บทที่ 2

ปริทรรศน์วรรณกรรม

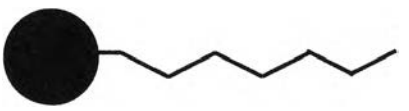
สารลดแรงตึงผิว (surfactant) และสารก่ออิมัลชัน (emulsifier) ถูกใช้อย่างแพร่หลายในชีวิตประจำวัน ทั้งในอุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมปิโตรเลียม และอุตสาหกรรมอาหาร เป็นต้น สารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในอุตสาหกรรมดังกล่าวมีอยู่มากมายหลายชนิดก็จริง แต่ก็ยังคงมีการพัฒนาเพื่อให้ได้สารใหม่ที่มีประสิทธิภาพมากกว่าเดิม (Cameotra and Makkar, 1998) ในปี 1997 อุตสาหกรรมการผลิตสารลดแรงตึงผิวมีมูลค่ามากกว่า 9 พันล้านเหรียญอเมริกาต่อปี (Desai และ Banat, 1997) สารลดแรงตึงผิวเหล่านี้ส่วนใหญ่แล้วสังเคราะห์ขึ้นโดยผ่านกระบวนการทางเคมีโดยใช้ปิโตรเลียมเป็นสารตั้งต้น มีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ย่อยสลายทางธรรมชาติได้ยาก และกระบวนการในการผลิตยังเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย ทำให้มีการออกกฎหมายให้ใช้สารลดแรงตึงผิวที่เข้าได้กับสิ่งแวดล้อม (Maier และ Soberon-Chavez, 2000) ต่อมามีคนหันไปสนใจสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเนื่องจากมันสามารถย่อยสลายเองได้ในธรรมชาติ มีความเป็นพิษต่ำ สามารถเข้ากันได้กับสิ่งแวดล้อม อีกทั้งสามารถผลิตจากสารตั้งต้นที่มีราคาถูกและมาจากทรัพยากรที่นำกลับมาใช้ใหม่ได้ (Mercade และคณะ, 1993; Babu และคณะ, 1996; Ishigami, 1997; Daniel และคณะ, 1998; Makkar และ Cameotra, 1999a, 1999b) ตลาดค้าขายสำคัญของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ใหญ่ที่สุดคืออุตสาหกรรมน้ำมันซึ่งรวมไปถึงการผลิตน้ำมันปิโตรเลียม ส่วนในอุตสาหกรรมน้ำมันอื่นๆ เช่น การกำจัดหรือกระจายคราบน้ำมันทั้งในพื้นดินและในทะเล การย้ายตะกอนน้ำมันออกจากถังเก็บน้ำมัน และเพิ่มประสิทธิภาพในการนำน้ำมันจากแหล่งธรรมชาติมาใช้ประโยชน์ (Banat และคณะ, 2000) จุดประสงค์ของการใช้สารลดแรงตึงผิวในอุตสาหกรรมน้ำมันคือเพื่อลดความหนืดของน้ำมัน ทำให้ง่ายในการการขนส่งและลำเลียงน้ำมันผ่านทางท่อส่งน้ำมัน (Bertrand และคณะ, 1994) Finnerty และ Singer (1985) ได้ศึกษาว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไกลโคลิพิดที่ผลิตได้จากแบคทีเรียที่ดิดสีแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่งชื่อว่า H13A สามารถลดความหนืดของน้ำมันได้ถึง 50% Emulsan ก็มีความสามารถในการลดความหนืดได้เช่นเดียวกัน (Hayes และคณะ, 1986) ตลาดที่รองลงมาคือ การใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นตัวช่วยผสมให้สารพอลิเมอร์เข้ากันในอุตสาหกรรมสี อุตสาหกรรมกระดาษ สิ่งทอ และเซรามิก (Banat และคณะ, 2000) ในด้านการแพทย์ แรมโนลิพิดที่ผลิตจาก *P. aeruginosa* (Itoh และคณะ, 1971) ไลโพเพพไทด์ที่ผลิตจาก *B. subtilis* (Sandrin และคณะ, 1990; Leenhouts และคณะ, 1995; Vollenbroich และคณะ, 1997) mannosylerythritol

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

lipids จาก *Candida antarctica* (Kitamoto และคณะ, 1993) และ ไซคลิก ไลโพเพพไทด์ (cyclic lipopeptides; CLPs) ผลิตจาก *Pseudomonas* spp. (Nielsen และคณะ, 2002) มีสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ ทางด้านการเกษตรมีการนำแรมโนลิพิดที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* ไปใช้แทนยาฆ่าราคือ *Pythium aphanidermatum* และ *Phytophora capsici* ที่ทำให้เกิดโรครากเน่าในแตงกวาและพริกไทย (Stanghellini และ Miller, 1997) ทางด้านเครื่องสำอาง Brown (1991) ได้พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีสมบัติเป็นตัวให้ความชุ่มชื้นและสามารถเข้าได้ดีกับผิว ซอฟฟอโรลิพิด (sophorolipids) เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *C. bombicola* KSM-36 และ *C. apicola* ผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยซอฟฟอโรลิพิด 1 โมล กับโพรพิลีนไกลคอล (propylene glycol) 12 โมล จะเข้ากันได้ดีกับผิวหนังและเอาไปใช้เป็นสารให้ความชุ่มชื้นแก่ผิวด้วย นอกจากนี้บริษัท Kao ยังนำซอฟฟอโรลิพิดไปใช้เป็นตัวดูดซับความชื้นในเครื่องสำอางยี่ห้อ Sofina เป็นต้น (Banat และคณะ, 2000) ทางด้านอุตสาหกรรมอาหารจะใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเช่น เลซิติน (Lecithin) เป็นตัวช่วยให้อาหารเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน (Bloomberg, 1991; Banat และคณะ, 2000) นอกจากนี้ Busscher และคณะ (1996) พบว่าการเคลือบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Streptococcus* sp. แยกได้จากนมและทนร้อน สามารถป้องกันการเจริญของ *S. thermophilus* บนแผ่นให้ความร้อนของเครื่องพาสเจอร์ไรส์ได้ ทำให้ไม่เกิดการเน่าเสียในกระบวนการผลิต

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

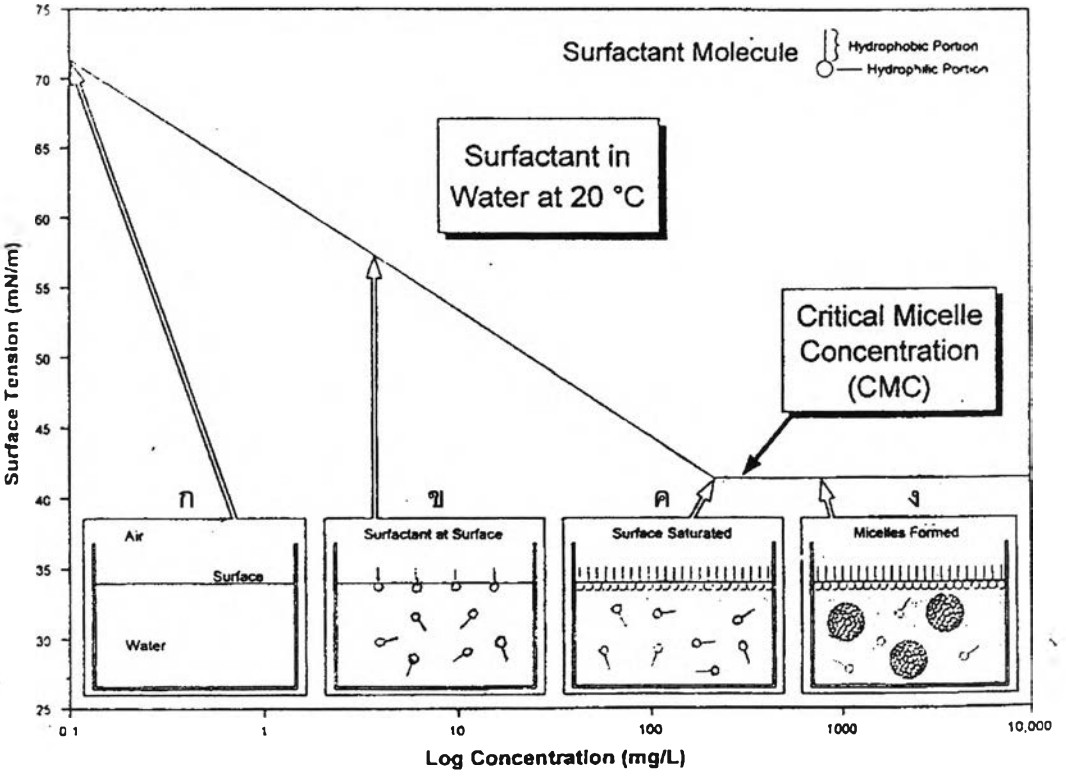
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) หมายถึง สารชีวโมเลกุลที่มีสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว (surface-active substance) ซึ่งสร้างโดยสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ เช่น แบคทีเรีย ราและยีสต์บางชนิด (Cooper และ Zajic, 1980) มีโครงสร้างเป็นแบบแอมฟิฟาติก (amphipatic structure) ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่มีขั้ว (hydrophilic portion) ได้แก่ โปรตีน และน้ำตาลซึ่งจะเป็นโมเลกุลที่มีหมู่คาร์บอกซิลิก หมู่ไฮดรอกซิล หมู่อะมิโน หมู่ฟอสเฟต เป็นต้น ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic portion) หรือส่วนที่ชอบไขมัน (lipophilic portion) ซึ่งจะเป็นโมเลกุลพวกไฮโดรคาร์บอนเช่น กรดไขมันทั้งชนิดอิ่มตัว (saturated fatty acid) และไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) มีทั้งโมเลกุลใหญ่และโมเลกุลเล็ก ซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแตกต่างกันไป ดังรูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เป็นแบบแอมฟิฟาติก



ส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic portion) ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic portion)

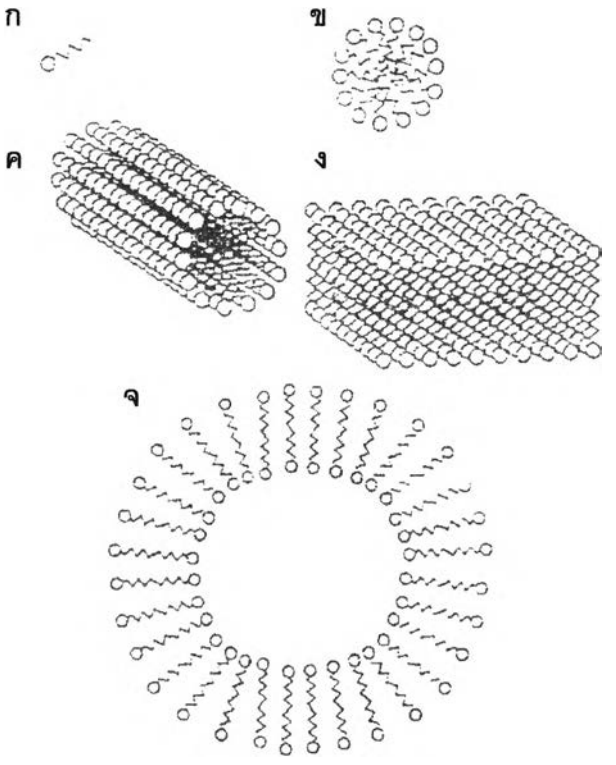
รูปที่ 2.1 ลักษณะโครงสร้างโดยทั่วไปของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Fiechter, 1992)

เมื่อสารลดแรงตึงผิวอยู่ในน้ำ ส่วนที่ชอบน้ำจะทำให้ละลายน้ำได้และส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะอยู่บริเวณผิวรอยต่อระหว่างน้ำกับอากาศ การที่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปอยู่ที่ผิวรอยต่อนี้จะทำให้ลดค่าแรงตึงผิวของสารละลายนั้นได้ และโดยส่วนใหญ่แล้วสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้จะลดค่าแรงตึงผิวของน้ำจาก 72 mN/m เป็น 30 ± 5 mN/m ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ สารลดแรงตึงผิวสามารถละลายอยู่ในตัวทำละลายทั้งชนิดมีขั้วหรือไม่มีขั้ว เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวมากขึ้นก็จะไปลดค่าแรงตึงผิวของของสารละลายจนถึงความเข้มข้นหนึ่งที่ทำให้เกิดโครงสร้างที่เรียกว่าไมเซลล์ (micelle) และค่าแรงตึงผิวของสารละลายนั้นจะคงที่ไม่ลดลงไปอีกแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงไปอีกเท่าใดก็ตามดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 **การเกิดโครงสร้างไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในน้ำเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจนถึงจุด** Critical Micelle Concentration (CMC) **ก) เป็นภาวะที่ไม่มีสารลดแรงตึงผิว ข) สารลดแรงตึงผิวละลายอยู่ในน้ำโดยหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำออกสู่ผิวน้ำ ค)** Critical Micelle Concentration (CMC) **เป็นจุดที่ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้นจนถึงระดับที่ก่อให้เกิดโครงสร้างไมเซลล์ และ ง) เมื่อเกิดเป็นโครงสร้างไมเซลล์แล้วค่าแรงตึงผิวมีค่าคงที่ไม่ลดลงอีกไม่ว่าความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะเพิ่มขึ้นก็ตาม** (Gilman, 1993)

เรียกค่าความเข้มข้นที่ทำให้เกิดโครงสร้างไมเซลล์นี้ว่า Critical Micelle Concentration (CMC) คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารลดแรงตึงผิวที่ทำให้เกิดโครงสร้างไมเซลล์ ซึ่งใช้เป็นตัววัดถึงประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวได้ โครงสร้างไมเซลล์จะประกอบไปด้วยโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิว 20-200 โมเลกุล ค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิดจะมีค่าต่างกันและขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ (Desai และ Banat, 1997; Volkering และคณะ, 1998) นอกจากนี้ค่า CMC ยังสามารถบอกได้ว่าพร้อมที่จะเกิดโครงสร้างทุติยภูมิ เช่น ไมเซลล์ ไบเลเยอร์ (bilayer) และ เวสสิเคิล (vesicles) ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 **โครงสร้างและการจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ** (Fiechter, 1992)

ก) โครงสร้างโมโนเมอร์ (monomer) ของแอมฟิฟาติกโมเลกุล

ข) โครงสร้างไมเซลล์แบบกลม

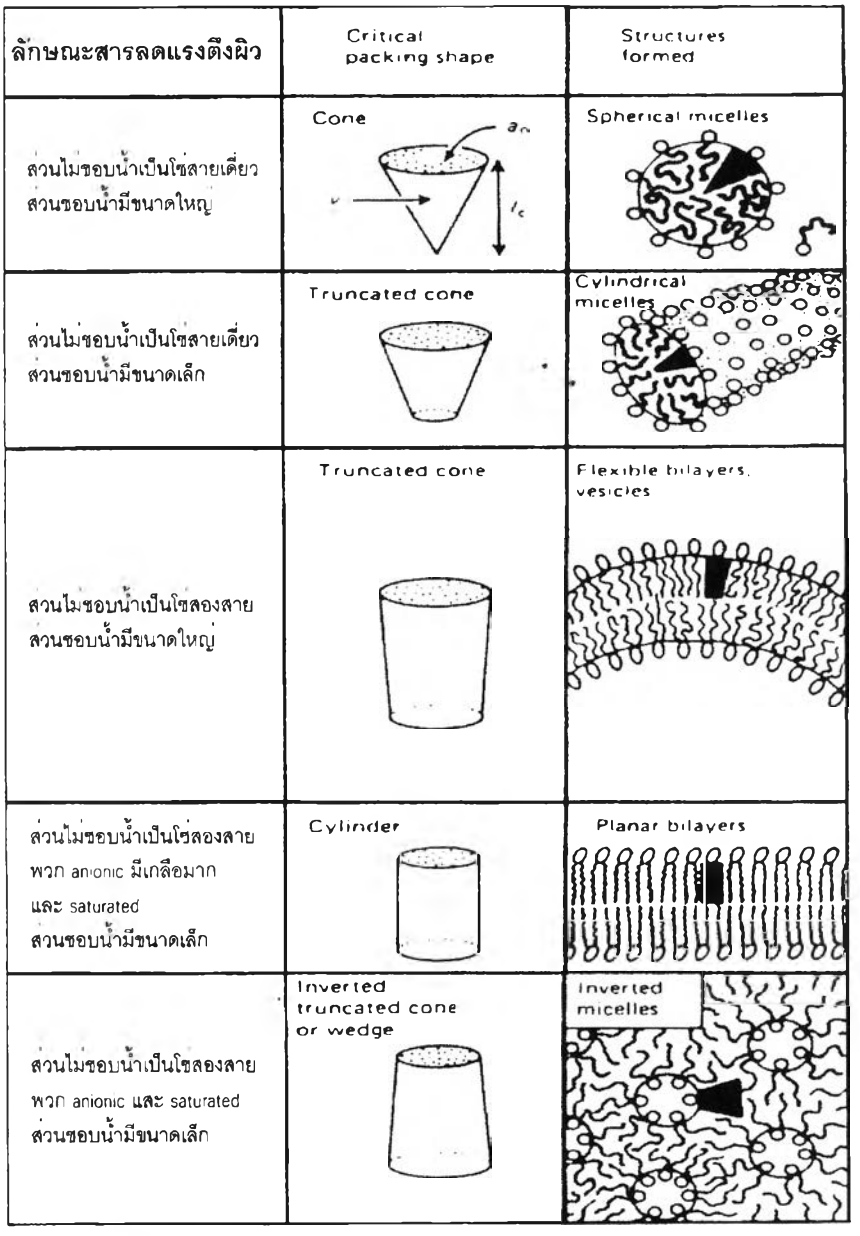
ค) โครงสร้างไมเซลล์แบบแท่ง

ง) โครงสร้างไมเซลล์แบบเลเยอร์

จ) โครงสร้างไมเซลล์แบบเวสสิเคิล

การที่จะเกิดการจัดเรียงตัวของโครงสร้างเป็นแบบใดนั้นนอกจากแรงกระทำระหว่างโมเลกุลแล้วยังขึ้นกับชนิดของสารลดแรงตึงผิวว่ามีโครงสร้างแบบใด เช่น โมเลกุลมีลักษณะโซ่สายสั้นและส่วนหัวที่มีขั้วใหญ่ก็จะเกิดการจัดเรียงตัวเป็นแบบไมเซลล์ทรงกลม ถ้าส่วนหัวมีขนาดเล็กก็จะรวมตัวเป็นไมเซลล์แบบทรงกระบอก หรือส่วนไม่ชอบน้ำเป็นสายยาวก็จะรวมตัวเกิดเป็นไบเลเยอร์ ดังรูปที่ 2.4 นอกจากนั้นยังขึ้นกับชนิดของตัวทำละลายว่าจะเกิดอิมัลชันเป็นแบบ oil in water หรือ water in oil และภาวะแวดล้อมเช่น ความเป็นกรดเป็นด่าง อุณหภูมิ ความเข้มข้นของเกลือต่างๆ ในสารละลายเป็นต้น สมบัติที่เป็นเอกลักษณ์ของไมเซลล์สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ ได้เช่น การแยกสารอินทรีย์และโลหะอิออนจากน้ำในการบำบัดสิ่งแวดล้อมในโรงงานอุตสาหกรรม เรายังสามารถ

คาดการณ์การทำงานของสารลดแรงตึงผิวได้จากค่า HLB (hydrophilic and lipophilic balance) เพราะเป็นค่าที่จะบอกได้ว่าสารลดแรงตึงผิวชนิดนั้นจะทำให้เกิดอิมัลชันแบบ water-in-oil หรือ oil-in-water คือถ้ามีค่า HLB ต่ำกว่า 6 จะเกิดอิมัลชันแบบ water-in-oil (ละลายได้ดีในไขมัน) แต่ถ้าค่า HLB อยู่ระหว่าง 10-18 จะเกิดอิมัลชันแบบ oil-in-water (ละลายได้ดีในน้ำ) (Desai, J. D. และ Banat, 1997)



รูปที่ 2.4 **การรวมตัวของโครงสร้างเมื่อสารลดแรงตึงผิวโมโนเมอร์มีโครงสร้างต่าง ๆ** (Clint, 1992)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพส่วนมากจะมีประจุสุทธิเป็นกลางหรือเป็นลบ โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประจุเป็นลบ อาจเนื่องมาจากหมู่คาร์บอกซิลิก หมู่ฟอสเฟต หรือ หมู่ซัลเฟต เป็นต้น ส่วนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประจุบวกนั้น อาจเกิดจากอิทธิพลของหมู่เอมีน แต่ก็พบได้น้อย (Cooper, 1986) ค่าแสดงถึงประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ นอกจากค่า CMC ที่กล่าวข้างต้นแล้วยังมีอีกหลายค่าได้แก่

1. **ค่าแรงตึงผิว** (surface tension)

หมายถึง แรงที่กระทำระหว่างของเหลวและอากาศ มีหน่วยเป็น mN/m หรือ dyne/cm ซึ่งค่าแรงตึงผิวของน้ำบริสุทธิ์เท่ากับ 72 mN/m และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ถือว่ามีประสิทธิภาพดีจะทำให้ค่าแรงตึงผิวลดลงเหลือ 35 mN/m (Kosaric, 1993)

2. **ค่าแรงตึงระหว่างผิวที่ประจัน** (interfacial tension)

หมายถึง แรงที่กระทำระหว่างของเหลวกับของเหลวที่มีเฟสต่างกัน มีหน่วยเป็น mN/m การวัดแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันจะวัดระหว่างน้ำและสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น น้ำมัน เฮกซาเด็กเคน หรือ น้ำมันก๊าด โดยทั่วไปค่าแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันของน้ำกับเฮกซาเด็กเคนมีค่าเท่ากับ 50 mN/m และค่าแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันของน้ำกับน้ำมันก๊าดมีค่าเท่ากับ 30-40 mN/m ซึ่งเมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถลดแรงตึงผิวที่ประจันลงเหลือ 0.1-1.0 mN/m (Gerson, 1993)

3. **การเกิดอิมัลชัน** (emulsification)

คือความสามารถในการทำให้น้ำและสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น น้ำมันปิโตรเลียม สารละลายอินทรีย์ และน้ำมันพืชชนิดต่างๆ รวมตัวเป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะทำให้เกิดอิมัลชันระหว่างน้ำกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เป็นผลทำให้น้ำมันมีสภาพเป็นหยดเล็กๆ อยู่ในน้ำ (อิมัลชันชนิด oil in water) เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวระหว่างน้ำและสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Cooper และ Zajic, 1980) การวัดประสิทธิภาพในการเกิดอิมัลชันอาจทำด้วยการวัดค่าอิมัลชันอินเด็กซ์ คือการวัดอัตราส่วนระหว่างความสูงของอิมัลชันและความสูงของของเหลวในหลอดทั้งหมดเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง (Patel และ Desai, 1997) และอาจวัดความเสถียรของอิมัลชันที่เกิดขึ้นโดยวัดค่าอิมัลชันอินเด็กซ์ในระยะเวลาที่นานออกไป

ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การจำแนกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ สามารถแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มตามโครงสร้างทางเคมี (Desai และ Banat, 1997) ได้แก่

1. **ไกลโคลิพิด** (glycolipid) เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต เช่น กลูโคส แมนโนส กาแล็กโตส กรดกลูคูโรนิก แรมโนส และ กาแล็กโตสซัลเฟต เชื่อมต่อกับไขมัน เช่น aliphatic acid และ hydroxyl-aliphatic โดยอาจเชื่อมต่อกับคาร์โบไฮเดรต 1-2 โมเลกุล สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่จัดเป็นไกลโคลิพิดได้แก่ ทรีฮาโรส (trehalose) โซโฟโรลิพิด (sophorolipids) แรมโนลิพิด (rhamnolipid) เททระเอซิลกลูโคส (tetraacylglucose) ไทรเอซิลกลูโคส (triacylglucose) (Rosenberg และ Ron, 1999)

2. **ไลโพเพพไทด์** (lipopeptide) **และไลโพโปรตีน** (lipoprotein) เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มักมีสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ เช่น เซอร์แฟคติน (surfactin) หรือ ซับทิไลซิน (subtilysin) พอลิมิกซิน (polymyxins) และไลเคไนซิน (lichenysin) จาก *Bacillus subtilis, Bacillus polymyxa* และ *Bacillus licheniformis* (Rosenberg, 1986) นอกจาก *Bacillus* sp. แล้วยังพบว่า *Pseudomonas rubescens* (Yamane, 1987) และ *Thiobacillus thiooxidans* (Knoche และ Shiveley, 1972) ผลิตออร์นิทีนลิพิด (ornithine lipids) *Gluconobacter cerinus* IFO 3267 ผลิตออร์นิทีนลิพิด (ornithine lipids) และทัวรีนลิพิด (taurine lipids) (Tahara, 1976a) *Agrobacterium tumefaciens* IFO 3058 ผลิตไลซีนลิพิด (lysine lipids) (Tahara, 1976b) เป็นต้น

3. **กรดไขมันและไขมัน** (Fatty acid and Neutral lipid) โดยสามารถพบได้ในเซลล์จุลินทรีย์ทุกชนิด และมักปล่อยออกนอกเซลล์เช่น กรดคาร์บอกซิลิก แอลกอฮอล์ เอสเทอร์ โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และไทรกลีเซอไรด์ ตัวอย่างของกรดไขมันและไขมันที่สามารถลดแรงตึงผิวได้แก่ กรดโครีโนมัยโคลิก (corynomycolic acid) ที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำลงเหลือ 40 mN/m (ปกติน้ำมีแรงตึงผิวเท่ากับ 72 mN/m) ไขมันที่เป็นกลาง ที่มีรายงานว่าสามารถลดแรงตึงผิวคือ ไขมันที่ผลิตจาก *Mycobacterium rhodochrous* เมื่อความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำเหลือ 44 mN/m และยังส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ (Cooper และ Zajic, 1980) รูบิเวททิน อาร์1 (rubiwettin R1) ซึ่งเป็นลิพิดที่ผลิตจาก *Serratia rubidaea* ATCC 27593 รูลิเวททิน อาร์1 เป็นลิพิดชนิด β-hydroxy fatty acid ที่มีจำนวนคาร์บอน 10 อะตอมเชื่อมต่อกับ β-hydroxy

fatty acid ที่มีจำนวนคาร์บอน 12, 14 หรือ 16 อะตอมด้วยพันธะเอสเทอร์ (Matsuyama และคณะ, 1990)

4. **ฟอสฟอลิพิด** (phospholipid) เป็นองค์ประกอบสำคัญในเซลล์จุลินทรีย์ แต่มีส่วนน้อยที่ปล่อยออกนอกเซลล์ ทำให้วัดค่าแรงตึงผิวได้ยาก โครงสร้างโดยทั่วไปของฟอสฟอลิพิดประกอบด้วยกลีเซอรอลต่อกับกรดไขมัน ตัวอย่างฟอสฟอลิพิดที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ เช่น ฟอสฟาทิดิลไอโนซิทอล (phosphatidylinositol) ฟอสฟาทิดิลกลีเซอรอล (phosphatidyglycerol) และกรดฟอสฟาทิดิก (phophatidic acid) จาก *Thiobacillus thiooxidans* และ *Rhodococcus erythropolis* ที่ผลิตฟอสฟาทิดิลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) นอกจากนั้นยังพบการสร้างฟอสฟอลิพิดใน *Corynebacterium alkanolyticum*, *Candida tropicalis* และ *Micrococcus cerificans* (Cooper และ Zajic, 1980 และ Rosenberg, 1986)

5. **สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์** (polymeric biosurfactant) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทนี้มีน้ำหนักโมเลกุลสูงเช่น อิมัลแซน (emulsan) ที่ผลิตได้จาก *Acinetobacter calcoacetius* RAG-1 ที่มีลักษณะเป็นไลโพเฮเทอโรพอลิแซ็กคาร์ไรด์ (lipoheteropolysaccharide) ที่มีประจุลบ น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 9.9 X 10^5 ดาลตัน อิมัลแซนไม่มีคุณสมบัติลดแรงประจันผิว (interfacial tension) แต่ทำให้เกิดอิมัลชันได้ดี คือใช้เพียง 0.001-0.01% และอิมัลชันที่เกิดก็มีความเสถียร ไบโอดีสเพอร์แซน (biodispersan) ผลิตจาก *Acinetobacter calcoacetius* A2 มีลักษณะเป็นเฮเทอโรพอลิแซ็กคาร์ไรด์ (heteropolysaccharide) ที่มีประจุลบ น้ำหนักโมเลกุล 51,400 ดาลตัน ไลโพแซน (liposan) ผลิตจาก *Candida lipolytica* ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 83% ได้แก่ กลูโคส กาแล็กโตส กาแล็กโตซามีน และกรดกาแล็กโตยูโรนิค และโปรตีน 17% อะลาแซน (alasan) ผลิตโดย *Acinetocacter radioresistens* KA53 ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนมีประจุเป็นลบ (Desai และ Banat, 1997)

6. **สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีลักษณะเป็นอนุภาค** (particulate biosurfactant) โดยเป็นส่วนของ extracellular membrane vesicles มารวมตัวเป็น microemulsion ซึ่งมีส่วนช่วยในการนำพวกแอลเคนเข้าสู่เซลล์ เช่น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีลักษณะเป็นอนุภาคที่ผลิตโดย *Acinetobacter* sp. H01-N ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20-50 นาโนเมตร มีความหนาแน่นการลอยตัว (buoyant density) 1.158 g/cm^3 และประกอบด้วยโปรตีน ฟอสฟอลิพิด และไลโพพอลิแซ็กคาไรด์ membrane vesicle เหมือนกับ outer membrane ของจุลินทรีย์ที่ผลิตขึ้น (Desai และ Banat, 1997)

ตารางที่ 2.1 **สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ** (Desai และ Banat, 1997)

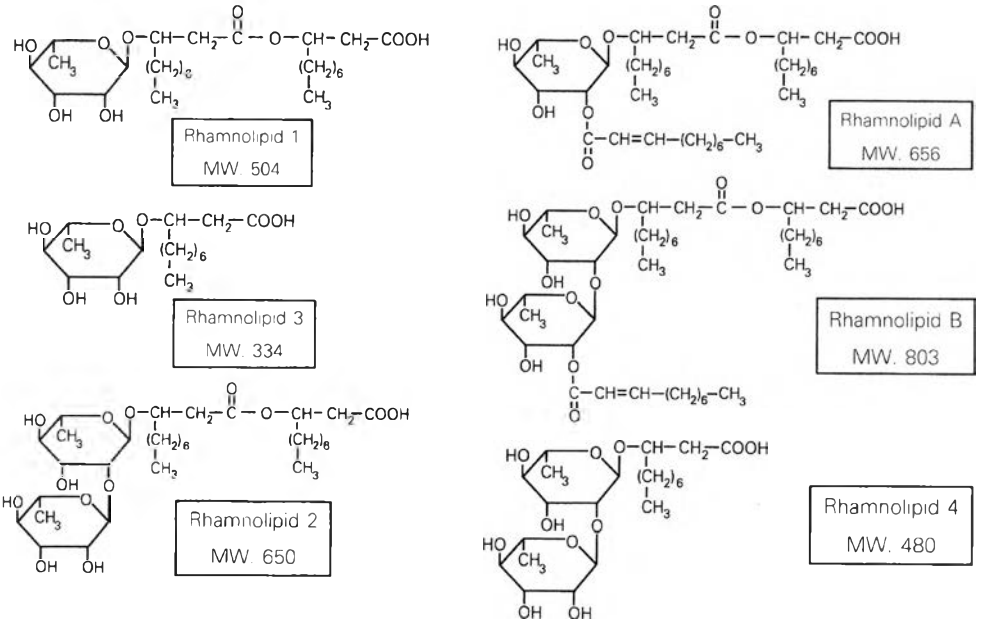
ชนิดของสารลดแรงตึงผิว	จุลินทรีย์	Surface tension (mN/m)	CMC (g/l)	Interfacial tension (mN/m)
Glycolipid				
Rhamnolipid	*P. aeruginosa*	29	0.1-10	0.25
	Pseudomonas sp.	25-30	4	1
Trehalolipid	*R. erythropolis*	32-36	20	14-17
	N. erythopolis	30	0.3	3.5
	Mycobacterium sp.	38		1.5
Sophorolipid	*T. bombicola*	33		1.8
	T. apicola	30		0.9
	T. petrophilum			
Cellobiolipid	*U. Zeac, U. maydis*			
Lipopeptide and lipoprotein				
Peptide-lipid	*B. licheniformis*	27	12-20	0.1-0.3
Serrawettin	*S. marcescens*	28-33		
Viscosin	*P. fluorescens*	26.5	150	
Surfactin	*B. subtilis*	27-32	23-160	1
Subtilisin	*B. subtilis*			
Gramicidin	*B. brevis*			
Polymyxin	*B. polymyxa*			
Fatty acid, neutral lipid and phospholipid				
Fatty acid	*C. lepus*	30	150	2
Neutral lipid	*N. erythropolis*	32		3
Phospholipid	*T. thiooxidans*			
Polymeric surfactant				
Emulsan	*A. calcoaceticus*			
Biodispersan	*A. calcoaecticus*			
Mannan lipid protein	*C. tropiccalis*			
Protein PA	*P. aeruginosa*			
Particulate biosurfactant				
Vesicle and fimbria	*A. calcoaceticus*			
Whole cell	*Variety of bacteria*			

ชนิดและกระบวนการสังเคราะห์แรมโนลิพิด

แรมโนลิพิดเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไกลโคลิพิดผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* และ *Pseudomonas* sp. (Desai และ Banat, 1997, Lang และ Wullbrandt, 1999) ประกอบด้วยน้ำตาลแรมโนส และ β-hydroxydecanoic acid พบครั้งแรกโดย Bergstrom และคณะในปี 1946 แรมโนลิพิดที่พบผลิตโดย *Pseudomonas pyocyanea* และใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ต่อมาในปี 1949 Jarvis และ Johnson เป็นกลุ่มแรกที่รายงานว่ามีการผลิตแรมโนลิพิดจาก *Pseudomonas aeruginosa* อีกทั้งพิสูจน์ได้ว่ามี β-hydroxydecanoyl-β-hydroxydecanoate ต่อกับน้ำตาลแรมโนส 2 โมเลกุลด้วยพันธะ glycosidic โดยวิเคราะห์แรมโนลิพิดจาก *Pseudomonas aeruginosa* ที่เลี้ยงใน 3% กลีเซอรอลแล้วทำให้บริสุทธิ์ ถึงกระนั้นการเชื่อมต่อระหว่างน้ำตาลแรมโนสทั้ง 2 โมเลกุลยังไม่กระจ่าง ในปี 1965 Edward และ Hayashi สามารถบอกถึงโครงสร้างของแรมโนลิพิดอย่างละเอียดโดยกล่าวว่าหลังจากเกิดออกซิเดชันและเมธิลเลชัน พบ 1,2-linkage คือ rhamnolipid 2 ในรูปที่ 2.5 Hisatsuka และคณะ (1971) พบว่า rhamnolipid 2 เป็นเพียงชนิดเดียวที่พบในการผลิตโดย *Pseudomonas aeruginosa* S_7B_1 ที่เลี้ยงใน n-hexadecane และ n-paraffins (C_{14}-C_{18}) (Lang และ Wullbrandt, 1999) พบแรมโนลิพิดชนิดใหม่ คือ L-α-rhamnosyl-β-hydroxydecanoyl-β-hydroxydecanoate (rhamnolipid 1 ในรูปที่ 2.5) ที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* KY 4025 ที่เลี้ยงใน 10% แอลเคน (Itoh และคณะ,1971) และในปี 1976 Yamagushi และคณะพบ rhamnolipid A และ B ซึ่งเกิดจาก acylation ของ α-decanoic acid ตามรูปที่ 2.5 จากรายงานของ Hirayama และ Kato ในปี 1982 พบทั้ง R1 และ R2 ในการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* 158 ในอาหาร Difco trypticase soya และในปี 1985 Syldatk และคณะพบว่ามีแรมโนลิพิดที่คล้าย R1 และ R2 แต่มี β-hydroxydecanoyl เพียงหน่วยเดียว (R3 และ R4 ในรูปที่ 2.5) ที่ผลิตโดย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ก่อโรค (Rendell และคณะ, 1990) และความยาวของโซ่คาร์บอนของสารตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีผลต่อโครงสร้างของแรมโนลิพิด (Lang และ Wullbrandt, 1999) จากรายงานของ Hisatsuka และคณะในปี 1971 พบว่า R2 มีผลในการกระตุ้นการเจริญของ *Pseudomonas* sp. หลายสายพันธุ์เมื่อเลี้ยงใน n-hexadecane แต่ไม่มีผลต่อแบคทีเรียชนิดอื่น protein-like activator ในขบวนการออกซิเดชันของแอลเคน มีส่วนร่วมในการสังเคราะห์ R2 แต่ก็ยังไม่ทราบขั้นตอนที่แน่นอน (Hisatuska และคณะ, 1972) นอกจากนี้เมื่อนำสายพันธุ์กลายของ *Pseudomonas aeruginosa* KY-4025 (Itoh และ Suzuki, 1972) และ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Koch และคณะ, 1991) ที่ไม่สามารถสร้างแรมโนลิพิดมาเลี้ยง

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ n-paraffin และแอลเคนเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าสามารถเจริญได้เพียงเล็กน้อย แต่เมื่อเติมแรมโนลิพิดลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่ามีการเจริญเพิ่มขึ้นและเทียบเท่าได้กับสายพันธุ์ดั้งเดิม (Lang และ Wullbrandt, 1999)

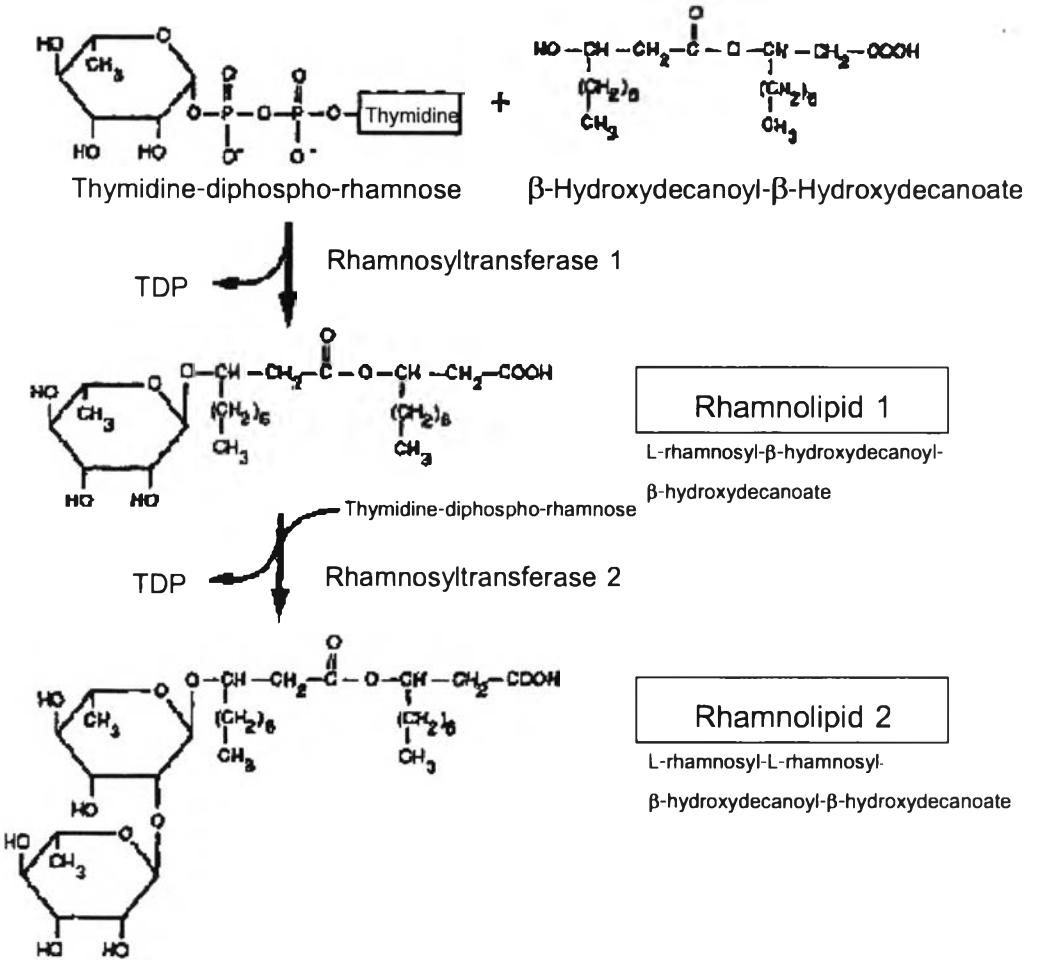
โครงสร้างของแรมโนลิพิดแบ่งเป็น 6 กลุ่มใหญ่ตามรายงานของ Lang และ Wullbrandt (1999) ดังแสดงในรูปที่ 2.5 ซึ่งแต่ละกลุ่มแตกต่างกันตามจำนวนของน้ำตาลแรมโนส และกรดบีต้า-ไฮดรอกซีดีคาร์โนอิก



รูปที่ 2.5 **โครงสร้างของแรมโนลิพิด ชนิด** R1, R2, R3, R4, A **และ** B **จาก** *Pseudomonas aeruginosa* **(**Lang **และ** Wullbrandt, 1999)

การศึกษาการสังเคราะห์แรมโนลิพิดครั้งแรกจากแรมโนลิพิดที่สร้างขึ้นในระยะพักเซลล์ (resting cells) หรือระยะการเจริญคงที่ (stationary phase) โดยแรมโนลิพิดที่ผลิตขึ้นจะปล่อยออกนอกเซลล์ (Hauser และ Karnovsky, 1957; 1958) และด้วยการสกัดเอนไซม์และใช้กัมมันตภาพรังสีติดตามสาร precursor ในการสังเคราะห์แรมโนลิพิด ทำให้ Burger และคณะ (1963) สามารถเสนอกระบวนการการสังเคราะห์แรมโนลิพิดชนิดที่ 1 และ 2 ที่ผลิตโดย *Pseudomonas aeruginosa* ATCC7700 โดยพบ rhamnosyl-transfer สองครั้งอย่างเป็นลำดับด้วยเอนไซม์ rhamnosyl-

transferase 2 ชนิด พบการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวที่ผนังเซลล์และภายในเซลล์ ในปี 1996 Ochsner และคณะวิจัยใน *Pseudomonas aeruginosa* PG201 พบว่าแรมโนลิพิดชนิดที่ 1 และ 2 ที่ผลิตขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเกิดขึ้นโดยกระบวนการ rhamnosyl-transfer สองครั้งอย่างเป็นลำดับด้วยเอนไซม์ rhamnosyltransferase 2 ชนิดเช่นเดียวกัน



รูปที่ 2.6 **กระบวนการสังเคราะห์แรมโนลิพิดชนิด** R1 **และ** R2 **ซึ่งผลิตจาก** *Pseudomonas aeruginosa* (Lang **และ** Wullbrandt, 1999)

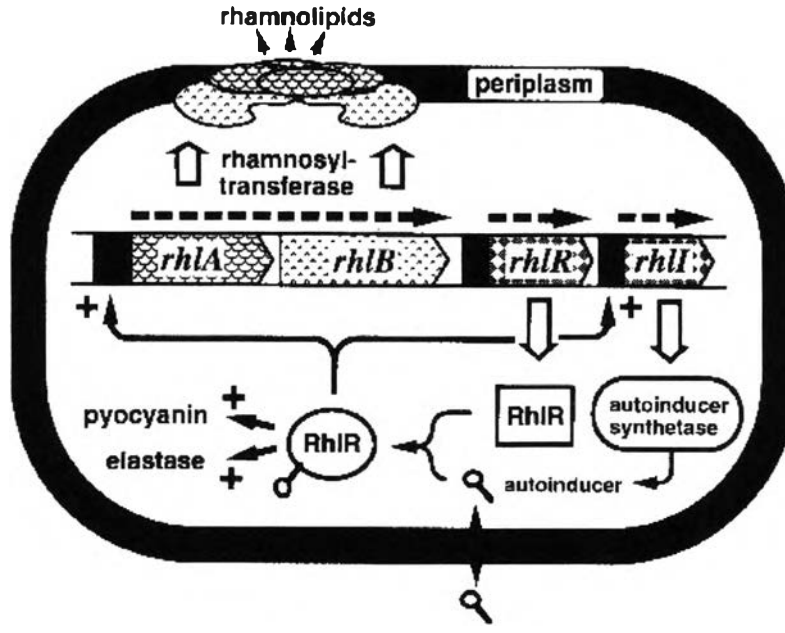
ปฏิกิริยา rhamnosyl-transfer หรือปฏิกิริยาการส่งแรมโนสอย่างเป็นลำดับ 2 ขั้นตอน แต่ละปฏิกิริยาถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ที่มีความจำเพาะคือ rhamnosyltransferase 1 (Rt 1) และ rhamnosyl transferase 2 (Rt 2) ตามลำดับ โดย Rt 1 มีความจำเพาะกับ thymidine-diphospho-L-rhamnose (TDP-L-rhamnose) และ β-hydroxydecanoyl-β-hydroxydecanoate ส่วน Rt 2 มีความจำเพาะกับ TDP-L-rhamnose และแรมโนลิพิดชนิดที่ 1 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์แรมโนลิพิดชนิดที่ 1 และ 2 เริ่มจาก TDP-L-rhamnose ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวให้กลุ่ม rhamnosyl แก่ β-hydroxydecanoyl-β-hydroxydecanoate ปฏิกิริยานี้ถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ Rt 1 ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือแรมโนลิพิดชนิดที่ 1 ต่อมาแรมโนลิพิดชนิดที่ 1 ที่เกิดขึ้นรับกลุ่ม rhamnosyl จาก TDP-L-rhamnose กลายเป็นแรมโนลิพิดชนิดที่ 2 เอนไซม์จำเพาะที่กระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาคือ Rt 2 (Burger และคณะ, 1963)

ยีนและกลไกการควบคุมที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แรมโนลิพิด

ยีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์แรมโนลิพิดส่วนใหญ่มาจากการศึกษาใน *Pseudomonas aeruginosa* PG201 และสายพันธุ์กลาย (Ochner และคณะ, 1994a; 1994b; 1995; Ochsner และ Reiser, 1995) ซึ่งยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แรมโนลิพิดชนิดที่ 1 (mono-rhamnolipid) คือ *rhlA* และ *rhlB* อยู่ภายใน *rhl* operon ประมวลรหัส rhamnosyltransferase 1 (Rt 1) ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนสองชนิด คือ RhlA และ RhlB ยีน *rhlA* ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ 885 bp ระบุรหัสโปรตีน RhlA มีขนาด 32.5 กิโลดาลตัน ประกอบด้วย 295 ลำดับกรดอะมิโน ตั้งอยู่ในเพอริพลาสซึม มีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์แรมโนลิพิดโดยทำให้โปรตีน RhlB มีความเสถียรและคงตัวอยู่ได้ใน cytoplasmic membrane โปรตีน RhlB ระบุรหัสโดย *rhlB* มีขนาด 1278 bp เรียงตัวต่อจาก *rhlA* ใช้โปรโมเตอร์ร่วมกันอยู่ภายใน *rhl* operon โปรตีน RhlB ประกอบด้วย 426 ลำดับกรดอะมิโน อยู่ภายในเมมเบรนและวางตัวข้ามเมมเบรนโดยมีส่วนเปิดออกทั้งสองด้านของเมมเบรน (putative membrane-spanning domain) ทำหน้าเป็น catalytic subunit ของเอนไซม์ rhamnosyltransferase 1 โปรตีนดังกล่าวมีขนาด 47.0 กิโลดาลตัน (Ochsner และคณะ, 1994a) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แรมโนลิพิดชนิดที่ 2 (di-rhamnolipid) คือ *rhlC* ระบุรหัสโปรตีน RhlC Rahim และคณะ (2001) หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *rhlC* โดยการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนที่คาดว่ามี *rhlC* จาก *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 *rhlC* ที่พบมีขนาด 975 bp ระบุรหัสโปรตีน RhlC ขนาด 35.9 กิโลดาลตัน ประกอบด้วย 325 ลำดับกรดอะมิโน อยู่ภายในเมมเบรนทำหน้าที่กระตุ้นการเติม TDP-L-rhamnose ให้กับแรมโนลิพิดชนิดที่ 1 ได้เป็นแรมโนลิพิดชนิดที่ 2

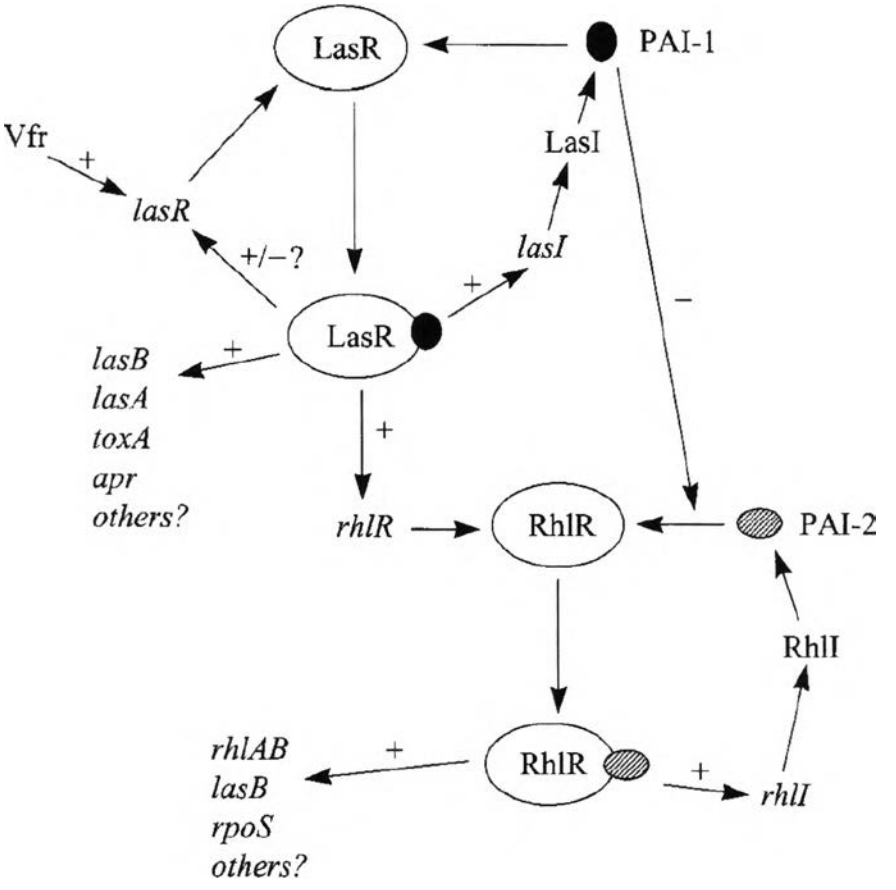
การผลิตแรมโนลิพิดทั้งแรมโนลิพิดชนิดที่ 1 และ 2 ของ *P. aeruginosa* จะเกิดขึ้นเมื่อความหนาแน่นของเซลล์เพิ่มมากขึ้นภายใต้ภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจน หรือเหล็กจำกัด (Ochsner และคณะ, 1995; Ochsner และ Reiser, 1995) การผลิตแรมโนลิพิดจะถูกควบคุมโดยกลไกที่เรียกว่า quorum sensing (QS) ซึ่งใน *P. aeruginosa* มีด้วยกัน 2 ระบบคือ *las* และ *rhl* เป็นระบบที่ควบคุมการแสดงออกของยีนซึ่งขึ้นกับความหนาแน่นของเซลล์ (Fuqua และคณะ, 1996) ระบบ *las* system ประกอบไปด้วย LasR และ LasI ซึ่งเป็นโปรตีนควบคุมการถอดรหัส และเอนไซม์ที่ใช้สังเคราะห์ autoinducer PAI-1 [*N*-(3-oxododecanoyl)-homoserine lactone หรือ (3O-C_{12}-HSL)] ตามลำดับ (Fuqua และคณะ, 2001; Gambello และ Iglewski, 1999; Passador และคณะ, 1993; Pearson และคณะ, 1994;) ระบบนี้จะกระตุ้นการแสดงออกของ *lasI, lasB, lasA, apr* และ *toxA* (Gambello และคณะ, 1993; Passador และคณะ, 1993; Seed และคณะ, 1995; Toder และคณะ, 1991) ส่วนระบบ *rhl* system ประกอบด้วย RhlR และ RhlI ซึ่งเป็นโปรตีนควบคุมการถอดรหัส และเอนไซม์ที่ใช้สังเคราะห์ autoinducer PAI-2 [*N*-butanoyl-L-homoserine lactone หรือ (C_4-HSL) โดยทั่วไปจะเรียก factor 2] (Fuqua และคณะ, 2001; Ochsner และคณะ, 1994b; Ochsner และ Reiser, 1995; Pearson และคณะ, 1995) ระบบนี้จะกระตุ้นการแสดงออกของ *rhlI rhlAB* และ *rhlC* (Latifi และคณะ, 1996; Ochsner และคณะ, 1994a, 1994b; Ochsner และ Reiser, 1995; Rahim และคณะ, 2001) autoinducer หรือ *N*-acylated homoserine lactone (HSL) เป็นสารที่มีโมเลกุลเล็กใช้ในการส่งสัญญาณในการวัดความหนาแน่นประชากรของเซลล์แบคทีเรียเพื่อพร้อมปรับกลไกการทำงานให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ที่เปลี่ยนไปได้ (Fuqua และคณะ, 1994) เมื่อความหนาแน่นของแบคทีเรียสูงขึ้น autoinducer เหล่านี้จะถูกปล่อยและไปกระตุ้นอย่างจำเพาะกับ transcriptional regulator ให้สามารถทำงานได้ (Fuqua และคณะ, 1996; Fuqua และ Greenberg, 1998; Salmond และคณะ, 1995) Fuqua และคณะ (1996) ได้อธิบายถึงการทำงานของระบบ quorum sensing ว่าเริ่มจาก autoinducer ซึ่งปกติจะผลิตขึ้นในปริมาณน้อย เมื่อเซลล์เจริญเติบโตและมีหนาแน่นมากขึ้นความเข้มข้นของ autoinducer ก็จะเพิ่มขึ้นจนถึงค่าความเข้มข้นหนึ่งจึงจะไปเข้าจับและกระตุ้นโปรตีนเป้าหมายอย่างจำเพาะเจาะจง (LasR หรือ RhlR) ได้เป็น autoinducer-protein complex ทำหน้าที่กระตุ้นการแสดงออกของยีนที่ควบคุม

โปรตีน RhlR ขนาด 28 กิโลดาลตัน ประกอบด้วย 241 ลำดับกรดอะมิโน ทำหน้าที่เป็น transcriptional activator กระตุ้นให้เกิดการถอดรหัสของ *rhlAB* (Ochsner และคณะ, 1994a, b) และ *rhlC* (Rahim และคณะ, 2001) ยีนที่ประมวลรหัสของโปรตีนดังกล่าวคือ *rhlR* มีขนาด 723 bp ซึ่งอยู่ downstream ของ *rhlB* สายพันธุ์กลายของ *P. aeruginosa* PG201 ที่ขาดยีนดังกล่าวจะไม่สามารถผลิตแรมโนลิพิดได้ (Ochner และคณะ ,1994b) แต่โปรตีน RhlR ไม่สามารถทำงานได้ด้วยตัวเองต้องเข้าจับกับโปรตีน C_4-HSL ซึ่งเป็น autoinducer ชนิดหนึ่งได้เป็น RhlR-C_4-HSL complex จึงจะสามารถกระตุ้นการถอดรหัสได้ (Ochsner และ Reiser, 1995) ยีน *rhlI* ประมวลรหัสของโปรตีน RhlI หรือที่เรียกว่า autoinducer synthetase ประกอบด้วย 201 ลำดับกรดอะมิโน ใช้ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ autoinducer PAI-2 *rhlI* เรียงตัวต่อจาก *rhlR* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 606 bp (Ochsner และ Reiser, 1995) ในสายพันธุ์กลายที่ขาด *rhlI* ไม่สามารถสร้างแรมโนลิพิดเพราะการกระตุ้นการสร้างแรมโนลิพิดเริ่มจากการสังเคราะห์ *N*-acylated homoserine lactones ดังนั้นยีน *rhlAB* และ *rhlC* จะถอดรหัสได้ต้องขึ้นอยู่กับ *rhlR* และ *rhlI* (Ochsner และคณะ, 1994a; Ochsner และ Reiser, 1995; Pearson และคณะ, 1997; Rahim และคณะ, 2001)



รูปที่ 2.7 **กลไกการควบคุมและการผลิตแรมโนลิพิดใน** *P. aeruginosa* (Ochsner **และ** Reiser, 1995)

จากรูปที่ 2.7 RhlR ซึ่งเป็น regulatory protein ต้องถูกกระตุ้นโดย autoinducer PAI-2 ก่อน ซึ่งสังเคราะห์จาก RhlI autoinducer synthetase ที่ระบุรหัสโดย *rhlI* ได้เป็น RhlR-PAI-2 complex หรือ RhlR- C_4-HSL complex เข้ากระตุ้นอย่างจำเพาะที่บริเวณ *las* box ซึ่งตั้งอยู่เหนือยีน *rhlAB* ทำให้เกิดการถอดรหัสของ *rhlAB* ได้เป็น rhamnosyltransferase และเกิดการผลิตแรมโนลิพิดตามมา (Pearson และคณะ, 1997) นอกจากนี้โปรตีน RhlR ที่ถูกกระตุ้นแล้วยังสามารถควบคุมการผลิตสารอื่นได้อีกคือ elastase และ pyocyanin เรียกโปรตีน RhlR ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการถอดรหัสได้มากกว่าหนึ่งนี้ว่าเป็น pleiotropic regulator (Ochsner และคณะ, 1994b; Ochsner และ Reiser, 1995)



รูปที่ 2.8 **กลไกการควบคุมของ** quorum sensing **ใน** *Pseudomonas aeruginosa*. (Pesci **และคณะ**, 1997)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในปี 1997 Pesci และคณะ ได้รายงานว่าการควบคุมของระบบ *las* และ *rhl* system มีความสัมพันธ์กันโดย *las* quorum sensing system จะควบคุม *rhl* quorum sensing system ที่โปรตีน RhlR ทั้งในระดับ transcription และ post translation ทั้งนี้เนื่องจากถ้าขาดโปรตีน LasR และ PAI-1 ซึ่งเป็นโปรตีนกระตุ้นการถอดรหัสและ autoinducer ของระบบ *las* system จะทำให้ไม่มีการแสดงออกของ *rhlR* ใน *E. coli* แสดงให้เห็นว่า LasR-PAI จะควบคุมการถอดรหัสแบบบวกคือกระตุ้นให้ทำงานของ *rhlR* ได้ ส่วนการควบคุมในระดับ post translation นั้นพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ PAI-1 ความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของ *rhlA* ด้วย RhlR และ PAI-2 ใน *E. coli* จะลดลง แสดงให้เห็นว่า PAI-1 จะไปป้องกันบริเวณเข้าจับกันของ RhlR และ PAI-2 ทำให้ไม่สามารถกระตุ้นการทำงานของ *rhlAB* ได้ Latifi และคณะ (1996) เสนอว่าระบบ *las* system น่าจะถูกกระตุ้นให้ทำงานก่อน *rhl* system จากรูปที่ 2.8 Pesci และคณะ ได้อธิบายว่า LasR และ PAI-1 ถูกผลิตขึ้นตั้งแต่มีการเจริญของเซลล์ไม่มากนักในปริมาณน้อย แต่เมื่อความหนาแน่นของเซลล์เพิ่มขึ้น autoinducer PAI-1 ก็เพิ่มความเข้มข้นขึ้นเช่นกัน *lasR* จะถูกกระตุ้นด้วย Vfr ให้สร้าง LasR ความเข้มข้นของ PAI-1 จะเพิ่มขึ้นจนถึงค่าหนึ่งจึงเข้าจับกับ LasR ได้ ในขณะเดียวกัน PAI-1 จะไปยับยั้งการเข้าจับของ RhlR และ PAI-2 (ควบคุมแบบ post translation) LasR-PAI-1 complex สามารถกระตุ้นการทำงานของ *lasI* และ *rhlR* ให้สร้าง LasI ที่ใช้สังเคราะห์ PAI-I ให้อยู่ในระดับที่มากกว่า PAI-2 และ RhlR (ควบคุมแบบ transcription) ตามลำดับ autoinducer PAI-2 จะเข้าจับกับ RhlR ได้ต่อเมื่อมีปริมาณของ RhlR และหรือ PAI-2 มากกว่า PAI-1 RhlR-PAI-2 complex ที่เกิดขึ้นจะกระตุ้นการทำงานของ *rhlI* และยีนควบคุมเป้าหมายซึ่งรวมถึง *rhlAB* ให้เกิดการถอดรหัสและสังเคราะห์เป็น rhamnosyltransferase 1 ซึ่งใช้ในการผลิตแรมโนลิพิดได้

ประโยชน์และการประยุกต์ใช้แรมโนลิพิด

เนื่องจากโครงสร้างของแรมโนลิพิดเป็นโมเลกุลแบบแอมฟิฟาติก สามารถลดค่าแรงตึงผิวของน้ำและลดค่าแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันของของเหลวที่มีเฟสต่างกันได้ (Beal และ Betts, 2000) ทำให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ได้ดังนี้

1. **ด้านการเกษตรใช้เป็น** antiphytopathogen **ที่เป็นพวกรา** โดยจะมีผลกับจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในพืช เช่น *Pythium aphanidermatum* ในระยะ zoospore (Stanghellini และคณะ, 1996) แรมโนลิพิดทั้งชนิดที่มีแรมโนส 1 หรือ 2 โมเลกุลมีผลยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในพืชเป็นอย่างดีในพวก Zoosporic plant pathogen เช่น *Pythium aphanidermatum* , *Phytophthora capsici* และ *Plasmopara lactucae-radicis* ตามรายงานของ Abalos และคณะในปี 2001 พบว่า *Pseudomonas aeruginosa* AT10 สามารถผลิตแรมโนลิพิดหลายชนิดผสมกันโดยใช้น้ำมันถั่วเหลืองที่นำกลับมาใช้ใหม่เป็นแหล่งคาร์บอน แรมโนลิพิดผสมดังกล่าวประกอบด้วย $R_2C_{10}C_{10}$ + $R_1C_{10}C_{10}$ + $R_2C_{10}C_{12}$ + $R_1C_{10}C_{12}$ + $R_1C_{12:1}C_{10}$ + $R_1C_{12:2}$ + $R_1C_{8:2}$ สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบอีกทั้งยับยั้งจุลินทรีย์พวกราที่ก่อโรคในพืชได้คือ *Botrytis cinerea* และ *Gliocadium virens* นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าแรมโนลิพิดสามารถยับยั้งไวรัสพืชโดย Haferburg และคณะ (1987) คือ tobacco mosaic virus (*Nicotiana glutinosa)* และ potato X virus (*Nicotiana tabacum)* อีกทั้งใช้เป็น wetting agent คือเป็นสารที่จะทำให้ใบพืชเปียกโดยอาศัยส่วนที่ไม่ชอบน้ำเกาะกับส่วนที่เป็นแว็กซ์ของใบไม้ (Bunster และคณะ, 1989)

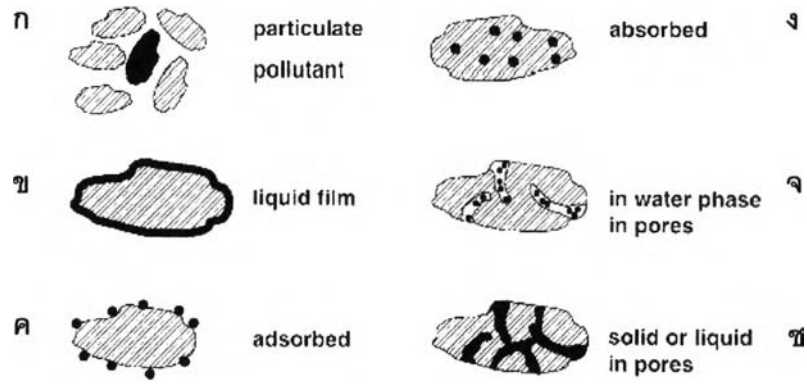
2. **ด้านอุตสาหกรรมอาหารใช้เป็นแหล่งของน้ำตาลแรมโนส** (L-rhamnose) ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นและรส และใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารอินทรีย์บางชนิด น้ำตาลแรมโนสส่วนมากได้มาจากพืช เช่น quercitrin จากเปลือกต้นโอ๊ก naringin จากกลีบของผลจากพืชตระกูลส้ม หรือ rutin เป็นต้น อยู่ในรูป rhamnose-containing polysaccharide ซึ่งยากในการแยกออกจากส่วนประกอบอื่นที่เป็นน้ำตาลและทำให้เกิดขยะมากมาย ดังนั้นจึงหันมาสนใจผลิตน้ำตาลแรมโนสจากแรมโนลิพิดที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* โดยขบวนการ hydrolysis ทั้งนี้เพราะแรมโนลิพิดผลิตออกนอกเซลล์ใน late log phase และ stationary phase ทำให้ง่ายในการแยกออกจากเซลล์ (Linhardt และคณะ, 1989)

3. **ด้านอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง** สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำนวนมากได้ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางโดยใช้เป็น emulsifier solubilizer สารทำให้เปียก และใช้เป็นสารทำความสะอาด เนื่องจากไม่ระคายเคืองและเข้ากันได้กับผิว (Kleckner และ Kosaric, 1993) ในญี่ปุ่นเริ่มมีการใช้แรมโนลิพิดเป็นสารเติมแต่งในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง (Maier และ Soberon-Chavez, 2000) นอกจากนี้มีการจดสิทธิบัตรในการใช้แรมโนลิพิดทำ liposome (Ishigami และคณะ, 1988a) และใช้เป็น emulsifier (Ishigami และคณะ, 1988b) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง

4. **ด้านสิ่งแวดล้อม** ปัญหาสารเคมีตกค้างในสิ่งแวดล้อมทั้งน้ำและดินยิ่งทวีเพิ่มมากขึ้น สารเคมีเหล่าล้วนแล้วเกิดจากอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมปิโตรเลียม กระดาษ และสารเคมีเป็นต้น ปล่อยของเสียหรือของเหลือจากกระบวนการผลิต (byproduct) ออกจากโรงงาน (Kosaric, 2001) ในปี 1994 สภาการวิจัยแห่งชาติ (National Research Council) ได้รายงานว่าในสหรัฐเอมริกามีพื้นที่ประมาณ 300,000 แห่ง ที่ปนเปื้อนไปด้วยสารเคมี การจะขจัดสิ่งปนเปื้อนออกไปนั้นต้องใช้เงินถึง 1 ล้านล้านล้านเหรียญสหรัฐ ดังนั้นจึงหันมาสนใจ bioremediation ซึ่งเป็นการบำบัดเพื่อลดปริมาณสารปนเปื้อนให้ออกจากสิ่งแวดล้อมอย่างจำเพาะเจาะจงและได้ผล (Head, 1998) โดยอาศัยธรรมชาติหรือสิ่งแวดล้อมภายในธรรมชาติเป็นตัวช่วยในการบำบัดแต่ทั้งนี้อาจเติมสารอาหารหรือสารบางอย่างลงไปในสิ่งแวดล้อมนั้นเพื่อเพิ่มอัตราการบำบัดได้เร็วขึ้น (Maier และ Soberon-Chavez, 2000) Kosaric (2001) กล่าวว่าการทำ bioremediation ในดินอาจทำได้โดยการเติมสารอาหารลงไปในบริเวณที่มีการปนเปื้อนเพื่อให้จุลินทรีย์ท้องถิ่นเจริญเพิ่มจำนวนและย่อยสลายสารปนเปื้อนดังกล่าว วิธีที่สองคือเลือกใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารปนเปื้อนดังกล่าวใส่ลงในดินที่ปนเปื้อนเมื่อจุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถปรับตัวและมีชีวิตรอดอยู่ได้ในสภาวะนั้นก็จะสามารถย่อยสลายสารปนเปื้อนดังกล่าวต่อไปได้ นอกจากนี้ยังมีการใช้สารลดแรงตึงผิวเพื่อช่วยให้จุลินทรีย์ย่อยสลายสารได้ดีขึ้น แรมโนลิพิดเป็นสารชนิดหนึ่งที่มีบทบาทมากมายใน bioremediation เช่น การกำจัดสารพวกสารอินทรีย์หรือโลหะหนักที่ปนเปื้อนร่วมกับสารอินทรีย์และสามารถชะล้าง (leaching agent) ทั้งสารอินทรีย์และโลหะหนัก

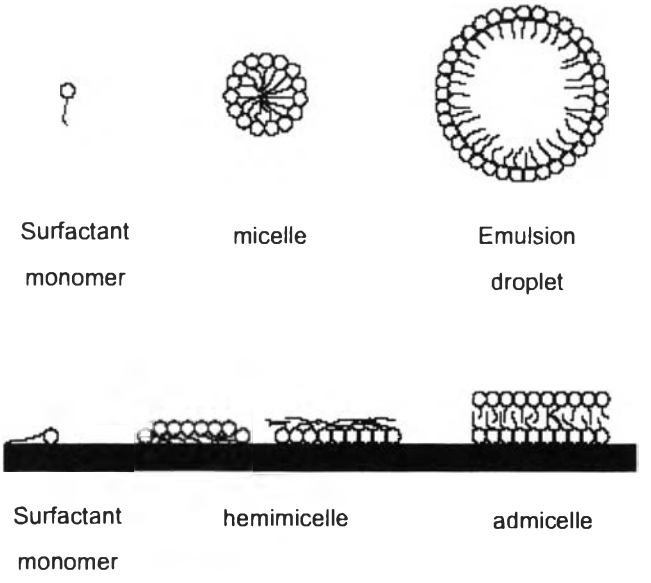
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1 **การย่อยสลายสารอินทรีย์ด้วยทางชีวภาพ** ปัจจุบันพบว่าการปนเปื้อนของ hydrophobic organic compounds (HOCs) ในดินกลายเป็นปัญหาสิ่งแวดล้อมที่กระจายไปทั่ว การย่อยสลาย (biodegradation) ของสารดังกล่าวเกิดขึ้นช้า (Beck และ Jones, 1995; Erickson และคณะ, 1993; Luthy และคณะ, 1994; Weissenfels และคณะ, 1992; Würdemann และคณะ, 1995) ทั้งนี้เนื่องจากสารปนเปื้อนดังกล่าวมีค่า bioavailability ต่ำทำให้สิ่งมีชีวิตนำไปใช้ได้ยาก (Volkering และคณะ, 1998) การปนเปื้อนของสารอินทรีย์ในดินอยู่ในรูปแบบต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 2.9 คือ ละลายในน้ำอยู่ตามช่องว่างของดิน ดูดซับและดูดซึมอยู่ในดินหรือแยกออกต่างหากจากดินอาจอยู่ในรูปของเหลวหรือของแข็งได้ (Volkering, 1996)

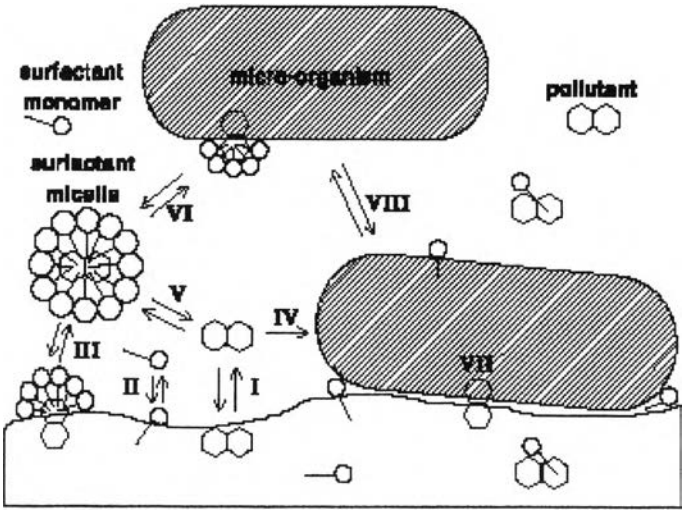


รูปที่ 2.9 **ลักษณะการปนเปื้อนของสารอินทรีย์ในดิน** (Volkering **และคณะ**, 1998) **ก) เป็นของแข็งแยกอยู่ต่างหากในดิน ข) เคลือบอยู่ที่ผิวหน้าดิน ค) ดูดซับอยู่ที่ผิวหน้าดิน ง) ดูดซึมเข้าไปในดิน จ) ละลายอยู่ในน้ำแทรกอยู่ในช่องว่างของอนุภาคดิน และ ช) เป็นของแข็งหรือของเหลวที่ไม่ใช่น้ำแทรกอยู่ในช่องว่างของอนุภาคดิน**

สารลดแรงตึงผิวมีส่วนช่วยเพิ่มค่า bioavailability ของสารปนเปื้อนดังกล่าวโดยใช้กลไกหลัก 3 กลไก คือ อย่างแรกการเกิดอิมัลชันของสารปนเปื้อนนั้นเนื่องจากสารลดแรงตึงผิวไปลดค่าแรงตึงผิวประจันระหว่างน้ำและสารปนเปื้อนที่เป็นของเหลวทำให้เกิดการรวมตัวกันเป็นอิมัลชัน กลไกที่สองคือการเพิ่มความสามารถในการละลายของสารปนเปื้อนเนื่องจากการเกิดโครงสร้างไมเซลล์ และสุดท้ายการทำให้สารปนเปื้อนเคลื่อนย้ายได้ง่าย (Volkering และคณะ, 1998) โดยปกติแล้วเมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มมากขึ้นในน้ำจะเกิดโครงสร้างไมเซลล์ แต่ในดินที่มีการปนเปื้อนด้วยสารอินทรีย์จะมีการเกิดโครงสร้างไมเซลล์ที่แตกต่างออกไปคือ สารลดแรงตึงผิวจะเข้าไปจับที่ผิวหน้าของดินและเกิดเป็นโครงสร้าง hemimicelle คือมีการเรียงตัวของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวชั้นเดียว และโครงสร้าง admicelle คือมีการเรียงตัวของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวสองชั้นดังแสดงในรูปที่ 2.10 ซึ่งแสดงให้เห็นโครงสร้างต่างๆ ของสารลดแรงตึงผิวในดิน ค่าความเข้มข้นที่ทำให้เกิดโครงสร้างดังกล่าวเรียกว่า critical admicelle concentration และมีค่าต่ำกว่าค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวในน้ำ (West และ Harwell, 1992; Nayyar และคณะ, 1994)



รูปที่ 2.10 **กลไกการเกิดโครงสร้างไมเซลล์** emulsion droplet hemimicelle **และ** admicelle (Volkering **และคณะ**, 1998)



รูปที่ 2.11 **ความสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์ ดิน และสารปนเปื้อน และสารลดแรงตึงผิว** (Volkering **และคณะ**, 1998)

Volkering และคณะ (1998) ได้อธิบายถึงบทบาทการเพิ่มค่า bioavailability ของสารปนเปื้อนที่มีต่อความสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์ สารปนเปื้อน ดิน และสารลดแรงตึงผิว ที่ทำให้เกิดการย่อยสลายสารอินทรีย์ปนเปื้อนได้ดีขึ้น จากรูปที่ 2.11 จะเห็นว่าสารอินทรีย์ปนเปื้อนบางส่วนอยู่ในรูปที่ละลายน้ำ บางส่วนถูกดูดซึมและดูดซับในดิน (I) เมื่อเพิ่มสารลดแรงตึงผิวลงไปโมเลกุลจะไปยึดเกาะที่ผิวหน้าดิน (II) และที่เมมเบรนของจุลินทรีย์เนื่องจากมีส่วนที่เป็นฟอสฟอลิพิดคล้ายสารลดแรงตึงผิว (Sikkema และคณะ, 1995) และยังไปช่วยเพิ่มการละลายของสารปนเปื้อนในดินโดยเกิดเป็นโครงสร้างไมเซลล์ขึ้น (III) จุลินทรีย์จะสามารถย่อยสลายสารปนเปื้อนที่ละลายอยู่ในน้ำได้ (IV) สารปนเปื้อนบางส่วนเกิดโครงสร้างไมเซลล์ (V) แล้วจึงนำเข้าเซลล์ (VI) บางครั้งจุลินทรีย์สามารถนำสารปนเปื้อนจากดินไปใช้ได้โดยตรง (VII) โดยสารลดแรงตึงผิวมีส่วนช่วยทำให้จุลินทรีย์สามารถเคลื่อนที่เข้ายึดเกาะที่ผิวหน้าดินได้ (VIII)

การใช้แรมโนลิพิดช่วยกำจัดสารพวกไฮโดรคาร์บอนทั้งที่เป็นสายและวง (Miller, 1995) การย่อยสลายทางชีวภาพโดยร่วมกับแรมโนลิพิดมีกลไก 2 แบบ แบบแรกคาดว่าแรมโนลิพิดจะช่วยเพิ่มการละลายแก่สารไฮโดรคาร์บอนเพื่อที่เซลล์จะย่อยสลายง่ายขึ้น (Shreve และคณะ, 1995; Zhang และ Miller, 1992) และกลไกแบบที่ 2 คาดว่าแรมโนลิพิดจะทำให้ผิวเซลล์มีภาวะไม่ชอบน้ำเพิ่มขึ้นซึ่งจะทำให้เซลล์เกาะติดกับซับสเตรทที่มีภาวะไม่ชอบน้ำเช่นกัน (Shreve และคณะ, 1995; Zhang และ

Miller, 1994) และเมื่อปี 2000 Al-Tahhan และคณะ พบว่าแรมโนลิพิดเป็นสาเหตุที่ทำให้ *Pseudomonas* sp. สูญเสีย LPS (lipopolysaccharide) จากผนังเซลล์ซึ่ง LPS เป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่เป็นส่วนชอบน้ำของผิวเซลล์ ดังนั้นการที่เซลล์สูญเสีย LPS จะทำให้ผิวเซลล์มีภาวะไม่ชอบน้ำ ดังนั้นกลไกแบบที่ 2 จึงเป็นกลไกสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์ด้วยวิธีชีวภาพ (Herman และคณะ, 1997) เมื่อใช้แรมโนลิพิดในปริมาณมากจะทำให้สารอินทรีย์ละลายได้เพิ่มมากขึ้น และเมื่อมีแรมโนลิพิดในปริมาณน้อยจะทำให้ผิวเซลล์เปลี่ยนไป จากที่กล่าวมาข้างต้นแรมโนลิพิดช่วยย่อยสลายสารอินทรีย์ปนเปื้อน และสามารถถูกย่อยสลายได้โดยเปรียบเสมือนเป็นแหล่งคาร์บอนอีกชนิดหนึ่ง

4.2 **การย่อยสลายพวกสารอินทรีย์ซึ่งมีโลหะหนักปนเปื้อน** (metal-organic co-contaminated) **ด้วยวิธีทางชีวภาพ** มีการประมาณการณ์ว่า 37% ของบริเวณที่ปนเปื้อนด้วยสารอินทรีย์ มีโลหะหนักอยู่ด้วย (Kovalick, 1991) พบว่าโลหะหนักที่เป็นพิษ เช่น ตะกั่ว แคดเมียม หรือสารหนู สามารถยับยั้งขบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ด้วยวิธีชีวภาพ (Baath, 1989; Duxbury, 1981; Hughes และ Poole, 1989) ซึ่งแรมโนลิพิดสามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีโลหะหนักที่เป็นพิษปนเปื้อนอยู่ด้วย โดยเมื่อใช้จุลินทรีย์บริสุทธิ์สามารถย่อยสลายได้ทั้ง แคดเมียม และแน็ฟทาลีน (Sandrin และคณะ, 2000) และสามารถย่อยสลาย แคดเมียม และแน็ฟทาลีนได้เมื่อปนเปื้อนในดิน ซึ่งการย่อยสลายในดินจะเกิดขึ้นมากกว่า 8-12 วัน และสามารถย่อยสลายแคดเมียมจนหมดได้ (Maier และ Soberon-Chavez, 2000)

5.3 **ความสามารถในการชะล้างสารอินทรีย์** เนื่องจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ด้วยวิธีทางชีวภาพใช้เวลานาน ดังนั้นจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องนำสารอินทรีย์ออกจากดินซึ่งสารอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ดีก็อาจใช้น้ำฉีดชะล้างออกไป แต่สารอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้น้อยหรือไม่ละลายน้ำจำเป็นต้องชะล้างออกด้วยวิธีอื่น การใช้แรมโนลิพิดก็เป็นวิธีหนึ่งซึ่งสามารถย่อยสลายได้และทำให้แรงตึงระหว่างผิวที่ประจันลดลงเป็นการเพิ่มความสามารถในการละลาย มีรายงานว่าแรมโนลิพิดช่วยละลายเฮกซะเดกเคนได้มากกว่าแอลคิลเบนซิลซัลโฟเนต (Thangamani และ Shreve, 1994) ละลาย octadecane มากกว่า Triton X-114 และ Corexit 0600 มากกว่า Triton X-114 10 เท่า และมากกว่า Corexit 0600 5 เท่า (Thai และ Maier, 1992) และเมื่อทำการทดลองการชะล้างในดิน พบว่าแรมโนลิพิดนำเฮกซะเดกเคนออก 20% จากดินโดยให้ผลมากกว่า SDS และ tween 80 ซึ่งไม่สามารถชะออกได้เลย และชะออกได้ 6% ตามลำดับ (Bai และคณะ, 1997) การชะโดยสารอินทรีย์ที่ไม่อยู่ในเฟสของน้ำและเป็นของเหลวจะมากน้อยขึ้นกับภาวะที่เหมาะสมได้แก่ ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง และ

ค่า ionic strength เพิ่มที่จะให้ค่าแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันน้อยที่สุด ส่วนสารอินทรีย์ที่เป็นของแข็งที่ปนเปื้อนในดิน แรมโนลิพิดสามารถช่วยละลายได้เช่นเดียวกัน เช่น phenanthrene (Noordoman และคณะ, 1998; Van Dyke และคณะ, 1993), pyrene (Lafrance และ Lapointe, 1998) และ polychlorinated biphenyls และยัง PAH อีกหลายชนิด (Van Dyke และคณะ, 1993) เมื่อเปรียบเทียบการชะสารอินทรีย์ผสมในดินระหว่างแรมโนลิพิด และสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ซึ่งสารอินทรีย์ผสมประกอบด้วย undecane, pentadecane, hexadecane, octadecane, pristine, naphthalene, phenanthrene และ pyrene พบว่าแรมโนลิพิดให้ผลดีกว่า TritonX-100 และ tween 60 (Scheibenbogen และคณะ, 1994)

4.4 **ความสามารถในการชะล้างโลหะหนัก** มีสารประกอบมากมายหลายชนิดที่สามารถรวมตัวได้เป็นออร์แกนิกลิแกนด์ (organic ligand) กับโลหะหนักที่มีพิษ ซึ่งการรวมเป็นออร์แกนิกลิแกนด์นั้นจำเป็นต่อขั้นตอนในการชะล้างโลหะหนักที่เป็นพิษ แต่เวลานำมาใช้งานจริงต้องคำนึงถึงสารที่จะนำมาใช้ว่าเป็นพิษต่อคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อมหรือไม่ เช่น DTPA, EDTA และ NTA ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์มีค่าคงที่ความเสถียรของ Cadmium organic ligand เท่ากับ 19, 16.36 และ 9.78 ตามลำดับ และมีค่าคงที่ความเสถียรของ Lead organic ligand เท่ากับ 18.66, 17.88 และ 11.34 ตามลำดับ (Martell และ Smith, 1976) ขณะที่แรมโนลิพิดมีค่าคงที่ความเสถียรของ Cadmium organic ligand เท่ากับ 6.89 และมีค่าคงที่ความเสถียรของ Lead organic ligand เท่ากับ 8.58 (Ochoa-Loza, 1998) (ค่าคงที่ความเสถียรของ organic ligand ที่แสดงเป็นค่า log) โดยที่สาร NTA และ DTPA เป็นสารก่อมะเร็ง ส่วน EDTA และ DPTA เป็นพิษต่อสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Borgman และ Norwood, 1995; Van Dam และคณะ, 1999) และแรมโนลิพิดยังสามารถรวมตัวได้เป็นออร์แกนิกลิแกนด์กับแคดเมียม ตะกั่ว สังกะสี แลนทานัม และคอปเปอร์ (Herman และคณะ, 1995; Ochoa-Loza, 1998; Tan และคณะ, 1994) ในการขจัดโลหะหนักออกจากดินในระดับห้องปฏิบัติการได้แก่ แคดเมียม (Torrens และคณะ, 1998) และ แทนทาลัม มีการใช้แรมโนลิพิดขจัด สังกะสี และคอปเปอร์ที่ปนเปื้อนในดินโดยมีน้ำมันและกรีส 12.6% (Mulligan และคณะ, 1999)

ถึงแม้ว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะมีคุณประโยชน์และมีหลายชนิดให้เลือกใช้ อีกทั้งไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม แต่การใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังมีน้อยอยู่ทั้งนี้เพราะสารลดแรงตึงผิวดังกล่าวมีราคาแพง ตัวอย่างเช่น สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ที่ใช้ในการนำน้ำมันจากแหล่งธรรมชาติขึ้นมาใช้ประโยชน์ มีราคาอยู่ที่ 4-6 เหรียญสหรัฐต่อกิโลกรัม (Rosenberg, 1993) ในขณะที่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีราคาแพงกว่าถึง 3-10 เท่า (Mulligan และ Gibbs, 1993) แรมโนลิพิดเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดหนึ่งที่มีคุณประโยชน์นานับประการดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ทำให้มีการผลิตแรมโนลิพิดในทางอุตสาหกรรมโดยบริษัท Jeneil Biosurfactant มีการประมาณราคาแรมโนลิพิดเท่ากับ 5-20 เหรียญสหรัฐต่อ 1 กิโลกรัม ในระดับการผลิตปริมาณ 100 – 20 ลูกบาศก์เมตร (Lang และ Wullbrandt, 1999) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ก็นับว่ายังแพงกว่าอยู่มาก ตัวอย่างเช่น อีทอไซเลท หรือแอลคิลพอลิไกลโคไซด์ มีราคาประมาณ 1-3 เหรียญสหรัฐต่อ 1 กิโลกรัม ทั้งนี้ Kosaric และคณะ 1984 ได้แนะนำว่าปัจจัยที่มีผลทำให้ลดต้นทุนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้นั้นคือ การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพและปริมาณสูง และการพัฒนากระบวนการผลิตซึ่งรวมไปถึงการเลือกใช้วัตถุดิบราคาถูกและวิธีการสกัดเพื่อให้ได้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ น้ำเสียที่ปล่อยจากโรงงานผลิตน้ำมันมะกอกถูกนำมาใช้ในการผลิตแรมโนลิพิดจาก *Pseudomonas* spp. (Mercade และคณะ, 1993; Robert และคณะ, 1989) ในปี 2000 Haba และคณะได้ใช้น้ำมันมะกอกและน้ำมันดอกทานตะวันที่ผ่านการทอดแล้วมาใช้ในการผลิตแรมโนลิพิด พบว่า *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 สามารถใช้น้ำมันมะกอกที่ผ่านการใช้แล้วในการเจริญและการผลิตแรมโนลิพิดได้ดีกว่าน้ำมันดอกทานตะวันคือ ผลิตแรมโนลิพิดชนิดที่ 1 และ 2 (R1 และ R2 ตามลำดับ) ได้ 2.7 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าการใช้น้ำเสียจากโรงงานกลั่นน้ำมันมะกอกผลิตแรมโนลิพิดโดยใช้เชื้อเดียวกัน (Mercade และคณะ, 1993) และลดค่าแรงตึงผิวได้ 34-36 mN/m อีกทั้งเกิดอิมัลชันกับคีโรซีนได้นาน 3 เดือน นอกจากนี้ยังมีรายงานอื่นที่แสดงถึงการใช้น้ำเสียต่างๆ มาเป็นวัตถุดิบในการผลิตแรมโนลิพิดเช่น น้ำเสียจากโรงกลั่นเหล้า และหางนม ผลิตได้ 1.85 และ 1.78 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Koch และคณะ, 1988; Babu และคณะ, 1996) Patel และ Desai (1997a) ใช้กากน้ำตาลผลิตได้ 0.24 กรัมต่อลิตร ในปี 2002 Hori และคณะ พบว่าสามารถผลิตแรมโนลิพิดควบคู่ไปกับ พอลิโฮดรอกซีแอลคาโนเอท (PHAs) โดย *P. aeruginosa* IFO3924 เมื่อใช้ดีคาโนเอทเป็นแหล่งคาร์บอน PHAs จะผลิตสะสมอยู่ภายในเซลล์ในช่วงที่มีเจริญเติบโตของเซลล์และจะลดลงเมื่อดีคาโนเอทถูกใช้หมด ส่วนแรมโนลิพิดจะผลิตออกนอกเซลล์ในช่วง late log phase และ stationary phase ถึงแม้ว่าดีคาโนเอทจะหมดแต่ยังคงมีการผลิตแรมโนลิพิดอยู่ สรุปแล้วจะมีอัตราการผลิต PHAs และแรมโนลิพิดเท่ากับ 0.07 และ 0.04 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ การ

ผลิตสารสองอย่างได้ในเวลาเดียวกันอีกทั้งสามารถแยกผลิตภัณฑ์ออกจากกันด้วยการปั่นเหวี่ยงก็เป็นการช่วยลดต้นทุนการผลิตได้อีกทางหนึ่ง ในปี 2004 Jeong และคณะ ได้ตรึงเซลล์ของ *P. aeruginosa* BYK-2 (KCTC 18012P) โดยใช้ 10% พอลิไวนิล แอลกอฮอล์ จากนั้นนำไปผลิตแรมโนลิพิดพบว่าความสามารถในการผลิตของเซลล์ที่ถูกตรึงนั้นยังอยู่ที่ 80-90% ของความสามารถในการผลิตเดิม ภายใน 15 รอบแรกของการผลิตแรมโนลิพิด และได้แรมโนลิพิด 0.1 กรัมต่อชั่วโมง นอกจากนี้ยังมีความพยายามต่างๆ มากมายในการที่จะเพิ่มผลผลิตทั้งการหาสูตรอาหารและภาวะที่เหมาะสมในการผลิต การเพิ่มผลผลิตโดยการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ดั้งเดิมให้มีความสามารถในการผลิตเพิ่มมากขึ้นโดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเข้ามาช่วยก็เป็นอีกหนทางหนึ่งที่น่าสนใจ (Kaweshima และคณะ, 1983; Mulligan และคณะ, 1989; Ohno และคณะ, 1995; Shabtai และ Gntnick, 1986) Ochsner และคณะ (1995) นำ *rhlAB* ต่อเชื่อมกับโปรโมเตอร์ *tac* ได้เป็นพลาสมิด pUO98 และนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านต่างๆ เพื่อดูความสามารถในการผลิตแรมโนลิพิดชนิดที่ 1 พบว่า *Pseudomonas putida* KT2442 ซึ่งปกติไม่มีความสามารถในการผลิตแรมโนลิพิดชนิดที่ 1 เมื่อได้รับพลาสมิด pUO98 จึงสามารถผลิตโมโนแรมโนลิพิดได้ในขณะที่ไม่มีการผลิตแรมโนลิพิดชนิดที่ 1 ใน *Escherichia coli* ในปี 2004 Tahzibi และคณะทำการกลายพันธุ์แบบสุ่ม *P. aeruginosa* MM1011 ด้ วย N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) ได้เป็นสายพันธุ์กลาย *P. aeruginosa* PTCC1637 ที่ผลิตแรมโนลิพิดได้มากกว่าเดิม 10 เท่า

Pseudomonas sp. A41 เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำในบริเวณอ่าวไทย จ. สมุทรสงคราม โดย อารีย์ กังฉิน ในปี พ.ศ. 2542 ซึ่งสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน สารลดแรงตึงผิวซึ่งอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อลดค่าแรงตึงผิวของน้ำจาก 72 mN/m เป็น 29 mN/m เมื่อมีแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มที่ 30^{o}ซ เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 7.0 ต่อมา นพรัตน์ วานิชสุขสมบัติ (2545) นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีและวิเคราะห์ทางเคมีด้วย LC-MS และ IR-spectrum สามารถกล่าวได้ว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้เป็นแรมโนลิพิด ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษา *rhlA* หรือ *rhlR* ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แรมโนลิพิดใน *Pseudomonas* sp. A41 โดย *rhlA* เป็นยีนที่กำหนดรหัสโปรตีน RhlA ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งของเอนไซม์ rhamnosyltransferase 1 และ *rhlR* เป็นยีนที่มีส่วนควบคุมการแสดงออกของ *rhlAB* เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงทางพันธุกรรม