รหัสโครงการ SUT3-304-62-36-18

รายงานการวิจัย

การพัฒนาโภชนเภสัชภัณฑ์และเวชสำอางจากน้ำตาลสายสั้น โอลิโกแซคคาไรด์ (คอซ)

Development of Nutraceuticals and Cosmeceutical from Short Chain Chitooligosaccharide (COS)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-304-62-36-18

รายงานการวิจัย

การพัฒนาโภชนเภสัชภัณฑ์ และเวชสำอางจากน้ำตาลสายสั้น โอลิโกแซคคาไรด์ (คอซ)

Development of Nutraceuticals and Cosmeceutical from short chain Chitooligosaccharide (COS)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร. มณฑารพ ยมาภัย

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ ๒๕๖๒-๒๕๖๒

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤษภาคม ๒๕๖๔

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ ๒๕๖๒ เพียง ๑ ปี โดยมีกรรมการจากสภาวิจัยแห่งชาติเป็นผู้ประเมินข้อเสนอโครงการ ผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร.พรศิริ เพชรศรีช่วง นักศึกษาระดับปริญญาเอก นายชายน้อย เชิ่ม นักศึกษาระดับปริญญาโท ชาวกัมพูชา ดร.มัณฑิภา คำผิว และ ดร.กุณฑลี ร่างน้อย นักวิจัยหลังปริญญาเอกทุนสนับสนุนคณาจารย์ที่มีผลผลิตด้านวิจัยสูงเพื่อจ้างนักวิจัยเต็มเวลาคุณวุฒิปริญญาเอก (Full-time Postdoctoral Researcher) ผศ. ทพ. ดร.ไพบูลย์ จิตประเสริฐวงศ์ สำนักวิชาทันตแพทย์ศาสตร์ มทส และ ศ. ดร. นพ.ฉัตรชัย เหมือนประสาท สถาบันการแพทย์จักรีนฤบดินทร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้ร่วมกันค้นคว้าวิจัย ในเรื่องนี้เป็นอย่างดี รวมทั้งคุณศุภกาญจน์ บุญอยู่ ที่ช่วยดูแลในเรื่องงานการเงิน และงานธุรการเป็นอย่างดีมาโดยตลอด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาไทย

โครงการการพัฒนาโภชนเภสัชภัณฑ์ และเวชสำอาง จากน้ำตาลสายสั้น โอลิโกแซคคาไรด์ คอซ นี้อันที่จริงเป็นโครงการที่วางแผนการดำเนินการเป็นระยะเวลา ๓ ปี แต่ได้รับการสนับสนุนในปีแรกเพียงปีเดียว แล้วต้องปิดโครงการไปก่อน แม้กระนั้น ผู้วิจัยยังสามารถดำเนินการวิจัยมาได้ระดับหนึ่ง จนได้ผลที่น่าสนใจ สามารถนำมารายงานได้ ซึ่งเป็นในส่วนต้นของโครงการ คือการพัฒนากระบวนการการผลิต คอซ ที่มีโครงสร้างชัดเจนแน่นอน และมีคุณสมบัติที่โดดเด่นคือละลายน้ำได้ดี จึงสามารถนำไปพัฒนาเป็น ชีวผลิตภัณฑ์ที่หลากหลายได้โดยง่าย จากนั้นได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ คือฤทธิ์ ต้านปฏิกริยาการอักเสบในเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์ คือเซลล์ โมโนไซต์ THP-1 ซึ่งพบว่ามีคุณสมบัติที่โดดเด่นคือ สามารถลดปฏิกริยาการอักเสบจากการกระตุ้นด้วยสาร Lipopolysaccharides (LPS) ในเซลล์ THP-1 ที่ถูกชักนำให้พัฒนาเป็นเซลล์ แมโครเฟจด้วยสาร Vit-D3 ได้ โดยผลการยับยั้งการอักเสบนั้นมีเพิ่มขึ้นตามปริมาณ COS ที่ใส่ลงไปจนถึงจุดสูงสุด ที่ดีเท่ากับยาเสตียรอยด์ อีกทั้งยังไม่พบฤทธิ์ที่เป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อใส่ในปริมาณสูงสุด จึงถือว่ามีคุณสมบัติโดดเด่นที่น่าสนใจ จากนั้นผู้วิจัยจึงได้พัฒนากระบวนการผลิตปริมาณมากขึ้นในระดับห้องปฏิบัติการ โดยการใช้เอนไซม์ ไคโตซาเนส ที่ได้พัฒนามาก่อนหน้าที่ ทั้งที่ผลิตได้จาก แบคทีเรีย อี โคไล และแบคทีเรียสำหรับใช้ในอาหาร คือ แลคโตบาซิลัส แพลนทารัม จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ คอซ ที่พัฒนามาได้ไปผลิตเป็น เวชสำอางต้นแบบในรูป ครีมทาหน้า และลำตัว ผลการทดสอบเบื้องต้นจากการสอบถามความเห็นของผู้ใช้ พบว่า มีฤทธิ์ ลดการอักเสบจากสิว และอาการ แสบคัน จากเห็บหมัด และการระคายเคืองอื่นๆ ได้ดี นอกจากองค์ความรู้ และเทคโนโลยีต้นแบบแล้ว ผลงานนี้ยังเป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาเอกของ นักศึกษาระดับปริญญาเอก ๑ คน ระดับปริญญาโท ๑ คน นักวิจัยหลังปริญญาเอก ๒ คน และนักเรียนโรงเรียนสุรวิวัฒน์ ห้อง วมว อีก ๓ คน ด้วย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

This research project entitled "Development of Nutraceuticals and Cosmeceutical from short chain Chitooligosaccharide (COS)" was originally planed for a period of 3-year. Unfortunately, the project was only supported for the first year; therefore, only the first part of the project is reported. Nevertheless, interesting results have been achieved. These are the results from the first part of the original project dealing with the production of COS with well-defined structures. The unique quality of this COS is water soluble, facilitating incorporation into a wide variety of novel bioproducts. After that COS was used for biological activity assay, i.e. anti-inflammatory assay on human macrophage. In this assay, human macrophage cell line THP-1 was differentiated with VitD3 and the inflammation was induced using bacterial Lipopolysaccharide (LPS). The results indicated COS can inhibit the inflammatory responses as good as dexamethasone in a dose-dependent manner. Moreover, cytotoxicity was not found. From this interesting and attractive results, a lab-scale for the production of COS using our enzymes, produced from both *E. coli* and *Lactobacillus plantarum* expression system has been established. After that COS was used as an active ingredient in our cosmeceutical prototypes in a form of body and face cream. Preliminary study from several users have informed us that the COS products have good effects on rash and itch, resulting from acne, insect bites, and general irritations. In addition to novel body of knowledge and technology platform, this research project was used parts of education for 1 Ph.D. student, 1 Master students, 2 postdocs, and a special project for 3 high school students from SCiUS - Science Classrooms in University-Affiliated Surawiwat School.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ..... ก

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ข

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค

สารบัญ ..... ง

สารบัญภาพ ..... ฉ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 1

1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2

1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย 2

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมและสารสนเทศที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 ไคติน 3

2.2 ไคโตซาน 3

2.3 คอซ 3

2.4 ไคโตซานเนส 4

2.5 กระบวนการผลิต ไคติน ไคโตซาน และ คอซ 4

2.6 ฤทธิ์ทางชีวภาพของคอซ 5

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย 6

3.1 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ คอซ ที่ผลิตขึ้นมาด้วย เอนไซม์ CHITOSANASE ที่ได้พัฒนาขึ้นมาในห้องปฏิบัติการ 6

3.2 การผลิต คอซ ด้วย FOOD-GRADE ENZYME 25

3.3 PLATFORM การผลิตคอซด้วยเทคโนโลยีเอนไซม์ และการผลิตเวชสำอางต้นแบบ 33

บทที่ 4 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย 35

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย 36

ประวัตินักวิจัย 38

ภาคผนวก..... 39

ภาคผนวก ก การผลิตบุคลากร 39

ภาคผนวก ข การเผยแพร่ผลงาน 40

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

รูปที่ 1 โครงสร้างไคติน (ก) และไคโตซาน (ข).....3

รูปที่ 2 การย่อยสลายไคโตซานด้วยเอนไซม์ไคโตซานเนส.....4

รูปที่ 3 แผนภาพแพลตฟอร์มการผลิต คอซ ด้วยเทคโนโลยีเอนไซม์ ที่ได้พัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการ .. 33

รูปที่ 4 PROTOTYPE ผลิตภัณฑ์เวชสำอางที่มีคอซเป็นสารสำคัญ 34

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

อุตสาหกรรมกุ้งสดแช่เย็นแช่แข็งและแปรรูปเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญที่สุดในกลุ่มสินค้าประมงของไทย สามารถสร้างรายได้จากการส่งออกกว่า 3 พันล้านเหรียญสหรัฐฯ ต่อปี ซึ่งอัตราการส่งออกนี้เป็นดัชนี แสดงถึงกากของเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการผลิต เช่น เปลือกและหัวกุ้ง ดังนั้นการสะสมของเปลือกกุ้งตามแหล่งอุตสาหกรรมอาหารจึงเป็นขยะที่ไม่ก่อให้เกิดมูลค่า ซึ่งในประเทศไทยมีการผลิตแปรรูปเปลือกกุ้งมาใช้ประโยชน์ โดยผลิต ไคโตซาน ทางการค้า เพื่อการเกษตรอย่างแพร่หลาย แต่มูลค่ายังมีมูลค่าทางเศรษฐกิจต่ำ โดยราคาในท้องตลาดของไคโตซานผงโดยเฉลี่ยอยู่ที่กิโลกรัมละ 1,000 บาท ทางผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ที่จะเพิ่มมูลค่าของไคโตซาน โดยใช้เทคโนโลยีเอนไซม์มาใช้ในการย่อยสลายไคโตซาน ให้เป็นน้ำตาลโอลิโกแซคคาร์ดสายสั้น คอซ ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าว คือ เอนไซม์ไคโตซานเนส ที่ผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* (Sak-Ubol, *et al*., 2016) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถนำมาใช้ในอาหาร และปราศจากยีนต้านสารปฏิชีวนะ ทำให้ได้ คอซ ที่เหมาะสมสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้เป็นองค์ประกอบของโภชนเภสัชภัณฑ์และเวชสำอาง

คุณสมบัติเด่นของ คอซ คือ สามารถละลายน้ำได้ ทำให้มีประสิทธิภาพในการดูดซึมสูงกว่า ไคโตซาน ซึ่งไคโตซาน จะละลายได้เฉพาะในกรดอ่อน และมีความหนืดมาก นอกจากนี้ คอซ ยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจหลายประการ เช่น พรีไบโอติค ต่อต้านการอักเสบ สารต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น (Yang, *et al*., 2012, Aam, *et al*., 2010) อย่างไรก็ตามจากข้อมูลการวิจัยในด้านฤทธิ์ทางชีวภาพของ คอซ ที่ผ่านมานั้น ยังไม่มีการศึกษาถึงคุณสมบัติทางโครงสร้างของ คอซ ที่ชัดเจน ดังนั้นผู้วิจัยจะทำการวิเคราะห์ส่วนประกอบของน้ำตาล ระดับการโพลีเมอไรซ์ (degree of polymerization, DP), น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight, M_W) สัดส่วนหมู่อะเซทิล (fraction of acetylation, F_A) เป็นต้น โดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์ขั้นสูง เช่น NMR, size exclusion chromatrography และ mass spectrometry เป็นต้น และนำ คอซ ที่ได้ทำการวิเคราะห์คุณสมบัติแล้วไปทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ การต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ การกระตุ้นกลืนกินตัวเองของเซลล์ (autophagy) ในเซลล์ไลน์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังทำการทดสอบผลของการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในเซลล์แมคโครเฟจ หลังจากนี้จึงทำการพัฒนาและเพิ่มมูลค่าของ คอซ ที่ทำการวิเคราะห์โครงสร้างและทำสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ไปพัฒนาเป็น โภชนเภสัชภัณฑ์และเวชสำอาง

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อผลิตเอนไซม์ไคโตซานเนส ในการย่อยสลายไคโตซานที่เตรียมได้จากเปลือกกุ้ง เพื่อเป็นต้นแบบในการประยุกต์ใช้ในการเพิ่มมูลค่ากากของเหลือจากอุตสาหกรรมอาหารทะเลในประเทศต่อไป

1.2.2 เพื่อผลิต คอซ ในระดับ pilot scale โดยใช้เทคโนโลยีเอนไซม์ และทำการตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติของ คอซ โดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์ขั้นสูง

1.2.3 เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพกับเซลล์ภูมิคุ้มกันแมคโครเฟจ

1.2.4 เพื่อพัฒนาเวชสำอางต้นแบบจากคอซที่ผลิตขึ้นมาได้

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

โครงการนี้จะทำการพัฒนาระบบการผลิตใน *E. coli* เฉพาะในระดับห้องปฏิบัติการ (lab scale) เท่านั้น และการทดสอบฤทธิ์ทางชีววิทยาเฉพาะในห้องทดลอง (*in vitro*)

1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ประเทศไทยมีอุตสาหกรรมกุ้งสดแช่เย็นแช่แข็ง และการแปรรูปเป็นสินค้าส่งออกเป็นปริมาณมาก ส่งผลให้เกิดกากของเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการผลิต เช่น เปลือกและหัวกุ้ง การสะสมของเปลือกกุ้งตามแหล่งอุตสาหกรรมอาหารเป็นขยะที่ไม่ก่อให้เกิดมูลค่า ในประเทศไทยมีการผลิตแปรรูปเปลือกกุ้งมาใช้ประโยชน์ โดยผลิตเป็น ไคโตซาน ทางการค้า เพื่อการเกษตรอย่างแพร่หลาย แต่ยังมีมูลค่าทางเศรษฐกิจต่ำอยู่ ผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ที่จะเพิ่มมูลค่าของไคโตซาน โดยใช้เทคโนโลยีเอนไซม์มาใช้ในการย่อยสลายไคโตซาน ให้เป็นน้ำตาลโอลิโกแซคคาร์ดสายสั้น คอซ คุณสมบัติเด่นของ คอซ คือ มีขนาดเล็กลง สามารถละลายน้ำได้ดีขึ้น ทำให้มีประสิทธิภาพในการดูดซึมสูงกว่า ไคโตซาน ซึ่งไคโตซาน จะละลายได้เฉพาะในกรดอ่อน และมีความหนืดมาก อย่างไรก็ตามรายงานค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับ คอซ นั้น มีความสับสนในระดับหนึ่ง ด้วยเหตุที่ คอซ มีโครงสร้างหลากหลาย และ ฤทธิ์ทางชีวภาพ ก็มีความหลากหลายสูงมาก เช่น พรีไบโอติค ต่อต้านการอักเสบ ยับยั้งมะเร็ง ต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้อง ศึกษาโครงสร้างคอซ ให้ดี เพื่อนำไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพให้เหมาะสม เพื่อที่จะสามารถนำไปพัฒนา ใช้คอซให้เป็น สารออกฤทธิ์ ในชีวผลิตภัณฑ์ ต่างๆ ได้อย่างเหมาะสมต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรมและสารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไคติน

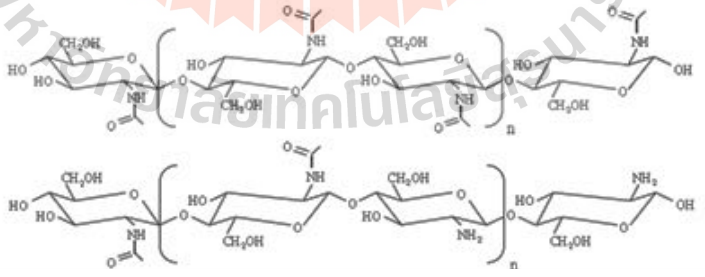
คือสายโพลิเมอร์ที่ประกอบขึ้นจากน้ำตาล *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-glycosidic (รูปที่ 1 ก) ต่อกันเป็นโครงสร้างของผลึกที่แข็งแรง ไคตินเป็นโพลิเมอร์ที่พบในธรรมชาติมากเป็นอันดับที่สองรองจากเซลลูโลก พบว่าส่วนประกอบหลักของผนังเซลล์เชื้อรา ยีสต์ นอกจากนี้ยังพบในโครงร่างภายนอกของแมลง กุ้ง กั้ง ปู รวมทั้ง แกนปลาหมึกอีกด้วย (Khoushab and Yamabhai, *et al*., 2010)

