Project Code : AGR560020S

Project Title : Extraction and characterization of seaweed extract and its use for property improvement of fish-skin gelatin film

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

Dr. Ponusa Jitphuthi
Department of Material Product Technology
Faculty of Agro-Industry
Prince of Songkla University

ABSTRACT

Total phenolic content and antioxidative and antimicrobial activities of methanolic and ethanolic extracts from brown seaweeds, *Turbinaria ornata* and *Sargassum polycystum*, were determined. Among all extracts, methanolic extract of *T. ornata* contained the highest total phenolic content (2.07 mg catechin/g dry seaweed) ($p<0.05$) and exhibited the highest antioxidative activity as indicated by the greatest ABTS and DPPH radical scavenging activity as well as reducing activity power (RAP), compared with other extracts ($p<0.05$). When different concentrations of seaweed extracts (100-500 mg/L) were used, antioxidative activities were dose-dependent. Correlations between ABTS and DPPH radical scavenging activity; DPPH radical scavenging activity and RAP; ABTS radical scavenging activity and RAP were observed. Therefore, antioxidants in seaweed extracts possessed the capability of scavenging the radicals together with reducing power. The efficacy in prevention of lipid oxidation of methanolic extract of *T. ornata* in lecithin-liposome and linoleic oxidation systems was studied. The extract at levels of 100-500 mg/L could retard the oxidation, regardless of chlorophyll removal but its efficacy was lower than that of BHT at levels of 50 and 200 mg/L. For antimicrobial activity, all extracts could not inhibit the growth of *B. subtilis*, *S. enteritidis* and *A. niger*, while *S. aureus* was inhibited with the extracts at 500 mg/L.

Effects of the extract from *T. ornata* with different pHs (8, 9 and 10) and concentrations (3 and 6%) on the changes of gelatin film forming solutions (FFS) were studied. FFS incorporated with 6% extract having pHs 9 or 10 showed the lowest free amino group content ($p<0.05$). FFS incorporated with seaweed extract and subjected to pH adjustment had the higher DPPH and ABTS scavenging activities than those without pH adjustment ($p<0.05$). The degradation of β and α- component of occurred in all FFS, regardless of seaweed extract addition.

When gelatin based film from FFS incorporated with the extract at pHs 9 or 10 were prepared and investigated in comparison with the control film, those incorporated with the extract exhibited the higher elongation at break (EAB) than those without the extract ($p<0.05$). However, no differences in tensile strength (TS) and transparency between films without and with the extract were observed ($p>0.05$). The lower water vapor permeability (WVP), film solubility, protein solubility, degree of hydrolysis and protein solubility in various solvents were found in gelatin film containing the extract, compared with those without the extract ($p<0.05$). Gelatin film without seaweed extract had smooth surface while the rougher surface was noticeable in film incorporated with seaweed extract. The transition temperature of gelatin film incorporated with 6% seaweed extract at pH 10 shifted to the higher temperature (178.96°C).

During the storage under 54% relative humidity at room temperature (28-30°C), TS of gelatin film without seaweed extract increased continuously, while EAB decreased markedly when storage time increase up to 3 weeks ($p<0.05$). Gelatin film incorporated with seaweed extract had a lesser changes in TS and EAB, compared with the control film. Slight decreases in water barrier property of all films were obtained throughout the storage time up to 4 weeks ($p<0.05$). Moisture content of all gelatin films increased slowly at Aw of 0.18-0.64 and increased rapidly at Aw of 0.64-0.90. Film solubility and protein solubility decreased continuously during storage. All films became darker and more yellowish as storage time increased, especially in the control film.

รหัสโครงการ : AGR560020S

ชื่อโครงการ : การสกัดและศึกษาคุณลักษณะของสารสกัดจากสาหร่ายทะเลและการใช้เพื่อปรับปรุงสมบัติของฟิล์มเจลาตินจากหนังปลา

ชื่อนักวิจัย : ผศ.ดร.ธรรมนูญ โปรดปราน
ภาควิชาเทคโนโลยีวัสดุภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ศ.ดร.สุทธวัฒน์ เบญจกุล
ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ดร.พรอุษา จิตพุทธิ
ภาควิชาเทคโนโลยีวัสดุภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทคัดย่อ

จากการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก กิจกรรมการต้านออกซิเดชันและ กิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล 2 สายพันธุ์ (*Turbinaria ornata* และ *Sargassum polycystum*) ด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ เมธานอลและเอธานอล พบว่าสาหร่ายทะเลสายพันธุ์ *T. ornata* ที่สกัดด้วยเมธานอลมีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกสูงสุด (2.07 มก. คาเทชิน/กรัม นน. แห้ง) ($p<0.05$) และมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูงสุด โดยตรวจสอบจากความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ABTS และความสามารถในการรีดิวซ์ RAP ที่สูงสุด ($p<0.05$) กิจกรรมการต้านออกซิเดชันเพิ่มขึ้นเมื่อระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้เพิ่มขึ้น (100-500 มก/ลิตร) โดยมีความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ABTS และ DPPH, DPPH และ RAP, ABTS และ RAP ดังนั้นสารสกัดจากสาหร่ายทะเลจึงมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและความสามารถในการให้อิเลคตรอน จากการทดสอบประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากสาหร่าย *T. ornata* ที่ระดับความเข้มข้น 100-500 มก./ลิตรในระบบเลซิติน-ลิโปโซมและลิโนเลอิก พบว่าสารสกัดจากสาหร่ายทะเลทั้งที่กำจัดและไม่กำจัดคลอโรฟิลล์มีประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันแต่ประสิทธิภาพต่ำกว่าสารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ BHT ที่ระดับ 50 และ 200 มก./ลิตร สำหรับการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์พบว่าสารสกัดจากสาหร่ายทะเลทั้ง 2 สายพันธุ์ไม่สามารถยับยั้ง *Bacillus subtilis, Salmonella enteritidis* และ *Aspergillus niger* แต่สามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ได้ที่ระดับความเข้มข้น 500 มก./ลิตร

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารละลายฟิล์มเจลาตินที่เติมสารสกัดจากสาหร่ายทะเล (*T. ornata*) ที่ระดับพีเอชต่างๆ (8 , 9 และ 10) และความเข้มข้นแตกต่างกัน (ร้อยละ 3 และ 6) พบว่าสารละลายฟิล์มที่เติมสารสกัดสาหร่ายที่ระดับพีเอช 10 ความเข้มข้นร้อยละ 6 มีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระต่ำสุด ($p<0.05$) สารละลายฟิล์มที่ปรับพีเอชให้เท่ากับพีเอชของสารสกัดสาหร่ายทะเลที่เติมลงไปมีค่าการต้านอะนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS สูงกว่าสารละลายฟิล์มที่ไม่

มีการปรับพีเอช เมื่อศึกษารูปแบบโมเลกุลของสารละลายฟิล์มเจลาตินพบว่าสารละลายฟิล์มที่เติมและไม่เติมสารสกัดจากสาหร่ายทะเลมีย่อยสลายของสายโปรตีนชนิดบีตาและแอลฟา

เมื่อทำการศึกษาฟิล์มเจลาตินที่เตรียมจากสารละลายฟิล์มที่ไม่เติมและเติมสารสกัดสาหร่ายทะเลที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 6 พีเอช 9 และ 10 พบว่าฟิล์มเจลาตินที่เติมสารสกัดสาหร่ายทะเลมีค่าระยะยืดเมื่อขาดสูงกว่าฟิล์มที่ไม่เติมสารสกัด ($p<0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างของค่าการทนต่อแรงดึงและความโปร่งใส ($p>0.05$) ฟิล์มเจลาตินที่เติมสารสกัดสาหร่ายทะเลมีค่าการซึมผ่านไอน้ำ การละลายของฟิล์ม การละลายของโปรตีน การย่อยสลายโดยเอนไซม์ และการละลายของโปรตีนในตัวทำละลายชนิดต่างๆ ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มที่ไม่เติมสารสกัด ผิวหน้าของฟิล์มเจลาตินในชุดควบคุมมีลักษณะเรียบและการเติมสารสกัดจากสาหร่ายทะเลมีผลให้ฟิล์มที่ได้มีพื้นที่ผิวที่ขรุขระ และอุณหภูมิในการเปลี่ยนสถานะของฟิล์มเจลาตินที่เติมสารสกัดสาหร่ายทะเลที่ระดับพีเอช 10 มีค่า 178.96 องศาเซลเซียส

