การตรึงรูปปาเปนบนไคทินเพื่อลดปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ

นางสาว อลิสา วังใน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2358 2538

ISBN 974-631-638-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I16718808X

IMMOBILIZATION OF PAPAIN ON CHITIN FOR NATURAL RUBBER LATEX DEPROTEINIZATION

Miss Alisa Vangnai

A Thesis Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements

for The Degree of Master of Science

Program of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

1995

ISBN 974-631-638-9

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title	Immobilization of papain on chitin for natural rubber latex deproteinization.
By	Miss Alisa Vangnai
Program	Biotechnology
Thesis advisors	Assistant Professor Vinich Khamviwath, M.Sc.
	Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.

Accepted by the Graduate school, Chulalongkorn University in Partial Fulfilment of the requirement for the Master's degree.

..... Dean of Graduate School
(Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.)

Thesis Committee

..... Chairman
(Assistant Professor Sirirat Rengpipat, Ph.D.)

..... Thesis advisor
(Assistant Professor Vinich Khamviwath, M.Sc.)

..... Thesis Coadvisor
(Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.)

..... Member
(Assistant Professor Chyagrit Siri-Upathum, M.Eng.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

อลิสา วังใน : การตรึงรูปปาเปนบนไคทินเพื่อลดปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ (IMMOBILIZATION OF PAPAIN ON CHITIN FOR NATURAL RUBBER LATEX DEPROTEINIZATION). อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. วินิจ ขำวิวรรธน์, รศ.ดร. จริยา บุญญวัฒน์, 142 หน้า. ISBN 974-631-638-9.

ยางโปรตีนต่ำที่ถูกขจัดโปรตีนออกโดยเอนไซม์ปาเปนมีสมบัติทางจลนพลศาสตร์ดีขึ้น แต่ปาเปนมีราคาแพงเมื่อใช้งานเพียงครั้งเดียว ดังนั้นเพื่อให้คุ้มทุน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์คือ ตรึงรูปปาเปนบนไคทินด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพและวิธีพันธะโคเวเลนต์ เลือกวิธีที่ดีที่สุดในการผลิตปาเปนตรึงรูปสำหรับลดโปรตีนในน้ำยาง ผลการทดลองแสดงหลักฐานว่าการตรึงรูปปาเปนบนไคทินด้วยพันธะโคเวเลนต์ดีกว่าวิธีดูดซับทางกายภาพ เนื่องจากแอคติวิตีสูงกว่า 7 เท่า (450-470 ยูนิตต่อกรัมไคทิน) แอคติวิตีจำเพาะสูงกว่า 4 เท่า (1200 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) และผลผลิตมากกว่า 10 เท่า นอกจากนั้นปาเปนตรึงรูปด้วยพันธะโคเวเลนต์ (CIP) มีความเสถียรต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดด่างในช่วงกว้างกว่า (50-80 องศาเซลเซียส,ความเป็นกรดด่าง 5-8) และสามารถจับกับโปรตีนในน้ำยางพาราได้ดีกว่าและมีประสิทธิภาพในการทำงานดีกว่า ดังจะเห็นจากค่าคงที่ไมเคิลลิสที่ต่ำกว่าและค่าอัตราเร็วปฏิกิริยาสูงสุดเหนือกว่าปาเปนที่ดูดซับบนไคทิน (PIP) ดังนั้นจึงเลือกปาเปนตรึงรูปด้วยวิธีพันธะโคเวเลนต์ในการลดปริมาณโปรตีนในน้ำยางพาราต่อไป ผลการทดลองแสดงว่าปริมาณไนโตรเจนของยางโปรตีนต่ำความหนืดคงที่ (70) ลดลงเหลือ 0.077±0.003 กรัมเปอร์เซ็นต์ การลดโปรตีนในยางช่วยปรับปรุงสมบัติทางกายภาพคือการดูดซับน้ำน้อยลง ปริมาณสิ่งระเหยและความแข็งเมื่อเก็บลดลงและดัชนีสีต่ำลง (2.5) และมีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักโมเลกุลของยางเท่ากับ 7.6×10^5 อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณผง (0.018 g%) และเถ้า (0.186 g%) ค่อนข้างสูง จากการศึกษาเปรียบเทียบการสุกของยางโปรตีนต่ำที่ใช้ปาเปนตรึงรูป ปาเปนอิสระ และยางโปรตีนสูงพบว่าทำให้อัตราการสุกของยางเร็วขึ้นและสมบัติการยืดหยุ่นของยางวัลคาไนซ์ดีขึ้นคือ แรงต้านการดึงยางจนขาดเปอร์เซ็นต์การยืดตัวสูงขึ้น แต่ความแข็งลดลง เมื่อเทียบกับยางที่ไม่สกัดโปรตีน เมื่อศึกษาความต้านทานความร้อนของยางที่ 70 องศาเซลเซียส 7 วัน พบว่ายางโปรตีนต่ำที่ผลิตจากปาเปนตรึงรูปมีสมบัติยางวัลคาไนซ์ที่ดีคือ แรงต้านการดึงยางจนขาดและโมดูลัสที่ 300 เปอร์เซ็นต์มีค่าเพิ่มขึ้น 3.14 และ 133.43 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในขณะที่เปอร์เซ็นต์การยืดตัวของยางมีค่าลดลง (8.13 เปอร์เซ็นต์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา — ลายมือชื่อนิสิต อลิสา วังใน