2.2 ไคโตซาน

คืออนุพันธ์ของไคติน ผลิตโดยการแช่ไคตินในสารละลายด่างเข้มข้น จะทำให้เกิดปฏิกริยา deacetylation ซึ่งจะดึงหมู่ acetyl ออกจากสายของไคติน (Hayes, *et al*., 2008). ไคโตซานสามารถละลายได้ในสารละลายกรดอ่อนในช่วง pH ≤ 6.5 โครงสร้างของไคโตซานประกอบด้วยน้ำตาล Glucosamine (GlcN) และ GlcNAc อยู่รวมในสายเดียวกัน (รูปที่ 1 ข) เราสามารถจำแนกประเภทของไคโตซานได้จาก ระดับการโพลีเมอไรเซชัน (degree of polymerization, DP), น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight, M_W) สัดส่วนหมู่อะเซทิล (fraction of acetylation, F_A) (Aam, *et al*., 2010) ซึ่งไคโตซานเป็นสารชีวภาพที่น่าสนใจเพราะไม่เป็นพิษ สามารถย่อยสลายได้ปัจจุบันมีการนำไคโตซานมาใช้ประโยชน์มากมายทั้งในด้านการเกษตร การแพทย์ และอาหาร เป็นต้น

ก)

ข)



รูปที่ 1 โครงสร้างไคติน (ก) และไคโตซาน (ข)

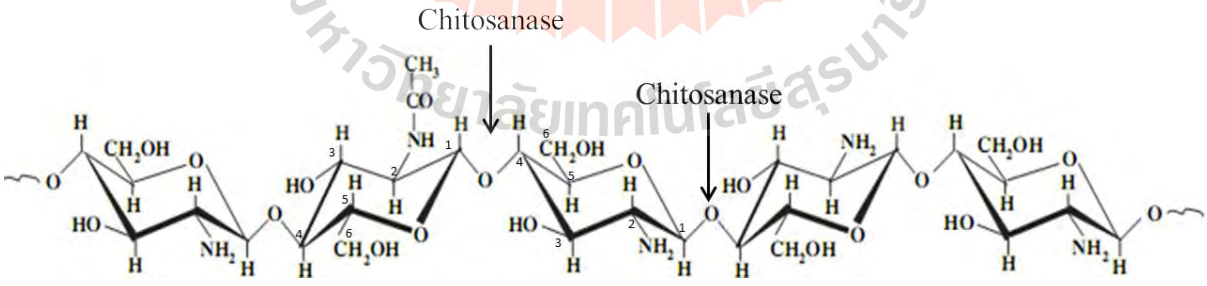
2.3 คอซ

คอซ คือสายน้ำตาลที่เกิดจากการย่อยสลายไคติน และไคโตซาน ด้วยปฏิกิริยาเคมีโดยใช้กรด หรือปฏิกิริยาการย่อยในสภาวะที่มีน้ำ (hydrolysis) โดยใช้เอนไซม์ในกลุ่มไคติโนไลติค (Chitinolytic enzyme)

เช่น ไคติเนส (chitinase) (Songsiriritthigul, *et al.,* 2010) และไคโตซานเนส (Pechsrichuang, Yoohat, and Yamabhai, 2013) เป็นต้น คุณสมบัติที่โดดเด่นของ คอซ คือ สามารถละลายน้ำได้ ทำให้มีประสิทธิภาพในการดูดซึมสูงกว่า ไคโตซาน เพราะละลายเฉพาะในกรดอ่อน และ มีความหนืดมาก ดังนั้น คอซ จึงมีมูลค่าสูงกว่า ไคติน และ ไคโตซานมาก

2.4 ไคโตซานเนส

เอนไซม์ไคโตซานเนส หรือ *N*-acetylglucosaminohydrolase (EC 3.2.1.132) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ทำให้พันธะ glycosidic ของไคโตซานถูกตัด ทำให้เกิดเป็นน้ำตาลโอลิโกเมอร์ คอซ ที่มีระดับโพลีเมอไรซ์ที่แตกต่างกัน (รูปที่ 2) ซึ่งไคโตซานเนสจัดอยู่ในกลุ่ม glycosyl hydrolase (GH) ได้แก่ GH5, GH7, GH8, GH46, GH75 และ GH80 ตามฐานข้อมูล CAZy ซึ่งไคโตซานเนส GH46 เป็นกลุ่มที่มีการศึกษามากที่สุด ถึงคุณสมบัติในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา กลไกเอนไซม์และโครงสร้างโปรตีน (Lacombe-Harvey, *et al*., 2009, Marcotte, *et al*., 1996) ไคโตซานเนสสามารถจำแนกออกเป็นกลุ่ม จำแนกจากตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ กลุ่มที่ 1 สามารถตัดพันธะ glycosidic ของ GlcNAc-GlcN และ GlcN-GlcN, กลุ่มที่สองจะตัดเฉพาะ GlcN-GlcN และกลุ่มที่ 3 ตัดที่ GlcN-GlcNAc และ GlcN-GlcN ไคโตซานเนสพบได้ในแบคทีเรีย รา และพืชบางชนิด (Jo, *et al*., 2003) โดยส่วนใหญ่แล้วจุลินทรีย์ที่สามรถผลิตไคโตซานเนสได้ จะอยู่ในสกุล *Bacillus* ในกลุ่ม family GH 8 และ 46 มีรายงานเกี่ยวกับลักษณะการศึกษาถึงคุณสมบัติของไคโตซานเนสจากแบคทีเรียชนิดต่างๆ เช่น *Bacillus subtilis* 168 (การศึกษานี้) (Pechsrichuang, Yoohat, and Yamabhai, 2013, Pechsrichuang, et al., 2016) *Bacillus coagulans* CK108 (Yoon, *et al*., 2002) *Bacillus* sp. สายพันธุ์ CK4 (Yoon, *et al*., 2000) *Bacillus* sp. DAU101 (Lee, *et al*., 2006) และ *Jantinobacterium* sp. สายพันธุ์ 4239 (Johnsen, Hansen and Stougaard, 2010) เป็นต้น



รูปที่ 2 การย่อยสลายไคโตซานด้วยเอนไซม์ไคโตซานเนส

2.5 กระบวนการผลิต ไคติน ไคโตซาน และ คอซ

เทคนิคการสกัดไคตินและไคโตซานจากเปลือกปูและเปลือกกุ้งส่วนใหญ่ใช้วิธีทางเคมี ประกอบด้วยขั้นตอนสามขั้นตอนคือการกำจัดแร่ธาตุและการฟอกขาว (Deminerization) สามารถทำได้โดยใช้ HCl เจือจาง (1-8%) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-3 ชั่วโมงหรือใช้กรดอื่นเช่นกรดอะซิติกและซัลฟิวริค วิธีการทาง

อุตสาหกรรมมักใช้สารละลายด่าง เช่น NaOH หรือ KOH ในขั้นตอนการกำจัดโปรตีน (Deproteinization) วิธีการทางอุตสาหกรรมอาจรวมถึงขั้นตอนการลดสีโดยใช้สารละลาย NaOCl หรือ H_2O_2 เป็นสารฟอกสี ส่วนขั้นตอน การดึงหมู่ acetyl ออกจากไคตินนั้น (chitin deacetylation) ทำได้โดยใช้สารละลาย NaOH ที่เข้มข้นในการทำให้เกิดการde-esterify ของ N-acetyl linkage ที่อุณหภูมิห้องหรืออุณหภูมิสูง (Hayes, *et al*., 2008) หลังจาก deacetylation ด้วยสารละลายด่างแล้ว ทำให้คาร์บอนตำแหน่งที่สองโอลิโกเมอร์บางส่วนเปลี่ยนหมู่อะมิโนและยังมีหมู่ acetyl ที่กระจายแบบสุ่มอยู่ในสายของไคโตซานโพลิเมอร์

การผลิตคอซในทางอุตสาหกรรมนั้น มักใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นมักใช้เพื่อย่อยสลายไคโตซานให้เป็น คอซ อย่างไรก็ตามการย่อยสลายทางเคมีทำให้ผลผลิตต่ำและมีน้ำตาล *D*-glucosamine ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก ข้อเสียของวิธีนี้คือมีการใช้สารเคมีอันตรายเป็นจำนวนมากและมีการปนเปื้อนด้วยสารเคมีที่เป็นพิษ (Kim and Rajapakse, 2005) ซึ่งจากปัญหาดังกล่าว จึงมีการใช้วิธีการย่อยสลายคอซ โดยใช้เอนไซม์ ซึ่งเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น เนื่องจากสามารถควบคุมปฏิกิริยาการย่อยสลายได้ ไม่เป็นปฏิกิริยาที่รุนแรงและปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย นอกจากนี้ยังสามารถใช้วิธีทางกายภาพในการผลิตคอซได้เช่นกัน เช่น การใช้กรด การย่อยสลายด้วยอัลตราโซนิค คลื่นไมโครเวฟ รังสีแกมมา และไฮโดรเทอร์มอล แต่วิธีการเหล่านี้ไม่ได้มีประสิทธิภาพเท่าวิธีเอนไซม์เนื่องจากไม่สามารถควบคุมปฏิกิริยาในการย่อยสลายได้ (Aam, *et al*., 2010)

2.6 ฤทธิ์ทางชีวภาพของคอซ

ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา คอซ ได้รับความสนใจนำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์อย่างแพร่หลาย เนื่องจากโอลิโกแซคาไรด์เหล่านี้ มีความหนืดต่ำสามารถละลายน้ำได้ที่ pH เป็นกลางและมีคุณสมบัติทางชีวภาพที่น่าสนใจมากมาย อย่างไรก็ตาม ยังไม่ทราบแน่ชัดถึงกลไกทางชีวภาพของคอซ มีรายงานว่าคุณสมบัติของ คอซ เช่น ระดับการโพลีเมอไรซ์ น้ำหนักโมเลกุล และ สัดส่วนหมู่อะเซทิล เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของคอซ (Aam, *et al*., 2010) จนถึงปัจจุบันการวิจัย คอซ ส่วนใหญ่จะใช้โอลิโกเมอร์ที่เป็น crude ซึ่งมีน้ำตาลที่มีความยาวหลายขนาดประกอบกัน มีรายงานวิจัยเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ทางชีวภาพและกลไกในระดับโมเลกุลของคอซ เกี่ยวกับ การต้านการอักเสบ (Yousef, *et al*., 2012, Muanprasat, *et al*., 2015) การต้านอนุมูลอิสระ (Fang, *et al* 2013, Huang, *et al*., 2015) การยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ในเซลล์มะเร็ง (Wu, *et al*., 2012) และ อื่นๆ อีกมากมาย

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย

3.1 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ คอซ ที่ผลิตขึ้นมาด้วย เอนไซม์ chitosanase ที่ได้พัฒนาขึ้นมาในห้องปฏิบัติการ

ผลงานวิจัยในส่วนนี้ได้นำไปตีพิมพ์ และผ่านการประเมินโดยผู้ทรงคุณวุฒิแล้ว โดยผู้วิจัยได้ทำการผลิต คอซ ด้วยเอนไซม์ที่ได้พัฒนาขึ้นมาในห้องปฏิบัติการวิจัย จากโครงการก่อนหน้านี้ จากนั้นนำไปศึกษาโครงสร้างเชิงลึก ร่วมกับผู้เชี่ยวชาญชาวนอร์เวย์ แล้วจึงได้นำมาวิเคราะห์ฤทธิ์ ต้านการอักเสบในเซลล์โดย ผลงานวิจัยส่วนนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ ในระดับปริญญาเอก ในส่วนการวิเคราะห์โครงสร้าง คอซ ในส่วนการวิเคราะห์ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ มีนักวิจัยหลายท่านมาร่วมงาน ผลงานวิจัยได้ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติที่ผ่านการ review PLOS One มีค่า IF 2.74 ในปี 2019 Q1 (Jitprasertwong, *et al*., 2021)

Jitprasertwong P, Khamphio M, Petsrichuang P, Eijsink VGH, Poolsri W, Muanprasat C, Rangnoi K, Yamabhai M. Anti-inflammatory activity of soluble chito-oligosaccharides (CHOS) on VitD3-induced human THP-1 monocytes. PLoS One. 2021 Feb 3;16(2):e0246381. doi: 10.1371/journal.pone.0246381. PMID: 33534833; PMCID: PMC7857634.

เนื้อหาแสดงใน 17 หน้าถัดไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

Anti-inflammatory activity of soluble chito-oligosaccharides (CHOS) on VitD3-induced human THP-1 monocytes

Paiboon Jitprasertwong[1☯], Munthipha Khamphio[2☯], Phornsiri Petsrichuang[2☯], Vincent G. H. Eijsink[3], Wanangkan Poolsri[4], Chatchai Muanprasat[4], Kuntalee Rangnoi[2], Montarop Yamabhai[2]*

1 School of Geriatric Oral Health, Institute of Dentistry, Suranaree University of Technology (SUT), Nakhon Ratchasima, Thailand, **2** Molecular Biotechnology Laboratory, School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology (SUT), Nakhon Ratchasima, Thailand, **3** Faculty of Chemistry, Biotechnology and Food Science, Norwegian University of Life Sciences (NMBU), Ås, Norway, **4** Faculty of Medicine, Chakri Naruebodindra Medical Institute, Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Samutprakarn, Thailand

☯ These authors contributed equally to this work.
* montarop@g.sut.ac.th

Check for updates

OPEN ACCESS

Citation: Jitprasertwong P, Khamphio M, Petsrichuang P, Eijsink VGH, Poolsri W, Muanprasat C, et al. (2021) Anti-inflammatory activity of soluble chito-oligosaccharides (CHOS) on VitD3-induced human THP-1 monocytes. PLoS ONE 16(2): e0246381. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246381

Editor: A. M. Abd El-Aty, Cairo University, EGYPT

Received: September 1, 2020

Accepted: January 18, 2021

Published: February 3, 2021

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246381

Copyright: © 2021 Jitprasertwong et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting information files.

Abstract

Chito-oligosaccharides (CHOS) are oligomers of D-glucosamine and *N*-acetyl-glucosamine. Anti-inflammatory activities of a wide variety of CHOS mixtures have previously been reported, mainly based on studies with mouse models and murine macrophages. Since the mouse and human immune systems are quite different, gaining insight into the activity of CHOS on human cell lines, using well-characterized CHOS mixtures, is of considerable interest. *Bacillus subtilis* chitosanase (BsCsn46A) can efficiently convert chitosan to mixtures of water soluble low molecular weight CHOS. Here, the anti-inflammatory activity of a properly characterized CHOS mixture was studied, using human THP-1 cells that were differentiated to mature monocytes using vitamin D3. Addition of CHOS reduced the production of multiple pro-inflammatory cytokines associated with bacterial lipopolyssacharide (LPS)-stimulated inflammation, in a dose-dependent manner and without affecting cell viability. Interestingly, only minimal effects of CHOS were observed in similar experiments with phorbol 12-myristate 13-acetate- (PMA-) differentiated, macrophage-like, THP-1 cells. Altogether, in addition to showing promising biological effects of well-characterized low molecular weight soluble CHOS in a human system, the present study also points at Vitamin D3-stimulated THP-1 cells as a favorable system for assessing the anti-inflammatory activity of bioactive compounds.

Introduction

Chitosan, a deacetylated form of chitin, which is the main structural component of the exoskeletons of arthropods and fungi, can be considered as one of the most promising biomaterials of the 21st century [1]. This is because chitosan and its derivatives possess diverse biological

Funding: This research was supported by the Suranaree University of Technology (SUT) [grant no. RU12/2562], the National Research Council of Thailand (NRCT) and the Office of the Higher Education Commission (OHEC) under the National Research University (NRU) project [grant no. SUT3-304-55-36-18 and SUT3-304-62-36-18]. MK and KR were supported by SUT Fulltime Doctoral Research [grants no. 61/13/2561 and 61/28/2563] and Thailand Science Research and Innovation (TSRI). PP was supported by a SUT-PhD scholarship.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

activities, including antioxidant, anti-inflammatory, anti-diabetes, and anti-bacterial activities [2]. Indeed, multiple companies are currently aiming at commercializing chitin-derived products for a wide variety of applications, ranging from environmental, agricultural, food, medical, pharmaceutical, and cosmeceutical applications [3]. Nevertheless, the mechanisms of action of different chitosans and chitosan-derivatives remain often unclear, one reason being that the compositions of the products and the biological assays used to test them vary [4].

Among the chitin-derived products, chitosan oligosaccharides (CHOS or COS) are highly attractive due to multiple favorable properties. For example, CHOS are soluble in mild acid, non-toxic, biocompatible, and biodegradable, and show good absorption to intestinal epithelia. CHOS can be generated by degradation of chitosan using different methods including heating in mild acid, microwave treatment, or enzymatic degradation [5]. The biological activity of CHOS has been shown to be closely associated with oligomer properties, which are defined by the degree of polymerization (DP), molecular weight (MW), the degree of *N*-acetylation (D_A), or the fraction of acetylation (F_A), and the pattern of *N*-acetylation (P_A) [6,7]. Enzymatic degradation of chitosan is an environmentally friendly approach to produce CHOS with well-defined properties. Various chitosan degrading enzymes have been characterized and can be used to produce CHOS by carefully controlling the biocatalytic process [8].

One of the most significant biological activities of CHOS is their immune-modulatory activity. So far, most studies on the immunomodulating activities of chitosan and CHOS were done using mouse models [9,10] or murine macrophages [10–12]. Until now, data from studies on human systems are scarce, but these limited data have shown interesting results. For example, a hepatoprotective effect of CHOS on Chang liver cells has been reported [13]. In addition, relative long CHOS (5–14 kDa) have been shown to inhibit nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB) transcriptional activity, NF-κB-mediated inflammatory responses, and barrier disruption via 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)-independent mechanisms in the human colon [14]. Since mouse and human immune systems are quite different and considering the encouraging results of previous studies on human cells, gaining further insight into the activity of CHOS on human immune cells is of interest.

The human monocytic cell line THP-1 is the most widely used model for primary human monocytes and macrophages [15]. In this study, THP-1 cells were differentiated to both mature monocytes and microphage-like cells after which the effect of CHOS on Lipopolysaccharides (LPS)-induced proinflammatory responses was investigated. To do so, a well-defined mixture of low molecular weight (0.4–1.4 kDa) soluble CHOS was generated through enzymatic hydrolysis of a highly deacetylated chitosan (F_A 0.15) with a previously characterized *Bacillus subtilis* chitosanase (*Bs*CsnA) [16].

Materials and methods

Chitosans

Chitosan F_A 0.15, with a MW of approximately 37 kDa, was provided by Teta Vennrensing (Kløfta, Norway).

Chitooligosaccharide (CHOS) production and analysis

Production of CHOS was performed based on a previous method [17]. Briefly, one gram of chitosan was dissolved in 1% HCl containing 0.1 mg/mL bovine serum albumin (BSA). Then, the pH was adjusted to 5.5 using 1M NaOH. Chitosan solutions (final concentration of 10 mg/mL, in 100 mL reaction volume) were pre-incubated for 30 min in an incubator shaker at 37˚C. The degradation reaction was started by adding 0.5 μg of *Bacillus subtilis* chitosanase

(*Bs*Csn46A; [16]) per mg of chitosan. To obtain maximum degradation, the same amount of enzyme was added at 6 h (360 min) and 24 h (1,440 min) after the start of the incubation, which was continued for 48 h (2,880 min) in total. Samples were taken from the reaction at various time points, from 10 min to 2,880 min. The reaction was stopped by adding 1M HCl followed by heating at 100˚C for 3 min. Then, the samples were dried under vacuum. For characterization, the samples were dissolved in D_2O or 0.15 M ammonium acetate, pH 4.5, for ^{1}H-NMR or size exclusion chromatography (SEC) analysis, respectively. The remaining reaction was stopped by heating in boiling water for 10 min to inactivate the enzyme. Then, the CHOS were lyophilized and stored at -20˚C until use. For biological assays, CHOS were dissolved in de-ionized water (DI) and the pH was adjusted with 6 N NaOH to 7.

NMR spectroscopy

Samples for ^{1}H-NMR analysis were dissolved in D_2O, and the pD was adjusted to 4.3–4.6 with DCl or NaOD. ^{1}H-NMR spectra were obtained at 400 M*Hz*, at 85˚C, as previously described [18]. The degree of scission (α) and the DPn were calculated according to a previously published method [19].

Size exclusion chromatography (SEC)

CHOS were separated on three XK 26 columns connected in series and packed with Superdex™ 30 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), with an overall dimension of 2.60 × 180 cm. The elution buffer used was 0.15 M ammonium acetate, pH 4.5. The elution buffer was pumped through the system using an LC-10ADvp pump (Shimadzu GmbH, Duisburg, Germany), delivering the elution buffer at a flow rate of 0.8 mL/min. The eluting oligomers were monitored with a refractive index (RI) detector (Shodex RI-101, Shodex Denko GmbH, Dusseldorf, Germany) coupled to a CR 510 Basic Data logger (Campbell Scientific Inc., Logan, UT). To characterize the isolated CHOS, fractions of 4 mL were collected using a fraction collector. For quantitative studies of degradation, typically 10 mg of degraded chitosan was injected.

Analysis of CHOS by mass spectrometry (MS)

Identification of CHOS was performed with Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization mass spectrometry (MALDI TOF/TOF MS). MS spectra were acquired using an UltraflexTM TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) with gridless ion optics under the control of Flexcontrol. For sample preparation, 1 μL of the reaction products was mixed with 1 μL of 10% 2,5 dihydroxybenzoic acid (DHB) in 30% acetonitrile and spotted onto a MALDI target plate (Bahrke et al. 2002). The MS experiments were conducted using an accelerating potential of 20 kV in the reflectron mode.

Cell culture of THP-1 monocytes

THP-1 cells (passage 41 Lot-no. 300356-1714SF) were purchased from CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Germany. The cells were maintained in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium, supplemented with 1% L-glutamine, 1% sodium pyruvate, and 10% fetal bovine serum (Gibco, Barcelona, Spain) at a concentration of 3–8 x 10^5 cells/mL, at 37˚C, 5% CO_2. The medium was changed three times a week and cells were passaged at regular intervals to assure optimum cell concentration. Cells were counted under a microscope using a haemocytometer (Bright-Line, improved Neubauer, Hausser Scientific, Pennsylvania, USA) and passaged at least one time after thawing before being used for an experiment. All experiments were conducted with cells after 4–14 passages.

Differentiation of THP-1 cells with Vitamin D_3 or Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)

THP-1 monocytes (1 x 10^6 cells/mL) in growth media were pre-mixed with 0.2 μM 1α, 25-Dihydroxy-Vitamin D_3 (VitD3, Calbiochem, Merck Chemicals, Nottingham, UK) or 25 ng/mL (40 nM) PMA (Cat. P1585, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) for inducing differentiation into mature monocytes or macrophages, respectively, before seeding into appropriate tissue culture plates. Unless otherwise stated, 400 μl of the cell mixture was seeded into wells of a 24-well tissue culture plate (4 x 10^5 cell/well). After 48 h, VitD3 differentiated THP-1 cells were used for a challenging experiment. For PMA-induced THP-1 cells, after 48 h, the plate was centrifuged at 700 *x g* for 5 min, after which the PMA-containing medium was replaced with fresh RPMI, and the plate was incubated for another 24 h at 37˚C, 5% CO_2 before a challenging experiment was initiated.

Treatment of CHOS before challenging differentiated-THP-1 cells with bacterial lipopolysaccharides (LPS)

To examine the effect of CHOS on the release of cytokine(s) by THP-1 cells upon LPS stimulation, THP-1 cells (4 x 10^5 cell/well in 24-well plate) were differentiated with VitD3 or PMA as described in section 2.7. Then, 50 μL of a CHOS mixture in RPMI was added to reach final concentrations of 0 to 200 μg/mL, and the cells were incubated for 24 h. After that 50 μL of LPS from *E. coli* 0111:B4 (Invivogen, Calne, Wilts, UK) in RPMI medium to a final concentration of 100 ng/mL was added to stimulate the inflammatory response. After 7 h of LPS challenge, supernatants were collected to determine cytokine release as described in section 2.9. Dexamethasone (Cat. D4902, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) at 0.2 μg/mL (0.5 μM), a standard anti-inflammatory drug, was used as a positive control in these experiments.

In one experiment, CHOS was removed from the cells after 24 h treatment before LPS was added. In this experiment, 500 μl of PBS was added, the plate was centrifuged at 700 *x g*, supernatant was removed, and the cells were washed one more time with 1000 μl of PBS, before 500 μL of medium containing LPS at a final concentration of 100 ng/mL was added.

Determination of cytokines released upon LPS-stimulation

ELISA-based methods were used to determine the concentration of cytokines secreted into culture supernatant after LPS stimulations of differentiated-THP-1 cells at various experimental conditions. The analysis was done according to the manufacturer's protocols (R & D Systems; Minneapolis, USA), for Interleukin (IL)-1β (Human IL-1β DuoSet ELISA, Cat.DY201, Lot.P218283), IL-6 (Human IL-6 DuoSet ELISA, Cat.DY206, Lot.P154822) and Tumor necrosis factor (TNF)-α (Human TNF-α DuoSet ELISA, Cat.DY210, Lot.P153726). The reported values represent the average of triplicate wells.

The effect of CHOS on the viability of LPS-treated THP-1 monocytes (MTT assay)

THP-1 cells in 100 μL RPMI medium (1x10^5 cells/well in a 96-well plate; triplicates) were treated with 0.2 μM VitD3 for 48 h. After that, 12.5 μL of CHOS solutions in RPMI medium to various final concentrations were added and incubated for 24 h. Then, 12.5 μL of LPS solution in RPMI medium to a final concentration of 100 ng/mL was added into each well. After 7-h of LPS stimulation, the plates were centrifuged at 700 x *g* for 5 min, and 100 μL of the supernatant was removed. Then, the 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) assay [20] was performed by adding 100 μL of a 0.5 mg/mL MTT (Invitrogen, USA)

solution in RPMI medium into each well. After 2 h of incubation at 37˚C and 5% CO_2, the plate was centrifuged at 700 x *g* for 5 min and the supernatant was removed. Then, formazan crystals were solubilized by adding 175 μL of solubilization reagent (40% Dimethylformamide, 20% glacial acetic 16% SDS, pH 4.7), followed by incubation at 37˚C for 1 h. The absorbance at 595 nm was measured using a microplate reader (Tecan, Austria). The reported values are the average absorbance of three independent experiments after subtraction of a blank without cells.

Assessment of cluster of differentiation (CD) 14 and cell viability by flow cytometry

THP-1 monocytes (2 x 10^6 cell/well in 6-well plates) were differentiated with VitD3 or PMA, as described in section 2.7. To prepare cell for flow cytometry analysis, both suspension and attached cells were collected from the plate at 0, 48, 72 and 96 h into centrifuge tubes and spun down. Then 100 μL of cell suspensions in microcentrifuge tubes containing 2x10^5 cells were incubated with 2 μL of FITC-conjugated anti-human CD14 Antibody (BioLegend Way, California, USA) for 15 min at 4˚C, followed by washing with 900 μL of PBS. Then, the tubes were centrifuged at 700 x *g* for 5 min to remove the supernatant, and, subsequently, the cells were stained with 1 μL of Propidium iodide (PI) (Cat. P3566, Life Technologies Corporation, USA) in 400 μL of PBS. For flow cytometry, a minimum of 10,000 events were acquired on an Attune™ NxT Acoustic Focusing cytometer (Thermofisher Scientific, USA), using Attune™ NxT v3.1.2 Software for data analysis. CD14 and PI were analyzed using the BL-1 and YL-2 channels, respectively. Quadrant regions indicated the percentage of cells for each sub-population.

Effect of CHOS on AMP-activated protein kinase (AMPK) activation in T84 cells

Human colon T84 cells (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) were cultured in a mixture of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) and Ham's F-12 medium (1:1) (Gibco, MA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin and 100 μg/mL streptomycin (Gibco, Massachusetts, USA) in a 5% CO_2 humidified incubator at 37˚C. For this assay, the cells were seeded in 6-well plates (Corning, Manassas, Virginia, USA) at a density of 1 × 10^6 cells/well. After treatments with solubilizing reagent (DMSO) or 100 μg/mL CHOS, or 10 μM A-769662 (a known AMPK activator; Tocris Bioscience, Bristol, UK) for 24 h, cell lysates were generated using a lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton-X100, 1 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 and 1 mM PMSF. The protein concentration in the lysates was quantified using the Bradford assay (Bio-Rad Laboratories, California, USA). Absorbance was determined at 595 nm using a microplate reader (BioTek Synergy Neo2). Extracted proteins were separated by 10% sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to 0.45 μm nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with 8% non-fat milk (Bio-Rad Laboratories, California, USA) in Tris Buffered Saline and 0.1% Tween 20 (TBST) for one hour at room temperature, followed by overnight incubation at 4˚C with specific primary antibodies against phospho-AMPKα (Thr172), AMPKα or β actin (Cell Signaling Technology, USA). Then, the membranes were incubated with a horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibody (Abcam, Massachusetts, USA) for one hour at room temperature, followed by addition of the HRP substrate for enhanced chemiluminescence (Luminata Forte, Merck Millipore, Germany). The intensity of the protein bands was measured using a

ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad Laboratories, California, USA). A total of 5 experiments were performed.

Statistical analysis

The data was recorded as mean ± standard deviation (SD) and were analyzed by one-way and two-way analysis of variance (ANOVA). Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparisons test were applied for analyses of non-parametric data of Figs 4–7. For Fig 3, parametric data were analyzed with Brown-Forsythe ANOVA and Unpaired t with Welch's correction test, after normal distribution was indicated. Statistical testing was performed using GraphPad Prism 8 software (GraphPad Software Inc., California, USA). Tables of data with mean ± standard deviation (SD), sample sizes and the exact *P*-values of each experiment can be found in the supplementary material, S1 Table.

Results and discussion

Characterization of the soluble CHOS

*Bs*Csn46A is one of the fastest chitosanases published so far, with reported initial rates being as high as $5.5x10^3$ min^{-1} for F_A 0.15 chitosan [17]. A detailed analysis of CHOS generated by treating F_A 0.15 chitosan with this enzyme has been reported previously [17]. In this study, the reaction was carried out in 100 mL scale and with multiple additions of higher amounts of enzyme to ensure that the chitosan substrate was completely converted to soluble CHOS.

To compare with the previous results obtained from the production of CHOS in analytical scale, ^{1}H-NMR spectroscopy was used to analyze the time course of the degradation. Fig 1 shows the degree of scission (α), i.e., the fraction of glycosidic linkages in the chitosan that has been cleaved by the enzyme, plotted against the reaction time. The progress curve was similar to the curve obtained previously [17] and comprised 2 phases, a rapid initial phase, followed by a slower second phase. After 48 h, the α value reached the maximum of 0.37, which is slightly higher than the value typically obtained in analytical scale reactions. Size exclusion chromatography (SEC) was also employed to analyze the CHOS mixtures as show in Fig 2. At 24 h (1,440 min) of reaction, a small void peak (DP > 50) was still visible (Fig 2A). After addition of more enzyme and incubation for another 24 h, the polymer peak disappeared, confirming complete degradation of the chitosan substrate. The major products were DP 2–3 (Fig 2B) as previously observed [17].

Finally, the chemical compositions of CHOS in fractions obtained after the SEC were analyzed by MALDI-TOF-MS, and the results are summarized in Table 1. The data show that the hydrolytic products obtained upon hydrolyzing F_A 0.15 chitosan with *Bs*Csn46A mainly are fully deacetylated dimers and trimers, whereas the less abundant longer products contain one or more acetylated units. The MS analysis confirmed the chromatographic data (Fig 2) showing that the CHOS products are small with the MW ranging from approximately 0.4 kDa (DP2) to 1.2 kDa (DP6).

Different effects of CHOS on LPS-induced secretion of IL-1β by PMA or VitD3-differentiated THP-1 cells

Human THP-1 cells, induced for differentiation by PMA or VitD3 to become macrophages or mature monocytes, respectively, were used to explore a possible inhibitory effect of CHOS on LPS-stimulated release of the pro-inflammatory cytokine IL-1β. After differentiation, the cells were treated with 100 μg/mL of CHOS for 24 h before challenging with LPS for 7 h. Supernatants were collected and assayed for IL-1β concentrations by ELISA (Fig 3). The results showed

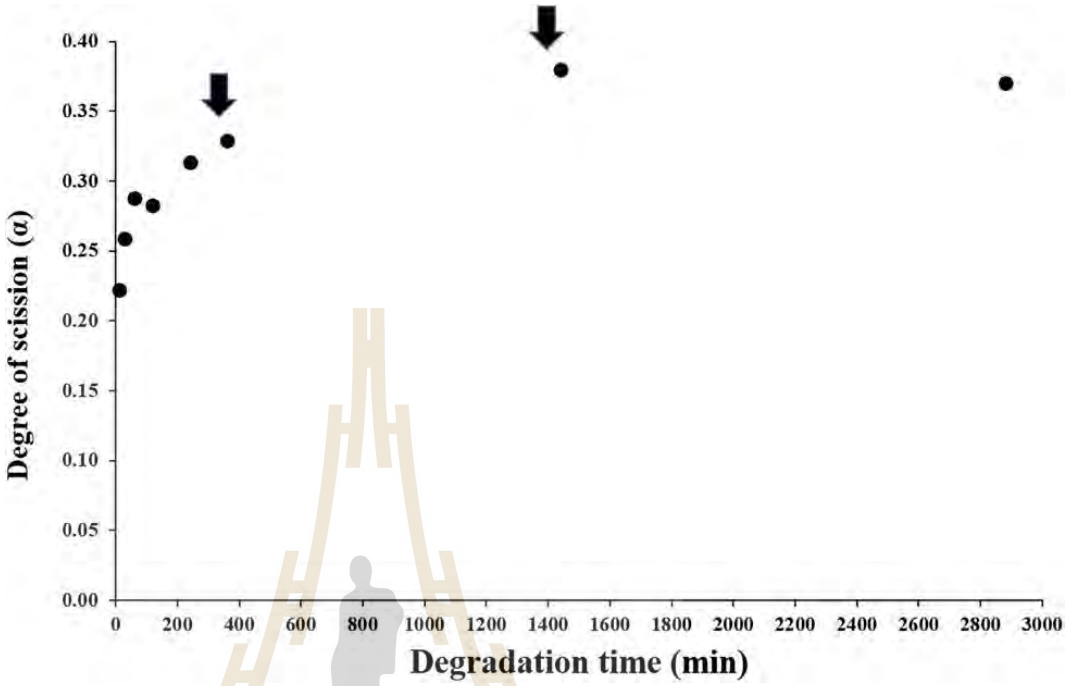


Fig 1. Time-course of the degradation of chitosan by *Bs*Csn46A. Time-course for the increase in the degree of scission (α) during degradation of chitosan with F_A 0.15 using *Bs*Csn46A. The graph shows the degree of scission (α) determined by ^{1}H NMR in 30 mL reactions containing 10 mg/mL chitosan and 0.5 μg of *Bs*Csn46A per mg of chitosan in 40 mM sodium acetate buffer, pH 5.5, 100mM NaCl, and 0.1 mg BSA/mL. The α value was calculated as the inverse value of DP_n (average degree of polymerization) [19]. In an attempt to reach maximum conversion of the chitosan, additional *Bs*Csn46A was added at 0.5 μg per mg of chitosan after incubation for 360 min and 1440 min (black arrows), and the degradation reaction was continued for another 1440 min.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246381.g001

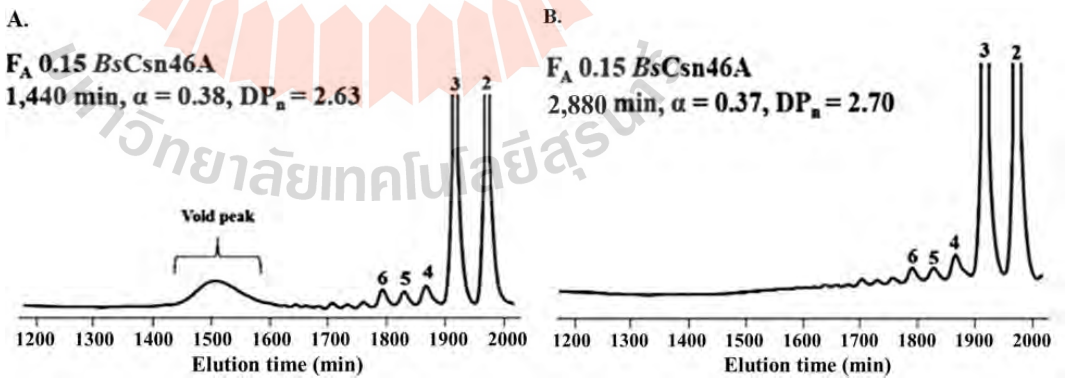


Fig 2. Product analysis by size exclusion chromatography (SEC). Size distribution of CHOS after degradation of chitosan F_A 0.15 with *Bs*Csn46A at 37˚C for 24 h (A) and 48 h (B). The peaks are labeled by numbers indicating the DP values.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246381.g002

Table 1. Chemical composition of CHOS fractions derived from the CHOS mixture used in this study*.

DP	Detected species
2	**DD**, DA, AA
3	**D3**, **D2A1**, D1A2
4	**D4, D3A1**, D2A2,
5	D5, **D4A1**, D3A2, D2A3
6	D6, **D5A1**, **D4A2**, D3A3

*The CHOS preparation used in this study was fractionated by SEC (Fig 2B) and fractions containing oligomers with DP2 to DP6 were collected for analysis by MALDI-TOF MS. The bold letters represent seemingly dominant products in the fractions, based on the signal intensities in the MS spectra.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246381.t001

that, as expected, LPS induced IL-1β release from both PMA- and VitD3-differentiated THP-1 cells (grey bars) and that IL-1β levels were about two-fold higher for vitD3-differentiated THP-1 cells, compared to PMA-differentiated cells. Interestingly, treatment with CHOS inhibited IL-1β production. While the effect was modest for the PMA-induced cells, strikingly, the effect was large for the VitD3-induced THP-1 cells.

Divergent responses of THP-1 cells upon induction for differentiation by PMA and VitD3

To gain insight into the discrepancy in the inhibitory effects of CHOS on LPS-induced IL-1β secretion by PMA- and VitD3-induced THP-1 cells, the expression of CD14, a macrophage biomarker, and cell viability, as a proxy of apoptotic cell death, were assessed. CD14 is an

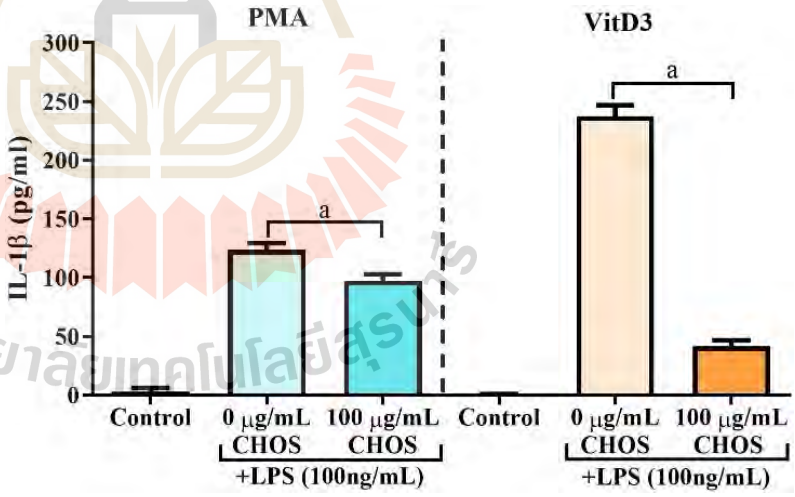


Fig 3. The effect of CHOS on IL-1β release from PMA and VitD3-differentiated THP-1 monocytes/macrophages after challenging with LPS. ELISA results showing IL-1β released after LPS stimulation of PMA- or VitD3-differentiated THP-1 cells. IL-1β was measured for cells that were treated with 0 and 100 μg/mL CHOS for 24 h before challenging with 100 ng/mL LPS for 7 h. The IL-1β concentration for cells that were not challenged with LPS (control) is shown for comparison. The results are expressed as the mean ± SD of duplicates from three independent experiments (n = 6); a indicates significant difference at ($P < 0.001$).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246381.g003

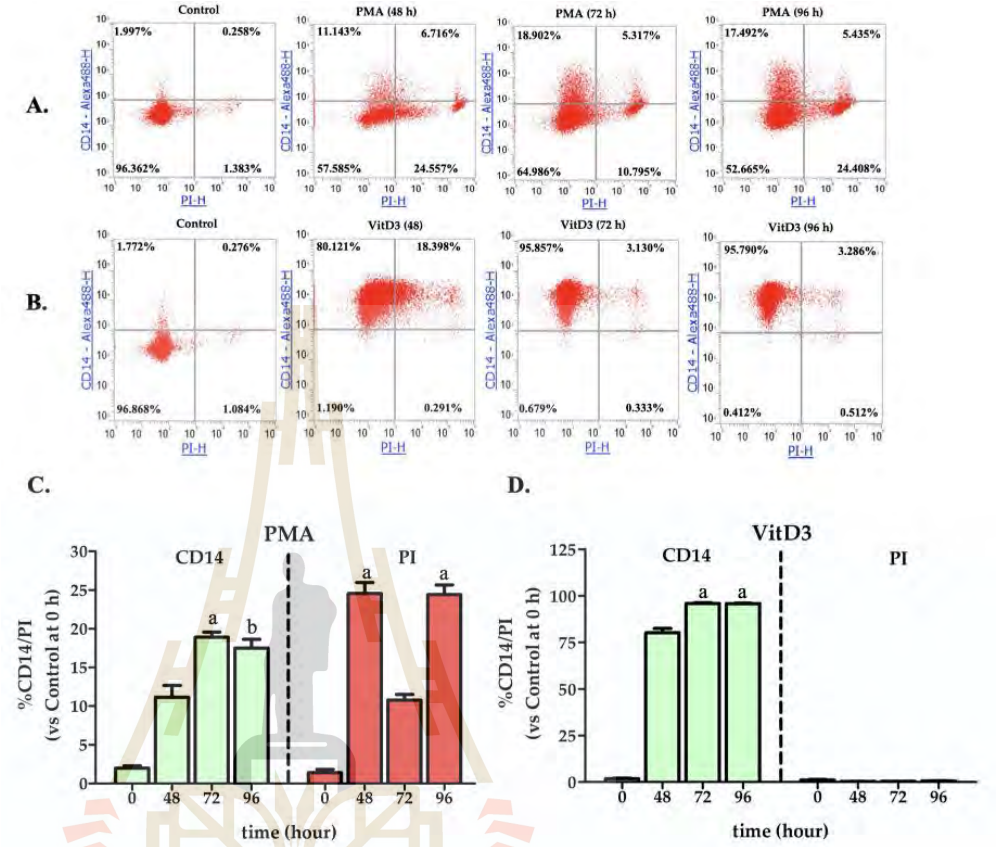


Fig 4. Flow cytometry analysis of CD14 expression and PI staining. Panels (**A**) and (**B**) show representative experiments of flow cytometry dot plots for PMA- and VitD3- differentiated cells, respectively. The bar graphs show analyses of CD14 expression and PI staining for PMA- (**C**) and VitD3-differentiated (**D**) THP-1 cells, measured by flow-cytometry at different time points, namely 0, 48, 72 and 96 h. The percentages of CD14- and PI- stained cells in comparison to the un-stimulated THP-1 cells (time 0) are shown. The bars show the mean ± SD of three independent duplicated experiments (n = 6); a = ($P < 0.001$) and b = ($P < 0.01$) indicate significant differences, relative to the control (0 time). Note that for PMA treated cells, the medium containing PMA was removed after 72 h to fresh media in order to get rid of PMA.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246381.g004

essential co-receptor for the recognition of bacterial LPS, binding directly to LPS and presenting LPS molecules to the TLR4-MD-2 signaling complex, which leads to cellular activation [21]. These two properties were assessed by antibody and propidium iodide (PI) staining, respectively, and staining levels were determined by flow cytometry. THP-1 monocytes (1.0 x 10^6 cells/well) were incubated with PMA or VitD3 and collected for staining and subsequent analysis at 4 different time points, i.e., at 0, 48, 72 and 96 h after induction. As shown in Fig 4, a large increase in CD14 expression was observed only in vitD3-induced THP-1 monocytes. Notably, while PMA had lesser effect on CD14 expression, cell death amounting to 10–25% of the cells was observed, as indicated by PI staining (Fig 4A).

In summary, Fig 4 shows that the different responses to LPS and CHOS in VitD3- and PMA-induced cells may be due to quite pronounced differences between the two differentiated cell types. It is known that stimulation of THP-1 cells with potent inducer agents such as PMA

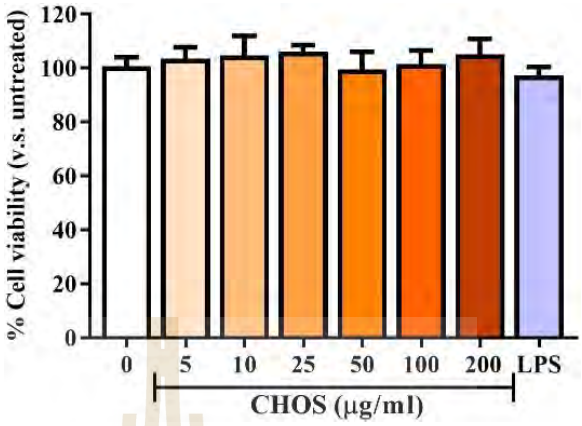


Fig 5. Cytotoxic effects of CHOS and LPS on VitD3-differentiated THP-1 cells. The MTT assay was used to determine cell viability after VitD3-differentiated THP-1 cells had been treated with various concentrations of CHOS for 24 h. Relative cell viability was calculated based on untreated cells (0 μg/ml, 100%). The effect of LPS on the viability of VitD3-differentiated THP-1 cells was also determined, as shown by the grey bar. The data shown are mean±SD from three independent triplicated experiments (n = 9). A Kruskal-Wallis test indicated no significant differences relative to cells treated with 0 μg/mL CHOS.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246381.g005

may cause phenotypic and functional differences and growth cycle arrest [22]. Accordingly, in the present experiments, the number of PI-positive cells increased after PMA- induced differentiation, suggesting that PMA may be cytotoxic, while there were almost zero PI-positive cells among vitamin D3-differentiated cells. Treatment of THP-1 cells with $VitD_3$ is known to induce the cells to differentiate along the myeloid lineage to mature monocyte-like cells, resembling primary human monocytes, which are characterized by expressing a high level of CD14 and are capable of releasing a myriad of cytokines [23,24].

Taken together, the present results demonstrate for the first time that vitamin D3-differentiated THP-1 cells provide an appropriate model system that can be used as an *in vitro* platform for screening of anti-inflammatory activities of bioactive compounds, including CHOS. Therefore, VitD3-induced THP-1 cells were used in the subsequent experiments.

CHOS and LPS have no cytotoxic effects on THP-1 monocytes

The MTT assay was performed to evaluate the effects of CHOS and LPS on the viability of VitD3-induced THP-1 cells. The experiments were designed to resemble the standard anti-inflammatory assay. Cells were exposed to various concentration of CHOS (0–200 μg/mL) or LPS (100 ng/mL). As shown in Fig 5, neither CHOS (0–200 μg/mL) nor LPS affected the viability of the THP-1 monocytes. These results indicate that CHOS and LPS, at the cocenetrations used in this study have no direct effect on THP-1 monocytes, and that CHOS-induced changes in cytokine or cell surface receptor expression were not due to changes in cell viability or proliferation.

