Final Report

Effect of Extracting Condition on Physico-Chemical and Film Properties of Gelatin from Bigeye Snapper (*Priacanthus macracanthus*) Skin and Use of the Gelatin for Clove Extract Containing Film Preparation

Thummanoon Prodpran

Soottawat Benjakul

Department of Material Product Technology and
Department of Food Technology
Faculty of Agro-Industry
Prince of Songkla University

2010

Project Code : AGR5122020052S

Project Title : Effect of Extracting Condition on Physico-Chemical and Film Properties of Gelatin from Bigeye Snapper (*Priacanthus macracanthus*) Skin and Use of the Gelatin for Clove Extract Containing Film Preparation

Investigators : Asst. Prof. Dr. Thummanoon Prodpran
Department of Material Product Technology
Faculty of Agro-Industry
Prince of Songkla University

Prof. Dr. Soottawat Benjakul
Department of Food Technology
Faculty of Agro-Industry
Prince of Songkla University

ABSTRACT

Autolysis mediated by protease associated with bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) skin was investigated. The maximal autolytic activity was observed at 60°C and pH 7.5. The proteolytic activity was strongly inhibited by 0.001 mM soybean trypsin inhibitor (SBTI), whereas pepstatin A (1 μM), EDTA (20 mM), EGTA (10 mM), iodoacetic acid (1 mM), PMSF (1 mM), E-64 (10 μM) and 1,10-phenanthroline (1 mM) showed no inhibitory effect. The result suggested that the major protease in bigeye snapper skin was a serine protease.

The proximate composition and autolytic activities of bigeye snapper skin with and without pretreatment involving deproteinization to remove non-collagenous proteins and swelling were studied. All skins constituted water as the major component in the descending order: swollen/deproteinized skin> deproteinized skin> fresh skin. No difference in hydroxyproline content was found between fresh and deproteinized skin, but the lower content was observed in swollen skin. The proteases associated with swollen/deproteinized skin were characterized at 60°C and pH 7.5 by using different inhibitors. Proteolysis of swollen skin was almost inhibited in the presence of 0.01 mM SBTI or 20 mM EDTA, resulting in the retained β- and α-components, whereas other inhibitors had no inhibitory effect. Thus, serine protease and/or metalloprotease exhibited the predominant activity after pretreatment and involved in degradation of collagen molecules at high temperature.

Gelatins extracted from bigeye snapper skin in water without and with 0.001 mM SBTI using a skin/water ratio of 1:7 at different temperatures (35, 40, 45, 50, 55 and 60°C) for 12 h were characterized. In the presence of SBTI, the degradation was markedly inhibited. However, β-chain disappeared and α-chains underwent degradation to some extent at temperatures above 50°C. Generally, a higher yield of gelatin was obtained as the extracting temperature increased ($p<0.05$). The addition of 0.001 mM SBTI caused a lower gelatin yield. However, SBTI had no impact on

bloom strength of resulting gelatin. Therefore, gelatins extracted at 50°C and 55°C in the absence of SBTI were used for film preparation. Films prepared from gelatin extracted in the absence of SBTI at 55°C had the greater tensile strength (TS: 45.25 MPa) and elongation at break (EAB: 20.00%) than did those from gelatin extracted at 50°C ($p<0.05$). However, no differences in water vapor permeability (WVP) were observed ($p>0.05$). The former was generally transparent and clear.

Compositions and properties of gelatin extracted in the absence of SBTI at 55°C from bigeye snapper skin was analyzed in comparison with bovine bone gelatin. Gelatin from bigeye snapper skin consisted of lower hydroxyproline content (108.30 mg/g dry sample) than did bovine bone gelatin (115.71 mg/g dry sample). This resulted in the lower bloom strength of the former. Microstructural study revealed that the gel of gelatin from bigeye snapper skin possessed the larger amount of pores with the loosen structure, compared with that of bovine bone gelatin.

Clove extract containing phenolic compounds exhibited both antioxidative and antimicrobial activities in a dose-dependent manner. Clove extract could inhibit *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. The extract was stable when heated up to 50°C for 30-60 min. The clove extract was incorporated into the film forming solution at various concentrations (0-3%). The addition of clove extract could increase the TS and EAB of the resulting film. Higher film solubility was noticeable when clove extract was incorporated into the film. Gelatin film without clove extract had the smooth surface and tended to possess the rougher surface as the concentration of clove extract increased. After the film forming solution was dried, total phenolic content in the resulting gelatin-based film markedly decreased. Those phenolics could bind tightly with gelatin molecules and those phenols in the free form were much lowered, leading the decrease in DPPH radical scavenging activity, reducing power and antimicrobial activity. Additionally, films incorporated with clove extract at various concentrations could not inhibit the growth of *E. coli* and *C. albicans*, while *S. aureus* was inhibited to some extent.

