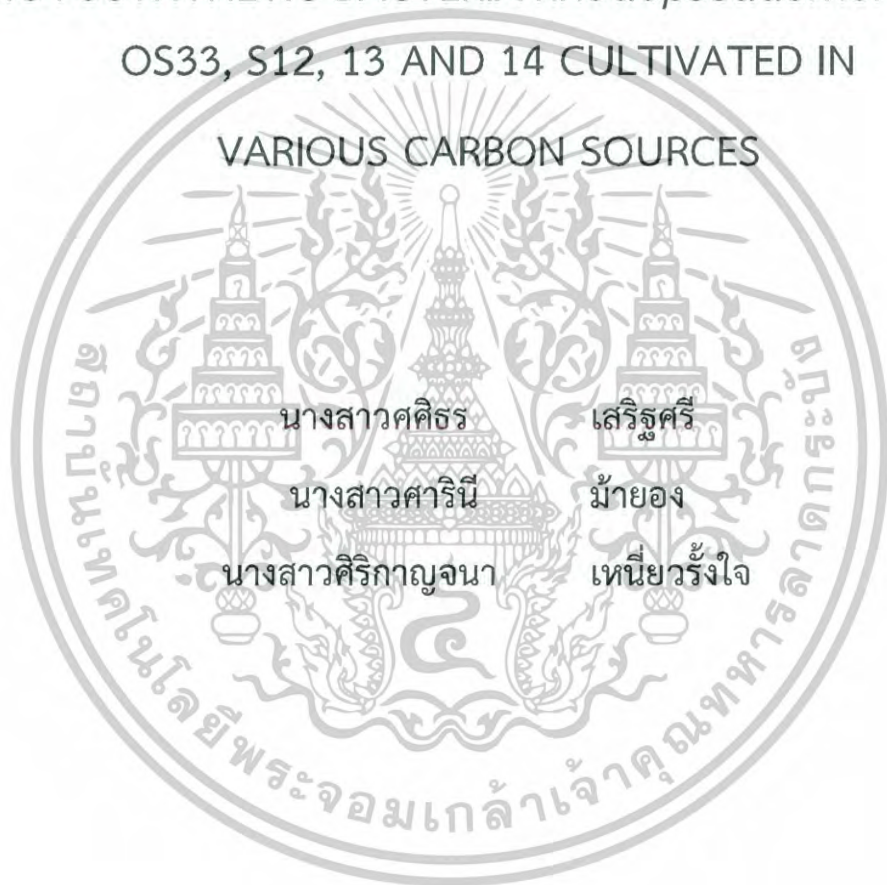


การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นจากจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง  
*Rhodopseudomonas* sp. OS33, S12, 13 และ 14 ที่เจริญใน  
แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

THE COENZYME Q10 PRODUCTION FROM  
PHOTOSYNTHETIC BACTERIA *Rhodopseudomonas* sp.  
OS33, S12, 13 AND 14 CULTIVATED IN  
VARIOUS CARBON SOURCES



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)  
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานภายในเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปีการศึกษา 2561

THE COENZYME Q10 PRODUCTION FROM  
PHOTOSYNTHETIC BACTERIA *Rhodospseudomonas* sp.  
OS33, S12, 13 AND 14 CULTIVATED IN  
VARIOUS CARBON SOURCES



A SPECIAL PROJECT IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR  
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)  
DEPARTMENT OF BIOLOGY FACULTY OF SCIENCE  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ACADEMIC YEAR 2018  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นจากจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง  
*Rhodospseudomonas* sp. OS33, S12, 13 และ 14 ที่เจริญในแหล่ง  
 คาร์บอนชนิดต่าง ๆ

ชื่อนักศึกษา นางสาวศศิธร เสรีรัฐศรี รหัสนักศึกษา 58050979  
 นางสาวศารินี ม้ายอง รหัสนักศึกษา 58050980  
 นางสาวศิริกาญจนา เหนี่ยวรังใจ รหัสนักศึกษา 58050981

ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)  
 ภาควิชา ชีววิทยา  
 คณะ วิทยาศาสตร์  
 มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)  
 ปีการศึกษา 2561  
 อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้  
 โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา  
 อุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2561

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์ฤกษ์ ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี กรรมการ	
ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นจากจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง <i>Rhodopseudomonas</i> sp. OS33, S12, 13 และ 14 ที่เจริญในแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ		
ชื่อนักศึกษา	นางสาวศศิธร	เสริฐศรี	รหัสนักศึกษา 58050979
	นางสาวศาริณี	มายอง	รหัสนักศึกษา 58050980
	นางสาวศิริกาญจนา	เหนียวรังใจ	รหัสนักศึกษา 58050981
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
คณะ	วิทยาศาสตร์		
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)		
ปีการศึกษา	2561		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์		

#### บทคัดย่อ

ศึกษาการเจริญ และการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น ของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง *Rhodopseudomonas* sp. OS33, S12, 13 และ 14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นแป้งมันสำปะหลัง โซเดียมอะซิเตท และตัวอย่างน้ำเสียจากบ่อ Oxidation Pond และจากบ่อ Anaerobic Digestion ตามลำดับ โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นแสง 1000-1500 ลักซ์ สภาวะไร้อากาศ การเลี้ยงเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. 13 ในแหล่งคาร์บอนแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 3.0 เปอร์เซ็นต์ ให้การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นได้สูงสุด 25.38 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในวันที่ 14 ของการเลี้ยงเชื้อ ขณะที่ *Rhodopseudomonas* sp. S12 เจริญในแหล่งคาร์บอนโซเดียมอะซิเตทความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ให้การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นได้สูงสุด 21.21 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในวันที่ 14 ของการเจริญ เมื่อนำ *Rhodopseudomonas* sp. 13 มาเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนที่เป็นตัวอย่างน้ำเสียจากบ่อ Anaerobic digestion และ Oxidation pond (ที่ระดับความเข้มข้น 0.50 เท่าของตัวอย่างน้ำเสีย และ 0.33 เท่าของตัวอย่างน้ำเสีย) พบว่าให้การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นได้สูงสุด 13.28 และ 31.34 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในวันที่ 9 และวันที่ 15 ของการเลี้ยงเชื้อ (ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่าความเป็นพิษของน้ำเสียจากโรงงานบำบัดสารเคมี มีระดับสูงมาก จึงส่งผลกระทบต่อผลของการเจริญของเชื้อ แต่เมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำเสียลดลง ส่งผลให้เชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงสามารถเจริญได้ ซึ่งทำให้ค่า COD ในน้ำเสีย มีระดับลดลง

คำสำคัญ : แบคทีเรียสังเคราะห์แสง โคเอนไซม์คิวเท็น Anaerobic-light *Rhodopseudomonas* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<b>Title</b>	The Coenzyme Q10 Production from Photosynthetic Bacteria <i>Rhodopseudomonas</i> sp. OS33, S12, 13 and 14 Cultivated in Various Carbon Sources	
<b>Students</b>	Miss Sasitorn Sertsri	Student ID 58050979
	Miss Sarinee Mayong	Student ID 58050980
	Miss Sirikanchana Niawrangjai	Student ID 58050981
<b>Degree</b>	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)	
<b>Department</b>	Biology	
<b>Faculty</b>	Science	
<b>University</b>	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)	
<b>Academic Year</b>	2018	
<b>Advisor</b>	Asst. Prof. Dr. Somchai Krairak	

### Abstract

The growth and Coenzyme Q10 production of *Rhodopseudomonas* sp. OS33, S12, 13 and 14 were studied for the optimal concentration of carbon sources such as cassava starch, sodium acetate, waste water samples (Anaerobic digestion and Oxidation pond), respectively. The cultivation was carried on 30-40°C, 1000-1500 lux under anaerobic condition. The cultivation of *Rhodopseudomonas* sp. 13 in 3.0% of cassava starch as C-source produced the maximum Coenzyme Q10 production of 25.38 mg/g-DCW on 14 days of cultivation. While the cultivation of *Rhodopseudomonas* sp. S12 in 0.5% of sodium acetate as C-source gave the maximum Coenzyme Q10 production of 21.21 mg/g-DCW on 14 days of cultivation. Then the cultivation and Coenzyme Q10 were observed by using waste water sample from anaerobic digestion and oxidation pond as C-source. Various concentrations of both waste water samples were examined by 0.66, 0.50, 0.33 and 0.12 time of initial sample concentration. It was found that the cultivation of *Rhodopseudomonas* sp. 13 in 0.50x of waste water from anaerobic digestion and 0.33x of waste water from oxidation pond gave maximum Coenzyme Q10 production of 13.28 mg/g-DCW and 31.34 mg/g-DCW on 9 days and 15 days of cultivation, respectively. It was concluded that the waste water from Wastewater Treatment Company contained high toxicity level that resulting in cell growth inhibition. When

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

the level of concentration was low, the cell growth was observed. The reduction of COD during cell cultivation was found.

**Keywords :** Photosynthetic bacteria, Coenzyme Q10, Anaerobic-light, *Rhodopseudomonas* sp.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยโครงการพิเศษเล่มนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความอนุเคราะห์จากคณาจารย์ผู้ทรงคุณวุฒิ ตลอดจนบุคลากรทางการศึกษา ผู้จัดทำและศึกษาโครงการพิเศษเล่มนี้ขอกราบขอบพระคุณผู้ให้ความช่วยเหลือและความอนุเคราะห์ดังต่อไปนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์ อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษาและช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของโครงการพิเศษนี้ตลอดจนให้ความรู้ และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาโครงการพิเศษฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์ฤกษ์ ประธานกรรมการโครงการพิเศษ และ ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี กรรมการโครงการพิเศษ ผู้ตรวจสอบและให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการพิเศษฉบับนี้

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ในภาควิชาชีววิทยาที่อำนวยความสะดวกในด้านเครื่องมือ อุปกรณ์สารเคมีตลอดจนสถานที่ที่ใช้สำหรับการศึกษาและจัดทำโครงการพิเศษนี้

ขอขอบคุณคณะเพื่อนในภาควิชาชีววิทยาที่ให้การช่วยเหลือ ตรวจสอบ แนะนำ ตลอดจนให้กำลังใจในการศึกษาและจัดทำโครงการพิเศษนี้

ท้ายนี้ ขอกราบขอบคุณพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การสนับสนุน ส่งเสริมการศึกษาตลอดจนเป็นกำลังใจอย่างดีเสมอมา จนทำให้ผู้ศึกษาประสบความสำเร็จในชีวิต

ศศิธร

เสริฐศรี

ศารินี

มายอง

ศิริกาญจนา

เหนี่ยวรังใจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ประวัติการค้นพบโคเอนไซม์คิวเท็น	4
2.2 โครงสร้างทางเคมีและหน้าที่ของโคเอนไซม์คิวเท็น	4
2.3 การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น	5
2.3.1 กระบวนการผลิตทางเคมีและกึ่งเคมี	5
2.3.2 กระบวนการผลิตทางชีวภาพ	7
2.4 การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นจากแบคทีเรีย	10
2.4.1 การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วง	11
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสง	13
เพื่อการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น	
2.5.1 แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน	13
2.5.2 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ	13
2.5.3 การเพิ่มปริมาณแคลเซียมในอาหารเลี้ยงเชื้อ	13
2.5.4 กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง	14
2.5.5 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)	14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สงวนไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	หน้า
2.6 การประยุกต์ใช้โคเอนไซม์คิวเท็นในทางการแพทย์	14
2.6.1 ระบบโรคหัวใจและหลอดเลือด (Cardiovascular disease)	14
2.6.2 ภาวะหัวใจล้มเหลวเนื่องจากเลือดไปเลี้ยงหัวใจไม่เพียงพอ (Congestive Heart Failure: CH)	14
2.6.3 ความดันโลหิตสูง (hypertension)	15
2.6.4 กล้ามเนื้อหัวใจอ่อนแรง และหัวใจโต (cardiomyopathy)	15
2.6.5 มะเร็ง (cancer)	15
2.6.6 โรคเกี่ยวกับเหงือก	15
2.6.7 การบำรุงผิวหนัง	15
2.7 แบคทีเรียสังเคราะห์แสง	16
2.7.1 การจัดจำแนก (Classification)	17
2.7.1.1 แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วง	18
2.7.1.2 แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีเขียว	20
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	22
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย</b>	<b>24</b>
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	24
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ	24
3.3 สารเคมี	24
3.4 เครื่องมือและอุปกรณ์	24
3.5 วิธีการทดลอง	25
3.5.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ในหลอดทดลอง	25
3.5.2 ศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงภายใต้สภาวะ Anaerobic-light	26
3.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนที่สารเคมีใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ (Cheical Oxygen Demand)	26
3.5.4 การสกัดโคเอนไซม์คิวเท็นจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสง	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	27
4.1 ศึกษาการเจริญของเชื้อ <i>Rhodopseudomonas</i> sp. โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อในขวดอาหารภายใต้สภาวะ Anaerobic-light	27
4.2 ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนที่สารเคมีใช้ในการ ย่อยสลายสารอินทรีย์ (Chemical Oxygen Demand ; COD) ภายใต้สภาวะ Anaerobic-light	32
4.3 การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นของเชื้อ <i>Rhodopseudomonas</i> sp. โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อในขวดอาหารภายใต้สภาวะ Anaerobic-light	36
4.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นสูงสุด จากเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) เปรียบเทียบกับเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์	40
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	43
5.1 สรุปผลการวิจัย	43
5.2 ข้อเสนอแนะ	44
เอกสารอ้างอิง	45
ภาคผนวก	52
ภาคผนวก ก สูตรอาหาร	53
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์ทางเคมี	54
ภาคผนวก ค รูปการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>Rhodopseudomonas</i> sp. ในขวดอาหาร	58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทินจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่าง ๆ	10
2.2 การจัดจำแนกวงศ์, สกุล, สายพันธุ์ของ Phototrophic Bacteria	17
4.1 ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินสูงสุดจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>Rhodopseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ OS33, 13, 14 ในแหล่งคาร์บอนแข็ง และ S12 ในแหล่งคาร์บอนโซเดียมอะซิเตท	41
4.2 ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินสูงสุดจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>Rhodopseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ OS33, S1, 13 และ 14 ในแหล่งคาร์บอนน้ำเสียจากบ่อ Oxidation Pond	42



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างทางเคมีของโคเอนไซม์คิวเทิน	5
2.2 การเตรียมโคเอนไซม์คิวเทินด้วยวิธีการกึ่งเคมี	6
2.3 กระบวนการผลิตโคเอนไซม์คิวเทินทางชีวภาพ	9
2.4 การถ่ายทอดอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจระดับเซลล์	12
2.5 บทบาทของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในธรรมชาติ	16
2.6 (a) คือ แบคทีเรียสังเคราะห์แสงในวงศ์ <i>Chromatiaceae</i> และ (b) คือ แบคทีเรียสังเคราะห์แสงในวงศ์ <i>Rhodospirillaceae</i>	18
2.7 แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน	20
2.8 แบคทีเรียสังเคราะห์แสงในวงศ์ <i>Chlorobiaceae</i>	21
4.1 การเจริญของเชื้อ <i>Rhodopseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ OS33, 13 และ 14 ในแหล่งคาร์บอนแข็งมันสำปะหลัง และสายพันธุ์ S12 ในแหล่งคาร์บอนโซเดียม อะซิเตทในอาหารเหลวสูตร AM เป็นระยะเวลา 14 วัน	28
4.2 การเจริญของเชื้อ <i>Rhodopseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ OS33, 13 และ 14 ในแหล่งคาร์บอนแข็งมันสำปะหลัง และสายพันธุ์ S12 ในแหล่งคาร์บอน โซเดียมอะซิเตทในอาหารเหลวสูตร AM เป็นระยะเวลา 14 วัน	29
4.3 การเจริญของเชื้อ <i>Rhodopseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ OS33, S12, 13 และ 14 ในอาหารเหลวสูตร AM แหล่งคาร์บอนน้ำเสียบ่อ Anaerobic Digestion เป็นระยะเวลา 15 วัน	30
4.4 แสดงค่าการวิเคราะห์ COD ของเชื้อ <i>Rhodopseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ OS33, 13 และ 14 ในแหล่งคาร์บอนแข็ง และสายพันธุ์ S12 ในแหล่งคาร์บอนโซเดียมอะซิเตท	32
4.5 แสดงค่าการวิเคราะห์ COD ของเชื้อ <i>Rhodopseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ OS33, S12, 13 และ 14 ในแหล่งคาร์บอนน้ำเสียบ่อ Oxidation Pond	33
4.6 แสดงค่าการวิเคราะห์ COD ของเชื้อ <i>Rhodopseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ OS33, S12, 13 และ 14 ในแหล่งคาร์บอนน้ำเสียบ่อ Anaerobic Digestion	35

- 4.7 ผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทินของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. 37  
 สายพันธุ์ OS33, 13 และ 14 ในแหล่งคาร์บอนแข็ง และสายพันธุ์ S12  
 ในแหล่งคาร์บอนโซเดียมอะซิเตท ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ
- 4.8 ผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทินของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. 38  
 สายพันธุ์ OS33, S12, 13 และ 14 ในแหล่งคาร์บอน Oxidation Pond  
 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ
- 4.9 ผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทินของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. 39  
 สายพันธุ์ OS33, S12, 13 และ 14 ในแหล่งคาร์บอนน้ำเสีย Anaerobic Digestion  
 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โคเอนไซม์คิวเทินมีชื่อเรียกต่างๆ กัน เช่น Coenzyme Q10, Ubiquinone, Ubiquinol, Ubidecarenone และ Coenzyme quinone มีชื่อเรียกทางเคมีว่า 2,2-dimethoxy-5-methyl-6-decaprenyl benzoquinone (Ernster และ Dallner, 1995) ประกอบด้วยวงแหวนของ benzoquinone ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการป้องกันการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ และส่วนของแขนงข้างจะแตกต่างกันออกไปตามแต่ละหน่วยของไอโซพรีนที่มาเชื่อมในส่วนหางของโมเลกุล โดยส่วนหางจะสามารถละลายได้ในไขมัน โดยมีจำนวนไอโซพรีนตั้งแต่ 1-10 ไอโซพรีน ขึ้นอยู่กับสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด พบได้ตามธรรมชาติ ซึ่งร่างกายมนุษย์สามารถสังเคราะห์ได้เอง โดยพบในเซลล์ทุกเซลล์ที่มีชีวิต บริเวณเยื่อหุ้มชั้นใน (inner membrane) ของไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ซึ่งเป็นออร์แกเนล (organelle) ที่ทำหน้าที่ผลิตสารพลังงานสูงให้กับเซลล์ในรูป ATP (Adenosine Triphosphate) ดังนั้นโคเอนไซม์คิวเทินจึงพบมากในอวัยวะที่ต้องการพลังงานสูง เช่น หัวใจ ตับ กล้ามเนื้อ สมอง ส่วนอวัยวะอื่นๆ ก็พบโคเอนไซม์คิวเทินเช่นกัน แต่พบค่อนข้างน้อย โคเอนไซม์คิวเทินที่ร่างกายสังเคราะห์ขึ้นนี้จะทำหน้าที่เป็นตัวถ่ายเทอิเล็กตรอนในปฏิกิริยา Electron Transport Chain (ETC) ซึ่งเป็นกระบวนการที่มีการสร้าง ATP ด้วยวิธีการเติมหมู่ฟอสเฟตจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidative phosphorylation) ซึ่งเป็นกระบวนการสร้าง ATP ที่มีประสิทธิภาพสูง เกิดขึ้นในกระบวนการหายใจระดับเซลล์แบบใช้ออกซิเจน (aerobic cellular respiration) ถ้าระดับของโคเอนไซม์คิวเทินลดลง การหายใจระดับเซลล์แบบใช้ออกซิเจนก็จะขาดประสิทธิภาพในการสร้างพลังงาน เซลล์หรืออวัยวะต่างๆ ก็จะทำหน้าที่ไม่เต็มศักยภาพ ทำให้เกิดการเจ็บป่วย ร่างกายอ่อนเพลีย และระบบภูมิคุ้มกันเสื่อมสภาพตามมาได้

แม้ว่าร่างกายจะสามารถสังเคราะห์โคเอนไซม์คิวเทินขึ้นมาได้เอง แต่การสังเคราะห์จะลดลงเมื่ออายุเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีปัจจัยภายนอกที่มีผลทำให้การสังเคราะห์โคเอนไซม์คิวเทินลดลง เช่น การพักผ่อนไม่เพียงพอ การได้รับยาหรือสารเคมี และความเครียด จะส่งผลกระทบต่อการทำงานของโคเอนไซม์คิวเทินในร่างกาย ดังนั้นร่างกายจึงควรได้รับโคเอนไซม์คิวเทินจากภายนอกเสริมเข้ามา โดยเฉพาะจากแหล่งอาหารที่อุดมด้วยโคเอนไซม์คิวเทิน ได้แก่ น้ำมันปลา ปลาทะเลเล็ก อาหารทะเล เครื่องในสัตว์ เช่น หัวใจ ตับ ไต และเนื้อสัตว์ ไข่ขาว ผลิตภัณฑ์จากถั่ว น้ำมันถั่วเหลือง เป็นต้น (อารีย์, 2551)

กระบวนการผลิตโคเอนไซม์คิวเทินมีด้วยกันหลายวิธี ทั้งการสกัดมาจากเนื้อเยื่อของพืชและสัตว์ การผลิตด้วยกระบวนการทางเคมี กิ่งเคมีและการผลิตด้วยกระบวนการทางชีวภาพโดยจุลินทรีย์ แต่การผลิตโคเอนไซม์คิวเทินในทางอุตสาหกรรมจะนิยมใช้การผลิตด้วยกระบวนการทางชีวภาพ เนื่องจากสามารถใช้วัตถุดิบได้หลายชนิดและเลือกใช้วัตถุดิบราคาถูกได้ แบคทีเรียที่ถูกนำมาใช้ผลิตหลากหลายสายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ที่มีรายงานว่าผลิตโคเอนไซม์คิวเทินได้ในปริมาณสูง ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรใช้เฉพาะเพื่อการสื่อสารเท่านั้น ไม่สงวนลิขสิทธิ์ในชื่อหรือชื่อผู้แต่งเอกสารนี้  
ไม่วางกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Agrobacterium tumefaciens*, *Paracoccus denitrificans*, *Rhodobacter sphaeroides*, และ *Rhodospirillum rubrum* (Yoshida และคณะ, 1998; Cluis และคณะ, 2007) การผลิตโคเอนไซม์ คิวเทินจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสง (Photosynthetic bacteria, PSB) กลุ่มนี้สามารถแบ่งออกได้ เป็น 2 กลุ่ม คือ แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีเขียวและแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วง โดยแบคทีเรีย สังเคราะห์แสงสีม่วงสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มสะสมก้ามะถันและกลุ่มไม่สะสม ก้ามะถัน

แบคทีเรียแสงกลุ่มไม่สะสมก้ามะถัน มี 6 สกุล ดังนี้ (Staley และคณะ, 1989)

1. *Rhodospirillum*
2. *Rhodopila*
3. *Rhodobacter*
4. *Rhodopseudomonas*
5. *Rhodomicrobium*
6. *Rhodocyclus*

สามารถพบได้ทั่วไปตามแหล่งน้ำธรรมชาติในชั้นน้ำที่มีแสงสว่างส่องถึง มีสารอินทรีย์ และ พบการรวมตัวกันเป็นกลุ่มในแหล่งน้ำที่ไม่มีออกซิเจนมีแสงเล็กน้อย ในแหล่งน้ำจืดที่มีซิลไฟด์อยู่จะ พบน้อยมาก แต่บางชนิดก็อาศัยอยู่ได้ในที่ที่มีปริมาณซิลไฟด์อยู่สูง (Imhoff และ Truper, 1989) นอกจากนี้ยังพบได้ในพื้นดิน สระน้ำ คลอง หรือแหล่งน้ำที่สกปรก เช่น บ่อบำบัดน้ำเสีย ซึ่งมีปริมาณ สารอินทรีย์สูง จึงเป็นแหล่งที่แบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่มดังกล่าวเจริญได้ดี โดยทั่วไปจะพบการ เจริญอย่างรวดเร็วของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมก้ามะถัน (Pfenning และ Truper, 1989; Olliver, 1994) เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้มีการสันดาปดีกว่าแบคทีเรียม่วงที่ใช้ซิลเฟอร์ ซึ่ง สามารถเจริญได้ทั้งแบบใช้แหล่งคาร์บอนเป็นสารอินทรีย์ (Photoheterotroph) และสารอนินทรีย์ (Photoautotroph) โดยใช้ก๊าซไฮโดรเจนซิลไฟด์เป็นตัวให้อิเล็กตรอน ส่วนใหญ่แบคทีเรียกลุ่มนี้จะ ทนต่อสภาพที่มีออกซิเจนจึงสามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีแสงแต่มีอากาศ มีแบคทีเรียโอ คลอโรฟิลล์ เอ และแคโรทีนอยด์หลายชนิดที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง สำหรับข้อดีของการเลือก แบคทีเรียสังเคราะห์แสงเป็นจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต เพราะสามารถผลิตโคเอนไซม์คิวเทินได้ใน ปริมาณมาก ลดต้นทุนการผลิต สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ง่าย และแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถ ย่อยสลายสารเคมีที่อยู่ในน้ำเสียที่ถูกปล่อยออกมาจากโรงงานอุตสาหกรรม จึงสามารถใช้บำบัดน้ำเสีย ได้ เนื่องจากการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงใช้เวลานาน มีขั้นตอนการเก็บเกี่ยวเยาะ และต้องมีการควบคุมไม่ให้เกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น เนื่องจากถ้าเกิดการปนเปื้อนจาก เชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ใช่แบคทีเรียสังเคราะห์แสงอาจทำให้มีการผลิตโคเอนไซม์คิวเทินได้ใน ปริมาณน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วยคุณสมบัติของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน โครงการพิเศษนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการวิเคราะห์การสกัดและวัดปริมาณโคเอนไซม์คิวเทิน ที่ได้จากการผลิตของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่มนี้ เนื่องจากปัจจุบันมีการนำโคเอนไซม์คิวเทิน มาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร ยา เครื่องสำอาง และทางการแพทย์ จึงทำให้เป็นที่ต้องการมากขึ้น และการผลิตด้วยวิธีทางชีวภาพ โดยการใช้จุลินทรีย์ยังเป็นการลดต้นทุนการผลิต และลดปริมาณน้ำเสียที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตโคเอนไซม์คิวเทินของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

2) ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจากการวัดปริมาณเซลล์ การวิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนที่สารเคมีใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ (Chemical Oxygen Demand) และศึกษาปริมาณโคเอนไซม์คิวเทิน

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1) การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ OS33 S12 S13 และ S14 ในอาหารเหลวสูตร AM โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ แยมมันสำปะหลัง โซเดียมอะซิเตท น้ำเสียจากบ่อ Oxidation pond และบ่อ Anaerobic digestion

2) ตรวจสอบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจากการวัดปริมาณเซลล์ ปริมาณสารเคมีที่จุลินทรีย์ใช้ในการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ (Chemical Oxygen Demand) และการวัดปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินที่ผลิตได้

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ได้ผลิตภัณฑ์โคเอนไซม์คิวเทินปริมาณมาก
- 2) ได้รู้ถึงกระบวนการผลิตโคเอนไซม์คิวเทินที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในด้านอุตสาหกรรมและการแพทย์ในอนาคตได้
- 3) ทราบปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตโคเอนไซม์คิวเทิน
- 4) สามารถลดต้นทุนในการผลิตโคเอนไซม์คิวเทินจากกระบวนการทางเคมี
- 5) ได้ผลิตภัณฑ์โคเอนไซม์คิวเทินจากแบคทีเรียที่มีปลอดภัยต่อผู้บริโภคและมีความเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

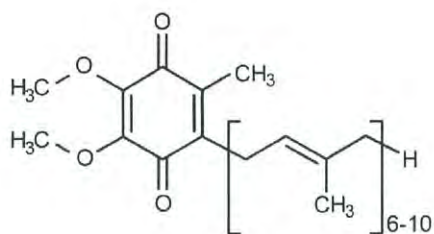
### 2.1 ประวัติการค้นพบโคเอนไซม์คิวเท็น

โคเอนไซม์คิวเท็นถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1957 โดยศาสตราจารย์ Frederick Crane สามารถแยกได้จากไมโทคอนเดรียของหัวใจวัว มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีส้ม เรียกว่า Ubiquinone ซึ่งหมายถึงสารควินินที่พบจำนวนมาก (Ubiquitous quinone) ต่อมาในปี ค.ศ. 1958 ศาสตราจารย์ Karl Folkers และคณะได้พบสูตรโครงสร้างของโคเอนไซม์คิวเท็น และได้มีการสังเคราะห์ครั้งแรกโดยใช้กระบวนการหมัก (fermentation) หลังจากนั้นจึงเริ่มมีการสนใจและศึกษาโคเอนไซม์คิวเท็นมากขึ้น (Lopez-Lluch และคณะ, 2010)

### 2.2 โครงสร้างทางเคมีและหน้าที่ของโคเอนไซม์คิวเท็น

โคเอนไซม์คิวเท็นประกอบด้วย วงแหวนของเบนโซควิโนน (benzoquinone ring) และส่วนของแขนงข้างจะแตกต่างกันออกไปตามแต่ละหน่วยไอโซพรีนที่มาเชื่อมในส่วนของโมเลกุล ซึ่งในส่วนทางนี้จะเป็นส่วนที่ละลายไขมันได้ ทำให้โคเอนไซม์คิวเท็นสามารถดูดซึมเข้าสู่เซลล์ได้ โคเอนไซม์คิวเท็นไม่ละลายในน้ำและละลายได้น้อยในแอลกอฮอล์ เมื่อเกิดปฏิกิริยารีดิวซ์วงแหวนควิโนนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นควินอล (quinol) ซึ่งมีสภาพขั้วสูงกว่าโคเอนไซม์คิว (CoQ) มีจำนวนไอโซพรีนตั้งแต่ 1 ถึง 10 ไอโซพรีนขึ้นอยู่กับสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด เช่น ในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* จะใช้โคเอนไซม์คิวซิก (CoQ6) หรือแบคทีเรีย *Escherichia coli* ใช้โคเอนไซม์คิวเอช (CoQ8) และเชื้อ *Schizosaccharomyces pombe* จะใช้ โคเอนไซม์คิวเท็น (CoQ10) เช่นเดียวกับในไมโทคอนเดรียของมนุษย์ โคเอนไซม์คิวเท็นในร่างกายมนุษย์ส่วนใหญ่ได้มาจากการสังเคราะห์เองและได้รับจากอาหารเพียงเล็กน้อย แต่การสังเคราะห์จะลดลงเมื่ออายุเพิ่มมากขึ้น โคเอนไซม์คิวเท็นจะทำหน้าที่ในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในปฏิกิริยา Electron Transport Chain ที่เกิดในไมโทคอนเดรียทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) สามารถป้องกันเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียจากการถูกทำลายหรือได้รับความเสียหายจากอนุมูลอิสระในภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) (Chew และ Watts, 2004) ที่เป็นสาเหตุนำมาสู่การเกิดโรคแห่งความเสื่อมทั้งหลาย (Cluis และคณะ, 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



## รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของโคเอนไซม์คิวเท็น

ที่มา : Khoshjou และ Farahnaz (2014)

## 2.3 การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น

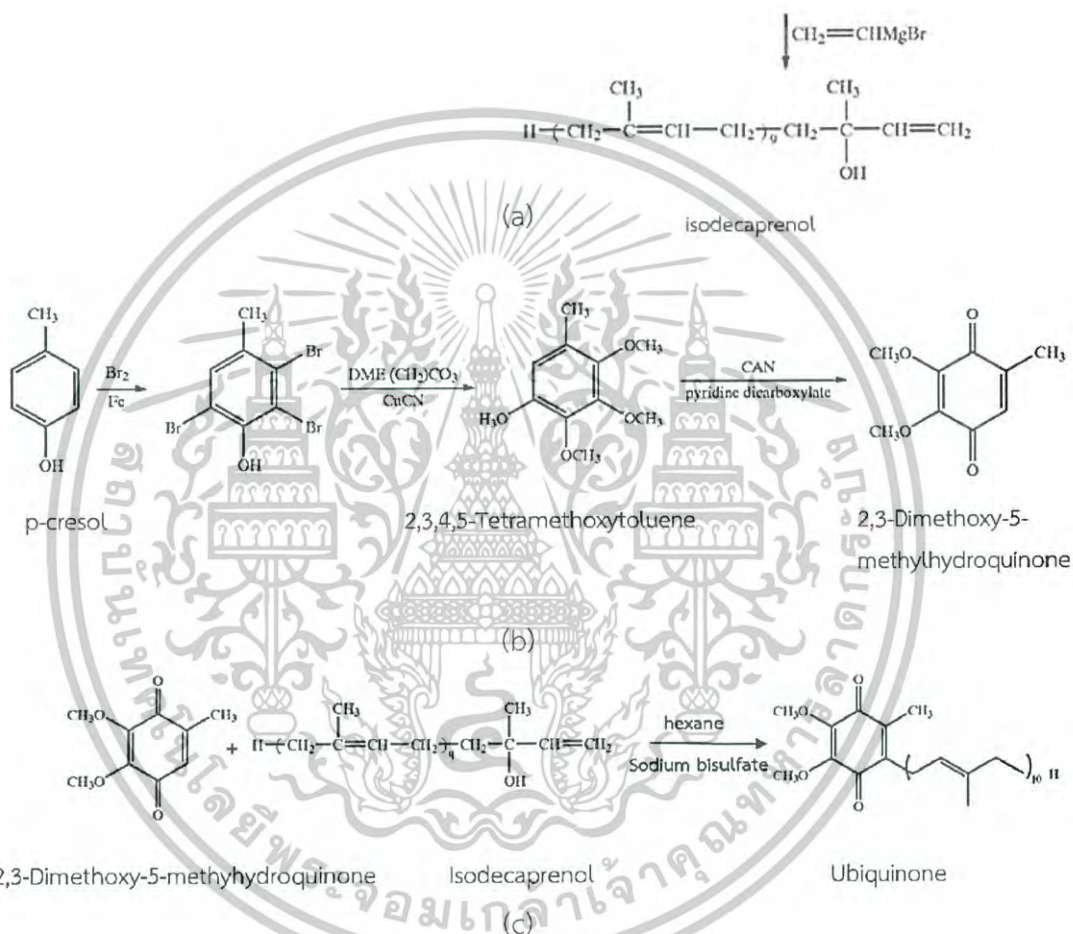
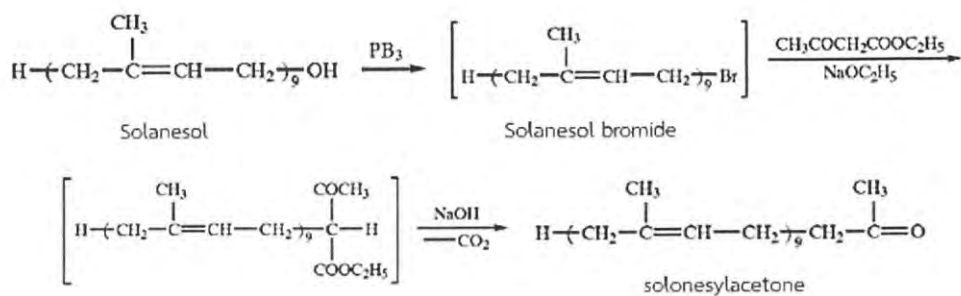
โคเอนไซม์คิวเท็นสามารถผลิตได้ 3 กระบวนการ คือ กระบวนการทางเคมี กึ่งเคมี และชีวภาพ มีกระบวนการดังนี้

### 2.3.1 กระบวนการผลิตทางเคมี และกึ่งเคมี

จากงานวิจัยของ West (2004) กล่าวว่า เมื่อนำ Solanesol (สารประกอบประเภทแอลกอฮอล์) ที่สกัดได้จากใบยาสูบหรือใบมันฝรั่ง มาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น ร่วมกับสารสกัดจากพืชตระกูลมะเขือม่วง เพื่อทำให้เปลี่ยนเป็น Decaprenol (Nine-isoprenoid compound) จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับ Hydroquinone จะได้เป็นโคเอนไซม์คิวเท็น จัดว่าเป็นกระบวนการผลิตทางกึ่งทางเคมี แต่ถ้าใช้ geraniol (สารสกัดจากพืช) เป็นสารตั้งต้นจึงจัดว่าเป็นกระบวนการผลิตทางเคมี

การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นด้วยวิธีกึ่งเคมี ประกอบด้วย 7 ขั้นตอน เริ่มจากขั้นตอนที่ 1 การสกัด solanesol จากใบยาสูบด้วยสารอินทรีย์ ขั้นตอนที่ 2-3 การเปลี่ยน solanesol เป็น solanesylacetone และ Isodecaprenol ตามลำดับ (รูปที่ 2.2a) ขั้นตอนที่ 4-6 การเปลี่ยน p-cresol เป็น 2,3,6-tribromo-4-methylphenol เป็น 2,3,4,5-tetramethoxytoluene และ 2,3-dimethoxy-5-methylhydroquinone ตามลำดับ (รูปที่ 2.2b) และสุดท้ายในขั้นตอนที่ 7 นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ทั้ง isoprenol และ 2,3-dimethoxy-5-methylhydroquinone มาทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์ และทำให้เข้มข้นโดยโครมาโตกราฟีบน silica gel (hexane/ether, 10:1) จะได้สารละลายสีเหลืองของโคเอนไซม์คิวเท็น (รูปที่ 2.2c)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 การเตรียมโคเอนไซม์คิวเท็นด้วยวิธีการกึ่งเคมี

- (a) คือ การเตรียม Isodecaprenol  
 (b) คือ การเตรียม 2,3-Dimethoxy-5-methylhydroquinone  
 (c) คือ การเตรียม Ubiquinone

ที่มา : West (2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.3.2 กระบวนการผลิตทางชีวภาพ

ประกอบด้วย 3 วิธี (รูปที่ 2.3) ดังนี้ (1) Shikimate (2) non-mevalonate (MEP) และ (3) mevalonate (MVA)

#### ก. การสังเคราะห์ *para*-hydroxybenzoate (pHBA)

pHBA เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์วงแหวน quinonoid และเป็นผลิตภัณฑ์ของวิถี Shikimate ใน *Escherichia coli* โดยสาร chorismate จะเปลี่ยนเป็น pHBA โดยการทำงานของเอนไซม์ chorismate pylvate-lyase ซึ่งมีรหัสในยีน *UbiC* (Nichols และ Green, 1992)

#### ข. การสังเคราะห์ Decaprenyl diphosphate

จากรูป 2.3 isoprenoid (IPP) สร้างมาจากสองวิถีที่มีความแตกต่างกันคือ วิถี MVA และวิถี MEP การสังเคราะห์ IPP ผ่านวิถี MVA จะพบในยีสต์, รา และมนุษย์ (Meganathan, 2001; Jeya และคณะ, 2010) ส่วนการสังเคราะห์ IPP ผ่านวิถี MEP จะพบในแบคทีเรียกลุ่มสาหร่ายสีเขียวและแบคทีเรียสังเคราะห์แสง (Caillet และ Droogmans, 1988; Rohmer, 1993; Meganathan, 2001) แต่ *Streptomyces* sp. จะใช้ทั้งสองวิถีในการสังเคราะห์ IPP

วิถี MEP ใช้ pyruvate และ glyceraldehyde-3-phosphate (GA3P) เป็นสารตั้งต้นเพื่อสังเคราะห์ IPP การสังเคราะห์สารนี้ใน *E. coli* เริ่มจากการสังเคราะห์ 1-deoxy-Dxylulose-5-phosphate (DXP) ที่เร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ DXP synthase (DXS) จากนั้น DXP ถูก catalyze ไปเป็น 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP) โดยการทำงานของเอนไซม์ DXP reductoisomerase (DXR) จากนั้น MEP จะถูกเปลี่ยนไปเป็น IPP โดยการทำงานของเอนไซม์ที่มีรหัสในยีน *ispD* (*ygbP*), *ispE* (*ychB*), *ispF* (*ygbB*), *ispF* (*ygbB*), *ispG* (*gcpE*) และ *ispH* (*lytB*) ใน *E. coli* IPP จะถูกเปลี่ยนเป็น Dimethylallyl diphosphate (DMAPP) โดยเอนไซม์ IPP isomerase ที่มีรหัสในยีน *idi* จากนั้น IPP และ DMAPP ถูกเปลี่ยนเป็น farnesyl diphosphate (FPP) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ Decaprenyl-PP

การสังเคราะห์ IPP โดยวิถี MVA เริ่มต้นด้วยการเปลี่ยน 3 โมเลกุลของ acetyl-CoA ให้เป็น mevalonate (MVA) โดยผ่านตัวกลาง acetoacetyl-CoA และ HMG-CoA MVA จะถูกเปลี่ยนเป็น MVA-diphosphate โดยการเติมหมู่ฟอสเฟตและมีเอนไซม์ MVA kinase และ phosphor MVA kinase เร่งปฏิกิริยาตามลำดับ MVA-diphosphate ผ่านปฏิกิริยา dehydration-decarboxylation จนได้ IPP เป็นผลิตภัณฑ์ จากนั้น IPP จะถูกเปลี่ยนเป็น DMAPP โดยเอนไซม์ IPP isomerase

IPP จัดเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญของการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น สารนี้จะถูกเปลี่ยนเป็น FPP โดยการเร่งด้วยเอนไซม์ FPP synthase จากนั้นเอนไซม์ DPS เปลี่ยน FPP ไปเป็น decaprenyl diphosphate (Jeya และคณะ, 2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

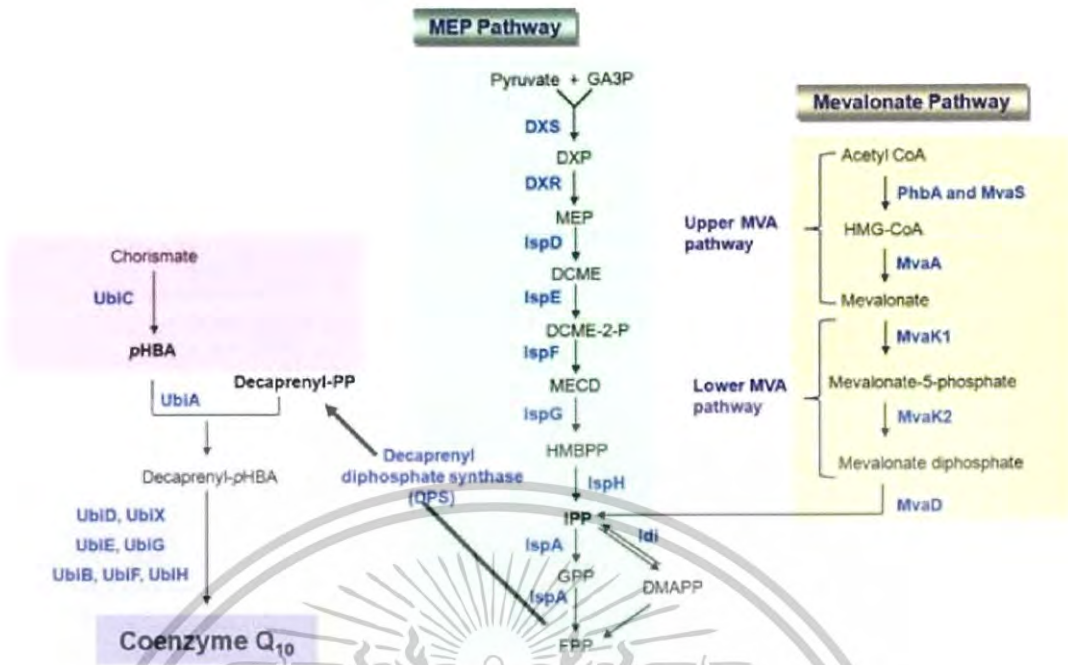
### ค. การดัดแปลงโครงสร้าง Cyclic (Ring modification)

Meganathan (2001) ได้อธิบายกระบวนการดัดแปลงโครงสร้าง Cyclic ในเชื้อ *E. coli* ว่า ปฏิกริยา prenylation เริ่มจาก *p*HBA เปลี่ยนเป็น 3-octaprenyl *p*HBA โดยการทำงานของ เอนไซม์ *p*HBA octaprenyltransferase จากนั้นเอนไซม์จำเพาะจะนำ prenyl diphosphate มาเชื่อม 3-octaprenyl *p*HBA จากนั้นผ่านปฏิกริยา decaprenylation โดย 3-octaprenyl *p*HBA เปลี่ยนไปเป็น 2-octaprenylphenol โดยการทำงานของเอนไซม์ 3-octaprenyl *p*HBA decarboxylase และ 2-octaprenylphenol ผ่านปฏิกริยา hydroxylation 3 ครั้ง สลับกับ ปฏิกริยา methylation 3 ครั้ง จนทำให้ได้โคเอนไซม์คิวเทิน

Meganathan (2011) อธิบายกระบวนการดัดแปลงโครงสร้าง cyclic ในยีสต์ว่า โซ่ยาวของ IPP (hexaprenyl diphosphate) ผ่านการเร่งปฏิกริยาด้วยเอนไซม์ prenyl transferase ทำให้ hexaprenyl diphosphate มาเชื่อมกับ *p*HBA ได้เป็น 3-hexaprenyl *p*HBA จากนั้นผ่านปฏิกริยา ดัดแปลงโครงสร้าง cyclic ซึ่งมีลำดับที่แตกต่างกันใน *E. coli* โดย 3-hexaprenyl *p*HBA ผ่าน ปฏิกริยา hydroxylation, methylation และ decarboxylation ตามลำดับ จนได้ 2-polyprenyl-6-methoxyphenol และเอนไซม์ O-methylase เปลี่ยนเป็น 2-polyprenyl-3-methyl-5-hydroxy-6-methoxy-1,4-benzoquinol ไปเป็นโคเอนไซม์คิวเทิน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 กระบวนการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นทางชีวภาพ

- เมื่อ
- DXS = 1-deoxy-xylulose-5-phosphate synthase
  - MEP = 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate
  - DCME = 4-diphosphocycidyl-2-C-methyl-Derythritol-2-phosphate
  - MECD = 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate
  - HMBPP = 4-hydroxy-3-methyl-but-2-enylpyrophosphate
  - PP = Isoprenyldiphosphate
  - FPP = farnesyl diphosphate
  - GAP = D-glyceraldehyde-3-phosphate
  - DMAPP = dimethylallyldiphosphate
  - Decaprenyl-PP = decaprenyldiphosphate
  - pHBA = para-hydroxybenzoic acid

ที่มา : Jeya และคณะ (2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.4 การผลิตโคเอนไซม์คิวเทินจากแบคทีเรีย

การผลิตโคเอนไซม์คิวเทินจากแบคทีเรียเป็นการผลิตทางชีวภาพซึ่งมีข้อได้เปรียบกว่าการผลิตด้วยวิธีการทางเคมีและกึ่งเคมี เนื่องจากสามารถใช้วัตถุดิบได้หลากหลายชนิดและเลือกใช้วัตถุดิบราคาถูกลงได้ แบคทีเรียที่นำมาใช้ผลิตโคเอนไซม์คิวเทินมีหลากหลายสายพันธุ์ดังแสดงในตารางที่ 2.1 โดยสายพันธุ์ที่มีรายงานว่าผลิตโคเอนไซม์คิวเทินได้ปริมาณสูง ได้แก่ *Agrobacterium tumefaciens*, *Paracoccus denitrificans*, *Rhodobacter sphaeroides*, และ *Rhodospirillum rubrum* ซึ่งให้ผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทินตั้งแต่ 30-130 มิลลิกรัมต่อลิตร (Yoshida และคณะ, 1998; Cluis และคณะ, 2007) แต่ในการผลิตทางอุตสาหกรรมต้องการผลผลิตที่สูงกว่า 500 มิลลิกรัมต่อลิตร (Cluis และคณะ, 2007) ดังนั้นจึงมีการนำเทคนิคต่าง ๆ มาใช้เพื่อทำให้ผลผลิตสูงขึ้น เช่น การปรับสภาวะการเพาะเลี้ยง การกลายพันธุ์จุลินทรีย์ และการสร้างจุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรม เป็นต้น (Yoshida และคณะ, 1998; Lee และคณะ, 2004; Park และคณะ, 2005; Sasaki และคณะ, 2005; Cluis และคณะ, 2007; Choi และคณะ, 2009; Seo และ Kim, 2010)

