

พงศกร กันหอม : การพัฒนาสารสกัดจากถั่งเช่าและสารสกัดโปรตีนคัตหลังจากเซลล์ต้นกำเนิดผิวหนังเพื่อเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและอาหารเพื่อสุขภาพ (DEVELOPMENT OF EFFECTIVE COSMECEUTICAL AND NUTRACEUTICAL INGREDIENTS FROM *CORDYCEPS MILITARIS* AND SECRETOME EXTRACTS)  
อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.ปริญญา น้อยสา, 133 หน้า.

คำสำคัญ: ถั่งเช่าสีทอง/คอร์ไดเซปิน/การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่สภาวะคงที่/การตัดแปรทางเอพิเจเนติก/Natural killer cell/มะเร็ง/ระบบภูมิคุ้มกัน/เคราติโนไซต์/HACAT/เซลล์ผิวหนังชนิดไฟโบรบลาสต์/สารสกัดโปรตีนคัตหลัง/การฟื้นฟูความสมบูรณ์ของผิวหนัง/การหายของแผล

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อสุขภาพ (nutraceutical) และเวชสำอาง (cosmeceuticals) ถือเป็นกลุ่มผลิตภัณฑ์ใหม่ในอุตสาหกรรมเพื่อดูแลสุขภาพ เพื่อให้ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีประสิทธิภาพและสร้างข้อได้เปรียบในการแข่งขันในตลาด จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) ที่มีความเป็นเอกลักษณ์และมีประสิทธิภาพสูงมาใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผู้วิจัยมุ่งศึกษาและพัฒนาและเป็นหัวใจของงานวิจัยชิ้นนี้คือ สารคอร์ไดเซปิน (cordycepin) และสารสกัดโปรตีนคัตหลังจากเซลล์ผิวหนัง (secretome) สารคอร์ไดเซปินเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถสกัดได้จาก ถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*) วิธีการเพาะเลี้ยงถั่งเช่าสีทองที่ได้รับความนิยมคือ Solid State Fermentation ที่ได้ชีวมวลถั่งเช่าจำนวนน้อยและใช้เวลานานในการเพาะเลี้ยงแล้ว ยังต้องอาศัยกระบวนการสกัด ดังนั้นผู้วิจัยจึงมุ่งพัฒนากระบวนการเพาะเลี้ยงถั่งเช่าที่สามารถผลิตสารคอร์ไดเซปินได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้นผ่านกระบวนการการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่สภาวะคงที่ (Liquid static culture) ร่วมกับการตัดแปรทางเอพิเจเนติกเพื่อเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญ พบว่าการเติม Valproic acid ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ให้ปริมาณสารคอร์ไดเซปินเท่ากับ 2,835.32 มิลลิกรัม/ลิตร ที่สัปดาห์ที่แปดของการเพาะเลี้ยง มากกว่ากลุ่มควบคุม 1.38 เท่า ซึ่งเกิดจากยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ cordycepin มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น และเพื่อเป็นการเน้นย้ำถึงศักยภาพของสารคอร์ไดเซปินในการเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลิตภัณฑ์ในกลุ่มต้านมะเร็ง ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาฤทธิ์ในการต้านมะเร็งของสารคอร์ไดเซปินเพิ่มเติม โดยมุ่งเน้นไปในการเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด Natural killer cell (NK cell) ในการเข้ากำจัดเซลล์มะเร็งเมื่อกระตุ้น NK-92 cell ด้วยสารคอร์ไดเซปิน ส่งผลทำให้ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ

เซลล์มะเร็ง THP-1 และ U-251 เพิ่มมากขึ้น โดยอาจสืบเนื่องมาจากการที่สารคอร์โตเซปินช่วยกระตุ้นการสังเคราะห์และหลั่ง TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12 IFN- $\gamma$  และ granzyme B อีกทั้งยังช่วยส่งเสริมให้ NK cell เข้าสู่สภาพที่พร้อมต่อการทำงาน ผ่านการลดการแสดงออกของ CD27 และเพิ่มการแสดงออกของ CD11b, CD16, และ NKG2D สำหรับการพัฒนากระบวนการผลิตสารสกัดโปรตีนคัดหลังจากเซลล์ผิวหนัง เซลล์ผิวหนังที่ใช้ในการผลิตคือเซลล์ HaCaT ซึ่งเป็นเซลล์ผิวหนังชนิดเคราติโนไซต์ที่ผ่านกระบวนการทำให้เป็นอมตะ โดยทำการเติมสารคอร์โตเซปิน ความเข้มข้น 2.5  $\mu$ M เข้าไปในระบบเพาะเลี้ยงเซลล์ก่อนทำการเก็บสารสกัดโปรตีนคัดหลัง ที่เรียกว่า Cordycepin induced HaCaT Secretome (CHS) พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อฟื้นฟูความสมบูรณ์ของผิวหนังในเซลล์ผิวหนังชนิดไฟโบรบลาสต์ ได้แก่ การต้านอนุมูลอิสระ การกระตุ้นการสร้างโครงข่ายเมทริกซ์ในผิวหนัง และการกระตุ้นกระบวนการออกฤทธิ์ไฟลาจี ซึ่งเกิดจากการเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีนหลายชนิดในสารคัดหลัง ได้แก่ CXCL1, IL-1Ra, IL-8, MIF, และ PAI-1 ดังนั้นการประยุกต์ใช้แนวคิดทางการตัดแปรทางเอพิเจเนติก และการกระตุ้นด้วยสารคอร์โตเซปินตามลำดับนั้นสามารถปรับปรุงกระบวนการผลิตวัตถุดิบทั้งสองชนิดได้จริงในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งจะเป็นรากฐานสำคัญในการนำไปประยุกต์ใช้ต่อไปในระดับอุตสาหกรรม



PHONGSAKORN KUNHORM : DEVELOPMENT OF EFFECTIVE COSMECEUTICAL AND NUTRACEUTICAL INGREDIENTS FROM *CORDYCEPS MILITARIS* AND SECRETOME EXTRACTS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PARINYA NOISA, Ph.D., 133 PP.

Keyword: CORDYCEPS MILITARIS/CORDYCEPIN/STATIC LIQUID CULTURE/EPIGENETIC MODIFICATION/NATURAL KILLER CELL/CANCER/IMMUNE SYSTEM/KERATINOCYTE/HACAT/DERMAL FIBROBLAST/SECRETOME/SKIN REGENERATION/WOUND HEALING

Effective bioactive ingredients are needed to stay ahead of the competition in the nutraceutical and cosmeceutical industries. In this study, we develop the novel production procedures of cordycepin and secretome extracts and used them as such promising bioactive ingredients. To increase cordycepin production, epigenetic modification was performed to static liquid cultures. *Cordyceps militaris* was grown in a static liquid culture with valproic acid, a histone deacetylase (HDAC) inhibitor, added to change the epigenetic state. Fifty micromolar valproic acid increased cordycepin production up to 41.187% by increasing global histone acetylation and upregulating 5'-nucleotidase, adenylate kinase, phosphorybosyltransferase, Cns1, Cns2, Cns3, and Cns4. Cordycepin production peaked at 2,835.32 mg/L in a 400 mL working volume. Therefore, epigenetic modification may enhance cordycepin production by changing the gene regulatory network of *C. militaris*. Then, we examined the biological effects of cordycepin on NK-92 cell physiology, cell stage development, and cytokine production that could result in the enhancement of cytotoxicity of NK cells against cancer cells. The cordycepin treatment of NK-92 cells improved their cytotoxicity against THP-1 and U-251 cells. In addition, cordycepin greatly stimulated the synthesis of TNF-, IFN-, IL-2, and IL-12 cytokine-related genes and the release of IFN- and granzyme B from NK-92 cells. Cordycepin was shown to increase the maturation of NK-92 cells by lowering the expression of the immature marker CD27 and increasing the expression of the mature markers CD11b, CD16, and NKG2D. Such results encouraged the development of cordycepin as an active ingredient in anti-cancer nutraceutical products. For secretome production, we modulated cytokine components and increase the quality of HaCaT secretome, by means of cordycepin administration. The

secretome produced by such strategy was designated as cordycepin-induced HaCaT secretome (CHS). The results suggested that CHS induced facilitated fibroblast proliferation/migration, ROS scavenging, extracellular matrix formation, and autophagy. These improved bioactivities of CHS may be attributable to an increase in important cytokines, including as CXCL1, IL-1Ra, IL-8, MIF, and PAI-1. Together, cordycepin and CHS might be demonstrated as promising bioactive compounds for nutraceutical and cosmeceutical formulations.



School of Biotechnology  
Academic Year 2022

Student's Signature Phongsakorn Kunhom  
Advisor's Signature P. [Signature]