	Natural rubber production process in Thailand	11
1.11	Natural rubber products in Thailand	12
1.12	The presumed structure of linkage between protein and NR	21
2.1	Illustration of test piece punching from rubber sheet.	31
2.2	Rheometer curing curve	35
2.3	Shape of a dumbbell	36
3.1	Optimum condition for saponification of latex	43
3.2	Efficiency of alkali solution for saponification of solid crumb	48
3.3	Color comparison among non saponified rubber and SAP-AL	52
3.4	Color comparison among non saponified rubber and SAP-SK	53
3.5	FTIR spectra of the rubber control and saponified rubber	58
3.6	Rheological properties of saponifed ammoniated crumb rubber	60
3.7	Rheological properties of saponifiec skim crumb rubber	61
3.8	Relationship between the total nitrogen content and the cure rate	62
3.9	Vulcanizate properties of saponified produced from ammoniated crumb	63
3.10	Vulcanizate properties of saponified produced from skim crumb	64
3.11	Color of ammoniated crumb rubber vulcanizate	65
3.12	Color of skim crumb rubber vulcanizate	66
3.13	Effect of $CuSO_4$ on stand ovalbumin protein determination by Lowry method	67
3.14	Scanning electron micrograph of rubber	70

Figure Page

3.15 Proteins pattern bands of rubber before and after saponification 72
3.16 Positive EAST of the test sera 74
3.17 Positive Skin prick test of protein allergen 78
A1 The operation procedure for saponificaion of fresh field latex 81
A2 The operation procedure for saponificaion of ammoniated crumb rubber 83
A3 The operation procedure for saponificaion of skim crumb rubber 84
A4 Molecular weight markers calibration curve of GPC 108
A5 Standard curve of Ovalbumin measured by modified Lowery 111
A6 Molecular weight markers calibration curve of SDS-PAGE 114

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS

DPNR	Deproteinized Natural Rubber
DRC	Dry Rubber Content
DTH	Delayed type hypersensitivity
HA	High Ammoniated latex
LLNR	Low Nitrogen Natural Rubber
NR	Natural rubber
NRL	Natural rubber latex
NRP	Natural rubber products
P_o	Initial plasticity
p.h.r.	Part per hundred rubber
PRI	Plasticity Retention Index
SAP-NR	Saponified Natural Rubber
SAP-L	Saponified Latex
SAP-AL	Saponified Ammoniated crumb rubber
SAP-SK	Saponified Skim crumb rubber
TSC	Total Solid Content
μm	Micrometer
°C	Degree Celsius
g	Gram
g%	Gram percent
lb.	Pound

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย