บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

แรมโนลิพิด เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไกลโคลิพิดผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* และ *Pseudomonas* sp. (Desai และ Banat, 1997; Lang และ Wullbrandt, 1999) มีความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิวของน้ำ อีกทั้งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นได้ เช่น ใช้ในการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในพืช ใช้เป็นแหล่งของน้ำตาลแรมโนส ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง และใช้ในการบำบัดคราบน้ำมันและสารตกค้างในสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงมีผู้สนใจหันมาผลิตแรมโนลิพิดขายในระดับอุตสาหกรรม แต่เนื่องจากต้นทุนในการผลิตแรมโนลิพิดดังกล่าวมีราคาสูง ทำให้ไม่สามารถแข่งขันในทางการตลาดกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ได้ มีผู้วิจัยหลายกลุ่มพยายามพัฒนากระบวนการผลิตแรมโนลิพิดให้มีต้นทุนที่ต่ำลงโดยการใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูก หาได้ง่าย พัฒนาขั้นตอนการสกัดและทำให้แรมโนลิพิดบริสุทธิ์ ตลอดจนคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ให้แรมโนลิพิดที่มีประสิทธิภาพและปริมาณสูง

Pseudomonas sp. A41 เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำบริเวณอ่าวไทย จ.สมุทรสงคราม (อารีย์ กังฉิน, 2542) สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ลดค่าแรงตึงผิวของน้ำจาก 72 mN/m ได้เป็น 29 mN/m เมื่อใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนและมีการจำกัดปริมาณไนโตรเจน ต่อมา นพรัตน์ วานิชสุขสมบัติ (2545) ได้พิสูจน์ว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดังกล่าวเป็นแรมโนลิพิดโดยใช้ LC-MS และ IR-spectrum จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 พบว่ามีเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอของ *Pseudomonas aeruginosa* เท่ากับ 100% ประกอบกับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี (อารีย์ กังฉิน, 2542) จึงสามารถจัดจำแนก *Pseudomonas* sp. A41 เป็นสมาชิกหนึ่งใน *Pseudomonas aeruginosa*

ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แรมโนลิพิดใน *Pseudomonas aeruginosa* A41 เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ในระดับพันธุวิศวกรรม การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าวเริ่มจากการสร้างดีเอ็นเอติดตาม *rhlA* และ *rhlR* จากจีโนมิกดีเอ็นเอของ *P. aeruginosa* A41 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จากนั้นนำไปติดตามในจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 โดยใช้เทคนิคเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอติดตาม *rhlA* หรือ *rhlR* นำชิ้นดีเอ็นเอที่ให้ผลบวกจากไฮบริไดเซชันโคลนเข้าพลาสมิดเวกเตอร์ต่างๆ จากการทดลองจะได้โคลนทั้งหมด 4 ตัว คือ pBR123 pBR530 pGA396 และ pKB261 ซึ่งมีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก 1531 513

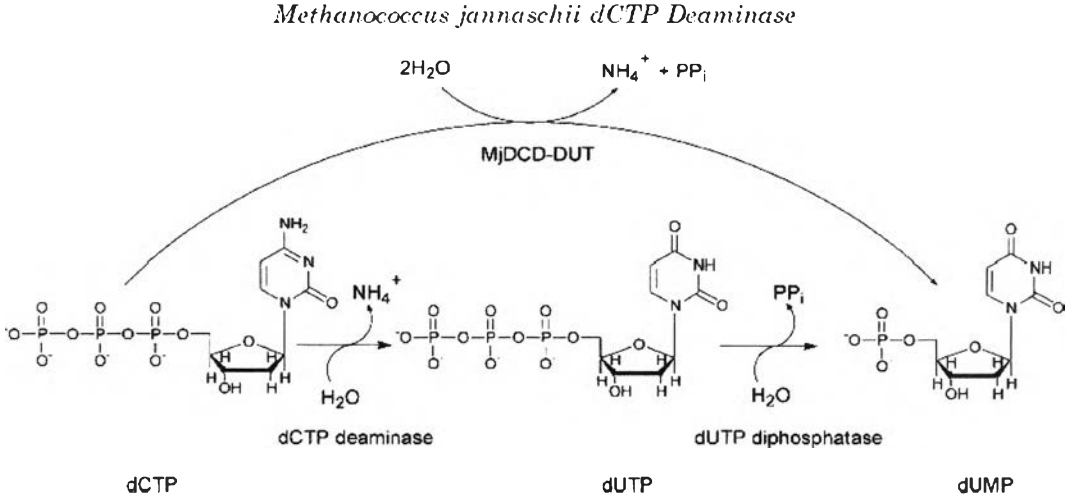
1562 และ 1975 bp ตามลำดับ จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกทั้งชิ้นในพลาสมิดที่โคลนได้โดยใช้ทั้งวิธี primer walking และการใช้ universal primer ที่จำเพาะกับพลาสมิดของโคลนนั้น เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้งหมดมาเชื่อมต่อกันได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 4965 bp

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม DNASIS เพื่อหากรอบอ่านรหัสเปิด และโปรแกรม BlastX version 2.2.9 ที่แปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโน และเทียบความคล้ายคลึงกับกรดอะมิโนของยีนต่างๆ ในฐานข้อมูล GenBank และหาบริเวณที่คาดว่าจะเป็นโปรโมเตอร์โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับ consensus sequence –35 region และ –10 region ของโปรโมเตอร์ที่รายงานโดย Lisser และ Margalit (1993)

จากข้อมูลความคล้ายในระดับกรดอะมิโนที่ได้หาตำแหน่งจุดเริ่มต้นและสิ้นสุดการถอดรหัสเป็นโปรตีน รวมถึงตำแหน่ง Shine-Dalgarno sequence (S/D) ซึ่งเป็นตำแหน่งเกาะของไรโบโซม มักจะประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ชนิดพิวรีน 3-10 เบส อยู่ก่อนรหัสเริ่มต้นของกรอบอ่านรหัสเปิดประมาณ 10 เบส เสนอโดย Shine และ Dalgarno (1974) อาจสามารถระบุกรอบอ่านรหัสเปิดจำนวน 5 กรอบ ซึ่งมีทิศทางการถอดรหัสไปทางเดียวกันดังต่อไปนี้ (ดูรูปที่ 4.19ประกอบ)

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 1 (ORF1) หรือ *dcd* เป็นกรอบอ่านรหัสเปิดที่ไม่สมบูรณ์กล่าวคือยังไม่สามารถพบกรดอะมิโนเมธิโอนีนที่ตำแหน่งที่ 1 ของ ORF (start codon) พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่พบมีความคล้ายคลึงกับ deoxycytidine triphosphate deaminase (dCTP deaminase) ใน *P. aeruginosa* PAO1 เท่ากับ 100% ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการสร้าง dUMP เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ thymidine อีกทีหนึ่ง

ในแบคทีเรียทั่วไป dCTP deaminase (DCD) ทำหน้าที่กระตุ้นให้เกิดการแทนที่ของ hydroxide ion ที่ตำแหน่ง 4-amino group ของเบส cytosine ใน dCTP ได้เป็น dUTP และเกิด NH_3 ขึ้น (Neuhard, 1968) จากนั้น dUTP จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ dUTP diphosphatase (DUT) ได้เป็น pyrophosphate (diphosphate; PPi) และ dUMP เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ thymidine ต่อไป (Shlomai และ Kornberg, 1978) แต่ในทางตรงกันข้ามการสังเคราะห์ dUMP ใน *Methanococcus jannaschii* ซึ่งเป็น archaebacteria นั้นอาศัยเพียงเอนไซม์ *Methanococcus jannaschii* dCTP deaminas (MjDCD-DUT) เพียงชนิดเดียวก็สามารถสังเคราะห์ dUMP ได้ทั้งนี้เพราะเอนไซม์ MjDCD-DUT ทำหน้าที่เป็นทั้ง dCTP deaminase และ dUTP diphophatase (Li และคณะ, 2003) ดังแสดงในรูปที่ 5.1



รูปที่ 5.1 **การทำงานของเอนไซม์** dCTP deaminase **และ** dUTP diphosphatase **ในแบคทีเรียและเอนไซม์** *Methanococcus jannaschii* dCTP deaminas (MjDCD-DUT)**ใน** *Methanococcus jannaschii* (Li **และคณะ**, 2003)

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 2 (ORF2) หรือ *rhlA* ประกอบด้วย 295 ลำดับกรดอะมิโน มีความคล้ายคลึงกับโปรตีน rhamnosyltransferase chain A ที่ประมวลรหัสโดย *rhlA* ของ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ, 1994a) เท่ากับ 100% โปรตีน RhlA มีขนาด 32.5 กิโลดาลตัน พบอยู่ในเพอริพลาสซึม ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แรมโนลิพิด หรือส่งผ่านสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ให้ rhamnosyltransferase หรือเป็นตัวช่วยให้โปรตีน RhlB เสถียรคงตัวอยู่ได้ใน cytoplasmic membrane (Ochsner และคณะ, 1994a)

โปรโมเตอร์แบบ σ^{54} เป็นโปรโมเตอร์ที่มีบริเวณจดจำของ σ^{54} factor ของ RNA polymerase และต้องการ transcriptional activator หรือ regulatory protein มากระตุ้นบริเวณโปรโมเตอร์ให้เกิดการถอดรหัส (Collado-Vides และคณะ, 1991; Woods และ Reid, 1993; Morett และSegovia, 1993) โปรโมเตอร์ของ *rhlA* ของสายพันธุ์ A41 เป็นแบบ σ^{54} เช่นกัน เนื่องจากพบบริเวณอนุรักษ์ของโปรโมเตอร์แบบ σ^{54} ที่ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ " $-N_{5\text{-}6}-$ " (N หมายถึงนิวคลีโอไทด์ตัวใดๆ) อยู่เหนือยีน *rhlA* ตัวอย่างยีนที่มีโปรโมเตอร์แบบ σ^{54} ได้แก่ pilin gene (*PAK*) ใน *P. aeruginosa* *xylCAB* และ *xylS* ที่อยู่บนพลาสมิดของ *P. putida* TOL ยีนที่ระบุรหัสโปรตีน carboxypeptidase ของ *Pseudomonas* CPG2 (Deretic และคณะ, 1987, 1989) และ *rhlA* ของ *P. aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ, 1994a)

นอกจากนี้ยังพบ *las* box ซึ่งมีลักษณะเป็น palindrome อยู่เหนือยีน Ochsner และคณะ (1994a) ได้ศึกษาการทำงานของโปรโมเตอร์ *rhlA* ใน *P. aeruginosa* PG201 โดยเชื่อมโปรโมเตอร์เข้ากับ *lacZ* เพื่อใช้เป็น reporter gene พบว่าโปรโมเตอร์จะทำงานได้ต้องอาศัย regulatory protein RhlR แต่ถ้าขาดส่วนที่มีลักษณะเป็น palindrome *rhlA* ก็ไม่สามารถทำงานได้เช่นกัน ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าบริเวณ palindrome เป็นส่วนขัดขวางการทำงานของ *rhlA* ต้องอาศัย regulatory protein RhlR เข้าจับบริเวณ palindrome ดังกล่าวก่อนยีนจึงทำงาน Pearson และคณะ (1997) ศึกษา RhlR-binding site นี้พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือน consensus sequence ของ *las* box ของ *lasB* OP1 ซึ่งถูกควบคุมด้วย regulatory protein RhlR บริเวณ *las* box ของ ORF-1 (*rhlA*) ของสายพันธุ์ A41 มี consensus sequence คล้าย *las* box ของ *lasB* OP1 และ *rhlA* ของ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า ORF-1 (*rhlA*) จะถูกควบคุมด้วย regulatory protein RhlR บริเวณ *las* box เช่นเดียวกัน

