บทที่ 1

บทนำ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactants) หมายถึง สารชีวโมเลกุลที่มีสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว ซึ่งสร้างโดยสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น แบคทีเรีย ราและยีสต์บางชนิด (Cooper และ Zajic, 1980) ปัจจุบันสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทวีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากขึ้นและมีการนำมาใช้แทนสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี เนื่องจากถูกย่อยสลายได้ทางชีวภาพจึงไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม มีความเป็นพิษต่ำ อีกทั้งสามารถผลิตจากสารตั้งต้นที่มาจากทรัพยากรที่นำกลับมาใช้ใหม่ได้ (Mercade และคณะ, 1993; Babu และคณะ, 1996; Daniel และคณะ, 1998) โครงสร้างหลักของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นแอมฟิพาติก ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่ชอบไขมันและส่วนที่ชอบน้ำ Desai และ Banat (1997) ได้แบ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกเป็น 6 ชนิดตามโครงสร้างทางเคมีได้แก่ ไกลโคลิพิด ไลโพเพพไทด์และไลโพโปรตีน กรดไขมันและไขมันที่เป็นกลาง ฟอสฟอลิพิด สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีลักษณะเป็นอนุภาค

แรมโนลิพิดเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไกลโคลิพิดผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* และ *Pseudomonas* sp. (Desai และ Banat, 1997; Lang และ Wullbrandt, 1999) แรมโนลิพิดบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นระหว่าง 10-200 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถลดแรงตึงผิวให้อยู่ระหว่าง 25-30 mN/m พบครั้งแรกโดย Bergstrom และคณะในปี 1946 แรมโนลิพิดที่พบผลิตโดย *Pseudomonas pyocyanea* ต่อมาในปี 1949 Jarvis และ Johnson เป็นกลุ่มแรกที่รายงานว่ามีการผลิตแรมโนลิพิดจาก *Pseudomonas aeruginosa* โครงสร้างของแรมโนลิพิดแบ่งเป็น 6 กลุ่มใหญ่ตามรายงานของ Lang และ Wullbrandt (1999) ซึ่งแต่ละกลุ่มแตกต่างกันตามจำนวนของน้ำตาลแรมโนสและกรดบีตา-ไฮดรอกซีดีคาร์โนอิก นอกจากแรมโนลิพิดจะมีสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวแล้ว Abalos และคณะ (2001) ได้รายงานว่าสารผสมแรมโนลิพิดที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* มีความสามารถในการต้านจุลชีพคือแบคทีเรียและราได้

กระบวนการการสังเคราะห์แรมโนลิพิดชนิดที่ 1 และ 2 ที่ผลิตโดย *Pseudomonas aeruginosa* ATCC7700 เกิดจากการส่งผ่านแรมโนซิลอย่างจำเพาะสองครั้งอย่างเป็นลำดับด้วยเอนไซม์แรมโนซิลทรานสเฟอเรส 2 ชนิด คือ rhamnosyltransferase 1 (Rt 1) และ rhamnosyltransferase 2 (Rt 2) ตามลำดับ โดยใช้ thymidine-diphospho-L-rhamnose (TDP-L-rhamnose) เป็นตัวให้ และ β-hydroxydecanoyl-β-hydroxydecanoate หรือ mono-

rhamnolipid เป็นตัวรับแรมโนซิล (Burger และคณะ, 1963) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แรมโนลิพิดชนิดที่ 1 อยู่ใน *rhl* operon โดย *rhlA* และ *rhlB* ประมวลรหัส rhamnosyltransferase 1 (Rt 1) นอกจากนี้ยังมียีนที่ควบคุมการแสดงออกของ *rhlA* และ *rhlB* อีกคือ *rhlR* ที่ประมวลรหัสของโปรตีน RhlR ทำหน้าที่ควบคุมการถอดรหัสของ *rhlA* และ *rhlB* (Ochner และคณะ ,1994b) และ RhlI เป็นเอนไซม์ autoinducer synthetase ที่ใช้ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ autoinducer (Ochsner และ Reiser, 1995) autoinducer หรือ *N*-acylated homoserine lactones (HSLs) เป็นสารที่มีโมเลกุลเล็กใช้ในการส่งสัญญาณในการวัดความหนาแน่นประชากรของเซลล์แบคทีเรียเพื่อพร้อมปรับกลไกการทำงานให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ที่เปลี่ยนไปได้ (Fuqua และคณะ, 1994) เมื่อความหนาแน่นของแบคทีเรียสูงขึ้น autoinducer เหล่านี้จะถูกปล่อยและไปกระตุ้นอย่างจำเพาะกับ transcription regulator ให้สามารถทำงานได้ (Fuqua และคณะ, 1996; Fuqua และ Greenberg, 1998; Salmond และคณะ, 1995) โปรตีน RhlR เป็น transcriptional activator ที่ยังไม่สามารถทำงานได้ต้องถูกกระตุ้นด้วย autoinducer ที่สร้างโดยการเร่งปฏิกิริยาด้วยโปรตีน RhlI Ochsner และ Reiser (1995) พบว่าในสายพันธุ์กลายที่ขาด *rhlI* ไม่สามารถสร้างแรมโนลิพิดเพราะการกระตุ้นการสร้างแรมโนลิพิดเริ่มจากการสังเคราะห์ *N*-acylated homoserine lactone

ปัจจุบันเนื่องจากทราบข้อมูลระดับอณูพันธุศาสตร์ และกลไกการควบคุมการผลิตแรมโนลิพิดแล้ว ยังมีผู้สนใจปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ดังกล่าวให้มีความสามารถในการผลิตโมโนแรมโนลิพิดเพิ่มมากขึ้น โดยนำ *rhlAB* ต่อเชื่อมกับโปรโมเตอร์ *tac* ได้เป็นพลาสมิด pUO98 และนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านต่างๆ เพื่อดูความสามารถในการผลิตโมโนแรมโนลิพิด พบว่า *Pseudomonas putida* KT2442 ซึ่งปกติไม่มีความสามารถในการผลิตโมโนแรมโนลิพิดเมื่อได้รับพลาสมิด pUO98 สามารถผลิตโมโนแรมโนลิพิดได้ในขณะที่ไม่มีการผลิตโมโนแรมโนลิพิดใน *Escherichia coli* (Ochsner และคณะ, 1995)

Pseudomonas sp. A41 เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทะเลในบริเวณอ่าวไทย จ. สมุทรสงคราม โดย อารีย์ กังฉิน ในปี พ.ศ. 2542 ซึ่งสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนแต่ถ้าใช้น้ำมันปาล์มจะทำให้ผลผลิตเพิ่มมากขึ้น สารลดแรงตึงผิวซึ่งอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อลดค่าแรงตึงผิวของน้ำจาก 72 mN/m เป็น 29 mN/m และผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีเมื่อมีแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มที่ 30°ซ เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 7.0 ต่อมา นพรัตน์ วานิชสุขสมบัติ (2545) นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีและวิเคราะห์ทางเคมีด้วย LC-MS และ IR-spectrum สามารถพิสูจน์ได้ว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้เป็นแรมโนลิพิด

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษา *rhlA* และ *rhlR* ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แรมโนลิพิดใน *Pseudomonas* sp. A41 โดย *rhlA* เป็นยีนที่กำหนดรหัสโปรตีน RhlA ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งของเอนไซม์ rhamnosyltransferase 1 และ *rhlR* เป็นยีนที่มีส่วนควบคุมการแสดงออกของ *rhlAB* เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงการผลิตแรมโนลิพิดในระดับอณูพันธุศาสตร์ให้มีผลิตภัณฑ์เพิ่มสูงขึ้น

วัตถุประสงค์

โคลนและศึกษาลักษณะของยีนกลุ่ม *rhl* ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แรมโนลิพิดของ *Pseudomonas* sp. A41

ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. จำแนก *Pseudomonas* sp. A41 โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal DNA (16S rDNA)

2. เพิ่มจำนวน *rhlA* หรือ *rhlR* ซึ่งอยู่บนโครโมโซมของ *Pseudomonas* sp. A41 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

3. ค้นหาชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบนโครโมโซมของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่มี *rhlA* หรือ *rhlR* ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization)

4. โคลนชิ้นดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่มี *rhlA* หรือ *rhlR*

5. หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rhlA* หรือ *rhlR* จากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดและเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ใน GenBank

ประโยชน์ที่ค่าว่าจะได้รับ

ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แรมโนลิพิดใน *Pseudomonas* sp. A41