รหัสโครงการ : AGR5122020052S

ชื่อโครงการ : ผลของสภาวะการสกัดต่อสมบัติเคมีกายภาพและสมบัติฟิล์มของเจลาตินจากหนังปลาตาหวาน (*Priacanthus macracanthus*) และการใช้เจลาตินเพื่อเตรียมเป็นแผ่นฟิล์มที่มีสารสกัดกานพลูเป็นส่วนผสม

ชื่อนักวิจัย : ผศ.ดร.ธรรมนูญ โปรดปราน
ภาควิชาเทคโนโลยีวัสดุภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ศ.ดร.สุทธวัฒน์ เบญจกุล
ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการย่อยสลายตัวเองของหนังปลาตาหวานหนังบางพบว่ามีกิจกรรมสูงสุดที่ อุณหภูมิ 60°ซ และพีเอช 7.5 โดยกิจกรรมดังกล่าวสามารถยับยั้งได้โดยสารยับยั้งทริปซินจากถั่วเหลืองเข้มข้น 0.001 มิลลิโมลาร์ แต่ไม่สามารถยับยั้งโดยเปปสตาติน *เอ (1 ไมโครโมลาร์)* อีดีทีเอ (20 มิลลิโมลาร์) อี-64 (10 ไมโครโมลาร์) และ 1,10-ฟีเนนโทรลีน (1 มิลลิโมลาร์) ดังนั้นเอนไซม์โปรตีเอสหลักในหนังปลาตาหวานหนังบางจึงจัดจำแนกเป็นเอนไซม์กลุ่มซีรีนโปรตีเอส

จากการศึกษาองค์ประกอบหลักและกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของหนังปลาตาหวานหนังบางที่ไม่ผ่าน และผ่านการเตรียมตัวอย่างซึ่งประกอบด้วยการกำจัดโปรตีนอื่นที่ไม่ใช่คอลลาเจน และ การทำให้พองตัว พบว่า หนังปลาจากขั้นตอนต่างๆ มีน้ำเป็นองค์ประกอบหลักเรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้คือ หนังปลาที่ผ่านการกำจัดโปรตีนอื่นที่ไม่ใช่คอลลาเจนและทำให้พองตัว > หนังปลาที่ผ่านการกำจัดโปรตีนอื่นที่ไม่ใช่คอลลาเจน > หนังปลาสด หนังปลาสดและหนังปลาที่ผ่านการกำจัดโปรตีนอื่นที่ไม่ใช่คอลลาเจนมีปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนไม่แตกต่างกัน ส่วนหนังปลาที่ผ่านการกำจัดโปรตีนอื่นที่ไม่ใช่คอลลาเจน และการทำให้พองตัวมีปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนลดลง การจัดจำแนกเอนไซม์โปรตีเนสในหนังปลาที่ผ่านการเตรียมตัวอย่างที่อุณหภูมิ 60°ซ และพีเอช 7.5 พบว่า กิจกรรมการย่อยสลายตนเองของหนังปลาดังกล่าวสามารถยับยั้งได้โดยสารยับยั้งทริปซินจากถั่วเหลืองเข้มข้น 0.01 มิลลิโมลาร์ และ อีดีทีเอเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ โดยตัวอย่างประกอบด้วยสายโปรตีน β และ α ในขณะที่สารยับยั้งชนิดอื่นไม่สามารถยับยั้งการย่อยสลายตัวเอง ดังนั้นภายหลังการเตรียมตัวอย่าง เอนไซม์ซีรีนโปรตีเอสและ/หรือเมทัลโลโปรตีเนสเป็นเอนไซม์หลักที่มีบทบาทในการย่อยสลายคอลลาเจนในหนังปลาตาหวานหนังบางที่อุณหภูมิสูง

จากการศึกษาการสกัดเจลาตินจากหนังปลาตาหวานหนังบางด้วยน้ำ ในสภาวะที่ไม่มี และมีสารยับยั้งทริปซินจากถั่วเหลืองเข้มข้น 0.001 มิลลิโมลาร์ ด้วยอัตราส่วนหนังปลาที่ทำให้พองตัว:น้ำ เท่ากับ 1:7 โดยใช้อุณหภูมิสกัดต่างๆ (35 40 45 50 55 และ 60°ซ) เป็นระยะเวลา 12 ชม. พบว่า การสกัดเจลาตินในสภาวะที่มีการเติมสารยับยั้งทริปซินจากถั่วเหลือง สามารถยับยั้งการย่อยสลายเจลาตินในหนังปลาตาหวาน

หนังบาง อย่างไรก็ตามเมื่ออุณหภูมิสกัดสูงกว่า 50°ซ พบว่าสายโปรตีน β มีการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ และสายโปรตีน α มีการย่อยสลายบางส่วน ทั้งนี้อุณหภูมิสกัดที่เพิ่มขึ้นมีผลให้ร้อยละของผลผลิตเจลาตินเพิ่มขึ้น ($p<0.05$) และการเติมสารยับยั้งทริปซินจากถั่วเหลืองทำให้ร้อยละของผลผลิตเจลาตินต่ำลง อย่างไรก็ตามสารยับยั้งทริปซินจากถั่วเหลืองไม่มีผลต่อค่าความแข็งแรงของเจล ดังนั้นจึงคัดเลือกเจลาตินซึ่งสกัดที่อุณหภูมิ 50 และ 55°ซ ภายใต้สภาวะที่ไม่มีสารยับยั้งทริปซินจากถั่วเหลืองสำหรับเตรียมฟิล์ม โดยฟิล์มที่เตรียมจากเจลาตินที่สกัดภายใต้สภาวะที่ไม่มีสารยับยั้งทริปซินจากถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 55°ซ มีความต้านทานแรงดึง (TS) (45.25 เมกกะปาสคาล) และการยืดตัวเมื่อขาด (EAB) (ร้อยละ 20.00) มากกว่าฟิล์มจากเจลาตินซึ่งสกัดที่อุณหภูมิ 50°ซ ($p<0.05$) อย่างไรก็ตามความสามารถในการซึมผ่านไอน้ำของแผ่นฟิล์มดังกล่าวไม่มีแตกต่างกัน ($p>0.05$) โดยทั่วไปฟิล์มที่เตรียมจากเจลาตินที่สกัดที่ 50°ซ มีลักษณะโปร่งใส

เมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบและสมบัติของเจลาตินจากหนังปลาตาหวานหนังบางที่สกัดภายใต้สภาวะที่ไม่มีสารยับยั้งทริปซินจากถั่วเหลืองที่ 55°ซ กับเจลาตินจากกระดูกวัวพบว่า เจลาตินจากหนังปลาตาหวานหนังบางมีปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน (108.30 มิลลิกรัม/กรัม นน.แห้ง) น้อยกว่าเจลาตินจากกระดูกวัว (115.71 มิลลิกรัม/กรัม นน.แห้ง) ส่งผลให้ความแข็งแรงของเจลาตินต่ำกว่า เมื่อศึกษาโครงสร้างระดับจุลภาคพบว่าเจลของเจลาตินจากหนังปลาตาหวานหนังบางมีรูพรุนและโครงสร้างจับกันแบบหลวมๆ

สารสกัดกานพลูซึ่งประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลิกแสดงกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ และกิจกรรมยับยั้งจุลินทรีย์โดยขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัด สารสกัดกานพลูสามารถยับยั้ง *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Candida albicans* ได้ สารสกัดกานพลูมีความคงตัวเมื่อให้ความร้อนสูงถึง 55°ซ เป็นระยะเวลา 30-60 นาที เมื่อเติมสารสกัดกานพลูความเข้มข้นต่างๆ (ร้อยละ 0-3) ในสารละลายฟิล์ม พบว่า TS และ EAB ของฟิล์มที่ได้มีค่าสูงขึ้น และมีผลให้ความสามารถในการละลายของฟิล์มมีค่าสูงขึ้น ผิวหน้าของฟิล์มเจลาตินที่ไม่เติมสารสกัดกานพลูมีลักษณะเรียบ และขรุขระเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดกานพลูสูงขึ้น เมื่อสารละลายฟิล์มแห้ง ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในฟิล์มมีปริมาณลดลงอย่างเห็นได้ชัด ทั้งนี้สารประกอบฟีนอกลิกอาจเชื่อมประสานและจับกับโมเลกุลเจลาติน สารประกอบฟีนอลิกอิสระจึงมีปริมาณลดลงส่งผลให้ความ สามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ค่า reducing power และการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ลดลง โดยฟิล์มที่มีสารสกัดกานพลูไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *C. albicans* แต่สามารถยับยั้งกิจกรรมของ *S. aureus* ได้