บริเวณปลายด้าน-N ของลำดับกรดอะมิโนของ RhlA พบว่ามีความคล้ายกับ Signal peptide ที่พบในแบคทีเรียติดสีแกรมลบ(Pugsley, 1993) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าโปรตีน RhlA อาจถูกส่งออกไปที่เพอริพลาสซึมสอดคล้องกับรายงานในลำดับกรดอะมิโนของ RhlA ของ *P. aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ, 1994a)

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 3 (ORF3) หรือ *rhlB* ประกอบด้วย 426 ลำดับกรดอะมิโน มีความคล้ายคลึงกับโปรตีน rhamnosyltransferase chain B (RhlB) ที่ประมวลรหัสโดย *rhlB* ของ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover และคณะ, 2000) เท่ากับ 100% โปรตีน RhlB มีขนาด 47 กิโลดาลตัน (kDa) ทำหน้าที่เป็น catalytic protein ของเอนไซม์ rhamnosyltransferase 1 ซึ่งทำหน้าที่กระตุ้นให้เกิดการส่งผ่านโมเลกุลแรมโนสจาก TDP-L-rhamnose ไปยัง β-hydroxydecanoyl-β-hydroxydecanoate อย่างจำเพาะได้เป็น L-rhamnosyl-β-hydroxydecanoyl-β-hydroxydecanoate หรือ rhamnolipid 1 ในกระบวนการผลิตแรมโนลิพิด ทั้งนี้ได้พิสูจน์ใน *E. coli* แล้วว่าเพียง *rhlB* ยีนเดียวก็สามารถสังเคราะห์โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น rhamnosyltransferase ได้ แต่ก็ต้องการ RhlA เพื่อให้เอนไซม์เกิดความเสถียรและคงตัวอยู่ได้ใน cytoplasmic membrane ส่วน RhlB จะฝังตัวอยู่ในเมมเบรนโดยใช้ส่วนปลายด้าน-N เป็นตัวยึดเหนี่ยวกับเมมเบรนไว้และวางตัวข้ามเมมเบรนโดยมีส่วน domain เปิดออกทั้งสองข้าง (Ochsner และคณะ, 1994a)

rhlB เรียงตัวต่อจาก *rhlA* ไม่พบส่วนโปรโมเตอร์ *rhlB* ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า *rhlB* น่าจะถอดรหัสเป็น mRNA สายเดียวกับ *rhlA* สอดคล้องกับรายงานของ Ochsner และคณะ (1994a) ซึ่งพบว่าสายพันธุ์กลาย UO299 ที่ไม่มีการทำงานของ *rhlA* จะไม่พบทั้งโปรตีน RhlA และ RhlB ที่มีขนาด 32 และ 47 กิโลดาลตันตามลำดับ แต่ในสายพันธุ์กลาย UO287 (*rhlB*) จะพบเพียงโปรตีน RhlA ขนาด 32 กิโลดาลตันเท่านั้น จากเหตุการณ์นี้จึงถือว่า *rhlA* และ *rhlB* ใช้โปรโมเตอร์ร่วมกันและอยู่ในโอเพอรอนเดียวกัน

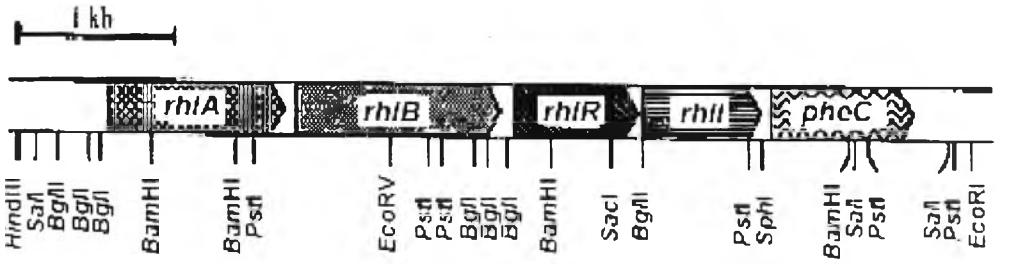
กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 4 (ORF4) หรือ *rhlR* ประกอบด้วย 241 ลำดับกรดอะมิโน มีความคล้ายคลึงกับ transcriptional regulator RhlR ที่ประมวลรหัสโดย *rhlR* ของ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover และคณะ, 2000) และ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ, 1994b) เท่ากับ 100% โปรตีน RhlR มีขนาด 28 กิโลดาลตัน ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้น *rhlAB* promoter ซึ่งอยู่เหนือขึ้นไปจากยีน *rhlR* 2.5 กิโลเบส ให้เกิดการถอดรหัส (transcriptional activator) (Ochsner และคณะ 1994a, 1994b) นอกจากนี้ Ochsner (1994b) ยังกล่าวว่าโปรตีน RhlR เป็นตัวควบคุมแบบ pleiotropic regulator คือมีผลควบคุมการถอดรหัสของโปรโมเตอร์ได้มากกว่าหนึ่งโปรโมเตอร์

บริเวณปลายด้าน-C ของลำดับกรดอะมิโน พบบริเวณอนุรักษ์ของโปรตีนที่เป็นตัวควบคุมการถอดรหัสประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโน " $LSXREX_2ILX_5GX_{22}NX_3K$" (X หมายถึงกรดอะมิโนใดๆ) นอกจากนี้ภายในบริเวณอนุรักษ์ดังกล่าวยังพบ helix-turn-helix motif (H-T-H motif) ซึ่งใช้ในการเข้าจับโปรโมเตอร์ของดีเอ็นเอเป้าหมาย (DNA-binding) (Ochsner และคณะ 1994b) regulatory protein ที่มีบริเวณอนุรักษ์ดังกล่าวที่ปลายด้าน-C มักจะพบในกลุ่ม regulatory protein ที่อาศัยตัวควบคุมอื่นอีกหนึ่งชนิดจึงทำงานได้ (two-component regulatory system) (Henikolf และคณะ, 1989) กลไกการควบคุมแบบนี้มักเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการทำงานของแบคทีเรีย (Adhya และ Garges, 1990; Bourret และคณะ, 1991; Stock และคณะ, 1989 และ Stock และคณะ, 1990) เช่น chemotaxis, osmosensitivity ความรุนแรงของการก่อโรค การเคลื่อนที่ ตลอดจนการผลิตสาร secondary metabolite ภายใต้ภาวะที่แน่นอน เป็นต้น การผลิตแรมโนลิพิดของ *P. aeruginosa* A41 และ *Pseudomonas aeruginosa* พบว่าเกิดขึ้นในระยะ late exponential และระยะ stationary phase ในภาวะที่ให้ไนโตรเจนจำกัด (อารีย์ กังฉิน, 2542; นพรัตน์ วานิชสุขสมบัติ, 2545; Wagner และคณะ, 1984) ดังนั้นจึงเป็นการแสดงให้เห็นว่าการผลิตแรมโนลิพิดถูกควบคุมโดยปัจจัยต่างๆ จากสิ่งแวดล้อม จึงเป็นไปได้ว่าการสังเคราะห์แรมโนลิพิดจะเกี่ยวข้องกับ two-component regulatory system ในปี 2003 Medina และคณะ พบว่าโปรตีน RhlR ไม่สามารถกระตุ้นการทำงานของ *rhlAB* promoter ได้ด้วยตัวมันเอง กลับไปยับยั้งการทำงานของ *rhlAB* promoter และการแสดงออกของยีนตัวมันเอง แต่

เมื่อโปรตีน RhlR พันธะกับ butanoyl-homoserine lactone (C_4-HSL) หรือ PAI-2 ซึ่งเป็น autoinducer ชนิดหนึ่งได้เป็น RhlR-PAI-2 complex กลับสามารถทำให้เกิดการแสดงออกของโอเพอรอน *rhlAB* แสดงให้เห็นว่าโปรตีน RhlR เป็นได้ทั้งตัวกระตุ้นและตัวกดการทำงานของ *rhlAB* promoter ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเร็วในการพันธะกับ PAI-2 และกลไกในการควบคุมในระดับพันธุศาสตร์ซึ่งยังไม่เป็นที่เข้าใจ Lamb และคณะ (2003) ได้พิสูจน์ว่าบริเวณปลายด้าน-N ของโปรตีน RhlR เป็นส่วนที่ autoinducer เข้าจับและสามารถกระตุ้นการถอดรหัสของดีเอ็นเอเป้าหมาย (*rhlAB* promoter) ได้โดยใช้ปลายด้าน-C ที่มี DNA-binding helix-turn-helix motif ตัวอย่างของ regulatory protein ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกับ RhlR ได้แก่ LuxR และ LasR ซึ่งรายงานว่าต้องรวมตัวกับ autoinducer ก่อนจึงกระตุ้นการทำงานของยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับการเกิด bioluminescence และการสังเคราะห์ elastase ใน *V. fischeri* และ *P. aeruginosa* ได้ตามลำดับ

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 5 (ORF5) หรือ *rhlI* ประกอบด้วย 201 ลำดับกรดอะมิโน มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนที่คาดว่าจะเป็น autoinducer synthetase (RhlI) ที่ประมวลรหัสโดย *rhlI* ของ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และ Reiser, 1995) เท่ากับ 94% และ autoinducer synthesis protein RhlI ของ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover และคณะ, 2000) เท่ากับ 93% โปรตีน RhlI มีขนาด 22 กิโลดาลตัน (kDa) เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ autoinducer ชนิด butanoyl-homoserine lactone (C_4-HSL) หรือ PAI-2 ทำงานร่วมกับโปรตีน RhlR ไปกระตุ้นการแสดงออกของ *rhlAB* โดย เมื่อความหนาแน่นของแบคทีเรียเพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของ butanoyl-homoserine lactone (Pearson และคณะ, 1995) ที่สังเคราะห์จากโปรตีน RhlI ก็จะเพิ่มสูงขึ้นจนถึงระดับหนึ่งจึงเข้าจับกับโปรตีน RhlR ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นการถอดรหัส (Ochsner และคณะ, 1994b) สารประกอบ RhlR-PAI-2 complex นี้จะเข้าจับบริเวณ *las* box เหนือยีน *rhlAB* ทำให้เกิดการถอดรหัสได้เป็น rhamnosyltransferase 1 ใช้ในการสังเคราะห์แรมโนลิพิด (Pearson และคณะ, 1997) นอกจากนี้บริเวณเหนือยีน *rhlI* เองยังพบ *las* box ชนิดที่มีการอนุรักษ์นิวคลีโอไทด์ที่ 8A และ 13T แสดงให้เห็นว่า *rhlI* เองก็ถูกควบคุมการแสดงออกด้วย LasR และ RhlR อีกทีหนึ่ง ซึ่งต่างกับ *las* box ของ *lasI* ที่ระบุรหัส autoinducer synthetase (LasI) ใช้ในการสังเคราะห์ autoinducer PAI-1 (N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone) ที่ไม่มีการอนุรักษ์นิวคลีโอไทด์ 8A และ 13T ของ *las* box ดังนั้นจึงถูกควบคุมด้วย LasR เท่านั้น (Whiteley และ Greenberg, 2001)

จากการศึกษาข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับลำดับกรดอะมิโนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แรมโนลิพิดใน *P. aeruginosa* A41 จะเห็นว่า *rhlA rhlB rhlR* และ *rhlI* มีการเรียงตัวต่อกันตามลำดับ โดย *rhlA* และ *rhlB* ใช้โปรโมเตอร์ร่วมกันอยู่ในโอเพอรอนเดียวกัน ส่วน *rhlR* และ *rhlI* มีโปรโมเตอร์แยกต่างหาก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ochsner และ Reiser (1995) ที่ได้ศึกษาและสรุปการจัดเรียงตัวของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แรมโนลิพิดใน *P. aeruginosa* PG201 ไว้ดังแสดงในรูปที่ 5.3 เหมือนกับที่รายงานใน *P. aeruginosa* PAO1 เช่นกัน (Stover และคณะ, 2000) แต่ยีนที่กล่าวถึงข้างต้นนั้นเกี่ยวข้องเฉพาะแค่การสังเคราะห์แรมโนลิพิดชนิดที่ 1 เท่านั้นซึ่งต้องอาศัยเอนไซม์ rhamnosyltransferase 1 ส่วนการสังเคราะห์แรมโนลิพิดชนิดที่ 2 ต้องอาศัยเอนไซม์ rhamnosyltransferase 2 Rahim และคณะ (2001) พบว่ายีนที่เกี่ยวข้องนั้นคือ *rhlC* และถูกควบคุมถูกควบคุมด้วย *rhl* quorum-sensing system เช่นเดียวกัน ส่วนแรมโนลิพิดชนิดอื่นนั้นยังไม่มีผู้ศึกษาถึงกระบวนการสังเคราะห์และยีนที่เกี่ยวข้อง



รูปที่ 5.2 **การจัดเรียงตัวของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แรมโนลิพิดภายใน** *Pseudomonas aeruginosa* PG201 **(Ochsner และ** Reiser, 1995)

นอกจากนี้บริเวณเหนือโปรโมเตอร์ของทั้ง *rhlAB rhlR* และ *rhlI* จะพบ *las* box ที่มีลักษณะเป็น palindrome ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีนดังกล่าวจะถูกควบคุมด้วย regulatory protein ที่เกี่ยวข้องกับ quorum sensing system สอดคล้องกับที่ Pesci และคณะ (1997) ได้รายงานถึงกลไกการควบคุมของ *las* และ *rhl* quorum sensing ใน *P. aeruginosa* PAO1 ว่ามีผลต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แรมโนลิพิด

จากการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แรมโนลิพิดใน *P. aeruginosa* A41 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับที่พบใน *P. aeruginosa* PAO1 และ PG201 ดังนั้นอาจสรุปการควบคุมและการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แรมโนลิพิดใน *P. aeruginosa* A41 ภายใต้ภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจนจำกัดได้ดังนี้คือ เมื่อความหนาแน่นของเซลล์เพิ่มมากขึ้นความเข้มข้นของ butanoyl-homoserine lactone (C_4-HSL) หรือ PAI-2 ซึ่งเป็น autoinducer ชนิดหนึ่งที่สังเคราะห์โดย RhlI จะมีค่าสูงขึ้นเช่นกันจนถึงค่าความเข้มข้นหนึ่ง autoinducer ดังกล่าวจะเข้าจับบริเวณปลายด้าน-N ของ transcriptional regulator RhlR ได้เป็น RhlR-PAI-2 complex ซึ่งสามารถทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานของยีน *rhlAB* ได้ โดย RhlR-PAI-2 complex นี้จะใช้บริเวณปลายด้าน-C ของ RhlR เข้าจับบริเวณ *las* box ที่อยู่เหนือโปรโมเตอร์ *rhlAB* เกิดการถอดรหัสเป็น rhamnosyltransferase 1 นำไปใช้ในการสังเคราะห์แรมโนลิพิดได้

จะเห็นได้ว่ากลไกควบคุมการผลิตแรมโนลิพิดมีความยุ่งยาก ซับซ้อน และขึ้นอยู่กับปัจจัยแวดล้อมอีกหลายประการ เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็นต้น ทั้งนี้เนื่องจากการแสดงออกของโปรโมเตอร์ของ *rhlAB* ถูกควบคุมด้วย quorum sensing system ดังนั้นเพื่อปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ *Pseudomonas aeruginosa* A41 และแก้ไขปัญหาปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อการผลิตแรมโนลิพิดจึงควรศึกษาการแทนที่โปรโมเตอร์ของ *rhlAB* ด้วยโปรโมเตอร์ที่มีประสิทธิภาพสูง เช่น โปรโมเตอร์ *tac* เป็นต้น ก็น่าจะเป็นวิธีการหนึ่งที่ช่วยให้มีการผลิตแรมโนลิพิดเพิ่มสูงขึ้น