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

C526399 : MAJOR PROGRAM BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: : IMMOBILIZATION / PAPAIN / CHITIN / NATURAL RUBBER / LATEX DEPROTEINIZATION

ALISA VANGNAI : IMMOBILIZATION OF PAPAIN ON CHITIN FOR NATURAL RUBBER LATEX DEPROTEINIZATION. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. VINICH KHAMVIWATH, M.Sc. AND ASSOC. PROF. JARIYA BOONJAWAT, Ph.D. 142 pp. ISBN 974-631-638-9

Deproteinized natural rubber (DPNR) produced by papain treatment has improved the dynamic properties but the cost of using free papain is too high with only one use. Therefore, the purpose of this study is to immobilize papain on chitin by physical adsorption and covalent-binding methods and to select the best method for production of immobilized papain for latex deproteinization. The results show strong evidences that immobilization of papain on chitin by covalent-binding method is more suitable because covalently-immobilized papain (CIP) shows 7-time higher activity (450-470 CDU/g chitin), 4-time higher specific activity (1,200 CDU/mg protein) and 10-time higher yield (23% yield) than physically-adsorbed immobilized papain (PIP). Moreover, CIP is more stable in wider range of temperature and pH (50-80°C and pH 5-9). From kinetics studies, CIP also has higher affinity for casein, ovalbumin and proteins in rubber latex and higher efficiency than PIP as evident by lower K_m and higher V_{max}. Hence, CIP was chosen for natural rubber latex deproteinization. The results indicate that at the optimal conditions , the constant viscosity-DPNR (CV-DPNR Mooney viscosity 70) obtained showed significant reduction in nitrogen content to 0.077±0.003 g%. CIP treatment was found to improve the physical properties of CV-DPNR due to less water adsorption (0.16 g% volatile matter), more resistance to storage hardening and low color index (2.5) with weight average molecular weight 7.6×10^5. However, dirt (0.018 g%) and ash content (0.186 g%) are rather high due to steam coagulation. Comparative study on the cure characteristics between CV-DPNR produced by CIP, free papain and control, high protein rubber showed that deproteinization resulted in faster cure rate. The CV-DPNR produced by CIP also shows better stress-strain properties by increasing tensile strength and % elongation at break but decreasing hardness comparing to the control. Test for ageing resistance at 70°C for 7 days showed that tensile strength and 300 % modulus of the CV-DPNR increased by 3.14% and 133.43%, respectively with a small decrease (8.13%) in elongation at break, which evident for better quality of CIP produced CV-DPNR.

ภาควิชา — ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deep gratitude and appreciation to Asst. Prof. Vinich Khamviwath, my advisor and Assoc. Prof. Dr.Jariya Boonjawat, my co-advisor for their encouragement, suggestions, discussion, and helpful guidance throughout this research.

My appreciation is also expressed to Asst. Prof. Dr. Sirirat Rengpipat and Asst. Prof. Chyagrit Siri-Upathum for serving as thesis committee.

I would like to thank University Development Committee (UDC) for financial supports and special thanks to Miss Vipa Savetanit and all staff members of the Rubber Research Institute of Bangkok for providing equipment for raw rubber testing, all staff members of Banpan Research Laboratory Co., Ltd. for their helps and providing equipment in vulcanizate properties testing, Rayong Bangkok Rubber Co., Ltd. for the supply of rubber and Asst. Prof. Dr. Nit Kirtibutr for the supply of papaya latex.

