

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลิแวน (Levan)

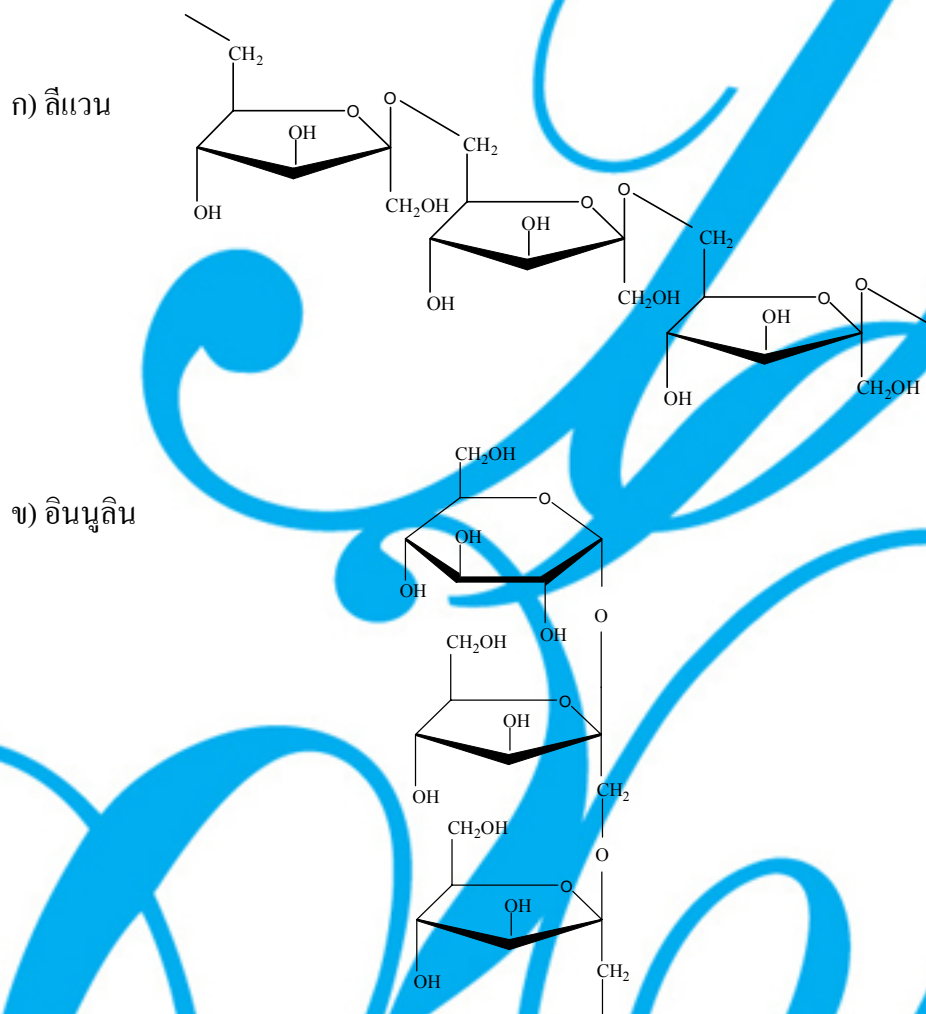
ฟรุกแทนเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่เกิดจากการรวมกันเป็นสายของน้ำตาลฟรุกโทส โดยฟรุกโทสแต่ละหน่วยย่อยจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีต้า-2,6-ไกลโคซิดิก (β -(2,6-glycosidic bond) หรือพันธะบีต้า-2,1-ไกลโคซิดิก (β -(2,1-glycosidic bond) เมื่อแบ่งฟรุกแทนตามลักษณะของพันธะที่ใช้เชื่อมต่อกจะทำให้แบ่ง ฟรุกแทนได้ 2 ประเภท คือ ลิแวน และ อินนูลิน

ลิแวนคือ พอลิฟรุกโทส โดยฟรุกโทสแต่ละหน่วยย่อยในสายหลักเชื่อมกันด้วยพันธะบีต้า-2,6-ไกลโคซิดิก ส่วนในบริเวณที่โซ่กิ่งเชื่อมกับสายหลักนั้น ฟรุกโทสทั้งสองหน่วยเชื่อมกับด้วยพันธะบีต้า-2,1-ไกลโคซิดิก ดังแสดงในแผนภาพที่ 2.1 ก)

อินนูลินคือ พอลิฟรุกโทส โดยฟรุกโทสแต่ละหน่วยย่อยในสายหลักเชื่อมกันด้วยพันธะบีต้า-2,1-ไกลโคซิดิก ส่วนในบริเวณที่โซ่กิ่งเชื่อมกับสายหลักนั้น ฟรุกโทสทั้งสองหน่วยเชื่อมกับด้วยพันธะบีต้า-2,6-ไกลโคซิดิก ดังแสดงในแผนภาพที่ 2.1 ข)

ลิแวนพบได้ทั้งในพืชและจุลินทรีย์โดยลิแวนจากพืช เช่น กรามิแนน (graminan) และฟลีอิน (phlein) เกิดจากฟรุกโทสตั้งแต่ 10-200 หน่วย ซึ่งมักมีขนาดเล็กกว่าลิแวนจากจุลินทรีย์ซึ่งอาจเกิดจากฟรุกโทส 50-5000 หน่วย ลิแวนจากจุลินทรีย์นั้นมักจะถูกสร้างในรูปของพอลิแซ็กการไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์โดยการเร่งปฏิกิริยาของลิแวนซูเครส (sucrose-6-fructosyltransferase; EC 2.4.1.10) โดยใช้ซูโครสหรือแรมฟิโนสเป็นสารตั้งต้น จุลินทรีย์ที่ผลิตลิแวนได้เช่น *Bacillus subtilis* *Bacillus polymyza* *Zymomonas mobilis* และ *Ewinia amylovara* ส่วนการผลิตลิแวนในระดับอุตสาหกรรมนั้น

ยังมีข้อจำกัด ในปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับการผลิตลิแวนโดยใช้เทคโนโลยีการหมักเพิ่มขึ้นซึ่งเป็นแรงกระตุ้นให้นักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มพยายามพัฒนาและประยุกต์ใช้ประโยชน์จากลิแวนมากขึ้น



แผนภาพที่ 2.1

โครงสร้างเคมีของฟรุกแทน

ก)

ลิแวน

ข)

อินนูลิน

2.2 โครงสร้างและสมบัติทางเคมีของลิแวน (Structure and Chemical properties of levan)

ฟรุกแทนเป็นโมเลกุลที่มีความหลากหลายเชิงโครงสร้างสูงโดยมักประกอบด้วยกลูโคส 1 โมเลกุลเชื่อมอยู่กับฟรุกโทส 2 โมเลกุลขึ้นไป ฟรุกแทนขนาดเล็กที่สุดที่พบในธรรมชาติคือฟรุกแทนไตรแซคคาไรด์ (fructantrisaccharide) ปัจจุบันถูกค้นพบแล้ว 3 ชนิดได้แก่

1-คีสโทส (1-kestose) หรือไอโซคีโทส (isokestose) เป็นไตรแซคคาไรด์ที่เกิดจากฟรุกโทสเชื่อมต่อกับฟรุกโทสของซูโครสที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ดังแสดงในแผนภาพที่ 2.2 ก)

6-คีสโทส (6-kestose) เป็นไตรแซคคาไรด์ที่เกิดจากฟรุกโทสเชื่อมต่อกับฟรุกโทสของซูโครสที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ดังแสดงในแผนภาพที่ 2.2 ข)

นีโอคีสโทส (neokestose) เป็นไตรแซคคาไรด์ที่เกิดจากฟรุกโทสเชื่อมต่อกับกลูโคสของซูโครสที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ดังแสดงในแผนภาพที่ 2.2 ค)

ดังนั้นไตรแซคคาไรด์สองชนิดแรกคือ 1-คีสโทส และ 6-คีสโทสจะมีปลายด้านหนึ่งเป็นฟรุกโทส ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งเป็นกลูโคสที่มาจากซูโครส ในขณะที่นีโอคีสโทสจะมีปลายทั้งสองด้านเป็นฟรุกโทส (Nelson และ Spollen, 1987)

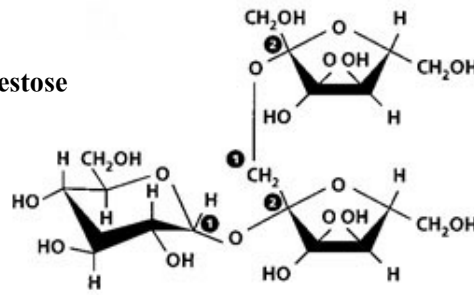
ลิแวนประกอบด้วยน้ำตาลบีต้า-ดี-ฟรุกโทฟูแรนโนส (β -D-fructofuranose) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีต้า-2,6-ไกลโคซิดิก โดยมี 6-คีสโทสเป็นหน่วยย่อย ลิแวนจะมีโซ่กิ่งซึ่งเชื่อมด้วยพันธะบีต้า-2,1-ไกลโคซิดิก โดยน้ำตาลตัวแรกจะเป็นบีต้า-ดี-ฟรุกโทฟูแรนโนส หรือบีต้า-ดี-กลูโคฟูแรนโนส (β -D-glucopyranose) ก็ได้ ลิแวนจะมีการแตกโซ่กิ่งมากกว่าอินนูลิน โดยพบว่าอินนูลินจะมีการแตกโซ่กิ่งประมาณ 5-7% ของโซ่หลักเท่านั้น (Wolff และคณะ, 2000)

โครงสร้างระดับโมเลกุลของลิแวนได้ก่อกำเนิดทรานส์อิเล็กตรอนมีลักษณะเป็นผลึกแบบอสัณฐาน ส่วนมากมีภาพร่างกลม ซึ่งให้เห็นว่าการสังเคราะห์ลิแวนเกิดในทุก ๆ ด้านในอัตราที่สม่ำเสมอ

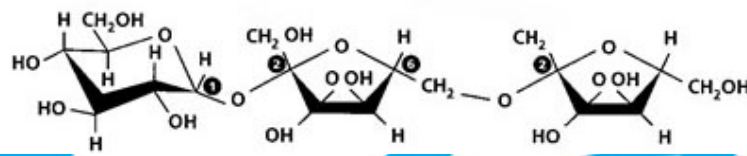
(Newburn และคณะ, 1971) น้ำหนักโมเลกุลของดีแวนจากแบคทีเรียมีค่าระหว่าง 2×10^6 ถึง 10^7 ดาลตัน (Keith และคณะ, 1991) ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลนี้จะมีค่าแตกต่างกันออกไปขึ้นกับชนิดของแบคทีเรีย

สถานะในการสังเคราะห์ ความแรงของไอออน อุณหภูมิ และพอลิเมอร์ชนิดอื่น ๆ ที่สังเคราะห์ขึ้นพร้อมกับดีแวน (Ammar-Ben และคณะ, 2002) ความหนืดของดีแวนขึ้นกับน้ำหนักโมเลกุล ดีแวนที่ละลายอยู่ในน้ำจะมีความหนืดเพิ่มขึ้นอย่างมากในสถานะที่มีเกลืออยู่ แต่จะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิเพียงเล็กน้อย (Kang และ Cottrell, 1979) ดีแวนมูรณะนางแสงโพลาไรซ์ไปทางซ้าย ละลายได้ดีในน้ำเย็น และละลายได้ดีขึ้นในน้ำร้อน ไม่ละลายในเอทานอลบริสุทธิ์ โดยทั่วไปดีแวนละลายได้ดีกว่าอินนูลินซึ่งส่วนใหญ่ (95.5%) จะไม่ละลายน้ำที่อุณหภูมิห้อง (Phelps, 1995) การที่ดีแวนละลายได้ดีกว่าอินนูลินน่าจะเป็นผลจากการเชื่อมต่อดัวยพันธะบีต้า-2,6-ไกลโคซิดิกซึ่งมีความยืดหยุ่นมากกว่าพันธะบีต้า-2,1-ไกลโคซิดิกในอินนูลิน ดีแวนไม่สลายโดยอินเวอร์เทส (invertase) และอะมิเลส (amylase) แต่สลายได้ด้วยกรด ดีแวนไม่เปลี่ยนสีสารละลายไอโอดีน แต่เกิดสีบานเย็นกับสารละลายไฮโดรเจนคลอไรด์ซึ่งนิยมใช้แยกดีแวนออกจากพอลิแซคคาไรด์ชนิดอื่น ๆ ที่ไม่มีองค์ประกอบเป็นฟรุกโทส (Pontis และ Del-Campillo, 1985)

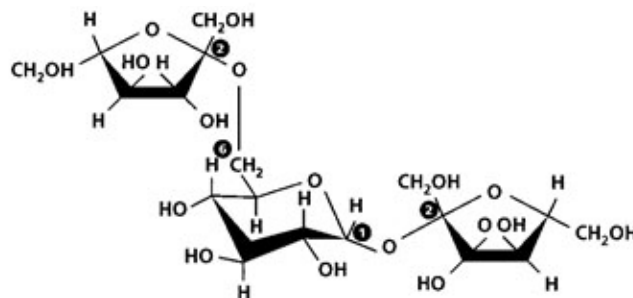
ก) 1-kestose



ข) 6-kestose



ค) neokestose



แผนภาพที่ 2.2 โครงสร้างเคมีของฟรุกแทนไตรแซคคาไรด์

ก) 1-คีสโทส ข) 6-คีสโทส ค) นีโอคีสโทส

ที่มา Vijn และ Smeekens, 1999

2.3 แหล่งที่พบ (Occurrence)

สิ่งมีชีวิตสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ขึ้นหลายชนิด ขึ้นกับชนิด หน้าที่และแหล่งที่พบของสิ่งมีชีวิต ซึ่งพอลิแซ็กคาไรด์เหล่านี้มีความหลากหลายทางโครงสร้างสูง ลิแวนเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่สร้างโดยสิ่งมีชีวิตหลายชนิดเช่น หญ้า *Dactylis glomerata* *Poa secunda* และ *Agorpyron cristatum* ข้าว *Hordeum vulgare* ส่วนสิ่งมีชีวิตที่ผลิตลิแวนมากที่สุดคือจุลินทรีย์ เช่น ยีสต์ รา และแบคทีเรียต่างดังแสดงในตารางที่ 2.1 แบคทีเรียในช่องปากเช่น *Streptococcus Rothis* และ *Odontomyces* สามารถผลิตลิแวนได้ เช่นเดียวกับแบคทีเรียจากดินโดยเฉพาะจีส *Bacillus* ได้แก่ *Bacillus polymyxa* (Aymerich, 1990) *Bacillus subtilis* ซึ่งยีสที่ผลิตลิแวนจากแบคทีเรียชนิดนี้เมื่อถ่ายให้แก่พืชแล้วพบว่าพืชทนเค็มได้มากขึ้น (Suzuki และ Chatterton, 1993, Kunst และ Rapoport, 1995) นอกจากนี้ยังพบลิแวนจาก *Pseudomonas* sp. ซึ่งมีบทบาทในระบบป้องกันตัวเองของพืช (Hettwer และคณะ, 1998) ขณะที่ลิแวนที่ได้จาก *Zymomonas mobilis* มีฤทธิ์ต้านทานการเจริญของเซลล์เนื้องอก (Calazans และคณะ, 2000) นอกจากนี้ยังพบลิแวนที่ผลิตจากแบคทีเรียในจีส *Lactobacillus* อีกด้วย (Van Geel-Schutten และคณะ, 1999)

ตารางที่ 2.1 จุลินทรีย์ที่ผลิตลิแวนได้

| จุลินทรีย์ | อ้างอิง |
|--|---|
| <i>Acetobacter xylinum</i> | Tajima และคณะ, 1998 |
| <i>Acinomyces naeslundii</i> | Bergeron และคณะ, 2000 |
| <i>Bacillus circulans</i> | Perez Oseguera และคณะ, 1996 |
| <i>Bacillus stearothormophilus</i> | Li และคณะ, 1997 |
| <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> | Arrieta และคณะ, 1996 |
| <i>Lactobacillus reuteri</i> | Van Geel-Schutten และคณะ, 1999 |
| <i>Pseudomonas syingae</i> pv. <i>Phaseolicola</i> | Hettwer และคณะ, 1995 |
| <i>Pseudomonas syingae</i> pv. <i>Glycinea</i> | Hettwer และคณะ, 1998 |
| <i>Rahnella aquatilis</i> | Ohtsuka และคณะ, 1992; Song และคณะ, 1998 |
| <i>Serratia levanicum</i> | Kojima และคณะ, 1993 |
| <i>Zymomonas mobilis</i> | Song และคณะ, 1993 |

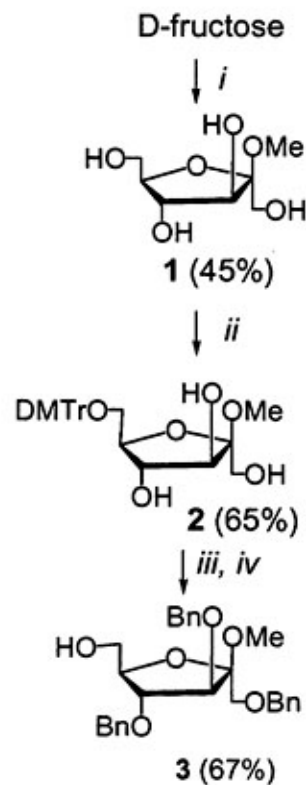
2.4 การสังเคราะห์ลิแวน (Levan synthesis)

การสังเคราะห์ลิแวนทำได้ 2 วิธีคือวิธีทางเคมี และวิธีทางชีวภาพโดยทั้งสองวิธีมีข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกันออกไป การสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีต้องอาศัยสารเคมีในการทำปฏิกิริยาหลายชนิด และมีต้นทุนในการผลิตสูงแต่ควบคุมปฏิกิริยาได้ง่าย และป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคได้เป็นอย่างดี ส่วนการสังเคราะห์ลิแวนด้วยวิธีทางชีวภาพนั้นทำได้โดยอาศัยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ลิแวนซูเครสซึ่งผลิตขึ้นจากจุลินทรีย์ เป็นวิธีที่ไม่ซับซ้อนมากนัก ลิแวนที่ได้ผลิตขึ้นจากซูโครสโดยตรง หากเลือก จุลินทรีย์ที่ไม่ก่อโรคมานั้นตัวผลิตก็จะลดปัญหาด้านการก่อโรคไปได้

2.4.1 การสังเคราะห์ลิแกนด์ด้วยวิธีทางเคมี (Chemical synthesis)

การสังเคราะห์ลิแกนด์ด้วยวิธีทางเคมีเป็นวิธีที่ซับซ้อน อาศัยปฏิกิริยามากกว่า 10 ขั้นตอน ทำได้โดยการเตรียมตัวรับฟรุกโทฟูแรนโนส(fructofuranosyl acceptor) และ ตัวให้(fructofuranosyl donor) จากนั้นนำสารทั้งสองตัวมาทำปฏิกิริยาคู่ควบ (coupling reaction) เกิดเป็นไดแซคคาร์ไรด์ไตรแซคคาร์ไรด์ และพอลิเมอร์สายยาวต่อไป

การเตรียมตัวรับฟรุกโทฟูแรนโนส (fructofuranosyl acceptor) ทำได้ดังแสดงในแผนภาพที่ 2.3 ขั้นที่ 1 เปลี่ยนน้ำตาลฟรุกโทสเป็นเมทิล บีต้า-ดี-ฟรุกโทฟูแรนโนไซด์ (methyl- β -D-fructofuranoside) หรือเรียกว่าสาร 1 โดยทำปฏิกิริยากับเมทานอลและกรดซัลฟูริก ขั้นที่ 2 ทำปฏิกิริยาไตรทิลเลชัน (tritylation) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ของสาร 1 ด้วย 4,4'-ไดเมท็อกซีไตรทิลคลอไรด์ (4,4'-dimethoxytrityl chloride; DMTrCl) โดยใช้ไพริดีน(pyridine) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เกิดผลของปฏิกิริยาเป็น 6-O-(4,4'-ไดเมท็อกซีไตรฟีนิล)-เมทิล-บีต้า-ดี-ฟรุกโทฟูแรนโนไซด์ (6-O-(4,4'-dimethoxytriphenyl)-methyl- β -D-fructofuranoside) หรือสาร 2 จากนั้นในขั้นที่ 3 เติมหุ่มเบนซีนที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 3 และ 4 ของสาร 2 เกิดเป็นสาร 3 ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับฟรุกโทฟูแรนโนสมีชื่อทางเคมีว่าเมทิล 1, 3, 4-ไตร-โอ-เบนซิล-บีต้า-ดี-ฟรุกโทฟูแรนโนไซด์ (1, 3, 4-tri-O-benzyl- β -D-fructofuranoside)

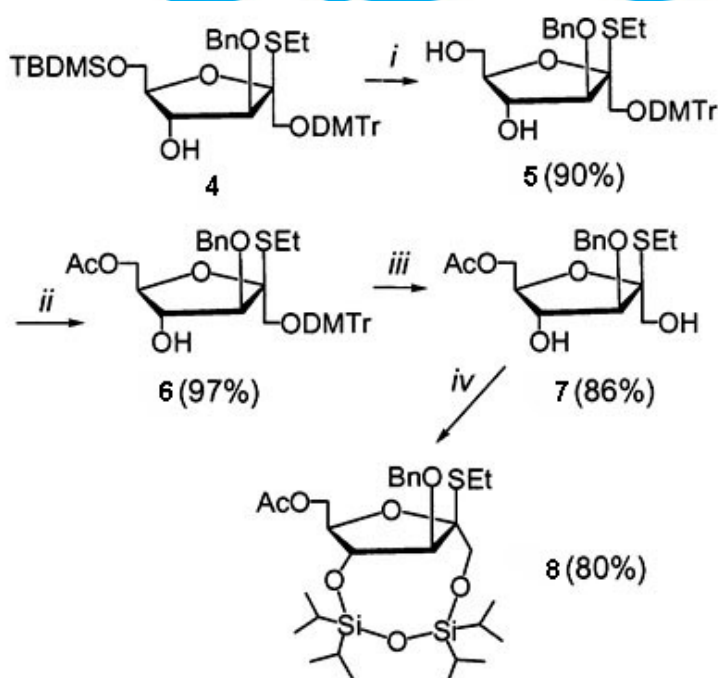


แผนภาพที่ 2.3 การเตรียมตัวรับฟรุกโทฟูแรนโนสจากฟรุกโทส

ที่มา Oscarson และ W-Schgelmeble, 2002

การเตรียมตัวให้ฟรุกโทฟูแรนโนส (fructofuranosyl acceptor) ทำได้ดังแสดงในแผนภาพที่ 2.4 ในขั้นที่ 1 โดยการเติมเตตระบิวทิลแอมโมเนียม ฟลูออไรด์ (tetrabutylammonium fluoride; TBAF) ซึ่งละลายในไตรไฮโดรฟลูออไรด์ (trihydrofluoride) ให้ผลของปฏิกิริยาเป็นเอทิล 3-โอ-เบนซิล-1-โอ-(4,4'-ไดเมท็อกไทรฟีนิล)เมทิล-2-ไทโอ-เบต้า-ดี-ฟรุกโทฟูแรนโนไซด์ (ethyl 3-O-benzyl-1-O(4,4'-dimethoxytriphenyl)methyl-2-thio- β -D-fructofuranoside) เรียกสารนี้ว่าสารที่ 5 ขั้นที่ 2 เติมหมู่เอซิทิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ของสารที่ 5 ได้ผลของปฏิกิริยาเป็นเอทิล 6-โอ-เอซิทิล-3-โอ-เบนซิล-1-

โอ-(4-4'-ไดเมท็อกไตรีฟีนิล)-เมทิล-2-ไทโอ-เบต้า-D-ฟรุกโทฟูแรนโนไซด์ (ethyl 6-O-acetyl-3-O-benzyl-1-O-(4-4'-dimethoxytriphenyl)-methyl-2-thio- β -D-fructofuranoside) เรียกสารนี้ว่าสาร 6 ขั้นที่ 3 ทำปฏิกิริยา detritylation ดึงหมู่ DMTr ออกจากสาร 6 เกิดผลของปฏิกิริยาเป็นเอทิล-6-โอ-แอซิทิล-3-โอ-เบนซิล-2-ไทโอ-เบต้า-D-ฟรุกโทฟูแรนโนไซด์ (ethyl-6-O-acetyl-3-O-benzyl-2-thio- β -D-fructofuranoside) เรียกสารนี้ว่าสาร 7 ในขั้นที่ 4 เติม 1, 3-ไดคลอโร-1, 1, 3, 3-เตตระไอโซโพรพิลไดไซลอกเซน (1, 3-dichloro-1, 1, 3, 3-tetraisopropylidisiloxane) และอิมิดาโซล (imidazol) โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 °C ให้ผลของปฏิกิริยาเป็นเอทิล-6-โอ-แอซิทิล-3-โอ-เบนซิล-1, 4-โอ-(1, 1, 3, 3-เตตระไอโซโพรพิลไดไซลอกเซน-1, 3-ไดอิล)-2-ไทโอ-เบต้า-D-ฟรุกโทฟูแรนโนไซด์ (ethyl-6-O-acetyl-3-O-benzyl-1,4-O-(1, 1, 3, 3-tetraisopropylidisiloxane-1, 3-diyl)-2-thio- β -D-fructofuranoside) หรือสาร 8

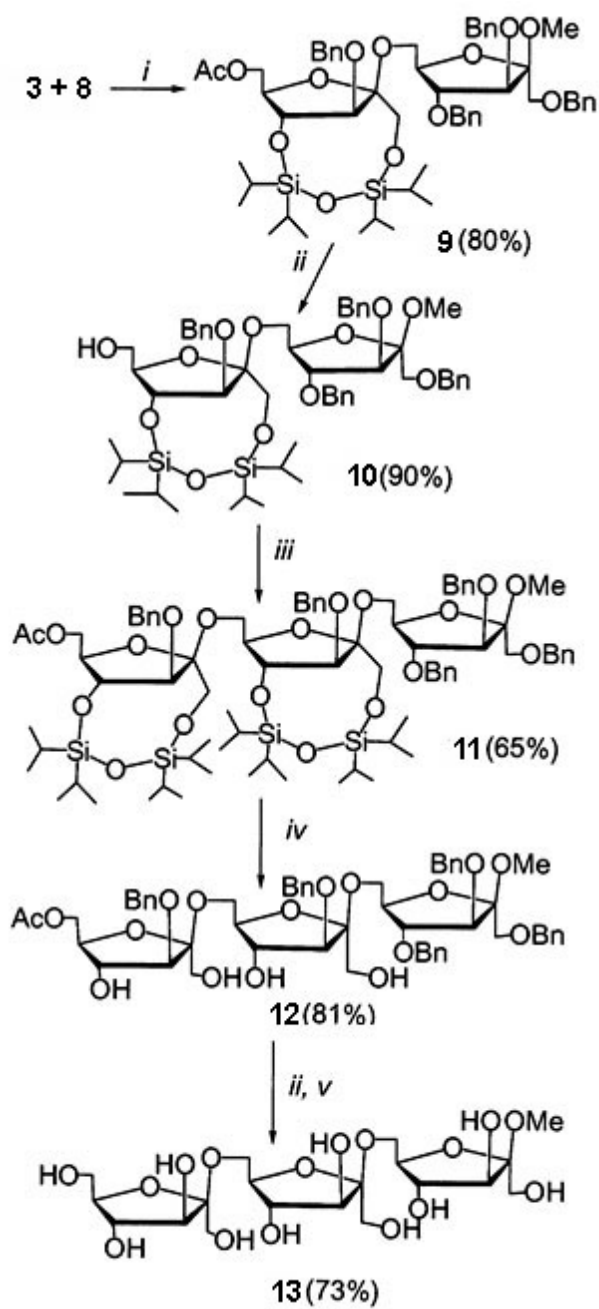


แผนภาพที่ 2.4 การเตรียมตัวให้ฟรุกโทฟูแรนโนสจากฟรุกโทส

ที่มา ดัดแปลงจาก Oscarson และ W-Sehgelmeble, 2002

การสังเคราะห์ลิแวน ทำได้ดังแสดงในแผนภาพที่ 2.5 ในขั้นที่ 1 การเกิดปฏิกิริยาคู่ควบระหว่างตัวรับ 3 และตัวให้ 8 โดยการใช้ไดเมทิล(เมทิลไทโอ)ซัลโฟเนียมไตรเฟต (dimethyl(methylthio)sulfoniumtriflate; DMTST) เกิดเป็นอนุพันธ์ของลิแวนไบโอส (levanbise) มีชื่อทางเคมีว่า เมทิล-6-โอ-แอซิทิล-3-โอ-เบนซิล-1,4-โอ-(1,1,3,3-เตตระไอโซโพรพิลไดไซล๊อกเซน-1,3-ไดอิล)-เบต้า-ดี-ฟรุกโทฟูแรนโนซิล-(2→6)-1,3,4-ไตร-โอ-เบนซิล-เบต้า-ดี-ฟรุกโทฟูแรนโนไซด์(methyl 6-O-acetyl-3-O-benzyl-1,4-O-(1,1,3,3-tetraisopropyl disiloxane-1,3-diyl)-β-D-fructofuranosyl-(2→6)-1,3,4-tri-O-benzyl-β-D-fructofuranoside) หรือสารที่ 9 ในขั้นที่ 2 ดึงหมู่แอซิทิลออกจากสารที่ 9 โดยใช้เมทานอลิก โซเดียม เมท็อกไซด์ (methanolic sodium methoxide) ในการทำปฏิกิริยาเกิดเป็นตัวรับฟรุกโตฟูแรนโนสใหม่ เรียกว่า เมทิล 3-โอ-เบนซิล-1,4-โอ-(1,1,3,3-เตตระไอโซโพรพิลไดไซล๊อกเซน-1,3-ไดอิล)-เบต้า-ดี-ฟรุกโทฟูแรนโนซิล-(2→6)-1,3,4-ไตร-โอ-เบนซิล-เบต้า-ดี-ฟรุกโทฟูแรนโนไซด์(methyl 3-O-benzyl-1,4-O-(1,1,3,3-tetraisopropyl disiloxane-1,3-diyl)-β-D-fructofuranosyl-(2→6)-1,3,4-tri-O-benzyl-β-D-fructofuranoside) หรือสารที่ 10 ในขั้นที่ 3 นำสาร 10 มาทำปฏิกิริยาไกลโคซิลเลชัน (glycosylation) โดยใช้สาร 8 เป็นตัวให้ฟรุกโตฟูแรนโนสอีกครั้งเกิดเป็นอนุพันธ์ของลิแวนไตรโอส (levantriose) มีชื่อเคมีว่าเมทิล 6-โอ-แอซิทิล-3-โอ-เบนซิล-1,4-โอ-(1,1,3,3-เตตระไอโซโพรพิลไดไซล๊อกเซน-1,3-ไดอิล)-เบต้า-ดี-ฟรุกโทฟูแรนโนซิล-(2→6)-3-โอ-เบนซิล-1,4-โอ-(1,1,3,3-เตตระไอโซโพรพิลไดไซล๊อกเซน-1,3-ไดอิล)-เบต้า-ดี-ฟรุกโทฟูแรนโนซิล-(2→6)-1,3,4-ไตร-โอ-เบนซิล-เบต้า-ดี-ฟรุกโทฟูแรนโนไซด์ (methyl 6-O-acetyl-3-O-benzyl-1,4-O-(1,1,3,3-tetraisopropyl disiloxane-1,3-diyl)-β-D-fructofuranosyl-(2→6)-3-O-benzyl-1,4-O-(1,1,3,3-tetraisopropyl disiloxane-1,3-diyl)-β-D-fructofuranosyl-(2→6)-1,3,4-tri-O-benzyl-β-D-fructofuranoside) หรือสารที่ 11 ในขั้นนี้ตัวให้ฟรุกโตฟูแรนโนส (สาร 8) จะถูกสลายไปทำให้ตัวรับฟรุกโตฟูแรนโนส (สาร 9) เหลือ ในการทำปฏิกิริยา

คู่ควบจึงต้องใช้สาร 9 มากเกินพอเพื่อให้เกิดเป็นสาร 11 ตามต้องการ ขั้นที่ 4 คิงหมู่แอซิติต ออกจากสาร 11 โดยการทำปฏิกิริยากับทริส(ไดเมทิลลามิโน)ซัลโฟเนียมไดฟลูออโรไตรเมทิลซิลิเกต (Tris(dimethylamino)sulfoniumdifluorotrimethylsilicate; TASF) เกิดเป็นตัวรับชนิดใหม่มีชื่อทางเคมีว่า เมทิล 6-โอ-แอซิติล-3-โอ-เบนซิล-เบต้า-ดี-ฟรุกโทฟูแรนโนซิล-(2→6)-3-โอ-เบนซิล-เบต้า-ดี-ฟรุกโทฟูแรนโนซิล-(2→6)-1,3,4-ไตร-โอ-เบนซิล-เบต้า-ดี-ฟรุกโทฟูแรนโนไซด์ (methyl 6-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl-β-D-fructofuranosyl-(2→6)-3-*O*-benzyl-β-D-fructofuranosyl-(2→6)-1,3,4-tri-*O*-benzyl-β-D-fructofuranoside) หรือสารที่ 12 ขั้นที่ 5 เดิมโซเดียมเมท็อกไซด์ (sodium methoxide) ลงในสาร 12 เพื่อคิงหมู่เบนซินทั้งหมดออกจากสาร 12 เกิดเป็นอนุพันธ์ของลิแวนไตรโอส (levantriose) ซึ่งมีชื่อเคมีว่า เมทิล-เบต้า-ดี-ฟรุกโทฟูแรนโนซิล-(2→6)-เบต้า-ดี-ฟรุกโทฟูแรนโนซิล-(2→6)-เบต้า-ดี-ฟรุกโทฟูแรนโนซิล-(2→6)ฟรุกโทฟูแรนโนไซด์ (methyl-β-D-fructofuranosyl-(2→6)-β-D-fructofuranosyl-(2→6)-β-D-fructofuranosyl-(2→6)-fructofuranoside) หรือสาร 13 ซึ่งสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ลิแวนสายยาวต่อไป (Oscarson และ W-Schgelmeble, 2002)



แผนภาพที่ 2.5 การสังเคราะห์ลิแกนด์

ที่มา ดัดแปลงจาก Oscarson และ W-Sehgelmeble, 2002

2.4.2 การสังเคราะห์ลิแวนด้วยวิธีทางชีวภาพ (Biological synthesis)

การสังเคราะห์ลิแวนด้วยวิธีทางชีวภาพทำได้โดยการเร่งปฏิกิริยาของลิแวนซูเครสซึ่งมีความจำเพาะต่อซูโครส ลิแวนซูเครส (levansucrase, sucrose: 2, 6- β -D-fructosyltransferase, sucrose-6-fructosyltransferase, EC 2.4.1.10) ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Hestrin และคณะ ในปีค.ศ. 1943 เอนไซม์นี้มีอยู่ในภายในเซลล์และสามารถเหนี่ยวนำให้ผลิตและส่งออกมานอกเซลล์ได้ (Han, 1990) หน้าที่ของลิแวนซูเครสที่อยู่ภายในเซลล์ยังไม่ทราบแน่ชัด ส่วนลิแวนซูเครสที่ผลิตออกมาภายนอกเซลล์นั้นเพื่อผลิตลิแวน แล้วแบคทีเรียใช้ลิแวนในการยึดเกาะกับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ หรือตรึงอาหารให้อยู่ใกล้เซลล์ทำให้ง่ายแก่การส่งเอนไซม์อื่น ๆ ออกไปสลายอาหารเหล่านั้นแล้วจึงเข้ามาภายในเซลล์

ลิแวนซูเครสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มทรานส์เฟอเรส (transferase family) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการย้ายน้ำตาลฟรุกโทสจากซูโครสไปยังตัวรับหลายชนิด ลิแวนซูเครสสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ 5 ปฏิกิริยาดังนี้

ปฏิกิริยาที่ 1 พอลิเมอไรเซชัน (Polymerization)



ปฏิกิริยาที่ 2 ไฮโดรไลซิส (Hydrolysis)



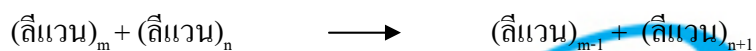
ปฏิกิริยาที่ 3 ปฏิกิริยาคู่ควบกับตัวรับ (Acceptor)



ปฏิกิริยาที่ 4 ปฏิกิริยาแลกเปลี่ยน (Exchange)



ปฏิกิริยาที่ 5 คิสพروبพอกิเนชั่น (Disproportionation)



การสังเคราะห์ลิแวนโดยแบคทีเรีย ลิแวนซูเครสจะเร่งปฏิกิริยาการเกิดพอลิเมอร์ไรซ์เซชันและไฮโดรไลซิสไปพร้อมกัน ทำให้เกิดพอลิเมอร์ที่มีฟรุกโทสเป็นองค์ประกอบเพียงอย่างเดียว และเหลือกลูโคสอิสระอยู่ในปฏิกิริยา ปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นได้เมื่อมีซูโครสเป็นตัวให้หมู่ฟรุกโทซิล (fructosyl group) เพียงชนิดเดียว (Chambert และคณะ, 1976) การต่อสายของลิแวนเกิดจากการนำหมู่ฟรุกโทซิลมาต่อเข้ากับตัวรับที่ละหู่ โดยอาศัยกลไกการเร่งปฏิกิริยาแบบปิงปอง (ping-pong mechanism) คือซูโครสจะถูกสลายเป็นกลูโคสและฟรุกโทสก่อน แล้วจึงย้ายเป็นหมู่ฟรุกโทซิลไปต่อกับตัวรับ จากนั้นค่อยเริ่มสลายซูโครสโมเลกุลใหม่อีกครั้ง (Chambert และคณะ, 1976)

เมื่อนำทำหน้าที่เป็นตัวรับ (ปฏิกิริยาที่ 2 ไฮโดรไลซิส) จะเกิดฟรุกโทสอิสระจากทั้งซูโครสและลิแวน ปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นโดยการเร่งปฏิกิริยาของลิแวนซูเครสทุกชนิด แต่มีอัตราการเร่งปฏิกิริยาช้ากว่าปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรซ์เซชัน เมื่อใช้น้ำตาลเป็นตัวรับหมู่ฟรุกโทซิล

เมื่อสารอื่นๆทำหน้าที่เป็นตัวรับ (ปฏิกิริยาที่ 3) เกิดขึ้นเมื่อมีตัวรับอื่นในปฏิกิริยาหรือสิ่งแวดล้อมของเอนไซม์ ลิแวนซูเครสเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่ฟรุกโทซิลจากกลูโคสไปยังหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ของตัวรับที่เป็นสารพวกอัลโดส (aldose) เช่น เมทานอล กลีเซอรอล หรือออลิโกแซคคาร์ไบด์ชนิดอื่นๆ

ปฏิกิริยาที่ 4 เป็นปฏิกิริยาที่คล้ายกับปฏิกิริยาที่ 2 และ 3 แต่ในปฏิกิริยาที่ 4 จะทำให้เกิดซูโครส (ฟรุกโทส- ^{14}C กลูโคส) ซึ่งมีพลังงานพันธะสูงกว่าการใช้ตัวรับที่เป็นอัลโดสอื่น ๆ

ปฏิกิริยาที่ 5 ตัดฟรุกโทสจากลิแวนโมเลกุลหนึ่งไปต่อกับลิแวนอีกโมเลกุลหนึ่ง เพื่อเปลี่ยนอัตราการแพร่ของลิแวน หรือออลิโกลิแวนที่เกิดขึ้น

ปฏิกิริยาทั้ง 5 ปฏิกิริยานี้จะเกิดแข่งขันกันทำให้เกิดผลิตภัณฑ์หลักเพียงชนิดเดียว ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาใดขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ความแรงไอออน อุณหภูมิ ความเป็นกรด-เบส และสารที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับ

การสังเคราะห์ลิแวนโดยพืชจะเกิดปฏิกิริยาแบบ 2 ขั้นตอน โดยซูโครส : ซูโครส 1- ฟรุกโทซิลทรานเฟอเรส (sucrose: sucrose 1- fructosyltransferase; 1-FFT, EC 2.4.1.100) จะย้ายหมู่ฟรุกโทซิลจากฟรุกแทนที่มีดีกรีการต่อสาย (degree of polymerization; DP) ≥ 3 ไปให้แก่ฟรุกแทนที่มีดีกรีการต่อสาย ≥ 2 ทำให้เกิดฟรุกแทนที่มีขนาดต่างกัน (Sprengr และคณะ, 1995)

2.5 การผลิตลิแวนด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ (Biotechnological Production of Levan)

การผลิตลิแวนโดยเทคโนโลยีชีวภาพทำได้โดยอาศัยเทคโนโลยีการหมักจุลินทรีย์ และการสังเคราะห์โดยเอนไซม์ ซึ่งการสังเคราะห์โดยใช้เอนไซม์ที่ปราศจากเซลล์นี้จะให้ผลิตภัณฑ์สูงกว่าการหมักโดยใช้จุลินทรีย์ ซึ่งการผลิตลิแวนด้วยเทคโนโลยีชีวภาพมีขั้นตอนที่สำคัญดังนี้

2.5.1 การแยกและการคัดเลือกจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ผลิตลิแวน (Isolation and Screening for Levan-producing stains)

ในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตลิแวนนั้น สามารถทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ได้บนอาหารแข็งที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน จุลินทรีย์ที่ผลิตลิแวนได้จะสร้างสารเมือกออกมารอบโคโลนี จากนั้นเก็บสารเมือกที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นมาทดสอบด้วยแอลกอฮอล์ (เมทานอล เอทานอล หรือไอโซโพรพานอล) แล้วนำตะกอนที่ได้มาตรวจสอบชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบ โดยการย่อยด้วยกรดแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี (Zweig และ Whitaker, 1971)

2.5.2 การผลิตลิแวนโดยเทคโนโลยีการหมัก (Fermentative production of levan)

การผลิตลิแวนจากจุลินทรีย์โดยการหมักนั้นมักเกิดปัญหาเนื่องจากความหนืดของพอลิเมอร์ที่ผลิตขึ้นมา โดยมีสถานะที่ใช้ในการหมักต่างกันออกไปขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ แต่ผลผลิตของลิแวนที่ได้ก็ยังไม่มากดังแสดงในตารางที่ 2 เนื่องจากสาเหตุต่าง ๆ เช่น จุลินทรีย์ใช้ซูโครสส่วนหนึ่งเป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโต ส่วนที่เหลือจึงนำไปสร้างลิแวน จุลินทรีย์สร้างสารอื่นขึ้นจากซูโครส จุลินทรีย์จึงผลิตลิแวนซูโครสได้น้อย จุลินทรีย์จะผลิตลิแวนเนส (levanase) ซึ่งสลายลิแวนที่สร้างขึ้นรวมทั้งกระบวนการเก็บลิแวนที่ได้จากหมักก็ทำได้ไม่เต็มที่เนื่องจากความหนืดของลิแวนเอง ในทางทฤษฎีลิแวนที่ผลิตจากซูโครสโดยลิแวนเนสต้องมามากถึง 50% โดยน้ำหนัก แต่จากการทดลองผลิตลิแวนที่ได้จากการหมักนี้ได้ผลผลิตไม่เกินร้อยละ 58 ของผลผลิตที่ควรจะได้

ตารางที่ 2.2 การผลิตลิแวนโดยเทคโนโลยีการหมัก

| สายพันธุ์ | วิธีหมัก | ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น(%) | ลิแวน (%โดยน้ำหนัก) ¹ | อ้างอิง |
|------------------------------|----------|------------------------------|----------------------------------|----------------------|
| <i>Bacillus ssp.</i> | BF | 12 | 23.5 | Elisaahvili, 1984 |
| <i>Bacillus polymyxa</i> | BF | 15 | 26.6 | Han, 1990 |
| <i>Erwinia herbicola</i> | CF | 5 | 19.2 | Keith และคณะ, 1991 |
| <i>Gluconobacter oxydans</i> | BF | 6.2 | 23.3 | Uchiyama, 1993 |
| <i>Rahnella aquatilis</i> | BF | 10 | 29 | Ohtsuka และคณะ, 1992 |
| <i>Zymomonas mobilis</i> | CF | 12 | 23 | Beker และคณะ, 1990 |

หมายเหตุ BF: batch fermentation; CF: continuous fermentation

¹ คำนวณจากซูโครสที่ใช้หมดไปในการทดลอง

2.5.3 การผลิตลิแวนโดยเอนไซม์ (Enzymatic production of levan)

การสังเคราะห์ลิแวนโดยลิแวนซูเครสนั้นมักใช้ซูโครสเป็นสารตั้งต้น โดยลิแวนซูเครสจะสลายซูโครสเพื่อนำฟรุกโทสไปสร้างลิแวน ส่วนกลูโคสที่เหลือหากมีปริมาณมากจะยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา โดยกลูโคสจะแย่งจับลิแวนซูเครส ซึ่งปัญหานี้สามารถแก้ไขโดยการเติมดี-ไซโลส(D-xylose) แอล-อะราบิโนส(L-arabinose) หรือแลคโทส(lactose) ลิแวนซูเครสซึ่งเร่งปฏิกิริยาได้ดีในสภาวะที่แตกต่างกัน

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์ลิแวนของลิแวนซูเครสจาก *Z. mobilis* มีช่วงกว้างตั้งแต่ 0°C ถึง 40°C โดยเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่ 0°C (Song และคณะ, 1996) ลิแวนซูเครสจาก *B. subtilis* เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 10°C (Elisashvili, 1998) ลิแวนซูเครสจาก *Pseudomonas* เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ 18°C (Hettwer และคณะ, 1995) ลิแวนซูเครสจาก *Rahnells* 40°C (Ohtsuka และคณะ, 1992) ลิแวนซูเครสส่วนใหญ่จะไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิเกิน 45°C ยกเว้นลิแวนซูเครสจาก *R. aquatilis* ATCC330701 ซึ่งมีอัตราการสังเคราะห์ลิแวนสูงสุดที่ 50°C ในเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นอัตราการสังเคราะห์จะลดลงเล็กน้อย จากคุณสมบัตินี้ทำให้ลิแวนซูเครสโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ลิแวนซูเครสจาก *Z. mobilis* นั้นเหมาะสำหรับการผลิตลิแวนในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ 0°C ซึ่งจะลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ในกระบวนการผลิตได้ ลิแวนซูเครสจาก *Z. mobilis* เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ pH 4 ถึง 7 โดยจะไม่สามารถสังเคราะห์ลิแวนได้ที่ pH ต่ำกว่า 3 และสูงกว่า 9 ได้ ซึ่งคล้ายกับเอนไซม์จาก *Bacillus Psuedomonas* และ *Rahnella* ซึ่งเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ pH 6 แต่อย่างไรก็ตามมีลิแวนซูเครสบางชนิดที่ยังทำงานได้ดีที่สภาวะอื่น ๆ เช่น ลิแวนซูเครสจาก *B. lincheniformis* NRRLB-18963 ยังทำงานได้ประมาณ 50 % ของการทำงานสูงสุดที่ 55°C และ pH 4 (Song และคณะ, 1996)

เมื่อการทดลองตรึงลิแวนซูเครสจาก *Z. mobilis* ไว้ในไฮดรอกซีอะพาไทด์ (hydroxyapatite) พบว่า การเร่งปฏิกิริยาและสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ตรึงคล้ายกับเอนไซม์อิสระ (Lang และคณะ,

2000) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อตรึงลิแวนซูเครสชนิดเดียวกันลงบนผิวของไฮดรอกซีอะพาไทด์พบว่า ลิแวนซูเครส เร่งปฏิกิริยาได้ดีในช่วงกรด นอกจากนี้อัตราส่วนระหว่างพอลิเมอร์ขนาดเล็กต่อพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ก็ยังเพิ่มขึ้นอีกด้วย (Lang และคณะ, 2001)

2.6 การประยุกต์ใช้ประโยชน์ของลิแวน (Applications of levan)

ลิแวนมีประโยชน์ใช้สอยในเชิงอุตสาหกรรมหลายด้าน เช่น ในทางการแพทย์ การเกษตรและอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งเป็นผลมาจากความพยายามในการปรับปรุงวิธีการผลิตลิแวนอย่างต่อเนื่อง

2.6.1 การประยุกต์ใช้ลิแวนในทางการแพทย์

ลิแวนที่ผลิตโดยจุลินทรีย์จะออกฤทธิ์โดยตรงต่อเซลล์เนื้อเยื่อ โดยมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ คือ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการเลือกผ่าน (Leibovici และ Stark, 1995; Calazans et al. 2000) นอกจากนี้ยังมีรายงานอีกว่าลิแวนมีความสามารถในการป้องกันสารกัมมันตภาพรังสี และมีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียบางชนิด (Vina และคณะ 1998) อนุพันธ์ของลิแวนบางชนิดยังสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ อนุพันธ์ซัลเฟต ฟอสเฟตและแอซิติลเลต ยังสามารถต้านเชื้อเอดส์ได้อีกด้วย (Clarke และคณะ, 1997) นอกจากนี้ลิแวนที่ผ่านการสลายให้มีขนาดเล็กลงยังใช้เป็นสารเพิ่มเติมในเลือดเพื่อยืดอายุของเลือด เนื่องจากลิแวนเป็นสารโพลีเมอร์ที่ถูกกำจัดออกจากเลือดช้าและไม่เป็นพิษ (Schechter และ Hestrin, 1963) ลิแวนเป็นโพลีเมอร์ที่ละลายน้ำ และมีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันตามแหล่งผลิตและสภาวะในการผลิต ทำให้ลิแวนที่ได้มีความหนืดที่ต่างกัน ลิแวนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะมีความหนืดน้อยมักใช้เป็นตัวประสานในยาเม็ด ส่วนลิแวนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงมักใช้เป็นตัวทำน้ำที่ควบคุมการปลดปล่อยยาออกมาสู่กระแสเลือด (Iman และ Abd-Allah, 1974) ลิแวนยังสามารถระดับโคเลสเตอรอลในกระแสเลือดของหนูทดลอง ซึ่งอาจนำไปสู่การพัฒนาเป็นสารช่วยลดระดับโคเลสเตอรอลในอนาคต (Yamamoto และคณะ, 1999)

2.6.2 การประยุกต์ใช้ลิแวนในด้านเกษตรกรรม

พืชทั้งในเขตร้อนและเขตหนาวหลายชนิดสามารถผลิตลิแวน เพื่อใช้เป็นคาร์โบไฮเดรตสำรอง เนื่องจากสภาพอากาศที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างรุนแรง จากรายงานพบว่า การสร้างลิแวนของพืชตระกูลรักเร่ (*Jerusalem artichoke*) ยังคงอยู่ 50% เมื่ออุณหภูมิลดลงเหลือ 5 °C ซึ่งในสภาวะปรกติพืชชนิดนี้จะสามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 20-25 °C (Koops และ Jonker, 1996) จึงมีความพยายามที่จะสร้างพืชตัดต่อพันธุกรรมโดยการถ่ายถอดยีนที่ผลิตลิแวนจาก *Bacillus subtilis* และ *Zymomonas mobilis* ให้แก่ต้นยาสูบ พบว่าต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้จะมีความสามารถทนต่อสภาวะอากาศแห้งแล้งและหนาวเย็นได้ดีขึ้น (Smits และคณะ, 1999 และ Park และคณะ, 1999) นอกจากนี้ยังมีผู้ที่ทำการทดลองนำพืชที่ดัดแปลงพันธุกรรมให้มีการสร้างลิแวนมาเป็นอาหารสัตว์ พบว่า แบคทีเรียในลำไส้ของวัวสามารถย่อยอาหารต่างๆ ได้ดีขึ้น (Biggs และ Hancock, 1998) ลิแวนยังเป็นสารปรับสภาพของดินโดยส่งผลให้อัตราการงอกของเมล็ดพืชหลายชนิดดีขึ้น (Iman และ Abd-Allah, 1974)

2.6.3 การประยุกต์ใช้ลิแวนในอุตสาหกรรมอาหาร

ลิแวนและลิแวนเฮปตะโอส (levanheptaose) เป็นแหล่งคาร์บอนของแบคทีเรียในลำไส้เล็กเช่น *Bifidobacterium adolescentis* *Lactobacillus acidophilus* และ *Eubacterium limosum* ส่วน *Clostridium perfringens* *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ไม่สามารถย่อยสลายลิแวนได้ (Kang และคณะ, 2000) จึงทำให้ลิแวนมีสมบัติเป็นสารพรีไบโอติก (prebiotic) ซึ่งทำหน้าที่ช่วยกระตุ้นให้แบคทีเรียในทางเดินอาหารเช่น *Lactobacillus* sp. ทำงานได้ดีขึ้น (Muller และ Seyfarth, 1997) ลิแวนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะมีสมบัติคล้ายน้ำตาลหรือกลูโคสไซรัป แต่ละลายง่ายกว่าและมีความหวานมากกว่าซูโครสประมาณ 30-50% และเนื่องจากร่างกายไม่สามารถย่อยสลายพันธะบีต้า-2,6-ไกลโคซิดิกและพันธะบีต้า-2,1-ไกลโคซิดิกภายใน โมเลกุลของลิแวนได้จึงนิยมใช้ลิแวนเป็นสารให้ความหวานแทน

สารสังเคราะห์เช่น เอสปาแตม (aspartame) และ แอซิซัลเฟม เค(acesulfame K) นอกจากนี้การเติมลิแวนขนาดเล็กลงในขนมหวานยังช่วยลดจุดเยือกแข็ง และทำหน้าที่เป็นตัวผสมในซ็อกโกเล็ตแบบแท่ง นอกจากนี้ยังผสมในอาหารเพื่อสุขภาพอื่น ๆ ซึ่งอาหารที่ผสมลิแวนนี้จัดเป็นอาหารที่ให้พลังงานต่ำและมีเส้นใยมากเหมาะกับผู้ป่วยที่ต้องการควบคุมระดับน้ำตาลและคนที่ต้องการรักษาสุขภาพ (Wiedmann และ Jager, 1997)

2.7 ลิขสิทธิ์ที่เกี่ยวข้อง (Relevant patents)

ปัจจุบันมีสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับการประยุกต์ใช้ลิแวนในรูปแบบต่าง ๆ (ดังแสดงในตารางที่ 2.3) เช่น ลิแวนจาก *S. salivarius* ใช้เป็นสารแต่งเติมในอาหารที่ช่วยลดระดับโคเลสเตอรอล (Kazuoki, 1996) อนุพันธ์ซัลเฟตของมีฤทธิ์ต้านไวรัส HIV (Robert และคณะ, 1998) นอกจากนี้ฟรุกแทน-เอ็น-อัลคิลยูรีเทน (fructan-*N*-alkylurethane) ซึ่งเกิดจากการแทนที่หมู่ไฮดรอกซี (hydroxyl group) ของฟรุกโทสด้วย หมู่อัลคิลามิโนคาร์บอนิลออกไซด์ (alkylaminocarbonyloxy group) ยังถูกจดลิขสิทธิ์ในภาพของสารลดแรงตึงผิวซึ่งเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ในครัวเรือน (Stevens และคณะ, 1999)

ส่วนลิขสิทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับลิแวนซูเครสนั้น สันเกตว่ามียีสต์ลิแวนซูเครสเพียงไม่กี่ชนิดที่โคลนได้และได้รับลิขสิทธิ์ เช่น ยีสต์ลิแวนซูเครสจาก *Z. mobilis* (Rhee และ Song, 1998) *R. aquatilis* (Rhee และคณะ, 1999) และ *A. diazotrophicus* (Juan และคณะ, 1998) นอกจากนี้ยังมีลิขสิทธิ์ของการถ่ายยีสต์ลิแวนซูเครสของ *Z. mobilis* ให้กับพืชของนักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมันอีกด้วย (Roerber และคณะ, 1994) ส่วนลิขสิทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตลิแวน โคนลิแวนซูเครสนั้นมีลิขสิทธิ์ของการผลิตลิแวนโดยเอนไซม์จาก *Bacillus* ซึ่งไม่ได้ใช้ชูโครสเป็นตัวเหนียวน้ำ (Roerber และคณะ, 1994)

ตารางที่ 2.3 สิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับการผลิตและการประยุกต์ใช้ลิแวน

| รหัสสิทธิบัตร | เจ้าของ | ผู้ประดิษฐ์ | ชื่อสิทธิบัตร | วันที่สิทธิบัตรมีผล |
|---------------|--|---------------------------------|--|--------------------------------|
| US 4,769,254 | IBI | Mays, T.D., Dally, E. I. | Microbial production of polyfructose. | September 6 th 1998 |
| US 4,927,757 | IRFI | Hatcher, H. J. และคณะ | Production of substantially pure fructose | May 22 rd 1990 |
| WO 94/04692 | IGF; Roeber, M.; Geire, G; Geider, K.; Willmitzer, L. | Roeber, M. และคณะ | DNA sequences which lead to the formation of polyfructans (levans), plasmids containing these sequences as well as a process for preparing transgenic plants | March 3 rd 1994 |
| US 5,334,524 | SOLVAY ENZYMES INC. | Robert, L. C. | Process for producing levansucrase using <i>Bacillus</i> | August 2 nd 1994 |
| US 5,527,284 | - | Kazuoki, I. | Antihyperlipidemic and antiobesity agent comprising levan or hydrolysis products thereof obtained from <i>Streptococcus salivarius</i> | June 17 th 1996 |
| US 5,547,863 | USASA | Han, Y. W., Clarke, M. A. | Production of fructan (lavan) polyfructose polymers using <i>Bacillus polymyxa</i> | August 20 th 1996 |
| WO 98/03184 | Clarke, G; Margaret, A; SPRI | Robert, E. J. และคณะ | Levan derivatives, their preparation, composition and applications including medical and food applications | January 29 th 1998 |

ตารางที่ 2.3 สิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับการผลิตและการประยุกต์ใช้ลิแวน (ต่อ)

| รหัสสิทธิบัตร | เจ้าของ | ผู้ประดิษฐ์ | ชื่อสิทธิบัตร | วันที่สิทธิบัตรมีผล |
|-----------------------|----------|--------------------------|---|--------------------------------|
| US 5,731,173 | - | Juan, G. A. S. และคณะ | Fructosyltransferase enzyme, method for its production and DNA encoding the enzyme | March 24 th 1998 |
| Korean patent 145946 | KRIBB | Rhee, S. K. และคณะ | Method for production of levan using levansucrase | May 6 th 1998 |
| Korean patent 176410 | KRIBB | Rhee, S. K. และคณะ | A novel levansucrase | November 13 th 1998 |
| Korean patent 0207960 | KRIBB | Rhee, S. K. และคณะ | Base and amino acid sequence of levansucrase derived from <i>Rahnella awuatilis</i> | April 14 th 1999 |
| EP 0964054 A1 | TS N. V. | Stevens, C. V. และคณะ | Surface-active alkylurethanes of fructans | December 15 th 1999 |
| Korean patent | KRIBB | Rhee, S. K. และคณะ | A process for preparation of alkyl β -D-fructoside using levansucrase | Febraury 28 th 2000 |
| Korean patent 262769 | KRIBB | Rhee, S. K. และคณะ | Novel polyethalene glycol/levan aqueous two-phase system and protein partitioning method using thereof. | May 6 th 2000 |

ตารางที่ 2.3 สิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับการผลิตและการประยุกต์ใช้ลิแวน (ต่อ)

| รหัสสิทธิบัตร | เจ้าของ | ผู้ประดิษฐ์ และคณะ | ชื่อสิทธิบัตร | วันที่สิทธิบัตรมีผล |
|----------------------------------|---|-----------------------|---|--------------------------------|
| WO 01/29185 | KRIBB and RBT | Rhee, S. K. และคณะ | Enzymatic production of difructose dianhydride IV from sucrose and relevant enzyme and gene encoding for them | October 19 th 2000 |
| WO 01/49127 | KRIBB and RBT | Rhee, S. K. และคณะ | Animal feed containing simple polysaccharides. | December 29 th 2000 |
| WO 02/050311 | Societedes Produits Nestle S. A.; | Vincent, Sébastien | Lactobacillus strain producing levan and its use in human or pet food productions | December 11 th 2001 |
| Japanese Patent 3734689 B2 | Nippon Beet Sugar Manufacturing Co., Ltd And JSTA | Hiroto, K. และคณะ | <i>E. coli</i> BL21 (DE3)- pET/LFT transformed host consists plasmid which does DNA of levanfructo- transferase (LFTase) gene | January 19 th 2006 |

หมายเหตุ EP:European Patent; IBI: Igene Biotechnology Institute;

IGF: INST GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG (DE); IRFI:Idaho Research Foundation Institute;

KRIBB: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology;

PCT: World Intellectual Property Organization; RBT: RealBioTech Co., Ltd;

SPRI: Sugar Processing Research Institute; TS N.V: Tiense Suikerraffinaderij N.V.;

US: United States Patent; USASA: The United States of America as represented by the Secretary
of Agriculture; WO: World IPO(PCT);JSTA: Japan Science and Technology Agency.

2.8 ปัญหาและข้อจำกัดในการผลิตลิวาน (Current problems and Limits in levan production)

แม้ว่าลิวานจะเป็นพอลิเมอร์ที่ละลายน้ำและมีความหนืดต่ำ แต่การประยุกต์ใช้งานของลิวานยังมีน้อยเนื่องจากลิวานเป็นพอลิเมอร์ที่ขุ่น ขึ้นสภาพได้ยาก ดังนั้นเพื่อเพิ่มประโยชน์ใช้สอยของลิวานจึงมีความพยายามพัฒนาวิธีการสังเคราะห์ลิวานทางชีวภาพด้วยเอนไซม์ชนิดใหม่ ๆ เพื่อควบคุมดีกรีพอลิเมอร์ไรซ์ น้ำหนักโมเลกุล และจำนวนโซ่กิ่ง นอกจากนี้ข้อจำกัดด้านการผลิตเมื่อเทียบต้นทุนการผลิตกับพอลิเมอร์ชนิดอื่น ๆ เช่น อินนูลินจากพืช พบว่าลิวานยังมีต้นทุนการผลิตสูงกว่ามาก เนื่องจากในการผลิตลิวานนั้นต้องผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์โดยการแยกลิวานออกจากซูโครส กลูโคส ฟรุกโทส และโอลิโกแซคคาไรด์ ที่มีเหลืออยู่ในปฏิกริยานั้นอาจทำได้โดยการกรองผ่านเยื่อเลือกผ่านโดยอาศัยขนาดที่ต่างกันของลิวานกับน้ำตาลอื่น ๆ น่าจะเป็นวิธีที่ดีที่สุดในขณะนี้