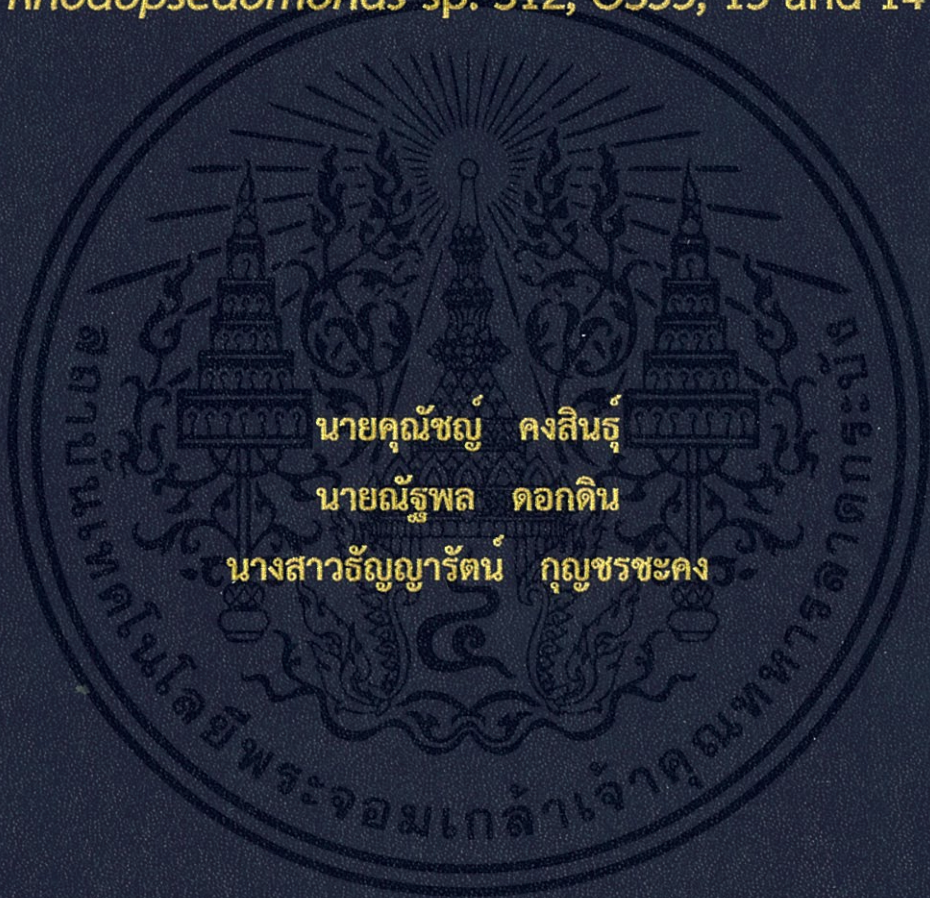


การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นจาก
Rhodopseudomonas sp. S12, OS33, 13 และ 14

The Coenzyme Q10 Production from
Rhodopsedomonas sp. S12, OS33, 13 and 14



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2558

การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นจาก
Rhodopseudomonas sp. S12, OS33, 13 และ 14

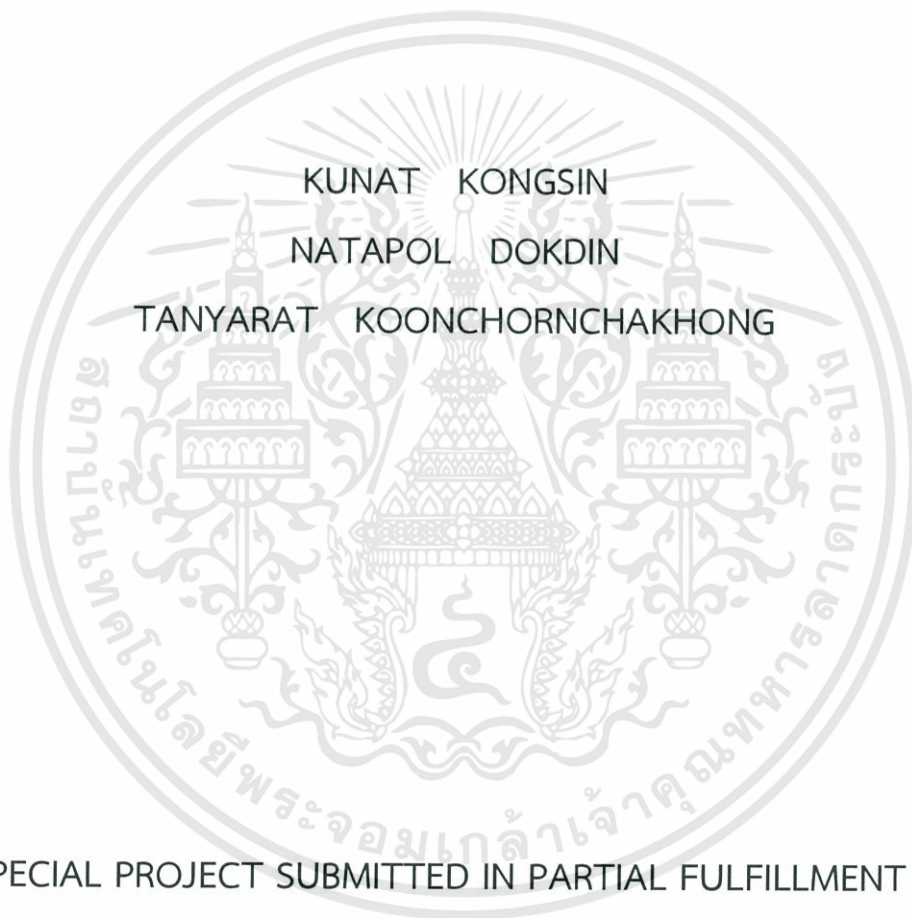
The Coenzyme Q10 Production from
Rhodopsedomonas sp. S12, OS33, 13 and 14



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The Coenzyme Q10 Production from
Rhodopseudomonas sp. S12, OS33, 13 and 14



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2015

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นจาก *Rhodopseudomonas* sp.
S12, OS33, 13 และ 14
The Coenzyme Q10 Production from *Rhodopseudomonas* sp.
S12, OS33, 13 and 14

ชื่อนักศึกษา นายคุณันท์ คงสินธุ์ รหัสนักศึกษา 55051244
นายณัฐพล ดอกดิน รหัสนักศึกษา 55051276
นางสาวธัญญารัตน์ กุญชรชะคง รหัสนักศึกษา 55051294
ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา ชีววิทยา
ปีการศึกษา 2558
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา
อุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2558

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

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นจาก <i>Rhodopseudomonas</i> sp. S12, OS33, 13 และ 14	
ชื่อนักศึกษา	นายคุณัญญ์ คงสินธุ์	รหัสนักศึกษา 55051244
	นายณัฐพล ดอกดิน	รหัสนักศึกษา 55051276
	นางสาวธัญญารัตน์ กุญชรชะคง	รหัสนักศึกษา 55051294
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)	
ภาควิชา	ชีววิทยา	
คณะ	วิทยาศาสตร์	
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)	
ปีการศึกษา	2558	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์	

บทคัดย่อ

การเลี้ยงเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. จำนวน 4 สายพันธุ์ (S12, OS33, 13 และ 14) เพื่อผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นภายใต้ 2 สภาวะ ได้แก่ 1) ให้อากาศจำกัดและให้แสง และ 2) ไม่มีอากาศและให้แสง (ตามลำดับ) ผลการทดลองพบว่าเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ให้การสร้างโคเอนไซม์คิวเท็นสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในขวดแบน ที่ความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อ 10 เซนติเมตร ภายใต้ความเข้มแสง 300 ลักซ์ อุณหภูมิ 35-45 องศาเซลเซียส โดยเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. 13 ให้การเจริญสูงสุดในวันที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ และให้ผลผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น 98.64 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะให้อากาศจำกัดและให้แสง ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะไม่มีอากาศและให้แสง แต่เมื่อเปรียบเทียบผลได้ผลิตภัณฑ์โคเอนไซม์คิวเท็น พบว่า *Rhodopseudomonas* sp. OS33 ให้ค่าสูงที่สุด 183.85 มิลลิกรัมโคเอนไซม์คิวเท็นต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ในวันที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ

คำสำคัญ : โคเอนไซม์คิวเท็น แบคทีเรียสังเคราะห์แสง Photoheterotroph
Rhodopseudomonas sp.

Title	The Coenzyme Q10 Production from <i>Rhodopseudomonas</i> sp. S12, OS33, 13 and 14	
Students	Mr.Kunat Kongsin	Student ID 55051244
	Mr.Natapol Dokdin	Student ID 55051276
	Miss Tanyarat Koonchornchakhong	Student ID 55051294
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)	
Department	Biology	
Faculty	Science	
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)	
Academic Year	2015	
Advisor	Asst. Prof. Dr. Somchai Krairak	

Abstract

Four strains of *Rhodopseudomonas* sp. S12, OS33, 13 and 14, were cultivated for Coenzyme Q10 production under 2 conditions; 1) microaerophilic and light condition and 2) anaerobic and light condition, respectively. The result showed that, all four strains gave the maximum Coenzyme Q10 production when cultivated in flat bottle with 10-cm medium height under 300 lux of light illumination at 35-45 °C. By the way, *Rhodopseudomonas* sp. 13 showed the maximum Coenzyme Q10 production (98.64 mg/l) within 10 day of cultivation under microaerophilic and light condition which was higher than one with anaerobic and light condition. In comparison to the product yield of Coenzyme Q10, *Rhodopseudomonas* sp. OS33 gave the maximum amount of 183.85 mg-Coenzyme Q10/g-DCW within day 12 of cultivation.

Keywords : Coenzyme Q10, Photosynthetic bacteria, Photoheterotroph, *Rhodopseudomonas* sp.

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยโครงการพิเศษเล่มนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความอนุเคราะห์จากคณาจารย์ผู้ทรงคุณวุฒิ ตลอดจนบุคลากรทางการศึกษา ผู้จัดทำและศึกษาโครงการพิเศษเล่มนี้ ขอกราบขอบพระคุณผู้ให้ความช่วยเหลือและความอนุเคราะห์ดังต่อไปนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์ อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษาและช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของโครงการพิเศษนี้ตลอดจนให้ความรู้ และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาโครงการพิเศษฉบับนี้

ขอกราบของพระคุณ ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พุกษ์ ประธานกรรมการโครงการพิเศษ และ ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี กรรมการโครงการพิเศษ ผู้ตรวจสอบและให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการพิเศษฉบับนี้

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ในภาควิชาชีววิทยาที่อำนวยความสะดวกในด้านเครื่องมือ อุปกรณ์สารเคมีตลอดจนสถานที่ที่ใช้สำหรับการศึกษาและจัดทำโครงการพิเศษนี้

ขอขอบคุณคณะเพื่อนในภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่ให้การช่วยเหลือ ตรวจสอบ แนะนำตลอดจนให้กำลังใจในการศึกษาและจัดทำโครงการพิเศษนี้

ท้ายนี้ ขอกราบขอบคุณพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การสนับสนุน ส่งเสริมการศึกษาตลอดจนเป็นกำลังใจอย่างดีตลอดมา จนทำให้ผู้ศึกษาประสบความสำเร็จในชีวิต

คุณชัญ คงสินธุ์

ณัฐพล ดอกดิน

ธัญญารัตน์ กุญชรชะคง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ประวัติการค้นพบโคเอนไซม์คิวเท็น	3
2.2 โครงสร้างทางเคมีของโคเอนไซม์คิวเท็น	3
2.3 แหล่งและหน้าที่ของโคเอนไซม์คิวเท็น	4
2.4 การสังเคราะห์โคเอนไซม์คิวเท็น	6
2.4.1 การสังเคราะห์ทางเคมีและกึ่งเคมี	6
2.4.2 การสังเคราะห์ทางชีวภาพ	7
2.5 การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นจากแบคทีเรีย	10
2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงเพื่อ การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น	13
2.6.1 แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน	13
2.6.2 ปริมาณออกซิเจนละลาย	13
2.6.3 การเพิ่มปริมาณแคลเซียมในอาหารเลี้ยงเชื้อ	13
2.6.4 กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง	14
2.6.5 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)	14
2.7 การประยุกต์ใช้โคเอนไซม์คิวเท็นในทางการแพทย์	16
2.7.1 บทบาทของโคเอนไซม์คิวเท็นที่มีต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด	16
2.7.2 บทบาทของโคเอนไซม์คิวเท็นเมื่อรับประทานร่วมกับยาลดโคเลสเตอรอล	16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.7.3 บทบาทในการป้องกันความเสื่อมของระบบประสาท	17
2.7.4 บทบาทในการบำรุงผิวหนัง	17
2.8 แบคทีเรียสังเคราะห์แสง	17
2.8.1 กลุ่มย่อยที่ 1: Purple sulfur bacteria	17
2.8.2 กลุ่มย่อยที่ 2: Purple sulfur bacteria	18
2.8.3 กลุ่มย่อยที่ 3: Purple non-sulfur bacteria	18
2.8.4 กลุ่มย่อยที่ 4: แบคทีเรียที่มีแบคทีเรียโอคโลโรฟิลล์ชนิด <i>g</i>	18
2.8.5 กลุ่มย่อยที่ 5: Green sulfur bacteria	18
2.8.6 กลุ่มย่อยที่ 6: Green sulfur bacteria ชนิดที่เป็นเส้นสาย	19
2.8.7 กลุ่มย่อยที่ 7: แบคทีเรียที่เจริญในสภาพ Chemoheterotroph	19
2.9 การสังเคราะห์ด้วยแสงในแบคทีเรียสังเคราะห์แสง	21
2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	24
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	28
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ	28
3.3 สารเคมี	28
3.4 เครื่องมือและอุปกรณ์	28
3.5 วิธีการทดลอง	29
3.5.1 การเตรียมกล้าเชื้อ	29
3.5.2 ศึกษาการเจริญ และการผลิตโคเอนไซม์คิวเทินโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ สองระยะ	29
3.5.3 ศึกษาการเจริญของเชื้อในหลอดทดลองภายใต้สภาวะ Photoheterotroph (ให้อากาศ และแสง)	30
3.5.4 ศึกษาการเจริญ และการผลิตโคเอนไซม์คิวเทิน โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อใน ขวดแบน ภายใต้สภาวะ Photoheterotroph (ให้อากาศจำกัด และแสง)	30
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	
4.1 ศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>Rhodopseudomonas</i> sp. สองสภาวะ	31
4.2 ศึกษาการเจริญของเชื้อ <i>Rhodopseudomonas</i> sp. ในหลอดทดลอง	32

สารบัญ (ต่อ)








	หน้า
4.2.1 ศึกษาความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ภายใต้สภาวะ Photoheterotrophเปรียบเทียบกับสภาวะ Anaerobic-light	33
4.2.2 ศึกษาความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ <i>Rhodopseudomonas</i> sp.ในสภาวะ Photoheterotroph	35
4.3 ศึกษาการเจริญ และการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อใน ขวดแบน ภายใต้สภาวะ Photoheterotroph และ Anaerobic-light	36
4.3.1 ผลการศึกษาการเจริญสภาวะ Photoheterotroph และ Anaerobic-light ในขวดทรงแบน	36
4.3.2 การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นของเชื้อ <i>Rhodopseudomonas</i> sp. ในแต่ละสายพันธุ์	39
4.3.3 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโต และการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นโดย <i>Rhodopseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ S12 และ OS33 สายพันธุ์กลาย 13 และ 14	43
4.3.4 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น สูงสุด จากเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และ HPLC	44
บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผลการวิจัย	45
5.2 ข้อเสนอแนะ	46
เอกสารอ้างอิง	47
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก วิธีวิเคราะห์	57
ภาคผนวก ข รูปแสดงการทดลอง	60

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทินจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ	11
2.2 แสดงผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทินจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสง และสภาวะที่เหมาะสม ในการเพาะเลี้ยง	15
2.3 การเปรียบเทียบลักษณะของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในกลุ่มย่อยที่ 1-7	20
2.4 ผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทินสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยง <i>R. sphaeroides</i> ภายใต้สภาวะต่างๆ	25
4.1 ค่าปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินของเชื้อ <i>Rhodopseudomonas</i> sp. 14	32
4.2 ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินสูงสุดจากการเพาะเลี้ยง <i>Rhodopseudomonas</i> sp. จำนวน 4 สายพันธุ์ที่วิเคราะห์ได้จากเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และ เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)	44



สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของโคเอนไซม์คิว (รูปออกซิไดซ์)	3
2.2 การเปลี่ยนรูปออกซิไดซ์ เป็นรีดิวซ์	4
2.3 ปริมาณโคเอนไซม์คิวที่พบในอวัยวะส่วนต่างๆ ของมนุษย์	4
2.4 การขนส่งอิเล็กตรอนของการหายใจแบบใช้ออกซิเจนและการสร้างพลังงานในสิ่งมีชีวิต	5
2.5 หน้าที่ของโคเอนไซม์คิวเห็นในเซลล์	5
2.6 การเตรียมโคเอนไซม์คิวเห็นด้วยวิธีการกึ่งเคมี	7
2.7 วิธีชีวสังเคราะห์ของโคเอนไซม์คิวเห็น	10
2.8 แมแทบอลิซึมของแหล่งคาร์บอนในแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่ม purple non-sulfur	23
2.9 ผลของการให้ออกซิเจนที่จำกัดต่อการผลิตโคเอนไซม์คิวเห็น โดยสายพันธุ์กลายสีเขียว (green mutant) ของ <i>R. sphaeroides</i>	24
4.1 การเจริญเติบโตของเชื้อ (a) <i>Rhodospseudomonas</i> sp. OS33, (b) <i>Rhodospseudomonas</i> sp. S12, (c) <i>Rhodospseudomonas</i> sp. 13 และ (d) <i>Rhodospseudomonas</i> sp. 14 สองสภาวะ คือ Aerobic-dark และ Aerobic-light โดยที่ () คือ การเจริญเติบโต (OD ₆₆₀) ในสภาวะ Aerobic dark () คือ การเจริญเติบโต (OD ₆₆₀) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อสองสภาวะโดยเลี้ยงที่สภาวะ Aerobic-Dark เป็นเวลา 1 วัน นำมาเลี้ยงต่อที่สภาวะ Aerobic-Light () คือ การเจริญเติบโต (OD ₆₆₀) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อสองสภาวะโดยเลี้ยงที่สภาวะ Aerobic-Dark เป็นเวลา 2 วัน นำมาเลี้ยงต่อที่สภาวะ Aerobic-Light	31
4.2 การเจริญเติบโตของเชื้อ (a) <i>Rhodospseudomonas</i> sp. OS33, (b) <i>Rhodospseudomonas</i> sp. S12, (c) <i>Rhodospseudomonas</i> sp. 13 และ (d) <i>Rhodospseudomonas</i> sp. 14 ภายใต้สภาวะ Photoheterotroph ที่ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเชื้อให้มีความสูง แตกต่างกัน 4 ระดับ โดยที่ () คือ 6 เซนติเมตร, () คือ 8 เซนติเมตร () คือ 10 เซนติเมตร และ () คือ 12 เซนติเมตร	33

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.3 แสดงการเจริญเติบโต (OD660) ในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเชื้อให้มีความสูง 10 เซนติเมตร ภายใต้สภาวะ Anaerobic-light ที่ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ของ <i>Rhodopseudomonas</i> sp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยที่ (✂) คือ <i>Rhodopseudomonas</i> sp. S12, (◆) คือ <i>Rhodopseudomonas</i> sp. 13, (▲) คือ <i>Rhodopseudomonas</i> sp. 14, (■) คือ <i>Rhodopseudomonas</i> sp. OS33	34
4.4 แสดงการเจริญเติบโต (OD660) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารสูง 10 เซนติเมตร ภายใต้สภาวะ Photoheterotroph ที่ความเข้มแสงแตกต่างกัน คือ (▲) คือ ความเข้มแสง 300 ลักซ์, (■) คือ ความเข้มแสง 500 ลักซ์ และ (◆) คือ ความเข้มแสง 1000 ลักซ์	35
4.5 แสดงการเจริญเติบโต โดยที่ (■) คือ OD660 และ (●) คือ ปริมาณแบคทีเรียโคคลอโรฟิลล์ (OD770) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในขวดแบน ภายใต้สภาวะ Photoheterotroph ของทั้ง 4 สายพันธุ์	37
4.6 แสดงการเจริญเติบโตโดยที่ (■) คือ OD660 และ (●) คือ ปริมาณแบคทีเรียโคคลอโรฟิลล์ (OD770) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ ในขวดทรงแบน ภายใต้สภาวะ Anaerobic-light	38
4.7 แสดงปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (g/L) และผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทิน (mg/L) ของเชื้อ <i>Rhodopseudomonas</i> sp. OS33 ซึ่งเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะ (a) Photoheterotroph, (b) Anaerobic-light โดยที่ (■) คือ ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และ (●) คือ ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทิน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	39
4.8 แสดงปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (g/L) และผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทิน (mg/L) ของเชื้อ <i>Rhodopseudomonas</i> sp. S12 ซึ่งเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะ (a) Photoheterotroph, (b) Anaerobic-light โดยที่ (■) คือ ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และ (●) คือ ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทิน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	40

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

4.9 แสดงปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (g/L) และผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทิน (mg/L) ของเชื้อ <i>Rhodopseudomonas</i> sp. S13 ซึ่งเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะ (a) Photoheterotroph, (b) Anaerobic-light โดยที่ (—■—) คือ ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และ (—●—) คือ ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทิน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	41
4.10 แสดงปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (g/L) และผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทิน (mg/L) ของเชื้อ <i>Rhodopseudomonas</i> sp. S14 ซึ่งเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะ (a) Photoheterotroph, (b) Anaerobic-light โดยที่ (—■—) คือ ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และ (—●—) คือ ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทิน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	42
4.11 ผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทินจากการเพาะเลี้ยง <i>Rhodopseudomonas</i> sp. 4 สายพันธุ์ ภายใต้สภาวะ (a) Photoheterotroph และ (b) Anaerobic-light โดยที่ (—■—) คือ <i>Rhodopseudomonas</i> sp. OS33, (—◆—) คือ <i>Rhodopseudomonas</i> sp. S12, (—●—) คือ <i>Rhodopseudomonas</i> sp. 13, (—▲—) คือ <i>Rhodopseudomonas</i> sp. 14	43
4.12 ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Rhodopseudomonas</i> sp. สภาวะ Photoheterotroph ในหลอดทดลอง กำหนดความสูงของปริมาตรอาหารแตกต่างกันดังนี้ 6 เซนติเมตร, 8 เซนติเมตร, 10 เซนติเมตร และ 12 เซนติเมตร ที่ความเข้มแสง 300 ลักซ์ อุณหภูมิ 35-45 องศาเซลเซียส	58
4.13 ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Rhodopseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ OS33 ในขวดทรงแบน ที่ความสูงของปริมาตรอาหาร 10 เซนติเมตร ความเข้มแสง 300 ลักซ์ อุณหภูมิ 35-45 องศาเซลเซียส (a). สภาวะ Anaerobic light (b). สภาวะ Photoheterotroph	59
4.14 ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Rhodopseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ S12 ในขวดทรงแบน ที่ความสูงของปริมาตรอาหาร 10 เซนติเมตร ความเข้มแสง 300 ลักซ์ อุณหภูมิ 35-45 องศาเซลเซียส (a). สภาวะ Anaerobic light (b). สภาวะ Photoheterotroph	60

สารบัญรูป (ต่อ)

- 4.15 ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ 13
 ในขวดทรงแบน ที่ความสูงของปริมาณอาหาร 10 เซนติเมตร
 ความเข้มแสง 300 ลักซ์ อุณหภูมิ 35-45 องศาเซลเซียส
 (a). สภาวะ Anaerobic light (b). สภาวะ Photoheterotroph 61
- 4.16 ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ 14
 ในขวดทรงแบน ที่ความสูงของปริมาณอาหาร 10 เซนติเมตร
 ความเข้มแสง 300 ลักซ์ อุณหภูมิ 35-45 องศาเซลเซียส
 (a). สภาวะ Anaerobic light (b). สภาวะ Photoheterotroph 62



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โคเอนไซม์คิวเท็น (Coenzyme Q10) หรือยูบิควิโนน (Ubiquinone) เป็นองค์ประกอบที่มีหน้าที่สำคัญในการรับส่งอิเล็กตรอนภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทั้งในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ โดยเป็นตัวร่วมในปฏิกิริยาการสร้างพลังงานในไมโทคอนเดรีย ซึ่งมีความจำเป็นต่อการหายใจระดับเซลล์แบบใช้ออกซิเจน (Kawamukai, 2002) นอกจากนี้โคเอนไซม์คิวเท็นยังมีคุณสมบัติเป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันการเกิดสภาวะเครียดออกซิเดชัน อันเป็นสาเหตุของความเสื่อมในระบบอวัยวะต่างๆ ซึ่งมีรายงานว่าปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็น จะลดลงไปตามความเสื่อมและชราภาพของเซลล์ จึงเกิดการศึกษาวิจัยอย่างกว้างขวางเพื่อนำโคเอนไซม์คิวเท็น มาใช้ป้องกันความเสียหายที่เกิดขึ้นต่อเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระ (รัศมี และจารุพงษ์, 2556) โดยมีรายงานทางการแพทย์ว่าการรับประทานโคเอนไซม์คิวเท็นสามารถช่วยส่งเสริมการบำบัดโรคบางชนิดได้ เช่น โรคหัวใจ, โรคเบาหวาน, โรคพาร์กินสัน, โรคอัลไซเมอร์ รวมถึงช่วยลดผลข้างเคียงจากการรับประทานยาในกลุ่มสเตตินได้ (Shults, 2002; Hodgson, 2002; Dhanasekaran และ Ren, 2005; Caso, 2007) นอกจากนี้โคเอนไซม์คิวเท็นยังเป็นที่นิยมใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางอีกด้วย (Hoppe, 1999)

เนื่องจากคุณสมบัติของโคเอนไซม์คิวเท็นที่มีผลดีต่อสุขภาพดังกล่าว จึงทำให้ผู้บริโภคมีความต้องการมากขึ้น ส่งผลให้อุตสาหกรรมด้านเภสัชกรรม และเครื่องสำอางมีการใช้โคเอนไซม์คิวเท็นเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์มากขึ้น โดยมีรายงานว่าในปี ค.ศ. 2015 มูลค่าของโคเอนไซม์คิวเท็นในตลาดโลกสูงถึง 402.4 ล้านดอลลาร์สหรัฐ (USD) และมีแนวโน้มที่สูงขึ้นอีกในปีถัดไป ซึ่งมีการใช้ประโยชน์เพื่อเป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์อาหารเสริมมากที่สุด รองลงมาคือผลิตภัณฑ์เวชสำอางและเครื่องสำอางตามลำดับ (Grand View Research, 2014)

โคเอนไซม์คิวเท็นสามารถผลิตได้โดยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี, วิธีสังเคราะห์กึ่งเคมี หรือวิธีทางชีวภาพโดยการผลิตจากจุลินทรีย์ (Ndikubwimana และ Lee, 2014) ซึ่งในปัจจุบันการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นจากจุลินทรีย์เป็นวิธีที่นิยมใช้ในเชิงพาณิชย์มากที่สุด (Choi และคณะ, 2005b) เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถเลือกใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลายชนิด ในขณะที่วิธีการสังเคราะห์ทางเคมีจำเป็นต้องใช้สารเคมีที่มีความจำเพาะ ราคาแพง และมีขั้นตอนที่ซับซ้อนมากกว่า อีกทั้งการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นจากจุลินทรีย์ ยังมีจุดเด่นหลายประการ ที่สามารถเพิ่มผลผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นให้สูงขึ้นได้ เช่น การปรับปรุงสภาพในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์, การเติมสารบางชนิดเพื่อส่งเสริมการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น, การกลายพันธุ์และการตัดต่อพันธุกรรมของจุลินทรีย์ รวมไปถึงการเพิ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลผลิตด้วยวิธีทางวิศวกรรมเมแทบอลิก (Metabolic Engineering) เป็นต้น (Jeya และคณะ, 2010; Cluis และคณะ, 2012) โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าสามารถผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นได้ในปริมาณสูง เช่น *Agrobacterium tumefaciens*, *Paracoccus denitrificans*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodospirillum rubrum* เป็นต้น (Yoshida และคณะ, 1998; Tian และคณะ, 2010a; Tian และคณะ, 2010b)

แต่สำหรับในโครงการงานพิเศษนี้ จะมุ่งเน้นการศึกษาเพื่อเพิ่มผลผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน *Rhodopseudomonas* sp. เนื่องจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถสะสมโคเอนไซม์คิวเท็นภายในเซลล์ได้สองบริเวณ คือ Mesosome และ Bacteriochlorophyll อีกทั้งยังมีลักษณะทางสรีระวิทยาที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในหลายสภาวะคือเจริญเติบโตแบบ photoheterotroph ภายใต้สภาวะ anaerobic และ microaerobic โดยอาศัยสารประกอบอินทรีย์เป็นแหล่งให้อิเล็กตรอนจากภายนอก นอกจากนี้ภายใต้สภาวะมีอากาศ (aerobic และ microaerobic) ยังสามารถเจริญเติบโตแบบ chemoheterotroph ได้อีกด้วย (Imhoff และ Truper, 1989)

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อปรับปรุงกระบวนการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นจาก *Rhodopseudomonas* sp. ให้ได้ปริมาณเพิ่มมากขึ้น

1.2.2 เพื่อศึกษาการเจริญ และการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นจาก *Rhodopseudomonas* sp. ในสภาวะที่มีออกซิเจนน้อยและมีแสง (Photoheterotroph)

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

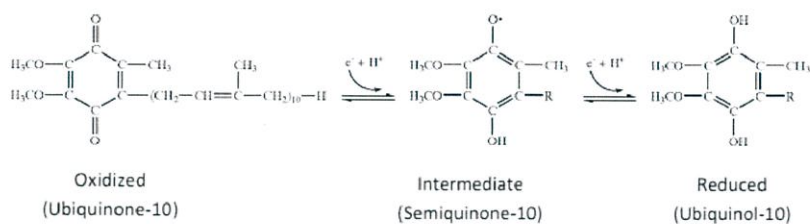
ศึกษาหาวิธีการปรับปรุงกระบวนการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นจาก *Rhodopseudomonas* sp. จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ OS33, S12 และสายพันธุ์กลาย 13, 14 ให้ได้ปริมาณสูงขึ้น โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ 2 สภาวะ ได้แก่ การเลี้ยงเชื้อในสภาวะมีแสง (ไม่มีอากาศ) และไม่มีแสง (มีอากาศ) และเพาะเลี้ยงในสภาวะ Photoheterotroph (มีอากาศจำกัด และมีแสง) แล้ววิเคราะห์ผลการเจริญของเซลล์โดยการวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร, ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง, แบคทีเรียโอสคิลโลโรฟิลล์ และโคเอนไซม์คิวเท็นที่สะสมภายในเซลล์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นจาก *Rhodopseudomonas* sp. ได้ปริมาณสูงขึ้น

1.4.2 ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *Rhodopseudomonas* sp. ให้ได้ปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็นสูงสุด

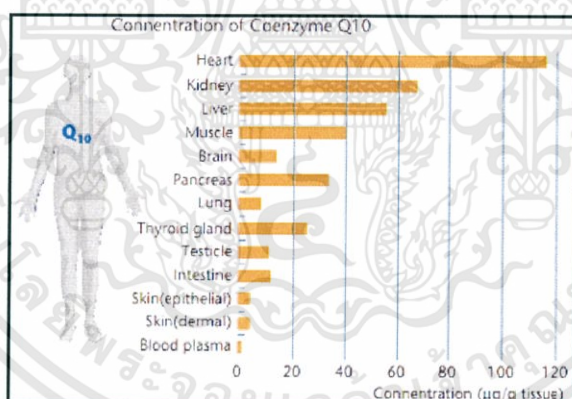
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 การเปลี่ยนรูปออกซิไดซ์ (ubiquinone-10, CoQ₁₀) เป็นรีดิวซ์ (ubiquinol-10, CoQ₁₀H₂) ของโคเอนไซม์คิวเท็น โดยมี semiquinone-10 (CoQ₁₀H[•]) เป็นสารตัวกลาง
ที่มา : West (2004)

2.3 แหล่งและหน้าที่ของโคเอนไซม์คิวเท็น

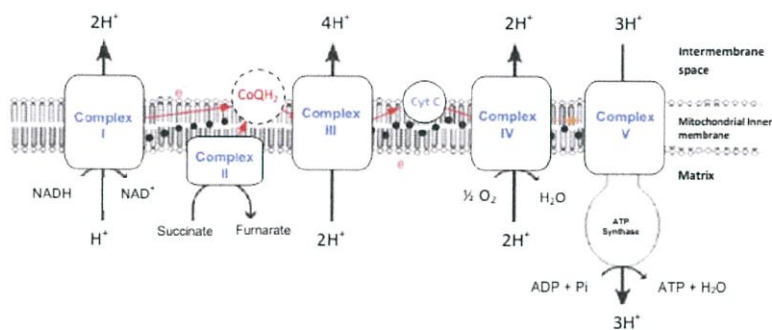
โคเอนไซม์คิวเท็นเป็นส่วนประกอบสำคัญในระบบขนส่งอิเล็กตรอน โดยในเซลล์สัตว์จะพบในบริเวณเยื่อหุ้มชั้นในของ Mitochondria, Endoplasmic Reticulum, Golgi apparatus, lysosomes, peroxisomes และ plasma membrane ส่วนในเซลล์มนุษย์พบโคเอนไซม์คิวเท็นปริมาณมากใน Mitochondria โดยเฉพาะในเซลล์หัวใจ นอกจากนี้ยังพบในอวัยวะอื่นๆ (Littarru และ Lambrechts, 2011) ดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 ปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็นที่พบในอวัยวะส่วนต่างๆ ของมนุษย์
ที่มา : Littarru และ Lambrechts (2011)

ทำหน้าที่รับอิเล็กตรอนจาก NADH และ FADH₂ ในการหายใจแบบใช้ออกาศ มีลำดับการทำงานดังนี้ อิเล็กตรอนจาก NADH และ FADH₂ ถูกส่งผ่านไปยังเอนไซม์คอมเพล็กซ์ I และคอมเพล็กซ์ II ตามลำดับ จากนั้นโคเอนไซม์คิวเท็นในรูปรีดิวซ์เป็นตัวรับอิเล็กตรอน แล้วส่งไปยังเอนไซม์คอมเพล็กซ์ III อิเล็กตรอนถูกส่งต่อไปยังไซโตโครมซีและเอนไซม์ คอมเพล็กซ์ IV และออกซิเจนมารับอิเล็กตรอนเป็นตัวสุดท้าย (รูปที่ 2.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

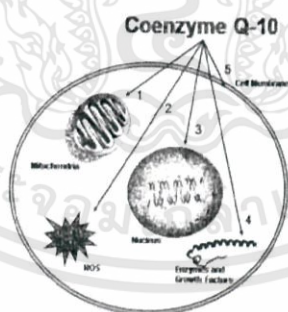


รูปที่ 2.4 การขนส่งอิเล็กตรอนของการหายใจแบบใช้ออกซิเจนและการสร้างพลังงานในสิ่งมีชีวิต
ที่มา : Chew และ Watts (2004)

เมื่อทำหน้าที่รับอิเล็กตรอนแล้ว โคเอนไซม์คิวเทินเปลี่ยนรูปจากรีดิวซ์ไปเป็นออกซิไดซ์
ดังสมการ (Akinterinwa และ Cirino, 2010)



นอกจากนี้โคเอนไซม์คิวเทินยังทำหน้าที่ (ดังรูปที่ 2.5) ช่วยให้กล้ามเนื้อหัวใจทำงานได้ดีขึ้น
และการใช้เพื่อบำบัดโรคหัวใจล้มเหลว (Belardinelli และคณะ, 2006) ซึ่งในปัจจุบัน
โคเอนไซม์คิวเทินได้รับการยอมรับให้ใช้บำบัดโรคหัวใจและหลอดเลือด จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการ
รักษาโรค เช่น โรคหัวใจขาดเลือด โรคหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง และโรคความดันโลหิตสูง (Belardinelli
และคณะ, 2006; Kumar และคณะ, 2009; Fedacko และคณะ, 2011)



รูปที่ 2.5 หน้าที่ของโคเอนไซม์คิวเทินในเซลล์

- 1 = เพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของไมโทคอนเดรียและเพิ่มการผลิต ATP
- 2 = ป้องกันปฏิกิริยาของออกซิเจนและปกป้องเซลล์
- 3 = ป้องกันการเสียหายของดีเอ็นเอและมีผล anti-apoptosis
- 4 = ช่วยเพิ่มเอนไซม์ antioxidant และปรับเปลี่ยน growth factor
- 5 = ยับยั้งปฏิกิริยา peroxidation ของไขมันและปกป้องเยื่อหุ้มเซลล์

ที่มา : Dhanasekaran และ Ren (2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

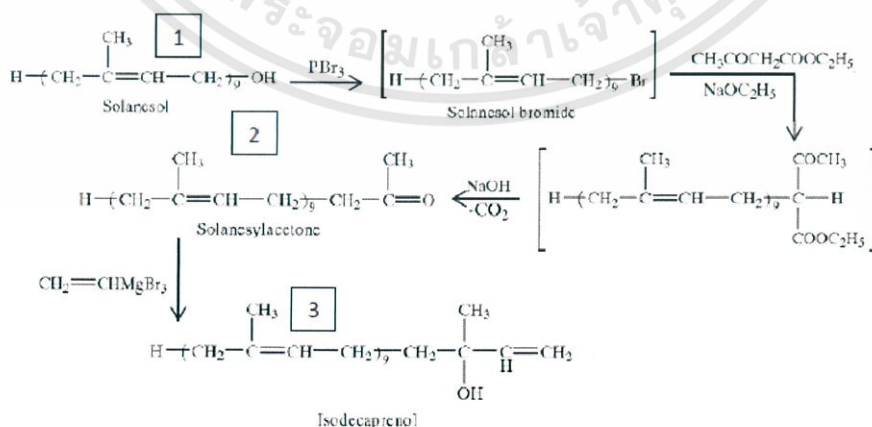
2.4 การสังเคราะห์โคเอนไซม์คิวเท็น

โคเอนไซม์คิวเท็นสามารถสังเคราะห์ได้โดยวิธีการทางเคมี กึ่งเคมี และชีวภาพ มีกรรมวิธีการผลิตโดยสังเขป ดังต่อไปนี้

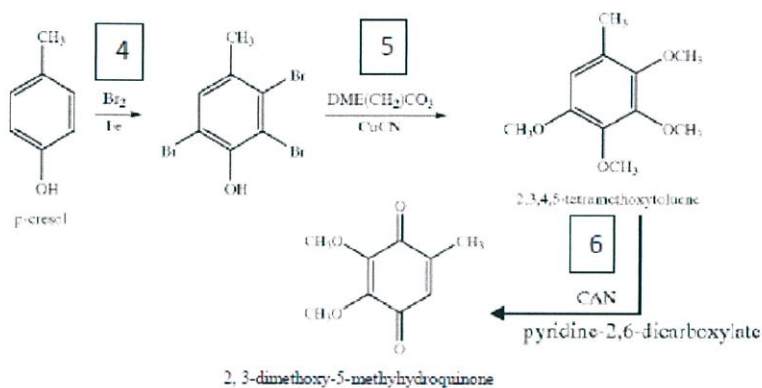
2.4.1 การสังเคราะห์ทางเคมีและกึ่งเคมี

จากสิทธิบัตรของ West (2004) กล่าวว่าเมื่อนำ solanesol (สารประเภทแอลกอฮอล์) ที่สกัดได้จากใบยาสูบหรือใบมันฝรั่ง มาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น ร่วมกับสารสกัดจากพืชในตระกูลมะเขือม่วง (Eggplant) เพื่อที่จะให้เปลี่ยนไปเป็น Decaprenol (Nine-isoprenoid compound) จากนั้นทำปฏิกิริยากับ Hydroquinone จะได้เป็นโคเอนไซม์คิวเท็น จัดว่าเป็นการสังเคราะห์ทางกึ่งเคมี แต่ถ้าใช้ geraniol (สารสกัดจากพืช) เป็นสารเริ่มต้นจัดว่าเป็นการสังเคราะห์ทางเคมี

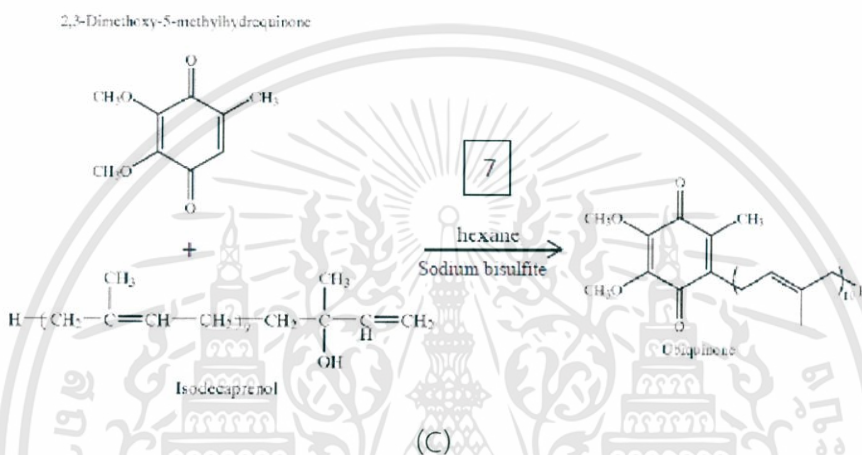
จากเอกสารสิทธิบัตร US 6,686,485 B2 ของ West (2004) การสังเคราะห์โคเอนไซม์คิวเท็น ด้วยวิธีกึ่งเคมี ประกอบด้วย 7 ขั้นตอน เริ่มจากขั้นตอนที่ 1 การสกัด solanesol จากใบยาสูบ ด้วยสารอินทรีย์ ขั้นตอนที่ 2-3 เปลี่ยน solanesol เป็น solanesylacetone และ isodecaprenol ตามลำดับ (รูปที่ 2.6 A) ขั้นตอนที่ 4-6 เปลี่ยน p-cresol เป็น 2,3,6-tribromo-4-methylphenol เป็น 2,3,4,5-tetramethoxytoluene และ 2,3-dimethoxy-5-methylhydroquinone ตามลำดับ (รูปที่ 2.6 B) สุดท้ายขั้นตอนที่ 7 นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ทั้ง isodecaprenol และ 2,3-dimethoxy-5-methylhydroquinone มาทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์ และทำให้เข้มข้นโดยโครมาโตกราฟีบน silica gel (hexane/ether, 10:1) จะได้สารละลายสีเหลืองของยูบิควิโนนเท็น หรือโคเอนไซม์คิวเท็น (รูปที่ 2.6 C)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(B)



(C)

รูปที่ 2.6 การเตรียมโคเอนไซม์คิวเทินด้วยวิธีการกึ่งเคมี

- (A) : การเตรียม Isodecaprenol
 (B) : การเตรียม 2, 3-dimethoxy-5-methylhydroquinone
 (C) : การเตรียม Coenzyme Q10

ที่มา : West (2004)

2.4.2 การสังเคราะห์ทางชีวภาพ

การสังเคราะห์โคเอนไซม์คิวเทิน (รูปที่ 2.7) ประกอบด้วย 3 วิธีดังนี้

(1) Shikimate (2) non-mevalonate (MEP) และ (3) mevalonate (MVA)

ก. การสังเคราะห์ *para*-hydroxybenzoate (pHBA)

pHBA เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์วงแหวน quinonoid และเป็นผลิตภัณฑ์ของวิธี shikimate ใน *Escherichia coli* สาร chorismate เปลี่ยนไปเป็น pHBA โดยการทำงานของเอนไซม์ chorismate pyruvate-lyase ซึ่งมีรหัสในยีน *UbiC* (Nichols และ Green, 1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข. การสังเคราะห์ Decaprenyl diphosphate

จากรูป 2.7 isoprenoid (IPP) สร้างมาจากสองวิธีที่มีความแตกต่างกันคือ วิธี MVA และวิธี MEP การสังเคราะห์ IPP ผ่านวิธี MVA พบในยีสต์, รา และ มนุษย์ (Meganathan, 2001; Jeya และคณะ, 2010) และการสังเคราะห์ IPP ผ่านวิธี MEP พบในแบคทีเรียส่วนใหญ่ สาหร่ายสีเขียว และแบคทีเรียสังเคราะห์แสง (Caillet และ Droogmans 1988; Rohmer และคณะ, 1993; Kato และคณะ, 1999; Meganathan, 2001) แต่ *Streptomyces* ใช้ทั้งสองวิธีในการสังเคราะห์ IPP (Hamano และคณะ, 2002)

วิธี MEP ใช้สารตั้งต้น pyruvate และ glyceraldehyde-3-phosphate (GA3P) สังเคราะห์ IPP การสังเคราะห์สารนี้ใน *E. coli* เริ่มจากการสังเคราะห์ 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate (DXP) ที่เร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ DXP synthase (DXS) จากนั้น DXP ถูกคะตะไลส์ไปเป็น 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP) โดยการทำงานของเอนไซม์ DXP reductoisomerase (DXR) มีรหัสในยีน *ispC (dxc)* จากนั้น MEP ถูกเปลี่ยนไปเป็น IPP โดยการทำงานของเอนไซม์ที่มีรหัสในยีน *ispD (ygbP), ispE (ychB), ispF (ygbB), ispG (gcpE)* และ *ispH (lytB)* ใน *E. coli* IPP เปลี่ยนไปเป็น Dimethylallyl diphosphate (DMAPP) โดยเอนไซม์ IPP isomerase ที่มีรหัสในยีน *idi* จากนั้นทั้ง IPP และ DMAPP ถูกเปลี่ยนเป็น farnesyl diphosphate (FPP) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับสังเคราะห์ Decaprenyl-PP

การสังเคราะห์ IPP โดยวิธี MVA เริ่มต้นด้วยการเปลี่ยน 3 โมเลกุลของ acetyl-CoA ไปเป็น mevalonate (MVA) โดยผ่านตัวกลาง acetoacetyl-CoA และ HMG-CoA ตามลำดับ (Maury และคณะ, 2005) MVA จะถูกเปลี่ยนเป็น MVA-diphosphate โดยการเติมหมู่ฟอสเฟต และมีเอนไซม์ MVA kinase และ phospho-MVA kinase เร่งปฏิกิริยาตามลำดับ MVA-diphosphate ผ่านปฏิกิริยา dehydration-decarboxylation จนได้ IPP เป็นผลผลิต จากนั้น IPP เปลี่ยนไปเป็น DMAPP โดยเอนไซม์ IPP isomerase

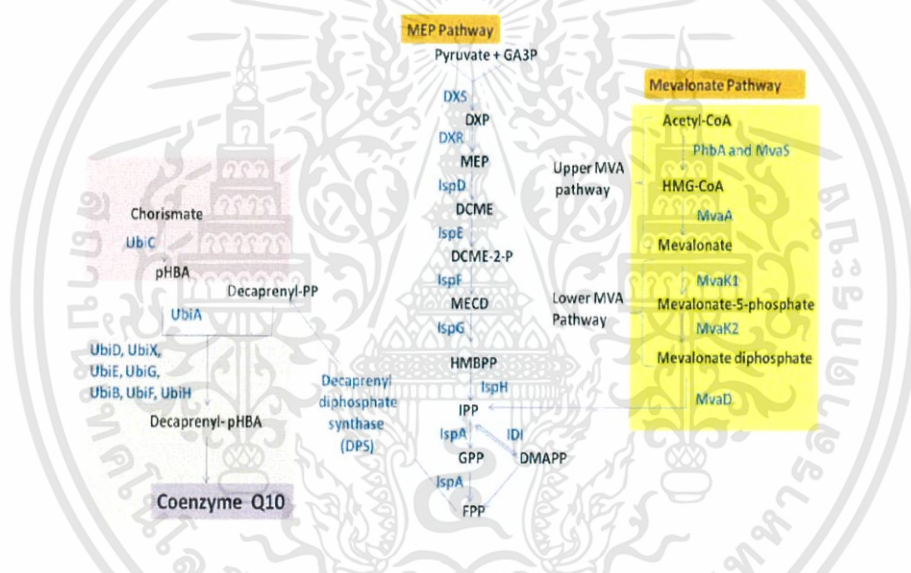
IPP จัดเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญของการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น สารนี้ถูกเปลี่ยนเป็น FPP โดยการเร่งด้วยเอนไซม์ FPP synthase จากนั้นเอนไซม์ DPS เปลี่ยน FPP ไปเป็น decaprenyl diphosphate (Jeya และคณะ, 2010)

ค. การดัดแปลงโครงสร้าง cyclic (Ring modification)

Meganathan (2001) อธิบายกระบวนการ ring modification (การดัดแปลงโครงสร้าง cyclic) ในเชื้อ *E. coli* ว่าปฏิกิริยา prenylation เริ่มจาก *pHBA* เปลี่ยนไปเป็น 3-octaprenyl *pHBA* โดยการทำงานของเอนไซม์ *pHBA* octaprenyltransferase จากนั้นเอนไซม์ที่ไม่จำเพาะเจาะจงสามารถนำ prenyl diphosphate มาเชื่อมกับ 3-octaprenyl *pHBA* ได้ จากนั้นเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผ่านปฏิกิริยา decarboxylation โดย 3-octaprenyl pHBA เปลี่ยนเป็น 2-octaprenylphenol โดยการทำงานของเอนไซม์ 3-octaprenyl pHBA decarboxylase และ 2-octaprenylphenol ผ่านปฏิกิริยา hydroxylations 3 ครั้ง สลับกับปฏิกิริยา methylation 3 ครั้ง ที่ทำให้ได้โคเอนไซม์คิวเท็น

Meganathan (2001) อธิบายกระบวนการ ring modification (ดัดแปลงโครงสร้าง cyclic) ในยีสต์ว่าโซ่ยาวของ IPP (hexaprenyl diphosphate) ผ่านการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ prenyl transferase ทำให้ hexaprenyl diphosphate มาเชื่อมกับ pHBA ได้เป็น 3-hexaprenyl pHBA จากนั้นผ่านปฏิกิริยา ring modification ซึ่งมีลำดับที่แตกต่างกับใน *E. coli* โดย 3-hexaprenyl pHBA ผ่านปฏิกิริยา hydroxylation, methylation และ decarboxylation ตามลำดับ จนได้ 2-polyprenyl-6-methoxyphenol และเอนไซม์ O-methylase เปลี่ยน 2-polyphenyl-3-methyl-5-hydroxy-6-methoxy-1,4-benzoquinol ไปเป็นโคเอนไซม์คิวเท็น



รูปที่ 2.7 วิธีชีวสังเคราะห์ของโคเอนไซม์คิวเท็น

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

ที่มา : Jeya และคณะ (2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 การผลิตโคเอนไซม์คิวเทินจากแบคทีเรีย

การผลิตโคเอนไซม์คิวเทินจากแบคทีเรีย เป็นการสังเคราะห์ทางชีวภาพซึ่งมีข้อได้เปรียบกว่าการสังเคราะห์ด้วยวิธีการทางเคมี และกึ่งเคมี เนื่องจากสามารถใช้วัตถุดิบได้หลากหลายชนิดและเลือกใช้วัตถุดิบราคาถูกได้ แบคทีเรียที่ถูกนำมาใช้ผลิตโคเอนไซม์คิวเทินมีหลายสายพันธุ์ดังแสดงในตารางที่ 2.1 โดยสายพันธุ์ที่มีรายงานว่าผลิตโคเอนไซม์คิวเทินได้ปริมาณสูง ได้แก่ *Agrobacterium tumefaciens*, *Paracoccus denitrificans*, *Rhodobacter sphaeroides* และ *Rhodospirillum rubrum* (Yoshida และคณะ, 1998; Tian และคณะ, 2010a) ซึ่งให้ผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทินตั้งแต่ 30-130 มิลลิกรัมต่อลิตร (Yoshida และคณะ, 1998; Cluis และคณะ, 2007) แต่ในการผลิตเชิงพาณิชย์ต้องการผลผลิตสูงกว่า 500 มิลลิกรัมต่อลิตร (Cluis และคณะ, 2007) ดังนั้นจึงมีการอาศัยเทคนิคต่างๆ มาใช้เพื่อให้ผลผลิตสูงขึ้น เช่น การปรับสภาวะการเพาะเลี้ยง การกลายพันธุ์จุลินทรีย์ การสร้างจุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรม และการเพิ่มผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทินด้วยวิธีการทางวิศวกรรมกระบวนการสร้างและการสลาย (Yoshida และคณะ, 1998; Lee และคณะ, 2004; Park และคณะ, 2005; Sasaki และคณะ, 2005; Zahiria และคณะ, 2006; Cluis และคณะ, 2007; Choi และคณะ, 2009; Seo and Kim, 2010)

ตารางที่ 2.1 แสดงผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทินจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ

Source	CoQ10 level (mg/l)	Specific CoQ10 content (mg/g DCW)	Type of strain	Referance
1. phototrophic bacteria				
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> FERM-P4675	97.20	2.70	Wild type	Choi และคณะ, 2005b
<i>Rhodospirillum rubrum</i> ATCC 25852	20.16	-	Wild type	Tian และคณะ, 2010b
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	350.00	8.70	Chemical mutants	Jeya และคณะ, 2010
<i>Rhodopseudomonas spheroides</i> KY8598	770.00	8.70	Chemical mutants	Choi และคณะ, 2005b
<i>Rhodobacter spheroides</i> Co-22-11 car ⁻	346.80	2.60		Cluis และคณะ, 2007
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> Co-22-11	347.00	2.50	Chemical mutants	Choi และคณะ, 2005b
2. bacteria				
<i>Pseudomonas</i> N84	2.02	1.20	Wild type	Jeya และคณะ, 2010
<i>Protaminobacter ruber</i>	2.84	1.52	Wild type	Jeya และคณะ, 2010
<i>Escherichia coli</i> BL21/pACDdsA	25.50	0.29	Recombinant strain	Choi และคณะ, 2005b
<i>Paracoccus denitrificans</i> ATCC 19367	27.60	0.86	Wild type	Choi และคณะ, 2005b
<i>Pseudomonas diminuta</i> NCIM 2865	29.22	-	Wild type	Bule และ Singhal, 2009
<i>Spingomonas</i> sp. ZUTE03	441.65	-	Wild type	Qiu และคณะ, 2012

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) แสดงผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทินจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ

Source	CoQ10 level (mg/l)	Specific CoQ10 content (mg/g DCW)	Type of strain	Referance
2. bacteria				
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ATTC4452	87.60	1.90	Wild type	Jeya และคณะ, 2010
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> AU-55	110.00	9.60	Chemical mutants	Choi และคณะ, 2005b
<i>Agrobacterium</i> sp.	180.00	1.96	Chemical mutants	Jeya และคณะ, 2010
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> KCCM 10413	458.00	8.54	Chemical mutants	Cluis และคณะ, 2007
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> KCCM 10413	638.00	9.71	Chemical mutants	Jeya และคณะ, 2010

ที่มา : ดัดแปลงจาก Ndikubwimana และ Lee (2014)

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงเพื่อการผลิตโคเอนไซม์คิวเทิน

2.6.1 แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน

Koo และคณะ (2010) ได้ศึกษาอิทธิพลของชนิดแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตโคเอนไซม์คิวเทินในสายพันธุ์กลายของ *Rhodobacter radiobacter* พบว่าซูโครส, กลูโคส และฟรักโทส มีผลทำให้ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับไซโลส, แล็กโตส และกาแล็กโตส ซึ่งขัดแย้งกับรายงานอื่นที่กล่าวว่าแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ไม่มีผลต่อปริมาณผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทิน (Ha และคณะ, 2007b)

ส่วนแหล่งไนโตรเจน มีรายงานว่าการใช้ corn steep powder และ soytone ให้ปริมาณผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทินจำเพาะสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ เช่น ยีสต์สกัด, meat extract และทรีปโตน (Ha และคณะ 2007b; Koo และคณะ, 2010) ทั้งนี้มีประเด็นที่น่าสนใจว่าทั้งแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน มีความสัมพันธ์กันในเชิงบวกกับอัตราส่วนของ NADH/NAD⁺ ซึ่งส่งผลต่อปริมาณผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทิน (Koo และคณะ, 2010)

2.6.2 ปริมาณออกซิเจนละลาย

แม้ว่าจะยังมีความขัดแย้งกันอยู่ในประเด็นนี้ (Wu และคณะ, 2003) แต่ก็พบว่ามีการศึกษาหลายฉบับแสดงให้เห็นว่า การผลิตโคเอนไซม์คิวเทินมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนน้อยทั้งใน *Rhodobacter radiobacter* และ *Rhodobacter sphaeroides* (Choi และคณะ, 2005a; Ha และคณะ, 2007b; Yen และ Chiu 2007; Yen และ Shih 2009; Seo และ Kim 2010) ยกตัวอย่างเช่น ผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทินจากสายพันธุ์กลายของ *R. radiobacter* เพิ่มขึ้นถึง 4 เท่า เมื่อลดปริมาณออกซิเจนละลายลงจาก 20 เปอร์เซ็นต์ เหลือเพียง 5 เปอร์เซ็นต์ (Choi และคณะ, 2005a)

2.6.3 การเพิ่มปริมาณแคลเซียมในอาหารเลี้ยงเชื้อ

การปรับปรุงผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทินจาก *Rhodobacter radiobacter* โดยการเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการเพิ่มขึ้นความเข้มข้นของ Ca⁺ เป็นสาเหตุหนึ่งให้เซลล์เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน, เกิดปฏิกิริยา peroxidation ของไขมัน และทำให้เกิดการสร้างสารอนุมูลอิสระชนิด reactive oxygen species (Ha และคณะ, 2009) เนื่องจากโคเอนไซม์คิวเทินมีคุณสมบัติเป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระ จึงอาจเป็นไปได้ว่าการเพิ่มขึ้นของผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทินเป็นการตอบสนองตามธรรมชาติที่มีต่อความเครียดออกซิเดชัน โดยมีรายงานว่าสนับสนุนสมมติฐานนี้ว่าการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงในอาหารที่เพาะเลี้ยง *Rhodobacter radiobacter* เพื่อให้เซลล์เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน ส่งผลให้การผลิตโคเอนไซม์คิวเทินเพิ่มขึ้น (Seo และ Kim 2010)

2.6.4 กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง

นอกจากการสร้างพลังงานโดยการหายใจแบบใช้อากาศ Facultative photoautotrophs อย่างเช่น *Rhodobacter sphaeroides* สามารถใช้โคเอนไซม์คิวเท็นขนส่งอิเล็กตรอนจาก reaction center ไปสู่ cytochrome bc_1 complex ภายใน photosynthetic apparatus (Vermeglio และ Joliot, 1999) โดยมีรายงานว่า การเจริญของ *R. sphaeroides* ภายใต้สภาวะ anaerobic-light สามารถเพิ่มปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็นจำเพาะได้สูงถึง 4 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ การเจริญภายใต้ สภาวะ aerobic-dark อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะ anaerobic-light ส่งผลให้เซลล์ เติบโตได้ช้า ทำให้มีอัตราการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นต่ำ ดังนั้นจึงไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้แข่งขันใน อุตสาหกรรม จากรายงานนี้จึงแนะนำให้เพาะเลี้ยงในสภาวะ aerobic-dark ที่มีการควบคุมออกซิเจน ละลาย 0 เปอร์เซ็นต์ (Yen และ Chiu, 2007)

2.6.5 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

Jeong และคณะ (2008) ได้ศึกษาผลของค่าพีเอชต่อการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น โดยการ เพาะเลี้ยง *Rhodobacter sphaeroides* พบว่าเมื่อไม่ควบคุมค่าพีเอช ได้ผลผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น สูงสุด 1.69 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่เมื่อควบคุมค่าพีเอชให้เท่ากับ 7 พบว่าได้ปริมาณ โคเอนไซม์คิวเท็นสูงขึ้นถึง 1.7 เท่า ดังนั้นค่าพีเอชจึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลโดยตรงต่อการผลิต โคเอนไซม์คิวเท็น

นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาอื่นๆ เกี่ยวกับการหาสภาวะที่เหมาะสม ในการเพาะเลี้ยง แบคทีเรียสังเคราะห์แสงเพื่อการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 แสดงผลผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสง และสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง

Organism	CoQ10 production (mg/L)	Specific CoQ10 content (mg/g DCW)	Optimized culture conditions	Study
<i>R. radiobacter</i> ATTC4452	87.6	1.9	Not applicable	Yoshida และคณะ (1998)
<i>R. radiobacter</i> ATTC4452	32.1	1.91	Maximal DO of 40% (of air saturation)	Wu และคณะ (2003)
<i>R. radiobacter</i> ATCC4452	Not reported	5.3	Decreased DO, azide (electron flux inhibitor) treatment	Choi และคณะ (2005a)
<i>R. radiobacter</i> KCCM 10413	458	8.54	Fed-batch with sucrose as carbon source, pH 7.0 and 0–10% DO	Ha และคณะ (2007b)
<i>R. radiobacter</i> KCCM 10413	638	9.71	Decreased sucrose feeding to 10% w/v, led to less byproducts/osmotic stress	Ha และคณะ (2007a)
<i>R. radiobacter</i> KCCM 10413	763.7	11.84	CaCl ₂ supplementation	Ha และคณะ (2009)
<i>R. radiobacter</i> T6102	14.6	1.95	Decreased DO; H ₂ O ₂ and azide treatment	Seo และ Kim (2010)
<i>R. radiobacter</i> A603-35-gapA	Not reported	5.27	Increased NADH/NAD ⁺ ratio	Koo และคณะ (2010)
<i>R. sphaeroides</i> KY 8598	770	Not reported	Controlled agitation speed and oxygen supply	Sakato และคณะ (1992)
<i>R. sphaeroides</i> KY 4113	350	8.7	Decreased aeration	Yoshida และคณะ (1998)
<i>R. sphaeroides</i> BCRC13100	10.5	8	0% DO and cultivation without light	Yen และ Chiu (2007)
<i>R. sphaeroides</i> BCRC13100	45.65	4.4	Use of airlift bioreactor for low aeration	Yen และ Shih (2009)
<i>R. sphaeroides</i> BCRC13100	83.8	4.5	Fed-batch system with molasses at 1% w/v	Yen และคณะ (2010)
<i>S. johnsonii</i>	Not reported	10.5	Post log growth phase addition of PHB	Dixson และคณะ (2011)

2.7 การประยุกต์ใช้โคเอนไซม์คิวเท็นในทางการแพทย์

เนื่องจากโคเอนไซม์คิวเท็น มีหน้าที่ที่หลากหลายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต จึงมีการศึกษาเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการป้องกัน รักษา และบรรเทาพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นจากโรคในระบบต่างๆ ดังนี้

2.7.1 บทบาทของโคเอนไซม์คิวเท็นที่มีต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด

โคเอนไซม์คิวเท็น สามารถป้องกันความเสียหายของกล้ามเนื้อหัวใจระหว่างการผ่าตัด โดยในอดีตมีการทดลองให้โคเอนไซม์คิวเท็นกับผู้ป่วยก่อนผ่าตัด และพบว่าการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจหลังผ่าตัดฟื้นฟูกำคืนได้ดีขึ้น และลดความเสียหายที่เกิดขึ้นกับกล้ามเนื้อหัวใจ (Quinzii และคณะ, 2007) นอกจากนี้ยังพบว่า การให้โคเอนไซม์คิวเท็น ร่วมกับกระบวนการฟื้นคืนชีพผู้ป่วย (cardiopulmonary resuscitation: CPR) จะทำให้ผู้ป่วยมีการฟื้นฟูก่อนการผ่าตัดได้ดีขึ้น (Belardinelli และคณะ, 2005) โดยมีการตั้งสมมติฐานว่า โคเอนไซม์คิวเท็นจะลดความรุนแรงของการบาดเจ็บจากการขาดเลือดแล้วได้เลือดกลับมาเลี้ยง (reperfusion injury) ของเนื้อเยื่อประสาท อันเป็นสาเหตุทำให้เซลล์ประสาทบาดเจ็บและตายจากภาวะเครียดออกซิเดชัน ซึ่งป้องกันได้ด้วยบทบาทการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโคเอนไซม์คิวเท็น นอกจากนี้โคเอนไซม์คิวเท็นยังมีบทบาทต่อการทำงานของหลอดเลือด โดยมีผลต่อการทำหน้าที่ของเซลล์เยื่อหลอดเลือด (endothelial cell) โดยปริมาณโคเอนไซม์ คิวเท็น ในเลือดที่สูงจะไปช่วยรักษาระดับของไนตริกออกไซด์ (NO) ซึ่งทำหน้าที่ขยายหลอดเลือด โดยป้องกันการทำปฏิกิริยาระหว่างไนตริกออกไซด์และซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-) และพบว่าโคเอนไซม์คิวเท็น อาจเกี่ยวข้องกับการเพิ่มระดับเอ็นไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) ซึ่งใช้ในการกำจัดอนุมูลอิสระของออกซิเจนที่อยู่ในรูปของซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนได้ (Quinzii และคณะ, 2007; Silver และคณะ, 2004)

2.7.2 บทบาทของโคเอนไซม์คิวเท็นเมื่อรับประทานร่วมกับยาลดโคเลสเตอรอล

เนื่องจากโคเอนไซม์คิวเท็นและโคเลสเตอรอลมีวิถีชีวสังเคราะห์ร่วมกัน ดังนั้นการให้ยายับยั้งการสังเคราะห์โคเลสเตอรอล ในกลุ่มยาสเตติน (statin) จึงมีผลต่อการลดระดับของโคเอนไซม์คิวเท็นในซีรัมของผู้ป่วยด้วย และคาดว่าอาการข้างเคียงจากการใช้ยาสเตติน เช่น การปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ อาจมาจากผลของการลดระดับโคเอนไซม์คิวเท็น แม้ประเด็นผลข้างเคียงของยาสเตตินกับการลดระดับของโคเอนไซม์คิวเท็น ยังคงเป็นประเด็นที่ถกเถียงกันอยู่ (Belardinelli และคณะ, 2005) แต่การรับประทานโคเอนไซม์คิวเท็น ร่วมกับการใช้ยาสเตตินพบว่า จะช่วยลดภาวะเครียดออกซิเดชัน ลดอัตราส่วนระหว่างโคเลสเตอรอล และไขมันดี (HDL: High Density Lipoprotein) รวมถึงช่วยรักษาระดับไนตริกออกไซด์ในเลือดของผู้ป่วย ซึ่งจะส่งผลดีต่อระบบหัวใจรวมหลอดเลือดได้ (Chew และ Watts, 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.3 บทบาทในการป้องกันความเสื่อมของระบบประสาท

โคเอนไซม์คิวเทินมีบทบาทในการป้องกันความเสื่อมของระบบประสาท อันเนื่องมาจากภาวะเครียดออกซิเดชัน โดยพบว่าโรคความเสื่อมของระบบประสาท (neurodegenerative disease) มีความสัมพันธ์กับภาวะเครียดออกซิเดชันของเซลล์ประสาท และความเสียหายต่อไมโทคอนเดรียอันนำไปสู่การตายของเซลล์ประสาท เช่น มีรายงานว่าสาเหตุของโรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) นั้นสัมพันธ์กับความเสียหายจากภาวะเครียดออกซิเดชัน ร่วมกับการสูญเสียหน้าที่ของไมโทคอนเดรีย ซึ่งการให้โคเอนไซม์คิวเทินเข้าไปจะช่วยในการป้องกันความเสียหายที่จะเกิดขึ้น รวมทั้งการป้องกันความเสียหายต่อไมโทคอนเดรียเพื่อป้องกันการปลดปล่อยสารที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ (Chapidze และคณะ, 2005)

2.7.4 บทบาทในการบำรุงผิวหนัง

ผิวหนังเป็นบริเวณที่ได้รับผลกระทบจากรังสีอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet: UV) จากการสัมผัสกับแสงแดดโดยตรง โดยรังสีดังกล่าวสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระในชั้นผิวหนัง ก่อให้เกิดการชราภาพและการตายของเซลล์ผิวหนัง ดังนั้นโคเอนไซม์คิวเทิน จึงใช้คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันความเสียหายที่อาจจะเกิดขึ้นกับระบบผิวหนังจากการสัมผัสกับรังสีอัลตราไวโอเล็ตได้ (Beal, 2004)

2.8 แบคทีเรียสังเคราะห์แสง

แบคทีเรียสังเคราะห์แสง (anoxygenic phototrophic bacteria) สามารถใช้พลังงานแสงและสารประกอบอินทรีย์ในการเจริญเติบโตโดยไม่มีออกซิเจน มีรูปร่าง spherical, spiral, rod หรือ vibrioid เป็นแบคทีเรียแกรมลบ สามารถผลิตสารสี แบคทีเรียโอคโลโรฟิลล์ และคาร์ทีนอยด์ได้ เจริญเติบโตแบบ photoautotroph หรือ photoorganotroph ภายใต้สภาวะ anaerobic และ microaerobic โดยอาศัยแหล่งให้อิเล็กตรอนจากภายนอก เช่น สารประกอบซัลเฟอร์, ไฮโดรเจน หรือสารประกอบอินทรีย์ แต่อย่างไรก็ตามภายใต้สภาวะมีอากาศ (aerobic และ microaerobic) สามารถเติบโตแบบ chemoautotroph หรือ chemoorganotroph โดย Imhoff และ Trüper (1989) ได้จำแนกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงออกเป็น 7 กลุ่มย่อย (ตารางที่ 2.3) ดังนี้

2.8.1 กลุ่มย่อยที่ 1: Purple sulfur bacteria: สะสมก้อนซัลเฟอร์ภายในเซลล์

แบคทีเรียในกลุ่มย่อยนี้สามารถตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ได้ในสภาวะที่มีแสง โดยใช้ซัลไฟด์และซัลเฟอร์เป็นแหล่งให้อิเล็กตรอน แกรนูลซัลเฟอร์สะสมภายในเซลล์ และซัลไฟด์ถูกออกซิไดซ์ไปเป็นซัลเฟต มีแบคทีเรียโอคโลโรฟิลล์ *a* หรือ *b* และคาร์ทีนอยด์กลุ่ม 1-4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่อยู่ในกลุ่มย่อยนี้ คือ *Amoebobacter*, *Chromatium*, *Lamprobacter*, *Lamprocystis*, *Thiocapsa*, *Thiocystis*, *Thiodictyon*, *Thiopedia* และ *Thiospirillum*

2.8.2 กลุ่มย่อยที่ 2: Purple sulfur bacteria: สะสมก้อนซัลเฟอร์ภายนอกเซลล์

แบคทีเรียในกลุ่มย่อยนี้สามารถตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ได้ในสภาวะที่มีแสง โดยใช้ซัลไฟด์และซัลเฟอร์ เป็นแหล่งให้อิเล็กตรอนเช่นเดียวกับกลุ่มย่อยที่ 1 แต่พบแกรนูลซัลเฟอร์สะสมภายนอกเซลล์และซัลไฟด์ถูกออกซิไดซ์ไปเป็นซัลเฟต มีแบคทีเรียโอคโลโรฟิลล์ *a* หรือ *b* และคาโรทีนอยด์กลุ่ม 1 แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่อยู่ในกลุ่มย่อยนี้ คือ *Ectothiorhodospira*

2.8.3 กลุ่มย่อยที่ 3: Purple non-sulfur bacteria

แบคทีเรียในกลุ่มย่อยนี้ไม่สามารถใช้ซัลไฟด์ และไทโอซัลเฟตเป็นแหล่งให้อิเล็กตรอนได้ และตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ได้ สามารถเจริญเติบโตแบบ Chemoheterotroph ภายใต้สภาวะที่มีอากาศน้อยหรือมีอากาศ ส่วนใหญ่ต้องการไบโอติน ไทอะมีน และไนอะซินในการเจริญเติบโต

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่อยู่ในกลุ่มย่อยนี้ คือ *Rhodobacter*, *Rhodocyclus*, *Rhodomicrobium*, *Rhodopila*, *Rhodopseudomonas* และ *Rhodospirillum*

2.8.4 กลุ่มย่อยที่ 4: แบคทีเรียที่มีแบคทีเรียโอคโลโรฟิลล์ชนิด *g* และเจริญแบบ Phototroph

แบคทีเรียในกลุ่มย่อยนี้สามารถเติบโตภายใต้สภาวะ Photoheterotroph ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งให้อิเล็กตรอนและแหล่งคาร์บอนได้ แต่ไม่สามารถใช้สารประกอบซัลเฟอร์ได้ ใช้แอมโมเนียและ dinitrogen เป็นแหล่งไนโตรเจนวิตามินเป็นสารที่จำเป็นในการเจริญ มีแบคทีเรียโอคโลโรฟิลล์ชนิด *g* และคาโรทีนอยด์ชนิด neuroporene ผนังเซลล์ไม่มี lipopolysaccharide

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่อยู่ในกลุ่มย่อยนี้ คือ *Heliobacillus* และ *Heliobacterium*

2.8.5 กลุ่มย่อยที่ 5: Green sulfur bacteria

แบคทีเรียในกลุ่มย่อยนี้สามารถเติบโตแบบ Photoautotroph และ Photoheterotroph มีแกรนูลของซัลเฟอร์สะสมภายนอกเซลล์ มีแบคทีเรียโอคโลโรฟิลล์ *c*, *d* และ *e* โคโลนีมีสีเขียว หรือสีน้ำตาล

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่อยู่ในกลุ่มนี้ คือ *Ancalochloris*, *Chlorobium*, *Chloroherpeton*, *Pelodictyon* และ *Prosthecochloris*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.6 กลุ่มย่อยที่ 6: Green sulfur bacteria ชนิดที่เป็นเส้นสาย (Multicellular filamentous green bacteria)

แบคทีเรียในกลุ่มย่อยนี้มี Multicellular filament และเคลื่อนไหวโดยการเลื่อนไปมา เซลล์เจริญเติบโตได้ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ และใช้สารอินทรีย์ ในกระบวนการเผาผลาญภายใต้สภาวะ phototroph หรือ chemotroph มีแบคทีเรียโคลอโรฟิลล์ *a* และ *b* และคาร์บอนอยด์ กลุ่ม 1-4

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่อยู่ในกลุ่มย่อยนี้ คือ *Chloroflexus*, *Chloronema*, *Heliobacterium* และ *Oscillochloris*

2.8.7 กลุ่มย่อยที่ 7: แบคทีเรียที่เจริญในสภาพ Chemoheterotroph แบบใช้อากาศ และมีแบคทีเรียโคลอโรฟิลล์ (Aerobic chemotropic bacteria with bacteriochlorophyll)

แบคทีเรียในกลุ่มย่อยนี้มีการเจริญแบบ Chemoheterotroph ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ ไม่สามารถเจริญภายใต้สภาวะไม่มีอากาศและมีแสงได้ มีแบคทีเรียโคลอโรฟิลล์ *a* และคาร์บอนอยด์ กลุ่ม 1-4 ไม่สามารถใช้สารประกอบซัลเฟอร์ได้

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่อยู่ในกลุ่มย่อยนี้ คือ *Erythrobacter*

ตารางที่ 2.3 การเปรียบเทียบลักษณะของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในกลุ่มย่อยที่ 1-7

Characteristics	Subgroup 1	Subgroup 2	Subgroup 3	Subgroup 4	Subgroup 5	Subgroup 6	Subgroup 7
Cell arrangement	Singly or in aggregates	Singly or in aggregates	Singly or in aggregates	Singly or in aggregates	Singly or in aggregates	Singly or in aggregates	Singly or in aggregates
Motility							
- Flagella	+ or -	+	+ or -	+ or -	-	-	+
- Gliding	-	-	-	+ or -	+ or -	+	-
Major absorption maxima in vivo	790-1030 nm	790-1030 nm	790-1030 nm	780-790 nm	700-755 nm	700-755 nm	790-1030 nm
Main bacteriochlorophylls	<i>Bchl a</i> or <i>b</i>	<i>Bchl a</i> or <i>b</i>	<i>Bchl a</i> or <i>b</i>	<i>Bchl g</i>	<i>Bchl c, d, or e</i>	<i>Bchl c, d, or e</i>	<i>Bchl a</i> or <i>b</i>
Carotenoids group	Group 1-4	Group 1-4	Group 1-4	Group 1-4	Group 5	Group 5	Group 1-4
Special photosynthetic structure	Internal membrane	Internal membrane	Internal membrane	Internal membrane	Chlorosomes	Chlorosomes	ND
Sulfur globules occur	Inside the cells	Outside the cells	Outside the cells or not	-	Outside the cells	Outside the cells or not	-
Sulfide oxidized to	Sulfate	Sulfur	Sulfate, sulfur or not oxidized	-	Sulfate	Sulfur or not oxidized	-
Phototrophic growth	Anaerobic	Anaerobic	Anaerobic	Anaerobic	Anaerobic	-	-
Chemotrophic growth	Microaerobic and aerobic	Microaerobic and aerobic	Microaerobic and aerobic	-	-	Microaerobic and aerobic	Microaerobic and aerobic

ตัวย่อ Bchl = Bacteriochlorophyll, ND = Not determined

ที่มา : Holt และคณะ (1994)

2.9 การสังเคราะห์ด้วยแสงในแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

การสังเคราะห์ด้วยแสงในแบคทีเรียสังเคราะห์แสง จะแตกต่างกับที่เกิดขึ้นในพืชและสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Staley, 1989) กล่าวคือในพืชและสาหร่ายจะใช้ระบบแสง (photosystem) 2 ระบบ และมีการสร้างออกซิเจน (oxygenic photosynthesis) ซึ่งเกิดขึ้นจากการใช้น้ำเป็นตัวให้อิเล็กตรอน โดยอิเล็กตรอนเหล่านี้จะรีดิวซ์ NADP^+ ไปเป็น NADPH ส่วนการสังเคราะห์แสงในแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจะใช้ระบบแสงเพียงระบบเดียว และไม่มีการสร้างออกซิเจน (anoxygenic photosynthesis) เนื่องจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจะใช้แก๊สไฮโดรเจน สารประกอบซัลเฟอร์ในรูปรีดิวซ์ หรือสารประกอบอินทรีย์ เช่น มาเลท อะซีเตท ไพรูเวท เป็นตัวให้อิเล็กตรอนแทนน้ำ (Atlas, 1995) โดยมีรงควัตถุเป็นแคเทอรีโอคลอโรฟิลล์หลายชนิด ซึ่งมีการดูดกลืนแสงได้แตกต่างกัน เมื่อแคเทอรีโอคลอโรฟิลล์ถูกกระตุ้นด้วยแสงจะทำให้เกิดการปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมา และถูกส่งไปยังตัวรับอิเล็กตรอนต่างๆ ได้แก่ unidentified electron acceptor, ubiquinone, cytochrome b_{50} และ cytochrome C_2 ตามลำดับ ในขั้นตอนของการขนส่งอิเล็กตรอนจาก cytochrome b_{50} ไปสู่ cytochrome C_2 จะเกิดการสังเคราะห์ ATP ขึ้นแบบเป็นวัฏจักร (Brock และ Madigan, 1991)

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงในกลุ่ม purple non-sulfur เป็นแบคทีเรียซึ่งได้รับพลังงานสำหรับการเจริญจากแสง โดยการเปลี่ยนพลังงานจากแสงให้เป็นพลังงานเคมีเก็บไว้ในรูปของ ATP โดยกระบวนการ photophosphorylation ระบบการสังเคราะห์แสงของแบคทีเรียประกอบด้วยแคเทอรีโอคลอโรฟิลล์ คาโรทีนอยด์ และแคเทอรีโอคลอโรฟิลล์รูปแบบพิเศษ (light harvesting protein) ที่ดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 890 นาโนเมตร (P890) และ 870 นาโนเมตร (P870) ตามลำดับ มีหลักการทำงานเช่นเดียวกับพืชและสาหร่าย การถ่ายทอดอิเล็กตรอนของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงเป็นแบบวัฏจักรโดยโมเลกุลของ แคเทอรีโอคลอโรฟิลล์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงจะมีพลังงานสูงขึ้น ทำให้อิเล็กตรอนสูญเสียไปหนึ่งอิเล็กตรอน (วิลาวินัย, 2540)

องค์ประกอบที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แสงที่พบภายในเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสง คือ แคเทอรีโอคลอโรฟิลล์, คาโรทีนอยด์, ไซโตโครม, ควิโนน และเฟอร์ริดอกซิน เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยธาตุเหล็กซึ่งไม่อยู่ในรูปฮีม องค์ประกอบต่างๆ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ตามหน้าที่ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แสง คือ กลุ่มแรกทำหน้าที่รับพลังงานจากแสง ได้แก่ แคเทอรีโอคลอโรฟิลล์ และคาโรทีนอยด์ กลุ่มที่ 2 ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงพลังงานแสงไปเป็นพลังงานเคมีในรูป ATP ประกอบด้วย แคเทอรีโอคลอโรฟิลล์ ไซโตโครม ควิโนน และเฟอร์ริดอกซิน ตำแหน่งที่ประกอบด้วยกลุ่มที่ 2 เรียกว่า reaction center

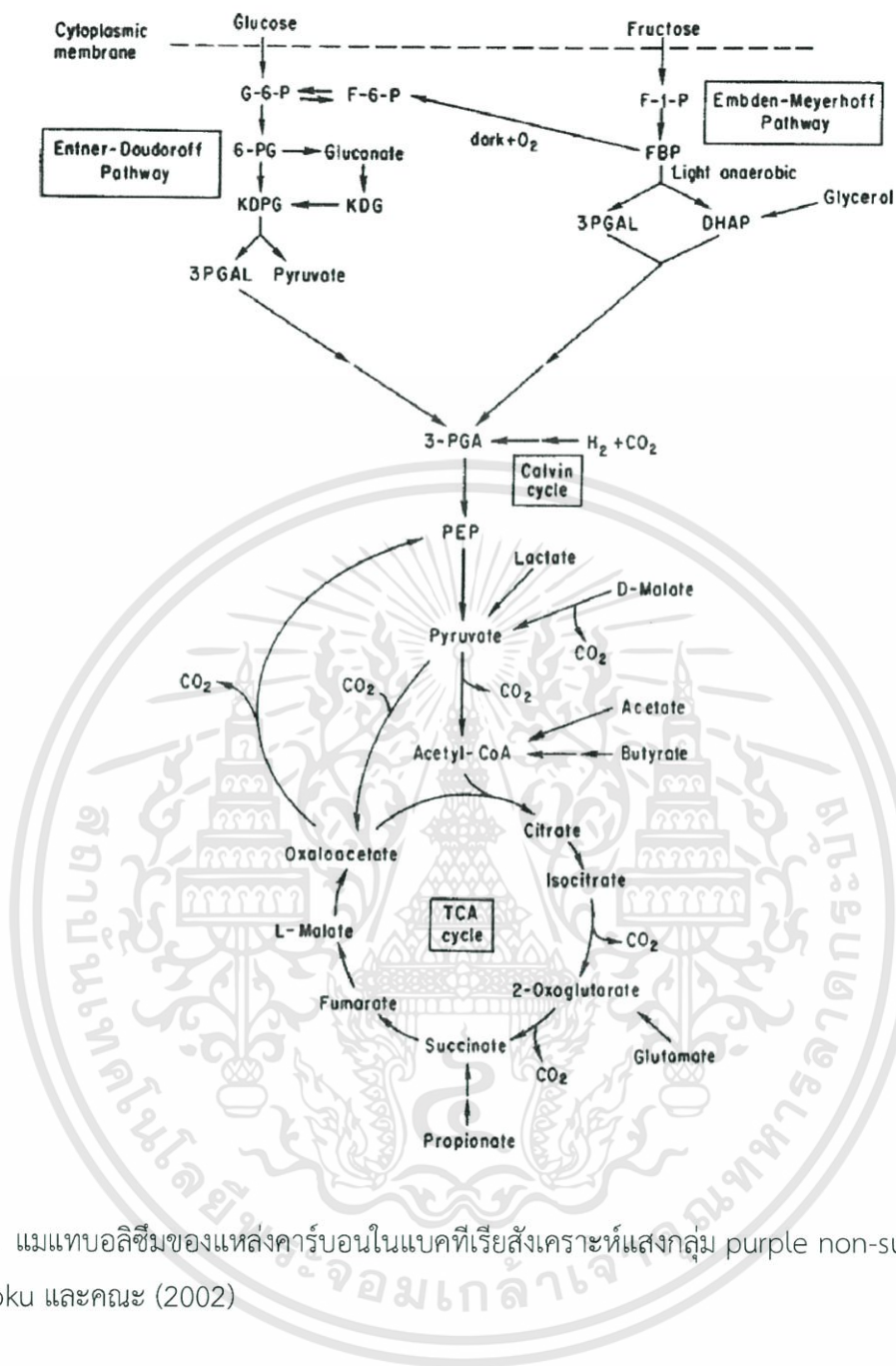
แบคทีเรียสังเคราะห์แสงพวก purple non sulfur มี reaction center อยู่ที่โครมาโตฟอร์ และมีแบคทีเรียออคโลโรฟิลล์ชนิด a และ b ซึ่งเป็นส่วนประกอบของโครมาโตฟอร์เป็นจำนวนมาก ทำหน้าที่ในการรับพลังงานจากแสงโดยมีแบคทีเรียออคโลโรฟิลล์ซึ่งเป็นองค์ประกอบของ reaction center ที่ P890 คาโรทีนอยด์ เป็นรงควัตถุที่ทำหน้าที่ในการรับพลังงานจากแสงแล้วส่งพลังงานจากแสงที่รับไว้ประมาณ 30-50 เปอเซ็นต์ ไปยัง reaction center และทำหน้าที่ป้องกันแบคทีเรียออคโลโรฟิลล์ไม่ให้ได้รับอันตรายจากปฏิกิริยาโฟโตออกซิเดชัน แบคทีเรียสังเคราะห์แสงมีคาโรทีนอยด์ 2 ชนิด คือ aliphatic และ aromatic สำหรับ purple non sulfur bacteria มีคาโรทีนอยด์อยู่มาก ส่วนใหญ่เป็นพวกอะลิฟาติกคาโรทีนอยด์ อยู่ที่เนื้อเยื่อโครมาโตฟอร์ (ดวงพร, 2546)

กระบวนการ photophosphorylation เป็นกระบวนการสังเคราะห์ ATP จาก ADP และอนินทรีย์ฟอสเฟต โดยอาศัยพลังงานจากแสง แสงจะเหนี่ยวนำให้เกิดการส่งผ่านของอิเล็กตรอนและเอนไซม์ ATPase complex ทำหน้าที่สังเคราะห์ ATP โดยการแตกตัวของโปรตอน photophosphorylation มีอยู่ 2 วิธี คือ cyclic photophosphorylation และ non-cyclic photophosphorylation ในแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกระบวนการโฟโตฟอสโฟไรเลชันเป็นแบบ non-cyclic กระบวนการสังเคราะห์แสงในแบคทีเรียสังเคราะห์แสงแตกต่างจากพืชชั้นสูงและสาหร่าย คือ ในระหว่างการสังเคราะห์แสงไม่มีก๊าซออกซิเจนเกิดขึ้น และเกิดขึ้นในสภาวะไม่มีอากาศ (Sybesma, 1970)

แบคทีเรียจำพวก purple non sulfur มีแบคทีเรียออคโลโรฟิลล์ a และ b รับพลังงานจากแสงส่วนใหญ่มีคุณสมบัติเป็น fulcultative เมื่อเจริญในสภาวะมีแสง-ไม่มีอากาศ แบคทีเรียขนส่งอิเล็กตรอนจากสับสเตรตซึ่งเป็นสารอินทรีย์ แบบไม่เป็นวัฏจักรได้ ATP และ $\text{NADPH} + \text{H}^+$ โดยมี P890 เป็นศูนย์กลางปฏิกิริยา และมีสารประกอบพวกโปรตีนซึ่งมีเหล็กและกำมะถันเป็นองค์ประกอบ ทำหน้าที่เป็นสารตัวกลางร่วมระหว่างการขนส่งอิเล็กตรอน (Whitmarsh และ Govindjee, 1995)

การถ่ายทอดอิเล็กตรอนในวัฏจักร TCA และการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของแบคทีเรียจำพวก purple non sulfur เกิดจากการสังเคราะห์ด้วยแสงแบบ non-cyclic photophosphorylation โดยการใช้กรดอินทรีย์หรือสารประกอบอินทรีย์ผ่านวัฏจักร TCA ในขณะที่มีแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม โดยสารประกอบอินทรีย์จะให้อิเล็กตรอนและทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอน และแสงเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการส่งผ่านอิเล็กตรอนไปยังเฟอร์ริดอกซิน และมีเอนไซม์ไนโตรจีเนสเป็นตัวรับอิเล็กตรอนเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่เจริญแบบเฮเทอโรโทรฟ สามารถใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด (ดังรูปที่ 2.8) นอกจากนี้ยังพบว่าสารอินทรีย์ ทำให้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงตรึงคาร์บอนไดออกไซด์มาใช้ในวัฏจักรคาลวินได้ลดลง เพราะสารประกอบอินทรีย์สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในวัฏจักรคาลวิน (Koku และคณะ, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



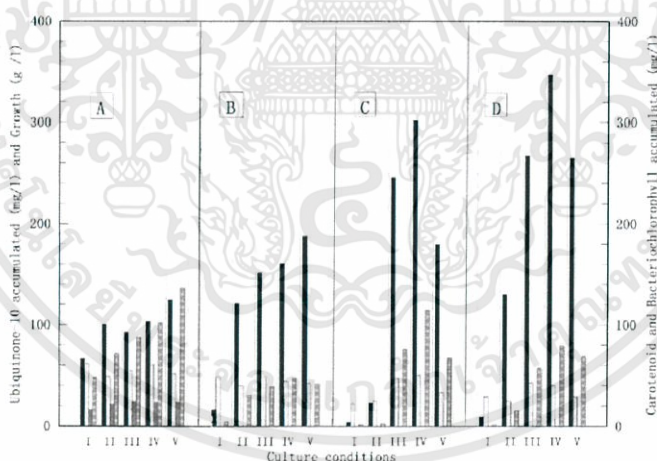
รูปที่ 2.8 แมแทบอลิซึมของแหล่งคาร์บอนในแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่ม purple non-sulfur
ที่มา : Koku และคณะ (2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Yoshida และคณะ (1998) ได้ทำการทดสอบการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นโดยเฉพาะเลี้ยง *Rhodobacter sphaeroides* KY-4113 (A) และสายพันธุ์กลาย (Green mutant) CL-37 (B), Co-22 (C) และ Co-22-11 (D) ในขวดรูปชมพู่ภายใต้สภาวะอากาศที่แตกต่างกัน 5 การทดลองดังนี้ (I), ปริมาตรอาหาร 10 มิลลิลิตร และมี Baffle; (II), ปริมาตรอาหาร 20 มิลลิลิตร และมี Baffle; (III), ปริมาตรอาหาร 20 มิลลิลิตร ไม่มี Baffle ; (IV), ปริมาตรอาหาร 30 มิลลิลิตร ไม่มี Baffle; (V), ปริมาตรอาหาร 40 มิลลิลิตร ไม่มี Baffle ภายใต้สภาวะที่มีอากาศน้อย KY-4113, CL-37, Co-22 และ Co-22-11 มีการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น เท่ากับ 124.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (สภาวะ V ในรูป 2.9A) 187.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (สภาวะ V ในรูป 2.9B), 302 มิลลิกรัมต่อลิตร (สภาวะ IV ในรูป 2.9C) และ 346.8 มิลลิกรัมต่อลิตร (สภาวะ IV ในรูป 2.9D) ตามลำดับ

โดยอากาศมีผลต่อการผลิตคาร์ทีนอยด์ในสายพันธุ์ดั้งเดิมและมีผลต่อการผลิตแบคทีอริโอคลอโรฟิลล์ในสายพันธุ์ที่ผ่านการทดสอบ ซึ่งส่งผลต่อการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น โดยมีเหตุผลนำเสนอคือ (1) สารตั้งต้น IPP ที่ใช้ในการสังเคราะห์คาร์ทีนอยด์ และแบคทีอริโอคลอโรฟิลล์ สามารถนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์โคเอนไซม์คิวเท็นมากขึ้น (2) เซลล์ผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ (โคเอนไซม์คิวเท็น) เพื่อชดเชยสารต้านอนุมูลอิสระคาร์ทีนอยด์ที่ลดลง



รูปที่ 2.9 ผลของการให้อากาศที่จำกัดต่อการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น โดยสายพันธุ์กลายสีเขียว (green mutant) ของ *R. sphaeroides* เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ ใน *R. sphaeroides* KY-4113 (A), และสายพันธุ์กลายสีเขียว CL-37 (B), Co-22 (C) และ Co-22-11 (D), ภายใต้สภาวะ (I), ปริมาตรอาหาร 10 มิลลิลิตร และมี Baffle; (II), ปริมาตรอาหาร 20 มิลลิลิตร และมี Baffle; (III), ปริมาตรอาหาร 20 มิลลิลิตร ไม่มี Baffle ; (IV), ปริมาตรอาหาร 30 มิลลิลิตร ไม่มี Baffle; (V), ปริมาตรอาหาร 40 มิลลิลิตร ไม่มี Baffle

■, Coenzyme Q10; □, growth (DCW); ▨, carotenoid; ▩ bacteriochlorophyll

ที่มา : Yoshida และคณะ (1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yen และ Chiu (2007) ผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นโดยเพาะเลี้ยง *Rhodobacter sphaeroides* ในถังหมักอาหารเหลวภายใต้สภาวะไม่มีอากาศและมีแสง (Anaerobic-Light) เปรียบเทียบกับสภาวะมีอากาศและไม่มีแสง (Aerobic-Dark) ที่มีการแปรผันปริมาณออกซิเจนละลาย (Dissolved Oxygen: DO) ให้แตกต่างกัน 4 ระดับ ได้แก่ 60±5 เปอร์เซ็นต์, 30±5 เปอร์เซ็นต์, 10±5 เปอร์เซ็นต์ และ 0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าได้ผลการทดลองดังตารางที่ 2.4

จากผลการศึกษาพบว่าในสภาวะไม่มีอากาศ-มีแสง (Anaerobic-Light) ได้ผลผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น 18.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะมีอากาศและไม่มีแสง (Aerobic-Dark) ที่ผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นได้สูงสุด 10.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้ระดับออกซิเจนละลาย 0 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะไม่มีอากาศและมีแสง (Anaerobic-Light) จะมีระยะการเจริญเติบโตในช่วง lag-phase เป็นเวลานาน ส่งผลให้อัตราการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นโดยรวมมีค่าเท่ากับ 0.095 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งต่ำกว่าในสภาวะมีอากาศและไม่มีแสง (Aerobic-Dark) ที่ให้อัตราการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นโดยรวมเท่ากับ 0.146 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ระดับออกซิเจนละลาย 0 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นโดยเพาะเลี้ยง *R. sphaeroides* สองระยะ ในขั้นแรกเพาะเลี้ยงในสภาวะมีอากาศและไม่มีแสง (Aerobic-Dark) ควบคุมการกวนผสมที่ 150 rpm และอัตราการให้อากาศที่ 1 vvm เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง (อยู่ในระยะ exponential phase ของการเจริญ) แล้วนำไปเพาะเลี้ยงต่อในระยะที่สอง ภายใต้สภาวะไม่มีอากาศและมีแสง (Anaerobic-Light) พบว่าได้ผลผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นได้สูงสุด 10.7 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งต่ำกว่าเพาะเลี้ยงในสภาวะไม่มีอากาศและมีแสง (Anaerobic-Light) แต่ใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงในสภาวะมีอากาศและไม่มีแสง (Aerobic-Dark) ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบสองระยะดังกล่าว สามารถลดระยะเวลาการเจริญในช่วง lag-phase ของเชื้อจุลินทรีย์ได้ แต่ก็ทำให้การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นลดลงด้วย เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะไม่มีอากาศและมีแสง (Anaerobic-Light) ทั้งนี้เป็นไปได้ว่าปริมาณออกซิเจนละลายส่งผลทำให้การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นลดลง

ตารางที่ 2.4 ผลผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยง *R. sphaeroides* ภายใต้สภาวะต่างๆ

	Aerobic-dark				Anaerobic-light	Two-stage
	High DO	Middle DO	Low DO	Zero DO		
Max. CoQ10 (mg/L)	5.5	4.8	3.7	10.5	18.2	10.7
Overall CoQ10 production rate (mg/L/h)	0.066	0.067	0.077	0.146	0.095	0.089
CoQ10 production yield ^a (mg/g)	4.75	3.76	2.3	8.0	21.3	12.2

^a CoQ10 produced based on per gram of DCW formed.

ที่มา : Yen and Chiu (2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Jiang และ Yu (2008) ได้ผลิตโคเอนไซม์คิวเทินโดยการเพาะเลี้ยง *Rhodospseudomonas palustris* J001 ในสภาวะมีอากาศและไม่มีแสง (Aerobic-Dark) ภายใต้การควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายให้แตกต่างกันสองระยะ โดยพบว่าในระยะแรก เมื่อควบคุมปริมาณออกซิเจนละลาย 45 เปอร์เซ็นต์ และระยะที่สองควบคุมปริมาณออกซิเจนละลาย 15 เปอร์เซ็นต์ พร้อมกับการเติมโซเดียมอะซิเตท 2 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 42 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง (สิ้นสุดระยะ exponential phase ของการเจริญ) เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญโดยให้มวลเซลล์สูงสุด 1.31 กรัมต่อลิตร และผลิตโคเอนไซม์คิวเทินได้สูงสุดถึง 89.1 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราการผลิต 1.142 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งให้ผลผลิตสูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบ batch ระยะเวลาเดียว ที่ควบคุมปริมาณออกซิเจนละลาย 45 เปอร์เซ็นต์

Jeong และคณะ (2008) ได้เพาะเลี้ยง *Rhodobacter sphaeroides* ในถังหมักขนาด 1 ลิตร โดยศึกษาผลของค่าพีเอชและความเข้มข้นของแสงต่อการผลิตโคเอนไซม์คิวเทิน พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อโดยไม่ควบคุมค่าพีเอช ได้ผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทินสูงสุด 1.69 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง จากนั้นศึกษาการเพิ่มปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินโดยการควบคุมค่าพีเอชให้เท่ากับ 7 พบว่าได้ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินสูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบไม่ควบคุมพีเอชถึง 1.7 เท่า และความเข้มข้นของแสงมีผลต่อการผลิตโคเอนไซม์คิวเทินเพียงเล็กน้อย

Yen และ Shih (2009) ได้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Rhodobacter sphaeroide* ในถังหมักชนิด airlift และ stirred tank ภายใต้สภาวะ aerobic-dark พบว่าปริมาณผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทินที่เพาะเลี้ยงในถังหมักแบบ airlift ได้ผลดีกว่า โดยได้ผลผลิตสูงถึง 25.04 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ถังหมักแบบ stirred tank ให้ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินเพียง 18.11 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch ในถังหมักชนิด airlift สามารถเพิ่มปริมาณมวลเซลล์ให้สูงขึ้น ส่งผลให้ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินสูงขึ้นไปถึง 33.91 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 3.5 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งมากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบ batch นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการเพิ่มปริมาณโคเอนไซม์คิวเทิน โดยเปลี่ยนอัตราการให้อากาศในการเลี้ยงแบบ fed-batch ในถังหมักชนิด airlift ซึ่งได้ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินสูงสุดถึง 45.65 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเพิ่มขึ้นถึง 35 เปอร์เซ็นต์

Tian และคณะ (2010b) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยง *Rhodospirillum rubrum* ATCC 25852 แบบ submerged fermentation โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นชีวมวลจากไบยาสูบที่ผ่านการย่อยให้มีขนาดเล็กลง (TBH) โดยทำการเปรียบเทียบกับพืชชนิด Alfalfa (ABH) หรือผักปวยเล้ง (SBH) พบว่าอัตราการเจริญในอาหารที่มีมวลชีวภาพจากไบยาสูบ (TBH) 20% v/v ส่งผลต่อการกระตุ้นการเจริญของเซลล์และปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (specific coenzyme Q10) ซึ่งให้ค่าถึง 20.16 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wu และ Tsai (2013) ได้ศึกษาวิธีการคัดแยก และการทำให้โคเอนไซม์คิวเท็นให้บริสุทธิ์ โดยผลิตจากเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* BCRC 13100 โดยศึกษาการปรับสภาพเซลล์ให้เหมาะสมต่อการสกัดด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่ การใช้เอนไซม์, เอทานอล, เครื่องโฮโมจีไนเซอร์ความดันสูง ซึ่งได้ปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็น 2.85, 2.01 และ 2.11 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการสกัดโคเอนไซม์คิวเท็น พบว่าเมื่อใช้เอทานอล สกัดโคเอนไซม์คิวเท็น 2 ครั้ง จากเซลล์ที่ได้จากกระบวนการหมัก โดยไม่ผ่านการปรับสภาพเซลล์ (extraction directly) ได้ปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็น 2.9 มิลลิกรัมต่อกรัม ส่วนโคเอนไซม์คิวเท็นที่ได้จากการสกัดจะถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเอทานอล และขจัดเอทานอลออกด้วยเฮกเซน หลังจากนั้นทำให้ตกผลึก (crystallization) แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ซึ่งพบว่าได้ความบริสุทธิ์ของโคเอนไซม์คิวเท็นถึง 96 เปอร์เซ็นต์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน *Rhodospseudomonas* sp. สายพันธุ์ OS33, S12 และสายพันธุ์กลาย 13, 14

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงสูตร A ประกอบด้วย

แหล่งคาร์บอน	10.0	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด (Yeast extract)	1.0	กรัมต่อลิตร
โมโนโซเดียมกลูตาเมต	10.0	กรัมต่อลิตร
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	10.0	กรัมต่อลิตร
ไนโตรเจนที่เตรียมเป็นอาหารแข็งให้เต็มวัน	15.0	กรัมต่อลิตร

และปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.8 - 7.2

แหล่งคาร์บอนปรับเปลี่ยนตามวัตถุประสงค์ของการทดลอง (สายพันธุ์ OS33 ใช้แป้งมันสำปะหลัง ส่วนสายพันธุ์ S12 และสายพันธุ์กลาย 13, 14 ใช้โซเดียมอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอน ตลอดการทดลอง)

3.3 สารเคมี

- 3.3.1 เฮกเซน (Chloroform, CHCl_3) AR Grade
- 3.3.2 เมทานอล (Methanol, CH_2OH) HPLC Grade
- 3.3.3 อะซิโตน (Acetone, $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) AR Grade
- 3.3.3 เอทานอล (Absolute Ethanol, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) 99.8%
- 3.3.4 สารมาตรฐานโคเอนไซม์คิวเท็น (Sigma-Aldrich, USA)

3.4 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 3.4.1 หลอดไฟฮาโลเจนขนาด 40-60 วัตต์
- 3.4.2 เดซิเคเตอร์
- 3.4.3 ปัมดูดอากาศ และเกจวัดความดันอากาศ (Pressure gauge)
- 3.4.4 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Shimadzu UV-1800)
- 3.4.5 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.4.6 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- 3.4.7 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
- 3.4.8 ตู้ปลอดเชื้อ (Lamina air flow)
- 3.4.9 กล้องจุลทรรศน์
- 3.4.10 เครื่องหมวนผสมสาร (Labnet international H5500-230V-EU)
- 3.4.11 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)
- 3.4.12 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)
- 3.4.13 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
- 3.4.14 เครื่องวัดความเข้มแสง (Lux meter)
- 3.4.15 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography)

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

ใช้ลูปเปียโคโลนีเชื้อ *Rhodospseudomonas* sp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่เก็บรักษาแบบไม่มีอากาศในหลอดอาหารแข็งสูตร A (Deep tube) ลงในหลอดอาหารเหลวสูตร A ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปิดทับผิวหน้าด้วยน้ำมันพืช จากนั้นปมไว้ที่ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 35-45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3.5.2 ศึกษาการเจริญ และการผลิตโคเอนไซม์คิวเทินโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อสองระยะ

ในระยะแรกเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะไม่มีแสง(มีอากาศ) (Aerobic-Dark) จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงในสภาวะ Photoheterotroph (มีอากาศจำกัดภายใต้การให้แสง) นำกล้าเชื้อที่เตรียมได้ (มีค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0) ปริมาตร 1 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ่ายลงในฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลวสูตร A ปริมาตร 150 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไม่มีแสง (มีอากาศ) (Aerobic-Dark) จากนั้นนำฟลask ออกไปเพาะเลี้ยงในสภาวะ Photoheterotroph (มีอากาศจำกัดภายใต้การให้แสง) ทุกๆวันจนครบ 14 วัน เก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร, ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง, และโคเอนไซม์คิวเทินที่สะสมภายในเซลล์

3.5.3 ศึกษาการเจริญของเชื้อในหลอดทดลองภายใต้สภาวะ Photoheterotroph (ให้อากาศ และแสง)

นำกล้าเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ (มีค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0) ปริมาตร 1 เพอร์เซ็นต์ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ่ายลงในหลอดทดลองที่มีฝาเกลียวปิด ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความสูงแตกต่างกัน ได้แก่ 6, 8, 10 และ 12 เซนติเมตร นำไปบ่มที่ความเข้มแสง 1000 ลักซ์ อุณหภูมิ 35-45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 วัน เพื่อวัดการเจริญของเชื้อด้วยค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร แล้วคัดเลือกความสูงของอาหารที่เชื้อสามารถเจริญได้ดีที่สุด เพื่อนำไปทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อภายใต้ความเข้มแสง 300, 500 และ 1000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 35-45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 วัน วัดการเจริญของเชื้อด้วยค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นนำความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อ และความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ในสภาวะ Photoheterotroph (มีอากาศจำกัดภายใต้การให้แสง)

3.5.4 ศึกษาการเจริญ และการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในขวดแบน ภายใต้สภาวะ Photoheterotroph (ให้อากาศจำกัด และแสง)

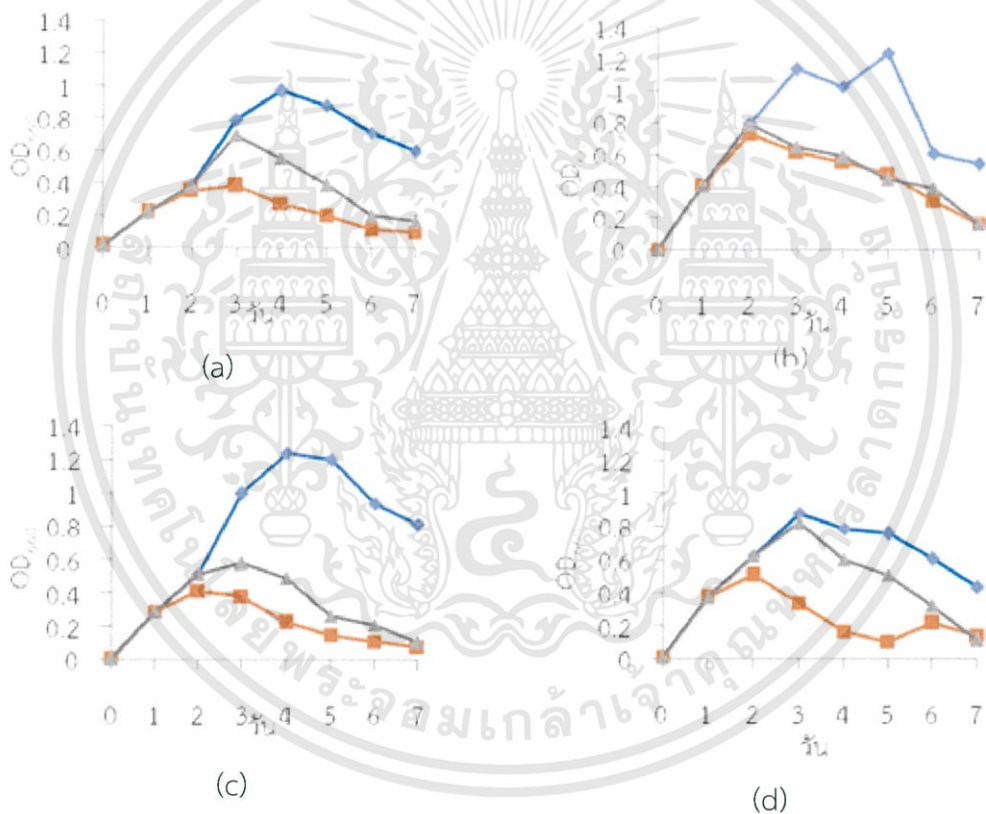
นำกล้าเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ (มีค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0) ปริมาตร 1 เพอร์เซ็นต์ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ่ายลงในขวดแบนที่บรรจุอาหารให้มีความสูง และบ่มไว้ที่ความเข้มแสงเหมาะสม ที่อุณหภูมิ 35-45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน โดยเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงในสภาวะไม่มีอากาศและมีแสง (Anaerobic-light) ภายใต้สภาวะเดียวกัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 วัน เพื่อวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร, ปริมาณน้ำหนักรวมของเซลล์แห้ง, แแบคทีเรียโคลิกโคโรฟิลล์ และโคเอนไซม์คิวเท็นที่สะสมขึ้นภายในเซลล์

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สองสภาวะ

ผลการทดลองการศึกษาสภาวะการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว A medium ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นโซเดียมอะซิเตรท สำหรับเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 สายพันธุ์กลาย 13 และ 14 และในแง่ สำหรับเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ OS33 ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงสองสภาวะ ดังนี้ Aerobic-dark และ Aerobic-light (ผ่านการเลี้ยงสภาวะ aerobic dark ในช่วงแรก) โดยจะแสดงในรูปที่ 4.1 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ OS33 และ S12 สายพันธุ์กลาย 13 และ 14 และในตารางที่ 4.1 เป็นการยกตัวอย่างแนวโน้มปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14



รูปที่ 4.1 การเจริญเติบโตของเชื้อ (a) *Rhodopseudomonas* sp. OS33, (b) *Rhodopseudomonas* sp. S12, (c) *Rhodopseudomonas* sp. 13 และ (d) *Rhodopseudomonas* sp. 14

โดยที่ (◆) คือ การเจริญเติบโต (OD₆₆₀) ในสภาวะ Aerobic dark
(▲) คือ การเจริญเติบโต (OD₆₆₀) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อสองสภาวะโดยเลี้ยงที่สภาวะ Aerobic-Dark เป็นเวลา 1 วัน แล้วนำมาเลี้ยงต่อที่สภาวะ Aerobic-Light
(■) คือ การเจริญเติบโต (OD₆₆₀) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อสองสภาวะโดยเลี้ยงที่สภาวะ Aerobic-Dark เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำมาเลี้ยงต่อที่สภาวะ Aerobic-Light

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.1 เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สองสภาวะ โดยระยะแรกการเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะ Aerobic-dark มีการเจริญเติบโตที่ดีที่สุด เจริญได้ดี รองลงมาในสภาวะ Aerobic-Dark เป็นเวลา 1 วัน แล้วนำมาเลี้ยงต่อที่สภาวะ Aerobic-Light และ สุดท้ายในสภาวะ Aerobic-Dark เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำมาเลี้ยงต่อที่สภาวะ Aerobic-Light พบว่าการเจริญเติบโต (OD_{660}) ลดลง ใน 2 สภาวะสุดท้ายอาจมีผลเนื่องจากเมื่อทำการเปลี่ยนสภาวะ การเพาะเลี้ยงเชื้อจะมีการปรับสภาพทั้งนี้ เนื่องจากปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจส่งผลต่อการเจริญในการปรับตัวสู่สภาวะ aerobic light (มีอากาศ (มีแสง) ดังนั้นจึงอาจต้องใช้ ระยะเวลามากขึ้นเพื่อให้เชื้อปรับตัวให้เข้ากับสภาวะดังกล่าวซึ่งส่งผลต่อปริมาณ โคเอนไซม์คิวเทิน กับ อัตราการเจริญของเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยขอยกตัวอย่างจากเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. 14 ใน ทั้งสองสภาวะดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ค่าปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. 14

สภาวะ	ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินของเชื้อ <i>Rhodopseudomonas</i> sp. 14 (OD_{275})					
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6
Aerobic-Dark	0.215	0.42	1.303	0.17	0.342	0.247
Aerobic-Dark ในวันแรก	0.215	0.109	0.685	0.108	0.185	0.153
Aerobic-Light ในวันที่เหลือ						
Aerobic-Dark ใน 2 วันแรก	0.215	0.42	0.728	0.182	0.258	0.06
Aerobic-Light ในวันที่เหลือ						

ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าอัตราการเจริญของเชื้อมีผลสอดคล้องกับปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินที่สกัดได้ และปริมาณเอนไซม์คิวเทินที่ได้ มีปริมาณลดลงอย่างมากเมื่อเปลี่ยนสภาวะการเลี้ยง

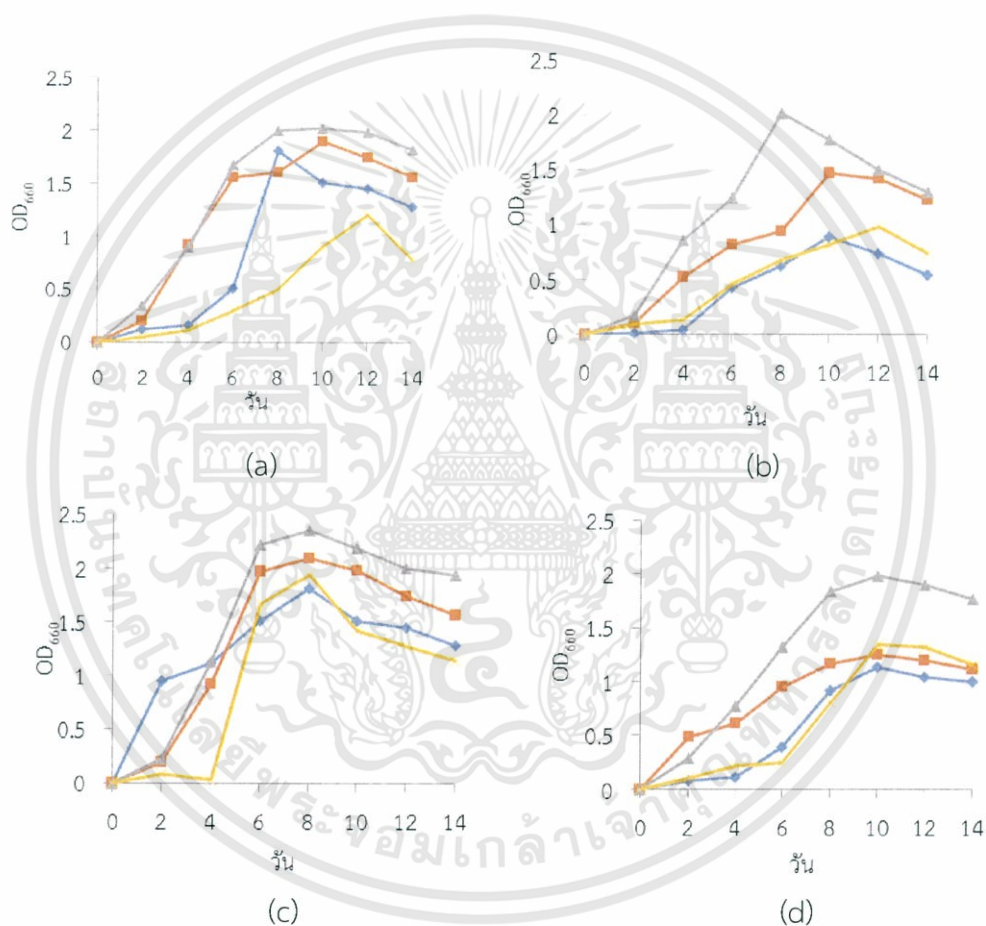
4.2 ศึกษาการเจริญของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. ในหลอดทดลอง

ผลการทดลองศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ ในหลอดทดลองที่สภาวะ Photoheterotroph (ให้อากาศจำกัด และมีแสง) เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Anaerobic light (ไม่มีอากาศ และมีแสง) และพิจารณาความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการเจริญ ซึ่งใน 4.2.1 ทำการศึกษาความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อภายใต้สภาวะ Photoheterotroph เปรียบเทียบกับสภาวะ Anaerobic light และใน 4.2.2 ทำการศึกษาความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการเจริญในสภาวะ Photoheterotroph

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.1 ศึกษาความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อภายใต้สภาวะ Photoheterotroph เปรียบเทียบกับสภาวะ Anaerobic light

ทำการศึกษาความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญที่ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 35-45 องศาเซลเซียส ดังแสดงอัตราการเจริญ (OD_{660}) ของ *Rhodopseudomonas* sp. ทั้ง 4 สายพันธุ์, ในรูปที่ 4.2 ภายใต้สภาวะ Photoheterotroph ที่ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความสูงแตกต่างกัน ดังนี้ 6 เซนติเมตร, 8 เซนติเมตร, 10 เซนติเมตร และ 12 เซนติเมตรและเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Anaerobic-light (ไม่มีอากาศ และมีแสง)



รูปที่ 4.2 การเจริญเติบโต (OD_{660}) ของเชื้อ (a) *Rhodopseudomonas* sp. OS33, (b) *Rhodopseudomonas* sp. S12 (c) *Rhodopseudomonas* sp. 13 และ (d) *Rhodopseudomonas* sp. 14 ภายใต้สภาวะ Photoheterotroph ที่ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความสูงแตกต่างกัน 4 ระดับ ได้แก่ (◆) คือ 6 เซนติเมตร, (■) คือ 8 เซนติเมตร (▲) คือ 10 เซนติเมตร และ (✕) คือ 12 เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.2 การศึกษาการเจริญของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. จำนวน 4 สายพันธุ์ ในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อให้สูงจากก้นหลอดแตกต่างกัน 4 ระดับ ได้แก่ 6, 8, 10 และ 12 เซนติเมตร ในสภาวะ Photoheterotroph ที่ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 35-45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน พบว่าทั้ง 4 สายพันธุ์ มีการเจริญสูงสุดที่ระดับความสูง 10 เซนติเมตร โดยสายพันธุ์กลาย 13 มีการเจริญสูงที่สุดในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง

จากนั้นจึงศึกษาการเจริญของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. จำนวน 4 สายพันธุ์ ในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อให้สูงจากก้นหลอด 10 เซนติเมตร ภายใต้สภาวะ Anaerobic-light ที่ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 35-45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เพื่อเปรียบเทียบกับในสภาวะ Photoheterotroph ดังแสดงในรูปที่ 4.3 พบว่าสายพันธุ์กลาย 13 มีการเจริญเติบโตสูงที่สุดโดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร สูงกว่าในสภาวะ Photoheterotroph



รูปที่ 4.3 แสดงการเจริญเติบโต (OD₆₆₀) ในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความสูง 10 เซนติเมตรภายใต้สภาวะ Anaerobic-light ที่ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ โดยที่ (—x—) คือ *Rhodopseudomonas* sp. S12, (—◆—) คือ *Rhodopseudomonas* sp. 13, (—▲—) คือ *Rhodopseudomonas* sp. 14, (—■—) คือ *Rhodopseudomonas* sp. OS33

จากรูปที่ 4.3 อัตราการเจริญในหลอดทดลอง พบว่าสายพันธุ์กลาย 13 มีการเจริญเติบโตสูงที่สุดโดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร สูงกว่าในสภาวะ Photoheterotroph จากผลการทดลองที่ 4.2.1 การเพาะเลี้ยงในสภาวะ Photoheterotroph พบว่าเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ เจริญได้ดีที่สุดที่ความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อ 10 เซนติเมตร เป็นผลมาจากการปริมาณออกซิเจนในหลอดทดลองและละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงมีปริมาณเหมาะสมกว่าระดับความสูงอื่นๆ และในสภาวะ Anaerobic-light เชื้อสายพันธุ์กลาย 13 มีอัตราการเจริญสูงที่สุด ซึ่งเจริญดีกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Photoheterotroph

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ศึกษาความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. ในสภาวะ Photoheterotroph

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. จำนวน 4 สายพันธุ์ ในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อให้สูงจากก้นหลอด 10 เซนติเมตร ภายใต้สภาวะ Photoheterotroph โดยแปรผันความเข้มแสงให้แตกต่างกันได้แก่ 300, 500 และ 1,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 35-45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ดังแสดงอัตราการเจริญในรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 แสดงการเจริญเติบโต (OD_{660}) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารสูง 10 เซนติเมตร ภายใต้สภาวะ Photoheterotroph (a) *Rhodopseudomonas* sp. OS33 (b) *Rhodopseudomonas* sp. S12, (c) *Rhodopseudomonas* sp. 13 และ (d) *Rhodopseudomonas* sp. 14 ที่ความเข้มแสงแตกต่างกัน ได้แก่ (▲) คือ ความเข้มแสง 300 ลักซ์, (■) คือ ความเข้มแสง 500 ลักซ์ และ (◆) คือ ความเข้มแสง 1000 ลักซ์

จากรูปที่ 4.4 พบว่าเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีอัตราเจริญดีที่สุด ที่ความเข้มแสง 300 ลักซ์ และเชื้อสายพันธุ์กลาย 13 มีอัตราการเจริญสูงที่สุดในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง

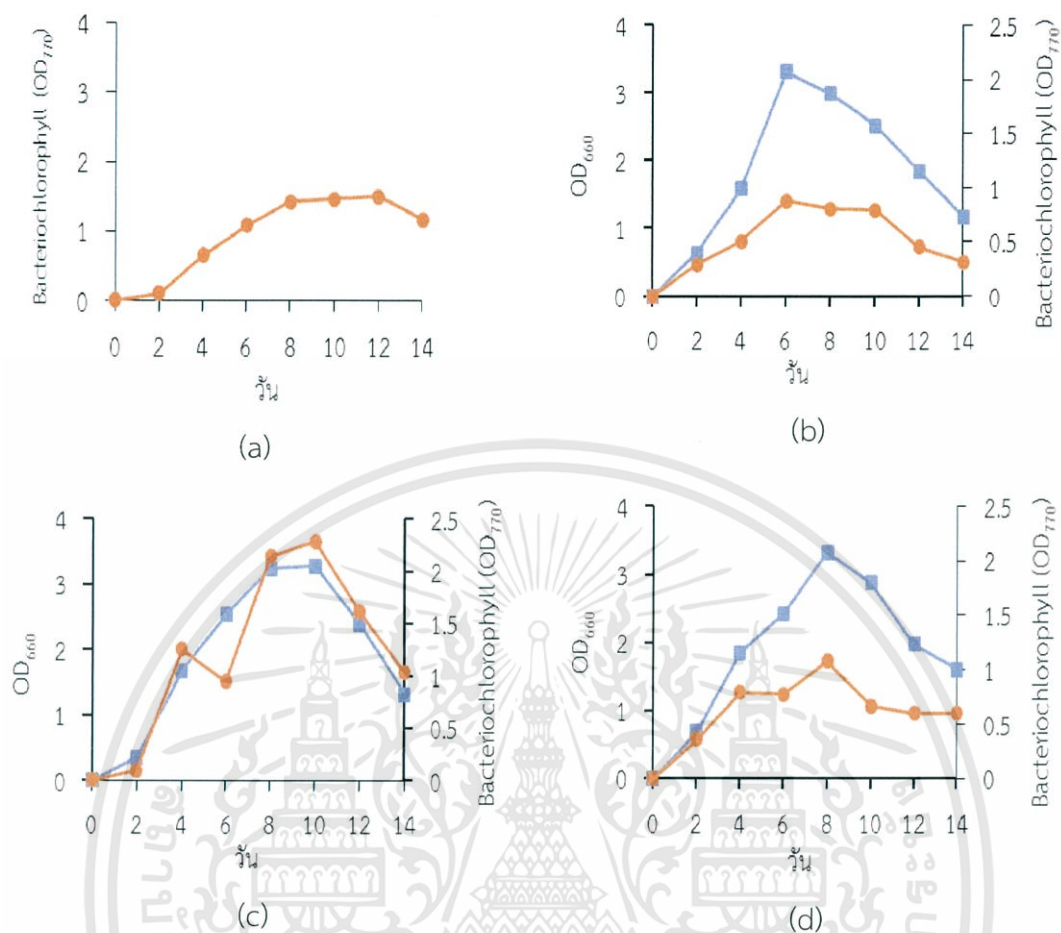
การทดลองที่ 4.2.2 สามารถสรุปได้ว่าที่ความเข้มแสง 300 ลักซ์ ให้อัตราการเจริญของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ สูงกว่าที่ความเข้มแสง 500 ลักซ์ และ 1,000 ลักซ์ ซึ่งในช่วงแรกของการเจริญจนถึงวันที่ 4 ของการเลี้ยง ความเข้มแสง 500 ลักซ์ และ 1,000 ลักซ์ ให้อัตราการเจริญสูงกว่า และในช่วงวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเป็นต้นไป อัตราการเจริญที่ความเข้มแสง 300 ลักซ์ สูงขึ้นอย่างมาก ส่งผลให้มีอัตราการเจริญของเชื้อสูงที่สุด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการจำกัดอากาศในการเพาะเลี้ยง ต้องการความเข้มแสงเพียงเล็กน้อย เพื่อให้ออร์แกเนลล์ส่วนของ mesosome และ bacteriochlorophyll ทำงานร่วมกันได้

4.3 ศึกษาการเจริญและการผลิตโคเอนไซม์คิวเทิน โดยเพาะเลี้ยงเชื้อในขวดแบน ภายใต้สภาวะ Photoheterotroph และ Anaerobic-light

ผลการทดลองศึกษาอัตราการเจริญและการผลิตโคเอนไซม์คิวเทิน เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. จำนวน 4 สายพันธุ์ ในขวดแบนที่ปิดด้วยฝาชนิดเกลียวในสภาวะ Photoheterotroph และ Anaerobic-light

4.3.1 ผลการศึกษาการเจริญสภาวะ Photoheterotroph และ Anaerobic-light ในขวดทรงแบน

เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. จำนวน 4 สายพันธุ์ ในขวดแบนที่ปิดด้วยฝาชนิดเกลียว โดยบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความสูงจากก้นขวด 10 เซนติเมตร (ปริมาตร 260 มิลลิลิตร) เพาะเลี้ยงเปรียบเทียบกัน 2 สภาวะได้แก่ Photoheterotroph (จำกัดอากาศ และมีแสง) และ Anaerobic-light (ไม่มีอากาศ และมีแสง) ซึ่งทั้งสองสภาวะเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 300 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 35-45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุก 2 วัน เพื่อวิเคราะห์การเจริญเติบโต (OD_{660}), ปริมาณน้ำหนักรีดิวซ์, แแบคทีเรียโกลด์โรฟิลล์ และโคเอนไซม์คิวเทิน ซึ่งในเบื้องต้นจะวิเคราะห์ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินด้วยเครื่องเสปคโตรโฟโตมิเตอร์ก่อน แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.5



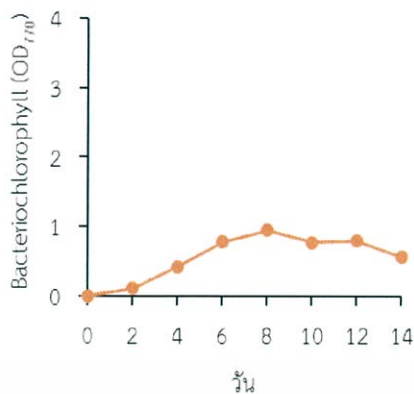
รูปที่ 4.5 แสดงการเจริญเติบโต (OD_{660})เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในขวดแบน ภายใต้สภาวะ

Photoheterotroph โดยที่ (—■—) คือ OD_{660} และ (—●—) คือ Bacteriochlorophyll

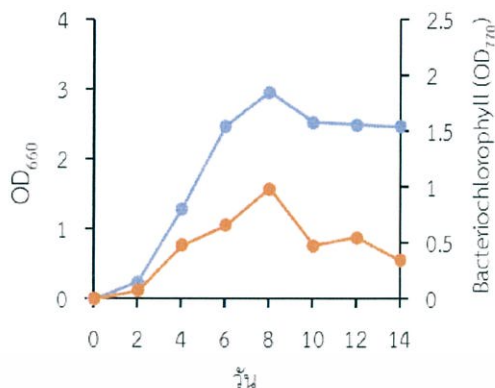
(a) *Rhodopseudomonas* sp. OS33, (b) *Rhodopseudomonas* sp. S12

(c) *Rhodopseudomonas* sp. 13, (d) *Rhodopseudomonas* sp. 14

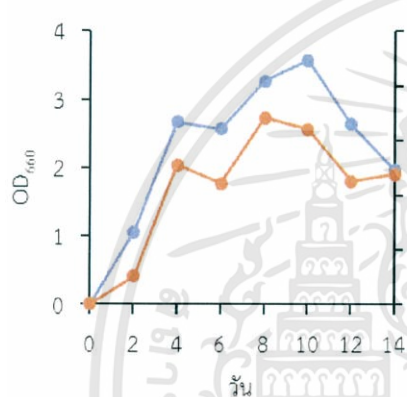
จากรูปที่ 4.5 เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในขวดแบนภายใต้สภาวะ Photoheterotroph พบว่าเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. 13 มีอัตราการเจริญเฉลี่ยสูงสุดในวันที่ 10 ของการเจริญ และอัตราการเจริญเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในขวดแบนภายใต้สภาวะ Anaerobic-light แสดงในรูปที่ 4.6



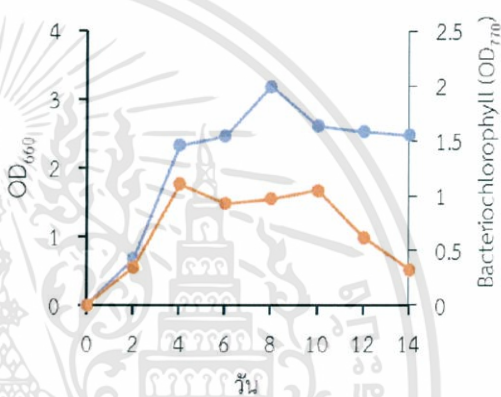
(a)



(b)



(c)



(d)

รูปที่ 4.6 แสดงการเจริญเติบโต (OD₆₆₀) และปริมาณแบคทีเรียคลอโรฟิลล์ (OD₇₇₀)

เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในขวดแบน ภายใต้สภาวะ Anaerobic-light

โดยที่ (—■—) คือ OD₆₆₀, (—●—) คือ Bacteriochlorophyll

(a) *Rhodopseudomonas* sp. OS33, (b) *Rhodopseudomonas* sp. S12

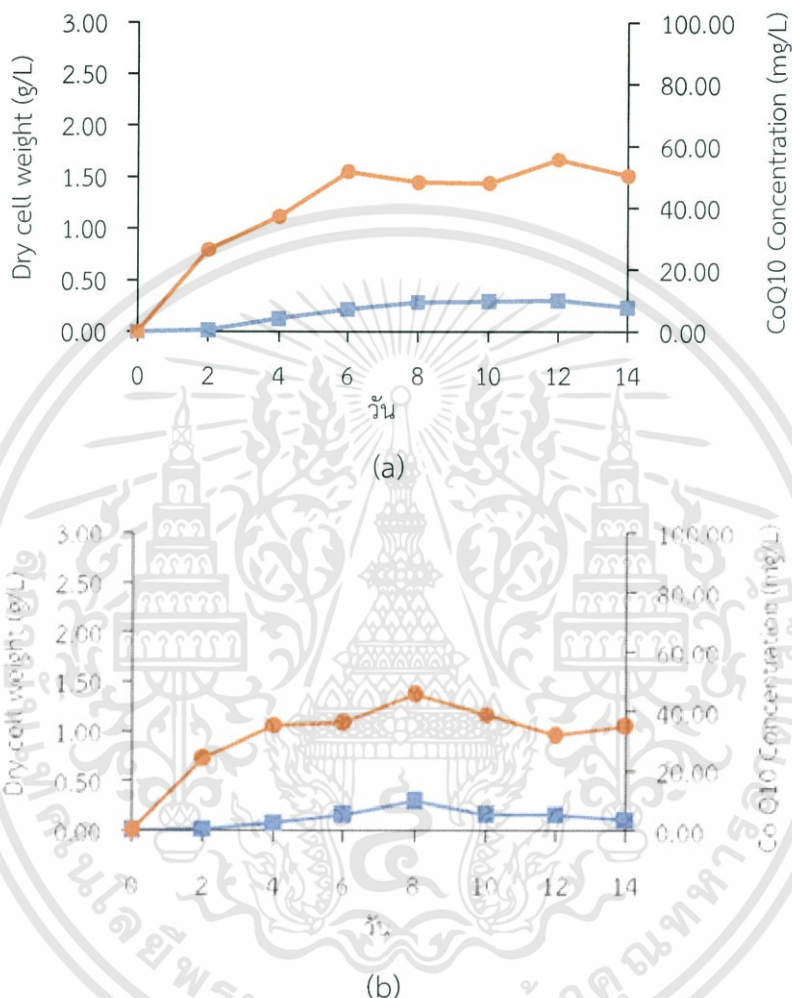
(c) *Rhodopseudomonas* sp. 13, (d) *Rhodopseudomonas* sp. 14

จากรูปที่ 4.6 พบว่าเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. 13 มีอัตราการเจริญเฉลี่ยสูงที่สุดในวันที่ 10 ของการเจริญ

ในการทดลอง 4.3.1 พบว่าทั้งในสภาวะ Photoheterotroph และ Anaerobic-light สายพันธุ์กลาย 13 มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และปริมาณแบคทีเรียคลอโรฟิลล์สูงสุดในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง รองลงมาคือสายพันธุ์กลาย 14, สายพันธุ์ S12 และสายพันธุ์ OS33 ตามลำดับ

4.3.2 การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. ในแต่ละสายพันธุ์

ผลการศึกษาการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ OS33 และ S12 ดังแสดงในรูปที่ 4.7 และ 4.8 ตามลำดับสายพันธุ์กลาย 13 และ 14 ดังแสดงในรูปที่ 4.9 และ 4.10 ตามลำดับ



รูปที่ 4.7 แสดงปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง และผลผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. OS33 ซึ่งเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะ

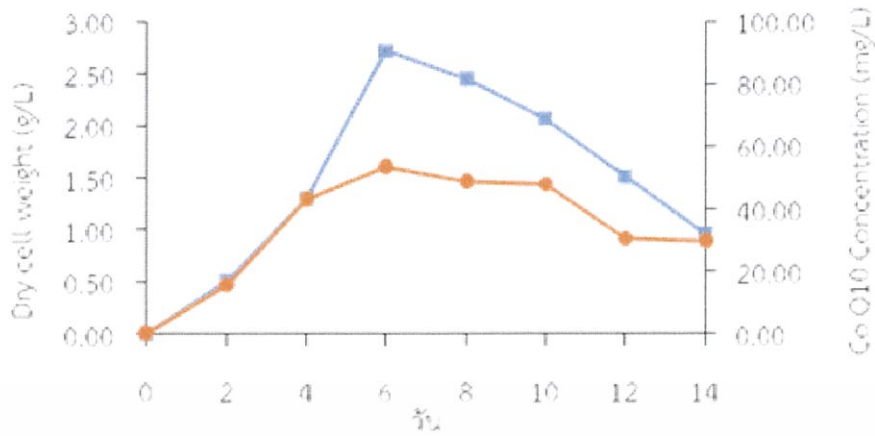
(a) Photoheterotroph, (b) Anaerobic-light

โดยที่ (■) คือ ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)

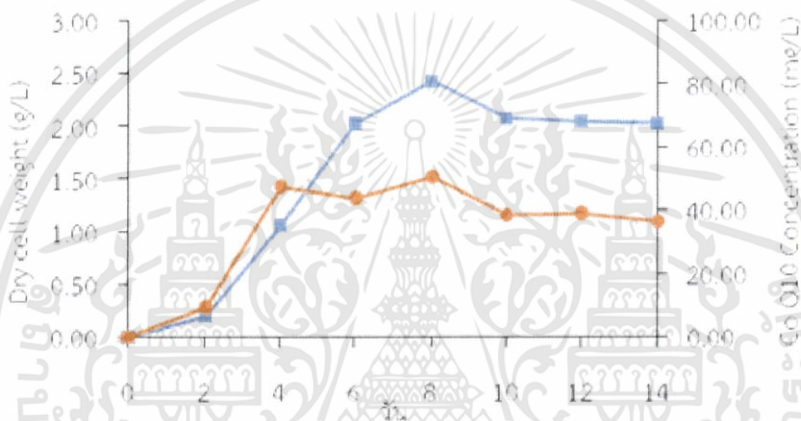
และ (●) คือ ปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็น (มิลลิกรัมต่อลิตร)

จากรูปที่ 4.7 การเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม OS33 พบว่าที่สภาวะ Photoheterotroph ได้ปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็นสูงสุด 55.56 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 0.30 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งสูงกว่าในสภาวะ Anaerobic-light ที่ได้ปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็นสูงสุด 45.69 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 0.30 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(a)



(b)

รูปที่ 4.8 แสดงปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง และผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทิน

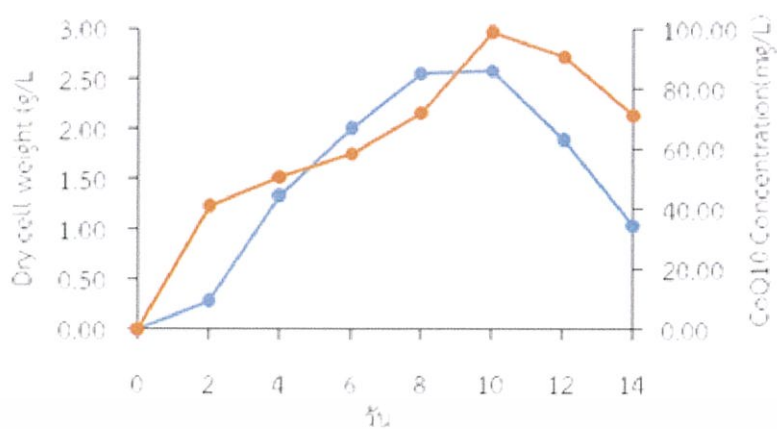
ของเชื้อ *Rhodospseudomonas* sp. S12 ซึ่งเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะ

(a) Photoheterotroph, (b) Anaerobic-light

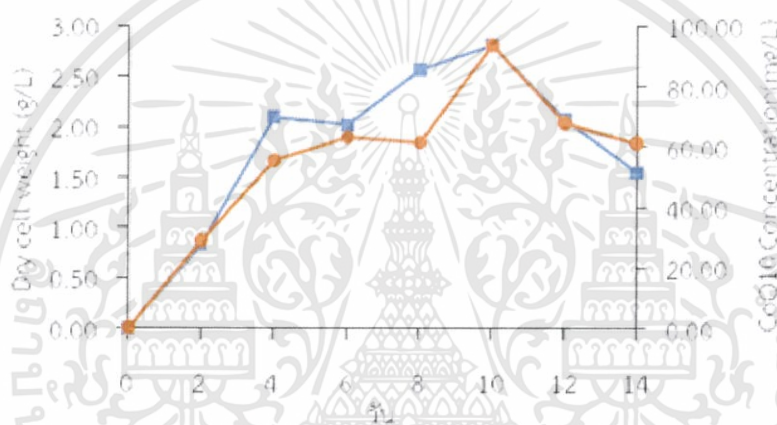
โดยที่ (■) คือ ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)

และ (●) คือ ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทิน (มิลลิกรัมต่อลิตร)

จากรูปที่ 4.8 การเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม S12 พบว่าที่สภาวะ Photoheterotroph ได้ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินสูงสุด 53.50 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำหนักรเซลล์แห้งสูงสุด 2.72 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งสูงกว่าในสภาวะ Anaerobic-light ที่ได้ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินสูงสุด 50.58 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำหนักรเซลล์แห้งสูงสุด 2.42 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง



(a)



(b)

รูปที่ 4.9 แสดงปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง และผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทิน
ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. 13 ซึ่งเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะ

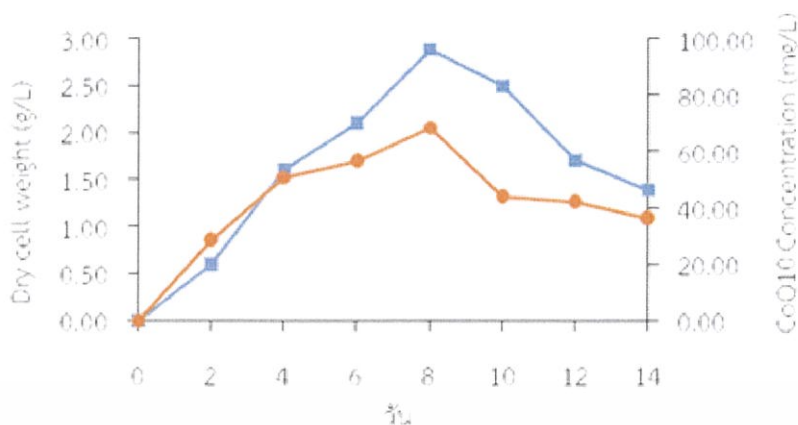
(a) Photoheterotroph, (b) Anaerobic-light

โดยที่ (—■—) คือ ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)

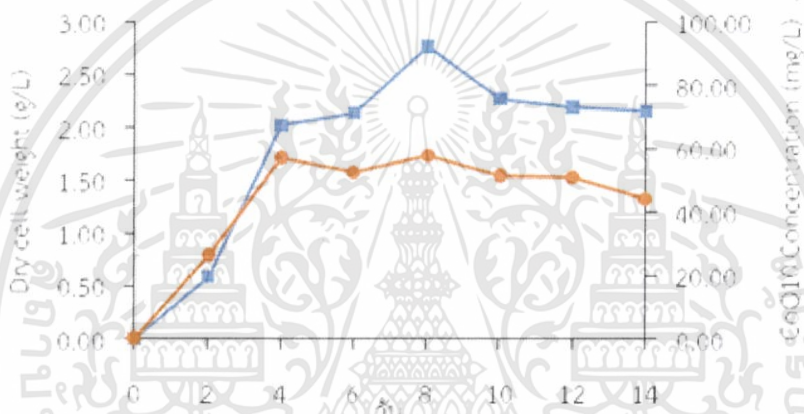
และ (—●—) คือ ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทิน (มิลลิกรัมต่อลิตร)

จากรูปที่ 4.9 การเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย 13 พบว่าที่สภาวะ Photoheterotroph ได้ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินสูงสุด 98.64 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 2.81 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งสูงกว่าในสภาวะ Anaerobic-light ที่ได้ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินสูงสุด 93.70 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 2.58 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(a)



(b)

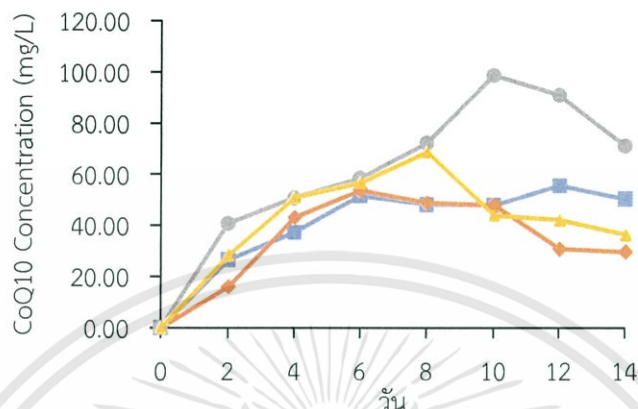
รูปที่ 4.10 แสดงปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง และผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทินของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. 14 ซึ่งเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะ (a) Photoheterotroph, (b) Anaerobic-light โดยที่ (■) คือ ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และ (●) คือ ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทิน (มิลลิกรัมต่อลิตร)

จากรูปที่ 4.10 การเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย 14 พบว่าที่สภาวะ Photoheterotroph ได้ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินสูงสุด 68.59 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 2.89 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งสูงกว่าในสภาวะ Anaerobic-light ที่ได้ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินสูงสุด 57.98 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 2.77 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง

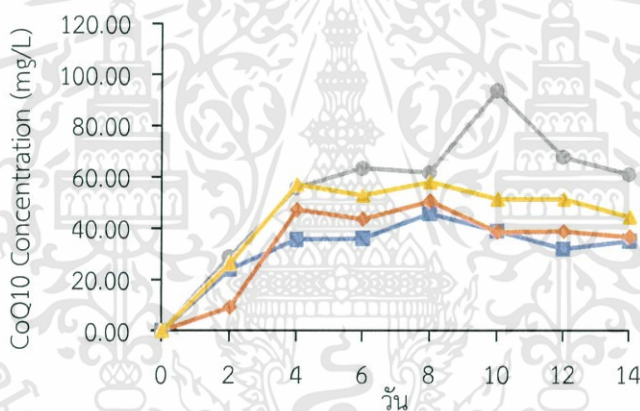
4.3.3 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโต และการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นโดย

Rhodopseudomonas sp. สายพันธุ์ S12 และ OS33 สายพันธุ์กลาย 13 และ 14

ผลการเปรียบเทียบการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นของ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 และ OS33 สายพันธุ์กลาย 13 และ 14 ดังแสดงในรูปที่ 4.11



(a)



(b)

รูปที่ 4.11 ผลผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นจากการเพาะเลี้ยง *Rhodopseudomonas* sp.

จำนวน 4 สายพันธุ์ ภายใต้สภาวะ (a) Photoheterotroph และ (b) Anaerobic-light

โดยที่ (■) คือ *Rhodopseudomonas* sp. OS33,

(◆) คือ *Rhodopseudomonas* sp. S12,

(●) คือ *Rhodopseudomonas* sp. 13,

(▲) คือ *Rhodopseudomonas* sp. 14

จากรูปที่ 4.11 เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นจาก *Rhodopseudomonas* sp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ ในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าในสภาวะ Photoheterotroph เชื้อสายพันธุ์กลาย 13 ให้ปริมาณผลผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นสูงที่สุด รองลงมาคือ สายพันธุ์ดั้งเดิม OS33 และสายพันธุ์ดั้งเดิม S12 ตามลำดับ ส่วนในสภาวะ Anaerobic-light ก็ได้ผลเช่นเดียวกัน ยกเว้นสายพันธุ์ดั้งเดิม S12 ที่มีผลผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม OS33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.4 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นสูงสุด จากเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

เมื่อคัดเลือกตัวอย่างที่มีปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็นสูง ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร นำไปวิเคราะห์ต่อยังเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบว่ามี retention time ที่เวลา 10 นาที ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ปริมาณผลผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นสูงสุดจากการเพาะเลี้ยง *Rhodospseudomonas* sp. จำนวน 4 สายพันธุ์ที่วิเคราะห์ได้จากเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

สายพันธุ์	สภาวะ	วันที่ผลผลิตสูงสุด	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)	ปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็นสูงสุด			
				mg/L		mg/g DCW	
				HPLC	Spectrophotometer	HPLC	Spectrophotometer
OS	Photoheterotroph	12	0.3022	1.92	37.29	5.77	183.85
33	Anaerobic-light	8	0.2790	1.81	45.69	6.08	158.84
S12	Photoheterotroph	6	2.7205	1.88	48.74	0.39	19.67
	Anaerobic-light	8	2.4248	1.67	50.58	0.50	20.86
13	Photoheterotroph	10	2.5843	2.13	58.46	0.78	38.17
	Anaerobic-light	10	2.8112	1.92	63.45	0.53	33.33
14	Photoheterotroph	8	2.8894	1.81	56.55	0.34	23.74
	Anaerobic-light	8	2.7692	1.88	52.76	0.74	20.94

จากตารางที่ 4.2 เมื่อพิจารณาปริมาณผลผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นสูงสุดเป็นมิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่าเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม OS33 ให้ปริมาณผลผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นสูงสุดเนื่องจากมีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งต่ำกว่าสายพันธุ์อื่นๆมาก

เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็น ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ กับเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) พบว่าผลการวิเคราะห์จากเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์สูงกว่ามาก เพราะความยาวคลื่น 275 นาโนเมตรที่ใช้ตรวจวัดปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็นใกล้เคียงกับความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรที่ใช้ตรวจวัดปริมาณกรดอะมิโนบางชนิด รวมถึงกรดนิวคลีอิกด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าผลการวิเคราะห์จากเครื่อง HPLC ในบางตัวอย่างไม่สอดคล้องผลการวิเคราะห์จากเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เนื่องจากผลการวิเคราะห์จากเครื่อง HPLC มี peak รบกวนเกิดขึ้นจำนวนมากประกอบกับตัวอย่างที่นำไปวิเคราะห์มีปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็นอยู่น้อยมาก ในงานวิจัยนี้จึงขออ้างอิงปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็น ที่วัดได้จากเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์เป็นหลัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเชื้อ 2 ระยะ โดยในระยะแรกเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะ Aerobic-Dark จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงในระยะที่สอง ภายใต้สภาวะมีอากาศ (มีแสง) พบว่าเชื้อมีปัญหาในการปรับตัวสู่สภาวะใหม่ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะปริมาณออกซิเจนละลายที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจึงอาจต้องใช้เวลาเพิ่มขึ้นเพื่อให้เชื้อปรับตัวให้เข้ากับสภาวะใหม่

การเจริญของเชื้อ *Rhodospseudomonas* sp. จำนวน 4 สายพันธุ์ ในหลอดทดลอง ชนิดมีฝาเกลียวปิด ภายใต้สภาวะ Photoheterotroph พบว่าระดับความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อ 10 เซนติเมตร และความเข้มแสง 300 ลักซ์ เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อมากที่สุด

การเจริญและการผลิตโคเอนไซม์คิวเทินโดย *Rhodospseudomonas* sp. จำนวน 4 สายพันธุ์ ในขวดแบนที่มีฝาเกลียวปิด ภายใต้สภาวะ Photoheterotroph และ Anaerobic-light ที่ความเข้มแสง 300 ลักซ์ พบว่าในสภาวะ Photoheterotroph ทั้ง 4 สายพันธุ์ เจริญเติบโตและผลิตโคเอนไซม์คิวเทินได้สูงกว่าในสภาวะ Anaerobic-light เล็กน้อยโดยพบว่าจากทั้ง 2 สภาวะ เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์ที่ได้จากเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ สายพันธุ์ดั้งเดิม OS33 ให้ผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทินได้สูงสุด รองลงมาคือสายพันธุ์กลาย 13, สายพันธุ์กลาย 14 และสายพันธุ์ดั้งเดิม S12 ตามลำดับ

จากผลการทดลองพบว่าปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินสูงสุด จะเกิดขึ้นในเวลาเดียวกับที่มีปริมาณเซลล์สูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Yen และ Chiu (2007), Yen และคณะ (2010) ดังนั้นโคเอนไซม์คิวเทินจึงจัดเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์ (Growth associated product)

5.2 ข้อเสนอแนะ

การเพาะเลี้ยงเชื้อในขวดแบนพบว่า เมื่อเซลล์มีอายุมากขึ้น เชื้อจะตกตะกอนและรวมตัวเป็นเมือก (Sheath) อยู่ด้านล่าง ทำให้เกิดปัญหาต่อการให้แสงอย่างทั่วถึงรวมถึงการสัมผัสตัวอย่างอีกด้วย จึงอาจปรับปรุงการเพาะเลี้ยงต่อไปโดยเพิ่มการกวนผสมด้วยเครื่อง Magnetic stirrer ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดปรากฏการณ์ Vortex แต่การเพิ่มการกวนในสภาวะ Photoheterotroph จะทำให้ออกซิเจนละลายลงไปได้มากขึ้น ดังนั้นจึงอาจต้องปรับระดับปริมาณอาหารให้เหมาะสมต่อการเจริญด้วย

การศึกษาในครั้งต่อไปควรประยุกต์ใช้การเลี้ยงเชื้อแบบ Fed-batch ซึ่งจะทำให้ปริมาณเซลล์สะสม และผลผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นสูงขึ้นได้



เอกสารอ้างอิง

- ดวงพร คันธโชติ. 2546. **อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ**. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ. 34-37
- รัศมี เหล็กพรม และจารุพงษ์ แสงบุญมี. 2556. “โคเอนไซม์ คิวเท็น: จากเคมีพื้นฐานสู่การประยุกต์ในทางการแพทย์.” *ศรีนครินทร์เวชสาร*. 28(4) : 589-595
- วิลาวัลย์ เจริญจิระตระกูล. 2540. “การใช้สารอาหารและการสร้างพลังงาน.” **สรีรวิทยาของจุลินทรีย์**. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 37-40
- Akinterinwa, O. and Cirino, P.C. 2010. “Catabolism and Metabolic Fueling Process.” **The Metabolic Pathway Engineering Handbook Fundamentals**. 2 : 1-30.
- Atlas, R. M. 1995. **Principle of Microbiology**. Von Hoffmann Press, Missouri. USA : 528-532
- Beal, MF. 2004. “Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Damage in Alzheimer’s and Parkinson’s Diseases and Coenzyme Q10 as a Potential Treatment.” *J Bioenerg Biomembr*. 36 : 381-6.
- Belardinelli, R. Mucaj, A. and Lacalaprice, F. 2005. “Coenzyme Q10 Improves Contractility Of Dysfunctional Myocardium in Chronic Heart Failure *Biofactors*. 25 : 137-45.
- Belardinelli, R. Mucaj, A. Lacalaprice, F. Solenghi, M. Seddaiu, G. Principi, F. Tiano, L. and Littarru, G. P. 2006. “Coenzyme Q10 and Exercise Training in Chronic Heart Failure.” *European Heart Journal*. 27 : 2675-2681.
- Brock, T. D. and Madigan M. T. 1991. **Biology of Microbiology**. 6th ed. Prantice-Hall. London.
- Bule MV, Singhal RS. 2009. “Use of Carrot Juice and Tomato Juice as Natural Precursors for Enhanced Production of Ubiquinone-10 by *Pseudomonas diminuta* NCIM 2865”. *Food Chem*. 116 : 302-305

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Caillet, J. and Droogmans, L. 1988. "Molecular Cloning of the *Escherichia coli* *miaA* Gene Involved in the Formation of Delta 2-Isopentenyl Adenosine in tRNA." *Journal of Bacteriology*. 170 : 4147-4152.
- Caso, G. 2007. "Effect of Coenzyme q10 on Myopathic Symptoms in Patients Treated with Statins. *Am. J. Cardiol.* 99 : 1409–1412
- Chapidze G, Kapanadze S, Dolidze N, Bachutashvili Z, Latsabidze N. 2005. "Prevention of Coronary Atherosclerosis by the Use of Combination Therapy with Antioxidant Coenzyme Q10 and Statins." *Georgian Med News.* 20-5.
- Chew G. T. Watts G. F. 2004. "Coenzyme Q10 and Diabetic Endotheliopathy: Oxidative Stress and the Recoupling Hypothesis." *QJM.* 97 : 537-48.
- Choi, G. S. Kim, Y. S. Seo, J. H. and Ryu, Y. W. 2005a. "Restricted Electron Flux Increases Coenzyme Q10 Production in *Agrobacterium tumefaciens* ATCC4452." *Process Biochemistry.* 40 : 3225-3229.
- Choi, J. H. Ryu, Y. W. and Seo, J. H. 2005b. "Biotechnological Production and Applications of Coenzyme Q10." *Applied Microbiology and Biotechnology.* 68 : 9-15.
- Choi, J. H. Ryu, Y. W. Park, Y. C. and Seo, J. H. 2009. "Synergistic Effects of Chromosomal *ispB* Deletion and *dxs* Overexpression on Coenzyme Q10 Production in Recombinant *Escherichia coli* Expressing *Agrobacterium tumefaciens dps* Gene." *Journal of Biotechnology.* 144(1) : 64-9.
- Cluis, C. P. Burja, A. M. and Martin, V. J. J. 2007. "Current Prospects for the Production of Coenzyme Q10 in Microbes." *Trends in Biotechnology.* 25 : 514-521.
- Cluis C. P. Pinel D. and Martin V. J. 2012. "The Production of Coenzyme Q10 in Microorganisms." *Subcell. 631. Biochem* 64, 303-326.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Dhanasekaran, M. and Ren, J. 2005. “The Emerging Role of Coenzyme Q10 in Ageing, Neurodegeneration, Cardiovascular Disease, Cancer and Diabetes Mellitus.” *Current Neurovascular Research*. 2 : 447–459.
- Dixson, D. D. Boddy, C. N. Doyle, R. P. 2011. “Reinvestigation of Coenzyme Q10 Isolation from *Sporidiobolus johnsonii*.” *Chem Biodivers*. 8 : 1033–1051
- Fedacko, J. D. Pella, Fedackova, P. Vargova, V. Meester, F. D. Durcikova, P. and Singh, R. B. 2011. “Coenzyme Q10 in Heart and Brain Diseases.” *The Open Nutraceuticals Journal*. 4 : 69-87.
- Grand View Research. 2014. **Coenzyme Q10 (CoQ10) Market Analysis by Application (Dietary Supplements, Pharmaceuticals, Cosmetics) and Segment Forecasts to 2024.** [Online]. Available : <http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/coenzyme-q10-coq10-market>
- Ha, S. J. Kim, S. Y. Seo, H. J. Oh, D. K. and Lee, J. K. 2007a. “Optimization of Culture Conditions and Scale-Up to Pilot and Plant Scales for Coenzyme Q10 Production by *Agrobacterium tumefaciens*.” *Applied Microbiology and Biotechnology*. 74 : 974-980.
- Ha, S. J., Kim, S. Y., Seo, H. J., Moon, H. J., Lee, K. M. and Lee, J. K. 2007b. “Controlling the Sucrose Concentration Increases Coenzyme Q10 Production in Fed Batch Culture of *Agrobacterium tumefaciens*.” *Applied Microbiology and Biotechnology*. 76 : 109-116.
- Ha, S. J. Kim, S. Y. Seo, J. H. Jeya, M. Zhang, Y. W. Ramu, T. Kim, I. W. Lee, J. K. 2009 “Ca²⁺ Increases the Specific Coenzyme Q10 Content in *Agrobacterium tumefaciens*.” *Bioprocess Biosyst Eng*. 32 : 697–700

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Hamano, Y., Dviri, T., Yamamoto, M., Kuzuyama, T., Itoh, N. and Seto, He. 2002. "Grothphasedependent expression of the mevalonate pathway in a terpenoid antibiotic-producing *Streptomyces* strain." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 66(4) : 808-819.
- Hodgson, J. M. 2002. "Coenzyme Q10 Improves Blood Pressure and Glycaemic Control: a Controlled Trial in Subjects with Type 2 Diabetes. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56 : 1137–1142
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. and Williams, S. T. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. Maryland: Williams & Wilkins.
- Hoppe, U. 1999. "Coenzyme Q10, a Cutaneous Antioxidant and Energizer." *Biofactors*. 9 : 371–378
- Imhoff, J. F. and Truper, H. G. 1989. "Purple nonsulfur bacteria." In Staley, J. T. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore : Williams & Wilkins.
- Jeong, S. K. Dao, V. T. Kien, N. and Kim, J. K. 2008. "Effect of pH and Light Irradiation on CoQ10 Production Using *Rhodobacter sphaeroides*." *J. Fish. Sci. Technol.* 11(4) : 219-223
- Jeya, M. Moon, H. J. Lee, J. L. Kim, I. W. and Lee, J. K. 2010. "Current State of Coenzyme Q10 Production and Its Applications." *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85 : 1653-1663.
- Jiang, S. Y. Yu, L. J. 2008. "Increasing CoQ10 Production by *Rhodopseudomonas palustris* J001 Using a Two-Stage Fermentation Process." *Zeitschrift für Naturforschung* 63 : 884-888.
- Kaplan, P. Kucera, I. and Dadak, V. 1993. "Effect of Oxygen on Ubiquinone 10 by *Paracoccus denitrificans*." *Biotechnology Letters*. 15 : 1001-1002.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Kapoor, P. 2013 “Coenzyme Q10 - A Novel Molecule.” *Indian Academy of Clinical Medicine*. 14(1) : 37-45
- Kato, J. I. Fujisaki, S. Nakajima, K. I. Nishimura, Y. Sato, M. and Nakano A. 1999. “The *Escherichia coli* Homologue of Yeast RER2, a Key Enzyme of Dolichol Synthesis, is Essential for Carrier Lipid Formation in Bacterial Cell Wall Synthesis.” *Journal of Bacteriology*. 181 : 2733-2738.
- Kawamukai, M. 2002. “Biosynthesis, Bioproduction, and Novel Roles of Ubiquinone.” *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 94(6) : 511-517.
- Koo, B. S. Gong, Y. J. Kim, S. Y. Kim, C. W. Lee, H. C. 2010. “Improvement of Coenzyme Q10 Production by Increasing the NADH/NAD⁺ Ratio in *Agrobacterium tumefaciens* . *Biosci Biotechnol Biochem*. 74 : 895–898
- Koku, H. Eroglu, I. Gunduz, U. Yucel, M. and Turker, L. 2002. “Aspects of the Metabolism of Hydrogen Production by *Rhodobacter sphaeroides*.” *International Journal of Hydrogen Energy*. 27 : 1315-1329.
- Kumar, A. Kaur, H. Devi, P. and Mohan, V. 2009. “Role of Coenzyme Q10 (CoQ10) in Cardiac Disease, Hypertension and Meniere-like Syndrome.” *Pharmacology & Therapeutics*. 124 : 259-268.
- Lee, J. K. Her, G. Kim, S. Y. and Seo, J. H. 2004. “Cloning and Functional Expression of the *dps* Gene Encoding Decaprenyl Diphosphate Synthase From *Agrobacterium tumefaciens*.” *Biotechnology Progress*. 20 : 51-56.
- Littarru, G. P. and Lambrechts, P. 2011. “Coenzyme Q10: Multiple Benefits in One Ingredient.” *OCL Journal* 18(2) : 76-82.
- Maury, J. Asadollahi, M. Kasper, A. Moller, A. C. and Nielsen J. 2005. “Microbial Isoprenoid Production: an Example of Green Chemistry Through Metabolic Engineering.” *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 100 : 19-51.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Meganathan, R. 2001. "Ubiquinone biosynthesis in microorganisms. FEMS Microbiol Lett 203:131-9
- Ndikubwimana, J. de D. and Lee, H. B. 2014. "Enhanced Production Techniques, Properties and Uses of Coenzyme Q10." *Biotechnology Letters*. 36 : 1917–1926.
- Nichols, B. P and Green, J. M. 1992. "Cloning and Sequencing of *Escherichia coli* UbiC and Purification of Chorismate Lyase." *Journal of Bacteriology*. 174 : 5309-5316.
- Park, Y. C. Kim, S. J. Choi, J. H. Lee, W. H. Park, K. M. Kawamukai, M., Ryu, Y. W. and Seo, J. H. 2005. "Batch and Fed-Batch Production of Coenzyme Q10 in Recombinant *Escherichia coli* Containing the Decaprenyldiphosphate Synthase Gene from *Gluconobacter suboxydans*." *Applied Microbiology and Biotechnology*. 67 : 192-196.
- Qiu L, Ding H, Wang W, Kong Z, Li X, Shi Y, Zhong W. 2012. "Coenzyme Q10 Production by Immobilized *Sphingomonas* sp. ZUTE03 via a Conversion-Extraction Coupled Process in a Three-Phase Fluidized Bed reactor." *Enzym Microb Technol*. 50 : 137–142
- Quinzii, C. M. DiMauro, S and Hirano, M. 2007. "Human Coenzyme Q10 Deficiency." *Neurochem Res*. 32 : 723-7.
- Rohmer, M. Knani, M. H. Simonin, P. Sutter, B. and Sahn, H. 1993. "Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria: a Novel Pathway for the Early Steps Leading to Isopentenyl Diphosphate." *Biochemical Journal*. 295 : 517-524.
- Sakato, K. Tanaka, H. Shibata, S. Kuratsu, Y. 1992. "Agitation-Aeration Studies on Coenzyme Q10 Production Using *Rhodospseudomonas spheroides*." *Biotechnol Appl Biochem*. 16 : 19–22

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Sasaki, K. Watanabe, M. Suda, Y. Ishizuka, A. and Noparatnaraporn, N. 2005. "Applications of Photosynthetic Bacteria for Medical Fields." *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 100 : 481-488.
- Seo, M.J. and Kim, S.O. 2010. "Effect of Limited Oxygen Supply on Coenzyme Q10 Production and Its Relation to Limited Electron Transfer and Oxidative Stress in *Rhizobium radiobacter* T6102." *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 20(2) : 346-349.
- Shults, C. W. 2002. "Effects of Coenzyme Q10 in Early Parkinson Disease: Evidence of Slowing of the Functional Decline." *Arch. Neurol.* 59 : 1541-1550
- Silver MA, Langsjoen PH, Szabo S, Patil H, Zelinger A. 2004. "Effect of Atorvastatin on Left Ventricular Diastolic Function and ability of coenzyme Q10 to reverse that dysfunction." *Am J Cardiol.* 94 : 1306-10.
- Staley, J. T. Bryant, M. P. Pfennig, N and Holt, J. G. 1989. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 3rd ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore. 2298 pp.
- Sybesma, R. 1970. "Photometabolism of Organic Substrate in Photobiology of Microorganism." Edited by Halldal, P. London, Bartholomew Press. 85-121
- Tian, Y. Yue, T. Yuan, Y. Soma, P. K. and Lo, Y. M. 2010a. "Improvement of Cultivation Medium for Enhanced Production of Coenzyme Q10 by Photosynthetic *Rhodospirillum rubrum*." *Biochemical Engineering Journal*. 51 : 160-166.
- Tian, Y. Yue, T. Yuan, Y. Soma, P. K. Williams, P. D. Machado, H. F. Kratochvil R. J. Wei, C-i. and Lo, Y. M. 2010b. "Tobacco Biomass Hydrolysate Enhances Coenzyme Q10 Production Using Photosynthetic *Rhodospirillum rubrum*." *Bioresour Technol*. 101 : 7877-7881.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Vermeglio, A. Joliot, P. 1999. “The Photosynthetic Apparatus of *Rhodobacter sphaeroides*.” *Trends Microbiol.* 7 : 435–440
- West, D. D. 2004. Synthesis of coenzyme Q10, Ubiquinone.US 6,686,485 B2.
- Whitmarsh, J. and Govindjee. 1995. “The Photosynthetic Process”. Published in *Encyclopedia of Applied Physics.* 11-51.
- Wu, Z., Du G. and Chen J. 2003. “Effect of Dissolved Oxygen Concentration and DO-Stat Feeding Strategy on CoQ10 Production with *Rhizobium radiobacter*.” *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 19 : 925-928.
- Wu, S. and Tsai, J. J. 2013. “Separation and Purification of Coenzyme Q10 from *Rhodobacter sphaeroides*.” *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers.* 44 : 872-878.
- Yen, H. W. and Chiu, C. H. 2007. “The Influences of Aerobic-Dark and Anaerobic-Light Cultivation on CoQ10 Production by *Rhodobacter sphaeroides* in the Submerged Fermenter.” *Enzyme and Microbial Technology.* 41 : 600-604.
- Yen, H. W., Chiu, C. H. and Kang J. L. 2010. “Cultivation of *Rhodobacter sphaeroides* in the Stirred Bioreactor with Different Feeding Strategies for CoQ10 Production.” *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 160 : 1441-1449.
- Yen, H. W. and Shih, T. Y. 2009. “Coenzyme Q10 Production by *Rhodobacter sphaeroides* in Stirred Tank and in Airlift Bioreactor.” *Bioprocess Biosyst Eng* 32 : 711–716
- Yoshida, H.Kotani, Y.Ochiai, K. and Araki, K. 1998. “Production of Ubiquinone-10 Using Bacteria.” *Journal of General and Applied Microbiology.* 44 : 19-26

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Zahiria, H. S., Yoon, S. H., Keasling, J. D., Lee, S. H., Kim, S. W., Yoon, S. C. & Shin, Y. C. 2006. “Coenzyme Q10 Production in Recombinant *Escherichia coli* Strains Engineered with a Heterologous Decaprenyl Diphosphate Synthase Gene and Foreign Mevalonate Pathway.” *Metabolic Engineering*. 8 : 406-416.

Zhong, W., Wang, W., Kong, Z., Wu, B., Zhong, L., Li, X., Yu, J. and Zhang, F. 2011. “Coenzyme Q10 Production Directly from Precursors by Free and Gelentrapped *Sphingomonas* sp. ZUTE03 in a Water-Organic Solvent, Two Phase Conversion System.” *Applied Microbiology and Biotechnology*. 89 : 293-302



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์

1. การวัดค่าความขุ่นของเซลล์ในกรณีที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

นำน้ำหมักมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วแยกส่วนใส่ออก นำตะกอนที่ได้มาละลายในน้ำร้อน 100 องศาเซลเซียส เพื่อกำจัดแป้งมันสำปะหลังที่ติดมากับตัวอย่าง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง ทำเช่นนี้ 2-3 ครั้ง จนกำจัดแป้งมันสำปะหลังได้หมด จากนั้นนำเซลล์ไปละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเท่าเดิม แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักรวมเซลล์แห้ง

เก็บตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตร บรรจุลงในหลอดไมโครทิวบ์ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว รอบ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นจำนวนสองรอบ แล้วนำเซลล์ที่ได้นำไปอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนกว่า น้ำหนักจะคงที่ ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนักเซลล์ที่ได้

3. การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียโอสโตรฟีลล์ (ดัดแปลงจาก Cohen-Bazire และคณะ, 1957)

นำตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตร บรรจุลงในหลอดไมโครทิวบ์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง นำเฉพาะตะกอนเซลล์ไปสกัดด้วยสารละลายผสมของอะซีโตนต่อเมทานอล ในอัตราส่วน 7:2 (v/v) ในที่มืด เป็นเวลา 150 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 770 นาโนเมตร

4. การสกัดและวิเคราะห์ปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็น

นำตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตร บรรจุลงในหลอดไมโครทิวบ์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสทิ้ง นำเฉพาะตะกอนเซลล์ไปสกัดด้วยสารละลายผสมของเฮกเซนต่อเมทานอล ในอัตราส่วน 2:1 (v/v) ในที่มืด เป็นเวลา 120 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นำเฉพาะส่วนใสของเมทานอลด้านล่างไปวิเคราะห์อย่างหยาบด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร แล้วคัดเลือกตัวอย่างที่มีค่าสูงนำไปวิเคราะห์อย่างละเอียดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

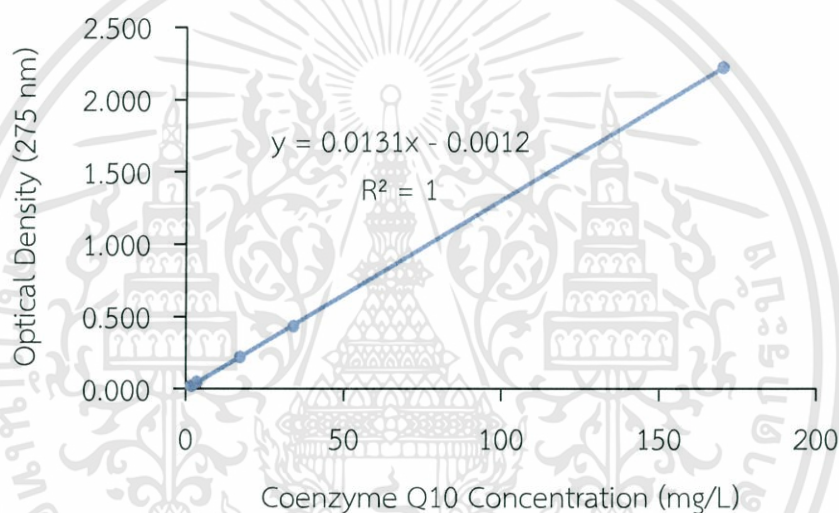
5. การสร้างกราฟมาตรฐานโคเอนไซม์คิวเท็นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

4.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานโคเอนไซม์คิวเท็นเข้มข้น 1.7 กรัมต่อลิตร โดยชั่งสารมาตรฐานโคเอนไซม์คิวเท็น 1.7 มิลลิกรัม ละลายด้วยเอทานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร

4.2 นำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้ในข้อ 4.1 เจือจางลงด้วยเอทานอลให้ได้ความเข้มข้น 170, 34, 17, 3.4 และ 1.7 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.3 นำสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ผสมกับเมทานอล 100 ไมโครลิตร

4.4 นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอลต่อเอทานอล ในอัตราส่วน 1:9 (v/v) เป็น blank



รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานโคเอนไซม์คิวเท็น โดยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

6. การวิเคราะห์ปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็นด้วยด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

6.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างที่สกัดได้มาจากเมทานอลปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับเอทานอล 900 ไมโครลิตร กรองด้วย filter membrane ขนาด 0.45 นาโนเมตร แล้วเก็บรักษาในที่มืด เตรียมสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ในขั้นต่อไปสร้างกราฟมาตรฐาน

6.2 การสร้างกราฟมาตรฐานโคเอนไซม์คิวเทินด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลว สมรรถนะสูง

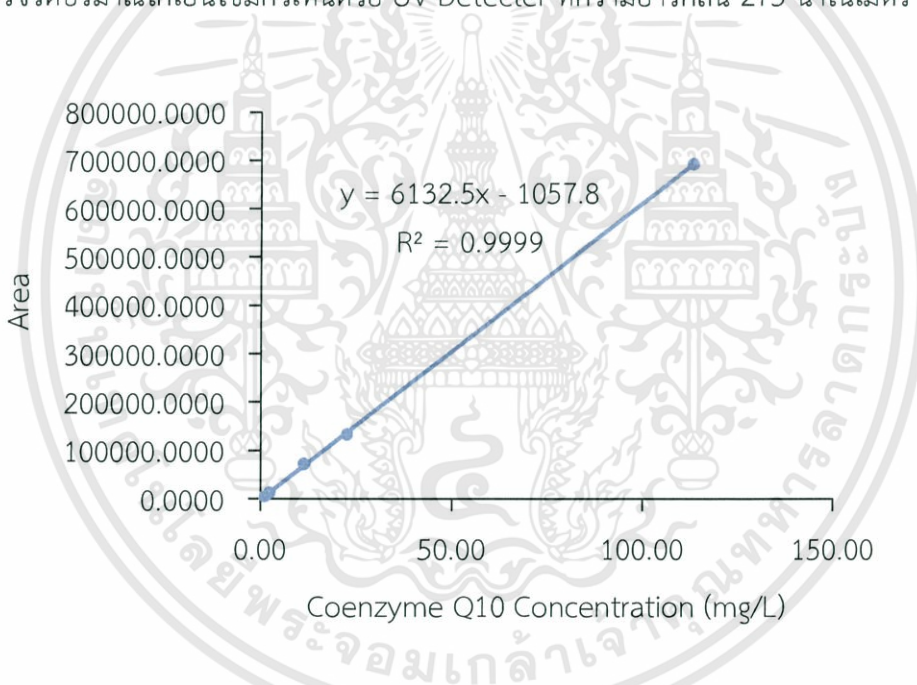
6.2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานโคเอนไซม์คิวเทินเข้มข้น 1.13 กรัมต่อลิตร โดยชั่ง
สารมาตรฐานโคเอนไซม์คิวเทิน 1.7 มิลลิกรัม ละลายด้วยเอทานอลปริมาตร 1.5 มิลลิตร

6.2.2 นำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้ในข้อ 5.1 เจือจางลงด้วยเอทานอลให้ได้
ความเข้มข้น 113, 22.60, 11.30, 2.26 และ 1.13 มิลลิกรัมต่อลิตร

6.2.3 นำสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ผสมกับ
เมทานอล 100 ไมโครลิตร

6.2.4 นำสารละลายผสมที่ได้กรองด้วย filter membrane ขนาด 0.45 นาโนเมตร

6.2.5 วิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้คอลัมน์ชนิด
C18 เฟสเคลื่อนที่คือ เมทานอลต่อเอทานอล ในอัตราส่วน 1:9 (v/v) ที่อัตราการไหล 1 มิลลิตรต่อ
นาที ตรวจวัดปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินด้วย UV-Detector ที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร



รูปที่ 2 กราฟมาตรฐานโคเอนไซม์คิวเทิน โดยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ภาคผนวก ข

รูปจากการทดลอง



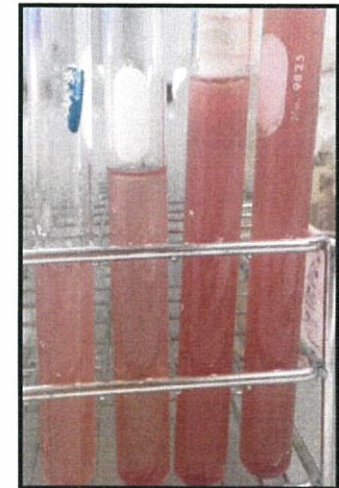
(a)



(b)



(c)



(d)

รูปที่ 4.12 ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodospseudomonas* sp. สภาวะ Photoheterotroph ในหลอดทดลอง กำหนดความสูงของปริมาตรอาหารแตกต่างกันดังนี้ 6 เซนติเมตร, 8 เซนติเมตร, 10 เซนติเมตร และ 12 เซนติเมตร ที่ความเข้มแสง 300 ลักซ์ อุณหภูมิ 35-45 องศาเซลเซียส (a) *Rhodospseudomonas* sp. OS33, (b) *Rhodospseudomonas* sp. S12, (c) *Rhodospseudomonas* sp. 13 และ (d) *Rhodospseudomonas* sp. 14

วันที่ 2

วันที่ 4

วันที่ 6

วันที่ 8

วันที่ 10

วันที่ 12

วันที่ 14



(a)



(b)

รูปที่ 4.13

ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodospseudomonas* sp. สายพันธุ์ OS33 ในขวดทรงแบน ที่ความสูงของปริมาตรอาหาร 10 เซนติเมตร ความเข้มแสง 300 ลักซ์ อุณหภูมิ 35-45 องศาเซลเซียส (a). สภาวะ Anaerobic light (b). สภาวะ Photoheterotroph

วันที่ 2

วันที่ 4

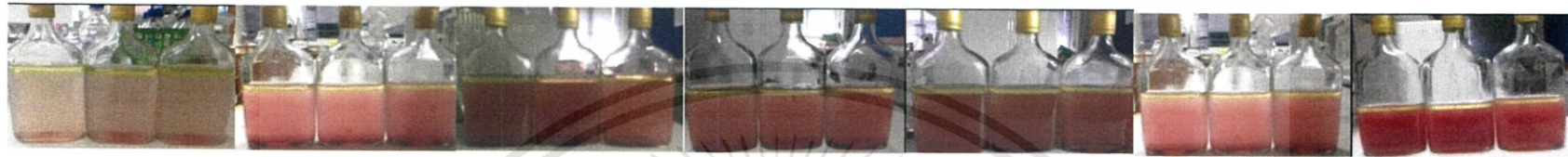
วันที่ 6

วันที่ 8

วันที่ 10

วันที่ 12

วันที่ 14



(a)



(b)

รูปที่ 4.14

ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 ในขวดทรงแบน ที่ความสูงของปริมาณอาหาร 10 เซนติเมตร ความเข้มแสง 300 ลักซ์ อุณหภูมิ 35-45 องศาเซลเซียส (a). สภาวะ Anaerobic light (b). สภาวะ Photoheterotroph

วันที่ 2

วันที่ 4

วันที่ 6

วันที่ 8

วันที่ 10

วันที่ 12

วันที่ 14



(a)



(b)

รูปที่ 4.15

ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodospseudomonas* sp. สายพันธุ์ 13 ในขวดทรงแบน ที่ความสูงของปริมาตรอาหาร 10 เซนติเมตร ความเข้มแสง 300 ลักซ์ อุณหภูมิ 35-45 องศาเซลเซียส (a). สภาวะ Anaerobic light (b). สภาวะ Photoheterotroph

วันที่ 2

วันที่ 4

วันที่ 6

วันที่ 8

วันที่ 10

วันที่ 12

วันที่ 14



(a)



(b)

รูปที่ 4.16

ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodospseudomonas* sp. สายพันธุ์ 14 ในขวดทรงแบน ที่ความสูงของปริมาตรอาหาร 10 เซนติเมตร ความเข้มแสง 300 ลักซ์ อุณหภูมิ 35-45 องศาเซลเซียส (a). สภาวะ Anaerobic light (b). สภาวะ Photoheterotroph