Dose-response relationships for the inhibitory activity of CHOS on secretion of IL-1β, IL-6 and TNF-α by LPS-stimulated VitD3-differentiated THP-1 cells

To further evaluate the inhibitory effect of CHOS on the production of inflammatory cytokines by THP-1 monocytes, dose-response effects for CHOS-mediated inhibition of the

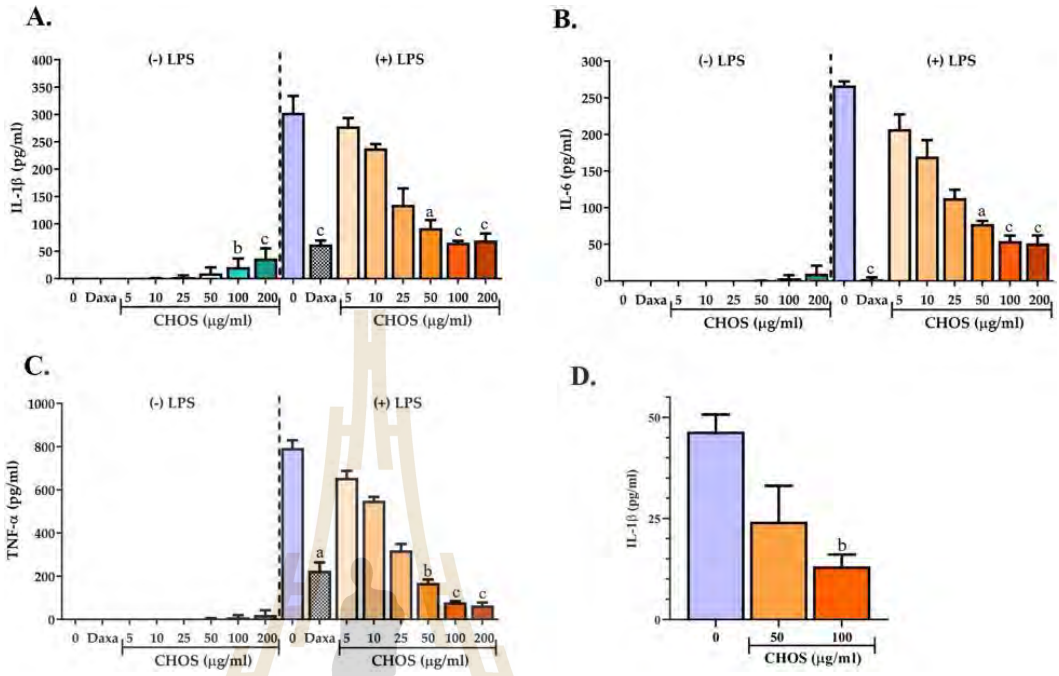


Fig 6. Dose-repose effects for the *in vitro* anti-inflammatory activity of soluble CHOS on human THP-1-derived monocytes. The effects of CHOS, at final concentrations ranging from 0 to 200 μg/mL, on release of IL-1β (**A**), IL-6 (**B**), and TNF-α (**C**) by LPS-stimulated, VitD3-differentiated THP-1 cells were determined by ELISA. Dexamethasone (0.5 μM), a standard anti-inflammatory drug, was used as a positive control. (**D**) An extra washing step was done after CHOS treatment before LPS challenging. The shown data are from three independent duplicated experiments (n = 6) except Fig 6D, which reflects one triplicated experiment (n = 3). Significance levels: a = $P < 0.001$, b = $P < 0.01$, c = $P < 0.05$ (compared with 0 μg/mL CHOS). See S1 Fig for an enlargement of data from the experiments without LPS stimulation (-LPS).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246381.g006

production of three pro-inflammatory cytokines, IL-1β, IL-6 and TNF-α, that are mainly produced by monocytes and macrophages [25], were determined. These cytokines are elevated in the early phase of infection and inflammation, and their excessive or unbalanced production may enhance systemic inflammation and mediate severe inflammatory diseases, which are responsible for the initiation and progression of a series of pathologies [26,27], including SARS-CoV-2 infection, which may lead to a lethal cytokine storm [28].

In this experiment, VitD3-differentiated THP-1 cells were treated with CHOS (0–200 μg/mL) for 24 h and then exposed to LPS for 7h. Dexamethasone-treated cells served as a positive control. The levels of IL-1β, IL-6 and TNF-α in the supernatants were analyzed by ELISA. Fig 6A–6C shows that LPS significantly increased the secretion of IL-1β, IL-6 and TNF-α from THP-1 monocytes ($p < 0.001$). Most importantly, CHOS significantly decreased LPS-induced IL-1β, IL-6 and TNF-α release from THP-1 monocytes ($p < 0.001$) in a dose-dependent manner. Anti-inflammatory activity of CHOS could be observed when CHOS concentrations were as low as 5 μg/mL and the effect gradually increased upon increasing the dose of CHOS, with maximum inhibition being reached at a dosage of 100 μg/mL. Importantly, the levels of all three pro-inflammatory cytokines were reduced. The maximum inhibitory effect obtained with these soluble CHOS is comparable to the effect of 0.2 μg/mL (0.5 μM) dexamethasone.

Notably, while CHOS at 200 μg/mL strongly inhibited the cytokine response upon LPS stimulation, this high concentration of CHOS slightly enhanced the release of IL-1β, IL-6 and

TNF-α in cells that were not exposed to LPS (see S1 Fig for an enlargement of the Y-axis scale). These results indicate that the optimal dosage of CHOS must be carefully evaluated to obtain the highest benefit, as the higher dosage of CHOS seems to (slightly) promote inflammation.

High molecular weight (30–130 kDa) chitosan forms a stable water-soluble chitosan–LPS complex through electrostatic interactions. Interestingly, it has been shown that these complexes enhance the secretion of TNF-α from murine monocyte cell line RAW 364.7 and IL-8 production from HEK293 cells overexpressing TLR4/MD2 [29]. This result contradicts another finding, which indicated that chitosan with a molecular weight of 5–300 kDa could slightly reduce LPS-induced secretion of TNF-α and IL-1β by RAW 364.76 cells, in a dose-independent manner [30]. Compared to these previous studies, with somewhat conflicting results, the CHOS used in the present study are very small and have a much stronger inhibitory effect on LPS-induced secretion of pro-inflammatory cytokines. Considering the small size and the performance of the CHOS, it is unlikely that complexation with LPS, and, consequently, blocking the effect of LPS on the THP- cells, is the mechanism behind the observed anti-inflammatory effects. To proof this hypothesis, an additional experiment with an extra washing step, after the CHOS treatment and before challenging with LPS, was conducted. As shown in Fig 6D, inhibitory effects of soluble CHOS can still be observed, even though the amount of secreted IL-1β was reduced due to a reduction in the numbers resulting from the washing step. This finding indicates that CHOS acts on an intracellular inflammatory signaling pathway of the THP-1 monocytes.

Anti-inflammatory activities of different CHOS mixtures with various compositions obtained from diverse preparation methods have been reported using different assay systems, such as mouse models and various cell lines including murine RAW 264.7 macrophages, murine *microglial* cell line *BV-2*, and human endothelial T84 cells [2,31]. To the best of our knowledge, this is the first report on the anti-inflammatory activity of CHOS on human monocytes.

Soluble CHOS do not inhibit CD14 expression in THP- cells but activate AMP activated protein kinase (AMPK) in T84 cells

In an attempt to find the mechanism of the anti-inflammatory effect of CHOS, the effects of CHOS on the expression of CD14 by THP-1 cells and VitD3-differentiated THP-1 cells (monocytes) were determined using flow cytometry. As shown in Fig 7, CHOS slightly enhanced CD14 expression in VitD3-differentiated THP-1 monocytes, but this effect was minimal compared to the effect of the VitD3 induction itself on CD14 levels. Moreover, when VitD3-differentiated THP-1 cells were challenged with LPS, the levels of CD14 were not affected by treatment with CHOS. These results indicate that the anti-inflammatory effects of CHOS is not due to a reduction of CD14 levels.

Longer CHOS with MW of > 5 kDa have been reported to activate AMP-activated protein kinase (AMPK) [14], and this effect could, at least in part, explain the previously observed anti-inflammatory effect of such CHOS in human intestinal epithelial (T84) cells [2,14]. Thus, this biological activity was investigated using the soluble CHOS employed in the present study (100 μg/mL; 24 h incubation). The results showed that, these short CHOS did activate AMPK in T84 cells, similar to the effect of a known AMPK activator, A-769662, that was used as a positive control (Fig 8). Indeed, it has been reported that AMPK activation could suppresse proinflammatory response in mouse and human macrophage [32]. Therefore, one of the possible mechanism of actions of the soluble CHOS is via the activation of AMPK.

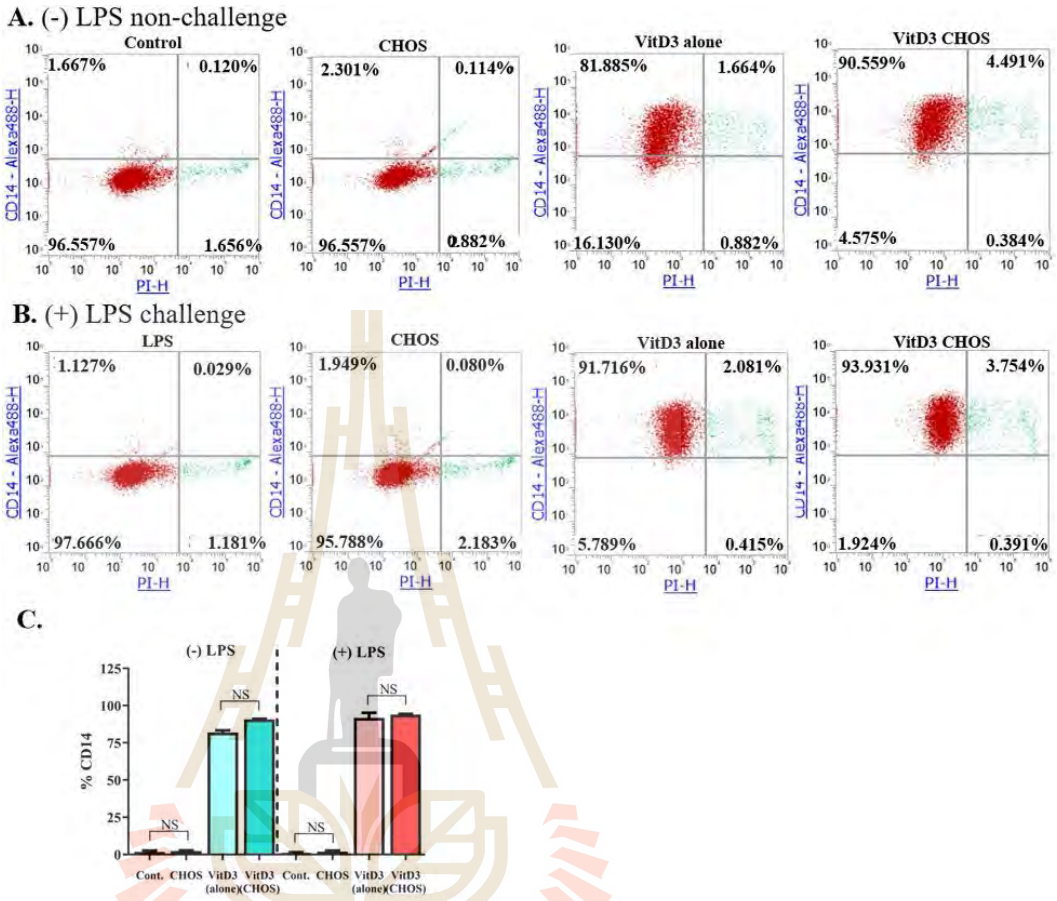


Fig 7. The effect of CHOS and LPS on CD14 expression and viability in THP-1 cells. Both non-differentiated and VitD3 differentiated THP-1 cells were treated with 100 μg/mL of CHOS and 100 ng/mL of LPS. Flow cytometry was used to determine CD14 expression and PI staining. Panels (**A**) and (**B**) show flow cytometry dot plots for representative experiments. The bar chart (**C**) is generated from the average of data from the upper-left quadrant of three independent experiments. The data represent three independent duplicated experiments (n = 6). NS means non-significant.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246381.g007

Inflammation and related cytokine production are complex processes and there are multiple inflammatory signaling pathways that can be inhibited by different compositions of CHOS mixtures. Further investigations must be conducted to completely understand the mechanism of the anti-inflammatory effects of the soluble CHOS used in the present study. Further analysis of the anti-inflammatory effects of CHOS in specific organs *in vivo* should be performed to further assess the potential of using CHOS for protective or therapeutic purposes.

Study strength and limitations

The strength of the present study lies in the utilization of properly characterized CHOS that were prepared using (green) enzyme technology and that, in contrast to the majority of previous studies, were well characterized. The CHOS mixtures in this study have low MW, facilitating incorporation into various nutraceutical or cosmeceutical preparations. In addition,

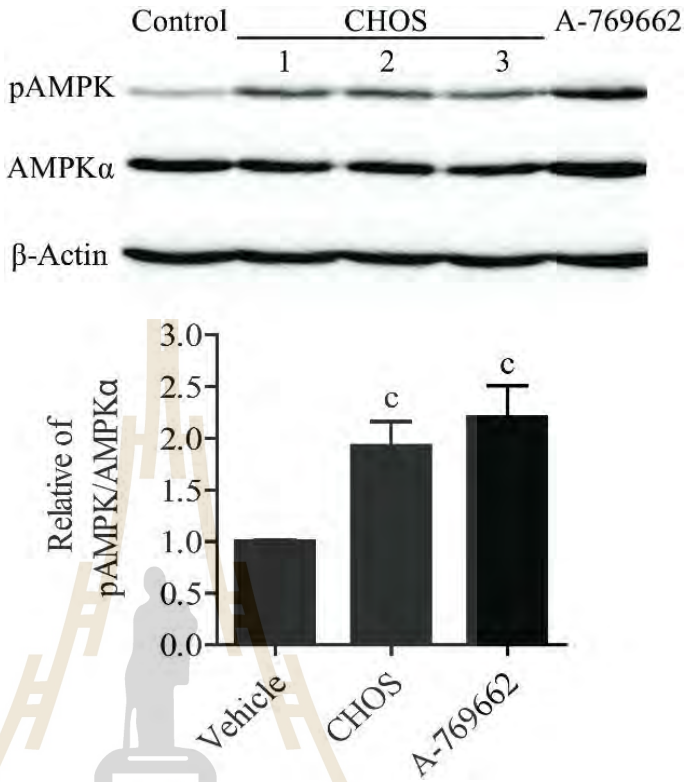


Fig 8. Effects of CHOS on AMPK activation. Western blot (WB) analysis of p-AMPK, AMPKα, and β-actin after treating T84 cells with CHOS at 100 μg/mL for 24 h. Data are analyzed as the ratio of p-AMPK/AMPKα and expressed as fold change in the ratio compared to the ratio for the control group (means ± SEM, n = 5). The compound A-769662 is a known activator of AMPK. c = $P < 0.05$ (compared with control).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246381.g008

human cells, as opposed to commonly used murine systems, were used for characterizing the CHOS, leading to the conclusion that soluble low MW CHOS only act on monocytes. The selective functionality of the CHOS confirms previous observations that different structures of CHOS can have different biological activities. While our study sheds light on the use of THP-1 cells for testing bioactivity, one limitation of the present study is that the biological effects of CHOS were only assessed *in vitro*. Moreover, transcriptomic analyses, which could help elucidate the mechanism of action of CHOS have not been done in this study. Such deeper analyses, including *in vivo* analysis in humans (clinical trials), are of great interest and needed to eventually bring CHOS to the clinic.

Conclusion

In summary, the present study has demonstrated that enzymatic hydrolysis of highly de-acetylated chitosan (F_A 0.15) by a chitosanase from *Bacillus subtilis* (BsCsn46A) yielded soluble, small CHOS products with potent anti-inflammatory activity when tested on VitD3-induced THP-1 cells. A similar effect of CHOS was not observed when using PMA-induced THP-1 cells. The results underscore that the choice of the differentiation method is important when

studying immunomodulatory activities of CHOS with human THP-1 monocytes and that different CHOS structures can have diverse biological activities. The strong anti-inflammatory activity of the CHOS studied here, comparable to Dexamethasone, implies clinical relevance as a novel non-steroidal anti-inflammatory substance. Importantly, the results also indicated that, while CHOS have promising medically relevant properties, the dosage of CHOS in potential pharmaceutical, nutraceutical or cosmeceutical products needs to be carefully optimized to obtain the highest benefits and prevent adverse reactions. Since chitin/chitosan and CHOS are biocompatible and have low toxicity, clinical trials of soluble CHOS products for prevention and treatment of pathogenic inflammatory conditions seem an attractive next step.

Supporting information

S1 Fig. Enlargement of scale for samples without LPS treatment (-LPS). The results of Fig 6 are plotted with a different Y-axis scale, to highlight the values of samples without LPS treatment.
(TIF)

S1 Table. Data from statistical analyses.
(PDF)

S1 File.
(PDF)

Acknowledgments

The authors would like to thank Chai Noi Soem, Thae Thae Min, Thanaporn Pimpakan, and Salinthip Jarusintanakorn for excellent technical assistance and advice.

Author Contributions

Conceptualization: Paiboon Jitprasertwong, Vincent G. H. Eijsink, Montarop Yamabhai.

Data curation: Chatchai Muanprasat, Kuntalee Rangnoi.

Funding acquisition: Montarop Yamabhai.

Investigation: Paiboon Jitprasertwong, Munthipha Khamphio, Phornsiri Petsrichuang, Wanangkan Poolsri.

Methodology: Paiboon Jitprasertwong, Chatchai Muanprasat, Montarop Yamabhai.

Project administration: Montarop Yamabhai.

Resources: Montarop Yamabhai.

Supervision: Paiboon Jitprasertwong, Vincent G. H. Eijsink, Chatchai Muanprasat, Montarop Yamabhai.

Validation: Paiboon Jitprasertwong, Vincent G. H. Eijsink, Kuntalee Rangnoi, Montarop Yamabhai.

Visualization: Munthipha Khamphio, Phornsiri Petsrichuang, Wanangkan Poolsri.

Writing – original draft: Paiboon Jitprasertwong, Munthipha Khamphio, Phornsiri Petsrichuang, Chatchai Muanprasat.

Writing – review & editing: Vincent G. H. Eijsink, Montarop Yamabhai.

References

1. Khoushab F, Yamabhai M. Chitin Research Revisited. Mar Drugs. 2010; 8(7):1988–2012. https://doi.org/10.3390/md8071988 PMID: 20714419
2. Muanprasat C, Chatsudthipong V. Chitosan oligosaccharide: Biological activities and potential therapeutic applications. Pharmacology & therapeutics. 2017; 170:80–97. Epub 2016/10/30. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.10.013 PMID: 27773783
3. Liang S, Sun Y, Dai X. A Review of the Preparation, Analysis and Biological Functions of Chitooligosaccharide. Int J Mol Sci. 2018; 19(8). Epub 2018/08/01. https://doi.org/10.3390/ijms19082197 PMID: 30060500
4. Aam BB, Heggset EB, Norberg AL, SØrlie M, Vårum KM, Eijsink VGH. Production of chitooligosaccharides and their potential applications in medicine. Mar Drugs. 2010; 8(5):1482–517. https://doi.org/10.3390/md8051482 PMID: 20559485
5. Lodhi G, Kim Y-S, Hwang J-W, Kim S-K, Jeon Y-J, Je J-Y, et al. Chitooligosaccharide and Its Derivatives: Preparation and Biological Applications. Biomed Res Int. 2014; 2014:654913. https://doi.org/10.1155/2014/654913 PMID: 24724091
6. Schmitz C, Auza LG, Koberidze D, Rasche S, Fischer R, Bortesi L. Conversion of Chitin to Defined Chitosan Oligomers: Current Status and Future Prospects. Mar Drugs. 2019; 17(8). Epub 2019/08/04. https://doi.org/10.3390/md17080452 PMID: 31374920
7. Basa S, Nampally M, Honorato T, Das SN, Podile AR, El Gueddari NE, et al. The Pattern of Acetylation Defines the Priming Activity of Chitosan Tetramers. J Am Chem Soc. 2020; 142(4):1975–86. Epub 2020/01/03. https://doi.org/10.1021/jacs.9b11466 PMID: 31895979
8. Kaczmarek MB, Struszczyk-Swita K, Li X, Szczęsna-Antczak M, Daroch M. Enzymatic Modifications of Chitin, Chitosan, and Chitooligosaccharides. Frontiers in bioengineering and biotechnology. 2019; 7:243. Epub 2019/10/16. https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00243 PMID: 31612131
9. Fernandes JC, Spindola H, de Sousa V, Santos-Silva A, Pintado ME, Malcata FX, et al. Anti-inflammatory activity of chitooligosaccharides in vivo. Mar Drugs. 2010; 8(6):1763–8. Epub 2010/07/16. https://doi.org/10.3390/md8061763 PMID: 20631868
10. Sánchez Á, Mengíbar M, Fernández M, Alemany S, Heras A, Acosta N. Influence of Preparation Methods of Chitooligosaccharides on Their Physicochemical Properties and Their Anti-Inflammatory Effects in Mice and in RAW264.7 Macrophages. Mar Drugs. 2018; 16(11). Epub 2018/11/08. https://doi.org/10.3390/md16110430 PMID: 30400250
11. Santos-Moriano P, Kidibule P, Míguez N, Fernández-Arrojo L, Ballesteros A, Fernández-Lobato M, et al. Tailored Enzymatic Synthesis of Chitooligosaccharides with Different Deacetylation Degrees and Their Anti-Inflammatory Activity. Catalysts. 2019; 9:405.
12. Xing R, Liu Y, Li K, Yu H, Liu S, Yang Y, et al. Monomer composition of chitooligosaccharides obtained by different degradation methods and their effects on immunomodulatory activities. Carbohydr Polym. 2017; 157:1288–97. Epub 2016/12/19. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.001 PMID: 27987835
13. Senevirathne M, Ahn C-B, Je J-Y. Hepatoprotective effect of chitooligosaccharides against tert-butylhydroperoxide-induced damage in Chang liver cells. Carbohydr Polym. 2011; 83:995–1000. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.09.016
14. Muanprasat C, Wongkrasant P, Satitsri S, Moonwiriyakit A, Pongkorpsakol P, Mattaveewong T, et al. Activation of AMPK by chitosan oligosaccharide in intestinal epithelial cells: Mechanism of action and potential applications in intestinal disorders. Biochem Pharmacol. 2015; 96(3):225–36. Epub 2015/06/07. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.05.016 PMID: 26047848
15. Bosshart H, Heinzelmann M. THP-1 cells as a model for human monocytes. Ann Transl Med. 2016; 4(21):438-. https://doi.org/10.21037/atm.2016.08.53 PMID: 27942529
16. Pechsrichuang P, Yoohat K, Yamabhai M. Production of recombinant Bacillus subtilis chitosanase, suitable for biosynthesis of chitosan-oligosaccharides. Bioresour Technol. 2013; 127:407–14. Epub 2012/11/10. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.130 S0960-8524(12)01492-7 [pii]. PMID: 23138063
17. Pechsrichuang P, Lorentzen SB, Aam BB, Tuveng TR, Hamre AG, Eijsink VGH, et al. Bioconversion of chitosan into chito-oligosaccharides (CHOS) using family 46 chitosanase from Bacillus subtilis (BsCsn46A). Carbohydr Polym. 2018; 186:420–8. Epub 2018/02/20. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.01.059 PMID: 29456005
18. Varum KM, Anthonsen MW, Grasdalen H, Smidsrod O. Determination of the degree of N-acetylation and the distribution of N-acetyl groups in partially N-deacetylated chitins (chitosans) by high-field n.m.r. spectroscopy. Carbohydr Res. 1991; 211(1):17–23. Epub 1991/04/02. https://doi.org/10.1016/0008-6215(91)84142-2 PMID: 1773428

19. Sørbotten A, Horn SJ, Eijsink VG, Varum KM. Degradation of chitosans with chitinase B from Serratia marcescens. Production of chito-oligosaccharides and insight into enzyme processivity. Febs j. 2005; 272(2):538–49. Epub 2005/01/19. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2004.04495.x PMID: 15654891

20. Meshulam T, Levitz SM, Christin L, Diamond RD. A simplified new assay for assessment of fungal cell damage with the tetrazolium dye, (2,3)-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carbox-anil ide (XTT). J Infect Dis. 1995; 172(4):1153–6. Epub 1995/10/01. https://doi.org/10.1093/infdis/172.4.1153 PMID: 7561202

21. Gioannini TL, Teghanemt A, Zhang D, Coussens NP, Dockstader W, Ramaswamy S, et al. Isolation of an endotoxin-MD-2 complex that produces Toll-like receptor 4-dependent cell activation at picomolar concentrations. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101(12):4186–91. Epub 2004/03/11. https://doi.org/10.1073/pnas.0306906101 PMID: 15010525

22. Lund ME, To J, O'Brien BA, Donnelly S. The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. J Immunol Methods. 2016; 430:64–70. Epub 2016/01/31. https://doi.org/10.1016/j.jim.2016.01.012 PMID: 26826276

23. Kitchens RL, Ulevitch RJ, Munford RS. Lipopolysaccharide (LPS) partial structures inhibit responses to LPS in a human macrophage cell line without inhibiting LPS uptake by a CD14-mediated pathway. J Exp Med. 1992; 176(2):485–94. Epub 1992/08/01. https://doi.org/10.1084/jem.176.2.485 PMID: 1380063

24. Schwende H, Fitzke E, Ambs P, Dieter P. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. J Leukoc Biol. 1996; 59(4):555–61. Epub 1996/04/01. PMID: 8613704

25. Jitprasertwong P, Jaedicke KM, Nile CJ, Preshaw PM, Taylor JJ. Leptin enhances the secretion of interleukin (IL)-18, but not IL-1β, from human monocytes via activation of caspase-1. Cytokine. 2014; 65(2):222–30. Epub 2013/11/28. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2013.10.008 PMID: 24275551

26. Man SM, Karki R, Kanneganti TD. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. Immunol Rev. 2017; 277(1):61–75. Epub 2017/05/04. https://doi.org/10.1111/imr.12534 PMID: 28462526

27. Rodriguez-Vita J, Lawrence T. The resolution of inflammation and cancer. Cytokine Growth Factor Rev. 2010; 21(1):61–5. Epub 2009/12/22. https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.11.006 PMID: 20022797

28. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. Nat Rev Immunol. 2020; 20(6):363–74. Epub 2020/04/30. https://doi.org/10.1038/s41577-020-0311-8 PMID: 32346093

29. Yermak IM, Davidova VN, Gorbach VI, Luk'yanov PA, Solov'eva TF, Ulmer AJ, et al. Forming and immunological properties of some lipopolysaccharide-chitosan complexes. Biochimie. 2006; 88(1):23–30. Epub 2005/09/27. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2005.07.004 PMID: 16181724

30. Chou TC, Fu E, Shen EC. Chitosan inhibits prostaglandin E2 formation and cyclooxygenase-2 induction in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 macrophages. Biochem Biophys Res Commun. 2003; 308(2):403–7. Epub 2003/08/07. https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)01407-4 PMID: 12901883

31. Marmouzi I, Ezzat SM, Salama MM, Merghany RM, Attar AM, El-Desoky AM, et al. Recent Updates in Pharmacological Properties of Chitooligosaccharides. BioMed research international [Internet]. 2019 2019; 2019:[4568039 p.]. http://europepmc.org/abstract/MED/31781615. https://doi.org/10.1155/2019/4568039 PMID: 31781615

32. Sag D, Carling D, Stout RD, Suttles J. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype. J Immunol. 2008; 181(12):8633–41. https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.12.8633 PMID: 19050283

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.2 การผลิต คอซ ด้วย Food-Grade Enzyme

เนื่องจาก คอซ มีคุณสมบัติที่น่าสนใจในการนำไปประกอบเป็นส่วนหนึ่งของโภชนเภสัชภัณฑ์ ดังนั้น หากใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้จาก แบคทีเรียที่มีความปลอดภัยสูงหรือ Food-grade มาใช้ผลิต คอซ ผลิตภัณฑ์จะได้รับการยอมรับมากกว่า ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาความเป็นไปได้ในการ ผลิต คอซ ด้วยเอนไซม์ chitosanase ที่ผลิตขึ้นมาด้วย Food-Grade Enzyme ที่ห้องปฏิบัติการได้พัฒนามาก่อนหน้านี้ [1] โดยงานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโทของนายชายน้อย เชิ่ม และผลงานนี้ได้นำไปตีพิมพ์ใน proceeding ดังแสดงใน ๗ หน้าถัดไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

AGT0001

Production of chitosan oligosaccharides using food-grade enzyme technology

Chai Noy Soem[1], and Montarop Yamabhai[1,*]

Molecular Biotechnology Laboratory, School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand 30000

* Corresponding Author: montarop@g.sut.ac.th

Abstract. 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 have developed a food-grade enzyme technology for the production of soluble CHOS from chitosan, derived from chitin of shrimp and prawn shells, in a lactic acid solution. The bioconversion yields were 100%, and the products were kept in lyophilized form. Even though CHOS can be produced chemically, physically and enzymatically, production of CHOS using enzyme technology is preferable due to several advantages, most importantly, the process is environmental-friendly, and the final products can be precisely control by regulating the bioconversion reaction. In this research, well-characterized chitosan oligosaccharides were produced using well developed food-grade enzyme technology in our laboratory. The CHOS products could be further applied for food and feed industry. The result from this study is an example of innovation for bio-circular green economy (BCG), of which wastes are converted into profitable high-value product using green technology.

1. Introduction

Chitosan oligosaccharides (CHOS), which are expected to be utilized as functional foods, pharmaceuticals ingredient and bioactive compound, are hydrolyzed oligomers of chitosan. Chitosan oligosaccharides can be produced partially through enzymatic reaction or chemically hydrolyzed. At high temperature with strong acidic condition, chitosan is hydrolyzed, result in large amount of glucosamine (chitosan monomer) [1]. Disadvantage of chemical reaction method is needs of highly convenient system to control the progress of the reaction and generation toxic wastes. Chitosan oligosaccharides production using enzymatic hydrolysis has few advantages over high performance chemical reaction such as mild reaction condition and ability to generate low monosaccharide final products [2]. The hydrolysis of chitosan using enzymatic methods is better than chemical reagent-catalyzed methods and physical methods because of the predictability and controllability as well as less demand of energy [3]. Moreover, the enzymatic methods are highly specific with minimal chemical modification of the products. Enzyme concentrations, pH, temperature, and reaction duration are critical factors in controlling the CHOS production using enzyme-catalyzed reaction. Chitosan oligosaccharides are found to hold plenty of potential biological properties and physicochemical properties which are beneficial to human health and beauty. Of particular importance, CHOS and its derivatives have been demonstrated to possess several biological activities including anti-inflammation, immunostimulation, anti-tumor, anti-obesity, antihypertension, anti-Alzheimer's disease, tissue regeneration promotion,

drug and DNA delivery enhancement, anti-microbial, anti-oxidation and calcium-absorption enhancement [1, 4-8]. In this study, we aimed to produce CHOS using a well-developed food-grade enzyme technology from *Lactobacillus plantarum* expression system that has been previously established in our laboratory. The reaction conditions were performed in a lactic acid solution. The products were analysed by thin layer chromatography (TLC) and kept in a lyophilized form.

2. Materials and Methods

2.1. Bacteria and Plasmid

Lactobacillus plantarum TLG02: [9, 10]

pSIP609/BsCsnA_nt [9]

2.2. Chitosan

Food grade chitosan was supported by Marine Bioresource Co.ltd Thailand. Chitosan (Off-white yellow appearance) used in this study is highly purified chitosan with percentage of purity >90%, produced from chitin of dried shrimp shell from tropical ocean. The degree of deacetylation (DD) was higher than 90%, pH 6-8 with water insolubility and solubility in acid solutions (99%). Chitosan particle size was smaller than 1.5 mm with less than 1% ash content.

2.3. Expression of Chitosanase using Food-Grade Expression system

Production of Chitosanase was carried out as previously described [9]. In short, batch fermentation with pH control was carried out in 3-L MRS medium using a bioreactor. Recombinant *L. plantarum* strains was taken from a glycerol stock stored at -80 °C, re-streaked on appropriate MRS plates and grown overnight at 37 °C. Ten colonies were picked and grown in 5 mL MRS broth overnight, then sub-culture into two flasks of 100 mL of MRS and cultivate at 37 °C without shaking for 18–24 h. The two overnight cultures were pooled together, mixed well and after measuring the cell density at 600 nm, they were used to inoculate 3 L of MRS medium to an OD 600 of ~0.1. After incubation at 30 °C with 100 rpm agitation under anaerobic condition to an OD600 of ~0.3, the cultures were induced with 12.5 ng/mL of IP-673 (amino acid sequence of IP-673 is Met-Ala-Gly-Asn-Ser–Ser-Asn-Phe-Ile-His-Lys-Ile-Lys-Gln-Ile-Phe-Tr-His-Arg). During further cultivation (30 °C with 100 rpm), the pH was controlled at pH 6.5 using 3.0 M sodium hydroxide. Chitosanase enzyme was secreted into the fermentation broth.

2.4. Concentration and purification of BsCsn46A

Bio-separation process, which were mainly centrifugation and crossflow filtration, were employed for the downstream processing of *Bs*Csn64A. The culture broth was concentrated using cross-flow concentrator (Viva Flow 200, Satorious) after filtered with 0.2 microns filter. One-step purification technique was used to purify secreted enzymes with HisPur Ni-NTA Resin (Thermofisher).

2.5. Enzyme activity assay

Chitosanase activity assay was carried out as previously described [9, 11]. In short, reaction mixture consisted of 40 µL of appropriately diluted sample and 160 µL of 0.5 % chitosan (w/v) (in 200 mM sodium acetate buffer, pH 5.5, and preincubated at 50 °C for 30 min). The reaction was incubated in a

Thermomixer Comfort (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) at 50 °C for 5 min, with mixing at 900 rpm. The reaction was stopped by adding 200 µL of DNS solution, and the mixture was centrifuged at 12,000g for 5 min to remove the remaining chitosan that was precipitated. The color in the supernatant was developed by heating at 100 °C for 20 min and cooling on ice. The reducing sugar in the supernatant was determined by measuring OD at 540 nm, using 1–5 µmol/mL of d-glucosamine as standards. The reactions were done in triplicate and the mean values with standard deviations are reported.

2.6. Protein determination

Protein concentrations were determined using the BCA method with bovine serum albumin as standard. Analysis were operated according to the company instruction.

2.7. SDS-PAGE analysis

As described previously [9], denaturing sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed using the method of Laemmli using 12 % (w/v) polyacrylamide gels. The protein samples were briefly heated (10 min) in the loading buffer at 100 °C with a heat block (Eppendorf), and then cooled on ice before loading. Protein bands were visualized by staining with Coomassie brilliant blue R-250.

2.8. Production of Chitosan oligosaccharides in lactic acid

Chitosan oligosaccharides was produced using enzymatic hydrolysis method, of which enzyme usage conditions were 0.05 and 0.1 µg per 1 mg of chitosan, respectively. Chitosan at 1% w/v was dissolved using 2% lactic acid solution, and the pH was adjusted to 5.5 using sodium hydroxide (1 N). Chitosan substrate solution was pre-incubated for 30 min at 37 ºC. The reaction mixture was proceeded for 48 hours. *Bs*Csn46A was added 3 times, at the start of the reaction, 12 hours and at 24 hours of reaction. The reaction mixture was then heated to inactivate enzyme activity at 100 ºC for 20 min, then cool down before being centrifuged and filtered to remove all the precipitate in the solution. Chitosan oligosaccharides was obtained as dried powder.

2.9. Lyophilization of CHOS

Lyophilization was carried out (GAMMA 2-16 LSC, CHRIST, Germany) using freeze-dryer where the product mixture was totally frozen before the operation. The condenser was set to -90ºC and the shelves were set to -20ºC. The samples were left in the freeze-dryer chamber for up to 72 hours with vacuum pressure at 0.001 Pa. After freeze-drying, samples were collected and kept at -20ºC.

2.10. Thin Layer Chromatography

Dried CHOS powder was weighted and dissolved in distilled water and a solution of 100mg/mL was prepared. Two and 3 µl of the samples were spotted onto the TLC silica plate with the distance from each sample of 0.5 cm. Hot air blower was used to dry the sample after each 1µl of spotting. The prepared plate was then left stand in a mobile-phase saturated beaker (14 mL isopropanol, 4 mL water and 2 mL ammonia) for about 2 hours until the visible mobile phase wet through to the top of the plate, then the plate was dried, and the same chromatography was repeated. After that, the plate was dried, and rapidly

soaked in 10% sulfuric acid in ethanol for about 1-2 mins before the visualization was done by heating the plate at 150°C with a plate heater until the spots on the plate became visible.

3. Results and Discussions

Expression and purification of BsCsn46A using food-grade expression system

Lactobacillus plantarum TGL02 was used as expression host for the production of food-grade chitosanase. According to previous report [9], the major proportion of the expressed enzyme is found in the bacterial culture supernatant which was reproducible in this experiment. After the expression for 20 hours, the culture supernatant was collected by centrifugation, filtered and then subjected to concentration process using a cross flow concentration system with a molecular weight cut off filter membrane of 10,000 Da. Then, the concentrated culture broth was subjected to the purification process using gravity-flow column chromatography technique. The enzyme could be well purified using resin affinity beads with high affinity specific binding to histidine tag and well-engineered histidine tag on the recombinant enzyme as demonstrated in Fig.1. The enzyme molecular weight of the expressed enzyme was approx.32 kDa as previously shown [9, 12]. The purified enzyme was then subjected to the concentration process in order to reduce the sample volume and increase enzyme concentration.

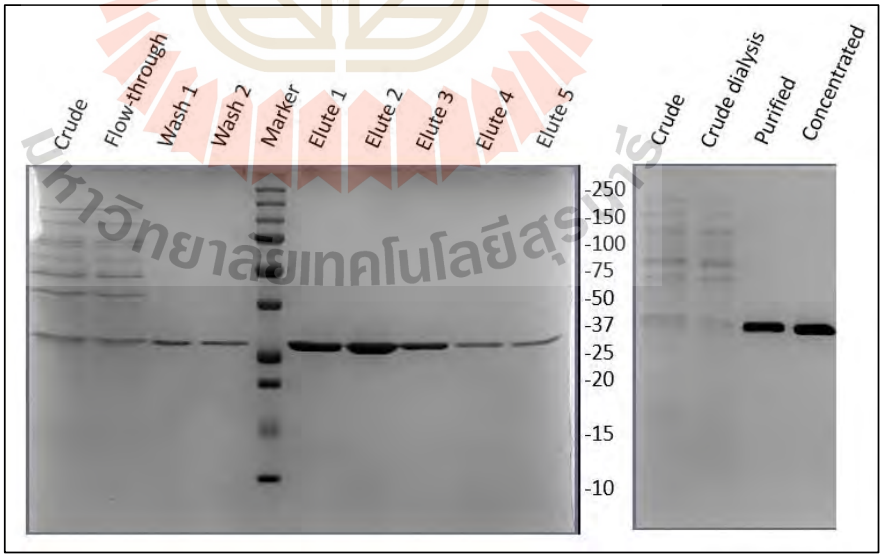


Figure 1. SDS-PAGE of chitosanase using food grade expression system. Purified protein was obtained from culture broth after 20 h of induction with 0.1 mM IPTG and were separated by SDS-PAGE on 15% gels.

Table 1. Enzymatic activity and protein concentration of *Bs*Csn46A

	Induction time (h)	Enzymatic activity (Total units[a])
Culture Broth	20	16.0±1
Purified enzyme	20	162.0±1
Concentrated purifies	20	413.0±1

	Induction time (h)	Protein conc (mg/L)
Culture Broth	20	4.0±1
Purified enzyme	20	680.0±1
Concentrated purifies	20	780.0±1

3.1.1. Production of Chitosan oligosaccharides using Food Grade BsCsn46A

At different time points of hydrolysis reaction, CHOS samples were collected and were subjected to TLC (Figure 2). Two different enzyme concentration were used, 0.05 and 0.1 µg per mg of chitosan, respectively. Hydrolyzed chitosan oligosaccharides samples were collected from the reaction at different time ranging from 5mins, 10 mins, 30 mins, 60 mins, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 12 hours 18 hours, 24 hours and 48. As shown in the TLC result, the final products were gradually shorter during the course of the reaction time. However, no monomer could be observed by TLC. This phenomena confirmed previous observation[13]. The reaction solution was then subjected to lyophilization using a freeze dryer. The dried CHOS powder was then dissolved in water at a concentration of 100 mg/mL for TLC analysis (Figure 3). The sample was fully water soluble, indicating that the water-insoluble chitosan was totally depolymerized by the enzyme during hydrolysis reaction. The sample of early stage of hydrolysis, specially at time points, 5 mins, 10 mins, 30 mins, 1 hours, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 12 hours, 24 hours, 30 hours and 36 hours, respectively, were not subjected to lyophilization and solubility testing. Judging from the TLC result, there were high molecular weight chitosan in the reaction inside the reaction solution until 24 hours of the reaction. To these time points, dimers and trimers CHOS molecules were merely visualized on the silica gel plate while only larger hydrolyzed molecules such as tetramers and pentamers could be observed. After second enzyme addition at 24-hour time point, shorter chain of hydrolyzed product was seen more while larger and longer molecules were fading out of the TLC plate. Still, no monomer sample was visualized even at 48 hours of the reaction. In this study, the purified food-grade enzyme was used, however, it should be possible to produce CHOS using crude enzyme directly from the culture broth, which would be cheaper. This future perspective for agriculture and animal applications of CHOS; however, is currently limited due to the complexity of the bacterial media (MRS). Further investigation on the development of host strain to be able to grow in cheaper media without addition of inducing peptide, will be more beneficial. Freeze-drying the final product is also an important step of the production process since it helps with product storage, transportation. as well as longer the final product shelf life. More investigation on the optimal storage condition of the CHOS products must be further explored.

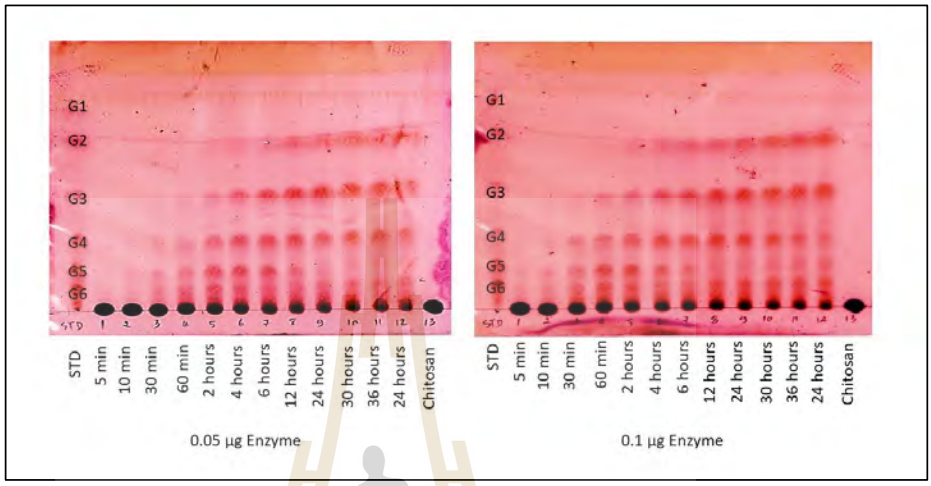


Figure 2. Thin layer chromatography of chitosan oligosaccharides produced by food grade enzyme. 2 different enzyme concentration were used, 0.05 and 0.1 µg, respectively. Hydrolyzed chitosan oligosaccharides samples were collected from the reaction at different time from 5mins, 10 mins, 30 mins, 60 mins, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 12 hours, 24 hours and, more enzyme was added again at 24 hours and samples were collected at 6 hours, 12 hours and 24 hours after second enzyme addition.

Figure 3. Final CHOS lyophilized product after lyophilization using freeze dryer. A: CHOS hydrolyzed for 48 hours using 0.05µg of *Bs*Csn46A per mg of chitosan, enzyme was added at time 0, 12, 24. B: CHOS hydrolyzed for 48 hours using 0.1µg of *Bs*Csn46A per mg of chitosan, enzyme was added at time 0, 12, 24. C: Thin layer chromatography analysis of final CHOS product dissolved in water after lyophilization (A: CHOS hydrolyzed by 0.1µg enzyme per mg of chitosan, B: CHOS hydrolyzed by 0.05µg of enzyme per mg chitosan for 48 hours)

Conclusion

According to our previous studies and this study, we demonstrated that *Bs*Csn46A can be used to efficiently converse chitosan into a mixture of variety of soluble chitosan oligosaccharides with various degree of polymerization from shortest DP2 to longest DP6 as expected from the enzyme natural characteristics [13]. The results indicated the potential application of food-grade enzyme technology from *Lactobacillus plantarum* for the production of CHOS for agriculture and animal feed applications after further investigation.

Acknowledgments

Authors wishing to acknowledge Suranaree University of Technology, OROG scholarship, Molecular Biotechnology Laboratory (MY Lab) and Marine Bioresource Co.ltd Thailand for the support of this study.

References

[1] Muanprasat C, Chatsudthipong V 2017 *Pharmacol Ther.***170**80-97

[2] Aam BB, Heggset EB, Norberg AL, Sorlie M, Varum KM, Eijsink VG 2010 *Mar Drugs.***8**(5)1482-517

[3] Lodhi G, Kim YS, Hwang JW, Kim SK, Jeon YJ, Je JY, et al. 2014 *Biomed Res Int.***2014**654913

[4] Dai X, Chang P, Li X, Gao Z, Sun Y 2017 *Neurosci Lett.***665**80-5

[5] Jia P, Yu L, Tao C, Dai G, Zhang Z, Liu S 2017 *Biomed Pharmacother.***93**807-15

[6] Xu Q, Wang W, Qu C, Gu J, Yin H, Jia Z, et al. 2017 *Carbohydr Polym.***170**241-6

[7] Xu Q, Wang W, Yang W, Du Y, Song L 2017 *Int J Biol Macromol.***98**502-5

[8] Zou P, Yuan S, Yang X, Zhai X, Wang J 2017 *Chem Biol Interact.***279**129-35

[9] Sak-Ubol S, Namvijitr P, Pechsrichuang P, Haltrich D, Nguyen TH, Mathiesen G, et al. 2016 *Microb Cell Fact.***15**81

[10] Nguyen TT, Mathiesen G, Fredriksen L, Kittl R, Nguyen TH, Eijsink VG, et al. 2011 *J Agric Food Chem.***59**(10)5617-24

[11] Pechsrichuang P, Yoohat K, Yamabhai M 2013 *Bioresour Technol.***127**407-14

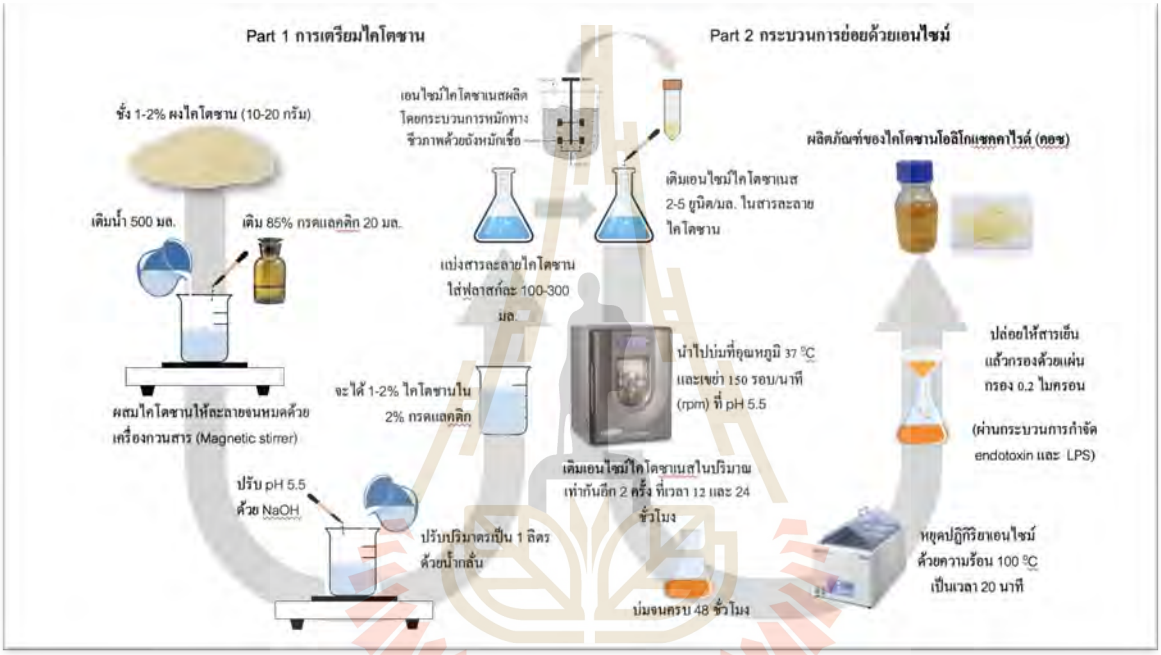
[12] Pechsrichuang P, Songsiriritthigul C, Haltrich D, Roytrakul S, Namvijtr P, Bonaparte N, et al. 2016 *Springerplus.***5**(1)1200

[13] Petsrichuang P, Lorentzen SB, Aam BB, Tuveng TR, Hamre AG, Eijsink VGH, et al. Bioconversion of chitosan into chito-oligosaccharides (CHOS) using family 46 chitosanase from Bacillus subtilis (BsCsn46A)2018. 420-8 p.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.3 Platform การผลิตคอซด้วยเทคโนโลยีเอนไซม์ และการผลิตเวชสำอางต้นแบบ

จากผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของ คอซ ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ต้านปฏิกริยาการอักเสบในเซลล์เม็ดเลือดขาวได้เป็นอย่างดี ผู้วิจัยจึงได้ พัฒนาการผลิตคอซให้เพิ่มขึ้นในระดับ ห้องปฏิบัติการ แล้วนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต้นแบบคือครีม คอซ แล้วนำไปลองใช้ ซึ่งปรากฏว่า ได้รับการยอมรับอย่างดี เมื่อใช้แล้วสามารถลดการ อักเสบคันจากสิว หรือ เห็บหมัด หรือการเสียดสี ได้ดี ทั้งนี้ผู้วิจัยกำลังอยู่ในระหว่างศึกษาความเหมาะในการยื่นจดสิทธิบัตร ซึ่งอาจแสดง เป็น แพลตฟอร์การผลิตดังแสดงด้านล่าง



รูปที่ 3 แผนภาพแพลตฟอร์มการผลิต คอซ ด้วยเทคโนโลยีเอนไซม์ ที่ได้พัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการ

จากนั้นได้นำผลิตภัณฑ์ คอซ ไปใส่เป็นสารสำคัญออกฤทธิ์ในครีมที่ความเข้มข้น 0.01% เนื่องจากพบว่าเป็นความเข้มข้นที่ออกฤทธิ์ได้ดีในหลอดทดลอง โดยจากการสอบถามความเห็นจากผู้ใช้ในเบื้องต้นพบว่ามีการตอบรับที่ค่อนข้างดี สามารถลดการอักเสบและคันได้ดี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รูปที่ 4 Prototype ผลิตภัณฑ์เวชสำอางที่มีคอซเป็นสารสำคัญ

Prototype ผลิตภัณฑ์เวชสำอาง ซึ่งได้รับการตอบรับที่ดี

ผลิตภัณฑ์ชุดนี้ ได้นำไปแสดงในงาน BioAsia 2020

บทที่ 4
สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

การพัฒนากระบวนการการผลิต คอซ ที่มีโครงสร้างชัดเจนแน่นอน และมีคุณสมบัติที่โดดเด่นคือ ละลายน้ำได้ดี จากนั้นได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ คือฤทธิ์ ต้านปฏิกริยาการอักเสบในเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์ คือเซลล์ โมโนไซต์ THP-1 ซึ่งพบว่ามีคุณสมบัติที่โดดเด่นคือ สามารถลดปฏิกริยาการอักเสบจากการกระตุ้นด้วยสาร Lipopolysaccharides (LPS) ในเซลล์ THP-1 ที่ถูกชักนำให้พัฒนาเป็นเซลล์ แมโครเฟจ ด้วยสาร Vit-D3 ได้ โดยผลการยับยั้งการอักเสบนั้น ดีเท่ากับยาเสตียรอยด์ จึงถือว่ามีคุณสมบัติโดดเด่นที่น่าสนใจ ผู้วิจัยจึงได้พัฒนากระบวนการผลิตปริมาณมากขึ้นในระดับห้องปฏิบัติการ โดยการใช้เอนไซม์ ไคโตซาเนส ที่ได้พัฒนามาก่อนหน้าที่ ทั้งที่ผลิตได้จาก แบคทีเรีย อี โคไล และแบคทีเรียสำหรับใช้ในอาหาร คือ แลคโตบาซิลัส แพลนทารัม จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ คอซ ที่พัฒนามาได้ ไปผลิตเป็น เวชสำอางต้นแบบในรูปครีมทาหน้า และลำตัว ผลการทดสอบเบื้องต้นจากการสอบถามความเห็นของผู้ใช้ พบว่า มีฤทธิ์ ลดการอักเสบจากสิว และอาการ แสบคัน จากเห็บหมัด และการระคายเคือง อื่นๆ ได้ดี นอกจากองค์ความรู้ และเทคโนโลยีต้นแบบแล้ว ผลงานนี้ยังเป็นส่วนหนึ่งของดร. พรศิริ เพชรศรีช่วง นักศึกษาระดับปริญญาเอก นายชายน้อย เชิ่ม นักศึกษาระดับปริญญาโท ชาวกัมพูชา

อันที่จริง งานวิจัยนี้เป็นโครงการที่วางแผนการดำเนินการเป็นระยะเวลา ๓ ปี แต่ได้รับการสนับสนุนในปีแรกเพียงปีเดียว แล้วต้องปิดโครงการไปก่อน จึงรายงานได้เพียงส่วนต้น ซึ่งผลงานที่ได้น่าสนใจ หากได้รับการต่อยอดขยายผล เพื่อทดสอบเพิ่มเติม ทั้งในคนและสัตว์ ในด้านความปลอดภัย ความเป็นพิษ การแพ้ และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา โดยอาจพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์รูปแบบต่างๆ อาทิ ครีม เซรั่ม เครื่องดื่ม และอาหารเสริมสุขภาพ แล้วทำการทดลองในมนุษย์ เพื่อดำเนินการยื่นจดทะเบียนจาก อย ทั้ง ที่เป็น โภชนเภสัช เวชสำอาง หรือ เครื่องสำอาง ต่อไป อาจช่วยสร้างมูลค่าเพิ่มให้ เกษตรกร และนำรายได้เข้าประเทศต่อไปได้

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

Aam, B.B., et al., (2010). Production of Chitooligosaccharides and Their Potential Applications in Medicine. Marine Drugs. 8. 5. 1482-1517.

Fang, I.M., et al. (2013). Chitosan Oligosaccharides Attenuates Oxidative-Stress Related Retinal Degeneration in Rats. PLoS ONE, 2013. 8. 10.

Hayes, M., et al., (2008). Mining marine shellfish wastes for bioactive molecules: chitin and chitosan--Part A: extraction methods. Biotechnol J,. 3. 7. 871-877.

Huang, H.-C., et al. (2015). Chitooligosaccharides Attenuate Cu2+-Induced Cellular Oxidative Damage and Cell Apoptosis Involving Nrf2 Activation. Neurotoxicity Research. 27. 4. 411-420.

Jitprasertwong, P., et al. (2021). Anti-inflammatory activity of soluble chito-oligosaccharides (CHOS) on VitD3-induced human THP-1 monocytes. PLoS One, 16. 2. 1-17.

Jo, Y.-Y., et al., (2003). Characterization and Kinetics of 45 kDa Chitosanase from *Bacillus sp*. P16. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 67. 9. 1875-1882

Johnsen, M., Hansen O., and Stougaard P. (2010). Isolation, characterization and heterologous expression of a novel chitosanase from Janthinobacterium sp. strain 4239. Microbial Cell Factories. 9. 1. 5.

Khoushab, F. and M. Yamabhai, (2010). Chitin research revisited. Marine Drugs. 8.

Kim, S.-K. and N. (2005). Rajapakse, Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. Carbohydrate Polymers. 62. 4. 357-368.

Lacombe-Harvey, M.E., et al. (2009). Accessory active site residues of Streptomyces sp. N174 chitosanase - variations on a common theme in the lysozyme superfamily. FEBS J. 276: 857 - 869.

Lee, Y., et al., (2006). Cloning, purification, and characterization of chitosanase from Bacillus sp. DAU101. Applied Microbiology and Biotechnology. 73(1): p. 113-121.

Marcotte, E.M., et al. (1996). X-ray structure of an anti-fungal chitosanase from Streptomyces N174. Nature Structural Biology. 3. 155 - 162.

Muanprasat, C., et al. (2015). Activation of AMPK by chitosan oligosaccharide in intestinal epithelial cells: Mechanism of action and potential applications in intestinal disorders. Biochemical Pharmacology. 96. 3. 225-236.

Pechsrichuang, P., et al., (2016). OmpA signal peptide leads to heterogenous secretion of B. subtilis chitosanase enzyme from *E. coli* expression system. Springer Plus. 5. 1. 1200.

Pechsrichuang, P., K. Yoohat, and M. Yamabhai. (2013). Production of recombinant Bacillus subtilis chitosanase, suitable for biosynthesis of chitosan-oligosaccharides. Bioresour Technol. 127.

Sak-Ubol, S., et al. (2016). Secretory production of a beta-mannanase and a chitosanase using a *Lactobacillus plantarum* expression system. Microbial Cell Factories,. 15. 1. 81.

Songsiriritthigul, C., et al., (2010). Expression and characterization of Bacillus licheniformis chitinase (ChiA), suitable for bioconversion of chitin waste. Bioresour Technol. 101.

Wu, H., et al. (2012). Inhibition of angiogenesis by chitooligosaccharides with specific degrees of acetylation and polymerization. Carbohydrate Polymers. 89. 2. 511-518.

Yang, C.M., et al. (2012). Effect of chito-oligosaccharide on growth performance, intestinal barrier function, intestinal morphology and cecal microflora in weaned pigs. Journal of Animal Science. 90. 8. 2671-2676.

Yoon, H.-G., et al. (2000). Thermostable Chitosanase from Bacillus sp. Strain CK4: Cloning and Expression of the Gene and Characterization of the Enzyme. Appl. Environ. Microbiol. 66. 9. 3727-3734.

Yoon, H.-G., et al., (2002). Gene Cloning and Biochemical Analysis of Thermostable Chitosanase (TCH-2) from *Bacillus coagulans* CK108. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 66. 5. 986-995.

Yousef, M., et al. (2012). Chitosan oligosaccharide as potential therapy of inflammatory bowel disease: Therapeutic efficacy and possible mechanisms of action. Pharmacological Research. 66. 1. 66-79.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัตินักวิจัย

มณฑารพ ยมาภัย เกิดเมื่อวันที่ 8 มกราคม 2510 เป็นบุตรของ รศ.ดร.สวนิต และ ผศ.อำไพ ยมาภัย จบการศึกษาทั้งในระดับประถม และมัธยมศึกษาจากโรงเรียนสาธิตจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นเข้าศึกษาต่อที่ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้รับปริญญาตรีเภสัชศาสตร์บัณฑิตเกียรตินิยม เมื่อปี พ.ศ. 2532 แล้วได้เข้ารับราชการเป็นเภสัชกรประจำโรงพยาบาลหัวตะพานเป็นเวลา 1 ปี ก่อนจะมาเป็นอาจารย์ประจำคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ในปี 2536 ได้รับทุน Fulbright Pre-doctoral Fellowship ไปทำงานวิจัยที่ University of Minnesota เป็นเวลา 9 เดือน แล้วจึงได้รับทุนรัฐบาลไทยไปเรียนต่อในระดับปริญญาเอกที่ University of North Carolina at Chapel Hill ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยมี Prof. Dr. Brian K. Kay เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา จบการศึกษา ระดับปริญญาเอกด้าน molecular biology ในปี พ.ศ. 2541 จากนั้นในปี พ.ศ. 2543-2545 ได้ทุน NIH ไปทำ postdoctoral research ที่ห้องปฏิบัติการของ Prof. Dr. Richard G.W. Anderson ณ. University of Texas, Southwestern Medical Center, Dallas และในปี พ.ศ. 2546-2547 ได้รับทุน Alexander von Humboldt Fellowship ไปทำการวิจัยที่ห้องปฏิบัติการของ Prof. Dr. Kai Simons ณ. Max Planck Insititute for Molecular Biology and Genetics กรุง Dresden ประเทศ สหพันธรัฐเยอรมัน สมรสกับ ศ.ดร. ดิฏฐมา หาลทิช เมื่อวันที่ 16 สิงหาคม 2547 และมีบุตร 1 คน ชื่อ ฐานิกา ยมาภัย หาลทิช ปัจจุบันเป็นศาสตราจารย์ และหัวหน้าห้องปฏิบัติการอณูเทคโนโลยชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี งานวิจัยในปัจจุบันเป็นงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพเชิงอณู (molecular biotechnology) มุ่งเน้นการใช้เทคโนโลยีเฟจ (phage display technology) และ เทคนิคอณูวิวัฒนาการ (molecular evolution) ในงานทางวิศวกรรมแอนติบอดี (antibody engineering) และวิศวกรรมเอนไซม์ (enzyme engineering) เพื่อสร้าง ชีวเภสัชภัณฑ์ มูลค่าสูง มีผลงานตีพิมพ์ใน ฐาน ISI 52 เรื่อง h-index 21, citation 1999 ฐาน Scopus 65 เรื่อง h-index 23, citation 2238 ฐาน Google Scholar 70 เรื่อง h-index 26, citation 3267 เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาระดับ หลังปริญญาอก 9 คน ปริญญาเอก 13 คน ระดับปริญาโท 9 คน และมัธยมศึกษา 10 คน

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร}, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ถ. มหาวิทยาลัย อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000

โทร 044 224152-4 224234 หรือ 244388 โทรสาร 044 224150

Email: montarop@g.sut.ac.th;

Website : http://mylab.sut.ac.th/home.html

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การผลิตบุคลากร

ผลงานวิจัยนี้ เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ ระดับปริญญาเอกของ ดร. พรศิริ เพชรศรีช่วง นักศึกษาระดับปริญญาเอก นายชายน้อย เชิ่ม นักศึกษาระดับปริญญาโท ชาวกัมพูชา รวมทั้งยังเป็นกลไกการพัฒนานักวิจัยระดับปริญญาเอกอีก ๒ คน คือ ดร. กุณฑลี ร่างน้อย และ ดร. มัณฑิภา คำผิว รวมทั้งใช้เป็นงานโครงการพิเศษของนักเรียน โรงเรียน สุรวิวัฒน์ อีก ๓ คนด้วย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก ข การเผยแพร่ผลงาน

ผลงานจากโครงการนี้ ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ ดังนี้

ก. งานประชุมระดับนานาชาติ

Soem, C. N., & Yamabhai, M. (2020). *Production of chitosan oligosaccharides using food-grade enzyme technology.* Paper presented at the SUT International Virtual Conference on Science and Technology (IVCST) 28 th August, Nakhon Ratchasima, Thailand.

Yamabhai, M. (2021). *MY Directed Evolution.* Paper presented at the IUPAC Global Women's Breakfast 2021, Phillippines, Thailand, India (online).

Yamabhai, M. (2020). *Molecular Biotechnology for Human Well-being.* Paper presented at the Bio Asia Pacific 2020, BITEC, Bangkok, Thailand and Virtual Conference 28-30 October.

Yamabhai, M. (2020). *Food and Immune System.* Paper presented at the The 2nd International Seminar of The Indonesian Society of Biochemistry and Molecular Biology and The 1st International Seminar of University Center of Excellence for Biotechnology and Conservation of Excellence, Manado, Indonesia (online), August 20.

Yamabhai, M. (2020). *Molecular Evolution Biotechnology for Human Well-being.* Paper presented at the The 32th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference, Online, November 26.

Soem, C. N., Pechsrichuang, P., Pramonphon, R., Pimpakan, T., Luesukprasert, K., Luesukprasert, P., & Yamabhai1, M. (2019). *Production of chitosan oligosaccharides (CHOS) using enzyme technology and investigation of its biological activity.* Paper presented at the Asian Congress on Biotechnology (ACB 2019), Taipei, Taiwan, July 01-04.

Yamabhai, M., Jitprasertworng, P., Some, C. N., Pechsrichuang, P., & Eijsink, V. (2019). *Biorefining Chitin Wastes into Functional Chito-oligosaccharides (CHOS).* Paper presented at the The 31st Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference, Patong Beach, Phuket, Thailand, November 10-12.

ข. ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ

Jitprasertwong P, Khamphio M, Petsrichuang P, Eijsink VGH, Poolsri W, Muanprasat C, Rangnoi K, Yamabhai M. (2021). Anti-inflammatory activity of soluble chito-oligosaccharides

(CHOS) on VitD3-induced human THP-1 monocytes. PLoS One. Feb 3;16(2):e0246381. doi: 10.1371/journal.pone.0246381. PMID: 33534833; PMCID: PMC7857634.

ค. สิทธิบัตร

กำลังอยู่ในระหว่างการศึกษาความเหมาะสมในการยื่นจดสิทธิบัตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี