

## การผลิตโคเอนไซม์คิวเทนและแคโรทีนอยด์จากการเลี้ยงเชื้อ

*Rhodopseudomonas* sp. OS33-UV13-5

โดยใช้แป้งดิบเป็นแหล่งคาร์บอน

Production of Coenzyme Q10 and Carotenoid by Cultivation of

*Rhodopseudomonas* sp. OS33-UV13-5 Using

Raw Starch as Carbon Source

สมชาย ไกรรักษ์<sup>1\*</sup>

Somchai Krairak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

<sup>1</sup>Department of Biology, School of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

วันที่ส่งบทความ : 29 พฤศจิกายน 2566 วันที่แก้ไขบทความ : 12 ธันวาคม 2566 วันที่ตอบรับบทความ : 28 ธันวาคม 2566

Received: 29 November 2023, Revised: 12 December 2023, Accepted: 28 December 2023

### บทคัดย่อ

*Rhodopseudomonas* sp. OS33-UV13-5 เป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์กลายที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์ของ *Rhodopseudomonas* sp. OS33 ด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต *Rhodopseudomonas* sp. OS33-UV13-5 มีคุณสมบัติในการย่อยแป้งดิบ ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการแก้ปัญหาความหนืดของอาหารเพาะเลี้ยง และลดการใช้พลังงานจากการใช้แป้งดิบเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากเชื้อสามารถย่อยสลายอนุภาคแป้งได้โดยตรง จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเจริญเติบโต การผลิตแคโรทีนอยด์ และโคเอนไซม์คิวเทน พบว่า *Rhodopseudomonas* sp. OS33-UV13-5 มีการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ  $11.82 \pm 0.935$  U<sub>770nm</sub> ซึ่งมีการผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดเท่ากับ  $15.67 \pm 1.137$  มิลลิกรัมต่อลิตร และการผลิตโคเอนไซม์คิวเทน สูงสุดเท่ากับ  $288.79 \pm 20.132$  ไมโครกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแป้งดิบความเข้มข้น 300 กรัมต่อลิตร ภายใต้ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ โดยคิดเป็น 5.65, 2.00 และ 1.44 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแป้งดิบความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ การเจริญเติบโตในสภาวะที่เหมาะสมนี้ส่งผลให้การใช้กลูโคสของเชื้อ และการย่อยสลายแป้งดิบไปเป็นกลูโคสดำเนินไปอย่างเหมาะสม โดยให้ปริมาณกลูโคสที่มีค่าต่ำกว่า 2.0 กรัมต่อลิตร ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งส่งผลต่อการเจริญเติบโต การผลิตแคโรทีนอยด์ และโคเอนไซม์คิวเทน นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโต และกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสที่ย่อยสลายแป้ง

---

\*ที่อยู่ติดต่อ E-mail address: kksomcha@kmitl.ac.th

ดิบในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ โดยตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ พบปริมาณกลูโคสในอาหารที่ระดับความเข้มข้น  $0.12 \pm 0.08$  ถึง  $1.18 \pm 0.15$  กรัมต่อลิตร

**คำสำคัญ :** แบคทีเรียสังเคราะห์แสง แบ่งดิบ เอนไซม์ย่อยสลายแป้งดิบ

## Abstract

*Rhodopseudomonas* sp. OS33-UV13-5 is the photosynthetic bacterial mutant strain obtained from a genetic improvement of *Rhodopseudomonas* sp. OS33 by UV irradiation. *Rhodopseudomonas* sp. OS33-UV13-5 showed the ability to digest raw starch, resulting in a problem-solving of the medium viscosity and a decrease in an energy consumption due to the direct degradation of raw starch particles. The result showed that *Rhodopseudomonas* sp. OS33-UV13-5 gave the highest growth at  $11.82 \pm 0.935$  U<sub>770nm</sub>, carotenoid concentration of  $15.67 \pm 1.137$  mg/L, and coenzyme Q10 concentration of  $288.79 \pm 20.132$  µg/L in cells cultivated in medium containing 300 g/L of raw starch under light intensity of 1,500 lux. They were 5.65, 2.00, and 1.44 times, respectively, higher than those from cells cultivated in medium containing 10 g/L of raw starch under light intensity of 1,000 lux. Under optimal conditions, a promising hydrolysis of raw starch to glucose as well as glucose utilization provided the lower glucose concentration than 2.0 g/L during a cultivation which promoted not only bacterial growth but also a production of carotenoid and coenzyme Q10. Finally, the relationship between the growth and raw starch amylase activity was demonstrated. During the cultivation of *Rhodopseudomonas* sp. OS33-UV13-5, the glucose level was found at  $0.12 \pm 0.08$  to  $1.18 \pm 0.15$  g/L.

**Keywords:** Photosynthetic bacteria, Raw starch, Raw starch digestive enzyme

## 1. บทนำ

*Rhodopseudomonas palustris* จัดเป็นจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงในกลุ่มสีม่วงไม่สะสมกำมะถัน (Purple non-sulfur bacteria: PNSB) เจริญภายใต้สภาวะที่มีแสงและไม่มีออกซิเจน หรือไม่มีแสงและมีออกซิเจน [1] *R. palustris* สามารถแบ่งการเจริญเป็น 4 ประเภท ได้แก่ Photoautotrophic, Photoheterotrophic, Chemoheterotrophic และ Chemoautotrophic โดยปรับเปลี่ยนรูปแบบการเจริญไปตามเงื่อนไขของสภาพแวดล้อม เช่น การเจริญในสภาวะที่ใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน สามารถตรึงคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อสร้างเป็นสารเมตาบอไลต์ [2] รวมถึงการนำกรดอินทรีย์สายสั้น หรือ พอลิเมอร์สายยาว มาใช้เพื่อการเจริญเติบโตได้ดี เพราะมีความสามารถย่อยสลายแหล่งคาร์บอนได้หลากหลาย [3] ความสามารถของ *R. palustris* ในการใช้วัตถุดิบตั้งต้นเหล่านี้ช่วยลดต้นทุนในภาคอุตสาหกรรม และเป็น

ประโยชน์ต่อสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะการลดความเป็นพิษทางชีวภาพ [4] โดยทั่วไปแล้ว *R. palustris* นิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และการบำบัดน้ำเสีย เพราะสามารถปรับปรุงสภาพน้ำที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและปรับพีเอชให้คงที่ [5]-[6] ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อการสร้างภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิตในน้ำและป้องกันการเกิดโรค [7] *R. palustris* สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ แคโรทีนอยด์ โคเอนไซม์คิวเทน แอสต้าแซนทีน และ ไขมันโอเมก้า 3 รวมถึง โปรตีน วิตามิน พอลิแซ็กคาไรด์ กรดแพนโทนิค และกรดโฟลิก ซึ่งนำมาใช้เป็นอาหารเสริม [8]-[9] โคเอนไซม์คิวเทนถูกนำมาใช้เป็นอาหารเสริมมากเป็นลำดับที่ 3 รองจากน้ำมันปลา และวิตามินรวม [10] เนื่องจากมีความเกี่ยวข้องกับโรคต่าง ๆ เช่น ความผิดปกติของระบบประสาท (โรคอัลไซเมอร์ โรคฮันติงตัน และโรคพาร์กินสัน) โรคหัวใจและหลอดเลือด ความผิดปกติของเยื่อปมั่งหลอดเลือด โรคไต และอื่นๆ [11] *R. palustris* ผลิตแคโรทีนอยด์ ได้แก่ โรโดพินกลูโคไซด์ (Rhodopin glucoside) โรโดไวบริน (Rhodovibrin) แอนไฮโดรโรโดไวบริน (Anhydrorhodovibrin) สไปริลโลแซนธิน (Spirilloxanthin) และไลโคพีน (Lycopene) [12]-[13] ซึ่งใช้เป็นสีผสมอาหาร และสารต้านอนุมูลอิสระ [13]-[14] จากการวิเคราะห์พันธุกรรมของ *R. palustris* พบว่ามียีนจำนวนมากที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติก แสดงให้เห็นลักษณะเด่นในการย่อยสลายทางชีวภาพ [2] นอกจากนี้ *R. palustris* ยังมีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการผลิตไฮโดรเจน [15] โดยใช้แป้งสุกและแป้งดิบเป็นแหล่งโปรตอน [16]-[18]

แป้งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่สะสมมากที่สุดในพื้นที่ มีราคาถูก เหมาะสำหรับการใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพ [19] การเปลี่ยนแป้งเป็นกลูโคสต้องใช้ 2 กระบวนการ คือ การทำให้เป็นของเหลว และการทำให้เป็นน้ำตาล ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ใช้พลังงานมาก งานวิจัยต่าง ๆ จึงมุ่งลดการใช้พลังงาน โดยศึกษาเอนไซม์อะไมเลสที่ย่อยสลายแป้งดิบ (Raw starch amylase) โดยสามารถทำปฏิกิริยากับเม็ดแป้งโดยตรง งานวิจัยนี้ จึงสนใจนำ *Rhodospseudomonas* sp. OS33 สายพันธุ์พ่อแม่ (Wild type) ที่สามารถย่อยสลายแป้งสุก [20] มาศึกษาการปรับปรุงพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต และคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่สามารถเจริญและย่อยสลายแป้งดิบ จากนั้นนำสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกมาศึกษาความเข้มข้นของแป้งดิบและความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการเจริญ การผลิตโคเอนไซม์คิวเทน และแคโรทีนอยด์

## 2. วิธีการทดลอง

### 2.1 จุลินทรีย์และสารเคมี

*Rhodospseudomonas* sp. OS33 สามารถเจริญในอาหารที่มีแป้งสุกเป็นแหล่งคาร์บอน [20] แป้ง (แป้งมันสำปะหลังตราปลามังกร) ไคตินผง (Chitin powder) และไคตินแผ่น (Chitin flake) (ยี่ห้อ Himedia, India) โคเอนไซม์คิวเทน และแคโรทีนอยด์ (ยี่ห้อ Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

### 2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Cooked starch medium [20] ประกอบด้วยแป้ง 10 กรัม โซเดียมกลูตาเมต 10 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัม และสารสกัดจากยีสต์ 1 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที อาหารเลี้ยงเชื้อ Raw starch medium เตรียมโดย ขวดที่ 1 ใส่แป้ง 10 กรัม และ ขวดที่ 2 ใส่โซเดียมกลูตาเมต 10 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1

กรัม สารสกัดจากยีสต์ 1 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำขวดที่ 1 และ 2 ไปทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากอุณหภูมิอาหารลดลง จึงนำขวดทั้ง 2 มาผสมกันในสภาวะปลอดเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อ Chitin powder medium และ Chitin flake medium เตรียมโดยใช้ไคตินผงและไคตินแผ่น 10 กรัม ตามลำดับ แขนง และนำไปทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### 2.3 การกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตและการคัดแยกเชื้อ

นำเชื้อ *Rhodopseudomonas* OS33 ที่เจริญในอาหารวุ้น (Deep tube) ปริมาณ 1 หลบ มาใส่ในอาหารเหลว Starch medium ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบ ปิดทับผิวหน้าอาหารเหลวด้วยพาราฟินเหลวปลอดเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ โดยใช้หลอดไฟทังสเตน กำลังไฟ 60 วัตต์ และวัดความเข้มแสงด้วยเครื่อง Testo 545 (ยี่ห้อ AG, Germany) เป็นเวลา 7 วัน นำเชื้อปริมาณ 10 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเชื้อเพื่อรับแสงอัลตราไวโอเล็ต (253 นาโนเมตร, TUV30W, Phillips) ที่ระยะห่าง 30 เซนติเมตร เก็บตัวอย่างที่เวลา 3-15 นาที แล้วนำตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร ไปกระจายบนอาหารแข็ง Raw starch medium บ่มในสภาพไร้อากาศที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 10 วัน นำโคโลนีที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ และนำมาลากบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง Raw starch medium บ่มในสภาพไร้อากาศที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทดสอบละลายไโอดีนในจานเพาะเชื้อ สังเกตและวัดขนาดบริเวณใส (Clear zone)

### 2.4 การเตรียมเชื้อเริ่มต้นและสภาวะการเลี้ยงเชื้อ

นำเชื้อ *Rhodopseudomonas* OS33-UV13-5 สายพันธุ์กลายที่เจริญในอาหารวุ้นปริมาณ 1 หลบ มาใส่ในอาหารเหลว Raw starch medium ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบ ปิดทับผิวหน้าอาหารเหลวด้วยพาราฟินเหลวปลอดเชื้อ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 7-10 วัน เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น

### 2.5 ศึกษาการเจริญในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

เตรียมอาหารเหลว Cooked starch medium, Raw starch medium, Chitin powder medium และ Chitin flake medium ปริมาตร 180 มิลลิลิตร ในขวดตูแรนปริมาตร 250 มิลลิลิตร ใส่เชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ จากนั้น นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 15 วัน เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียโอคโลโรฟิลล์ (Bacteriochlorophylls: Bchl) กลูโคส เอ็นอะซีทิลกลูโคซามีน (N-acetyl glucosamine: NAG) โคเอนไซม์คิวเทน และแคโรทีนอยด์

## 2.6 ศึกษาการเจริญในอาหารเหลวแบ่งดิบเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสม

เตรียมอาหารเหลว Raw starch medium ที่ความเข้มข้นของแป้งดิบ 10, 50, 100, 200, 300, 400 และ 500 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 180 มิลลิลิตร ลงในขวดดูแรนปริมาตร 250 มิลลิลิตร จากนั้น ใส่เชื้อเริ่มต้นปริมาตร 1 เปอร์เซ็นต์ และนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 15 วัน เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรีย-โอสคลอโรฟิลล์ กลูโคส โคเอนไซม์คิวเทน และแคโรทีนอยด์

## 2.7 ศึกษาการเจริญภายใต้ความเข้มแสงที่เหมาะสม

เตรียมอาหารเหลว Raw starch medium ความเข้มข้น 300 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 180 มิลลิลิตร ลงในขวดดูแรนปริมาตร 250 มิลลิลิตร จากนั้นใส่เชื้อเริ่มต้นปริมาตร 1 เปอร์เซ็นต์ และนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 500, 1,000, 1,500 และ 2,000 ลักซ์ โดยเพิ่มปริมาณหลอดไฟทั้งสแตนด์ และวัดความเข้มแสงด้วยเครื่อง Testo 545 เป็นเวลา 15 วัน เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรีย-โอสคลอโรฟิลล์ กลูโคส โคเอนไซม์คิวเทน และแคโรทีนอยด์

## 2.8 การวิเคราะห์แบคทีเรียโอสคลอโรฟิลล์

วัดความหนาแน่นของเซลล์ *Rhodospseudomonas* sp. OS33-UV13-5 ด้วยวิธีการสกัดแบคทีเรีย-โอสคลอโรฟิลล์ โดยนำตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนที่ได้ไปสกัดด้วยสารละลายผสมของอะซิโตนและเมทานอล ในอัตราส่วน 7 ต่อ 2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 150 นาที ในสภาวะไร้แสง จากนั้นนำส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 770 นาโนเมตร [21]

## 2.9 การวิเคราะห์เอ็นอะซิติกกลูโคซามีน

นำตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใสเพื่อวัดปริมาณเอ็นอะซิติกกลูโคซามีนด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) method [22] นำส่วนใส 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DNS reagent 1 มิลลิลิตร นำไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำให้เย็นและเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับค่าของสารละลายมาตรฐานเอ็นอะซิติกกลูโคซามีน

## 2.10 การวิเคราะห์โคเอนไซม์คิวเทน

นำตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 15 นาที จากนั้นนำตะกอนที่ได้ไปสกัดด้วยสารละลายผสมของเอทานอลและเฮกเซน ในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 60 นาที ภายใต้สภาวะไร้แสง จากนั้นนำส่วนใสด้านล่าง (Heavy phase) ไปวิเคราะห์ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทนด้วยเครื่อง High-performance liquid chromatography (HPLC) (รุ่น LC-10AD, Shimadzu, Columbia, MD) โดยใช้คอลัมน์  $\mu$ Bondapak C18 (3.9 mm  $\times$  300 mm, Waters, Milford, MA) วิเคราะห์ด้วย UV detector (SPD-10A, Shimadzu, Columbia, MD) และ

ใช้เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) เป็นสารละลายผสมของเอทานอลต่อเมทานอล ในอัตราส่วน 9 ต่อ 1 ที่ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับค่าของสารละลายมาตรฐานโคเอนไซม์คิวเทน [23]-[24]

### 2.11 การวิเคราะห์แคโรทีนอยด์

นำตัวอย่างน้ำมันหักปริมาณ 5 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำตะกอนที่ได้ไปสกัดแคโรทีนอยด์ด้วยสารละลายผสมของอะซิโตนและเมทานอล ในอัตราส่วน 7 ต่อ 2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร [25]-[26] และคำนวณความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ (C) ด้วยสมการ (1)

$$C = D.V.F.(10/2500) \quad (1)$$

เมื่อ C = ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)  
D = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร  
V = ปริมาตรตัวอย่าง (5 ml)  
F = ค่าการเจือจาง  
2500 = สัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงของแคโรทีนอยด์ (Extinction co-efficient)

### 2.12 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ย่อยแป้งดิบ

ของผสมของปฏิกิริยาการย่อยแป้งดิบ (Reaction mixture) ประกอบด้วยสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร และสารละลายน้ำแป้งดิบ 20 กรัมต่อลิตร (ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ ค่าพีเอช 6.8) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนใส (หลังจากการปั่นเหวี่ยง 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที) มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS method [19] เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานกลูโคส โดยกำหนดให้ 1 หน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายแป้งดิบ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายแป้งดิบไปเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ 0.1 ไมโครโมล ( $\mu\text{mol}$ ) ในเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส [18]

### 3. ผลการทดลองและวิจารณ์

#### 3.1 การกลายพันธุ์

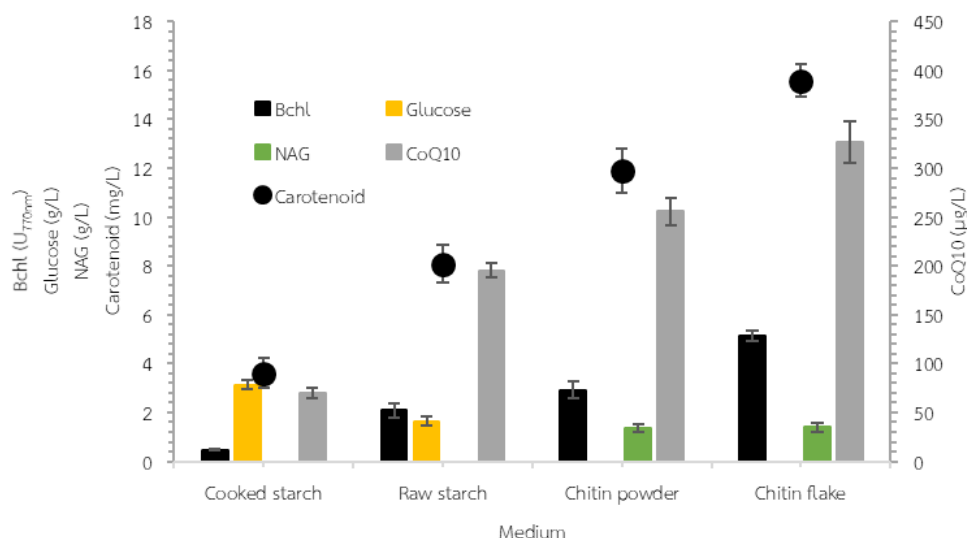
จากการศึกษาการย่อยสลายแป้งดิบของ *Rhodopseudomonas* sp. OS33 สายพันธุ์พ่อแม่ที่เจริญบนอาหารแข็ง Raw starch medium โดยย้อมด้วยไอโอดีน พบว่าไม่มีการสร้างบริเวณสีที่บ่งชี้ถึงการย่อยสลายแป้ง หลังจากการนำ *Rhodopseudomonas* sp. OS33 มาปรับปรุงพันธุ์ด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตพบว่าสามารถคัดแยกสายพันธุ์กลายบนอาหารแข็ง Raw starch medium ที่มีการสร้างบริเวณสี ได้จำนวน 27 ไอโซเลท โดยแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 สร้างบริเวณสีน้อยกว่า 0.2 เซนติเมตร จำนวน 20 ไอโซเลท กลุ่มที่ 2 สร้างบริเวณสีขนาด 0.2 ถึง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 5 ไอโซเลท และกลุ่มที่ 3 สร้างบริเวณสีมากกว่า 0.5 เซนติเมตร จำนวน 2 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยพบว่าเชื้อกลุ่มที่ 3 ไอโซเลท 13-5 สร้างบริเวณสีได้ 1.1 เซนติเมตร ซึ่งสูงกว่าไอโซเลท 11-7 ที่สร้างบริเวณสีได้ 0.7 เซนติเมตร จึงคัดเลือกไอโซเลท 13-5 ไปทำการศึกษาต่อไป โดยกำหนดชื่อเป็น *Rhodopseudomonas* sp. OS33-UV13-5

**ตารางที่ 1.** การสร้างบริเวณสีของเชื้อกลายพันธุ์จาก *Rhodopseudomonas* sp. OS33 ที่เจริญบนอาหารแข็ง Raw starch medium อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 15 วัน และทดสอบบริเวณสีด้วยสารละลายไอโอดีน

| บริเวณสี                               | เชื้อสายพันธุ์กลาย                                                                                                     |
|----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| กลุ่ม 1 บริเวณสีน้อยกว่า 0.2 ซม.       | ไอโซเลท 7-1, 7-2, 7-4, 7-5, 9-1, 9-2, 9-3, 9-4, 9-6, 9-7, 9-8, 9-10, 11-1, 11-2, 11-3, 11-4, 11-6, 13-1, 13-2 และ 13.4 |
| กลุ่มที่ 2 บริเวณสีระหว่าง 0.2-0.5 ซม. | ไอโซเลท 7-3, 9-5, 9-9, 11-5 และ 13-3                                                                                   |
| กลุ่มที่ 3 บริเวณสีมากกว่า 0.5 ซม.     | ไอโซเลท 11-7 และ 13-5                                                                                                  |

#### 3.2 การเจริญในอาหารแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. OS33-UV13-5 สายพันธุ์กลาย ในแหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ Cooked starch medium, Raw starch medium, Chitin powder medium และ Chitin flake medium หลังจากใส่เชื้อเริ่มต้นลงในอาหารเหลว แล้วนำไปหมักบนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 15 วัน นำตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียโอสโตรโรฟิลล์ กลูโคส เอ็นอะซีทิลกลูโคซามีน แครทีนอยด์ และโคเอนไซม์คิวเทน ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 1



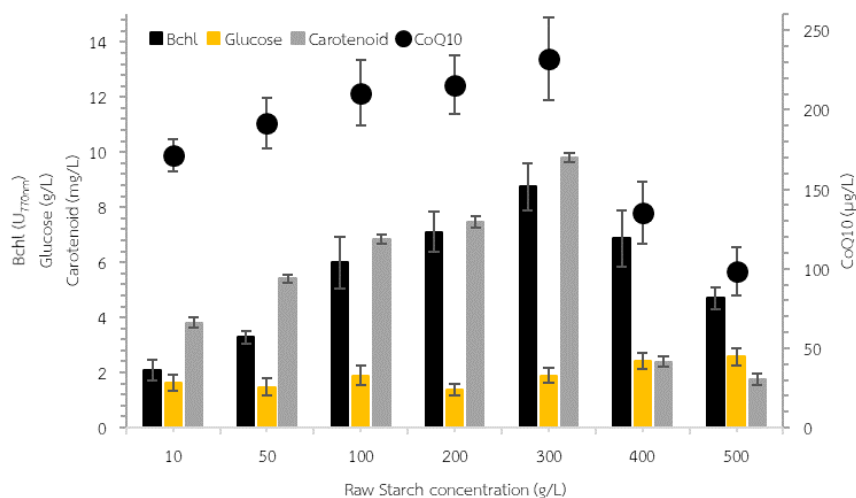
รูปที่ 1. ปริมาณแบคทีเรียโคลอโรฟิลล์ (Bchl) กลูโคส เอ็นอะซิติกกลูโคซามีน (NAG) แคโรทีนอยด์ และโคเอนไซม์คิวเทน ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. OS33-UV13-5 สายพันธุ์กลาย ที่เจริญในอาหารเหลว

เมื่อเพาะเลี้ยง *Rhodopseudomonas* sp. OS33-UV13-5 สายพันธุ์กลาย ใน Cooked starch medium เชื้อมีปริมาณแบคทีเรียโคลอโรฟิลล์ต่ำเท่ากับ  $0.48 \pm 0.03$  U<sub>770nm</sub> มีปริมาณกลูโคสในอาหารเหลวสูงเท่ากับ  $3.14 \pm 0.18$  กรัมต่อลิตร และมีการผลิตแคโรทีนอยด์ และโคเอนไซม์คิวเทนน้อยที่สุด เมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น แสดงว่าแป้งสุกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อสายพันธุ์กลาย เมื่อศึกษาการเจริญใน Raw starch medium กรณีสตาร์ชเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *Rhodopseudomonas* sp. OS33-UV13-5 สายพันธุ์กลาย ให้ปริมาณแบคทีเรียโคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้นเท่ากับ  $2.09 \pm 0.29$  U<sub>770nm</sub> ในขณะที่ปริมาณกลูโคสในอาหารเหลวลดลงเท่ากับ  $1.64 \pm 0.19$  กรัมต่อลิตร ซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ นอกจากนี้ ยังให้การผลิตแคโรทีนอยด์สูงเท่ากับ  $7.81 \pm 0.28$  มิลลิกรัมต่อลิตร และผลิตโคเอนไซม์คิวเทนสูงเท่ากับ  $201.76 \pm 19.18$  ไมโครกรัมต่อลิตร ผลจากการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยที่พบว่า กลูโคสที่ความเข้มข้นมากกว่า 2.0 กรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *Rhodopseudomonas spheroides* [27] แต่กรณีที่ความเข้มข้นของกลูโคสน้อยกว่า 0.2 มิลลิโมลาร์ จะไม่ยับยั้งการเจริญของ *Rhodopseudomonas capsulata* ได้ [28] ในขณะที่การเพาะเลี้ยงเชื้อ *R. palustris* ในกลูโคสที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร พบการสะสมกรดอินทรีย์ที่ส่งผลยับยั้งการเจริญ [29] สอดคล้องกับการเลี้ยงเชื้อ *R. palustris* strain B1 ในอาหาร 50% Sago effluent พบว่ามีค่าพีเอชต่ำ ทำให้เชื้อสร้างแคโรทีนอยด์ลดลง [30] แสดงให้เห็นว่าปริมาณกรดอินทรีย์ส่งผลกระทบต่อ การเจริญและการสร้างแคโรทีนอยด์ การเลี้ยงเชื้อในอาหาร Raw starch medium มีข้อดีในการช่วยลดปัญหาความหนืด และให้ระดับการสะสมกลูโคสที่เหมาะสมต่อการเจริญ จึงสามารถผลิตโคเอนไซม์คิวเทนและแคโรทีนอยด์ได้เพิ่มขึ้น

สำหรับการเจริญของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. OS33-UV13-5 สายพันธุ์กลาย ในอาหาร Chitin powder medium และ Chitin flake medium เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อมีปริมาณแบคทีเรีย-โอคัลโรฟิลล์เท่ากับ  $2.92 \pm 0.35$  U<sub>770nm</sub> และ  $5.11 \pm 0.21$  U<sub>770nm</sub> ตามลำดับ และมีปริมาณเอ็นอะซิทิลกลูโคซามีนเท่ากับ  $1.36 \pm 0.17$  และ  $1.57 \pm 0.33$  กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งให้การผลิตแคโรทีนอยด์และโคเอนไซม์คิวเทนสูงที่สุดเท่ากับ  $10.23 \pm 0.57$  และ  $13.04 \pm 0.85$  กรัมต่อลิตร และ  $297.27 \pm 22.03$  และ  $389.58 \pm 16.86$  มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ความเข้มข้นของเอ็นอะซิทิลกลูโคซามีนที่ได้จากการย่อยสลายไคติน ทำให้เชื้อเจริญได้ดี อีกทั้งยังส่งเสริมการผลิตแคโรทีนอยด์และโคเอนไซม์คิวเทน ไคตินเป็นโคพอลิเมอร์ (Co-polymer) ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อย (Monomer) เอ็นอะซิทิลกลูโคซามีนเป็นส่วนใหญ่ เมื่อเชื้อย่อยสลายไคตินจะได้เอ็นอะซิทิลกลูโคซามีน ซึ่งสามารถนำไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตได้ในขณะที่แบ่งเป็นโฮมโพลิเมอร์ (Homopolymer) ที่ย่อยสลายแล้วได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคส [31] จากการศึกษาการเจริญของเชื้อในอาหารที่มี แป้งดิบ ไคตินผง และไคตินแผ่น เป็นแหล่งคาร์บอน ไม่พบปัญหาความหนืด อีกทั้งอาหารมีการผสมผสานเป็นอย่างดี จึงส่งเสริมการเจริญ และการผลิตผลิตภัณฑ์ อย่างไรก็ตามจุดมุ่งหมายของงานวิจัยนี้มุ่งไปที่การประยุกต์การใช้แป้งดิบ เนื่องจากมีราคาถูก และการเพิ่มความเข้มข้นแป้งดิบไม่ก่อให้เกิดปัญหาความหนืด และยังช่วยเพิ่มศักยภาพการผลิตแคโรทีนอยด์และโคเอนไซม์คิวเทนของเชื้ออีกด้วย จึงคัดเลือกอาหาร Raw starch medium ไปทำการศึกษาต่อไป

### 3.3 การเจริญในอาหารเหลวที่ความเข้มข้นของแป้งดิบแตกต่างกัน

จากการศึกษาการเจริญของ *Rhodopseudomonas* sp. OS33-UV13-5 สายพันธุ์กลาย ในอาหารเหลวที่มีแป้งดิบเป็นแหล่งคาร์บอน และแปรผันความเข้มข้นของแป้งดิบดังนี้ 10, 50, 100, 200, 300, 400 และ 500 กรัมต่อลิตร ได้ผลดังแสดงรูปที่ 2

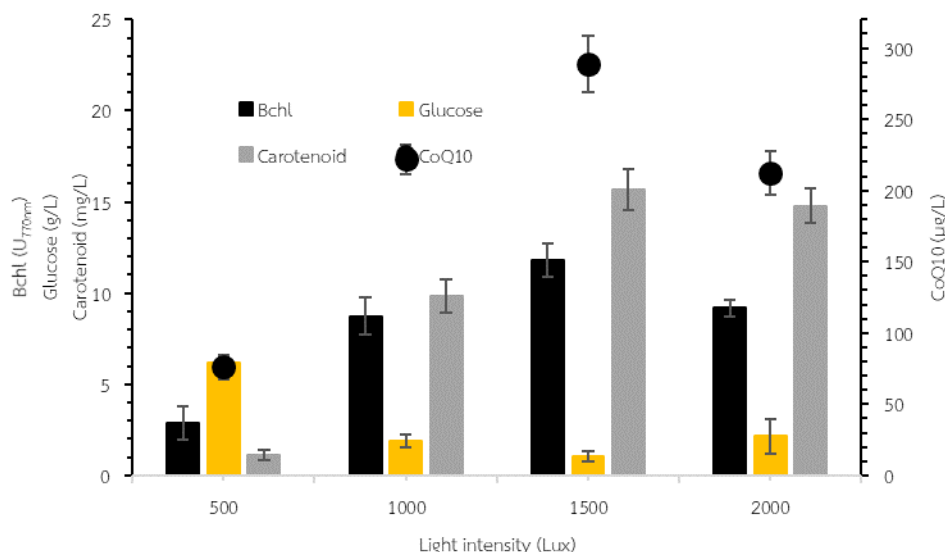


รูปที่ 2. ปริมาณแบคทีเรียโอคัลโรฟิลล์ (Bchl) กลูโคส แคโรทีนอยด์ และโคเอนไซม์คิวเทน ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. OS33-UV13-5 สายพันธุ์กลาย ในอาหารเหลว ที่แปรผันความเข้มข้นของแป้งดิบตั้งแต่ 10 ถึง 500 กรัมต่อลิตร

จากการเพิ่มความเข้มข้นของแป้งดิบจาก 10 กรัมต่อลิตร ไปจนถึง 300 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. OS33-UV13-5 สายพันธุ์กลาย มีการเจริญเพิ่มขึ้นจาก  $2.09 \pm 0.36$  U<sub>770nm</sub> เป็น  $8.74 \pm 0.87$  U<sub>770nm</sub> ของปริมาณแบคทีเรียโคลอโรฟิลล์ มีการสะสมกลูโคสอยู่ที่ระดับ  $1.47 \pm 0.31$  ถึง  $1.89 \pm 0.26$  กรัมต่อลิตร มีปริมาณการผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นจาก  $3.81 \pm 0.18$  เป็น  $9.18 \pm 0.16$  มิลลิกรัมต่อลิตร และมีปริมาณการผลิตโคเอนไซม์คิวเทนเพิ่มขึ้นจาก  $171.34 \pm 10.29$  เป็น  $231.76 \pm 25.97$  ไมโครกรัมต่อลิตร แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแป้งดิบเป็น 400 และ 500 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อมีการเจริญ การผลิตแคโรทีนอยด์และโคเอนไซม์คิวเทนลดลง โดยมีการสะสมกลูโคสเท่ากับ  $2.43 \pm 0.28$  และ  $2.57 \pm 0.31$  กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะอนุภาคของแป้งดิบขัดขวางการส่องผ่านของแสงภายในขวดเลี้ยงเชื้อ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การใช้แป้งดิบความเข้มข้น 10-300 กรัมต่อลิตรในอาหาร ยังทำให้แสงสามารถส่องผ่านได้ นอกจากนี้ความเข้มข้นนี้ยังเพียงพอต่อกิจกรรมของเชื้อ โดยทำให้ปริมาณกลูโคสอยู่ในระดับที่เหมาะสม ซึ่งเป็นผลจากอัตราการใช้กลูโคสของเชื้อ และอัตราการย่อยสลายแป้งดิบไปเป็นกลูโคสของเอนไซม์ดำเนินไปอย่างเหมาะสมในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ จึงส่งผลต่อการเจริญ การผลิตแคโรทีนอยด์ และโคเอนไซม์คิวเทน แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแป้งดิบเป็น 400 และ 500 กรัมต่อลิตร อนุภาคแป้งดิบไปขัดขวางการส่องผ่านของแสง ทำให้กิจกรรมของเชื้อลดลง การใช้กลูโคส และการย่อยแป้งเป็นกลูโคสไม่เหมาะสมจึงเกิดการสะสมกลูโคส จนทำให้การเจริญ การผลิตแคโรทีนอยด์ และโคเอนไซม์คิวเทนลดลง มีรายงานแสดงให้เห็นว่าระดับกลูโคสในระหว่างการเลี้ยงเชื้อที่ต่ำกว่า 2 กรัมต่อลิตร ไม่ส่งผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ และการสร้างผลิตภัณฑ์ [28]-[29] สอดคล้องกับปริมาณกลูโคสที่มากขึ้น (C/N ratio สูง) ทำให้มีการสะสมพอลิแซ็กคาไรด์ และส่งผลกระทบต่ออัตราการส่งผ่านออกซิเจน (Oxygen transfer rate) และยับยั้งการสร้างโคเอนไซม์คิวเทนในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* [32] จากการทดลอง จึงทำการคัดเลือกอาหารเหลวที่ใช้แป้งดิบ 300 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนไปทำการศึกษาต่อไป

### 3.4 การเจริญในอาหารเหลวแป้งดิบภายใต้ความเข้มแสงที่แตกต่างกัน

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. OS33-UV13-5 สายพันธุ์กลาย ในอาหารเหลวแป้งดิบ 300 กรัมต่อลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสงที่แตกต่างกัน ได้แก่ 500, 1,000, 1,500 และ 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 15 วัน ได้ผลดังแสดงรูปที่ 3

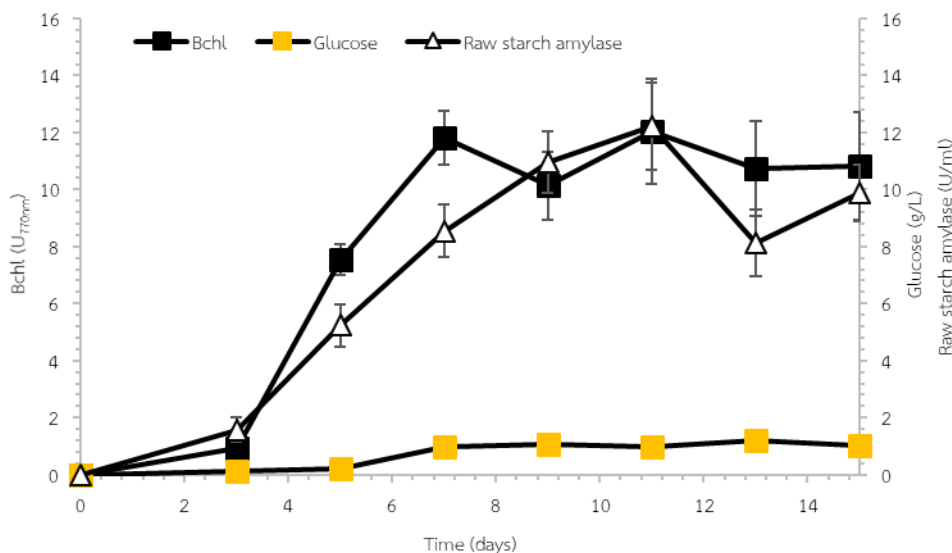


รูปที่ 3. ปริมาณแบคทีเรียโคลอโรฟิลล์ (Bchl) กลูโคส แคโรทีนอยด์ และโคเอนไซม์คิวเทน ของเชื้อ *Rhodospseudomonas* sp. OS33-UV13-5 สายพันธุ์กลาย ในอาหารเหลวความเข้มข้นของแบคทีเรีย 300 กรัมต่อลิตร ที่แปรผันความเข้มแสง 500, 1,000, 1,500 และ 2,000 ลักซ์

จากการทดลองพบว่า ภายใต้ความเข้มแสง 500 ลักซ์ เชื้อมีปริมาณแบคทีเรียโคลอโรฟิลล์ต่ำที่สุดเท่ากับ  $2.87 \pm 0.94$  U<sub>770nm</sub> และมีการสะสมกลูโคสสูงถึง  $6.18 \pm 0.35$  กรัมต่อลิตร โดยมีการผลิตแคโรทีนอยด์และโคเอนไซม์คิวเทนเพียง  $1.13 \pm 0.27$  มิลลิกรัมต่อลิตร และ  $75.94 \pm 8.35$  ไมโครกรัมต่อลิตร เท่านั้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มแสงจาก 1,000 เป็น 1,500 ลักซ์ ส่งผลให้การเจริญเพิ่มขึ้นจาก  $8.74 \pm 1.03$  เป็น  $11.82 \pm 0.93$  U<sub>770nm</sub> การผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นจาก  $9.81 \pm 0.92$  เป็น  $15.67 \pm 1.14$  มิลลิกรัมต่อลิตร และการผลิตโคเอนไซม์คิวเทนเพิ่มขึ้นจาก  $221.95 \pm 10.46$  เป็น  $288.79 \pm 20.13$  ไมโครกรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่า ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ ส่งเสริมการเจริญของเชื้อ เนื่องจากแสงส่องผ่านอนุภาคแบคทีเรียในขวดเลี้ยงเชื้อได้ทั่วถึง แต่อย่างไรก็ตามที่ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ เชื้อให้การเจริญ การผลิตแคโรทีนอยด์ และการผลิตโคเอนไซม์คิวเทนลดลง อาจเป็นเพราะความร้อนจากแสง มีผลทำให้อุณหภูมิสะสมในขวดเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น โดยเพิ่มเป็น 45 องศาเซลเซียส ขณะเดียวกัน ยังพบการสะสมกลูโคสเพิ่มขึ้นเป็น  $2.34 \pm 0.93$  กรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่กล่าวว่า ความเข้มข้นของกลูโคสที่มากกว่า 2.0 กรัมต่อลิตร ส่งผลยับยั้งการเจริญ [28]-[29] มีรายงานการปรับแต่งพันธุกรรมของ *Rhodobacter sphaeroides* ที่ทำให้เชื้อสามารถนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้น และช่วยเพิ่มการผลิตโคเอนไซม์คิวเทนถึง 2 เท่า [33] และความเข้มแสง 500-2,000 ลักซ์ ให้ผลดีต่อการเจริญ [34]-[35] การใช้ความเข้มแสงมากกว่า 2,000 ลักซ์ ทำให้การเจริญลดลง แต่การใช้ความเข้มแสงมากกว่า 8,000 ลักซ์ ทำให้ผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มเป็น 2 เท่าเมื่อเทียบกับการใช้ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ แสดงให้เห็นว่าการผลิตแคโรทีนอยด์ไม่สัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อ [36]

### 3.5 การสร้างเอนไซม์ย่อยสลายแป้งดิบ

จากการศึกษาการเจริญและการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายแป้งดิบของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. OS33-UV13-5 สายพันธุ์กลายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีแป้งดิบความเข้มข้น 300 กรัมต่อลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ เป็นเวลา 15 วัน ได้ผลดังแสดงรูปที่ 4



รูปที่ 4. ปริมาณแบคทีเรียโคลอโรฟิลล์ (Bchl) กลูโคส และกิจกรรมเอนไซม์ย่อยแป้งดิบ ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. OS33-UV13-5 ในอาหารเหลวที่มีแป้งดิบความเข้มข้น 300 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ เป็นเวลา 15 วัน

จากการทดลองพบว่า ปริมาณแบคทีเรียโคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ จนถึงวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจึงเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงวันที่ 7 แล้วให้ค่าคงที่จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 15 ซึ่งสอดคล้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งดิบ ซึ่งในช่วง 3 วันแรกนั้น มีการเพิ่มขึ้นค่อนข้างช้า และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วไปจนถึงวันที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ จากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์มีแนวโน้มลดลงจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง แสดงให้เห็นว่าการเจริญของเชื้อสัมพันธ์กับกิจกรรมของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายแป้งดิบไปเป็นกลูโคส ซึ่งเพียงพอต่อความต้องการของเชื้อ ในขณะเดียวกัน พบการสะสมของระดับกลูโคสตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ โดยมีระดับกลูโคสสูงสุดเท่ากับ  $1.18 \pm 0.15$  กรัมต่อลิตร ไม่เกิน 2 กรัมต่อลิตร จึงไม่ส่งผลยับยั้งการเจริญ เนื่องจากความสมดุลระหว่างอัตราการนำกลูโคสไปใช้เพื่อการเจริญและอัตราการย่อยสลายแป้ง แสดงให้เห็นว่าเชื้อสายพันธุ์กลายไม่ได้รับผลกระทบจากกลูโคส เชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. OS33 มีการเจริญดีมากในอาหารเหลวที่มีกลูโคสความเข้มข้น 5–10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อนำมาเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีแป้งสูง พบการสะสมกลูโคสในอาหารเหลวถึง 3.0 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้การเจริญลดลง [20] แสดงว่าการสะสมกลูโคสน้อยกว่า 2 กรัมต่อลิตร

เหมาะสมต่อการเจริญ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานผลการทดลองก่อนหน้านี้ [18],[28]-[29] ดังนั้น การใช้แบง์ดิบเป็นแหล่งคาร์บอนจึงส่งผลต่อการเจริญ และไม่ได้รับผลกระทบของความหนืด ทำให้เชื้อสามารถใช้สับสเตรทได้อย่างมีประสิทธิภาพ

#### 4. สรุปผลการทดลอง

จากการปรับปรุงพันธุ์ของ *Rhodopseudomonas* sp. OS33 ด้วยแสง UV สามารถคัดแยกเชื้อสายพันธุ์กลาย *Rhodopseudomonas* sp. OS33-UV13-5 ที่มีคุณสมบัติในการย่อยแบง์ดิบได้เป็นอย่างดี ซึ่งต่างจากสายพันธุ์พ่อแม่ นอกจากนี้ยังพบความสามารถในการย่อยสลายไคติน (ชนิดผงและชนิดแผ่น) ได้อีกด้วย แต่การทดลองนี้เน้นไปที่การใช้แบง์ดิบเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งมีคุณสมบัติดีกว่าการใช้แบง์ดิบสูง เนื่องจากไม่มีปัญหาของความหนืดที่ส่งผลต่อการผสมผสาน เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. OS33-UV13-5 ในอาหารที่มีความเข้มข้นของแบง์ดิบ 300 กรัมต่อลิตร ภายใต้ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ ทำให้การเจริญ การผลิตแคโรทีนอยด์ และการผลิตโคเอนไซม์คิวเทน เพิ่มขึ้น 5.65, 2.00 และ 1.44 เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของแบง์ดิบ 10 กรัมต่อลิตร ภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ สำหรับกิจกรรมการย่อยแบง์ดิบและการเจริญ พบว่ามีความสัมพันธ์กัน ส่งผลให้การสะสมกลูโคสน้อยกว่า 2 กรัมต่อลิตร จึงไม่เกิดการยับยั้งการเจริญ เนื่องจากกิจกรรมใช้กลูโคสและการย่อยแบง์ดิบเป็นกลูโคสอยู่ในระดับที่เหมาะสม โดยผู้วิจัยสนใจการใช้การเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่อง (Continuous cultivation) เพื่อเพิ่มศักยภาพการใช้แบง์ดิบและการผลิตแคโรทีนอยด์ และโคเอนไซม์คิวเทน ในลำดับต่อไป

#### เอกสารอ้างอิง (References)

- [1] Guan, C.J., Ji, Y.J., Hu, J.L., Hu, C.N., Yang, F. and Yang, G.E. 2017. Biotransformation of rutin using crude enzyme from *Rhodopseudomonas palustris*. *Current Microbiology*, 74(4), 431–436.
- [2] Larimer, F.W., Chain, P., Hauser, L., Lamerdin, J., Malfatti, S. and Do, L. 2003. Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas palustris*. *Nature Biotechnology*, 22(1), 55–61.
- [3] Madigan, M.T. and Jung, D.O. 2009. An Overview of Purple Bacteria: Systematics, Physiology, and Habitats, In Hunter, C.N., Daldal, F., Thurnauer, M.C. and Beatty, J.T. (eds). *The Purple Phototrophic Bacteria*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1–15.
- [4] Li, M., Ning, P. Ning, Sun, Y.I., Luo, J. and Yang, J. 2022. Characteristics and application of *Rhodopseudomonas palustris* as a microbial cell factory. *Frontiers in Bioengineering Biotechnology*, 10, 1-19.
- [5] Luo, W., Deng, X., Zeng, W. and Zheng, D. 2012. Treatment of wastewater from shrimp farms using a combination of fish, photosynthetic bacteria, and vegetation. *Desalination and Water Treatment*, 47, 221-227.

- [6] Peirong, Z. and Wei, L. 2013. Use of fluidized bed biofilter and immobilized *Rhodopseudomonas palustris* for ammonia removal and fish health maintenance in a recirculation aquaculture system. *Aquaculture Research*, 44(3), 327–334.
- [7] Zhou, X., Tian, Z., Wang, Y. and Li, W. 2010. Effect of treatment with probiotics as water additives on Tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Fish Physiology and Biochemistry*, 36(3), 501–509.
- [8] Sasaki, K., Watanabe, M., Suda, Y., Ishizuka, A. and Noparatnaraporn, N. 2005. Applications of photosynthetic bacteria for medical fields. *Journal of Bioscience Bioengineering*, 100(5), 481–488.
- [9] Nookongbut, P., Kantachote, D. and Megharaj, M. 2016. Arsenic contamination in areas surrounding mines and selection of potential as resistant purple non-sulfur bacteria for use in bioremediation based on their detoxification mechanisms. *Annals of Microbiology*, 66, 1419–1429.
- [10] Kapoor, P. and Kapoor, A.K. 2013. Coenzyme Q10-A novel molecule. *The Journal Indian Academy of Clinical Medicine*, 14, 37–45.
- [11] Barcelos, I.P. and Haas, R.H. 2019. CoQ10 and aging. *Biology*, 8(28), 1–22.
- [12] Brotosudarmo, T.H.P., Heriyanto, L.L. and Prihastyanti, M.N.U. 2015. Adaptation of the photosynthetic unit of purple bacteria to changes of light illumination intensities. *Procedia Chemistry*, 14, 414–421.
- [13] Muzziotti, D., Adessi, A., Faraloni, C., Torzillo, G. and Philippis, R.D. 2017. Acclimation strategy of *Rhodopseudomonas palustris* to high light irradiance. *Microbiological Research*, 197, 49–55.
- [14] Lerfall, J. 2016. Carotenoids: Occurrence, Properties and Determination. In Caballero, B., Finglas, P. and Toldra, F. (eds). *Encyclopedia of Food and Health*. 1<sup>st</sup> ed, Elsevier, Trondheim, 663–669.
- [15] McKinlay, J.B. and Harwood, C.S. 2010. Photobiological production of hydrogen gas as a biofuel. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(3), 244–251.
- [16] Buranakarl, L., Ying, F.C., Ito, K., Izaki, K. and Takahashi, H. 1985. Production of molecular hydrogen by photosynthetic bacteria with raw starch. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49(11), 3339–3341.
- [17] Buranakarl, L., Ito, K., Izaki, K. and Takahashi, H. 1988. Purification and characterization of a raw starch digestion amylase from non-sulfur purple photosynthetic bacteria. *Enzyme Microbiology Technology*, 10(3), 173–179.
- [18] Mahakhan, P., Chobvijuk, C., Ngmjarearnwong, M., Trakulnalernsai, S., Bucke, C., Svasti, J., Kanlayakrit, W. and Chitradon, L. 2005. Molecular hydrogen production by

a thermotolerant *Rubrivivax gelatinosus* using raw cassava starch as an electron donor. *ScienceAsia*, 31, 415-424.

- [19] Sun, H., Ge, X.Y., Wang, L., Zhao, P. and Peng, M. 2009. Microbial production of raw starch digesting enzymes. *African Journal of Biotechnology*, 8(9), 1734-1739.
- [20] Manjeen, N., Phunpruch, S. and Krairak, S. 2012. Hydrogen production by photosynthetic bacterium strain OS33 using domestic waste as a carbon source. Proceedings of the 23<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. February 1-2, 2012. The Imperial Queen's Park Hotel, Bangkok, Thailand. P-IV-26, 206-210.
- [21] Cohen, B.G., Sistrom, W.R. and Stanier, Y.R. 1957. Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *Journal of Cellular Physiology*, 49, 25-68.
- [22] Zbircea, R.I., Menghiu, G., Matica, A. and Ostafe, V. 2016. Use of 3,5-Dinitrosalicylic acid reaction to study the chitosan hydrolysis. *New Frontiers in Chemistry*, 25(2), 145-153.
- [23] Matsumura, M., Kobayashi, T. and Aiba, S. 1983. Anaerobic production of ubiquinone-10 by *Paracoccus denitrificans*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 17(2), 85-89.
- [24] Jeong, S.K. Ahn, S.C. Kong, I.S. and Kim, J.K. 2008. Isolation and identification of a photosynthetic bacterium containing a high content of coenzyme Q 10. *Journal of the Fisheries Science and Technology*, 11(3), 172-176.
- [25] Jalal, K.C.A., Azira, Z.A., Hafizah, N.Z., Rahman, M.M., Kamaruzzaman, B.Y.K. and Noor, H. N. 2014. Carotenoid contents in anoxygenic phototrophic purple bacteria, *Marichromatium* sp. and *Rhodopseudomonas* sp. of tropical aquatic environment, Malaysia. *Oriental Journal of Chemistry*, 30(2), 607-613.
- [26] Jensen, S.L. and Jensen, A. 1971. Quantitative determination of carotenoids in photosynthetic tissues. *Methods in Enzymology*, 23, 586-602.
- [27] Maruyama, K. and Kitamura, H. 1975. Some effects of propionate on the growth of *Rhodopseudomonas spheroides* S. *Agricultural and Biological Chemistry*, 39(8), 1521-1526.
- [28] Conrad, R. and H.G. Schlegel. 1978. Regulation of glucose, fructose and sucrose catabolism in *Rhodopseudomonas cupsuluta*. *Journal of General Microbiology*, 105, 315-322.
- [29] Oh, Y.K., Seol, E.H., Lee, Y.E. and Park, S. 2002. Fermentative hydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Rhodopseudomonas palustris* P4. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11-12), 1373-1379.

- [30] Vikineswary, S., Getha, K., Maheswary, S., Chong, V.C., Shaliza, I. and Sastry, C.A. 1997. Growth of *Rhodopseudomonas palustris* strain B1 in sago starch processing wastewater. *Studies in Environmental Science*, 66, 335–348.
- [31] Dohendou, M., Pakzad, K., Nezafat, Z., Nasrollahzadeh, M. and Dekamin, M.G. 2021. Progresses in chitin, chitosan, starch, cellulose, pectin, alginate, gelatin and gum based (nano) catalysts for the heck coupling reactions. *A review International Journal of Biological Macromolecules*, 192, 771-819.
- [32] Wang, Z.J., Zhang, Z., Wang, P., Sui, Z., Guo, M., Zhang, S. and Zhuang, Y.P. 2020. Oxygen uptake rate controlling strategy balanced with oxygen supply for improving coenzyme Q10 production by *Rhodobacter sphaeroides*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 25, 459-469.
- [33] Yang, Y., Li, L., Sun, H., Li, Z., Qi, Z.L. and Liu, X. 2021. Improving CoQ10 productivity by strengthening glucose transmembrane of *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbial Cell Factories*, 20, 1-11.
- [34] Cheirsilp, B. and Torpee, S. 2012. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource Technology*, 110, 510–516.
- [35] Sorokin, C. and Krauss, R.W. 1958. The effects of light intensity on the growth rates of green algae. *Plant Physiology*, 33, 109–113.
- [36] Zhou, Q., Zhang, P. and Zhang, G. 2014. Biomass and carotenoid production in photosynthetic bacteria wastewater treatment: Effects of light intensity. *Bioresource Technology*, 171, 330-335.