ตารางที่ 2.1 แสดงผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทินจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่าง ๆ

Source	CoQ10 level (mg/l)	Specific CoQ10 content (mg/g DCW)	Type of strain	Reference
<i>Pseudomonas</i> N84	2.02	1.2	Wild type	Jeya et al. (2010)
<i>Protaminobacter ruber</i>	2.84	1.52	Wild type	Jeya et al. (2010)
<i>Rhodospirillum rubrum</i> ATCC 25852	20.16	—	Wild type	Tian et al. (2010)
<i>Escherichia coli</i> BL21/pACDdsA	25.5	0.29	Recombinant strain	Choi et al. (2005)
<i>Paracoccus denitrificans</i> ATCC 19367	27.6	0.86	Wild type	Choi et al. (2005)
<i>Pseudomonas diminuta</i> NCIM 2865	29.22	—	Wild type	Bule and Singhal (2009)
<i>Spingomonas</i> sp. ZUTE03	441.65	—	Wild type	Qiu et al. (2012)
<i>A. tumefaciens</i> KY-8593	75.0	1.2	Wild type	Cluis et al. (2007)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ATTC4452	87.6	1.9	Wild type	Jeya et al. (2010)
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> FERM-P4675	97.2	2.7	Wild type	Choi et al. (2005)
<i>A. tumefaciens</i> AU-55	110.0	9.6	Chemical mutants	Choi et al. (2005)
<i>Agrobacterium</i> sp.	180	1.96	Chemical mutants	Jeya et al. (2010)
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	350	8.7	Chemical mutants	Jeya et al. (2010)
<i>R. sphaeroides</i> Co-22 - 11 car-	346.8	2.6	—	Cluis et al. (2007)
<i>R. sphaeroides</i> Co-22-11	347.0	2.5	Chemical mutants	Choi et al. (2005)
<i>A. tumefaciens</i> KCCM 10413	458.0	8.54	Chemical mutants	Cluis et al. (2007)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> KCCM 10413	638	9.71	Chemical mutants	Jeya et al. (2010)
<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i> KY8598	770.0	8.7	Chemical mutants	Choi et al. (2005)

ที่มา : Ndikubwimana และ Lee (2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.4.1 การผลิตโคเอนไซม์คิวเทินจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วง

ในสถานะที่มีออกซิเจน-ไม่มีแสง (dark aerobe) แบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rhodobacter sphaeroides* จะใช้การหายใจแบบใช้ออกซิเจน (aerobic respiration) ในการสร้างพลังงาน โดยที่เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในจะมีกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน และการสังเคราะห์ ATP เกิดขึ้น สำหรับสถานะที่ไม่มีออกซิเจน-มีแสง (light anaerobe) *R. sphaeroides* จะสร้างพลังงานจากกระบวนการสังเคราะห์แสง แต่ในบริเวณที่ไม่มีแสง *R. sphaeroides* จะสร้างพลังงานจากการถ่ายทอดอิเล็กตรอนโดยจะสิ้นสุดกระบวนการที่เอนไซม์ dimethyl sulfoxide reductase (DMSO) หรือ trimethylamine N-oxide reductase (TMAO) (Aussel และคณะ, 2014)

*R. sphaeroides* ใช้ bacteriochlorophyll ในการ metabolism แบบไม่ใช้ออกซิเจน โดยเซลล์จะสร้างออร์แกเนลล์ที่เรียกว่า ไซโตพลาสติกเมมเบรน (intracytoplasmic membrane) เกิดจากเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในมีลักษณะเว้าเข้าไปใน cytosol ซึ่งไซโตพลาสติกเมมเบรนเป็นที่อยู่ของสารประกอบโปรตีนที่เป็นรงควัตถุ (pigment protein complex) 3 ชนิดที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง ได้แก่ (1) RC (reaction center) (2) LH-I (Light Harvesting complex I) และล้อมรอบด้วย (3) LH-II (Light Harvesting complex II) (Woronowicz และคณะ, 2011)

*R. sphaeroides* สามารถสังเคราะห์ metallo-tetrapyrroles ได้แก่ แบคทีอริโอคลอโรฟิลล์, ฮีม และแคโรทีนอยด์ได้ (Fales และคณะ, 2001) สำหรับการเจริญของ *R. sphaeroides* จำเป็นต้องใช้ ATP ที่ได้มาจากการถ่ายทอดอิเล็กตรอน ซึ่งมีหลายรูปแบบ และเกิดขึ้นพร้อมกันขึ้นอยู่กับสภาวะการเจริญของเชื้อ รูปแบบหลักของการสร้าง ATP ได้จาก 1) การถ่ายทอดอิเล็กตรอนในการหายใจระดับเซลล์ และ 2) กระบวนการสังเคราะห์แสง

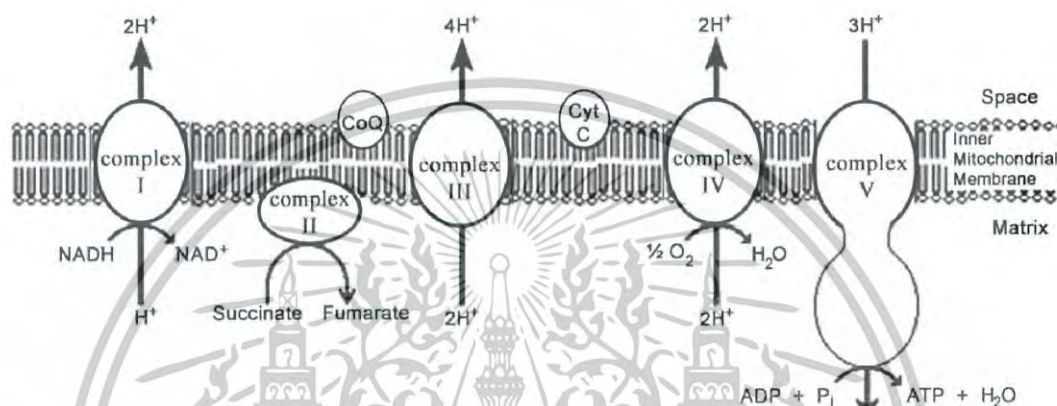
#### 1.) การถ่ายทอดอิเล็กตรอนในการหายใจระดับเซลล์

เมื่อเชื้อเจริญในสถานะที่มีแหล่งอาหารและออกซิเจนที่เหมาะสม ตัวอย่างเช่น เมื่อน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่เซลล์ *R. sphaeroides* จะถูกออกซิไดซ์ภายในไซโทซอลจากขั้นตอนไกลโคไลซิส และวัฏจักรเครบส์ แล้วปลดปล่อยพลังงานออกมาในรูปโมเลกุลรีดิวซ์  $\text{NADH}+\text{H}^+$  จากนั้นโมเลกุล  $\text{NADH}+\text{H}^+$  จะเคลื่อนที่ไปสู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน ซึ่งมีกลุ่มโปรตีนสำหรับรับกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนอยู่ ซึ่งโปรตีนตัวแรกจะดึงอิเล็กตรอนออกจากโมเลกุล  $\text{NADH}+\text{H}^+$  เข้าสู่กระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนเพื่อสร้าง ATP

ทุกกลุ่มโปรตีนที่แทรกอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในที่ทำหน้าที่เป็นตัวพาอิเล็กตรอนไม่ว่าจะเป็น complex I หรือ II หรือ III หรือ IV ประกอบด้วยเอนไซม์ยึดเกาะกับหมู่ Prosthetic group ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาระหว่างการถ่ายทอดอิเล็กตรอน โดยระหว่างที่มีการรับส่งอิเล็กตรอน หมู่ Prosthetic group จะมีการเปลี่ยนสภาพระหว่างรีดิวซ์และออกซิไดซ์ ยกตัวอย่างเช่น FMN (flavin mononucleotide) ใน complex I ทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ของ NADH dehydrogenase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากกลุ่มโปรตีน complex I, II, III และ IV ซึ่งแทรกตัวอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน ยังมีองค์ประกอบอีก 2 ตัว ที่อยู่บนเยื่อหุ้มชั้นในแต่สามารถเคลื่อนที่ไปมาได้ คือ โคเอนไซม์คิวเทิน ทำหน้าที่รับอิเล็กตรอนจาก  $\text{NADH} + \text{H}^+$  ผ่านทาง complex I หรือรับอิเล็กตรอนจาก  $\text{FADH}_2$  ผ่านทาง complex II เพื่อส่งให้ complex III ต่อไป สำหรับไซโตโครม C (Cytochrome C) ซึ่งโปรตีนที่มีฮีม (heme) เปรียบเหมือนกับฮีโมโกลบินที่เป็นโปรตีนในเม็ดเลือดแดง แต่ไซโตโครมนี้จะทำหน้าที่รับอิเล็กตรอนจาก complex III เพื่อส่งให้ IV ที่มีชื่อว่า cytochrome oxidase ซึ่งเป็นองค์ประกอบตัวสุดท้ายของระบบถ่ายเทอิเล็กตรอน ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจน



รูปที่ 2.4 การถ่ายเทอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจระดับเซลล์

ที่มา : Bouitbir และคณะ (2019)

## 2.) กระบวนการสังเคราะห์แสง

องค์ประกอบในการสังเคราะห์แสงของ *R. sphaeroides* ส่วนใหญ่อยู่ที่ไซโตพลาสติกเมมเบรน ซึ่งบริเวณที่เกิดการสังเคราะห์แสงในสภาวะที่มีออกซิเจน-ไม่มีแสง (Aagaard และ Siström, 1972) ประกอบด้วยกลุ่มโปรตีนรงควัตถุ 3 ชนิด ได้แก่ Reaction Center, Light-Harvesting (Complex I, Complex II) และไซโตโครม  $bc_1$  (cyt  $bc_1$ ) ที่แทรกตัวอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ Light-Harvesting Complex I และ II ทั้งสองชนิดมีหน้าที่เก็บรวบรวมแสงที่ตกกระทบลงมา ซึ่งปริมาณของ Light-Harvesting Complex II จะเปลี่ยนแปลงตามปัจจัยต่าง ๆ เช่น ความเข้มแสง ปริมาณออกซิเจน เป็นต้น ในขณะที่ Light-Harvesting Complex I จะแปรผันตามปริมาณ Reaction Center เรียกได้ว่าเป็นการสังเคราะห์ของสารประกอบ RC-LH I (Reaction Center - Light-Harvesting Complex I) (Drews และ Golecki, 1995) ปริมาณ Pigment ที่พบใน Reaction Center จะเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนกับปริมาณแสงที่จับได้ (พบ bacteriochlorophyll สูงสุดถึง 100% ของ RC)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงเพื่อการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น

### 2.5.1 แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน

Koo และคณะ (2010) ได้ศึกษาอิทธิพลของชนิดแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นในสายพันธุ์กลายของ *Rhodobacter radiobacter* พบว่า ซูโครส, กลูโคส และฟรักโทส มีผลทำให้ปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็นสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับไซโลส, แล็กโตส และกาแล็กโตส ซึ่งขัดแย้งกับรายงานอื่นที่กล่าวว่าแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อปริมาณการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น (Ha และคณะ, 2007a)

ส่วนแหล่งไนโตรเจน มีรายงานว่าการใช้ corn steep powder และ soytone ให้ปริมาณการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นจำเพาะสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ เช่น yeast extract, beef extract และ Tryptone (Ha และคณะ 2007b; Koo และคณะ, 2010) ทั้งนี้มีประเด็นที่น่าสนใจว่าทั้งแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน มีความสัมพันธ์กันในเชิงบวกอัตราส่วนของ NADH/NAD<sup>+</sup> ซึ่งส่งผลต่อปริมาณการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น (Koo และคณะ, 2010)

### 2.5.2 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ

แม้ว่ายังมีความขัดแย้งกันอยู่ในประเด็นนี้ (Wu และ Tsai, 2013) แต่ก็พบว่ามีรายงานการศึกษาหลายฉบับแสดงให้เห็นว่า การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นภายใต้สภาวะที่มีอากาศน้อยทั้งใน *Rhodobacter radiobacter* และ *Rhodobacter sphaeroides* (Choi และคณะ, 2005a; Ha และคณะ, 2007b; Yen และ Chiu, 2007; Yen และ Shin, 2009; Seo และ Kim, 2010) ยกตัวอย่างเช่น ผลผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นสายพันธุ์ *Rhodobacter radiobacter* เพิ่มขึ้นถึง 4 เท่า เมื่อลดปริมาณออกซิเจนละลายลงจาก 20 เปอร์เซ็นต์ เหลือเพียง 5 เปอร์เซ็นต์ (Choi และคณะ, 2005a)

### 2.5.3 การเพิ่มปริมาณแคลเซียมในอาหารเลี้ยงเชื้อ

การปรับปรุงการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นจาก *Rhodobacter radiobacter* โดยการเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียม เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เซลล์เกิดสภาวะเครียดออกซิเดชัน, เกิดปฏิกิริยา peroxidation ของไขมัน และทำให้เกิดการสร้างสารอนุมูลอิสระชนิด reactive oxygen species ยกตัวอย่างเช่น peroxides, superoxide, hydroxyl radical, singlet oxygen และ alpha-oxygen (Ha และคณะ, 2009) เนื่องจากโคเอนไซม์คิวเท็นมีคุณสมบัติเป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระ จึงอาจเป็นไปได้ว่า การเพิ่มขึ้นของผลผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นเป็นการตอบสนองตามธรรมชาติที่มีต่อความเครียดออกซิเดชัน โดยมีรายงานที่สนับสนุนสมมติฐานนี้ว่าการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงในอาหารที่เพาะเลี้ยง *Rhodobacter radiobacter* เพื่อให้เซลล์เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน ส่งผลให้การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นเพิ่มขึ้น (Seo และ Kim, 2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 2.5.4 กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง

*Rhodobacter sphaeroides* สามารถใช้โคเอนไซม์คิวเท็นขนส่งอิเล็กตรอนจาก RC ไปสู่ Cytochrome  $bc_1$  complex ภายใน bacteriochlorophyll โดยมีการรายงานว่า การเจริญของ *Rhodobacter sphaeroides* ภายใต้สภาวะ anaerobic-light ส่งผลให้เซลล์เติบโตช้า ทำให้มีอัตราการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นต่ำ ดังนั้นจึงไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้แข่งขันในอุตสาหกรรม จากรายงานนี้ จึงแนะนำให้เพาะเลี้ยงในสภาวะ anaerobic-dark ที่มีการควบคุมออกซิเจนละลาย 0 เปอร์เซ็นต์ (Yen และ Chiu, 2007)

#### 2.5.5 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

Jeong และคณะ (2008) ได้ศึกษาผลของค่าพีเอชต่อการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น โดยการเพาะเลี้ยง *Rhodobacter sphaeroides* พบว่าเมื่อไม่ควบคุมค่าพีเอช ได้ผลผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นสูงสุด 1.69 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง แต่เมื่อควบคุมค่าพีเอชให้เท่ากับ 7 พบว่าได้ปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็นสูงขึ้น

### 2.6 การประยุกต์ใช้โคเอนไซม์คิวเท็นในทางการแพทย์

เนื่องจากโคเอนไซม์คิวเท็น มีหน้าที่สำคัญในกระบวนการสร้างพลังงานให้แก่ร่างกาย ดังนั้นเมื่อระดับโคเอนไซม์คิวเท็นมีการเปลี่ยนแปลงไปก็จะส่งผลกระทบต่อระบบต่าง ๆ ของร่างกาย ในปัจจุบันพบว่า โคเอนไซม์คิวเท็นมีประโยชน์อย่างมากทั้งในเรื่องของการเป็นสารที่ช่วยต่อต้านสารอนุมูลอิสระ และช่วยป้องกันและรักษาโรคต่าง ๆ ดังนี้

#### 2.6.1 ระบบโรคหัวใจและหลอดเลือด (Cardiovascular disease)

โดยปกติร่างกายจะสามารถสร้างโคเอนไซม์คิวเท็นขึ้นได้เอง แต่ปริมาณจะลดลงเมื่ออายุเพิ่มมากขึ้น หัวใจเป็นอวัยวะที่ต้องการ และมีการใช้พลังงานสูงมาก จึงเป็นอวัยวะที่มีกระบวนการ metabolism สูงมากการขาดโคเอนไซม์คิวเท็น ซึ่งเป็นสารสำคัญในการสร้างพลังงาน จึงมีผลกระทบต่อหัวใจ และพบว่านำไปสู่สภาวะหัวใจล้มเหลว จากการศึกษาองค์ประกอบในเนื้อเยื่อหัวใจของผู้ป่วยโรคหัวใจ พบว่า 50-70% ของผู้ป่วยนั้นมีภาวะขาดโคเอนไซม์คิวเท็น ในคนไข้โรคหัวใจส่วนมากจะพบการเสื่อมของกล้ามเนื้อหัวใจอยู่ด้วย ทั้งนี้เป็นผลมาจากการได้รับเลือดที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนต่ำไปเลี้ยงหรือมีการอักเสบของกล้ามเนื้อหัวใจ โคเอนไซม์คิวเท็นจึงเป็นตัวป้องกันและรักษาการเสื่อมดังกล่าวด้วยการให้สารอาหารที่จำเป็นในระดับเซลล์

จากการศึกษาคนไข้โรคหัวใจ 424 คน ในระหว่างปี 1985-1993 โดยการให้รับประทานโคเอนไซม์คิวเท็น พบว่ากว่า 87% คนไข้มีอาการดีขึ้น (Kumar และคณะ, 2009)

#### 2.6.2 ภาวะหัวใจล้มเหลวเนื่องจากเลือดไปเลี้ยงหัวใจไม่เพียงพอ (Congestive Heart Failure: CH)

คือ สภาวะที่หัวใจไม่สามารถสูบฉีดเลือดได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งมักเกิดจากภาวะแทรกซ้อนจากความดันโลหิตสูง ความผิดปกติของลิ้นหัวใจ หรือกล้ามเนื้อหัวใจโต โดยเป็นผลเอกสารนี้เป็นเอกสารที่ส่งวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มาจากกล้ามเนื้อหัวใจอ่อนแรงซึ่งวัดจากระดับของพลังงาน (ATP) และโคเอนไซม์คิวเท็น (Morisco และคณะ, 1993)

### 2.6.3 ความดันโลหิตสูง (hypertension)

พบว่าคนที่มีภาวะความดันโลหิตสูงจะมีระดับโคเอนไซม์คิวเท็นต่ำ การรับประทานโคเอนไซม์คิวเท็นไม่ได้ช่วยเฉพาะผู้ที่ขาดเท่านั้น แต่ยังช่วยในกระบวนการ metabolism ที่ผิดปกติ การรับประทานโคเอนไซม์คิวเท็นช่วยลดการทำลายผนังหลอดเลือดจากอนุมูลอิสระช่วยลดแรงต้านทานของผนังหลอดเลือด ทำให้ประสิทธิภาพในการสูบฉีดเลือดของหัวใจดีขึ้น ลดระดับความดันโลหิตลงได้ (Kumar และคณะ, 2009)

### 2.6.4 กล้ามเนื้อหัวใจอ่อนแรง และหัวใจโต (cardiomyopathy)

คือ สภาวะที่กล้ามเนื้อหัวใจขาดประสิทธิภาพในการบีบตัวสูบฉีดเลือด ซึ่งผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้นี้ มักจะพบว่า การขาดโคเอนไซม์คิวเท็นส่งผลให้ไมโทคอนเดรียไม่สามารถสร้างพลังงาน (ATP) ได้อย่างสมบูรณ์ กล้ามเนื้อหัวใจจึงไม่มีพลังงานในการหดหรือคลายตัวได้อย่างปกติ

### 2.6.5 มะเร็ง (cancer)

จากความสามารถในการเพิ่มภูมิคุ้มกันและกำจัดอนุมูลอิสระโคเอนไซม์คิวเท็น จึงถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง โดยเฉพาะในการใช้ร่วมกับผู้ป่วยที่รักษาด้วยยาเคมีบำบัด (chemotherapy) ซึ่งการรักษาด้วยวิธีดังกล่าวพบว่ายาเคมีบำบัดหลายชนิดเกิดพิษ หรือมีผลกระทบต่อหัวใจ การให้โคเอนไซม์คิวเท็นจะช่วยป้องกันอันตรายที่จะเกิดกับหัวใจจากการรักษาได้

### 2.6.6 โรคเกี่ยวกับเหงือก

เหงือกทำหน้าที่ในการยึดและพยุงฟันให้คงอยู่ในช่องปาก โรคเหงือกที่เป็นปัญหาและพบได้บ่อยเกิดจากคราบจุลินทรีย์ที่ถูกปล่อยให้สะสมอยู่บนตัวฟัน ซึ่งจะกระตุ้นให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อต่าง ๆ จากการวิจัยพบว่า การรับโคเอนไซม์คิวเท็นเข้าไปในร่างกาย จะช่วยลดและบรรเทาอาการเหงือกบวมรวมถึงอาการฟันโยก (periodontitis) ได้

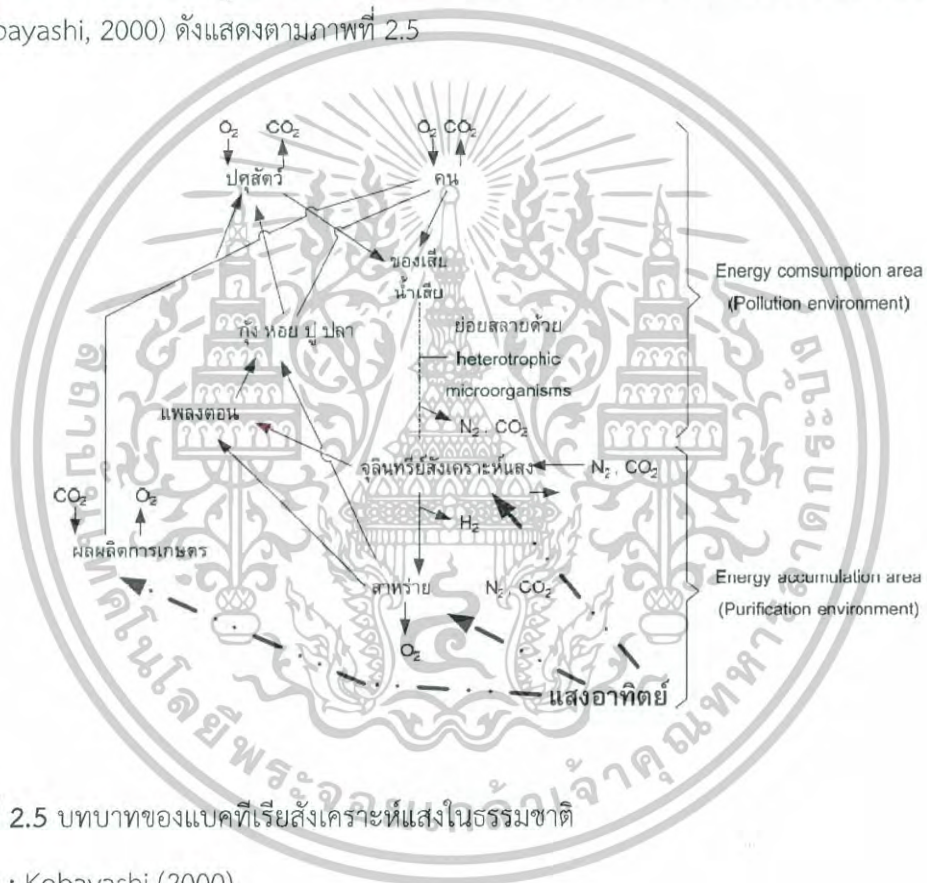
### 2.6.7 การบำรุงผิวหนัง

ผิวหนังเป็นบริเวณที่ได้รับผลกระทบจากรังสีอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet: UV) จากการสัมผัสกับแสงแดดโดยตรง โดยรังสีดังกล่าวสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระในชั้นผิวหนัง ก่อให้เกิดการตายของเซลล์ผิวหนัง ดังนั้นโคเอนไซม์คิวเท็นจึงใช้คุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระป้องกันความเสียหายที่อาจจะเกิดขึ้นกับระบบผิวหนังจากการสัมผัสกับรังสีอัลตราไวโอเล็ตได้ (Beal, 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.7 แบคทีเรียสังเคราะห์แสง

แบคทีเรียสังเคราะห์แสง (photosynthetic bacteria; PSB) พบกระจายทั่วไปในธรรมชาติ ตามแหล่งน้ำจืด น้ำเค็ม ทะเลสาบน้ำเค็ม น้ำทะเลสาบที่มีความเป็นด่าง น้ำที่มีความเป็นกรด น้ำพุร้อน น้ำทะเลบริเวณขั้วโลกเหนือ นอกจากนี้ยังพบตามแหล่งน้ำเสีย บ่อบำบัดน้ำเสีย (levett, 1990; Imhoff และ Truper, 1989; Brock และ Madigant, 1991) บทบาทของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงมีความสำคัญในกระบวนการนำก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไปใช้ ( $\text{CO}_2$  - assimilation) และการตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixation) นอกจากนี้ยังมีบทบาทสำคัญในห่วงโซ่อาหารซึ่งสัตว์ขนาดเล็ก ปลา กุ้ง หอย และปู สามารถนำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงมาใช้เป็นอาหารได้นอกจากนี้ในน้ำเสียจากบ้านเรือนและน้ำเสียจากการทำปศุสัตว์สามารถบำบัดด้วยแบคทีเรียสังเคราะห์แสงได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Kobayashi, 2000) ดังแสดงตามภาพที่ 2.5



รูปที่ 2.5 บทบาทของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในธรรมชาติ

ที่มา : Kobayashi (2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.7.1 การจัดจำแนก (Classification)

โดยทั่วไปจะแบ่งแบคทีเรียสังเคราะห์แสงออกเป็น 2 กลุ่ม คือ แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วง (purple photosynthetic bacteria) และแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีเขียว (green photosynthetic bacteria) (Pfenning และ Truper, 1989; Kobayashi, 2000) ดังแสดงตามตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 การจัดจำแนกวงศ์,สกุล,สายพันธุ์ของ Phototrophic Bacteria มีดังนี้

ชั้น (Order)	วงศ์ (family)	สกุล (Genus)	สายพันธุ์ (species)		
Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	<i>Rhodospirillum</i>	<i>Rubrum, tenue, fulvum, inolischianum, photonietricum</i>		
		<i>Rhodopseudomonas</i>	<i>Palustris, viridis, acidophila, gelatinosa, capsulata, sphaeroides</i>		
		<i>Rhodomicrobium</i>	<i>vanniellii</i>		
		<i>Chromatium</i>	<i>Okenii, weissel, warmingii, buderi, minus, violascens, vinosum, gracillimum, minutissimum</i>		
		<i>Thiocystis</i>	<i>violace, gelatmosa</i>		
		<i>Thiosarcina</i>	<i>rosea</i>		
		<i>Thiospirillum</i>	<i>sanguineu, jenens, rosenbergii</i>		
		<i>Thiocapsa</i>	<i>roseopersicin, pfennigii</i>		
		<i>Lamprocystis</i>	<i>roseopersicina</i>		
		<i>Thiodictyon</i>	<i>elegans, bacillosum</i>		
		<i>Thionedia</i>	<i>rosea</i>		
		<i>Amoebobacter</i>	<i>roseus, pendens</i>		
		Chlorobiales	Chlorobiaceae	<i>Ectothiorhodospira</i>	<i>mobilis, shaposhnikovii, halophila</i>
				<i>Chlorobium</i>	<i>limicola, vibrioforme, phaeobacteroides, phaeovibrioides</i>
				<i>Prosthecochloris</i>	<i>aestuarii</i>
<i>Chloropseudomonas</i>	<i>ethylica</i>				
<i>Pelodictyon</i>	<i>ciathraiforme, luteolum</i>				
<i>Clathrochloris</i>	<i>sulphurica</i>				

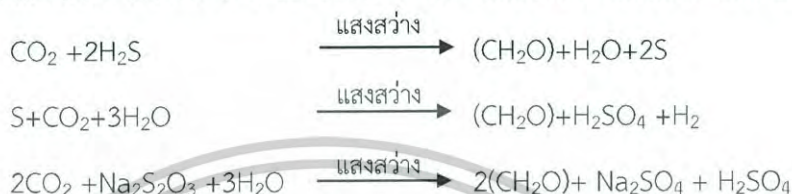
ที่มา : ดัดแปลงจาก Kobayashi (2000); Levett (1990); Imhoff และ Truper (1989); Pfenning และ Truper (1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.7.1.1 แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วง (purple photosynthetic bacteria)

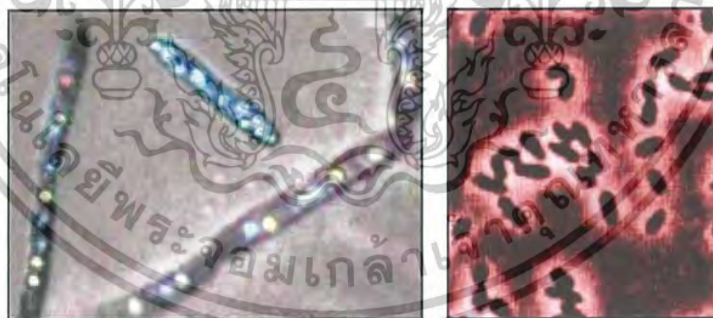
ก. แบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่มสะสมกำมะถัน (Purple Sulfur bacteria)

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงในวงศ์ *Chromatiaceae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วง (รูปที่ 2.6a) พบว่า สามารถเจริญได้ดีในสภาพโฟโตออโตโทรฟ (photoautotroph) ซึ่งสามารถใช้สารประกอบซัลเฟอร์ ซัลไฟต์ และไทโอซัลเฟตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนเพื่อรีดิวซ์ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไปเป็นสารอาหารภายในเซลล์ได้ (Imhoff และ Truper, 1989; Van Niel, 1944) แสดงสมการดังนี้ และแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในวงศ์ *Chromatiaceae* จะสะสมกำมะถันไว้ในเซลล์



ข. แบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน (Purple non-sulfur bacteria)

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงในวงศ์ *Rhodospirillaceae* (รูปที่ 2.6B) เป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่ไม่สามารถใช้ซัลไฟต์เป็นตัวให้อิเล็กตรอนเพื่อรีดิวซ์ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไปเป็นสารอาหารภายในเซลล์ได้ และมีการ metabolism ตีกว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่มสีม่วงที่ใช้ซัลเฟอร์ เนื่องจากสามารถเจริญได้ทั้งแบบโฟโตเฮเทอโรโทรฟ และโฟโตออโตโทรฟ โดยใช้ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เป็นตัวให้อิเล็กตรอน ซึ่งส่วนใหญ่แบคทีเรียกลุ่มนี้จะทนต่อสภาพที่มีออกซิเจน จึงสามารถเจริญได้ภายใต้สภาวะที่มีอากาศแต่ไม่มีแสง มีแบคทีเรียโอบิโกลีฟัล เอ และแคโรทีนอยด์หลายชนิดในการสังเคราะห์แสง



(a)

(b)

รูปที่ 2.6 (a) คือ แบคทีเรียสังเคราะห์แสงในวงศ์ *Chromatiaceae* และ

(b) คือ แบคทีเรียสังเคราะห์แสงในวงศ์ *Rhodospirillaceae*

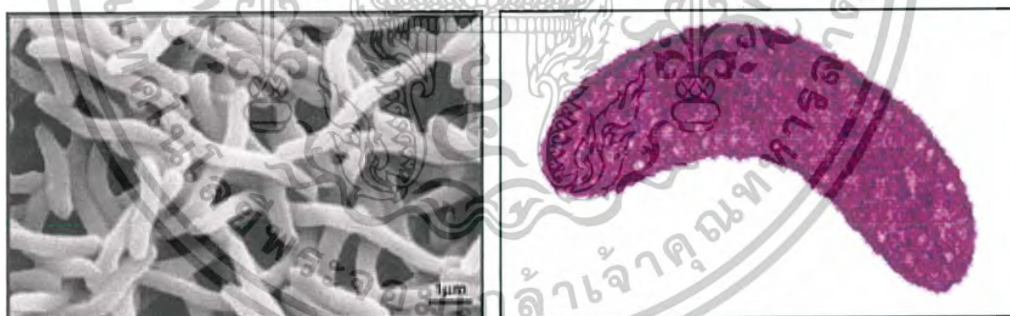
ที่มา : Van Niel (1994) ; Imhoff และ Truper (1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

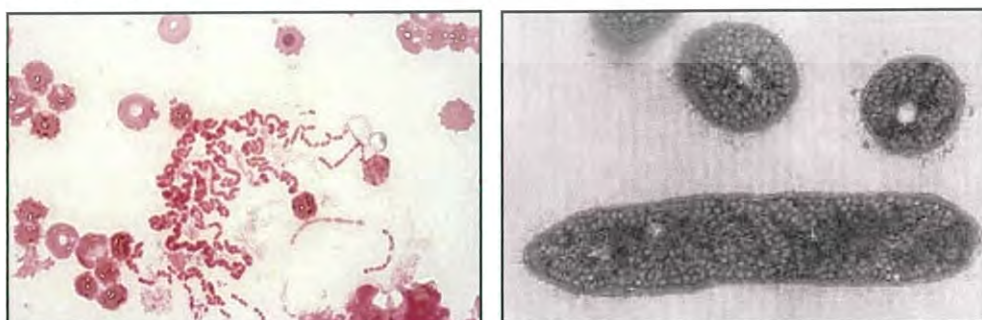
Bergey's Manual of Determinative Bacteriology เล่ม 9 ได้จัดจำแนกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วง กลุ่มไม่สะสมกำมะถันไว้ในกลุ่มที่ 10 (anoxygenic phototrophic bacteria) กลุ่มย่อย (Subgroup) ที่ 3 แบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่มไม่สะสมกำมะถันมี 6 สกุล ดังนี้ (Singh และคณะ, 1998) (รูปที่ 2.7)

1. *Rhodospirillum*
2. *Rhodopila*
3. *Rhodobacter*
4. *Rhodopseudomonas*
5. *Rhodomicrobium*
6. *Rhodocyclus*

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน พบได้ทั่วไปตามแหล่งน้ำธรรมชาติในชั้นน้ำที่มีแสงสว่างส่องถึงมีสารอินทรีย์ และพบการรวมตัวกันเป็นกลุ่มในแหล่งน้ำที่ไม่มีออกซิเจนมีแสงเล็กน้อย ในแหล่งน้ำจืดที่มีซัลไฟด์อยู่จะพบน้อยมาก แต่บางชนิดก็อาศัยอยู่ได้ในที่มีปริมาณซัลไฟด์อยู่สูง (Imhoff และ Truper, 1989) นอกจากนี้ยังพบได้ในพื้นดิน สระน้ำ คลอง หรือแหล่งน้ำที่สกปรก เช่น บ่อบำบัดน้ำเสีย ซึ่งมีปริมาณสารอินทรีย์สูง จึงเป็นแหล่งที่แบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่มดังกล่าวเจริญได้ดี โดยทั่วไปจะพบการเจริญอย่างรวดเร็วของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน (Pfenning และ Truper, 1989; Olliver, 1994)

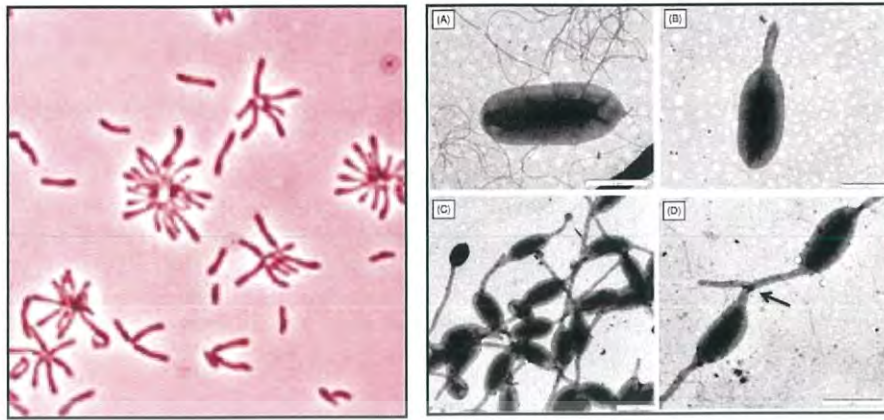


*Rhodospirillum*



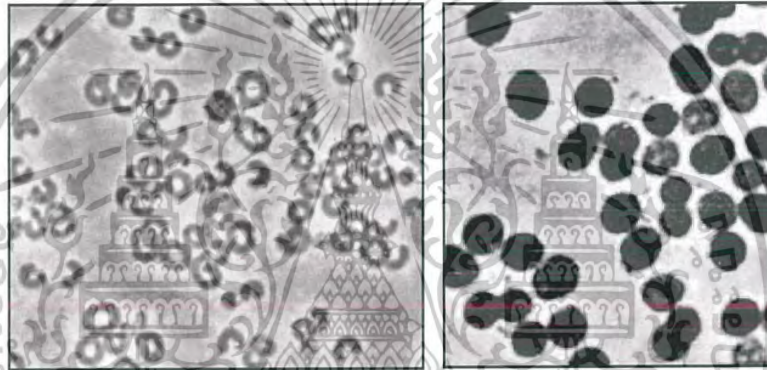
*Rhodobacter*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



*Rhodospirillum rubrum*

*Rhodospirillum rubrum*



*Rhodospirillum rubrum*

*Rhodospirillum rubrum*

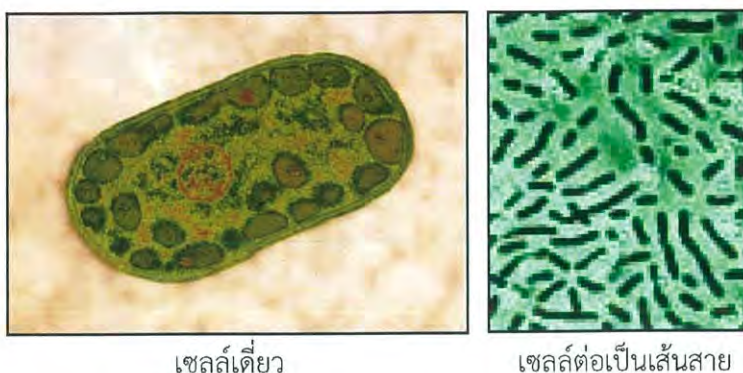
รูปที่ 2.7 แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมก้ำมะถัน

ที่มา : พลสัมพันธ์ (2555)

### 2.7.1.2 แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีเขียว (green photosynthetic bacteria)

แบคทีเรียกลุ่มนี้จะอยู่ในวงศ์ *Chlorobiaceae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีเขียว มีลักษณะเซลล์เป็นแบบเส้นสาย ไม่มีระบบอินทราไซโทพลาสติกเมมเบรน (intracytoplasmic membrane system) มีโครงสร้างพิเศษ คือ คลอโรเปียม (chlorobium vesicle) หรือ คลอโรโซม (chlorosome) จะพบอยู่ภายในไซโทพลาสติกหรือ ติดอยู่ที่ผิวของไซโทพลาสติกเมมเบรน คลอโรโซมมีขนาดใหญ่ประกอบด้วย แบคทีเรียโอคลอโรฟิลล์ ซี ดี และ อี และมีโครงสร้างในการจับพลังงานแสง (light-harvesting) ศูนย์กลางของปฏิกิริยาของแบคทีเรียกลุ่มนี้จะพบอยู่ในไซโทพลาสติกเมมเบรนอยู่ติดกับคลอโรโซม (Imhoff และ Truper, 1989) และไม่สะสมก้ำมะถันไว้ในเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เซลล์เดี่ยว

เซลล์ต่อเป็นเส้นสาย

รูปที่ 2.8 แบคทีเรียสังเคราะห์แสงในวงศ์ *Chlorobiaceae*

ที่มา : Imhoff และ Truper (1989)

### 2.7.2 การบำบัดน้ำเสียและของเสียจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน

เนื่องจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน สามารถย่อยสลายสารประกอบภายในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนและมีออกซิเจน จึงสามารถนำไปบำบัดน้ำเสียและของเสียกลับมาใช้ได้อีก โดยทั่วไปจะเป็นน้ำเสียที่มีสารอินทรีย์ น้ำเสียทางการเกษตร น้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร น้ำเสียจากอาคารบ้านเรือน น้ำเสียจากอุตสาหกรรมการใช้จุลินทรีย์ เช่น ผลิตเบียร์ ยา ปฏิชีวนะ ฯลฯ น้ำเสียจากอุตสาหกรรมทางเคมีและปิโตรเลียม และอุตสาหกรรมของเสียในรูปแบบก๊าซต่าง ๆ เป็นต้น ซึ่งแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถันที่นิยมนำมาใช้ในการบำบัดของเสียต่าง ๆ จะอยู่ในสกุล *Rhodospseudomonas*, *Rhodobacter*, *Rhodospirillum* และ *Rhodocycclus* โดยที่แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถันดังกล่าว จะทำให้น้ำเสียมีคุณภาพดีขึ้นได้โดย

1. ช่วยลดค่า BOD, COD และ TOC (total organic carbon) โดยสามารถลดได้ถึง 20-99 เปอร์เซ็นต์
2. ย่อยสลายสารประกอบที่เป็นพิษต่างๆ
3. ย่อยสลายสารประกอบ Aromatic
4. เคลื่อนย้ายพวกคาร์บอนมอนนอกไซด์ (CO)
5. เกิดกระบวนการ Denitrification และ Deammonification ทำให้ช่วยลดแอมโมเนียและไนเตรทที่เป็นปัญหาในการบำบัดน้ำเสียได้

จากรูวรรณ (2532) ได้นำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงไปใช้บำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานมันสำปะหลังพบว่า สามารถลดค่าซีโอดี(ค่าความสกปรกของน้ำเสีย)ได้มากถึง 94.4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้แบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นหัวเชื้อในปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์และเมื่อเพิ่มเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ความสามารถในการกำจัดความสกปรกในน้ำเสียเพิ่มสูงขึ้นเป็น 96.45 เปอร์เซ็นต์

Kobayashi และ Kurata (1978) ได้นำแบคทีเรียสังเคราะห์สีม่วงในกลุ่มไม่สะสมก้ำมะถันกำจัดน้ำทิ้งที่มีค่าบีโอดี (BOD) มากกว่า 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยไม่ต้องเจือจางน้ำเสีย เป็นเวลา 1 สัปดาห์ โดยใช้วิธีการเลี้ยงแบบให้อากาศและมีแสง ซึ่งพบว่าสามารถลดค่า BOD ได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้ Sawada (1971) ได้ใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสง *R. Capsulata* บำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าสัตว์ พบว่าสามารถลดค่าบีโอดีจาก 3,030 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือ 140 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพไร้อากาศและมีแสง เปรียบเทียบกับการบำบัดโดยไม่ใส่เชื้อ *R. Capsulata* ค่าบีโอดีลดจาก 3,480 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น 370 มิลลิกรัมต่อลิตร

Chuang และ Lai (1978) ทดลองกำจัดน้ำเสียจากการผลิตแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาล ซึ่งการกำจัดประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกใช้ยีสต์ ขั้นตอนที่สองเป็นการสร้างมีเทนด้วยแบคทีเรีย และขั้นตอนสุดท้ายใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสง โดยเลี้ยงภายใต้สภาวะมีอากาศและไม่มีแสงในถังหมักแบบ Continuous พบว่าบีโอดีจาก 9,100 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือเพียง 380 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็น 95.82 เปอร์เซ็นต์

ในการนำแบคทีเรียสังเคราะห์มาบำบัดน้ำเสีย พบว่าการบำบัดน้ำเสียโดยใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงร่วมกับจุลินทรีย์อื่น ๆ ช่วยให้การเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงและประสิทธิภาพการกำจัดน้ำเสียดีขึ้น ซึ่ง Sawada (1971) ได้รายงานว่ามี *R. Capsulata* และ *Klebsiella* sp. มาบำบัดน้ำเสีย พบว่าการสลายตัวของเซลล์ *Klebsiella* sp. จะกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

จากการวิจัยของ Prof. Dr. Michiharu Kobayachi พบว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถทำให้สารอินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำเสียลดลง และสามารถลดความเป็นพิษของสาร Dimethylnitrosamine ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง ก่อการกลายพันธุ์ และ ก่อให้เกิดความผิดปกติในเด็กทารก ดังนั้น แบคทีเรียสังเคราะห์แสงจึงมีบทบาทสำคัญหลายประการต่อสิ่งแวดล้อม

## 2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Jeong และคณะ (2008) ได้เพาะเลี้ยง *Rhodobacter sphaeroides* ในถังหมักขนาด 1 ลิตร โดยศึกษาผลของค่าพีเอชและความเข้มข้นของแสงต่อการผลิตโคเอนไซม์คิวเทิน พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อโดยไม่ควบคุมค่าพีเอช ได้ผลิตโคเอนไซม์คิวเทินสูงสุด 1.69 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง จากนั้นศึกษาการเพิ่มปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินโดยการควบคุมค่าพีเอชให้เท่ากับ 7 พบว่าได้ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินสูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบไม่ควบคุมค่าพีเอชถึง 1.7 เท่า และความเข้มข้นมีผลต่อการผลิตโคเอนไซม์คิวเทินเพียงเล็กน้อย

Yen และ Shin (2009) ได้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* ในถังหมักแบบพ่นอากาศ (airlift) และถังหมักแบบกวน (stirred tank) ภายใต้สภาวะไม่มีอากาศและไม่มีแสง พบว่าไม่มีการผลิตใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทินที่เพาะเลี้ยงในถังหมักแบบพ่นอากาศดีกว่า โดยได้ผลผลิตสูงสุดถึง 25.04 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ถังหมักแบบกวนให้ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินเพียง 18.11 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch ในถังหมักแบบพ่นอากาศสามารถเพิ่มปริมาณมวลเซลล์ให้สูงขึ้น ส่งผลให้ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินสูงขึ้นถึง 33.91 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 3.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งมากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบ batch นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการเพิ่มปริมาณโคเอนไซม์คิวเทิน โดยเปลี่ยนอัตราการให้อากาศในการเลี้ยงแบบ fed-batch ในถังหมักแบบพ่นอากาศ ซึ่งได้ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินสูงสุดถึง 45.65 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเพิ่มขึ้นถึง 35 เปอร์เซ็นต์

Tian และคณะ (2010b) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยง *Rhodospirillum rubrum* ATCC 25852 โดยการหมักในอาหารเหลว และใช้แหล่งคาร์บอนเป็นชีวมวลจากใบยาสูบที่ผ่านการย่อยให้มีขนาดเล็กลง (TBH) โดยทำการเปรียบเทียบกับพืชชนิด Alfalfa (ABH) พบว่า อัตราการเจริญในอาหารที่มีมวลชีวภาพจากใบยาสูบ 20% v/v ส่งผลต่อการกระตุ้นการเจริญของเซลล์และปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (specific coenzyme Q10) ซึ่งให้ค่าถึง 20.16 มิลลิกรัมต่อลิตร

Wu และ Tsai (2013) ได้ศึกษาวิธีการคัดแยกและการทำโคเอนไซม์คิวเทินให้บริสุทธิ์ โดยผลิตจากเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* BCRC 13100 และได้ศึกษาการปรับสภาพเซลล์ให้เหมาะต่อการสกัดด้วยวิธีการต่างๆ ได้แก่ การใช้เอนไซม์, เอทานอล, เครื่องโม่จิ๋วในเซอร์ความเร็วสูง เป็นต้น ซึ่งได้ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทิน 2.85, 2.01 และ 2.11 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการสกัดโคเอนไซม์คิวเทิน พบว่าเมื่อใช้เอทานอลสกัดโคเอนไซม์คิวเทิน 2 ครั้ง จากเซลล์ที่ได้จากกระบวนการหมัก โดยไม่ผ่านการปรับสภาพเซลล์ (extraction directly) ได้ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทิน 2.9 มิลลิกรัมต่อกรัม ส่วนโคเอนไซม์คิวเทินที่ได้จากการสกัดจะถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเอทานอล และขจัดเอทานอลออกด้วยเฮกเซน หลังจากนั้นทำการตกผลึก (crystallization) แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ซึ่งพบว่ามีความบริสุทธิ์ของโคเอนไซม์คิวเทินถึง 96 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมก้ำมะถัน *Rhodospseudomonas* sp. สายพันธุ์ OS33, S12, 13 และ 14

#### 3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงสูตร AM ประกอบด้วย

แหล่งคาร์บอน	10.0	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด (Yeast extract)	1.0	กรัมต่อลิตร
โมโนโซเดียมกลูตาเมต	10.0	กรัมต่อลิตร
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	10.0	กรัมต่อลิตร
ไนโตรเจนที่เตรียมเป็นอาหารแข็งให้เต็มวัน	15.0	กรัมต่อลิตร

ปรับความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.8-7.2

แหล่งคาร์บอนสารอินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ โซเดียมอะซิเตท กลูโคส และ แยม้ำมันสำปะหลัง แหล่งคาร์บอนสารเคมีใช้ในการทดลอง ได้แก่ น้ำเสียจากบ่อ Oxidation Pond และน้ำเสียจากบ่อ Anaerobic Digestion (จากระบบบำบัดน้ำเสียจากโรงงานขนส่งสารเคมี)

#### 3.3 สารเคมี

- 3.3.1 คลอโรฟอร์ม (Chloroform,  $\text{CHCl}_3$ ) AR Grade
- 3.3.2 เมทานอล (Methanol,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ) AR Grade
- 3.3.3 สารมาตรฐานโคเอนไซม์คิวเทิน (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.3.4 แยม้ำมันสำปะหลัง ตราปลาไทย 5 ตัว
- 3.3.5 กรดซัลฟิวริก
- 3.3.6 สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต
- 3.3.7 สารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลท

#### 3.4 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 3.4.1 หลอดทิ้งสแตนขนาด 25-60 วัตต์

เอกสารนี้เป็นเอกสาร 3.4.2 โถดูดความชื้น (Desiccator) การศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.4.3 บั้มดูดอากาศ และเกจวัดความดันอากาศ (Pressure gauge)
- 3.4.4 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis Spectrophotometer) (UV-1800, shimadzu)
- 3.4.5 เครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท (Microplate Reader) (Fluostar Omega, BMG LABTECH)
- 3.4.6 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) (HA-300HIV)
- 3.4.7 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter) (sevencompact pH/Ion S220, Mettler Toledo)
- 3.4.8 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (HA-300HIV)
- 3.4.9 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Air Flow)
- 3.4.10 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light Microscope)
- 3.4.11 เครื่องหมุนวนสาร (Labnet international H5500-230V-E)
- 3.4.12 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)
- 3.4.13 เครื่องปั่นเหวี่ยงสาร (Centrifuge) (HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen, Germany)
- 3.4.14 ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven)
- 3.4.15 เครื่องวัดความเข้มแสง (Lux meter)
- 3.4.16 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography) (C20994007894 LP, LC-10ADvp, Shimadzu)
- 3.4.17 เครื่องให้ความร้อนและผสมสาร (Hotplate Stirrer)

### 3.5 วิธีการทดลอง

#### 3.5.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ในหลอดทดลอง

นำเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ OS33 S12 13 และ 14 เลี้ยงในอาหารเหลว สูตร AM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นโซเดียมอะซิเตท 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ และ แป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์ ทำการเลี้ยงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปิดทับผิวหน้าด้วยพาราฟินหนา 1 เซนติเมตรเพื่อให้อยู่ในสภาวะไร้ออกซิเจน บ่มภายใต้ ความเข้มแสง 1000 - 1500 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 35 - 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.5.2 ศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงภายใต้สภาวะ Anaerobic-light

นำเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในหลอดทดลอง (มีค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.8 - 1.0) ปริมาตร 1 เพลอร์เซ็นต์ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการใช้ ถ่ายลงในขวดอาหารที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 250 มิลลิลิตร โดยแหล่งคาร์บอนแบ่งมันสำปะหลังจะใช้สำหรับการเลี้ยงเชื้อ *Rhodospseudomonas sp.* สายพันธุ์ OS33, 13 และ 14 แหล่งคาร์บอนโซเดียมอะซิเตทสำหรับสายพันธุ์ S12 ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน และแหล่งคาร์บอนน้ำเสียจากบ่อ Oxidation Pond และน้ำเสียจากบ่อ Anaerobic Digestion ใช้สำหรับการเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน บ่มภายใต้ความเข้มข้นแสง 1000 - 1500 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 35 - 40 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการเจริญโดยวัดค่าความขุ่นเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ค่า COD (Chemical Oxygen Demand) ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินที่สะสมในเซลล์

### 3.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนที่สารเคมีใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ (Chemical Oxygen Demand)

นำตัวอย่างแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในขวดอาหารตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงมา 1 มิลลิลิตร ปั่นหยาบที่ 10000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 10 นาที เก็บตัวอย่างส่วนตะกอนเพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทิน นำของเหลวส่วนใสที่ได้มา 2.5 มิลลิลิตร ใส่ลงหลอดฝาเกลียวที่ผ่านการล้างหลอดและฝาด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 20 เพลอร์เซ็นต์ เติมสารละลายที่ใช้ในการย่อยสลายซึ่งได้แก่ สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต 1.5 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเอเจนต์ 3.5 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดทดลองและเขย่าสารผสมให้เข้ากัน นำไปเร่งปฏิกิริยาด้วยตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven) ที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วทิ้งให้เย็นจนได้อุณหภูมิห้อง นำสารละลายส่วนใสไม่มีตะกอนมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

### 3.5.4 การสกัดโคเอนไซม์คิวเทินจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

นำตัวอย่างแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในขวดอาหารตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง นำตะกอนที่ได้จากการปั่นหยาบในข้อ 3.5.3 มาล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ปั่นหยาบเพื่อแยกตะกอนเซลล์ ที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์มาสกัดโคเอนไซม์คิวเทิน โดยใช้คลอโรฟอร์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 2:1 (v/v) ผสมให้เข้ากัน กลิ้งด้วยเครื่องกลิ้งในที่มีดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร นำผลที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโคเอนไซม์คิวเทินมีหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

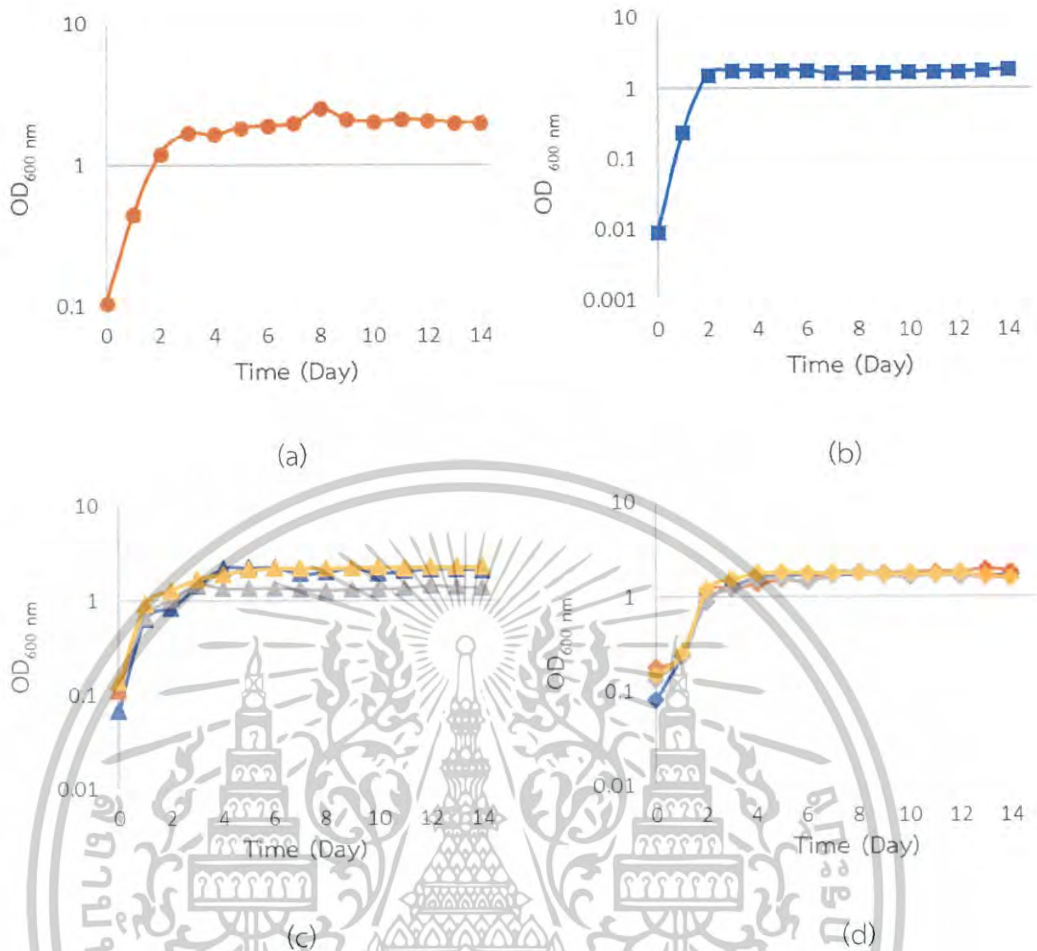
### ผลการวิจัยและอภิปรายผล

#### 4.1 ศึกษาการเจริญของเชื้อ *Rhodopseudomonas sp.* โดยเพาะเลี้ยงเชื้อในขวดอาหารภายใต้สภาวะ Anaerobic-light

ผลการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตร AM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นแป้งมันสำปะหลัง โซเดียมอะซิเตท น้ำเสียจากบ่อ Oxidation Pond และน้ำเสียจากบ่อ Anaerobic Digestion โดยในแหล่งคาร์บอนแป้งจะใช้สำหรับการเลี้ยงเชื้อ *Rhodopseudomonas sp.* สายพันธุ์ OS33, 13 และ 14 แหล่งคาร์บอนโซเดียมอะซิเตทสำหรับสายพันธุ์ S12 ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน และแหล่งคาร์บอนน้ำเสียจากบ่อ Oxidation Pond และน้ำเสียจากบ่อ Anaerobic Digestion ใช้สำหรับการเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน ที่อุณหภูมิ 35 - 40 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1000 - 1500 ลักซ์ ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Anaerobic-light นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.1 4.2 และ 4.3



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยนาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 การเจริญของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ OS33, 13 และ 14 ในแหล่งคาร์บอนแป้งมันสำปะหลัง และสายพันธุ์ S12 ในแหล่งคาร์บอนโซเดียมอะซิเตท ในอาหารเหลวสูตร AM เป็นระยะเวลา 14 วัน

โดยที่ (a) สายพันธุ์ OS33 แหล่งคาร์บอนแป้ง (—●—) ที่ความเข้มข้น 1.0%

(b) สายพันธุ์ S12 แหล่งคาร์บอนโซเดียมอะซิเตท (—■—) ที่ความเข้มข้น 0.5%

(c) สายพันธุ์ 13 แหล่งคาร์บอนแป้ง ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่

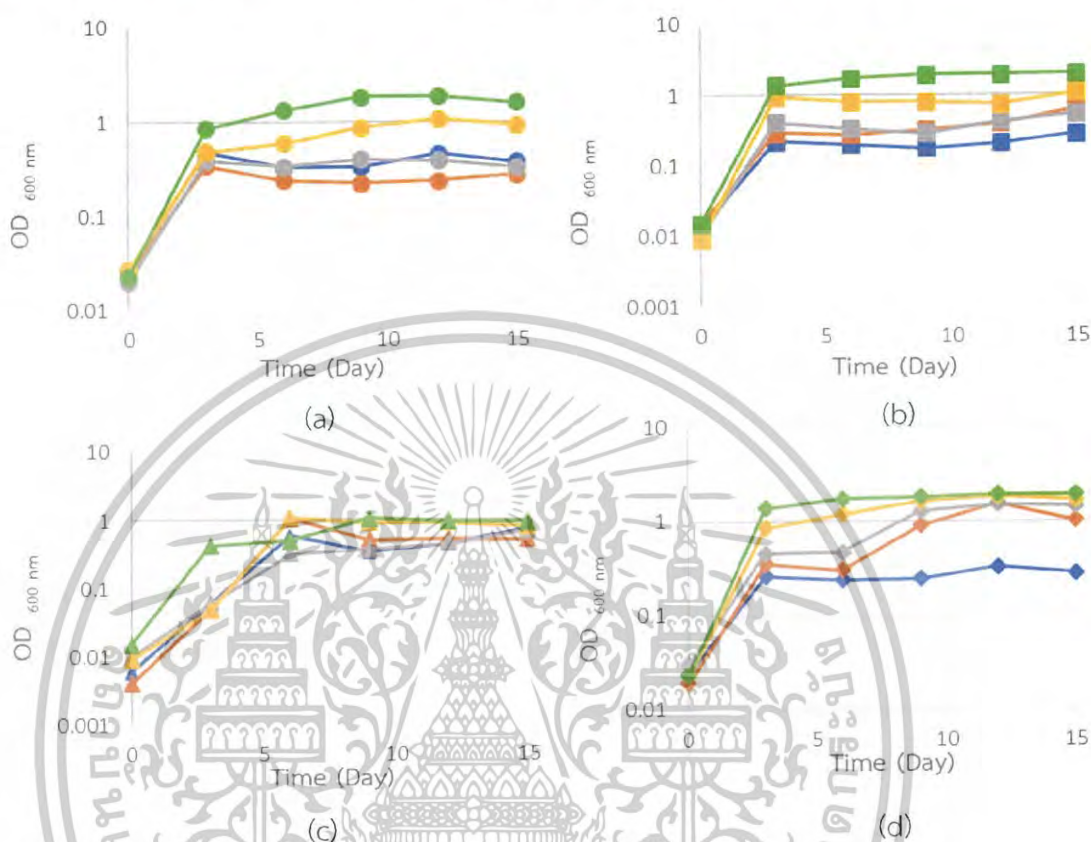
(—▲—) คือ ความเข้มข้น 0.5%, (—▲—) คือ ความเข้มข้น 1.0%, (—▲—) คือ ความเข้มข้น 2.0% และ (—▲—) คือ ความเข้มข้น 3.0%

(d) สายพันธุ์ 14 แหล่งคาร์บอนแป้ง ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่

(—◆—) คือ ความเข้มข้น 0.5%, (—◆—) คือ ความเข้มข้น 1.0%, (—◆—) คือ ความเข้มข้น 2.0% และ (—◆—) คือ ความเข้มข้น 3.0%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.1 พบว่าอัตราการเจริญของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. โดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร สายพันธุ์ OS33 และ S12 มีการเจริญเข้าสู่ช่วง stationary phase ในวันที่ 3 ส่วนในสายพันธุ์ 13 และ 14 มีการเจริญเข้าสู่ช่วง stationary phase ในวันที่ 4



รูปที่ 4.2 การเจริญของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ OS33, S12, 13 และ 14 ในอาหารเหลวสูตร AM แหล่งคาร์บอนน้ำเสียบ่อ Oxidation Pond เป็นระยะเวลา 15 วัน

โดยที่ (a) สายพันธุ์ OS33 แหล่งคาร์บอนน้ำเสียบ่อ Oxidation Pond ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ (—●—) คือ ความเข้มข้น 0.66 เท่า, (—○—) คือ ความเข้มข้น 0.50 เท่า, (—●—) คือ ความเข้มข้น 0.33 เท่า, (—●—) คือ ความเข้มข้น 0.25 เท่า และ (—●—) คือ ความเข้มข้น 0.16 เท่า

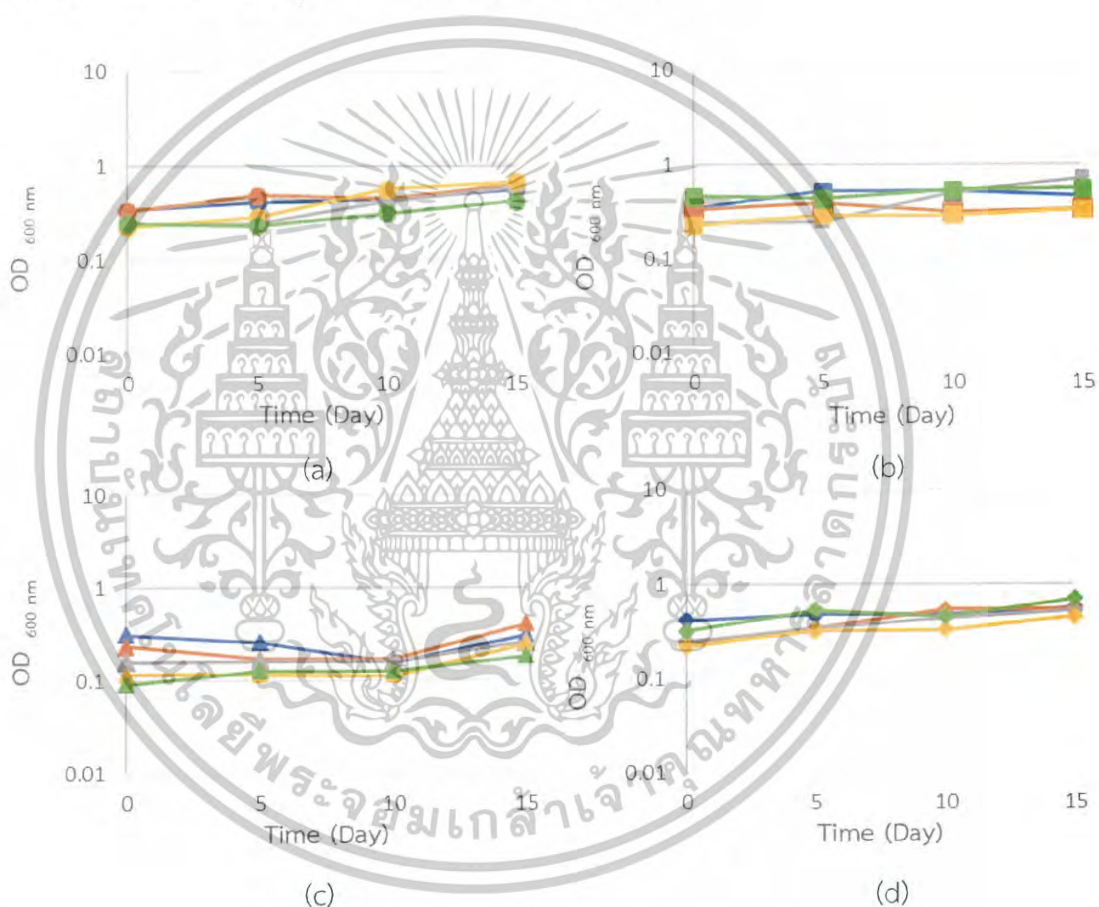
(b) สายพันธุ์ S12 แหล่งคาร์บอนน้ำเสียบ่อ Oxidation Pond ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ (—■—) คือ ความเข้มข้น 0.66 เท่า, (—■—) คือ ความเข้มข้น 0.50 เท่า, (—■—) คือ ความเข้มข้น 0.33 เท่า, (—■—) คือ ความเข้มข้น 0.25 เท่า และ (—■—) คือ ความเข้มข้น 0.16 เท่า

(c) สายพันธุ์ 13 แหล่งคาร์บอนน้ำเสียบ่อ Oxidation Pond ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ (—▲—) คือ ความเข้มข้น 0.66 เท่า, (—▲—) คือ ความเข้มข้น 0.50 เท่า, (—▲—) คือ ความเข้มข้น 0.33 เท่า, (—▲—) คือ ความเข้มข้น 0.25 เท่า และ (—▲—) คือ ความเข้มข้น 0.16 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(d) สายพันธุ์ 14 แหล่งคาร์บอนน้ำเสียบ่อ Oxidation Pond ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ (—◆—) คือ ความเข้มข้น 0.66 เท่า, (—◆—) คือ ความเข้มข้น 0.50 เท่า, (—◆—) คือ ความเข้มข้น 0.33 เท่า, (—◆—) คือ ความเข้มข้น 0.25 เท่า และ (—◆—) คือ ความเข้มข้น 0.16 เท่า

จากรูปที่ 4.2 พบว่าอัตราการเจริญของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ OS33 และ S12 มีการเจริญเติบโตได้ดีในที่มีความเข้มข้น 0.25 และ 0.16 เท่า มีการเจริญเข้าสู่ช่วง stationary phase ในวันที่ 3 สายพันธุ์ 13 มีการเจริญเติบโตได้ดีในทุกความเข้มข้น มีการเจริญเข้าสู่ช่วง stationary phase ในวันที่ 6 สายพันธุ์ 14 มีการเจริญเติบโตได้ดีในอัตราส่วน 0.50 0.33 0.25 และ 0.16 เท่า มีการเจริญเข้าสู่ช่วง stationary phase ในวันที่ 3



รูปที่ 4.3 การเจริญของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ OS33, S12, 13 และ 14 ในอาหารเหลวสูตร AM แหล่งคาร์บอนน้ำเสียบ่อ Anaerobic Digestion เป็นระยะเวลา 15 วัน

โดยที่ (a) สายพันธุ์ OS33 แหล่งคาร์บอนน้ำเสียบ่อ Anaerobic Digestion ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ (—◆—) คือ ความเข้มข้น 0.66 เท่า, (—◆—) คือ ความเข้มข้น 0.50 เท่า, (—◆—) คือ ความเข้มข้น 0.33 เท่า, (—◆—) คือ ความเข้มข้น 0.25 เท่า และ (—◆—) คือ ความเข้มข้น 0.16 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(b) สายพันธุ์ S12 แหล่งคาร์บอนน้ำเสียบ่อ Anaerobic Digestion ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ (—■—) คือ ความเข้มข้น 0.66 เท่า, (—■—) คือ ความเข้มข้น 0.50 เท่า, (—■—) คือ ความเข้มข้น 0.33 เท่า, (—■—) คือ ความเข้มข้น 0.25 เท่า และ (—■—) คือ ความเข้มข้น 0.16 เท่า

(c) สายพันธุ์ 13 แหล่งคาร์บอนน้ำเสียบ่อ Anaerobic Digestion ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ (—▲—) คือ ความเข้มข้น 0.66 เท่า, (—▲—) คือ ความเข้มข้น 0.50 เท่า, (—▲—) คือ ความเข้มข้น 0.33 เท่า, (—▲—) คือ ความเข้มข้น 0.25 เท่า และ (—▲—) คือ ความเข้มข้น 0.16 เท่า

(d) สายพันธุ์ 14 แหล่งคาร์บอนน้ำเสียบ่อ Anaerobic Digestion ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ (—◆—) คือ ความเข้มข้น 0.66 เท่า, (—◆—) คือ ความเข้มข้น 0.50 เท่า, (—◆—) คือ ความเข้มข้น 0.33 เท่า, (—◆—) คือ ความเข้มข้น 0.25 เท่า และ (—◆—) คือ ความเข้มข้น 0.16 เท่า

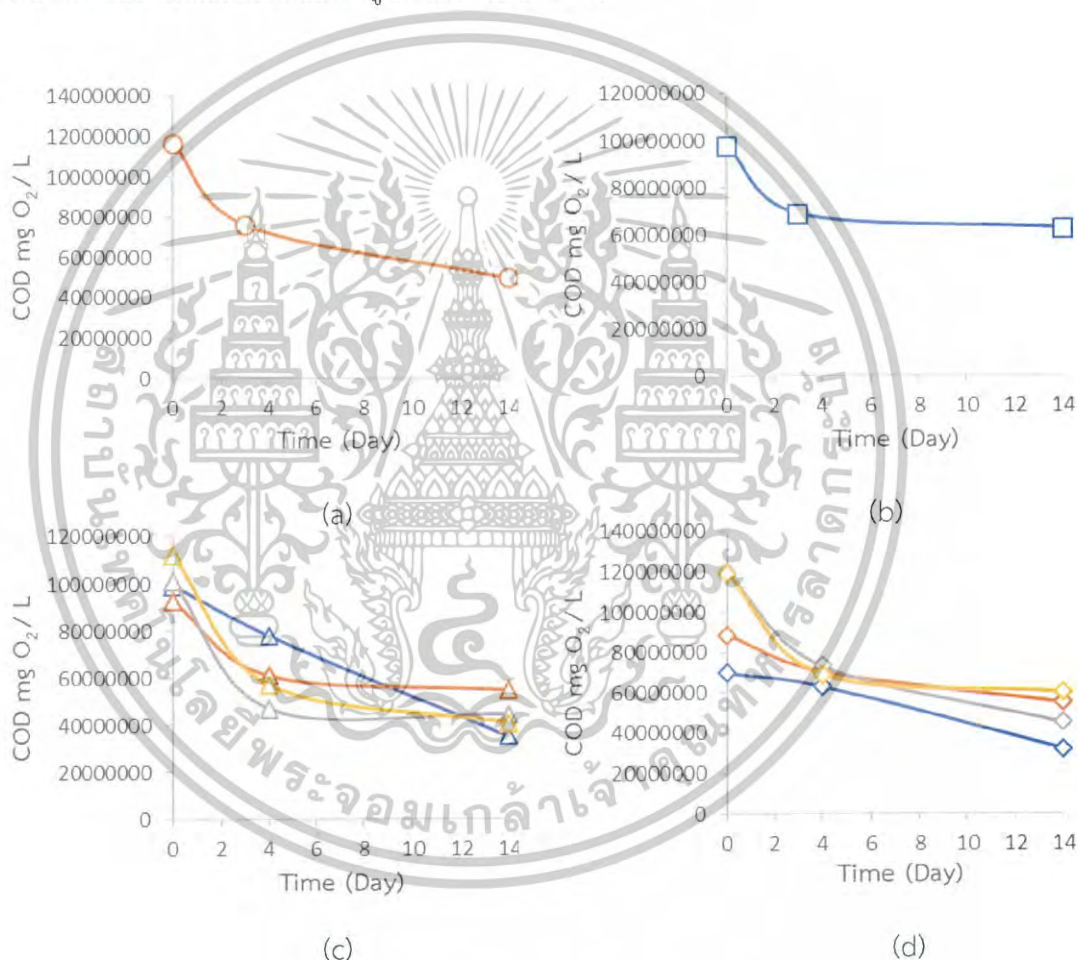
จากรูปที่ 4.3 พบว่าอัตราการเจริญของเชื้อ *Rhodospseudomonas* sp. ของทั้ง 4 สายพันธุ์ ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ดี



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.2 ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนที่สารเคมีใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ (Chemical Oxygen Demand ; COD)

ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อ *Rhodopseudomonas sp.* สายพันธุ์ OS33, S12, 13 และ 14 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในขวดอาหารภายใต้สภาวะ Anaerobic-light โดยที่สายพันธุ์ OS33 และ S12 เก็บตัวอย่างวันที่ 0 3 และ 14 สายพันธุ์ 13 และ 14 เก็บตัวอย่างวันที่ 0 4 และ 14 มาใช้ในการวิเคราะห์ สำหรับแหล่งคาร์บอนน้ำเสียจากบ่อ Oxidation Pond และบ่อ Anaerobic Digestion ใช้สำหรับการเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยในแหล่งคาร์บอนน้ำเสียจากบ่อ Oxidation Pond เก็บตัวอย่างวันที่ 0 9 และ 15 และน้ำเสียจากบ่อ Anaerobic Digestion เก็บตัวอย่างวันที่ 15 นำไปวิเคราะห์ค่า COD ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.4 4.5 และ 4.6



รูปที่ 4.4 แสดงค่าการวิเคราะห์ COD ของเชื้อ *Rhodopseudomonas sp.* สายพันธุ์ OS33, 13 และ 14 ในแหล่งคาร์บอนแป้ง และสายพันธุ์ S12 ในแหล่งคาร์บอนโซเดียมอะซิเตท

โดยที่ (a) สายพันธุ์ OS33 แหล่งคาร์บอนแป้ง (—○—) ที่ความเข้มข้น 1.0%

(b) สายพันธุ์ S12 แหล่งคาร์บอนโซเดียมอะซิเตท (—□—) ที่ความเข้มข้น 0.5%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

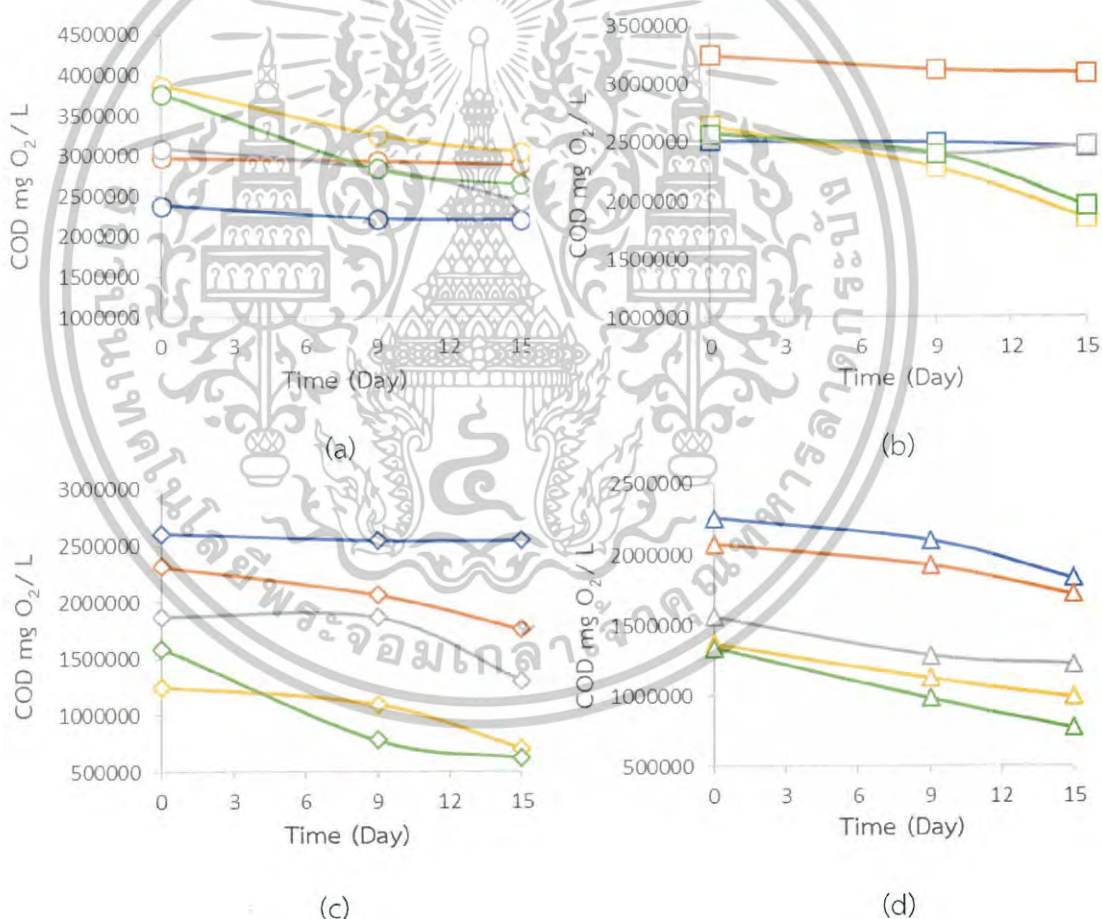
(c) สายพันธุ์ 13 แหล่งคาร์บอนแข็ง ที่ความเข้มข้นแตกต่าง ๆ ได้แก่

(—△) คือ ความเข้มข้น 0.5%, (—▲) คือ ความเข้มข้น 1.0%, (—▽) คือ ความเข้มข้น 2.0% และ (—◇) คือ ความเข้มข้น 3.0%

(d) สายพันธุ์ 14 แหล่งคาร์บอนแข็ง ที่ความเข้มข้นแตกต่าง ๆ ได้แก่

(—◇) คือ ความเข้มข้น 0.5%, (—◇) คือ ความเข้มข้น 1.0%, (—◇) คือ ความเข้มข้น 2.0% และ (—◇) คือ ความเข้มข้น 3.0%

จากรูปที่ 4.4 พบว่าเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีการเจริญเติบโตได้ดี โดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เมื่อนำไปวิเคราะห์ค่า COD ในวันที่ 0 จะมีค่า COD ที่สูง และมีค่าลดลงในวันสุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อคือวันที่ 14



รูปที่ 4.5 แสดงค่าการวิเคราะห์ COD ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ OS33, S12, 13 และ 14 ในแหล่งคาร์บอนน้ำเสียบ่อ Oxidation Pond

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยที่ (a) สายพันธุ์ OS33 แหล่งคาร์บอนน้ำเสียบ่อ Oxidation Pond ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ (—○—) คือ ความเข้มข้น 0.66 เท่า, (—○—) คือ ความเข้มข้น 0.50 เท่า, (—○—) คือ ความเข้มข้น 0.33 เท่า, (—○—) คือ ความเข้มข้น 0.25 เท่า และ (—○—) คือ ความเข้มข้น 0.16 เท่า

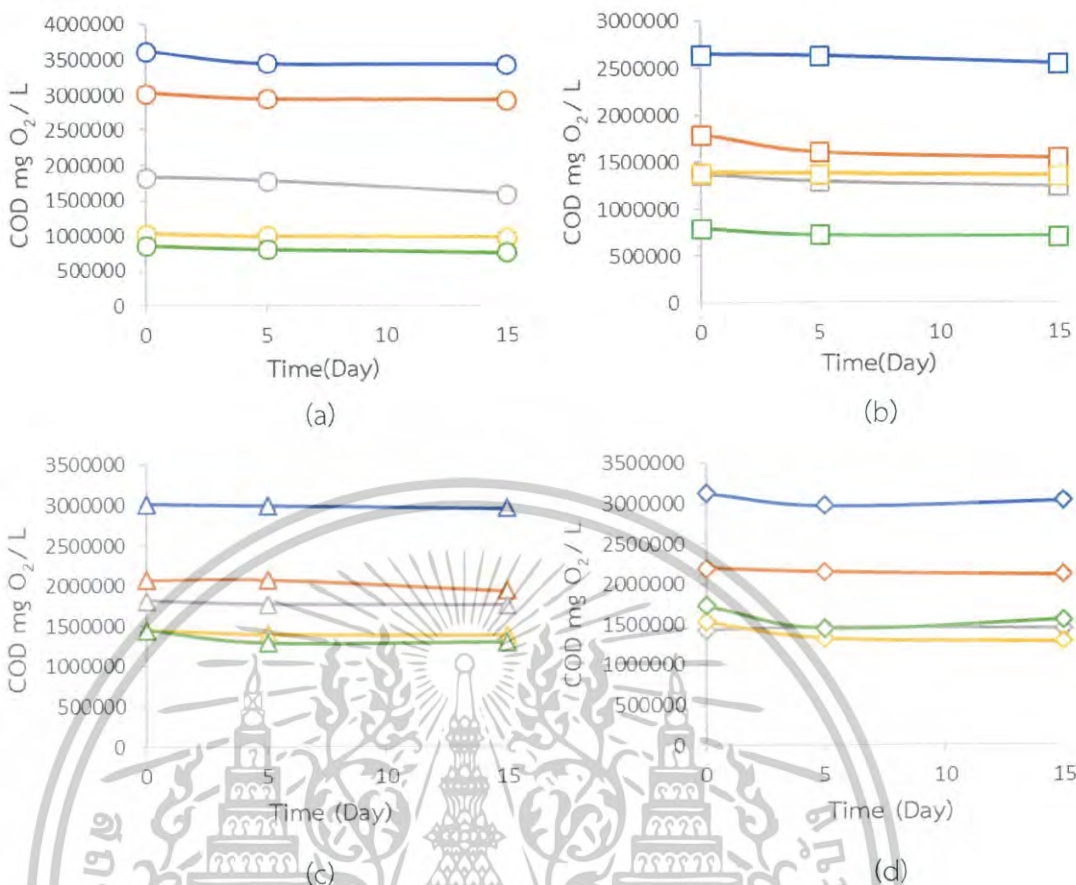
(b) สายพันธุ์ S12 แหล่งคาร์บอนน้ำเสียบ่อ Oxidation Pond ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ (—□—) คือ ความเข้มข้น 0.66 เท่า, (—□—) คือ ความเข้มข้น 0.50 เท่า, (—□—) คือ ความเข้มข้น 0.33 เท่า, (—□—) คือ ความเข้มข้น 0.25 เท่า และ (—□—) คือ ความเข้มข้น 0.16 เท่า

(c) สายพันธุ์ 13 แหล่งคาร์บอนน้ำเสียบ่อ Oxidation Pond ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ (—△—) คือ ความเข้มข้น 0.66 เท่า, (—△—) คือ ความเข้มข้น 0.50 เท่า, (—△—) คือ ความเข้มข้น 0.33 เท่า, (—△—) คือ ความเข้มข้น 0.25 เท่า และ (—△—) คือ ความเข้มข้น 0.16 เท่า

(d) สายพันธุ์ 14 แหล่งคาร์บอนน้ำเสียบ่อ Oxidation Pond ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ (—◇—) คือ ความเข้มข้น 0.66 เท่า, (—◇—) คือ ความเข้มข้น 0.50 เท่า, (—◇—) คือ ความเข้มข้น 0.33 เท่า, (—◇—) คือ ความเข้มข้น 0.25 เท่า และ (—◇—) คือ ความเข้มข้น 0.16 เท่า

จากรูปที่ 4.5 พบว่าเชื้อ *Rhodospseudomonas* sp. สายพันธุ์ OS33 และ S12 มีการเจริญเติบโตได้ดีที่ความเข้มข้น 0.25 และ 0.16 เท่า สายพันธุ์ 13 มีการเจริญเติบโตได้ดีในทุกความเข้มข้น สายพันธุ์ 14 มีการเจริญเติบโตได้ดีในอัตราส่วน 0.50 0.33 0.25 และ 0.16 เท่า โดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เมื่อนำไปวิเคราะห์ค่า COD ในวันที่ 0 จะมีค่า COD ที่สูง และมีค่าลดลงในวันสุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อคือวันที่ 15 ของความเข้มข้นที่เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 แสดงค่าการวิเคราะห์ COD ของเชื้อ *Rhodopseudomonas sp.* สายพันธุ์ OS33, S12, 13 และ 14 ในแหล่งคาร์บอนน้ำเสียบ่อ Anaerobic Digestion

โดยที่ (a) สายพันธุ์ OS33 แหล่งคาร์บอนน้ำเสียบ่อ Anaerobic Digestion ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ (—○—) คือ ความเข้มข้น 0.66 เท่า, (—●—) คือ ความเข้มข้น 0.50 เท่า, (—○—) คือ ความเข้มข้น 0.33 เท่า, (—●—) คือ ความเข้มข้น 0.25 เท่า และ (—○—) คือ ความเข้มข้น 0.16 เท่า

(b) สายพันธุ์ S12 แหล่งคาร์บอนน้ำเสียบ่อ Anaerobic Digestion ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ (—□—) คือ ความเข้มข้น 0.66 เท่า, (—■—) คือ ความเข้มข้น 0.50 เท่า, (—□—) คือ ความเข้มข้น 0.33 เท่า, (—■—) คือ ความเข้มข้น 0.25 เท่า และ (—□—) คือ ความเข้มข้น 0.16 เท่า

(c) สายพันธุ์ 13 แหล่งคาร์บอนน้ำเสียบ่อ Anaerobic Digestion ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ (—△—) คือ ความเข้มข้น 0.66 เท่า, (—▲—) คือ ความเข้มข้น 0.50 เท่า, (—△—) คือ ความเข้มข้น 0.33 เท่า, (—▲—) คือ ความเข้มข้น 0.25 เท่า และ (—△—) คือ ความเข้มข้น 0.16 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(d) สายพันธุ์ 14 แหล่งคาร์บอนน้ำเสียบ่อ Anaerobic Digestion ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ (—◇—) คือ ความเข้มข้น 0.66 เท่า, (—◇—) คือ ความเข้มข้น 0.50 เท่า, (—◇—) คือ ความเข้มข้น 0.33 เท่า, (—◇—) คือ ความเข้มข้น 0.25 เท่า และ (—◇—) คือ ความเข้มข้น 0.16 เท่า

จากรูปที่ 4.6 พบว่าเชื้อ *Rhodopseudomonas sp.* ทั้ง 4 สายพันธุ์ ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในทุกความเข้มข้น โดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เมื่อนำไปวิเคราะห์ค่า COD ในวันที่ 0 และในวันสุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อคือวันที่ 15 ค่า COD ไม่ลดลงเลย

จากการทดลองที่ 4.2 ค่า COD ของความเข้มข้นที่เจือจางมากที่สุด คือ 0.16 เท่า ของแหล่งคาร์บอนน้ำเสีย พบว่ามีค่า COD ในวันที่ 0 สูงกว่าเข้มข้นอื่น เป็นเพราะการเตรียมอาหารต้องใช้ความร้อนฆ่าเชื้อ อาจมีผลต่อความเข้มข้นของสารเคมีในขวดอาหาร เช่น การแตกตัว การสลายตัว การละลาย ทำให้ค่า COD ของสารเคมีจากน้ำเสียเปลี่ยนแปลงไป ไม่เป็นตามที่คำนวณได้

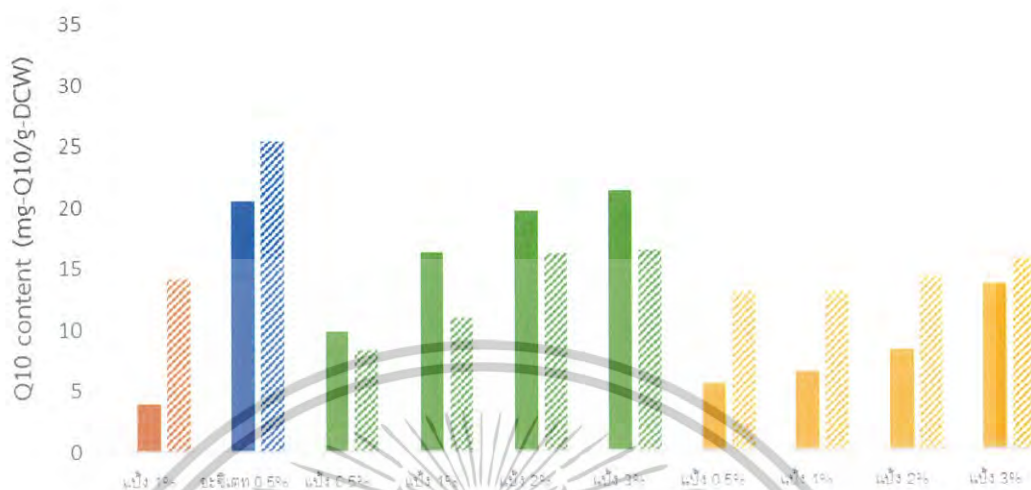
การที่เชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้ดี อาจเกิดจากหลายสาเหตุ เช่น ปริมาณของสารอาหารลดน้อยลง มีการสะสมผลผลิตของกระบวนการเมตาบอลิซึมที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ เช่น กรด, สารพิษ หรือเกิดจากสารพิษที่มีอยู่ในน้ำเสียที่นำมาใช้ในการทดลอง มีสารกลุ่มต่าง ๆ เหล่านี้เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ Poly (ethylene terephthalate ; PET), Polyaromatic hydrocarbons (PAHs), Alcohol ethoxylates (AEOs), Alkyl phenol ethoxylates (APEOs) และ Poly (vinyl alcohol ; PVA) จึงส่งผลให้เชื้อมีการเจริญเติบโตไม่ได้

#### 4.3 การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นของเชื้อ *Rhodopseudomonas sp.* โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อในขวดอาหารภายใต้สภาวะ Anaerobic-light

การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตร AM ในแหล่งคาร์บอนแบ่งใช้สำหรับการเลี้ยงเชื้อ *Rhodopseudomonas sp.* สายพันธุ์ OS33, 13 และ 14 ส่วนแหล่งคาร์บอนโซเดียมอะซิเตทสำหรับสายพันธุ์ S12 ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน โดยที่สายพันธุ์ OS33 และ S12 เก็บตัวอย่างวันที่ 0 3 และ 14 สายพันธุ์ 13 และ 14 เก็บตัวอย่างวันที่ 0 4 และ 14 มาใช้ในการวิเคราะห์ สำหรับแหล่งคาร์บอนน้ำเสียจากบ่อ Oxidation Pond และบ่อ Anaerobic Digestion ใช้สำหรับการเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยในแหล่งคาร์บอนน้ำเสียจากบ่อ Oxidation Pond เก็บตัวอย่างวันที่ 0 9 และ 15 และน้ำเสียจากบ่อ Anaerobic Digestion เก็บตัวอย่างวันที่ 15 นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวก์ ปั่นเหวี่ยงที่ 10000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 10 นาที นำตะกอนเซลล์ที่ได้ มาล้างด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 10000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 10 นาที นำตะกอนเซลล์มาสกัดโคเอนไซม์คิวเท็นด้วยสารละลายผสมคลอโรฟอร์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 2:1 (v/v) ผสมให้เข้ากันในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเฉพาะส่วนใสมาวัดค่าการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดูคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.7 4.8 และ 4.9



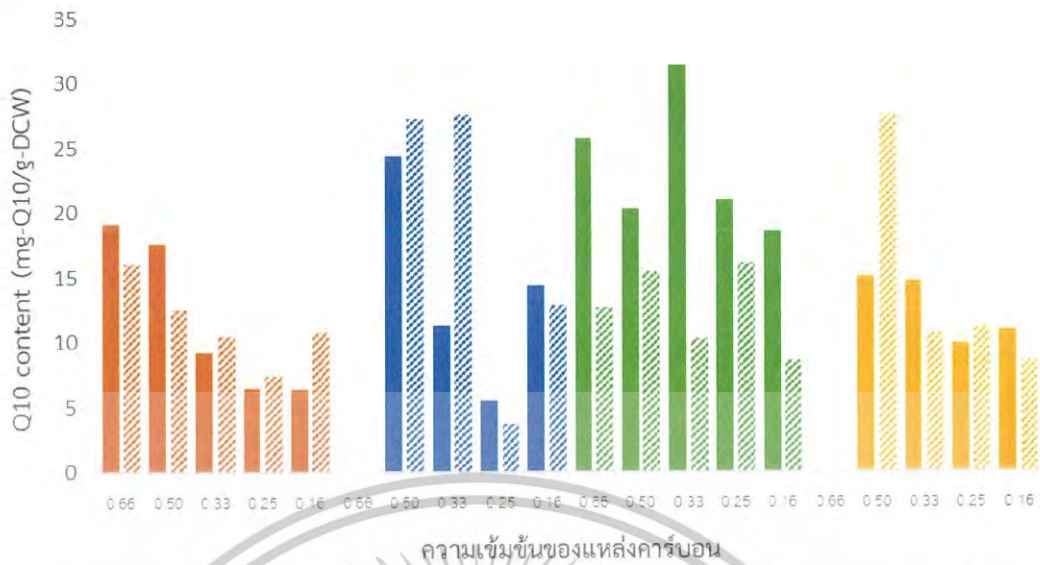
ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

รูปที่ 4.7 ผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทินของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ OS33, 13 และ S14 ในแหล่งคาร์บอนแป้ง และสายพันธุ์ S12 ในแหล่งคาร์บอนโซเดียมอะซิเตท ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

โดยที่ (■) สายพันธุ์ OS33 (วันที่ 4), (▨) สายพันธุ์ OS33 (วันที่ 14)  
 (■) สายพันธุ์ S12 (วันที่ 4), (▨) สายพันธุ์ S12 (วันที่ 14)  
 (■) สายพันธุ์ 13 (วันที่ 4), (▨) สายพันธุ์ 13 (วันที่ 14)  
 (■) สายพันธุ์ 14 (วันที่ 4), (▨) สายพันธุ์ 14 (วันที่ 14)

จากรูปที่ 4.7 แสดงให้เห็นว่า สายพันธุ์ OS33 มีผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทินสูงที่สุดเท่ากับ 14.19 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยงที่แหล่งคาร์บอนแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 1.0% สายพันธุ์ S12 มีผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทินสูงที่สุดเท่ากับ 25.38 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง ในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยงที่แหล่งคาร์บอนอะซิเตทที่ความเข้มข้น 0.5% สายพันธุ์ S13 มีผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทินสูงที่สุดเท่ากับ 21.21 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงที่แหล่งคาร์บอนแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 3.0% สายพันธุ์ S14 มีผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทินสูงที่สุดเท่ากับ 15.63 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยงที่แหล่งคาร์บอนแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 3.0%

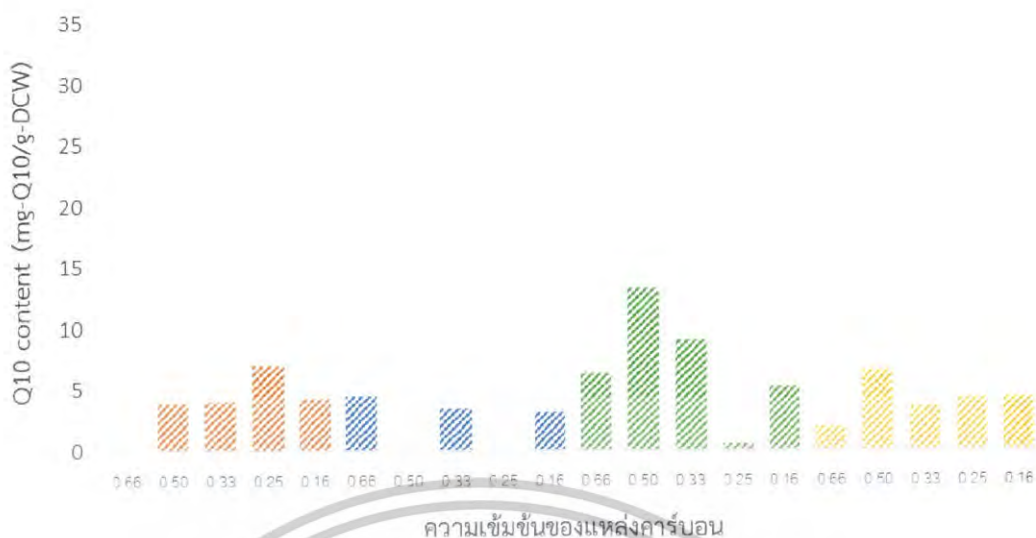
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 ผลผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นของเชื้อ *Rhodospseudomonas* sp. สายพันธุ์ OS33, S12, 13 และ 14 ในแหล่งคาร์บอน Oxidation Pond ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

โดยที่ (■) สายพันธุ์ OS33 (วันที่ 9), (▨) สายพันธุ์ OS33 (วันที่ 15)  
 (■) สายพันธุ์ S12 (วันที่ 9), (▨) สายพันธุ์ S12 (วันที่ 15)  
 (■) สายพันธุ์ 13 (วันที่ 9), (▨) สายพันธุ์ 13 (วันที่ 15)  
 (■) สายพันธุ์ 14 (วันที่ 9), (▨) สายพันธุ์ 14 (วันที่ 15)

จากรูปที่ 4.8 แสดงให้เห็นว่า สายพันธุ์ OS33 มีผลผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นสูงที่สุดเท่ากับ 19.15 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง ที่ความเข้มข้น 0.66 เท่า สายพันธุ์ S12 มีผลผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นสูงที่สุดเท่ากับ 27.54 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง ที่ความเข้มข้น 0.33 เท่า สายพันธุ์ 13 มีผลผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นสูงที่สุดเท่ากับ 31.34 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง ที่ความเข้มข้น 0.33 เท่า สายพันธุ์ 14 มีผลผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นสูงที่สุดเท่ากับ 27.50 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง ที่ความเข้มข้น 0.50 เท่า



รูปที่ 4.9 ผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทินของเชื้อ *Rhodospseudomonas* sp. สายพันธุ์ OS33, S12, 13 และ 14 ในแหล่งคาร์บอนน้ำเสีย anaerobic digestion ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

- โดยที่ ( ) สายพันธุ์ OS33 (วันที่ 15)  
 ( ) สายพันธุ์ S12 (วันที่ 15)  
 ( ) สายพันธุ์ 13 (วันที่ 15)  
 ( ) สายพันธุ์ 14 (วันที่ 15)

จากรูปที่ 4.9 แสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อในแหล่งน้ำเสีย Anaerobic Digestion เชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถผลิตโคเอนไซม์คิวเทินได้น้อยเมื่อเทียบกับผลการทดลองในแหล่งคาร์บอนอื่น ๆ โดยสายพันธุ์ที่สามารถผลิตโคเอนไซม์คิวเทินได้มากที่สุดคือ สายพันธุ์ 13 มีผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทินสูงที่สุดเท่ากับ 13.28 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้ง ในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น 0.50 เท่า

จากผลการทดลองที่ 4.3 การวัดปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Rhodospseudomonas* sp. สายพันธุ์ OS33, S12, 13 และ 14 พบว่า สายพันธุ์ 13 มีการผลิตโคเอนไซม์คิวเทินสูงที่สุด เท่ากับ 31.34 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้ง ในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนน้ำเสียจากบ่อ Oxidation Pond ที่ความเข้มข้น 0.33 เท่า ซึ่งในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยวเซลล์เพื่อให้ได้ผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทินสูงที่สุด ซึ่งเซลล์จะอยู่ในช่วง stationary phase (รูปที่ 4.2c) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Yen และ Shin (2009), Kien และคณะ (2010), Yen และคณะ (2010) ซึ่งกล่าวว่าการผลิตโคเอนไซม์คิวเทินเกิดควบคู่กับการผลิตเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นในแหล่งคาร์บอนน้ำเสียบ่อ Anaerobic Digestion มีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนอื่น ๆ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากสารพิษที่มีอยู่ในน้ำเสียที่นำมาใช้ในการทดลอง มีสารกลุ่มต่าง ๆ เหล่านี้เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ Poly (ethylene terephthalate ; PET), Polyaromatic hydrocarbons (PAHs), Alcohol ethoxylates (AEOs), Alkyl phenol ethoxylates (APEOs) และ Poly (vinyl alcohol I; PVA) จึงส่งผลให้เชื่อมีการเจริญเติบโตได้ไม่ดี

#### 4.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นสูงสุด จากเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) เปรียบเทียบกับเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

คัดเลือกตัวอย่างที่มีปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็นสูงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร นำไปวิเคราะห์ต่อด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) พบว่ามี retention time ที่เวลา 10 นาที ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.1 และ 4.2



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็นสูงสุดจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ OS33, 13, 14 ในแหล่งคาร์บอนแป้ง และ S12 ในแหล่งคาร์บอนโซเดียมอะซิเตท

สายพันธุ์	ความเข้มข้น ของแหล่งคาร์บอน	วันที่ ผลผลิตสูงสุด	ปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็น (mg/g-DCW)	
			HPLC	Spectrophotometer
OS33	แป้ง 1.0%	3	0.16	3.96
		14	0.02	14.19
S12	โซเดียมอะซิเตท 0.5%	3	0.18	20.53
		14	0.08	25.38
13	แป้ง 0.5%	4	0.06	9.80
		14	0.03	8.30
13	แป้ง 1.0%	4	0.18	16.26
		14	0.04	10.97
13	แป้ง 2.0%	4	0.05	19.63
		14	0.29	16.14
13	แป้ง 3.0%	4	0.08	21.21
		14	0.28	16.38
14	แป้ง 0.5%	4	0.02	5.44
		14	0.02	12.98
14	แป้ง 1.0%	4	0.02	6.34
		14	0.03	12.98
14	แป้ง 2.0%	4	0.02	8.18
		14	0.18	14.13
14	แป้ง 3.0%	4	0.08	13.56
		14	0.17	15.63

จากตารางที่ 4.1 เมื่อพิจารณาปริมาณผลผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นสูงสุดจากเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) พบว่า สายพันธุ์ 13 ให้ปริมาณผลผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นสูงสุดที่แหล่งคาร์บอนแป้งความเข้มข้น 2.0% และ 3.0% ในวันที่ 14 ซึ่งมีปริมาณ 0.29 และ 0.28 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์พบว่าสายพันธุ์ 13 ให้ปริมาณผลผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นสูงสุดที่แหล่งคาร์บอนแป้งความเข้มข้น 3.0% ในวันที่ 14 ซึ่งมีปริมาณ 21.21 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็นสูงสุดจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ OS33, S12, 13 และ 14 ในแหล่งคาร์บอนน้ำเสียจากบ่อ Oxidation Pond

สายพันธุ์	ความเข้มข้น ของแหล่งคาร์บอน	วันที่ ผลผลิตสูงสุด	ปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็น (mg/g-DCW)	
			HPLC	Spectrophotometer
OS33	0.16x	9	0.03	6.40
		15	0.09	10.72
S12	0.16x	9	0.11	14.38
		15	0.11	12.82
13	0.16x	9	0.08	18.55
		15	0.09	8.51
14	0.16x	9	0.07	1.96
		15	0.06	8.53

จากตารางที่ 4.2 เมื่อพิจารณาปริมาณผลผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นสูงสุดจากเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) พบว่า สายพันธุ์ S12 ให้ปริมาณผลผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นสูงสุดในวันที่ 9 และ 15 ซึ่งมีปริมาณ 0.11 และ 0.11 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์พบว่าสายพันธุ์ 13 ให้ปริมาณผลผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นสูงสุดที่ในวันที่ 9 ซึ่งมีปริมาณ 18.55 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

จากผลการทดลองพบว่าผลการวิเคราะห์จากเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์มีค่าสูงกว่าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) เนื่องจากความยาวคลื่น 275 นาโนเมตรที่ใช้ตรวจวัดปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็นมีความใกล้เคียงกับความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรที่ใช้ตรวจวัดปริมาณกรดอะมิโนบางชนิดรวมถึงกรดนิวคลีอิกด้วยจึงทำให้ค่าที่ได้จากเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์มีค่าที่สูงกว่าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง อาจเป็นไปได้ว่าค่าที่วัดได้เกิดจากการตรวจวัดปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็นและกรดอะมิโนชนิดอื่น ๆ ด้วยจึงทำให้มีค่าที่สูงกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

### 5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตร AM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นแป้งมันสำปะหลัง โซเดียมอะซิเตท น้ำเสียจากบ่อ Oxidation Pond และน้ำเสียจากบ่อ Anaerobic Digestion โดยในแหล่งคาร์บอนแป้งจะใช้สำหรับการเลี้ยงเชื้อ *Rhodospseudomonas sp.* สายพันธุ์ OS33, 13 และ 14 แหล่งคาร์บอนโซเดียมอะซิเตทสำหรับสายพันธุ์ S12 ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน และแหล่งคาร์บอนน้ำเสียจากบ่อ Oxidation Pond และน้ำเสียจากบ่อ Anaerobic Digestion ใช้สำหรับการเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน ที่อุณหภูมิ 35 - 40 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นแสง 1000 - 1500 ลักซ์ ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Anaerobic-light

พบว่า ในแหล่งคาร์บอนแป้งมันสำปะหลัง สายพันธุ์ 13 สามารถผลิตโคเอนไซม์คิวเทินได้สูงที่สุด 25.38 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น 3.0%

แหล่งคาร์บอนโซเดียมอะซิเตท สายพันธุ์ S12 สามารถผลิตโคเอนไซม์คิวเทินได้สูงที่สุด 21.21 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น 0.5%

แหล่งคาร์บอนน้ำเสียจากบ่อ Oxidation Pond พบว่า สายพันธุ์ 13 สามารถผลิตโคเอนไซม์คิวเทินได้สูงที่สุด 31.34 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น 0.33 เท่า

แหล่งคาร์บอนน้ำเสียจากบ่อ Anaerobic Digestion พบว่า สายพันธุ์ 13 สามารถผลิตโคเอนไซม์คิวเทินได้สูงที่สุด 13.28 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น 0.50 เท่า

จากผลการทดลอง การเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนน้ำเสียจากบ่อ Oxidation pond เชื้อสามารถเจริญและผลิตโคเอนไซม์คิวเทินได้ดีแสดงให้เห็นว่าน้ำเสียจากบ่อ Oxidation pond ไม่ส่งผลต่อการเจริญ เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนน้ำเสียจากบ่อ Anaerobic digestion เชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้ดีทำให้การผลิตโคเอนไซม์คิวเทินมีปริมาณน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

1. การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. ในขวดแบนพบว่า เมื่อเซลล์มีอายุเพิ่มมากขึ้น เชื้อจะเกิดการตกตะกอนและรวมตัวเป็นเมือก (Sheath) อยู่ที่ก้นขวด ทำให้เกิดปัญหาต่อการให้แสงอย่างทั่วถึง จึงอาจปรับปรุงโดยเพิ่มการกวนผสมด้วยเครื่อง Magnetic Stirrer ในระดับที่ไม่ทำให้เกิดการ Vortex
2. ศึกษาการเจริญของเชื้อในขวดหลายรูปแบบเพิ่มเติม เพื่อเปรียบเทียบพื้นที่การรับแสงซึ่งส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ
3. ควรลดระดับสารพิษที่อยู่ในน้ำเสียก่อนนำมาทดลองอาจทำให้เชื้อสามารถเจริญเติบโตและใช้สารอาหารได้อย่างเต็มที่
4. การศึกษาในครั้งต่อไปควรประยุกต์ใช้การเลี้ยงเชื้อแบบ Fed-Batch เนื่องจากทำให้ปริมาณเซลล์สะสม และปริมาณโคเอนไซม์คิวเทนสูงขึ้นได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

- จารุวรรณ หวะสุวรรณ. 2532. “การกำจัดและการใช้ประโยชน์จากน้ำทิ้งโรงงานแป้งมันสำหรั่ง โดยใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงร่วมกับ Heterotrophic Bacteria.” มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- พลสันต์ มหาขันธุ์. 2555. “รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์การคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจน.” มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
- อารีย์ คชฤทธิ์. 2551. “โคเอนไซม์ Q10 (Co-enzyme Q 10).” สำนักพัฒนาศักยภาพนักวิทยาศาสตร์ห้องปฏิบัติการกรมวิทยาศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Aagaard, J. and Sistrom, W. R. 1972. “Control of Synthesis of reaction center bacteriochlorophyll in photosynthetic bacteria.” *Photochemistry and Photobiology*. 15(2): 209–225.
- American Society for Testing and Materials. 1995. “Standard test method for chemical oxygen demand (dichromate oxygen demand) of water.” *ASTM Annual Book of Standard*. 1252-95.
- Aussel L, Pierrel F, Loiseau L, Lombard M, Fontecave M and Barras F. 2014. “Biosynthesis and physiology of coenzyme Q in bacteria.” *Biochim. Biophys. Acta*. 1837: 1004–1011.
- Beal, MF. 2004. “Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Damage in Alzheimer’s and Parkinson’s Disease and Coenzyme Q10 as a Potential Treatment.” *J Bioenerg Biomembr*. 36: 381-6.
- Bouitbir J., Gerda M. and Miljenko V. 2019. “Mechanisms of statin-associated skeletal muscle-associated symptoms.” *Pharmacological Research*. 45-2
- Brock, T. D. and Madigan M.T. 1991. **Biology of Microbiology**. 6<sup>th</sup> ed. Prantice-Hall. London.
- Caillet, J. and Droogmans, L. 1988. “Molecular cloning of the *Escherichia coli miaA* gene involved in the formation of delta 2-isopentenyl adenosine in tRNA.” *Journal of Bacteriology*. 170(9), 4147–4152.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Chew G. T. and Watts G.F. 2004. "Coenzyme Q10 Diabetic Endotheliopathy: Oxidative Stress and the Recoupling Hypothesis." *QJM*. 97: 537-48.
- Choi, G.S. Kim, Y. S. Seo, J. H. and Ryu, Y. W. 2005a. "Restricted Electron Flux Increases Coenzyme Q10 Production *Agrobacterium tumefaciens* ATCC4452." *Process Biochemistry*. 40: 3225-3229.
- Choi, J. H. Ryu, Y. W. and Seo, J. H. 2005b. "Biotechnological Production and Applications of Coenzyme Q10." *Applied Microbiology and Biotechnology*. 68: 9-15.
- Choi, J. H. Ryu, Y. W. Park. Y. C. and Seo, J. H. 2009. "Synergistic Effects of Chromosomal *ispB* Deletion and *dxs* Overexpression on Coenzyme Q10 Production in Recombination *Escherichia coli* Expressing *Agrobacterium tumefaciens dps* Gene." *Journal of Biotechnology*. 144(1): 64-9.
- Chuang, T.C. and Lai, C.L. 1978. "Study on treatment and utilization of molasses alcohol slop." *Proceedings of the International Conference on Water Pollution Control in Developing Countries*. 513-524.
- Cluis, C. P. Burja, A. M. and Martin, V. J. J. 2007. "Current Prospects for the Production of Coenzyme Q10 in Microbes." *Trends in Biotechnology*. 25: 514-521.
- Drews, G. and Golecki, JR. 1995. "Structure, molecular organization, and biosynthesis of membranes of purple bacteria." *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. 231-257.
- Ernster, L. and Dallner, G. 1995. "Physiological and medical aspects of ubiquinone Function." *Biochim Biophys Acta*. 1271(1): 195-204.
- Fales, L., Kryszak, L., and Zeilstra-Ryalls, J. (2001). "Control of *hemA* Expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: Effect of a Transposon Insertion in the *hbdA* Gene." *Journal of Bacteriology*, 183(5): 1568-1576.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Ha, S. J. Kim, Seo, S. Y., Jeya, J. H., Zhang, M., Ramu, Y. W., Kim, T., Lee, W. 2009. "Ca<sup>2+</sup> Increases the Specific Coenzyme Q10 Content in *Agrobacterium tumefaciens*." *Bioprocess Biosyst Eng.* 32: 697-700.
- Ha, S. J., Kim, S. Y., Seo, H. J., Moon, H. J., Lee, K. M. and Lee, J. K. 2007b. "Controlling the Sucrose Concentration increases Coenzyme Q10 Production in Fed Batch Culture of *Agrobacterium tumefaciens*." *Applied Microbiology and Biotechnology.* 76: 109-116.
- Ha, S. J. Kim, S. Y., Seo, H. J. Oh, D. K. and Lee, J. K. 2007a. "Optimization of Culture Conditions and Scale-Up to Pilot and Plant Scales for Coenzyme Q10 Production by *Agrobacterium tumefaciens*." *Applied Microbiology and Biotechnology.* 74: 974-980.
- Imhoff, J. F. and Truper, H. G. 1989. "Purple Non-Sulfur Bacteria." *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Baltimore: Williams & Wilkins.
- Jeong, S. K. Dao, V. T. Kien, N. and Kim, J. K. 2008. "Effect of pH and Light irradiation on CoQ10 Production Using *Rhodobacter sphaeroides*." *J. Fish. Sci. Technol.* 11(4): 219-223.
- Jeya, M., Moon, H. J., Lee, J. L., Kim, I. W and Lee, J. K. 2010. "Current State of Coenzyme Q10 Production and Its Applications." *Appl Microbiol Biotechnol.* 85: 1653-63.
- Khoshjou, F. and Farahnaz, D. 2014. "Mitochondrion and Its Role in Diabetic Nephropathy." *Iranian Journal of Kidney Diseases.* 8(5): 355-358.
- Kien, N. B., Kong, I-S., Lee, M-G. and Kim, J. K. 2010. "Coenzyme Q10 production in a 150-l reactor by a mutant strain of *Rhodobacter sphaeroides*." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* 37: 521- 529.
- Kobayashi, M. and Kurata, S.I. 1978. "The mass culture and cell utilization of photosynthetic bacteria." *Process Biochem.* 13(9): 27-30.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Kobayashi, M. 2000. "Waste Remediation and Treatment Using Anoxygenic Phototropic Bacteria." *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. 1269 – 1282.
- Koo, B. S., Gong, Y. J., Kim, S. Y., Kim, C. W. and Lee, H. C. 2010. "Improvement of Coenzyme Q10 Production by Increasing the NADH/NAD<sup>+</sup> Ratio in *Agrobacterium tumefaciens*." *Biosci Biotechnology Biochem*. 74: 895-898.
- Kumar, A., Kaur, H., Devi, P. and Mohan, V. 2009. "Role of Coenzyme Q10 (CoQ10) in Cardiac Disease, Hypertension and Meniere-Like Syndrome." *Pharmacology and Therapeutics*. 124(3): 259-268.
- Lee, J. K., Her, G., Kim, S. Y. and Seo, J. H. 2004. "Cloning and Functional Expression of the *dps* Gene Encoding Decaprenyl Diphosphate Synthase from *Agrobacterium tumefaciens*." *Biotechnology Progress*. 20: 51-56.
- Levett, P.N. 1990. "Anaerobic Bacteria a Functional Biology." *St Edmunds bury Press Ltd. Philadelphia*. 116.
- Lopez-Lluch, G., Rodriguez-Aguilera, J. C., Santos-Ocana, C. and Navas, P., 2010 "Is coenzyme Q a key factor in aging?" *Mech Ageing Dev*. 131: 225-35.
- Meganathan, R. 2001. "Ubiquinone biosynthesis in microorganisms." *FEMS Microbiol*. 203: 131-139.
- Meganathan, R. 2011. "Ubiquinone biosynthesis in microorganisms." *FEMS Microbiol Lett*. 203: 131-9.
- Morisco, C., Timarco, B. and Condorelli, M. 1993. "Effect of Coenzyme Q10 Therapy in Patients with Congestive Heart Failure: a Long-Term Multicenter Randomized Trial." *Clin Investig*. 71: S134-6.
- Ndikubwimana, J. de D. and Lee, H. B. 2014. "Enhanced Production Techniques, Properties and Uses of Coenzyme Q10." *Biotechnology Letters*. 36: 1917-1926.

Nichols B.P. and Green J.M. (1992). "Cloning and sequencing of *Escherichia coli* *ubiC* and purification of chorismatylase." *J. Bacteriol*. 174: 5309-5316.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนและเผยแพร่ความรู้ทางวิชาการโดยไม่หวังผลกำไร หากมีข้อผิดพลาดประการใดขออภัยเป็นอย่างสูงและขอเชิญชวนให้ทุกท่านช่วยกันตรวจสอบและแจ้งข้อผิดพลาดให้ทราบเพื่อปรับปรุงแก้ไขต่อไป

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Olliver, B. 1994. "Anaerobic bacteria from hypersaline environments." *Microbiol. Rev.* 58(1): 27-38.
- Park, Y. C., Kim, S. J., Choi, J. H., Lee, W. H., Park, K. M., Kawamukai, M., Ryu, Y. W. and Seo, J. H. 2005. "Batch and Fed-Batch Production of Coenzyme Q10 in Recombinant *Escherichia coli* Containing the Decaprenyldiphosphate Synthase Gene from *Gluconobacter suboxydans*." *Applied Microbiology and Biotechnology.* 67: 192-196.
- Pfenning, N. and H.G.Truper. 1989. "Anoxygenic phototrophic bacteria." **Bergey's Manual of Systemetic Bacteriology.** Vol.3. The William and Wilkins, Co., Baltimore.
- Rohmer, M., 1993. "Biosynthesis of the Triterpenoids of the Hopane Series in the Eubacteria: a Mine of New Enzyme Reactions." *Pure and Applied Chemistry.* 65: 1293-1298.
- Sasaki, K., Watanabe, M., Sude, Y., Ishizuka, A., and Noparatnaraporn, N. 2005. "Applications of photosynthetic bacteria for medical fields." *J. Biosci. Bioeng. (Japan).* 100-481.
- Sawada, Y. 1971. "A New Synonym of *Thinobius* Kiesenwetter, 1844 (Coleoptera: Staphylinidae)." *Zootaxa.* 748: 1-4.
- Seo, M. J. and Kim, S. O. 2010. "Effect of Limited Oxygen Supply on Coenzyme Q10 Production and its Relation to Limited Electron Transfer and Oxidative Stress in *Rhizobium radiobacter* T6102." *Journal of Microbiology and Biotechnology.* 20(2): 346-349.
- Singh, R.B, Wander, G.S, Rastogi, A., Shukla, P. K., Mittal, A. and Sharma, J. P. 1998. "Randomized, Double Blind, Placebo Controlled Trial of CoQ10 in Patients with Acute Myocardial Infarction." *Cardiovasc Drugs Ther.* 12: 347-53.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Stately, J. T. Bryant, M. P. Pfenning, N. and Holt, J. G. 1989. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 3<sup>rd</sup> ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Tian, Y., Yue, T., Yuan, Y., Soma, P. K. and Lo, Y. M. 2010. "Improvement of Cultivation Medium for Enhanced Production of Coenzyme Q10 by Photosynthetic *Rhodospillum rubrum*." *Biochemical Engineering Journal*. 51: 160-166.
- Tian, Y., Yue, T., Yuan, Y., Soma, P. K., Williams, P. D., Machado, H. F., Kratochvil R. J., Wel, C. I. and Lo, Y. M. 2010b. "Tobacco Biomass Hydrolysate Enhances Coenzyme Q10 Production Using Photosynthetic *Rhodospillum rubrum*." *Bioresource Technology*. 101: 7877-7881.
- Van Niel, C. B. 1944. "The Culture, General Physiology, Morphology, and Classification of the Non-Sulfur Purple and Brown Bacteria." *Bacteriol Rev*. 8:1-118.
- West, D. D. 2004. "Synthesis of coenzyme Q10, Ubiquinone." *Patent Application Publication*.10: 700-424.
- Woronowicz, K., Sha, D., Frese, R. N., and Niederman. 2011. "The Accumulation of the Light-Harvesting 2 Complex during Remodeling of the *Rhodobacter sphaeroides* Intracytoplasmic Membrane Results in a Slowing of the Electron Transfer Turnover Rate of Photochemical Reaction Centers." *Biochemistry*. 50(22): 4819-4829.
- Wu, S. and Tsai, J. J. 2013. "Sepration and Purification of Coenzyme Q10 from *Rhodobacter sphaeroides*" *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 44: 872-878.
- Yahong, Y., Tian, Y., and Yue, T. 2012. "Improvement of Coenzyme Q10 Production: Mutagenesis Induced by High Hydrostatic Pressure Treatment and Optimization of Fermentation Conditions." *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 1-8.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Yen, H.W., Feng, C.Y. and Kang, J.L. 2010. Cultivation of *Rhodobacter sphaeroides* in the Stirred Bioreactor with Different Feeding Strategies for CoQ10 Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 160: 1441-1449.
- Yen, H. W. and Chiu, C. H. 2007. "The Influences of Aerobic-Dark and Aerobic-Light Cultivation on CoQ10 Production by *Rhodobacter sphaeroides* in the Submerged Fermenter." *Enzyme and Microbial Technology*. 41: 600-604.
- Yen, H. W. and Shin, T. Y. 2009. "Coenzyme Q10 Production by *Rhodobacter sphaeroides* in Stirred Tank and in Airlift Bioreactor." *Bioprocess Biosyst Eng*. 32: 711-716.
- Yoshida, H. Kotani, Y. Ochiai, K. and Araki, K. 1998. "Production of Ubiquinone-10 Using Bacteria." *Journal of General and Applied Microbiology*. 44 : 19-26.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 1. สูตรอาหาร AM

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงสูตร AM ประกอบด้วย

แหล่งคาร์บอน	10.0	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด (Yeast extract)	1.0	กรัมต่อลิตร
โมโนโซเดียมกลูตาเมต	10.0	กรัมต่อลิตร
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	10.0	กรัมต่อลิตร
ในกรณีที่เตรียมเป็นอาหารแข็งให้เติมวุ้น	15.0	กรัมต่อลิตร

ปรับความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.8-7.2

แหล่งคาร์บอนสารอินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ โซเดียมอะซิเตท กลูโคส และ แป้งมันสำปะหลัง แหล่งคาร์บอนสารเคมีใช้ในการทดลอง ได้แก่ น้ำเสียจากบ่อ Oxidation Pond และน้ำเสียจากบ่อ Anaerobic Digestion (จากระบบบำบัดน้ำเสียจากโรงงานขนส่งสารเคมี)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

### วิธีวิเคราะห์

#### 1. การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง

นำตะกอนเซลล์ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ที่ได้จากการสกัดโคเคนโซลิวชัน นำไปอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศา เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรือจนกว่าน้ำหนักจะคงที่ นำออกจากตู้อบทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งสัปดาห์

#### 2. การวิเคราะห์ COD จากวิธีของ American Society for Testing and Materials, 1995

##### 2.1 การเตรียมรีเอเจนต์

2.1.1 สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต ความเข้มข้น 0.0167 โมลาร์

ชั่งสารมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต 4.913 กรัม ซึ่งถูกทำให้แห้งในเตาอบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ใส่ลงในน้ำกลั่นประมาณ 500 มิลลิลิตร ค่อยๆเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 167 มิลลิลิตร เติมนีโอควิกซัลเฟต 33.3 กรัม ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วปรับให้มีปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

##### 2.2.2 กรดซัลฟิวริกรีเอเจนต์

ละลายซิลเวอร์ซัลเฟต (Silver Sulfate;  $Ag_2SO_4$ ) 10.11 กรัม ในกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1000 มิลลิลิตร ใช้วิธีการกวนอย่างต่อเนื่องซึ่งวิธีนี้จะสามารถทำให้ซิลเวอร์ซัลเฟตละลายได้เร็วขึ้น

##### 2.2 การเตรียมตัวอย่าง

2.2.1 นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองฝาเกลียวที่ผ่านการล้างด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์

2.2.2 เติมน้ำที่ใช้น้ำในการย่อยสลายซึ่งได้แก่ สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต 1.5 มิลลิลิตร

2.2.3 ค่อย ๆ เติมน้ำกรดซัลฟิวริกรีเอเจนต์ 3.5 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดโดยให้ไหลลงก้นหลอดแก้ว ผสมให้เข้ากัน

2.2.4 นำตัวอย่างที่เตรียมได้ มาเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วทิ้งให้เย็นถึงอุณหภูมิห้อง ถ้ามีตะกอนเกิดขึ้นให้ตั้งสารละลายทิ้งไว้จนตะกอนนอนก้นแล้วนำสารละลายส่วนใสไม่มีตะกอนมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรด้วยเอกซเรย์เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์การใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.3 การสร้างกราฟมาตรฐาน COD

2.3.1 ละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลท ซึ่งอบให้แห้งจนน้ำหนักคงที่แล้วที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นหนัก 0.425 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร และเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ 100, 200, 300, 400 และ 500 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

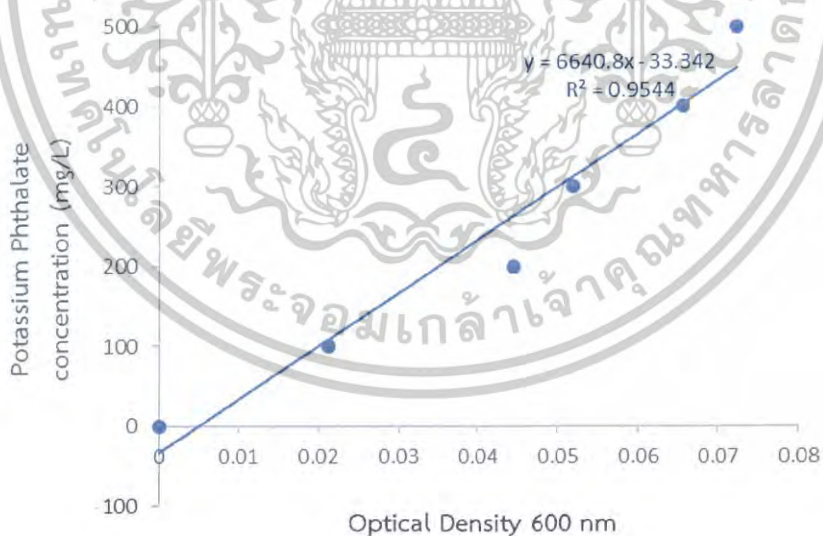
2.3.3 นำสารที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.1 มาใส่ลงในหลอดทดลองฝาเกลียวที่ผ่านการล้างด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ 2.5 มิลลิลิตร

2.3.4 เติมน้ำสารละลายที่ใช้ในการย่อยสลายซึ่งได้แก่ สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต 1.5 มิลลิลิตร

2.3.5 ค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเอเจนต์ 3.5 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดโดยให้ไหลลงก้นหลอดแก้ว ผสมให้เข้ากัน

2.3.6 นำตัวอย่างที่เตรียมได้ มาเร่งปฏิกิริยาที่ อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วทิ้งให้เย็นถึงอุณหภูมิห้อง ถ้ามีตะกอนเกิดขึ้นให้ตั้งสารละลายทิ้งไว้จนตะกอนนอนก้นแล้วนำสารละลายใสไม่มีตะกอนมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

2.3.7 ทำแบบลงค์โดยใช้ น้ำกลั่น ซึ่งมีรีเอเจนต์ต่าง ๆ และมีปริมาตรน้ำกลั่นเท่ากับ ปริมาตรของตัวอย่างน้ำที่ใช้คือ 2.5 มิลลิลิตร



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลทด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3. การสกัดและวิเคราะห์ปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็น ดัดแปลงมาจากวิธีของ

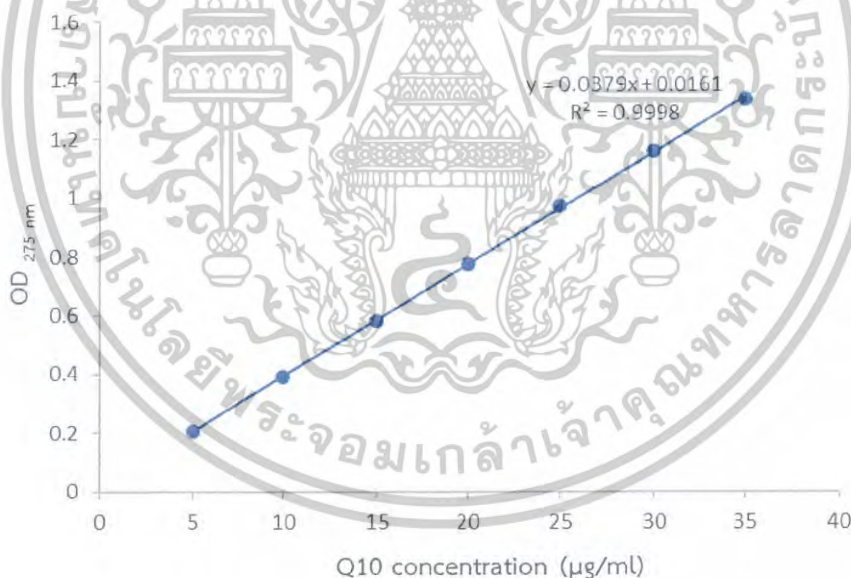
Yen และ Chiu, 2007

นำสารละลายตัวอย่างปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวก์ ปั่นเหวี่ยงที่ 10000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 10 นาที นำส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 10000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 10 นาที นำส่วนใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์มาสกัดด้วยสารละลายผสม คลอโรฟอร์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 2:1 (v/v) ผสมให้เข้ากัน กลิ้งด้วยเครื่องกลิ้งในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเฉพาะส่วนใสวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร แล้วคัดเลือกตัวอย่างที่มีค่าสูงไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

### 4. การสร้างกราฟมาตรฐานโคเอนไซม์คิวเท็นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

4.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานโคเอนไซม์คิวเท็นเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารมาตรฐานโคเอนไซม์คิวเท็น 0.0005 กรัม ละลายด้วยเอทานอล 5 มิลลิลิตร

4.2 นำสารละลายมาตรฐานที่ได้จากข้อ 4.1 มาเจือจางด้วยเอทานอล ให้ได้ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 25, 30, และ 35 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์



รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานโคเอนไซม์คิวเท็นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 5. การวิเคราะห์ปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็นด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลว

สมรรถนะสูง ดัดแปลงมาจากวิธีของ Yahong และคณะ, 2012

### 5.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างที่สกัดได้มา 100 ไมโครลิตร ใส่เอทานอล 900 ไมโครลิตร กรองด้วย filter membrane ขนาด 0.45 นาโนเมตร เก็บรักษาในที่มืดก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

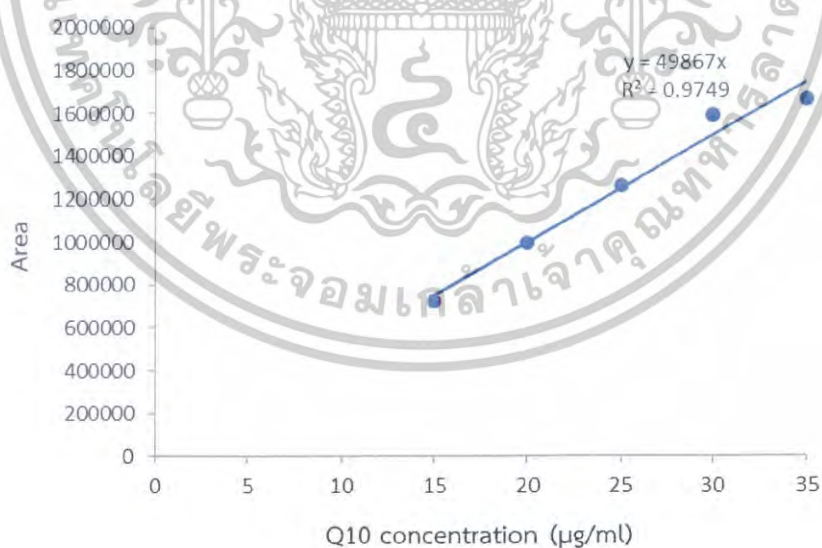
### 5.2 การสร้างกราฟมาตรฐานโคเอนไซม์คิวเท็นด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

5.2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานโคเอนไซม์คิวเท็นเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารมาตรฐานโคเอนไซม์คิวเท็น 0.0005 กรัม ละลายด้วยเอทานอล 5 มิลลิลิตร

5.2.2 นำสารละลายมาตรฐานที่ได้จาก ข้อ 5.2.1 มาเจือจางด้วยเอทานอล ให้ได้ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 25, 30, และ 35 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

5.2.3 นำสารละลายที่ได้กรองด้วย filter membrane ขนาด 0.45 นาโนเมตร

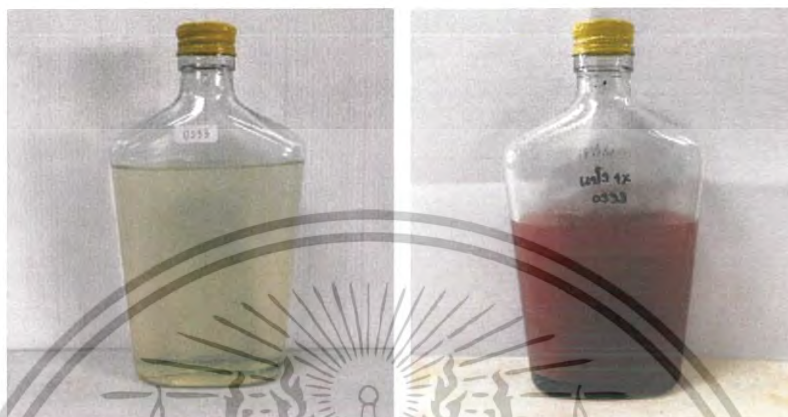
5.2.4 วิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 เฟสเคลื่อนที่คือ เมทานอลต่อเอทานอล ในอัตราส่วน 1:9 (v/v) ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วย UV-detector ที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร



รูปที่ ก.3 กราฟมาตรฐานโคเอนไซม์คิวเท็นด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ค

รูปการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. ในขวดอาหาร

(วันที่ 0)

(วันที่ 14)

รูปที่ ค.1 ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ OS33 ในอาหารเหลว สูตร AM ที่แหล่งคาร์บอนแบ่ง 1.0% เป็นเวลา 14 วัน ที่ความเข้มข้นแสง 1000 - 1500 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 - 40 องศาเซลเซียส สภาวะ Anaerobic-light

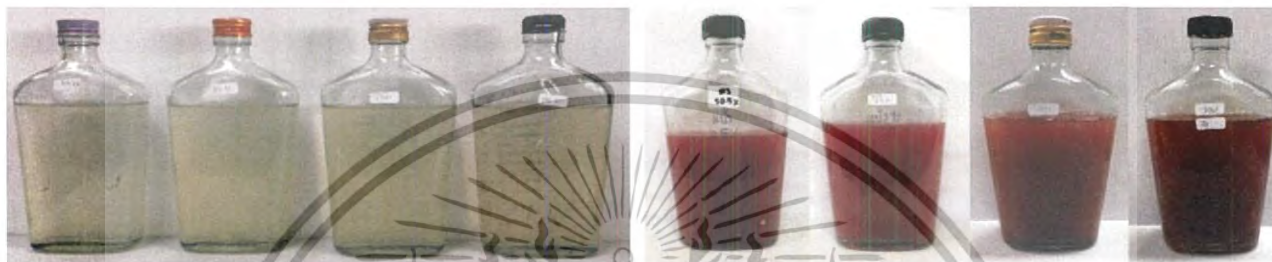


(วันที่ 0)

(วันที่ 14)

รูปที่ ค.2 ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 ในอาหารเหลว สูตร AM ที่แหล่งคาร์บอนโซเดียมอะซิเตท 0.5% เป็นเวลา 14 วัน ที่ความเข้มข้นแสง 1000 - 1500 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 - 40 องศาเซลเซียส สภาวะ Anaerobic-light

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(วันที่ 0)

(วันที่ 14)

รูปที่ ค.3 ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodospseudomonas* sp. สายพันธุ์ 13 ในอาหารเหลวสูตร AM ที่แหล่งคาร์บอนแบ่งความเข้มข้น 0.5% 1.0% 2.0% และ 3.0% ตามลำดับ เป็นเวลา 14 วัน ที่ความเข้มข้นแสง 1000 - 1500 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 - 40 องศาเซลเซียส สภาวะ Anaerobic-light



(วันที่ 0)

(วันที่ 14)

รูปที่ ค.3 ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodospseudomonas* sp. สายพันธุ์ 14 ในอาหารเหลวสูตร AM ที่แหล่งคาร์บอนแบ่งความเข้มข้น 0.5% 1.0% 2.0% และ 3.0% ตามลำดับ เป็นเวลา 14 วัน ที่ความเข้มข้นแสง 1000 - 1500 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 - 40 องศาเซลเซียส สภาวะ Anaerobic-light



รูปที่ ค.4 ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodospseudomonas* sp. สายพันธุ์ OS33 ในอาหารเหลวสูตร AM ที่แหล่งน้ำเสียจากบ่อ Oxidation Pond ที่ความเข้มข้น 0.66 0.50 0.33 0.25 และ 0.16 เท่า ตามลำดับ เป็นเวลา 15 วัน ที่ความเข้มข้นแสง 1000 - 1500 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 - 40 องศาเซลเซียส สภาวะ Anaerobic-light



รูปที่ ค.5 ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodospseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 ในอาหารเหลวสูตร AM ที่แหล่งน้ำเสียจากบ่อ Oxidation Pond ที่ความเข้มข้น 0.66 0.50 0.33 0.25 และ 0.16 เท่า ตามลำดับ เป็นเวลา 15 วัน ที่ความเข้มข้นแสง 1000 - 1500 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 - 40 องศาเซลเซียส สภาวะ Anaerobic-light



รูปที่ ค.6 ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodospseudomonas* sp. สายพันธุ์ 13 ในอาหารเหลวสูตร AM ที่แหล่งน้ำเสียจากบ่อ Oxidation Pond ที่ความเข้มข้น 0.66 0.50 0.33 0.25 และ 0.16 เท่า ตามลำดับ เป็นเวลา 15 วัน ที่ความเข้มข้นแสง 1000 - 1500 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 - 40 องศาเซลเซียส สภาวะ Anaerobic-light



รูปที่ ค.7 ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodospseudomonas* sp. สายพันธุ์ 14 ในอาหารเหลวสูตร AM ที่แหล่งน้ำเสียจากบ่อ Oxidation Pond ที่ความเข้มข้น 0.66 0.50 0.33 0.25 และ 0.16 เท่า ตามลำดับ เป็นเวลา 15 วัน ที่ความเข้มข้นแสง 1000 - 1500 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 - 40 องศาเซลเซียส สภาวะ Anaerobic-light



(วันที่ 0)

(วันที่ 5)

(วันที่ 10)

(วันที่ 15)

รูปที่ ค.8 ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ OS33 ในอาหารเหลวสูตร AM ที่แหล่งน้ำเสียจากบ่อ Anaerobic Digestion ที่ความเข้มข้น 0.66 0.50 0.33 0.25 และ 0.16 เท่า ตามลำดับ เป็นเวลา 15 วัน ที่ความเข้มข้นแสง 1000 - 1500 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 - 40 องศาเซลเซียส สภาวะ Anaerobic-light



(วันที่ 0)

(วันที่ 5)

(วันที่ 10)

(วันที่ 15)

รูปที่ ค.9 ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 ในอาหารเหลวสูตร AM ที่แหล่งน้ำเสียจากบ่อ Anaerobic Digestion ที่ความเข้มข้น 0.66 0.50 0.33 0.25 และ 0.16 เท่า ตามลำดับ เป็นเวลา 15 วัน ที่ความเข้มข้นแสง 1000 - 1500 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 - 40 องศาเซลเซียส สภาวะ Anaerobic-light



(วันที่ยี่ 0)

(วันที่ยี่ 5)

(วันที่ยี่ 10)

(วันที่ยี่ 15)

รูปที่ยี่ ค.10 ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodospseudomonas* sp. สายพันธุ์ 13 ในอาหารเหลวสูตร AM ที่แหล่งน้ำเสียจากบ่อ Anaerobic Digestion ที่ความเข้มข้น 0.66 0.50 0.33 0.25 และ 0.16 เท่า ตามลำดับ เป็นเวลา 15 วัน ที่ความเข้มข้นแสง 1000 - 1500 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 - 40 องศาเซลเซียส สภาวะ Anaerobic-light



(วันที่ยี่ 0)

(วันที่ยี่ 5)

(วันที่ยี่ 10)

(วันที่ยี่ 15)

รูปที่ยี่ ค.11 ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodospseudomonas* sp. สายพันธุ์ 14 ในอาหารเหลวสูตร AM ที่แหล่งน้ำเสียจากบ่อ Anaerobic Digestion ที่ความเข้มข้น 0.66 0.50 0.33 0.25 และ 0.16 เท่า เป็นเวลา 15 วัน ที่ความเข้มข้นแสง 1000 - 1500 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 - 40 องศาเซลเซียส สภาวะ Anaerobic-light