การผลิตสารละลายของโปรตีนจากเศษไหมโดยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในน้ำกึ่งวิกฤติ สำหรับการเตรียมอนุภาคซิริซินและไฟโบรอินขนาดเล็ก

นาย วิวัฒน์ ลมูลภักตร์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-17-4276-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

27 ธ.ค. 2549
I22476001

PRODUCTION OF PROTEIN SOLUTION FROM SILK WASTE BY SUBCRITICAL WATER HYDROLYSIS FOR PREPARATION OF SERICIN AND FIBROIN MICROPARTICLES

Mr. Wiwat Lamoolphak

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering Program in Chemical Engineering
Department of Chemical Engineering
Faculty of Engineering
Chulalongkorn University
Academic Year 2005

ISBN 974-17-4276-2

Thesis Title	PRODUCTION OF PROTEIN SOLUTION FROM SILK WASTE BY SUBCRITICAL WATER HYDROLYSIS FOR PREPARATION OF SERICIN AND FIBROIN MICROPARTICLES
By	Mr. Wiwat Lamoolphak
Field of Study	Chemical Engineering
Thesis Advisor	Assistance Professor Artiwan Shotipruk, Ph.D.

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

..... Dean of the Faculty of Engineering
(Professor Direk Lavansiri, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman
(Associate Professor Siriporn Damrongsakkul, Ph.D.)

.....Thesis Advisor
(Assistance Professor Artiwan Shotipruk, Ph.D.)

.....Member
(Associate Professor Wanchai De-Eknamkul, Ph.D.)

.....Member
(Associate Professor Tawatchai Charinpanitkul, Ph.D.)

.....Member
(Sorada Kanokpanont, Ph.D.)

วิวัฒน์ ลมูลภักตร์ : การผลิตสารละลายของโปรตีนจากเศษไหมโดยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในน้ำกึ่งวิกฤติสำหรับการเตรียมอนุภาคซิริซินและไฟโบรอินขนาดเล็ก (PRODUCTION OF PROTEIN SOLUTION FROM SILK WASTE BY SUBCRITICAL WATER HYDROLYSIS FOR PREPARATION OF SERICIN AND FIBROIN MICROPARTICLES) อ. ที่ปรึกษา: ผศ. ดร. อาทิวรรณ โชติพฤกษ์, 132 หน้า. ISBN 974-17-4276-2

งานวิจัยนี้เพื่อศึกษาการผลิตสารละลายโปรตีนจากเศษไหมด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่สภาวะน้ำกึ่งวิกฤติ และการเตรียมอนุภาคผงจากสารละลายที่ได้ โดยทดลองการเกิดปฏิกิริยาในระบบถังปฏิกรณ์แบบกะที่สภาวะต่างๆ คือศึกษาปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในช่วงอุณหภูมิ 120-160 องศาเซลเซียส และ 160-220 องศาเซลเซียส สำหรับปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของซิริซินและไฟโบรอิน ตามลำดับ โดยทั้ง 2 กระบวนการนี้ ทำการศึกษาผลของเวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่ 10, 30 และ 60 นาที และศึกษาผลของอัตราส่วนของเศษไหมต่อน้ำ เท่ากับ 1:20, 1:50 และ 1:100 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณของเศษไหมที่เหลือหลังการเกิดปฏิกิริยามีปริมาณลดลง เมื่ออุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น กรณีของสารละลายซิริซิน พบว่าอิทธิพลของอุณหภูมิและเวลาไม่มีผลต่อปริมาณผลได้ของโปรตีน แต่ปริมาณผลได้ของกรดอะมิโนในสารละลายซิริซินนั้น มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิและเวลาที่ใช้เกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น โดยปริมาณผลได้ของโปรตีนและกรดอะมิโนสูงสุด เท่ากับ 0.466 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของไหม (อัตราส่วน 1:100 อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที) และ 0.203 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของไหม (อัตราส่วน 1:20 อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เวลา 60 นาที) ตามลำดับ กรณีการศึกษาปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเส้นใยไฟโบรอิน พบว่าปริมาณเส้นใยไฟโบรอินมีปริมาณลดลง เมื่ออุณหภูมิและเวลาที่ใช้เกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น แต่ปริมาณผลได้ของโปรตีนและกรดอะมิโนในสารละลายไฟโบรอิน มีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิและเวลาที่ใช้เกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น โดยปริมาณผลได้ของโปรตีนและกรดอะมิโนสูงสุด เท่ากับ 0.455 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของไฟโบรอิน (อัตราส่วน1:100 อุณหภูมิ 220 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที) และ 0.755 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของไฟโบรอิน (อัตราส่วน1:50 อุณหภูมิ 220 องศาเซลเซียส เวลา 60 นาที) ตามลำดับ จากผลการศึกษาสามารถอธิบายกลไกและค่าจลนพลศาสตร์การย่อยสลายของเส้นใยไฟโบรอินได้ด้วยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนพื้นผิวของเส้นใย ซึ่งกรณีของการเตรียมอนุภาคผงซิริซินและไฟโบรอินจากสารละลาย สามารถเตรียมได้โดยผ่านกระบวนการทำแห้งด้วยความเย็นที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส และผ่านการบดเป็นอนุภาคผง ซึ่งจากผลการตรวจสอบอนุภาคผง แสดงให้เห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างโมเลกุลเกิดขึ้นจากแบบโครงสร้าง (เบต้า-ชีท) กลายเป็นเกลียว (อัลฟา-เฮลิค) ระหว่างการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเส้นใย เนื่องจากการแตกตัวของพันธะไฮโดรเจนของโครงสร้างเส้นใย สำหรับงานวิจัยนี้ไม่ได้ศึกษาผลสภาวะของกระบวนการเตรียมที่มีอิทธิพลต่อคุณลักษณะของอนุภาคที่ได้ อย่างไรก็ตามผลของงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่สภาวะน้ำกึ่งวิกฤติเป็นกระบวนการที่มีประสิทธิภาพที่สามารถใช้ในการผลิตสารละลายและอนุภาคผงโปรตีนจากเศษไหม

ภาควิชา.....วิศวกรรมเคมี.....ลายมือชื่อนิสิต.....วิวัฒน์ ลมูลภักตร์.....

สาขาวิชา.....วิศวกรรมเคมี.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....อ.ที่ปรึกษา โชติพฤกษ์.....

ปีการศึกษา.....2548.....

4770460221 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING DEPARTMENT
KEY WORD: SUBCRITICAL WATER / HYDROLYSIS / SILK/ PROTEIN / SERICIN / FIBROIN / MICROPARTICLES

WIWAT LAMOOLPHAK : PRODUCTION OF PROTEIN SOLUTION FROM SILK WASTE BY SUBCRITICAL WATER HYDROLYSIS FOR PREPARATION OF SERICIN AND FIBROIN MICROPARTICLES. THESIS ADVISOR :ARTIWAN SHOTIPRUK, PhD., 132 pp. ISBN 974-17-4276-2

This study examines non-catalytic hydrothermal decomposition of silk waste into protein and amino acids in subcritical water and the characteristics of the particles formed from the solution products. The reaction was carried out in a closed batch reactor at various temperatures between 120-160 °C for sericin, and between 160-220 °C for fibroin. The reaction time was varied between 10-30 minutes and different silk to water ratios of 1:20, 1:50, and 1:100 were examined. The reaction products were separated into solid residue, whose dried weight was measured, and aqueous product, which was analyzed for protein and amino acid content. The results demonstrated that for the hydrolysis of silk for the removal of sericin, the amount of silk residue decreased with increasing hydrolysis temperature and reaction time, and as protein and amino acids were produced. The protein yield in the sericin solution was not affected greatly by temperature and time of reaction, and the highest amount was found to be 0.466 mg protein/mg raw silk (1:100, 120 °C, 10 min). On the other hand the amino acids yield increased when temperature and reaction time increased, and the highest amount of amino acids was 0.203 mg AA/mg raw silk, which was found at the highest temperature and time of extraction tested (1:20, 160 °C, 60 min). Like sericin, the amount of silk fibroin residue decreased with temperature and reaction time. Both protein and amino acids yields in the fibroin solutions increased when temperature and reaction time increased. The highest amount of protein yield was 0.455 mg protein/mg silk fibroin (1:100, 220 °C, 10 min) and that amino acids was 0.755 mg AA/mg silk fibroin (1:50, 220 °C, 60 min). The results of silk fibroin decomposition in this study could be described by a surface reaction kinetics. In addition to determining the appropriate hydrolysis conditions, the aqueous solutions of silk sericin and fibroin were formed into particles by means of freeze drying at -40 °C and mechanical disintegration of the dried product. The particle morphology and characteristics such as conformation, crystal structure, and degradation temperature were examined. The analysis showed that the conformation and structure of the final product were changed, particularly in case of fibroin, where change from β–sheet conformation to α-helix/random coil was observed. This is a result of the cleavage of hydrogen linkages in the silk fibre. Although further study is needed to examine the effects of drying method and drying condition on the characterisitcs of particles, the results of this study demonstrated that subcritical water hydrolysis is a promising means for the decomposition of silk waste into useful products.

Department.....Chemical Engineering.....Student's signature.....Wiwat Lamoolphak.....

Field of study.....Chemical Engineering.....Advisor's signature.....

Academic year.....2005.....

ACKNOWLEDGMENTS

I would like to express my sincere gratitude to my advisor Asst. Prof. Artiwan Shotipruk for her encouragement, support, and guidance provided throughout the two year course of my thesis work.

Special thanks for the following people for their most invaluable suggestion to improve the quality of my work: Prof. Motonobu Goto (Kumamoto University, Japan), Assoc. Prof. Mitsuru Sasaki (Kumamoto Unviersity, Japan), and Assoc. Prof. Wanchai De-Eknamkul (Natural Product Biotechnology Research Unit Laboratory, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University). The also provide equipments and analytical instruments required for the analytical study.

Thanks to all my thesis committee, Assoc. Prof. Siriporn Damrongsakkul, Assoc. Prof. Wanchai De-Eknamkul, Assoc. Prof. Tawatchai Charinpanitkul and Dr. Sorada Kanokpanont for their kind advice.

Many thanks are also given to Miss Raveewan Siripokasatkul and Mr. Seubsakul Pokasem for assistance in analytical work. The help with the interpretation of the analytical results from Dr. Anongnat Somwangthanaroj is also appreciated.

Financial supports from Thailand Japan Technology Transfer Program (TJTTP), UNEDO, and The Department of Chemical Engineering, Chulalongkorn University for providing the full scholarship for my master study were highly appreciated.

Sincere thanks are given to all members of the Biochemical Engineering Research Laboratory and all my friends in the Department of Chemical Engineering for their assistance and warm collaborations.

Finally, I would like to express the highest gratitude to my parents, my sister, and all of my friends for their help, their unfailing understanding and affectionate encouragements.

CONTENTS

Page

ABSTRACT IN THAI iv

ABSTRACT IN ENGLISH v

ACKNOWLEDGEMENTS vi

LIST OF TABLES x

LIST OF FIGURES xi

CHAPTER I INTRODUCTION

1.1 Rationale 1

1.2 Objectives 3

1.3 Working Scopes 3

1.4 Expected benefits 4

CHAPTER II BACKGROUND AND LITERATURE REVIEW

2.1 Silk waste 5

2.2 Structure of silk 6

2.2.1 Silk fibre 6

2.2.2 Silk proteins 6

2.3 Sericin 8

2.4 Fibroin 10

2.5 Application of silk protein 13

2.5.1 Application of sericin 13

2.5.2 Application of silk fibroin 16

2.6 Silk protein processing 20

2.6.1 Degumming methods 20

2.6.1.1 Degumming with hot water 21

2.6.1.2 Degumming with soap 21

2.6.1.3 Degumming with synthetic Detergent 21

2.6.1.4 Degumming with acid 22

2.6.1.5 Degumming with enzymes 23

2.6.2 Processing silk fibroin.....24
2.7 Reactions in sub and supercritical water.....25
2.7.1 Oxidation in supercritical water.....26
2.7.2 Hydrolysis Reactions.....27
2.7.2.1 Hydrolysis of cellulose (Glucolysis).....27
2.7.2.2 Hydrolysis of saccharides.....29
2.7.2.3 Hydrolysis of protein.....29

CHAPTER III MATERIALS AND METHODS
3.1 Materials..... 32
3.2 Experimental.....32
3.2.1 Preparation of Raw Silk.....32
3.2.1 Subcritical water hydrolysis of sericin.....33
3.2.2 Subcritical hydrolysis of silk fibroin.....35
3.2.3 Formation of particles from sericin and fibroin solutions 35
3.3 Analytical Method.....36
3.3.1 Scanning electron microscopy (SEM).....36
3.3.2 SDS-PAGE.....36
3.3.3 Protein and Amino Acids Compositions 40
3.3.3.1 Protein assay 40
3.3.3.2 Amino acids assay 41
3.3.4 Measurement of particle sizes.....42
3.3.5 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR).....42
3.3.6 X-ray diffraction (XRD).....43
3.3.7 Differential Scanning Calorimetry (DSC).....43

CHAPTER IV RESULT AND DISSCUSSION
4.1 Hydrolysis of silk fibre in subcritical water: Preliminary study 44
4.1.1 Soluble products 44
4.1.2 Morphology of silk residue 46
4.1.3 Molecular size 47
4.2 Noncatalytic hydrolyis of sericin 48

4.2.1 Weight of residue.....48
4.2.2 Protein yield 51
4.2.3 Amino acids 54
4.3 Noncatalytic hydrolysis of fibroin 56
4.3.1 Weight of residue 56
4.3.2 Protein yield 59
4.3.3 Amino acids yield 61
4.4 Kinetic model for silk fibroin conversion in subcritical water 64
4.5 Characterization of powder of hydrolysis products 69
4.5.1 Particle size and morphology.....69
4.5.2 Fourier Transform Infrared Spectroscopy.....71
4.5.2 X-ray diffraction (XRD) 74
4.5.2 Differential Scanning Calorimetry (DSC).....77
4.6 Possible application of silk sericin and fibroin products..... 79

CHAPTER V CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS
5.1 Conclusions.....80
5.2 Recommendations.....81

REFERENCES.....82
APPENDICES.....88
APPENDIX A Experimental and Data Analysis 89
APPENDIX B Experimental data 92
APPENDIX C Procedure for HPLC analysis of amino acids and preliminary data ..... .113
APPENDIX D Hydrothermal decomposition of yeast powder 122
APPENDIX E List of publication 129
VITA 138

LIST OF TABLES

Page

Table 2.1: Amino acid compositions of silk sericins.....9
Table 2.2: Amino acid compositions of silk fibroins.....11
Table 2.3: Comparison of mechanical properties of common silk to several types of biomaterial fibers and tissues commonly used today.....12
Table 2.4: The rages of size of sericin peptide for application.....13
Table 3.1: Saturated steam table 33
Table 3.2: Ranges of variables for sericin hydrolysis 34
Table 3.3: Ranges of experimental variables for fibroin hydrolysis 35
Table 3.4: Formulations for SDS-PAGE Separating and Stacking gels.....39
Table 4.1: shows the reaction rate constant for conversion reaction of fibroin at difference ratio hydrolysis.....67

LIST OF FIGURES

Page

Figure 2.1: The *Bombyx mori* cocoons.....5
Figure 2.2: Structure of the raw silk fibre.....6
Figure 2.3: Structure of crystalline-encoding region of silk:
Ser-Gly-(Ala-Gly)$_n$ 6
Figure 2.4: α-helix.....7
Figure 2.5: Silk β-sheet.....7
Figure 2.6: A scanning electron micrograph of (a) a raw silk
(b) fibroin fiber 20
Figure 2.7: Proteolytic enzyme action on protein.....22
Figure 2.8: Specific site of protein hydrolysis by trypsin..... 23
Figure 2.9: Arrhenius plot of decomposition rate constanats of cellulose
cellobiose and glucose in subcritical and supercritical water
at 25 MP.....28
Figure 2.10: Behavior of Gly, Ala, Ser and Asp formation from hydrolysis
of silk fibroin under hydrothermal conditions.....30
Figure 2.11: First-order plot of decomposition rate of Gly, Ala, Ser, and
Asp in subcritical water (573 K, 20MPa).....31
Figure 3.1: Batch system for subcritical water hydrolysis 34
Figure 3.2: An illustration of an apparatus used for SDS-PAGE 37
Figure 4.1: Soluble products of silk fibre in subcritical water:
(a) Silk sericin solution, reaction time=30 min (b) Silk fibroin
solution, reaction time= 30 min.....45
Figure 4.2: Scanning Electron Micrograph: (a) Raw silk (b) 1:50 120 °C
30 min (c) 1:50 120 °C 60 min (d) 1:50 160 °C 30 min 46
Figure 4.3: The molecular weight range of sericin and fibroin solution
determined by SDS-PAGE (a) 1:50, 30 min, 120-180 °C
(b) 1:50, 30 min, 190-250 °C.....47
Figure 4.4: Weight of silk residue after subcritical water hydrolysis
at different temperatures (1:50 silk:water ratio) 49
Figure 4.5: Effect of silk to water ratio on weight of residue at

different reaction time: (a) 10 min (b) 30 min (c) 60 min 50
Figure 4.6: Protein yield after hydrolysis at different temperatures (1:50 silk:water ratio) 52
Figure 4.7: Effect of silk to water ratio on protein yield at different reaction time : (a) 10 min (b) 30 min (c) 60 min 52
Figure 4.8: Amino acid yield after hydrolysis at different temperatures (1:50 silk:water ratio) 54
Figure 4.9: Effect of silk to water ratio on amino acid yield at different reaction time : (a) 10 min (b) 30 min (c) 60 min 55
Figure 4.10: Weight of silk residue after hydrolysis at different temperatures (1:50 silk:water ratio) 57
Figure 4.11: Effect of silk to water ratio on weight of residue at different reaction times: (a) 10 min (b) 30 min (c) 60 min 58
Figure 4.12: Protein yield after hydrolysis at different temperatures (1:50 silk:water ratio) 59
Figure 4.13: Effect of silk to water ratio on protein yield at different reaction times: (a) 10 min (b) 30 min (c) 60 min 61
Figure 4.14: Amino acid yield after hydrolysis at different temperatures (1:50 silk:water ratio) 62
Figure 4.15: Effect of silk to water ratio on amino acid yield at different reaction times: (a) 10 min (b) 30 min (c) 60 min 63
Figure 4.16: Pathways of hydrolysis of silk sericin and fibroin to useful Products 64
Figure 4.17: Reaction pathways of both a heterogeneous reaction and a homogeneous reaction 65
Figure 4.18: Relationship between the $1-(1-X)^{1/2}$ and the reaction time of hydrolysis (t) on the reaction of crystalline silk fibroin in subcritical water at ratio 1:50 68
Figure 4.19: Arrhenius pot of the rate constant of conversion of silk fibroin (k) in subcritical water.....68
Figure 4.20: SEM of sericin and fibroin powder: (a) freeze-dried sericin powder from solution prepared at at 1:50, 160 °C and 30 min (b) freezed-dried fibroin powder from solution prepared at 1:50, 200 °C and 30 min (c) ground sericin powder from solution

prepared at 1:50, 160 °C and 30 min (d) ground fibroin powder from solution prepared at 1:50, 200 °C and 30 min (e) Spray-dried sericin powder (f) spray-dried fibroin powder. 71

Figure 4.21: (a) Sericin powder was prepared by autoclave at at 1:50 120 °C 30 min (b) Sericin powder was prepared at 1:50 150 °C 30 min by subcritical water hydrolysis 72

Figure 4.22: (a) Fibroin fibre after degumming in autoclave (120 °C and 30 min) (b) Fibroin powder from solution prepared by subcritical water hydrolysis at 200 °C, 30 min, 1:50.....73

Figure 4.23: XRD of (a) sericin powder prepared from autoclave sample (b) fibroin powder 75

Figure 4.24: (a) XRD of sericin powder (1:50, 150 °C, and 30 min (b) XRD peak for fibroin powder (1:50, 200 °C and 30 min) 76

Figure 4.25: Thermogram of sericin powder obtained (a) at 120 °C, 30 min in an autoclave (b) at 150 °C 30 min in an SW reactor 78

Figure 4.26: Fibroin powder curve (a) was fibroin fibre were obtained by autoclave at 120 °C 30 min, curve (b) was fibroin powder were obtained by subcritical water hydrolysis at 200 °C, 30 min 78