ผลของการฉายรังสีแกมมาต่อปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ และสมบัติทางกายภาพของน้ำยางข้นและฟิล์มยางวัลคาไนซ์

นางสาวอรนุช เฮ้าวุฒิกุล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-5162-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF GAMMA RADIATION ON WATER EXTRACTABLE PROTEIN CONTENT AND PHYSICAL PROPERTIES OF CONCENTRATED LATEX AND VULCANIZED RUBBER FILM

Miss Oranoot Haowuttikul

ศูนย์วิทยทรัพยากร
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 2003
ISBN 974-17-5162-1

Thesis Title :	Effect of gamma radiation on water extractable protein content and physical properties of concentrated latex and vulcanized rubber film
By	Oranoot Haowuttikul
Field of study	Biochemistry
Thesis Advisor	Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph. D.
Thesis Co-advisor	Associate Professor Chyagrit Siri-Upathum

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

.....Dean of the Faculty of Science

(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor

(Associate Professor Chyagrit Siri-Upathum)

..... Member

(Associate Professor Porntip Puvabanditsin, M.D.)

..... Member

(Rath Pichayangkura, Ph.D.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นางสาวอรนุช เฮ้าวุฒิกุล : ผลของการฉายรังสีแกมมาต่อปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้และสมบัติทางกายภาพของน้ำยางข้นและฟิล์มยางวัลคาไนซ์. (EFFECT OF GAMMA RADIATION ON WATER EXTRACTABLE PROTEIN CONTENT AND PHYSICAL PROPERTIES OF CONCENTRATED LATEX AND VULCANIZED RUBBER FILM) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร.จริยา บุญญวัฒน์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ชยากริต ศิริอุปถัมภ์ จำนวนหน้า 139 หน้า. ISBN 974-17-5162-1

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อโปรตีนที่ละลายน้ำได้ในน้ำยางธรรมชาติและสมบัติทางกายภาพของน้ำยางข้นและยางวัลคาไนซ์ด้วยวิธีการฉายรังสี น้ำยางสดที่ใช้ปราศจากเทตราเมทิลไทยูแรมไดซัลไฟด์และซิงค์ออกไซด์รวบรวมจากจังหวัดระยอง ระหว่างปี 2544-2546 ซึ่งมีปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ในน้ำยางสด 20-70 มิลลิกรัมต่อกรัมยาง มีความแปรผันแบบคู่ขนานกับปริมาณเนื้อยางแห้งซึ่งมีค่าร้อยละ 40 ในช่วงต้นฤดูกรีดยางและฤดูฝนคือเดือนพฤษภาคมถึงตุลาคม และลดลงเป็นร้อยละ 30 ในช่วงปลายฤดูกรีดคือพฤศจิกายนถึงมกราคม เมื่อปั่นเหวี่ยงเป็นน้ำยางข้นพบว่าโปรตีนที่ละลายน้ำได้ลดลงร้อยละ 90 ในน้ำยางข้นควบคุมที่ไม่ฉายรังสีพบการแปรผันตามฤดูกาลเช่นเดียวกับน้ำยางสดคือ 5 มิลลิกรัมต่อกรัมยางต้นฤดูกรีดและลดลงเหลือ 1-2 มิลลิกรัมต่อกรัมยางในช่วงปลายฤดูกรีด การฉายรังสีน้ำยางสดก่อนปั่นเหวี่ยงที่ความเข้มต่ำ 1-10 กิโลเกรย์ มีผลให้โปรตีนในยางที่ละลายน้ำได้แตกสลายเป็นจำนวนสายเปปไทด์มากขึ้น ขนาดเล็กลงล้างออกจากแผ่นฟิล์มยางได้ดีแต่ที่ความเข้มของรังสี 40-120 กิโลเกรย์มีข้อเสียคือโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำถูกทำลายกลายเป็นโปรตีนที่ละลายน้ำได้ทำให้หลังการฉายรังสีกลับมีโปรตีนละลายน้ำได้เพิ่มขึ้นมากกว่าเดิม ดังนั้นจึงเปลี่ยนเป็นฉายรังสีน้ำยางข้นที่ความเข้ม 10 กิโลเกรย์แก่น้ำยางข้นโปรตีนต่ำซึ่งขจัดโปรตีนทั้งหมดด้วยเอนไซม์อัลคาเลสจนมีโปรตีนที่ละลายน้ำได้ 82± 28 ไมโครกรัมต่อกรัมยาง ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดต่ำกว่าร้อยละ 0.09 และความเสถียรต่อแรงกล (MST) ต่ำกว่า 200 วินาที พบว่ายังคงทำให้โปรตีนที่ละลายน้ำได้เพิ่มขึ้นเป็น 373± 72 ไมโครกรัมต่อกรัมยางโดยไม่สามารถเพิ่ม MSTได้ วิธีที่ดีกว่าคือการเติมอัลจิเนตเพื่อไปจับกับโปรตีนและทำให้อนุภาคยางเกาะกลุ่มก่อนปั่นเหวี่ยงช่วยเพิ่มผลผลิตของน้ำยางข้น ทำให้ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ลดลงน้อยกว่า 300 ไมโครกรัมต่อกรัมและสมบัติทางกายภาพอยู่ในช่วงของข้อกำหนดน้ำยางข้น ISO 2004 ยกเว้นปริมาณแมกนีเซียม รวมทั้งปริมาณไนโตรเจนต่ำกว่า 0.20% การฉายรังสีน้ำยางข้นที่เติมอัลจิเนตที่ความเข้ม 10 กิโลเกรย์ที่เวลา 17-150 วันหลังการปั่นเหวี่ยง ทำให้ MST เพิ่มขึ้นเล็กน้อยไม่เกิน 1200 วินาที ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ที่สกัดจากฟิล์มยางวัลคาไนซ์น้อยกว่า 300 ไมโครกรัมต่อกรัมยาง ซึ่งภายหลังการล้างแผ่นฟิล์มยางในอัตราส่วนยาง 1 กรัมต่อน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตรที่ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาทีแผ่นฟิล์มยางวัลคาไนซ์โดยรังสี มีปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ต่ำกว่า 50 ไมโครกรัมต่อกรัมยางและปราศจากโปรตีนขนาด 14-45 กิโลดาลตันซึ่งเป็นแอลเลอเจนหลักยืนยันโดยวิธีสะกิดผิวหนังให้ผลเป็นลบในบุคคลากร 2 คนที่ให้ผลบวกกับแอลเลอเจนมาตรฐาน แผ่นฟิล์มยางที่วัลคาไนซ์ด้วยรังสีทั้งน้ำยางควบคุม น้ำยางข้นโปรตีนต่ำและน้ำยางเติมอัลจิเนตที่ความหนา 0.2-0.3 มิลลิเมตร มีสมบัติทางกายภาพโดยรวมใกล้เคียงกับฟิล์มยางที่ใช้ในทางทันตกรรม

ภาควิชา.....ชีวเคมี.....
สาขาวิชา.....ชีวเคมี.....
ปีการศึกษา.....2546.....

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

4372482023 : MAJOR BIOCHEMISTRY

KEY WORD: NATURAL RUBBER LATEX / WATER EXTRACTABLE PROTEIN / RADIATION VULCANISATION / LATEX PROTEIN ALLERGEN / GAMMA RADIATION

ORANOOT HAOWUTTIKUL : EFFECT OF GAMMA RADIATION ON WATER EXTRACTABLE PROTEIN CONTENT AND PHYSICAL PROPERTIES OF CONCENTRATED LATEX AND VULCANIZED RUBBER FILM. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. JARIYA BOONJAWAT, Ph. D., THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. CHAYAGRIT SIRI-UPATHUM, 139 pp. ISBN 974-17-5162-1

The aim of this research is to study the effect of gamma radiation on water extractable proteins (WEP) in natural rubber latex and physical properties of concentrated latex and radiation vulcanized rubber film. The fresh field latex (FFL) used is free from of tetramethyl thiuram disulphide and zinc oxide and collected from Rayong province during 2001-2003. WEP content in FFL shows seasonal variation 70-20 mg/g rubber parallel to %DRC, which starts at 40% at the beginning of tapping season (May-October) and decreases to 30% towards the end of tapping season (November-January). The WEP can be reduced about 90% by centrifugation, and the concentrated latex (CL) 60% obtained shows seasonal variation in similar pattern as FFL starting about 5 mg/g rubber at the beginning of tapping season, and 1-2 mg/g at the end of tapping season. Irradiation of FFL at low dose of 1-10 kGy resulted in disintegration of water-soluble latex proteins, increased small peptides and easy for removal by leaching of rubber film, whereas high doses 40-120 kGy resulted in disintegration of insoluble protein and consequently increasing amount of WEP greater than in non-irradiated FFL. Hence, deproteinized CL (DPCL) by Alcalase enzyme which had WEP 82 $\pm$ 28 μ g/g rubber, nitrogen content < 0.09% and MST lower than 200 sec was therefore used for irradiated at 10 kGy. It was found that WEP still increased to 373 $\pm$ 72 μg/g rubber and MST could not be increased. The better approach was alginate addition to interact with protein and creaming of latex to improve recovery yield of concentrated latex 60%. WEP of alginate added CL (AGCL) was lower than 300 μg/g rubber and physical properties meets with ISO 2004 specification except magnesium content and nitrogen content was < 0.20%. Irradiation of AGCL at 10 kGy on days 17-150 after centrifugation could slightly increase MST, but not higher than 1200 sec. WEP extracted from radiation vulcanized rubber film (RVRF) was lower than 300 μg/g rubber. After leaching RVRF with distilled water at the ratio 1 g rubber to 10 ml at 70°C for 30 minutes, WEP was lower than 50 μg/g rubber and free from major allergen proteins molecular weight (MW) range 14-45 kDa. It was confirmed by skin prick test that shows the negative results in 2 volunteers who shows positive test with commercial standard allergen. The radiation vulcanized rubber film from CCL, DPCL and AGCL at thickness 0.2-0.3 mm had all physical properties comparable to commercial dental rubber dam.

Department.....Biochemistry..... Student's signature...Oranoot Haowuttikul

Field of study.....Biochemistry..... Advisor's signature...Jariya Boonjawat

Academic year.....2003..... Co-advisor's signature...Chayagrit Siri-Upathum

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest appreciation to my advisor, Assoc. Prof. Dr. Jariya Boonjawat, for her valuable advice, encouragement, suggestion, financial supports, kindness and helpful guidance throughout this study. I would like to acknowledge Assoc. Prof. Chayagrit Siri-Upathum, my thesis co-advisor, for his initiation throughout this thesis. My appreciation is also expressed to Assoc. Prof. Dr. Piamsook Pongsawasdi, Assoc. Prof. Dr. Porntip Puvabanditsin and Dr. Rath Pichayankura for serving as thesis commeittee, for valuable comments and also for useful suggestions.

I would like to send my sincere thanks to all staff of Ban Pan Biotechnology Co. Ltd., for their helps, supplying the latex materials and laboratory equipment.

Assis. Prof. Niyom Thamrongananskul for their helps and laboratory equipment in vulcanizate properties testing and Prapon Pransopon for providing gamma irradiation.

I wish to thank all staff members and friends of Biochemistry Program Department, expecially in room 604, 708 and 618 for their assistance and friendship. Finally, I am most grateful to my parents, sister and brother for their love, understanding and encourangement.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT.....iv

ENGLISH ABSTRACT.....v

ACKNOWLEDGEMENTS.....vi

CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES.....xi

LIST OF FIGURES.....xiii

ABBREVIATIONS.....xv

CHAPTER I INTRODUCTION.....1

CHAPTER II MATERIALS AND METHODS.....19

2.1 Biological materials.....19

2.2 Chemicals.....19

2.3 Apparatus.....20

2.4 Assay of Alcalase specific activity.....21

2.5 Deproteinization of natural rubber latex.....22

2.6 Preparation of polysaccharide addition concentrated latex.....23

2.7 Preparation of radiation vulcanization natural rubber latex.....23

2.8 Testing of concentrated latex specification.....24

2.8.1 Determination of total solid content.....24

2.8.2 Determination of dry rubber content.....24

2.8.3 Determination of non rubber content.....25

2.8.4 Determination of volatile fatty acid.....25

2.8.5 Determination of alkalinity.....25

2.8.6 Determination of Mg content.....26

Page

2.8.7 Determination of mechanical stability time.....26

2.8.8 Determination of potassium hydroxide.....27

2.8.9 Determination of nitrogen content.....27

2.9 Preparation of latex proteins.....28

2.9.1 Extraction of water extractable proteins in solid rubber.....28

2.9.2 Lyophilization.....29

2.9.3 Extraction of water extractable proteins in latex films.....29

2.9.4 Latex protein extracts for skin prick test.....29

2.10 Precipitation and concentration of protein.....29

2.11 Determination of water extractable protien by modified Lowry method (ASTM D 5712- 99).....30

2.12 Determination of water extractable protien by modified Lowry method (ISO DIS 12243).....30

2.13 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.....31

2.14 Testing of the rubber vulcanizates.....31

2.14.1 Determination of tensile strength,300% modulus and Elongation at break (ASTM D412,1987).....31

2.14.2 Tear strenght test (ASTM D624,2989).....32

2.14.3 Hardress test (ASTM D1415,1988).....32

2.15 Allergen detection by Skin Prick test.....33

CHAPTER III RESULTS.....34

3.1 Seasonal variation of dry rubber content (DRC) and water extractable protein (WEP) of fresh field latex (FFL).....34

3.2 The effect of centrifugation on WEP of concentrated latex (CL) 60%.....34

3.3 Effect of gamma radiation on protein.....36

Page

3.3.1 Effect of dose variation on the quantity of WEP from rubber film.....36

3.3.2 MW distribution of WEP of irradiated latex.....38

3.3.3 The effect of gamma radiation on Bovine Serum Albumin (BSA).....41

3.4 The effect of natural polysaccharide addition on irradiated natural rubber latex...43

3.4.1 Recovery yield (%) of irradiated and polymer addition natural rubber latex..45

3.4.2 WEP of irradiated FFL plus NP before centrifugation concentrated latex films.....47

3.4.3 Effect of leaching on WEP of irradiated latex film.....50

3.4.4 Effect of leaching on MW distribution of WEP from IR , alginate and centrifugation.....52

3.4.5 MW distribution of WEP of carrageenan added after irradiated latex 52

3.5 The effect of radiation on WEP of alginate addition latex.....58

3.5.1 Recovery yield (%) of alginate addition and irradiated latex.....60

3.5.2 Leaching effect with WEP of rubber AG-IRR-CL films.....61

3.6 Effect of irradiation after centrifugation.....63

3.6.1 Recovery yield of control and deproteinized concentrated latex.....65

3.6.2 Physical properties of control and deproteinized concentrated latex.....65

3.6.3 The effect of irradiation on control and deproteinized concentrated latex.....67

3.7 Effect of irradiation on NP addition and centrifugation.....68

3.7.1 Recovery yield of alginate addition concentrated latex.....68

3.7.2 Physical properties of control and alginate addition concentrated latex 60%..70

3.7.3. The effect of 10 kGy irradiation on CCL and AGCL.....71

3.8 The effect of gamma radiation on MST of CCL, DPCL and AGCL.....73

3.9 The leaching effect on WEP of latex films.....76

3.10 Effect of deprotenization, alginate addition and irradiation on

Page

MW distribution of WEP....78

3.11 Allergen detection by skin prick test (SPT)....84

3.12 Physical properties on RVNRL....85

CHAPTER IV DISCUSSION....87

CHAPTER V CONCLUSION....98

REFERENCES....101

APPENDICES....107

BIOGRAPHY....139

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table Page

CHAPTER I

1.1 Composition of acid coagulated field latex.....3

1.2 The ISO 2004 specifications of concentrated latex 6

CHAPTER III

3.1 Table 3.1 Effect of NP addition after irradiation of FFL on recovery yield.....46

3.2 Effect of FFL irradiation and alginate addition on WEP of rubber film.....48