I wish to extend my deepest gratitude to Assoc. Prof. Dr. Somsak Vangnai, my father and my family, Mr. Varong Pavarajarn, Miss Rosawan Srivoravit and Mr. Klaewkla Kaewthai who always give me suggestions,encouragement,warmest love, understanding and friendship.

Finally, I wish to express my sincere thanks to all teachers and friends in the Department of Biochemistry and Biotechnology for their helps, encouragement and friendship.

CONTENTS

PAGE

THAI ABSTRACT..... i

ENGLISH ABSTRACT..... ii

ACKNOWLEDGEMENT..... iii

CONTENTS..... iv

LIST OF TABLES..... vii

LIST OF FIGURES.....viii

ABBREVIATIONS..... xi

CHAPTER I INTRODUCTION..... 1

1. Natural rubber (Para rubber)..... 1

2. Solid natural rubber..... 6

3. Protein and its effect..... 8

4. The deproteinization of natural rubber..... 10

5. Papain immobilization..... 13

6. Objectives of the research..... 23

CHAPTER II MATERIALS AND METHODS..... 24

1. Biological materials..... 24

2. Chemicals..... 24

3. Apparatus..... 25

4. Assay of papain activity..... 26

5. Protein determination by Biuret method..... 28

6. Pretreatment of chitin..... 29

7. Immobilization of papain..... 29

8. Properties of immobilized papain on chitin..... 31

9. Effect of temperature on storage stability..... 33

10. Continuous operation..... 33

PAGE

11. Preparation of latex deproteinization..... 34
12. Determination of optimal conditions for latex - deproteinization..... 35
13. DPNR production..... 37
14. Batch reusability of immobilized papain for - producing DPNR..... 37
15. Raw rubber testing..... 38
16. Vulcanized rubber testing..... 38
CHAPTER III RESULTS..... 40
1. Determination of activity and specific activity of crude papain..... 40
2. Papain immobilization..... 40
3. Properties of immobilized papain on chitin by both methods comparison to free papain..... 47
4. Effect of temperature on storage stability..... 53
5. Continuous operation stability of covalently-immobilized papain..... 53
6. Optimal conditions for deproteinization of field-latex by covalently-immobilized papain..... 57
7. Effect of viscosity-stabilizer, reducing agent - and non-ionic detergent..... 58
8. Adding the activators and metal-chelating..... 62
9. Effect of latex dilution on latex deproteinization 64
10. Overall optimal conditions for rubber latex-deproteinization..... 64

PAGE

11. Batch reusability of immobilized papain on chitin for latex deproteinization..... 66
12. Effect of deproteinization on the molecular weight distribution..... 70
13. Physical properties of raw rubber..... 72
14. Cure characteristics..... 78
15. Properties of unaged and aged vulcanized rubber... 78
16. Estimated cost of production of DPNR produced by covalently-immobilized papain..... 82
CHAPTER IV DISCUSSION..... 87
1. The optimal conditions for papain immobilization.. 87
2. Properties of immobilized papain on chitin..... 91
3. The conditions of latex deproteinization by CIP... 95
4. Effect of deproteinization on molecular weight distribution..... 97
5. The properties of DPNR..... 97
6. Estimated cost of production of DPNR produced by covalently-immobilized papain..... 102
7. Suggestion for further research..... 103
CHAPTER V CONCLUSION..... 104
REFERENCES..... 107
APPENDIX 1. Standard curves for papain activity and protein determination..... 115
APPENDIX 2. The calculation and raw data..... 117
APPENDIX 3. Testing of the properties of DPNR..... 127
BIOGRAPHY..... 142

LIST OF TABLES

TABLE PAGE

1. The composition of latex..... 2
2. Specification of DPNR..... 11
3. Properties of papain..... 15
4. Preparation and characteristics of immobilized enzymes..... 18
5. Comparison of papain immobilization between - physical adsorption and covalent-binding method..... 46
6. K_m and V_{max} from Lineweaver-Burk reciprocal plot of immobilized papain by physical adsorption and free papain.... 51
7. K_m and V_{max} from Lineweaver-Burk reciprocal plot of immobilized papain by covalent-binding and free papain..... 51
8. Weight average molecular weight ($\bar{M}w$), number average molecular weight ($\bar{M}n$) and molecular weight distribution (MWD) or polydispersity of DPNR produced from immobilized papain, free papain and control..... 71
9. Production cost of DPNR..... 85
10. The compounding formulation chosen for assessing the cure behavior of natural rubber..... 136

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

FIGURE PAGE

1. The chemical structure of Hevea rubber..... 3
2. Types of molecular weight distribution curves of natural rubber..... 5
3. A mechanism of action for papain catalyzed hydrolysis..... 16
4. Chemical structure of chitin..... 22
5. Physical adsorption method for immobilization of papain on chitin..... 42
6. The optimal conditions for papain immobilized on chitin by physical adsorption method..... 43
7. Covalent-binding method for immobilization of papain on chitin..... 44
8. The optimal conditions for papain immobilized on chitin by covalent-binding method..... 45
9. The effect of pH and temperature on the activity of immobilized papain and free papain..... 48
10. The effect of pH and temperature on the stability of immobilized papain and free papain..... 50
11. Lineweaver-Burk plot of immobilized papain and free papain when casein,ovalbumin and rubber latex were used as substrate..... 52
12. Storage stability of immobilized papain and free papain at room temperature..... 54
13. Storage stability of immobilized papain and free papain at $4^{o}C$ for 3 months..... 55

FIGURE PAGE

14. Continuous operation stability of CIP..... 56
15. Optimization of fresh latex deproteinization by immobilized papain on chitin..... 59
16. The effect of hydroxylamine hydrochloride, sodium metabisulfite and Triton X-100 on latex deproteinization..... 61
17. The effect of thiourea, cysteine and EDTA on latex deproteinization..... 63
18. The effect of latex dilution on latex deproteinization..... 65
19. Profile of rubber latex deproteinization by immobilized papain on chitin..... 67
20. The optimal conditions for latex deproteinization by immobilized papain on chitin..... 68
21. Batch reusability of immobilized papain on chitin for rubber latex deproteinization..... 69
22. The comparative study of MWD of the DPNR produced from CIP and FP with the control..... 71
23. Comparison of raw rubber properties of DPNR and the control.. 74
24. Comparison of raw rubber color of both DPNR and the control.. 75
25. Comparison of the physical properties of raw rubber of DPNR and the control..... 76
26. Mooney viscosity before and after storage..... 77
27. Rheograph of compounded rubber..... 79
28. Comparison of cure characteristics of both DPNR and the control..... 80

FIGURE PAGE

29. Comparison of compound rubber color of both DPNR and the control..... 81
30. Comparison of vulcanizate properties of both DPNR and the control..... 83
31. Comparison of vulcanizate rubber color of both DPNR and the control..... 84
32. Comparison of the activity of immobilized papain when phosphate-cysteine-EDTA buffer and Tris-cysteine-EDTA buffer were used in the immobilization process..... 85
33. Comparison of the activity free papain when cysteine and sodium bisulfite were used as papain activator in the immobilization process..... 85
34. A stirrer which the immobilized papain is enclosed in mesh containers..... 103
35. Tyrosine standard curve..... 115
36. Biuret standard curve..... 116
37. Illustration of testpiece punching from rubber sheet..... 131
38. The molecular weight calibration curve of polystyrene standard..... 135
39. Rheomater curing curve..... 138
40. Shape of dumb-bell testpiece..... 141

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS

CDU	Casein digestion unit (1 ug tyrosine released / g immobilized papain / min)
CIP	Covalently-immobilized papain on chitin
DPNR	Deproteinized natural rubber
DRC	Dry rubber content
FP	Free papain
g	gram
GPC	Gel permeation chromatography
hr	hour
K_m	Michaelis-Menten constant
kW	kilowatt
min	minute
mg	milligram
M	Molar
$\bar{M}n$	Number average molecular weight
Mw	Molecular weight
$\bar{M}w$	Weight average molecular weight
MWD	Molecular weight distribution
P_O	Initial plasticity value of the unaged test
P_H	Plasticity value after storage hardening test
p.h.r.	Part per hundred of dry rubber
PIP	Physical-adsorbed immobilized papain on chitin
PRI	Plasticity Retention Index
SBS	Sodium bisulfite

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THF	Tetrahydrofuran
V_{max}	Maximum velocity
wt	Weight
W	Watt
^{o}C	Degree Celcius
µg	microgram
µm	micrometre

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย