

Thesis Title	Effect of Kraft Lignin on Rheological and Functional Properties of Fish Protein-Based Biomaterial
Thesis Credits	12
Candidate	Miss Yotsavimon Sakunkittiyut
Thesis Advisors	Assoc. Prof. Suwit Siriwattanayotin Dr. Thiranan Kunanopparat
Program	Master of Engineering
Field of Study	Food Engineering
Department	Food Engineering
Faculty	Engineering
Academic Year	2011

#### Abstract

The objective of this research was to investigate the effect of Kraft lignin on rheological and functional properties of fish protein-based biomaterial. Fish protein powder plasticized with 30% glycerol was blended with 0-70% Kraft lignin; the whole content was then thermally molded. The rheological properties were determined by a capillary rheometer as well as a dynamic mechanical analyzer (DMA). Addition of Kraft lignin resulted in a decrease in the viscosity and storage modulus of the biomaterial. The rheology of plasticized fish protein/Kraft lignin biomaterial followed a shear thinning behavior and the presence of Kraft lignin in the mixture seemed to improve the rheological properties. However, Fourier transform infrared spectra revealed no new chemical bonds. The addition of Kraft lignin resulted in an increase in the protein solubility in sodium dodecyl sulfate buffer. However, the changes of the protein molecular weight of plasticized fish protein/Kraft lignin biomaterial as determined by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) were not observed. In addition, radical scavenging effect between fish protein and Kraft lignin,

which was measured using electron spin resonance (ESR) spectroscopy, was not observed. Concerning the functional properties introduction of Kraft lignin into fish protein blend improved the functional properties of the biomaterial by improving the mechanical properties and by decreasing the water absorption of the biomaterial. Therefore, addition of Kraft lignin is a good way to improve the processability as well as properties of fish protein-based biomaterial.

**Keywords:** Biomaterial/ Fish Protein/ Free Radical/ Kraft Lignin/ Polymer Blend

หัวข้อวิทยานิพนธ์	อิทธิพลของกราฟที่ลิกนินที่มีต่อสมบัติเชิงการไหลและสมบัติเชิงหน้าที่ของวัสดุย่อยสลายได้จากโปรตีนปลา
หน่วยกิต	12
ผู้เขียน	นางสาวศวิมล สกุลกิตติบุตร
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.สุวิช ศิริวัฒน์ โยธิน ดร.ถิรนนท์ คุณานพรัตน์
หลักสูตร	วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิศวกรรมอาหาร
ภาควิชา	วิศวกรรมอาหาร
คณะ	วิศวกรรมศาสตร์
ปีการศึกษา	2554

#### บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือการศึกษาผลของกราฟที่ลิกนินที่มีต่อสมบัติเชิงการไหลและสมบัติเชิงหน้าที่ของวัสดุย่อยสลายได้จากโปรตีนปลา ทั้งนี้เตรียมวัสดุผสมโดยการผสมโปรตีนปลากับกลีเซอรอลซึ่งเป็นพลาสติกไซเซอรอลในปริมาณร้อยละ 30 และกราฟที่ลิกนินตั้งแต่ร้อยละ 0-70 จากนั้นขึ้นรูปส่วนผสมทั้งหมดด้วยความร้อนโดยวิธีการอัดด้วยแรงดันและวิเคราะห์สมบัติเชิงการไหลโดยอาศัยเครื่องคาปิลารีรีโอมิเตอร์และเครื่องวิเคราะห์ทางกลศาสตร์เชิงพลศาสตร์ จากผลการทดลองพบว่าการเติมกราฟที่ลิกนินช่วยลดความหนืดและค่ามอดูลัสสะสม และพบว่าวัสดุผสมโปรตีนปลา-กราฟที่ลิกนินมีพฤติกรรมการไหลเป็นแบบเชิษฐ์ทินนิ่ง ดังนั้นการเติมกราฟที่ลิกนินจึงช่วยปรับปรุงสมบัติเชิงการไหลได้ อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์อินฟราเรดสเปกตรัมไม่แสดงให้เห็นการเกิดพันธะเคมีใหม่ นอกจากนี้พบว่าการเติมกราฟที่ลิกนินช่วยเพิ่มการละลายของโปรตีนในโซเดียมโคเด็กซิลซัลเฟตบัฟเฟอร์ แต่จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโซเดียมโคเด็กซิลซัลเฟต พอลิอะคริลาไมด์ เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ไม่พบการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน และจากการวิเคราะห์ด้วย

เครื่องอิเล็กทรอนิกส์ปิเนเรโซแนนซ์ ไม่พบผลของการจับอนุมูลอิสระระหว่างโปรตีนปลาและกราฟท์  
ลิกนิน นอกจากนี้การเติมกราฟท์ลิกนินยังช่วยปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของวัสดุย่อยสลายได้ โดยพบ  
การเปลี่ยนแปลงของสมบัติเชิงกลและการลดลงของค่าการดูดซึมน้ำของวัสดุย่อยสลายได้ ดังนั้นการเติม  
กราฟท์ลิกนินจึงน่าจะช่วยปรับปรุงสมบัติของวัสดุย่อยสลายได้จากโปรตีนปลาให้ดีขึ้นได้

คำสำคัญ: โปรตีนปลา/โพลีเมอร์ผสม/ ลิกนินกราฟท์/ วัสดุย่อยสลายได้/ อนุมูลอิสระ

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

I wish to express the sincerest gratitude to my advisors, Assoc. Prof. Suwit Siriwattanayotin and Dr. Thiranan Kunanopparat for valuable support, guidance and encouragement throughout the complete this project. I am very grateful to Asst. Prof. Dr. Montira Nopharatana for her encouraging comments, suggestions, and their time as members of the examination committee. Special thanks go to technicians and laboratory staff of the Food Engineering Department especially Mrs. Walaiporn Srichumpoung, Mrs. Ratchaneeporn Ai-Tang and Mr. Tis Ai-Tang for their helping suggestion and providing the laboratory equipments. Finally, I would like to thank my family and all friends for their assistance and encouragement.

## CONTENTS

	<b>PAGE</b>
ENGLISH ABSTRACT	ii
THAI ABSTRACT	iv
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	ix
LIST OF FIGURES	xii
LIST OF ABBREVIATIONS	xiv
<b>CHAPTER</b>	
<b>1. INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
1.1 Rational	1
1.2 Objectives	2
1.3 Scopes	3
1.4 Expected Benefit	3
<b>2. THEORY AND LITERATURE REVIEWS</b>	<b>4</b>
2.1 Fish protein	4
2.2 Production of biomaterial	9
2.3 Protein-based biomaterial	15
2.4 Lignin	22
2.5 Protein-lignin blend	29
<b>3. MATERIALS AND METHOD</b>	<b>31</b>
3.1 Raw Materials and Equivalents	31
3.2 Preparation of fish protein powder	32
3.3 Preparation of plasticized fish protein/ Kraft lignin biomaterial	33
3.4 Characterization of biomaterial	35
3.5 Characterization of plasticized fish protein/ Kraft lignin biomaterial	36
3.6 Statistical analysis	40

	<b>PAGE</b>
<b>4. RESULTS AND DISCUSSION</b>	<b>41</b>
4.1 Characterization of materials	41
4.2 Rheological properties of plasticized fish protein/ Kraft lignin blend	42
4.3 Thermomechanical properties	45
4.4 FTIR spectra	47
4.5 Protein aggregation of plasticized fish protein/ Kraft lignin biomaterial	50
4.6 Free radicals	52
4.7 Mechanical properties of plasticized fish protein/ Kraft lignin biomaterial	53
4.8 Water absorption of plasticized fish protein/ Kraft lignin biomaterial	56
<b>5. CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS</b>	<b>58</b>
5.1 Conclusions	58
5.2 Recommendation	59
<b>REFERENCES</b>	<b>60</b>
<b>APPENDICES</b>	<b>70</b>
A Proximate analysis	71
B Properties of fish protein and Kraft Lignin	72
C Rheological Properties of plasticized fish protein/ Kraft lignin Blend	80
D Plasticized fish protein/ Kraft lignin Biomaterial Experiment Data	83
E Statistic analysis	108
<b>CURRICULUM VITAE</b>	<b>117</b>

## LIST OF TABLES

<b>TABLE</b>	<b>PAGE</b>
2.1 Main component of myofibrillar protein	6
2.2 Amino acid composition of fish muscle	7
2.3 Shear rate depends principally on the nature of the shaping	18
2.4 Storage modulus of material and composite	20
2.5 Mechanical properties of material and composite	21
2.6 Functional groups in softwood lignin per 100 phenyl propane units	24
2.7 Molecular weight and functional groups of lignin	26
2.8 $T_g$ of different lignin types.	26
3.1 Composition of biomaterial with 0-70% Kraft lignin	33
4.1 Chemical composition of fish protein powder	41
4.2 $T_d$ (thermal decomposition) and $T_g$ (glass transition temperature) of fish protein and Kraft lignin.	42
4.3 Power-law model parameters of plasticized fish protein/ Kraft lignin blends	45
4.4 Storage modulus ( $E'$ ) at 140°C, glass transition temperature ( $T_g$ ) and $\tan \delta$ peak height of plasticized fish protein/ Kraft lignin biomaterial	47
4.5 IR peaks assignments for lignin	49
4.6 IR peaks assignments for protein	49
4.7 Protein content (%) of SDS-soluble, SDS-insoluble fraction and total protein recovery of fish protein powder and plasticized fish protein/ Kraft lignin biomaterial molded at 100°C.	51
4.8 Mechanical properties of plasticized fish protein/ Kraft lignin biomaterial molded at 100°C and at 130°C	56
A.1 Protein content in fish protein powder	71
A.2 Moisture content in fish protein powder	71
A.3 Ash in fish protein powder	71
A.4 Fat content in fish protein powder	71
A.5 sieve analysis of fish protein powder for preparation sample	71
B.1 TGA of fish protein and Kraft lignin which test temperature from the room temperature (30°C) to 600 °C and the heating rate was 10 °C/min.	73

<b>TABLE</b>	<b>PAGE</b>
B.2 DSC of fish protein was heated first time at 10 °C/min from 25 to 250 °C and heated a second time at 10 °C/min to 250 °C. Finally the sample was cooled to 25 °C at 10 °C/min.	74
B.3 DSC of Kraft lignin was heated first time at 10 °C/min from 25 to 250 °C and heated a second time at 10 °C/min to 250 °C. Finally the sample was cooled to 25 °C at 10 °C/min.	76
C.1 Shear rate and appearance viscosity of plasticized fish protein/ Kraft lignin blend and die temperature is 140 °C	81
D.1 Dynamic mechanical analysis of 0% KL	84
D.2 Dynamic mechanical analysis of 10% KL	86
D.3 Dynamic mechanical analysis of 20% KL	88
D.4 Dynamic mechanical analysis of 30% KL	90
D.5 Dynamic mechanical analysis of 40% KL	92
D.6 Dynamic mechanical analysis of 50% KL	94
D.7 Dynamic mechanical analysis of 60% KL	96
D.8 Dynamic mechanical analysis of 70% KL	98
D.9 FTIR spectrum of plasticized fish protein/ Kraft lignin biomaterial	100
D.10 Mechanical properties of plasticized fish protein/ Kraft lignin biomaterial at 100 °C	104
D.11 Mechanical properties of plasticized fish protein/ Kraft lignin biomaterial at 130 °C	105
D.12 Water absorption of plasticized fish protein/ Kraft lignin biomaterial at 100 °C	106
D.13 Water absorption of plasticized fish protein/ Kraft lignin biomaterial at 130 °C	107
E.1 ANOVA table of water absorption of biomaterial at 100°C	109
E.2 ANOVA table of water absorption of biomaterial at 130°C	109
E.3 ANOVA table of Young's modulus of biomaterial at 100 °C	110
E.4 ANOVA table of Tensile strength of biomaterial at 100 °C	110
E.5 ANOVA table of elongation at break of biomaterial 100 °C	111
E.6 ANOVA table of Young's modulus of biomaterial at 130 °C	111

<b>TABLE</b>	<b>PAGE</b>
E.7 ANOVA table of Tensile strength of biomaterial at 130 °C	112
E.8 ANOVA table of elongation at break of biomaterial 130 °C	112
E.9 ANOVA table of storage modulus (E') of biomaterial	113
E.10 ANOVA table of Tan $\delta$ peak high of biomaterial	113
E.11 ANOVA table of Glass transition temperature of biomaterial	114
E.12 ANOVA table of consistency (K) of biomaterial	114
E.13 ANOVA table of power law index (n) of biomaterial	115
E.14 ANOVA table of soluble protein of biomaterial	115
E.15 ANOVA table of insoluble protein of biomaterial	116

## LIST OF FIGURES

<b>FIGURE</b>	<b>PAGE</b>
2.1 Muscle cell and components of fish	5
2.2 General structure of an amino acid	7
2.3 Schematic representation of the thermoplastic process applied to protein-based materials	11
2.4 Processing paths leading to thermoplastic processing	12
2.5 Compression molding press	13
2.6 Main features of a single screw extruder	14
2.7 Main features of injection molding.	15
2.8 General change in modulus with temperature of amorphous and semi-crystalline polymer materials, showing the different regions of visco-elastic behavior.	19
2.9 Fundamental type-structures of the monomers in lignin	23
2.10 Valorisation of Kraft lignin by a biorefinery concept: the proposed integrated process for producing biopolymers	23
2.11 Structural model of Kraft lignin	25
3.1 Threadfin bream (a), Fish protein powder (b)	33
3.2 Process of plasticized fish protein/ Kraft lignin biomaterial specimen preparation	34
4.1 Equilibrium torque and equilibrium temperature of plasticized fish protein/ Kraft lignin blends with 0-70% Kraft lignin content at 80 °C 100 rpm for 15 min.	43
4.2 Viscosity of Fish protein blends with 0-70% Kraft lignin content determined by capillary rheometer at 140 °C die temperature	44
4.3 Storage modulus (E') and tan $\delta$ of plasticized fish protein/ Kraft lignin biomaterial	46
4.4 FTIR spectra (top to bottom) of biomaterial with 0% Kraft lignin, 20% Kraft lignin, 40% Kraft lignin, 60% Kraft lignin and 70% Kraft lignin	48
4.5 Protein molecular weight of SDS-soluble (a) SDS-insoluble (b) of fish protein powder and fish protein biomaterial with 0-70% Kraft lignin contents.	52
4.6 Free radicals of plasticized fish protein/ Kraft lignin biomaterial after mixing at 80°C (a) and molding at 100°C (b)	53

<b>FIGURE</b>		<b>PAGE</b>
4.7	Mechanical properties of plasticized fish protein/ Kraft lignin biomaterial molded at 100 °C (a) and 130°C (b)	55
4.8	Water absorption of fish protein-based biomaterial with 0-70% Kraft lignin content at mold 100°C and 130 °C	57
B.1	(—) TG and (—) derivative TG (DTG) curves of Fish protein (a) and Kraft lignin (b) measured at 10°C min <sup>-1</sup> in nitrogen	78
B.2	DSC scan of Fish protein (a), Kraft lignin (b) of biomaterial at 0% RH	79

## LIST OF ABBREVIATIONS

A	Constant
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
°C	Degree Celsius
$\Delta C_p$	Molar excess heat capacity
Da	Dalton
DMA	Dynamic Mechanical Analyzer
DPPH	2, 2'-diphenyl- $\beta$ -picryl hydrazyl
DSC	Differential Scanning Calorimetry
DTE	Dithioerythriol
E	Activation energy
E'	Storage modulus
E''	Loss modulus
ESR	Electron Spin resonance
FP	Fish protein
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectrometer
$\times g$	Relative centrifugal force
kDa	Kilodalton
KL	Kraft lignin
M	Molar
MHC	Myosin heavy chain
MW	Molecular Weight
rpm	Revolution per minute
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SH	Sulfhydryl
T	Temperature
TB	Threadfin bream
Td	Thermal degradation
T <sub>g</sub>	Glass transition temperature
TGA	Thermogravimetric Analysis
UV	Ultraviolet
$\eta$	Viscosity