รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

สมบัติและการใช้ฟิล์มชีวภาพนาโนคอมพอสิทระหว่างเจลาตินและนาโนเคลย์

Properties and Applications of Bio-nanocomposite Film based on Gelatin and Nanoclay

ดร.พรอุษา จิตพุทธิ

ผศ.ดร.ธรรมนูญ โปรดปราน

ศ.ดร.สุทธวัฒน์ เบญจกุล

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2556 รหัสโครงการ AGR560105S

ชื่อโครงการ : สมบัติและการใช้ฟิล์มชีวภาพนาโนคอมพอสิทระหว่างเจลาตินและนาโนเคลย์

Properties and Applications of Bio-nanocomposite Film based on Gelatin and Nanoclay

คณะนักวิจัย

1. ดร.พรอุษา จิตพุทธิ (หัวหน้าโครงการ)

ภาควิชาเทคโนโลยีวัสดุภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร

2. ผศ.ดร.ธรรมนูญ โปรดปราน

ภาควิชาเทคโนโลยีวัสดุภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร

3. ศ.ดร.สุทธวัฒน์ เบญจกุล

ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร

Acknowledgement

The authors are grateful to Prince of Songkla University for the financial support on contract number AGR560105S.

Abstract

Gelatin from splendid squid (*Loligo formosana*) skin extracted at different temperatures (50-80 °C) and their corresponding films were characterized. Gelatin extracted at 80 °C showed the highest yield (45.3%, dry weight basis) with relatively higher free amino group content ($P<0.05$). However, gelatin extracted at 50 °C (G50) had the highest gel strength ($P<0.05$). G80 had the higher *a** value, compared with others ($P<0.05$). When films from those gelatins were prepared, tensile strength (TS) and elongation at break (EAB) of films decreased, but water vapor permeability (WVP) increased ($P<0.05$) as the extraction temperature increased. Increase in transparency value with coincidental decrease in lightness was observed with increasing extraction temperatures. Thermogravimetric analysis (TGA) indicated that film prepared from G80 (F80) exhibited the higher heat susceptibility and weight loss. Loosen structure was observed in film prepared from gelatin with increasing extraction temperatures.

Gelatins obtained from bleached (0-8% H_2O_2 w/v) squid skin and films from those gelatins were characterized. Gelatin from skin bleached with higher H_2O_2 concentrations had higher yield, lower free amino group and carbonyl group contents than the control gelatin ($P<0.05$). Gel strength of gelatin generally decreased as H_2O_2 concentrations increased ($P<0.05$). Gelatin prepared from skin bleached with 2% H_2O_2 showed the highest *L**, but lowest *ΔE**-values ($P<0.05$). H_2O_2 at higher concentrations yielded gelatin with increasing *b**-value. TS and WVP of films decreased, but EAB increased ($P<0.05$) as the concentration of H_2O_2 increased. TGA indicated that heat susceptibility and weight loss of different films varied with H_2O_2 concentrations. Rougher surface was obtained in gelatin films prepared from skin bleached with H_2O_2 concentrations above 4%.

The impacts of hydrophilic and hydrophobic montmorillonite (MMT) nanoclays at various levels (0-10%, w/w) on properties of tilapia skin gelatin films were investigated. Generally, mechanical properties were improved by the addition of Cloisite Na^+ in the range of 0.5-5% (w/w). The lowest WVP was observed for films incorporated with Cloisite Na^+ and Cloisite 20A at a level of 1% (w/w) ($P<0.05$). Wide angle X-ray diffraction (WAXD) and scanning electron microscopic

(SEM) analyses revealed the intercalated/exfoliated structure of films. Homogeneity and smoothness of film surface decreased with the addition of both nanoclays. The incorporation of nanoclays enhanced the rigidity and heat stability of films.

Tilapia skin gelatin films incorporated with hydrophilic and hydrophobic nanoclays with the aid of homogenization using different pressure levels (1000 to 4000 psi) and passes (2 and 4) were characterized. YM, TS and EAB of films decreased and WVP increased with increasing pressure levels and number of passes. Films incorporated with Cloisite 20A exhibited the lower WVP than those with Cloisite Na^+. Transparency of films increased when homogenization pressure and number of passes increased. Nanocomposite films prepared using homogenization had exfoliated structure, whilst those prepared without homogenization exhibited intercalated structure. TGA and DSC analyses indicated that thermal stability of nanocomposite films varied with homogenization condition.

Effects of various pHs (4-8) of film forming suspensions (FFS) on the properties of nanocomposite film based on tilapia skin gelatin and Cloisite Na^+ were investigated. In general, mechanical and water vapor barrier properties of nanocomposite films were improved when FFS having pH 6 was used. Intercalated/exfoliated structure of nanocomposite films was revealed by WAXD analysis. Homogeneity and smoothness of film surface were obtained for nanocomposite films with pH 6 as confirmed by SEM micrographs. Thermal stability of nanocomposite films varied with different pH levels.

Effects of ethanolic extract from coconut husk (EECH) at 0-0.4% (w/w) on properties of films and nanocomposite films from tilapia skin gelatin were investigated. YM, TS and EAB of both films decreased with addition of EECH ($P<0.05$). The lowest WVP was obtained for gelatin film and nanocomposite film containing 0.05% and 0.4% EECH (w/w), respectively ($P<0.05$). Generally, a^* value of films increased ($P<0.05$) with increasing levels of EECH, regardless of nanoclay incorporation. Intercalated or exfoliated structure of nanocomposite films was revealed by WAXD analysis. Based on SEM analysis, the rougher surface was found when EECH was added. EECH had varying impact on thermal stability of films.

When tilapia and squid skin gelatin films and nanocomposite films incorporated without and with EECH were used to cover mackerel meat powder, quality changes were monitored in comparison with that covered with polyethylene (PE) film and the control (without covering) during storage of 30 days at 28-30 °C. The powder covered with nanocomposite film incorporated with EECH at 0.4% (w/w) (SGF-Na-EECH) generally had the lower moisture content than those covered with other gelatin films throughout the storage. The lower PV, TBARS, TVB and pH were observed for SGF-Na-EECH sample than PE sample and the control ($P<0.05$). Based on SPME-GC-MS analysis, SGF-Na-EECH sample contained the lower volatile lipid oxidation products. Higher overall likeness score was observed for SGF-Na-EECH sample on day 30 of storage.

Therefore, fish and squid gelatins could be used as biomaterials for film preparation. The improvement of film properties could be achieved by incorporation of nanoclay, especially in combination with EECH. The film could extend the shelf-life of dried mackerel powder, mainly via the prevention of lipid oxidation.

บทคัดย่อ

เจลาตินจากหนังหมึกกล้วย (*Loligo formosana*) สกัดที่อุณหภูมิ 50-80 องศาเซลเซียสและนำไปวิเคราะห์ การทดลองพบว่าเจลาตินที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสให้ yield สูงสุดคือร้อยละ 45.3 โดยน้ำหนักแห้ง รวมทั้งปริมาณ free amino group สูงสุด ($P<0.05$) อย่างไรก็ตามเจลาตินที่ได้จากการสกัดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสให้ค่า gel strength สูงสุด เมื่อนำมาเตรียมฟิล์มและทดสอบพบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นค่า tensile strength (TS) และ elongation at break (EAB) ของฟิล์มมีค่าลดลงในขณะที่ค่าการต้านการซึมผ่านไอน้ำเพิ่มขึ้น นอกจากนี้อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ความใสของฟิล์มเพิ่มขึ้น และจากการทดสอบทางความร้อนโดย Thermogravimetric analysis (TGA) พบว่าที่อุณหภูมิในการสกัด 80 องศาเซลเซียส ฟิล์มที่ได้ทนต่อความร้อนต่ำ

เจลาตินที่ทำการฟอกสีโดยใช้ H_2O_2 (0-8%w/v) จากการทดสอบพบว่าเมื่อความเข้มข้นของ H_2O_2 เพิ่มขึ้น yield มีค่าสูงขึ้น รวมทั้งปริมาณของ free amino group และ carbonyl group มีค่าลดลงเมื่อเทียบกับ control gelatin รวมทั้งค่า gel strength มีค่าลดลง ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 พบว่า L^* มีค่าสูงสุดในขณะที่ ΔE^* มีค่าต่ำสุด เมื่อความเข้มข้นของ H_2O_2 สูงขึ้นพบว่า b^* มีค่ามากขึ้นด้วย ค่า TS และ WVP ของฟิล์มลดลง ขณะที่ EAB เพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของ H_2O_2 เกินร้อยละ 4 ส่งผลให้ผิวของฟิล์มมีความขรุขระเพิ่มมากขึ้น

ทั้งนี้มีการศึกษาผลจากการเติม hydrophilic และ hydrophobic montmorillonite (MMT) นาโนเคลย์ที่ปริมาณ 0-10%, w/w ต่อสมบัติของฟิล์มเจลาตินที่ได้จากหนังปลานิล พบว่านาโนเคลย์ Cloisite Na^+ สามารถปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิล์ม เมื่อเติมในปริมาณร้อยละ 0.5-5 โดยน้ำหนัก ทั้งนี้พบว่า WVP มีค่าต่ำสุดเมื่อเติม Cloisite Na^+ และ Cloisite 20A ร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก การศึกษาโครงสร้างและสัณฐานวิทยาของฟิล์มโดย Wide angle X-ray diffraction (WAXD) และ scanning electron microscopic (SEM) แสดงการกระจายตัวของเคลย์เป็นแบบ intercalated/exfoliated ความสม่ำเสมอและความเรียบของพื้นผิวฟิล์มลดลงเมื่อเติมนาโนเคลย์ในปริมาณมากขึ้น และการเติมนาโนเคลย์ส่งผลให้ความแข็งและเสถียรภาพทางความร้อนของฟิล์มมีค่าเพิ่มขึ้น

ต่อมาได้ศึกษาผลของการ homogenization ต่อสมบัติของฟิล์มเจลาตินจากหนังปลาที่เติม hydrophilic และ hydrophobic นาโนเคลย์ ซึ่งสภาวะที่ใช้คือ pressure levels (1000 ถึง 4000 psi) และ passes (2 และ 4) พบว่าค่า YM TS และ EAB ลดลงในขณะที่ค่า WVP เพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่ม pressure level และ pass ฟิล์มที่เติม Cloisite 20A ส่งผลให้ค่า WVP ต่ำกว่าเมื่อเติม Cloisite Na^+ นอกจากนี้การเพิ่ม homogenization pressure และ pass ส่งผลให้ฟิล์มใสขึ้น การกระจายตัวของนาโนเคลย์เป็นแบบ exfoliated

การศึกษาผลของค่า pH (4-8) ของ film forming suspensions (FFS) ต่อสมบัติของนาโนคอมพอสิทฟิล์ม พบว่าสมบัติเชิงกลและ WVP ดีขึ้นเมื่อ FFS มี pH เท่ากับ 6 และการกระจายตัวของเคลย์เป็นแบบ Intercalated/exfoliated นอกจากนี้พบว่าเสถียรภาพทางความร้อนของฟิล์มมีความแตกต่างกันเมื่อใช้ pH ต่างกัน

ทั้งนี้การเติม ethanolic ที่สกัดได้จาก coconut husk (EECH) ปริมาณร้อยละ 0-0.4 (w/w) ส่งผลให้ค่า YM TS and EAB ของฟิล์มลดลง ค่า WVP ของฟิล์มเจลาตินและฟิล์มนาโนคอมพอสิทมีค่าต่ำที่สุดเมื่อเติม EECH ปริมาณร้อยละ 0.05 และ 0.4 ตามลำดับ ค่า a^* ของฟิล์มเพิ่มขึ้นเมื่อเติม EECH มากขึ้น นอกจากนี้พบว่าการกระจายตัวของเคลย์เป็นแบบ Intercalated หรือ exfoliated และจากการวิเคราะห์โดย SEM พบว่าพื้นผิวฟิล์มมีความขรุขระเพิ่มขึ้นเมื่อเติม EECH

เมื่อนำฟิล์มนาโนคอมพอสิทที่เติม EECH มาบรรจุเนื้อปลา mackerel และเก็บรักษาที่สภาวะ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วันและนำไปตรวจสอบคุณภาพเทียบกับการบรรจุในฟิล์มที่ไม่เติม EECH ฟิล์มพอลิเอทิลีน (PE) และตัวอย่างควบคุมที่ไม่บรรจุในฟิล์ม พบว่า ฟิล์มนาโนคอมพอสิทที่ผสม EECH ปริมาณร้อยละ 0.4 โดยน้ำหนัก (SGF-Na-EECH) มีปริมาณความชื้นต่ำกว่าฟิล์มเจลาตินอื่น นอกจากนี้พบว่า PV TBARS TVB และ pH ในตัวอย่าง SGF-Na-EECH ต่ำกว่าใน PE และตัวอย่างควบคุม จากการวิเคราะห์ SPME-GC-MS พบว่าตัวอย่าง SGF-Na-EECH ให้ volatile lipid oxidation products ในปริมาณต่ำ

Executive Summary

Introduction

Polymer nanocomposites have received great interest, because of possible enhancements in mechanical and thermomechanical performance, barrier properties, environmentally-friendly flame-retardant character [1, 2]. One of the most attractive advantages, compared to the neat polymers and conventional composites, of using nanoparticles as fillers in polymers, is that the properties of the polymer matrix can be markedly improved at very low filler content. These improvements are generally associated to high surface area combined with high aspect ratio of nano-scale fillers [3, 4]. Traditionally, layered silicates (LS), such as talc and mica, have been proposed as the reinforcing fillers in polymeric materials for quite a long period of time [5]. After a major breakthrough in polymer nanocomposite technology by the Toyota research group, who achieved a polyamide 6/organically modified layered silicate with a remarkable combination of high thermomechanical properties [6, 7], the layered silicates, especially those in the class of smectite clays, and in particular montmorillonite (*mmt*), exploded in research activity. This single material became the reason to revitalize clays as functional fillers in numerous fields and applications of polymer composites, coining the term 'nanocomposites' as a new class of materials. Among the class of polymer nanocomposites, biodegradable polymer nanocomposites, the so-called bio-nanocomposites, have considerable attention in recent years, because of their biocompatibility, non-toxicity, and biodegradability [8].

Gelatin, one of the most attractive biodegradable polymers, is widely used in a board range of applications, notably, in food, cosmetic, photographic, and pharmaceutical industry [9]. Recently, fish gelatin has gained attention and possibly become the potential alternative to mammalian-based gelatin due to mad cow and chicken flue crisis, as well as for religious concerns [10]. Moreover, the fish skins, scales, bones, fins etc., which are major by-products from fish processing, can be value added by using as the raw materials for gelatin production. Although fish gelatin presents good properties, such as film-forming ability, elasticity, light and oxygen

barrier property, its limitations in commercial applications are poor mechanical properties, and low water vapor barrier property as compared to synthetic polymers.

Coconut husk is the mesocarp of coconut and a coconut is composed of about 35% of husk [11]. Coconut husk is an agricultural and industrial organic waste product, which is either burned for energy production or simply disposed. Ethanolic extract containing phenolic compounds can be obtained from coconut husk. It has been reported that these phenolics can improve the physical properties and bioactivity of gelatin films.

This research aims to improve the properties of gelatin film, in particular mechanical and water vapor barrier properties, by incorporating *mmt* and modified *mmt* into gelatin as a nano-filler. Natural plant extracts will be added to the gelatin nanocomposite films in order to extend the shelf-life of food products, particularly perishable fish and fish products.

Objective

1. To investigate the impact of nano-clay, in particular *mmt*, as well as the preparation methods on the morphological structure and properties of gelatin-based bio-nanocomposites.

2. To develop and characterize the gelatin-based bio-nanocomposite films incorporated with natural plant extracts.

3. To use gelatin based nanocomposite film for shelf-life extension of fish products.

Summary

1. Splendid squid skin gelatin extracted at 60 °C had superior gelling and film-forming abilities. Higher extraction temperature yielded the gelatin with darker color and lower functional properties. Gelatin extracted at higher temperature had weaker film network, associated with lower mechanical and water vapor barrier properties.

2. Gelatin from squid skin bleached with H_2O_2 at a concentration of 2% had the improved color. H_2O_2 at higher concentration resulted in the increasing yield, however negatively affected gelling property and color of gelatin. Gelatin from squid skin bleached with H_2O_2 at higher concentrations yielded the films with lower WVP but higher extensibility.

3. Tilapia skin gelatin film incorporated with hydrophilic nanoclay had a stronger film network than hydrophobic nanoclay. Cloisite Na^+ at a level of 1% (w/w) could effectively improve the water vapor barrier and mechanical properties as well as the thermal stability of films.

4. Homogenization under appropriate shear force, especially the conventional homogenization (CH) could improve the mechanical resistance, water vapor barrier property, transparency and thermal stability of nanocomposite fish gelatin films. The decrease in overall properties of the nanocomposite films was obtained when high pressure homogenization (HPH) under higher pressures with more than 2 passes was implemented.

5. Highest mechanical, water vapor barrier properties as well as the thermal stability were obtained when FFS with pH of 6 was used for preparation of nanocomposite films.

6. Fish gelatin film and nanocomposite film incorporated with EECH at 0.05% and 0.4% (w/w, on protein basis), respectively showed the improved water vapor barrier property.

7. Nanocomposite films from squid skin gelatin incorporated with EECH at 0.4% (w/w) could retard lipid oxidation more effectively than other films. Thus, SGF-Na-EECH film can be an alternative to synthetic films in maintaining the quality and extend the shelf-life of mackerel meat powder.

References

1. Alexandre, M. and P. Dubois, *Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials.* Materials Science & Engineering, 2000. 28: p. 1-63.
2. Manias, E., et al., *Polyethylene Nanocomposite Heat-Sealants with a Versatile Peelable Character.* Macromolecular Rapid Communications, 2009. 30(1): p. 17-23.
3. Giannelis, E.P., *Polymer Layered Silicate Nanocomposites.* Advanced Materials (Weinheim, Federal Republic of Germany), 1996. 8(1): p. 29-35.
4. LeBaron, P.C., Z. Wang, and T.J. Pinnavaia, *Polymer-layered silicate nanocomposites: an overview.* Applied Clay Science, 1999. 15(1-2): p. 11-29.
5. Maine, F.W. and P.D. Shepherd, *Mica reinforced plastics: a review.* Composites 1974. 5: p. 193-200.
6. Kojima, Y., et al., *Mechanical-properties of Nylon 6-clay hybrid.* Journal of Materials Research, 1993. 8(5): p. 1185-1189.
7. Usuki, A., et al., *Synthesis of nylon 6-clay hybrid.* Journal of Materials Research, 1993. 8: p. 1179-1184.
8. Zheng, J.P., et al., *Gelatin/montmorillonite hybrid nanocomposite. I. Preparation and properties.* Journal of Applied Polymer Science, 2002. 86(5): p. 1189-1194.
9. Schrieber, R. and H. Gareis, *Gelatine handbook: Theory and industrial practice*2007, Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 348.
10. Badii, F. and N.K. Howell, *Fish gelatin: Structure, gelling properties and interaction with egg albumen proteins.* Food Hydrocolloids, 2006. 20(5): p. 630-640.
11. Tan, I.A.W., A.L. Ahmad, and B.H. Hameed, *Adsorption of basic dye on high-surface-area activated carbon prepared from coconut husk: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies.* Journal of Hazardous Materials, 2008. 154(1-3): p. 337-346.

ภาคผนวก

1. สำเนาบทความที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว

ตามเอกสารแนบ

2. Suggested future work

1. Shelf-life and storage stability of bio-nanocomposite gelatin films should be examined.

2. Migration of nanoclays from bio-nanocomposite gelatin films to food should be investigated.