

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกให้ความสนใจกับการค้นหาและผลิตพอลิเมอร์จากธรรมชาติชนิดใหม่ ๆ ขึ้นมา เพื่อทดแทนโพลิเมอร์ธรรมชาติชนิดเดิม เช่น แป้ง เซลลูโลส และไคติน ซึ่งมีข้อดีที่สำคัญคือ ไม่ละลายน้ำ รวมถึงมีความหนืดสูงขึ้น เมื่อมีขนาดโมเลกุลสูงขึ้น สมบัติเหล่านี้จะส่งผลกระทบต่อกระบวนการผลิต รูป รส สัมผัส และกลิ่นของผลิตภัณฑ์ที่ได้ ลิแวนเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่มีลักษณะเด่นคือ ละลายน้ำได้ดี และเมื่อมีขนาดโมเลกุลสูงขึ้น ความหนืดของพอลิเมอร์จะไม่เพิ่มขึ้นมากนัก ลิแวนเป็นฮอโมพอลิเมอร์ของฟรุกโทส โดยแต่ละโมเลกุลของฟรุกโทสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ บีตา-(2,6)-ไกลโคซิดิก และมีโซ่กิ่งซึ่งจะเชื่อมอยู่กับโซ่หลักด้วยพันธะ บีตา-(2,1)-ไกลโคซิดิก พีช รา และแบคทีเรียบางชนิดสามารถสังเคราะห์ลิแวนได้ ลิแวนจากพีช เช่น กรามิแนน เป็นโพลิเมอร์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำเมื่อเทียบกับลิแวนจากรา และแบคทีเรียซึ่งมีขนาดโมเลกุลได้มากถึง 10^6 ดาลตัน ในทางการแพทย์ลิแวนเป็นโพลิเมอร์ที่ใช้เพิ่มเวลาการออกฤทธิ์และควบคุมการปลดปล่อยยาภายในร่างกาย (Liepa และคณะ, 1993) ลิแวนสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้ออกบางชนิด (Sang และคณะ, 2004) และสารอนุพันธ์ของลิแวนบางชนิดยังเป็นที่ยอมรับว่าสามารถต้านทานไวรัส HIV ได้ (Han, 1990) อีกทั้งเป็นสารให้ความหวานที่ไม่ให้พลังงานซึ่งเหมาะกับการนำไปใช้กับผู้ป่วยโรคเบาหวาน (Gibson และ Roberfroid, 1995) ในทางการเกษตร ลิแวนช่วยเร่งการเจริญเติบโต และการงอกของเมล็ดได้เป็นอย่างดี (Ingrid และคณะ, 2003) ในด้านอาหารมีการใช้ลิแวนเป็นสารพรีไบโอติก (Cummings และคณะ, 2001) นอกจากนี้ยังช่วยลดคอเลสเตอรอล และไตรกลีเซอไรด์ในเลือดได้อีกด้วย (Ishihara, 1996 และ Yamamoto และคณะ, 1999) แต่อย่างไรก็ตามการ

ประยุกต์ใช้ลิแวนยังไม่แพร่หลายมากนัก เนื่องจากข้อจำกัดในด้านการผลิต ลิแวนโดยมากสกัดมาจากพืชซึ่งสามารถผลิตได้ในปริมาณน้อยจึงทำให้ลิแวนมีราคาสูงจึงมีความพยายามที่จะผลิตลิแวนโดยอาศัยปฏิกิริยาการหมักของแบคทีเรีย ปัจจุบันพบแบคทีเรียหลายชนิดที่ผลิตลิแวนได้ โดยอาศัยการเร่งปฏิกิริยาร่วมกันของเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส ไอโซเมอร์เรส และโพลิเมอร์เรส ได้แก่ กลูแคนเนส กลูโคไอโซเมอร์เรส และลิแวนซูเครส โดยเอนไซม์ที่ทำหน้าที่หลักในการสร้างลิแวนคือ ลิแวนซูเครส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถสลายซูโครสให้กลายเป็นกลูโคสและฟรุกโทส จากนั้นนำฟรุกโทสที่ได้ไปต่อกันเป็นลิแวน ลิแวนซูเครสจาก *Zymomonas mobilis* เป็นตัวอย่างของเอนไซม์ที่ได้รับความสนใจในขณะนี้ เนื่องจากมีลักษณะเด่นหลายประการเช่น เร่งปฏิกิริยาได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 0-40° C โดยมี pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาตั้งแต่ 4-8 ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเร่งปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิและ pH ต่ำนี้ ทำให้ใช้เอนไซม์ในรูปเซลล์แบคทีเรียได้ โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการผลิตเอนไซม์ และทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ ซึ่งนับเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการผลิตลิแวน นอกจากเอนไซม์ชนิดนี้แล้ว ยังมีเอนไซม์จากแบคทีเรียบางชนิดที่กำลังเป็นที่สนใจเช่นลิแวนซูเครสจาก *Bacillus polymyxa* และ *Lactobacillus reuteri* แต่อย่างไรก็ตามลิแวนซูเครสจากแบคทีเรียทั้งสามชนิดยังมีข้อจำกัดคือ ให้ปริมาณลิแวนน้อย โดย *Bacillus polymyxa*, *Lactobacillus reuteri*, และ *Zymomonas mobilis* ให้ลิแวนเพียง 26.6, 24.5, และ 23 % ตามลำดับ (Hestrin และคณะ, 1994, Gell-Schutten และคณะ, 2002 และ Beker และคณะ, 1993) ในทางทฤษฎีการผลิตลิแวนจากซูโครสโดยเอนไซม์ชนิดนี้จะให้ผลิตภัณฑ์มากถึง 50 %(W/W)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยจึงมีความประสงค์ที่จะคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตลิแวนได้ในปริมาณมากจากขนมไทย โดยทั่วไปขนมไทยมักใช้น้ำตาลทรายเป็นส่วนผสมจำนวนมาก ดังนั้นเมื่อทิ้งให้อาหารเหล่านี้เกิดการเน่าเสีย แบคทีเรียบางชนิดที่ปนเปื้อนมาในขนมไทยสามารถผลิตสารในกลุ่มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ซึ่งมีลิแวนรวมอยู่ด้วย โดยสังเกตจากสารเมือกที่เกิดขึ้นเมื่ออาหารเริ่มเน่าเสีย

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตลิแวน จากแหล่งต่าง ๆ ภายในประเทศไทย
- 1.2.2 เพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียที่สามารถผลิตลิแวน โดยวิธีทางชีวเคมี และวิธีเปรียบเทียบ

ลำดับเบสของ 16S rRNA ได้

- 1.2.3 เพื่อผลิตลิแวน โดยอาศัยการทำงานของแบคทีเรียที่แยกได้ในประเทศไทย

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตพอลิแซ็กการไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ได้จากขนมไทยที่มีข้าวเหนียวและน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ ข้าวต้มมัด บะจ่าง และข้าวเหนียวหน้าปลาแห้ง ข้าวเหนียวหน้ากุ้ง และข้าวเหนียวหน้าสังขยา

- 1.3.2 แยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตพอลิแซ็กการไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ได้ให้บริสุทธิ์

- 1.3.3 ระบุชนิดของแบคทีเรียที่แยกให้บริสุทธิ์แล้ว

1.3.3.1 ระบุชนิดของแบคทีเรียโดยวิธีทางชีวเคมี ตามหลักของ Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology

1.3.3.2 ระบุชนิดของแบคทีเรียโดยการเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rRNA กับยีนชนิดเดียวกันจากสิ่งมีชีวิตอื่นในฐานข้อมูลโดย Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

- 1.3.4 ผลิตพอลิแซ็กการไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์

- 1.3.5 ตรวจสอบชนิดของพอลิแซ็กการไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ที่ผลิตได้

13.5.1 ตรวจสอบชนิดของพอลิแซ็กการไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์โดยทำปฏิกิริยา Saliwanolf ซึ่งเป็นปฏิกิริยาเฉพาะของน้ำตาลกลีโคส

13.5.2 ตรวจสอบชนิดของคีโทสด้วยเทคนิค TLC เทียบกับน้ำตาลมาตรฐานชนิด หากคีโทสที่เกิดขึ้นเป็นฟรุกโทสจะเรียกพอลิแซ็กการไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ที่ผลิตได้ว่าฟรุกแทน

13.5.2 ตรวจสอบชนิดของฟรุกแทนด้วย $^{13}\text{C-NMR}$

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1.4.1 สามารถคัดเลือก และระบุชนิดของแบคทีเรียที่สามารถผลิตลิแวนได้

1.4.2 สามารถผลิตลิแวน เพื่อพัฒนาประโยชน์ใช้สอยในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ในอนาคต

1.5 สถานที่ทำวิจัยและเก็บข้อมูล

1.5.1 ห้องปฏิบัติการเคมี 11603 โปรแกรมวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต

1.5.2 ศูนย์เชี่ยวชาญเทคโนโลยี ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.5.3 ศูนย์เชี่ยวชาญมหโมเลกุล ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.6 ระยะเวลาที่ใช้ในการทำวิจัย

วันที่ 14 มีนาคม 2549 – 13 กุมภาพันธ์ 2550 รวมระยะเวลาทั้งสิ้น 1 ปี

1.7 นิยามศัพท์เฉพาะ

1.7.1 ลิแวน (levan) เป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่เกิดจากการรวมกันเป็นสายของน้ำตาลฟรุกโทส โดยฟรุกโทสแต่ละหน่วยย่อยในสายหลักเชื่อมกันด้วยพันธะบีต้า-2,6-ไกลโคซิดิก (β -2,6-glycosidic bond) ส่วนในบริเวณที่โซ่กิ่งเชื่อมกับสายหลักนั้น ฟรุกโทสทั้งสองหน่วยเชื่อมกับด้วยพันธะบีต้า-2,1-ไกลโคซิดิก (β -2,1-glycosidic bond) ลิแวนพบได้ทั้งในพืชและจุลินทรีย์ โดยลิแวนจากพืชเกิดจากฟรุกโทสตั้งแต่ 10-200 หน่วย มักมีขนาดเล็กกว่าลิแวนจากจุลินทรีย์ซึ่งอาจเกิดจากฟรุกโทส 50-5000 หน่วย ลิแวนจากจุลินทรีย์นั้นมักจะถูกสร้างในรูปเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ (exopolysaccharide) โดยการเร่งปฏิกิริยาของลิแวนซูเครส

1.7.2 บีต้า-2,6-ฟรุกโทซิลทรานสเฟอร์เรส และลิแวนซูเครส (β -2,6-fructosyltransferase and levansucrase) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มทรานสเฟอร์เรส (transferase family) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการย้ายน้ำตาลฟรุกโทสจากซูโครสไปยังตัวรับหลายชนิดทำให้เกิดเป็นพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ รวมทั้งสามารถสลายพอลิเมอร์ที่สร้างขึ้นมาได้ด้วย ลิแวนซูเครสสามารถเร่งปฏิกิริยาได้หลายปฏิกิริยาเช่น พอลิโมไรเซชัน ไฮโดรไลซิส และคิสปรอปพอกิเนชัน