จากการศึกษาการเก็บรักษาฟิล์มเจลาตินที่ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 54 และอุณหภูมิห้อง (28-30 °ซ) พบว่าฟิล์มเจลาตินที่ไม่มีเติมสารสกัดสาหร่ายทะเลมีค่าการทนต่อแรงดึงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและค่าระยะยืดเมื่อขาดลดลงอย่างชัดเจนในช่วง 3 สัปดาห์แรก ($p<0.05$) ส่วนฟิล์มเจลาตินที่เติมสารสกัดสาหร่ายทะเลมีการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางกลเพียงเล็กน้อย ฟิล์มเจลาตินทุกตัวอย่างมีการเปลี่ยนแปลงสมบัติการป้องกันการซึมผ่านของไอน้ำเพียงเล็กน้อยตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 4 สัปดาห์ ($p<0.05$) ความชื้นของฟิล์มทุกตัวอย่างมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆเมื่อมีการเก็บรักษาที่ Aw ต่ำ (0.18-0.64) และค่าความชื้นเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเก็บรักษาที่ Aw สูงขึ้น (0.64-0.90) ในระหว่างการเก็บรักษาการละลายของฟิล์มและการละลายของโปรตีนมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น ฟิล์มมีลักษณะคล้ำขึ้นและมีสีเหลืองเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งตัวอย่างฟิล์มในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมสารสกัดสาหร่ายทะเลซึ่งมีสีเหลืองเกิดขึ้นอย่างเด่นชัด

ACKNOWLEDGEMENT

We would like to express our sincere thank to Prince of Songkla University for the financial support of this research (Grant no. AGR560020S). We also would like to thank Miss Saowapa Rattaya for her assistance throughout this study.

Table of Contents

	Page
Abstract	i
บทคัดย่อ	iii
Acknowledgment	v
Table of Content	vii
List of Tables	ix
List of Figures	x
Chapter	
1. Introduction	**1**
General introduction	1
Review of literature	2
1. Seaweeds	2
2. Lipid oxidation	5
3. Antioxidants	6
4. Antimicrobials	12
5. Gelatin	14
6. Protein film properties	17
Research objectives	**23**
2. Research Methodology	**25**
1. Materials	25
2. Chemicals and enzyme	25
3. Instruments	26
4. Methods	26
4.1 Extraction and characterization of seaweed extracts	26
4.2 Study on antioxidative activity of seaweed extracts	27
4.3 Study on antimicrobial activity of seaweed extracts	29
4.4 Study on gelatin cross-linking activity of seaweed extracts and the effect on properties of gelatin film	30
4.5 Moisture sorption isotherms	35
4.6 Changes of gelatin films during storage	35

Table of Contents (Continued)

Page

5. Statistical analysis 35

3. Results and Discussion **37**

1. Extraction and study on properties of seaweed extracts 37

1.1 Total phenolic content and total chlorophyll content of brown seaweed extracts 37

1.2 Antioxidative activities of brown seaweed extracts 38

1.3 The correlation between antioxidative activities tested by different assays 42

1.4 Antioxidative activity of seaweed extract in different systems 44

1.5 Antimicrobial activity of brown seaweed extracts 47

2. Effect of the incorporation of seaweed extract on cross-linking and film properties of bigeye snapper skin gelatin 48

2.1 Compositions and protein pattern of bigeye snapper skin gelatin 48

2.2 Effect of pH and concentration of seaweed extract on characteristics of gelatin film forming solutions and properties of resulting films 50

