**TRANG THÔNG TIN LUẬN ÁN**

Tên đề tài luận án: Nghiên cứu hoạt tính kháng oxi hoá, kháng viêm của chitooligosaccharide và dẫn xuất phenolic-chitooligosaccharide

Ngành: Hóa sinh học

Mã số ngành: 62420116

Họ tên nghiên cứu sinh: Bùi Văn Hoài

Khóa đào tạo: 2016

Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS NGÔ ĐẠI NGHIỆP

Cơ sở đào tạo: Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG.HCM

**1. TÓM TẮT NỘI DUNG LUẬN ÁN (SUMMARY)**:

Chitosan có những hoạt tính kháng khuẩn, giảm cholesterol, giảm huyết áp, kháng viêm, kháng oxi hóa, v.v.. Ngoài ra, chitosan là nguyên liệu dễ phân hủy sinh học, không độc vì vậy được ứng dụng rất nhiều và đa dạng trong công nghiệp dược phẩm, thực phẩm, thực phẩm bảo vệ sức khỏe. Tuy nhiên, chitosan không được ruột non hấp thu do hệ tiêu hóa của động vật, đặc biệt là hệ tiêu hóa của cơ thể người không có chitosanase để thủy phân chúng thành những chất có khối lượng phân tử thấp để cơ thể có thể hấp thu. Chính lý do trên, nghiên cứu cắt mạch chitosan tạo chitooligosaccharide (COS) để mở rộng phạm vi ứng dụng là rất cần thiết. Trong những năm gần đây, nghiên cứu gắn nhóm chức năng acid phenolic như acid gallic (GA), acid syringic (SA), acid caffeic (CA) và acid ferulic (FA) có hoạt tính sinh học như kháng oxi hoá, kháng viêm vào chuỗi mạch của COS để tăng cường hoạt tính sinh học và đa dạng ứng dụng của COS rất được quan tâm, qua nghiên cứu sẽ làm rõ khả năng kháng viêm và kháng oxi hóa của bốn dẫn xuất GA-COS, SA-COS, CA-COS, FA-COS. Nghiên cứu sử dụng enzym không đặc hiệu cellulase cho quá trình thủy phân chitosan nhằm thu nhận COS và quá trình tạo dẫn xuất phenolic-COS được thực hiện thông qua cặp oxy hóa khử acid ascorbic /hydrogen peroxyde. Đại thực bào RAW 264.7 được sử dụng làm mô hình *in vitro* để thử nghiệm hoạt tính kháng oxi hóa như khả năng bảo vệ DNA, protein, lipid màng và hoạt tính kháng viêm thông qua con tín hiệu MAPK và NF-kB/IkB với tác nhân cảm ứng lipopolysaccharide. Phản ứng RT-PCR được sử dụng để phân tích biểu hiện các gen iNOS, COX-2 và các cytokine tiền viêm như TNF-α, IL-1β và IL-6 với trình tự mồi cho cDNA mục tiêu như iNOS: mồi xuôi 5’-CCC-TTC-CGA-AGT-TTC-TGG-CAG-CAG-C-3’, mồi ngược 5’-GGC-TGT-CAG-AGC-CTC-GTG-GCT-TTG-G-3’; COX-2: mồi xuôi 5’-GGG-GTA-CCT-TCC-AGC-TGT-CAA-AAT-CTC-3’, mồi ngược 5’-GAA-GAT-CTC-GCC-AGG-TAC-TCA-CCT-G-3’; TNF-α: mồi xuôi 5’-ATG-AGC-ACA-GAA-AGC-ATG-ATC-3’, mồi ngược 5’-TAC-AGG-CTT-GTC-ACT-CGA-ATT-3’; IL-6: mồi xuôi 5’-ATG-AGC-ACA-GAA-AGC-ATG-ATC-3’, mồi ngược 5’-TAC-AGG-CTT-GTC-ACT-CGA-ATT-3’; IL-1β: mồi xuôi 5’-ATGGCA-ACT-GTT-CCT-GAA-CTC-AAC-T-3’, mồi ngược 5’-TTT-CCTTTC-TTA-GAT-ATG-GAC-AGG-AC-3’ và gen kiểm soát glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): mồi xuôi 5’-GCC-ACC-CAG-AAG-ACT-GTG-GAT-3’, mồi ngược 5’-TGG-TCC-AGG-GTT-TCT-TAC-TCC-3’. Phương pháp Western Blot để xác định các biểu hiện protein trong đáp ứng viêm như JNK, p38, ERK1/2 và MNK1 trong con đường MAPK và NF-kB (p50) và NF-kB (p65) trong con đường NF-kB/IkB. Kết quả nghiên cứu đã xác định được các thông số tối ưu cho quá trình thủy phân như nhiệt độ 49oC, pH 5,9; nồng độ cơ chất 0,76%, hoạt độ cellulase 8,97 UI/g và thông số tối ưu trong quá trình sấy phun tạo bột COS như nhiệt độ 138oC, nồng độ chất khô 14,3%, lưu lượng nhập liệu 5,2 mL/phút. Phân tích phổ proton 1H-NMR cho thấy nghiên cứu đã tổng hợp thành công bốn dẫn xuất chitooligosaccharide ghép nhóm acid phenolic như GA-COS, SA-COS, CA-COS, FA-COS với các điều kiện thu nhận bột dẫn xuất có hoạt tính tốt nhất như tỷ lệ cơ chất COS: acid phenolic là 1:0,5, pH 5, nhiệt độ 27oC, thời gian tổng hợp là 6 giờ. COS và các dẫn xuất mới đều có khả năng kháng oxi hóa thể hiện qua hiệu quả bắt gốc tự do DPPH**·** và **·**OH; khả năng bảo vệ DNA, protein và lipid màng trong tế bào RAW 264.7. Các dẫn xuất mới GA-COS, SA-COS, CA-COS, FA-COS cho thấy hoạt tính kháng oxi hóa được cải thiện đáng kể so COS. Trong đó có hoạt tính kháng oxi hóa của GA-COS là tốt nhất. COS và các dẫn xuất đều có vai trò là tác nhân kháng viêm thể hiện qua tác dụng làm giảm hàm lượng NO, điều hòa giảm biểu hiện gen COX-2, iNOS, IL-1β, IL-6, TNF-α, điều hòa giảm biểu hiện protein trong con đường tín hiệu MAPK như iNOS, ERK1/2, p38, JNK và MNK và con đường NF-kB/IkB như hai tiểu phần của NF-kB (p50 và p65), các dẫn xuất cho thấy có hiệu quả kháng viêm cải thiện hơn COS. Ngoài ra, COS phân đoạn 1-3 kDa có vai trò prebiotic đối với hai vi khuẩn probiotic *Lactobacillus plantarum* và *Lactobacillus acidophilus* tại nồng độ 1 mg/ml. So với FOS và Inulin thương mại, COS 1-3 kDa có hiệu quả kích thích sự phát triển hai lợi khuẩn probiotic tương đương và cao hơn.

**2. NHỮNG KẾT QUẢ MỚI CỦA LUẬN ÁN (NOVELTY OF THESIS)**:

- Nghiên cứu đã xác định các thông số tối ưu cho quá trình thủy phân như nhiệt độ 49oC, pH 5,9; nồng độ cơ chất 0,76%, hoạt độ cellulase 8,97 UI/g và thông số tối ưu trong quá trình sấy phun tạo bột COS như nhiệt độ 138oC, nồng độ chất khô 14,3%, lưu lượngnhập liệu 5,2 mL/phút.

- Nghiên cứu đã tổng hợp thành công bốn dẫn xuất chitooligosaccharide ghép nhóm acid phenolic như GA-COS, SA-COS, CA-COS, FA-COS với các điều kiện thu nhận bột dẫn xuất có hoạt tính tốt nhất như tỷ lệ cơ chất COS:acid phenolic là 1:0,5; pH 5; nhiệt độ 27oC; thời gian phản ứng tổng hợp là 6 giờ.

- Các dẫn xuất mới GA-COS, SA-COS, CA-COS, FA-COS cho thấy hoạt tính kháng oxi hóa được cải thiện đáng kể so COS. Trong đó có hoạt tính kháng oxi hóa của GA-COS là tốt nhất. COS và các dẫn xuất đều có vai trò là chất kháng viêm thể hiện qua tác dụng làm giảm hàm lượng NO, ức chế biểu hiện gen COX-2, iNOS, IL-1β, IL-6, TNF-α, ức chế biểu hiện protein trong con đường tín hiệu MAPK như iNOS, ERK1/2, p38, JNK và MNK, ức chế biểu hiện protein p50 và p65 trong con đường NF-kB/IkB, các dẫn xuất cho thấy có hiệu quả kháng viêm cải thiện hơn COS.

- COS phân đoạn 1-3 kDa có vai trò prebiotic đối với hai vi khuẩn probiotic *Lactobacillus plantarum* và *Lactobacillus acidophilus* tại nồng độ 1 mg/ml. So với FOS và Inulin thương mại, COS 1-3 kDa có hiệu quả kích thích sự phát triển hai lợi khuẩn probiotic tương đương và cao hơn.

**3.** **CÁC ỨNG DỤNG/ KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG TRONG THỰC TIỄN HAY NHỮNG VẤN ĐỀ CÒN BỎ NGỎ CẦN TIẾP TỤC NGHIÊN CỨU** **(APPLICATIONS/ APPLICABILITY/ PERSPECTINE)**

- Mở rộng khảo sát biểu hiện gen và protein trên các yếu tố kháng viêm khác như IL-4, IL-8, IL-10.

- Khảo sát khả năng kháng viêm của COS (1-3 kDa) và các dẫn xuất *in vivo* ở chuột và đánh giá độc tính bán trường diễn của các dẫn xuất.

- COS phân đoạn 1-3 kDa có vai trò prebiotic tiềm năng cho nghiên cứu ứng dụng vào các sản phẩm thực phẩm dạng bột, các sản phẩm nước giải khát đồ uống không cồn.

|  |  |
| --- | --- |
| **TẬP THỂ CÁN BỘ HƯỚNG DẪN** | **NGHIÊN CỨU SINH** (PhD STUDENT)  (Ký tên, họ tên) |

**PGS.TS Ngô Đại Nghiệp Bùi Văn Hoài**

**XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO**

**THESIS INFORMATION**

Thesis title: Research on antioxidant and anti-inflammatory activities of chitooligosaccharides and phenolic-chitooligosaccharide derivatives

Specialty: Biochemistry

Code: 62420116

Name of Ph.D. Student: Bui Van Hoai

Academic year: 2016

Supervisor: Ngo Dai Nghiep, Ph.D. Associate Professor

At: VNUHCM - University of Science

**1. SUMMARY**:

- Chitosan has antibacterial, cholesterol-lowering, blood pressure-lowering, anti-inflammatory, antioxidant activities, etc. In addition, chitosan is a biodegradable, non-toxic material, so it is widely and diversely used in the pharmaceutical, food, and health supplement food industries. However, chitosan is not absorbed by the small intestine because the digestive system of animals, especially the human body’s digestive system, does not have the chitosanase to hydrolyze chitosan into low molecular weight substances for absorption by the body. Therefore, research on chitosan cutting to create chitooligosaccharide (COS) to expand the application range is very necessary. In recent years, research has attached functional groups of phenolic acids such as gallic acid (GA), syringic acid (SA), caffeic acid (CA), and ferulic acid (FA) with biological activities such as antioxidant, anti-inflammatory into the chain of COS to enhance biological activity and diverse applications of COS is of great interest, through the research will clarify the anti-inflammatory and antioxidant capacity of four derivatives such as GA-COS, SA-COS, CA-COS, FA-COS. The study using a non-specific cellulase enzyme for chitosan hydrolysis to obtain the COS and phenolic-COS derivatization was carried out through an ascorbic acid/hydrogen peroxide redox pair. RAW 264.7 macrophages were used as an *in vitro* model for antioxidant activity analysis such as DNA, protein, membrane lipid protection, and anti-inflammatory activity via MAPK and NF-kB/IkB signaling pathway with lipopolysaccharide-induced. RT-PCR was used to analyze the expression of iNOS, COX-2 genes, and proinflammatory cytokines such as TNF-α, IL-1β, and IL-6 with primer sequences for target cDNAs such as for iNOS, forward 5'-CCC-TTC-CGA-AGT-TTC-TGG-CAG-CAG-C-3' and reverse 5'-GGC-TGT-CAG-AGC-CTC-GTG-GCT-TTG-G-3 '; for COX-2, forward 5'-GGG-GTA-CCT-TCC-AGC-TGT-CAA-AAT-CTC-3' and reverse 5'-GAA-GAT-CTC-GCC-AGG-TAC-TCA-CCT -G-3'; for TNF-α: forward 5’-ATG-AGC-ACA-GAA-AGC-ATG-ATC-3’ and reverse 5’-TAC-AGG-CTT-GTC-ACT-CGA-ATT-3’; for IL-6, forward 5’-ATG-AGC-ACA-GAA-AGC-ATG-ATC-3’ and reverse 5’-TAC-AGG-CTT-GTC-ACT-CGA-ATT-3’; for IL-1β, forward 5'-ATGGCA-ACT-GTT-CCT-GAA-CTC-AAC-T-3' and reverse 5'-TTT-CCTTTC-TTA-GAT-ATG-GAC-AGG-AC-3 '; for the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) control gene, forward 5'-GCC-ACC-CAG-AAG-ACT-GTG-GAT-3' and reverse 5'-TGG-TCC-AGG-GTT-TCT -TAC-TCC-3'. Western Blot method to identify inflammatory response proteins such as JNK, p38, ERK1/2, and MNK1 in the MAPK and NF-kB (p50) and NF-kB (p65) in the NF-kB/ IkB signaling pathway. The work results have determined the optimal parameters for hydrolysis such as 49oC temperature, pH 5.9; 0.76% substrate, cellulase activity of 8.97 UI/g and optimal parameters during spray drying to create COS powder such as 138oC temperature, 14.3% dry content, the input flow rate of 5.2 mL/min. Proton spectrum analysis of 1H-NMR identified successfully synthesized four phenolic acid grafted chitooligosaccharide derivatives such as GA-COS, SA-COS, CA-COS, and FA-COS. The conditions obtaining the derivatives powder with the best activity as the ratio of COS: phenolic at 1:0.5, pH 5, 27oC temperature, and time for 6 hours. COS and novel derivatives have antioxidant capacity demonstrated through the DPPH· and ·OH free radical scavenging effects; the ability to protect DNA, protein, and membrane lipids in RAW 264.7 cells. The novel derivatives GA-COS, SA-COS, CA-COS, and FA-COS showed significantly improved antioxidant activity compared to COS. Among them, the antioxidant activity of GA-COS is the best. COS and derivatives play the role of anti-inflammatory agents, which are shown that reduce NO content, down-regulate gene expression as COX-2, iNOS, IL-1β, IL-6, TNF-α, and down-regulate proteins expression in the MAPK signaling pathway such as iNOS, ERK1/2, p38, JNK, and MNK1 and the NF-kB/IkB pathway as two NF-kB subunits (p50 and p65). The derivatives showed improved anti-inflammatory effects than COS. In addition, a COS fraction of 1-3 kDa has a prebiotic role for two probiotic bacteria Lactobacillus plantarum and Lactobacillus acidophilus at a concentration of 1 mg/mL. COS of 1-3 kDa had effective in stimulating the growth of two probiotics from equal to higher than FOS and Inulin which are used in the market.

**2. NOVELTY OF THESIS**:

- The study has determined the optimal parameters for hydrolysis such as 49oC temperature, pH 5.9; 0.76% substrate, cellulase activity of 8.97 UI/g, and optimal parameters during spray drying to create COS powder such as 138oC temperature, 14.3% dry content, the input flow rate of 5.2 mL/min.

- The research successfully synthesized four phenolic acid grafted chitooligosaccharide derivatives such as GA-COS, SA-COS, CA-COS, and FA-COS with the conditions that obtaining the derivatives powder with the best activity such as the ratio of COS: phenolic at 1:0.5, pH 5, 27oC temperature and time for 6 hours.

- The novel derivatives GA-COS, SA-COS, CA-COS, and FA-COS showed significantly improved antioxidant activity compared to COS. Among them, the antioxidant activity of GA-COS is the best. COS and derivatives play the role of anti-inflammatory agents, which are shown that reduce NO content, down-regulate gene expression as COX-2, iNOS, IL-1β, IL-6, TNF-α, and down-regulate proteins expression in the MAPK signaling pathway such as iNOS, ERK1/2, p38, JNK, and MNK1, and the NF-kB/IkB pathway as two NF-kB subunits (p50 and p65), derivatives showed improved anti-inflammatory effects than COS.

- COS fraction of 1-3 kDa has a prebiotic role for two probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* at a concentration of 1 mg/mL. COS of 1-3 kDa had effective at stimulating the growth of two probiotics from equal to higher than FOS and Inulin which are used in the market.

**3**. **APPLICATIONS/ APPLICABILITY/ PERSPECTIVE**

- Expanding the investigation of gene and protein expression on other anti-inflammatory factors such as IL-4, IL-8, and IL-10.

- Investigation of the anti-inflammatory activity of COS (1-3 kDa) and derivatives *in vivo* in mice and the chronic toxicity assessment of derivatives.

- The COS of 1-3 kDa has a potential prebiotic role for research and application in powdered and non-alcoholic beverage products.

|  |  |
| --- | --- |
| **SUPERVISOR** | **PhD STUDENT** |

**Assoc. Prof. NGO DAI NGHIEP BUI VAN HOAI**

**CERTIFICATION**

**UNIVERSITY OF SCIENCE**

**PRESIDENT**