

การพัฒนาทางธรรมชาติโปรตีนแอลเลอเจนต่ำโดยกระบวนการสะพอนิฟิเคชัน



นางสาวศิริวัลย์ บุญสุข

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-334-083-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 19014140 16 พ.ศ. 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

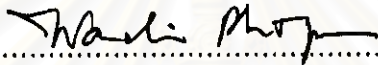
Academic Year 1999

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

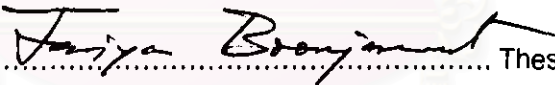
---

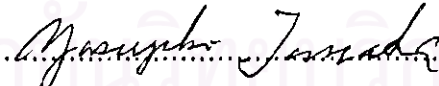
Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial  
Fulfillment of the Requirements for the Master 's Degree


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

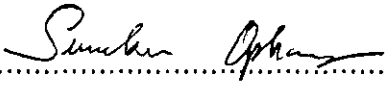
THESIS COMMITTEE

  
..... 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 Ophaswong, 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 ดังนั้นการพัฒนาของธรรมชาติโปรตีนแอลเลอเจนต่ำจึงเป็นวัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้ วิธีการที่ใช้คือการสะพอนิฟิเคชันในสภาวะที่เหมาะสมและศึกษาคุณสมบัติต่างๆของยางที่ผ่านการสะพอนิไฟด์หรือ SAP-NR ที่ผลิตได้ในระดับยางดิบและคุณสมบัติของยางวัลคาไนซ์โดยเปรียบเทียบกับยาง STR5L และเปรียบเทียบกับรูปแบบโปรตีนแอลเลอเจนในยางก่อนและหลังการสะพอนิไฟด์ นอกจากนี้ยังทดสอบการแพ้ต่อโปรตีนในยาง SAP-NR และยางที่ไม่ได้สะพอนิไฟด์ ผลการวิจัยพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสะพอนิไฟด์น้ำยางสด 30 %DRC คือใช้ 5% โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ 70 องศาเซลเซียสนาน 3 ชั่วโมงจากนั้นเจือจางน้ำยางเป็น 15 % DRC และจับก้อนด้วยกรด ได้ยางสะพอนิไฟด์ที่มีปริมาณไนโตรเจนลดลง 23% แต่ยังมีปริมาณเถ้าสูงเกินมาตรฐานยางแท่ง STR5L ดังนั้นจึงพัฒนาวิธีการสะพอนิไฟด์ยางก้อนซึ่งได้จากการจับกรดก่อนแล้วจึงแช่ใน 5% โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ 70 องศาเซลเซียสนาน 3 ชั่วโมง วิธีการพัฒนาใหม่นี้สามารถประหยัดโซเดียมไฮดรอกไซด์และน้ำทิ้งในกระบวนการโดยการนำสารละลายต่างไปใช้ซ้ำได้ 7 รอบในยางก้อนที่มีแอมโมเนีย (AL) และ 5 ครั้งในยางก้อนที่เตรียมจากน้ำยางสด (SK) ผลการวิจัยพบว่ายางสะพอนิไฟด์สกิน SAP-SK มีคุณภาพดีกว่ายางสะพอนิไฟด์แอมโมเนีย SAP-AL เนื่องจากมีปริมาณไนโตรเจนต่ำกว่าและมีสมบัติยางดิบใกล้เคียงกับ STR5L แต่มีปริมาณเถ้าและปริมาณสิ่งระเหยสูงกว่ามาตรฐาน ในขณะที่ค่าความอ่อนตัวเริ่มต้นต่ำกว่ามาตรฐาน 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 ของบุคลากรที่ทำงานในโรงพยาบาลและมีประวัติเป็นโรคภูมิแพ้ แสดงผลบวกต่อโปรตีนจากยางสกินปกติ 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 allergic 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 saponified NR were studied at the level of raw rubber and vulcanized rubber by comparing with STR5L. Nitrogen content characteristics of protein allergens and allergic 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

สาขาวิชา ชีวเคมี

ปีการศึกษา 2542

ลายมือชื่อนิสิต..... *Siriwan B.*  
ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา..... *Jariya Boonjawat*  
ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... *Yasuyuki Tanaka*

## 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 Saponification 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 different 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 vulcanizate 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 saponified ammoniated crumb rubber .....	60
3.7 Rheological properties of saponificc 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 $\text{CuSO}_4$ on stand ovalbumin protein determination .....	67
by Lowry method	
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 <sub>0</sub>	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