การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น ด้วยการเลี้ยงเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp.14 แบบต่อเนื่อง

COENZYME Q_{10} PRODUCTION BY CONTINUOUS CULTIVATION OF *Rhodopseudomonas* sp.14

มนัญญา ศรีสวัสดิ์เพชร

รัตนาภรณ์ อินศร

อมรรัตน์ เขียวระยับ

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์
ปริญญาบัณฑิตสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COENZYME Q_{10} PRODUCTION BY CONTINUOUS CULTIVATION OF *Rhodopseudomonas* sp.14

MANANYA SRISAWATPET

RATTANAPORN INSORN

AMORNRAT KEAWRAYAB

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE IN BIOTECNOLOGY DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG ACADEMIC YEAR 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น ด้วยการเลี้ยงเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. 14 แบบต่อเนื่อง Coenzyme Q_{10} production by the continuous cultivation of *Rhodopseudomonas* sp. 14		
ชื่อนักศึกษา	นางสาวมนัญญา	ศรีสวัสดิ์เพชร	56050889
	นางสาวรัตนาภรณ์	อินศร	56050893
	นางสาวอมรรัตน์	เขียวระยับ	56050946
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต		
ภาควิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ		
ปีการศึกษา	2559		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์		

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิตสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปีการศึกษา 2559

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ (ประธานกรรมการ)	
ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี (กรรมการ)	
ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์ (กรรมการ)	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น ด้วยการเลี้ยงเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp.14 แบบต่อเนื่อง
Coenzyme Q_{10} production by the continuous cultivation of *Rhodopseudomonas* sp.14

ชื่อนักศึกษา	นางสาวมนัญญา	ศรีสวัสดิ์เพชร	56050889
	นางสาวรัตนาภรณ์	อินศร	56050893
	นางสาวอมรรัตน์	เขียวระยับ	56050946

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
คณะ วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา 2559
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์

บทคัดย่อ

ศึกษาผลของอัตราการไหลของอาหารเลี้ยงเชื้อ (60 80 และ 100 ไมโครลิตรต่อนาที ตามลำดับ) ต่อการเจริญและการสร้างโคเอนไซม์คิวเท็นของ Rhodopseudomonas sp. 14 ในการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่อง ภายใต้สภาวะ มีแสง ไม่มีอากาศ โดยเปรียบเทียบระหว่างการใช้กรดอินทรีย์ในน้ำเสียสังเคราะห์ และโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน (ตามลำดับ) พบว่าที่อัตราการไหล 80 ไมโครลิตรต่อนาที เชื้อมีการเจริญ และสร้างโคเอนไซม์คิวเท็นได้สูงสุด (14.82 และ 15.79 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ) ต่อมาศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่อัตราการไหล 80 ไมโครลิตรต่อนาที โดยใช้โซเดียมอะซิเตต 0.50 0.75 และ 1.00 เปอร์เซ็นต์ และกรดอินทรีย์ในน้ำเสียสังเคราะห์ ตามลำดับ พบว่าการเลี้ยงเชื้อด้วยโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ให้การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นสูงสุด 15.45 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ขณะที่การใช้โซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 1.00 เปอร์เซ็นต์ ให้การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นต่ำที่สุด (11.81 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)

คำสำคัญ : กรดอินทรีย์ โซเดียมอะซิเตต อัตราการไหล *Rhodopseudomonas* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Coenzyme Q_{10} production by the continuous cultivation of *Rhodopseudomonas* sp.14		
Students	Miss.Mananya	Srisawatpet	56050889
	Miss.Rattanaporn	Insorn	56050893
	Miss.Amornrat	Keawrayab	56050946
Degree	Bachelor of Science		
Department	Biotechnology		
Faculty	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
Academic Year	2016		
Advisor	Asst.Prof.Dr.Somchai Krairak		

ABSTRACT

The effect of medium feed rate (60, 80 and 100 µL/min, respectively) on continuous cultivation for growth and Coenzyme Q_{10} production of *Rhodopseudomonas* sp. 14 was studied. The cultivation was examined in anaerobic with light condition by using organic acid from synthetic waste water and 1.0 % Na-acetate as C-source, respectively. It was found that, the medium flow rate at 80 µL/min presented the maximal growth and coenzyme Q_{10} production (14.82 and 15.79 µg/g-DCW, respectively). Furthermore, C-source at feeding rate of 80 µL/min was also studied by supplying with 0.50, 0.75 and 1.00% sodium acetate and the organic acid from synthetic waste water, respectively. The result showed that, the feeding medium of 0.5% sodium acetate gave the highest coenzyme Q_{10} production (15.45 µg/g-DCW) among the others. However, the feeding medium of 1.00% sodium acetate showed the lowest coenzyme Q_{10} production (11.81 µg/g-DCW).

Keyword : Organic acid Na-acetate Flowrate *Rhodopseudomonas* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องด้วยการได้รับความอนุเคราะห์จากอาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ ที่ให้คำปรึกษาแนะนำ ตลอดจนช่วยแก้ไขปัญหาข้อบกพร่องต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างขั้นตอนการทดลอง รวมทั้งคณะกรรมการโครงงานพิเศษ ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ และ ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ ตลอดทั้งอาจารย์ท่านอื่นที่ได้ให้ความรู้ ข้อเสนอแนะ และความช่วยเหลือในทุกๆเรื่อง

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเบิก – คืนสารเคมีและอุปกรณ์ต่างๆที่ใช้สำหรับการทดลอง รวมทั้งเจ้าหน้าที่ดูแลอาคารที่คอยอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการต่าง ๆ ตลอดการทำโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณสำนักหอสมุดกลาง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่เอื้อเฟื้อสถานที่ และข้อมูลในการค้นคว้าหาความรู้ในการประกอบการทำโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ตลอดจนญาติพี่น้องของผู้จัดทำทุกๆคนที่คอยให้กำลังใจในเรื่องต่างๆ และคอยให้ความช่วยเหลือให้คำแนะนำในการทำโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณเพื่อนๆและพี่ๆทุกคนที่คอยช่วยเหลือให้คำแนะนำในการทดลอง อีกทั้งยังเอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีต่างๆที่ใช้ในการทดลอง

คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงงานพิเศษเล่มนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่สนใจหรือผู้ที่ต้องการจะศึกษาหาความรู้เกี่ยวกับโครงงานนี้ หากมีข้อผิดพลาดประการใดคณะผู้จัดทำขออภัยมา ณ โอกาสนี้ด้วย

มนัญญา ศรีสวัสดิ์เพชร

รัตนาภรณ์ อินศร

อมรรัตน์ เขียวระยับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขต	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 โครงสร้างและคุณสมบัติของโคเอนไซม์คิวเท็น	3
2.1.1 โครงสร้างโคเอนไซม์คิวเท็น	4
2.1.2 ชีวสังเคราะห์ของโคเอนไซม์คิวเท็น	5
2.1.3 ประโยชน์ของโคเอนไซม์คิวเท็น	7
2.2 แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง (Photosynthetic Bacteria)	9
2.2.1 โครงสร้างของเซลล์จุลินทรีย์สังเคราะห์แสง	10
2.2.2 ลักษณะของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง (ดวงพร, 2530)	10
2.3 การจัดจำแนกแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง	11
2.3.1 แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีม่วง (Purple photosynthetic bacteria)	12
2.3.2 แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีเขียว (Green photosynthetic bacteria)	13
2.4 แบคทีเรียแสงสังเคราะห์ด้วยแสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน	13
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน	14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.1 อุณหภูมิ (Temperature) 14
2.5.2 ความเข้มแสง (Light intensity) 14
2.5.3 แหล่งคาร์บอน (Carbon source) 14
2.5.4 ความเข้มของซัลไฟด์ (Sulfide concentration) 15
2.5.5 ออกซิเจน (Oxygen) 15
2.5.6 พีเอช (pH) 16
2.5.7 วิตามิน (Vitamin) 16
2.5.8 ความเข้มข้นของเกลือ (Salinity) 16
2.6 แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงกลุ่มไม่สะสมกำมะถันเพื่อการเกษตร และสิ่งแวดล้อม 17
2.6.1 การใช้เพื่อบำบัดน้ำเสีย และของเสีย 17
2.6.2 การใช้ในทางการแพทย์ 18
2.6.3 การใช้แหล่งอาหารเสริมของสัตว์ 18
2.6.4 การใช้ในการเกษตร 19
2.7 จลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์ 19
2.7.1 Batch fermentation 20
2.7.2 Fed-batch fermentation 23
2.7.3 Continuous fermentation 24
2.8 ข้อดีและข้อเสียของระบบต่อเนื่อง 28
2.9 การใช้ระบบต่อเนื่องในอุตสาหกรรม 31
2.9.1 การใช้ระบบต่อเนื่องในการผลิตมวลเซลล์ 31
2.9.2 การใช้ระบบการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องในการผลิตเบียร์ 32
2.9.3 การใช้ระบบต่อเนื่องในการแยก และปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ 33
2.9.4 การใช้ระบบต่อเนื่องในการหาข้อมูลพื้นฐานของจุลินทรีย์ 33
2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 34

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์ 36
3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง 36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 สารเคมี 36
3.4 วิธีการทดลอง 37
3.4.1 การเตรียมหัวเชื้อ 37
3.4.2 การเตรียมน้ำเสียสังเคราะห์ 37
3.4.3 การเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องโดยใช้กรดอินทรีย์ในน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน 37
3.4.4 การเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องโดยใช้โซเดียมอะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอน 39
3.4.5 ศึกษาอัตราการไหลของอาหารเลี้ยงเชื้อ 40
3.4.6 ศึกษาผลของความเข้มข้นโซเดียมอะซิเตตที่เหมาะสม 40
3.5 วิเคราะห์ผล 41
3.5.1 การวิเคราะห์โคเอนไซม์คิวเท็น 41
3.5.2 การวิเคราะห์การเจริญจากน้ำหนักเซลล์แห้ง 41
3.5.3 การวิเคราะห์ความเข้มข้นกรดในน้ำเสียสังเคราะห์ 41
3.5.4 การคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะ 41
บทที่ 4 ผลการทดลอง
4.1 ศึกษาอัตราการไหลในการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องเพื่อผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น 42
4.1.1 ผลของอัตราการไหล 60 ไมโครลิตรต่อนาที 46
4.1.2 ผลของอัตราการไหล 80 ไมโครลิตรต่อนาที 49
4.1.3 ผลของอัตราการไหล 100 ไมโครลิตรต่อนาที 52
4.2 ศึกษาผลของความเข้มข้นโซเดียมอะซิเตตในอาหารเหลวที่ไหลเข้าระบบเลี้ยงเชื้อ 56
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ
5.1 สรุปผลการวิจัย 60
5.2 ข้อเสนอแนะ 61
บรรณานุกรม 62
ภาคผนวก ก. 67
ภาคผนวด ข. 68
ภาคผนวก ค. 71

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 การจัดจำแนกวงศ์ สกุล และสายพันธุ์ของ Phototrophic Bacteria มีดังนี้ ชั้น (Order) วงศ์ (Family) สกุล (Genus) สายพันธุ์ (Species)	11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1 โครงสร้างโคเอนไซม์คิวเท็น	1
2.1 ปฏิกิริยารีดอกซ์ของวงแหวนควิโนน เมื่อควิโนนในรูปที่ถูกออกซิไดซ์ (Q) สามารถที่จะรับอิเล็กตรอนแล้วเปลี่ยนเป็นเซมิควิโนน (Q-•) ต่อมาเมื่อได้รับอิเล็กตรอนอนุภาคที่สอง และโปรตรอนอีกสองอนุภาค จะกลายเป็นควิโนนที่อยู่ในรูปที่ถูกรีดิวซ์หรือที่เรียกว่าไดไฮโดรควิโนน (QH2)	4
2.2 วิถีกรดเมวาโลนิก (Mevalonic acid pathway)	5
2.3 ชีวสังเคราะห์วงแหวนควิโนน (เมื่อ PPHB คือ Polyprenyl para-hydroxybenzoate; COQ2 คือ S. cerevisiae gene ประกอบด้วย Prenyltransferase catalyzing โดยจะนำ Polyisoprenoid chain สู่ Para-hydroxybenzoate; COQ3 คือ S. cerevisiae gene ประกอบด้วย S-adenosylmethionine O-methyl transferase)	6
2.4 ชีวสังเคราะห์ของหน่วยไอโซปรีน (Isoprenenoid unit)	7
2.5 บทบาทของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงในธรรมชาติ	9
2.6 แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงในวงศ์ Chromatiaceae (A) และแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงในวงศ์ Rhodospirillaceae (B)	12
2.7 แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงในวงศ์ Chlorobiaceae	13
2.8 กราฟแสดงการเจริญของจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงในระบบ batch	21
2.9 ผลของความเข้มข้นของสับสเตรทเริ่มต้นต่อปริมาณเซลล์สูงสุด	22
2.10 ผลของความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหลือต่ออัตราการเจริญจำเพาะของแบคทีเรีย	23
2.11 ผลของอัตราการเจือจางต่อความเข้มข้นของมวลชีวเซลล์และสับสเตรทที่เหลือที่สภาวะคงที่ เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีค่า Ks ต่ำ ในระบบ chemostat	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.12 ผลของอัตราการเจือจางต่อความเข้มข้นของมวลเซลล์และสับสเตรทที่ 27
เหลือที่สภาวะคงที่ เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีค่า K_s สูง ในระบบ chemostat
2.13 ผลของความเข้มข้นของสับสเตรทเริ่มต้น ต่อความเข้มข้นของมวลเซลล์ 28
และสับสเตรทที่เหลือที่สภาวะคงที่ เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบ chemostat
2.14 ผลของอัตราการเจือจางต่อ biomass productivity เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ 29
แบบต่อเนื่อง
3.1 ชุดการทดลองที่ใช้กรดอินทรีย์ในน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน 38
3.2 แผนผังชุดการทดลองที่ใช้กรดอินทรีย์ในน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน 38
3.3 ชุดการทดลองที่ใช้โซเดียมอะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอน 39
3.4 แผนผังชุดการทดลองที่ใช้โซเดียมอะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอน 40
4.1 ชุดการทดลองที่ใช้กรดอินทรีย์ในน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน 43
4.2 แผนผังชุดการทดลองที่ใช้กรดอินทรีย์ในน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน 43
4.3 ชุดการทดลองที่ใช้โซเดียมอะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอน 44
4.4 แผนผังชุดการทดลองที่ใช้โซเดียมอะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอน 45
4.5 การเจริญของ Rhodopseudomonas sp. S14 ที่อัตราการให้อาหาร 48
60 ไมโครลิตรต่อนาที โดยที่ (ก.) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข.) อัตราการเจริญจำเพาะ (ค.)
ความเข้มข้นโคเอนไซม์คิวเท็น และ (ง.) ความเข้มข้นกรดอินทรีย์ในน้ำเสีย ● ซึ่งแทน
กรดอินทรีย์จากน้ำเสียที่แพร่ผ่านแผ่นเยื่อเมมเบรน เป็นแหล่งคาร์บอน ▲ โซเดียมอะซิเตต
เป็นแหล่งคาร์บอน และ △ ความเข้มข้นกรดอินทรีย์ ตามลำดับ
4.6 การเจริญของ Rhodopseudomonas sp. S14 ที่อัตราการให้อาหาร 52
80 ไมโครลิตรต่อนาที โดยที่ (ก.) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข.) อัตราการเจริญจำเพาะ (ค.)
ความเข้มข้นโคเอนไซม์คิวเท็น และ (ง.) ความเข้มข้นกรดอินทรีย์ในน้ำเสีย ● ซึ่งแทน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดอินทรีย์จากน้ำเสียที่แพร่ผ่านแผ่นเยื่อเมมเบรนเป็นแหล่งคาร์บอน

▲ โซเดียมอะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอน และ △ ความเข้มข้นกรดอินทรีย์ ตามลำดับ

4.7 การเจริญของ *Rhodopseudomonas* sp. S14 ที่อัตราการให้อาหาร 54

100 ไมโครลิตรต่อนาที โดยที่ (ก.) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข.)อัตราการเจริญจำเพาะ (ค.)

ความเข้มข้นโคเอนไซม์คิวเท็น และ (ง.) ความเข้มข้นกรดอินทรีย์ในน้ำเสีย ● ซึ่งแทน

กรดอินทรีย์จากน้ำเสียที่แพร่ผ่านแผ่นเยื่อเมมเบรนเป็นแหล่งคาร์บอน ▲ โซเดียมอะซิเตต

เป็นแหล่งคาร์บอน และ △ ความเข้มข้นกรดอินทรีย์ ตามลำดับ

4.8 ความเข้มข้นกรดอินทรีย์ในขวดเตรียมน้ำเสียสังเคราะห์ที่เวลาต่างๆ 55

4.9 การเจริญของ Rhodopseudomonas sp. S14 ที่อัตราการให้อาหาร 58

80 ไมโครลิตรต่อนาที โดยที่ (ก.) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข.) อัตราการเจริญจำเพาะ (ค.)

ความเข้มข้นโคเอนไซม์คิวเท็น ● ซึ่งแทน กรดอินทรีย์จากน้ำเสียที่แพร่ผ่านแผ่น

เยื่อเมมเบรนเป็นแหล่งคาร์บอน ◇ โซเดียมอะซิเตต 0.5 เปอร์เซ็นต์

□ โซเดียมอะซิเตต 0.75 เปอร์เซ็นต์ ▲ โซเดียมอะซิเตต 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

4.10 ความเข้มข้นโคเอนไซม์คิวเทน ที่ได้จากวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟี 59

ของเหลวสมรรถนะสูง จากการเลี้ยงเชื้อด้วยอัตราการไหลของอาหาร

80 ไมโครลิตรต่อนาที ความเข้มข้นโซเดียมอะซิเตต 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 144 ชั่วโมง

ข.1 กราฟมาตรฐานโคเอนไซม์คิวเทนโดยเครื่องโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง 69

ข.2 กราฟมาตรฐานโคเอนไซม์คิวเทนโดยเครื่อง Spectrophotometer 70

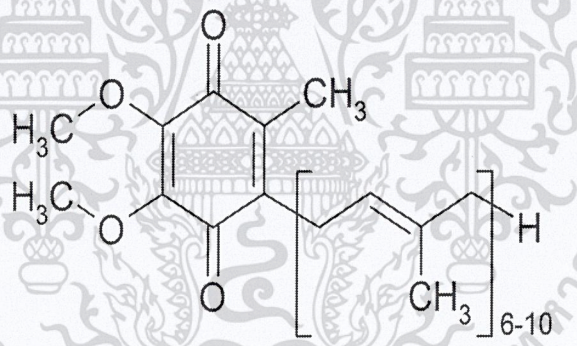
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

โคเอนไซม์คิวเท็น (Coenzyme Q_{10}) หรือยูบิควิโนน (Ubiquinone) ประกอบด้วยวงแหวน 2,3-dimethoxy-methyl-benzoquinone และสายยาวของ Monosaturated isoprenoid จำนวน 10 หน่วย ดังแสดงในรูปที่ 1.1 พบได้ในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ โดยมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีของสิ่งมีชีวิต) Kalen และคณะ, 1987; Kawamukai, 2002) เป็นสารที่มีคุณสมบัติคล้ายวิตามิน ละลายได้ในไขมัน มีอยู่ตามธรรมชาติในร่างกาย และร่างกายสามารถผลิตได้เอง พบในเซลล์ทุกเซลล์ที่มีชีวิต มีความจำเป็นต่อร่างกาย ในร่างกายจะพบโคเอนไซม์คิวเท็นมาก เช่น เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ เพราะเป็นอวัยวะที่ต้องใช้พลังงานมาก ปัจจุบันมีการใช้โคเอนไซม์คิวเท็นในด้านเภสัชกรรม และเครื่องสำอางอย่างกว้างขวาง มีการยอมรับให้ใช้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการบำบัดโรคหัวใจ และโรคหลอดเลือด (อรุณี และคณะ, 2555)



รูปที่ 1.1 โครงสร้างโคเอนไซม์คิวเท็น

ที่มา : Maki (2004)

โคเอนไซม์คิวเท็นสามารถผลิตได้โดยวิธีการทางเคมี (Negishi และคณะ, 2002) กึ่งเคมี (Lipshutz และคณะ, 2002) และทางชีวภาพ แต่การสังเคราะห์ทางชีวภาพของโคเอนไซม์คิวเท็นจะมีความหลากหลายมากกว่าการสังเคราะห์ทางเคมี และกึ่งเคมี เพราะสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ทางชีวภาพมีหลายชนิด และสามารถเลือกใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูกเพื่อลดต้นทุนการผลิต (Yoshida และคณะ, 1998; Ha และคณะ, 2007; Tian และคณะ, 2010; Yen และคณะ, 2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น ในเชิงพาณิชย์นิยมใช้การสังเคราะห์ทางชีวภาพ เพราะให้ผลผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นในปริมาณสูง และต้นทุนการผลิตต่ำ ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี เช่น เทคนิคการคัดเลือกสายพันธุ์ การปรับปรุงสายพันธุ์ การปรับปรุงสภาวะการเพาะเลี้ยง รวมทั้งการเลือกใช้แหล่งคาร์บอนเหลือใช้ โดยการทดลองนี้จะใช้แหล่งคาร์บอนเหลือใช้ที่ได้จากน้ำเสียครัวเรือนมาใช้เพาะเลี้ยง *Rhodopseudomonas* sp. 14 เพื่อหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม เพื่อให้เชื้อผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นมากที่สุดภายใต้กระบวนการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation)

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม ที่จะทำให้ได้ปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็นสูงสุด

2. เพื่อหาอัตราการไหล (Feed rate) ของอาหารที่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตโคเอนไซม์คิวเทนของ *Rhodopseudomonas* sp. 14

3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณเซลล์ และปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็น

1.3 ขอบเขต

ศึกษาหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนรวมทั้งแหล่งคาร์บอนเหลือใช้ และอัตราการไหลของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Rhodopseudomonas* sp .14 ที่จะทำให้ผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นได้สูงสุด โดยมีการใช้โซเดียมอะซิเตรต และน้ำเสียจากครัวเรือนเป็นแหล่งคาร์บอนที่อัตราการไหลของอาหารที่แตกต่างกัน ภายใต้กระบวนการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่อง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ลดต้นทุนในการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น โดยสามารถใช้น้ำเสียจากครัวเรือนเป็นแหล่งคาร์บอนได้

2. สามารถใช้น้ำเสียจากครัวเรือนเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ทำให้เชื้อผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นได้ในปริมาณสูง

3. สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิจัยต่อเนื่อง และการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นในเชิงพาณิชย์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โครงสร้างและคุณสมบัติของโคเอนไซม์คิวเท็น

โคเอนไซม์คิวเท็น (2,3-dimethoxy-5-methyl-6-decaprenyl benzoquinone) หรือ โคคิวเท็น (CoQ_{10}) หรือยูบิควิโนน เป็นสารที่มีคุณสมบัติคล้ายวิตามิน สามารถละลายได้ในไขมัน (Fat-soluble vitamin-like substance) (Greenberg, 1990; Kalen และคณะ, 2001) โคเอนไซม์คิวเท็นพบได้ตามธรรมชาติ ซึ่งร่างกายมนุษย์สามารถสังเคราะห์ได้เอง โดยพบในเซลล์ทุกเซลล์ที่มีชีวิตในบริเวณเยื่อหุ้มชั้นใน (Inner membrane) ของไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) ซึ่งเป็นออร์แกเนล (Organelle) ที่ทำหน้าที่ผลิตสารพลังงานสูงให้กับเซลล์ในรูป ATP (Adenosine Triphosphate) ดังนั้นโคเอนไซม์คิวเท็นจึงพบมากในอวัยวะที่ต้องการพลังงานสูง ซึ่งจะมีไมโทคอนเดรียจำนวนมาก เช่น หัวใจ ตับ กล้ามเนื้อ สมอง ส่วนอวัยวะอื่นๆ ก็พบโคเอนไซม์คิวเท็นเช่นกัน แต่พบค่อนข้างน้อยโดยมีความสัมพันธ์กับปริมาณของไมโทคอนเดรียในเซลล์ชนิดนั้นๆ เอนไซม์คิวเท็นที่ร่างกายสังเคราะห์ขึ้นนี้จะทำหน้าที่เป็นตัวถ่ายโอนอิเล็กตรอนในปฏิกิริยาลูกโซ่การถ่ายทอดอิเล็กตรอน (Electron Transport Chain: ETC) ซึ่งเป็นกระบวนการที่มีการสร้าง ATP ด้วยวิธีการเติมหมู่ฟอสเฟตจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidative phosphorylation) จัดเป็นกระบวนการสร้าง ATP ที่มีประสิทธิภาพสูงโดยเกิดขึ้นในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ที่ใช้ออกซิเจน (Aerobic cellular respiration) ถ้าระดับของโคเอนไซม์คิวเท็นลดลง การหายใจระดับเซลล์แบบใช้ออกซิเจนก็จะขาดประสิทธิภาพในการสร้างพลังงาน เซลล์ หรืออวัยวะต่าง ๆ ก็จะทำงานได้ไม่เต็มศักยภาพ ทำให้เกิดการเจ็บป่วย ร่างกายอ่อนเพลีย ระบบภูมิคุ้มกันเสื่อมสภาพตามมาได้ โคเอนไซม์คิวเท็นถูกค้นพบครั้งแรกโดย Frederick Crane ปีคริสตศักราช 1957 โดยแยกได้จากไมโทคอนเดรียของหัวใจวัว มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีส้ม เรียกว่า ยูบิควิโนน ซึ่งหมายถึงสารควินินที่พบจำนวนมาก (Ubiquitous quinine) ในปี 1958 Karl Folkers และคณะได้พบสูตรโครงสร้างของโคเอนไซม์คิวเท็น และได้มีการสังเคราะห์ครั้งแรกโดยใช้กระบวนการเลี้ยงเชื้อ (Fermentation) หลังจากนั้นจึงเริ่มมีการสนใจและศึกษาโคเอนไซม์คิวเท็นมากขึ้น

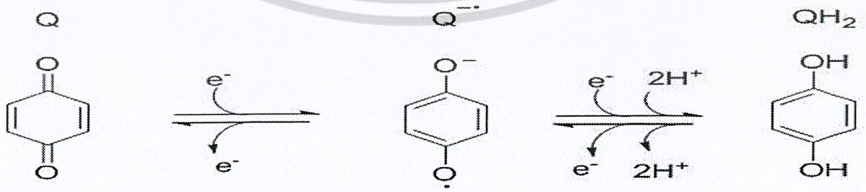
แม้ว่าร่างกายจะสามารถสังเคราะห์โคเอนไซม์คิวเท็นขึ้นมาได้เอง แต่การสังเคราะห์จะลดลงเมื่ออายุเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีปัจจัยภายนอกที่มีผลทำให้การสังเคราะห์โคเอนไซม์คิวเท็นลดลง เช่น การพักผ่อนไม่เพียงพอ การได้รับยาหรือสารเคมี หรือแม้แต่ความเครียดที่ส่งผลต่อการลดลงของโคเอนไซม์คิวเท็นในร่างกาย ดังนั้นร่างกายจึงควรได้รับโคเอนไซม์คิวเท็นจากภายนอกเสริมเข้ามา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โคเอนไซม์คิวเท็นนอกจากสังเคราะห์ขึ้นจากร่างกายมนุษย์แล้ว ในสัตว์และพืชบางชนิดก็เป็นแหล่งอุดมของโคเอนไซม์คิวเท็น เช่น หัวใจ ตับ ไตของสัตว์ เนื้อสัตว์ รำข้าว ผลิตภัณฑ์จากถั่ว ปลาซาร์ดีน ปลาแมคเคอเรล ปลาแซลมอน แม้แต่ในอาหารที่มีเชื้อจุลชีพ เช่น เชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงก็สามารถสังเคราะห์โคเอนไซม์คิวเท็นได้ โดยแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงที่นิยมนำมาใช้ผลิตเช่น *Rhodocyclus gelatinosus*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodospirillum rubrum* เป็นต้น (Lee และคณะ, 2012; Ernster, 1993)

2.1.1 โครงสร้างโคเอนไซม์คิวเท็น

โคเอนไซม์คิวเท็น ประกอบไปด้วยวงแหวนของเบนโซควิโนน (Benzoquinone ring) ซึ่งเป็นส่วนที่สำคัญในการป้องกันหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ (Redox) และส่วนของสายยาวจะแตกต่างกันออกไปตามแต่ละหน่วยไอโซปรีน (Isoprene unit) ซึ่งประกอบด้วยโครงสร้างคาร์บอน 5 อะตอม มาเชื่อมในส่วนหางของโมเลกุล ส่วนหางนี้เองที่เป็นส่วนที่ละลายไขมันได้ดีทำให้โคเอนไซม์คิวเท็นสามารถดูดซึมเข้าสู่เซลล์ได้ โคเอนไซม์คิวเท็นไม่ละลายในน้ำ และละลายได้เล็กน้อยในแอลกอฮอล์ เมื่อเกิดปฏิกิริยาการรีดิวซ์วงแหวนควิโนนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นควินอล (Quinol) ซึ่งจะมีสภาพขั้วสูงกว่า ดังแสดงในรูปที่ 2.1 (Nowicka, 2010; Szkopinska, 2000) ในไมโทคอนเดรียของมนุษย์โคเอนไซม์คิวเท็นส่วนใหญ่ได้มาจากการสังเคราะห์ขึ้นเอง และได้รับจากอาหาร แต่ว่าการสังเคราะห์จะลดลงเมื่ออายุเพิ่มมากขึ้น โคเอนไซม์คิวเท็นทำหน้าที่ในการถ่ายโอนอิเล็กตรอนในวิถีลูกโซ่ การถ่ายทอดอิเล็กตรอนที่เกิดในไมโทคอนเดรีย และสามารถทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ซึ่งสามารถกำจัดอนุมูลอิสระของออกซิเจนที่เกิดขึ้นระหว่างปฏิกิริยานี้ได้ โคเอนไซม์คิวเท็นจึงป้องกันเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียจากการทำลาย หรือความเสียหายจากอนุมูลอิสระในภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) ที่เป็นสาเหตุนำมาสู่การเกิดโรคแห่งความเสื่อมทั้งหลาย โคเอนไซม์คิวเท็นสามารถเปลี่ยนแปลงกลับมาสู่รูปรีดิวซ์ (Reduced form) ได้เช่นเดียวกับสารต้านอนุมูลอิสระอื่นๆ เช่น วิตามินซี วิตามินอี เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดลง (Shapiro, 2001)

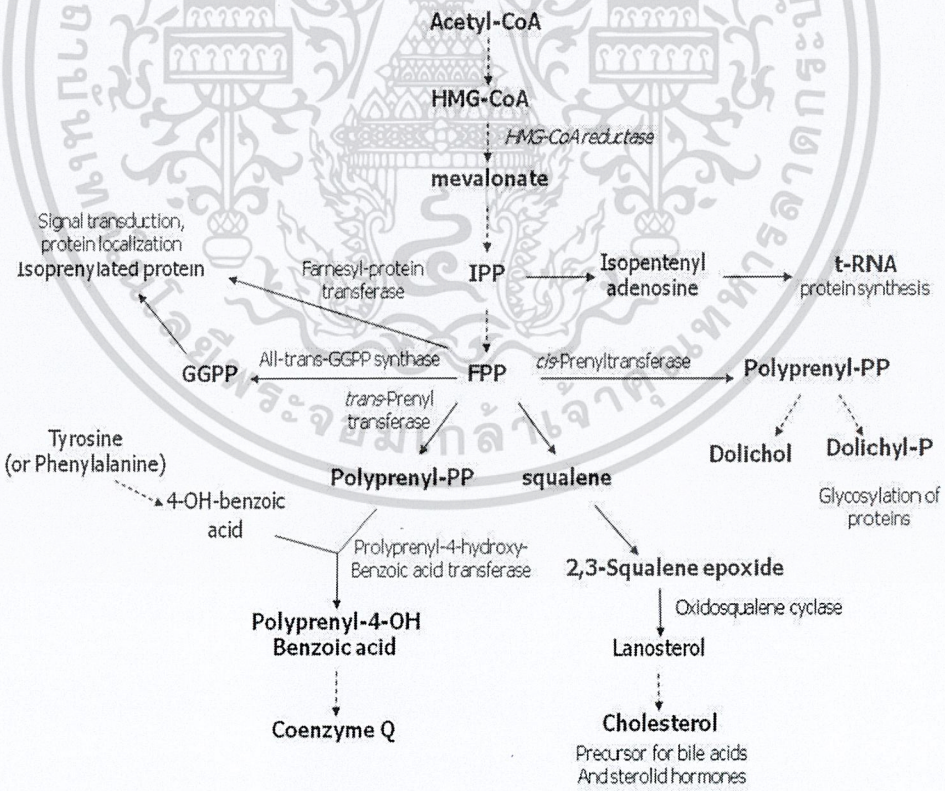


รูปที่ 2.1 ปฏิกิริยารีดอกซ์ของวงแหวนควิโนน เมื่อควิโนนในรูปที่ถูกออกซิไดซ์ (Q) สามารถที่จะรับอิเล็กตรอนแล้วเปลี่ยนเป็นเซมิควิโนน ($Q^{-\bullet}$) ต่อมาเมื่อได้รับอิเล็กตรอนอนุภาคที่สอง และโปรตรอนอีกสองอนุภาค จะกลายเป็นควิโนนที่อยู่ในรูปที่ถูกรีดิวซ์หรือที่เรียกว่าไดไฮโดรควิโนน (QH_2)
ที่มา : Nowicka (2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 ชีวสังเคราะห์ของโคเอนไซม์คิวเท็น

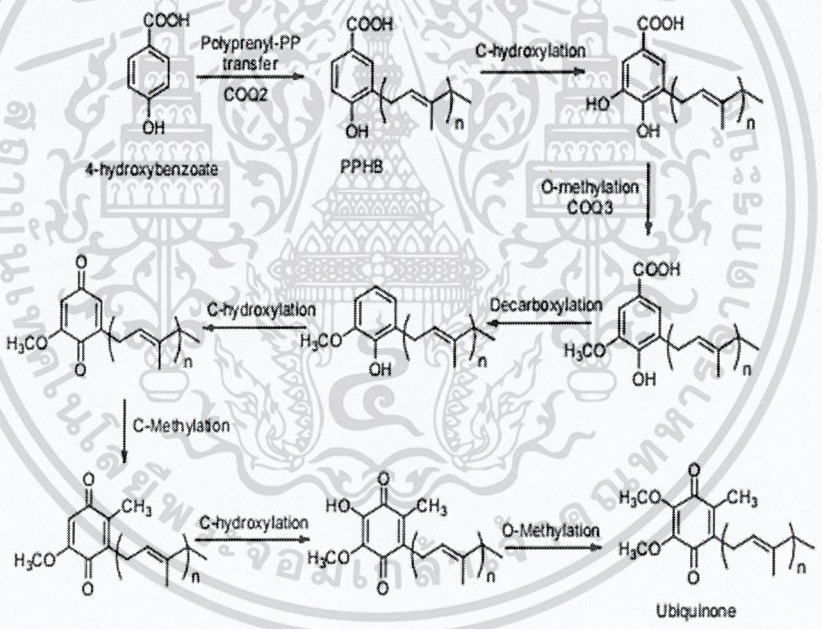
วิถีชีวสังเคราะห์ของโคเอนไซม์คิวเท็นเริ่มจากวิถีของกรดเมวาโลนิก (Mevalonic acid pathway) ซึ่งเป็นวิถีชีวสังเคราะห์เดียวกับโคเลสเตอรอล (Cholesterol) เริ่มจากอะซิติลโคเอนไซม์เอ (acetyl-coenzyme A) เกิดปฏิกิริยาผ่าน (S)-3-hydroxy-3-methylglutaryl co-enzyme A (HMG-CoA) ก่อนจะได้เป็น Isopentenyl pyrophosphate (IPP) ซึ่งเป็นหน่วยย่อยไอโซปรีนที่มีคาร์บอน 5 อะตอม และถือเป็นสารตั้งต้นของสารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ (Terpenoids) แล้วเกิดปฏิกิริยากับ 4-hydroxybenzoic acid จากนั้นจึงมีการปรับเปลี่ยนภายในโครงสร้างจนได้โคเอนไซม์คิวเท็นดังแสดงในรูปที่ 2.2 การศึกษาขั้นตอนต่าง ๆ ในวิถีชีวสังเคราะห์ของโคเอนไซม์คิวเท็นได้มาจากการศึกษาวิเคราะห์ทางพันธุศาสตร์ของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (Cluis และคณะ, 2007) โดยมีการเสนอขั้นตอนในวิถีการสังเคราะห์โคเอนไซม์คิวเท็นออกเป็น 3 ส่วน ประกอบไปด้วยการสังเคราะห์วงแหวนควิโนน (Quinonoid ring) การสังเคราะห์หน่วยย่อยไอโซปรีน 10 หน่วย (Decarprenyl diphosphate) และขั้นตอนสุดท้ายเป็นการปรับเปลี่ยนโครงสร้างในวงควิโนน (Jeya และคณะ, 2010)



รูปที่ 2.2 วิถีกรดเมวาโลนิก (Mevalonic acid pathway)
ที่มา : Szkopinska (2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

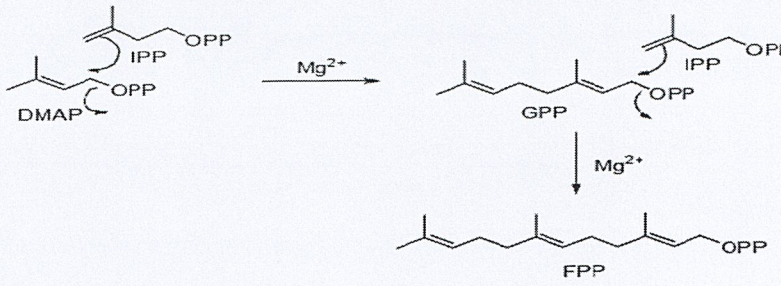
ส่วนของวงแหวนควิโนนได้มาจากวงแหวนของไทโรซีน (Tyrosine) หรือฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) โดยการสังเคราะห์จะเกิดการเปลี่ยน Para-hydroxybenzoate ซึ่งถูกเปลี่ยนแปลง และปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันภายในโมเลกุลจนได้ยูบิควิโนน หรือโคเอนไซม์คิวดังแสดงในรูปที่ 2.3 ส่วนสายยาวของไอโซปรีน (Isoprenoid side chain) ได้มาจากปฏิกิริยาการเติม Isopentenyl pyrophosphate (IPP, C5) ให้กับ Geranylgeranyl pyrophosphate (GPP, C10) ซึ่งได้มาจากวิถีของกรดมีวาโลนิกดังที่ได้กล่าวมาแล้ว และจะเกิดการเติมหมู่ IPP เข้าไปจนกระทั่งได้ Decaprenyl pyrophosphate (DPP, C50) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Decaprenyl diphosphate synthase ซึ่งจากปฏิกิริยาจะได้สายยาวของโคเอนไซม์คิวเท็น 10 หน่วยของไอโซปรีน (C50) ดังแสดงในรูปที่ 2.4 จึงเรียกสารชนิดนี้ว่า โคเอนไซม์คิวเท็น ซึ่งเป็นชนิดที่พบมากที่สุดในมนุษย์ และจำนวนหน่วยของไอโซปรีนนี้จะแตกต่างไปขึ้นอยู่กับสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (Bentinger และคณะ, 2010; Shults และคณะ, 2002)



รูปที่ 2.3 ชีวสังเคราะห์วงแหวนควิโนน (เมื่อ PPHB คือ Polyprenyl *para*-hydroxybenzoate; COQ2 คือ *S. cerevisiae* gene ประกอบด้วย Prenyltransferase catalysing โดยจะนำ Polyisoprenoid chain สู่ Para-hydroxybenzoate; COQ3 คือ *S. cerevisiae* geneประกอบด้วย *S*-adenosylmethionine *O*-methyl transferase)

ที่มา : Szkopinska (2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 ชีวสังเคราะห์ของหน่วยไอโซปรีน (Isoprenenoid unit)

ที่มา : Szkopinska (2000)

2.1.3 ประโยชน์ของโคเอนไซม์คิวเท็น

2.1.3.1 ช่วยป้องกันความเสียหายของกล้ามเนื้อหัวใจ

โดยในอดีตมีการทดลองให้โคเอนไซม์คิวเท็นกับผู้ป่วยก่อนผ่าตัด และพบว่าการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจหลังผ่าตัดฟื้นฟูได้ดีขึ้น และลดความเสียหายที่เกิดขึ้นกับกล้ามเนื้อหัวใจ (Quinzii และคณะ, 2007) นอกจากนี้ยังพบว่าการให้โคเอนไซม์คิวเท็นร่วมกับกระบวนการฟื้นคืนชีพผู้ป่วย (Cardiopulmonary resuscitation: CPR) จะทำให้ผู้ป่วยมีการฟื้นฟูของระบบประสาทได้ดีขึ้น (Belardinelli และคณะ, 2005) โดยมีการตั้งสมมติฐานว่าโคเอนไซม์คิวเท็นจะลดความรุนแรงของการบาดเจ็บจากการขาดเลือดแล้วได้เลือดกลับมาเลี้ยง (Reperfusion injury) เนื้อเยื่อประสาทอันเป็นสาเหตุทำให้เซลล์ประสาทบาดเจ็บ และตายจากภาวะเครียดออกซิเดชัน ซึ่งป้องกันได้ด้วยบทบาทการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโคเอนไซม์คิวเท็น

2.1.3.2 ช่วยการทำงานของหลอดเลือด

โคเอนไซม์คิวเท็นมีบทบาทต่อการทำงานของหลอดเลือด โดยมีผลต่อการทำหน้าที่ของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด (Endothelial cell) โดยในเลือดที่มีปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็นความเข้มข้นสูงจะไปช่วยรักษาระดับของไนตริกออกไซด์ (NO) ซึ่งทำหน้าที่ขยายหลอดเลือด โดยป้องกันการทำปฏิกิริยาระหว่างไนตริกออกไซด์ และซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-) นอกจากนี้ยังพบว่าโคเอนไซม์คิวเท็นอาจเกี่ยวข้องกับการเพิ่มระดับเอ็นไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase) ซึ่งใช้ในการกำจัดอนุมูลอิสระของออกซิเจนที่อยู่ในรูปของซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนได้ (Silver, 2004; Quinzii และคณะ, 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3.3 ช่วยลดระดับโคเลสเตอรอล และไขมัน

เนื่องจากวิถีชีวสังเคราะห์ของโคเอนไซม์คิวเท็น และวิถีชีวสังเคราะห์ของโคเลสเตอรอลมีความสัมพันธ์และเกี่ยวข้องโดยตรง ดังนั้นการให้ยายับยั้งการสังเคราะห์โคเลสเตอรอลในกลุ่มยาสเตติน (Statin) จึงมีผลต่อการลดระดับของโคเอนไซม์คิวเท็นในซีรัมของผู้ป่วยด้วย และคาดว่าอาการข้างเคียงจากการใช้ยาสเตติน เช่น การปวดเมื่อยกล้ามเนื้ออาจมาจากผลของการลดระดับโคเอนไซม์คิวเท็น แม้ประเด็นผลข้างเคียงของยากับการลดระดับของโคเอนไซม์คิวเท็นยังคงเป็นประเด็นที่ถกเถียงกันอยู่ (Belardinelli และคณะ, 2005) แต่การให้โคเอนไซม์คิวเท็นรูปแบบรับประทานร่วมกับการใช้ยาสเตติน พบว่าจะช่วยลดอัตราส่วนระหว่างโคเลสเตอรอล และไขมันดี (HDL: High Density Lipoprotein) และช่วยรักษาระดับไนตริกออกไซด์ในเลือดของผู้ป่วย ซึ่งจะส่งผลดีต่อระบบหัวใจร่วมหลอดเลือดได้

2.1.3.4 ช่วยป้องกันความเสื่อมของระบบประสาท

เนื่องมาจากภาวะโรคความเสื่อมของระบบประสาท (Neurodegenerative disease) พบว่ามีความสัมพันธ์กับเซลล์ประสาท และความเสียหายต่อไมโทคอนเดรียอันนำไปสู่การตายของเซลล์ประสาท เช่น มีรายงานว่าสาเหตุของโรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) นั้นสัมพันธ์กับความเสียหายจากภาวะเครียดออกซิเดชันร่วมกับการสูญเสียหน้าที่ของไมโทคอนเดรีย ซึ่งการให้โคเอนไซม์คิวเท็นเข้าไปจะช่วยในการป้องกันความเสียหายที่จะเกิดขึ้น รวมทั้งการป้องกันความเสียหายต่อไมโทคอนเดรียเพื่อป้องกันการปลดปล่อยสารที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ (Chew และคณะ, 2004)

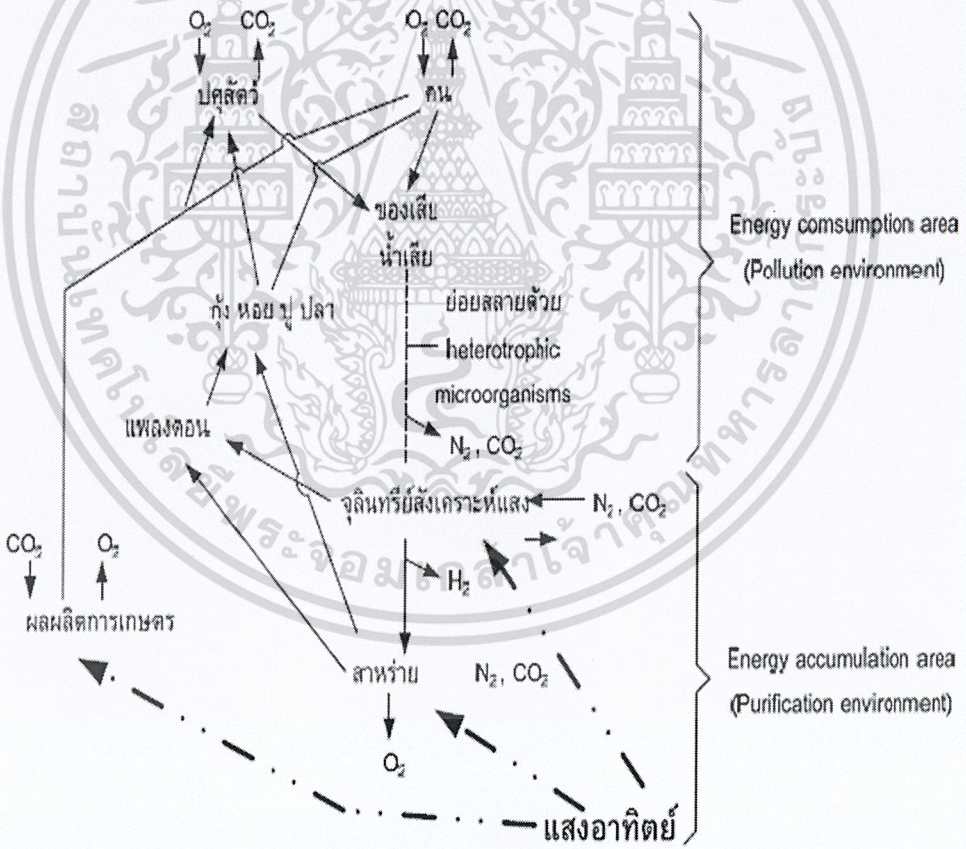
2.1.3.5 ช่วยบำรุงผิวหนัง

ผิวหนังเป็นบริเวณที่ได้รับผลกระทบจากรังสีอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet: UV) จากการสัมผัสกับแสงแดดโดยตรง โดยรังสีดังกล่าวสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระในชั้นผิวหนัง ก่อให้เกิดการชราภาพและการตายของเซลล์ผิวหนัง ดังนั้นโคเอนไซม์คิวเท็นจึงใช้คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระป้องกันความเสียหายที่อาจจะเกิดขึ้นกับระบบผิวหนังจากการสัมผัสกับรังสีอัลตราไวโอเลตได้ (Beal, 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง (Photosynthetic Bacteria)

แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง (Photosybthetic bacteria; PSB) พบกระจายทั่วไปในธรรมชาติตามแหล่งน้ำจืด น้ำเค็ม ทะเลสาบน้ำเค็ม น้ำทะเลสาบที่มีความเป็นด่าง น้ำที่มีความเป็นกรด น้ำพุร้อน น้ำทะเลบริเวณขั้วโลกเหนือ นอกจากนี้ยังพบตามแหล่งน้ำเสีย บ่อบำบัดน้ำเสีย (Levett, 1990; Lmhoff, 1992; Brock, 1994) บทบาทของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงมีความสำคัญในกระบวนการนำก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไปใช้ (CO_2 - assimilation) และการตรึงไนไตรเจน (Nitrogen fixation) นอกจากนี้ยังมีบทบาทสำคัญในห่วงโซ่อาหาร ซึ่งสัตว์ขนาดเล็ก ปลา กุ้ง หอย และปู สามารถนำแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงมาใช้เป็นอาหารได้ นอกจากนี้ในน้ำเสียจากบ้านเรือน และน้ำเสียจากการทำปศุสัตว์สามารถบำบัด ด้วยแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Kobayashi, 2000) ดังแสดงในรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 บทบาทของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงในธรรมชาติ

ที่มา : Kobayachi (2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 โครงสร้างของเซลล์จุลินทรีย์สังเคราะห์แสง

ประกอบด้วยแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ (Bacteriochlorophyll) ที่รับพลังงานแสงได้ดีที่สุดในช่วงความยาวคลื่นประมาณ 725-745 นาโนเมตร (ช่วงยาวสุดของสเปคตรัมที่สามารถมองเห็นได้) ถึงช่วงความยาวคลื่น 1,035 นาโนเมตร (อินฟราเรด) ซึ่งแสงนี้มีความยาวคลื่นเกินกว่าที่แบคทีเรียหรือสาหร่ายที่สังเคราะห์ด้วยแสง (ให้ก๊าซออกซิเจน) ที่เจริญบนผิวน้ำจะสามารถดูดซับแสงนี้ได้ จึงทำให้แสงผ่านลงไปถึงจุลินทรีย์ไม่ใช้ออกซิเจน (Anoxygenic bacteria) สีของจุลินทรีย์ไม่ใช้ออกซิเจนเป็นผลมาจากแคโรทีนอยด์มากกว่าการเกิดจากแบคทีเทอริโอคลอโรฟิลล์ ดังนั้นจึงแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ตามสีของรงควัตถุ คือ แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงกลุ่มสีม่วง และแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่มสีเขียว ถ้าเคลื่อนที่ได้จะใช้แฟลกเจลลาที่ขั้วเซลล์ (Polar flagella) ยกเว้นตระกูล Chloroflexaceae มีการเคลื่นที่แบบคลืบคลาน แบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่มสีม่วง และแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่มสีเขียวอาจตรึงไนโตรเจนได้ ถ้าอยู่ในสภาพที่ไม่มีอากาศ และได้รับแสง (Staley และคณะ, 1994)

2.2.2 ลักษณะของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง (ดวงพร, 2530)

2.2.2.1 เซลล์มีรูปร่างทรงกลม แท่ง รูปไข่ หรือเป็นเกลียว เส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์อยู่ระหว่าง 0.3-0.6 ไมครอน

2.2.2.2 การเพิ่มจำนวนส่วนใหญ่เป็นแบบแบ่งตัว (Binary fission) แต่มีบางชนิดในวงศ์ Rhodospirillaceae ที่แบ่งตัวโดยการแตกหน่อ

2.2.2.3 เป็นแบคทีเรียติดสีแกรมลบ

2.2.2.4 เซลล์แขวนลอย (Cell suspension) มีสีม่วง แดงเข้ม แดง ส้ม น้ำตาล หรือสีเขียว อาจมีการสะสมเม็ดซัลเฟอร์

2.2.2.5 มีรงควัตถุเป็นแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ และแคโรทีนอยด์ (Carotenoid)

2.2.2.6 กลไกการสังเคราะห์ด้วยแสงแตกต่างจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และพืชสีเขียว เพราะเกิดในสภาพไร้ออกซิเจน ไม่มีการสร้างออกซิเจนในการสังเคราะห์ด้วยแสง เนื่องจากไม่ได้ใช้น้ำเป็นตัวให้อิเล็กตรอน แต่ใช้ก๊าซไฮโดรเจน สารประกอบซัลเฟอร์ในสภาพรีดิวซ์ หรือสารอินทรีย์ แทนการใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยวัฏจักรคัลวิน (Calvin cycle) หรือกระบวนการ Reductive Phosphate cycle

2.2.2.7 มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน เนื่องจากมีไซโตโครม (Cytochrome) ยูบิควิโนน และเฟอร์รีดอกซิน (Ferredoxin) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีเหล็ก แต่ไม่มีฮีม (Non-heme internal membeane iron protein)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2.8 รงควัตถุในการสังเคราะห์ด้วยแสง (Photopigment) อยู่ที่เยื่อภายในเซลล์ (Internal membrane) อาจมีลักษณะเป็นถุง (Vesical) ในสกุล Chlorobium

2.2.2.9 G+G Content อยู่ระหว่าง 45-73 เปอร์เซ็นต์โมล (mol %)

2.3 การจัดจำแนกแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง

การจัดจำแนก (Classification) โดยทั่วไปจะแบ่งแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงออกเป็น 2 กลุ่ม คือ แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีม่วง (Purple photosynthetic bacteria) และแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีเขียว (Green photosynthetic bacteria) (Pfenning และ Truper, 1989; Kobayashi, 2000) ดังแสดงตามตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 การจัดจำแนกวงศ์ สกุล และสายพันธุ์ของ Phototrophic Bacteria มีดังนี้ ชั้น (Order) วงศ์ (Family) สกุล (Genus) สายพันธุ์ (Species)

ชั้น (Order)	วงศ์ (Family)	สกุล (Genus)	สายพันธุ์ (species)
Rhodospirillales	*Rhodospirillaceae*	*Rhodospirillum*	*Rubrum,tenue,fulvum, Inolischianum, photonietricum*
		Rhodopseudomonas	*Palustris,viridls,acidophilia, gelatinosa, capsulata,sphaeroldes*
		Rhodomicrobium	*vannielii*
	Chromatiaceae	*Chromatium*	*Okenii,weissel, warmingil, buderi,minus,Violascens, vinosum, gracillsimum, minutissium*
		Thiocystis	*violace , gelatrnosa*
		Thiosarcina	*rosea*
		Thiospirillum	*sanguineu , jenens, rosenbergil*
		Thiocapsa	*roseopersicin , pfennigil*
		Lamprocystis	*roseopersicina*
		Thiodictyon	*elegans, bacillosum*
		Thiopedia	*rosea*
		Amoebobacter	*roseus , pendens*
	Ectothiorhodospiraceae	*Ectothiorhofospira*	*mobilis, shaposhnikovil , halophila*
Chlorobiales	*Chlorobiaceae*	*Chlorbium*	*limicola,vlbrioforme, phaeobacteroides, phaeovibrioides*
		Prosthecochloris	*aestuaril*
		Choropseudomonas	*ethylica*
		Pelodictyon	*ciathratifornie, luteolum*
		Clathrochloris	*sulphurica*

ที่มา : Kabayashi, 2000; Levett, 1990; Imhoff, 1992; Pfenning และTruper, 1989

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1 แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีม่วง (Purple photosynthetic bacteria)

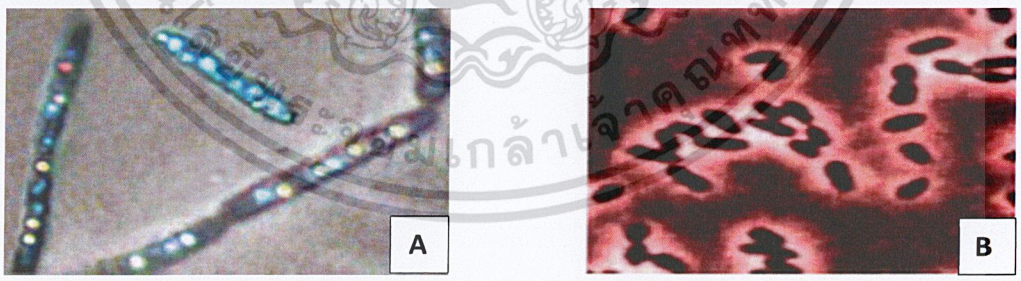
แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงในวงศ์ Chromatiaceae ซึ่งเป็นแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีม่วง (รูปที่ 2.6A) พบว่าสามารถเจริญได้ดีในสภาพโฟโตออโตโทรฟ (Photoautotroph) ซึ่งสามารถใช้สารประกอบซัลเฟอร์ ซัลไฟต์ และไทโอซัลเฟตเป็นตัวรับอิเล็กตรอน เพื่อรีดิวซ์ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไปเป็นสารอาหารภายในเซลล์ได้ และแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงในวงศ์ Chromatiaceae จะสะสมกำมะถันไว้ในเซลล์ (Imhoff, 1992) แสดงสมการดังนี้

$$CO_2 + 2H_2S \xrightarrow{\text{แสงสว่าง}} (CH_2O) + H_2O + 2S$$

$$S + CO_2 + 3H_2O \xrightarrow{\text{แสงสว่าง}} (CH_2O) + H_2SO_4 + H_2$$

$$2CO + Na_2S_2O_3 + 3H_2O \xrightarrow{\text{แสงสว่าง}} 2(CH_2O) + Na_2SO_4 + H_2SO_4$$

แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงในวงศ์ Rhodospirillaceae (รูปที่ 2.6B) เป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่ไม่สามารถใช้ซัลไฟด์เป็นตัวให้อิเล็คตรอน เพื่อรีดิวซ์ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไปเป็นสารอาหารภายในเซลล์ได้ และมีการสันดาป (Metabolism) ดีกว่าแบคทีเรียม่วงที่ใช้ซัลเฟอร์ เนื่องจากสามารถเจริญได้ทั้งแบบโฟโตเฮเทอโรโทรฟ (Photoheterotroph) และโฟโตออโตโทรฟ (Photoautotroph) โดยใช้ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เป็นตัวให้อิเล็กตรอน ซึ่งส่วนใหญ่แบคทีเรียกลุ่มนี้จะทนต่อสภาพที่มีออกซิเจนจึงสามารถเจริญได้ภายใต้สภาวะแบบเฮเทอโรโทรฟที่มีอากาศ ไม่มีแสง มีแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์เอ และแคโรทีนอยด์ ต่าง ๆ ชนิดในการสังเคราะห์แสง



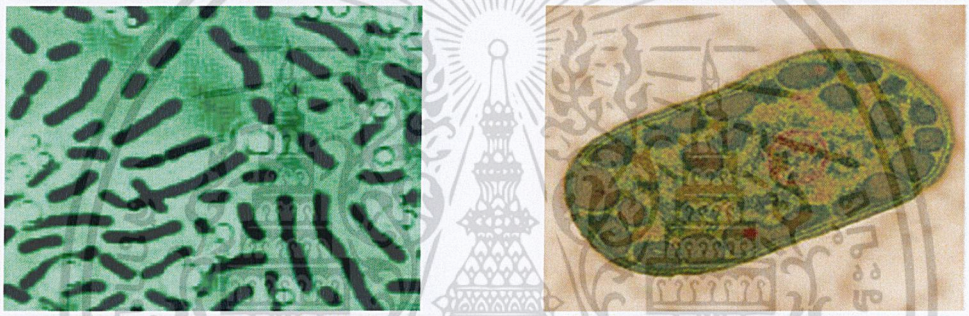
รูปที่ 2.6 A คือ แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงในวงศ์ Chromatiaceae
B คือ แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงในวงศ์ Rhodospirillaceae

ที่มา : Imhoff (1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีเขียว (Green photosynthetic bacteria)

แบคทีเรียกลุ่มนี้จะอยู่ในวงศ์ Chlorobiaceae ซึ่งเป็นแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีเขียว มีลักษณะเซลล์เป็นเส้นสาย ไม่มีระบบอินตราไซโตพลาสมิกเมมเบรน (Intracytoplasmic membrane system) มีโครงสร้างพิเศษ คือ คลอโรเบียม (Chlorobium vesicle) หรือคลอโรโซม (Chlorosome) จะพบอยู่ภายในไซโตพลาสมิก หรือติดอยู่ที่ผิวของไซโตพลาสมิกเมมเบรน คลอโรโซมมีขนาดใหญ่ ประกอบด้วยแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ ซี ดี และอี มีโครงสร้างในการจับพลังงานแสง (light-harvesting) ศูนย์กลางของปฏิกิริยาของแบคทีเรียกลุ่มนี้จะพบอยู่ในไซโตพลาสมิกเมมเบรนอยู่ติดกับคลอโรโซม (Imhoff, 1992) และจะไม่สะสมกำมะถันไว้ในเซลล์ (รูปที่ 2.7)



รูปที่ 2.7 แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงในวงศ์ Chlorobiaceae

ที่มา : Imhoff, 1992

2.4 แบคทีเรียแสงสังเคราะห์ด้วยแสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology เล่ม 9 ได้จำแนกแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถันไว้ในกลุ่มที่ 10 (Anoxygenic phototrophic bacteria) กลุ่มย่อย (subgroup) ที่ 3 (purple non-sulfur bacteria) มี 6 สกุลดังนี้ (Staley และคณะ,1994) *Rhodopila*, *Rhodospirillum, Rhodobacter*, *Rhodocyclus, Rhodomicrobium* และ *Rhodopseudomonas* แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน พบได้ทั่วไปตามแหล่งน้ำธรรมชาติในชั้นน้ำที่มีแสงสว่างส่องถึง มีสารอินทรีย์ และพบการรวมตัวกันเป็นกลุ่มในแหล่งน้ำที่ไม่มีออกซิเจน มีแสงเล็กน้อย ในแหล่งน้ำจืดที่มีซัลไฟด์อยู่จะพบน้อยมากแต่บางชนิดก็อาศัยอยู่ได้ในที่ที่มีปริมาณซัลไฟด์อยู่สูง (Imhoff, 1992) นอกจากนี้ยังพบได้ในพื้นดิน สระน้ำ คลอง หรือแหล่งน้ำที่สกปรก เช่น บ่อบำบัดน้ำเสีย ซึ่งมีปริมาณสารอินทรีย์สูง จึงเป็นแหล่งที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงกลุ่มดังกล่าวเจริญได้ดี โดยทั่วไปจะพบการเจริญอย่างรวดเร็วของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน (Pfenning และ Truper, 1992; Olliver และคณะ, 1994) เช่น การเจริญอย่างรวดเร็วที่พบในประเทศญี่ปุ่น เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้มีการสันดาปดีกว่าแบคทีเรียม่วงที่ใช้ซัลเฟอร์ ซึ่งสามารถเจริญได้ทั้งแบบโฟโตเฮเทอโรโทรฟ และโฟโตออโตโทรฟ โดยใช้ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เป็นตัวให้อิเล็กตรอน ซึ่งส่วนใหญ่แบคทีเรียกลุ่มนี้จะทนต่อสภาพที่มีออกซิเจน จึงสามารถเจริญได้ภายใต้สภาวะแบบเฮเทอโรโทรฟที่มีอากาศ ไม่มีแสง มีแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ และแคโรทีนอยด์หลายชนิดในการสังเคราะห์แสง ทำให้ปัจจุบันแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงโดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน ได้รับความสนใจในด้านการศึกษาและวิจัยอย่างกว้างขวาง มีการนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพกันอย่างแพร่หลาย (Sasikala และคณะ, 1993; Sasikala และ Ramana, 1995)

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน

2.5.1 อุณหภูมิ (Temperature)

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถันอยู่ในช่วง 25-35 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิจะมีความสำคัญในการคัดเลือกชนิดของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงที่เจริญได้เร็ว บางชนิดสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 40 องศาเซลเซียส หรือมากกว่านี้ เช่น *Rhodopseudomonas cryptolactis* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และเจริญได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส (Stadwald-Demchick, 1990) นอกจากนี้ยังพบว่า *Rhodopseudomonas sphaeroides*เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 หรือ 40 องศาเซลเซียส (พลสันห์ และ จุฑาพร, 2554)

2.5.2 ความเข้มแสง (Light intensity)

ความเข้มแสงที่แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถันต้องมีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิที่เหมาะสม ฉะนั้นหลอดไฟที่ใช้ให้แสงก็จะเพิ่มอุณหภูมิในการบ่มเชื้อด้วย ดังนั้นหลอดไฟทังสเตนจะใช้ได้ดีเพราะไม่ต้องเพิ่มความร้อนไปด้วยขณะให้แสง แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงบางชนิดจะมีรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงชนิดเดียวกัน เช่น *Rhodopseudomonas sulfoviridis* และ *Rhodopseudomonas viridis* จะมีแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ บี เหมือนกันจึงต้องใช้ช่วงแสง 1,000 นาโนเมตร หรือมากกว่านี้ในการคัดเลือก (Sasikala และคณะ, 1993)

2.5.3 แหล่งคาร์บอน (Carbon source)

แหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงคือ อะซิเตต (Acetate) และมาเลต (Malate) สำหรับแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงกลุ่มไม่สะสมกำมะถันแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ อะซิเตต (Acetate), ไพรูเวต (Pyrruvate), มาเลต (Malate), ซักซิเนต (Succinate)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และฟูมาเรต (Fumarate) (Imhoff, 1992) ในกลุ่มที่สามารถเกิดการเลี้ยงเชื้อได้ จะใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ อะซิเตต, เอทานอล (Ethanol), เบนโซเอต (BenZoate), ไอโซโปรพานอล (Isopropanol), บิวทีเรต (Butyrate) หรือกรดไดคาร์บอกซิลิก (Dicarboxylic acid) และ ซักซิเนต เป็นต้น บางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีกรดไขมัน เมทานอล (Methanol) หรือ เอทานอล แต่บางชนิดก็ไม่ต้องการ (Brock และคณะ, 1994) แหล่งคาร์บอนที่ใช้สำหรับการคัดเลือก *Rhodocyclus gelatinosus* คือ ซิเตรต (Citrate)(Imhoff, 1992) นอกจากนี้พบว่า *Rhodopseudomonas cryptolactis* ต้องการไพรูเวต และแลคเตท (Lactate) เป็นแหล่งคาร์บอน (Stadtwald-Demechick และคณะ, 1990)

2.5.4 ความเข้มของซัลไฟด์ (Sulfide concentration)

แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถันจะมีความไวต่อซัลไฟด์ ฉะนั้น อาหารที่ใช้เลี้ยงจะต้องมีความเข้มของซัลไฟด์ในปริมาณต่ำ คือ ประมาณ 0.005-0.01 เปอร์เซ็นต์ ของ $Na_2S{\cdot}9H_2O$ (Brock และคณะ, 1994) บางชนิดสามารถรีดิวส์สารประกอบซัลไฟด์ได้ เช่น *Rhodopseudomonas sulfuviridis*, *Rhodobacter adriatiuces*, *Rhodobacter veldkampii* และ *Rhodopila globiformis* บางชนิดจะต้องเติม Na_2S เข้มข้น 0.4-0.2 มิลลิโมลาร์ เพื่อเป็นตัวรับอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสง (Imhoff, 1992) Burgess และคณะ (1994) รายงานว่าพบแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงชนิดใหม่ คือ *Rhodobacter marinus* ที่ไวต่อซัลไฟด์ นั่นคือถ้ามีซัลไฟด์มากกว่า 0.7 มิลลิโมลาร์ จะไม่เจริญ

2.5.5 ออกซิเจน (Oxygen)

แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถันเป็นแบคทีเรียแกรมลบ เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe) ถ้ามีออกซิเจนในการเลี้ยงจะมีผลยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงไม่ให้มีการสร้างรงควัตถุ ดังนั้นการเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงกลุ่มดังกล่าวจึงไม่ให้ออกซิเจน บางชนิดไวต่อออกซิเจนมาก เช่น *Rhodospirillum* sp., *Rhodopila globiformis*, *Rhodopseudomonas viridis* และ *Rhodocyclus purpureus* ฉะนั้นจึงต้องเติม $NaCO_3$ ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพื่อปรับสภาพไม่ให้มีออกซิเจน (Imhoff, 1992) ออกซิเจนมีผลในการยับยั้งการสร้าง protoporphyrin ใน *Rhodobacter capsulatus* Prasertsan และคณะ (1993) รายงานว่าสกุล *Rhodospirillaceae* ที่แยกได้จากน้ำเสียของกระบวนการผลิตอาหารทะเลสามารถสร้าง แคโรทีนอยด์ และแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ในที่มีออกซิเจน และมีแสงมากกว่าในสภาวะไม่มีออกซิเจนและมีแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.6 พีเอช (pH)

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถันเจริญได้ดีที่พีเอชต่ำ เช่น *Rhodopila globiformis* (พีเอชที่เหมาะสมคือ 4.8-5.0) *Rhodopseudomonas acidophila* (พีเอชที่เหมาะสมคือ 5.8) และ *Rhodomicrobium vannielii* (เจริญดีที่พีเอชต่ำจนถึง 5.2) (Imhoff, 1992)

นอกจากนี้ยังสามารถพบแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถันสามารถเจริญอยู่ในช่วง 6.5-7.0 แต่ถ้าเป็นอาหารที่ enrichment จะมีพีเอชอยู่ที่ 5.0 และ 5.5 ซึ่งให้คัดเลือก *Rhodomicrobium vannielii* และ *Rhodopseudomonas globiformis* ตามลำดับ (Sasikala และคณะ, 1993)

2.5.7 วิตามิน (Vitamin)

แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงจะต้องการวิตามินต่าง ๆ มากมาย เป็นปัจจัยในการเจริญ (Growth factor) ได้แก่ ไบโอติน (Biotin), ไนอะซิน (Niacin), ไธอะมันไดคลอไรด์ (Thaiaminedichloride), กรดพาราอะมิโนเบนโซอีก (p-aminobenzoic acid), ไพริดอกโซเลียมไฮโดรคลไรด์ (Pyridoxolium hydrochloride), แคลเซียมเพนโธทีเนต (Ca-panthotenate), วิตามินบีสิบสอง (B12) เป็นต้น ซึ่งจะใช้เพียงชนิดเดียวหรือใช้รวมกันก็ได้ (Imhoff, 1992) เช่น *Rhodobacter* sp. ต้องการไบโอติน, กรดนิโคตินิก และไธอะมีนในการเจริญ (Choorit และคณะ, 1993)

2.5.8 ความเข้มข้นของเกลือ (Salinity)

แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงที่อาศัยอยู่ตามชายฝั่งทะเล จะสามารถทนต่อความเค็มได้มากกว่า 2-4 เปอร์เซ็นต์ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ Olliver (1994) ได้แบ่งแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงโดยอาศัยความทนต่อความเข้มข้นของเกลือออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

2.5.8.1 กลุ่มที่ทนต่อความเข้มข้นเกลือน้อย (Slight halophile)

กลุ่มนี้ต้องการเกลือโซเดียมคลอไรด์เพื่อใช้ในการเจริญ 2-5 เปอร์เซ็นต์ เช่น *Rhodobacter sulfidophilus*, *Rhodobacter adriaticus* และ *Rhodopseudomonas marina* แต่จะไม่พบในน้ำทะเล

2.5.8.2 กลุ่มที่ทนต่อความเข้มข้นเกลือปานกลาง (Moderate halophile)

กลุ่มนี้ต้องการเกลือโซเดียมคลอไรด์เพื่อใช้ในการเจริญ 6-11 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียที่สังเคราะห์แสงในกลุ่มนี้ได้แก่ *Rhodospirillum mediosalinum*, *Rhodospirillum salexigens* และ *Rhodospirillum salinalum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.8.3 กลุ่มที่ทนต่อความเข้มข้นเกลือสูง (Extreme halophile)

กลุ่มนี้ต้องการเกลือโซเดียมคลอไรด์เพื่อใช้ในการเจริญ 20-25 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นไม่พบกลุ่มนี้ในแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีม่วงไม่สะสมกำมะถัน

สำหรับแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีม่วงไม่สะสมกำมะถันที่เจริญในน้ำทะเลจะต้องเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อด้วย สำหรับกลุ่มที่อาศัยในน้ำจืดเช่น *Rhodobacter sphearides* จะถูกยับยั้งเมื่อมีปริมาณเกลือโซเดียวคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ (Vreeland และคณะ, 1992) และ *Rhodospirillum rutile* จะถูกยับยั้งเมื่อมีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ 3 เปอร์เซ็นต์ (Pfenning และ Truper, 1989)

2.6 แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงกลุ่มไม่สะสมกำมะถันเพื่อการเกษตร และสิ่งแวดล้อม

2.6.1 การใช้เพื่อบำบัดน้ำเสีย และของเสีย

แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน สามารถย่อยสลายสารประกอบภายในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน และมีออกซิเจน จึงสามารถนำไปบำบัดน้ำเสียและของเสียกลับมาใช้ได้อีก ฉะนั้นแหล่งน้ำเสียสามารถใช้แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงกลุ่มนี้บำบัดได้จึงมีมากมาย โดยทั่วไปจะเป็นน้ำเสียที่มีสารอินทรีย์ น้ำเสียทางการเกษตร น้ำเสียจากอุตสาหรรมอาหาร น้ำเสียจากอาคารบ้านเรือน น้ำเสียจากอุตสาหกรรมการใช้จุลินทรีย์ เช่น ผลิตเบียร์ ยา ปฏิชีวนะ ฯลฯ น้ำเสียจากอุตสาหกรรมทางเคมี ปิโตเลียม และอุตสาหกรรมของเสียในรูปก๊าซต่างๆ เป็นต้น ซึ่งแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถันที่นิยมนำมาให้ในการบำบัดของเสียต่าง ๆ จะอยู่ในสกุล *Rhodopseudumonas Rhodobacter Rhodospirillum* และ *Rhodocyclus* โดยที่แบคทีเรียสังเคราะห์กลุ่มไม่สะสมกำมะถันดังกล่าวจะทำให้น้ำเสียมีคุณภาพดีขึ้นได้โดย

1. ช่วยลดค่า BOD, COD และ TOC (Totalorganic carbon) สามารถลดได้ถึง 20-99 เปอร์เซ็นต์

2. ย่อยสลายสารประกอบที่เป็นพิษต่าง ๆ มากมาย

3. ย่อยสลายสารประกอบ อะโรมาติค (Aromatic)

4. เคลื่อนย้ายพวกคาร์บอนมอนนอกไซด์ (CO)

5. เกิดกระบวนการ Denitrification และ Deammonification ทำให้ช่วยลดแอมโมเนียและไนเตรทที่เป็นปัญหาในการบำบัดน้ำเสียได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จารุวรรณ (2532) ได้นำแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไปใช้บำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานมันสำปะหลัง พบว่าสามารถลดค่าซีโอดี (ค่าความสกปรกของน้ำเสีย) ได้มากถึง 94.4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้แบคทีเรียเป็นหัวเชื้อในปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ความสามารถในการกำจัดความสกปรกในน้ำเสียเพิ่มสูงขึ้นเป็น 96.45 เปอร์เซ็นต์

Kobayashi และคณะ (1971) นำแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีม่วงในกลุ่มไม่สะสมกำมะถันกำจัดน้ำทิ้งที่มีค่าบีโอดี (BOD) มากกว่า 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยไม่ต้องเจือจางน้ำเสียเป็นเวลา 1 สัปดาห์ โดยใช้วิธีการเลี้ยงแบบให้อากาศ และมีแสง ซึ่งพบว่าสามารถลดค่า BOD ได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้มีการใช้แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง *R. Capsulata* บำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าสัตว์ พบว่าสามารถลดค่าบีโอดีจาก 3,030 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือ 140 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพไร้อากาศและมีแสง เปรียบเทียบกับการบำบัดโดยไม่ใส่เชื้อ *R. Capsulata* ค่าบีโอดี ลดจาก 3,480 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็น 370 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.6.2 การใช้ในทางการแพทย์

แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสามารถสังเคราะห์ยูบิควิโนน (UQ_{10}) ขึ้นภายในเซลล์ได้ โดยแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงที่นิยมนำมาใช้ผลิต เช่น *Rhodocyclus gelatinosus, Rhodobacter capsulatus, Rhodospirillum rubrum* ฯลฯ ซึ่งยูบิควิโนนที่สกัดจากแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงนำมาเป็นอาหารเสริมในผู้ป่วยโรคเกี่ยวกับหัวใจ และหลอดเลือด นอกเหนือจากการนำยูบิควิโนนมาเป็นอาหารเสริมแล้วยังมีผู้สนใจในคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชั่น (Antioxidant) และเป็นสารธรรมชาติที่ร่างกายมนุษย์สามารถสังเคราะห์ขึ้นได้เองของยูบิควิโนน ยูบิควิโนนนำมาใช้ในทางเครื่องสำอางสำหรับลดการเกิดริ้วรอย ชะลอการเสื่อมของเซลล์ผิวหนังจากแสงแดด (Photo aging)

2.6.3 การใช้แหล่งอาหารเสริมของสัตว์

เซลล์ของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง อาทิเช่น แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสายพันธุ์ *Rhodopseudomonas capsulate* เป็นเซลล์ที่มีปริมาณโปรตีนสูงถึง 60-65 เปอร์เซน ซึ่งโปรตีนเหล่านี้ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นครบถ้วน และยังมีวิตามินและแร่ธาตุ เช่น วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 วิตามินบี 6 กรดฟอลิค วิตามินบี 12 วิตามินซี วิตามินดี และวิตามินอี เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรงควัตถุสารโคแฟคเตอรเช่น ยูบิควิโนน โคเอนไซม์คิว ประกอบอยู่ด้วยจึงเหมาะที่จะใช้เป็นแหล่งอาหาร

Kabayashi และ Kurata (1978) ได้ทดลองผสมเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงในอาหารเลี้ยงไก่ในปริมาณ 0.01–0.04 เปอร์เซ็นต์ในรูปของเซลล์สด ซึ่งพบว่าไก่จะเริ่มไข่เร็วขึ้น ระยะเวลาในการให้ไข่มากขึ้น คุณภาพของไข่ดีขึ้น สีของไข่แดงขึ้น น้ำหนักไข่และน้ำหนักตัวดีขึ้น และอัตราการใช้อาหารของไก่ดีขึ้นด้วย นอกจากนี้ยังได้มีการนำแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงมาผสมในอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปลาสวยงาม เช่น ในอาหารเลี้ยงปลาทองเมื่อนำเอาแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสายพันธุ์ *Rhodobactor gelatinosa* ซึ่งมีปริมาณโปรตีนอยู่ 57.93 เปอร์เซ็นต์และยังมีวิตามินและกรดอะมิโนที่จำเป็นในปริมารมาก เช่น วิตามินบี 12 วิตามินอี เมไทโอนีน และไลซีน ซึ่งลักษณะการผสมจะผสมในรูปเซลล์สด โดยทดแทนปลาป่น 50 เปอร์เซ็นต์ พบว่าช่วยให้การเจริญของปลาดีขึ้น มีอัตราการอยู่รอด 96.3 เปอร์เซ็นต์ และทำให้ไข่สุกเร็วขึ้น

2.6.4 การใช้ในการเกษตร

การผลิตฮอร์โมนพืชแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงเช่น ไซโตไคนิน (Cytokinin) ผลิตจาก Rhodospirillum rubrum, ไคเนติน (Kinetin) และซีเอติน (Zeatin) ซึ่งผลิตโดย *Rhodobacter sphaeroides* นอกจากนี้ยังมีออกซิน (Auxin), กรดอินโดล-3-อะซิติก (Indole-3-acetic acid ; IAA) และกรดอินโดล-3-บิวทีริก (Indole-3-butyric acid ; IBA) ผลิตจาก *Rhodobacter sphaeroides*

สารกำจัดวัชพืช และยาฆ่าแมลงชีวภาพ เช่น 5-Aminolevulinic acid (ALA) ซึ่งแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถันที่ผลิตสารนี้เช่น *Rhodobacter palustris* (ได้ ALA 750 นาโนโมล) , *Rhodobacter sphaeroides* (ได้ ALA 2,000-4,000 นาโนโมล)

Maki (2004) นำแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไปใช้สำหรับการเพาะปลูกข้าว ได้รายงานว่าดินในบริเวณราข้าวในระยะข้าวตั้งท้อง จะมีสภาวะไม่มีออกซิเจนทำให้แบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มแอนแอโรบิกแบคทีเรียเจริญได้ดี สร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ขึ้นมา ทำให้มีผลไปยับยั้งกระบวนการเมตาโบลิซึมของรากข้าว ซึ่งเป็นพิษต่อราก แต่เมื่อนำแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงมาใส่ลงในดินในระยะเวลาดังกล่าว แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงจะเปลี่ยนไฮโดรเจนซัลไฟด์ให้อยู่ในรูปสารประกอบซัลเฟอร์ที่ไม่เป็นพิษต่อราก จึงมีผลให้รากของต้นข้าวเจริญงอกงามมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัดและลักษณะของต้นข้าวก็มีความแข็งแรง ซึ่งมีผลให้ผลผลิตของข้าวมากขึ้นตามไปด้วย

2.7 จลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์

การศึกษาไคเนติกส์ของการเลี้ยงเชื้อ (Fermentation kinetics) เป็นสิ่งจำเป็นที่จะทำให้เราทราบธรรมชาติของการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการเลี้ยงเชื้อ เช่น การเจริญของจุลินทรีย์ การเปลี่ยนแปลงของสับสเตรท การเกิดผลผลิต การเปลี่ยนแปลงของ pH และอุณหภูมิ รวมทั้งปริมาณออกซิเจนที่ถูกดูดซึมไปใช้ โดยบ่งบอกปริมาณการเปลี่ยนแปลงเป็นตัวเลขอย่างแน่ชัด ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาไคเนติกส์ของการเลี้ยงเชื้อนี้จะเป็นประโยชน์อย่างมากในการควบคุมปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งการจัดการระบบการเลี้ยงเชื้อให้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเลี้ยงเชื้อสามารถแบ่ง ตามลักษณะของกระบวนการที่ใช้ได้เป็น 3 ชนิดคือ batch, continuous และ fed batch fermentation และไคเนติกส์ของกระบวนการเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดนี้ก็จะแตกต่างกันไป

2.7.1 Batch fermentation

เป็นการเพาะเลี้ยงจุลินทรย์ในระบบปิดที่มีปริมาณสารอาหารเริ่มต้นจำกัดให้จุลินทรีย์มีรูปแบบการเจริญ ดังแสดงในรูปที่ 2.8 เมื่อใส่จุลินทรีย์ลงในอาหาร ระยะแรกเป็นระยะที่จุลินทรีย์ปรับตัว เซลล์จะยังไม่มีการเพิ่มจำนวน เรียกระยะนี้ว่า lag phase ระยะเวลาในช่วง lag phase ในกระบวนการเลี้ยงเชื้อในระดับอุตสาหกรรมจะต้องทำให้สั้นที่สุดเพื่อลดต้นทุนการผลิต โดยใช้เชื้อเริ่มต้น (Starter หรือ Inoculum) ที่เหมาะสม หลังจากนั้นจุลินทรีย์จะมีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นตามลำดับ จนกระทั่งเข้าสู่ exponential หรือ log phase ซึ่งเป็นระยะที่จุลินทรีย์มีอัตราการเจริญสูงสุดและคงที่ การเจริญของจุลินทรีย์ในระยะ log phase นี้สามารถเขียนเป็นสมการได้ดังนี้

$$dx / dt = \mu x \qquad (1)$$

เมื่อ x = ความเข้มข้นของมวลเซลล์ (biomass)

t = เวลา มีหน่วยเป็นชั่วโมง

μ = อัตราการเจริญจำ เพาะ (specific growth rate) มีหน่วยเป็นชั่วโมง 1 เมื่อ integrate สมการ (1) จะได้

$$x_t = x_o e^{\mu t} \qquad (2)$$

เมื่อ x_0 = ความเข้มข้นของมวลเซลล์เริ่มต้น

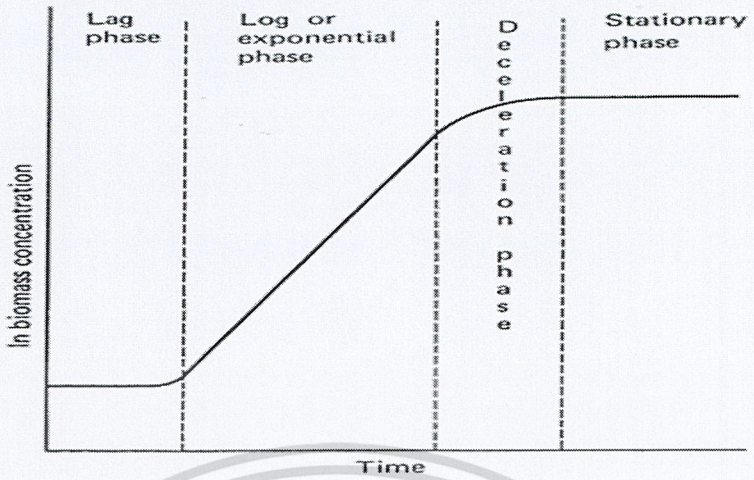
x_t = ความเข้มข้นของมวลเซลล์หลักจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา t ชั่วโมง

e = ฐานของ natural logarithm

เมื่อใส่ natural logarithm ในสมการ (2) จะได้

$$\ln x_t = \ln x_0 + \mu t \qquad (3)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

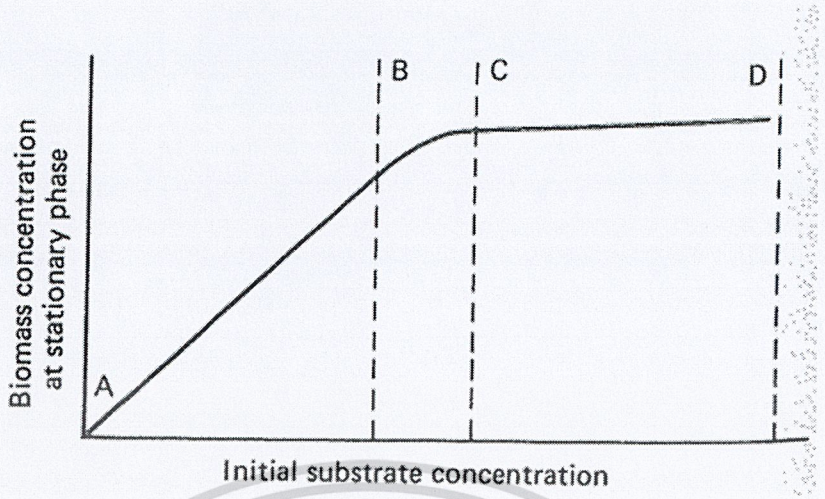


รูปที่ 2.8 กราฟแสดงการเจริญของจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงในระบบ batch

ที่มา : Stanbury and Whitaker (1984)

ดังนั้นเมื่อเขียนกราฟระหว่าง natural logarithm ของความเข้มข้นของมวลเซลล์กับเวลา จะได้กราฟเส้นตรงซึ่งมีค่าความลาดเอียง (slope) เท่ากับอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) ซึ่งจะแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์ และสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ จากสมการ (2) พบว่าจุลินทรีย์สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่องไม่มีที่สิ้นสุด แต่ในความเป็นจริงการเจริญของจุลินทรีย์จะถูจำ กัดด้วยสารอาหาร และสารพิษ ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น ดังนั้นหลังจากที่จุลินทรีย์เจริญเติบโตอย่างรวดเร็วไปได้ระยะหนึ่งแล้วอัตราการเจริญจะค่อย ๆ ลดลง จนกระทั่งหยุดเจริญเพิ่มจำนวน การศึกษาการเจริญที่มีขอบเขตจำกัดของจุลินทรีย์เมื่อเพาะเลี้ยงแบบ batch ในอาหาร ที่มีความเข้มข้นของสับสเตรทเริ่มต้นต่างกัน พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์สูงสุดที่ระยะ stationary phase กับความเข้มข้นของสับสเตรทเริ่มต้น แบ่งได้เป็น 3 โซนคือ A-B,B-C และ C-D ดังแสดงในรูปที่ 2.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.9 ผลของความเข้มข้นของสับสเตรทเริ่มต้นต่อปริมาณเซลล์สูงสุด

ที่มา : stanbury and whitaker (1984)

ในโซน A-B ปริมาณเซลล์สูงสุดที่ stationary phase จะเพิ่มขึ้นเป็นอัตราส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสับสเตรทที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสามารถเขียนเป็นสมการได้ดังนี้

$$x = Y (S_R - s) \qquad (4)$$

เมื่อ x = ความเข้มข้นของมวลเซลล์ที่ผลิตได้

Y = yield cofactor (dimensionless constant)

S_R = ความเข้มข้นของสับสเตรทเริ่มต้น

s = ความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหลือ

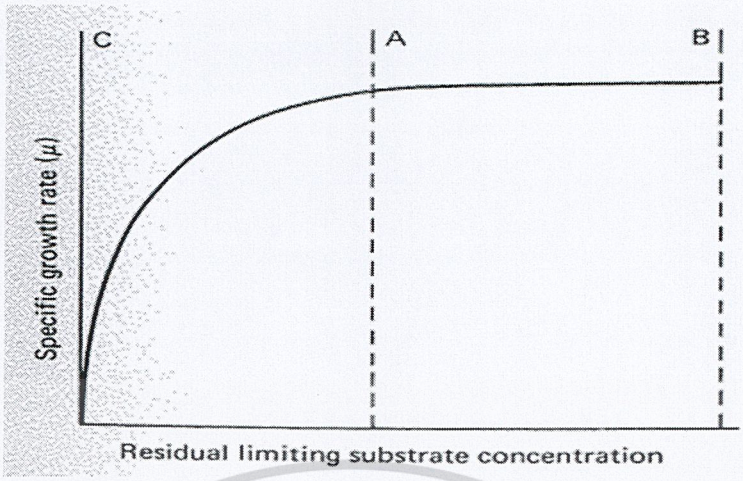
ในโซน A-B การเจริญเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์จะหยุดลงเมื่อ S มีค่าเท่ากับศูนย์ ดังนั้นจึงสามารถใช้สมการ (4) ในการประมวลค่าปริมาณเซลล์ที่เกิดขึ้นจากสารอาหารที่ใช้เป็นสับสเตรทได้

ในโซน B-C แม้ว่าความเข้มข้นของสับสเตรทที่ใช้จะเพิ่มขึ้น แต่ปริมาณเซลล์ที่ stationary phase จะเพิ่มขึ้นและลดลงตามลำดับ เนื่องจากการสะสมพิษที่เกิดจากการเจริญของเซลล์เองและการสะสมสารพิษนี้เมื่อเพิ่มขึ้นมากถึงจุหนึ่งแล้วจะทำ ให้เซลล์ไม่สามารถเพิ่มจำนวนต่อไปได้ แม้จะเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทอีกก็ตาม ดังแสดงในโซน C-Dนอกจากนี้การที่จุลินทรีย์มีอัตราการเจริญลดลงจนกระทั่งหยุดเจริญเนื่องจากอาหารหมด ยังสามารถอธิบายได้ในรูปความสัมพันธ์ระหว่าง μ และความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหลือโดยใช้สมการของ Monod และรูปที่ 2.10 ดังนี้คือ

$$\mu = \mu_{max} \cdot s / K_s + s \qquad (5)$$

เมื่อ K_s = ค่าคงที่ในการใช้สับสเตรท (substrate utilization constant) ซึ่งมีค่าเท่ากับความเข้มข้นของสับสเตรท μ เท่ากับ $\frac{1}{2}\mu_{max}$ และเป็นค่าที่แสดงสัมพรรคภาพ (affinity) ของจุลินทรีย์ต่อสับสเตรทอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.10 ผลของความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหลือต่ออัตราการเจริญจำเพาะของแบคทีเรีย

ที่มา : stanbury and whitaker (1984)

จากรูปที่ 2.10 โซล A-B จะอยู่ในช่วง log phase ซึ่งเป็นช่วงที่มีความเข้มข้นของสับสเตรทมากเกินพอและจุลินทรีย์ มีอัตราการเจริญสูงสุด ส่วนโซน C-A จะอยู่ในช่วง deceleration phase ซึ่งเป็นช่วงที่จุลินทรีย์มีอัตราการเจริญลดลง เนื่องจากความเข้มข้นของสับสเตรทลดลง จึงมีอาหารเหลือไม่เพียงพอที่จะทำให้จุลินทรีย์เจริญได้ในอัตราสูงสุด ในกรณีที่จุลินทรีย์มีสัมพรรคภาพต่อสับสเตรทสูง (มีค่า K_s ต่ำ) อัตราการเจริญของจุลินทรีย์จะเริ่มลดลงก็ต่อเมื่อความเข้มข้นของสับสเตรทลดลงถึงระดับที่ต่ำมาก ดังนั้นจึงทำให้มี deceleration phase สั้น แต่ในกรณีที่จุลินทรีย์มีสับสเตรทต่ำ (มีค่า K_s สูง) อัตราการเจริญของจุลินทรีย์จะเริ่มลดลงที่ความเข้มข้นของสับสเตรทค่อนข้างสูงจึงทำให้มี dcceleration phase ยาว อย่างไรก็ตามโดยทั่วไปค่า K_s ของจุลินทรีย์ต่อสับสเตรทจะมีค่าน้อยมาก

การเลี้ยงเชื้อแบบ batch สามารถใช้ได้ทั้งการผลิตมวลเซลล์ สารเมแทบอไลท์ปฐมภูมิ และสาร เมแทบอไลท์ทุติยภูมิ โดยในการผลิตมวลเซลล์ ควรใช้สภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ส่งเสริมให้เซลล์มีการเจริญเพิ่มจำนวนได้มากที่สุด การผลิตสารเมแทบอไลท์ปฐมภูมิ ควรใช้สภาวะที่ทำให้มี log phase ลดลงก็จะทำให้มีการสร้างสารเมแทบอไลท์ทุตยภูมิได้เร็วขึ้น

2.7.2 Fed-batch fermentation

Yoshida และคณะ (1973) ได้นำ คำว่า fed-batch culture มาใช้อธิบายการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบ batch ซึ่งมีการเติมอาหารเข้าไปอย่างต่อเนื่องหรือเติมเป็นระยะ ๆ โดยไม่มีการถ่ายอาหารที่เพาะเลี้ยงเชื้อแล้วออกเลย เพราะฉะนั้นปริมาตรของอาหารจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพิ่มขึ้น ถ้าพิจารณาการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบ batch การเจริญของจุลินทรีย์จะถูกจำกัดโดยความเข้มข้นของสับสเตรท ดังนั้นความเข้มข้นของมวลเซลล์ที่เวลาใด ๆ จะหาได้จากสมการ

$$x_t = x_0 + Y (S_R \cdot s)$$

เมื่อ x_t = ความเข้มข้นของมวลเซลล์ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา t ชั่วโมง

x_0 = ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น

เมื่อ $s \approx 0$ ความเข้มข้นของมวลเซลล์จะมีค่ามากที่สุด (x_{max}) และทำ ให้ x_0 มีค่าน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับ x_{max} ดังนั้นจากสมการจะได้

$$x_{max} \approx Y \cdot S_R$$

ถ้าเริ่มเติมอาหารเพิ่มในเวลาที่ x มีค่าเท่ากับ x_{max} โดยให้อัตราการเจือจางมีค่าต่ำกว่า μ_{max} จะทำให้สับสเตรทที่เข้าสู่ภาชนะที่เพาะเลี้ยงเชื้อถูกใช้ไปอย่างรวดเร็ว ดังนั้น

$$FS_R \approx \mu (X/Y)$$

เมื่อ F = อัตราการไหลของอาหาร

X = ปริมาณมวลเซลล์ทั้งหมดในระบบ

= xV เมื่อ V คือปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อในระบบที่เวลา t

จากสมการอาจสรุปได้ว่าสับสเรตทที่เติมเพิ่มเข้าไป มีค่าเท่ากับสับสเตรทที่จุลินทรีย์ใช้ไป ดังนั้น ds/dt ≈ 0 แม้ว่าปริมาณมวลเซลล์ทั้งหมด (X) จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลา แต่ความเข้มข้นของมวลเซลล์ (x) จะมีค่าคงที่ นั่นคือ ds/dt ≈ 0 μ = D สภาวะเช่นนี้เรียกว่า quasisteady state อัตราการเจือจางจะลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นตามลำดับ เนื่องจากปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อในภาชนะเพิ่มขึ้น การหาค่า D สามารถคำ นวณได้จากสมการ

$$D = F / (V_0 + F_t)$$

เมื่อ V_0 = ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลาเริ่มต้น

ดังนั้นสภาวะคงที่ของระบบ chemostat กับ quasi-stedy state ของระบบ fed-batch จึงมีควมแตกต่างกันคือ ค่า μ ในระบบ chemostat จะมีค่าคงที่ แต่ค่า μ ในระบบ fed-batch จะมีค่าลดลงตามระยะเวลา

2.7.3 Continuous fermentation

การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบ batch ถ้าใช้อาหารเลี้ยงเชื้อทีมีส่วนประกอบบางอย่างที่จำกัดการเจริญของจุลินทรีย์ แต่การเจริญไม่ถูกจำกัดด้วยสารพิษแล้ว จะสามารถเพิ่มระยะเวลาการเจริญในระยะ log phase ให้นานขึ้นได้โดยการเติมอาหารใหม่ลงไปจนกว่าจะเต็มภาชนะแต่ถ้ามีการถ่ายอาหารเก่าออกจากภาชนะจำนวนหนึ่งและเติมอาหารใหม่เข้าไปแทนที่ในปริมาณเท่าเดิม จะทำให้จุลินทรีย์เจริญเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่อง และถ้ามีการถ่ายอาหารเก่าและเติมอาหารใหม่เข้าสู่ภาชนะอย่างต่อเนื่องด้วยอัตราที่เหมาะสม จะทำให้เกิดสภาวะคงตัว (Steady state) กล่าวคือปริมาณเซลล์ที่เกิดขึ้นใหม่จะเท่ากับปริมาณเซลล์ในอาหารเก่าที่ปล่อยออกจากภาชนะ ความสัมพันธ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระหว่างอัตราการไหลของอาหารเข้าสู่ภาชนะกับปริมาตรของภาชนะเรียกว่าอัตราการเจือจาง (dilution rate , D) สามารถเขียนเป็นสมการได้

$$D = F/V \quad (1)$$

เมื่อ F = อัตราการไหล (หน่วยเป็นลูกบาศก์เมตรต่อชั่วโมง)

V = ปริมาตร (ลูกบาศก์เมตร)

D = อัตราการเจือจาง (หน่วยเป็นต่อชั่วโมง)

การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเซลล์ในระยะเวลาหนึ่ง อาจเขียนเป็นสมการได้ดังนี้

$$dx/dt = \text{growth} - \text{output}$$

หรือ $$dx/dt = \mu x - Dx \quad (2)$$

แต่ที่สภาวะคงที่ ความเข้มข้นของเซลล์จะคงที่ ดังนั้น dx/dt = 0 และ

$$\mu x = Dx \quad (3)$$

$$\mu = D \quad (4)$$

ดังนั้นที่สภาวะคงที่อัตราการเจริญจำเพาะจะมีค่าเท่ากับอัตราการเจือจางเมื่อแทนค่า $\mu = \mu_{max} s / K_s + s$ ลงในสมการ (2) จะได้

$$dx/dt = x [(\mu_{max} S/Ks + s) - D] \quad (5)$$

เป็นสมการได้ดังนี้เป็นสมการได้ดังนี้

$$s/dt = \text{input of substrate} - \text{output of substrate} - \text{consumption by cells}$$

หรือ $$ds/dt = DS_R - D_s - \mu_{max} \{x/Y [s/ (K_s + s)] \} \quad (6)$$

ที่สภาวะคงที่ ds/dt และ dx/dt จะมีค่าเท่ากับศูนย์ ดังนั้นเมื่อแทนค่าเหล่านี้ลงในสมการ (5) และ (6) จึงสามารถเขียนใหม่ได้ดังนี้

$$\bar{x} = Y (S_R - s) \quad (7)$$

$$\bar{S} = K_s D/ (\mu_{max} - D) \quad (8)$$

เมื่อ $\bar{x}$ = ความเข้มข้นของเซลล์ที่สภาวะคงตัว

$\bar{S}$ = ความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหลือที่สภาวะคงตัว

สมการ (8) อธิบายกลไกของ D ในการควบคุม μ เมื่อจุลินทรีย์มีการเจริญจะทำให้ปริมาณสารอาหารลดลง จนกระทั่งความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหลือสนับสนุนการเจริญของจุลินทรีย์ได้ในอัตราที่เท่ากับ D ซึ่งจะทำให้เกิดสภาวะคงที่ แต่ถ้าความเข้มข้นของสับสเตรทลดลงมากเกินไปจะทำให้เซลล์ถูกชะออกมาในอัตราที่สูงกว่าการเจริญ ทำให้จำนวนเซลล์ลดลงและความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหลือเพิ่มขึ้น อัตราการเจริญของจุลินทรีย์ก็จะสูงขึ้นตามไปด้วย และในที่สุดระบบก็จะเข้าสู่สมดุลได้อีกครั้ง จะเห็นได้ว่าการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่องนี้เป็นระบบที่สามารถปรับตัวให้อยู่ในสมดุลได้เอง (self-balancing system)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระบบการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่องซึ่งได้อธิบายมาแล้วนี้เป็นแบบ chemostat เนื่องจากอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ถูกควบคุมโดยสภาพแวดล้อมทางเคมี ซึ่งในที่นี้ได้แก่ความเข้มข้นของสับสเตรทในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ยังมีระบบควบคุมการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่องอีกแบบคือ turbidostat ซึ่งใช้วิธีควบคุมอัตราการไหลของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมเพื่อให้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงมีความเข้มข้นคงที่ สำหรับวิธีการควบคุมความเข้มข้นของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงให้คงที่นั้นอาจทำได้โดยการวัดความขุ่นของเซลล์โดยใช้ photoelectric cell ต่อเข้ากับเครื่องส่งสัญญานไปยังเครื่องสูบอาหารเลี้ยงเชื้อที่จะส่งเข้าสู่ระบบ หรืออาจใช้วิธีการวัดความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์แทนก็ได้ ซึ่งในกรณีหลังนี้ การเรียกชื่อระบบควรใช้คำว่า biostat จะถูกต้องกว่า โดยทั่วไปการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่องนิยมใช้ระบบ chemostat มากกว่าระบบ turbidostat เนื่องจากไม่จำเป็นต้องใช้ระบบควบคุมที่ซับซ้อนในการรักษาสภาวะคงที่ อย่างไรก็ตามระบบ tubidostat ก็มีข้อดี คือ ไม่มีปัญหาการชะล้างเซลล์ออกจากระบบจนหมดในระยะแรกของการเลี้ยงเชื้อ

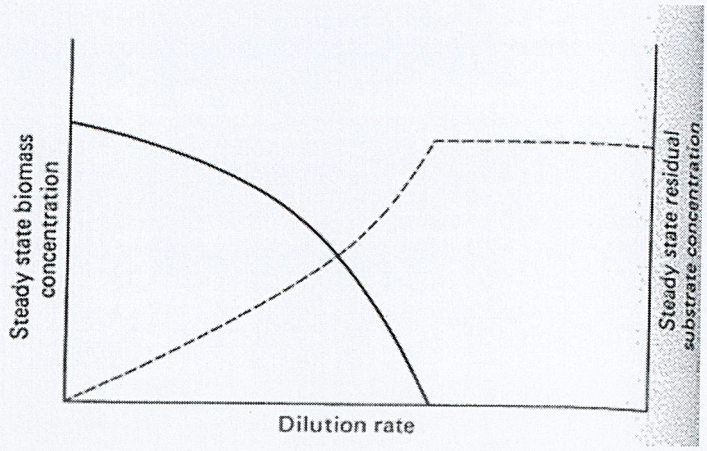
ลักษณะทางไคเนติกส์ของจุลินทรีย์ในระบบ chemostat สามารถอธิบายได้โดยดูได้จากค่าคงที่ Y , μ_{max} และ K_s ค่า Y จะมีผลต่อความเข้มข้นของเซลล์ที่สภาสวะคงที่ ค่า μ_{max} จะมีผลต่ออัตราการเจือจางสูงสุดที่จะใช้ได้ และค่า K_s จะมีผลต่อความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหลือ

ความเข้มข้นของเวลล์ที่ได้ และมีผลต่ออัตราการเจือจางต่างกัน จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ s และ x ดังแสดงในรูปที่ 2.11 เมื่ออัตราการเจือจางเพิ่มขึ้น s จะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยและ x จะลดลงเพียงเล็กน้อย จนกระทั่งอัตราการเจือจางมีค่าเข้าใกล้ μ_{max} จึงจะทำให้ s เพิ่มขึ้น และ x จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญสำหรับอัตราการเจือจางที่ทำให้ x มีค่าเท่ากับศูนย์ (เซลล์ถูกชะล้างออกจากระบบจนหมด) เรียกว่า critical dilution rate (D_{crit}) ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการ

$$D_{crit} = \mu_{max} \cdot S_R / K_s + S_R$$

จากสมการ จะเห็นได้ว่า D_{crit} จะขึ้นอยู่กับค่า μ_{max} , K_s และ S_R ถ้า S_R ยิ่งมีค่ามาก D_{crit} ก็มีค่าเข้าใกล้ μ_{max} มากขึ้น อย่างไรก็ตามในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์อย่างต่อเนื่องโดยใช้ระบบ simple chemostat ตามปกติความเข้มข้นของสับสเตรทจะเป็นตัวจำกัดการเจริญเติบโตทำให้จุลินทรีย์มีอัตราการเจริญเติบโตที่ต่ำกว่า μ_{max}

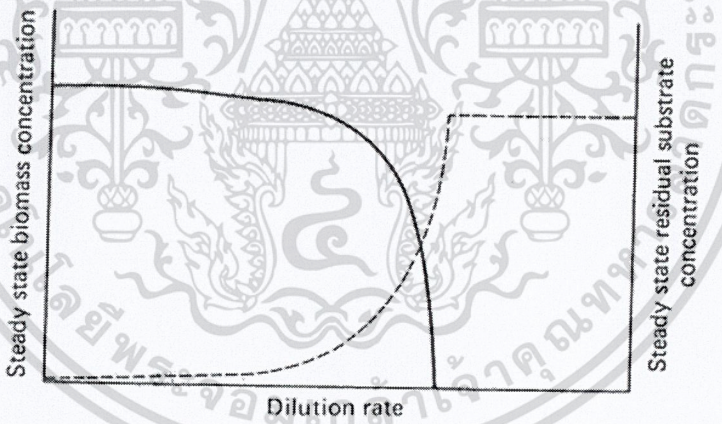
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.11 ผลของอัตราการเจือจางต่อความเข้มข้นของมวลชีวเซลล์และสับสเตรทที่เหลือที่สภาวะคงที่ เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีค่า K_s ต่ำ ในระบบ chemostat

ที่มา : Stanbury and Whitaker (1984)

สำหรับจุลินทรีย์ที่มีค่า K_s สูง เมื่ออัตราการเจือจางเพิ่มขึ้น s จะเพิ่มขึ้น และ x จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในรูปที่ 2.12

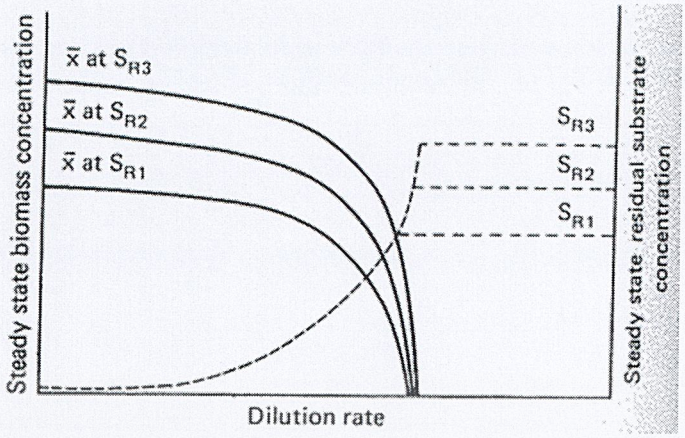


รูปที่ 2.12 ผลขออัตราการเจือจางต่อความเข้มข้นของมวลเซลล์และสับสเตรทที่เหลือที่สภาวะคงที่ เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีค่า K_s สูง ในระบบ chemostat

ที่มา : Stanbury and Whitaker (1984)

ในกรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของสับสเตรทเริ่มต้น (S_R) ต่างกัน เมื่อ S_R เพิ่มขึ้น x จะเพิ่มขึ้นตาม แต่ไม่มีผลทำให้ s เปลี่ยนแปลงต่างกัน และ D_{crit} จะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้นเมื่อ S_R เพิ่มขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 2.13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.13 ผลของความเข้มข้นของสับสเตรทเริ่มต้น ต่อความเข้มข้นของมวลเซลล์ และสับสเตรทที่เหลือที่สภาวะคงที่ เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบ chemostat

ที่มา : Stanbury และ Whitaker (1984)

อย่างไรก็ตามในทางปฏิบัติการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์อย่างต่เนื่องโดยใช้ระบบ chaemostat จะได้ผลแตกต่างไปจากทฤษฎีที่กล่าวมา เนื่องจากความไม่สมบูรณ์ของเครื่องมือ และอุปกรณ์ต่าง ๆ เช่น การกวนผสมไม่ดีทำให้จุลินทรีย์ติดอยู่ตามผนังภาชนะ หรืออาจเกิดจากสาเหตุทางด้านสรีระวิทยาของจุลินทรีย์ เช่น การสับสเตรทเมื่อใช้อัตราการเจือจางสูง ๆ เป็นต้น การเลี้ยงจุลินทรีย์อย่างต่อเนื่องโดยใช้ระบบ chemostat สามารถดัดแปลงได้หลายแบบแต่ที่นิยมใช้กันมากที่สุด ได้แก่ multistage system และ feedback system

2.8 ข้อดีและข้อเสียของระบบต่อเนื่อง

การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โดยใช้ระบบต่อเนื่องมีข้อดีกว่าการใช้ระบบ batch คือ ให้ผลผลิตต่อหน่วยเวลา (productivity) สูงกว่า มีความสม่ำเสมอในการดำเนินงาน และควบคุมโดยใช้ระบบอัตโนมัติได้ง่าย แต่มีข้อเสียคือ มีโอกาสเกิดการปนเปื้อนได้ง่ายกว่าการใช้ระบบ batch Productivity หมายถึงปริมาณผลผลิตที่ได้ต่อหน่วยเวลาของการเลี้ยงเชื้อ ในการเลี้ยงเชื้อแบบ batch จะหา productivity ของมวลเซลล์ได้จากสูตร

$$R_{batch} = x_{max} \cdot x_0 / t_i + t_{ii}$$

เมื่อ R_{batch} = ความเข้มข้นของเซลล์ที่ผลิตได้ต่อชั่วโมง

x_{max} = ความเข้มข้นสูงสุดของเซลล์ที่ stationary phase

x_0 = ความเข้มข้นของเซลล์ที่เริ่มต้น

t_i = ระยะเวลาที่จุลินทรีย์เจริญกด้วยอัตราเร็ว μ_{max}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

t_{ii} = ระยะเวลาทั้งหมดที่ใช้ในกระบวนการเลี้ยงเชื้อ ยกเว้นระยะเวลาที่จุลินทรีย์เจริญด้วยอัตราเร็ว μ_{max} ระยะเวลาในช่วงนี้จะรวมทั้งเวลาในระยะ lag phase , deceleration phase การทำให้ปราศจากเชื้อ และการเก็บเกี่ยวผลผลิต

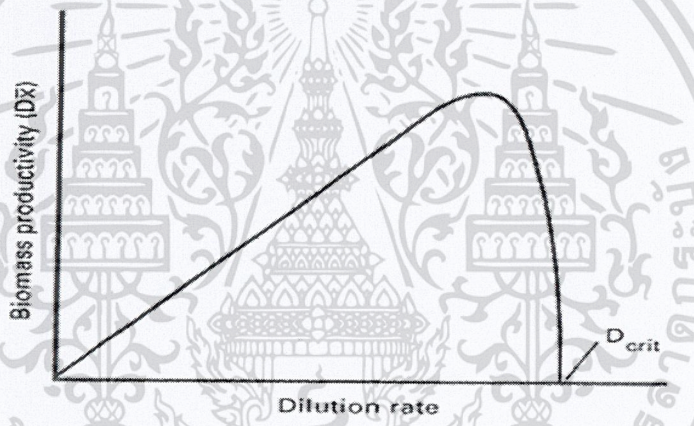
สำหรับ productivity ของกระวบการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่อง จะหาได้จากสูตร

$$R_{cont} = Dx [1 .(t_{iii}/T)]$$

เมื่อ R_{cont} = ความเข้มข้นของเซลล์ที่ผลิตได้ต่อชั่วโมง

t_{iii} = ระยะเวลาตั้งแต่การเตรียมถังหมัก การทำ ให้ปราศจากเชื้อ และการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบ batch ก่อนที่จะเข้าสู่ระบบต่อเนื่อง จนกระทั่งเข้าสู่สภาวะคงที่

T = ระยะเวลาที่สภาวะคงที่ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อนเอง เมื่ออัตราการเจือจางเพิ่มขึ้น จะทำ ให้ค่า Dx มีค่าสูงสุด หลังจากนั้นถ้าเพิ่มอัตราการเจือจางต่อไป จะทำ ให้ค่า Dx ลดลง ดังแสดงในรูปที่ 2.14



รูปที่ 2.14 ผลของอัตราการเจือจางต่อ biomass productivity เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่อง

ที่มา : Stanbury และ Whitaker (1984)

Productivity ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบบ batch เป็นค่าเฉลี่ยตลอดระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อ ผลผลิตของเซลล์ส่วนใหญ่เกิดขึ้นในระยะหลังของการเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบ batch จะได้ผลผลิตสูงสุดก็ต่อเมื่อกระบวนการเลี้ยงเชื้อสิ้นสุดลง แต่การเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่องโดยใช้อัตราการเจือจางที่เหมาะสม ภายใต้สภาวะคงตัว ผลผลิตจะมีค่าสูงสุดและค่าคงที่ตอลดเวลาทำให้ได้ productivity สูงกว่าการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบ batch มาก นอกจากนี้ระบบต่อเนื่องยังสามารถเลี้ยงเชื้อได้เป็นเวลานานหลายสัปดาห์ หรือหลายเดือน ทำให้ t_{iii} (non-productivity period) มีค่าน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาทั้งหมดที่ทำให้เกิดผลผลิต ในขณะที่ระบบ batch หมักได้ในระยะเวลาจำกัด ทำให้ t_{iii} มีค่ามากเมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาที่จุลินทรีย์เจริญด้วยอัตราสูงสุด (μ_{max})

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากการผลิตมวลเซลล์แล้ว ระบบการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องยังสามารถใช้ผลิตสารอื่นๆ จากจุลินทรีย์ และทำให้ได้ผลผลิตสูงกว่าระบบ batch เนื่องจากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบต่อเนื่องสามารถปรับอัตราการเจือจางให้เหมาะสมเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงสุดเป็นเวลานาน ๆ ได้ ขณะที่ระบบ batch มีระยะเวลาจำกัดในการสร้างผลผลิต ดังนั้นถ้าต้องการให้ได้ผลผลิตปริมาณเท่ากันในระยะเวลาที่เท่ากัน การเลี้ยงเชื้อโดยใช้ระบบต่อเนื่องจึงใช้ถังหมักขนาดเล็กกว่าระบบ batch มาก ทำให้ต้นทุนการก่อสร้าง การติดตั้ง และการบำรุงรักษาต่ำกว่าระบบ batch

ความสม่ำเสมอในการดำเนินงาน และการควบคุมด้วยระบบอัตโนมัติ เนื่องจากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่องเป็นระบบที่ควบคุมตัวเองได้ อัตราการเจริญของจุลินทรีย์จะปรับตัวตามอัตราการเจือจาง จนกระทั่งเกิดสภาวะคงตัว ซึ่งมีความเข้มข้นของเซลล์ สับสเตรท ผลผลิต และสารพิษคงที่ และมีความต้องการปัจจัยต่าง ๆ เช่น ปริมาณออกซิเจน น้ำหล่อเย็น และpH คงที่ตลอดเวลา ดังนั้นจึงทำให้กระบวนการควบคุมการเลี้ยงเชื้อคงตัวด้วย แต่ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบ batch กระบวนการควบคุมการเลี้ยงเชื้อจะมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา เช่น ปริมาณออกซิเจนที่ต้องการในระยะแรกจะต่ำกว่าระยะหลัง เนื่องจากเซลล์เจริญเพิ่มจำนวนมากขึ้นและอาหารมีความหนืดสูงขึ้น ปริมาณน้ำหล่อเย็นจะต้องการเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อที่เพิ่มขึ้น และการเติมสารละลายกรดหรือด่างเพื่อควบคุม pH จะมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบ batch ยังต้องการแรงงานมากในช่วงเวลาการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และการเก็บเกี่ยวผลผลิต แต่ใช้แรงงานน้อยในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่องมีการใช้แรงงานค่อนข้างสม่ำเสมอ เนื่องจากมีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อการทำให้ปราศจากเชื้อ และการเลี้ยงเชื้ออย่างต่อเนื่องทำให้ใช้ระบบอัตโนมัติในการควบคุมได้ง่ายกว่าการเพาะเลี้ยงจุลินทรย์แบบ batch

การปนเปื้อน เนื่องจากการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องโดยทั่วไปจะใช้เวลาในการเลี้ยงเชื้อนานกว่าการเลี้ยงเชื้อแบบ batch มาก จึงมีโอกาสเกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นได้มากกว่า จะทำให้จุลินทรีย์ปนเปื้อนอยู่รวมกับจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการผลิต แต่ถ้าจุลินทรีย์ปนเปื้อนเจริญได้ในอัตราที่สูงกว่าอัตราการเจือจาง จะทำให้จุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตถูกแทนที่โดยจุลินทรีย์ปนเปื้อน การแก้ปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นนี้ สามารถทำได้โดยการออกแบบก่อสร้างถังเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ และการจัดการดำเนินงานที่ดีในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ

นอกจากปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ภายนอกแล้ว การเลี้ยงเชื้อโดยใช้ระบบต่อเนื่องยังอาจมีปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ภายในด้วย ซึ่งปัญหานี้ไม่สามารถแก้ไขได้โดยการออกแบบถังหมักและการดำเนินการที่ดี ตามปกติการเลี้ยงเชื้อโดยใช้ระบบต่อเนื่องจะหมักเป็นเวลานาน ทำให้จุลินทรีย์ในระบบมีโอกาสเกิดการกลายพันธุ์ได้มากกว่าการเลี้ยงเชื้อแบบ batch และถ้ามิวแทนท์ที่เกิดขึ้นสามารถปรับตัวเจริญได้ดีกว่าจุลินทรีย์เดิมที่ใช้ในการผลิตจะทำให้จุลินทรีย์เดิมถูกแทนที่โดยมิวแทนท์ได้ ปรากฏการณ์เช่นนี้อาจมีประโยชน์ในการผลิตเซลล์ เพราะมิวแทนท์ที่เจริญขึ้นมาแทนที่นั้นจะมีประสิทธิภาพในการเจริญดีกว่าจุลินทรีย์เดิม แต่ในกรณีที่ต้องการผลิตสารเมแทบอไรท์จาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุลินทรีย์โดยเฉพาะเชื้อที่ได้จาการชักนำ ให้เกิดการกลายพันธุ์หรือการตัดต่อยีน การคัดเลือกเชื้อตามธรรมชาติอาจทำให้เกิดผลเสีย เนื่องจากจุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ถูกดัดแปลงให้สร้างสารเมแทบอไรท์ได้สูงกว่าที่จุลินทรีย์ต้องการปกติ ดังนั้นจุลินทรีย์เหล่านี้จึงมีประสิทธิภาพในการเจริญค่อนข้างต่ำ ถ้ามีมิวแทนท์ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ย้อนกลับ (Back mutation) หรือมีการสูญเสียยีนที่ทำให้สร้างผลผลิตปริมาณสูง จะทำให้ความสามารถในการผลิตสารเมแทบอไรท์ต่ำลง แต่ประสิทธิภาพในการเจริญดีขึ้น จึงเจริญแทนที่จุลินทรีย์เดิมที่ใช้ในกระบวนการเลี้ยงเชื้อทำให้ได้ผลผลิตต่ำลง

2.9 การใช้ระบบต่อเนื่องในอุตสาหกรรม

2.9.1 การใช้ระบบต่อเนื่องในการผลิตมวลเซลล์

เซลล์จุลินทรีย์ที่ผลิตขึ้นเพื่อเป็นอาหารของมนุษย์และสัตว์ เรียกว่า single cell protein (SCP) การผลิตเซลล์ยีสต์เพื่อใช้เป็นอาหารในระดับอุตสาหกรรมเนริ่มขึ้นในประเทศเยอรมนี ตั้งแต่สมัยสงครามโลกครั้งที่ 1 แต่ในระยะนั้นการศึกษาเกี่ยวกับการใช้จุลินทรีย์เป็นอาหารยังไม่มีมากนัก จนกระทั่งประมาณปี ค.ศ. 1960 จึงได้เริ่มมีการศึกษากันอย่างกล้างขวางเกี่ยวกับการผลิต SCP จากแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องซึ่งเป็นวิธีที่ดีที่สุดในการผลิตมวลเซลล์ เนื่องจากให้ผลผลิตต่อหน่วยสูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบ batch มากและการกลายพันธุ์ที่อาจเกิดขึ้นในระบบต่อเนื่อง ก็ไม่เป็นปัญหาในการผลิตมวลเซลล์เหมือนการผลิตสารเมแทบอไรท์ต่าง ๆ จากจุลินทรีย์ การพัฒนากระบวนการผลิต SCP ทำ ให้มีการออกแบบระบบ chemostat ขนาดใหญ่ และถังหมักแบบใหม่ขึ้นอีกหลายชนิด รวมทั้งมีการศึกษาพฤติกรรมของจุลินทรีย์ขณะที่เพาะเลี้ยงอยู่ในระบบด้วย

แหล่งคาร์บอนที่มีการนำมาศึกษาทดลองใช้ในการผลิต SCP มีหลายชนิดคือ เซลลูโลส เวย์ ข้าวสาลี ข้าวโพด แป้งมันฝรั่ง และสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น มีเทน และอัลเคน (alkanes) เป็นต้น

เซลลูโลสเป็นสารที่มีอยู่มากตามธรรมชาติ จึงเป็นที่สนใจของนักวิทยาศสาตร์ ที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำ หรับกระบนการผลิตสารต่าง ๆ รวมทั้ง SCP ด้วย แต่ธรรมชาติของเซลลูโลสเป็นสารที่ย่อยสลายได้ยาก จึงเป็นปัญหาสำคัญในการนำ มาใช้เป็นสับสเตรทสำหรับจุลินทรีย์

เวย์เป็นของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็ง การนำเวย์มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิต SCP เริ่มต้นประมาณปี ค.ศ. 1940 การใช้เวย์ในการผลิต SCP จะทำให้ได้ผลผลิตคุณภาพดี และช่วยลดปัญหาการกำจัดของเสียในอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็งอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้าวสาลี ข้าวโพด แป้งมันฝรั่ง เป็นสารคาร์โบไฮเดรดซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเชื้อรา สำหรับเป็นอาหารมนษย์ได้ดี การใช้เชื้อราเป็นอาหารมีข้อดี คือ สามารถผลิตเป็นโปรตีนที่มีลักษณะเนื้อสัมผัส (Texture protein) ได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น

สารประกอบไฮโดรคาร์บอน เป็นสารที่มีราคาถูกมากในสมัยหนึ่ง ซึ่งเป็นที่สนใจของนักวิทยาศาสตร์ และมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางเพื่อนำมาใช้ในการผลิต SCP แต่หลังจากสงครามตะวันออกกลางปี ค.ศ. 1973 น้ำมันมีราคาสูงขึ้นมาก ความนิยมในการนำสารประกอบไฮโดรคาร์บอนมาใช้จึงลดลง อย่างไรก็ตามบริษัทไอซีไอ ได้ประสบความสำเร็จในการผลิตเซลล์แบคทีเรียจากเมธานอล โดยใช้ถังหมักระบบบบ air-lift ขนาด 3,000 ลูกบาศก์เมตร ผลิต SCP ได้ 54,000-70,000 ตันต่อปี

2.9.2 การใช้ระบบการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องในการผลิตเบียร์

ระบบการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องที่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์มี 2 แบบ คือ cascade หรือ multistage และ tower system

Cascade system เป็นระบบต่อเนื่องซึ่งใช้ในการผลิตเบียร์ที่โรงงาน Watneys' Mortlake ในกรุงลอนดอน ประเทศอังกฤษ โดยใช้ถังหมัก 3 ถัง ถังหมัก 2 ถังแรกใช้สำหรับการหมักเบียร์ และถังที่ 3 ใช้สำหรับการแยกเซลล์ยีสต์ เมื่อใช้เวิร์ทที่มีความถ่วงจำเพาะเริ่มต้น 1,035-1,040 ระยะเวลาที่อยู่ในระบบเท่ากับ 15- 20 ชั่วโมง ในถังที่ 1 ความถ่วงจำเพาะจะลดลงเหลือ 1,019 และในถังที่ 2 ความถ่วงจำเพาะจะลดลงเหลือ 1,011 ระบบนี้สามารถใช้ผลิตอย่างต่อเนื่องได้นานถึง 3 เดือน แต่หลังจากนี้มักมีปัญหาเนื่องจาการสร้างมวลเซลล์มากเกิน กระบวนการผลิตเบียร์แบบต่อเนื่องนี้นอกจากมีใช้ในประเทศอังกฤษแล้ว ในประเทศนิวซีแลนด์ ก็มีการใช้กันอย่างแพร่หลาย และได้รับความสำเร็จสูงด้วย อย่างไรก็ตามการผลิตในระยะหลังถ้ามีการติดตั้งถังหมักใหม่ จะนิยมใช้ระบบ batch มากกว่าการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่อง

Tower system เป็นระบบที่ใช้ถังหมักลักษณะเป็นหอสูง การหมักเบียร์โดยใช้ระบบนี้จะมีเซลล์ยีสต์ออกมาจากถังน้อยมาก เพราะธรรมชาติของยีสต์ที่ใช้มีการจับกลุ่มกันได้ดี เวิร์ทจะถูกส่งเข้าถังหมักทางด้านฐาน ไหลผ่านชั้นของยีสต์ที่เกาะกลุ่มกันขึ้นมาด้านบน หลังจากนั้นจะถูกปล่อยออกจากถังหมักผ่านโซนที่ใช้แยกเซลล์ยีสต์ (Yeast sparation zone) ซึ่งอยู่ท่างด้านบน และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเป็น 2 เท่าของส่วนล่างของถังหมักแล้วจึงใส่ยีสต์ลงไป ในระยะแรกจะต้องควบคุมสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการสร้างเซลล์ยีสต์โดยเติมเวิร์ทเป็นระยะ ๆ ตลอดเวลาประมาณ 9 วัน จนกระทั่งยีสต์มีการเจริญมากขึ้นและจับตัวกันเป็นกลุมอยู่ที่ส่วนฐานของถังหมัก หลังจากนั้นจึงเพิ่มอัตราการไหลของเวิร์ทขึ้นตามลำดับ และปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมกับกรผลิตเบียร์ โดยให้มีการผลิตเซลล์ปริมาณใกล้เคียงกับในระบบ batch ซึ่งใช้เวลาประมาณ 9-12 วัน จึงจะได้สภาวะคงที่ ตามปกติการผลิตเบียร์ในระยะเริ่มต้น 3 สัปดาห์แรกจะได้เบียร์ที่มีคุณภาพต่ำ จึงต้องนำไปผสมกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เบียร์คุณภาพสูงที่ผลิตได้ในภายหลัง เพื่อปรับให้ได้เบียร์ที่มีคุณภาพดีสม่ำเสมอ ดังนั้นการผลิตเบียร์โดยใช้ระบบต่อเนื่องแบบนี้จึงจำเป็นต้องทำการหมักแบบต่อนเองไม่น้อยกว่า 3 เดือน เพื่อชดเชยความสูญเสียที่เกิดขึ้นในระยะแรกของการหมัก

ข้อดีที่สำคัญของการใช้ tower fermenter ในการผลิตเบียร์แบบต่อเนื่องคือช่วยลด wort residance time ลงเหลือเพียง 4-8 ชั่วโมง ในขณะที่การหมักแบบ batch ต้องใช้เวลานาน 1 สัปดาห์ อย่างไรก็ตามได้มีการพัฒนาถังหมักแบบ cylindro-conical ขึ้นใช้ภายหลัง ทำให้ลดระยะเวลาในการบรรจุหีบห่อ (Packaging) เบียร์ใช้เวลานานกว่าการหมักมาก ทำให้เวลาทั้งหมดในการผลิตเบียร์แบบต่อเนื่องโดยใช้ tower fermenter ไม่แตกต่างจากการหมักแบบ batch ใน cylendro-conical vessel มากนัก ดังนั้นการผลิตเบียร์ในระยะหลังจึงนิยมใช้ระบบ batch มากกว่า

สำหรับข้อเสียของระบบนี้คือ การใช้เวลานานในการเริ่มต้นระบบความซับซ้อนทางเทคนิคของโรงงาน ต้องการบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญสูงกว่าการผลิตแบบ batch ความไม่คล่องตัวของระบบเนื่องจากต้องเสียเวลามากในระหว่างที่การหมักสิ้นสุดลง และการเริ่มต้นระบบใหม่ในแต่ละครั้ง นอกจากนี้กลิ่นรสของเบียร์ที่ผลิตได้ก็มักจะมีคุณภาพไม่ดีเท่าเบียร์ที่ผลิตโดยใช้ระบบ batch

2.9.3 การใช้ระบบต่อเนื่องในการแยก และปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์

ธรรมชาติของระบบ chemostat สามารถคัดเลือกเชื้อที่เจริญได้ดีที่สุดในระบบ ดังนั้นจึงนำมาใช้ในการแยก และปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ได้ โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า continuous enrichment culture เทคนิคนี้นอกจากจะสามารถแยกเชื้อที่มี μ_{max} สูงสุดแล้วยังสามารถแยกเชื้อที่มีสัมพรรคภาพต่อสับสเตรทสูงสุดได้ด้วย แม้ว่าเชื้อนั้นจะมี μ_{max} ต่ำกว่าจุลินทรีย์อื่นในระบบก็ตาม เทคนิค continuous enrichment culture มีประโยชน์มากในการแยกเชื้อเพื่อใช้ในกระบวนการผลิตแบบต่อเนื่องในอุตสาหกรรม เพราะจุลินทรีย์ที่แยกได้จะมีประสิทธิภาพในการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องได้ดีกว่าจุลินทรีย์ที่แยกได้โดยวิธี batch enrichment culture

2.9.4 การใช้ระบบต่อเนื่องในการหาข้อมูลพื้นฐานของจุลินทรีย์

การศึกษาสรีระวิทยาพื้นฐาน และสมบัติทางชีวเคมีของจุลินทรีย์ สามารถทำได้ผลดีมาก โดยใช้ระบบ chemostat เนื่องจากจุลินทรีย์มีการเจริญอยู่ที่สภาวะคงที่ และสามารถควบคุมอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ได้โดยการควบคมัตราการเจือจาง นอกจากนี้อัตราการเจริญจะถูกควบคุมโดยความเข้มข้นของสับสเตรทเท่านั้น จึงสามารถตรวจสอบผลของสับสเรตทชนิดต่าง ๆ ที่เป็นปัจจัยจำกัดการเจริญต่อพฤติกรรมของจุลินทรีย์ และข้อมูลที่ได้สามาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Maria J. Barbosa (2000) ได้ทำการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง 3 ชนิด ได้แก่ *Rhodopseudomonas* sp., *Rhodopseudomonas palustrisc* และไม่ระบุสายพันธุ์อีก 1 ชนิด โดยใช้แหล่งคาร์บอน 4 ชนิดคือ กรดแลคเตต กรดมาเลต กรดอะซีติกและกรดบิวทาเรต ผลที่ได้คือ *Rhodopseudomonas* sp. สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุดจากการใช้อะซีเตตเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ยังได้ศึกษาความเข้มของแสงที่แตกต่างกันคือ 40 และ 600 ไมโครโมลโฟตอน m^{-2} s^{-1} (หลอดฮาโลเจนและหลอดทังสเตน) ใช้อะซีเตตเป็นตัวให้อิเล็คตรอนเปรียบเทียบอัตราการผลิตไฮโดรเจน และประสิทธิภาพการให้แสงสว่าง ผลการทดลองที่ได้คือ *Rhodopseudomonas* sp. สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดถึง 25 มิลลิลิตรต่อเชื้อ 1 ลิตรต่อชั่วโมง ภายใต้ความเข้มแสง 680 ไมโครโมลโฟตอน m^{-2} s^{-1} และประสิทธิภาพการให้แสงสว่างสูงสุด 6.2 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้ความเข้มแสง 43 ไมโครโมลโฟตอน m^{-2} s^{-1} นอกจากนี้การลดความเข้มข้นของอะซีเตต จาก 22 เป็น 11 มิลลิโมล ทำให้ไฮโดรเจนลดลงจาก 214 ถึง 27 มิลลิลิตรต่อหน่วยการทดลอง

Tian (2010) ได้ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงโดยเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนที่ใช้คือแลคเทต และอะซิเทตในสภาวะไร้แสง พบว่าแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสายพันธุ์ที่ใช้คือ *Rhodobacter sphaeroides RV* ผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นอะซิเตต ได้ใช้แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง *R. rubrum* เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่ดีที่สุดในการเจริญ และผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น อันได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุต่าง ๆ ในการหาแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดผู้วิจัยได้เปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนจาก 6 แหล่ง คือ โซเดียมอะซิเตต กรดมาลิก ซูโครส กรดซิตริก และฟรักโตส โดยใช้ปริมาณ 2 กรัมต่อลิตร ผลที่ได้คือโซเดียมอะซิเตตและกรดมาลิกเป็นสองแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญของ *R. rubrum* โดยให้ค่าชีวมวลสูงถึง 1.73 และ 1.56 กรัมต่อลิตร จากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 96 ชั่วโมง จะเห็นว่าโซเดียมอะซิเตตทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้มากกว่ากรดมาลิก ซึ่งตรงกับการศึกษาของ Najafpour และคณะ, 2004 ที่ได้รายงานว่าอะซีเตตเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับ *R. rubrum* ในการผลิตไฮโดรเจน ได้รายงานอีกว่า *R. rubrum* ที่ใช้มาเลตไม่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้อีกด้วย (Najafpour และ Younes, 2004) แต่ในการศึกษาครั้งนี้กลับพบว่ากรดมาลิกกลับให้ค่าการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นสูงที่สุดถึง 5.16 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถบอกได้ว่าค่าการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นไม่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณเซลล์ แต่จะขึ้นอยู่กับแหล่งคาร์บอนเมื่อใช้กรดมาลิก สามารถให้ค่าการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น ได้สูงสุดคือ 3.32 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้าของ Carr และ Exell (1965) ที่รายงานถึงการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นของมาเลตมากกว่าอะซิเตต ยิ่งไปกว่านั้น *R. rubrum* สามารถเจริญได้แบบ Chemotrophically เช่น มีออกซิเจนในที่มืด หรือ Phototrophically เช่น มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ออกซิเจนให้แสง เมื่อเซลล์ปรับตัวจากสภาวะ Chemotrophic ไปเป็นแบบ Phototrophic จะทำให้มีโคเอนไซม์คิวเท็นสะสมภายในเซลล์เพิ่มขึ้น

Qin Zhou และคณะ (2016) ได้ทำการศึกษาเพื่อเพิ่มการผลิตสารชีวมวลและสารสีควบคู่ไปกับการบำบัดมลพิษในน้ำเสียด้วยแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง (Photosynthetic bacteria) โดยใช้แหล่งกำเนิดแสงที่แตกต่างกันคือ จากหลอดแอลอีดีสีแดง สีเหลือง สีฟ้า สีขาว และหลอดทังสเตน ผลการศึกษาพบว่าการใช้แหล่งกำเนิดแสงที่แตกต่างกัน ให้ผลกระทบอย่างมากต่อแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง โดยแหล่งกำเนิดแสงที่ทำให้ผลิตสารชีวมวล ผลได้ของสารชีวมวลและลดค่าซีโอดีมากที่สุดคือหลอดแอลอีดีสีแดง คือค่าสูงสุดของชีวมวล การลดค่าซีโอดีและผลได้ชีวมวลคือ 2,580 มิลลิกรัมต่อลิตร 88.6 เปอร์เซ็นต์และ 0.49 มิลลิกรัมชีวมวลต่อมิลลิกรัมซีโอดีที่ลดลง ตามลำดับ ระยะเวลาในการบำบัด หรือ ระยะเวลาการเก็บกักน้ำเสียในระบบ (Hydraulic retention time) ของระบบบำบัดน้ำเสียอาจสั้นกว่า 72 ชั่วโมงภายใต้หลอดแอลอีดีสีแดง การวิเคราะห์กลไกของเซลล์แสดงให้เห็นว่าหลอดแอลอีดีสีแดงทำให้มีการผลิต ATP มากที่สุด แหล่งกำเนิดแสงอาจส่งผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการผลิตสารสี ภายใต้หลอดชนิดแอลอีดีให้การผลิตสารสีที่มากกว่าหลอดทังสเตนอย่างมาก หลอดแอลอีดีสีเหลืองมีการผลิตเม็ดสีสูงสุดในขณะที่หลอดแอลอีดีสีแดงผลิตแคโรทีนอยด์ต่ออัตราส่วนแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์สูงสุด เมื่อพิจารณาทั้งประสิทธิภาพและค่าใช้จ่ายด้านพลังงาน หลอดแอลอีดีสีแดงเป็นแหล่งกำเนิดแสงที่ดีที่สุด และหลังจากนั้นได้ศึกษาการผลิตมวลชีวภาพของแบคทีเรีย และสารสีควบคู่กับการกำจัดมลพิษ และบำบัดน้ำเสีย โดยแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง (Photosynthetic bacteria) ใช้ช่วงรอบของการให้แสงที่แตกต่างกัน และความถี่ที่แตกต่างเป็นตัวชี้วัดผลของการศึกษา พบว่าช่วงรอบของการให้แสงที่ดีที่สุดที่ทำให้แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงมีการผลิตชีวมวลมากที่สุด กำจัดค่าซีโอดี และการใช้พลังงานแสงได้มีประสิทธิภาพที่สุด ที่การให้แสง 2 ชั่วโมง และอยู่ในความมืด 2 ชั่วโมงสลับกัน อัตราการผลิตชีวมวลอยู่ที่ 2068 มิลลิกรัม/ลิตร การกำจัดค่าซีโอดี 90.3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณชีวมวลต่อการกำจัดค่าซีโอดี คือ 0.38 mg-biomass/mg-COD-removal โดยค่าดังกล่าวจะสามารถเพิ่มสูงขึ้น เมื่อวิเคราะห์ดูพบว่าช่วงรอบของการให้แสง ที่ 2 ชั่วโมง/ 1ชั่วโมง ในความถี่ต่ำเพียง 2-4 ครั้ง/วัน ให้ผลผลิตมากกว่า 1ชั่วโมง/2ชั่วโมง ในความถี่ที่สูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อแบคทีเรีย *Rhodopseudomonas* sp. 14 เป็นเชื้อกลายพันธุ์มาจาก *Rhodopseudomonas* sp. 12 ที่ได้รับมาจากกลุ่มโครงงานพิเศษปีการศึกษา 2558 เรื่อง "การผลิตไคตินโอลิโกเมอร์จากแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงโดยใช้ของเหลือทิ้งเปลือกกุ้งเป็นแหล่งอาหาร"

3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) (Hermle; Z383K, Germany)

3.2.2 เครื่องวัดความเข้มแสง (Lux Meter) (Testo; Testo 545, Germany)

3.2.3 เครื่องกวนสารละลาย (Magnetic Stirrer)

3.2.4 แผ่นเมมเบรนขนาดรูพรุน 3.5 K Dalton (Thermo Scientific, America)

3.2.5 ปั๊ม (Peristaltic Pump) (Baoding Longer; BT100-1F, China)

3.2.6 หลอดไฟชนิดหลอดไส้ (Incandescent)

3.2.7 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Helios Gamma; Thermo Scientific, USA)

3.2.8 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) (Model? Shimadzu; Japan)

3.2.9 ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar air flow) (ISSCO; BVT 123)

3.2.10 กล้องจุลทรรศน์ (Nikon; ECLIPSE 80i, Japan)

3.3 สารเคมี

3.3.1 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Disodium Hydrogen phosphate)

3.3.2 โมโนโซเดียมกลูตาเมต (Monosodium glutamate)

3.3.3 โซเดียมอะซิเตต (Sodium Acetate)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.4 สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)

3.3.5 โพแทสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลต (Potassium hydrogen phthalate)

3.3.6 คลอโรฟอร์ม (Chloroform) HPLC Grade

3.3.7 เมทิลแอลกอฮอล์ (Methyl alcohol) HPLC Grade

3.3.8 เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol)

3.3.9 เฮกเซน (Hexane)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเตรียมหัวเชื้อ

นำเชื้อแบคทีเรีย *Rhodopseudomonas* sp. 14 มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร A (ภาคผนวก ก.) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 8-10 วัน จากนั้นจึงนำมา ใช้หัวเชื้อปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลวสูตร A เพื่อให้เชื้ออยู่ในสภาพพร้อมใช้งาน โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 38-40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1,500-3,500 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน หรือจนกระทั่งเชื้อเจริญจนมีค่าการดูดกลืนแสงเป็น 1.200 เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นสำหรับการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องต่อไป

3.4.2 การเตรียมน้ำเสียสังเคราะห์

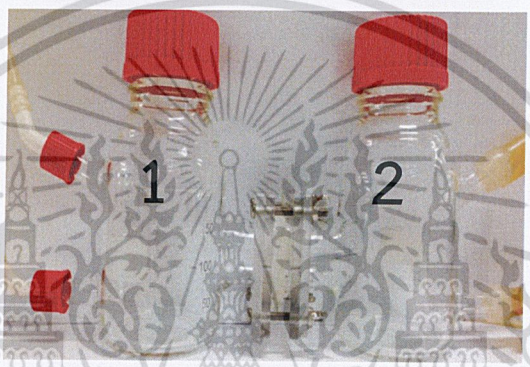
น้ำเสียสังเคราะห์ได้จากการเตรียมโดยน้ำข้าวสุกปริมาณ 30 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร แล้วนำไปใส่ในขวดปริมาตร 1200 มล. ปิดด้วยฝาปิดเพื่อป้องกันอากาศ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 วัน เพื่อใช้เป็นน้ำเสียสังเคราะห์สำหรับการทดลองต่อไป

3.4.3 การเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องโดยใช้กรดอินทรีย์ในน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน

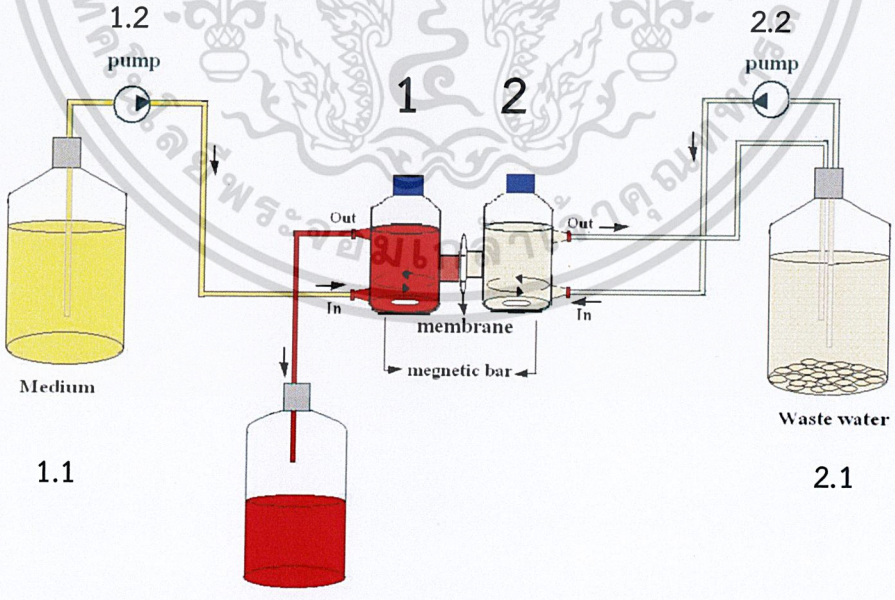
เตรียมอาหารเหลวสูตร A ปริมาตร 200 มล. บรรจุในขวดเลี้ยงเชื้อหมายเลข 1 หลังจากทำให้ปลอดเชื้อ (121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที) จึงใส่หัวเชื้อปริมาตร 3 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 38-40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1,500-3,500 ลักซ์ จนกระทั่งเชื้อเข้าสู่ระยะ early stationary phase จึงนำมาต่อเข้ากับขวดเลี้ยงเชื้อหมายเลข 2 โดยมีแผ่นเมมเบรนที่มีรูพรุนขนาด 3.5 K-dalton กั้นระหว่างขวดเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ใบ โดยขวดหมายเลข 2 มีสารละลายน้ำเสียสังเคราะห์ไหลผ่านมาจากขวดน้ำเสีย (เตรียมได้จากข้อ 3.4.2) การเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่อง (continuous cultivation) เริ่มต้นโดยนำอาหารเหลวสูตร A ที่ปราศจากแหล่งคาร์บอน ซึ่งบรรจุใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขวดอาหาร (Medium reservoir) (หมายเลข 1.1) ไหลผ่านปั้มดูดจ่ายสารละลาย (Peristaltic pump) (หมายเลข 1.2) เข้าสู่ขวดเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง (หมายเลข 1) ทางด้านล่าง จากนั้นจึงไหลออกจากขวดเลี้ยงเชื้อทางด้านบน เพื่อไปยังขวดรองรับเชื้อ (retrieved culture) (หมายเลข 1.3) ขณะเดียวกันน้ำเสียสังเคราะห์ก็จะไหลจากขวดน้ำเสีย (หมายเลข 2.1) ไหลผ่านปั้มดูดจ่ายสารละลาย (หมายเลข 2.2) เข้าไปยังขวดหมายเลข 2 ทางด้านล่าง แล้วไหลออกทางด้านบน จนกระทั่งกลับเข้ามายังขวดน้ำเสีย (หมายเลข 2.1) ใบเดิม กรดอินทรีย์จากขวดหมายเลข 2 สามารถแพร่ผ่านเมมเบรนไปยังขวดเลี้ยงเชื้อหมายเลข 1 ตลอดเวลา เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงนำไปใช้เพื่อการเจริญต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 3.1 และรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.1 ชุดการทดลองที่ใช้กรดอินทรีย์ในน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 3.2 แผนผังชุดการทดลองที่ใช้กรดอินทรีย์ในน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน

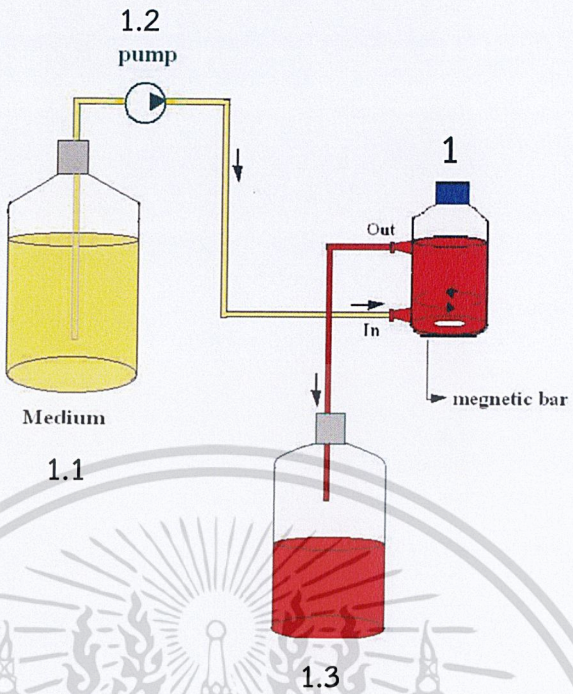
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.4 การเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องโดยใช้โซเดียมอะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอน

เตรียมอาหารเหลวสูตร A ปริมาตร 200 มล. บรรจุในขวดเลี้ยงเชื้อหมายเลข 1 หลังจากทำให้ปลอดเชื้อ (121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที) จึงใส่หัวเชื้อปริมาตร 3 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 38-40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1,500-3,500 ลักซ์ จนกระทั่งเชื้อเข้าสู่ระยะ early stationary phase จึงเริ่มต้นการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่อง (continuous cultivation) โดยนำอาหารเหลวสูตร A ที่ใช้โซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งบรรจุในขวดอาหาร (medium reservoir) (หมายเลข 1.1) ไหลผ่านปั๊มดูดจ่ายสารละลาย (peristaltic pump) (หมายเลข 1.2) เข้าสู่ขวดเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง (หมายเลข 1) ทางด้านล่าง จากนั้นสารละลายเชื้อส่วนเกินก็จะไหลออกจากขวดเลี้ยงเชื้อทางด้านบน เพื่อไปยังขวดรองรับเชื้อ (retrieved culture) (หมายเลข 1.3) ดังแสดงในรูปที่ 3.3 และรูปที่ 3.4

รูปที่ 3.3 ชุดการทดลองที่ใช้โซเดียมอะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.4 แผนผังชุดการทดลองที่ใช้โซเดียมอะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอน

3.4.5 ศึกษาอัตราการไหลของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ศึกษาอัตราการไหลของอาหารเหลวสูตร A ที่มีและไม่มีแหล่งคาร์บอน ต่อการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เคราะห์ด้วยแสงแบบต่อเนื่อง โดยกำหนดอัตราการไหลของอาหารเหลวเข้าสู่ขวดเลี้ยงเชื้อ (หมายเลข 1) ที่ความเร็ว 60 80 และ 100 ไมโครลิตรต่อนาที ตามลำดับ และกำหนดให้เลี้ยงเชื้อภายใต้แสงที่ความเข้ม 1,000-1,500 ลักซ์ ในสภาวะไม่มีอากาศ อุณหภูมิ 37-40 องศาเซลเซียส แต่ละการทดลองจะใช้ปริมาตรอาหารเหลวทั้งหมด 700 มิลลิลิตร เพื่อศึกษาการแสดงออกของเชื้อทั้งในแง่การเจริญ และการสร้างโคเอนไซม์คิวเท็น

3.4.6 ศึกษาผลของความเข้มข้นโซเดียมอะซิเตตที่เหมาะสม

นำอัตราการไหลที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 3.4.5 มาใช้ในการทดลองนี้ โดยศึกษาผลของความเข้มข้นโซเดียมอะซิเตต ในอาหารเหลวสูตร A ที่ไหลเข้าสู่ขวดเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง ด้วยวิธี 3.4.4 กำหนดให้ความเข้มข้นโซเดียมอะซิเตต เป็น 0.5 0.75 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจากเลี้ยงเชื้อจุลิทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงจนเข้าสู่ระยะ early stationary phase จึงเริ่มต้นการให้อาหารที่อัตราการการไหล 80 ไมโครลิตรต่อนาที โดยใช้ความเข้มข้นโซเดียมอะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 700 มล. จากนั้นจึงเปลี่ยนไปใช้อาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นโซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 0.75 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เพื่อศึกษาการแสดงออกของเชื้อทั้งในด้านการเจริญ และการสร้างโคเอนไซม์คิวเท็นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 วิเคราะห์ผล

3.5.1 การวิเคราะห์โคเอนไซม์คิวเท็น

นำตัวอย่างแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้งแล้วเติมสารละลายผสม เฮกเซน (Hexane) ต่อเมทานอล (Methanol) ในอัตราส่วน 4 : 2 (มิลลิตร) ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนที่เป็นเมทานอลนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร

3.5.2 การวิเคราะห์การเจริญจากน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำตะกอนเซลล์ที่ได้จากการวิเคราะห์โคเอนไซม์คิวเท็นไปทำการอบแห้งโดยการอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.5.3 การวิเคราะห์ความเข้มข้นกรดในน้ำเสียสังเคราะห์

ปิเปตต์ตัวอย่าง 10.0 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร หยดฟีนอล์ฟทาลีนลงไป 3 หยด บรรจุสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 mol/dm^3 ในบิวเรตต์ ไขสารละลายให้เต็มปลายล่างของบิวเรตต์ และปรับระดับของสารละลายให้ตรงกับขีดใดขีดหนึ่ง บันทึกปริมาตรไว้ หยดสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จากบิวเรตต์ลงในสารละลายตัวอย่างที่อยู่ในขวดรูปชมพู่ทีละหยด พร้อมกับเขย่าขวดให้สารละลายผสมกันกระทั่งสารละลายเริ่มเปลี่ยนสีเป็นสีชมพูอ่อนอย่างถาวร บันทึกปริมาณของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง บันทึกผลและหาปริมาตรเฉลี่ยของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ใช้ทำปฏิกิริยาพอดีกับสารละลายตัวอย่าง (ภาคผนวก ข.)

3.5.4 การคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ของ *Rhodopseudomonas* sp. S14

สูตรการคำนวน

$$\mu = \ln \frac{\left(\frac{V.x2}{V.x1}\right)}{\Delta t}$$

เมื่อ x_1 = ปริมาณมวลเซลล์ x ปริมาตรอาหารในขวด

x_2 = ปริมาณมวลเซลล์ x (ปริมาตรในขวด + ปริมาณที่ล้นออก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

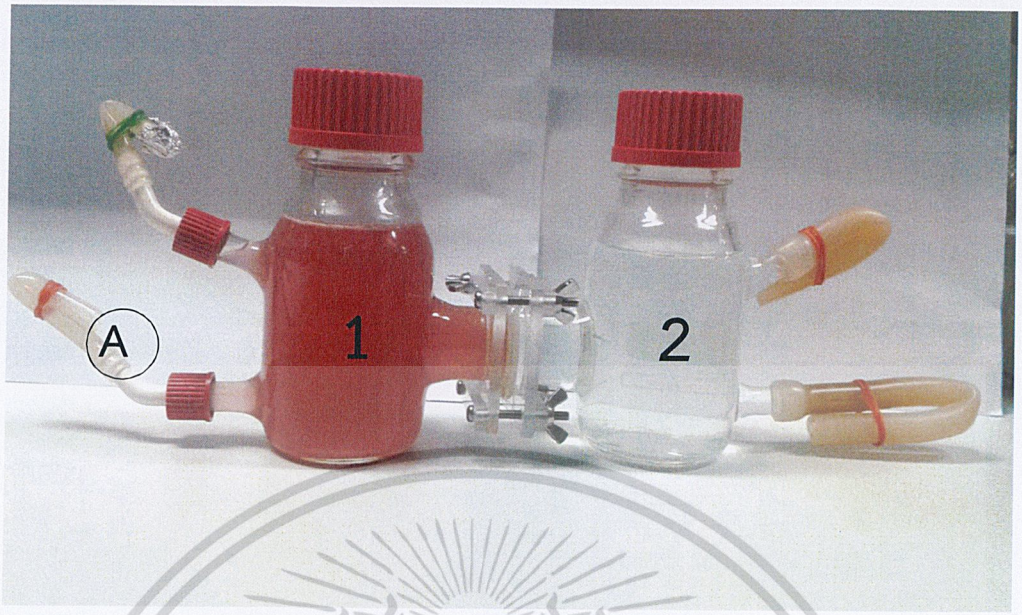
4.1 ศึกษาอัตราการไหลในการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องเพื่อผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น

ศึกษาผลของอัตราการไหลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการสร้างโคเอนไซม์คิวเท็นของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง ในการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่อง ภายใต้สภาวะ มีแสง ไม่มีอากาศ โดยได้แบ่งการทดลองการออกเป็น 2 แบบ ได้แก่

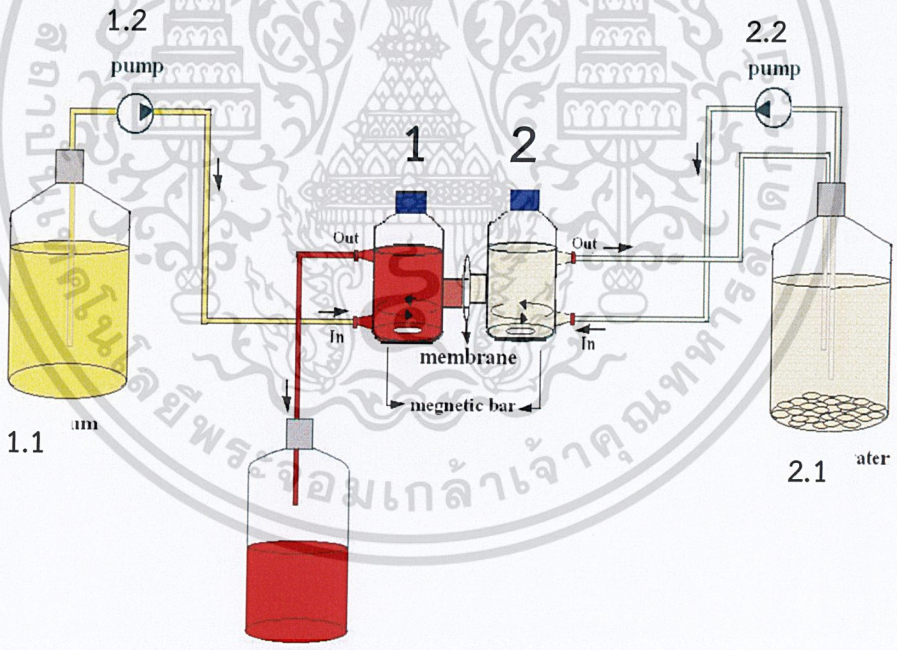
แบบการทดลองที่ 1 การเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องโดยใช้กรดอินทรีย์ในน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน

เตรียมอาหารเหลวสูตร A ปริมาตร 200 มล. บรรจุในขวดเลี้ยงเชื้อหมายเลข 1 หลังจากทำให้ปลอดเชื้อ (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที) จึงใส่หัวเชื้อปริมาตร 3 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 38-40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1,500-3,500 ลักซ์ จนกระทั่งเชื้อเข้าสู่ระยะ early stationary phase จึงนำมาต่อเข้ากับขวดเลี้ยงเชื้อหมายเลข 2 โดยมีแผ่นเมมเบรนที่มี รูพรุนขนาด 3.5 K-dalton กั้นระหว่างขวดเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ใบ โดยขวดหมายเลข 2 มีสารละลายน้ำเสียสังเคราะห์ไหลผ่านมาจากขวดเตรียมน้ำเสีย การเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่อง (continuous cultivation) เริ่มต้นโดยนำอาหารเหลวสูตร A ที่ปราศจากแหล่งคาร์บอน ซึ่งบรรจุในขวดอาหาร (medium reservoir) (หมายเลข 1.1) ไหลผ่านปั้มดูดจ่ายสารละลาย(peristaltic pump) (หมายเลข 1.2) เข้าสู่ขวดเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง (หมายเลข 1) ทางด้านล่าง จากนั้นจึงไหลออกจากขวดเลี้ยงเชื้อทางด้านบน เพื่อไปยังขวดรองรับเชื้อ (retrieved culture) (หมายเลข 1.3) ขณะเดียวกันน้ำเสียสังเคราะห์ก็จะไหลจากขวดน้ำเสีย (หมายเลข 2.1) ไหลผ่านปั้มดูดจ่ายสารละลาย (หมายเลข 2.2) เข้าไปยังขวดหมายเลข 2 ทางด้านล่าง แล้วไหลออกทางด้านบน จนกระทั่งกลับเข้ามายังขวดน้ำเสีย (หมายเลข 2.1) ใบเดิม กรดอินทรีย์จากขวดหมายเลข 2 สามารถแพร่ผ่านเมมเบรนไปยังขวดเลี้ยงเชื้อหมายเลข 1 ตลอดเวลา เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงนำไปใช้เพื่อการเจริญต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 4.1 และรูปที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 ชุดการทดลองที่ใช้กรดอินทรีย์ในน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน

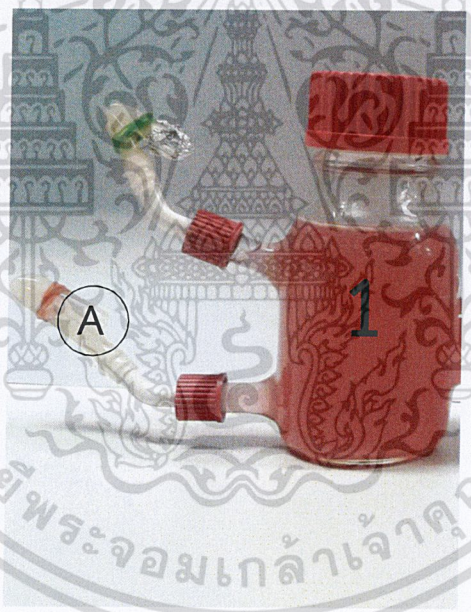


รูปที่ 4.2 แผนผังชุดการทดลองที่ใช้กรดอินทรีย์ในน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

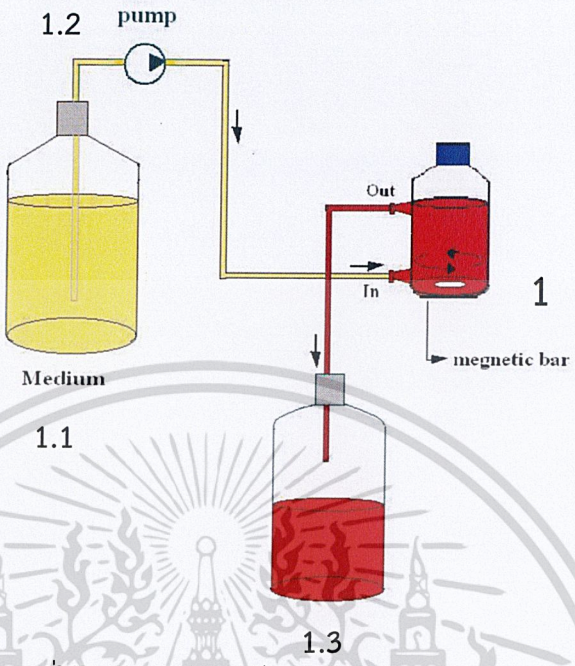
แบบการทดลองที่ 2 การเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องโดยใช้โซเดียมอะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอน

เตรียมอาหารเหลวสูตร A ปริมาตร 200 มล. บรรจุในขวดเลี้ยงเชื้อหมายเลข 1 หลังจากทำให้ปลอดเชื้อ (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที) จึงใส่หัวเชื้อปริมาตร 3 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 38-40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1,500-3,500 ลักซ์ จนกระทั่งเชื้อเข้าสู่ระยะ early stationary phase จึงเริ่มต้นการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่อง (continuous cultivation) โดยนำอาหารเหลวสูตร A ที่ใช้โซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งบรรจุในขวดอาหาร (medium reservoir) (หมายเลข 1.1) ไหลผ่านปั๊มดูดจ่ายสารละลาย (peristaltic pump) (หมายเลข 1.2) เข้าสู่ขวดเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง (หมายเลข 1) ทางด้านล่าง จากนั้นสารละลายเชื้อส่วนเกินก็จะไหลออกจากขวดเลี้ยงเชื้อทางด้านบน เพื่อไปยังขวดรองรับเชื้อ (retrieved culture) (หมายเลข 1.3) ดังแสดงในรูปที่ 4.3 และรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.3 ชุดการทดลองที่ใช้โซเดียมอะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 แผนผังชุดการทดลองที่ใช้โซเดียมอะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอน

การเตรียมหัวเชื้อและการลงเชื้อในชุดการทดลอง

นำเชื้อแบคทีเรีย Rhodopseudomonas sp. 14 มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร A (ภาคผนวก ก.) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 8-10 วัน จากนั้นจึงนำมาใช้เป็นหัวเชื้อปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ ลงในขวดเลี้ยงเชื้อ (ขวดที่ 1) ของทั้งชุดการทดลองที่ใช้กรดอินทรีย์ในน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน และชุดการทดลองที่ใช้โซเดียมอะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งภายในขวดบรรจุอาหารเหลวสูตร A ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที ปริมาตร 200 มิลลิลิตร จากนั้นให้ทำให้เชื้ออยู่ในสภาพพร้อมใช้งาน โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 38-40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1,500-3,500 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน หรือจนกระทั่งเชื้อเจริญจนมีค่าการดูดกลืนแสงเป็น 1.200 จากนั้นจึงนำไปใช้ในการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่อง เพื่อศึกษาอัตราการไหลของอาหารเหลวสูตร A ในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง ของชุดการทดลองที่ใช้กรดอินทรีย์ในน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน และชุดการทดลองที่ใช้โซเดียมอะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอน โดยกำหนดอัตราการไหลของอาหารเหลวเข้าสู่ขวดเลี้ยงเชื้อ (หมายเลข 1) ที่ความเร็ว 60 80 และ 100 ไมโครลิตรต่อนาที ตามลำดับ และกำหนดให้เลี้ยงเชื้อภายใต้แสงที่ความเข้ม 1,000-1,500 ลักซ์ ในสภาวะไม่มีอากาศ อุณหภูมิ 37-40 องศาเซลเซียส แต่ละการทดลองจะใช้ปริมาตรอาหารเหลวทั้งหมด 700 มิลลิลิตร เพื่อศึกษาการแสดงออกของเชื้อทั้งในแง่การเจริญ และการสร้างโคเอนไซม์คิวเท็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.1 ผลของอัตราการไหล 60 ไมโครลิตรต่อนาที

ศึกษาอัตราการไหลของอาหารเหลวสูตร A ที่มีและไม่มีแหล่งคาร์บอน ต่อการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงแบบต่อเนื่อง (การทดลองที่ 1) โดยกำหนดอัตราการไหลของอาหารเหลวเข้าสู่ขวดเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง (ขวดที่ 1) ที่ความเร็ว 60 ไมโครลิตรต่อนาที เพื่อศึกษาการแสดงออกของเชื้อทั้งในแง่การเจริญ และการสร้างโคเอนไซม์คิวเท็น ผลของชุดการทดลองที่ใช้กรดอินทรีย์ในน้ำเสียสังเคราะห์เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า เมื่อให้อาหารเหลวสูตร A (ปราศจากแหล่งคาร์บอน) ไหลเข้าขวดเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง ที่อัตราการไหล 60 ไมโครลิตรต่อนาที ปริมาตรอาหารเหลวจะไหลเข้าและออกจากขวดเลี้ยงเชื้ออย่างช้าๆ ขณะที่กรดอินทรีย์ในน้ำเสียแพร่ผ่านแผ่นเมมเบรนมาอย่างต่อเนื่อง ทำให้ปริมาณกรดในขวดเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงมีความเข้มข้นสูงขึ้น และเชื้อสามารถนำไปใช้ได้ในระยะแรกของการเจริญ แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลานานขึ้น พบว่าปริมาณกรดในขวดเลี้ยงเชื้อมีค่ามากขึ้น จนส่งผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง ทำให้ความเข้มข้นเซลล์ที่วัดได้ และอัตราการเจริญจำเพาะ มีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง (4.5 ก และ 4.5 ข) นอกจากนี้ยังสังเกตเห็นการเจริญของที่บริเวณปลายสาย (อาหารไหลเข้า) ต่อกับขวดเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 4.1บริเวณ A) เชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง อาจถูกยังยั้งการเจริญจากกรดความเข้มข้นสูง (ที่แพร่มาจากน้ำเสียสังเคราะห์) ซึ่งคาดว่าเซลล์จะถูกชะออกจากระบบ (wash out) เมื่อการทดลองดำเนินมาถึงชั่วโมงที่ 192 ส่วนผลการผลิตโคเอนไซม์คิวเทน พบว่าในช่วงแรกของการให้อาหาร มีปริมาณผลิตภัณฑ์ลดลง จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ พบว่าการผลิตโคเอนไซม์คิวเทนมีค่าคงที่ไปจนสิ้นสุดการทดลอง (4.5 ค) แสดงให้เห็นว่าปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้ต่อน้ำหนักเซลล์ มีค่าคงที่ แม้ปริมาณเซลล์ในระบบจะลดลงก็ตาม การลดลงของเซลล์จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงเป็นผลมาจาก ความเข้มข้นกรดอินทรีย์ในน้ำเสียที่แพร่ผ่านเมมเบรนเข้ามาอย่างต่อเนื่อง (4.5 ง) จนเกิดการสะสมของกรดความเข้มข้นสูงภายในขวดเลี้ยงเชื้อจนยับยั้งการเจริญของเชื้อในที่สุด

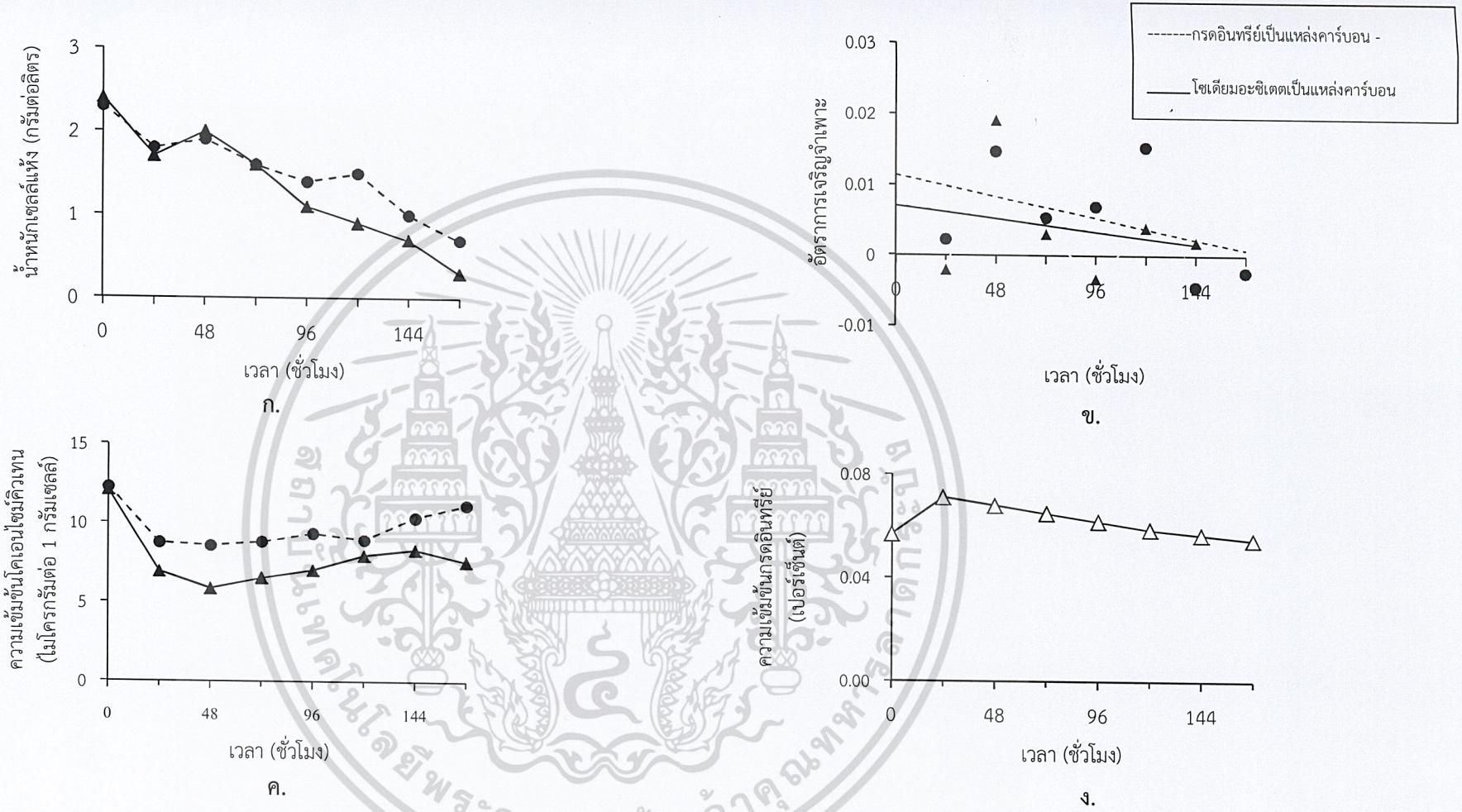
สำหรับการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องในชุดการทดลองที่ 2 ซึ่งใช้โซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าความเข้มข้นเซลล์ที่วัดได้ และอัตราการเจริญจำเพาะมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง หลังจากเริ่มต้นการให้อาหาร (4.5 ก และ 4.5 ข) และเมื่อเวลาผ่านก็พบว่าการเจริญมีการลดลงจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง คาดว่าเซลล์จะถูกชะออกจากระบบ (wash out) เมื่อการทดลองดำเนินมาถึงชั่วโมงที่ 192 ส่วนผลการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น พบว่าในช่วงแรกของการเลี้ยงเชื้อ มีปริมาณผลิตภัณฑ์ลดลง จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ พบว่าการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นมีค่าคงที่ไปจนสิ้นสุดการทดลอง (4.5 ค) แสดงให้เห็นว่าปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้ต่อน้ำหนักเซลล์ มีค่าคงที่ แม้ปริมาณเซลล์ในระบบจะลดลงก็ตาม สภาวะดังกล่าวอาจเป็นผลมาจากอัตราการไหลของอาหารมีค่าน้อยมาก จนสารอาหารไม่เพียงพอต่อการเจริญของเชื้อ นอกจากนี้ยัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบการเจริญของเชื้อในสายยางที่ให้อาหาร (บริเวณ A) และเชื้อเกาะตัวที่พื้นผิวของขวดเลี้ยงเชื้อ ซึ่งทำให้การวัดปริมาณเชื้อได้น้อยกว่าความเป็นจริง ดังแสดงในรูปที่ 4.3

เมื่อเปรียบเทียบการทดลองทั้ง 2 แบบจะเห็นได้ว่า การทดลองที่ใช้กรดอินทรีย์ในน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน มีการลดลงของปริมาณเซลล์ในอัตราที่ช้ากว่าการทดลองที่ใช้โซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน อภิปรายได้ว่า การทดลองที่ใช้กรดอินทรีย์ในน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน มีกรดอินทรีย์แพร่ผ่านเมมเบรนเข้ามาในปริมาณมาก ซึ่งเชื้อสามารถนำไปใช้ได้ในระยะแรกของการเจริญ แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลานานขึ้น พบว่าปริมาณกรดที่สะสมในขวดเลี้ยงเชื้อมีค่ามากขึ้น จนเริ่มยับยังการเจริญ ทำให้แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงเจริญได้ช้าลง ตรงกันข้ามกับการทดลองที่ใช้โซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อได้รับอาหารในปริมาณที่ไม่เพียงพอต่อการเจริญ ความเข้มข้นเซลล์จึงลดลงเร็วกว่า ทั้งนี้ผลการทดลองของทั้งแบบ ยังแสดงให้เห็นว่า ไม่ว่าสภาวะในการเลี้ยงเชื้อจะเป็นอย่างไร อัตราส่วนของคิวเท็นภายในเซลล์จะยังคงที่ ดังแสดงในรูปที่ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 การเจริญของ *Rhodopseudomonas* sp. S14 ที่อัตราการให้อาหาร 60 ไมโครลิตรต่อนาที โดยที่ (ก.) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข.) อัตราการเจริญจำเพาะ (ค.) ความเข้มข้นโคเอนไซม์คิวเท็น และ (ง.) ความเข้มข้นกรดอินทรีย์ในน้ำเสีย ซึ่งแทน ● กรดอินทรีย์จากน้ำเสียที่แพร่ผ่านแผ่นเยื่อเมมเบรน เป็นแหล่งคาร์บอน ▲ โซเดียมอะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอน และ Δ ความเข้มข้นกรดอินทรีย์ ตามลำดับ

4.1.2 ผลของอัตราการไหล 80 ไมโครลิตรต่อนาที

ศึกษาอัตราการไหลของอาหารเหลวสูตร A ที่มีและไม่มีแหล่งคาร์บอน ต่อการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงแบบต่อเนื่อง โดยกำหนดอัตราการไหลของอาหารเหลวเข้าสู่ขวดเลี้ยงเชื้อ (หมายเลข 1) ที่ความเร็ว 80 ไมโครลิตรต่อนาที เพื่อศึกษาการแสดงออกของเชื้อทั้งในแง่การเจริญ และการสร้างโคเอนไซม์คิวเท็น ผลการทดลองที่ได้พบว่า ที่อัตราการไหล 80 ไมโครลิตรต่อนาที ชุดการทดลองที่ใช้กรดอินทรีย์ในน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อให้อาหารเหลวสูตร A (ปราศจากแหล่งคาร์บอน) ไหลเข้าขวดเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง ที่อัตราการไหล 80 ไมโครลิตรต่อนาที ปริมาตรอาหารเหลวที่ไหลเข้าและออกจากขวดเลี้ยงเชื้อ สมดุลกับปริมาณกรดอินทรีย์ในน้ำเสีย ที่แพร่ผ่านแผ่นเมมเบรนเข้ามาอย่างต่อเนื่อง ทำให้ปริมาณกรดในขวดเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง (ขวดที่ 1) มีความเข้มข้นเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ส่งผลให้จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง สามารถเจริญนำกรดอินทรีย์ไปใช้ในการเจริญได้อย่างปกติ ทำให้ความเข้มข้นเซลล์ที่วัดได้ และอัตราการเจริญจำเพาะ มีค่าคงที่ตลอดระยะเวลาที่เลี้ยงเชื้อ (4.6 ก และ 4.6 ข) ส่งผลให้ให้การผลิตโคเอนไซม์คิวเทนมีค่าคงที่ตลอดการทดลองเช่นเดียวกัน โดยจากการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมงพบว่า ชุดการทดลองที่ใช้กรดอินทรีย์ในน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นได้ 12.24 14.56 12.10 12.05 12.65 12.78 และ 14.82 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมเซลล์ ตามลำดับ (4.6 ค) เนื่องจากปริมาณกรดในน้ำเสียสังเคราะห์ที่แพร่ผ่านเมมเบรนเข้ามาอย่างต่อเนื่อง มีปริมาณเพียงพอต่อการเจริญของเชื้อ (4.6 ง)

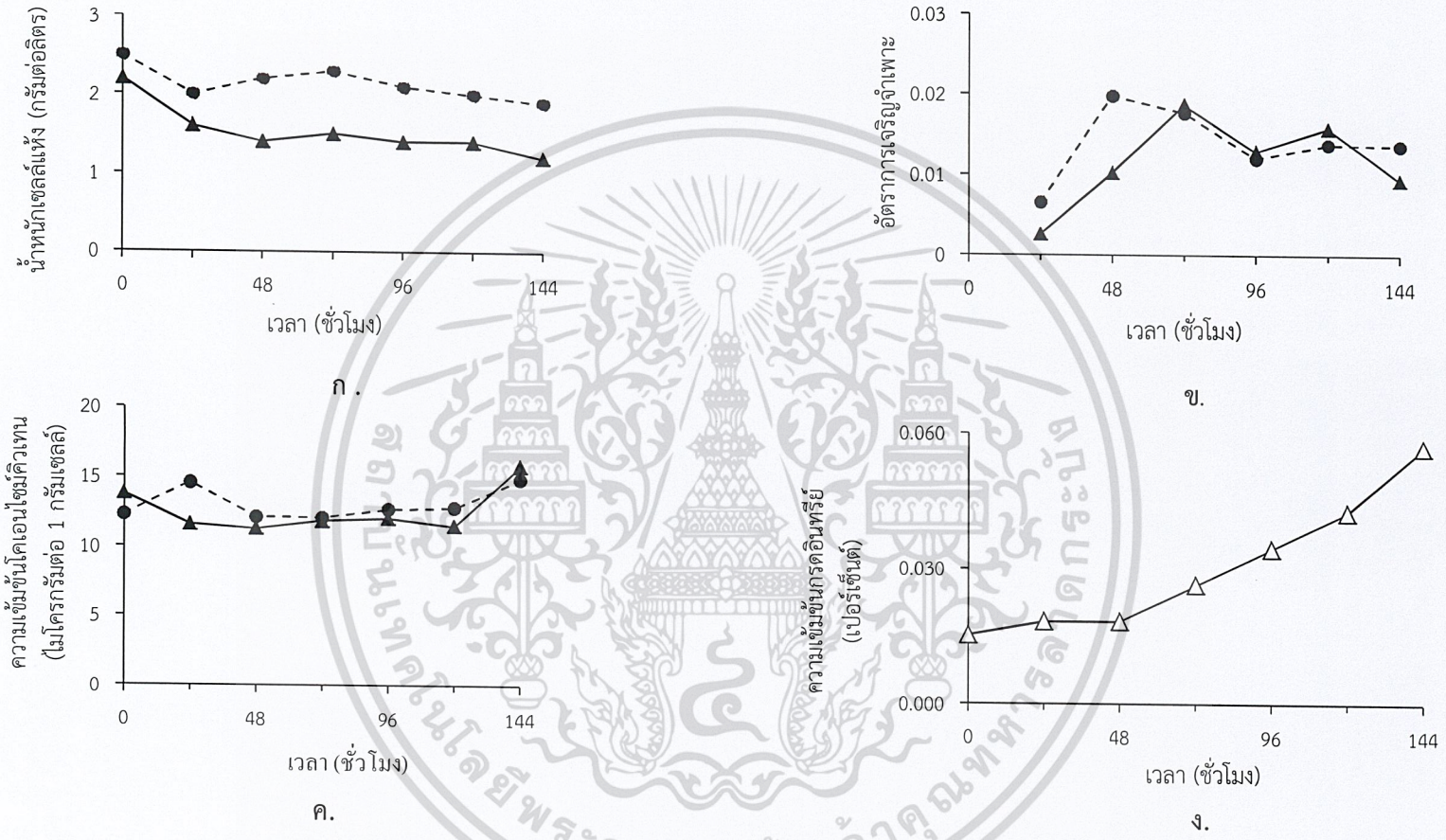
สำหรับการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องในชุดการทดลองที่ใช้โซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีความเข้มข้นเซลล์ที่วัดได้ และอัตราการเจริญจำเพาะ มีค่าคงที่ตลอดการทดลอง (4.5 ก และ 4.5 ข) เนื่องจากที่อัตราการไหล 80 ไมโครลิตรต่อนาที เชื้อจะได้รับแหล่งคาร์บอน คือ โซเดียมอะซิเตต ในปริมาณที่เพียงพอต่อการเจริญ ส่งผลให้เซลล์เจริญเติบโตและมีอัตราการแบ่งเซลล์ที่สูง จึงทำให้การผลิตโคเอนไซม์คิวเทนมีค่าสูง และคงที่ตลอดการทดลอง โดยจากการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง ในชุดการทดลองที่ใช้โซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตโคเอนไซม์คิวเทนได้ 13.76 11.56 11.27 11.81 12.02 11.47 และ 15.79 ตามลำดับ (4.6 ค)

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า ที่อัตราการไหล 80 ไมโครลิตรต่อนาที เป็นอัตราการไหลที่เหมาะสมต่อการเจริญ ส่งผลให้ความเข้มข้นเซลล์ที่วัดได้ และอัตราการเจริญจำเพาะมีค่าคงที่ จึงไม่พบปัญหาการเกิดกรดสะสมในขวดเลี้ยงเชื้อของแบบการทดลองที่ใช้กรดอินทรีย์ในน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน และปัญหาเรื่องอาหารไม่เพียงพอต่อการเจริญในแบบการทดลองที่ใช้โซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน คาดว่าหากเพิ่มอัตราการไหลให้มากขึ้น จะรักษาปริมาณเซลล์ และอัตราการเจริญจำเพาะให้มีค่าคงที่ได้ อีกทั้งจากผลการทดลองยังสังเกตเห็นว่า การแบ่งตัวของเซลล์ ทำให้เซลล์มีปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็นคงที่ ดังแสดงในรูปที่ 4.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเปรียบเทียบการทดลองทั้งสองแบบพบว่า การทดลองที่ใช้กรดอินทรีย์ในน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน มีความเข้มข้นเซลล์มากกว่าการทดลองที่ใช้โซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น เปอร์เซ็นต์ 1.0 เป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจาก การทดลองที่ใช้กรดอินทรีย์ในน้ำเสีย มีปริมาณแหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญได้มากกว่า แต่อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นเซลล์ และอัตราการเจริญจำเพาะ ของการทดลอง ทั้งสองแบบมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อย ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 72 จนสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อในชั่วโมงที่ 144 ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลานาน ทำให้เชื้อเริ่มมีการจับตัวกันเป็นกลุ่มของเซลล์ จึงส่งผลในขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง ปัญหานี้อาจแก้ไขได้โดยการเพิ่มความเร็วรอบในการกวนภายในขวดที่ใช้เลี้ยงเชื้อ แต่อย่างไรก็ตาม สิ่งที่ต้องคำนึงถึงต่อมาคือแรงเฉือนที่เชื่อจะได้รับ รวมไปถึงการรักษาสภาวะไร้อากาศภายในชุดการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 การเจริญของ *Rhodopseudomonas* sp. S14 ที่อัตราการให้อาหาร 80 ไมโครลิตรต่อนาที โดยที่ (ก.) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข.) อัตราการเจริญจำเพาะ (ค.) ความเข้มข้นโคเอนไซม์คิวเท็น และ (ง.) ความเข้มข้นกรดอินทรีย์ในน้ำเสีย ซึ่งแทน ● กรดอินทรีย์จากน้ำเสียที่แพร่ผ่านแผ่นเยื่อเมมเบรนเ เป็นแหล่งคาร์บอน ▲ โซเดียมอะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอน และ △ ความเข้มข้นกรดอินทรีย์ ตามลำดับ

4.1.3 ผลของอัตราการไหล 100 ไมโครลิตรต่อนาที

ศึกษาอัตราการไหลของอาหารเหลวสูตร A ที่มีและไม่มีแหล่งคาร์บอน ต่อการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงแบบต่อเนื่อง โดยกำหนดอัตราการไหลของอาหารเหลวเข้าสู่ขวดเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง (ขวดที่ 1) ที่ความเร็ว 100 ไมโครลิตรต่อนาที เพื่อศึกษาการแสดงออกของเชื้อทั้งในแง่การเจริญ และการสร้างโคเอนไซม์คิวเท็น ผลของชุดการทดลองที่ใช้กรดอินทรีย์ในน้ำเสียสังเคราะห์เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า เมื่อให้อาหารเลี้ยงเชื้อ A medium (ปราศจากแหล่งคาร์บอน) ไหลเข้าขวดเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง ที่อัตราการไหล 100 ไมโครลิตรต่อนาที ปริมาตรอาหารเหลวจะไหลเข้าและออกจากขวดเลี้ยงเชื้ออย่างรวดเร็ว ส่งผลให้เชื้อไม่สามารถเจริญและแบ่งตัวได้ทัน ทำให้ความเข้มข้นเซลล์และอัตราการเจริญจำเพาะลดลงตั้งแต่ 24 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ (4.7 ก และ 4.7 ข) หลังจากนั้นจึงลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเชื้อถูกชะออกจากระบบ (Wash out) ในอัตราที่สูงกว่าการเจริญ ทำให้จำนวนเซลล์ลดลง และคาดว่าจะไม่มีเซลล์เหลือในระบบในชั่วโมงที่ 144 ของการเลี้ยงเชื้อ ส่งผลให้ปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็นที่ผลิตได้ลดน้อยลงเรื่อยๆ จนมีค่าเข้าใกล้ 0 ในชั่วโมงที่ 96 ของการเลี้ยงเชื้อ แม้ว่าจะยังมีแหล่งคาร์บอน คือกรดอินทรีย์ที่แพร่ผ่านแผ่นเมมเบรนมาอย่างต่อเนื่องในปริมาณที่เพียงพอก็ตาม (4.7 ค)

สำหรับการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องในชุดการทดลองที่ใช้โซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงความเข้มข้นเซลล์ที่วัดได้ และอัตราการเจริญจำเพาะ มีแนวโน้มลดลงในเวลาอันรวดเร็ว ตั้งแต่ 24 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ (4.7 ก และ 4.7 ข) หลังจากนั้นจึงลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากที่อัตราการไหล 100 ไมโครลิตรต่อนาที ปริมาตรอาหารเหลวจะไหลเข้าและออกจากขวดเลี้ยงเชื้ออย่างรวดเร็ว ส่งผลให้เชื้อไม่สามารถเจริญและแบ่งตัวได้ทัน เชื้อจึงถูกชะออกจากระบบ (Wash out) ในอัตราที่สูงกว่าการเจริญ ทำให้จำนวนเซลล์ลดลง และคาดว่าจะไม่มีเซลล์เหลือในระบบในชั่วโมงที่ 144 ของการเลี้ยงเชื้อ ส่งผลให้ปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็นที่ผลิตได้ลดน้อยลงเรื่อยๆ จนมีค่าเข้าใกล้ 0 ในชั่วโมงที่ 96 ของการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกัน

กล่าวได้ว่า อัตราการไหลของอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ไมโครลิตรต่อนาที เป็นอัตราการไหลที่สูงเกินไป ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงของการทดลองทั้งสองแบบ ไม่สามารถเจริญและแบ่งเซลล์ได้ทัน เชื้อจึงถูกชะออกจากระบบ (Wash out) ในเวลาที่ใกล้เคียงกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.6

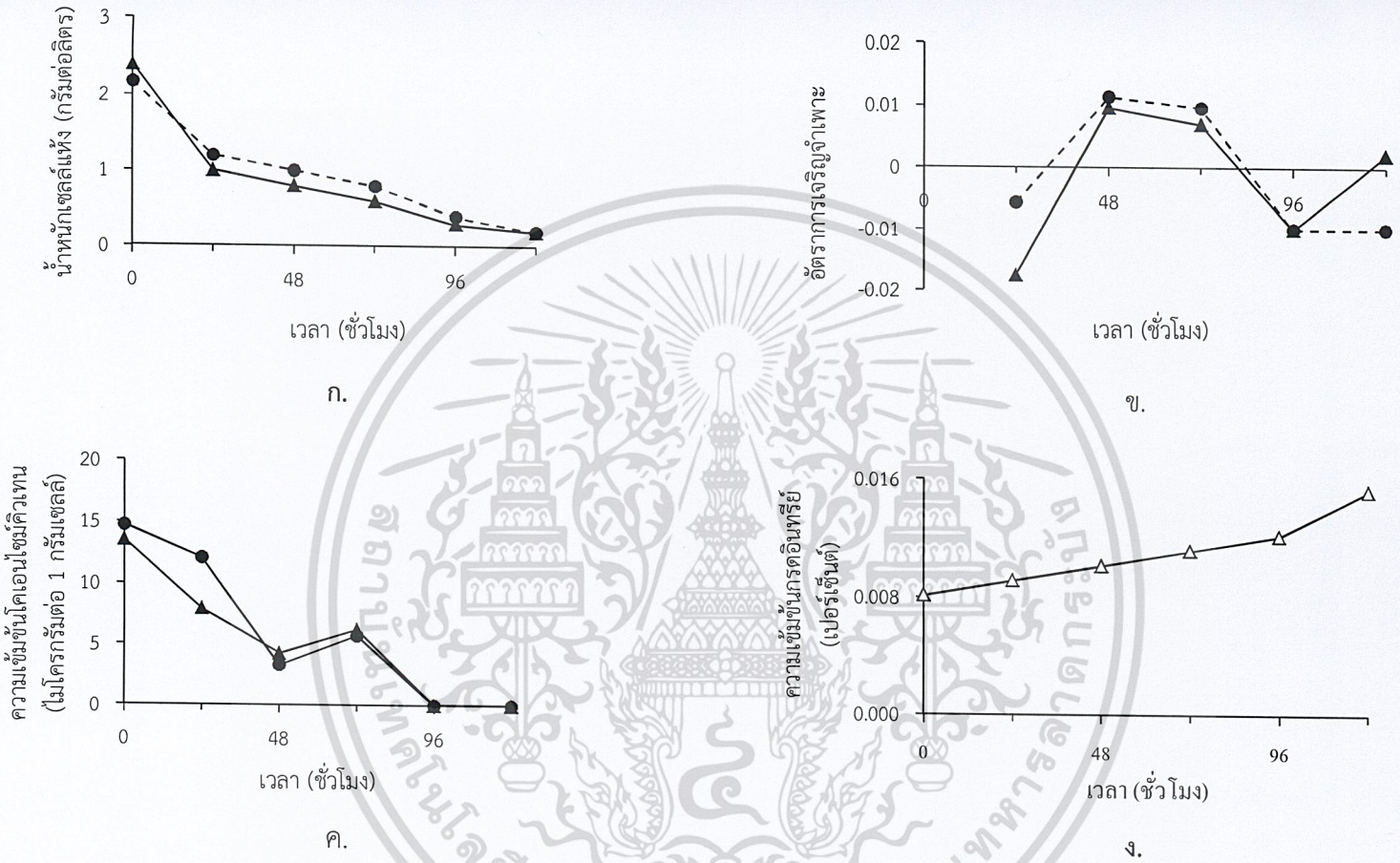
จากการศึกษาอัตราการไหลของอาหารเหลวสูตร A ที่มีและไม่มีแหล่งคาร์บอน ต่อการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงแบบต่อเนื่อง โดยกำหนดอัตราการไหลของอาหารเหลวเข้าสู่ขวดเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง (ขวดที่ 1) ที่ความเร็ว 60 80 และ 100 ไมโครลิตรต่อนาที เพื่อศึกษาการแสดงออกของเชื้อทั้งในแง่การเจริญ และการสร้างโคเอนไซม์คิวเท็น พบว่าที่อัตราการไหล 60 ไมโครลิตรต่อนาที เป็นอัตราการไหลของอาการที่น้อยจนเกินไป จึงพบปัญหากรดสะสม จนเกิดการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงภายในขวดเลี้ยงเชื้อของแบบการทดลองที่ใช้กรดอินทรีย์ในน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน และปัญหาแหล่งคาร์บอนไม่เพียงพอต่อการเจริญของเชื้อ ในแบบการทดลองที่ใช้โซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ทำให้เชื้อเจริญได้ไม่ดี อีกทั้งยังสังเกตเห็นเจริญของที่บริเวณปลายสาย (อาหารไหลเข้า) ต่อกับขวดเลี้ยง (บริเวณ A) ของชุดการทดลองทั้งสองแบบ ที่อัตราการไหล 60 ไมโครลิตรต่อนาทีจึงไม่เหมาะกับการนำมาใช้เลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงในการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่อง ต่อมาจึงได้เพิ่ม อัตราการไหลให้มากขึ้นเป็น 80 ไมโครลิตรต่อนาที ซึ่งพบว่าเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ทำให้เชื้อมีการเจริญได้อย่างคงที่ ไม่พบปัญหากรดสะสมภายในขวดที่ใช้เลี้ยงเชื้อในแบบการทดลองที่ใช้กรดอินทรีย์ในน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน และไม่พบปัญหาเชื้อขาดแคลนอาหารในแบบการทดลองที่ใช้โซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน หลังจากนั้นจึงเพิ่มอัตราการไหลของอาหารให้มากขึ้นเป็น 100 ไมโครลิตรต่อนาที ซึ่งพบว่าเป็นอัตราการไหลที่มากเกินไป แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงของทั้งสองชุดการทดลองไม่สามารถแบ่งตัวได้ทัน จึงเกิดการชะออกจากระบบ (Wash out) ในเวลาต่อมา

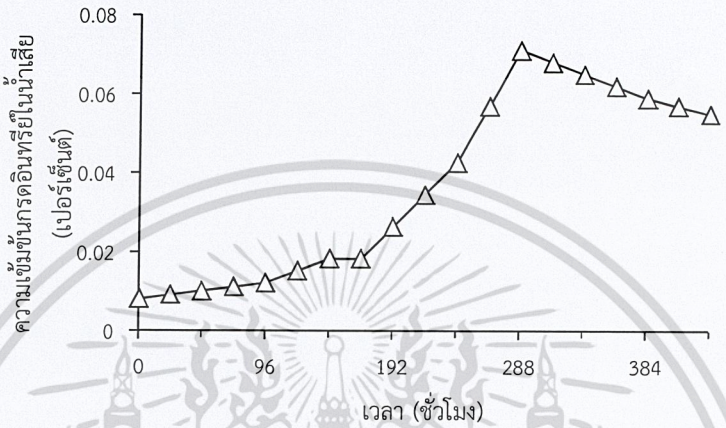
ดังที่กล่าวมานี้จึงสรุปได้ว่า ที่อัตราการไหล 60 ไมโครลิตรต่อนาที เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง Rhodopseudomonas sp. 14 มากที่สุด ดังนั้นจึงได้นำอัตราการไหลที่เหมาะสมนี้ไปใช้ในการศึกษา เพื่อหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ คือโซเดียมอะซิตต ที่เหมาะสม ในหัวข้อต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 การเจริญของ *Rhodopseudomonas* sp. S14 ที่อัตราการให้อาหาร 100 ไมโครลิตรต่อนาที โดยที่ (ก.) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข.)อัตราการเจริญจำเพาะ (ค.) ความเข้มข้นโคเอนไซม์คิวเท็น และ (ง.) ความเข้มข้นกรดอินทรีย์ในน้ำเสีย ซึ่งแทน ● กรดอินทรีย์จากน้ำเสียที่แพร่ผ่านแผ่นเยื่อเมมเบรน เป็นแหล่งคาร์บอน▲ โซเดียมอะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอน และ △ ความเข้มข้นกรดอินทรีย์ ตามลำดับ

รูปที่ 4.8 แสดงให้เห็นว่าการทดลองที่ 4.1 อาศัยการแพร่ของกรดอินทรีย์จากน้ำเสียสังเคราะห์ (ขวดหมายเลย 2) ไปยังขวดเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง (ขวดหมายเลข 1) มีการแพร่ของกรดอินทรีย์เกิดขึ้น และเพียงพอต่อการเจริญของจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง



รูปที่ 4.8 ความเข้มข้นกรดอินทรีย์ในขวดเตรียมน้ำเสียสังเคราะห์ที่เวลาต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ศึกษาผลของความเข้มข้นโซเดียมอะซิเตตในอาหารเหลวที่ไหลเข้าระบบเลี้ยงเชื้อ

จากผลของการศึกษาอัตราการให้อาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ ในหัวข้อ 4.1 พบว่า อัตราการไหลของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 80 ไมโครลิตรต่อนาที เป็นอัตราการให้อาหารที่ให้การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นได้สูงที่สุด และมีอัตราการเจริญจำเพาะคงที่ตลอดทั้งการทดลอง ผู้ทดลองจึงได้นำอัตราการให้อาหารที่เหมาะสมนี้ มาศึกษาต่อโดยมีการปรับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ คือ โซเดียมอะซิเตต ที่ความเข้มข้น 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อและการลงเชื้อในชุดการทดลองดังนี้คือ นำเชื้อแบคทีเรีย *Rhodopseudomonas* sp. 14 มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร A (ภาคผนวก ก.) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 8-10 วัน จากนั้นจึงนำมาใช้เป็นหัวเชื้อปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ ลงในขวดเลี้ยงเชื้อ (ขวดที่ 1) ของชุดการทดลองที่ใช้กรดอินทรีย์ในน้ำเสียสังเคราะห์เป็นแหล่งคาร์บอน และชุดการทดลองที่ใช้โซเดียมอะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งภายในขวดบรรจุอาหารเหลวสูตร A ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที ปริมาตร 200 มิลลิลิตร จากนั้นให้ทำให้เชื้ออยู่ในสภาพพร้อมใช้งาน โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 38-40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1,500-3,500 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน หรือจนกระทั่งเชื้อเจริญจนมีค่าการดูดกลืนแสงเป็น 1.200 จากนั้นจึงนำไปใช้ในการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่อง (Continuous culture) โดยกำหนดให้ใช้อัตราการไหลอาหารเหลวเข้าสู่ขวดเลี้ยงเชื้อ (หมายเลข 1) ที่ความเร็ว 80 ไมโครลิตรต่อนาที เลี้ยงเชื้อภายใต้แสงที่ความเข้ม 1,000-1,500 ลักซ์ ในสภาวะไม่มีอากาศ อุณหภูมิ 37-40 องศาเซลเซียส แต่ละการทดลองจะใช้ปริมาตรอาหารเหลวทั้งหมด 700 มิลลิลิตร เพื่อศึกษาการแสดงออกของเชื้อทั้งในแง่การเจริญ และการสร้างโคเอนไซม์คิวเท็น

ผลการทดลองพบว่า การทดลองที่ใช้กรดอินทรีย์ในน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน มีความเข้มข้นเซลล์ (4.8 ก) และอัตราการเจริญของเชื้อคงที่ (4.8 ข) ส่งผลให้มีการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นได้อย่างคงที่เช่นเดียวกัน (4.8 ค) เนื่องมาจากที่อัตราการไหลของอาหารเลี้ยงเชื้อ 80 ไมโครลิตรต่อนาที ปริมาตรอาหารเหลวที่ไหลเข้าและออกจากขวดเลี้ยงเชื้อ สมดุลกับปริมาณกรดอินทรีย์ในน้ำเสีย ที่แพร่ผ่านแผ่นเมมเบรนเข้ามาอย่างต่อเนื่อง ทำให้ปริมาณกรดในขวดเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง (ขวดที่ 1) มีความเข้มข้นเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ส่งผลให้จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง สามารถเจริญนำกรดอินทรีย์ในน้ำเสียไปใช้ในการเจริญอย่างปกติ และเมื่อเปรียบเทียบผลของการเลี้ยงเชื้อด้วยกรดอินทรีย์ในน้ำเสีย กับการเลี้ยงเชื้อจากโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้นต่างๆ พบว่า การเลี้ยงเชื้อด้วยกรดอินทรีย์ในน้ำเสียให้มีการเจริญของเซลล์ที่ใกล้เคียงกับการเลี้ยงเชื้อด้วยโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 0.5 และ โซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ อาจกล่าวได้ว่าปริมาณแหล่งคาร์บอนในน้ำเสีย มีค่าใกล้เคียงกับปริมาณแหล่งคาร์บอนที่มีอยู่ในโซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 0.5 - 0.75 เปอร์เซ็นต์

การเลี้ยงเชื้อด้วยโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีความเข้มข้นเซลล์ที่วัดได้มากที่สุด (4.8 ก) รวมไปถึงอัตราการเจริญของเชื้อคงที่ (4.8 ข) สอดคล้องกับปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็นที่คงที่ และมีค่าสูงสุดเมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่นๆ (4.8 ค) ซึ่งโซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คาร์บอน ที่มีความเข้มข้นน้อยที่สุดในการทดลองครั้งนี้ และหากการของเจริญเป็นไปตามทฤษฎี เชื้อจะต้องเจริญได้น้อยที่สุด หรืออาจเกิดปัญหาเชื้อขาดแคลนแหล่งคาร์บอน จนไม่สามารถเจริญได้อย่างเต็มที่ แต่ผลการทดลองกลับพบว่า ที่สภาวะนี้เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงมากที่สุด อธิบายได้ว่า แหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นสูงเกินไปจะยับยั้งการเจริญของเชื้อ เชื้อจึงสามารถเจริญได้ดีขึ้นเมื่อมีการลดความเข้มข้นของโซเดียมอะซิเตต

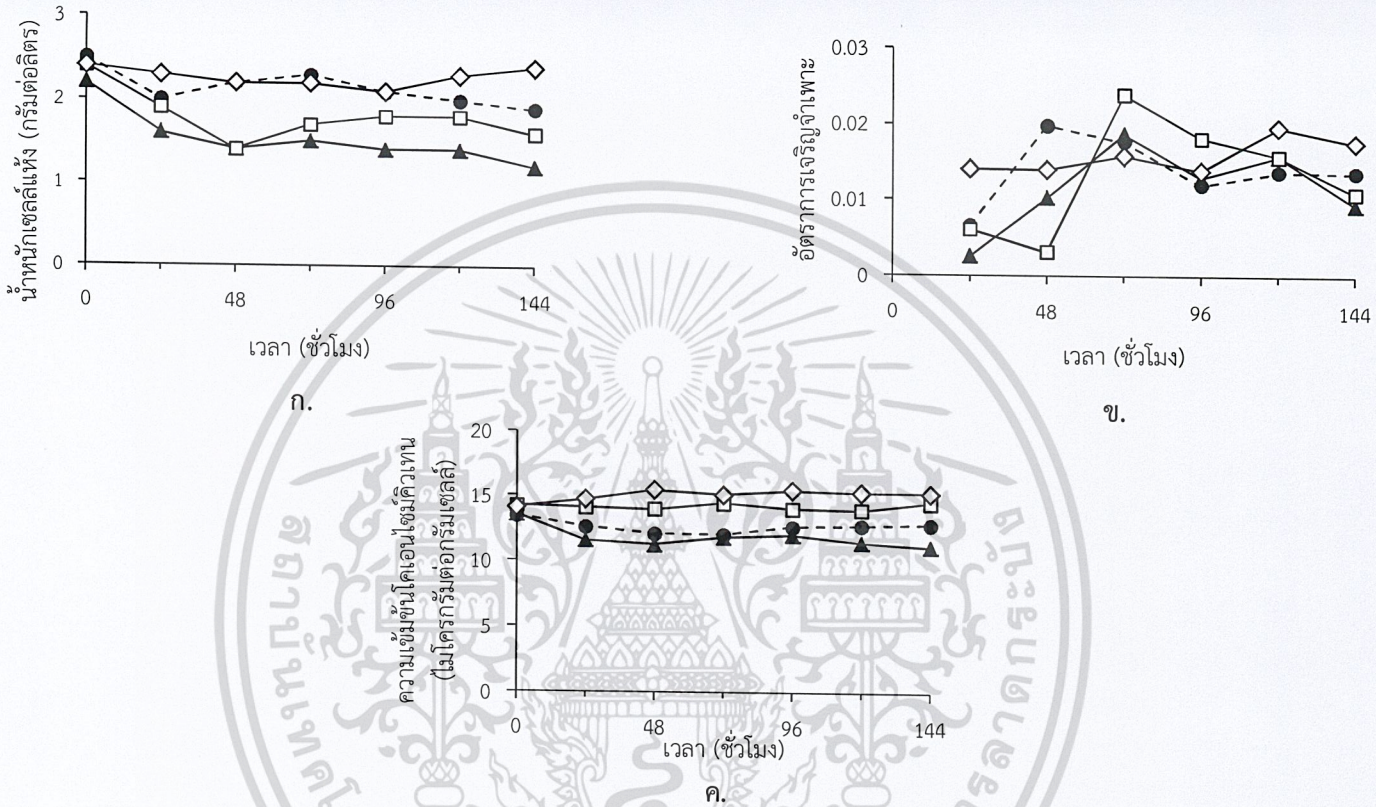
การเลี้ยงเชื้อด้วยโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีความเข้มข้นเซลล์ที่วัดได้ (4.8 ก) และอัตราการเจริญของเชื้อคงที่ (4.8 ข) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็นที่มีค่าคงที่เช่นเดียวกัน (4.8 ค) โดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่เลี้ยงจากการใช้โซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ มีความเข้มข้นเซลล์น้อยกว่าการเลี้ยงเชื้อจากการใช้โซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 0.5 แสดงให้เห็นว่า การเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไม่ได้เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

การเลี้ยงเชื้อด้วยโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีความเข้มข้นเซลล์ที่วัดได้น้อยที่สุด (4.8 ก) อัตราการเจริญของเชื้อคงที่ (4.8 ข) และปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็นที่เช่นเดียวกัน (4.8 ค) และมีค่าน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่นๆ (4.8 ค) ซึ่งโซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นมากที่สุดในการทดลองครั้งนี้ และหากการเจริญเป็นไปตามทฤษฎี เชื้อจะต้องเจริญได้ดีที่สุด เพราะมีแหล่งคาร์บอนมากพอที่เชื้อจะสามารถนำไปใช้สำหรับการเจริญและแบ่งเซลล์ แต่พบว่า การเลี้ยงเชื้อด้วยโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เชื้อมีการเจริญที่น้อยที่สุด เห็นได้ชัดว่า แหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นสูงเกินไปจะยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Substrate inhibition)

จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นถึงสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น โดยวิเคราะห์จากน้ำหนักเซลล์แห้ง อัตราการเจริญจำเพาะ และปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็นที่ผลิตได้ ซึ่งค่าสูงสุดคือที่อัตราการให้อาหาร 80 ไมโครลิตรต่อนาที โซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ให้การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นสูงสุด 15.45 ไมโครกรัมต่อ1กรัมเซลล์ รองลงมาคือ โซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ น้ำเสียและโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น1เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นได้ 15.10 12.89 และ 11.81 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมเซลล์ ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.9

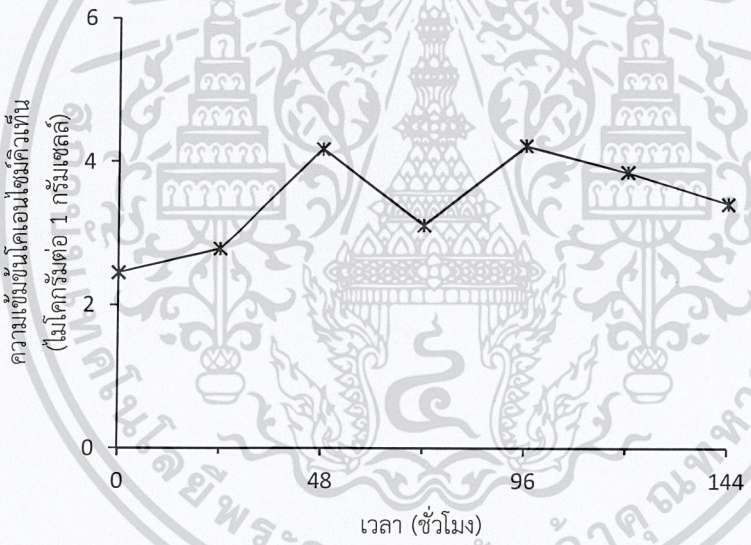
จากผลการทดลองดังกล่าวสามารถอธิบายได้จาก ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ใช้จะมีผลต่อการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง การเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรทจะสามารถทำให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญได้ดีขึ้น เนื่องจากเชื้อจะสามารถนำแหล่งคาร์บอนในอาหารมาใช้ในการเจริญ แบ่งเซลล์ และสร้างผลิตภัณฑ์ได้อย่างเพียงพอ และเมื่อเพิ่มแหล่งคาร์บอนให้มากขึ้น เชื้อจะเจริญได้ดีขึ้นเรื่อยๆ ตามปริมาณแหล่งคาร์บอนที่ใช้ จนกระทั้งถึงจุดๆ หนึ่ง ซึ่งเชื้อจะไม่สามารถเจริญได้ดีขึ้นอีกต่อไป ไม่ว่าความเข้มข้นของ ซับสเตรทจะมากขึ้นก็ตาม และหากยังมีการใช้แหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นไปเรื่อยๆ เชื้อจะถูกยับยังจากซับสเตรทที่ความเข้มข้นสูงนี้ในที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 การเจริญของ *Rhodopseudomonas* sp. S14 ที่อัตราการให้อาหาร 80 ไมโครลิตรต่อนาที โดยที่ (ก.) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข.) อัตราการเจริญจำเพาะ (ค.) ความเข้มข้นโคเอนไซม์คิวเท็น ซึ่งแทน ● กรดอินทรีย์จากน้ำเสียที่แพร่ผ่านแผ่นเยื่อเมมเบรนเป็นแหล่งคาร์บอน ◇ โซเดียมอะซิเตต 0.5 เปอร์เซ็นต์ □ โซเดียมอะซิเตต 0.75 เปอร์เซ็นต์ ▲ โซเดียมอะซิเตต 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

จากผลการทดลองเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rhodopseudomonas* sp. S14 เพื่อศึกษา ผลของอัตราการไหลของอาหารเลี้ยงเชื้อ (หัวข้อ 4.1) และการศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมอะซิเตตต่อการเจริญและการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น (หัวข้อ 4.2) พบว่าที่อัตราการไหลของอาหารเลี้ยงเชื้อ 80 ไมโครลิตรต่อนาที ความเข้มข้นโซเดียมอะซิเตต 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นสภาวะที่ดีที่สุดต่อการเจริญและการผลิต โคเอนไซม์คิวเท็น นำตัวอย่างโคเอนไซม์คิวเท็นที่สกัดได้จากการเลี้ยงเชื้อในสภาวะดังกล่าว มาทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high Performance Liquid Chromatography) (ภาคผนวก ข.) จากนั้นนำพื้นที่ได้กราฟที่ได้มาคำนวณเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน โคเอนไซม์คิวเทน โดยที่อัตราการไหลของอาหาร 80 ไมโครลิตรต่อนาที ความเข้มข้นโซเดียมอะซิเตต 0.5 เปอร์เซ็นต์ ผลิตโคเอนไซม์คิวเทนสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 96 สูงถึง 4.22 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.9 ความเข้มข้นโคเอนไซม์คิวเทน ที่ได้จากวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จากการเลี้ยงเชื้อด้วยอัตราการไหลของอาหาร 80 ไมโครลิตรต่อนาที ความเข้มข้นโซเดียมอะซิเตต 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 144 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ศึกษาผลของอัตราการไหลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญ และการสร้างโคเอนไซม์คิวเท็นของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง *Rhodopseudomonas* sp. 14 ในการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องภายใต้สภาวะ มีแสง ไม่มีอากาศ โดยได้แบ่งการทดลองการออกเป็น 2 แบบ ได้แก่ แบบการทดลองที่ 1 การเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องโดยใช้กรดอินทรีย์ในน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน และแบบการทดลองที่ 2 การเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องโดยใช้โซเดียมอะซิเตต 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อศึกษาอัตราการไหลของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ความเร็ว 60 80 และ 100 ไมโครลิตรต่อนาที ตามลำดับ ภายใต้แสงที่ความเข้ม 1,000-1,500 ลักซ์ ในสภาวะไม่มีอากาศ อุณหภูมิ 37-40 องศาเซลเซียส พบว่าที่อัตราการไหล 60 ไมโครลิตรต่อนาที การทดลองที่ใช้กรดอินทรีย์ในน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอนมีความเข้มข้นเซลล์ และอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อมีแนวโน้มลดลง เนื่องจากมีกรดอินทรีย์แพร่ผ่านเมมเบรนเข้ามาในปริมาณมาก ซึ่งแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสามารถนำไปใช้ได้ในระยะแรกของการเจริญ แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลานานขึ้น พบว่าปริมาณกรดที่สะสมในขวดเลี้ยงเชื้อมีค่ามากขึ้น จนยับยั้งการเจริญ ทำให้แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงเจริญได้ช้าลง อีกทั้งยังสังเกตเห็นการเจริญของเชื้อที่บริเวณปลายสาย (อาหารไหลเข้า) ต่อกับขวดเลี้ยงเชื้อ และปัญหาเชื้อจับตัวกันเป็นกลุ่มของเซลล์ ส่วนการการทดลองที่ใช้โซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีความเข้มข้นเซลล์ และอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ มีแนวโน้มลดลงเร็วกว่าการเลี้ยงเชื้อด้วยกรดอินทรีย์ในน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน เพราะเชื้อได้รับอาหารในปริมาณที่ไม่เพียงพอต่อการเจริญ ซึ่งสังเกตเห็นการเจริญของที่บริเวณปลายสาย (อาหารไหลเข้า) ต่อกับขวดเลี้ยงเชื้อ และปัญหาเชื้อจับตัวกันเป็นกลุ่มของเซลล์เช่นเดียวกัน

เมื่อเพิ่มอัตราการไหลเป็น 80 ไมโครลิตรต่อนาที ซึ่งพบว่าเป็นอัตราการไหลที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ส่งผลให้ความเข้มข้นเซลล์ที่วัดได้ และอัตราการเจริญจำเพาะ ของการทดลองทั้ง 2 แบบ มีค่าคงที่ โดยไม่พบปัญหาการเกิดกรดสะสมในขวดเลี้ยงเชื้อ ของแบบการทดลองที่ใช้กรดอินทรีย์ในน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน และปัญหาเรื่องอาหารไม่เพียงพอต่อการเจริญ ในแบบการทดลองที่ใช้โซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเปรียบเทียบการทดลองทั้งสองแบบพบว่า การทดลองที่ใช้กรดอินทรีย์ในน้ำเสียเป็น แหล่งคาร์บอน มีความเข้มข้นเซลล์มากกว่าการทดลองที่ใช้โซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากการทดลองที่ใช้กรดอินทรีย์ในน้ำเสีย มีปริมาณแหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญได้มากกว่า แต่อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นเซลล์ และอัตราการเจริญจำเพาะของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลอง ทั้งสองแบบมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อย ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลานาน ทำให้เชื้อเริ่มมีการจับตัวกันเป็นกลุ่มของเซลล์

สำหรับอัตราการไหลที่ 100 ไมโครลิตรต่อนาที ซึ่งพบว่าเป็นอัตราการไหลที่สูงเกินไป ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงของการทดลองทั้งสองแบบ ไม่สามารถเจริญและแบ่งเซลล์ได้ทัน เชื้อจึงถูกชะออกจากระบบในเวลาที่ใกล้เคียงกัน ดังที่กล่าวมานี้จึงสรุปได้ว่า ที่อัตราการไหล 80 ไมโครลิตรต่อนาที เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง *Rhodopseudomonas* sp. 14 มากที่สุด ดังนั้นจึงได้นำอัตราการไหลที่เหมาะสมนี้ ไปใช้ในการศึกษาเพื่อหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ คือโซเดียมอะซิตต ที่เหมาะสมต่อไป โดย มีการปรับความเข้มข้นโซเดียมอะซิเตต ที่ความเข้มข้น 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเปรียบเทียบผลที่ได้กับการใช้กรดอินทรีย์ในน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน จากการวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง อัตราการเจริญจำเพาะ และปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็น พบว่าที่อัตราการไหล 80 ไมโครลิตรต่อนาที โซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ให้การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นสูงสุด 15.45 ไมโครกรัมต่อ1กรัมเซลล์ รองลงมาคือ โซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ น้ำเสีย และโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น1เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นได้ 15.10 12.89 และ 11.81 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมเซลล์ ตามลำดับ

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง *Rhodopseudomonas* sp. 14 ที่อัตราการไหล 60 และ 80 ไมโครลิตรต่อนาที พบว่าเชื้อมีการจับตัวกันเป็นกลุ่มของเซลล์ ปัญหานี้อาจแก้ไขได้โดยการเพิ่มความเร็วรอบในการกวนภายในขวดที่ใช้เลี้ยงเชื้อ แต่อย่างไรก็ตาม สิ่งที่ต้องคำนึงถึงต่อมาคือแรงเฉือนที่เชื่อจะได้รับ รวมไปถึงการรักษาสภาวะไร้อากาศภายในชุดการทดลอง

2.จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.2 พบว่าการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง Rhodopseudomonas sp. 14 โดยการใช้โซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน ส่งผลให้เชื้อเจริญ และสร้างโคเอนไซม์คิวเท็นได้สูงที่สุด ดังนั้นในอนาคต จึงควรศึกษาการเลี้ยงเชื้อด้วยโซเดียมอะซิเตตที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดต่อไป

3. ผลการทดลองพบว่า การใช้กรดอินทรีย์ในน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน ให้การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นได้ใกล้เคียงกับการใช้โซเดียมอะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อพิจารณาทางด้านค่าใช้จ่าย พบว่าการใช้กรดอินทรีย์ในน้ำเสีย ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนเหลือทิ้งสามารถลดต้นทุนการผลิตได้เป็นอย่างมาก ซึ่งถือเป็นปัจจัยสำคัญ ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม จึงจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง หากทำการศึกษาเพิ่มเติมว่าแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง *Rhodopseudomonas* sp. 14 รวมไปถึงแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงอีกหลากหลายสายพันธุ์ จะสามารถใช้น้ำเสียที่เหลือทิ้งจากกระบวนการในอุตสาหกรรมอาหารอื่นๆ ได้อีกหรือไม่ เพื่ออาจเป็นหนทางในการประยุกต์ใช้ให้กว้างขวางต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

จารุวรรณ หวะสุวรรณ . 2532. การกำจัดและการใช้ประโยชน์จากน้ำทิ้งโรงงานแป้งมันสำปะหลังโดยใช้แบคทีเรีย สังเคราะห์แสงร่วมกับ Heterotrophic bacteria. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ

ดร.ดวงพร คันธโชติ. 2530. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

ตะวัน ฉัตรสูงเนิน. จลนพลศาสตร์ของของจุลินทรีย์. มหาวิทยาลัยแม่โจ้. [Online]. Available: http://coursewares.mju.ac.th:81/elearning46/bi480/Lecture/4kinetic.pdf

สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. แบคทีเรียสังเคราะห์แสง. [Online]. Available: http://www.nia.or.th/download/activity/20060120_presentation.pdf

อรุณี ประดิษฐคล้าย และคณะ. 2555. การผลิตโคเอนไซม์คิวเทนจากเศษเหลือทะลายปาล์มน้ำมันที่ผ่านการย่อย โดยเชื้อ Rhodobacter sphaeroides S10. การประชุมวิชาการแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 9

พลสัณห์ มหาขันธ์ และ จุฑาพร แสวงแก้ว.การผลิตไฮโดรเจนชีวภาพจากแบคทีเรียสังเคราะห์กลุ่ม purple non-sulfur. [Online]. Available: http://www.tnrr.in.th/?page=result_search&record_id=9976946

Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Alzheimer's and Parkinson's diseases and coenzyme Q_{10} as a potential treatment. J Bioenerg Biomembr. 2004; 36: 381-6.

Belardinelli R, Mucaj A, Lacalaprice F, et al. Coenzyme Q_{10} improves contractility of dysfunctional myocardium in chronic heart failure. Biofactors. 2005; 25: 137- 45.

Bentinger M, Tekle M, Dallner G. Coenzyme Q_{10} biosynthesis and functions. Biochem Biophys Res Commun. 2010; 396: 74-9.

Brock, T.D., M.T. Madigan, J. M. Martinko and J. Parker. 1994. Biology of Microorganisms. 7th ed., Prentice- Hall International, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey. 909 p.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม (ต่อ)

Burgess, J.G., R. Kawaguchi, A. Yamada and T. Matsunaga, 1994 *Rhodobacter marinus* sp. nov. a new marine hydrogen producing photosynthetic bacterium.Microbiol. 140 : 965-970.

Chew GT, Watts GF. Coenzyme Q_{10} and diabetic endotheliopathy: oxidative stress and the 'recoupling hypothesis'. QJM. 2004; 9: 537-48.

Choorit, W.,Abe, N., Kaneko, J., Noparatnaraporn, N., Kamio, Y. and Izaki, K. 1993. Isolation and properties of new photosynthetic bacteria isolated from seawater. Bioscience Biotechnology Biochemistry. 57, 2189-2191

Cluis CP, Burja AM, Martin VJ. Current prospects for the production of coenzyme Q10 in microbes. Trends Biotechnol. 2007; 25: 514-21.

Ha, S.J., S.Y. Kim, J.H.Seo, D.K. Oh and J.K. Lee. 2007. Optimization of culture conditions and scale-up to pilot and plant scales for coenzyme Q_{10} production by Agrobacterium tumefaciens. Applied Microbiology and Biotechnology 74: 974-980.

Imhoff, J. F. 1992. Taxonomy, phylogeny, and general ecology of anoxygenic phototrophic bacteria, In N. H. Mann, and N. G. Carr (ed.). Photosynthetic Prokaryotes. Vol.6. Plnum Press, Now York and Londan. pp. 53-92

Jeya M, Moon HJ, Lee JL, Kim IW, Lee JK. Current state of coenzyme Q10 production and its applications. Appl Microbiol Biotechnol. 2010; 85: 1653-63.

Kalen, A., B. Norling, E.L. Appelkvist and G. Dallner. 1987. Ubiquinone biosynthesis by the microsomal fraction from rat liver. Biochemical and Biophysical Research Communications 926: 70-78.

Kawamukai M. Biosynthesis, bioproduction and novel roles of ubiquinone. J Biosci Bioeng. 2002; 94: 511-7.

Kobayashi, M. and S.I. Kurata. 1978. The mass culture and cell utilization of photosynthetic bacteria. Process Biochem. 13(9): 27-30.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม (ต่อ)

Kobayashi. M. 2000. Waste Remediation and Treatment Using Anoxygenic Phototropic Bacteria. Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. pp. 1269–1282.

Lee BJ, Huang YC, Chen SJ, Lin PT. Coenzyme Q_{10} supplementation reduces oxidative stress and increases antioxidant enzyme activity in patients with coronary artery disease. Nutrition. 2012; 28: 250-5.

Levett, P.N. 1990. Anaerobic Bacteria a Functional Biology. St Edmunds bury Press Ltd. Philadelphia. 116 p.

Maki, T. 2004. Aurace PSB and G2 for Nursery. Matsumoto Institute of Microorganism Co. Ltd.

Maria J. Barbosa. Acetate as a carbon source for hydrogen production by photosynthetic bacteria. Wageningen University. 2000; 85:25-33

N.G. Carr, G. Exell, Ubiquinone concentrations in Athiorhodaceae grown under various environmental conditions, Biochem. J. 96 (1965) 688–692.

Najafpour G, Younesi H, Mohamed AR. A survey on various carbon sources for biological hydrogen production via the water-gas reaction using a photosynthetic bacterium (Rhodospirillum rubrum). Energy Source Part A 2006; 28(11): 1013e26

Nowicka B, Kruk J. Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinones. Biochim Biophys Acta. 2010; 1797: 1587-605.

Okada K, Kainou T, Matsuda H, Kawamukai M. Biological significance of the side chain length of ubiquinone in Saccharomyces cerevisiae. FEBS Lett.1998; 431: 241-4.

Olliver, B. 1994. Anaerobic from hypersaline environments. Microbiol.Rev.58 (1): 27-38

Pfenning, N. and Truper, H.G. 1989. "Anoxygenic phototrophic bacteria" pp. 1635-1682. In Staley, J.T. Bryant, M.P. Pfennig, N. and Holt, T.G. (eds.). Bergey's Manual of Systemetic

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม (ต่อ)

Prasertsan, P., W. Choorit and S. Suwanno. 1993. Isolation, identification and growth conditions of photosynthetic bacteria found in seafood processing waste water. World J. Microbiol.Biotechnol. 9(3): 590-592

Qin Zhou, Panyue Zhang, Guangming Zhang. Biomass and pigments production in photosynthetic bacteria wastewater treatment: Effects of light sources. Renmin University of China.2014; 505–509

Quinzii CM, DiMauro S, Hirano M. Human coenzyme Q_{10} deficiency. Neurochem Res. 2007; 32: 723-7.

Sasikala, C. and C.V. Ramara. 1995. Biotechnological potentials of anoxygenic phototrophic bacteria I and II, pp. 173-227. In S.L. Neidleman and A.J. Laskin (eds.). Advances Applied Microbiology. Vol. 41. Academic Press, San Diego.

Sasikala, K., CH. V. Ramana, P. Raghuveer and K.L. Lovacs. 1993. Anoxygenic photophic bacteria: physiology and advances in hydrogen product echnology, pp. 211-295. In S. Neidleman and A.I. Leskin (eds.). Advances in Applied Microbiology. Vol. 38. Academic Press, San Diego.

Shapiro SS, Saliou C. Role of vitamins in skin care. Nutrition. 2001; 17: 839-44.

Shults CW, Oakes D, Kieburtz K, Beal MF, Haas R, Plumb S, et al.. Effects of coenzyme Q_{10} in early Parkinson disease: evidence of slowing of the functional decline.

Shults CW, Oakes D, Kieburtz K, Beal MF, Haas R, Plumb S, et al.. Effects of coenzyme Q_{10} in early Parkinson disease: evidence of slowing of the functional decline. Arch Neurol. 2002;59: 1541-50.

Silver MA, Langsjoen PH, Szabo S, Patil H, Zelinger A. Effect of atorvastatin on left ventricular diastolic function and ability of coenzyme Q_{10} to reverse that dysfunction. Am J Cardiol. 2004; 94: 1306-10.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม (ต่อ)

Stadtwald-Demchick, R.,F.R.Tuner and H. Gest. 1990. *Rhodopseudomonas cryptolactis* sp. nov., a new thermotolerant species of budding phototrophic purple bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 71: 117-120.

Staley, J.T., M.P. Bryant, N. Pfenning and J.G. Holt (eds.). 1994. Bergey' s Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. The Williams and Wilkins, Co., Baltimore. 754 p.

Szkopinska A. Ubiquinone. Biosynthesis of quinone ring and its isoprenoid side chain. Intracellular localization. Acta Biochim Pol. 2000;47: 469-80.

Tian, Y., T.Yuea, Y.Yuana, P.K. Somaband Y.M. Loa. 2010. Improvement of cultivation medium for enhanced production of coenzyme Q_{10} by photosynthetic Rhodospirillum rubrum. Biochemical Engineering Journal51: 160–166.

Tran MT, Mitchell TM, Kennedy DT, Giles JT. Role of coenzyme Q_{10} in chronic heart failure, angina, and hypertension. Pharmacotherapy. 2001; 21: 797-806.

Yen, H-W., C-Y Feng and J-L. Kang. 2010. Cultivation of Rhodobacter sphaeroides in the Stirred Bioreactor with Different Feeding Strategies for CoQ_{10} Production. Applied Biochemistry and Biotechnology 160: 1441-1449

Yoshida, H., Y. Kotani, K. Ochiaiand K. Araki. 1998. Production of ubiquinone-10 using bacteria. Journal of General and Applied Microbiology 44: 19–26.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร A มีองค์ประกอบดังนี้

แหล่งคาร์บอน	10	กรัมต่อลิตร
โมโนโซเดียมกลูตาเมต	10	กรัมต่อลิตร
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟส	10	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด	1	กรัมต่อลิตร

แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน จะเปลี่ยนแปลงตามวัตถุประสงค์ของการทดลอง ปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 6.8-7

2. การเตรียมน้ำเสียสังเคราะห์

ชั่งข้าวสุก 150 กรัม ลงในขวดดูแรนขนาด 5 ลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 5 ลิตร จากปล่อยให้ย่อยสลายในสภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

สารเคมี และวิธีวิเคราะห์

1. สารเคมี

1.1 การเตรียมสารละลาย 0.1000 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

1.1.1 ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 กรัม ในขวดปรับปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

1.1.2 ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

1.1.3 เก็บสารละลายที่เตรียมไว้ (ความเข้มข้นโดยประมาณเท่ากับ 0.1000 M) เพื่อนำไปไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานโพแทสไฮโดรเจนพาทาเรท เพื่อหาความเข้มข้นที่แน่นอนของโซเดียมไฮดรอกไซด์ต่อไป

1.1.4 สารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1000 M จำนวน 250 มิลลิลิตร ที่เตรียมได้นี้ต้องใช้ในการทดลองการหาปริมาณกรดทั้งหมดในน้ำเสียสังเคราะห์ ตลอดทั้งการทดลอง

1.2 การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้เป็นสารละลายมาตรฐาน (Standardization of sodium Hydroxide Solution)

1.2.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลตความเข้มข้น 0.1000 M ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร 3 ขวด ขวดละ 10 มิลลิลิตร

1.2.2 เติมฟีนอล์ฟทาลีน (อินดิเคเตอร์) 3 หยด ลงในขวดทั้ง 3 และเขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียว

1.2.3 เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เตรียมไว้ ลงในบิวเรตจนเต็ม แล้วปรับปริมาตรของสารละลายให้อยู่ที่ขีด 0 ค่อย ๆ ไขสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากบิวเรตลงในขวดรูปชมพู่ พร้อมกับเขย่าขวดเบาๆ ตลอดเวลา เมื่อหยดโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไปในช่วงแรกจะเห็นสีชมพูเกิดขึ้น แต่เมื่อเขย่าเบาๆ สีก็จะหายไปอย่างรวดเร็ว เมื่อใกล้ถึงจุดสมมูล การหายไปของสีจะช้าขึ้นกว่าเดิมในตอนนี้ต้องทำการไทเทรตด้วยความระมัดระวังค่อย ๆ หยดสารละลายทีละหยดหรือเพียงครึ่งหยด ในกรณีที่มีสารติดข้างภาชนะ ให้ใช้น้ำกลั่นฉีดล้างลงไปในขวด ที่จุดยุติสารละลายจะเป็นสีชมพูอ่อน จดบันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไป (ทศนิยม 2 ตำแหน่ง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. วิธีวิเคราะห์

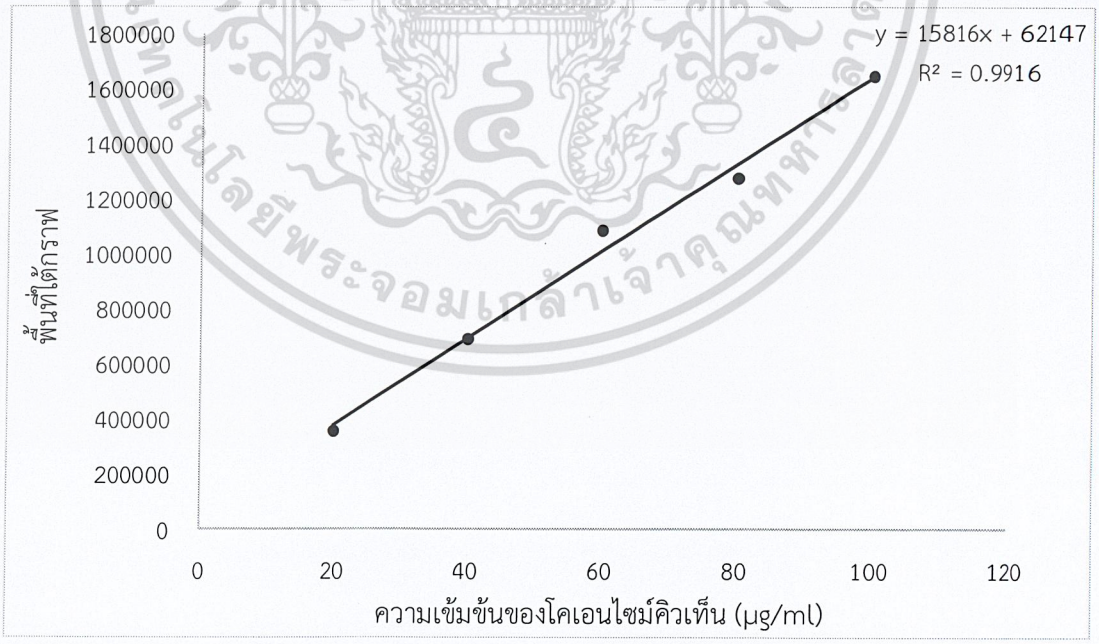
2.1 การวิเคราะห์ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทน โดยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

2.1.1 ชั่งผงโคเอนไซม์คิวเทน ปริมาณ 5 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยเอทานอล ในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายโคเอนไซม์คิวเทนความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2.1.2 นำโคเอนไซม์คิวเทนความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยเอทานอล ให้ได้ความเข้มข้น 0 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2.1.3 ดูดในช่วงความเข้มข้นต่างๆ มาความเข้มข้นละ 900 ไมโครลิตร ผสมกับเมทานอล 100 ไมโครลิตร กรองและบรรจุในหลอดไมโครเซนติฟิวก์

2.1.4 นำไปฉีดวิเคราะห์โดยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ μBondapak C18 วัดด้วย UV โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร ชะคอลัมน์ด้วยเมทานอลต่อเอทานอลในอัตราส่วน 1:9 (V/V) ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานโคเอนไซม์คิวเทนโดยเครื่องโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

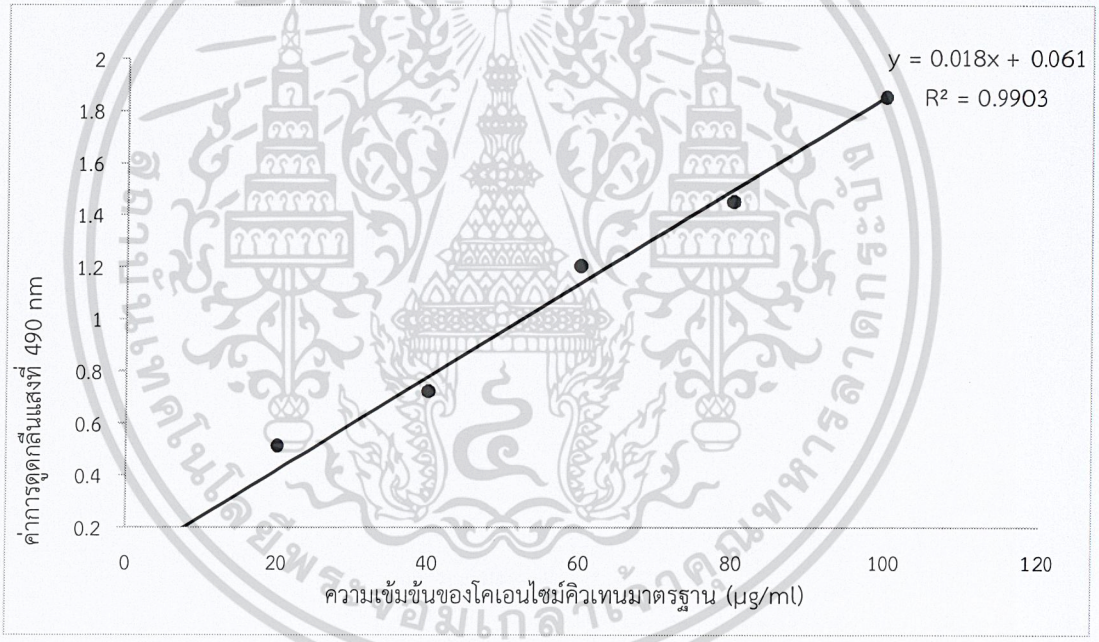
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทนโดยเครื่อง spectrophotometer

2.2.1 ชั่งผงโคเอนไซม์คิวเทน ปริมาณ 5 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยเอทานอล ในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายโคเอนไซม์คิวเทนความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2.2.2 นำโคเอนไซม์คิวเทนความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยเอทานอล ให้ได้ความเข้มข้น 0 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2.2.3 วิเคราะห์ตัวอย่างโดยเครื่อง Spectrophotometer ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอลต่อเอทานอลในอัตราส่วน 1:9 (V/V) เป็น Blank



รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานโคเอนไซม์คิวเทนโดยเครื่อง Spectrophotometer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การคำนวนผล

1. การคำนวณหาความเข้มข้นกรดอะซิติกในน้ำเสียสังเคราะห์

สูตรการคำนวณ

$$n_{CH3COOH} = M_{NaOH} \times V_{NaOH}$$

$$M_{CH3COOH} = n_{CH3COOH} \times MW_{CH3COOH}$$

$$\%\ \text{ความเข้มข้นของเนื้อสาร} = \frac{m_{CH3COOH}}{\text{ปริมาณสารตัวอย่าง}} \times 10$$

2. การคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ของ *Rhodopseudomonas* sp. S14

สูตรการคำนวน

$$\mu = \ln \frac{\left(\frac{x2}{x1}\right)}{\Delta t}$$

เมื่อ x_1 = ปริมาณมวลเซลล์ x ปริมาตรอาหารในขวด

x_2 = ปริมาณมวลเซลล์ x (ปริมาตรในขวด + ปริมาณที่ล้นออก)

3. การความเข้มข้นที่แน่นอนโซเดียมไฮดรอกไซด์

สูตรการคำนวณ

$$n_{NaOH} = n_{KHP}$$

$$M_{NaOH} \times V_{NaOH} = n_{KHP}$$

$$M_{NAOH} = \frac{n_{KHP}}{V_{KHP}}$$

4. การคำนวณหาความเข้มข้นโคเอนไซม์คิวเท็นต่อ 1 กรัมเซลล์

สูตรการคำนวณ

เข้มข้นโคเอนไซม์คิวเท็น(ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมเซลล์) = $\frac{\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง 1 กรัม}}{\text{น้ำหนักเซลล์แห้งที่วัดได้}}$ x ปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้