

Abstract of thesis presented to the Senate of Universiti Malaysia Terengganu in fulfilment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy

**DIETARY ASTAXANTHIN FROM GREEN MICROALGAE "*Hematococcus pluvialis*" ON ANTI-OXIDATION, ANTI-INFLAMMATORY, ANTI-AGEING AND ITS APPLICATION IN COOKIES**

**BAYAN YOUSEF ATA AL-TARIFI**

**AUGUST 2022**

**Main Supervisor : Ts. Azizah binti Mahmood, Ph.D**  
**Co-Supervisor : Suvik A/L Assaw, Ph.D**  
**Co-Supervisor : Hassan Ibrahim Sheikh Mohamed, Ph.D**  
**School/Institute : Faculty of Fisheries and Food Science**

Astaxanthin (ASTA) is a red carotenoid pigment that occurs widely in marine sources with considerable antioxidant activity potential. The world's largest contributor of astaxanthin is from synthetic sources, however, *Hematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*) is the most potent biological source to date. This study aimed to develop and optimize the functional food of cookies containing ASTA from *H. pluvialis*. The ASTA was evaluated for its antioxidant activities using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), ferric reducing antioxidant power (FRAP), and hydroxyl radical scavenging activity (HRSA). *In vitro*, ASTA was also examined for its cytotoxicity and anti-inflammatory using RAW267.4 cell line. Cookies containing ASTA were evaluated for their quality by sensory evaluation, physical properties, and nutritional composition. The anti-aging activities were measured by skin structure, lipid profile, antioxidant liver enzymes and FOXO3 gene expression using Sprague-Dawley rats. Results showed that colorimetric DPPH and FRAP assays gave significantly different results compared to non-colorimetric HRSA assay. ASTA did not cause any morphological alterations or nucleus damage when incubated for 24 hours at various concentrations. Incubation for 48 and 72 hours reduced cell viability, with IC<sub>50</sub> values of 67.10 and 59.33 g/ml, respectively. Meanwhile, the cells treated with ASTA prior to LPS significantly reduced NO production in a dose-dependent manner with a reduction of NO level of almost 57.6% when compared with untreated cells with LPS. Increasing of ASTA enhanced textural qualities but not on the color, aroma, flavor, and appearance of the cookies. The presence of ASTA in cookies significantly prevents lipid oxidation stored at 50°C for 21 days. The rats fed with ASTA cookies had thicker dermis and epidermis, a more homogeneous fiber arrangements, well as significantly lower LDL and higher HDL cholesterol levels. The ASTA cookie group had higher levels of SOD, CAT, GPX, and GR in their hepatic tissue than the untreated groups. ASTA can up-regulate the expression of the FOXO3 gene in heart tissue by 10%. In conclusion, this research would be able to serve as a reference for the food industry regarding the

application ASTA in their products as it's positively affected the anti-aging process, due to its strong antioxidant source.

Abstrak tesis yang dikemukakan kepada Senat Universiti Malaysia Terengganu sebagai syarat memenuhi Ijazah Doktor Falsafah

**ASTAXANTHIN DIET DARIPADA MIKROALGA HIJAU "*Haematococcus pluvialis*" MENGENAI ANTI-OKSIDASI, ANTI-KERADANGAN, ANTI-PENUAAN DAN PENGGUNAANNYA DALAM BISKUT**

**BAYAN YOUSEF ALTARIFI**

**AGOS 2022**

**Penyelia** : **Ts.Azizah binti Mahmood, Ph.D**  
**Penyelia Bersama** : **Suvik A/L Assaw, Ph.D**  
**Penyelia Bersama** : **Hassan Ibrahim Sheikh Mohamed, Ph.D**  
**Pusat Pengajian** : **Fakulti Pengajian dan Sains Makanan**

Astaxanthin (ASTA) ialah pigmen karotenoid merah yang terdapat secara meluas dalam sumber marin dengan potensi aktiviti antioksidan yang besar. Penyumbang terbesar astaxanthin di dunia adalah daripada sumber sintetik, namun, *Hematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*) adalah sumber biologi paling berpotensi setakat ini. Kajian ini bertujuan untuk membangunkan dan mengoptimumkan makanan berfungsi biskut yang mengandungi ASTA daripada *H. pluvialis*. ASTA telah dinilai aktiviti antioksidannya menggunakan 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), kuasa antioksidan penurunan ferik (FRAP), dan aktiviti penghapusan radikal hidroksil (HRSA). Secara *in vitro*, ASTA juga telah diperiksa untuk sitotoksikiti dan anti-radang menggunakan sel titisan RAW267.4. Biskut yang mengandungi ASTA dinilai kualitinya melalui penilaian deria, sifat fizikal dan komposisi pemakanan. Aktiviti antipenuaan diukur melalui struktur kulit, profil lipid, enzim hati antioksidan dan ekspresi gen FOXO3 menggunakan tikus Sprague-Dawley. Keputusan menunjukkan bahawa ujian kolorimetrik DPPH dan FRAP memberikan keputusan yang berbeza secara signifikan berbanding ujian bukan kolorimetrik HRSA. ASTA didapati tidak menyebabkan sebarang perubahan morfologi atau kerosakan nukleus apabila diinkubasi selama 24 jam pada pelbagai kepekatan. Pengeraman selama 48 dan 72 jam mengurangkan viabiliti sel, dengan nilai IC<sub>50</sub> masing-masing 67.10 dan 59.33 g/ml. Sementara itu, sel yang dirawat dengan ASTA sebelum LPS dapat mengurangkan pengeluaran NO dengan ketara dalam situasi pendosan-kebergantungan dengan pengurangan tahap NO hampir 57.6% berbanding dengan sel yang tidak dirawat dengan LPS. Penambahan ASTA telah meningkatkan kualiti tekstur tetapi tidak pada warna, aroma, rasa dan sifat luaran biskut. Kehadiran ASTA dalam biskut menghalang pengoksidaan lipid secara ketara apabila disimpan pada suhu 50°C selama 21 hari. Tikus yang diberi biskut mengandungi ASTA mempunyai dermis dan epidermis yang lebih tebal, serat yang lebih homogen susunannya, serta menurunkan kadar kolesterol LDL dan HDL yang lebih tinggi secara ketara. Kumpulan dengan biskut mengandungi ASTA mempunyai tahap SOD, CAT, GPX dan GR yang lebih tinggi dalam tisu

hepatik mereka berbanding kumpulan yang tanpa ASTA. ASTA boleh mengawal selia ekspresi gen FOXO3 dalam tisu jantung sebanyak 10%. Kesimpulannya, kajian ini akan dapat dijadikan rujukan kepada pihak industri makanan mengenai penggunaan ASTA dalam produk mereka kerana ia mempunyai kesan positif kepada proses anti-penuaan, disebabkan sumber antioksidannya yang tinggi.