

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



E46270

EXHAUSTIVE SEPARATION OF FIBROIN, SERICIN
AND PIGMENTS FROM YELLOW
THAI SILK COCOON

RUCHIRA PINKAEW

MASTER OF SCIENCE
IN CHEMISTRY

THE GRADUATE SCHOOL
CHULANG MAI UNIVERSITY
OCTOBER 2011

000256105



ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



E46270

**EXHAUSTIVE SEPARATION OF FIBROIN, SERICIN
AND PIGMENTS FROM YELLOW
THAI SILK COCOON**

RUCHIRA PINKAEW

**A THESIS SUBMITTED TO THE GRADUATE SCHOOL IN
PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
IN CHEMISTRY**

**THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY
OCTOBER 2011**


**EXHAUSTIVE SEPARATION OF FIBROIN, SERICIN
AND PIGMENTS FROM YELLOW
THAI SILK COCOON**


RUCHIRA PINKAEW


THIS THESIS HAS BEEN APPROVED
TO BE A PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN CHEMISTRY


EXAMINING COMMITTEE

THESIS ADVISOR


..... CHAIRPERSON
Associate Professor Dr. Mongkon Rayanakorn


.....
Associate Professor Dr. Surasak Watanesk


..... MEMBER
Associate Professor Dr. Surasak Watanesk


..... MEMBER
Dr. Chumni Sangphagdee

ACKNOWLEDGEMENTS

The author would like to express her sincere thanks and appreciation to Assoc. Prof. Dr. Surasak Watanesk, her thesis advisor, and also Assoc. Prof. Dr. Ruangsri Watanesk, for their kindness on giving such invaluable guidance, grateful supervision and many suggestions, and also continual encouragement and discussions.

The acknowledgement is also extended to the Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Commission on Higher Education, Ministry of Education, for sponsoring the graduate scholarship. Thanks to the Graduate School, Chiang Mai University for additional financial supports to this research, and also to the Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University for supporting the facilities which enable this work to be carried out.

Thank to Queen Sirikit Sericulture Centre, Nan and Chiang Mai Province, Thailand, for the support of silk cocoon sample as raw material.

Thanks also to those who have one way or other contributions to the success of this work, especially members of the Chemical Modification of Natural Fibrous Materials Research Laboratory.

Finally, the author would like to greatly thank and express her appreciation to her parents for their love, encouragement, inspiration, understanding and support.

Ruchira Pinkaew

Thesis Title	Exhaustive Separation of Fibroin, Sericin and Pigments from Yellow Thai Silk Cocoon
Author	Ms. Ruchira Pinkaew
Degree	Master of Science (Chemistry)
Thesis Advisor	Associate Professor Dr. Surasak Watanesk

ABSTRACT

E46270

At present, there have been widespread studies on the extraction of silk proteins consisting of sericin and fibroin as well as their various applications. Moreover, pigment components of the yellow silk cocoon are very interesting because they are mostly associated with carotenoids and flavonoids as highly efficient antioxidants. In this research, exhaustive separation of fibroin, sericin and pigments from yellow Thai silk cocoons from two sources (Chiang Mai and Nan provinces) were used in this study. Pigment extraction was conducted in order to investigate the suitable extraction conditions including type of solvent, acid-base condition, temperature and extraction time. The amount of pigment extracted was checked spectrophotometrically. Complete removal of the pigments of silk cocoon could be achieved by repeating reflux extraction 4 times with 0.80 M CH_3COONa in 80% (v/v) ethanol at 80 °C for 30 min. The total amounts of pigments of cocoon samples from Nan and Chiang Mai provinces were 24.0 ± 0.6 and 24.5 ± 0.4 mg/g, respectively. After removing the pigment, the sericin was extracted using a mixture of sodium carbonate (Na_2CO_3) and sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3) in the presence of 2% (v/v) sodium dodecyl sulfate (SDS) at 95 °C for 30 min. In the purification step, the degumming solution was precipitated with 5 % (v/v) acetic acid to obtain sericin. For fibroin, the degummed silk was dissolved in a mixed solution of CaCl_2 , ethanol and water. The results showed that the amounts of sericin and fibroin in the cocoons samples from Nan province were 67.7 ± 4.9 mg/g and 550 ± 21 mg/g, respectively

while those samples from Chiang Mai province were 77.8 ± 7.1 mg/g and 576 ± 33 mg/g, respectively. The analysis revealed that the amounts of pigment, sericin and fibroin extracted from silk cocoon raised in Chiang Mai province were not significantly different from those raised in Nan province. Hence, this result indicated that the differences in weather, and harvesting conditions did not affect the qualities of mulberry leaves used for feeding the silkworms, thus they did not cause any differences in the amounts of the compounds under study. However, the identities of the extracted products i.e., pigment, sericin and fibroin, were finally verified through their functional groups using Fourier Transform Infrared Spectroscopy.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การแยก ไฟโบรอิน เซรีซิน และสารสี ออกให้หมดจากรังไหมไทยสีเหลือง
ผู้เขียน	นางสาวรุจิรา ปิ่นแก้ว
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เคมี)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร. สุรศักดิ์ วัฒนศักดิ์

บทคัดย่อ

E46270

ปัจจุบัน มีการศึกษาการสกัดโปรตีนไหมที่ประกอบด้วยเซรีซิน และไฟโบรอินกันอย่างแพร่หลาย เช่นเดียวกับการนำไปประยุกต์ ยิ่งไปกว่านั้น องค์ประกอบที่เป็นสารสีของรังไหมสีเหลืองยังน่าสนใจ เพราะว่ามีสารจำพวกแคโรทีนอยด์ และฟลาโวนอยด์ที่มีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระที่ดี ในงานวิจัยนี้ ได้ทำการแยกไฟโบรอิน เซรีซิน และสารสีออกให้หมดจากรังไหมไทยสีเหลืองที่มาจากสองแหล่ง (จังหวัดเชียงใหม่และน่าน) การสกัดสารสีได้ดำเนินการเพื่อหาสภาวะการสกัดที่เหมาะสม เช่น ชนิดของตัวทำละลาย สภาพกรด-เบส อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการสกัด ได้มีการตรวจวัดปริมาณของสารสีที่สกัดได้โดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี การแยกที่สมบูรณ์ของสารสีจากรังไหมทำได้โดยการสกัดแบบรีฟลักซ์ซ้ำ 4 ครั้ง ด้วยตัวทำละลายที่ประกอบด้วย 0.80 โมลาร์โซเดียมแอซิเตด ในเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 80 °ซ เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งปริมาณสารสีทั้งหมดที่สกัดได้ คือ 24.0 ± 0.6 และ 24.5 ± 0.4 มิลลิกรัมต่อกรัมของตัวอย่างรังไหมจากจังหวัดน่าน และเชียงใหม่ ตามลำดับ สำหรับการสกัดเซรีซิน หลังจากที่เราสารสีออกแล้ว นำมาลอกกาวโดยใช้สารละลายผสมของ โซเดียมคาร์บอเนต โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตและ สารละลายโซเดียมโคเดซิลซัลเฟต เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยต้มที่ 95 °ซ เป็นเวลา 30 นาที ในขั้นตอนการทำเซรีซินให้บริสุทธิ์นั้น ทำได้โดยนำสารละลายที่ได้จากกระบวนการลอกกาวไหม มาตกตะกอนด้วยกรดแอซิดิก เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์สำหรับไฟโบรอิน ได้นำไหมที่ผ่านการลอกกาวแล้ว มาละลายในสารละลายผสมของ แคลเซียมคลอไรด์ เอทานอล และน้ำ สำหรับปริมาณเซรีซิน และไฟโบรอิน ที่มีในตัวอย่างรังไหมจากจังหวัดน่าน คือ 67.7 ± 4.9 และ 550 ± 21 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ขณะที่ปริมาณเซรีซิน และไฟโบรอินในตัวอย่างจากจังหวัดเชียงใหม่ คือ 77.8 ± 7.1 และ 576 ± 33 มิลลิกรัมต่อกรัม

E46270

ตามลำดับ จะเห็นว่า สารสี เซรีซิน และไฟโบรอินที่สกัดจากรังไหมไทยสีเหลืองที่เลี้ยงในจังหวัด เชียงใหม่ มีปริมาณที่ไม่แตกต่างไปกว่าสารต่างๆในรังไหมที่เลี้ยงในจังหวัดน่านอย่างเป็นนัยสำคัญ จากผลลัพธ์ที่ได้นี้ แสดงให้เห็นว่าความแตกต่างของสภาพอากาศ และการเก็บเกี่ยว ไม่มีผลต่อ คุณภาพของไหมหม่อนที่ใช้เลี้ยงหนอนไหม จึงทำให้ไม่เกิดความแตกต่างของปริมาณของสารต่างๆ ที่ทำการศึกษา แต่อย่างไรก็ตาม ได้มีการยืนยันเอกลักษณ์ของสารที่สกัดได้จากหมู่ฟังก์ชันต่างๆ ของสารสี เซรีซิน และไฟโบรอิน โดยใช้เทคนิคฟูเรียทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี อีก ด้วย

TABLE OF CONTENTS

	Page
ACKNOWLEDGEMENTS	iii
ABSTRACT (ENGLISH)	iv
ABSTRACT (THAI)	vi
LIST OF TABLES	xiii
LIST OF FIGURES	xiv
ABBREVIATIONS AND SYMBOLS	xix
 CHAPTER 1 INTRODUCTION	 1
1.1 Methods of separation	1
1.1.1 Separation of a Solid-Solid Mixture	4
1.1.1.1 Sublimation	4
1.1.1.2 Magnetic Separation	4
1.1.1.3 Solvent Extraction	5
1.1.2 Separation of a Solid-Liquid Mixture	5
1.1.2.1 Suspension	6
1) Sedimentation or Decantation	6
2) Centrifugation	6
3) Filtration	7

1.1.2.2	Solution	8
1)	Evaporation	8
2)	Crystallization	9
3)	Simple Distillation	9
1.1.2.3	Colloid	10
	Chromatography	10
1.1.3	Separation of a Liquid – Liquid Mixture	11
1.1.3.1	Fractional distillation	11
1.1.3.2	Funnel separation	12
1.2	Solvent Extraction Method	12
1.2.1	Heat Reflux Extraction (HRE)	13
1.2.2	Soxhlet Extraction (SE)	13
1.2.3	Ultrasound-assisted Extraction (UAE)	14
1.2.4	Microwave-assisted Extraction (MAE)	15
1.2.5	Subcritical Water Extraction (SWE)	16
1.3	Purification method	19
1.3.1	Precipitation	19
1.3.2	Dialysis	20
1.4	Experimental techniques	21
1.4.1	Ultraviolet and Visible spectrophotometry	21
1.4.2	Fourier Transform Infrared spectroscopy (FT-IR)	22
1.5	Silks	26
1.5.1	Composition of raw silk cocoon	29
1.5.2	Pigments in silk cocoon	31

1.5.2.1 Carotenoids	34
1.5.2.2 Flavonoids	38
1.5.3 Solvent extraction of pigments	41
1.5.4 Techniques for pigment quantification	44
1.5.5 Structure of silk protein	45
1.5.6 Interactions between silk fibroin and silk sericin	46
1.5.7 Amino acid composition of silk proteins	47
1.5.8 Silk sericin	49
1.5.9 Silk fibroin	51
1.6 Research Objectives	53
CHAPTER 2 EXPERIMENTAL	54
2.1 Chemicals, materials and equipment	54
2.1.1 Chemicals	54
2.1.2 Materials	55
2.1.3 Equipment	55
2.2 Preparation of solutions	56
2.3 Procedures	59
2.3.1 Pigment Extraction and Determination of total pigments	59
2.3.1.1 Solvent selection	60
2.3.1.2 Factors affecting pigments extraction	61
1) Effect of methanol and ethanol concentrations	61
2) Effect of temperature and extraction time	62
3) Effect of solvent polarity	62

4) Effect of acidity/alkalinity	63
5) Effect of ionic strength	63
2.3.1.3 Determination of the total pigments	64
2.3.2 Extraction and Determination of the sericin protein	64
2.3.3 Extraction and Determination of the fibroin protein	65
2.3.4 Structural characterizations of fibroin sericin and pigment powders	65
CHAPTER 3 RESULTS AND DISCUSSION	66
3.1 Pigment Extraction and Determination of total pigments	66
3.1.1 Solvent selection	67
3.1.2 Factors affecting pigment extraction	69
3.1.2.1 Effect of methanol and ethanol concentrations	71
3.1.2.2 Effect of temperature and extraction time	74
3.1.2.3 Effect of solvent polarity	76
3.1.2.4 Effect of acidity/alkalinity	77
3.1.2.5 Effect of ionic strength	79
3.1.3 Determination of total pigments	82
3.2 Extraction and Determination of the sericin and fibroin proteins	86
3.3 Structural determination of sericin fibroin and pigment powders	91
CHAPTER 4 CONCLUSION	98
REFERENCES	100
APPENDIX	116

CURRICULM VITAE	121
THE RELEVANCE OF THE RESEARCH WORK TO THAILAND	131

LIST OF TABLES

Table	Page
1.1 Common separation methods in chemistry laboratory	3
1.2 Characteristic infrared bands of peptide linkage	23
1.3 The different species of silkworms and the types of leaves	27
1.4 The chemical composition of silk	30
1.5 Amino acid composition of fibroin and sericin	48
3.1 The absorbances of total carotenoid extract in Thai yellow silk cocoon, var. <i>Nangnoi Si Sa Ket</i> (Nan province) in each extracted batch	83
3.2 The weight of total pigment in Thai yellow silk cocoon, var. <i>Nangnoi Si Sa Ket</i> (Nan and Chiang Mai provinces)	85
3.3 Weights and percentages of pigment, sericin and fibroin powder	90
3.4 Frequency ranges of characteristic absorption bands of amides in crystalline state	92
3.5 Comparison of IR absorption bands of fibroin as amide I, amide II and amide III	96
3.6 Comparison of IR absorption bands of sericin as amide I, amide II	96

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1.1 Diagram illustrating methods for mixture separation	2
1.2 Sublimation of ammonium chloride	4
1.3 Separation of a magnetic substance by a magnet	5
1.4 Centrifugation method for separating particles; (a) differential centrifugation and (b) rate-zonal centrifugation	7
1.5 Rotary evaporator	8
1.6 Simple distillation	9
1.7 Column chromatography	10
1.8 Fractional distillation	11
1.9 Funnel separation	12
1.10 Heat reflux extraction	13
1.11 Soxhlet extraction	14
1.12 Assemble of ultrasound-assisted Soxhlet extraction	15
1.13 The heating principles of classical conduction and the MAE	16
1.14 The phase diagram of water	17
1.15 Schematic representation of hydrophobic, negatively and positively charged areas of general protein	19

1.16	Dialysis	20
1.17	Systematic diagram of UV-Vis instrument	22
1.18	Characteristic amide bands as exhibited by a capillary film of N- methylacetamide	24
1.19	Diagram of the components of infrared spectrophotometer	24
1.20	Source of silk and processes of making silk fiber	28
1.21	SEM images of (a) the structure of a silk cocoon and (b) cross sectional structure of silk fiber showing the fibroin-sericin co-existence	29
1.22	Application of sericin in various industries	30
1.23	Chemical structure of (a) Lutein and (b) Quercetin	32
1.24	Silk cocoon with different colors (a) pink cocoon; (b) yellow; (c) whitish sasa; (d) deep sasa; (e) golden-yellow; (f) white	33
1.25	Some example of silk cocoons found in Thailand	34
1.26	Basic structure of carotenoid	35
1.27	Chemical structure of some carotenoids	36
1.28	Role of carotenoids in the prevention of chronic diseases	38
1.29	Basic flavonoid structure	39
1.30	Chemical structure of some flavonoids	40
1.31	Common structure of protein	45
1.32	Secondary structure of proteins include <i>random coil</i> (no structure), <i>alpha-helix</i> , the <i>beta-sheet</i> , and the <i>turn</i>	46
1.33	Schematic representation of the intermolecular hydrogen bonding at the boundary of silk fibroin and silk sericin	47

1.34	Photographs of sericin film, gel and sponge comprised of various sericin solutions (SL-1A, SL-1B and SL-1C)	51
2.1	Reflux extraction apparatus	60
2.2	Reflux extraction apparatus by heating in a water bath	62
3.1	<i>Nangnoi Si Sa Ket</i> silk cocoon samples of <i>B. mori</i> silkworms obtained from Nan and Chiang Mai provinces in Thailand	67
3.2	The yellow color of pigment extracted by various solvents	67
3.3	Chemical structures of (a) lutein (carotenoid) and (b) quercetin (flavonoid)	68
3.4	UV-Vis spectrum of pigment extracted from silk cocoon with 80%v/v ethanol	69
3.5	(a) UV-Vis spectrum of the purified lutein- binding protein dissolved in 20 mM Tris-HCl, pH 7.0 solution, (b) UV-VIS spectrum of lutein dissolved in acetone/methanol	70
3.6	UV-VIS spectrum of the quercetin	71
3.7	Effect of MeOH concentrations on the extraction of pigments	72
3.8	Effect of EtOH concentrations on the extraction of pigments	72
3.9	Absorbances of the extracted pigments in various concentrations of MeOH solution at different wavelengths	73
3.10	Absorbances of the extracted pigments in various concentrations of EtOH solution at different wavelengths	73
3.11	The effect of temperature and extraction time on pigment extraction	75
3.12	Absorbances of the pigment extracted by various polarities solvents	76
3.13	Effect of the % acetic acid added in 80% v/v EtOH solution on pigment extraction	77

3.14	Effect of concentrations of NaOH on pigment extraction	78
3.15	The electrostatic interaction between lutein and silk fiber	79
3.16	The pH value of each salt containing solution	80
3.17	Effect of salt addition on pigment extraction	80
3.18	Effect of CH ₃ COONa concentrations on pigment extraction	81
3.19	Pigment solution obtained in each extraction	82
3.20	Process of pigment extraction: (a) refluxing, (b) extracting, (c) filtering, (d) cocoon residue, (e) pigment solution (f) rotary evaporating and (g) freeze-drying	84
3.21	The freeze-dried pigment powder	84
3.22	The freeze-dried sericin powder	87
3.23	Process of sericin extraction: (a) silk cocoon after pigment removal, (b) silk degumming (c) degummed cocoon, (d) degumming solution and precipitated sericin, (e) centrifugation, (f) dialysis and (g) freeze-drying	88
3.24	Processes of preparation of fibroin powder: (a) degummed silk, (b) dissolving, (c) dialysis, (d) freeze-drying	89
3.25	The SF powder prepared by using different temperature in the process of dissolving SF fiber (a) temperature at $110 \pm 5^\circ\text{C}$, (b) temperature below 105°C	90
3.26	The vibrations responsible for the amide I and amide II bands	92
3.27	FT-IR spectra of fibroin powder (NAN)	93
3.28	FT-IR spectra of fibroin powder (Chiang Mai)	94
3.29	FT-IR spectra of sericin powder (NAN)	95
3.30	FT-IR spectra of sericin powder (Chiang Mai)	95

3.30 FT-IR spectra of sericin powder (Chiang Mai)	95
3.31 FT-IR spectra of pigment powder	97
3.32 FT-IR spectra of lutein	97

ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

A	Absorbance
e.g.	for example
FT-IR	Fourier transform infrared spectroscopy
g	gram
h	hour
mg	milligram
mg/mL	milligram per milliliter
M	molarity
min	minute
mm	millimeter
mL	milliliter
nm	nanometer
v/v	volume by volume
w/v	weight by volume
α	alpha
β	beta
$^{\circ}\text{C}$	degree Celsius
SD	standard deviation

SS	silk sericin
kDa	kilodalton
t	time
HPLC	high performance liquid chromatography
pH	potential of hydrogen ion
%	percentage
SDS	Sodium dodecyl sulphate
UV-Vis	Ultraviolet–Visible