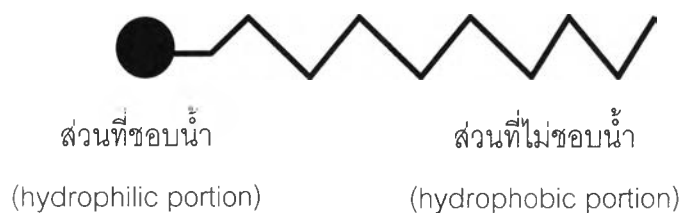


บทที่ 2

ปรีทรรศน์วรรณกรรม

สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ชนิดแรกที่ถูกค้นพบอย่างดี ตั้งแต่ปีทศวรรษ 1930 คือสบู่ หลังจากนั้นก็ได้มีการใช้สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์อย่างแพร่หลาย โดยในปี 1984 ทั่วโลกได้มีการใช้สารลดแรงตึงผิวมากถึง 14 ล้านตัน ซึ่งมูลค่าการซื้อขายถึง 100 ล้าน มาร์กเยอรมัน (Falbe, 1987) ในปี 1992 มูลค่าการซื้อขายสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์มีถึง 1.7 พันล้านเหรียญอเมริกา และคาดว่าจะมีอัตราการเพิ่มอีก 3-5 % ต่อปี (Lin, 1996) และจนถึงศตวรรษที่ 20 จะมีมูลค่าเพิ่มถึง 35% (Desai และ Banat, 1997) สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์นั้นผลิตจากกระบวนการทางเคมีซึ่งเป็นกระบวนการที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมและสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ยังเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมเองอีกด้วยซึ่งจะเกิดการย่อยสลายทางธรรมชาติได้ยาก (Fiechter, 1992) ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจึงเป็นที่สนใจศึกษาเพื่อนำมาใช้ทางอุตสาหกรรม

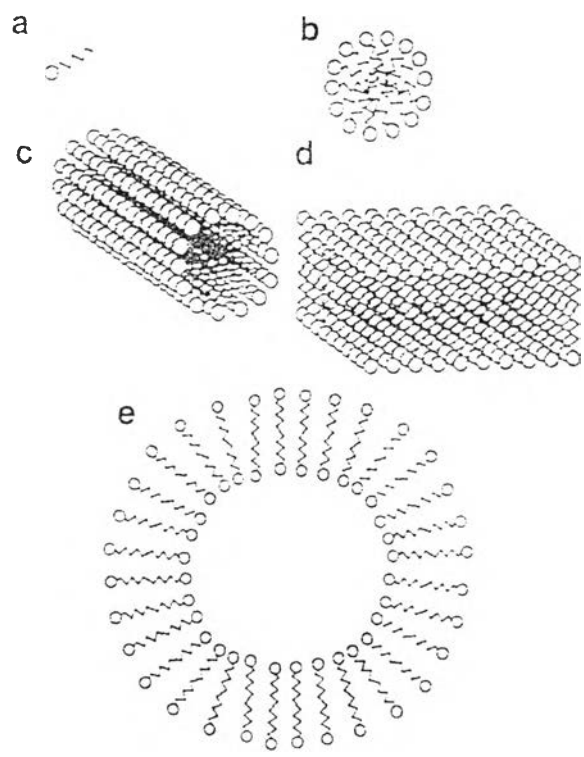
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant) คือ สารลดแรงตึงผิวที่ได้จากสิ่งมีชีวิต ส่วนใหญ่ได้มาจากจุลินทรีย์ทั้ง แบคทีเรีย รา ยีสต์ มีโครงสร้างเป็นแบบแอมฟิพาติก (amphipatic structure) ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่มีขั้ว (ส่วนที่ชอบน้ำ) ส่วนใหญ่ได้แก่ โพรตีน และน้ำตาลซึ่งจะเป็นโมเลกุลที่มีหมู่คาร์บอกซิลิก หมู่ไฮดรอกซิล หมู่อะมิโน หมู่ฟอสเฟต เป็นต้น ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic portion) หรือ ส่วนที่ชอบไขมัน (lipophilic portion) ซึ่งจะเป็นโมเลกุลพวกไฮโดรคาร์บอน เช่น กรดไขมัน ทั้งชนิดอิ่มตัว (saturated fatty acid) และไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) มีทั้งโมเลกุลใหญ่และโมเลกุลเล็ก ซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแตกต่างกันไป ดังรูปที่ 1.2 แสดงโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เป็นแบบแอมฟิพาติก



รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะโครงสร้างโดยทั่วไปของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Fiechter, 1992)

เมื่อสารลดแรงตึงผิวละลายอยู่ในตัวทำละลายไม่ว่าเป็นพวกมีขั้วหรือไม่มีขั้ว จะเกิดโครงสร้างที่เรียกว่าไมเซลล์ (micelle) และสารลดแรงตึงผิวต่างชนิดกันจะให้ค่าของความเข้มข้นที่น้อยที่สุด ซึ่งทำให้เกิดไมเซลล์ โดยเรียกว่า CMC (critical micelle concentration) หรือกล่าวได้ว่า CMC คือ ประสิทธิภาพของการละลายของสารลดแรงตึงผิวในตัวทำละลาย หรือความเข้มข้นที่น้อยที่สุด ซึ่งทำให้ค่า

แรงดึงผิวต่ำที่สุด (Lin, 1996) ค่า CMC ยังสามารถบอกได้ว่าพร้อมที่จะเกิดโครงสร้างทุติยภูมิ เช่น ไมเซลล์ (micelle) ไบเลเยอร์ (bilayer) และ เวสสิเคิล (vesicles) ดังรูปที่ 2.2 การรวมตัวของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพเกิดจากแรงไฮโดรฟอบิก (hydrophobic) แวนเดอร์วาลส์ (van der Waal's) อิเล็กโตรสแตติก (electrostatic) และพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond)

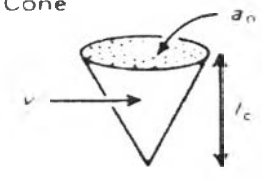
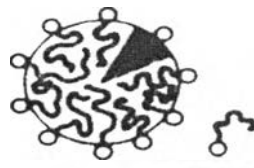
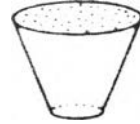
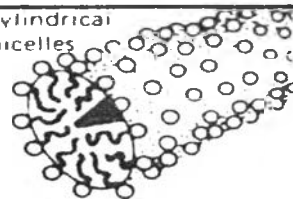

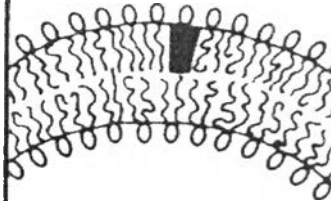
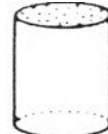
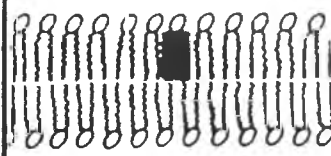

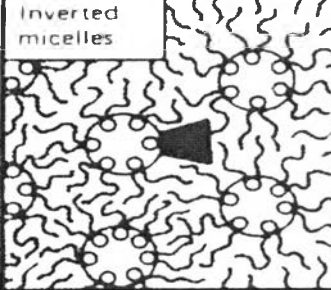


รูปที่ 2.2 แสดงโครงสร้างและการจัดเรียงตัวของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ (Fiechter, 1992)

- โครงสร้างโมโนเมอร์ (monomer) ของแอมฟิพาติกโมเลกุล
- โครงสร้างไมเซลล์แบบกลม
- โครงสร้างไมเซลล์แบบแท่ง
- โครงสร้างไมเซลล์แบบเลเยอร์
- โครงสร้างไมเซลล์แบบเวสสิเคิล

การที่จะเกิดการจัดเรียงตัวของโครงสร้างเป็นแบบใดนั้นนอกจากแรงกระทำระหว่างโมเลกุลแล้วยังขึ้นกับชนิดของสารลดแรงดึงผิวว่ามีโครงสร้างแบบใด เช่น โมเลกุลมีลักษณะโซ่สายสั้นและส่วนหัวที่มีขั้วใหญ่ก็จะเกิดการจัดเรียงตัวเป็นแบบไมเซลล์ทรงกลม ถ้าส่วนหัวมีขนาดเล็กก็จะรวมตัวเป็นไมเซลล์แบบทรงกระบอก หรือส่วนไม่ชอบน้ำเป็นสายยาวก็จะฟอร์มเป็นไบเลเยอร์ ดังรูปที่ 2.3 นอกจากนี้ยังขึ้นกับชนิดของตัวทำละลายว่าจะเกิดอิมัลชันเป็นแบบ oil in water หรือ water in oil และสภาวะแวดล้อมเช่น ความเป็นกรดเป็นด่าง อุณหภูมิ ความเข้มข้นของเกลือต่างๆในสารละลาย

เป็นต้น คุณสมบัติที่เป็นเอกลักษณ์ของไมเซลล์สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานต่างๆได้ เช่น การสกัดโปรตีนจากน้ำหมัก การแยกสารอินทรีย์ และ โลหะไอออนจากน้ำในการบำบัดสิ่งแวดล้อมในโรงงานอุตสาหกรรม เรายังสามารถคาดการณ์การทำงานของสารลดแรงตึงผิวได้จาก HLB (hydrophilic and lipophilic balance) คือถ้ามีค่า HLB ต่ำกว่า 6 จะละลายได้ดีในไขมัน ถ้ามีค่าอยู่ระหว่าง 10-18 จะละลายได้ดีในน้ำ แต่อย่างไร ค่า HLB มักจะรายงานในสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสังเคราะห์

ลักษณะสารลดแรงตึงผิว	Critical packing shape	Structures formed
ส่วนไม่ชอบน้ำเป็นโซ่สายเดี่ยว ส่วนชอบน้ำมีขนาดใหญ่	Cone 	Spherical micelles 
ส่วนไม่ชอบน้ำเป็นโซ่สายเดี่ยว ส่วนชอบน้ำมีขนาดเล็ก	Truncated cone 	Cylindrical micelles 
ส่วนไม่ชอบน้ำเป็นโซ่สองสาย ส่วนชอบน้ำมีขนาดใหญ่	Truncated cone 	Flexible bilayers, vesicles 
ส่วนไม่ชอบน้ำเป็นโซ่สองสาย พวก anionic มีเกลือมาก และ saturated ส่วนชอบน้ำมีขนาดเล็ก	Cylinder 	Planar bilayers 
ส่วนไม่ชอบน้ำเป็นโซ่สองสาย พวก anionic และ saturated ส่วนชอบน้ำมีขนาดเล็ก	Inverted truncated cone or wedge 	Inverted micelles 

รูปที่ 2.3 แสดงการรวมตัวของโครงสร้างเมื่อสารลดแรงตึงผิวโมโนเมอร์มีโครงสร้างต่างๆ (Clint, 1992)

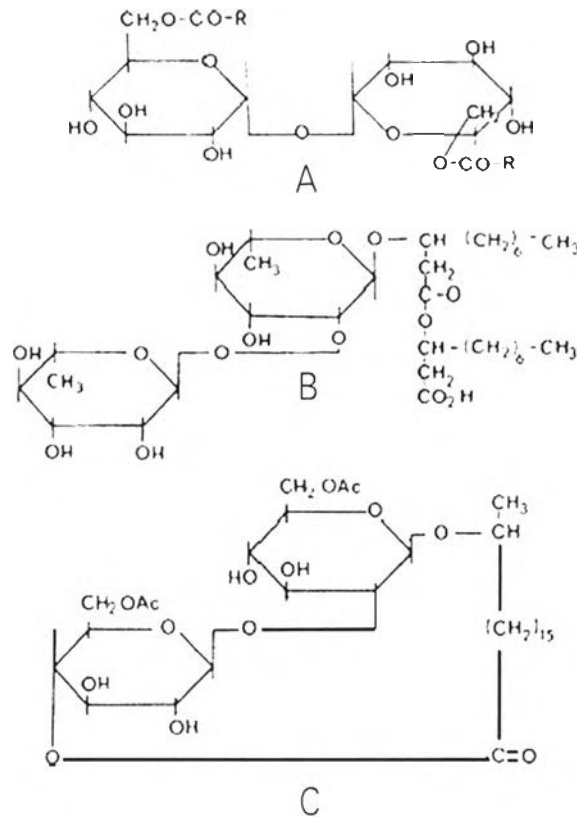
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพส่วนมากจะมีประจุสุทธิเป็นกลางหรือเป็นลบ โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประจุเป็นลบ อาจเนื่องมาจากหมู่คาร์บอกซิลิก หมู่ฟอสเฟต หรือ หมู่ซัลเฟต เป็นต้น ส่วนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประจุบวกนั้น อาจเกิดจากอิทธิพลของหมู่เอมีน แต่ก็พบได้น้อย (Cooper, 1986) ค่าแสดงถึงประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ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

1. ค่าแรงตึงผิว (surface tension) หมายถึง แรงที่กระทำระหว่างของเหลวและอากาศ มีหน่วยเป็น mN/m หรือ dyne/cm ซึ่งค่าแรงตึงผิวของน้ำบริสุทธิ์เท่ากับ 72 mN/m และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ดีความีประสิทธิภาพดีจะทำให้ค่าแรงตึงผิวลดลงเหลือ 35 mN/m (Kosaric, 1993)
2. ค่าแรงตึงระหว่างผิวที่ประจัน (interfacial tension) หมายถึง แรงที่กระทำระหว่างของเหลวกับของเหลวที่มีเฟสต่างกัน มีหน่วยเป็น mN/m การวัดแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันจะวัดระหว่างน้ำและสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น น้ำมัน เฮกซะเดคเคน (hexadecane) หรือ น้ำมันก๊าด (kerosene) โดยทั่วไปค่าแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันของน้ำกับเฮกซะเดคเคนมีค่าเท่ากับ 50 mN/m และค่าแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันของน้ำกับน้ำมันก๊าดมีค่าเท่ากับ 30-40 mN/m ซึ่งเมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถลดแรงตึงผิวที่ประจันลงเหลือ 0.1-1.0 mN/m (Gerson, 1993)
3. การเกิดอิมัลชัน (Emulsification) คือความสามารถในการทำให้น้ำและ สารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น น้ำมันปิโตรเลียม สารละลายอินทรีย์ และน้ำมันพืชชนิดต่างๆ รวมตัวเป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะทำให้เกิดอิมัลชันระหว่างน้ำกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เป็นผลทำให้น้ำมันมีสภาพเป็นหยดเล็กๆ อยู่ในน้ำ (อิมัลชันชนิด oil in water) เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวระหว่างน้ำและ สารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Cooper และ Zajic, 1980) การวัดประสิทธิภาพในการเกิดอิมัลชัน อาจทำได้ด้วยการวัดค่าอิมัลชัน อินเด็กซ์ คือการวัดอัตราส่วนระหว่างความสูงของอิมัลชันและ ความสูงของของเหลวในหลอดทั้งหมด เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง (Patel และ Desai, 1997) และอาจวัดความเสถียรของอิมัลชันที่เกิดขึ้นโดยวัดค่าอิมัลชัน อินเด็กซ์ในระยะเวลาที่นานออกไป

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

1. ไกลโคลิปิด (glycolipid) เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต เช่น กลูโคส แมนโนส กาแล็คโตส กรดกลูคูโรนิก แรมโนส และ กาแล็คโตสซัลเฟต เชื่อมต่อกับไขมัน เช่น aliphatic acid และ hydroxy-aliphatic โดยอาจเชื่อมต่อกับคาร์โบไฮเดรต 1-2 โมเลกุล สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่จัดเป็นไกลโคลิปิดได้แก่ ทรีฮาโลส (trehalose) โซโฟโรลิปิด (sophorolipids) แรมโนลิปิด (rhamnolipid) เตตระอะซิลกลูโคส tetraacylglycerol ไตรอะซิลกลูโคส (triacylglycerol)

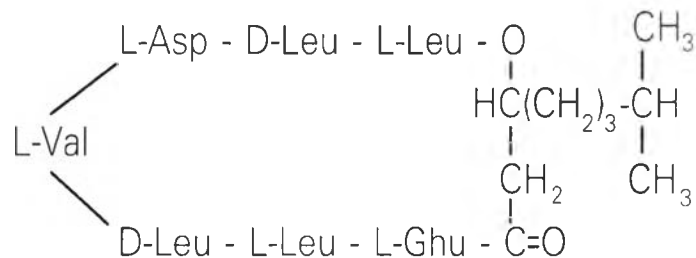
แมนโนซิลเอริททอล ลิพิด (mannosylerythritol lipid) ซูโครส ลิพิด (sucrose lipid) ฟรุคโทส ลิพิด (fructose lipid) ไดเอซิล อินอสิทอล แมนโนไซด์ (diacyl inositol mannoside) เป็นต้น



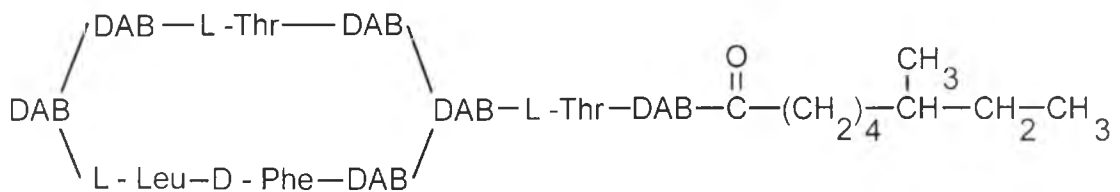
รูปที่ 2.4 โครงสร้างของไกลโคลิพิดที่พบได้ทั่วไป (Rosenberg และ Ron, 1999)

- โครงสร้างของทรีฮาไรด์ (α,α -6,6'-dicarboxylic ester) ตัวอย่าง ทรีฮาไรด์ คือ trehalose dimycolates ที่ผลิตจาก *Rhodococcus erythropolis* ประกอบด้วยทรีฮาไรด์ 2 โมเลกุลต่อกับสายโซ่ยาว 2 สาย (β -hydroxy fatty acid) ซึ่งมีจำนวนคาร์บอน 37-41 ที่ตำแหน่ง α โดย หมู่ R และ R' แทน fatty acid
- โครงสร้างของแรมโนลิพิดแบบที่ 2 (Lang และ Wullbrandt, 1999) จาก *Pseudomonas aeruginosa* แรมโนลิพิดประกอบด้วย แรมโนส 2 โมเลกุลเชื่อมต่อกับ β -hydroxydecanoic acid 2 โมเลกุล
- โครงสร้างของไซโฟโรลิพิด จาก *Torulopsis bombicola* ประกอบด้วย กลูโคส 2 โมเลกุลเชื่อมกันแบบ β -1,2 ต่อกับพวกกรดไขมันโซ่ยาวของ hydroxy fatty acid (C_{18}) อาจเป็น lactic form

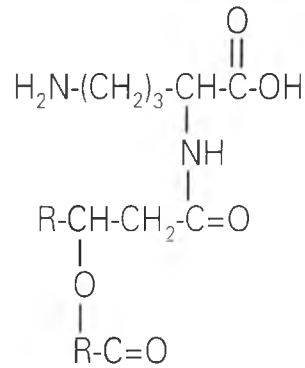
2. ไลโปเพพไทด์ (lipopeptides) และ ไลโปโปรตีน (Lipoprotein) เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มักมีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ เช่น เซอร์แฟคติน (surfactin) หรือซับทีไลซิน (subtilysin) พอลิมิกซิน (polymyxins) และไลเคไนซิน (lichenysin) จาก *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa* และ *Bacillus licheniformis* (Rosenberg, 1986) นอกจากนี้ *Bacillus* sp. แล้วยังพบว่า *Pseudomonas rubescens* (Yamane, 1987) และ *Thiobacillus thiooxidans* (Knoche, 1972) ผลิตออร์นิทีนลิปิด (ornithine lipids) *Gluconobacter cerinus* IFO 3267 ผลิตออร์นิทีนลิปิด (ornithine lipids) และ ทัวรีนลิปิด (taurine lipids) (Tahara, 1976a) *Agrobacterium tumefaciens* IFO 3058 ผลิตไลซีนลิปิด (lysine lipids) (Tahara, 1976b) เป็นต้น



รูปที่ 2.5 โครงสร้างของเซอร์แฟคตินที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* (Desai และ Banat, 1997)

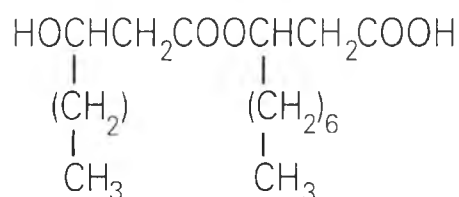


รูปที่ 2.6 โครงสร้างของพอลิมิกซิน B ที่ผลิตจาก *Bacillus polymyxa* มีโครงสร้างเป็น cyclic octapeptide และส่วนกรดไขมันเชื่อมกับ 2,4-diaminobutyric acid (Dab) และโครงสร้างของพอลิมิกซินอาจมีการแทนที่ของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 3 จาก Dab เป็น D-Ser ตำแหน่ง 6 จาก D-Leu เป็น L-Ileu และตำแหน่ง 7 จาก D-Dab เป็น L-Dab (Suzuki และคณะ, 1965)



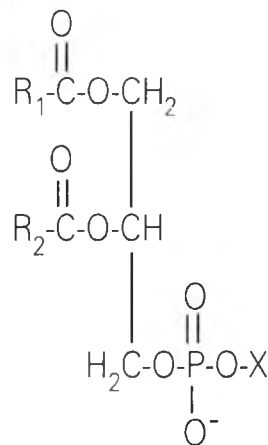
รูปที่ 2.7 โครงสร้างของออร์นิติน ลิพิด ที่ผลิตจาก *Pseudomonas rubescens* ซึ่งมีโครงสร้างเป็น zwitterion คือมีทั้งประจุบวกและลบในโมเลกุล จากหมู่คาร์บอกซิลและเอไมด์ (Cooper และ Zajic, 1980)

3. กรดไขมันและไขมัน (Fatty acid and Neutral lipid) โดยสามารถพบได้ในเซลล์จุลินทรีย์ทุกชนิด และมักปล่อยออกนอกเซลล์เช่น กรดคาร์บอกซิลิก แอลกอฮอล์ เอสเทอร์ โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และไตรกลีเซอไรด์ ตัวอย่างของกรดไขมันและไขมันที่สามารถลดแรงตึงผิวได้แก่ กรดโครีโนมัยโคลิก (corynomycolic acid) ที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำลงเหลือ 40 mN/m (ปกติมีแรงตึงผิวเท่ากับ 72 mN/m) ไขมัน (neutral lipid) ที่มีรายงานว่าสามารถลดแรงตึงผิวคือ ไขมันที่ผลิตจาก *Mycobacterium rhodochrous* เมื่อความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำเหลือ 44 mN/m และยังส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ (Cooper และ Zajic, 1980) รูบิเวทิน อาร์1 (rubiwettin R1) ซึ่งเป็นลิพิดที่ผลิตจาก *Serratia rubidaea* ATCC 27593 รูบิเวทิน อาร์1 เป็นลิพิดชนิด β -hydroxy fatty acid ที่มีจำนวนคาร์บอน 10 อะตอมเชื่อมต่อกับ β -hydroxy fatty acid ที่มีจำนวนคาร์บอน 12, 14 หรือ 16 อะตอมด้วยพันธะเอสเทอร์ (Matsuyama และคณะ, 1990)

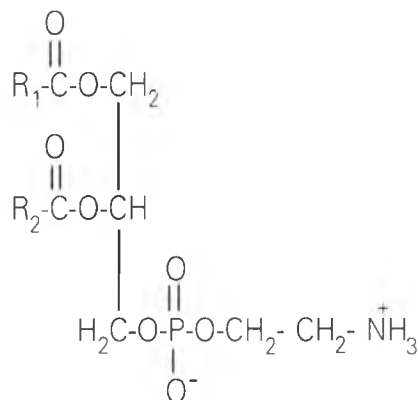


รูปที่ 2.8 โครงสร้างของรูบิเวทิน อาร์1 (rubiwettin R1) ที่ผลิตจาก *Serratia rubidaea* ATCC 27593 (Matsuyama และคณะ, 1990)

4. ฟอสโฟลิปิด(phospholipids) เป็นองค์ประกอบสำคัญในเซลล์จุลินทรีย์ แต่มีส่วนน้อยที่ปล่อยออกนอกเซลล์ ทำให้วัดค่าแรงตึงผิวได้ยาก โครงสร้างทั่วไปของฟอสโฟลิปิดประกอบด้วย กลีเซอรอลต่อกับกรดไขมัน ตัวอย่างฟอสโฟลิปิดที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ เช่น ฟอสฟาติดีลไอโนซิทอล (phosphatidylinositol) ฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) และกรดฟอสฟาติก (phosphatidic acid) จาก *Thiobacillus thiooxidans* และ *Rhodococcus erythropolis* ที่ผลิตฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) นอกจากนี้ยังพบการสร้างฟอสโฟลิปิดใน *Corynebacterium alkanolyticum*, *Candida tropicalis* และ *Micrococcus cerificans* (Cooper และ Zajic, 1980 และ Rosenberg, 1986)

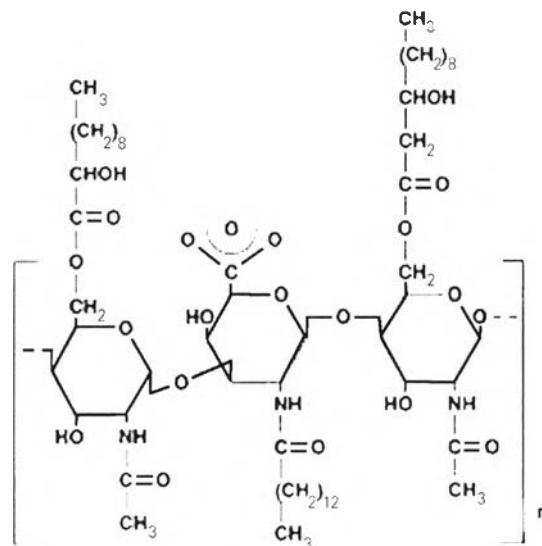


รูปที่ 2.9 โครงสร้างโดยทั่วไปของฟอสโฟลิปิดที่แยกได้จากจุลินทรีย์ (Cooper และ Zajic, 1980) R_1 และ R_2 คือหมู่แอลคิล ถ้า X คือ H ทำให้กลายเป็นกรดฟอสฟาติก ถ้า X คือ CH_2NH_2 กลายเป็นฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน ถ้า X คือ ไอโนซิทอล(inositol) ในรูป ฟอสฟาติดีลไอโนซิทอล แต่หาก X คือ $\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2$ จะได้เป็น ฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล



รูปที่ 2.10 โครงสร้างของ ผลิตฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ที่ผลิตจาก *Acinetobacter* sp. R_1 และ R_2 คือ สายของ fatty acid (Desai และ Banat, 1997)

5. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ (polymeric biosurfactants) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทนี้มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เช่น อิมัลแซน (emulsan) ที่ผลิตได้จาก *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 ที่มีลักษณะเป็นไลโปเฮเทอโรพอลิแซคคาไรด์ (lipoheteropolysaccharide) ที่มีประจุลบ น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 9.9×10^5 ดาลตัน อิมัลแซนไม่มีคุณสมบัติลดแรงประจันผิว (interfacial tension) แต่ทำให้เกิดอิมัลชันได้ดี คือใช้เพียง 0.001 – 0.01 % และอิมัลชันที่เกิดก็มีความเสถียร ไบโอดีสเพอร์แซน (biodispersan) ผลิตจาก *Acinetobacter calcoaceticus* A2 มีลักษณะเป็นเฮเทอโรพอลิแซคคาไรด์ (lipoheteropolysaccharide) ที่มีประจุลบ น้ำหนักโมเลกุล 51,400 ดาลตัน ไลโปแซน (liposan) ผลิตจาก *Candida lipolytica* ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 83% ได้แก่ กลูโคส กาแลคโตส และกรดกาแลคโตยูโรนิก และโปรตีน 17% อะลาซาน (alasan) ผลิตโดย *Acinetobacter radioresistens* KA53 ประกอบด้วยโปรตีน และ ไขมัน มีประจุเป็นลบ น้ำหนักโมเลกุล 900,000 ดาลตัน (Rosenberg, 1986; Desai และ Desai, 1993; Navon-Venezia และคณะ, 1995)



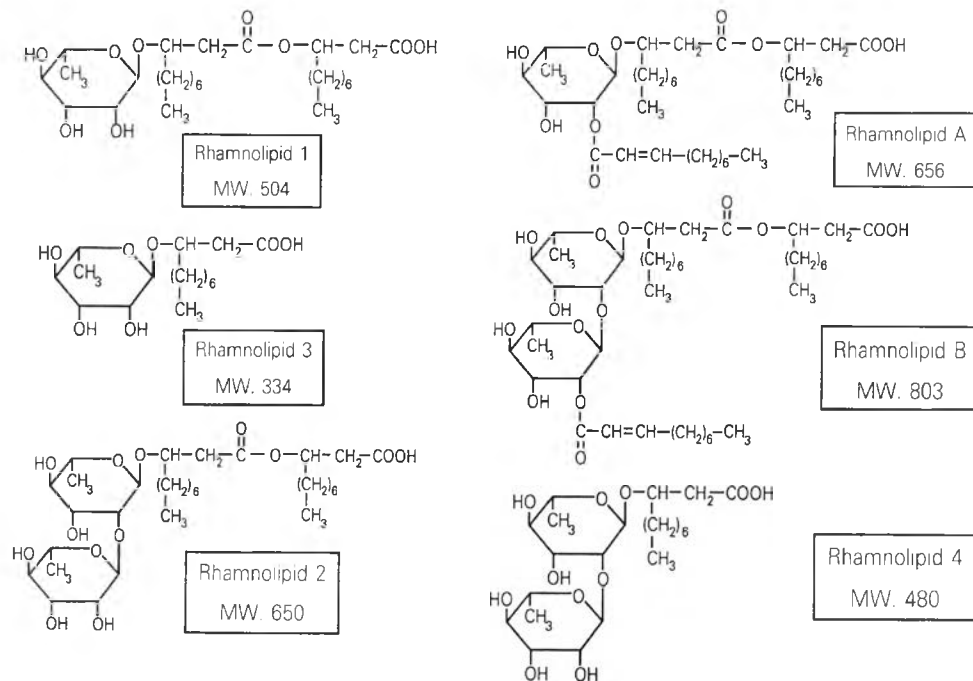
รูปที่ 2.11 โครงสร้างของอิมัลแซน ที่ผลิตจาก *Acinetobacter calcoaceticus* (Desai และ Banat, 1997)

6. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีลักษณะเป็นอนุภาค (particulate biosurfactants) โดยเป็นส่วนของ extracellular membrane vesicles มาฟอร์มเป็น microemulsion ซึ่งมีส่วนช่วยในการนำ พวก alkane เข้าสู่เซลล์ เช่น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีลักษณะเป็นอนุภาคที่ผลิตโดย *Acinetobacter* sp. H01-N ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20-50 นาโนเมตร มีความหนาแน่นการลอยตัว (buoyant density) 1.158 g/cm^3 และประกอบด้วยโปรตีน ฟอสโฟลิปิด และไลโปพอลิแซคคาไรด์ membrane vesicle เหมือนกับ outer membrane ของจุลินทรีย์ที่ผลิตขึ้น (Desai และ Banat, 1997)

ตารางที่ 2.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (Desai และ Banat, 1997)

ชนิดของสารลดแรงตึงผิว	จุลินทรีย์	Surface tension (mN/m)	CMC (g/l)	Interfacial tension (mN/m)
Glycolipids				
Rhamnolipids	<i>P.aeruginosa</i>	29	0.1-10	0.25
	<i>Pseudomonas</i> sp.	25-30	4	1
Trehalolipids	<i>R.erythropolis</i>	32-36	20	14-17
	<i>N.erythropolis</i>	30	0.3	3.5
	<i>Mycobacterium</i> sp.	38		1.5
Sophorolipids	<i>T.bombicola</i>	33		1.8
	<i>T.apicola</i>	30		0.9
	<i>T.petrophilum</i>			
Cellobiolipids	<i>U.zeac,U.maydis</i>			
Lipopeptide and lipoprotein				
Peptide-lipid	<i>B.licheniformis</i>	27	12-20	0.1-0.3
Serrawettin	<i>S.marcescens</i>	28-33		
Viscosin	<i>P.fluorescens</i>	26.5	150	
Surfactin	<i>B.subtilis</i>	27-32	23-160	1
Subtilisin	<i>B.subtilis</i>			
Gramicidins	<i>B.brevis</i>			
Polymyxins	<i>B.polymyxa</i>			
Fatty acids, neutral lipids and phospholipids				
Fatty acids	<i>C.lepus</i>	30	150	2
Neutral lipids	<i>N.erythropolis</i>	32		3
Phospholipids	<i>T.thiooxidans</i>			
Polymeric surfactants				
Emulsan	<i>A.calcoaceticus</i>			
Biodispersan	<i>A.calcoaectius</i>			
Mannan lipids protein	<i>C.tropiccalis</i>			
Protein PA	<i>P.aeruginosa</i>			
Particulate biosurfactants				
Vesicle and fimbriac	<i>A.calcoaceticus</i>			
Whole cell	<i>Variety of bacteria</i>			

แรมโนลิปิดเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด ไกลโคลิปิด ที่ผลิตได้จาก *Pseudomonas* sp. ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลแรมโนส และ β -hydroxydecanoic acid พบครั้งแรกโดย Bergstrom และคณะในปี 1946 แรมโนลิปิดที่พบผลิตโดย *Pseudomonas pyocyanea* และมีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน อย่างไรก็ดี Bergstrom และคณะ ยังไม่สามารถหาอัตราส่วนระหว่างน้ำตาลแรมโนส และ β -hydroxydecanoic acid ต่อมาในปี 1949 Jarvis และ Johnson สามารถพิสูจน์ได้ว่ามี β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate ต่อกับน้ำตาลแรมโนส 2 โมเลกุลด้วยพันธะ glycosidic โดยวิเคราะห์แรมโนลิปิดจาก *Pseudomonas aeruginosa* ที่เลี้ยงใน 3% กลีเซอรอลแล้วทำให้บริสุทธิ์ถึงกระนั้นการเชื่อมต่อระหว่างน้ำตาลแรมโนสทั้ง 2 โมเลกุลยังไม่กระจ่าง ในปี 1965 Edward และ Hayashi สามารถบอกถึงโครงสร้างของแรมโนลิปิดอย่างละเอียดโดยกล่าวว่า หลังจากเกิด oxidation และ methylation พบ 1,2-linkage คือ rhamnolipid 2 ในรูปที่ 2.12 Hisatsuka และคณะ, 1971 พบว่า rhamnolipid 2 เป็นเพียงชนิดเดียวที่พบในการผลิตโดย *Pseudomonas aeruginosa* S₇B₁ ที่เลี้ยงใน n-hexadecane และ n-paraffins (C₁₄-C₁₈) (Lang และ Wullbrandt, 1999) พบแรมโนลิปิดชนิดใหม่ คือ L- α -rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate (rhamnolipid 1 ในรูปที่ 2.12) ที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* KY 4025 ที่เลี้ยงใน 10% n-alkane (Itoh และคณะ, 1971) และในปี 1976 Yamagushi และคณะ พบ rhamnolipid A และ B ซึ่งเกิดจาก acylation ของ α -decanoic acid ตามรูปที่ 2.12 จากรายงานของ Hirayama และ Kato ในปี 1982 พบทั้ง R1 และ R2 ในการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* 158 ในอาหาร Difco trypticase soya และในปี 1985 Sylatk และคณะ พบว่ามีแรมโนลิปิดที่คล้าย R1 และ R2 แต่มี β -hydroxydecanoyl เพียงหน่วยเดียว (R3 และ R4 ในรูปที่ 2.12) ที่ผลิตโดย *Pseudomonas* sp. DSM 2874 ในระยะ resting cell ต่อมาพบว่าแรมโนลิปิด มีความยาวของสายโซ่ fatty acid ได้หลากหลายโดยมีจำนวนคาร์บอนอะตอมตั้งแต่ 8-12 จาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ก่อโรค (Rendell และคณะ, 1990) และความยาวของโซ่คาร์บอนของสารตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีผลต่อโครงสร้างของแรมโนลิปิด (Lang และ Wullbrandt, 1999) จากรายงานของ Hisatsuka และคณะ ในปี 1971 พบว่า R2 มีผลในการกระตุ้นการเจริญของ *Pseudomonas* sp. หลายสายพันธุ์เมื่อเลี้ยงใน n-hexadecane แต่ไม่มีผลต่อแบคทีเรียชนิดอื่น protein-like activator ในขบวนการ oxidation ของ n-alkane มีส่วนร่วมในการสังเคราะห์ R2 แต่ก็ยังไม่ทราบขั้นตอนที่แน่นอน (Hisatuska และคณะ, 1972) *Pseudomonas aeruginosa* KY-4025 ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลาย (mutant) ที่ไม่สามารถสร้างแรมโนลิปิด (Itoh และ Suzuki, 1972) และ *Pseudomonas aeruginosa* PG 201 (Koch และคณะ, 1991) สามารถเจริญได้เล็กน้อยใน n-paraffin และ n-alkane เมื่อเปรียบเทียบกับ wild-type เมื่อเติมแรมโนลิปิดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า สายพันธุ์กลายให้การเจริญอย่างเต็ม (Lang และ Wullbrandt, 1999)



รูปที่ 2.12 แสดงโครงสร้างของแรมโนลิปิด ชนิด R1, R2, R3 R4, A และ B จาก *Pseudomonas aeruginosa* (Lang และ Wullbrandt, 1999)

ตารางที่ 2.2 แสดงชนิดและ [M-H]⁻ แรมโนลิปิดที่ผลิตโดย *Pseudomonas aeruginosa* 57RP ที่เลี้ยงบน แมนนิทอล หรือเนฟทาร์ริน 2% (Deziel และคณะ, 1999)

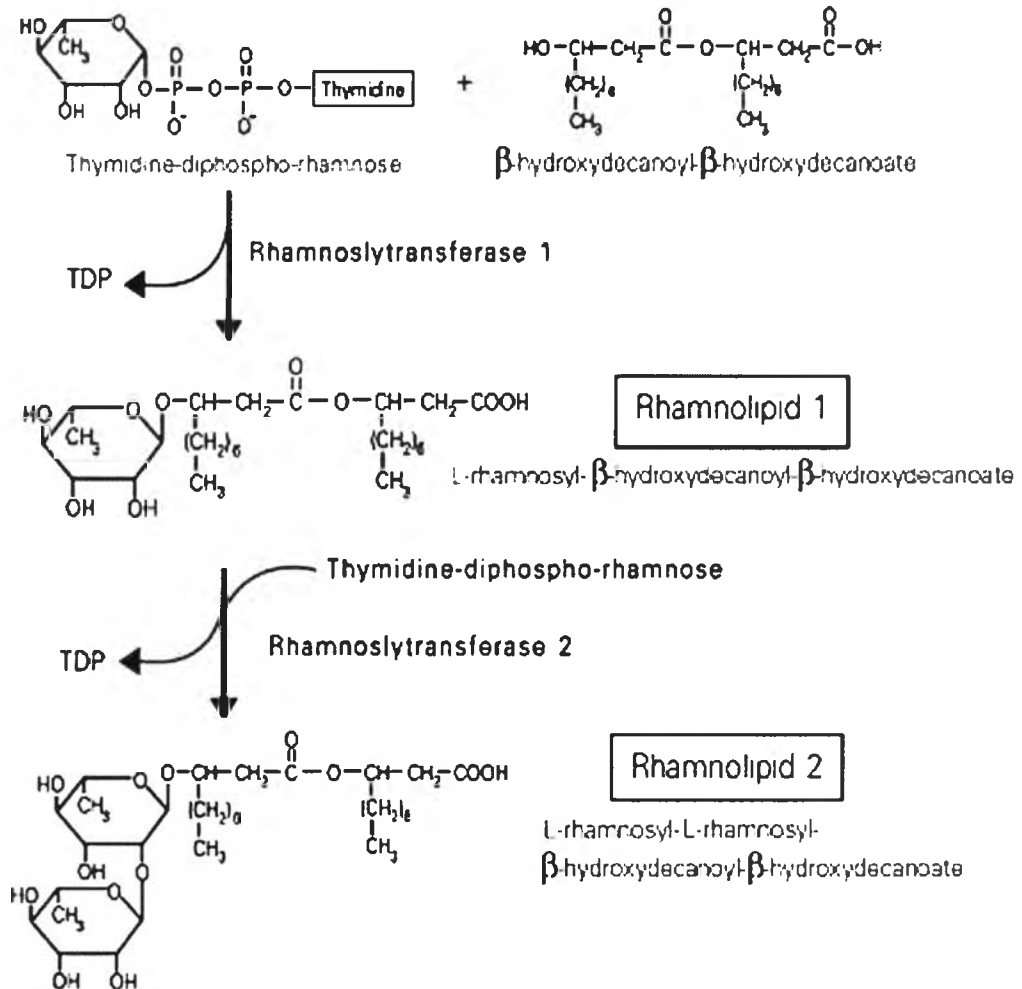
ชนิดแรมโนลิปิด	[M-H] ⁻	% สัมพัทธ์ระหว่าง แมนนิทอล และ เนฟทาลีน ที่เหลือ	
		แมนนิทอล	เนฟทาลีน
Rha-C8-C8	447	0.12	-
Rha-Rha-C8-C8	593	0.3	-
Rha-Rha-C8-C10	621	11.30	2.65
Rha-Rha-C10-C8	621	1.84	0.88
Rha-C8-C10	475	2.22	1.20
Rha-C10-C8	475	0.95	0.38
Rha-Rha-C8-C12:1	647	1.53	0.12
Rha-Rha-C12:1-C8	647	0.61	0.74
Rha-Rha-C10-C10	649	56.95	13.11

ชนิดแรมโนลิปิด	[M-H] ⁻	% สัมพัทธ์ระหว่าง แมนนิทอล และ แนฟทาลีน ที่เหลือ	
		แมนนิทอล	แนฟทาลีน
Rha-C10-C10	503	8.77	2.04
Rha-Rha-C10-C12:1	675	4.52	0.70
Rha-C10-C12:1	529	0.78	-
Rha-C12:1-C10	529	0.78	-
Rha-Rha-C12:1-C10	675	0.09	-
Rha-Rha-C12-C10	677	1.51	-
Rha-Rha-C10-C12	677	4.53	-
Rha-C12-C10	531	0.10	-
Rha-C10-C12	531	0.33	-
Rha-Rha-C12:1-C12	703	0.25	-
Rha-Rha-C10-C14:1	703	0.25	-
Rha-Rha-C12-C12	705	0.10	-
Rha-Rha-C8	451	0.05	3.41
Rha-Rha-C10	479	0.16	52.99
Rha-C8	305	-	1.85
Rha-Rha-C12:1	505	-	0.70
Rha-Rha-C12	507	-	3.33
Rha-C10	333	-	15.49
Rha-C12	361	-	0.41

หมายเหตุ CX:Y X หมายถึงจำนวนคาร์บอน Y หมายถึงจำนวนพันธะคู่

การศึกษาการสังเคราะห์แรมโนลิปิดครั้งแรก จากแรมโนลิปิดที่สร้างขึ้นในระยะพักเซลล์ (resting cell) หรือ ระยะ stationary phase โดยแรมโนลิปิดที่ผลิตขึ้นจะปล่อยออกนอกเซลล์ (Hauser และ Karnovsky, 1957;1958) และด้วยการสกัดเอนไซม์ และ ใช้กัมมันตภาพรังสีติดตามสาร precursor ในการสังเคราะห์แรมโนลิปิด ทำให้ Burger และคณะ (1963) สามารถเสนอ กระบวนการการสังเคราะห์แรมโนลิปิด ที่ผลิตโดย *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 7700 ตามรูปที่ 2.13 โดยพบว่าปฏิกิริยา glycosyl-transferase สองครั้ง ด้วยเอนไซม์ rhamnosyltransferase 2 ชนิด ซึ่ง

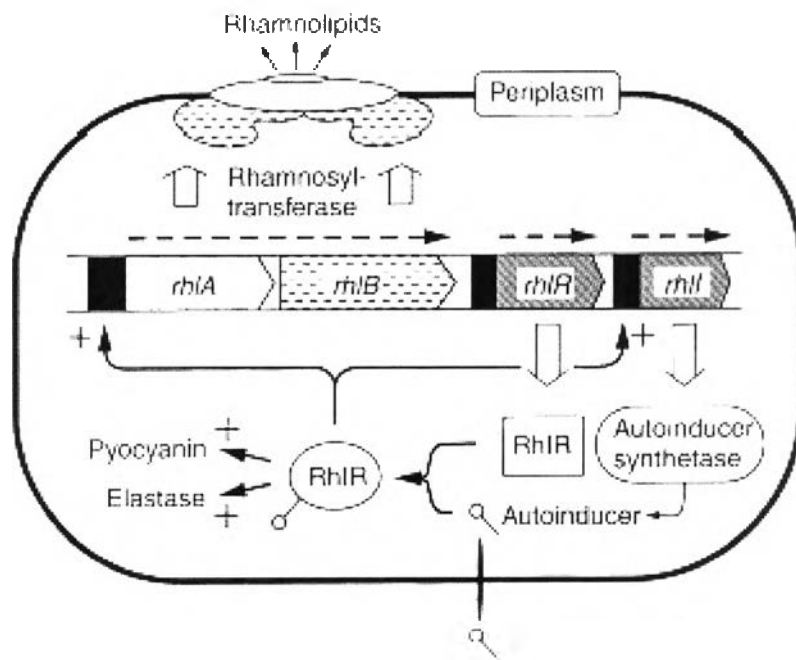
พบการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวที่ ผึ้งเซลล์ และ ภายในเซลล์ ในปี 1996 Ochsner และคณะ พบว่าเป็นไปดังที่กล่าวมาแล้วโดยวิจัยใน *Pseudomonas aeruginosa* PG 201



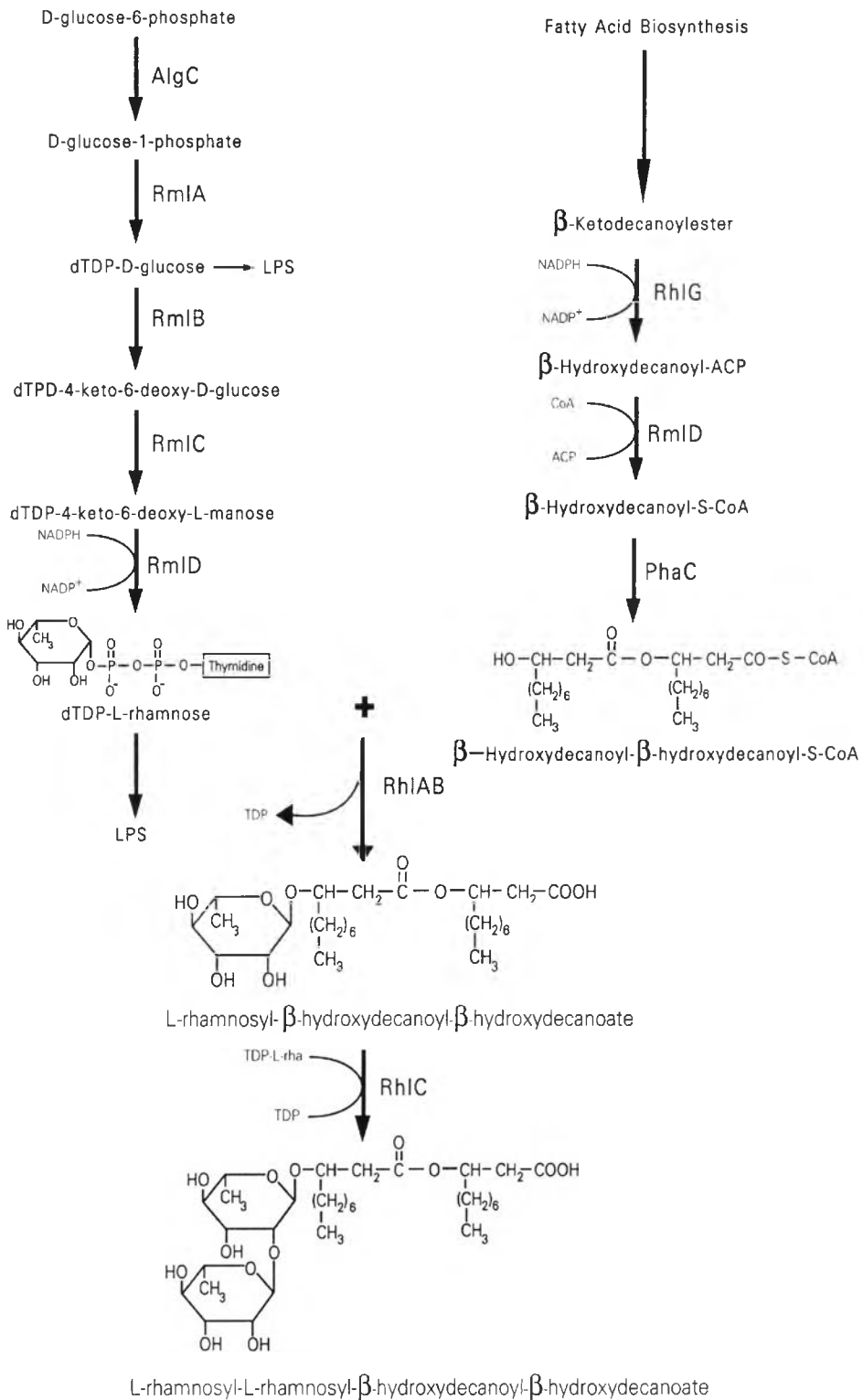
รูปที่ 2.13 กระบวนการสังเคราะห์แรมโนลิปิดชนิด R1 และ R2 ซึ่งผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* (Lang และ Wullbrandt, 1999)

ปฏิกิริยา rhamnosyl-transferase ทั้งสองขั้นตอนถูก catalyze ด้วย เอนไซม์ rhamnosyl-transferase ที่จำเพาะ 2 ชนิด เริ่มจาก deoxy-thymidine-diphospho-L-rhamnose (d-TDP-L-rhamnose) ซึ่งเป็นตัวที่จะให้ rhamnosyl แก่แรมโนลิปิด โดยที่ β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate หรือ mono-rhamnolipid เป็นตัวรับ (Burger และคณะ, 1963) ส่วนความยาวของ hydrocarbon chain นั้นไม่เกี่ยวข้องกับ rhamnosyl-transferase ทั้งสองชนิด (Maier และ Soberon-Chavez, 2000)

การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์แรมโนลิปิด ส่วนใหญ่มาจากการศึกษาใน *Pseudomonas aeruginosa* PG 201 และสายพันธุ์กลาย (Ochsner และคณะ, 1994a; 1994b; 1995; Ochsner และ Reiser, 1995) ซึ่งยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แรมโนลิปิด คือ *rhl* region ตามรูปที่ 2.14 โดยที่ยีน *rhl* AB ถอดรหัสเป็น rhamnosyltransferase 1 ในขณะที่ยีน *rhl* R และ *rhl* I เป็นยีนที่ควบคุมการแสดงออกของยีน *rhl* AB โดยมีโปรตีน Rhl R เป็นตัวควบคุมปฏิกิริยาซึ่งขึ้นกับความหนาแน่นของเซลล์ โดย N-acylhomoserine lactone หรือที่เรียกว่า autoinducer ที่สร้างจากโปรตีน Rhl I ซึ่งในสายพันธุ์กลายที่ขาดยีน *rhl* I ไม่สามารถสร้างแรมโนลิปิด เพราะการกระตุ้นการสร้างแรมโนลิปิดเริ่มจากการสังเคราะห์ N-acylhomoserine lactone และเมื่อนำยีน *rhl* AB ร่วมกับ plasmid pU098 ที่มี tac promotor เข้าไปยัง *Pseudomonas putida* KT 2442 สามารถสร้าง precursor (rhamnose และ β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate) ในการผลิตแรมโนลิปิดได้เมื่อเทียบกับ *Escherichia coli* และในปี 2001 โดย Rahim และคณะ พบยีน *rhl* C ซึ่งถอดรหัส rhamnosyltransferase 2 มีขนาด 35.9 กิโลดาลตัน ซึ่งเกี่ยวกับการสังเคราะห์ lipopolysaccharide (LPS) ตามรูปที่ 2.15

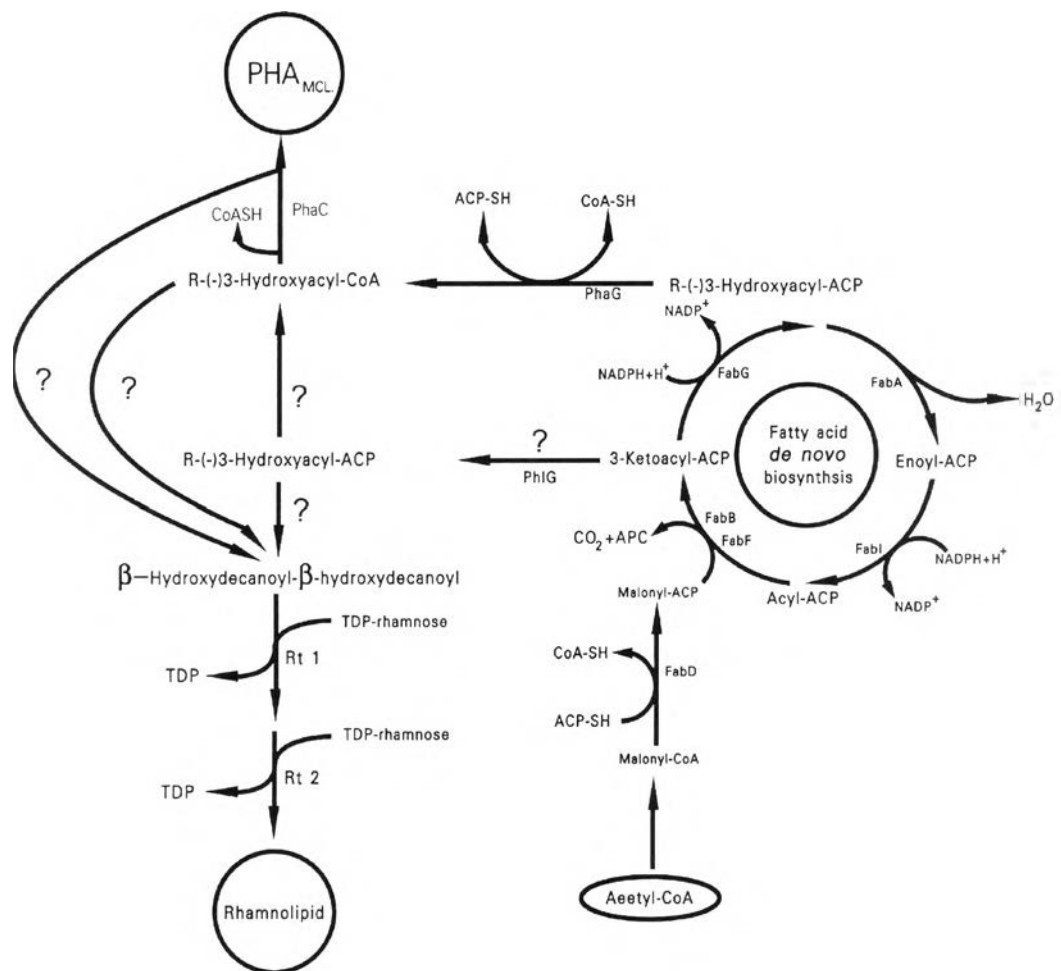


รูปที่ 2.14 แสดงการควบคุมการผลิตแรมโนลิปิดใน *Pseudomonas aeruginosa* (Ochsner และ Reiser, 1995)



รูปที่ 2.15 แสดงกระบวนการสังเคราะห์แรมโนลิปิดและการที่ควบคุมโดยผลิตภัณฑ์จากยีนต่างๆ (Maier และ Soberon-Chavez, 2000)

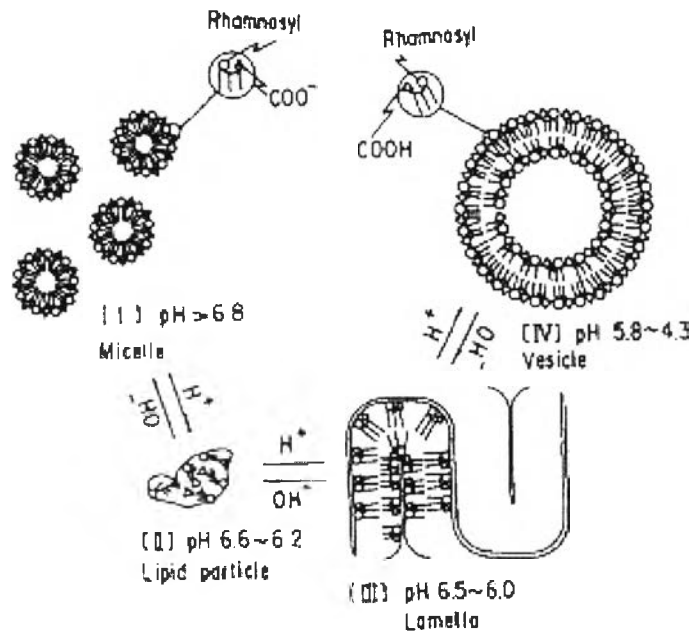
เอนไซม์ rhamnosyltransferase 1 มี β -hydroxy acid เป็นสารตั้งต้น (precursor) โดยจะต่อกับ ACP หรือ CoA แต่เมื่อศึกษาการสังเคราะห์แรมโนลิปิดใน heterologous host พบว่า rhamnosyltransferase สามารถเชื่อมได้ทั้ง ACP(Acyl Carrier Protein) และ CoA (Maier and Soberon-Chavez, 2000) การสังเคราะห์ในส่วนที่เป็นกรดไขมันของแรมโนลิปิด จะแยกจากการสังเคราะห์ไขมันโดยทั่วไปใน *Pseudomonas* sp. โดยแตกต่างในระดับ ketoacyl reduction (Campos-Garcia, 1998) โดยมีเอนไซม์ Rhl G ที่จะเปลี่ยน สารตั้งต้นของกรดไขมันของแรมโนลิปิด จากขบวนการสังเคราะห์กรดไขมันปกติ และ Rhl G เหมือนเป็น NADPH-dependent ketoacyl reductase คือมี NADPH เป็น co-enzyme ในปี 2000 Rehm และคณะ ได้เสนอขบวนการการสังเคราะห์กรดไขมันแบบใหม่เพื่อสร้างเป็นแรมโนลิปิด และ polyhydroxyalkanoic acid (PHA) ตามรูปที่ 2.16



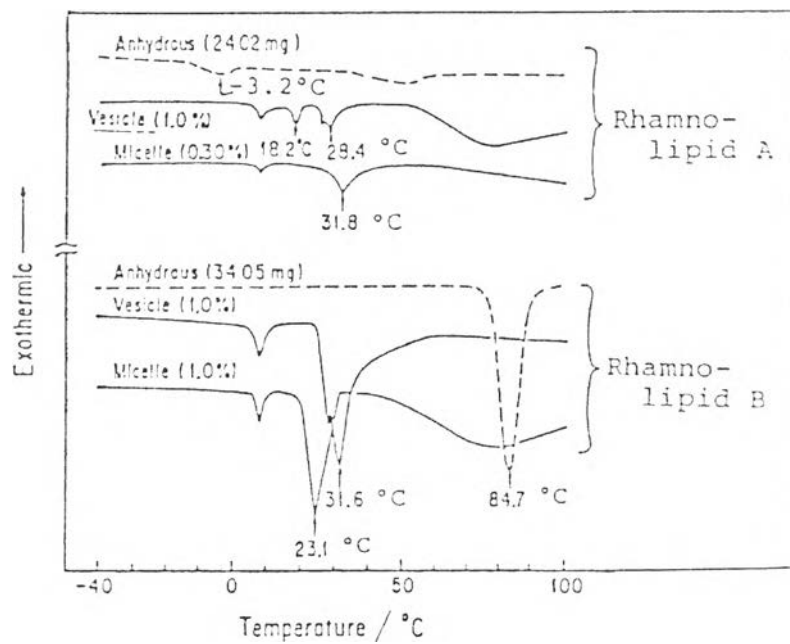
รูปที่ 2.16 แสดงกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันแบบใหม่และเกี่ยวข้องกับขบวนการสร้างแรมโนลิปิด (Rehm และคณะ, 2000)

Pseudomonas sp. มีการสังเคราะห์ L-rhamnose เพื่อเป็นองค์ประกอบใน LPS (lipopolysaccharide) โดย L-rhamnose ทำหน้าเป็นหน่วยรับของ O antigen (Rahim และคณะ, 2000) ดังนั้นการสังเคราะห์แรมโนลิปิดมี L-rhamnose เป็นสารตั้งต้นโดยจะเปลี่ยนเป็น TDP-L-rhamnose ด้วยเอนไซม์ที่ถอดรหัสจาก *rml* locus ซึ่งประกอบด้วย *rml A* *rml B* *rml C* และ *rml D* โดยจะถอดรหัสเป็น glucose-1-phosphate thymidyltransferase, dTDP-D-glucose-4,6-dehydratase, dTDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose-3,5-epimerase และ dTDP-4-keto-L-rhamnose reductase ตามลำดับ (Rahim และคณะ, 2000) ยีน *alg C* เป็นยีนที่ถอดรหัส Phosphomannomutase ซึ่งเป็นเอนไซม์ในขั้นตอนที่ 2 ในการสังเคราะห์ alginate ที่เป็น exopolysaccharide ซึ่งเกี่ยวข้องกับสายพันธุ์ที่ก่อโรค cystic fibrosis ถึงกระนั้นโปรตีนที่ถอดรหัสจากยีน *alg C* ก็สามารถเป็น Phosphoglucomutase ซึ่งเกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ LPS (Cooyne และคณะ, 1994) และเมื่อเร็ว ๆ นี้พบว่า การสังเคราะห์ กลูโคส และ แรมโนส จำเป็นต่อส่วน core-LPS (Olvera และคณะ, 1999) จากข้างบนจะเห็นได้ว่า โปรตีน Alg C จำเป็นต่อการสังเคราะห์แรมโนลิปิด ตามรูปที่ 2.15 จะเห็นได้ว่ามีเอนไซม์ที่ควบคุมการสังเคราะห์แรมโนลิปิดมากมาย เช่น *las R* และ *rhl R* แต่การแสดงออกของยีนยังขึ้นกับตัวควบคุมการถอดรหัสตัวอื่นๆ อีก (Maier และ Soberon-Chavez, 2000)

จากที่กล่าวในข้างต้นพบว่าการฟอร์มตัวเป็นโครงสร้างใดๆ (vesicle, lamella, micelle) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สภาวะต่างๆ นั้นมีผลต่อการทำงาน เช่น การลดแรงตึงผิว การเกิดอิมัลชัน และการกระจายน้ำมัน ซึ่งได้แก่ ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ความเข้มข้นของเกลือ และ อุณหภูมิ เป็นต้น เมื่อค่าความเป็นกรดเป็นด่างมากกว่า 4 แรมโนลิปิดมีประจุสุทธิเป็นลบ (Rosenberg และ Ron, 1999) จากการทดลองใน แรมโนลิปิดชนิด A และ B ที่ผลิตได้จาก *Pseudomonas* sp. BOP 100 เมื่อเริ่มการทดลองที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่ 7.35 พบว่า แรมโนลิปิดชนิด A มีน้ำหนักของไมเซลล์เท่ากับ 38,000 และ แรมโนลิปิดชนิด B มีน้ำหนักของไมเซลล์เท่ากับ 7,000 และตรวจสอบการฟอร์มตัวด้วย กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน หลังการเขย่าแรมโนลิปิดชนิด A และ B ที่ละลายอยู่ในน้ำ โดยพบว่าที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 4.3, 6.2, 6.4 และ 7.35 มีโครงสร้างเป็น vesicle, lamella และ อนุภาคไขมัน (lipid particle) ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 2.17 และโครงสร้างดังกล่าวสามารถย้อนกลับได้ ตามค่าความเป็นกรดเป็นด่างของสภาวะแวดล้อม (Ishigami และ Suzuki, 1997) เมื่อทดสอบ แรมโนลิปิดชนิด A และ B ที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่า แรมโนลิปิดชนิด A มีโครงสร้างเป็น ไมเซลล์ ที่ 31.8 °C และ ชนิด B ที่ 23.1 °C และโครงสร้างที่เป็น vesicle แรมโนลิปิดชนิด A เป็นที่อุณหภูมิ 28.4 °C และ ชนิด B 31.6 °C ดังแสดงตามรูปที่ 2.18 ขณะที่ทำการทดลอง แรมโนลิปิดมีความเข้มข้น 0.5-20 มล.ต่อมก. และสารละลายมีค่าความเป็นกรดเป็นด่างอยู่ระหว่าง 5.8-7.2 (Ishigami และคณะ, 1987)



รูปที่ 2.17 แสดงการจัดเรียงตัวของแรมโนลิปิดชนิด A และ B ที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่างต่างๆ (Ishigami และ Suzuki, 1997)



รูปที่ 2.18 แสดงการจัดเรียงตัวของแรมโนลิปิดชนิด A และ B ที่อุณหภูมิต่างๆ (Ishigami และคณะ, 1997)

การผลิตแรมโนลิปิดโดย *Pseudomonas aeruginosa* นั้น แหล่งคาร์บอนที่ใช้ผลิตได้แก่ กลีเซอรอล กลูโคส ไตรกลีเซอไรด์ และ n-alkane ส่วนแหล่งไนโตรเจน คือ แอมโมเนียม และ ไนเตรท อ็อกไซด์ (Syldatk และ Wagner, 1987) ข้อจำกัดในการผลิตแรมโนลิปิดให้ได้ปริมาณมากนั้นคือ การเจริญเติบโต ดังนั้นปริมาณแหล่งไนโตรเจน ปริมาณ multivalent ion และปริมาณแหล่งคาร์บอนที่มากเกินไป จึงเป็นปัจจัยสำคัญในการรักษาการผลิตแรมโนลิปิดให้ได้ปริมาณที่มาก โดยตัวแปรที่บ่งบอกถึงปริมาณแรมโนลิปิดว่าผลิตได้มากน้อยเท่าใดได้แก่ ปริมาณแรมโนลิปิดที่ผลิตได้ (g/l) และ High yield coefficient ($Y_{P/S}$, $Y_{P/X}$) ซึ่งสามารถวัดวัดปริมาณแรมโนลิปิดด้วยวิธี agar-plate diffusion ด้วย dye reagent โดย Siegmund และ Wagner, 1991 หรือ วิธี HPLC (High-pressure liquid chromatography) โดย Schenk และคณะ, 1995 (Lang และ Wullbrandt, 1999) วิธีการผลิตแรมโนลิปิดที่มีรายงานไว้ ได้หลายแบบดังต่อไปนี้

1. การเลี้ยงแบบ batch หรือ fed-batch ภายใต้ภาวะควบคุมการเจริญ การผลิตแรมโนลิปิด อาจเกิดผลิตภัณฑ์ร่วม โดยสามารถพบ pyocyanin และ phenazine dye ซึ่งมีปริมาณมากกว่า 0.2 กรัมต่อลิตร (Osman และคณะ, 1996) และมีรายงานว่า *Pseudomonas* sp. 19SJ ที่สามารถใช้ mannose เป็นแหล่งคาร์บอน แล้วยังสามารถใช้ phenanthrene เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวได้ (Deziel และคณะ, 1996)

2. การเลี้ยงแบบ Batch ในระยะ resting free cells จากการรายงานของ Syldatk ในปี 1984 -1985 (Lang และ Wullbrandt, 1999) โดยทำการทดลองใน *Pseudomonas* sp. DSM 2874 ในระยะ resting cell ซึ่งเปรียบเทียบการผลิตโดยดูจากผลของ yield coefficient ($Y_{P/S}$, $Y_{P/X}$) โดยเปรียบเทียบการเลี้ยงเมื่อจำกัดปริมาณไนโตรเจน จาก 0.16 ถึง 0.23 และ จาก 0.61 ถึง 3.30 ตามลำดับ ภายใต้สภาวะดังกล่าว พบแรมโนลิปิดชนิด R3 และ R4 เป็นครั้งแรก และมีแรมโนลิปิดชนิด R1 และ R2 รวมอยู่ด้วย โดยมี n-C₁₄ เป็นแหล่งคาร์บอน มีอัตราส่วนการผลิตแรมโนลิปิดชนิดต่างๆ ดังนี้ R1 เท่ากับ 41%, R2 เท่ากับ 42%, R3 เท่ากับ 15% และ R4 เท่ากับ 2%

3. การเลี้ยงแบบ Semicontinuous ใน immobilized cell มักพบว่าเกิดฟองมากขณะผลิตซึ่งเป็นลักษณะของจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ดังนั้นจึงเลือกที่จะผลิตแรมโนลิปิดใน immobilized cell จุดประสงค์ในการเพิ่มระยะเวลาในการผลิต สามารถนำเซลล์กลับมาใช้ได้อีก และสามารถเก็บผลผลิตจากเซลล์ได้อย่างต่อเนื่องโดยที่เซลล์ที่จะไหลล้นออกมา การคัดเลือกแหล่งคาร์บอน และ ระบบ immobilized cell ใน *Pseudomonas* sp. DSM 2874 (โดยเซลล์จะอยู่ใน polymer และยึดเกาะกับ supportor) โดย polymer ส่วนใหญ่ที่เลือกใช้และ ได้ผลคือ calcium alginate เมื่อกลีเซอรอลเป็นสับสเตรท (Klein และ Wagner, 1987) การผลิตโดยวิธี immobilized cell สำเร็จสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้หลายครั้ง โดย Siemann และ Wagner (1993)

ตารางที่ 2.3 สรุปรายงานการผลิตแรมโนลิโดจาก *Pseudomonas* sp. ในขวดเขย่าและ bioreactor โดยเลี้ยงในอาหาร mineral salt หรือ complex media ที่อุณหภูมิ 28 – 37 °C ที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่างระหว่าง 6 – 7.5 (Lang และ Wullbrandt, 1999)

สายพันธุ์	C- source (g/l)	RL (g/l)	$Y_{P/S}$ (g/g)	X (g/l)	$Y_{P/X}$ (g/g)	T (h)	Pv (g/l/h)	เอกสารอ้างอิง
<i>P. aeruginosa</i>	Glycerol (30)	2.5	0.083	ND	ND	96	0.026	Jarvis และ Johnson 1949
<i>P. aeruginosa</i>	Glycerol (30)	2.0	0.067	ND	ND	120	0.016	Hauser และ Karnovsky 1954
<i>P. aeruginosa</i> KY 4025	n-Paraffin (90)	8.5	0.094	ND	ND	144	0.059	Itoh และคณะ, 1971; Suzuki และ Itoh 1972
<i>P. sp</i>	n-Paraffin (50)	14.0	0.280	ND	0.85	120	0.117	Yamaguchi และคณะ 1976
<i>P. sp.</i> MUB	n-C14/15 (20)	2.9	0.145	3.4	0.85	48	0.060	Wagner และคณะ 1983; Wagner และคณะ 1984
<i>P. sp.</i> DSM 2874	n-C14/15 (80)	12.8	0.160	21.0	0.61	180	0.071	Syldatk และคณะ 1985
<i>P. aeruginosa</i> UI 29791	Corn oil (75)	46.0	0.613	12.0	3.83	192	0.240	Limhardt และคณะ 1989; Daniels และคณะ 1988
<i>P. aeruginosa</i> 44T1	Olive oil (20)	7.65	0.382	6.0	1.28	72	0.106	Robert และคณะ 1989
<i>P. aeruginosa</i> 44T1	Olive oil (20)	9.0	0.450	ND	ND	120	0.075	Parra และคณะ 1990

ตารางที่ 2.3 ต่อ

สายพันธุ์	C- source (g/l)	RL (g/l)	$Y_{P/S}$ (g/g)	X (g/l)	$Y_{P/X}$ (g/g)	T (h)	Pv (g/l/h)	เอกสารอ้างอิง
<i>P. aeruginosa</i> 44T1	Olive oil (20)	10.0	0.500	4.2	2.38	110	0.091	Manresa และคณะ 1991
<i>P. sp.</i> JAMM	Mill waste olive oil (24)	1.40	0.058	ND	ND	150	0.009	Mercade และ Manresa 1994
<i>P. aeruginosa</i> DSM 7108	Soybean oil (125)	78.0	0.624	ND	ND	167	0.467	Wullbrandt และคณะ 1994; 1995; Wullbrandt 1998;
<i>P. aeruginosa</i> DSM 7107	Soybean oil (163)	112.0	0.687	ND	ND	264	0.424	Giani และคณะ 1997
		1.78	0.089	1.6	1.11	44	0.040	Babu และคณะ 1996
<i>P. aeruginosa</i> BS2	Whey (20)							
<i>P. aeruginosa</i> BS2	Sucrose)(20) (distillery waste	1.85	0.093	1.5	1.23	44	0.042	Babu และคณะ 1996
<i>P. aeruginosa</i> GL1	Glycerol (30)	5.8	0.193	2.8	2.07	150	0.038	Arino และคณะ 1996
<i>P. sp.</i> BOP 100	Ethanol (30)	3.0	0.100	1.0		3.00	120	Osman และคณะ 1996

ตารางที่ 2.3 ต่อ

สายพันธุ์	C- source (g/l)	RL (g/l)	$Y_{P/S}$ (g/g)	X (g/l)	$Y_{P/X}$ (g/g)	T (h)	P_v (g/l/h)	เอกสารอ้างอิง
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3924	Ethanol (55)	32.0	0.582	3.4	9.41	168	0.1900	Matsufuji และคณะ 1997
<i>P. aeruginopsa</i> UW-1	Canola oil (60)	24.3	0.405	ND	ND	216	0.113	Sim และคณะ 1997

หมายเหตุ RL: rhamnolipid

$Y_{P/S}$: ปริมาณแรมโนลิปิดต่อน้ำหนักsubstrate

X : น้ำหนักเซลล์แห้ง

$Y_{P/X}$: ปริมาณแรมโนลิปิดต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

T : เวลา

P_v : แรมโนลิปิดต่อลิตรต่อเวลา

ตารางที่ 2.4 สรุปการผลิตแรมโนลิปิดจาก *Pseudomonas* sp. DSM 2874 เมื่อใช้วิธี immobilization เปรียบเทียบกับวิธีใช้เซลล์อิสระ (Kosaric, 1993)

Immobilization support	Principle of immobilization	Rhamnolipids Production		
		Glycerol	Glucose	n-Alkane
Free cells	None	100	100	100
Alginate	Ionic binding	90.00	66.1	21.9
Chitosane	Ionic binding	2.1	2.0	2.5
Agar	Nonspecific gelation	54.9	51.5	20.8
Carrageenan	Nonspecific gelation	44.4	39.2	16.9
Epoxide resin	Covalent binding	2.8	3.8	7.8
Polyacrylamide	Covalent binding	3.5	1.5	6.5

4. วิธีการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง และ ผลผลิตในเซลล์อิสระ การผลิตแรมโนลิปิดแบบต่อเนื่องโดยเริ่มแรกไม่มีการเติมเซลล์เพิ่มเข้าไป โดยทดลองใน *Pseudomonas aeruginosa* PG 201 เมื่อมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งมีสภาพที่เหมาะสมดังนี้ คือ ปริมาณของคาร์บอน และ ฟอสเฟตมากเกินไป จำกัดปริมาณไนโตรเจน และ อีออนโลหะ ทำให้มีผลผลิตจำเพาะ (specific productivities) สูงสุดในขณะที่อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) ต่ำ (Guerra-Santos และคณะ, 1984; 1986; Reiling และคณะ, 1986) หลังจากนั้นได้ใช้วิธีการเลี้ยงแบบต่อเนื่องโดยเติมเซลล์กลับเข้าไป ซึ่งส่วนมากเมื่อความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มขึ้น และ เวลาการใช้สับสเตรทลดลงสองเท่า ต้องมีการกวนถังหมักอย่างต่อเนื่องเพื่อเซลล์ได้รับอาหารอย่างทั่วถึง และ การแลกเปลี่ยนออกซิเจน และ คาร์บอนออกไซด์ เป็นต้น (Fiechter, 1992) ผลผลิตโดยรวมของแรมโนลิปิดต้องนำมาคำนวณในเชิงเศรษฐกิจ ซึ่งพบว่าการเลี้ยงแบบต่อและเติมเซลล์กลับเข้าไป จะให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น คือ $Y_{P/S}$ เท่ากับ 0.15 กรัมต่อกรัม และ volumetric productivity (P_V) เท่ากับ 0.545 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้น้ำมันข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนในสภาพที่เหมาะสมพบว่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 0.48 กรัมต่อกรัม และ volumetric productivity (P_V) เท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (Ochsner และคณะ, 1996)

ตารางที่ 2.5 สรุปผลการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* DSM 2659 ด้วยวิธีการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง ณ ภาวะต่างๆ (Kosaric, 1993)

Condition	D (h ⁻¹)	B (h ⁻¹)	X (g/l)	P _v (mg/l/h)	q _p (mg/g/h)	Y _{p/s} (g/g)	Y _{x/s} (g/g)	V ^L /V _r (l/l)
A	0.18	0.002	13.63	545	41	0.15	0.007	1.8/2
	0.10	0.004	7.7	292	38	0.145	0.015	7.2/8
	0.14	0.04	7.9	300	37	0.1	0.11	7.2/8
	0.14	0.07	4.6	179	39	0.07	0.12	1.8/2
B	0.135	0.135	2.4	134	56	0.05	0.12	1.5/5
	0.05	0.05	2.5	77	31	0.08	0.13	1.5/5
C	0.05	0.05	2.5	88	35	0.097	0.14	1.5/5
	0.12	0.12	3.8	309	81	0.070	0.14	1.5/5
	0.065	0.065	2.5	147	59	0.077	0.085	23/50

หมายเหตุ

Condition A : cell recycle S₀ = 20 g/l glucose

Condition B : chemostat S₀ = 20 g/l glucose

Condition C : chemostat ¹S₀ = 18, ²S₀ = 36, ³S₀ = 30 g/l glucose

D : Dilution Rate

B : Bleed Rate

X : Cell Weight

P_v : Volumetric productivity

q_p : Specific productivity

Y_{p/s} : Production Yield

Y_{x/s} : Cell Yield

V^L/V_r : Volume Ratio

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Desai และ Banat, 1997) ได้แก่

1. แหล่งคาร์บอน แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแบ่งออกได้เป็นชนิดที่สามารถละลายน้ำ และ ไม่สามารถละลายน้ำ แหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำที่นิยมใช้ในการผลิตแรมโนลิปิดจาก *Pseudomonas* sp. เช่น กลีเซอรอล กลูโคส แมนนิทอล และ เอทานอล เป็นต้น และตัวอย่างแหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ ได้แก่ n-alkane และพวกน้ำมันพืชต่างๆ เช่น น้ำมันมะกอก น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันถั่วเหลือง และ น้ำมันปาล์ม แม้ว่าความยาวของสายกรดไขมันในสับสเตรทไม่เท่ากัน ก็ไม่มีผลต่อความยาวของสายกรดไขมันในส่วนที่เป็นไขมันในสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แต่เมื่อแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน จะทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีองค์ประกอบที่ต่างกัน
2. แหล่งไนโตรเจน พบว่าการผลิตแรมโนลิปิดจาก *Pseudomonas* sp. จะใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นไนเตรทเนื่องจากจะให้ผลผลิตสูงสุด และการที่จำกัดปริมาณแหล่งไนโตรเจนในการผลิตแรมโนลิปิด เพราะการสังเคราะห์แรมโนลิปิดจะเกิดในระยะ Stationary phase ซึ่งการจำกัดปริมาณแหล่งไนโตรเจนนอกจากจะเป็นการควบคุมในการผลิตได้มากแล้ว ยังพบว่าสามารถเปลี่ยนองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยจะมีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากเมื่อมีอัตราส่วน C/N เท่ากับ 16:1 ถึง 18:1 และพบว่าไม่มีการผลิตเมื่อมีอัตราส่วน C/N ต่ำกว่า 11:1 (Guerra-Santos และคณะ, 1984; 1986) ปริมาณแหล่งไนโตรเจนจะบอกถึง biomass yield ในขณะที่ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ไม่ชอบน้ำ ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Hommel และคณะ, 1987)
3. แหล่งเกลือแร่และวิตามิน เกลือแร่และวิตามินเป็นปัจจัยที่จุลินทรีย์ต้องการเพื่อการเจริญนอกจากแหล่งคาร์บอน และ แหล่งไนโตรเจน นอกจากนี้ยังมีผลกระตุ้นหรือยับยั้งการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์และชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เกลือแร่ที่มีความสำคัญต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้แก่ แมงกานีส แมกนีเซียม เหล็ก และ ฟอสฟอรัส (Fiechter, 1992; Kim และคณะ, 1997; Sen, 1997) ในการผลิตแรมโนลิปิดที่ได้จาก *Pseudomonas aeruginosa* DSM 2659 ถ้าควบคุมปริมาณ เหล็ก ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม แคลเซียม โบตัสเซียม และ โซเดียม ให้เหมาะสมจะช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตแรมโนลิปิด (Guerra-Santos และคณะ, 1984; 1986)
4. ปัจจัยทางกายภาพ เป็นอีกปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งปัจจัยทางกายภาพที่สำคัญได้แก่ ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง อุณหภูมิ อัตราการกวน และอัตราการให้อากาศ โดยจะส่งผลต่ออัตราการเจริญ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ในการผลิตแรมโนลิปิดพบว่าถ้าค่าความเป็นกรดเป็นด่างอยู่ระหว่าง 6.0-6.5 จะให้การผลิตสูงสุด แต่ถ้าค่าความเป็นกรดเป็นด่างมากกว่า 7 การผลิตจะลดลงอย่างชัดเจน (Guerra-Santos และคณะ, 1984)

Pseudomonas sp. แต่ละสายพันธุ์จะผลิตแรมโนลิปิดได้หลากหลายชนิดแตกต่างกัน และสามารถผลิตได้มากกว่า 1 ชนิดจากสายพันธุ์เดียว จากตารางที่ 2.6 จะเปรียบเทียบการผลิตแรมโนลิปิดในสายพันธุ์ต่างๆ ของ *Pseudomonas* sp. และแรมโนลิปิดแต่ละชนิดที่ผลิตได้นั้นมีคุณสมบัติอย่างไรบ้าง ได้แก่ ค่า CMC และ ค่าแรงตึงผิวที่ลดลงทั้ง surface tension และ interfacial tension

ตารางที่ 2.6 เปรียบเทียบแรมโนลิปิดที่ผลิตได้ใน *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเลี้ยงในอุณหภูมิระหว่าง 25-40 °C และคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิว (Lang และ Wullbrandt, 1999)

Strain	Product	Surface tension (mN/m)	Interfacial tension (mN/m)	CMC (mg/l)
<i>P.aeruginosa</i> S ₇ B ₁	R2	40	-	50
<i>P.sp</i> DSM 2874	R1+R2	26	<1 ^a	20
<i>P.sp</i> DSM 2874	R1-R4	28	<1 ^a	20
<i>P.sp</i> DSM 2874	R1	26	4 _a	20
<i>P.sp</i> DSM 2874	R2	27	<1 _a	10
<i>P.sp</i> DSM 2874	R3	25	<1 _a	200
<i>P.sp</i> DSM 2874	R4	30	<1 _a	200
<i>P.aeruginosa</i> 44T1	R1	25	0.2 _b	11
<i>P.aeruginosa</i> 44T1	R2	25	1 _b	11
<i>P.aeruginosa</i> BPO 100	R B Na salt	29	3.5 ^c	260
<i>P.aeruginosa</i> BPO 100	RB-Me	31	0.1 ^c	400

หมายเหตุ a, b และ c หมายถึงสารที่ใช้วัด Interfacial tension ได้แก่ n-C₁₆, kerosene และ n-C₈ ตามลำดับ Me หมายถึง methyl ester โดยข้อมูลจากตารางที่ 2.6 อ้างจากงานวิจัยของ Hisatsuka และคณะ, 1971; Sylatck และคณะ, 1985; Parra และคณะ, 1989; Ishigami และคณะ, 1993

โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวที่มีโมเลกุลเป็นแบบ แอมฟิพาติก (amphiphatic) ทำให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ตามคุณสมบัติดังนี้ อิมัลซิฟายเออร์ ช่วยให้เกิดการแยกของเฟส เวทิง เอเจนต์ (wetting agent) สารช่วยให้เกิดฟอง(foaming agent) สารช่วยในการละลาย(solubilizer) สารลดการเกิดสนิม สารทำความสะอาด และสารลดความหนืด เป็นต้น จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในด้านอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหารซึ่งนิยมใช้สารลดแรงตึงผิวในอาหารจำพวก เครื่องดื่มใช้เป็นสารช่วยในการละลาย ช่วยให้อาหารนำรับประทานด้วยการทำให้แวววาว หรือด้านสีส่น อาหารพวกของอบโดยช่วยให้เป็นเนื้อเดียวกันจากคุณสมบัติเป็นอิมัลซิฟายเออร์ ช่วยทำให้เกิดโฟม ช่วยเพิ่มความหนืด ทำให้เป็นเจลลิติน อาหารพวกที่มีนม และ ไข่เป็นองค์ประกอบซึ่งจะช่วยทำให้เกิดเจลลิติน ทำให้เกิดการรวมตัว ช่วยทำให้เกิดโฟม หรือ เพิ่ม fat holding capacity อาหารพวกเนื้อสัตว์ โดยทำเป็นอิมัลซิฟายเออร์ ทำให้เกิดเจลลิติน เกิดการยึดเกาะและดูดซับ อาหารพวกซूपและน้ำเกรวี่ โดยจะช่วยเพิ่มความหนืด เป็นอิมัลซิฟายเออร์ ดูดซับน้ำ และพวกที่ใช้ตกแต่งอาหารเช่น ทอปปิงต่างๆ ซึ่งสารลดแรงตึงผิวจะช่วยให้เกิดโฟม เป็นเจลลิติน และเป็นอิมัลซิฟายเออร์ และในเครื่องสำอางจากคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวข้างต้นทำให้สารลดแรงตึงผิวเป็นที่แพร่หลายจากตารางที่ 2.7 จะแสดงตัวอย่างของคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในอาหารชนิดต่างๆ และต่อไปนี้เป็นตัวอย่างที่ใช้เป็นอิมัลซิฟายเออร์ในอาหาร เช่น lecithin และ lecithin derivative, glycerol fatty acid ester, hydroxylic acid และ fatty acid ester, lactylate fatty acid ester, polyglycerol fatty acid ester, ethylene หรือ propylene glycol fatty acid ester, ethoxylated derivative of monoglycerides, sorbitan fatty acid ester, miscellaneous derivative (Kosaric, 1993) อย่างไรก็ตามยังเป็นที่ถกเถียงว่าจะสามารถใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์จะใช้กับอาหารได้หรือไม่ ดังนั้นองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา จึงทดสอบการลดแรงตึงผิวชีวภาพในด้านคุณค่าทางอาหาร คุณสมบัติต่างๆ ด้านการรับรส ด้านชีวภาพ และ ด้านพิษวิทยา สุดท้ายยังห้ามใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์กับอาหาร แต่อนุญาตให้ใช้ในยา และ เครื่องสำอางค์ได้ ในขณะที่ในประเทศญี่ปุ่นอนุญาตให้ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์กับอาหารได้ เช่น sophorolipid โดยใช้เป็น additive ในแป้งเพื่อเพิ่มอายุของการวางขาย(shelf life) ของขนมอบ mannosylerythrytol lipids จาก *Cadida antarctica* ที่ผลิตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันถั่วเหลือง นอกจากนี้ยังมีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เป็นพอลิเมอร์ เช่น emulsan ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 200 กิโลดาลตัน ซึ่ง emulsan และ apoemulsan ที่ผลิตจาก *Acinetobacter calcoacetius* ส่วนในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางตัวอย่างเครื่องสำอางที่ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่น สบู่ ครีมอาบน้ำ แผ่นป้องกันผิว ผลิตภัณฑ์ป้องกันรังแค น้ำยาล้างคอนแทคเลนส์ ผลิตภัณฑ์ดับกลิ่น ลิปสติก ยาสีฟัน มาสคาร่า आयแชโต สารให้ความชุ่มชื้น ผลิตภัณฑ์ต่างมม เป็นต้น ในสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางคือ แรมโนลิปิด โดยแรมโนลิปิด จะฟอร์มตัวเป็น liposome (Ishigami และ

คณะ, 1987) โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในวงการอุตสาหกรรมส่วนมากได้จัดสิทธิบัตรแล้ว ตามตัวอย่างใน ตารางที่ 2.8 (Kosaric, 1993) นอกจากนั้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบางชนิดยังเป็นสารปฏิชีวนะ เช่น เซอร์เฟกติน พอลิไมซิน และ แรมโนลิปิด เป็นต้น

ตารางที่ 2.7 หน้าที่ต่างๆของสารลดแรงตึงผิวที่ใช้เป็นอิมัลซิเออร์ในอาหารชนิดต่างๆ (Kosaric, 1993)

Functions	Product examples
Emulsification (water-in-oil)	Margarine
Emulsification (oil-in-water)	Mayonnaise
Aeration	Whipped toppings
Improvement of whippability	Whipped toppings
Inhibition of fat crystallization	Candy
Softening	Candy
Antistaling	Bread
Dough conditioning	Bread dough
Improvement of loaf volume	Bread
Reduction of shortening requirements	Bread
Pan release agent	Yeast-leavened and other dough and batter products
Fat stabilizer	Food oil
Antispattering agent	Margarine and frying oils
Antisticking agent	Caramel candy
Protective coating	Fresh fruits and vegetables
Surfactant	Molasses
Viscosity control	Molten chocolate
Improvement of solubility	Instant drinks
Starch complexation	Instant potatoes
Humectant	Cake icing

Functions	Product examples
Plasticizer	Cake icings
Defoaming agent	Sugar production
Stabilization of flavor oils	Flavor emulsification
Promotion of "dryness"	Ice cream
Freeze-thaw stability	Whipped topping
Improved wetting ability	Instant soups
Inhibition of sugar crystallization	Panned coating

ตารางที่ 2.8 ตัวอย่างสิทธิบัตรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตด้วยจุลินทรีย์ (Kosaric, 1993)

Product	Microorganism	Patent
Emulsan	<i>Arthrobacter</i> sp. ATCC 31012	Biotechnol. Aktienges., US 4,276,094 (1981)
Biosurfactant	<i>Corynebacterium hydroblastus</i> NRRL-B_5631	CPDL, US 3,997,398 (1976)
Biosurfactant	<i>Arthrobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Pseudomonas</i>	CPD, CA 1,114,759 (1981)
Biosurfactant	<i>Arthrobacter</i> RAG 1	Gutnick, D., Rosenberg, E. DE 2,415,897 (1987)
Lipopeptide	<i>Methylomonas clara</i> ATCC 31226	Hoescht AG, DE 3,312,166 (1984)
Biosurfactant	<i>Penicillium spiculisporum</i>	Inoue-Japax Reseach Inc., Jpn Kokai 7837,189 (1987)
Sophorose lipids	<i>Torulopsis bombicola</i>	Kao Soap Ltd., DE 2,834,118 (1979) DE 2,938,383 (1980)

Product	Microorganism	Patent
Glycolipids (trehalose lipids)	<i>Arthrobacter paraffineus</i> ATCC 15591 <i>Corynebacterium hydroblastus</i> ATCC 15592	Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd. DE 1,905,472 (1970) US 3,637,461 (1972)
Fructose lipids	<i>Arthrobacter paraffineus</i> ATCC 15591	Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd. DE 2,440,942 (1975)
Spiculisporic acid	<i>Penicillium spiculisporum</i> ATCC 16071	Kobayashi, Y., Tabuchi, T., US 3,625,826 (1971)
Biosurfactant	<i>Thiobacillus, Bacillus,</i> <i>Nocardia, Pseudomonas</i>	Philips Petroleum Co US 2,907,389 (1959) US 3,185,216 (1965)
Emulsan	<i>Acinetobacter</i> sp.ATCC 31012	Petroleum Fermentation N.V. US 4,311,829 (1982) US 4,311,832(1965)
Sophorose lipid	<i>Torulopsis magnoliae</i> <i>Torulopsis apicola</i>	Spencer, J.F.T., Tullich, A.P., Gorin, P.A.J. US 3,205,150 (1965)
Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21331	Takeda Chemical Ind. Ltd. US 3,687,926 (1972)
Biosurfactant	<i>Candida</i>	VEB Petri-chemisches Kombinant Schedt, DD 139,069 (1979)
Biosurfactant	<i>Candida, Pichia, Nocardia,</i> <i>Mycobacterium,</i> <i>Pseudomonas</i>	Wintershall AG, DE 2,401,267 (1975) DE 2,843,685 (1980) DE 2,911,016 (1980)
Trehalose lipid	<i>Rhodococcus erythropolis</i> DSM 43215	Wintershall AG, DE 3,248,167 (1984)
Biosurfactant	<i>Corynebacterium salvinum</i>	Zajic, J.E., Gerson, R.K. US 4,355,109 (1982)

ประโยชน์และการนำแรมโนลิปิดไปใช้ในด้านต่างๆ

1. แรมโนลิปิดสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เช่น สามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ที่ความเข้มข้น 10 –25 µg/ml (IC₅₀) (Lang และคณะ, 1989; Lang และ Wagner, 1993) และตามรายงานของ Abalos และคณะ ในปี 2001 พบว่า แรมโนลิปิดหลายชนิดผสมกันจาก *Pseudomonas aeruginosa* AT10 โดยใช้ไขมันถั่วเหลืองที่นำกลับมาใช้ใหม่ ซึ่งแรมโนลิปิดผสมประกอบด้วย R₂C₁₀C₁₀ + R₁C₁₀C₁₀ + R₂C₁₀C₁₂ + R₁C₁₀C₁₂ + R₁C₁₂₋₁C₁₀ + R₁C₁₂₋₂ + R₁C₈₋₂ สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและลบ และยังสามารถยับยั้งจุลินทรีย์พวกราได้ดีอีกด้วย แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์
2. ด้านการเกษตร antiphytopathogen ที่เป็นพวกรา โดยจะมีผลกับ phytopathogen เช่น *Pythium aphanidermatum* ในระยะ zoospore เพราะเป็นระยะที่ไม่มีผนังเซลล์ (Stanghellini และคณะ, 1996) แรมโนลิปิดทั้งชนิดที่มีแรมโนส 1 หรือ 2 โมเลกุลมีผลยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในพืชเป็นอย่างดีในพวก zoosporic plant pathogen เช่น *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora capsici* และ *Plasmopara lactucae-radices* โดยแรมโนลิปิดเข้มข้น 5-30 mg/l สามารถหยุดการเคลื่อนที่ของ zoospore และ ทำให้เซลล์แตกในเวลาน้อยกว่า 1 นาที (Stanghellini และ Miller, 1997) และมีรายงานว่าแรมโนลิปิดสามารถยับยั้งไวรัสพืชโดย Haferburg และคณะ, 1987 คือ tobacco mosaic virus (*Nicotiana glutinosa*) และ potato X virus (*Nicotiana tabacum*) สามารถใช้เป็น wetting agent คือเป็นสารที่จะทำให้ใบพืชเปียกโดยอาศัยส่วนที่ไม่ชอบน้ำเกาะกับส่วนที่เป็นแวกซ์ของใบไม้ (Bunster และคณะ, 1989)
3. แหล่งของน้ำตาลแรมโนส (L-rhamnose) ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นและรส ในอุตสาหกรรมอาหาร น้ำตาลแรมโนสส่วนมากได้มาจากพืช เช่น quercitrin จากเปลือกต้นโอ๊ก naringin จาก กลีบของผล จากพืชตระกูลส้ม หรือ rutin เป็นต้น แต่น้ำตาลแรมโนสที่ได้จากพืชนั้นจะทำให้เกิดขยะมากมาย จึงได้มีการผลิตน้ำตาลแรมโนสจากแรมโนลิปิด โดยได้จากขบวนการ hydrolysis (Linhardt และคณะ, 1989)
4. ใช้เป็นตัวติดตามคือ เมื่อนำแรมโนลิปิดไปต่อกับ pyrene เป็น pyrenacyclester of rhamnolipid ซึ่งใช้เป็นตัวติดตามแบบฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent probe) เพื่อใช้ตรวจหา micropolarity และ microfluidity ของพื้นผิว (Ishigami และ Suzuki, 1997)
5. ด้านสิ่งแวดล้อมแรมโนลิปิดมีบทบาทอย่างมากเช่น การกำจัดสารพิษสารอินทรีย์ หรือ โลหะหนักที่ปนเปื้อนร่วมกับสารอินทรีย์ และสามารถชะล้าง (flushing agent) ทั้งสารอินทรีย์ และ โลหะหนัก
 - 5.1 การย่อยสลายพวกสารอินทรีย์ด้วยวิธีทางชีวภาพ การใช้แรมโนลิปิดช่วยกำจัดสารพวกไฮโดรคาร์บอนทั้งที่เป็นสาย (aliphatic) และวง (aromatic) (Miller, 1995) ดังแสดงในตารางที่ 2.9

ตารางที่ 2.9 สรุปการกำจัดสารอินทรีย์โดยใช้จุลินทรีย์ร่วมกับแรมโนลิปิด

วิธีการ	สารอินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
1. ใช้จุลินทรีย์แบบ pure culture	Hexadecane	Hisatuska และคณะ, 1971; Shreve และคณะ, 1995; Zhang และ Miller, 1994; 1995
	Octadecane	Churchill และคณะ, 1995; Zhang และ Miller, 1992; 1994; 1995
	n-paprrffin	Itoh และ Suzuki, 1972
	phrnanthrene	Zhang และคณะ, 1997
2. กำจัดสารอินทรีย์ปนเปื้อนในดิน	hexadecane	Herman และคณะ, 1997a; 1997b; Jain และคณะ, 1992
	tetradecane	Jain และคณะ, 1992
	pristane	Jain และคณะ, 1992
	creosote	Provideni และคณะ, 1995
	ไฮโดรคาร์บอนผสม	Oberermer และคณะ, 1990

การย่อยสลายทางชีวภาพโดยรวมกับแรมโนลิปิดมีกลไก 2 แบบ แบบแรกคาดว่าแรมโนลิปิดจะช่วยเพิ่มการละลายแก่สารไฮโดรคาร์บอนเพื่อที่เซลล์จะย่อยสลายง่ายขึ้น (Shreve และคณะ, 1995; Zhang และ Miller, 1992) และกลไกแบบที่ 2 คาดว่าแรมโนลิปิดจะทำให้ผิวเซลล์มีสถานะเป็น hydrophobic เพิ่มขึ้นซึ่งจะทำให้เซลล์เกาะติดกับสับสเตรทที่มีสถานะ hydrophobic เช่นกัน (Shreve และคณะ, 1995; Zhang และ Miller, 1994) และเมื่อปี 2000 Al-Tahhan และคณะ พบว่าแรมโนลิปิดเป็นสาเหตุที่ทำให้ *Pseudomonas* sp. สูญเสีย LPS (Lipopolysaccharide) จากผนังเซลล์ ซึ่ง LPS เป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่เป็น hydrophilic ของผิวเซลล์ ดังนั้นการที่เซลล์สูญเสีย LPS จะทำให้ผิวเซลล์มีสถานะเป็น hydrophobic ดังนั้นกลไกแบบที่ 2 จึงเป็นกลไกสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์ด้วยวิธีชีวภาพ (Herman และคณะ, 1997b) เมื่อใช้ แรมโนลิปิดในปริมาณมากจะทำให้สารอินทรีย์ละลายได้เพิ่มมากขึ้น และเมื่อมีแรมโนลิปิดในปริมาณน้อยจะทำให้ผิวเซลล์เปลี่ยนไป จากที่กล่าวมาข้างต้นแรมโนลิปิดช่วยย่อยสลายสารอินทรีย์ปนเปื้อน และสามารถถูกย่อยสลายได้โดยเปรียบเสมือนเป็นแหล่งคาร์บอนอีกชนิดหนึ่ง

5.2 การย่อยสลายพวกสารอินทรีย์ที่มีโลหะหนักปนเปื้อน (metal-organic co-contaminated) ด้วยวิธีทางชีวภาพ มีการประมาณการณ์ว่า 37% ของบริเวณที่ปนเปื้อนด้วยสารอินทรีย์ มีโลหะหนักอยู่ด้วย (Kovalick, 1991) พบว่าโลหะหนักที่เป็นพิษ เช่น ตะกั่ว แคดเมียม หรือ สารหนู สามารถยับยั้งขบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ด้วยวิธีชีวภาพ (Baath, 1989; Duxbury, 1981; Hughes และ Poole, 1989) ซึ่งแรมโนลิปิดสามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีโลหะหนักที่เป็นพิษปนเปื้อนอยู่ด้วย โดยเมื่อใช้จุลินทรีย์แบบ pure culture สามารถย่อยสลายได้ทั้ง แคดเมียม และ naphthalene (Sandrin และคณะ, 2000) และสามารถย่อยสลาย แคดเมียม และ naphthalene ได้เมื่อปนเปื้อนในดิน ซึ่งการย่อยสลายในดินจะเกิดขึ้นมากกว่า 8 -12 วัน และสามารถย่อยสลาย แคดเมียมจนหมดได้ (Maier และ Soberon-Chavez, 2000)

5.3 ความสามารถในการชะล้างสารอินทรีย์ เนื่องจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ด้วยวิธีทางชีวภาพใช้เวลานาน ดังนั้นจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องนำสารอินทรีย์ออกจากดินซึ่งสารอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ดีก็อาจใช้น้ำฉีดชะล้างออกไป แต่สารอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้น้อย หรือ ไม่ละลายน้ำจำเป็นต้องชะล้างออกด้วยวิธีอื่น การใช้แรมโนลิปิดก็เป็นวิธีหนึ่งซึ่งสามารถย่อยสลายได้และทำให้ interfacial tension ลดลงเป็นการเพิ่มความสามารถการละลาย มีรายงานว่าแรมโนลิปิดช่วยละลาย hexadecane ได้มากกว่า alkyl benzyl sulfonate (Thangamani และ Shreve, 1994) ละลาย octadecane มากกว่า Triton X-114 และ Corexit 0600 มากกว่า Triton X-114 10 เท่า และ มากกว่า Corexit 0600 5 เท่า (Thai และ Maier, 1992) และเมื่อทำการทดลองการชะล้างในดินพบว่า แรมโนลิปิดนำ hexadecane ออก 20% จากดินโดยให้ผลมากกว่า SDS และ tween 80 ซึ่งไม่สามารถชะออกได้เลย และ ชะออกได้ 6% ตามลำดับ (Bai และคณะ, 1997) การชะโดยสารอินทรีย์ที่ไม่อยู่ในเฟสของน้ำและเป็นของเหลวจะมากขึ้นกับสภาวะที่เหมาะสมได้แก่ ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง และ ค่า ionic strength เพิ่มที่จะให้ค่า interfacial tension น้อยที่สุด ส่วนสารอินทรีย์ที่เป็นของแข็งที่ปนเปื้อนในดินแรมโนลิปิดสามารถช่วยละลายได้เช่นเดียวกัน เช่น phenanthrene (Noordomn และคณะ, 1998; Van Dyke และคณะ, 1993) ,pyrene (Lafrance และ Lapointe, 1998) และ polychlorinated biphenyls และยัง PAH อื่นหลายชนิด (Van Dyke และคณะ, 1993) เมื่อเปรียบเทียบการชะสารอินทรีย์ผสมในดินระหว่างแรมโนลิปิด และ สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ ซึ่งสารอินทรีย์ผสมประกอบด้วย undecane, pentadecane, hexadecane, octadecane, pristane, naphthalene, phenanthrene และ pyrene พบว่าแรมโนลิปิดให้ผลดีกว่า TritonX-100 และ tween 60 (Scheiben และคณะ, 1994)

5.4 ความสามารถในการชะล้างโลหะหนัก มีสารประกอบมากมายหลายชนิดที่สามารถฟอร์มเป็น organic ligand กับโลหะหนักที่มีพิษ ซึ่งการฟอร์มเป็น organic ligand นั้นก็จำเป็นต่อขั้นตอนในการชะล้างโลหะหนักที่เป็นพิษ แต่เวลานำมาใช้งานจริงต้องคำนึงถึง สารที่จะนำมาใช้เป็นพิษต่อคน

สัตว์ และ สิ่งแวดล้อม หรือไม้ เช่น DTPA, EDTA และ NTA ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่มีค่าคงที่ความเสถียรของ 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) ขณะที่แรมโนลิปิดมีค่าคงที่ความเสถียรของ 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 DTPA เป็นพิษต่อสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Borgman และ Norwood, 1995; Van Dam และคณะ, 1999) และแรมโนลิปิดยังสามารถฟอร์มเป็น organic ligand กับ แคดเมียม ตะกั่ว สังกะสี แลนทานัม และ คอปเปอร์ (Herman และคณะ, 1995; Ochoa-Loza, 1998; Tan และคณะ, 1994) ในการขจัดโลหะหนักออกจากดินในระดับห้องปฏิบัติการได้แก่ แคดเมียม (Torrens และคณะ, 1998) และ แทนทาลัม มีการใช้แรมโนลิปิดขจัด สังกะสี และ คอปเปอร์ ที่ปนเปื้อนในดินโดยมีน้ำมัน และ กรด 12.6% (Mulligan และคณะ, 1999)

จากประโยชน์ต่างๆ ของแรมโนลิปิดข้างต้น ทำให้มีการผลิตแรมโนลิปิดในทางอุตสาหกรรม โดยบริษัท Jeneil Biosurfactant มีการประมาณราคาแรมโนลิปิดโดยมีราคา 5-20 เหรียญสหรัฐต่อ 1 กิโลกรัม และมีปริมาณการผลิต 20 (20 เหรียญสหรัฐต่อ 1 กิโลกรัม) –100 (5 เหรียญสหรัฐต่อ 1 กิโลกรัม) ต่อลูกบาทเมตร (Lang และ Wullbrandt, 1999) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ก็นับว่ายังแพงกว่าอยู่มาก ตัวอย่างเช่น ethoxylate หรือ alkyl polyglycoside มีราคาประมาณ 1-3 เหรียญสหรัฐต่อ 1 กิโลกรัม ถึงกระนั้นก็มีความพยายามที่จะให้แรมโนลิปิดผลิตได้มากขึ้น และมีราคาที่ถูกลง โดยการปรับปรุงทางวิศวกรรม