การลดปริมาณโปรตีนของยางธรรมชาติโดยโปรตีเอสร่วมกับพลังงานไมโครเวฟ

นางสาวพรรณสุนันท์ เจียรรุ่งแสง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2543

ISBN 974-347-239-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

29 ต.ค. 2546

I19923156

DEPROTEINIZATION OF NATURAL RUBBER BY THE COUPLING ACTION OF PROTEASE AND MICROWAVE ENERGY

Miss Punsunan Chainrungsang

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Biotechnology

Program of Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2000

ISBN 974-347-239-8

Thesis Title	Deproteinization of natural rubber by the coupling action of protease and microwave energy
By	Miss Punsunan Chainrungsang
Program in	Biotechnology
Thesis Advisor	Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Assistant Professor Vinich Khamviwath, M.Sc.

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
(Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D)

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

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

.....Member
(Associate Professor Porntip Huiprasert, M.D)

.....Member
(Prateep Bumroongvityapan)

นางสาวพรรณสุนันท์ เจียรรุ่งแสง : การลดปริมาณโปรตีนของยางธรรมชาติโดยโปรตีเอสร่วมกับพลังงานไมโครเวฟ. (DEPROTEINIZATION OF NATURAL RUBBER BY THE COUPLING ACTION OF PROTEASE AND MICROWAVE ENERGY) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร.จริยา บุญญวัฒน์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.วินิจ ขำวิวรรธน์, 165 หน้า. ISBN 974-347-239-8.

โปรตีนแอลเลอเจนซึ่งอยู่ในน้ำยางธรรมชาติมีผลทำให้คนที่ใช้ผลิตภัณฑ์ยางธรรมชาติเกิดอาการแพ้ประเภท 1 ซึ่งมีอันตรายถึงชีวิตได้ในคนประเภทภูมิไวเกิน ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อพัฒนายางธรรมชาติโปรตีนแอลเลอเจนต่ำ โดยการใช้เอนไซม์ร่วมกับพลังงานไมโครเวฟในการลดปริมาณโปรตีนและติดตามผลโดยวัดปริมาณไนโตรเจนที่ลดลง โดยมีสมมุติฐานว่าพลังงานไมโครเวฟซึ่งเป็นสนามแม่เหล็กไฟฟ้าความถี่สูง (2450 MHz) ทำให้โมเลกุลที่มีขั้วในน้ำยางหมุนตัวตามการสลับขั้วสนามแม่เหล็กไฟฟ้าเกิดความร้อนอย่างรวดเร็วและทั่วถึง ทำให้อนุภาคยางและโปรตีนที่เกาะอยู่เกิดโครงสร้างคลี่ขยายออก เมื่อเติมเอนไซม์โปรตีเอสทำให้เอนไซม์ทำงานได้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากขึ้น ดังนั้นจึงคาดว่าจะได้ยางโปรตีนต่ำในเวลาสั้น ผลการวิจัยพบว่าเมื่อใช้พลังงานไมโครเวฟและปาเปนสามารถลดโปรตีนในน้ำยางวัดจากปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดลงถึง 80% ของปริมาณไนโตรเจนตั้งต้นภายใน 10 นาที แต่เมื่อขยายส่วนปริมาตรน้ำยางเริ่มต้นเป็น 5 ลิตรโดยกระบวนการเดียวกันได้ยางโปรตีนต่ำ (DPNR) ปริมาณไนโตรเจน 0.18 กรัม% ลดลง 60 % จากค่าตั้งต้นและปริมาณสิ่งระเหยลดลงเหลือ 0.18% เท่ากันแต่ปริมาณเถ้า (0.31%), สิ่งสกปรก (0.03%) และดัชนีสี (3.6) เพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับยางควบคุมแสดงว่าโปรตีนและลิปิดในยางดิบลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ค่าความอ่อนตัวเริ่มต้น (Po=27) และดัชนีความอ่อนตัว (PRI=63%) ต่ำกว่ามาตรฐานของยางแท่ง STR5L (Po=35, PRI=65) ในขณะที่ค่าความหนืดมูนี่ (58) ไม่แตกต่างจากเดิมแสดงว่าต้องเพิ่มแอนติออกซิแดนส์ในการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ยางที่ต้องการความทนทาน เมื่อสกัดโปรตีนที่ละลายน้ำได้จาก DPNR พบว่าปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ (143 ไมโครกรัมต่อกรัม) ต่ำกว่ายางควบคุม (414 ไมโครกรัมต่อกรัม) และยาง STR5L (640 ไมโครกรัมต่อกรัม) อย่างมีนัยสำคัญ ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ใน DPNR ต่ำกว่าในน้ำยางข้น 60% (1120 ไมโครกรัมต่อกรัม) และตัวอย่างถุงมือยาง เมื่อนำโปรตีนที่ละลายน้ำได้มาแยกขนาดโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE ไม่พบแถบโปรตีนในช่วงขนาดโมเลกุล 14-30 กิโลดาลตัน จากการใช้วิธีเอนไซม์อัลเลอโกซอบเบนท์ (EAST) ไม่พบโปรตีนแอนติเจนในยาง DPNR เมื่อให้ทำปฏิกริยากับ IgE จากตัวอย่างซีรั่ม 41 ตัวอย่างที่จำเพาะกับโปรตีนในน้ำยางข้น 60% เมื่อใช้วิธีสกิดผิวหนัง (Skin prick test, SPT) เปรียบเทียบผื่นบนผิวหนังในผู้แพ้ยาง 1 คน ไม่พบผื่นแพ้โปรตีนแอลเลอเจนจากโปรตีนที่ละลายน้ำได้ของยาง DPNR ในขณะที่ได้พบผื่นแพ้โปรตีนแอลเลอเจนจากโปรตีนที่ละลายน้ำได้ของยางควบคุมและถุงมือยาง จากการศึกษาความชุกของโอกาสการแพ้ยางในประชากรคนไทยโดยวิธี EAST ในกลุ่มตัวอย่าง 3 กลุ่ม กลุ่มละ 100 คน แบ่งเป็นกลุ่ม 1: คนทั่วไปไม่มีประวัติเป็นโรคภูมิแพ้ กลุ่ม 2 คนทั่วไปที่มีประวัติเป็นโรคภูมิแพ้และกลุ่ม 3: บุคลากรที่ทำงานในโรงพยาบาลพบว่ามีตัวอย่างซีรั่ม 13.7% ที่มี IgE จำเพาะต่อโปรตีนในน้ำยางโดยแสดงผลบวกต่อโปรตีนแอลเลอเจนมาตรฐานจากน้ำยางข้น 60% (41/300 ตัวอย่าง) แบ่งเป็นกลุ่ม 1: 3% (3/100 ตัวอย่าง) กลุ่ม 2: 8% (8/100 ตัวอย่าง) และกลุ่ม 3: 30% (30/100 ตัวอย่าง) ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานในประเทศอื่นๆสำหรับคนปกติแต่สูงกว่ารายงานอื่นๆในกลุ่มบุคคลากรที่ทำงานในโรงพยาบาล (กลุ่ม 3) ผลสรุปจากงานวิจัยนี้คือ พลังงานไมโครเวฟช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของปาเปนในการลดปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติโดยสามารถลดปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ในช่วงขนาดโมเลกุล 14-30 กิโลดาลตันซึ่งเป็นโปรตีนแอลเลอเจนทำให้ได้ยางโปรตีนแอลเลอเจนต่ำที่ปลอดภัยสำหรับกลุ่มผู้ป่วยภูมิแพ้และกลุ่มบุคคลากรที่ทำงานในโรงพยาบาลที่ใช้ผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติ

หลักสูตร เทคโนโลยีชีวภาพ
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2543

ลายมือชื่อนิสิต .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

4072230023: MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: NATURAL RUBBER / LATEX ALLERGY / MICROWAVE ENERGY / PROTEASES / DEPROTEINIZATION

MISS PUNSUNAN CHAINRUNGSANG: DEPROTEINIZATION OF NATURAL RUBBER BY THE COUPLING ACTION OF PROTEASE AND MICROWAVE ENERGY. THESIS ADVISOR: ASSOC.PROF.JARIYA BOONJAWAT, Ph D., THESIS CO-ADVISOR: ASSIST.PROF.VINICH KHAMVIWATH, M.Sc., 165.

ISBN 974-347-239-8

Protein allergens in NRL and NRP may cause life threatening (latex allergy) Type I in hypersensitive users. Thus, the purpose of this research is to develop a new grade of natural rubber with low protein allergen by using protease and microwave energy. The criterion of deproteinization is determined by monitoring from reduction of per cent nitrogen content from initial % nitrogen content in fresh latex. Based on hypothesis that microwave energy is a high frequency electromagnetic field (2450 MHz) that induces the polar molecules in latex to rotate due to alternate change of electromagnetic field resulting rapid and homogenous heating. The rubber particles and proteins associated with rubber particle were deformed and loosen. Addition of protease thereafter should lead to more rapid enzyme activity and higher efficiency. It is expected that deproteinization of latex will be accomplished in shorter time. The results show that use of microwave energy and papain can reduce 80% protein in latex within 10 minutes as measured by total nitrogen content, compared with the initial nitrogen content. Scaling up of the reaction volume to 5 liter of latex, using the same process, DPNR obtained showed 0.18 g% of the nitrogen content, or 60% nitrogen reduction from the initial value, and the volatile matters were reduced equally to 0.18%. The other non-rubber components namely ash (0.31%), dirt (0.03%) and color index (3.6) were slightly higher than control (CDPNR). The results show that protein and lipid in DPNR were significantly decreased. The processibility properties such as initial plasticity (Po=27), plasticity retention index (PRI=63%) were lower than standard specifications of STR5L (Po=35, PRI=65), but the Mooney viscosity (58) does not change. The results show that in the compounding of DPNR to make rubber products, more antioxidant should be added to increase the shelf life. The water extractable protein (WEP=143 μg/g) is significantly lower than control deproteinized natural rubber (CDPNR=413 μg/g) and STR5L (640 μg/g). The WEP from DPNR is significantly lower than concentrated latex 60% and some glove samples. Analysis of molecular size of WEP from DPNR by SDS-PAGE showed no protein band in the range of 14-30 kD. Results from Enzyme allergosorbent test (EAST) indicated that there was no protein antigen in DPNR that reacted with latex specific-IgE in 41 serum samples previously checked with in the concentrated latex 60%. Using skin prick test (SPT) to compare the wheal size in one latex sensitive person confirmed that no wheal was observed with WEP from DPNR, while positive wheals were observed with protein allergen from CDPNR and gloves. EAST was used to study the prevalence of rubber allergic hypersensitivity in the 3-group of human serum samples (100 persons/group): Group 1, general healthy persons; Group 2, the general atopic patients; and Group 3, the healthcare workers. Positive EAST to WEP from concentrated latex 60% used as standard protein allergen, was 13.7% (41/300 samples) which is divided to 3%of Group 1 (3/100 samples), 8% of Group 2 (8/100 samples) and 30% of Group 3 (3/100 samples). The result is similar to the reports in other countries for general healthy person but higher than other reports in the healthcare workers (Group 3). In conclusion, microwave energy improves the efficiency of papain in removing protein from natural rubber, by decreasing the WEP, in the molecular weight range of 14-30 kD which are protein allergen, yielding DPNR which is safe for high-risk allergic people and healthcare workers who are involved with NRP.

Program Biotechnology — Student's signature .....

Field of study Biotechnology — Advisor's signature .....

Academic Year **2000** — Co-advisor's signature .....

ACKNOWLEDGEMENT

This research was successful, the researcher wish to express my keen gratitude and appreciation to Assoc. Prof. Dr. Jariya Boonjawat, my impressive advisor to her encouragement, suggestion, discussion, financial supports and helpful guidance throughout this research. I would like to acknowledge Asst. Prof. Vinich Khamviwath, my thesis co-advisor, for his willpower, valuable guidance and suggestions throughout this study.

My appreciation is also expressed to Assoc. Prof. Dr. Piamsook Pongsawasdi, Assoc. Prof. Dr. Porntip Huiprasert and Mr.Prateep Bumroongvityapan for serving as thesis committee.

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 member of Rayong Bangkok Rubber Co. Ltd. For their helps and supplying the rubber materials and providing equipment for raw rubber properties testing.

I wish to acknowledge Ramathibodi Hospital, Veterans Hospital and School of Dentistry Mahidol University for supplying the serum. Special thanks to all people for their serum, Dermatology Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn Hospital and the volunteer for skin prick test.

I would like to thank the National Research Council of Thailand for their financial support. 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 equipments.

Finally, I would like to extend my deepest gratitude to my family, all teachers, friends and Dr.Sanga Pinijpichitkul who always give me warmest love, knowledge, suggestions, encouragement, understanding and friendship.

CONTENTS

Page

Thai abstract IV

English abstract V

Acknowledgement VI

Contents VII

List of Table VIII

List of Figure X

Abbreviation XII

Chapter I Introduction 1

Chapter II Materials and methods 55

1. Biological materials 55
2. Chemicals 55
3. Apparatus 56
4. Method for assay enzyme activity 57
5. Preparation of latex for deproteinization 58
6. Deproteinization of natural rubber by protease and microwave energy 59
7. Testing of properties of DPNR 61
8. Characterization and quantitation of protein in latex and raw rubber. 66

Chapter III Results 71

Chapter IV D scussion 103

Chapter V Summary 112

References 113

Appendices 123

Biography 165

List of Table

Table		Page
1.1	Top ten exports of Thailand	3
1.2	Taxonomy of rubber tree	4
1.3	Production of natural rubber	4
1.4	Exports of natural rubber	5
1.5	Exports of natural rubber to foreign countries	6
1.6	Composition of acid coagulated natural rubber	8
1.7	Latex sensitivity in atopic and general patients, healthcare workers and .... blood donors	25
1.8	Identified latex allergens	27
1.9	Properties of Papain	37
1.10	Properties of fields	43
1.11	Dielectric loss factor at 300 MHz	47
3.1	Raw rubber properties of STR5L, CDPNR and DPNR	86
3.2	Protein concentration of papain	90
3.3	The water extractable protein prepared from STR5L, ... concentrated latex 60%, CDPNR, DPNR and glove samples	91
3.4	EAST positive result from 3 groups of blood donors	96
3.5	Prevalence of risk factor and history of Atopic patients and ..... Atopic healthcare workers with latex	97
3.6	Allergenic response by EAST test	98
3.7	Allergen detection by Skin Prick Test	100
4.1	The cost of deproteinized natural rubber	105
4.2	Potential latex protein allergens	110
A2.1	Content of Total Nitrogen, % Nitrogen Reduction, Protein Concentration ... and %Yield in Solid Rubber (50^{o}C, 5min, Dilution 1 fold, Vary papain concentration)	128

Table		Page
A2.2	Content of Total Nitrogen, % Nitrogen Reduction, Protein Concentration and %Yield in Solid Rubber (50°C, papain 0.3 phr, Dilution 1 fold, Vary time)	129
A2.3	Content of Total Nitrogen, % Nitrogen Reduction, Protein Concentration and %Yield in Solid Rubber (50°C, 5min, pain 0.3 phr, Vary dilution)	129
A2.4	Content of Total Nitrogen, % Nitrogen Reduction, Protein Concentration and %Yield in Solid Rubber (50°C, 5min, Dilution 1 fold, Vary alcalase concentration)	130
A2.5	Content of Total Nitrogen, % Nitrogen Reduction, Protein Concentration and %Yield in Solid Rubber (50°C, alcalase 0.06 phr, Dilution 1 fold, Vary time)	130
A2.6	Content of Total Nitrogen, % Nitrogen Reduction, Protein Concentration and %Yield in Solid Rubber (50°C, 5min, alcalase 0.06 phr, Vary dilution)	131
A3	Statistic calculation of raw rubber properties	132
A4.1	Protein determination by modified lowry's method	137
A4.2	Water extractable protein of STR5L,Concentrated latex 60%, CDPNR, DPNR and gloves	139
A6	Example one of the EAST from ELISA microplate reader	142
A7	Statistic calculation of EAST test with standard latex allergen	146
A8	Statistic calculation of positive EAST test with standard latex allergen, CDPNR and DPNR	147
A9	Statistic of prevalence of latex allergy	148

LIST OF FIGURE

Figure		Page
1.1	High-speed centrifugation of natural rubber latex	9
1.2	Presumed structure of solid rubber particle	10
1.3	The chemical structure of natural rubber	11
1.4	Presumed structure of natural rubber	12
1.5	Natural rubber production process in Thailand	17
1.6	Natural rubber products in Thailand	18
1.7	Role of the immune system in allergy	22
1.8	The sequence of the amino acid of papain	36
1.9	A mechanism of action for papain catalyzed hydrolysis	38
1.10	The presumed structure of linkage between protein and NR	40
1.11	The electromagnetic spectrum	44
1.12	Microwave properties	44
1.13	Dipole rotation of polar molecules in a microwave field	47
1.14	Rubber particle	51
1.15	The presumed effect of microwave energy and papain on the latex	52
3.1	Optimum papain concentration for fresh latex deproteinization	73
3.2	Optimum time for fresh latex deproteinization	74
3.3	Optimum dilution for fresh latex deproteinization	75
3.4	Compare %nitrogen between STR5L, CDPNR and DPNR at optimum condition (papain)	76
3.5	Optimum Alcalase concentration for fresh latex deproteinization	78
3.6	Optimum time for fresh latex deproteinization	79
3.7	Optimum dilution for fresh latex deproteinization	80
3.8	Compare %nitrogen between STR5L, CDPNR and DPNR at optimum condition (Alcalase)	81

Figure		Page
3.9	Effect of $CuSO_4$ on standard ovalbumin protein determination by lowry method	88
3.10	Protein pattern of papain (origin, microwave and lab), concentrated latex 60% and 3 brands of commercial examination gloves	93
3.11	Protein pattern of STR5L, CDPNR and DPNR	94
3.12	Positive EAST of the test serum	95
3.13	Positive SPT of protein allergen	101
A1.1	Tyrosine standard curve	126
A4.1	Standard curve of ovalbumin measure by modified lowry method	140
A5.1	Molecular weight markers calibration curve of SDS-PAGE	141

ABBREVIATIONS

ADS	Air dried sheet
AL	Ammoniated latex
BAEE	Benzoyl-L-arginine-ethyl ester
BAPNA	Benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide
BL	Block rubber
BSA	Bovine serum albumin
CDPNR	Control of deproteinized natural rubber
CDU	Casein digestion unit
CL	Concentrated latex 60%
CV	Constant Viscosity
DPNR	Deproteinized Natural Rubber
DRC	Dry Rubber Content
DTH	Delayed type hypersensitivity
EAST	Enzyme allergosorbent test
FCC	Federal Communication Commission
FDA	The Food and Drug Administration
FL-latex	Fresh field latex
g	Gram

g%	Gram percent
GHz	Gigahertz
HA	High Ammoniated latex
HDPNR	Highly deproteinized natural rubber
Ig	Immunoglobulin
kD	Kilodalton
kg	Kilogram
L	Liter
lb	Pound
LNNR	Low Nitrogen Natural Rubber
m	Meter
M	Molar
MCV	Microwave Continuous Vulcanization
MHz	Megahertz
ml	milliliter
mm	millimeter
MW	Molecular weight
NAL	Non-ammoniated latex
NR	Natural rubber

NRL	Natural rubber latex
NRP	Natural rubber products
NSS	Normal saline solution
p.h.r	Part per hundred rubber
PAJ	Pineapple Juice
pI	Isoelectric point
Po	Initial plasticity
PPO	Polyphenol oxidase
PRI	Plasticity Retention Index
Quest	Questionnaires
RAST	Radioallergosorbent test
RSS	Rubber smoke sheet, Ribbed smoked sheet
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SPT	Skin prick test
STR	Standard Thai Rubber
STRL	Standard Thai Rubber Light Color Grade
TCA	Trichloroacetic acid
TSC	Total solid content
V	volume

W	Weight
y	Year
^{o}C	Degree Celsius
μm	Micrometer