2.3 Characterization of bigeye snapper skin gelatin film incorporated with seaweed extract 58

2.4 Moisture sorption isotherm 65

2.5 Changes of gelatin films during storage 66

4. Conclusions **73**

References 75

Research outputs 89

Index 91

List of Tables

Table		Page
1	Amino acid composition of gelatin from different fish species	16
2	Barrier properties, mechanical properties and soluble matter of gelatin films	19
3	Total phenolic content (TPC) of methanolic and ethanolic extract of *T. ornata* and *S. polycystum* without and with chlorophyll removal	37
4	Total chlorophyll content of methanolic and ethanolic extract of *T. ornata* and *S. polycystum* without and with chlorophyll removal	38
5	Inhibition zone of different microorganisms in the presence of methanolic and ethanolic extracts of *T. ornata* and *S. polycystum* with and without chlorophyll removal at 500 mg/L	48
6	Proximate composition and hydroxyproline content of bigeye snapper skin gelatin	49
7	TNBS and radical scavenging activities of gelatin FFS incorporated with seaweed extract at different concentrations and pHs	51
8	Thickness and mechanical properties of gelatin film prepared from FFS containing seaweed extract adjusted to different pHs at different concentrations without and with pH adjustment to various FFS pHs	54
9	Light transmission and transparency of gelatin film prepared from FFS containing seaweed extract adjusted to different pHs at different concentrations without and with pH adjustment to various FFS pHs	56
10	Color of gelatin film prepared from FFS containing seaweed extract adjusted to different pHs at different concentrations without and with pH adjustment to various FFS pHs	57
11	Physical and mechanical properties of gelatin films containing seaweed extract at different pHs	59
12	Moisture content and color of gelatin films incorporated with seaweed extract at different pHs	60
13	Light transmission and transparency of gelatin films incorporated with 6 % seaweed extract at different pHs	60
14	Film solubility and protein solubility of gelatin films containing seaweed extract at different pHs	61
15	Film solubility and protein solubility of gelatin films containing seaweed extract at different pHs	62
16	Protein solubility (%) of gelatin films incorporated with seaweed extract at different pHs	63
17	Transition temperatures and enthalpy of gelatin films incorporated with seaweed extract at different pHs	65

List of Figures

Figure		Page
1	*Sargassum polycystum*	4
2	*Turbinaria ornata*	4
3	Structures of lanosol and lanosol derivertive in red seaweed (*Osmundaria serrata*)	10
4	Basic structures of chlorophyll	11
5	Reactions of a phenolic acid with amino side chains of polypeptides	21
6	DPPH radical scavenging activity (µmol TE/ml) of methanolic (ME) and ethanolic (EE) extracts of *T. ornata* and *S. polycystum* without (a) and with (b) chlorophyll removal at various concentrations	39
7	ABTS radical scavenging activity (µmol TE/ml) of methanolic (ME) and ethanolic (EE) extracts of *T. ornata* and *S. polycystum* without (a) and with (b) chlorophyll removal at various concentrations	41
8	Reducing activity power (µmol TE/ml) of methanolic (ME) and ethanolic (EE) extracts of *T. ornata* and *S. polycystum* without (a) and with (b) chlorophyll removal at various concentrations	42
9	Correlation between ABTS and DPPH radical scavenging activity (a), RAP and ABTS radical scavenging activity (b) and RAP and DPPH radical scavenging activity (c) of the extract of *T. ornata* and *S. polycystum* without and with chlorophyll removal	43
10	Changes in TBARS (mg MDA/ml liposome) of lecithin liposome system containing methanolic extract of *T. ornata* without (a) and with (b) chlorophyll removal at different levels	45
11	Changes in A_{500} of linoleic acid system containing methanolic extract of *T. ornata* without (a) and with (b) chlorophyll removal at different levels	46
12	Protein pattern of bigeye snapper skin gelatin under reducing (SR) and non-reducing (SN) conditions	50
13	Protein patterns of gelatin forming solution (FFS); incorporated with seaweed extract at pH 8 (A); incorporated with seaweed extract at pH 8 and the mixture was adjusted to pH 8 (B); incorporated with seaweed extract at pH 9 (C); incorporated with seaweed extract at pH 9 and the mixture was adjusted to pH 9 (D); incorporated with seaweed extract at pH 10 (E); incorporated with seaweed extract at pH 10 and the mixture was adjusted to pH 10 (F)	53
14	SEM micrographs of gelatin films	61
15	Moisture sorption isotherms at 28-30°C of gelatin films incorporated without and with seaweed extract at different pHs	66
16	Changes in tensile strength and elongation at break of gelatin films incorporated without and with seaweed extract at different pHs during storage at room temperature (28-30°C)	67

List of Figures (Continued)

Figure		Page
17	Changes in L*, a* and b*-values of gelatin films incorporated without and with seaweed extract at different pHs during storage at room temperature (28-30°C)	68
18	Changes in transparency value of gelatin-based films incorporated without and with seaweed extract at different pHs during storage at room temperature (28-30°C).	69
19	Changes in film solubility and protein solubility of gelatin films incorporated without and with seaweed extract at different pHs during storage at room temperature (28-30°C)	70
20	Changes in water vapor permeability (WVP) of gelatin films incorporated without and with seaweed extract at different pHs during storage at room temperature (28-30°C).	71