3.3 Effect of FFL irradiation and carrageenan addition on WEP of rubber film 49

3.4 Effect of leaching on WEP of IRR-AG-CL films 50

3.5 Effect of leaching on WEP of IRR-CA-CL films 51

3.6 Effect of Alginate addition before irradiation of FFL on recovery yield.....60

3.7 WEP of FFL plus AG before irradiated and centrifugation and leaching effect with WEP of rubber films 62

3.8 Recovery yield of DPCL compared with control concentrated latex.....65

3.9 Comparison of physical properties in control concentrated latex and DPCL... ...66

3.10 Effect of irradiation on physical properties of 50% control and deproteinized concentrated latice.....67

3.11 Recovery yield (%) of control and alginate added concentrated latex 68

3.12 Physical properties of control and alginate addition concentrated latex 70

3.13 Effect of irradiation on WEP and 50% concentrated latex..... 72

3.14 Effect of radiation vulcanization and leaching on WEP.....77

3.15 Allergen detection by SPT 84

Table Page

3.16 Physical properties on RVNRL at thickness 0.2-0.3 mm.....85

3.17 Physical properties on RVNRL at thickness 2 mm 85

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure Page

CHAPTER I

1.1 Presumed structure of rubber particle.....3

CHAPTER II

2.1 Shape of dumbbell 31

CHAPTER III

3.1 Dry rubber content of fresh field latex during 2001-2003.....35

3.2 Trend of WEP content in rubber film prepared from FFL in 2001-2003.....35

3.3 Effect of centrifugation on WEP in rubber film from CL 60% in 2001-2003.....35

3.4 The protocol of irradiated film preparation and WEP extraction 36

3.5 Different effects of radiation at low dose (1-3 kGy) and high dose

(20-120 kGy) on latex protein.....37

3.6 SDS PAGE of WEP extracted from dry rubber film prepared from FFL,

CL, and FFL IRR with 1-3 kGy 39

3.7 SDS PAGE of WEP extracted from dry rubber film prepared from FFL,

CL, and FFL IRR with 20-120 kGy.....40

3.8 SDS PAGE of IRR BSA protein. 42

3.9 The protocol to study effect of irradiation, NP addition and leaching on WEP...44

3.10 Effect of leaching on MW distribution of WEP from IRR,

AGe and centrifugation.....53

3.11 Effect of leaching on MW distribution of WEP from IRR, °

AG and centrifugation. 54

Figure Page

3.12 Effect of leaching on MWdistribution of WEP from IRR
CA addition and centrifugation....56
3.13 Effect of leaching on MW distribution of WEP from IRR,
CA addition and centrifugation....57
3.14 The protocol to study effect of ,AG addition, IRR and leaching on WEP....59
3.15 Production of concentrated latex followed by irradiation 64
3.16 Production of control and AGCL followed by irradiation....69
3.17 Effect of irradiation on MST of CCL, DPCL, CCL IRR and DPCL IRR
Irradiation 10 kGy on day 3 after centrifugation....74
3.18 Effect of irradiation on MST of CCL, AGCL, CCL IRR and AGCL IRR
Irradiation 10 kGy on day after centrifugation....75
3.19 Effect of centrifugation, deproteinization and irradiation on MW
distribution of WEP lot No 111/7/03....79
3.20 Effect of centrifugation, deproteinization and irradiation on MW
distribution of WEP lot No 21/7/03....80
3.21 Effect of centrifugation, alginate addition and irradiation on MW
distribution of WEP lot No 12/9/03....82
3.22 Effect of centrifugation, alginate addition and irradiation on MW
distribution of WEP lot No 4/11/03....83

ABBREVIATIONS

AGCL	Alginate added concentrated latex
ASTM	American Society for Testing and Materials
CACL	Carrageenan added concentrated latex
CCL	Control concentrated latex
DPCL	Deproteinized concentrated latex
DPNR	Deproteinized natural rubber
DRC	Dry rubber content
FDA	Food and Drug Administration
G-value	No. of produced molecule changed by absorption of radiation 100-eV
ISO	International Standard Organization
HA	High- ammoniated latex
IRR	gamma irradiation
kDa	kilodalton
LA	Low- ammoniated latex
mm	millimeter
MPa	Mega pascal
MST	Mechanical stability time
NP	Natural polysaccharide
NR	Natural rubber
NRL	Natural rubber latex
NSS	Normal saline solution
phr	part per hundred rubber
ppm	part per million
RF	Rubber film
RRIM	Rubber Research Institute of Malaysia
RVNRL	Radiation vulcanisation natural rubber latex
SDBS	Sodium dodecyl benzene sulfonate
SPT	Skin prick test

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

STR	Standard Thai rubber
SVNRL	Sulfur vulcanization natural rubber latex
TMTD	Tetramethyl thiuram disulfide
TSC	Total solid content
VFA	Volatile fatty acid
WEP	Water extractable protein
μg	microgram

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย