รายงานการวิจัย

"การผลิตอาหารเสริมสุขภาพเพื่อป้องกันโรคข้อกระดูกเสื่อมจากเปลือกอาหารทะเล"

"Production of amino sugar food supplement from squid pen"

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

คณะผู้วิจัย:

รศ.ดร. มงคล สุขวัฒนาสินิทธิ์ (หัวหน้าโครงการ)

อ.ดร. อนวัช อาชวาคม

กิตติกรรมประกาศ

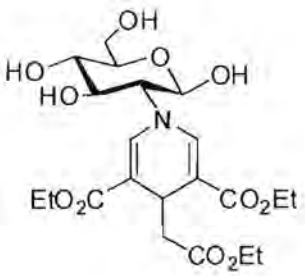
คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน จากแผนงานวิจัย "นวัตกรรมเพื่อยกระดับคุณภาพและความปลอดภัยทางอาหารสู่โครงสร้างเศรษฐกิจยุคใหม่" ประจำปีงบประมาณ 2554 ประเภทผลงานวิจัยเพื่อถ่ายทอดเทคโนโลยี ที่ให้การสนับสนุนต้นทุนในการทำวิจัยครั้งนี้

บทคัดย่อ

การย่อยไคตินจากแกนหมึกด้วยเอนไซม์จากรา *Aspergillus fumigatus* และโคลนแบคทีเรีย *Serratia sp.* สามารถผลิตเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน (GlcNAc) และเอ็น,เอ็น-ไดแอซีทิลไคโตไบโอส [$(GlcNAc)_2$] อย่างเฉพาะเจาะจงได้ เอนไซม์จากรา *Aspergillus fumigatus* (4 U/1 g of chitin) สามารถย่อยไคติน (3% w/v) ที่ pH เป็น 3 อุณหภูมิ 40 °C ได้ผลิตภัณฑ์เป็น GlcNAc ด้วยเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 72% ภายในเวลา 2 วัน การย่อยไคติน (3% w/v) ด้วยเอนไซม์จากโคลนแบคทีเรีย *Serratia sp.* (1 U/1 g of chitin) ที่ pH เท่ากับ 6 อุณหภูมิ 37 °C ทำการบ่มเป็นเวลา 6 วันให้ผลิตภัณฑ์เป็น $(GlcNAc)_2$ และ GlcNAc ด้วยเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ 43% และ 2.6% ตามลำดับ การทำให้ GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$ บริสุทธิ์สามารถทำได้โดยการตกตะกอนด้วยเอทานอล ตามด้วยการกำจัดสีด้วยผงถ่านกัมมันต์หรือใช้คอลัมน์ที่มีผงถ่านกัมมันต์ให้ GlcNAc บริสุทธิ์ด้วยเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 64% และ $(GlcNAc)_2$ บริสุทธิ์ด้วยเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 40% และด้วยกรรมวิธีการทำให้บริสุทธิ์ที่พัฒนาแล้วสามารถเพิ่มความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์สูงถึง 100%

การย่อยไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น โดยการใช้และไม่ใช้คลื่นอัลตราโซนิคเพื่อให้ได้เกลือกลูโคซามีน ไฮโดรคลอไรด์ (GlcNHCl) ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการเตรียมเกลือ GlcNHCl คืออัตราส่วนไคตินต่อกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1:1 (w/w) และที่อุณหภูมิ 40 °C ได้ผลการย่อยที่มีประโยชน์และสามารถนำไปใช้ในการทดลองในขั้นต่อไป การย่อยไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นโดยการใช้คลื่นไมโครเวฟซึ่งสภาวะที่ใช้ในการเตรียมเกลือ GlcNHCl คืออัตราส่วนไคตินต่อกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1:3 (w/w) ที่พลังงาน 850 วัตต์เป็นเวลา 12 นาทีทำให้ได้เปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ 52% และการปรับปรุงเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ของการย่อยโดยการใช้เมคานิคัลสเตอร์เรอร์เข้าช่วยสามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ได้เป็น 56%

ในส่วนของการนำเอา GlcNHCl มาใช้ประโยชน์นอกจากการใช้เป็นอาหารเสริมแล้วเรากำลังปรับโครงสร้างให้เหมาะกับการนำไปใช้เป็นสารตรวจวัดการวาวแสงทางชีวภาพซึ่งมีโครงสร้างดังแสดง ซึ่งจากผลการวิจัยทำให้สามารถสังเคราะห์สารเป้าหมาย Glc-DHP และกำลังจะนำเอาไปศึกษาต่อไป



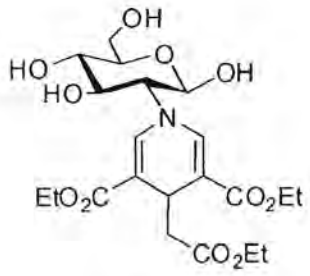
Glc-DHP

Abstract

The degradation of squid pen by using enzymes of *Aspergillus fumigatus* and cloned bacteria *Serratia sp.* can be accomplished to specifically *N*-acetyl-*D*-glucosamine (GlcNAc) and *N,N*-acetylchitobiose [$(GlcNAc)_2$]. Enzyme of *Aspergillus fumigatus* (4 U/1 g of chitin) can degrade chitin (3% w/v) at 40°C, pH 3, for 2 days, to give GlcNAc in 72% yield. The degradation of chitin (3% w/v) by using enzymes from bacteria *Serratia sp* (1 U/1 g of chitin) at 37°C, pH 6, for 6 days, to produce both $(GlcNAc)_2$ and (GlcNAc) in 72% and 2.6% yields respectively. The purification of (GlcNAc) and $(GlcNAc)_2$ could be done by recrystallization following by either the activated charcoal decolorization or the activated charcoal column chromatography to obtain pure GlcNAc in 64% yield and pure $(GlcNAc)_2$ and 40% yield. And the %purity of both products is raised to 100% by using the developed purification method.

The degradation of chitin by using conc. HCl to obtain Glucosamine hydrochloride salt (GlcNHCl) can be accomplished with or without ultrasonication. The condition is to use chitin to conc. HCl ratio 1:1 (w/w) and at 40°C the result was useful enough to further utilize in the next experimental step. The degradation of chitin by using conc. HCl to obtain Glucosamine hydrochloride salt (GlcNHCl) can be accomplished with microwave. The condition is to use chitin to conc. HCl ratio 1:3 (w/w) with 850 watts for 12 minutes provided 52% yield. By using mechanical stirrer, the yield could be improved up to 56%.

To utilize the obtained GlcNHCl apart from the use as supplementary, GlcNHCl is being developed to be used as the fluorescence biochemosensor as shown below. This target molecule Glc-DHP was successfully synthesized and going to be tested in the further investigation.



Glc-DHP

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูปภาพ	จ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฉ
1.บทนำ	
1.1 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง	1
1.1.1 การย่อยด้วยเอนไซม์	2
1.1.2 การย่อยด้วยกรด	4
1.1.3 การนำเอาเกลือ GlcNHCl ที่สังเคราะห์ได้ไปประยุกต์ใช้เป็นสารตรวจวัดทางชีวภาพ	5
1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	8
1.3 วัตถุประสงค์	8
1.4 ขอบเขตการวิจัย	8
1.5 วิธีการดำเนินการวิจัย	8
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	9
2. เนื้อเรื่อง	9
2.1 วิธีการดำเนินการวิจัย	10
2.2 ผลการวิจัย	10
สรุปรายงานวิจัยที่ได้ดำเนินแล้วเสร็จในปี 2554	10
A) การย่อยไคตินด้วยเอนไซม์ และกรด	11
B) การนำเอาเกลือ GlcNHCl ที่สังเคราะห์ได้ไปประยุกต์ใช้เป็นสารตรวจวัดทางชีวภาพ	11
3. วิจารณ์ผลการทดลอง	14
4. สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป	14

เลขหมู่

เลขทะเบียน 015703

วัน, เดือน, ปี 5 ก.พ. 56

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 การศึกษาสังเคราะห์ tetraacetyl Glc-DHP 13

สารบัญรูปภาพ และสมการ

รูปภาพที่	หน้า
1. โครงสร้างทางคมีของไคติน (n>m) และไคโตซาน (n<m)	1
2. ลำดับความจำเพาะเจาะจงของไอออนประจุบวกถูกดูดซับบนแผ่นฟิล์มของไคโตซาน	5
3. A การสังเคราะห์อนุพันธ์ $GlcNH_2Cys$, B การเปรียบเทียบอัตราการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันโดยอนุพันธ์ TCA	6
4. การเปลี่ยนแปลงสีของคีโมเซนเซอร์ L_1 (แถวบน) และ L_2 (แถวล่าง) เมื่อเติมไอออนต่างๆ	7
5. การเกิดปฏิกิริยาระหว่าง GlcN และ MDA จะได้ผลิตภัณฑ์ 2 ชนิด	7
6. การสังเคราะห์อนุพันธ์ 1,4-DHP	7

สมการที่	หน้า
1. แผนการสังเคราะห์สารเป้าหมาย Glc-DHP จาก GlcNHCl	10
2. การวางแผนการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์เป้าหมาย Glc-DHP จาก GlcNHCl	11
3. การสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ tetraacetyl GlcNHCl	12
4. การสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ tetraacetyl GlcN	12
5. การสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ tetraacetyl $GlcNHCH{=}CHCO_2Et$	13
6. การสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ tetraacetyl Glc-DHP	13
7. การสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์เป้าหมาย Glc-DHP	14

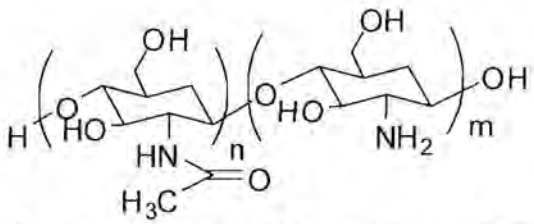
อธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

Conc. HCl	Concentrated hydrochloric acid
DHP	Dihydropyridine
g	Gram
GlcNAc	*N*-Acetyl-*D*-glucosamine
$(GlcNAc)_2$	*N,N*-Acetylchitobiose
GlcNHCl	Glucosamine hydrochloride salt
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IR	Infrared
mL	Milliliter
HCl	Hydrochloric acid
MS	Mass spectrometry
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
TLC	Thin Layer Chromatography
U	Unit
UV	Ultraviolet
w/v	Weight by volume
w/w	Weight by weight

1. บทนำ

1.1 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

โดยนิยามโครงสร้างเคมี ไคติน (chitin)[1] หมายถึง poly(β-(1-4)-2-acetymido-2-deoxy-*D*-glucose) ซึ่งมีโครงสร้างของสายพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 2-acetamido-2-deoxy- *D* -glucose หรือ *N*-acetyl-*D*-glucosamine (GlcNAc) เป็นหน่วยซ้ำในสายพอลิเมอร์ ส่วนไคโตซาน (chitosan)[1] หมายถึง poly(β-(1-4)-2-amido-2-deoxy- *D* -glucose) ที่มีน้ำตาล 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose หรือ *D* -glucosamine (GlcN) เป็นหน่วยซ้ำในสายโซ่พอลิเมอร์ อย่างไรก็ตามไคโตซานมักได้จากการทำปฏิกิริยาดีแอซิทิเลชั่น (deacetylation) ของไคตินในสารละลายด่างเข้มข้น ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นโคพอลิเมอร์ระหว่างน้ำตาล GlcNAc และน้ำตาล GlcN ในทางปฏิบัติไคตินจึงหมายถึงโคพอลิเมอร์ที่ไม่ละลายในสารละลายกรดเจือจางเนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์ของ GlcNAc (degree of acetylation) มากกว่า 50% และไคโตซานหมายถึงโคพอลิเมอร์ที่ละลายได้ในกรดเจือจางเนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์ของ GlcN (degree of deacetylation) มากกว่า 50%



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของไคติน (n>m) และไคโตซาน (n<m)

เนื่องจากโครงสร้างของไคตินและไคโตซานมีหน่วยย่อยของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ไคตินและไคโตซานจึงสามารถถูกย่อยโดยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสให้ผลิตภัณฑ์เป็นไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (chitooligosaccharide) และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในที่สุด ได้มีรายงานการทำไฮโดรไลซิสของไคตินและไคโตซานอยู่ 2 ลักษณะด้วยกันคือ การใช้กรดหรือเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในทางอุตสาหกรรมปัจจุบัน นิยมใช้วิธีการย่อยไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์เป็นเกลือกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (GlcNHCl) เนื่องจากเป็นกระบวนการผลิตที่ทำได้ค่อนข้างรวดเร็ว และใช้รีเอเจนต์ที่มีราคาถูกเมื่อเปรียบเทียบกับการย่อยด้วยเอนไซม์

ในการตัดสายไคตินและไคโตซานเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เหล่านี้ สามารถทำได้ทั้งวิธีทางเคมี[2] และการใช้เอนไซม์[3] ในส่วนของการใช้เอนไซม์นั้นจะมีข้อได้เปรียบด้านการควบคุมปฏิกิริยาซึ่งทำได้ค่อนข้างง่าย ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ที่อุณหภูมิและความดันปกติ มีความจำเพาะต่อซับสเตรทสูงและมีปฏิกิริยาข้างเคียงน้อย และในหลายปีที่ผ่านมา มีผู้วิจัยศึกษาฤทธิ์ในการย่อยไคตินของเอนไซม์หลายชนิดไม่ว่าจะเป็นเอนไซม์จากรา, แบคทีเรียหรือเอนไซม์จากพืช ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้มีฤทธิ์ในการย่อยที่แตกต่างกันออกไปและได้ผลิตภัณฑ์ทั้งที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ขนาดต่างๆ[4,5]

ในกรณีของกรรมวิธีการย่อยไคตินนั้น ถึงแม้ว่าตามทฤษฎีปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพันธะไกลโคซิดิกต้องการกรดเพียงเล็กน้อยเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แต่ในทางปฏิบัตินั้นต้องใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ทั้งนี้เนื่องจากไคตินไม่ละลายในกรดเจือจางแต่สามารถละลายได้ในกรดหรือเบสเข้มข้น และมักใช้

อุณหภูมิค่อนข้างสูงคือประมาณ 95-100 °C ในการทำปฏิกิริยา เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เกิดขึ้นเป็น GlcNHCl ซึ่งเป็นผลมาจากการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสทั้งพันธะไกลโคซิดิกและพันธะเอไมด์

คลื่นอัลตราโซนิคหมายถึง คลื่นเสียงที่มีความถี่สูงเกินกว่าที่หูมนุษย์จะได้ยิน โดยทั่วไปแล้วหูของมนุษย์โดยเฉลี่ยจะได้ยินเสียงสูงถึงเพียงแค่ประมาณ 15 KHz เท่านั้น ดังนั้นโดยปกติแล้วคำว่าอัลตราโซนิคจึงมักจะหมายถึงคลื่นเสียงที่มีความถี่สูงกว่า 20 KHz ขึ้นไป แต่ความถี่ที่ใช้ก็มักจะจำกัดอยู่เพียงไม่เกิน 50 KHz คลื่นอัลตราโซนิคเมื่อออกจากเครื่องกำเนิดหรือบางทีเราเรียกว่า "เครื่องโซนิเคเตอร์" แล้วสามารถถ่ายทอดพลังงานทางกลโดยการสั่นไปมากระจายไปในอากาศหรือของเหลวได้

ในกรณีที่โมเลกุลได้รับพลังงานของคลื่นอัลตราโซนิคแล้ว โมเลกุลจะดูดซับพลังงานที่ถ่ายทอดผ่านพาหะนั้นๆและทำให้ตัวโมเลกุลเกิดการสั่นได้มากขึ้น และตรงนี้เองที่เราสามารถนำพลังงานที่ดูดซับไปช่วยในการทำปฏิกิริยาต่างๆได้ เนื่องจากเมื่อโมเลกุลมีอัตราการสั่นตัวเพิ่มมากขึ้นเพราะฉะนั้นอัตราเร็วของปฏิกิริยาก็จะเพิ่มตามไปด้วยเช่นเดียวกัน เพราะฉะนั้นในกรณีของปฏิกิริยาการย่อยไคตินถ้านำคลื่นอัลตราโซนิคมาใช้เราคาดหวังว่าจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยในทุกๆด้านซึ่งจะทำให้ต้นทุนในการผลิต GlcNAc และ GlcNHCl ลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญ

1.1.1) การย่อยด้วยเอนไซม์

เอนไซม์ที่สามารถนำมาใช้ในการย่อยมีสองชนิดคือเอนไซม์ที่ได้จากราและเอนไซม์ที่ได้เชื้อแบคทีเรีย

a. ศึกษาวิจัยการผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินที่ได้จากรา

ในปี 2002 Nopakarn Rattanakit และคณะ[6] ศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp.S1-13 โดยการหมักแบบแห้งที่มีเปลือกกุ้งและเปลือกปูที่ผ่านการย่อยด้วยกรดเป็นสารอาหาร และบ่มที่อุณหภูมิ 45 °C และ pH 4 เป็นเวลา 11-13 วัน ได้ GlcNAc 33% จากไคตินเริ่มต้น

ในปี 2003 Krissana Auyunirudronkul[7] ได้ทดสอบรา 5 สายพันธุ์ *Aspergillus fumigatus, Trichoderma viride, Trichoderma aureoviride, Trichoderma reesei* และ *Mucor sp.* สำหรับการผลิตเอนไซม์ย่อยไคติน รา *Aspergillus fumigatus* สามารถชักนำให้เกิดเอนไซม์ได้สูงที่สุด โดยให้แอคติวิตีสูงถึง 438 mU/ml เมื่อเลี้ยงด้วยคอลลอยดอลไคติน ที่อุณหภูมิ 40 °C และมีปริมาณโปรตีนเป็น 1.70 mg/ml ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเบต้าไคตินโดยเอนไซม์ย่อยไคตินที่ผลิตจากรา *Aspergillus fumigatus* ให้ผลิตภัณฑ์ GlcNAc มากกว่า 70% ใน 1 วัน อัตราส่วนที่เหมาะสมของเอนไซม์ต่อไคตินคือ 1-4 mU/mg ที่ความเข้มข้นของสับเสตรทเป็น 20 mg/mL ช่วงพีเอชที่เหมาะสมคือ 3-5 และอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 45 °C ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสามารถทำได้โดยไม่ต้องมีบัฟเฟอร์ซึ่งง่ายต่อการทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ในระดับการผลิต

ในปี 2004 Parameswaran Binod และคณะ[8] ศึกษาการผลิตและการทำเอนไซม์ไคติเนสให้บริสุทธิ์ โดยทำการคัดเลือก *Penicillium* 14 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงบนอาหารรำข้าวสาลีผสมกับไคติน ซึ่งเป็นการหมักแบบแห้ง และคัดเลือก *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้ดีที่สุดที่เวลา 72 ชั่วโมง ในสภาวะการณ์ทำงานที่เหมาะสมที่พีเอช 5.5 และอุณหภูมิ 50 °C ได้เอนไซม์ที่มีแอคติวิตี้เท่ากับ 0.2 U/gds (gram dry substrate)

ในปี 2005 Laura Ramirez – Coutiño และคณะ[9] ทำการคัดเลือกรา *Lecanicillium* sp. 15 สายพันธุ์ โดยการเลี้ยงแบบอาหารเหลวที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ พบว่า *Lecanicillium fungicola* ที่เลี้ยงที่พีเอช 6 อุณหภูมิ 40 °C สามารถผลิต endochitinase และ *N*-acetylhexosaminidase ได้แอคติวิตี้เท่ากับ 747 และ 410 U/mg ตามลำดับ

ในปี 2005 Patidar และคณะ[10] ทำการแยกรา *Aspergillus flavus* 15 สายพันธุ์ *Aspergillus niger* 6 สายพันธุ์ และ *Penicillium chrysogenum* ซึ่งทำการแยกจากดิน ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไคติเนส จาก *P. chrysogenum* , PPCS 1 และ PPCS 2 ที่สภาวะการหมักแบบแห้ง ที่อุณหภูมิ 40 °C พีเอช 4 โดยที่ PPCS 1 ได้ไคติเนสแอคติวิตี้ 3809 U/g ของไคตินเริ่มต้น และ PPCS 2 ได้ 2516 U/g ของไคตินเริ่มต้น

b. การศึกษาวิจัยการผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินจากเชื้อแบคทีเรีย

ในปี 2001 Gemma Reguera และ Susan Leschine[11] ทำการศึกษาแบคทีเรีย *Cellulomonas* sp. 8 สายพันธุ์, *clostridium sp. 12 สายพันธุ์, Acetivibrio cellullolyticus, bacteroides cellulosolvens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศ ที่สามารถย่อยไคตินได้ โดยแยกแบคทีเรียจากดินได้ทั้งหมด 22 สายพันธุ์ และเลือก *Cellulomonas uda* มาทำการเปรียบเทียบสภาวะที่ใช้ในการย่อยเซลลูโลสกับไคตินและการผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิด

ในปี 2002 Rath Pichyangkura และคณะ[12] ได้ทำการย่อยแอลฟาและเบต้าไคตินด้วยเอนไซม์ chitinase (EC 3.2.1.14) and β-*N*-acetylhexosaminidase (EC 3.2.1.52) เพื่อทำการผลิต 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose (GlcNAc) โดยใช้ crude chitinase จากแบคทีเรีย *Burkholderia cepacia* TU09 และ *Bacillus licheniformis* SK-1 ในการย่อยผงแอลฟาและเบต้าไคติน พบว่า chitinase จาก *B. cepacia* TU09 ให้ผลผลิต GlcNAc มากกว่า 85 % จากเบต้าไคตินใน 1 วัน และจากแอลฟาไคตินใน 7 วัน และ chitinase จาก *B. licheniformis* SK-1 ย่อยเบต้าไคตินได้หมดภายใน 6 วัน ได้ GlcNAc 75 % กับ 20% ของ $(GlcNAc)_2$ และจากแอลฟาไคตินได้ 41% ของ GlcNAc

ในปี 2003 M.Gómez Ramírez และคณะ[13] ทำการคัดเลือกแบคทีเรีย wild type 150 สายพันธุ์ ซึ่งเลือก *Serratia marcescens* Wf ซึ่งผลิตเอนไซม์สูงสุด และ *B. thuringiensis* Bt-8 ซึ่งผลิตเอนไซม์ต่ำสุด มาทำการทดสอบการย่อยไคติน โดยใช้เทคนิคการย้อมสี colloidal chitin ด้วย Remazal Brilliant Blue R® เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเหลว

ในปี 2004 Purwani Yuli และคณะ[14] ศึกษาผลของการผลิตไคติเนสจากแบคทีเรียที่แยกจากน้ำพุร้อน Tompaso ทางเหนือของประเทศอินโดนีเซีย พบว่า *Bacillus* sp.13.26 สามารถเจริญได้บนอาหารที่มีไคติน 0.5% ที่อุณหภูมิ 55 °C และผลิตเอนไซม์ไคติเนสหลังจากผ่านไป 72 ชั่วโมง โดยเอนไซม์นี้จะมีความเสถียรต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง มีแอคติวิตี้ 420 U/mg protein

ในปี 2004 Ju Hee Kuk และคณะ[15] ได้ทำการแยก *Aeromonas* sp. GJ-18 จากดิน และใช้ในการเตรียมเอนไซม์ ซึ่งมีเอนไซม์ 2 ชนิด คือ *N*-acetyl-D-glucosaminidase และ *N,N'*-diacetylchitobiohydrolase ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ทำงานที่อุณหภูมิต่างกัน โดย *N*-acetyl-D-glucosaminidase จะผลิตให้ 74% ของ GlcNAc ที่อุณหภูมิ 45 °C ใน 5 วัน และ *N,N'*-diacetylchitobio hydrolase จะผลิตให้ 35%

ของ $(GlcNAc)_2$ ที่อุณหภูมิ 55 °C ใน 5 วัน และในปีถัดมา Ju Hee Kuk และคณะ[16] ได้ต่อยอดการพัฒนาการย่อยไคติน ให้ผลิตภัณฑ์หลักเป็น *N,N'*-diacetylchitobiose โดยการควบคุมอัตราส่วนของ β-*N*-acetylglucosaminidase ต่อ *N,N'*-diacetylchitobiohydrolase activities ในการเตรียม crude enzyme ของ *Aeromonas* sp. GJ-18 เมื่อบ่มอุณหภูมิที่ 50 °C β-*N*-acetylglucosaminidase จะเสียสภาพ ในขณะที่ *N,N'*-diacetylchitobiohydrolase ยังคงมี activity อยู่ หลังจากย่อย swollen แอลฟาไคติน และผงเบต้าไคติน 7 วัน ได้ $(GlcNAc)_2$ 78.9 และ 56.6% ตามลำดับ

Aeromonas hydrophila เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะเป็นเป็นแท่งยาว มีแฟลกเจลาที่ขั้ว เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ทั้งแบบมีอากาศและแบบไม่มีอากาศ สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 °C พบทั่วไปในน้ำจืด มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินได้ 2 ชนิด ที่สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิต่างกัน คือ *N*-acetylhexosaminidase ทำงานได้ที่อุณหภูมิ 37 °C ได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็น GlcNAc และ *N,N'*-diacetylchitobio-hydrolase ทำงานได้ที่อุณหภูมิ 50 °C ได้ $(GlcNAc)_2$

งานวิจัยนี้จะทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของ *Aeromonas hydrophila* MOK-1 จากดินในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และนำเอนไซม์ที่ผลิตได้มาทำการย่อยแอลฟาและเบต้าไคตินในสภาวะที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$ และเพิ่มขนาดการผลิตน้ำตาลแอมิโนโดยใช้ไคติน 100 กรัม ทำการแยกผลิตภัณฑ์ GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$ ให้บริสุทธิ์ ซึ่งความแตกต่างจากงานวิจัยของ Ju Hee Kuk และคณะจะอยู่ที่สายพันธุ์ของแบคทีเรีย สเกลในการผลิต และการทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์

1.1.2) การย่อยด้วยกรด

รายงานการเตรียม GlcNHCl จากการย่อยไคตินด้วยกรด ปรากฏขึ้นครั้งแรกตั้งแต่ปี 1946 โดย Purchase และ Braun[17] ได้ทำการย่อยไคตินขนาด 20 กรัม ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 116 กรัม ที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 150 นาที เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาเติมน้ำ 100 กรัม และผงถ่านกัมมันต์ (activated charcoal) 2 กรัม กวนที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมากรองเอาส่วนใสมาระเหยภายใต้ความดันต่ำที่อุณหภูมิ 50 °C ได้ GlcNHCl ซึ่งเมื่อล้างด้วยเอทานอล 95% และทำให้แห้งแล้วได้ผลิตภัณฑ์ 67.5% ที่มีความบริสุทธิ์ 95.31%

ในปี 1997 Novikov และ Ivanov[18] ได้เตรียม GlcNHCl จากการย่อยไคติน 100 กรัม ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 200 กรัม ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นตั้งสารละลายที่ได้จากการย่อยไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดผลึก GlcNHCl นำมากรองและล้างสีเหลืองของผลึกด้วยเอทานอล 194 กรัม ได้ผลิตภัณฑ์ 70% ซึ่งมีความบริสุทธิ์ 100% จากการไทเทรตด้วยเบส

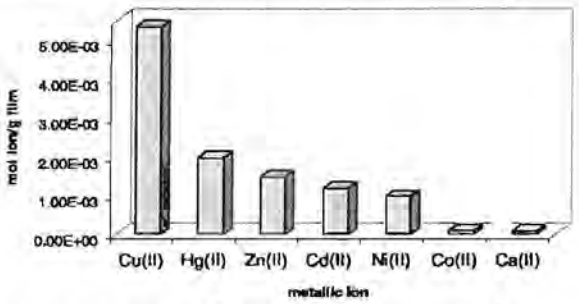
ในปี 2002 Gandhi และ Laidlhi[19] ได้เตรียม GlcNHCl จากการย่อยไคตินขนาด 20 mesh ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น โดยใช้สัดส่วนของไคตินต่อกรดเป็น 1:2 (W:W) โดยจะมีการให้ความร้อนแก่กรดจนกระทั่งอุณหภูมิถึง 65 °C แล้วจึงเติมไคติน และเพิ่มอุณหภูมิเป็น 95 °C หลังจากนั้น 75 นาที ตั้งสารละลายให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง กรองตะกอนที่เกิดขึ้น นำมาละลายน้ำและเติมผงถ่านกัมมันต์กรองเอาส่วนที่ใสมาระเหยจนแห้งเหลือผลึก GlcNHCl ซึ่งเมื่อล้างด้วยเอทานอล 95% ได้ผลิตภัณฑ์ 70% ที่มีความบริสุทธิ์ 100%

ในปี 2004 Novikov[20] ได้ศึกษาการย่อยไคตินและไคโตซานด้วยกรดไฮโรคลอริกเข้มข้น ที่อุณหภูมิ 50 °C และ 70 °C พบว่ากลไกของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพันธะ *N*-acetyl และพันธะ glycosidic ต่างกัน คือพันธะ *N*-acetyl เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยกลไก S_N2 ส่วนพันธะ glycosidic นั้นเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยกลไก S_N1 โดย rate-determining step เกิดจากการที่โมเลกุลน้ำเข้าทำที่ carbocation ซึ่งอัตราเร็วขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของน้ำ

จากการรายงานที่ได้อธิบายมาขั้นต้นยังไม่มีการใช้โซนิเคเตอร์มาช่วยในการย่อยไคตินด้วยกรดแต่อย่างใด เพราะฉะนั้นถ้าเราสามารถนำเอาโซนิเคเตอร์มาช่วยในการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไคตินด้วยกรดเพื่อใช้ในการเตรียม GlcNHCl หรือน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว GlcNAc เราคาดหวังว่าจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยไคตินด้วยกรดดังกล่าวได้อย่างมีนัยสำคัญ และหาสภาวะที่เหมาะสมที่ควบคุมการย่อยให้เกิดเป็น GlcNAc

1.1.3) การนำเอาผลิตภัณฑ์ที่ได้มาสังเคราะห์ต่อให้เป็นสารตรวจวัดทางชีวภาพ

ในปี 2006 กลุ่มวิจัย CERMAV-CNRS[21] ได้รวบรวมงามวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสมบัติต่างๆของไคโตซาน จากงานวิจัยที่เกี่ยวกับความสามารถของไคโตซาน ในการเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับไอออนของโลหะต่างๆ พบว่าหมู่อะมิโนบนสายโซ่ของไคโตซาน นั้นก่อให้เกิดอันตรกริยาอย่างจำเพาะเจาะจงกับไอออนของโลหะ โดยวัดจากปริมาณโมลไอออนของโลหะแต่ละชนิดที่ถูกดูดซับใน 1 กรัมของแผ่นฟิล์มไคโตซาน โดยพบว่าไคโตซานนั้นสามารถเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับ Cu^{2+} ได้ดีที่สุด และการคีเลตจะเกิดได้ดีเมื่อดีกรีของการเกิดดีอะเซทิเลชัน ของไคตินมีปริมาณสูง

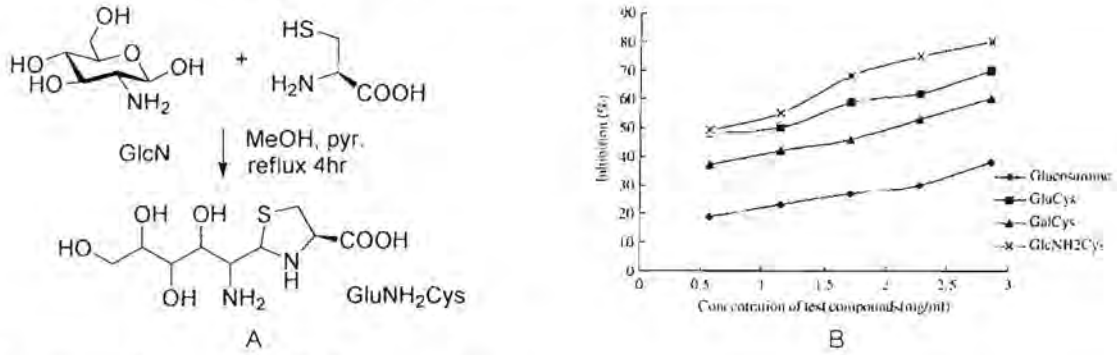


รูปที่ 2 ลำดับความจำเพาะเจาะจงของไอออนประจุบวกถูกดูดซับบนแผ่นฟิล์มของไคโตซาน

ในปี 2005 Shen และคณะ[22] ได้พัฒนาเทคนิคฟลูออเรสเซนต์แบบอ้อมเพื่อใช้ในการตรวจหา GlcN โดยเติมสารประกอบเชิงซ้อนของ copper-tryptophan ซึ่งไม่วาวแสงเข้าไปในสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์แล้วจะให้โมเลกุลของ L-tryptophan (L-Trp) เดี่ยวๆซึ่งเป็นสารที่สามารถวาวแสงได้ โดย GlcN จะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับ Cu^{2+} แทน การตรวจวัด GlcN จะทำได้โดยการวัดการเพิ่มขึ้นของสัญญาณการวาวแสงของ L-Trp ค่า Detection limit ในการตรวจหา GlcN ด้วยเทคนิคนี้อยู่ในช่วง 0.15 - 0.30 nmol ค่า pH ที่เหมาะสมที่ทำให้ L-Trp เปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์จากเมื่ออยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อน copper-tryptophan มากที่สุดคือที่ pH 9

ในปี 2006 Yan และคณะ[23] ได้สังเคราะห์ thiazolidine-4(R)-carboxylic acid (TCA) และ 2-glucosamine-TCA ($GlcNH_2Cys$) เพื่อศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเปรียบเทียบกับอนุพันธ์ของ TCA 2 ชนิดคือ 2-gluco-TCA และ 2-galacto-TCA จากการศึกษาพบว่า $GlcNH_2Cys$ มี

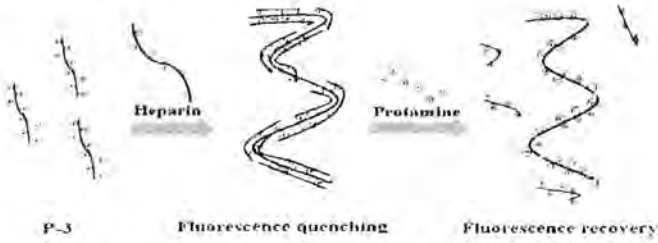
สมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยการจับตัวกับอนุมูลอิสระที่ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเช่น hydroxyl radical และ superoxide anion เป็นต้น, ป้องกันการเสื่อมสภาพของโมเลกุลใหญ่ๆ เช่น ดีออกซีไรโบส, โปรตีน, ลิพิด เป็นต้น, เพิ่มความจุของการเก็บสารต้านอนุมูลอิสระในสิ่งมีชีวิต, และสามารถยับยั้งกระบวนการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของลิพิดได้ ดังนั้น $GlcNH_2Cys$ จึงจัดเป็นสารที่มีแนวโน้มว่าจะสามารถป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระเนื่องจากสิ่งแปลกปลอมในสิ่งมีชีวิตได้



รูปที่ 3 A การสังเคราะห์อนุพันธ์ $GlcNH_2Cys$

B การเปรียบเทียบอัตราการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันโดยอนุพันธ์ TCA

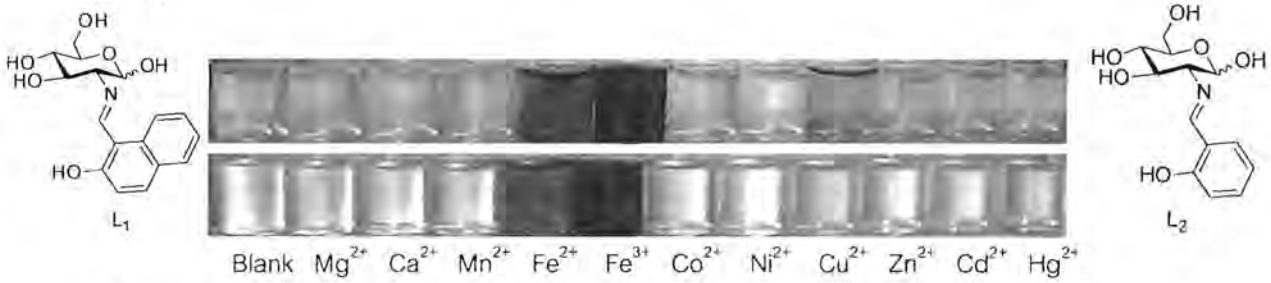
ในปี 2011 Chen และคณะ[24] ได้สังเคราะห์สารฟลูออเรสเซนต์ที่มีคอนจูเกตพอลิเมอร์โดยมีกลุ่มของ GlcNHCl เป็นหมู่ฟังก์ชันตลอดสายโซ่ (P_3) และคอนจูเกตพอลิเมอร์ที่มี GlcNHCl เพียงโมเลกุลเดียวเป็นหมู่ฟังก์ชันตลอดสายโซ่ (P_4) จากการวิจัยพบว่า P_3 มีความสามารถในการละลายน้ำและค่าประสิทธิภาพการคลายแสงฟลูออเรสเซนต์สูงกว่า P_4 ด้วยจำนวนหมู่ GlcNHCl ที่มากกว่าและแน่นอนจำนวนประจุบวกที่มากกว่าตามมา P_3 จึงเป็นสารฟลูออเรสเซนต์-พอลิอิเล็กโตรไลต์ ซึ่งสามารถเกิดอันตรกิริยากับ heparin โดยการเหนี่ยวนำกันทางประจุได้ดีกว่า นั้นสามารถเกิดอันตรกิริยาที่แข็งแรงกว่ากับ heparin เป็นผลให้เกิดการระงับสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของ P_3 เนื่องจากพอลิเมอร์เกิดการจับตัวกัน นอกจากนี้ยังสามารถเรียกสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของ P_3 กลับคืนมาได้โดยเติม protamine ซึ่งจะไปแยกพอลิเมอร์ออกจาก P_3



รูปที่ 6 การเกิดอันตรกิริยาของ P_3 กับ heparin และ P_3-heparin กับ protamine

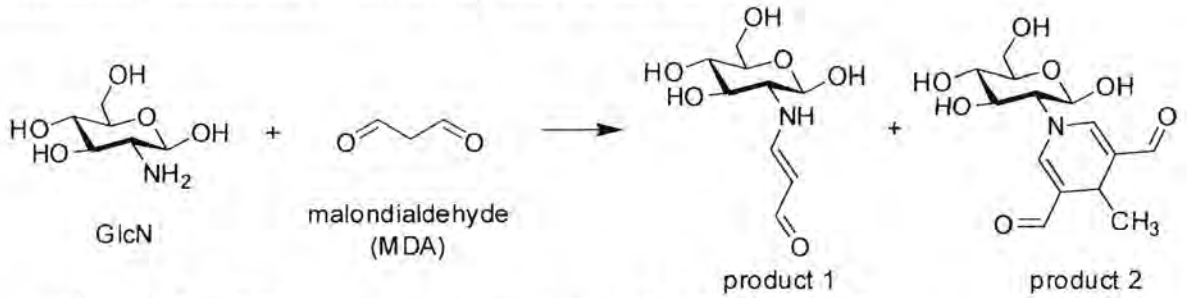
ในปี 2008 Mitra และคณะ[25] ได้สังเคราะห์ colorimetric chemo-sensor (L_1) ชนิดใหม่ขึ้น โดยการทำปฏิกิริยากันระหว่างกลูโคซามีน และ 2-hydroxy-1-naphthaldehyde เพื่อใช้ในการตรวจวัดไอออนของโลหะทรานซิชัน จากการศึกษาในการตรวจวัดไอออนของโลหะทั้งหมด 11 ชนิด คือ Mg^{2+}, Ca^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+} และ Hg^{2+} ผลที่ได้พบว่าเซ็นเซอร์ชนิดนี้สามารถเปลี่ยนสีในช่วงที่ตามองเห็นได้เมื่อตรวจพบไอออนของ Fe^{2+}, Fe^{3+} และ Cu^{2+} เมื่อใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย

แต่เมื่อใช้สารละลายบัฟเฟอร์ HEPES (pH 7.2) เป็นตัวทำละลายแล้วจะมีเพียงไอออนของ Fe^{3+} เท่านั้นที่สามารถทำให้เซ็นเซอร์ชนิดนี้เปลี่ยนสีได้ ซึ่งอธิบายได้ว่ามีสารประกอบเชิงซ้อนเกิดขึ้น ทำให้ความยาวคลื่นในการดูดกลืนแสงเปลี่ยนไป



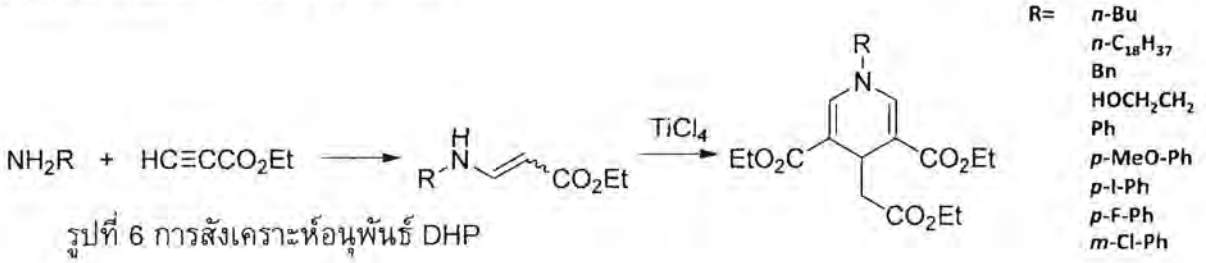
รูปที่ 4 การเปลี่ยนแปลงสีของคีโมเซนเซอร์ L_1 (แถวบน) และ L_2 (แถวล่าง) เมื่อเติมไอออนต่างๆ

ในปี 2007 Fang และคณะ[26] ได้นำ GlcN มาทำปฏิกิริยาโดยตรงกับ malondialdehyde (MDA) ในปริมาณที่มากเกินกว่าปกติ ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกัน 2 ชนิด คือ สารอีนามีน (product 1) ซึ่งไม่ให้สัญญาณการวาวแสง และสารวาวแสง 1,4-dihydropyridine (DHP; product 2) (Exc. 392 nm/ Ems. 454 nm) ซึ่งพบในกระแสโลหิตมนุษย์เมื่อความเข้มข้นสูงๆจะสามารถเปลี่ยนเป็น acetaldehyde ได้บางส่วนและเกิดปฏิกิริยากับ bovine serum albumin (BSA) เกิดเป็นสารที่เรียกว่า lipofuscin-like ฟลูออเรสเซนต์ เป็นเหตุให้เกิดการเสื่อมสภาพของโปรตีน จากการศึกษาทำให้เชื่อว่า GlcN ช่วยปกป้องการเสื่อมสภาพของโปรตีนได้โดยการทำปฏิกิริยากับ MDA แทน



รูปที่ 5 การเกิดปฏิกิริยาระหว่าง GlcN และ MDA จะได้ผลิตภัณฑ์ 2 ชนิด

ในปี 2010 Sirijindalert และคณะ[27] ได้สังเคราะห์อนุพันธ์ DHP จากการปิดวงของโมเลกุล β-amino acrylate ด้วย $TiCl_4$ ในสภาวะที่ไม่รุนแรง พบว่า DHP สามารถวาวแสงในช่วงที่ตามองเห็นที่ความยาวคลื่น 430-450 nm และขณะนี้ในกลุ่มวิจัยของเราได้นำอนุพันธ์ของ DHP มาพัฒนาให้เป็นฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์เพื่อใช้ในการตรวจวัดไอออนของโลหะต่างๆ โดยการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเปลี่ยนจากไดรเอสเทอร์เป็นไดรแอซิด



รูปที่ 6 การสังเคราะห์อนุพันธ์ DHP

1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ไคตินและไคโตซานเป็นสารที่มีมากในเปลือกกุ้ง กระดองปู และแกนหมึก ซึ่งเป็นของเหลือทิ้งที่ยังมีการนำมาใช้ประโยชน์ไม่มากเท่าที่ควร ถึงแม้ประเทศไทยได้มีการผลิตไคตินและไคโตซานจากของเหลือทิ้งเหล่านี้มาเป็นเวลาพอสมควร แต่การผลิตยังถือว่ามีปริมาณต่ำเมื่อเทียบกับปริมาณของเหลือทิ้ง นอกจากนี้ไคโตซานที่ผลิตได้มักจะส่งออกในรูปของวัตถุดิบราคาต่ำ การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการแปรรูปผลิตภัณฑ์จากไคตินให้มีมูลค่าสูงขึ้นจึงเป็นสิ่งจำเป็น

ไคติน-ไคโตซานที่ผลิตขึ้นภายในประเทศส่วนใหญ่จะส่งออกในรูปของวัตถุดิบราคาถูก (กิโลกรัมละ 400-1,000 บาท) ดังนั้นการวิจัยเพื่อหาวิธีการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงขึ้น จึงเป็นการช่วยเปลี่ยนของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็งให้กลายเป็นทรัพยากรที่มีค่าของประเทศ ซึ่งจัดได้ว่าเป็นการวิจัยเพื่อพัฒนาเทคโนโลยีที่มั่นคงและยั่งยืน GlcNAc ที่ขายในรูปสารเคมีปัจจุบันมีราคากว่า 57,700 บาท/กิโลกรัม ส่วนไดเมอร์ของไคตินคือ $(GlcNAc)_2$ มีราคาสูงกว่า 900,000 บาท/กรัม และโอลิโกเมอร์ที่มีขนาด 3-7 หน่วยนั้นมีราคาสูงขึ้นไปอีกตามลำดับ[28] ซึ่งสารเหล่านี้ใช้เป็นส่วนผสมหลักในยารักษาอาการเจ็บปวดตามข้อกระดูกสำหรับผู้ป่วยที่เป็นโรคออสทีโออาร์ไทรทีส (osteoarthritis)[29,30] โครงการวิจัยนี้จึงอาจถือได้ว่าเป็นจุดเริ่มต้นของการแปรรูปวัถดุดิบคือไคติน และไคโตซานให้เป็นสารเคมีโมเลกุลขนาดเล็กลงที่มีประโยชน์ในทางเภสัชกรรมที่มีราคาสูงขึ้น

ในงานวิจัยเบื้องต้นของเราพบว่าเอนไซม์จาก Burkoderia cepacia สามารถใช้ผลิต GlcNAc จากไคตินได้มากกว่า 90% ในเวลา 1 วัน โดยอัตราค่าใช้จ่ายในการผลิตในระดับห้องปฏิบัติการจะอยู่ที่ประมาณ 800-1,500 บาท/กิโลกรัม และถ้าขยายขนาดการผลิตก็จะสามารถลดราคาการผลิตต่อกิโลกรัมลงอย่างมีนัยสำคัญได้อีก อย่างไรก็ตามจุดเด่นของการวิจัยนี้ไม่ได้อยู่ที่ต้นทุนการผลิตต่ำแต่เพียงอย่างเดียว แต่อยู่ที่ความปลอดภัยและความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมที่มีมากกว่าวิธีการผลิตโดยใช้สารเคมีซึ่งมีกระบวนการทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ที่ยุ่งยากซับซ้อน

1.3 วัตถุประสงค์

1.3.1 ศึกษาการย่อยไคตินด้วยเอนไซม์เพื่อเตรียม GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$ รวมทั้งการย่อยไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริกเพื่อเตรียม GlcNHCl และ ศึกษาหาวิธีแยกผลิตภัณฑ์ทั้งสามดังกล่าว ออกจากของผสมในปฏิกิริยา

1.3.2 นำเอาผลิตภัณฑ์ที่ได้มาประยุกต์ใช้ให้เป็นประโยชน์ด้วยการนำมาสังเคราะห์ต่อให้เป็นสาร Glc-DHP เป็นสารตรวจวัดทางชีวภาพ

1.4 ขอบเขตการวิจัย

ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย่อยไคตินให้เป็นผลิตภัณฑ์ GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$ พร้อมทั้งการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย่อยไคตินให้เป็นผลิตภัณฑ์ GlcNHCl ด้วยกรดไฮโดรคลอริกโดยมีคลื่นอัลตราโซนิกไมโครเวฟเป็นตัวช่วย รวมไปถึงการนำเอา GlcNHCl ที่ได้ไปสังเคราะห์เพิ่มเติมเพื่อให้ได้สาร Glc-DHP เพื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารตรวจวัดทางชีวภาพต่อไป

1.5 วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี และ/หรือแนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

-แบ่งแนวทางวิธีดำเนินการวิจัยเป็นสองทางคือ

1.5.1) การย่อยด้วยเอนไซม์ การย่อยด้วยกรด

1.5.2) การนำเอาผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปประยุกต์ใช้เป็นสารตรวจวัดทางชีวภาพ

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลงานตีพิมพ์ลงในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์คือภาคอุตสาหกรรมทางด้านการแปรรูปอาหารทะเล

2. เนื้อเรื่อง

น้ำตาล GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$ เป็นคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลเล็กที่ได้จากการตัดสายไคตินและไคโตซานซึ่งมีความสำคัญทางชีวภาพสำหรับทั้งสัตว์และพืช จึงได้มีการศึกษาและนำไปประยุกต์ใช้ทั้งทางด้านเภสัชกรรมและเกษตรกรรม เช่น ช่วยรักษาอาการเจ็บปวดตามข้อกระดูกสำหรับผู้ป่วยที่เป็นโรคออสทีโออาร์ไทรทีสนี้[29,30] ช่วยทำให้ภูมิคุ้มกันภายในร่างกายมีประสิทธิภาพมากขึ้น เป็นสารที่ช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์หลายประเภทในร่างกายรวมทั้งยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้องอกภายในร่างกาย และต่อต้านศัตรูพืชที่มารบกวนได้อีกด้วย น้ำตาล GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$ ยังใช้สังเคราะห์ต่อเป็นอนุพันธ์ต่างๆ ของยาเพราะเชื่อว่าจะทำให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากขึ้น

ในการตัดสายไคตินและไคโตซานเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เหล่านี้ สามารถทำได้ทั้งวิธีทางเคมี และการใช้เอนไซม์ แต่การใช้เอนไซม์นั้นจะมีข้อได้เปรียบมากกว่าวิธีการทางเคมีหลายประการ เช่น การควบคุมปฏิกิริยานั้นทำได้ค่อนข้างง่าย ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ที่อุณหภูมิและความดันปกติมีความจำเพาะต่อซับสเตรทสูงและมีปฏิกิริยาข้างเคียงน้อย ในหลายปีที่ผ่านมามีผู้วิจัยศึกษาฤทธิ์ในการย่อยไคตินของเอนไซม์หลายชนิดไม่ว่าจะเป็นเอนไซม์จากรา แบคทีเรียหรือเอนไซม์จากพืช ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้มีฤทธิ์ในการย่อยที่แตกต่างกันออกไปและได้ผลิตภัณฑ์ทั้งที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ขนาดต่างๆ

มีคณะผู้วิจัยหลายคณะได้ศึกษาถึงการผลิต GlcNAc และไคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากไคติน เนื่องจากสารเหล่านี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ทั้งทางการแพทย์ เภสัชกรรมและเกษตรกรรม แต่ในปัจจุบันการผลิต GlcNAc และไคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ได้มาจากการนำไคตินและไคโตซานมาทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยกรดหรือด่าง แต่กระบวนการเหล่านี้ต้องอาศัยสภาวะที่รุนแรง เช่น อุณหภูมิสูง ความดันสูง และปฏิกิริยามักจะมีความจำเพาะต่ำ ให้เปอร์เซ็นต์ของผลิตภัณฑ์น้อย อีกทั้งยังต้องมีกระบวนการในการกำจัดกรดหรือสารที่ใช้เร่งปฏิกิริยาก่อนนำมาใช้ และของเสียจากกระบวนการผลิตนี้สามารถส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมได้ ในหลายปีที่ผ่านมาได้มีการศึกษาการนำเอนไซม์มาใช้ตัดสายไคตินและไคโตซาน เพราะสามารถทำได้ง่าย ภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาการตัดได้ที่อุณหภูมิต่ำ นอกจากนี้ยังสามารถควบคุมการเกิดปฏิกิริยาได้ง่าย ให้เปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการสูง มีของเสียที่เกิดจากการผลิตต่ำและมีความเป็นพิษน้อย

กลุ่มวิจัยของเราเองก็ได้ทำการศึกษาทางด้านนี้มาพอสมควรและเคยได้รับทุนสนับสนุนจากทางมูลนิธิโทเร และปัจจุบันจากสถาบันวิจัยโลหะและวัสดุแห่งชาติ มีผลงานตีพิมพ์ในระดับห้องปฏิบัติทางด้านนี้ 4 บทความ เราจึงมีความสนใจที่จะขยายขอบเขตและพัฒนางานวิจัยนี้ให้สามารถพัฒนาไปสู่

การใช้จริงในอุตสาหกรรมได้ในที่สุด รวมไปถึงการนำเอาผลิตภัณฑ์โมโนแซ็คคาไรด์ที่ได้มาสังเคราะห์ต่อเพิ่มเติมเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ต่อเช่น สารตรวจจับเป็นต้น

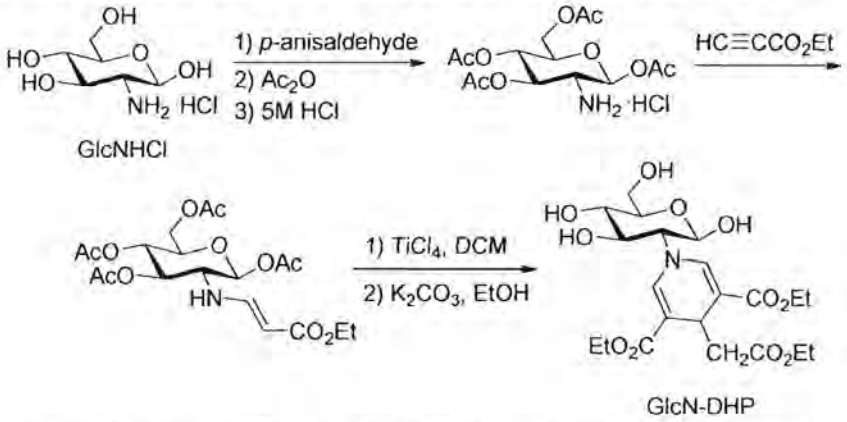
2.1 วิธีการดำเนินการวิจัย (Materials & method)

2.1.1) การย่อยด้วยเอนไซม์ และการย่อยด้วยกรดทั้งแบบใช้คลื่นอัลตราโซนิคช่วยเร่งปฏิกิริยา และแบบใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยเร่งปฏิกิริยา

a. ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
b. วิเคราะห์สรุปผล และเขียนรายงาน และเตรียมบทความเพื่อลงตีพิมพ์ หรือจดสิทธิบัตร

2.2.2) การนำเอาผลิตภัณฑ์ที่ได้มาประยุกต์ใช้

a. ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
b. ศึกษาเอกสารผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง จัดเตรียมอุปกรณ์และสารเคมีที่จำเป็น
c. สังเคราะห์สารอนุพันธ์ GlcN ซึ่งหมู่อะมิโนได้รับการดัดแปลงเป็นหน่วย DHP โดยจะต้องเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซี (-OH) ของ GlcN ซึ่งเป็นหมู่ที่ช่วยในการละลายน้ำให้เป็นหมู่เอสเทอร์ (-OAc)[31] ที่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์เสียก่อน (สมการที่ 1)



สมการที่ 1 แผนการสังเคราะห์สารเป้าหมาย Glc-DHP จาก GlcNHCl

d. พิสูจน์เอกลักษณ์ของโมเลกุลที่สังเคราะห์ได้ ด้วยเทคนิคสเปกโตรสโกปี (^{1}H NMR, ^{13}C NMR และ IR) และเทคนิค MS
e. ศึกษาสมบัติการเรืองแสงและดูดกลืนแสงด้วย UV-vis spectrophotometer และ spectrofluorometer โดยหา Absorption wavelength (λ_{max}), Emission wavelength (λ_{max}), Molar absorptivity (ε_{max}), และ Quantum yield (ϕ)
f. ศึกษาการระงับการวาวแสงด้วยสารชีวภาพต่างๆ
g. วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผลการทดลอง และเขียนวิทยานิพนธ์
h. วิเคราะห์สรุปผล และเตรียมเขียนบทความเพื่อลงตีพิมพ์ หรือจดสิทธิบัตร

สถานที่ทำการทดลอง ณ ชั้น 13 ตึกมหามกุฏ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 ผลการวิจัย

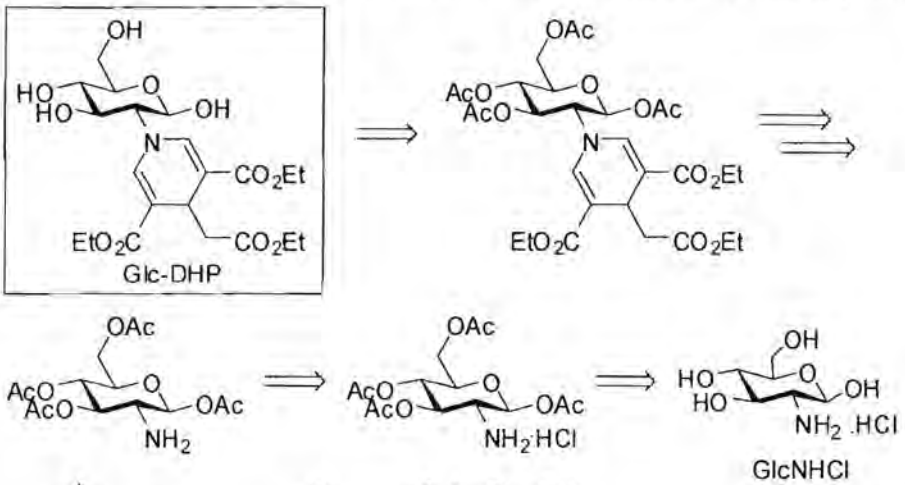
<u>สรุปรายงานวิจัยที่ได้ดำเนินแล้วเสร็จในปี 2554</u>

การย่อยไคตินด้วยเอนไซม์ และกรด

ได้ศึกษาการเตรียมสารเคมีและวัตถุดิบที่จำเป็นโดยทำการเตรียมแกนปลาหมึกที่บดแล้วมาเตรียมคอลลอยด์ไคตินโดยทำการเตรียมในสภาวะที่เป็นกรดจะได้สเลอร์รีสีขาว นำคอลลอยด์ไคตินที่เตรียมมาหา activity ของเอนไซม์จากรา *Aspergillus fumigatus* และโคลนแบคทีเรีย *Serratia sp.* ซึ่งผลเราสามารถสรุปผลการวิจัยได้ว่าการย่อยไคตินจากแกนหมึกด้วยเอนไซม์จากรา *Aspergillus fumigatus* (4 U/1 g ไคติน) สามารถย่อยไคติน (3% w/v) ที่อุณหภูมิ 40 °C pH 3 เป็นเวลา 2 วัน ได้ GlcNAc ด้วยเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ 72% การย่อยไคติน (3% w/v) ด้วยเอนไซม์จากโคลนแบคทีเรีย *Serratia sp.* (1 U/1 g ไคติน) ที่อุณหภูมิ 37 °C pH 6 เป็นเวลา 6 วันให้ $(GlcNAc)_2$ และ GlcNAc ด้วยเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ 43% และ 2.6% ตามลำดับ สามารถทำให้ GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$ บริสุทธิ์ได้โดยการตกตะกอนด้วยเอทานอล ตามด้วยการกำจัดสีด้วยคอลัมน์ที่มีผงถ่านกัมมันต์ให้ GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$ ที่บริสุทธิ์ด้วยเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 64% และ 40% ตามลำดับ ส่วนการย่อยไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นมี 2 กรรมวิธีคือที่ใช้โซนิเคเตอร์เป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยา และที่ใช้ไมโครเวฟเป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยานั้น ให้ผลสำเร็จที่ดีน่าพึงพอใจโดยที่กรรมวิธีแรกสามารถปรับปรุงขบวนการย่อยให้ดีขึ้นและสามารถเลือกสภาวะในการสังเคราะห์โมโนเมอร์และไดเมอร์ออกได้อย่างโดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาการย่อยที่อุณหภูมิ 40 °C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ต่ำกว่าอุณหภูมิการย่อยทั่วๆไปให้ผลที่ดีอย่างมีนัยสำคัญ ในส่วนผลของกรรมวิธีที่ 2 นั้นสามารถย่นระยะเวลาในการย่อยให้เหลือเพียง 12 นาที ซึ่งจากกรรมวิธีดั้งเดิมต้องใช้เวลากว่า 1.5~2 ชั่วโมง

การนำเอาเกลือ GlcNHCl ที่สังเคราะห์ได้ไปประยุกต์ใช้เป็นสารตรวจวัดทางชีวภาพ

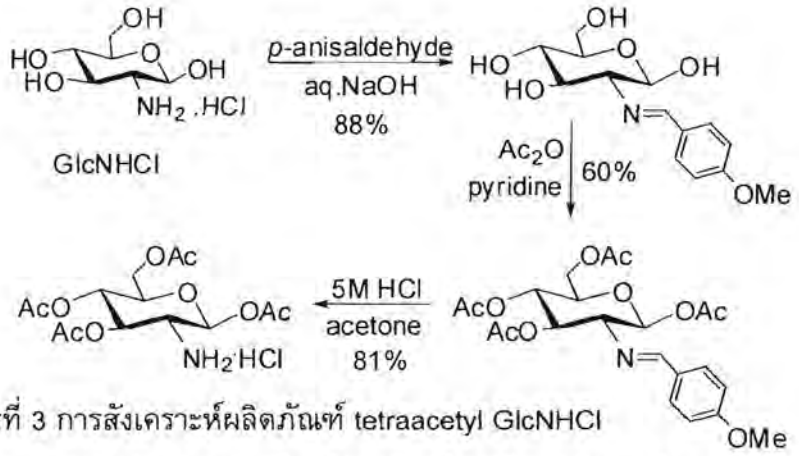
เพื่อสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่มีหมู่กลูโคซามีนต่อกับ 1,4-ไดไฮโดรพิริดีน (Glc-DHP) ดังรูปที่ตีกรอบสี่เหลี่ยม เราจึงวางแผนการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์เป้าหมาย Glc-DHP ตามสมการที่ 1 ข้างล่าง โดยเริ่มจากการนำเอาเกลือ GlcNHCl มาทำปฏิกิริยาใส่หมู่อะเซทิล หลังจากทรีทด้วยเบสให้หมู่เกลือไฮโดรคลอไรด์เป็นหมู่เอมีนเพื่อนำมาสร้าง 1,4-ไดไฮโดรพิริดีนแล้วดีโปรเท็คหมู่อะซิทิลออกเป็นอันเสร็จสิ้นการสังเคราะห์ ได้ผลิตภัณฑ์เป้าหมาย Glc-DHP ที่คาดว่าจะเรืองแสงและนำเอาไปประยุกต์ใช้ได้



สมการที่ 2 การวางแผนการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์เป้าหมาย Glc-DHP จาก GlcNHCl

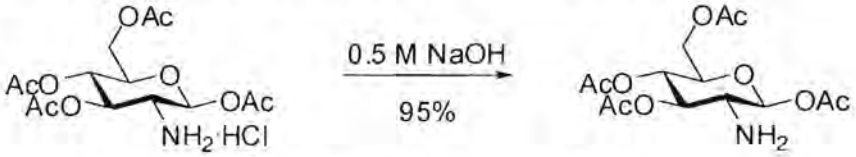
การนำเอาเกลือ GlcNHCl มาทำปฏิกิริยาใส่หมู่อะเซทิล ได้กระทำปฏิกิริยาตามรายงานที่ถูกเผยแพร่วารสารวิชาการในระดับนานาชาติแล้ว ขั้นตอนแรกคือการปกป้องหมู่เกลืออะมิโนด้วยการทำปฏิกิริยาระหว่างเกลือ GlcNHCl และอะนิซัลดีไฮด์จากนั้นใส่หมู่ปกป้องอะซิทิลด้วยการทำปฏิกิริยากับอะซิติกแอนไฮดรายด์โดยมีเบสอ่อน, พิริดีน, เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจากนั้นทำการกำจัดหมู่ปกป้องที่อยู่ในรูปอิมีนด้วยกรดในตัวทำละลายอะซิโตน ซึ่งเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ที่ได้ของขั้นตอนแรก, ขั้นตอนที่ 2 และขั้นตอนที่ 3 เท่ากับ 88%, 60%, และ 81% ตามลำดับ ซึ่งเป็นที่น่าพอใจเมื่อเทียบกับเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ที่ได้รายงานเอาไว้[31,32] (72%, 88%, และ 89%)

ในรายละเอียด ขั้นตอนป้องกันหมู่อะมิโนด้วยอะนิซัลดีไฮด์นั้นพบว่าการใช้ NaOH มากกว่า 1 equiv. เล็กน้อยเพื่อเป็นตัวทำละลายและเพื่อให้หมู่อะมิโนมีความเป็นนิวคลีโอไฟล์ที่ดี ในขั้นตอนปฏิกิริยาอะเซทิเลชันนั้นถึงแม้ว่าจะพยายามปรับปรุงสภาวะต่างๆแล้วก็ตาม เปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ที่ได้ก็ยังต่ำกว่าผลที่มีรายงานไว้ก่อนหน้า[31,32] ซึ่งสาเหตุอาจจะเป็นเพราะอะเซติดแอนไฮดรายด์ที่อาจจะควบคุมปฏิกิริยาได้ยากจึงเป็นสาเหตุที่ทำให้เปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ต่ำ ขั้นตอนการกำจัดอะนิซัลดีไฮด์ออกพบว่าเมื่อนำสารตั้งต้นสามารถละลายด้วยอะซีโตนที่อุณหภูมิ 40 °C ได้ หลังจากเติมกรดไฮโดรคลอริกแล้วทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องผลิตภัณฑ์จะเริ่มตกตะกอนออกมาจึงต้องเพิ่มตัวทำละลายอีเทอร์ลงไปคนให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปแช่เย็นประมาณหนึ่งคืนจะช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ได้



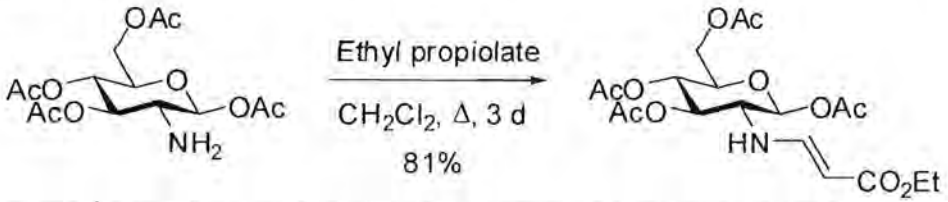
สมการที่ 3 การสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ tetraacetyl GlcNHCl

การเติมเบส (0.5M NaOH) ลงไปเพื่อทำให้เพื่อเปลี่ยนให้หมู่เกลือควอเตอนารีแอมโมเนียมกลายเป็นหมู่อะมิโน ถ้าใช้เบสที่อ่อนกว่าเช่น พิริดีน แล้วจะทำให้ปฏิกิริยาขั้นถัดไปซึ่งให้เอนามีนเป็นผลิตภัณฑ์เกิดได้ไม่สมบูรณ์ วิธีการคือนำเอาสารตั้งต้นที่เป็นเกลือมาเติมไดคลอโรมีเทนแล้วทำให้เป็นกลางด้วยการเติม 0.5M NaOH โดยที่เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไป ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะละลายอยู่ในชั้นสารละลายอินทรีย์ (ไดคลอโรมีเทน) ซึ่งจะสังเกตได้จากการที่สารตั้งต้นที่เป็นเกลือจะค่อยๆละลายหายไป และในที่สุดสารละลายปฏิกิริยาจะใสไม่มีสารตั้งต้นหลงเหลือ



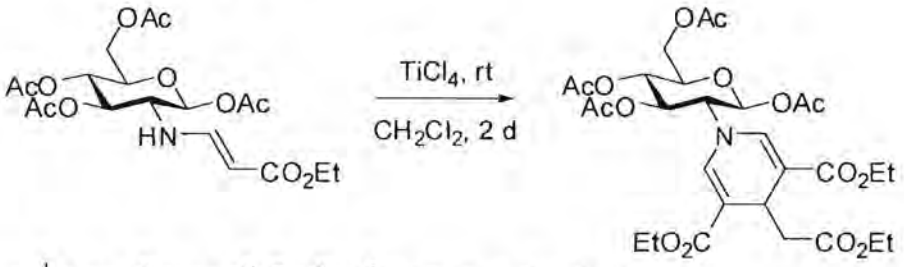
สมการที่ 4 การสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ tetraacetyl GlcN

จากนั้นนำไพรมารีเอมีนที่ได้มาทำปฏิกิริยากับ ethyl propiolate 1 eq. ที่อุหห้องเป็นเวลา 1 คืน โดยมีไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลาย แต่จากการตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC พบว่าผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นน้อย และยังมีสารตั้งต้นหลงเหลืออยู่อีกมาก จึงได้ลองเพิ่มปริมาณ ethyl propiolate ในการทำปฏิกิริยาเป็น 4.7 eq. แล้วให้ความร้อนเป็นเวลา 4 วัน พบว่าจะทำให้ได้เปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ร้อยละ 81 ซึ่งเป็นที่น่าพอใจ



สมการที่ 5 การสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ tetraacetyl GlcNHCH=CHCO$_2$Et

เมื่อนำสาร enamine ที่ได้มาทำปฏิกิริยาปิดวง โดยคาดหวังว่าการเติม ethyl propiolate จะสามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ได้ จึงได้มีการเปลี่ยนปริมาณ ethyl propiolate และ $TiCl_4$ ที่เติมลงในระบบ (ตารางที่ 1) พบว่าปริมาณ ethyl propiolate ไม่มีผลต่อการเพิ่มเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ แต่ปริมาณ $TiCl_4$ ที่เปลี่ยนไปมีผลต่อเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์คือถ้ามากเกินไปก็อาจทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้บางส่วนเกิดการสลายตัวได้ และเมื่อเติม $TiCl_4$ 0.3 eq. จะให้เปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์สูงสุด นอกจากนั้นตัวทำละลายที่ใช้ก็ต้องแห้งไม่มีน้ำเจือปนอยู่ ไดคลอโรมีเทนที่ใช้ในปฏิกิริยาจะผ่านการกลั่น และเก็บในภาชนะที่มี molecular sieve ก่อนนำมาใช้ทุกครั้ง

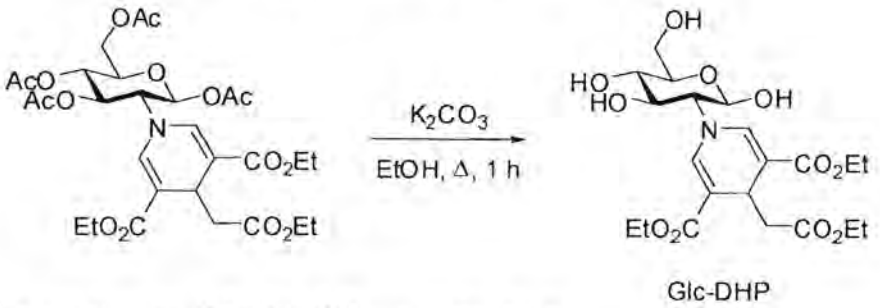


สมการที่ 6 การสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ tetraacetyl Glc-DHP

ตารางที่ 1 การศึกษาสังเคราะห์ tetraacetyl Glc-DHP

Entry	Amount of $TiCl_4$ (equiv.)	Ethyl propiolate (equiv.)	% Yield
1	1	-	Trace
2	0.8	-	12
3	0.8	2	20
4	0.5	0.2	30
5	0.5	0.4	15
6	0.5	-	28
7	0.3	-	35
8	0.3	0.2	30

ปฏิกิริยาดีอะเซทิเลชันของ tetraacetyl Glc-DHP กำลังได้รับการศึกษาอยู่โดยสภาวะปฏิกิริยานี้ใช้โปแตสเซียมคาร์บอเนตและมีเอทานอลเป็นตัวทำละลายให้ความร้อนที่ 70 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามที่มีรายงานไว้[32] อย่างไรก็ตามปฏิกิริยายังไม่สามารถดีอะเซทิเลตหมู่อะซิทิลได้ทั้งหมดจึงเกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงปนอยู่บ้าง ส่งผลให้การแยกผลิตภัณฑ์เป้าหมายให้บริสุทธิ์มีปัญหา ซึ่งปฏิกิริยานี้กำลังอยู่ในช่วงหาสภาวะปฏิกิริยาที่เหมาะสม พร้อมไปกับการหาวิธีแยกสารผสม



Glc-DHP

สมการที่ 7 การสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์เป้าหมาย Glc-DHP

3. วิจารณ์ผลการทดลอง

ปัจจุบันในส่วนของการย่อยไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นกรรมวิธีที่ 1 ที่ใช้โซนิเคเตอร์เป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยา และกรรมวิธีที่ 1 ที่ใช้ไมโครเวฟเป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยานั้น ให้ผลสำเร็จระดับหนึ่ง โดยที่กรรมวิธีแรกสามารถปรับปรุงขบวนการการทำงานของการย่อยให้ดีขึ้นและสามารถเลือกสภาวะในการสังเคราะห์โมโนเมอร์และไดเมอร์ออกได้อย่างโดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาการย่อยที่อุณหภูมิ 40 °C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ต่ำกว่าอุณหภูมิการย่อยทั่วๆไปให้ผลที่ดีอย่างมีนัยสำคัญ ในส่วนผลของกรรมวิธีที่ 2 นั้นสามารถย่นระยะเวลาในการย่อยให้เหลือเพียง 12 นาที ซึ่งจากกรรมวิธีดั้งเดิมใช้เวลากว่า 2 ชั่วโมง

ในส่วนของการนำไปประยุกต์ใช้ให้เป็นประโยชน์รวมทั้งเพิ่มความเป็นไปได้ในการนำไปตีพิมพ์เป็นบทความทางวิชาการในระดับนานาชาตินั้นกำลังอยู่ในขณะพัฒนากรรมวิธีการสังเคราะห์อนุพันธ์กลูโคซามีนที่เรืองแสงได้ ซึ่งในรายละเอียดคือยังอยู่ในขั้นสุดท้ายคือการกำจัดหมู่อะซิทิลออกเพื่อให้ได้อนุพันธ์กลูโคซามีนที่ละลายน้ำและเพื่อนำเอาไปทดลองใช้เป็นสารตรวจวัดทางชีวภาพ หรือใช้ในการตรวจวัดสิ่งเจือปนในน้ำต่อไป

4. สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป

ผลในการย่อยโดยใช้โซนิเคเตอร์ และไมโครเวฟเป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยานั้น ได้รวบรวมผลงานและนำไปตีพิมพ์เป็นบทความทางวิชาการในระดับนานาชาติแล้ว และเป็นที่น่าดีใจที่เราได้รับการตอบรับจากวารสารวิชาการระดับนานาชาติในการตีพิมพ์ลงวารสารอย่างเป็นทางการแล้วโดยรายละเอียดได้แนบมาพร้อมกับรายงานฉบับนี้แล้ว

ในส่วนการพัฒนากรรมวิธีการสังเคราะห์อนุพันธ์กลูโคซามีนเรืองแสงนั้นกำลังอยู่ในระหว่างการพัฒนาซึ่งจะทำการพัฒนาให้แล้วเสร็จให้เร็วที่สุดและนำเอาไปประยุกต์ใช้เป็นสารตรวจวัดทางชีวภาพให้ประโยชน์ต่อไป

บรรณานุกรม

1) Shahidi, F.; Kamil, J.; Arachchi, V.; Jeon, Y. J., "Food applications of chitin and chitosan", *Trends in Food Science & Technology*, **1999**, *10*, 37-51.

2) Rupley, J. A., "The hydrolysis of chitin by concentrated hydrochloric acid, and the preparation of low-molecular-weight substrates for lysozyme", *Biochem. Biophys. Acta*, **1964**, *83*, 245-255.

3) Izume, M.; Nagae, S.; Kawagishi, H.; Ohtakara, A., "Preparation of *N*-acetylchitooligosaccharides from lysozymic hydrolysates of partially *N*-acetylated chitosans", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1992**, *56*, 1327-1328.

4) Muzzarelli, R. A. A.; Peter, M. G., *Chitin Handbook, Atec Edizioni: Grottammare AP*, Italy, **1997**, 147-151.

5) Izume, M.; Ohtakara, A., "Preparation of D-glucosamine oligosaccharides by enzymatic hydrolysis of chitosan", Agric. *Biol. Chem.*, **1987**, *51*(4), 1189-1191.

6) Rattanakit, N.; Yano, S.; Wakayama, M.; Plikomol A.; Tachiki, T.; "Sacharification of Chitin Using Solid-State Culture of *Aspergillus* sp S1-13 with Shellfish Waste as a Substrate", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **2003**, *95*(4), 391-396.

7) Auyunirudronkul, K.; "Production of amino sugar from squid pen chitin by fungal biocatalyst" A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Petrochemistry and Polymer Science Faculty of Science Chulalongkorn University Academic Year **2003**, ISBN 974-17-3724-6.

8) Binod, P.; Pusztahelyi, T.; Nagy, V.; Sandhya, C.; Szakács, G.; Pócsi, I.; Pandey, A.; "Production and purification of extracellular chitinases from *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 under solid-state fermentation", *Enzyme and Microbial Technology*, **2005**, *36*, 880-887.

9) Ramírez, C. L.; Marín-Cervantes, M. C.; Huerta, S.; Revah, S.; Shirai, K.; "Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicillium fungicola* chitinases", *Process Biochemistry*, **2005**, *41*, 1106-1110.

10) Patidar, P.; Agrawal, D.; Banerjee, T.; Patil, S., "Optimization of process parameters for chitinase production by soil isolates of *Penicillium chrysogenum* under solid substrate fermentation", *Process Biochemistry*, **2005**, *40*, 2962–2967.

11) Reguera, G.; Leschine, S., "Chitin degradation by cellulolytic anaerobes and facultative aerobes from soils and sediments", *FEMS Microbiology Letters*, **2001**, *204*, 367-374.

12) Pichyangkura, R.; Kudan, S.; Kuttiyawong, K.; Sukwattanasinitt, M.; Aiba, S., "Quantitative production of 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose from crystalline chitin by bacterial chitinase", *Carbohydrate Research*, **2002**, *337*, 557–559.

13) Ramírez, G.; Avelizapa, R.; Avelizapa, R.; Camarillo, C., "Colloidal chitin stained with Remazol Brilliant Blue R® a useful substrate to select chitinolytic microorganisims and to evaluate chitinase", *Microbiological Methods*, **2004**, *56*, 213-219.

14) Yuli, P.; Suhartono, M. T.; Rukayadi, Y.; Hwang, J. K.; Pyun, Y. R., "Characteristics of thermostable chitinase enzymes from the Indonesian *Bacillus* sp. 13.26", *Enzyme and Microbial Technology*, **2004**, *35*, 147-153.

I2578391

15) Kuk, J. H.; Jung, W. J.; Jo, G. H.; Ahn, J. S.; Kim, K. Y.; Park, R. D., "Selective preparation of *N*-acetyl-D-glucosamine and *N,N'*-diacetylchitobiose from chitin using a crude enzyme preparation from *Aeromonas* sp.", *Biotechnology Letters*, **2004**, *27*, 7-11.

16) Kuk, J. H.; Jung, W. J.; Jo, G. H.; Ahn, J. S.; Kim, K. Y.; Park, R. D., "Production of *N,N'*-diacetylchitobiose from chitin using temperature-sensitive chitinolytic enzyme preparations of *Aeromonas* sp. GJ-18", *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **2005**, *22*, 135-139.

17) Purchase, R.; Braun, E., "D-Glucosamine Hydrochloride", *Org. Syn.*, **1946**, *26*, 36-37.

18) Novikov, V.Yu.; et al., "Synthesis of (+)-glucosamine hydrochloride", *Russian Journal of Applied Chemistry*, **1997**, 70, 1467-1470.

19) Gandhi, N.; Laidler, J. K., "Preparation of glucosamine hydrochloride", *US patent 6,486,307 B1*, **2002**.

20) Nivikov V. Y., "Acid hydrolysis of chitin and chitosan", *Russian Journal of Applied Chemistry*, **2004**, 77, 484-487.

21) CERMAV-CNRS, affiliated with Joseph Fourier University. "Chitin and chitosan: Properties and applications" *Prog. Polym. Sci.*, **2006**, *31*, 603–632.

22) Shen, X.; Yang, M.; Tomellini, A. S. . "Indirect fluorescence detection of amino sugars with the use of copper complexes of tryptophan and its analogues following highperformance liquid chromatographic separation" *Journal of Chromatography A*, **2005**, *1072*, 273–277.

23) Yan, Y.; Wan, L.; Hai, S. "Antioxidative properties of a newly synthesized 2-glucosaminethiazolidine-4(R)-carboxylic acid ($GlcNH_2Cys$) in mice" *Nutrition Research*, **2006**, *26*, 369– 377.

24) Chen, Q.; Cui, Y.; Cao, J.; Han, B. "Water-soluble conjugated polyelectrolyte with pendant glycocluster: Synthesis and its interaction with heparin" *Polymer*, **2011**, *52*, 383-390.

25) Mitra, A.; Ramanujam, B.; Rao, P. C. "1-(D-Glucopyranosyl-20-deoxy-20-iminomethyl)-2-hydroxynaphthalene as chemo-sensor for Fe^{3+} in aqueous HEPES buffer based on colour changes observable with the naked eye" *Tetrahedron Lett.*, **2009**, *50*, 776–780.

26) Fang, C.; Peng, M.; Li, G.; Tian, J.; Yin, D. "New Functions of Glucosamine as a Scavenger of the Lipid Peroxidation Product Malondialdehyde" *Chem. Res. Toxicol.*, **2007**, *20*, 947-953.

27) Sirijindalert, T.; Hansuthirakul, K.; Rashatasakhon, P.; Sukwattanasinitt, M.; Ajavakom, A. "Novel synthetic route to 1,4-dihydropyridines from β-amino acrylates by using titanium(IV) chloride under facile conditions" *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 5161-5167.

28) Sigma-Aldrich "Biochemicals and Reagents for Life Science Research" Catalog **2004-2005**, p.45 and p.625.

29) Shikhman, A. R.; Kuhn, K.; Alaaeddine, N.; Lotz, M., "*N*-Acetylglucosamine Prevents IL-1 Beta-Mediated Activation of Human Chondrocytes", *J. Immunology*, **2001**, *166*, 5155-5160.

30) *Ishiguro, N., Kojima, T., & Poole, A. R., "Mechanism of cartilage destruction in osteoarthritis", Nagoya Journal of Medical Science*, **2002**, *65*, 73-84.

31) Myszka, H.; Bednarczyk, D.; Najder, M.; Kaca, W. "Synthesis and induction of apoptosis in B cell chronic leukemia bydiosgenyl 2-amino-2-deoxy-β-D-glucopyranoside hydrochloride and its derivatives" *Carbohydrate Research*, **2003**, *338*, 133–141.

32) Yang, Y.; Yu, B. "*N*-Dimethylphosphoryl-protected glucosamine trichloroacetamidate as an effective glycosylation donor" *Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48*, 4557-4560.

33) Chen, J.; Yu, B. "Effective protection of the *N*-sulfate of glucosamine derivatives with the 2,2,2-trichloroethyl group" Tetrahedron *Lett.*, **2008**, *49*, 1682-1685.

ประวัตินักวิจัยและคณะ

1. หัวหน้าโครงการ

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาย นาง นางสาว ยศ ดร.มงคล สุขวัฒนาสินิทธ์
   (ภาษาอังกฤษ) Mr, Mrs, Miss, Rank Dr.Mongkol Sukwattanasinitt
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน
   3101800407665
3. ตำแหน่งปัจจุบัน
   ตำแหน่งทางวิชาการ (ศ./รศ./ผศ./อื่นๆ) (โปรดระบุ) รองศาสตราจารย์
4. หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail
   ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   ที่อยู่ ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330
   โทรศัพท์ 0-2218-7620
   โทรสาร 0-2218-7598
   E-mail smongkol@chula.ac.th
5. ประวัติการศึกษา
   ปริญญาตรี พ.ศ. 2534 สาขาวิชา เคมี จาก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   ปริญญาเอก พ.ศ. 2539 สาขาวิชา Organic Chemistry จาก Iowa State University, USA
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
   Polymer Chemistry
   Supramolecular Chemistry
   Chitin-Chitosan Chemistry
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

1) Smith, A. V.; Lane P. A.; Shinar, J; **Sukwattanasinitt, M.;** Barton, T. J. "Optical Absorption, Luminescence, and UV-Excited Optically Detected Magnetic Resonance (UV-ODMR) Study of Poly(*p*-Phenyleneethynyleneaniline) (PPEA) Derivatives." *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1994**, *256*, 685.

2) **Sukwattanasinitt, M.**; Wang, X.; Li, L.; Jiang, X.; Kumar, J.; Tripathy, S. K.; Sandman, D. J. "Functionalizable Self-Assembling Polydiacetylenes and Their Optical Properties" *Chem. Mater.* **1998**, *10*, 27.

3) Sandman, D. J. ; **Sukwattanasinitt, M.**; Wang, X.; Lee, D.-C.; Kim, M.; Li, L.; Kumar, J.; Tripathy, S. K. "Submicron Photomanipulation of Self-Assembled Polydiacetylenes" *Synthetic Metals* **1999**,*102*,1546.

4) **Sukwattanasinitt, M.**; Lee, D.-C.; Kim, M.; Wang, X.; Li, L.; Yang, K.; Kumar, J.; Tripathy, S. K; Sandman, D. J. "New Processible Functionalizable Polydiacetylenes" *Macromolecules* **1999**, *32*, 7361.

5) Sukontpanish, U.; Boonyawan, S; Boonsong, P.; Pimpa, N.; Chantarasiri, N.; **Sukwattanasinitt, M.** "Synthesis of Novel Well-defined Soluble Polymers Containing Chiral Salen" *J. Sci. Res. Chula. Univ.* **1999**, *24*, 115.

6) Veravong, S.; Ruangpornvisuti, V.; Pipoosananakaton, B.; **Sukwattanasinitt, M.**; Tuntulani, T. "Synthesis of Tetraalkylated Calix[4]arenes and Studies of Their Conformational Behaviors." *Science Asia* **2000**, *26*, 163-170.

7) Pipoosananakaton, B.; **Sukwattanasinitt, M.**; Jaiboon, N.; Chaichit, N.; Tuntulani, T. "New Azobenzene Crown *p-tert*-Butylcalix[4]arenes as Switchable Receptors for Na^+ and K^+ ions: Synthesis and Isomerization Studies." *Bull. Kor. Chem. Soc.* **2000**, *21*, 867-874.

8) Pipoosananakaton, B.; **Sukwattanasinitt, M.**; Jaiboon, N.; Chaichit, N.; Tuntulani, T. "Preparation of New Azobenzene Crown Ether *p-tert*-Butylcalix[4]arenes and Their Roles as Switchable Ionophores for Na^+ and K^+ Ions." *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 9095-9100.

9) Jaiboon, N.; Chaichit, C.; Pipoosananakaton, B.; Tuntulani, T.; **Sukwattanasinitt, M.** "Crystal Structure of Diethoxynitrobenzene-*p*-tert-Butylcalix[4]arene$o_2(CH_3)_2C$=O: Evidence of Intra- and Intermolecular CH/p Interactions Forced by Crystal Packing" *J. Chem. Cryst.* **2000**, *30*, 717-720.

10) **Sukwattanasinitt, M.**; Rojanathanes, R.; Tuntulani, T.; Sritana-anant, Y.; Ruangpornvisuti, V. "Synthesis of stilbene crown ether *p-tert*-butylcalix[4]arenes" *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5291-5293.

11) **Sukwattanasinitt, M.**; Zhu, H.; Sashiwa, H.; Aiba, S. "Utilization of commercial non-chitinase enzymes from fungi for preparation of 2-acetamido-2-deoxy-*D*-glucose from β-chitin" *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 133-137.

12) Pichyangkura, R.; Kudan, S.; Kuttiyawong, K.; **Sukwattanasinitt, M.**; Aiba, S. "Quantitative production of *N*-Acetyl-*D*-glucosamine from crystalline chitin by chitinase" *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 557-559.

13) **Sukwattanasinitt M.**; Rojanathanes, R.; Jiwpanich, S., Tuntulani, T.; Ruangpornvisuti, V. "Selective Oxidation of 25,27-Bis-(3′-formylphenoxylethoxy)-*p-tert*-butylcalix[4]arene" *Science Asia* **2002**, *28*, 25-28.

14) **Sukwattanasinitt M.**; Rojanathanes, R.; Jiwpanich, S., Tuntulani, T.; Ruangpornvisuti, V. "Selective oxidation of 25,27-Bis-(3′-formylphenoxylethoxy)-*p-tert*-butylcalix[4]arene" *Science Asia* **2002**, *28*,25-28.

15) Sashiwa, H.; Fujishima, S.; Yamano, N.; Kawasaki, N.; Nakayama, A.; Muraki, E.; **Sukwattanasinitt, M.**; Pichyangkura R.; Aiba, S. "Enzymatic production of N-acetyl-D-glucosamine from chitin. Degradation study of *N*-acetylchitooligosaccharide and the effect of mixing of crude enzymes" *Carbohydr. Polym.* **2003**, *51*, 391-395.

16) **Sukwattanasinitt, M.**; Nantalaksakul, A.; Potisatityuenyong, A.; Tuntulani, T.; Chailapakul, O.; Prapairaksit, N. "An Electrochemical Sensor from a Soluble Polymeric Ni-salen Complex" *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 4337-4339.

17) Klaikherd, A.; Jayanta S.; Boonjawat, J.; Aiba, S.; **Sukwattanasinitt, M.** "Depolymerization of b-chitin to mono- and disaccharides by the serum fraction from the para rubber tree, Hevea brasiliensis" *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 2799-2804.

18) Rojanathanes, R.; Pipoosananakaton, B.; Tuntulani, T.; Bhanthumnavin, W.; Orton, J. B.; Cole, S. J.; Hursthouse, M. B.; Grossel, M. C.; Sukwattanasinitt, M. Comparative study of azobenzene and stilbene bridged crown ether *p-tert*-butylcalix[4]arene *Tetrahedron* **2004**, *61*, 1317-1324.

19) *Rojanathanes, R.; Pipoosananakaton, B.; Tuntulani, T.; Bhanthumnavin, W.; Orton, J. B.; Cole, S. J.;* Hursthouse, M. B.; Grossel, M. C.; **Sukwattanasinitt, M.*** "Comparative study of azobenzene and stilbene bridged crown ether p-tert-butylcalix[4]arene" *Tetrahedron* **2005**, *61*, 1317-1324.

20) Rojanathanes, R., Tuntulani, T., Bhanthumnavin, W. and **Sukwattanasinitt, M.*** "Stilbene-bridged *tert*-Butylcalix[4]arene as photoswitchable molecular receptors" *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3401-3404.

21) Potisatityuenyong, Anupat; Tumcharern, G.; Dubas, S. T.; **Sukwattanasinitt, M.*** "Layer-by-layer assembly of intact polydiacetylene vesicles with retained chromic properties" *J. Colloid and Interf. Sci.*, **2006**, *304*, 45-51.

22) Sae-Lim, C.; **Sukwattanasinitt, M.**; Foxman, B. M; Sandman, D. J.* "Synthesis and crystallographic study of 1,6-bis-(*N*-phenothiazinyl)-2,4-hexadiyne" *J. Macromol. Sci., Part A: Pure and Applied Chemistry* **2006**, *43*, 1929–1936.

23) Jaiyu, A.; Rojanathanes, R.; **Sukwattanasinitt, M.*** "Stilbene-bridged 1,3-alternate calix[4]arene crown ether for selective alkali ion extraction" *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1817-1821.

24) Lim, C.; Sandman, D.J.; **Sukwattasinitt, M.*** "Topological polymerization of tert-butylcalix[4]arenes containing diynes" *Macromolecules* **2008**, *41*, 675-681.

25) Kitkulnumchai, Y.; Ajavakom, A.; **Sukwattanasinitt, M.*** "Treatment of oxidized cellulose fabric with chitosan and its surface activity towards anionic reactive dyes" *Cellulose* **2008**, *15*, 599-608.

26) Potisatityuenyong, A.; Rojanathanes, R.; Tumcharern, G.; **Sukwattanasinitt, M.*** "Electronic absorption spectroscopy probed side-chain movement in chromic transitions of polydiacetylene vesicles" *Langmuir* **2008**, *24*, 446-4463.

27) Champaiboon, T.; Tumcharern, G.; Potisatityuenyong, A.; Wacharasindhu, S.; **Sukwattanasinitt, M.*** "A polydiacetylene multilayer film for naked eye detection of aromatic compounds" *Sens. Actuator B-Chem.* **2009**, *139*, 532-537.

28) Niamnont, N.; Siripornnoppakhun, W.; Rashatasakhon, P.; **Sukwattanasinitt, M.*** "A polyanionic Dendritic Fluorophore for Selective detection of Hg^{2+} in triton x-100 aqueous media" *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2768-2771.

29) Rashatasakhon, P.; Jaiyu, A.; Rojanathanes, R., Muangsin, N.; Chaichit, N.; **Sukwattanasinitt, M.*** "X-ray guided 1H NMR analysis of pinched cone calix[4]arenes" *Journal of Molecular Structure* **2010**, 963, 22–26.

30) *Wacharasindhu, S.; Montha, S.; Boonyiseng, J.; Potisatityuenyong, A.; Phollookin, C.; Tumcharern, G.;* **Sukwattanasinitt, M.*** "Tuning of thermochromic properties of Polydiacetylene Toward Universal Temperature Sensing Materials Through Amido Hydrogen Bonding" *Macromolecules* **2010**, *online*.

31) Sirijindalert, T.; Hansuthirakul, K.; Rashatasakhon, P.; **Sukwattanasinitt, M.**; Ajavakom, A., "Novel synthetic route to 1,4-dihydropyridines from beta-amino acrylates by using titanium(IV) chloride under facile conditions" *Tetrahedron*, **2010**, in press.

ผลงานวิจัยที่เสนอในการประชุมนานาชาติ

1) **Sukwattanasinitt, M.**; Ijadi-Maghsoodi, S.; Barton, T. J. "A Convenient Introduction of NLO Chromophores into Electron-Rich Acetylenic Polymers." *Polymer Preprints.* **1995**, *36*, 497.

2) **Sukwattanasinitt, M.**; Wang, X.; Lee, D.-C.; Li, L.; Kumar, J.; Tripathy, S. K.; Sandman, D. J. "Self-Assembling Functionalizable Polydiacetylenes and Their Optical Properties" *Mater. Res. Soc. Conf. Proc.* **1998**, *488*, 677.

3) Chittibabu, K. G.; Li, L.; Balasubramanian, S.; Wang, X.; **Sukwattanasinitt, M.**; Yang, K.; Kumar, J.; Sandman, D. J.; Tripathy, S. K.; "Design, Methodology and Preparation of Novel Polymers for Nonlinear Optics" *Mater. Res. Soc. Conf. Proc.* **1998**, *488*, 795.

4) Tripathy, S.K.; Kumar, J.; Kim, D.-Y.; Jiang, X.; Wang, X.; Li, L.; **Sukwattanasinitt, M.**; Sandman, D.J. "Photofabrication of Surface Relief Grating Using Post Functionalized Azo Polymers" *Mater. Res. Soc. Conf. Proc.* **1998**, *488*, 141.

5) Lee, D. C.; **Sukwattanasinitt, M;** Wang, X.; Li, L.; Kumar, J.; Tripathy, S. K.; Sandman, D. J. "Synthesis, Optical Properties and Self-Assembly of Water Soluble Polydiacetylenes" *Polymer Preprints* **1998**, *39*, 554.

6) **Sukwattanasinitt, M.**; Klaikherd A.; Skulnee, K.; Aiba, S. Chitosan as A Releasing Device for 2,4-D Herbicide" *Proc. of 8th International Chitin and Chitosan Conference*, Yamaguchi, Japan, September 21-23, 2000, Kondansha Scientific Ltd., Tokyo **2001**, 142-143.

7) Zhu, H.; **Sukwattanasinitt, M.**; Pichayangkura, R.; Miyaoka, S. Yunoue, M; Muraki, M.; Aiba, S. "Preparation of *N*-Acetyl-D-glucosamine from Chitin by Enzymatic Hydrolysis" *Chitin and Chitosan in Life Science: Proceedings for 8th International Chitin and Chitosan Conference*, Yamaguchi, Japan, September 21-23, 2000, Kondansha Scientific Ltd., Tokyo **2001**, 330-331.

8) **Sukwattanasinitt, M.**; Prakobkij, W.; Sashiwa, H.; Aiba, S. "Preparation of *N*-Acetyl-D-glucosamine and *N,N'*-Diacetylchitobiose from Chitin by Enzymatic Hydrolysis" *Abstracts for 5th Asia Pacific Chitin-Chitosan Symposium & Exhibition*, Bangkok, Thailand, March 13-15, **2002**, 40.

9) Nantalaksakul, A.; Tuntulani, T.; Chailapakul, O.; Prapairaksit, N.; **Sukwattanasinitt, M.** "Synthesis of The Novel Soluble Polymeric Metal-salen complexes and Their Electrochemical Properties" *Abstracts for 8th International Conference & Exhibition on Pure and Applied Chemistry*, Bangkok, Thailand, May 29-31, **2002**, 73.

10) Boonwan, S.; **Sukwattanasinitt, M.** "Preparation of Chitosan Beads Containing 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and Their Releasing Profiles" *Abstracts for 8th International Conference & Exhibition on Pure and Applied Chemistry*, Bangkok, Thailand, May 29-31, **2002**, 191.

11) Rojanathanes, R.; Pipoosananakaton, B.; Tuntulani, T.; **Sukwattanasinitt, M.** "Synthesis of Calixarene Based Photo-switchable Ionophores" *Abstracts for 8th International Conference & Exhibition on Pure and Applied Chemistry*, Bangkok, Thailand, May 29-31, **2002**, 200.

12) **Sukwattanasinitt, M.**; Nantalaksakul, A.; Potisatityuenyong, A.; Tuntulani, T.; Chailapakul, O.; Prapairaksit, N. "Polymeric Metal-salen Complexes and Their Electrochemical Properties" *Abstracts for 8th Pacific Polymer Conference*, Bangkok, Thailand, November 24-27, **2003**, 60.

13) Maneekul, T.; Prakobkij, W.; Klaikherd, A.; Pichyankura, R.; Aiba, S.; **Sukwattanasinitt, M.** "Improved selectivity in chitinolytic activity of cellulase from acremonium cellulyticus toward preparation of *N,N'*-diacetylchitobiose from chitin" *The 1st mathematic and physical science graduate congress*, Bangkok, Thailand, December 6-8, **2005**.

14) Potisatityuenyong, A.; Dubas, S. T.; **Sukwattanasinitt, M.** "The layer by layer deposition of polydiacetylene vesicles on glass substrate" *The 1st mathematic and physical science graduate congress*, Bangkok, Thailand, December 6-8, **2005**.

15) Potisatityuenyong, A.; Dubas S. T.; **Sukwattanasinitt, M.** "Layer-by-Layer deposition of chitosan/polydiacetylene vesicles for convenient preparation of colorimetric sensing film" *NSTI Nanotech 2006*, Boston, USA, May 7-11, **2006**.

16) Potisatityuenyong, A.; Guangyu, Ma; **Sukwattanasinitt, M.**; Cheng, Q. "The interaction of mannose substituted viologens with poly(phenylene vinylene): the effect of ionic strength on fluorescence quenching and *Concanavalin A*. response" *Abstract for 2nd mathematic and physical science graduate congress*, Singapore, December 12-14, **2006,** 61.

17) Jaiyu, A.; **Sukwattanasinitt, M.**; Rojanathanes, R. "Stilbene-bridged 1,3-alternate calyx[4]arene crown ether for selective alkali ion extraction" *Abstract for 2nd mathematic and physical science graduate congress*, Singapore, December 12-14, **2006,** 87.

18) Sae-Lim, C.; **Sukwattanasinitt, M.** "Synthesis and properties of new calyx[4]arene containing diacetylene" *Abstract for 2nd mathematic and physical science graduate congress*, Singapore, December 12-14, **2006,** 88.

19) Champaiboon, T.; Tumcharern, G.; Potisatityuenyong, A.; **Sukwattanasinitt, M.** "Preparation of Polydiacetylene Thin film for naked eye detection of 4-nitrophenol" *Abstract for 2nd mathematic and physical science graduate congress*, Singapore, December 12-14, **2006,** 149.

20) Boonyiseng, J.; Sukwattanasinitt, M. "Thermochromism of polydiacetylene vesicles prepared from 10,12-pentacosadiynoic acid and its derivatives" *Abstract for 2nd mathematic and physical science graduate congress*, Singapore, December 12-14, **2006,** 151.

21) Somboot, A.; Pichyangkura, R.; Lertsutthiwong, P.; Ajavakom, A.; **Sukwattanasinitt, M.** "Preparation of aminosaccharides by ultrasonication assisted acid hydrolysis of chitin" *Abstract for 2nd mathematic and physical science graduate congress*, Singapore, December 12-14, **2006,** 153.

22) Siripornnoppakhun, W.; Niamnon, N.; **Sukwattanasinitt, M.** "Fluorescence quenching between water soluble fluorophores containing triphenylamine core linked phynylenethynylene building blocks" *Abstract for 3rd mathematic and physical science graduate congress*, Malaysia, December 12-14, **2007,** P5CB-3.

23) Boonchit, S.; **Sukwattanasinitt, M.**; Ajavakom, A. "Preparation and application of polydiacetylene nanovesicles" *Abstract for 3rd mathematic and physical science graduate congress*, Malaysia, December 12-14, **2007,** A044.

24) **Sukwattanasinitt, M.**;* Rashatasakhon, P.; Jaiyu, A.; Rojanathanes, R.; Muangsin, N. "Knowing and controlling the rims of calix[4]arene for supramolecular recognition and assembly" *Abstract for 239th ACS National Meeting*, San Francisco, USA, March 21–25, **2010**, ORGN-750.

25) Chantra, T.; Sukwattanasinitt, M.; Ajavakom, A. "Synthesis of oxazolidinones via acid-induced intramolecular cyclization"*The Pure and Applied Chemistry International Conference*, UbonRatchathani, Thailand, 21-23, **2010.**

26) Kumchoo, T; **Sukwattanasinitt, M.**; Rashatasakhon, P."Blue light-emitting dipyrenylcarbazole derivatives" *The Pure and Applied Chemistry International Conference*, Ubon Ratchathani, Thailand, 21-23, **2010**.

27) Sirijindalert, T.; Rashatasakhon, P; **Sukwattanasinitt, M.**; Ajavakom, A. "A facile synthesis of N-sunstituted 1,4- dihydropyridines by using titanium(IV) chloride from beta-amino acrylate"*The Pure and Applied Chemistry International Conference*, Ubon Ratchathani, Thailand, 21-23, **2010**.

28) Phollookin, C.; Tumcharern, G.; **Sukwattanasinitt, M.** "Thermochromic polydiacetylene lipids with varying akyl chain lengths" *The Pure and Applied Chemistry International Conference*, Ubon Ratchathani, Thailand, 21-23, **2010**.

29) Mungkarndee, R.; Niamnont, N.; Rashatasakhon, P; Techakriengkrai, I.; **Sukwattanasinitt, M.** "Multiderivate statistical analyses in protein array detection with charged dendritic fluorophores"*The Pure and Applied Chemistry International Conference*, Ubon Ratchathani, Thailand, 21-23, **2010**.

30) Niamnont, N.; Mungkarndee, R.; Rashatasakhon, P.; Techakriengkrai, L.; **Sukwattanasinitt, M.***"Charged denditric fluorophores for array detection of proteins" *Abstract for 239th ACS National Meeting*, San Francisco, USA, March 21−25, **2010**, ORGN-749.

31) Rashatasakhon, P.; Niamnont, N.; Siripornnoppakhun, W.; **Sukwattanasinitt, M.*** "Syntheses and sensing applications of water soluble fluorescent dendrimers" *Abstract for 239th ACS National Meeting*, San Francisco, USA, March 21−25, **2010**, ORGN-662.

32) Ampornpun, S.; **Sukwattanasinitt, M.**; Vachirawongkwin, V.; Tumcharern, G.; Wacharasindhu, S. "Effect of Methylene Chain Length on the Thermochromic Behaviors of PDAs Containing Diamido Groups" *The 7th International Symposium on Advanced Materials in Asia-Pacific* (7th ISAMAP), Ishikawa High-Tech Exchange Center, Ishikawa, Japan, Sep 30-Oct 1, **2010**.

33) Vongnam, K.; Vilaivan, T; Sukwattanasinit, M.; Rashatasakhon, P "Anionic Water Soluble Terphenylene Diethynylene Fluorophores" *Pure and Applied Chemistry International Conference*, Bangkok, Thailand, January 5-7, **2011**.

34) Eaidkong, T.; Mungkarndee, R.; Phollookin, C.; **Sukwattanasinitt, M.**; Wacharasindhu, S. "Colorimetric Paper Based Array from Polydiacetylenes: New Sensor Platform for Discrimination of Volatile Organic Compounds (VOCs)" *Pure and Applied Chemistry International Conference*, Bangkok, Thailand, January 5-7, **2011**.

35) Pumtang, S.; Ajavakom, A; **Sukwattanasinitt, M**. "Solvent and Surfactant Colorimetric Sensors from Polydiacetylenes" *Pure and Applied Chemistry International Conference*, Bangkok, Thailand, January 5-7, **2011**.

36) Homraruen, D.; Dubas, L.; **Sukwattanasinitt, M.**; Ajavakom, A. "The novel fluorescent sensor based on 1,4-dihydropyridine derivatives" *Pure and Applied Chemistry International Conference*, Bangkok, Thailand, January 5-7, **2011**, OM_O0039.

37) Khumsri, A.; Niamnont, N.; Siripornnoppakhun, W.; Vongnam, K.; Tumcharern G.; **Sukwattanasinitt, M.** "Synthesis and characterization of cyanide fluorescent sensors from diphenylacetylene derivatives" *Pure and Applied Chemistry International Conference*, Bangkok, Thailand, January 5-7, **2011**, O0053.

38) Younbunlim, W; Rashatasakhon, P.; **Sukwattanasinitt, M.** "Dendritic polyelectrolytes as fluorescent aptasensors for potassium ions" *Pure and Applied Chemistry International Conference*, Bangkok, Thailand, January 5-7, **2011**, OM_O0041.

39) Kimpitak, N; Rashatasakhon, P.; **Sukwattanasinitt, M.** "Tetrabranch diphenylacetylene fluorescent sensors" *Pure and Applied Chemistry International Conference*, Bangkok, Thailand, January 5-7, **2011**, OM_O0037.

40) Sirilaksanapong, S.; **Sukwattanasinitt, M.**, Rashatasakhon, P. "Triphenylbenzene-ethynylene dendritic fluorophore" *Pure and Applied Chemistry International Conference*, Bangkok, Thailand, January 5-7, **2011**, OM_O0058.

41) Niamnont, N.; Stuparu, M.; Rashatasakhon, P.; Kim, K. B.; Jay, S. S.; **Sukwattanasinitt, M.** "Synthesis and photophysical properties of novel star-shaped fluorophores with triphenylamine core" *Pure and Applied Chemistry International Conference*, Bangkok, Thailand, January 5-7, **2011**, OM_O0034.

42) Ngampeungpis, W.; Tumcharern, G.; **Sukwattanasinitt, M.*** "Paper-based Polydiacetylene temperature indicators from diacetylene lipids" *The 8th International Symposium on Advanced Materials in Asia-Pacific Rim (ISAMAP) and the 2nd International Workshop on Nanogrid Materials (IWNM)*, Pusan, Korea, November 2-5, **2011**, 21.

43) Kimpitak, N; Niamnont, N.; Rashatasakhon, P.; **Sukwattanasinitt, M.** "Fluorescent sensors from dendritic diphenylacetylene fluorophores" *The 8th International Symposium on Advanced Materials in Asia-Pacific Rim (ISAMAP) and the 2nd International Workshop on Nanogrid Materials (IWNM)*, Pusan, Korea, November 2-5, **2011**, 83.

44) Auttapornpitak, P.; **Sukwattanasinitt, M.**; Rashatasakhon, P. "Water-soluble fluorophores with *N*-aryl carbazole core" *The 8th International Symposium on Advanced Materials in Asia-Pacific Rim (ISAMAP) and the 2nd International Workshop on Nanogrid Materials (IWNM)*, Pusan, Korea, November 2-5, **2011**, 138-142.

45) Khumsri, A.; Niamnont, N.; Siripornnoppakhun, W.; Tumcharern G.; **Sukwattanasinitt, M.** "A cyanide fluorescent sensor from diphenylacetylene derivative" *The 8th International Symposium on Advanced Materials in Asia-Pacific Rim (ISAMAP) and the 2nd International Workshop on Nanogrid Materials (IWNM)*, Pusan, Korea, November 2-5, **2011**, 82.

46) Homraruen, D.; Sirijindalert, T.; Dubas, L.; **Sukwattanasinitt, M.**; Ajavakom, A. "Applications of 1,4-dihydropyridine based fluorescent sensor" *The 8th International Symposium on Advanced Materials in Asia-Pacific Rim (ISAMAP) and the 2nd International Workshop on Nanogrid Materials (IWNM)*, Pusan, Korea, November 2-5, **2011**, 99-106.

47) Ngampeungpis, W.; Tumcharern, G.; **Sukwattanasinitt, M.*** "Practical colorimetric evaluation for polydiacetylene paper-based thermal indicators" *7th Mathematics and physical sciences graduate congress (7th MPSGC)*, Singapore, December 12-14, **2011**.

48) Kimpitak, N; Niamnont, N.; Rashatasakhon, P.; **Sukwattanasinitt, M.** "Tetracationic diphenylacetylene fluorophores for oligonucleotides detection" *7th Mathematics and physical sciences graduate congress (7th MPSGC)*, Singapore, December 12-14, **2011**, 106.

49) Auttapornpitak, P.; **Sukwattanasinitt, M.**; Rashatasakhon, P. "Water-soluble fluorophores with N-aryl carbazole core" *7th Mathematics and physical sciences graduate congress (7th MPSGC)*, Singapore, December 12-14, **2011**, 100.

ผลงานวิจัยที่เสนอในการประชุมระดับประเทศ

1) **Sukwattanasinitt, M.**; Ijadi-Maghsoodi, S.; Barton, T. J. "A Convenient Introduction of NLO Chromophores into Electron-Rich Acetylenic Polymers" *Abstracts for 23rd Congress on Science and Technology of Thailand*, Chiang Mai, Thailand **1997**, 304.
2) **Sukwattanasinitt, M.**; Wang, X.; Li, L.; Jiang, X.; Kumar, J.; Tripathy, K.; Sandman, D. J. "Synthesis of Functionalizable Polydiacetylenes and Their Optical Properties" *Abstracts for 24th Congress on Science and Technology of Thailand*, Bangkok, Thailand **1998**, 122.
3) Pipoosananakaton, B.; **Sukwattanasinitt, M.**; Tuntulani, T. "Preparation and Isomerization Properties of Azobenzene Crown p-tert-Butylcalix[4]arene" *Abstracts for 24th Congress on Science and Technology of Thailand*, Bangkok, Thailand **1998**, 124.
4) Boonyawan, S; Sukontpanish, U.; Chantarasiri, N.; **Sukwattanasinitt, M.** "Synthesis of Novel Well-defined Soluble Polymers Containing Chiral Salen" *Abstracts for 25th Congress on Science and Technology of Thailand*, Pitsanuloke, Thailand **1999**, 304.
5) Pipoosananakaton, B.; **Sukwattanasinitt, M.**; Jaiboon, N.; Chaichit, N.; Tuntulani, T. "Photoisomerization Studies of Azobenzene Crown Ether Calix[4]arenes for Applications in Alkali Metal Ion Extraction" *Abstracts for 26th Congress on Science and Technology of Thailand* , Bangkok, Thailand **2000**, 190.
6) Rojanathanes, R.; Tuntulani, T.; Ruangpornvisuti, V.; **Sukwatanasinitt, M.** "Selective Oxidation of 25,27-Di-(3-formylphenoxyethoxy)-p-tert-butylcalix[4]arene" *Abstracts for 26th Congress on Science and Technology of Thailand* , Bangkok, Thailand **2000**, 199.
7) Klaikherd, A.; Skulnee, K.; Ajavakom, A.; Chavasiri, W.; **Sukwattanasinitt, M.**; Aiba, S. "Control Release of 2,4-D Herbicide by Chitosan" *Abstracts for 26th Congress on Science and Technology of Thailand*, Bangkok, Thailand **2000**, 697.
8) Mansawat, W.; Vilaivan, T. Bhanthumnavin, W.; Boonsong, P.; Jewpanich, S.; **Sukwattanasinitt, M.** "Synthesis of α-Aminonitriles Using Novel Catalysis" *Abstracts for 27th Congress on Science and Technology of Thailand,* 16-18 October 2001, Songkla, Thailand **2001**, 204.
9) Boonsong, P.; Pimpa, N.; **Sukwattanasinitt, M.** "Synthesis of Novel Chiral Salens Containing Alkyl Chain and Ethylene Glycol Chains" *Abstracts for 27th Congress on Science and Technology of Thailand,* 16-18 October 2001, Songkla, Thailand **2001**, 226.
10) Rojanathanes, R.; Tuntulani, T.; Ruangpornvisuti, V. **Sukwattanasinitt, M.** "Synthesis of stilbene crown ether *p-tert*-butylcalix[4]arenes and Their Isomerization" *Abstracts for 27th Congress on Science and Technology of Thailand,* 16-18 October 2001, Songkla, Thailand **2001**, 230.
11) Potisatityuenyong, A.; Sae-lim, C.; **Sukwattanasinitt, M.**; Ruangpornvisuti, V. "Synthesis and Determination of Acidic Constant for Salen Derivative by Potentiometric Titration" *Abstracts for 27th Congress on Science and Technology of Thailand*, 16-18 October 2001, Songkla, Thailand **2001**, 253.
12) Ruangpornvisuti, V.; Sae-lim, C.; Potisatityuenyong, A.; **Sukwattanasinitt, M.** "Determination of Protonation Energies and Protonation Constants of Salen Derivative" *Abstracts for 27th Congress on Science and Technology of Thailand,* 16-18 October 2001, Songkla, Thailand **2001**, 254.

13) Klaikherd, A.; **Sukwattanasinitt, M.**; Aiba, S. "Enzymatic Hydrolysis of Chitin for Production of N-Acetyl-D-glucosamine" *Abstracts for 27th Congress on Science and Technology of Thailand,* 16-18 October 2001, Songkla, Thailand **2001**, 548.

14) Jiwpanich, S.; Sirichartchai, S.; **Sukwattanasinitt, M.** "Synthesis of Novel Soluble Polymer Containing Metal Complexes of Salen" *Abstracts for 27th Congress on Science and Technology of Thailand,* 16-18 October 2001, Songkla, Thailand **2001**, 845.

15) Nantalaksakul, A.; Tuntulani, T.; **Sukwattanasinitt, M.**; Sato, H. "Synthesis of Soluble Fluorescent Polymers Containing Vinylene Linked Triphenylamine" *Abstracts for 27th Congress on Science and Technology of Thailand,* 16-18 October 2001, Songkla, Thailand **2001**, 846.

16) Boonwan, S.; Jaiyu, A.; Limruangroj, I.; **Sukwattanasinitt, M.** "Utilization of Chitosan for controlled Release of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid with Polyphosphoric acid and Glutaraldehyde as Crosslinking Agents" *Abstracts for 27th Congress on Science and Technology of Thailand,* 16-18 October 2001, Songkla, Thailand **2001**, 858.

17) **Sukwattanasinitt, M.**; Prakobkij, W.; Sashiwa, H.; Aiba, S. "Preparation of *N*-Acetyl-D-glucosamine and *N,N'*-Diacetylchitobiose from Chitin by Enzymatic Hydrolysis" *Abstracts for 5th Asia Pacific Chitin-Chitosan Symposium & Exhibition*, Bangkok, Thailand, March 13-15, **2002**, 40.

18) Nantalaksakul, A.; Tuntulani, T.; Chailapakul, O.; Prapairaksit, N.; **Sukwattanasinitt, M.** "Synthesis of The Novel Soluble Polymeric Metal-salen complexes and Their Electrochemical Properties" *Abstracts for 8th International Conference & Exhibition on Pure and Applied Chemistry*, Bangkok, Thailand, May 29-31, **2002**, 73.

19) Boonwan, S.; **Sukwattanasinitt, M.** "Preparation of Chitosan Beads Containing 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and Their Releasing Profiles" *Abstracts for 8th International Conference & Exhibition on Pure and Applied Chemistry*, Bangkok, Thailand, May 29-31, **2002**, 191.

20) Rojanathanes, R.; Pipoosananakaton, B.; Tuntulani, T.; **Sukwattanasinitt, M.** "Synthesis of Calixarene Based Photo-switchable Ionophores" *Abstracts for 8th International Conference & Exhibition on Pure and Applied Chemistry*, Bangkok, Thailand, May 29-31, **2002**, 200.

21) **Sukwattanasinitt, M.**; Nantalaksakul, A.; Potisatityuenyong, A.; Tuntulani, T.; Chailapakul, O.; Prapairaksit, N. "Polymeric Metal-salen Complexes and Their Electrochemical Properties" *Abstracts for 8th Pacific Polymer Conference*, Bangkok, Thailand, November 24-27, **2003**, 60.

22) Jaiyu, A.; Klaikherd, A. Jayanta, S.; **Sukwattanasinitt, M.**; Boonjawat, J.; Aiba, S. "Preparation of *N*-Acetyl-D-glucosamine and Chitobiose by Enzymatic Hydrolysis of Chitin with Serum from Para Rubber" *Abstracts for 29th Congress on Science and Technology of Thailand,* 20-22 October **2003**, Khon Kean, Thailand, SC88.

23) Lim, C.; Boonsong, P. Sritana-anant, Y.; **Sukwattanasinitt, M.** "Synthesis of Salen Complexes Containing Ethylene Glycol Chains and Their Catalytic Properties" *Abstracts for 29th Congress on Science and Technology of Thailand,* 20-22 October **2003**, Khon Kean, Thailand, SC89.

24) Jaiyu, A.; **Sukwattanasinitt, M.**; Kongsaeree, P.; Prabpai, S. "Synthesis and Complexation Study of Calix[4]arene Containing Stilbene and Crown Ether" *Abstracts for 30th Congress on Science and Technology of Thailand,* 19-21 October **2004**, Bangkok, Thailand, C0194.

25) Lim, C.; **Sukwattanasinitt M.** "Synthesis and Properties of New Calix[4]arene Tube Containing Diacetylene" *Abstracts for 30th Congress on Science and Technology of Thailand,* 19-21 October **2004**, Bangkok, Thailand, C0195.

26) Hansuthirakul, K.; Ajavakom A.; **Suwattanasinitt, M.** "Synthesis of aziridine derivatives" *Abstracts for 30th Congress on Science and Technology of Thailand,* 19-21 October 2004, Bangkok, Thailand, C0247.

27) Maneekul, T.; Auynirundronkul, K.; Prakobkij, W.; Klaikherd, A.; Pichyangkura, R.; Punnapayak, H., **Sukawattanasinitt, M.** "Preparation of *N*-Acetyl-D-glucosamine and *N,N'*-Diacetylchitobiose by Enzymatic Hydrolysis of Chitin" *Abstracts for 30th Congress on Science and Technology of Thailand,* 19-21 October **2004**, Bangkok, Thailand, L0015.

28) Maneekul, T.; Punnapayak, H.; **Sukwattanasinitt, M.** "Production of *N*-Acetyl-D-glucosmine and *N,N'*-Diacetylchitobiose by Enzymatic Hydrolysis of Squid Pen Chitin" *Abstacts for The 4th National Chitin-Chitosan Conference,* 5-6 October **2006**, Bangkok, Thailand, O14.

29) Somboot, A.; **Sukwattanasinitt, M.** "Ultrasonication assisted acid hydrolysis of chitin for preparation of amino monosaccharide" *Abstacts for 4th National Chitin-Chitosan Conference,* 5-6 October **2006**, Bangkok, Thailand, O15.

30) Kijkulnumchai, Y.; **Sukwattanasinitt, M.** "Enhancement of reactive dye uptake on cellulose fabric with chitosan" *Abstacts for 4th National Chitin-Chitosan Conference,* 5-6 October **2006**, Bangkok, Thailand, O16.

31) Sae-Lim, C.; **Sukwattanasinitt, M.** "Synthesis and properties of calix[4]arenes containing diacetylenes" *Abstacts for 33rd Congress on Science and Technology of Thailand,* 18-20 October **2007**, Nakorn Si Thammarat, Thailand, C0030.

32) Siripornnoppakhun, W.; Niamnon, N.; **Sukwattanasinitt, M.** "Synthesis and study of water-soluble fluorophores containing multiple phenylenehtynylene building blocks" *Abstacts for 33rd Congress on Science and Technology of Thailand,* 18-20 October **2007**, Nakorn Si Thammarat, Thailand, C0226.

33) Boonchit, S.; Ajavakom, A.; **Sukwattanasinitt, M.** "Preparation and morphology of polydiacetylene from self-assembly of diacetylene lipids" *Abstacts for 33rd Congress on Science and Technology of Thailand,* 18-20 October **2007**, Nakorn Si Thammarat, Thailand, E0015.

34) Champaiboon, T.; Tumcharern, G.; **Sukwattanasinitt, M.** "Prepation of polydiacetylene film for naked eye detection of aromatic compounds" *Abstacts for 33rd Congress on Science and Technology of Thailand,* 18-20 October **2007**, Nakorn Si Thammarat, Thailand, E0046.

35) Potisatityuenyong, A.; **Sukwattanasinitt, M.** "Chromatic transition mechanism of polydiacetylene vesicles" *Abstacts for 33rd Congress on Science and Technology of Thailand,* 18-20 October **2007**, Nakorn Si Thammarat, Thailand, E0086.

36) Chantra, T.; **Sukwattanasinitt, M.**; Ajavakom, A. "Synthesis of chiral oxazolidinones via acid-induced intramolecular cyclisation" *Organic Synthesis Research Unit Mini-Symposium 2009,* 12th February **2009**, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Thailand, oral presentation

37) Wacharasindhu, S.; Montha, S.; **Sukwattanasinitt, M.** "Polydiacetylenes containing amide group(s) and their chromism properties" *Organic Synthesis Research Unit Mini-Symposium 2009,* 12th February **2009**, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Thailand, oral presentation

38) Siripornnoppakhun, W.; Niamnonnt, N.; Rashatasakhon, P.; **Sukwattanasinitt, M.** "Water-soluble fluorescent dendrimer for DNA Sensing" *Organic Synthesis Research Unit Mini-Symposium 2009*, 12th February **2009**, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Thailand, oral presentation

39) Niamnont, N.; Siripornnoppakhun, W.; Rashatasakhon, P.; **Sukwattanasinitt, M.** "Polyanionic fluorophore for selective detection of Hg^{2+} in aqueous media" *Organic Synthesis Research Unit Mini-Symposium 2009*, 12th February **2009**, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Thailand, oral presentation

40) Phollookin, C.; Ajavakom, A.; Tumcharern, G.; **Sukwattanasinitt, M.** "Thermochromic polydiacetylene from nanoaggregate of diacetylene lipids with varying alkyl chain lengths" *Organic Synthesis Research Unit Mini-Symposium 2009*, 12th February **2009**, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Thailand, oral presentation.

รางวัลและทุนวิจัยที่เคยได้รับ (ด้านวิชาการโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เกี่ยวกับงานวิจัย)

- **2530-2534** ทุนการศึกษาระดับปริญญาตรีในประเทศ โครงการ พสวท.
- **2534** เกียรตินิยมเหรียญทอง ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- **2534-2539** ทุนการศึกษาระดับปริญญาเอกต่างประเทศ โครงการ พสวท.
- **2540-2542** ทุนนักวิจัยใหม่ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) โครงการวิจัยเรื่อง "การสังเคราะห์พอลิเมอร์ละลายได้ชนิดใหม่ที่มีสารประกอบเชิงซ้อนซาเลนของโลหะเป็นส่วนประกอบ"
- **2541-2543** ทุนวิจัยหลังปริญญาเอก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) โครงการวิจัยเรื่อง "การสังเคราะห์สติลบีนคราวน์อีเธอร์คาลิก[4]เอรีนเพื่อใช้เป็นเครื่องมือระดับโมเลกุลในการแยกไอออนหรือใช้เป็นไอออนเซนเซอร์"
- **2542-2543** ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ปี 2543 สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ โครงการวิจัยเรื่อง "การเตรียมและการศึกษาสมบัติของเกลือของไคโตซานกับสารกำจัดวัชพืชที่เป็นกรด"
- **2543** ITIT fellowship, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Osaka, Japan; Research area: *Enzymatic Hydrolysis of Chitin and Chitosan;* Host: Dr. Sei-ichi Aiba
- **2544** STA fellowship, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Osaka, Japan; Research area: *Enzymatic Hydrolysis of Chitin and Chitosan;* Host: Dr. Sei-ichi Aiba
- **2545** รางวัลนักวิทยาศาสตร์รุ่นใหม่ประจำปี 2545 มูลนิธิส่งเสริมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีในพระบรมราชูปถัมภ์
- **2545-2548** ทุนพัฒนานักวิจัย (เมธีวิจัย สกว.) เรื่อง การสังเคราะห์และศึกษาเปรียบเทียบอนุพันธ์คาลิกซ์[4]เอรีนที่มีไดเอโซเบนซีนและสติลบีนสำหรับการพัฒนาสารจับไอออนแบบสวิทซ์ได้

งานวิจัยที่กำลังดำเนินอยู่ (โปรดกรอกข้อความในตาราง)

ชื่อโครงการ	แหล่งเงินทุน	ระยะเวลาโครงการ	สัดส่วนของงานวิจัยที่เสร็จแล้ว(%)
1) โครงการผลิตอาหารเสริมสุขภาพเพื่อป้องกันโรคข้อกระดูกเสื่อมจากเปลือกอาหารทะเล	ทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ	2549-2553	90%

2. ผู้วิจัย

1. ชื่อนักวิจัย/ผู้ช่วยวิจัย

   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) (นาย/นาง/นางสาว, ดร.) อนวัช อาซวาคม

   (ภาษาอังกฤษ) (Mr./Mrs./Miss, Dr.) Anawat Ajavakom

2. เลขหมายประจำตัวประชาชน

   3101700302799

3. ตำแหน่งปัจจุบัน

   ตำแหน่งทางวิชาการ (ศ./รศ./ผศ./อื่นๆ (โปรดระบุ) อาจารย์

4. หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

   ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

   ที่อยู่ ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330

   โทรศัพท์ 0-2218-7623

   โทรสาร 0-2218-7598

   E-mail anawat77@hotmail.com

5. ประวัติการศึกษา

   ปริญญาตรี พ.ศ. 2539 สาขาวิชา เคมี จาก มหาวิทยาลัยโอซากา ประเทศญี่ปุ่น

   ปริญญาโท พ.ศ. 2541 สาขาวิชา เคมี จาก มหาวิทยาลัยโอซากา ประเทศญี่ปุ่น

   ปริญญาเอก พ.ศ. 2546 สาขาวิชา เคมีอินทรีย์ จาก มหาวิทยาลัยเซาธ์แฮมป์ตัน ประเทศอังกฤษ

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

   Organic Synthesis

   Radical Chemistry

   Supramolecular Chemistry

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

1) Akiyama, T.; Imahori, H.; **Ajawakom, A.**; Sakata, Y. "Synthesis and self-assembly of porphyry-linked fullerene on gold surface using S-Au linkage." *Chem. Lett.*, **1996**, *10*, 907-908.
2) Imahori, H.; Ozawa, S.; Ushida, K.; Takahashi, M.; Azuma, T.; **Ajavakom, A.**; Akiyama, T.; Hasegawa, M. ; Taniguchi, S.; Okada, T.; Sakata, Y. "Organic Photoelectrochemical Cell Mimicking Photoinduced Multistep Electron Transfer in Photosynthesis: Interfacial Structure and Photoelectrochemical Properties of *Self-Assembled Monolayers of Porphyry-Linked Fullerenes on Gold Electrodes*", *Bull. Chem. Soc. Japan*, **1999**, *72*, 485-502.
3) Imahori, H.; Azuma, T.; Ozawa, S.; Yamada, H.; Ushida, K.; **Ajavakom, A.**; Norieda, H.; Sakata, Y. "Photoinduced electron transfer at a gold electrode modified with a self-assembled monolayer of fullerene" *Chem. Comm.*, **1999**, *6*, 557-558.
4) Imahori, H.; Azuma, T.; **Ajavakom, A.**; Norieda, H.; Yamada, H.; Sakata, Y. "An Investigation of Photocurrent Generation by Gold Electrodes Modified with Self-Assembled Monolayer of C60". *J. Phys. Chem., Series B, Materials, Surfaces, Interfaces and Biophysical* **1999**, *103*, 7233-7237.
5) Setthakaset, P.; Pichyankura, R.; **Ajavakom, A.**; Sukwattanasinitt, M. "Preparation of N-Acetyl-D-Glucosamine Using Enzyme from Aspergillus sp.", *Journal of Metals, Materials and Minerals*, **2008**, *18*, 53-57.
6) Kitkulnumchai, Y.; **Ajavakom, A.**; Sukwattanasinitt, M. "Treatment of oxidized cellulose fabric with chitosan and its surface activity towards anionic reactive dyes". *Cellulose* **2008**, *15*, 599-608.
7) Sirijindalert, T.; Hansuthirakul, K.; Rashatasakhon, P.; Sukwattanasinitt, M.; **Ajavakom, A.** "Novel synthetic route to 1,4-dihydropyridines from β-amino acrylates by using titanium(IV) chloride under facile conditions". *Tetrahedron* **2010**, *66*, 5161-5167.
8) Phollookin, C.; Wacharasindhu, S.; **Ajavakom, A.**; Tumcharern, G.; Ampornpun, S.; Eaikong, T.; Sukwattanasinitt, M. "Tuning Down of Color Transition Temperature of Thermochromically Reversible Bisdiynamide Polydiacetylenes". *Macromolecules* **2010**, *43*, 7540-7548.
9) Pumtang, S.; Siripornnoppakhun, W.; Sukwattanasinitt, M.; **Ajavakom, A.** "Solvent Colorimetric Paper-based Polydiacetylene Sensors from Diacetylene Lipids". *J Colloid Interface Sci.* **2011**, *364*, 366-372.
10) **Ajavakom, A.**; Supsvetson, S.; Somboot, A.; Sukwattanasinitta, M. "Products from Microwave and Ultrasonic Wave Assisted Acid Hydrolysis of Chitin" *Carbohydrate Polymers* **2012**, xxx, xxx-xxx.

ผลงานวิจัยที่เสนอในการประชุมนานาชาติ

1) Klaikherd, A.; Skulnee, K.; **Ajawakom, A.**; Chavasiri, W.; **Sukwattanasinitt, M.**; Aiba, S. "Control Release of 2,4-D Herbicide by Chitosan" *Abstracts for 26th Congress on Science and Technology of Thailand*, Bangkok, Thailand **2000**, 697.

2) Hansuthirakul, K.; Sukwattanasinitt, M.; **Ajavakom, A.** "Synthesis of Aziridine Derivatives" *Abstracts for 30th Congress on Science and Technology of Thailand*, 19-21 October **2004**, Bangkok, Thailand, C0247.

3) Hansuthirakul, K.; Sukwattanasinitt, M.; **Ajavakom, A.** "Acid-promoted Intramolecular Cyclisation of Enamide Derivatives" *Abstracts for 31th Congress on Science and Technology of Thailand*, 18-21 October **2005**, Bangkok, Thailand, C0065.

4) Hansuthirakul, K.; Sirijindalert, T.; **Ajavakom, A.**, "Acid-promoted Intramolecular Cyclisation of Enamide Derivatives and Synthesis of Pyrrolidine *trans*-Lactams" *Proceeding for 4th International Symposium on Advanced Materials in Asia-Pacific Rim (ISAMAP)*, 13-15 July **2007**, Niigata, Japan, IL06, 21.

5) Boonchit, S.; **Ajavakom, A.**; Sukwattanasinitt, M. "Separation and Morphology of PDA from Self-assembly of Diacetylene Lypid" *Abstracts for 33th Congress on Science and Technology of Thailand*, 18-20 October **2007**, Nakornsritammarat, Thailand, E0015.

6) Hansuthirakul, K.; Sirijindalert, T.; **Ajavakom, A.** "Acid-promoted Intramolecular Cyclisation of Enamine and Enamide Derivatives" *Proceeding for International Symposium on Catalysis & Fine Chemicals (C&FC)*, 16-21 December **2007**, Singapore, NMP-A0400.

7) Supsvetson, S.; **Ajavakom, A.**; Sukwattanasinitt, M. "PREPARATION OF GLUCOSAMINE HYDROCHLORIDE FROM a-CHITIN BY MICROWAVE ASSISTED ACID HYDROLYSIS" *Posters for PACCON*, 14-16 January **2009**, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand, S15-PO-12.

8) Chantra, T.; Sukwattanasinitt, M.; **Ajavakom, A.** "Synthesis of oxazolidinones via acid-induced intramolecular cyclization" The Pure and Applied Chemistry International Conference, UbonRatchathani, Thailand, 21-23, 2010.

9) Sirijindalert, T.; Rashatasakhon, P.; Sukwattanasinitt, M.; **Ajavakom, A.** "A Facile Synthesis of *N*-substituted 1,4-Dihydropyridines by Using Titanium(IV) Chloride from β-Amino Acrylates" *Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2010)*, 21-23 January **2010**, Sunee Grand Hotel and Conventional Center, Ubon Ratchathani, Thailand, ORC_OR-13.

10) Homraruen, D.; Dubas, L.; Sukwattanasinitt, M.; **Ajavakom, A.** "The Novel Fluorescent Sensor Based on 1,4-Dihydropyridine Derivatives" *Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2011)*, 5-7 January **2011**, Miracle Grand Hotel Bangkok, Thailand, OM_O0039.

11) Homraruen, D.; Sirijindalert, T.; Dubas, L.; Sukwattanasinitt, M.; **Ajavakom, A.** "Applications of 1,4-Dihydropyridine Based Fluorescent Sensor" *The 8th International Symposium on Advanced Materials in Asia-Pacific Rim (ISAMAP) and the 2nd International Work shop on Nanogrid Materials (IWNM)*. 2-5 November **2011**, Hotel Novotel Anbassdor Busan, Busan, Korea, Proceeding page 99-106, PS-03.

12) Sirijindalert, T.; Homraruen, D.; Rashatasakhon, P.; Sukwattanasinitt, M.; **Ajavakom, A.** "Novel Synthetic Route, Fluorescence Property Study and Development for Selective Chemosensor of 1,4-Dihydropyridine Derivatives" *The 1st Junior International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia*, 9-11 December **2011**, Xiamen University, Xiamen, China, O-5.

ผลงานวิจัยที่เสนอในการประชุมระดับประเทศ

1) Klaikherd, A.; Skulnee, K.; **Ajavakom, A.**; Chavasiri, W.; Sukwattanasinitt, M.; Aiba, S. "Control Release of 2,4-D Herbicide by Chitosan" *Abstracts for 26th Congress on Science and Technology of Thailand*, Bangkok, Thailand **2000**, 697.

2) Hansuthirakul, K.; **Ajavakom A.**; Suwattanasinitt, M. "Synthesis of aziridine derivatives" *Abstracts for 30th Congress on Science and Technology of Thailand,* 19-21 October 2004, Bangkok, Thailand, C0247.Boonchit, S.; **Ajavakom, A.**; Sukwattanasinitt, M. "Preparation and morphology of polydiacetylene from self-assembly of diacetylene lipids" *Abstacts for 33rd Congress on Science and Technology of Thailand,* 18-20 October **2007**, Nakorn Si Thammarat, Thailand, E0015.

3) Chantra, T.; Sukwattanasinitt, M.; **Ajavakom, A.** "Synthesis of chiral oxazolidinones via acid-induced intramolecular cyclisation" *Organic Synthesis Research Unit Mini-Symposium 2009,* 12th February **2009**, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Thailand, oral presentation

4) Phollookin, C.; **Ajavakom, A.**; Tumcharern, G.; Sukwattanasinitt, M. "Thermochromic polydiacetylene from nanoaggregate of diacetylene lipids with varying alkyl chain lengths" *Organic Synthesis Research Unit Mini-Symposium 2009,* 12th February **2009**, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Thailand, oral presentation.

รางวัลและทุนวิจัยที่เคยได้รับ (ด้านวิชาการโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เกี่ยวกับงานวิจัย)

- **2533-2535** ทุนการศึกษาของ ก.พ. ระดับมัธยมปลาย โตเกียว ประเทศญี่ปุ่น
- **2535-2539** ทุนการศึกษาของ ก.พ. ระดับปริญญาตรี มหาวิทยาลัยโอซากา ประเทศญี่ปุ่น
- **2539-2541** ทุนการศึกษาของ ก.พ. ระดับปริญญาโท มหาวิทยาลัยโอซากา ประเทศญี่ปุ่น
- **2539-2541** ทุน ORS (Overseas Research Scholarship) จากประเทศอังกฤษ ระดับปริญญาเอก มหาวิทยาลัยเซาธ์แธมป์ตัน ประเทศอังกฤษ
- **2546-2547** ทุนรัชดาภิเษกสมโภช สำหรับนักวิจัยใหม่ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- **2549-2552** ทุนสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาโครงการพัฒนากลุ่มสถาบันอุดมศึกษาเพื่อเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขันของประเทศ "ศูนย์ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ชีวภาพจากสิ่งมีชีวิตในทะเลและราเอนโดไฟท์"
- **2549-2553** ทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

งานวิจัยที่กำลังดำเนินอยู่ (โปรดกรอกข้อความในตาราง)

ชื่อโครงการ	แหล่งเงินทุน	ระยะเวลาโครงการ	สัดส่วนของงานวิจัยที่เสร็จแล้ว(%)
1) โครงการผลิตอาหารเสริมสุขภาพเพื่อป้องกันโรคข้อกระดูกเสื่อมจากเปลือกอาหารทะเล	ทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ	2549-2554	90%

รายงานการวิจัย "การผลิตอาหารเสริมสุขภาพเพื่อป้องกันโรคข้อกระดูกเสื่อมจากเปลือกอาหารทะเล"

1.บทนำ

1) มูลเหตุจูงใจและปัญหา

ไคติน (chitin) เป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่ประกอบด้วยโครงสร้างทางเคมีคือ poly(β-(1-4)-2-acetamido-2-deoxy-*D*-glucose) หรือเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน (*N*-acetyl-*D*-glucosamine) เป็นหน่วยซ้ำหลักในสายพอลิเมอร์ ส่วนไคโตซาน (chitosan) ได้จากการทำปฏิกิริยาดีอะซิทิเลชันของไคตินในสารละลายด่างเข้มข้น ดังนั้นไคโตซานจึงประกอบด้วยโครงสร้างทางเคมีส่วนใหญ่เป็น poly(β-(1-4)-2-amino-2-deoxy-*D*-glucose) หรือดี-กลูโคซามีน (*D*-glucosamine) เป็นหน่วยซ้ำหลัก ไคตินและไคโตซานมีโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกับเซลลูโลส แตกต่างกันที่หมู่แทนที่บนคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่สองในวงแหวนไพราโนส (pyranose ring) ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของเซลลูโลสโดยหมู่แทนที่ที่ตำแหน่งนี้ของเซลลูโลสจะเป็นหมู่ไฮดรอกซิลแต่ของไคตินเป็นหมู่อะซิทาไมด์ (NHAc) ส่วนไคโตซานเป็นหมู่อะมิโน (NH_2)

ไคติน-ไคโตซานที่ผลิตขึ้นภายในประเทศส่วนใหญ่จะส่งออกในรูปของวัตถุดิบราคาถูก (กิโลกรัมละ 400-1000 บาท) ดังนั้นการวิจัยเพื่อหาวิธีการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงขึ้น จึงเป็นการช่วยเปลี่ยนของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็งให้กลายเป็นทรัพยากรที่มีค่าของประเทศ ซึ่งจัดได้ว่าเป็นการวิจัยเพื่อพัฒนาเทคโนโลยีที่มั่นคงและยั่งยืน เอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน ที่ขายในรูปสารเคมีปัจจุบันมีราคากว่า 57,700 บาท/กิโลกรัม ส่วนไดเมอร์ของไคตินคือ เอ็น,เอ็น-ไดแอซีทิลไคโตไบโอส มีราคาสูงกว่า 900,000 บาท/กรัม และโอลิโกเมอร์ที่มีขนาด 3-7 หน่วยนั้นมีราคาสูงขึ้นไปอีกตามลำดับ[1] ซึ่งสารเหล่านี้ใช้เป็นส่วนผสมหลักในยารักษาอาการเจ็บปวดตามข้อกระดูกสำหรับผู้ป่วยที่เป็นโรคออสทีโออาร์ไทรทีส (osteoarthritis)[2] โครงการวิจัยนี้จึงอาจถือได้ว่าเป็นจุดเริ่มต้นของการแปรรูปวัถดุดิบคือไคติน และไคโตซานให้เป็นสารเคมีโมเลกุลขนาดเล็กลงที่มีประโยชน์ในทางเภสัชกรรมที่มีราคาสูงขึ้น

ในงานวิจัยที่ผ่านของเราพบว่าเอนไซม์จาก Burkoderia cepacia สามารถใช้ผลิตเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน จาก ไคติน มากกว่า 90% ในเวลา 1 วัน โดยอัตราค่าใช้จ่ายในการผลิตในระดับห้องปฏิบัติการจะอยู่ที่ประมาณ 800-1500 บาท/กิโลกรัม และถ้าขยายขนาดการผลิตก็จะสามารถลดราคาการผลิตต่อกิโลกรัมลงอย่างมีนัยสำคัญได้อีก อย่างไรก็ตามจุดเด่นของการวิจัยนี้ไม่ได้อยู่ที่ต้นทุนการผลิตต่ำแต่เพียงอย่างเดียว แต่อยู่ที่ความปลอดภัยและความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมที่มีมากกว่าวิธีการผลิตโดยใช้สารเคมีซึ่งมีกระบวนการทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ที่ยุ่งยากซับซ้อน

2) วัตถุประสงค์

2.1) เพื่อศึกษาการย่อยไคตินด้วยเอนไซม์เพื่อเตรียม GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$ รวมทั้งการย่อยไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริกเพื่อเตรียม GlcNHCl และ ศึกษาหาวิธีแยกผลิตภัณฑ์ทั้งสามดังกล่าว ออกจากของผสมในปฏิกิริยา

2.2) เพื่อศึกษาการนำเอาผลิตภัณฑ์ที่ได้มาประยุกต์ใช้ให้เป็นประโยชน์ด้วยการนำมาสังเคราะห์ต่อให้เป็นสาร Glc-DHP เป็นสารตรวจวัดทางชีวภาพ

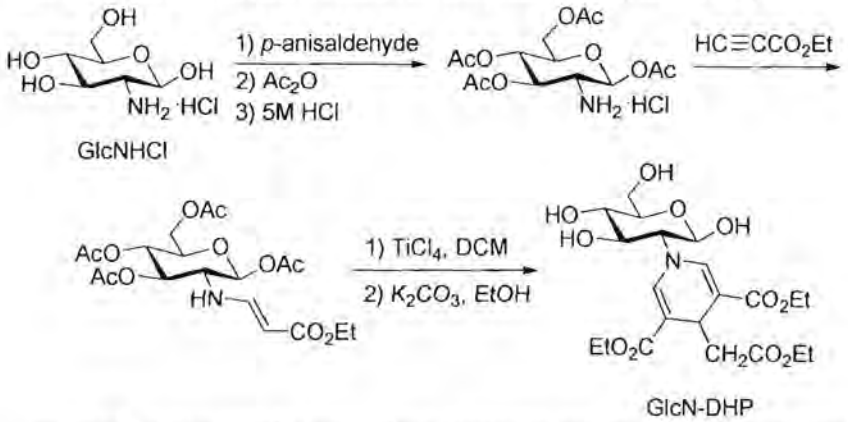
2. วิธีการดำเนินการวิจัย

1) การย่อยด้วยเอนไซม์ และการย่อยด้วยกรดทั้งแบบใช้คลื่นอัลตราโซนิคช่วยเร่งปฏิกิริยา และแบบใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยเร่งปฏิกิริยา

a. ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
b. วิเคราะห์สรุปผล และเขียนรายงาน และเตรียมบทความเพื่อลงตีพิมพ์ หรือจดสิทธิบัตร ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

2) การนำเอาผลิตภัณฑ์ที่ได้มาประยุกต์ใช้เป็นสารตรวจวัดทางชีวภาพ

a. ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
b. ศึกษาเอกสารผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง จัดเตรียมอุปกรณ์และสารเคมีที่จำเป็น
c. สังเคราะห์สารอนุพันธ์ GlcN ซึ่งหมู่อะมิโนได้รับการดัดแปลงเป็นหน่วย DHP โดยจะต้องเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซี (-OH) ของ GlcN ซึ่งเป็นหมู่ที่ช่วยในการละลายน้ำให้เป็นหมู่เอสเทอร์ (-OAc)[31] ที่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์เสียก่อน (สมการที่ 1)



สมการที่ 1 แผนการสังเคราะห์สารเป้าหมาย Glc-DHP จาก GlcNHCl

d. พิสูจน์เอกลักษณ์ของโมเลกุลที่สังเคราะห์ได้ ด้วยเทคนิคสเปกโตรสโกปี (^{1}H NMR, ^{13}C NMR และ IR) และเทคนิค MS
e. ศึกษาสมบัติการเรืองแสงและดูดกลืนแสงด้วย UV-vis spectrophotometer และ spectrofluorometer โดยหา Absorption wavelength (λ_{max}), Emission wavelength (λ_{max}), Molar absorptivity (ε_{max}), และ Quantum yield (ϕ)
f. ศึกษาการระงับการวาวแสงด้วยสารชีวภาพต่างๆ
g. วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผลการทดลอง และเขียนวิทยานิพนธ์
h. วิเคราะห์สรุปผล และเตรียมเขียนบทความเพื่อลงตีพิมพ์ หรือจดสิทธิบัตร

3. ผลการวิจัย

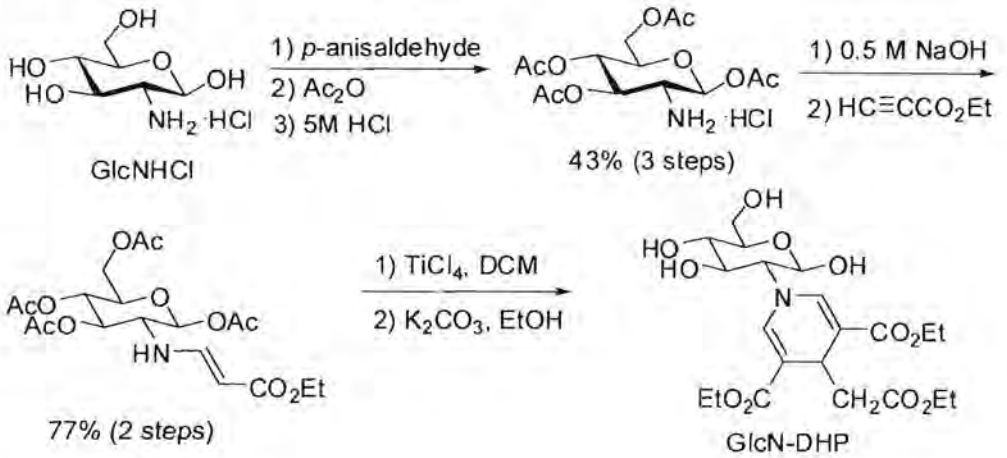
<u>การย่อยไคตินด้วยเอนไซม์ และกรด</u>

ได้ศึกษาการเตรียมสารเคมีและวัตถุดิบที่จำเป็นโดยทำการเตรียมแกนปลาหมึกที่บดแล้วมาเตรียมคอลลอยด์ไคตินโดยทำการเตรียมในสภาวะที่เป็นกรดจะได้สเลอร์รีสีขาว นำคอลลอยด์ไคตินที่เตรียมมาหา activity ของเอนไซม์จากรา *Aspergillus fumigatus* และโคลนแบคทีเรีย *Serratia sp.* ซึ่งผลเราสามารถสรุป

ผลการวิจัยได้ว่าการย่อยไคตินจากแกนหมึกด้วยเอนไซม์จากรา *Aspergillus fumigatus* (4 U/1 g ไคติน) สามารถย่อยไคติน (3% w/v) ที่อุณหภูมิ 40 °C pH 3 เป็นเวลา 2 วัน ได้ GlcNAc ด้วยเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ 72% การย่อยไคติน (3% w/v) ด้วยเอนไซม์จากโคลนแบคทีเรีย *Serratia sp.* (1 U/1 g ไคติน) ที่อุณหภูมิ 37 °C pH 6 เป็นเวลา 6 วันให้ $(GlcNAc)_2$ และ GlcNAc ด้วยเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ 43% และ 2.6% ตามลำดับ สามารถทำให้ GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$ บริสุทธิ์ได้โดยการตกตะกอนด้วยเอทานอล ตามด้วยการกำจัดสีด้วยคอลัมน์ที่มีผงถ่านกัมมันต์ให้ GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$ ที่บริสุทธิ์ด้วยเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 64% และ 40% ตามลำดับ ส่วนการย่อยไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นมี 2 กรรมวิธีคือที่ใช้โซนิเคเตอร์เป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยา และที่ใช้ไมโครเวฟเป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยานั้น ให้ผลสำเร็จที่ดีน่าพึงพอใจโดยที่กรรมวิธีแรกสามารถปรับปรุงขบวนการย่อยให้ดีขึ้นและสามารถเลือกสภาวะในการสังเคราะห์โมโนเมอร์และไดเมอร์ออกได้อย่างโดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาการย่อยที่อุณหภูมิ 40 °C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ต่ำกว่าอุณหภูมิการย่อยทั่วๆไปให้ผลที่ดีอย่างมีนัยสำคัญ ในส่วนผลของกรรมวิธีที่ 2 นั้นสามารถย่นระยะเวลาในการย่อยให้เหลือเพียง 12 นาที ซึ่งจากกรรมวิธีดั้งเดิมต้องใช้เวลากว่า 1.5~2 ชั่วโมง

<u>การนำเอาเกลือ GlcNHCl ที่สังเคราะห์ได้ไปประยุกต์ใช้เป็นสารตรวจวัดทางชีวภาพ</u>

ผลการสังเคราะห์สารเป้าหมาย Glc-DHP นั้นสามารถพัฒนามาได้ดังแสดงในสมการข้างล่างแล้ว ซึ่งได้ผลเป็นที่น่าพอใจระดับหนึ่ง อย่างไรก็ตามยังมีความจำเป็นต้องพัฒนาปฏิกิริยาขั้นสุดท้ายให้ได้เปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ที่สูงขึ้นพร้อมกับพัฒนากรรมวิธีในการแยกสารเป้าหมาย Glc-DHP ให้บริสุทธิ์ดีกว่านี้อีกด้วย



4. สรุปและเสนอแนะ

ผลในการย่อยโดยใช้โซนิเคเตอร์ และไมโครเวฟเป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยาเพื่อสังเคราะห์ GlcNHCl ที่สามารถนำมาใช้บริโภคเป็นอาหารเสริมป้องกันโรคข้อกระดูกเสื่อมนั้นได้ถูกรวบรวม และนำไปตีพิมพ์เป็นบทความทางวิชาการในระดับนานาชาติแล้ว และเป็นที่น่าดีใจที่เราได้รับการตอบรับจากวารสารวิชาการระดับนานาชาติในการตีพิมพ์ลงวารสารอย่างเป็นทางการแล้วโดยรายละเอียดได้แนบมาพร้อมกับรายงานฉบับนี้แล้ว

ในส่วนการพัฒนากรรมวิธีการสังเคราะห์อนุพันธ์กลูโคซามีนเรืองแสงนั้นกำลังอยู่ในระหว่างการพัฒนาซึ่งจะทำการพัฒนาให้แล้วเสร็จให้เร็วที่สุดและนำเอาไปประยุกต์ใช้เป็นสารตรวจวัดทางชีวภาพให้เป็นประโยชน์ต่อไป

สัญญาเลขที่ GRB_๒๖_๕๐_๒๓_๐๒

โครงการวิจัยเรื่อง แผนงานวิจัยนวัตกรรมเพื่อยกระดับคุณภาพและความปลอดภัยทางอาหารสู่โครงสร้างเศรษฐกิจยุคใหม่

การรายงานฉบับสมบูรณ์ประจำปี 2554

รายงานช่วงระยะ ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2554 ถึงวันที่ 31 มีนาคม 2555

หัวหน้าโครงการ: รองศาสตราจารย์ ดร. มงคล สุขวัฒนาสินิทธิ์

หน่วยงาน: ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ

๑. การดำเนินงาน: [✓] ได้ดำเนินงานตามแผนงานที่ได้วางไว้ทุกประการ
[ ] ได้เปลี่ยนแปลงแผนงานที่ได้วางไว้ดังนี้ คือ .....

๒. สรุปผลการดำเนินงาน

ขณะนี้สามารถสังเคราะห์สารที่ต้องการคือเกลือกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (GlcNHCl) จากการย่อยไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริคโดยมีโซนิเคเตอร์และคลื่นไมโครเวฟเป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยา และได้นำเอาสารดังกล่าวมาปรับแต่งโครงสร้างเป็นสารตรวจวัดวาวแสง (fluorescent sensor) อยู่ ซึ่งการพัฒนากรรมวิธีการสังเคราะห์ได้มาถึงปฏิกิริยาสุดท้ายก่อนได้สารตรวจวัดแล้ว

๓. การดำเนินงานในช่วงต่อไป

- หาสภาวะปฏิกิริยาที่เหมาะสมของปฏิกิริยาดีอะเซทิเลชัน
- พิสูจน์เอกลักษณ์และศึกษาสมบัติเชิงแสงของโมเลกุลเป้าหมายที่สังเคราะห์ได้
- ศึกษาการระงับการวาวแสงด้วยสารชีวภาพต่างๆ
- วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผลการทดลอง และตีพิมพ์ผลงานลงในวารสารวิชาการนานาชาติ

๔. อุปสรรคในการดำเนินงาน และแนวทางแก้ไข

ขณะนี้ปฏิกิริยาสุดท้ายก่อนได้สารตรวจวัดนี้ยังมีปัญกาคือสภาวะปฏิกิริยาที่ใช้ไม่สามารถให้ผลิตภัณฑ์ได้แบบสมบูรณ์ได้ ทั้งยังมีผลิตภัณฑ์ข้างเคียงเกิดขึ้นหลายชนิดอีกด้วย จึงมีความจำเป็นต้องหาสภาวะปฏิกิริยาที่เหมาะสมซึ่งกำลังดำเนินการอยู่

.....

(อาจารย์ ดร. อนวัช อาชวาคม)
หัวหน้าโครงการวิจัย (แทน)
15 / 05 / 55

AUTHOR QUERY FORM

ELSEVIER	**Journal:** CARP **Article Number:** 6592	**Please e-mail or fax your responses and any corrections to:** **E-mail:** corrections.esch@elsevier.thomsondigital.com **Fax:** +353 6170 9272

Dear Author,

Please check your proof carefully and mark all corrections at the appropriate place in the proof (e.g., by using on-screen annotation in the PDF file) or compile them in a separate list. Note: if you opt to annotate the file with software other than Adobe Reader then please also highlight the appropriate place in the PDF file. To ensure fast publication of your paper please return your corrections within 48 hours.

For correction or revision of any artwork, please consult http://www.elsevier.com/artworkinstructions.

Any queries or remarks that have arisen during the processing of your manuscript are listed below and highlighted by flags in the proof. Click on the 'Q' link to go to the location in the proof.

Location in article	Query / Remark: click on the Q link to go Please insert your reply or correction at the corresponding line in the proof
Q1	Please confirm that given names and surnames have been identified correctly.
Q2	Please check the telephone and fax numbers of the corresponding author, and correct if necessary.
	Please check this box if you have no corrections to make to the PDF file ☐

Thank you for your assistance.

Carbohydrate Polymers xx (2012) xxx–xxx

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Carbohydrate Polymers

journal homepage: www.elsevier.com/locate/carbpol

Highlights

Carbohydrate Polymers xx (2012) xxx–xxx

Products from microwave and ultrasonic wave assisted acid hydrolysis of chitin

Anawat Ajavakom, Sulaleewan Supsvetson, Aimjit Somboot, Mongkol Sukwattanasinitt

- Acid hydrolysis of α-chitin using microwave and ultrasonic wave were studied.
- The microwave assisted hydrolysis afforded GlcN.HCl in 56% yield within 12 min.
- Sonication allows solubilization of chitin in conc. HCl at room temperature.
- GlcNAc was isolated in up to 37% yield after the sonication of chitin at 30 C.

G Model
CARP 6592 1–5

Carbohydrate Polymers xxx (2012) xxx–xxx

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Carbohydrate Polymers

journal homepage: www.elsevier.com/locate/carbpol

Products from microwave and ultrasonic wave assisted acid hydrolysis of chitin

Anawat Ajavakom[a], Sulaleewan Supsvetson[b], Aimjit Somboot[b], Mongkol Sukwattanasinitt[a,*]

[a] Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand
[b] Program of Petrochemical and Polymer Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:
Received 30 March 2012
Received in revised form 26 April 2012
Accepted 27 April 2012
Available online xxx

Keywords:
Chitin
Chitosan
Glucosamine
Hydrolysis
Microwave chemistry
Sonochemistry

ABSTRACT

Hydrolysis of α-chitin in concentrated hydrochloric acid under elevated temperature is a general preparation of a nutrapharmaceutical glucosamine hydrochloride (GlcN.HCl). In this study, the microwave and ultrasonic wave assisted acid hydrolysis of shrimp shell α-chitin are investigated with an aim to improve the reaction rate and selectivity. Microwave heating shortens the hydrolysis time from 120 min in the conventional heating process to 12 min to afford GlcN.HCl in 57% yield. Sonication can be used to assist chitin dissolution in 38% HCl prior to the hydrolysis at 120 °C for 120 min to produce GlcN.HCl in 62% yield. The selective hydrolysis of glycosidic bond of chitin is achievable at 30 °C for 4 h to give *N*-acetyl glucosamine (GlcNAc) in 37% yield.

© 2012 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

As the second most abundant and renewable natural polysaccharide, chitin is considered as an unlimited source of nitrogen containing organic compounds. It is the structural constituent of the exoskeletons of marine and terrestrial arthropods as well as cell walls of fungi and yeasts (Muzzarelli, 2012; Muzzarelli et al., 2012). Frozen and processed seafood industries generate marine biomass byproduct containing billions of tons of chitin each year. There will be huge economic and environmental benefits if these marine biomass wastes are efficiently utilized (Pillai, Paul, & Sharma 2009; Rinaudo, 2006; Sakai, 1995). One of the brightest applications of chitin is as a raw material for production of the amino sugar, glucosamine (GlcN). GlcN has been proven effective in numerous scientific trials for easing osteoarthritis pain (D'Ambrosio, Casa, Bompani, Scali, & Scali, 1981; Gladman & Farewell, 1999; Hauselman, 2001; Mankin, Brandt, & Shulman, 1986; Matheson & Perry, 2003), and has long been prescribed as a safe nutraceutical alternative to nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) for osteoarthritis pain and inflammation treatment (Da Camara & Dowless, 1998; Ishiguro, Kojima, & Poole, 2002; Todd, 2002; White & Stegemann, 2001). This has led to worldwide consumption of large amounts of a great variety of over-the-counter GlcN. Most of GlcN products for arthritis are usually prepared from the hydrochloride salt (GlcN.HCl) which is industrially produced by the acid hydrolysis of chitin using concentrated hydrochloric acid. GlcN.HCl also has potential applications in cosmetics (Szego & Makk, 1982), antiviral drugs (Floc'h & Werner, 1976; Rashad, Hegab, Abdel-Megeid, Micky, & Abdel-Megeid, 2008), anti-cancer (Chesnokov, Sun, & Itakura, 2009), wound healing (Mackay & Miller, 2003), and as a substrate in the synthesis of glycoproteins (Menon, Mayor, Ferguson, Duszenko, & Cross, 1988) and glycolipids (Mayor et al., 1990). The yield of GlcN.HCl obtained from the acid hydrolysis of chitin is depended on reaction conditions including acid concentration, acid to solid ratio, and reaction time (Jngle, Vaidya, & Pai, 1973; Kamasastri & Prabhu, 1961). In general, concentrated (38%, w/w) hydrochloric acid solution is required for solubilizing the solid chitin and high yield of glucosamine hydrochloride were obtained by refluxing this acidic solution at a temperature about 100 °C for at least 90 min (Gandhi and Laidler, 2002; Mojarrad, Nemati, Valizadeh, Ansarin, & Bourbour, 2007; Novikov, 2004). Under this condition, both amidic and anhydroglucosidic bonds are hydrolyzed to simultaneously affect the deacetylation and depolymerization. An alternative to the acid hydrolysis of chitin is an enzymatic hydrolysis which is used for chitin degradation to chito-oligosaccharides and/or its monomer, *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) (Klaikherd, Jayanta, Boonjawat, Aiba, & Sukwattanasinitt, 2004; Pichyangkura, Kudan, Kuttiyawong, Sukwattanasinitt, & Aiba, 2002; Sashiwa et al., 2003; Sukwattanasinitt, Zhu, Sashiwa, & Aiba, 2002). Despite low selectivity between depolymerization and deacetylation, acid hydrolysis is still attractive mainly due to its cost effectiveness compared to the enzymatic hydrolysis. Ultrasonic wave and microwave irradiations have recently become useful energy sources in various

* Corresponding author. Tel.: +66 819010730; fax: +66 22187598.
E-mail address: sukwatt@gmail.com (M. Sukwattanasinitt).

0144-8617/$ – see front matter © 2012 Published by Elsevier Ltd.
http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.04.064

Please cite this article in press as: Ajavakom, A., et al. Products from microwave and ultrasonic wave assisted acid hydrolysis of chitin. Carbohydrate Polymers (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.04.064

iemical processes (Capelo-Martinez, 2009; Kidak & Ince, 2006; ogi, 2006; Mats & Kristofer, 2006; Mutyala et al., 2010). The :nefits of these irradiations in chemical processes include faster action rate, higher product yield and reduced energy consump-)n. Due to the lack of research in hydrolysis of chitin under ese irradiations, we therefore decided to investigate the prod-:ts from ultrasonic wave and microwave assisted acid hydrolysis chitin and the condition optimization for greater product yields reported herein.

Materials and methods

Shrimp chitin flakes (~0.4 mm) were obtained from Taming iterprises (Thailand). Concentrated HCl (38%, w/w) and activated arcoal were purchased from Merck (Germany).

Hydrolysis of chitin by microwave heating

38% HCl (50 mL) was pre-warmed by conventional microwave en (Samsung, M183GN) at 850 watts (W) for 30 s. Shrimp chitin)g; chitin/acid ratio = 1:2, w/w) was added quickly into the pre-armed acid. After 1 min, when chitin was fully submerged, the crowave irradiation was continued for the designated period time. After stopping the irradiation, the resulting slurry was owed to cool to room temperature and filtered to obtain a brown ecipitate containing GlcN.HCl. All reactions were performed in plicates.

Purification of GlcN.HCl

The crude precipitate was dissolved in distilled water)mL/10 g initial chitin), stirred for 30 min with activated char-al (20 mg/10 g initial chitin). The decolorized solution was stirred room temperature for 30 min. After the removal of activated arcoal and insoluble residue by filtration, the clear filtrate was aporated under reduced pressure to recover GlcN.HCl as light low solid. The solid was then dispersed in absolute ethanol)mL/10 g initial chitin), stirred for 30 min at room tempera-e and the slurry was then filtered. The white solid obtained s dried under vacuum for 24 h to yield pure GlcN.HCl. For rity determination by acid-base titration, GlcN.HCl solution pre-ed by dissolving GlcN.HCl salt in Milli-Q water (~0.01 M) was ated with a standardized NaOH solution (~0.01 M) using phe-phthalein as the indicator. NaOH solution was standardized potassium hydrogen phthalate (KHP) solution (~0.01 M) using enolphthalein as the indicator. All titrations were performed in olicates.

Hydrolysis with ultrasonic wave treatment

Chitin (10 g divided into 5 portions) was added portion wise into % HCl (50 g) immersed in a controlled temperature ultrasonic h (Elmasonic S30H, 50/60 Hz, 275 W, England). The addition of tin was performed while the acid was sonicated at designated nperature. Each chitin portion was added after complete disso-on of the previous portion was observed. Typically, all portions ild be completely dissolved within 30 min. The chitin solution s allowed to stir at controlled temperature for a designated iod of time and the product was monitored and isolated as cribed below.

Determination of degree of hydrolysis

The hydrolysate was neutralized with NaOH solution (10%, w/w) l was then centrifuged at 2000 rpm for 20 min. The supernatant s removed and the solid residue was washed with DI water (40 mL) and ethanol (95%, 40 mL). The solid was dried under vacuum and the degree of hydrolysis was calculated from 100 × (mass of starting chitin − mass of residue)/mass of starting chitin.

Monitoring of hydrolysis reaction by ESI-MS

The hydrolysate (2 mL) was pipetted into absolute ethanol (25 mL) at each time interval. The resulting cloudy mixture was kept in a refrigerator at 4 C overnight and then centrifuged at 2000 rpm for 20 min. The precipitate was collected by decanting the liquid supernatant off. The precipitate was dissolved in DI-water (4 mL), added with activated charcoal (4 mg) and stirred for 30 min. The mixture was filtered through a filter paper (Whatman No. 1) and then a 0.45 μm PTFE filter. The filtrate volume was adjusted to 5 mL by DI-water in a 5 mL volumetric flask and analyzed by an electrospray ionization mass spectrometer (ESI-MS). The solution sample (~1 ppm, each 1.5 mL) was injected into the mass spectrometer using the following injection and ionization parameters; *i.e.* the voltage at capillary, extractor and RF lens were 40 kV, 3 V and 0 V, respectively. The cone voltage was 30 and 35 V for GlcN and GlcNAc, respectively. Under MS scan mode, these parameters were adjusted to give the highest signals corresponding to glucosamine (GlcN) and *N*-acetyl glucosamine (GlcNAc). GlcN was detected as the signal of [GlcNH.H O] at $m/z = 162$ and GlcNAc was detected as the signal of [GlcNAcH.H O] at $m/z = 204$. The relative abundance of these signals was plotted *vs* the hydrolysis time.

Purification of GlcNAc

The brown slurry obtained from the hydrolysis was diluted with 95% ethanol (40 mL) to precipitate a part of impurities. The ethanolic slurry was centrifuged at 2000 rpm for 20 min to remove the remaining chitin and impurities. The obtained precipitate was dispersed in 10 mL of water and filtered to remove the water insoluble residue. The filtrate was then evaporated by rotary evaporator to dryness. The pH of supernatant was adjusted from pH ~ 1 to neutral by filtering through NaHCO powder (40 g). The neutral supernatant was then concentrated to 1/3 of volume by rotating evaporator and dropped into absolute ethanol (50 mL) while stirring to form a cloudy suspension and left in a refrigerator at 4 C overnight to complete the precipitation. The precipitate was separated by centrifugation at 2000 rpm and dried in desiccators under vacuum to afford solid A. The supernatant was concentrated to 1/3 of volume by rotating evaporator and dropped into cool absolute ethanol (50 mL) to form cloudy suspension. The precipitate (solid B) was collected by centrifugation at 2000 rpm. The supernatant was decolorized by stirring with activated charcoal for 45 min, filtered off to yield a clear solution that was concentrated in a rotating evaporator and then freeze-dried to provide a white solid (solid C).

H NMR spectroscopy

H NMR spectra of the product samples, GlcN.HCl and GlcNAc standards were acquired from the deuterium oxide (D O) solutions on Varian Mercury 400 NMR spectrometer at 400 MHz.

Results and discussion

Chitin hydrolysis under microwave heating

First, we have investigated the effect of chitin/38% HCl ratio on the yield of GlcN.HCl. As illustrated in Fig. 1, the optimum chitin/38% HCl ratio is 1:3, w/w where GlcN.HCl can be obtained ~50% yield. The amount of HCl used affected the yield of GlcN.HCl in two manners. With lower amount of 38% HCl (1:2 ratio), significant amount of insoluble chitin was observed after the hydrolysis. Though the

ease cite this article in press as: Ajavakom, A., et al. Products from microwave and ultrasonic wave assisted acid hydrolysis of chitin. *Carbohydrate lymers* (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.04.064

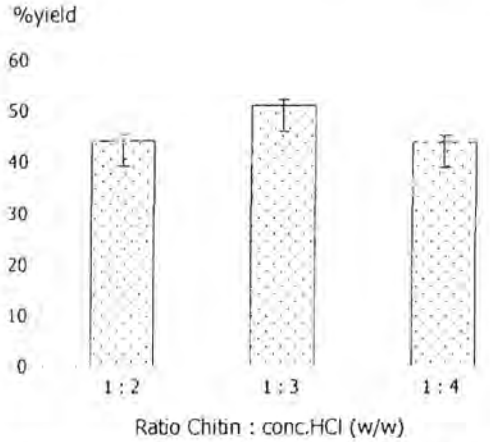


Fig. 1. GlcN.HCl yield obtained from chitin hydrolysis in 38% HCl with microwave irradiation power of 850 W for 12 min at various chitin/acid ratios. The plots are the average values from three replicates with the error bars representing the maximum and minimum values.

reaction was done in reflux conditions, some HCl escaped from the reaction mixture leading to inadequate acidity to dissolve chitin in the initial state of the hydrolysis. When higher amount of 38% HCl (1:4 ratio) was used, less GlcN.HCl precipitate was obtained after allowing the reaction mixture to cool to room temperature due to dilution effect.

Fig. 2 shows a time course of GlcN.HCl yield obtained from the chitin hydrolysis with 38% HCl under microwave irradiation. The isolated yield of GlcN.HCl increased with the hydrolysis time up to 12 min. The GlcN.HCl yield dropped slightly as the irradiation time was extended beyond 12 min, probably due to the decomposition of GlcN.HCl product. The optimum irradiation time for hydrolysis is thus 12 min.

To study the effect of heat transfer in this microwave assisted chitin hydrolysis, the reaction was conducted with and without stirring. Use of a mechanical stirrer improved the product yield by 5–10% (Fig. 3). Under the optimum 1:3 chitin/38% HCl ratio, GlcN.HCl was obtained in 57% yield with mechanical stirring. This yield is comparable to conventional heating reported in literatures but within much shorter time (Gandhi & Laidler, 2002; Ingle et al., 1973; Kamasastri & Prabhu, 1961; Mayor et al., 1990). Since agitation of the reaction mixture can increase the product yield, the faster reaction is likely to be a result of the faster heating rate rather than the superheating or selective heating. Microwave can thus speed up and reduce the energy consumption in the acid

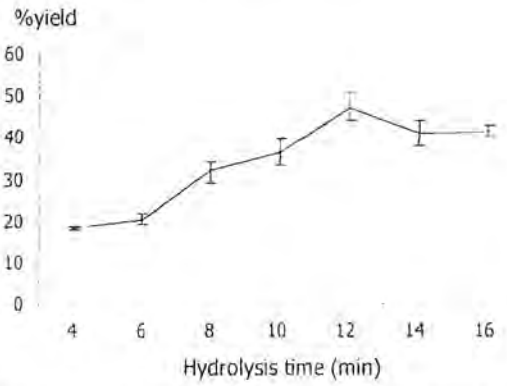


Fig. 2. GlcN.HCl yield obtained from chitin hydrolysis in 38% HCl (1:1, w/w) using microwave irradiation of 850 W at various irradiation times. The plots are the average values from three replicates with the error bars representing the maximum and minimum values.

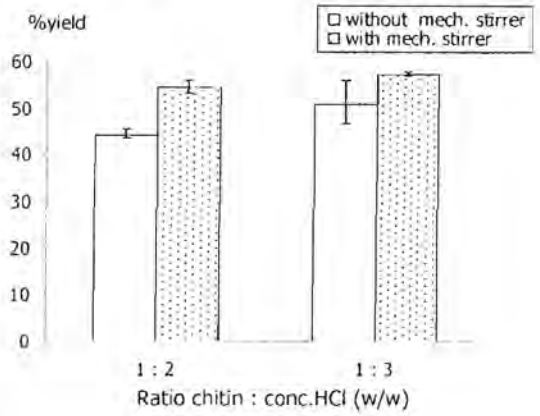


Fig. 3. GlcN.HCl obtained from chitin hydrolysis with microwave irradiation of 850 W for 12 min with and without mechanical agitation. The plots are the average values from three replicates with the error bars representing the maximum and minimum values.

hydrolysis of chitin to produce GlcN.HCl but it cannot improve product yield.

White crystalline powder of GlcN.HCl was obtained by using the decolorization-precipitation method (Gandhi & Laidler, 2002). The isolated GlcN.HCl product obtained from the hydrolysis shows the same H-NMR spectrum pattern (Fig. S1) as the standard GlcN.HCl (Fluka Chemicals, Ltd., ≥99% HPLC). The acid-base titration also confirmed the percent purity of GlcN.HCl above 99%.

3.2. Chitin hydrolysis with pre-sonication

As described in the previous section that there was no selectivity between glycosidic and amido bonds in the hydrolysis of chitin either by microwave or conventional heating and only GlcN.HCl was obtained as the final product. It is important to note that chitin is dissolved in 38% HCl very slowly at room temperature that a solution with concentration higher than 5% (w/w) cannot be obtained within acceptable time, viz. <1 h, without warming the acid (~60 C). In this part of study, we used ultrasonic wave to accelerate the dissolution of chitin at low temperature to obtain acidic chitin solution with appreciable concentration. The hydrolysis of chitin is expected to proceed with selectivity that should allow a preparation of GlcNAc.

With sonication, 30 g of chitin was completely dissolved in 50 mL 38% HCl within 30 min even at 20 C. After the dissolution of chitin by sonication at designated temperatures, the solutions were allowed to be stirred at controlled temperature for additional 90 min. For comparison, another similar set of chitin/38% HCl mixtures were allowed to stirred without pre-sonication at the same designated temperature for 120 min. The degree of hydrolysis, determined from the ratio of water soluble portion to the amount of initial chitin, was significantly higher with the sonication pretreatment (Table 1). At 20 C, about 12% of chitin was hydrolyzed with pre-sonication while only 3% of hydrolysis was observed without the sonication pretreatment. At 40 C, the sonication process

Table 1
Degree of hydrolysis of chitin (10 g) in HCl (50 g) without and with sonication.

Temperature	Without sonication		With sonication	
	Residue (g)	*% hydrolysis*	*Residue (g)*	*% hydrolysis*
20 C	9.7	3	8.8	12
40 C	4.3	57	2.0	80
60 C	0.9	91	0.3	97

Time = 120 min.
Total time = 120 min with 30 min of sonication.

Please cite this article in press as: Ajavakom, A., et al. Products from microwave and ultrasonic wave assisted acid hydrolysis of chitin. Carbohydrate Polymers (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.04.064

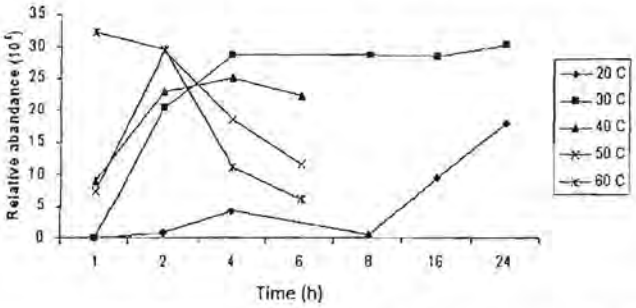


Fig. 4. MS signal intensities of GlcNAc during chitin hydrolysis in 38% HCl (1:5, w/w) at various temperature and times with 30 min pre-sonication.

improved the degree of hydrolysis from 57% to 80%. However, high degree of hydrolysis (>90%) could be obtained at the temperature 60 C with and without sonication. The results confirmed that after the dissolution of chitin by sonication process, the hydrolysis of chitin readily proceeded even at the temperature below 40 C.

To study the products obtained from the chitin hydrolysis, the hydrolysates at various temperature were monitored by an electrospray ionization mass spectrometer (ESI-MS). The MS spectra of the hydrolysate samples typically showed two major peaks corresponding to GlcN at $m/z = 162$ ([GlcNH.H O]) and GlcNAc at $m/z = 204$ ([GlcNAc.H O]) (Fig. S2). First the GlcNAc peak was monitored at various hydrolysis temperature and the signal abundance was plotted *vs* the hydrolysis time as shown in Fig. 4. At low hydrolysis temperature of 20 C, GlcNAc started to appear after 8 h and increased slowly thereafter. Using hydrolysis temperature of 30 C, GlcNAc yield reached the maximum at 4 h and became constant afterward. At 40 C, the production of GlcNAc also reached the maximum at 4 h but gradually dropped afterward. For the hydrolysis temperature of 50 C, GlcNAc yield reached the maximum within 2 h which then dropped quickly afterward. Similarly, the hydrolysis at 60 C gave the maximum GlcNAc yield within the first hour which then dropped quickly. We hypothesize that the yield drop is caused by the deacetylation of GlcNAc. We monitored both GlcN and GlcNAc MS peaks obtained from the hydrolysis at 40 C and found that the GlcN peak increased sharply after 4 h at the expense of GlcNAc peak (Fig. 5). The results confirmed that the deacetylation was responsible for the decrease of GlcNAc yield upon prolonged hydrolysis.

The crude GlcNAc product was purified by fractional precipitation in absolute ethanol followed by decolorization as described in Section 2.6. The purity was measured by ESI-MS against the GlcNAc standard. The purities and recovery masses of the precipitate fractions (solid A, B and C) are summarized in Table 2. The solid C which was the last precipitate fraction showed the highest purity. It is important to note that the low temperature (30 or 40 C) hydrolysis of chitin afforded higher GlcNAc purity and recovery mass of solid C. With the hydrolysis at 30 C for 4 h, the total GlcNAc yield of 65% was determined in the crude product which could be isolated by fractional precipitation to give 37% yield of high purity product (>95% pure). The high purity of GlcNAc was also confirmed by comparing the H NMR spectrum of the product with standard GlcNAc (Fig. S3).

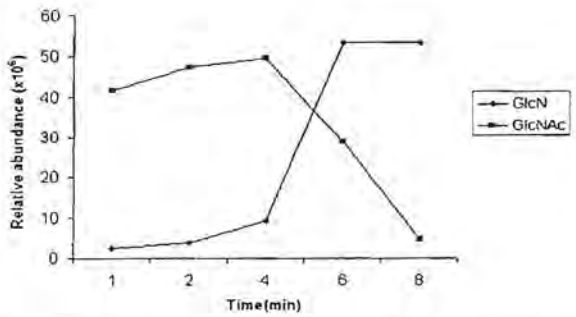


Fig. 5. MS signal intensities of GlcNAc and GlcN during chitin hydrolysis in 38% HCl (1:5, w/w) at 40 C with 30 min pre-sonication.

Table 2
Purity and recovery mass of solid A, solid B and solid C from fractional precipitation.

Hydrolysis conditions	Solid A		Solid B		Solid C		GlcNAc yield (%)
	% purity	% mass	% purity	% mass	% purity	% mass	
30 C, 4 h	75	27	77	13	>95	37	65
40 C, 2 h	65	27	73	30	>95	16	55
40 C, 3 h	69	20	67	28	>95	33	64
50 C, 2 h	67	30	75	20	92	10	43
60 C, 1 h	71	55	81	21	92	5	60

4. Conclusion

The acid hydrolysis of α-chitin with 38% HCl to GlcN.HCl can be accelerated by microwave irradiation. The reaction rate acceleration is likely to be a result of the faster heating rate rather than the superheating or selective heating. The hydrolysis gave GlcN.HCl comparable to the conventional heating within 12 min which is much shorter than 90 min normally required. Sonication brought about the dissolution of chitin in HCl even at 20 C that provides a method for selective acid hydrolysis of chitin at low temperature to produce GlcNAc. This is the first report of \microwave and ultrasonic wave assisted acid hydrolysis of chitin in the preparation of amino monosaccharide, GlcN.HCl and GlcNAc.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the financial support from the National Research Council of Thailand (NRCT) in the project of "Production of Amino Sugar Food Supplement from Squid Pen", the National Research University of CHE and the Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund (AM1006A), and the 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund for the financial support. This work is part of the Project for Establishment of Comprehensive Center for Innovative Food, Health Products and Agriculture supported by the Thai government stimulus package 2 (TKK2555, SP2).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.04.064.

References

Capelo-Martinez, J. L. (2009). *Ultrasound in chemistry. Analytical applications*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., pp. 129–147
Chesnokov, V., Sun, C., & Itakura, K. (2009). Glucosamine suppresses proliferation of human prostate carcinoma DU145 cells through inhibition of STAT3 signaling. *Cancer Cell International, 10*(9), 25.
D Ambrosio, E., Casa, B., Bompani, R., Scali, G., & Scali, M. (1981). Glucosamine sulfate: A controlled clinical investigation in arthrosis. *Pharmacotherpeutica, 2*, 504–508.
Da Camara, C. C., & Dowless, G. V. (1998). Glucosamine sulfate for osteoarthritis. *The Annals of Pharmacotherapy, 32*, 580–587.
Floc'h, F., & Werner, G. H. (1976). In vivo antiviral activity of D-glucosamine. *Archives of Virology, 52*, 169–173.
Gandhi, N., & Laidler, J. K. (2002). Preparation of glucosamine hydrochloride. U.S. patent 6,486,307 B1.

Please cite this article in press as: Ajavakom, A., et al. Products from microwave and ultrasonic wave assisted acid hydrolysis of chitin. *Carbohydrate Polymers* (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.04.064

Gladman, D. D., & Farewell, V. T. (1999). Progression in psoriatic arthritis: Role of time varying clinical indicators. *Journal of Rheumatology, 26*, 2409–2413.
Hauselman, H. J. (2001). Nutripharmaceuticals for osteoarthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology, 15*, 595–607.
Ingle, T. R., Vaidya, S. H., & Pai, M. V. (1973). Production of D-glucosamine hydrochloride (GAH) from fish canning waste. *Research and Industry, 18*, 54–56.
Ishiguro, N., Kojima, T., & Poole, A. R. (2002). Mechanism of cartilage destruction in osteoarthritis. *Nagoya Journal of Medical Science, 65*, 73–84.
Kamasastri, P. R., & Prabhu, P. V. (1961). Preparation of chitin and glucosamine from prawn shell waste. *Journal of Scientific & Industrial Research (India), 20D*(12), 466.
Kidak, R., & Ince, N. H. (2006). Ultrasonic destruction of phenol and substituted phenols: A review of current research. *Ultrasonics Sonochemistry, 13*, 195–199.
Klaikherd, A., Jayanta, M. L., Boonjawat, S., Aiba, J., & Sukwattanasinitt, S. M. (2004). Depolymerization of β-chitin to mono- and disaccharides by the serum fraction from the para rubber tree, *Hevea brasiliensis*. *Carbohydrate Research, 339*, 2799–2804.
Mackay, D. J., & Miller, A. L. (2003). Nutritional support for wound healing. *Alternative Medicine Review, 8*, 359–377.
Mankin, H. J., Brandt, K. D., & Shulman, L. E. (1986). Workshop on etiopathogenesis of osteoarthritis. Proceedings and recommendations. *Journal of Rheumatology, 13*, 1130–1160.
Matheson, A. J., & Perry, C. M. (2003). Glucosamine: A review of its use in the management of osteoarthritis. *Drugs & Aging, 20*, 1041–1060.
Mats, L., & Kristofer, O. (2006). *Microwave methods in organic synthesis*. Berlin/Heidelberg/New York: Springer.
Mayor, S., Menon, A. K., Cross, G. A., Ferguson, M. A., Dwek, R. A., & Rademacher, T. W. (1990). Glycolipid precursors for the membrane anchor of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoproteins. I. Can structure of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C sensitive and resistant glycolipids. *Journal of Biological Chemistry, 265*, 6164–6173.
Menon, A. K., Mayor, S., Ferguson, M. A., Duszenko, M., & Cross, G. A. (1988). Candidate glycophospholipid precursor for the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry, 263*, 1970–1977.
Mojarrad, J. S., Nemati, M., Valizadeh, H., Ansarin, M., & Bourbour, S. (2007). Preparation of glucosamine from exoskeleton of shrimp and predicting production yield by response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55*, 2246–2250.
Mutyala, S., Fairbridge, C., Pare, J. R. J., Bélanger, J. M. R., Ng, S., & Hawkins, R. (2010). Microwave applications to oil sands and petroleum: A review. *Fuel Processing Technology, 91*, 127–135.
Muzzarelli, R. A. A. (2012). *Chitin nanostructures in living organisms. Chitin: Formation and digenesis, vol. 34*. Dordrecht: Springer., pp. 1–34.
Muzzarelli, R. A. A., Boudrant, J., Meyer, D., Manno, N., DeMarchis, M., & Paoletti, M. G. (2012). A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science on the chitin bicentennial. *Carbohydrate Polymers, 87*, 995–1012.
Novikov, V. Y. (2004). Acid hydrolysis of chitin and chitosan. *Russian Journal of Applied Chemistry, 77*, 484–487.
Pichyangkura, R., Kudan, S., Kuttiyawong, K., Sukwattanasinitt, M., & Aiba, S. (2002). Quantitative production of *N*-acetyl-D-glucosamine from crystalline chitin by chitinase. *Carbohydrate Research, 337*, 557–559.
Pillai, C. K. S., Paul, W., & Sharma, C. P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science, 34*, 641–678.
Rashad, A. E., Hegab, M. I., Abdel-Megeid, R. E., Micky, J. A., & Abdel-Megeid, F. M. (2008). Synthesis and antiviral evaluation of some new pyrazole and fused pyrazolopyrimidine derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry, 16*, 7102–7106.
Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science, 31*, 603–632.
Sakai, K. (1995). *Chitin chitosan handbook*. Tokyo: Japan Society of Chitin and Chitosan. pp. 209–210.
Sashiwa, H., Fujishima, S., Yamano, N., Kawasaki, N., Nakayama, A., Muraki, E., et al. (2003). Enzymatic production of *N*-acetyl-D-glucosamine from chitin Degradation study of *N*-acetylchitooligosaccharide and the effect of mixing of crude enzymes. *Carbohydrate Polymers, 51*, 391–395.
Srogi, K. (2006). A review: Application of microwave techniques for environmental analytical chemistry. *Analytical Letters, 39*, 1261–1288.
Sukwattanasinitt, M., Zhu, H., Sashiwa, H., & Aiba, S. (2002). Utilization of commercial non-chitinase enzymes from fungi for preparation of 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose from β-chitin. *Carbohydrate Research, 337*, 133–137.
Szego, F., & Makk, A. (1982). Methods and compositions for the promotion of hair growth. U.S. Patent 4,329,338.
Todd, C. (2002). Meeting the therapeutic challenge of the patient with osteoarthritis. *Journal of the American Pharmacists Association (Wash.), 42*, 74–82.
White, T., & Stegemann, J. A. (2001). *Advance in environmental materials, vol. II*. Singapore: Material Research Society., pp. 249–260.

Please cite this article in press as: Ajavakom, A., et al. Products from microwave and ultrasonic wave assisted acid hydrolysis of chitin. *Carbohydrate Polymers* (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.04.064