นายชายน้อย เชิ่ม : การศึกษาฤทธิ์ของไคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ (คอซ) เพื่อพัฒนานวตกรรมเวชสำอาง (BIOLOGICAL ACTIVITIES OF CHITOSAN OLIGOSACCHARIDES (CHOS) TOWARD COSMECEUTICAL INNOVATIONS) อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.ภญ.มณฑารพ ยมาภัย, 103 หน้า.

ไคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์หรือคอซ เกิดจากกระบวนการเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายในน้ำ (hydrolysis) ของไคโตซาน ให้ได้ได้เป็น ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ หรือ คอซ ซึ่งมีคุณสมบัติหลากหลายทั้งในทางชีวภาพและเคมี (physicochemical properties) อันเป็นประโยชน์ต่อทั้งสุขภาพและความงามของมนุษย์ ในงานวิทยานิพนธ์นี้ได้นำเทคโนโลยีเอนไซม์ได้พัฒนามาแล้วในห้องปฏิบัติการมาใช้ ได้แก่การปรับแต่งพันธุกรรมเอนไซม์ไคโตซาเนส จากแบคทีเรียแลคโตบาซิลลัส แพลนทารัม (*Lactobacillus plantarum*) TGL02 ซึ่งเป็นสายพันธุ์สำหรับใช้ในอาหารและจากระบบการแสดงออกของเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในแบคทีเรียเอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli* : *E. coli*) TOP10 เพื่อผลิตให้ได้คอซที่มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดี จากการย่อยไคโตซานที่เตรียมจากกุ้งและเปลือกกุ้งในตัวทำละลายกรดแลคติก โดยได้ทำการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมต่างๆ ต่อกระบวนการผลิต ดังนี้ ความเข้มข้นของไคโตซาน ร้อยละ 1 - 2 มวลต่อปริมาตร (1-2 mg/ml) ระดับปริมาตร (100 และ 250 มิลลิลิตร) ความเข้นข้นของเอนไซม์ไคโตซาเนส (0.1, 0.5, 1 และ 3 ยูนิตต่อมิลลิตร) ระดับอุณหภูมิ (37 และ 50 องศาเซลเซียล) ระยะเวลา (6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง) และตัวทำละลาย (1% กรดไฮโดรคลอริกและ 2% กรดแลคติก) รวมไปถึงการประเมินผลวิธีการการจัดเก็บผลิตภัณฑ์คอซที่ได้ ผลการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคอซด้วยกระบวนการแปรรูปทางชีวภาพ (bioconversion) ได้แก่ ไคโตซานมีความเข้มข้นเป็น ร้อยละ 1 มวลต่อปริมาตร ในตัวทำละลาย กรดแลคติกความเข้มข้น ร้อยละ 2 โดยใช้เวลาย่อยสลาย 48 ชั่วโมง ในปริมาตร 100 - 250 มิลลิลตร ในสภาวะเช่นนี้ให้ผลผลิตทางชีวภาพเป็น ร้อยละ 100 จากนั้นทำการวิเคราะห์โครงสร้างสารผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีการต่างๆ ได้แก่ การวัด ^{1}H NMR การวิเคราะห์ด้วยแมสสเปกโตรเมทรี (MS) การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ (SEC) และวิธีโครมาโตกราฟฟีแบบแผ่นบาง (TLC) ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์พบว่าส่วนใหญ่ผลิตภัณฑ์สุดท้ายหลังจากกระบวนการแปรรูปทางชีวภาพ ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 (dimer) และ 3 หน่วย (trimer) เป็นส่วนใหญ่ และมีโอลิโกแซคคาไรด์คาไรด์สายยาว ขนาด 4 และ 5 หน่วยย่อยด้วย จากผลการเปรียบเทียบทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์ในรูปแบบของเหลวหรือรูปแบบผงแห้งจากวิธีการเยือกแข็ง (lyophilized form) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจของมนุษย์ (differentiated human macrophages) โดยผลการ

ทดลองที่สำคัญจากการศึกษาในครั้งนี้คือพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้จากกระบวนการย่อยนี้สามารถยับยั้งกระบวนการอักเสบที่เกิดจากการชักนำด้วยสาร LPS ต่อเซลล์โมโนไซต์ที่โตเต็มวัยของมนุษย์ (human mature monocytes; THP-1) อย่างไรก็ตามพบว่าฤทธิ์การยับยั้งการอักเสบของคอซจะลดลงหลังจากกระบวนการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง เนื่องจากโอลิโกแซคคาไรด์ คอซ ที่ผลิตได้นั้นสามารถละลายน้ำได้ดีและมีฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงมีความน่าสนใจ เพราะอาจสามารถประยุกต์ใช้ในงานด้านเภสัชผลิตภัณฑ์และเวชสำอางอย่างหลากหลาย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ปีการศึกษา 2562 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

CHAINOY SOEM : BIOLOGICAL ACTIVITIES OF CHITOSAN OLIGOSACCHARIDES (CHOS) TOWARD COSMECEUTICAL INNOVATIONS. THESIS ADVISOR : PROF. MONTAROP YAMABHAI, Ph.D., 103 PP.

CHITOSAN OLIGOSACCHARIDES/CHOS/COSMECEUTICAL/ANTI-INFLAMMATION/CHITOSANASE/ENZYME TECHNOLOGY/ BIOCONVERSION/WASTES/CHITIN/PRAWN/SHRIMP

Chitosan oligosaccharides (CHOS), hydrolyzed oligomers of chitosan, have been shown to have several biological and physicochemical properties which are beneficial to human health and beauty. In this study, we used an established enzyme technology, recombinant chitosanase produced from food grade expression system of *Lactobacillus plantarum* TGL02 and efficient *Escherichia coli* : *E.coli* TOP10 expression system, for the production of soluble CHOS from chitosan prepared from shrimp and prawn shells, dissolved in lactic acid solution. To determine the optimal bioconversion reaction, different conditions, namely chitosan concentrations (1 and 2%), reaction volumes (100 mL and 250 mL), enzyme concentrations (0.1, 0.5, 1 and 3 U/mL), temperatures (37 and 50 ^{o}C), reaction times (6, 12, 24 and 48 hours), solvents (1% HCL and 2% LAC), as well as the condition for the storage of the final products were evaluated. The results indicated that the optimal condition for the bioconversion is 1% chitosan in 2% LAC, hydrolyzed for 48 hours at 100-250 mL scale . At these conditions, the bioconversion yields were 100%. ^{1}H NMR, Mass spectrometry (MS), Size exclusion chromatography (SEC) and Thin Layer Chromatography (TLC) were employed to analyze the final

hydrolysis product. Product analysis revealed that the majority of the final product after bioconversion are dimers and trimers with combination of small numbers of longer saccharides such as tetramers and pentamers. Comparison of bioactivity of the products kept in liquid or lyophilized form were investigated, and it was shown that this product was not toxic to differentiated human macrophages at various concentrations, i.e., 25, 50, 100 μg/mL. Most importantly, the hydrolytic products also showed anti-inflammation activity against LPS-induced inflammation of human mature monocytes (THP-1). However, there were some loss of anti-inflammatory activity of certain CHOS samples after lyophilization. Since the oligosaccharides generated in this thesis are water soluble and bioactive, the expansion of its application to a wide a variety of pharmaceutical and cosmeceutical products is attractive.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology

Academic Year 2019

Student's Signature _____

Advisor's Signature _____