

การเปรียบเทียบการผลิตโคเอนไซม์คิวเทนจากสายพันธุ์เมทิลโอแบคทีเรีย



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง ภาควิชาวิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรม

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2563

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

COMPARISON OF COENZYME Q₁₀ PRODUCTION FROM *METHYLOBACTERIUM* STRAINS



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Cosmetic Science
Department of Pharmaceutics and Industrial Pharmacy
FACULTY OF PHARMACEUTICAL SCIENCES
Chulalongkorn University
Academic Year 2020
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเปรียบเทียบการผลิตโคเอนไซม์คิวเทนจากสายพันธุ์เมทิลโอแบคทีเรีย
โดย	น.ส.ณัฐธิดา มิ่งระโกชน์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกศษกรหญิง ดร.ดุขฎิ ซาญวานิช
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะเภสัชศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกศษกรหญิง ดร.รุ่งเพชร สกุลบำรุงศิลป์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ เกศษกรหญิง ดร.พรเพ็ญ วีระวัฒกานนท์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกศษกรหญิง ดร.ดุขฎิ ซาญวานิช)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ เกศษกรหญิง ดร.อังคณา ตันติธูวานนท์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ เกศษกรหญิง ดร.วราภรณ์ สุวกุล)

ณัฐธิดา มิ่งระโกชน์ : การเปรียบเทียบการผลิตโคเอนไซม์คิวเทนจากสายพันธุ์เมทิลแบคทีเรีย. (COMPARISON OF COENZYME Q₁₀ PRODUCTION FROM *METHYLOBACTERIUM* STRAINS)
 อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. ภญ. ดร.ดุชนฎิ ขาวญาวณิช, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ศ. ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์

โคเอนไซม์คิวเทน (CoQ₁₀) เป็นที่ทราบกันดีว่าเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูงใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอาง โคเอนไซม์คิวเทนสามารถผลิตได้โดยการหมักแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T และ *Methylobacterium* sp. LRY1-08 ด้วยวิธีการสกัดโคเอนไซม์คิวเทนจากเซลล์ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของวิธีการสกัด สายพันธุ์ *Methylobacterium* และปัจจัยทางกระบวนการหมัก ต่อปริมาณโคเอนไซม์คิวเทนที่ได้ การวิเคราะห์ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทนทำโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) การศึกษาปัจจัยทางกระบวนการหมักแบคทีเรีย ได้แก่ ความแตกต่างของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนและระยะเวลาของการหมัก ผลการศึกษา พบว่า วิธีการทำให้เซลล์แตกก่อนโดยใช้เมทานอลและโซเดียมคลอไรด์ 0.3% (10:1 v/v) ที่มีส่วนประกอบของไตรตอนเอ็กซ์-100 1% ควบคุมกับการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง แล้วสกัดด้วยไอโซโพรพานอลและเฮกเซน (3:5) พบว่า ให้ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทนสูงสุดในทั้งสองสายพันธุ์ โดย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T ให้ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทนสูงกว่า *Methylobacterium* sp. LRY1-08 ซึ่งสอดคล้องกับน้ำหนักเซลล์แห้งที่มากกว่า ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าวิธีการสกัดนี้สามารถใช้เพื่อสกัดโคเอนไซม์คิวเทนจากเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้ และผลการศึกษาปัจจัยของกระบวนการหมัก พบว่า กลูโคสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร และสารสกัดยีสต์ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด โดยหมักเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ส่งผลต่อปริมาณโคเอนไซม์คิวเทนที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T ซึ่งให้ค่า CoQ₁₀ production เท่ากับ 2.7667 ± 0.26 mg/L ค่า Specific CoQ₁₀ content เท่ากับ 0.7663 ± 0.07 mL/g ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 3.62 ± 0.20 g/L

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 CHULALONGKORN UNIVERSITY

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง
 ปีการศึกษา 2563

ลายมือชื่อนิสิต
 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

6076253733 : MAJOR COSMETIC SCIENCE

KEYWORD: Coenzyme Q10, cell lysis, fermentation, dry cell weight, Specific CoQ10 content, extraction method, *Methylobacterium*

Nattida Mingrapoch : COMPARISON OF COENZYME Q₁₀ PRODUCTION FROM *METHYLOBACTERIUM* STRAINS. Advisor: Asst. Prof. Dusadee Charnvanich, Ph.D. Co-advisor: Prof. SOMBOON TANASUPAWAT, Ph.D.

Coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) is known to be a strong antioxidant used in food and cosmetic industries. CoQ₁₀ could be produced by bacterial strains, *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T and *Methylobacterium* sp. LRY1-08 by the cell extraction method. The objective of this study was to investigate the effects of extraction methods, *Methylobacterium* strains and the fermentation parameters on the quantity of the obtained CoQ₁₀. The content of CoQ₁₀ was analyzed with HPLC method. The bacterial fermentation parameters including different carbon and nitrogen sources and the duration of fermentation were investigated for the produced CoQ₁₀ content. The result showed that the cell lysis treatment using methanol and 0.3% sodium chloride (10:1 v/v) containing 1% Triton X-100 with sonication and then extraction with isopropanol and hexane (3:5) were found to yield the highest CoQ₁₀ content for both *Methylobacterium* strains. *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T produced significantly higher CoQ₁₀ content than *Methylobacterium* sp. LRY1-08 corresponding to its higher dry cell weight. The findings indicated that this cell lysis method could be used to extract CoQ₁₀ from plasma membrane of the bacteria. For the study of fermentation factors, it was found that 10 g/L of glucose and 10 g/L of yeast extract were the most suitable carbon and nitrogen sources respectively for 96 hours fermentation of *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T. These factors provided CoQ₁₀ production of 2.7667 ± 0.26 mg/L, specific CoQ₁₀ content of 0.7663 ± 0.07 mL/g dry cell weight (DCW) and dry cell weight of 3.62 ± 0.20 g/L.

Field of Study: Cosmetic Science

Student's Signature

Academic Year: 2020

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความกรุณาของผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกษักรหญิง ดร. ศุภฎี ขาวญวนิช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ความรู้ ความเข้าใจ ตลอดจนช่วยแก้ไขปัญหาและข้อบกพร่องต่างๆรวมถึงวิทยานิพนธ์เล่มนี้ด้วย

ขอบคุณศาสตราจารย์ ดร. สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ผู้ให้คำแนะนำ แนวทาง รวมถึงช่วยแก้ไขปัญหาลดระยะเวลาการทำวิจัย ขอขอบคุณสนับสนุนโครงการบูรณาการงานวิจัยสู่นานาชาติประเภท ทุนส่งเสริมกลุ่มวิจัยกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช และขอบคุณพี่น้องๆทุกคนในภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยาที่ให้คำปรึกษา และแนะนำในการทำวิจัยทางด้านจุลชีววิทยา

ขอบคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่ให้ความเมตตา และคำแนะนำเพื่อให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และขอบคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาวิทยาการเภสัชกรรม และเภสัชอุตสาหกรรมที่ให้ความรู้ ประสบการณ์อันเป็นประโยชน์แก่ตัวข้าพเจ้า

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านภายในภาควิชาวิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรมที่อำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ และขอบคุณศูนย์เครื่องมือคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์แก่การทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอบคุณครอบครัว พี่ น้อง และเพื่อนทุกคนที่คอยให้กำลังใจและให้ความช่วยเหลือข้าพเจ้าเสมอมา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ณัฐธิดา มิ่งระโกชน์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ญ
สารบัญคำย่อ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
วัตถุประสงค์.....	5
บทที่ 2 ปริทัศน์วรรณกรรม.....	6
1. โคเอนไซม์ควิเทน (Coenzyme Q ₁₀).....	6
1.1 การนำมาใช้ประโยชน์.....	7
1.1.1 ประโยชน์ทางการแพทย์.....	7
1.1.2 ประโยชน์ทางเครื่องสำอาง.....	8
1.2 การผลิต CoQ ₁₀	9
วิธีชีวสังเคราะห์ของ CoQ ₁₀	9
1.3 แบคทีเรียที่สามารถผลิต CoQ ₁₀	12
สกุล <i>Methylobacterium</i>	12
1.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต CoQ ₁₀ ของแบคทีเรีย.....	14
1.4.1 แหล่งคาร์บอน.....	14
1.4.2 แหล่งไนโตรเจน.....	14

1.4.3 ระยะเวลา.....	15
2. การสกัด	15
บทที่ 3 วัสดุและวิธีดำเนินการวิจัย.....	18
3.1 รายการสารเคมีและเครื่องมือ	18
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย.....	20
1. การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียและการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียเพื่อการผลิต CoQ ₁₀	20
2. การศึกษาวิธีการสกัด CoQ ₁₀ จากแบคทีเรีย	20
3. การศึกษาผลของระยะเวลาการหมักต่อปริมาณ CoQ ₁₀ ที่ผลิตได้.....	21
4. การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณ CoQ ₁₀ ที่ผลิตได้	22
4.1 การศึกษาแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณ CoQ ₁₀	22
4.2 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณ CoQ ₁₀	22
5. การศึกษาแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นต่อปริมาณ CoQ ₁₀	23
6. การประเมินคุณสมบัติของแบคทีเรียและการวิเคราะห์ปริมาณ CoQ ₁₀	23
6.1 การนับจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิต	23
6.2 น้ำหนักเซลล์แห้ง (Dry cell weight)	24
6.3 การวิเคราะห์หาปริมาณ CoQ ₁₀ ด้วยวิธี High Pressure Liquid Chromatography (HPLC).....	24
7. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์	26
บทที่ 4 ผลและการอภิปรายผลการทดลอง	27
1. การศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย <i>Methylobacterium</i> เพื่อสกัด CoQ ₁₀	27
2. การศึกษาวิธีการสกัด CoQ ₁₀ จากแบคทีเรีย <i>Methylobacterium</i>	28
3. การศึกษาผลของระยะเวลาการหมักต่อปริมาณ CoQ ₁₀ ที่ผลิตได้.....	30
4. การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นต่อปริมาณ CoQ ₁₀ ที่ผลิตได้	32
4.1 การศึกษาแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณ CoQ ₁₀	32

4.2 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณ CoQ ₁₀	34
5. การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อปริมาณ CoQ ₁₀	36
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษา.....	41
ข้อเสนอแนะเพิ่มเติมในงานวิจัยต่อไป.....	42
บรรณานุกรม.....	43
ภาคผนวก ก ข้อมูลอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย	49
ภาคผนวก ข ข้อมูลผลการนับจำนวนเซลล์.....	51
ภาคผนวก ค ข้อมูลผลการศึกษาปัจจัยต่างๆต่อปริมาณ CoQ ₁₀ production และ Specific CoQ ₁₀ content รวมถึงน้ำหนักเซลล์แห้ง.....	56
ภาคผนวก ง กราฟมาตรฐานและการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์	69
ภาคผนวก จ ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	74
ประวัติผู้เขียน.....	103

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ค่าการละลายของ CoQ ₁₀ ที่ 20 °C ในตัวทำละลายต่างๆ.....	7
ตารางที่ 2 ตัวอย่างแบคทีเรียที่สามารถผลิต CoQ ₁₀	12
ตารางที่ 3 แสดงวิธีการสกัด CoQ ₁₀ จากแบคทีเรีย <i>Methylobacterium</i>	21
ตารางที่ 4 ผลของวิธีการสกัดต่อปริมาณ CoQ ₁₀ ของแบคทีเรีย <i>Methylobacterium</i> sp. LRY1-08 และ <i>Methylobacterium organophilum</i> NBRC 15689 ^T (ค่าเฉลี่ย ± SD, n = 3).....	28
ตารางที่ 5 ผลของระยะเวลาการหมักต่อปริมาณ CoQ ₁₀ ที่ผลิตได้ น้ำหนักเซลล์แห้งและจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของแบคทีเรีย <i>Methylobacterium organophilum</i> NBRC 15689 ^T	32
ตารางที่ 6 ผลของชนิดแหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร ต่อปริมาณ CoQ ₁₀ น้ำหนักเซลล์แห้งและจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของแบคทีเรีย <i>Methylobacterium organophilum</i> NBRC 15689 ^T (ค่าเฉลี่ย ± SD, n = 6).....	33
ตารางที่ 7 ผลความเข้มข้นของ glucose ต่อปริมาณ CoQ ₁₀ น้ำหนักเซลล์แห้ง และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของแบคทีเรีย <i>Methylobacterium organophilum</i> NBRC 15689 ^T (ค่าเฉลี่ย ± SD, n = 9)	35
ตารางที่ 8 ผลความเข้มข้นของ yeast extract และ CSL ต่อปริมาณ CoQ ₁₀ น้ำหนักเซลล์แห้ง และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของแบคทีเรีย <i>Methylobacterium organophilum</i> NBRC 15689 ^T	38

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของ CoQ ₁₀	6
รูปที่ 2 แสดงชีวสังเคราะห์ของ CoQ ₁₀	11
รูปที่ 3 ลักษณะเซลล์ของ <i>Methylobacterium</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ (Phase-contrast microscope)	13
รูปที่ 4 แสดงการทำลายเซลล์ด้วยสารลดแรงตึงผิวหรือสารซักฟอก เพื่อปลดปล่อยสารที่อยู่ภายในเซลล์	17
รูปที่ 5 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย <i>Methylobacterium</i> sp. LRY1-08 และ <i>Methylobacterium organophilum</i> NBRC 15689 ^T ที่หมักด้วยอาหาร ISP2.....	27

สารบัญย่อ

ATP	=	adenosine triphosphate
CFU	=	colony forming unit
CoQ ₁₀	=	coenzyme Q ₁₀
CSL	=	corn steep liquor
DCW	=	dry cell weight
DXP	=	1-deoxy-D-xylose-5-phosphate
DNA	=	deoxyribonucleic acid
FPP	=	farnesyl diphosphate
g	=	gram (s)
G3P	=	glyceraldehyde-3-phosphate
HPLC	=	high performance liquid chromatography
IPP	=	isopentenyl-5-diphosphate
L	=	liter (s)
mg	=	milligram (s)
mL	=	milliliter (s)
mm	=	millimeter (s)
MMP-1	=	metalloproteinase-1
nm	=	nanometer (s)
pH	=	the negative logarithm of hydrogen ion concentration
RNA	=	ribonucleic acid
SD	=	standard deviation

Ubc	=	chorismate lyase
v/v	=	volume by volume
w/w	=	weight by weight
pHBA	=	4-hydroxybenzoate
μg	=	microgram (s)
μL	=	microliter (s)



บทที่ 1

บทนำ

โคเอนไซม์คิวเทน (Coenzyme Q₁₀) หรือ Ubiquinone-10 ถูกค้นพบครั้งแรกเมื่อ 50 ปีที่แล้วในปี ค.ศ.1957 โดย Frederick Crane ซึ่งแยกได้จากไมโทคอนเดรียของหัวใจวัว CoQ₁₀ เป็นสารที่มีคุณสมบัติคล้ายวิตามินที่ละลายได้ในไขมัน โดยมีโครงสร้างเป็นวงแหวนและสายยาว isoprenoid จำนวน 10 หน่วย (Kumar และคณะ, 2009; Littarru และ Lambrechts, 2011) CoQ₁₀ สามารถพบได้ในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ (Yen และ Chiu, 2007) โดยจะอยู่ภายในเยื่อหุ้มเซลล์ของไมโทคอนเดรียที่พบในกลุ่มยูคาริโอตและพบในเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) ของกลุ่มโพรคาริโอต ในมนุษย์พบ CoQ₁₀ ทุกเซลล์ภายในร่างกาย (Cao และคณะ, 2006) โดยร่างกายสามารถสังเคราะห์ CoQ₁₀ มาเพื่อเป็นตัวร่วมในปฏิกิริยาสร้างพลังงานที่มีความจำเป็นต่อกระบวนการหายใจระดับเซลล์แบบใช้ออกซิเจนซึ่งเป็นกระบวนการสร้างพลังงานที่มีประสิทธิภาพ (Lekphrom และ Charupong, 2013)

CoQ₁₀ มีประโยชน์ในทางการแพทย์มากมาย มีการประยุกต์ใช้ CoQ₁₀ เพื่อป้องกันและรักษาโรคต่างๆ (Bule และ Singhal, 2011; Lekphrom และ Charupong, 2013) เช่น โรคระบบหัวใจและหลอดเลือด โรคความดันโลหิตสูง ภาวะหัวใจล้มเหลว (Kumar และคณะ, 2009) โรคความเสื่อมของระบบประสาท โรคพาร์กินสัน และการมีบทบาทร่วมกับยา statin เป็นต้น และในทางเครื่องสำอาง CoQ₁₀ เป็นส่วนประกอบหลักในผลิตภัณฑ์หลากหลายรูปแบบ โดยมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) (Lekphrom และ Charupong, 2013) และเป็นส่วนประกอบหลักในอาหารเสริม (Bule และ Singhal, 2011) ถึงแม้ว่า CoQ₁₀ สามารถสังเคราะห์ได้เองภายในร่างกาย แต่เมื่ออายุมากขึ้นประสิทธิภาพการทำงานในการสังเคราะห์ CoQ₁₀ ลดลง ทำให้เกิดการเจ็บป่วยชราภาพ และเกิดริ้วรอยได้ง่าย CoQ₁₀ จึงเป็นสารสำคัญที่ควรเสริมให้แก่ร่างกายเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์ต่างๆในร่างกาย

การผลิต CoQ₁₀ สามารถผลิตได้ 3 วิธี คือ การสังเคราะห์จากกระบวนการทางเคมี การสกัดจากพืชและสัตว์ และการหมักจากแบคทีเรีย (Bule และ Singhal, 2009; Vaghari และคณะ, 2016; Wu และ Tsai, 2013) โดยการสังเคราะห์จากกระบวนการทางเคมีและวิธีการสกัดจากพืชและสัตว์ มีต้นทุนสูง มีการใช้สารเคมีและตัวทำละลายซึ่งส่งผลต่อสิ่งแวดล้อม และให้ผลผลิตน้อย (Bule และ

Singhal, 2011; Tian และคณะ, 2010; Vaghari และคณะ, 2016) ส่วนวิธีการสร้าง CoQ₁₀ ด้วยการหมักจากแบคทีเรียมีข้อดีเหนือกว่า 2 วิธีแรกคือ สารตั้งต้นในการสังเคราะห์ทางชีวภาพมีหลายชนิดสามารถเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่ราคาถูก (Kantachote และ Choorit, 2012) เป็นวิธีที่ทางอุตสาหกรรมให้ความสนใจ เนื่องจากเป็นกระบวนการที่สามารถควบคุมได้ง่ายและต้นทุนในการผลิตต่ำ (Tian และคณะ, 2010; Vaghari และคณะ, 2016; Wu และ Tsai, 2013) วิธีชีวสังเคราะห์ของ CoQ₁₀ ได้จากการศึกษาวิเคราะห์ทางพันธุศาสตร์ของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยมีการเสนอวิธีสังเคราะห์ออกเป็น 3 ส่วน คือ การสังเคราะห์วงแหวน quinone การสังเคราะห์หน่วยย่อย isoprenoid 10 หน่วย และการปรับเปลี่ยนโครงสร้างในวงแหวน quinone โดยเริ่มจากวงแหวน quinone ได้มาจาก chorismate ในวิถีซิกิเมต (Shikimate pathway) ซึ่งพบได้ในพวกโพรคาริโอตและจะเกิดการปรับเปลี่ยนเป็น 4-hydroxybenzoate (pHBA) ส่วนสายยาว isoprenoid ได้มาจากวิถีของ MEP (2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate) ซึ่งพบได้ในพวกโพรคาริโอต แล้วทำปฏิกิริยากับ pHBA จากนั้นมีการปรับเปลี่ยนภายในโครงสร้างจนได้ CoQ₁₀ (Choi และคณะ, 2005b; de Dieu Ndikubwimana และ Lee, 2014; Jeya และคณะ, 2010; Lekphrom และ Charupong, 2013) และในปัจจุบันการผลิต CoQ₁₀ ด้วยการหมักจากแบคทีเรียกลายเป็นวิธีที่นิยมในอุตสาหกรรมยา (Tian และคณะ, 2010) อย่างไรก็ตามวิธีการหมักจากแบคทีเรียมีปัจจัยต่างๆที่ต้องศึกษาเพื่อให้ได้ผลผลิต CoQ₁₀ ที่สูงเพียงพอต่อความต้องการของอุตสาหกรรม (Seo และ Kim, 2010) เช่น สภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียหรือการตัดต่อพันธุกรรมของแบคทีเรีย เป็นต้น (Kantachote และ Choorit, 2012; Seo และคณะ, 2006)

จากการทบทวนวรรณกรรมพบงานวิจัยที่ศึกษาผลของปัจจัยการหมักในแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ต่อปริมาณ CoQ₁₀ ที่ได้ โดยปัจจัยหลักที่สำคัญคือ แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ซึ่งเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เนื่องจากเป็นแหล่งพลังงานและเป็นแหล่งแร่ธาตุที่แบคทีเรียนำไปใช้ประโยชน์ในการทำงานภายในเซลล์ การสร้างหรือซ่อมแซมเซลล์ (Kampen, 2014) โดยแบคทีเรียจะเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะอาหารที่เหมาะสม โดยพบว่า sucrose และ corn steep powder เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับที่ให้ผลผลิต CoQ₁₀ ได้ปริมาณสูงในแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* (Ha และคณะ, 2007; Koo และคณะ, 2010; Yuan, Tian และ Yua, 2012) สำหรับแบคทีเรีย *Rhodospirillum rubrum* พบว่า malic acid เป็นแหล่งคาร์บอน และ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ CoQ₁₀ สูงที่สุด (Tian และคณะ, 2010) ใน

แบคทีเรีย *Gluconobacter japonicus* พบว่า sorbitol และ yeast extract กับ peptone เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับที่ให้ CoQ₁₀ สูงที่สุด (Moghadami, Fooladi และ Hosseini, 2019) นอกจากนี้ พบว่า glycerol เป็นแหล่งคาร์บอน และ proteose peptone กับ NH₄NO₃ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ CoQ₁₀ สูงที่สุดในแบคทีเรีย *Paracoccus denitrificans* (Bule และ Singhal, 2011) จากการทบทวนวรรณกรรมจะเห็นว่าความเข้มข้นและชนิดของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนมีผลต่อปริมาณการผลิต CoQ₁₀ ของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ นอกจากนี้ ยังมีผลของระยะเวลาในการหมักเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ต่อปริมาณการผลิต CoQ₁₀ อีกด้วย ซึ่งตัวอย่างแบคทีเรียที่สามารถผลิต CoQ₁₀ ได้ปริมาณสูง เช่น *Agrobacterium tumefaciens*, *Paracoccus denitrificans* และ *Rhodobacter sphaeroides* เป็นต้น (Yoshida และคณะ, 1998)

นอกจากแบคทีเรียที่กล่าวข้างต้นนี้ ยังมีรายงานว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Methylobacterium* สามารถผลิต CoQ₁₀ ได้ (Green, 2006; 2015) แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาการผลิต CoQ₁₀ จากแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T ซึ่งแยกได้จากตะกอนในทะเลสาบ (Patte, Cole และ Hanson, 1976) ได้รับจากศูนย์เก็บเชื้อ National institute of technology and evaluation และ *Methylobacterium* sp. LRY1-08 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ใหม่ที่คัดแยกจากไลเคนในจังหวัดระยองโดยได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการสกัด CoQ₁₀ จากเซลล์แบคทีเรียมีรายงานการศึกษาหลายวิธี โดยวิธีการสกัดแบบ Liquid-liquid extraction เป็นวิธีสกัด CoQ₁₀ ที่นิยมใช้ในหลายๆตัวอย่างโดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง 2-propanol และ hexane (Vaghari และคณะ, 2016) นอกจากนี้ ยังมีงานวิจัยที่มีการศึกษาการทำให้เซลล์แตกก่อนที่จะนำไปสกัดเพื่อที่จะทำลายโครงสร้างผนังเซลล์หรือเยื่อหุ้มเซลล์แล้วสามารถสกัดสารที่อยู่ภายในเซลล์ หรือสามารถทำให้เซลล์ปลดปล่อยสารเหล่านั้นได้ปริมาณมากขึ้น เช่น DNA RNA โปรตีน CoQ₁₀ หรือสารชีวภาพต่างๆ เป็นต้น (Shehadul Islam, Aryasomayajula และ Selvaganapathy, 2017) โดยวิธีที่ใช้ทำลายเซลล์แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ วิธีที่ใช้เอนไซม์ วิธีที่อาศัยเครื่องมือ และวิธีที่ใช้สารเคมี (Jaki และคณะ, 2006; Yuting และคณะ, 2010) โดยมีงานวิจัยที่สกัด CoQ₁₀ จากแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhodospirillum rubrum* และ *Rhodobacter sphaeroides* โดยมีการทำให้เซลล์แตกก่อนด้วยเอนไซม์ จากนั้น สกัดด้วยตัวทำละลายผสม n-propanol : hexane (3:5) (Choi และคณะ, 2005a; Ha และคณะ, 2007; Tian และคณะ, 2010; Wu และ Tsai, 2013) แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดเกี่ยวกับความสามารถในการทำซ้ำ

เนื่องจากความคงตัวของเอนไซม์และวิธีนี้ไม่สามารถใช้กับการผลิตที่ระดับใหญ่ขึ้นได้ สำหรับวิธีการใช้สารเคมี มีงานวิจัยของ Seo และคณะ, (2006) ได้ใช้ส่วนผสมระหว่าง methanol และ 0.3% sodium chloride (10:1) ที่ประกอบด้วย 1% Triton X-100 ควบคู่กับการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) ก่อนไปสกัดด้วยตัวทำละลายผสม isopropanol : hexane (3:5) นอกจากนี้ ในงานวิจัยของ Wu และ Tsai, (2013) ได้ทดลองสกัด CoQ₁₀ ด้วยตัวทำละลายผสม n-propanol : hexane (3:5) เปรียบเทียบกับการสกัดด้วย 95% ethanol จากแบคทีเรีย *Rhodobacter sphaeroides* โดยไม่มีการทำให้เซลล์แตกก่อน ผลการศึกษาพบว่า 95% ethanol สามารถสกัด CoQ₁₀ ได้มากกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายผสม n-propanol : hexane จากวิธีการสกัด CoQ₁₀ ที่หลากหลายวิธีดังกล่าวข้างต้นซึ่งมีและไม่มีขั้นตอนการทำให้เซลล์แตกก่อนการสกัด ในงานวิจัยนี้จึงได้เปรียบเทียบวิธีการทำให้เซลล์แตกก่อน ก่อนนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเพื่อให้ได้วิธีที่เหมาะสมที่สุดในการสกัด CoQ₁₀ จากแบคทีเรีย *Methylobacterium*

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการผลิต CoQ₁₀ จากแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T และ *Methylobacterium* sp. LRY1-08 โดยศึกษาควบคู่ไปกับการหาวิธีการสกัด CoQ₁₀ ที่เหมาะสม แล้วคัดเลือกแบคทีเรียที่ให้ปริมาณการผลิต CoQ₁₀ มากกว่าเพื่อนำไปศึกษาผลของปัจจัยทางกระบวนการหมัก ได้แก่ ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนรวมทั้งระยะเวลาการหมัก ต่อปริมาณ CoQ₁₀ ที่ผลิตได้

วัตถุประสงค์

วัตถุประสงค์ทั่วไป

เพื่อเปรียบเทียบการผลิตโคเอนไซม์คิวเทนจากสายพันธุ์ *Methylobacterium*

วัตถุประสงค์เฉพาะ

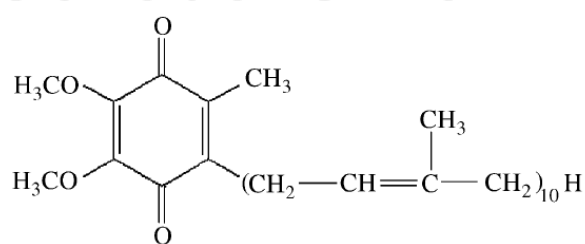
1. เพื่อเปรียบเทียบการผลิตโคเอนไซม์คิวเทนจากสายพันธุ์ *Methylobacterium* sp.LRY1-08 และสายพันธุ์ *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T
2. เพื่อศึกษาผลของวิธีการสกัดโคเอนไซม์คิวเทนจากสายพันธุ์ *Methylobacterium* sp.LRY1-08 และสายพันธุ์ *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T ต่อปริมาณการผลิตโคเอนไซม์คิวเทน
3. เพื่อศึกษาผลของความแตกต่างของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนรวมทั้งความเข้มข้น และระยะเวลาการหมักต่อปริมาณการผลิตโคเอนไซม์คิวเทนจากสายพันธุ์ *Methylobacterium*

บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรม

1. โคเอนไซม์คิวเทน (Coenzyme Q₁₀)

โคเอนไซม์คิวเทน (Coenzyme Q₁₀ หรือ CoQ₁₀) หรือเรียกว่า Ubiquinone-10 (2,3-dimethoxy-5-methyl-6-decaprenyl-1,4-benzoquinone) ซึ่งมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยส่วนหัวคือ 2,3-dimethoxy-methyl-benzoquinone และสาย monosaturated isoprenoid จำนวน 10 หน่วยแสดงดังรูปที่ 1 (Yen และ Chiu, 2007) CoQ₁₀ ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ.1957 โดย Frederick Crane โดยแยกได้จากไมโทคอนเดรียของหัวใจวัว (Littarru และ Lambrechts, 2011) CoQ₁₀ สามารถพบได้ในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ (Yen และ Chiu, 2007) มีลักษณะเป็นผงสีส้ม โดยมีสูตรมวลโมเลกุลคือ C₅₉H₉₀O₄ มีน้ำหนักโมเลกุล 863.34 กรัมต่อโมล มีจุดหลอมเหลวอยู่ที่ 47.5 – 48.5 องศาเซลเซียส (Raekasin, 2013) มีคุณสมบัติคล้ายวิตามิน (Cao และคณะ, 2006) สามารถละลายได้ในไขมันและตัวทำละลายอินทรีย์ซึ่งขึ้นอยู่กับขั้วของตัวทำละลาย โดย CoQ₁₀ มีค่าการละลายที่ 20 องศาเซลเซียส ในตัวทำละลายต่างๆ แสดงดังตารางที่ 1 CoQ₁₀ เป็นสารธรรมชาติที่ร่างกายสามารถสังเคราะห์ขึ้นมาเพื่อเป็นตัวร่วมในปฏิกิริยาสร้างพลังงานในรูป ATP ภายในไมโทคอนเดรีย มีความจำเป็นต่อกระบวนการหายใจระดับเซลล์แบบใช้ออกซิเจนซึ่งเป็นกระบวนการสร้างพลังงานที่มีประสิทธิภาพ จะพบมากในอวัยวะที่ต้องการพลังงานสูง เช่น หัวใจ ตับ กล้ามเนื้อ และสมอง เป็นต้น (Lekphrom และ Charupong, 2013)



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของ CoQ₁₀ (Cao และคณะ, 2006)

ตารางที่ 1 ค่าการละลายของ CoQ₁₀ ที่ 20 °C ในตัวทำละลายต่างๆ (Raekasin, 2013)

ตัวทำละลาย	ค่าการละลายของ CoQ ₁₀ ที่ 20°C (mmol/L)
n-hexane	105
benzene	>270
chloroform	>390
ethanol	5.8
water	ไม่ละลาย

1.1 การนำมาใช้ประโยชน์

1.1.1 ประโยชน์ทางการแพทย์

CoQ₁₀ มีประโยชน์ในทางการแพทย์ มีการประยุกต์ใช้ CoQ₁₀ ช่วยในการป้องกันและรักษาโรคต่างๆ (Bule และ Singhal, 2011; Lekphrom และ Charupong, 2013) ดังนี้

1. โรคระบบหัวใจและหลอดเลือด

โรคระบบหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular diseases) เป็นกลุ่มโรคที่เกิดกับระบบหัวใจและหลอดเลือด ประกอบด้วยโรคหัวใจขาดเลือด โรคความดันโลหิตสูง และโรคหลอดเลือด ซึ่งหัวใจเป็นอวัยวะที่ใช้พลังงานสูง เมื่ออายุมากขึ้นร่างกายจะสังเคราะห์ CoQ₁₀ ได้น้อยลง ทำให้เกิดการสร้างพลังงานลดลงตามไปด้วยจึงส่งผลกระทบต่อหัวใจ ส่งผลต่อกล้ามเนื้อหัวใจเสื่อม โดยคนไข้โรคหัวใจ 70-75% มีระดับ CoQ₁₀ ที่ต่ำ ซึ่งการได้รับประทาน CoQ₁₀ เข้าไปพบว่าช่วยรักษากล้ามเนื้อหัวใจได้ดีขึ้น (Kumar และคณะ, 2009)

- โรคความดันโลหิตสูง (Hypertension) คือภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงความดันภายในหลอดเลือดที่สูงขึ้น CoQ₁₀ จะช่วยในเรื่องลดการต้านทานของผนังหลอดเลือด ช่วยลดอนุมูลอิสระที่ทำลายผนังหลอดเลือด และลดความหนืดของเลือดได้ ส่งผลให้เลือดไหลเวียนได้ดีขึ้น (Kumar และคณะ, 2009)

- ภาวะหัวใจล้มเหลว (Congestive heart failure) คือภาวะที่หัวใจไม่สามารถสูบฉีดเลือดไปเลี้ยงส่วนต่างๆของร่างกายหรือรับเลือดเข้าสู่ร่างกายได้ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการขาด CoQ₁₀

โดย CoQ₁₀ จะไปช่วยเพิ่มการสังเคราะห์พลังงาน ATP ซึ่งเกี่ยวกับการเพิ่มการบีบตัวของกล้ามเนื้อหัวใจให้ทำงานดีขึ้น (Kumar และคณะ, 2009)

2. บทบาทร่วมกับยาลดคอเลสเตอรอล กลุ่มยา statin หรือ 3-hydroxy-3-methylglutary coenzyme A เป็นยาที่ไปยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล (Littarru และ Lambrechts, 2011) จะส่งผลต่อการลดระดับของ CoQ₁₀ เช่นกัน เนื่องจากวิถีชีวสังเคราะห์ของ CoQ₁₀ มีวิถีร่วมกันกับวิถีชีวสังเคราะห์ของคอเลสเตอรอล โดยการรับประทาน CoQ₁₀ ร่วมกับยา statin พบว่าจะช่วยลดภาวะเครียดออกซิเดชันและลดอัตราส่วนระหว่างคอเลสเตอรอลและไขมันดี (Lekphrom และ Charupong, 2013)

3. โรคความเสื่อมของระบบประสาท (Neurodegenerative disease) คือการเสื่อมลงของโครงสร้างหรือการทำงานของเซลล์ประสาท นำไปสู่การตายของเซลล์ประสาท โดยพบว่ามีความสัมพันธ์กับภาวะเครียดออกซิเดชันของเซลล์ประสาทและความเสียหายของไมโทคอนเดรีย ซึ่งสัมพันธ์กับโรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) การรับประทาน CoQ₁₀ จะไปช่วยป้องกันความเสียหายที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ได้ (Lekphrom และ Charupong, 2013)

1.1.2 ประโยชน์ทางเครื่องสำอาง

ในทางเครื่องสำอาง CoQ₁₀ เป็นส่วนประกอบหลักที่สำคัญในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางหลากหลายรูปแบบเช่น ครีม เซรั่ม เป็นต้น ผิวหนังเป็นอวัยวะภายนอกที่ได้รับผลกระทบโดยตรงจากสิ่งแวดล้อม แสงแดด รังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV) จึงเกิดการกระตุ้นให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระภายในชั้นผิวหนัง ก่อให้เกิดการตายของเซลล์ การเกิดริ้วรอย ผิวขาดความยืดหยุ่น และร่องลึก ดังนั้น CoQ₁₀ มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Lekphrom และ Charupong, 2013) ช่วยลดเลือนริ้วรอย และป้องกันสารอนุมูลอิสระ โดยมีการทดสอบในหลอดทดลอง (in vitro) ซึ่งพบว่า CoQ₁₀ สามารถยับยั้งเอนไซม์ MMP-1 เป็นเอนไซม์ย่อยแมทริกซ์ที่อยู่นอกเซลล์และกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ fibroblasts (Žmitek และคณะ, 2017) และการทดสอบในอาสาสมัคร ประเมินการลดลงของริ้วรอยหลังจากใช้ครีมที่มี CoQ₁₀ เป็นองค์ประกอบ โดยทดสอบในอาสาสมัครผู้หญิงจำนวน 31 คน อายุ 27-61 ปี โดยทาครีมที่มี CoQ₁₀ 1 % เปรียบเทียบกับครีมพื้น ว่าง 2 ครั้ง เป็นเวลา 5 เดือน พบว่าคะแนนริ้วรอยบริเวณหางตาจากการประเมินโดยแพทย์ผิวหนังลดลงจาก 2.25 เป็น 1.75 ตามคะแนนของ wrinkle grade standard (Inui และคณะ, 2008) อีกทั้ง CoQ₁₀ ยังเป็นสารสำคัญในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร (Bule และ Singhal, 2011)

1.2 การผลิต CoQ₁₀

การผลิต CoQ₁₀ สามารถผลิตได้ 3 วิธีคือ การสังเคราะห์จากกระบวนการทางเคมี การสกัดจากพืชและสัตว์ และการหมักจากแบคทีเรีย (Bule และ Singhal, 2009; Vaghari และคณะ, 2016; Wu และ Tsai, 2013) โดยการสังเคราะห์จากกระบวนการทางเคมีและวิธีการสกัดจากพืชและสัตว์ มีต้นทุนสูง มีการใช้สารเคมีและตัวทำละลายซึ่งส่งผลต่อสิ่งแวดล้อม และให้ผลผลิตน้อย (Bule และ Singhal, 2011; Tian และคณะ, 2010; Vaghari และคณะ, 2016) ส่วนวิธีการสร้าง CoQ₁₀ ด้วยการหมักจากแบคทีเรียมีข้อดีเหนือกว่า 2 วิธีแรกคือสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ทางชีวภาพมีหลายชนิด สามารถเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่ราคาถูก (Kantachote และ Choorit, 2012) เป็นวิธีที่ทางอุตสาหกรรมให้ความสนใจ เนื่องจากเป็นกระบวนการที่สามารถควบคุมได้ง่ายและลดต้นทุนในการผลิต (Tian และคณะ, 2010; Vaghari และคณะ, 2016; Wu และ Tsai, 2013)

วิถีชีวสังเคราะห์ของ CoQ₁₀

วิถีชีวสังเคราะห์ของ CoQ₁₀ ได้จากการศึกษาวิเคราะห์ทางพันธุศาสตร์ของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยมีการเสนอวิถีสังเคราะห์ออกเป็น 3 ส่วนคือ การสังเคราะห์วงแหวน quinone การสังเคราะห์หน่วยย่อย isoprenoid 10 หน่วย และการปรับเปลี่ยนโครงสร้างในวงแหวน quinone แสดงดังรูปที่ 2

ขั้นตอนที่ 1 การสังเคราะห์วงแหวน quinone

โดยเริ่มจากวงแหวน quinone ได้มาจาก chorismate ในวิถีชิคิเมต (Shikimate pathway) ซึ่งพบได้ในพวกโพรคาริโอตและจะเกิดการปรับเปลี่ยนเป็น pHBA ด้วยเอนไซม์ UbiC ส่วนในยูคาริโอตวงแหวน quinone ได้มาจากกรดอะมิโน Tyrosine หรือกรดอะมิโน Phenylalanine

ขั้นตอนที่ 2 การสังเคราะห์หน่วยย่อย isoprenoid

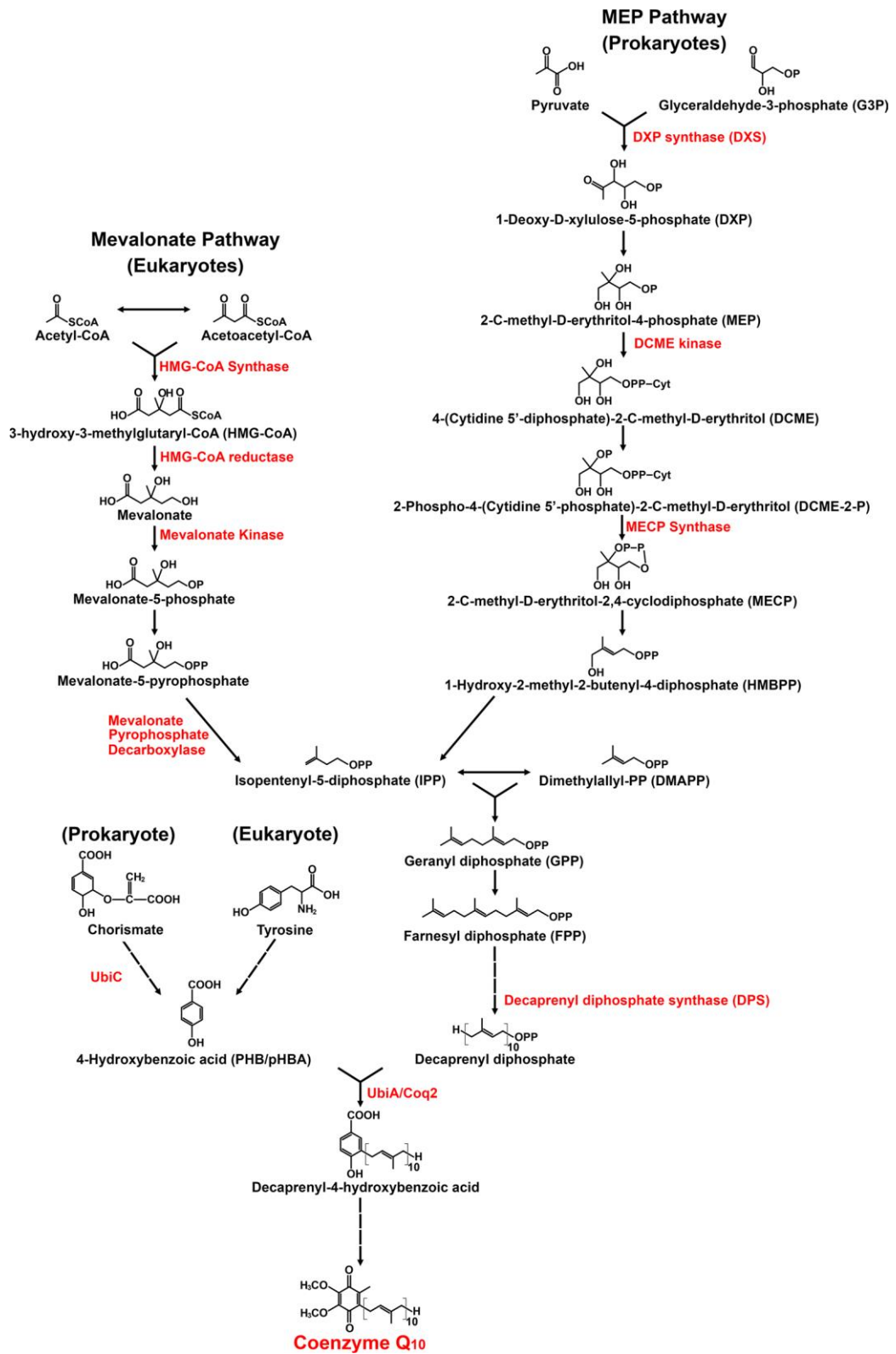
สายยาว isoprenoid สามารถสังเคราะห์ได้ 2 ทาง คือได้จาก Acetyl CoA ในวิถี Mevalonate พบในกลุ่มยูคาริโอตและจากวิถี MEP ซึ่งพบได้ในพวกโพรคาริโอต โดยเริ่มจากปฏิกิริยาควบแน่นระหว่าง pyruvate กับ G3P เป็น DXP เร่งปฏิกิริยาด้วย DXP synthase จากนั้นทำปฏิกิริยาจนได้ IPP แล้วเปลี่ยนเป็น FPP และเปลี่ยนเป็น decarprenyl diphosphate

ขั้นตอนที่ 3 การปรับเปลี่ยนโครงสร้างในวงแหวน quinone

สายยาว decarprenyl diphosphate ทำปฏิกิริยากับ pHBA จากนั้นมีการปรับเปลี่ยนภายในโครงสร้างจนได้ CoQ₁₀ แสดงดังรูปที่ 2 (Choi และคณะ, 2005b; de Dieu Ndikubwimana และ Lee, 2014; Jeya และคณะ, 2010; Lekphrom และ Charupong, 2013)

ถึงแม้ว่า CoQ₁₀ สามารถสังเคราะห์ได้เองภายในร่างกาย แต่เมื่ออายุมากขึ้น ประสิทธิภาพการทำงานในการสังเคราะห์ CoQ₁₀ ลดลง นอกจากนี้ยังมีปัจจัยภายนอกที่ส่งผลให้การสังเคราะห์ CoQ₁₀ ในร่างกายลดลงได้อีก เช่น ผลกระทบจากสภาพแวดล้อม พฤติกรรมการบริโภคที่ไม่เหมาะสม การพักผ่อนไม่เพียงพอ การได้รับยาหรือสารเคมี และความเครียด ทำให้เกิดการเสื่อมของเซลล์ เจ็บป่วย ชราภาพ และเกิดริ้วรอยได้ง่าย CoQ₁₀ จึงเป็นสารสำคัญที่ควรเสริมให้แก่ร่างกาย เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงาน (Lekphrom และ Charupong, 2013; Vaghari และคณะ, 2016)





รูปที่ 2 แสดงชีวสังเคราะห์ของ CoQ₁₀ (Lee และคณะ, 2017)

1.3 แบคทีเรียที่สามารถผลิต CoQ₁₀

CoQ₁₀ สามารถผลิตจากจุลินทรีย์หลากหลายชนิด รวมถึงแบคทีเรียที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Cluis, Pinel และ Martin, 2012) ตัวอย่างแบคทีเรียที่สามารถผลิต CoQ₁₀ ได้ปริมาณสูง ได้แก่ *Agrobacterium tumefaciens* *Paracoccus denitrificans* และ *Rhodobacter sphaeroides* เป็นต้น (Yoshida และคณะ, 1998) และยังมีแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่สามารถผลิต CoQ₁₀ แสดงดังตารางที่ 2

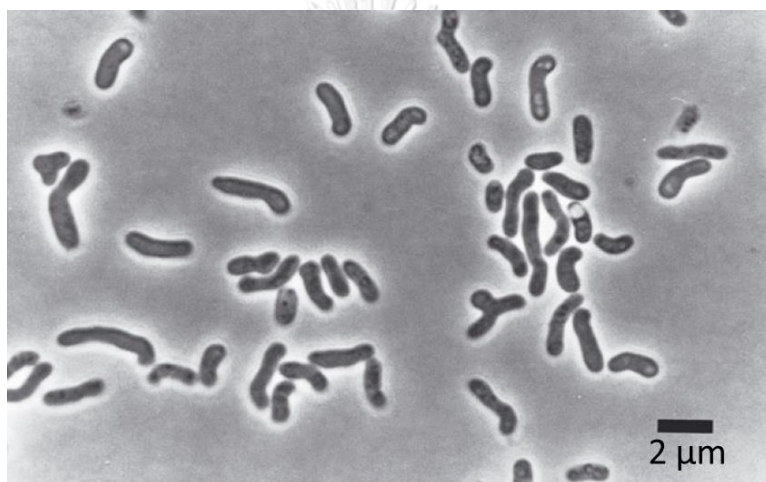
ตารางที่ 2 ตัวอย่างแบคทีเรียที่สามารถผลิต CoQ₁₀ (de Dieu Ndikubwimana และ Lee, 2014)

แบคทีเรีย	CoQ ₁₀ Production (mg/L)	Specific CoQ ₁₀ content (mg/g DCW)	ชนิดของแบคทีเรีย
<i>Pseudomonas N84</i>	2.02	1.2	Wild type
<i>Protaminobacter ruber</i>	2.84	1.52	Wild type
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ATTC4452	87.6	1.9	Wild type
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> AU-55	110.0	9.6	Chemical mutant
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	350	8.7	Chemical mutant

สกุล *Methylobacterium*

Methylobacterium มีลักษณะโคโลนีเป็นสีชมพูหรือสีส้ม นูน รูปร่างเป็นแท่งขนาด 0.8-1.0 × 1.0-8.0 mm แสดงดังรูปที่ 3 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ จัดเป็นแบคทีเรียประเภท facultative methylotroph พบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป เช่น ดิน แหล่งน้ำ ตะกอนทะเลสาบ และบนผิวใบไม้ เป็นต้น สามารถเจริญเติบโตโดยอาศัยแหล่งคาร์บอน 1 อะตอมเป็นแหล่งพลังงาน เช่น methanol และ methane เป็นต้น และเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Green, 2006) ซึ่งจัดจำแนกสกุล *Methylobacterium* (Kelly, McDonald และ Wood, 2014) ได้ดังนี้

ไฟลัม	<i>Proteobacteria</i>
ชั้น	<i>Alphaproteobacteria</i>
อันดับ	<i>Rhizobiales</i>
วงศ์	<i>Methylobacteriaceae</i>
สกุล	<i>Methylobacterium</i>



รูปที่ 3 ลักษณะเซลล์ของ *Methylobacterium* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ (Phase-contrast microscope) (Green, 2015)

โดยมีรายงานว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Methylobacterium* สามารถผลิต CoQ₁₀ ได้ (Green, 2006; 2015) ซึ่งพบ CoQ₁₀ 94% จากโคเอนไซม์ทั้งหมดที่ผลิตได้ในแบคทีเรีย *Methylobacterium extorquens* หรือ *Pseudomonas extroquens* (Urakami และ Komagata, 1979; 1984) แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาการผลิต CoQ₁₀ จากแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T ซึ่งแยกได้จากตะกอนในทะเลสาบ (Patt และ คณะ, 1976) ได้รับจากศูนย์เก็บเชื้อ National institute of technology and evaluation และ *Methylobacterium* sp. LRY1-08 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ใหม่ที่คัดแยกจากไลเคนในจังหวัดระยอง ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต CoQ₁₀ ของแบคทีเรีย

สารอาหารเป็นสิ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เนื่องจากเป็นแหล่งพลังงาน และเป็นแหล่งแร่ธาตุที่แบคทีเรียนำไปใช้ประโยชน์ในการทำงานภายในเซลล์ การสร้างหรือซ่อมแซมเซลล์ (Kampen, 2014) โดยแบคทีเรียจะเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะอาหารที่เหมาะสม ซึ่งจะแตกต่างกันแต่ละสายพันธุ์ โดยทั่วไปปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการหมักของแบคทีเรีย ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุ วิตามิน อุณหภูมิ pH ออกซิเจน และระยะเวลา เป็นต้น โดยจากการทบทวนวรรณกรรมปัจจัยหลักที่มีผลต่อการหมักในแบคทีเรียต่อปริมาณ CoQ₁₀ คือ แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน

1.4.1 แหล่งคาร์บอน

เป็นสารที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ โดยมีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์ และเป็นแหล่งพลังงาน โดยทำหน้าที่เป็นส่วนประกอบต่างๆของเซลล์ซึ่งจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 50% ในการสังเคราะห์เซลล์ โดยชนิดและปริมาณความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนมีผลต่อการเจริญของเซลล์แบคทีเรีย ตัวอย่างแหล่งคาร์บอน เช่น glucose sucrose glycerol แป้ง lactose เป็นต้น (Kampen, 2014) ซึ่งการเลือกชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนให้เหมาะสมเป็นสิ่งสำคัญต่อการเจริญของแบคทีเรีย และการหมักเพื่อผลิต CoQ₁₀ จากการทบทวนวรรณกรรมพบงานวิจัยที่ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนในการหมักในแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ต่อปริมาณ CoQ₁₀ ได้แก่ แบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* พบว่า sucrose (30-50 g/L) เป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ปริมาณ CoQ₁₀ สูงที่สุด (14.88 – 89.5 mg/L) (Ha และคณะ, 2007; Koo และคณะ, 2010; Yuan และคณะ, 2012) ในแบคทีเรีย *Rhodospirillum rubrum* พบว่า malic acid 2.50 g/L เป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ CoQ₁₀ ที่สูงเท่ากับ 9.76 ± 0.13 mg/L (Tian และคณะ, 2010) นอกจากนี้แบคทีเรีย *Gluconobacter japonicus* พบว่า sorbitol 100 g/L เป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ CoQ₁₀ สูงที่สุดเท่ากับ 2.53 ± 0.12 mg/L (Moghadami และคณะ, 2019) และในงานวิจัยของ Bule และ Singhal, (2011) พบ glycerol 40 g/L เป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ CoQ₁₀ สูงที่สุดเท่ากับ 12.22 ± 0.67 mg/L จากแบคทีเรีย *Paracoccus denitrificans*

1.4.2 แหล่งไนโตรเจน

เป็นสารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบโดยมีความสำคัญในการเจริญของแบคทีเรียเนื่องจากเป็นองค์ประกอบในการสร้างโปรตีน กรดนิวคลีอิก และเอนไซม์ อีกทั้งยังเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ ตัวอย่างแหล่งไนโตรเจน เช่น NH₄NO₃ NaNO₃ CSL peptone และ yeast

extract เป็นต้น (Kampen, 2014) โดยการเลือกชนิดและปริมาณความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนให้เหมาะสมก็เป็นสิ่งสำคัญต่อการเจริญและการหมักของแบคทีเรียต่อปริมาณ CoQ₁₀ เช่นกัน จากการศึกษาการทบทวนวรรณกรรมพบงานวิจัยที่ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนในการหมักในแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ต่อปริมาณ CoQ₁₀ ได้แก่ แบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* พบว่า corn steep powder (30-40 g/L) เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ปริมาณ CoQ₁₀ สูงที่สุด (18.92 – 85.80 mg/L) (Ha และคณะ, 2007; Koo และคณะ, 2010; Yuan และคณะ, 2012) นอกจากนี้มีงานวิจัยอื่นๆ ที่พบว่า yeast extract (1.29-20 g/L) เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ปริมาณ CoQ₁₀ มากที่สุดซึ่งพบในแบคทีเรีย *Rhodospirillum rubrum* (9.76 ± 0.13 mg/L) และแบคทีเรีย *Gluconobacter japonicus* (2.53 ± 0.12mg/L) (Moghadami และคณะ, 2019; Tian และคณะ, 2010) และในงานวิจัยของ Bule และ Singhal, (2011) ที่ศึกษาแบคทีเรีย *Paracoccus denitrificans* พบว่า Proteose peptone 20 g/L และ NH₄NO₃ 5 g/L เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ปริมาณ CoQ₁₀ สูงที่สุดเท่ากับ 14.12 ± 0.24 mg/L จากการทบทวนวรรณกรรมจะเห็นว่าความเข้มข้นและแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจนมีผลต่อปริมาณการผลิต CoQ₁₀ ของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์

1.4.3 ระยะเวลา

ระยะเวลาในการหมักแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ก็มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียและต่อปริมาณการผลิต CoQ₁₀ จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า แบคทีเรีย *Paracoccus denitrificans*, *Rhodospirillum rubrum*, *Agrobacterium tumefaciens* และ *Rhodobacter sphaeroides* ระยะเวลาการหมักที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 72-96 ชั่วโมง (Bule และ Singhal, 2011; Ha และคณะ, 2007; Tian และคณะ, 2010; Wu และ Tsai, 2013; Yuan และคณะ, 2012) และแบคทีเรีย *Methylobacterium* ที่แสดงการเจริญเติบโตได้ดีที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง glycerol peptone agar โดยใช้ระยะเวลา 168 ชั่วโมง (Green, 2006)

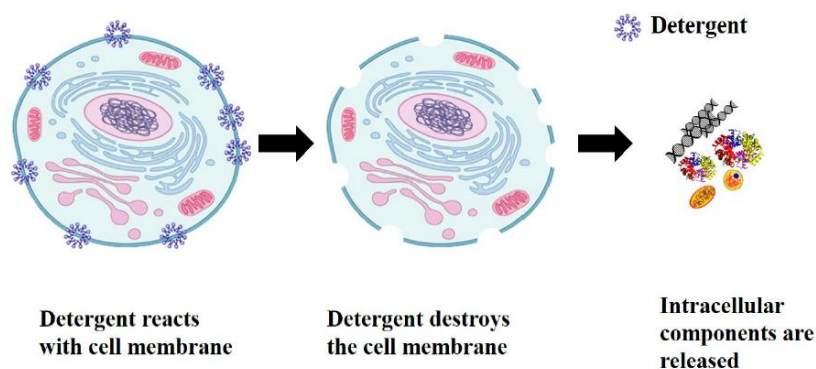
2. การสกัด

การสกัดด้วยตัวทำละลายเป็นวิธีหนึ่งในการแยกสาร โดยอาศัยหลักการของการละลายระหว่างสารสำคัญกับตัวทำละลาย ซึ่งสารสำคัญและตัวทำละลายต้องมีความมีขั้วใกล้เคียงกันตามหลักการ “Like dissolves like” สารสำคัญถึงจะสามารถละลายในตัวทำละลายออกจากสารที่ต้องการแยกได้ (Neelapong, Phonyotin และ Sittikijyothin, 2018)

วิธีการสกัดแบบ Liquid-liquid extraction เป็นวิธีการสกัด CoQ₁₀ ที่นิยมใช้ในหลายๆ ตัวอย่างโดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง 2-propanol และ hexane (Vaghari และคณะ, 2016) เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว เนื่องจากตัวอย่างเป็นเซลล์แบคทีเรียจึงเป็นวิธีสกัดแบบ Solid-liquid extraction วิธีการสกัด CoQ₁₀ จากเซลล์แบคทีเรียมีรายงานการศึกษาหลายวิธี ในงานวิจัยของ Wu และ Tsai, (2013) ได้ศึกษาการสกัด CoQ₁₀ ด้วยตัวทำละลายผสม n-propanol : hexane (3:5) เปรียบเทียบกับการสกัดด้วย 95% Ethanol จากแบคทีเรีย *Rhodobacter sphaeroides* โดยไม่มีการทำให้เซลล์แตกก่อน ผลการศึกษาพบว่า 95% ethanol สามารถสกัด CoQ₁₀ (2.9 mg/g DCW) ได้มากกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายผสม n-propanol : hexane (2.6 mg/g DCW) อีกทั้ง 95% ethanol เป็นตัวทำละลายที่ราคาถูกลงกว่า n-propanol : hexane ซึ่งเหมาะกับการนำไปใช้ในอุตสาหกรรม

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาการทำให้เซลล์แตกก่อนก่อนที่จะนำปัสกัดเพื่อที่จะทำลายโครงสร้างผนังเซลล์หรือเยื่อหุ้มเซลล์ แล้วสามารถสกัดสารที่อยู่ภายในเซลล์ หรือเซลล์มีการปลดปล่อยสารเหล่านั้นได้ปริมาณมากขึ้น เช่น DNA RNA โปรตีน CoQ₁₀ หรือสารชีวภาพต่างๆ เป็นต้น (Shehadul Islam และคณะ, 2017) โดยวิธีที่ใช้ทำลายเซลล์แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ วิธีที่ใช้สารเคมี วิธีที่อาศัยเครื่องมือ วิธีที่ใช้เอนไซม์ เป็นต้น (Jaki และคณะ, 2006; Yuting และคณะ, 2010)

1. วิธีที่ใช้สารเคมี (Chemical method) เป็นวิธีที่สารเคมีสามารถซึมผ่านผนังเซลล์ แล้วไปทำปฏิกิริยาเฉพาะกับองค์ประกอบของผนังเซลล์หรือเยื่อหุ้มเซลล์ให้สามารถปลดปล่อยสารภายในเซลล์ได้มากขึ้น (Yuting และคณะ, 2010) เช่น ตัวทำละลาย กรด ด่าง และสารลดแรงตึงผิว เป็นต้น ดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4 แสดงการทำลายเซลล์ด้วยสารลดแรงตึงผิวหรือสารซักฟอก เพื่อปลดปล่อยสารที่อยู่ภายในเซลล์ (Shehadul Islam และคณะ, 2017)

2. วิธีที่อาศัยเครื่องมือ (Mechanical method) เป็นวิธีที่ใช้เครื่องมือมากกระทำกับเซลล์ โดยอาศัยแรงเฉือน (Shear force) เพื่อทำลายโครงสร้างของผนังเซลล์หรือเยื่อหุ้มเซลล์ และเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมในเชิงธุรกิจเนื่องจากได้ปริมาณงานที่สูงและมีประสิทธิภาพ ตัวอย่างเช่น sonication และ high-pressure homogenization เป็นต้น (Shehadul Islam และคณะ, 2017)

3. วิธีที่ใช้เอนไซม์ (Enzymatic method) เป็นวิธีที่ใช้เอนไซม์ในการย่อยองค์ประกอบของผนังเซลล์ ซึ่งเป็นวิธีทางชีววิทยาที่มีความเฉพาะเจาะจง ตัวอย่างเอนไซม์ เช่น lysozyme, lysostaphin, zymolyase, cellulase และ protease เป็นต้น (Shehadul Islam และคณะ, 2017; Yuting และคณะ, 2010)

มีงานวิจัยที่สกัด CoQ₁₀ จากแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhodospirillum rubrum* และ *Rhodobacter sphaeroides* โดยการทำให้เซลล์แตกก่อนด้วยเอนไซม์จากนั้นสกัดด้วยตัวทำละลายผสม n-propanol : hexane (3:5) (Choi และคณะ, 2005a; Ha และคณะ, 2007; Tian และคณะ, 2010; Wu และ Tsai, 2013) แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดเกี่ยวกับความสามารถในการทำซ้ำ เนื่องจากความคงตัวของเอนไซม์และวิธีนี้ไม่สามารถใช้กับการผลิตที่ระดับใหญ่ขึ้นได้ นอกจากนี้มีงานวิจัยของ Seo และคณะ, (2006) ได้ใช้สารละลายผสมระหว่าง methanol และ 0.3% sodium chloride อัตราส่วน 10:1 ที่ประกอบด้วย 1% Triton X-100 ควบคู่กับการ sonicate ก่อนไปสกัดด้วยตัวทำละลายผสม isopropanol : hexane (3:5) พบว่า สามารถสกัด CoQ₈ (44.6%), CoQ₉ (11.3%) และ CoQ₁₀ (44.1%) โดยคิดเป็นความเข้มข้นเท่ากับ 0.72 มิลลิกรัมต่อลิตร

บทที่ 3

วัสดุและวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 รายการสารเคมีและเครื่องมือ

3.1.1 สารเคมี

1. Absolute ethanol (99.9%) ACS grade (Lot no. K51607983932, Merck, Germany)
2. Agar (Becton, Dickinson and Company, USA)
3. Bacto™ Malt extract (Lot no. 9239948, Becton, Dickinson and Company, USA)
4. Corn steep liquor (Lot no. 55H1066, Sigma-Aldrich, USA)
5. Deionized water
6. Fructose (Sigma-Aldrich, USA)
7. Glucose (Ajax Finechem, Australia)
8. Hexane, ACS grade (Lot no. TAHG4A, Honeywell Burdick & Jackson, Korea)
9. Hexane, HPLC grade (Lot no. U2SM1H, Honeywell Burdick & Jackson, Korea)
10. Hydrochloric acid (Merck, Germany)
11. Isopropyl alcohol (Merck, Germany)
12. Methanol, ACS grade (Lot no. SBAG2A, Honeywell Burdick & Jackson, Korea)
13. Methanol, HPLC grade (Lot no. DX919-TH, Honeywell Burdick & Jackson, Korea)
14. Sodium chloride (Lot no. K49976204833, Merck, Germany)
15. Sodium Hydroxide (Ajax Finechem, Australia)
16. Standard coenzyme Q₁₀ (≥98%) (Lot no. SLBX4909, Sigma-Aldrich, USA)
17. Sucrose (Ajax Finechem, Australia)
18. Triton® X-100 (batch no. 106K0177, Sigma-Aldrich, USA)
19. Yeast extract powder (Lot no. 0000419102, HiMedia, India)

3.1.2 เครื่องมือ

1. Analytical balance (Mettler Toledo, Switzerland)
2. Autoclave (Model HVE-50, HIRAYAMA, Japan)
3. Biosafety cabinet (Scientific Industries, USA)
4. High performance liquid chromatography (HPLC) (Shimadzu LC20, Japan)
 - Auto injector (model SIL-20AC HT, Shimadzu, Japan)
 - Column (Phenomenex C18, 4.6 mm × 250 mm)
 - Column oven (model CTO-20A)
 - Degasser (Model DGU-20A3, Shimadzu, Japan)
 - Pump A, B liquid chromatography (Model LC20-AD, Shimadzu, Japan)
 - System controller (SPD-M20A)
 - UV-VIS detector (diode array detector; SPD-M20A)
5. High speed refrigerator microcentrifuge (Model MX305, TOMY, USA)
6. Micropipette (Gilson, France)
7. Oven (Mettler, Germany)
8. pH meter (SevenCompact™ pH/ion meter S220, Mettler Toledo, Switzerland)
9. Rotary evaporator (BUCHI, Switzerland)
10. Shaker (MaxQ™ 6000 Incubated/Refrigerated stackable shakers, Thermo Fisher Scientific, Inc., USA)
11. Ultrasonic bath (Elma Schmidbauer GmbH, Germany)
12. Vortex mixer (Vortex Genie-2, Scientific Industries, USA)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียและการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียเพื่อการผลิต CoQ₁₀

1.1 การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรีย

การเลี้ยงแบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. LRY1-08 และแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T โดยแต่ละเชื้อแบคทีเรีย 1 ลูบจากผิวหน้าอาหารเอียง (slant agar) ลงในฟลาสก์ที่มีอาหาร yeast extract- malt extract (ISP2) ซึ่งได้จากการคัดเลือกของการศึกษาก่อนหน้านี้ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร มีส่วนประกอบดังนี้ glucose 4 กรัมต่อลิตร, yeast extract 4 กรัมต่อลิตร และ malt extract 10 กรัมต่อลิตร ปรับ pH 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

1.2 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย *Methylobacterium* เพื่อการผลิต CoQ₁₀

นำเซลล์แขวนลอยของทั้ง 2 สายพันธุ์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มีค่าความขุ่น (ค่าการดูดกลืนแสง) ซึ่งวัดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร มีค่าประมาณ 0.6 ลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารสำหรับหมักเชื้อ (ISP2) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 168 ชั่วโมง และนำตัวอย่างเซลล์ที่ได้ไปทำการสกัด CoQ₁₀ ต่อไปนี้ในข้อ 2

2. การศึกษาวิธีการสกัด CoQ₁₀ จากแบคทีเรีย

เก็บตัวอย่างเซลล์แขวนลอยที่ได้จากการหมักเชื้อจากข้อ 1 มา 10 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยง 8000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 15 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้ตกตะกอน แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้น นำเซลล์ที่ตกตะกอนไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้งตามวิธีในข้อ 6.2 และนำไปสกัด CoQ₁₀ โดยศึกษาวิธีการสกัด 4 วิธี ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงวิธีการสกัด CoQ₁₀ จากแบคทีเรีย *Methylobacterium*

วิธี ที่	วิธีการสกัด			ที่มา
	Pretreatment	ตัวทำละลายในการสกัด	สภาวะการ สกัด	
1	methanol และ 0.3% NaCl ที่ประกอบด้วย 1% Triton X-100 อัตราส่วน 10:1 ปริมาตร 5 mL แล้ว sonicate 20 วินาที 15 ครั้ง	isopropanol : hexane (3:5) ปริมาตร 10 mL	40°C เขย่า 200 รอบต่อ นาที เป็น เวลา 30 นาที	ดัดแปลงวิธีของ (Seo และคณะ , 2006)
2	isopropanol : hexane (3:5) 10 mL และ sonication 20 วินาที 15 ครั้ง			ดัดแปลงวิธีของ (Wu และ Tsai, 2013)
3	ไม่มี pretreatment			
4	ไม่มี pretreatment	95% ethanol 10 mL		

จากนั้น นำตัวอย่างที่สกัดได้มาหมุนเหวี่ยง 8000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 15 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้ตกตะกอน แล้วเก็บชั้นใส (organic phase) ไประเหยแห้งด้วยเครื่อง Rotary evaporator และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ CoQ₁₀ ด้วยวิธี HPLC ตามข้อ 6.3 โดยเกณฑ์การเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียและวิธีการสกัดที่เหมาะสม เลือกจากปริมาณการผลิต CoQ₁₀ มากที่สุดเพื่อนำไปศึกษาผลของระยะเวลาการหมัก แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อไป (ทำซ้ำ 3 การทดลอง)

3. การศึกษาผลของระยะเวลาการหมักต่อปริมาณ CoQ₁₀ ผลิตได้

นำแบคทีเรียที่ได้จากข้อ 2 ซึ่งเลี้ยงโดยใช้อาหาร ISP2 ตามข้อที่ 1 แล้วบีบเปิดเซลล์แขวนลอย 5 มิลลิลิตร ลงในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารสำหรับหมักเชื้อ (ISP2) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที ศึกษาผลของระยะเวลาการหมัก คือ 96 และ 168 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างเซลล์ไปสกัดด้วยวิธีที่เลือกจากข้อ 2 นับจำนวนแบคทีเรียตามข้อ 6.1 หาน้ำหนักเซลล์แห้งตามข้อ 6.2 และวิเคราะห์หาปริมาณ CoQ₁₀ ตามข้อ 6.3

โดยเกณฑ์การเลือกระยะเวลาการหมักที่เหมาะสม เลือจากปริมาณการผลิต CoQ₁₀ มากที่สุด (ทำซ้ำ 3 การทดลองและเก็บตัวอย่าง 3 ซ้ำต่อการทดลอง)

4. การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณ CoQ₁₀ ที่ผลิตได้

การศึกษาแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณ CoQ₁₀ โดยใช้แบคทีเรียที่ได้จากข้อ 2 และวิธีการสกัดที่คัดเลือกมาจากข้อ 2 โดยจะทดลองทีละปัจจัย

4.1 การศึกษาแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณ CoQ₁₀

เตรียมอาหาร ISP2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที โดยปรับเปลี่ยนชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ทีละชนิด ได้แก่ methanol, glucose, sucrose และ fructose ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดเท่ากับ 4 กรัมต่อลิตร และกำหนดแหล่งไนโตรเจนเป็น yeast extract ความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร

นำแบคทีเรียที่ได้จากการคัดเลือกจากข้อ 2 เลี้ยงโดยใช้อาหาร ISP2 ตามข้อที่ 1 แล้วปิเปตเซลล์แขวนลอย 5 มิลลิลิตร ลงฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารหมักจากแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิด บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที ตามระยะเวลาการหมักที่ได้จากการศึกษาข้อ 3 จากนั้นนำตัวอย่างเซลล์ไปสกัดด้วยวิธีที่เลือกจากข้อ 2 นับจำนวนแบคทีเรียตามข้อ 6.1 หาน้ำหนักเซลล์แห้งตามข้อ 6.2 และวิเคราะห์หาปริมาณ CoQ₁₀ ตามข้อ 6.3 โดยเกณฑ์การเลือกแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม เลือจากปริมาณการผลิต CoQ₁₀ มากที่สุด (ทำซ้ำ 2 การทดลองและเก็บตัวอย่าง 3 ซ้ำต่อการทดลอง) จากนั้น ศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เลือกนี้ต่อไป

4.2 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณ CoQ₁₀

เตรียมอาหาร ISP2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 4.1 ศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ได้แก่ 2, 4, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร และกำหนดแหล่งไนโตรเจนเป็น yeast extract ความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร นำแบคทีเรียที่ได้จากการคัดเลือกจากข้อ 2 เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร ISP2 ตามข้อที่ 1 แล้วปิเปตเซลล์แขวนลอย 5 มิลลิลิตร ลงฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารหมักจากแหล่งคาร์บอนตามความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที ตามระยะเวลาการหมักที่ได้จากการศึกษาข้อ 3 จากนั้นนำตัวอย่างเซลล์ไปสกัดด้วยวิธีที่เลือกจากข้อ 2 นับจำนวนแบคทีเรียตามข้อ 6.1 หาน้ำหนักเซลล์แห้งตามข้อ 6.2 และวิเคราะห์หา

ปริมาณ CoQ₁₀ ตามข้อ 6.3 โดยเกณฑ์การเลือกความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม เลือกจากปริมาณการผลิต CoQ₁₀ มากที่สุด (ทำซ้ำ 3 การทดลองและเก็บตัวอย่าง 3 ซ้ำต่อการทดลอง)

5. การศึกษาแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นต่อปริมาณ CoQ₁₀

การศึกษาแหล่งไนโตรเจนต่อปริมาณ CoQ₁₀ โดยใช้แบคทีเรียที่ได้จากข้อ 2 และวิธีการสกัดที่คัดเลือกมาจากข้อ 2

เตรียมอาหาร ISP2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที โดยใช้แหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 4.1 และ 4.2 ตามลำดับ และศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน 2 แหล่งคือ yeast extract ที่ความเข้มข้น 2, 4, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร และ CSL ที่ความเข้มข้น 3.2, 6.4, 16, 32 และ 64 มิลลิลิตรต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นของสารที่ให้ปริมาณไนโตรเจนที่เท่ากันตามลำดับ โดยคำนวณจาก yeast extract 15 g/L ให้ปริมาณไนโตรเจนเทียบเท่ากับ CSL 24 mL/L (Liu และคณะ, 2008) นำแบคทีเรียที่ได้จากการคัดเลือกจากข้อ 2 เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร ISP2 ตามข้อที่ 1 แล้วปิเปตเซลล์แขวนลอย 5 มิลลิลิตร ลงฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารหมักที่จะศึกษา บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที ตามระยะเวลาการหมักที่ได้จากข้อ 3 จากนั้นนำตัวอย่างเซลล์ไปสกัดด้วยวิธีที่เลือกจากข้อ 2 นับจำนวนแบคทีเรียตามข้อ 6.1 หาน้ำหนักเซลล์แห้งตามข้อ 6.2 และวิเคราะห์หาปริมาณ CoQ₁₀ ตามข้อ 6.3 โดยเกณฑ์การเลือกแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นที่เหมาะสม เลือกจากปริมาณการผลิต CoQ₁₀ มากที่สุด (ทำซ้ำ 3 การทดลองและเก็บตัวอย่าง 3 ซ้ำต่อการทดลอง)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. การประเมินคุณสมบัติของแบคทีเรียและการวิเคราะห์ปริมาณ CoQ₁₀

6.1 การนับจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิต

วิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียที่ได้จากการหมักเชื้อจากการศึกษาในแต่ละปัจจัยตามข้อ 3, 4 และ 5 โดยมีการเจือจางเป็นลำดับส่วน (serial dilution) แล้วปิเปตตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารวุ้นแข็ง (ISP2) และเกลี่ยตัวอย่างด้วยแท่งแก้วให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหาร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนผิวหน้าอาหารซึ่งอยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี แสดงผลเป็นจำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตร (CFU/mL) โดยคำนวณจากสูตรดังต่อไปนี้ (Bacteriological Analytical Manual, 2001)

$$\text{CFU/mL} = \frac{\Sigma C}{(1 \times n_1) + (0.1 \times n_2) \times d} \quad (1)$$

- เมื่อ ΣC = ผลรวมของโคโลนีทั้งหมดที่นับได้จากงานเพาะเชื้อที่นับได้ในช่วง 25-250 โคโลนี
 n_1 = จำนวนงานเพาะเชื้อที่นับได้ในช่วง 25-250 โคโลนี ในระดับความเข้มข้นแรก
 n_2 = จำนวนงานเพาะเชื้อที่นับได้ในช่วง 25-250 โคโลนี ในระดับความเข้มข้นที่สอง
 d = ระดับความเข้มข้นแรกที่สามารถนับเชื้อได้ในช่วง 25-250 โคโลนี

6.2 น้ำหนักเซลล์แห้ง (Dry cell weight)

เก็บตัวอย่างเซลล์แขวนลอยที่ได้จากการหมักเชื้อตามข้อ 1 มา 10 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยง 8000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 15 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้ตกตะกอน แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลล์ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วชั่งน้ำหนักหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ แสดงเป็นหน่วย กรัมต่อลิตรของเซลล์แขวนลอย (g/L) (Wu และ Tsai, 2013)

6.3 การวิเคราะห์หาปริมาณ CoQ₁₀ ด้วยวิธี High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากกระบวนการเตรียมในข้อที่ 2 มาละลายด้วย 95% ethanol แล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (Wu และ Tsai, 2013) คำนวณปริมาณ CoQ₁₀ โดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน CoQ₁₀ และคำนวณการแปลงหน่วย แสดงเป็นค่า CoQ₁₀ production (mg/L) ซึ่งคำนวณจากปริมาณ CoQ₁₀ ที่วิเคราะห์ได้ต่อปริมาณเซลล์แขวนลอย และคำนวณค่า Specific CoQ₁₀ content (mg/g DCW) ดังสมการที่ 2

$$\text{Specific CoQ}_{10} \text{ content (mg/g DCW)} = \frac{\text{CoQ}_{10} \text{ production (mg/L)}}{\text{DCW (g/L)}} \quad (2)$$

สภาวะ HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์ CoQ₁₀ มีดังนี้

คอลัมน์ : Phenomenex 250 mm 4.6 mm RP-C18 column

ปริมาณที่ฉีด : 10 ไมโครลิตร

อัตราการไหล : 1 มิลลิลิตรต่อนาที

เฟสเคลื่อนที่ : 70% methanol และ 30% hexane

เครื่องตรวจวัด : Shimadzu Model SPD-20A UV-Vis detector at 275 นาโนเมตร

โดยมีการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ตามวิธีของ ICH guideline Q2 (R1) ดังนี้

1 การวัดความจำเพาะ (Specificity)

โดยการเทียบสารสกัดตัวอย่างกับสารมาตรฐาน CoQ₁₀ ผลวิเคราะห์โดยพีคของสารสำคัญจะต้องไม่ถูกรบกวนจากสารประกอบอื่นๆ

2 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน 7 ความเข้มข้น คือ 1, 2.5, 5, 10, 20, 30 และ 40 µg/mL แล้วนำไปสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) เพื่อหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้พีคโดยค่า r^2 (coefficient of determination) จะต้องมีค่ามากกว่า 0.999

3 การวัดเชิงปริมาณค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่วิธีทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้ในตัวอย่างอย่างถูกต้อง (limit of quantitation; LOQ) และการตรวจหาปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้ในตัวอย่าง (limit of detection; LOD)

คำนวณค่า LOQ และ LOD ได้จากสมการดังนี้

$$LOQ = 10\sigma/S$$

$$LOD = 3.3\sigma/S$$

เมื่อ σ คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

S คือ ความชันของกราฟมาตรฐาน

แทนค่าสมการในสูตรจากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน จากนั้นยืนยันความถูกต้องโดยการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นของ CoQ₁₀ ที่คำนวณได้ด้วยวิธี HPLC

4. ความถูกต้อง (Accuracy)

ทดสอบโดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน CoQ₁₀ ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน 3 ความเข้มข้นในช่วงที่ศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้น ทดสอบความเข้มข้นละ 3 ครั้ง คำนวณหา %recovery ต้องมีค่าอยู่ในช่วง 98-102%

5. ความแม่นยำ (Precision)

5.1. Within-run precision (repeatability) วิเคราะห์ความเข้มข้นของ CoQ₁₀ 3 ความเข้มข้น ทดสอบความเข้มข้นละ 3 ครั้ง ภายในคราวเดียวกัน คำนวณ RSD (Relative standard deviation) หรือ CV (coefficient of variation) ต้องมีค่าน้อยกว่า 2%

5.2. Between-run precision วิเคราะห์ความเข้มข้นของ CoQ₁₀ 3 ความเข้มข้น โดยวิเคราะห์ต่างวันกัน 3 วัน คำนวณค่า RSD (Relative standard deviation) หรือ CV (coefficient of variation) ต้องมีค่าน้อยกว่า 2%

7. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

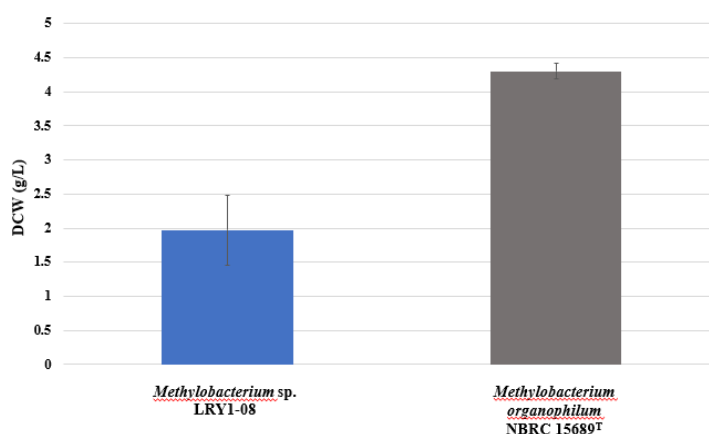
ข้อมูลผลการทดลองเชิงปริมาณได้จากการทำซ้ำ 3 การทดลอง ของการศึกษาผลของวิธีการสกัดและสายพันธุ์ของแบคทีเรีย การทำซ้ำ 6 การทดลอง ของการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอน และการทำซ้ำ 9 การทดลอง ของการศึกษาผลของระยะเวลาการหมัก ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน การวิเคราะห์ทางสถิติดำเนินการโดยใช้ T-Test independent สำหรับวิเคราะห์ข้อมูลที่มีกลุ่มตัวอย่าง 2 กลุ่ม และ One-Way ANOVA สำหรับวิเคราะห์ข้อมูลที่มีการศึกษาปัจจัยเดียวและมีกลุ่มตัวอย่างมากกว่า 2 กลุ่ม และใช้ Tukey's test เพื่อเปรียบเทียบสถิติระหว่างกลุ่ม โดยมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($p < 0.05$)

บทที่ 4

ผลและการอภิปรายผลการทดลอง

1. การศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย *Methylobacterium* เพื่อสกัด CoQ₁₀

การศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยเริ่มจากการเลี้ยงแบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. LRY1-08 และแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T ในอาหาร ISP2 จากนั้นเข้าสู่กระบวนการหมักแล้วเก็บตัวอย่างเซลล์แขวนลอย เพื่อนำเซลล์ไปวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์แห้ง ผลการศึกษาพบว่า น้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T ที่ได้เท่ากับ 4.30 ± 0.11 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณมากกว่าแบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. LRY1-08 ที่ได้เท่ากับ 1.97 ± 0.52 กรัมต่อลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงดังรูปที่ 5 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าแบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. LRY1-08 ภายใต้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกัน (ISP2) ซึ่งได้จากการศึกษาท่อนำของงานวิจัยนี้ที่มีการเปรียบเทียบผลของชนิดอาหารเลี้ยงแบคทีเรียระหว่าง methanol mineral salts (MMS), glycerol-peptone (GP) (Green, 2006), R2A (Kelly และคณะ, 2014) และ yeast extract-malt extract (ISP2) โดยดูการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบนเพลทอาหาร และพบว่า อาหาร ISP2 ให้การเจริญเติบโตของเชื้อทั้งสองชนิดนี้ได้ดีที่สุด



รูปที่ 5 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. LRY1-08 และ *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T ที่หมักด้วยอาหาร ISP2

เป็นเวลา 168 ชั่วโมง (ค่าเฉลี่ย \pm SD, n = 3)

2. การศึกษาวิธีการสกัด CoQ₁₀ จากแบคทีเรีย *Methylobacterium*

การศึกษาวิธีการสกัด CoQ₁₀ โดยนำเซลล์จากการเลี้ยงข้อที่ 1 ไปสกัด CoQ₁₀ ด้วย isopropanol กับ hexane (3:5) และ 95% ethanol ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบ ต่อนาที เป็นระยะเวลา 30 นาที โดยก่อนการสกัดจะมีวิธีการ pretreatment ที่แตกต่างกันเพื่อเป็นการทำลายเซลล์ให้สามารถสกัด CoQ₁₀ จากเยื่อหุ้มเซลล์ได้ปริมาณมากขึ้น โดยในงานวิจัยนี้จะศึกษาวิธีการสกัดทั้งหมด 4 วิธี แสดงผลดังตารางที่ 4 เมื่อเปรียบเทียบวิธีที่ 1 กับวิธีที่ 2 ซึ่งใช้ตัวทำละลายในการ pretreatment ที่แตกต่างกัน แต่ใช้วิธี sonication และวิธีการสกัดเหมือนกัน และเปรียบเทียบวิธีที่ 3 กับวิธีที่ 4 ซึ่งไม่มีการ pretreatment แต่ใช้ตัวทำละลายในการสกัดแตกต่างกัน

ตารางที่ 4 ผลของวิธีการสกัดต่อปริมาณ CoQ₁₀ ของแบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. LRY1-08 และ *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T (ค่าเฉลี่ย \pm SD, n = 3)

วิธีที่	<i>Methylobacterium</i> sp. LRY1-08		<i>Methylobacterium organophilum</i> NBRC 15689 ^T	
	CoQ ₁₀ production (mg/L)**	Specific CoQ ₁₀ content (mg/g DCW)**	CoQ ₁₀ production (mg/L)**	Specific CoQ ₁₀ content (mg/g DCW)**
1	0.9173 \pm 0.05 ^{aA}	0.4656 \pm 0.03 ^{a*}	3.0881 \pm 0.17 ^{aB}	0.7182 \pm 0.04 ^{a#}
2	0.2320 \pm 0.04 ^{bA}	0.1178 \pm 0.02 ^{b*}	2.6825 \pm 0.10 ^{bB}	0.6238 \pm 0.02 ^{b#}
3	0.2818 \pm 0.06 ^{bA}	0.1431 \pm 0.03 ^{b*}	1.9133 \pm 0.10 ^{cB}	0.4450 \pm 0.02 ^{c#}
4	0.0000 ^{cA}	0.0000 ^{c*}	0.0000 ^{dA}	0.0000 ^{d*}

**ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน (a-d) ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างวิธี pretreatment ที่แตกต่างกันต่อปริมาณ CoQ₁₀ ในแต่ละสายพันธุ์ (p<0.05), ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกัน (A,B) ระหว่างคอลัมน์แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างสายพันธุ์ที่ใช้วิธี pretreatment เดียวกันต่อ CoQ₁₀ production (p<0.05), สัญลักษณ์ที่แตกต่างกัน (*,#) ระหว่างคอลัมน์แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างสายพันธุ์ที่ใช้วิธี pretreatment เดียวกันต่อ Specific CoQ₁₀ content (p<0.05)

ผลการศึกษาพบว่าค่า CoQ₁₀ production และ Specific CoQ₁₀ content ของวิธีการสกัดที่ 1 ซึ่งใช้ methanol และ 0.3% NaCl ที่ประกอบด้วย 1% Triton X-100 อัตราส่วน 10:1 มีปริมาณมากที่สุดทั้งสองสายพันธุ์เมื่อเทียบกับวิธีอื่นๆ เนื่องจากมีการทำลายเซลล์ก่อนด้วยตัวทำละลายทางเคมีและใช้เครื่องมือร่วมด้วย ซึ่งตัวทำละลายทางเคมีสามารถซึมผ่านผนังเซลล์ของแบคทีเรียและทำปฏิกิริยาเฉพาะกับองค์ประกอบของผนังเซลล์ (Yuting และคณะ, 2010) ดังนั้นโครงสร้างของเซลล์แบคทีเรียจะถูกทำลาย ทำให้สามารถสกัด CoQ₁₀ ได้ปริมาณมากขึ้น และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ การใช้คลื่นเสียงความถี่สูง ซึ่งเป็นวิธีเชิงกลที่ถูกนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการที่สามารถทำลายเซลล์โดยเกิดแรงดันสูง เกิดการสร้างฟองอากาศขนาดเล็ก จากการสั่นสะเทือนของคลื่นความถี่ทำให้เกิดโพรงอากาศภายในของเหลว โดยส่วนใหญ่โพรงอากาศจะเกิดใกล้บริเวณพื้นผิวที่สั่นสะเทือน ส่งผลไปทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ (Yuting และคณะ, 2010)

สำหรับวิธีที่ 2 ใช้ตัวทำละลายผสม isopropanol และ hexane (3:5) ควบคู่กับการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง พบว่า CoQ₁₀ production และ Specific CoQ₁₀ content มีปริมาณน้อยกว่าวิธีที่ 1 แสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายทางเคมีมีผลมากกว่าการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง นอกจากนี้ วิธีที่ 2 มีปริมาณ CoQ₁₀ production และ Specific CoQ₁₀ content มากกว่าวิธีที่ 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T ซึ่งทั้งสองวิธีใช้ isopropanol : hexane (3:5) เหมือนกัน แต่วิธีที่ 2 ใช้คลื่นเสียงความถี่สูงร่วมด้วย ในขณะที่วิธีที่ 3 ไม่ได้ใช้ แสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงต่อปริมาณ CoQ₁₀ ที่สกัดได้ อย่างไรก็ตาม ไม่พบความแตกต่างนี้กับแบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. LRY1-08 ซึ่งอาจเนื่องจากความแตกต่างของผนังเซลล์ของแบคทีเรียสองชนิดนี้ และเนื่องด้วยข้อจำกัดของปริมาณตัวอย่างซึ่งมีปริมาณน้อย ในงานวิจัยนี้จึงใช้เครื่อง sonication bath ซึ่งมีความถี่น้อยและความแรงอาจไม่เพียงพอในการทำให้เซลล์ชนิดนี้แตก ในการทดลองครั้งต่อไปควรมีการศึกษาผลของการใช้เครื่อง sonication probe ในการทำให้เซลล์แตกโดยศึกษาในปริมาณการผลิตที่มากขึ้น

เมื่อเปรียบเทียบวิธีที่ 3 กับวิธีที่ 4 ที่ไม่มี pretreatment แต่ใช้ตัวทำละลายในการสกัดต่างกัน ทั้งสองสายพันธุ์ พบว่า isopropanol และ hexane (3:5) สามารถสกัด CoQ₁₀ ได้ปริมาณมากกว่า 95% ethanol อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ผลการศึกษานี้ไม่สอดคล้องกับงานวิจัยของ (Wu และ Tsai, 2013) ที่รายงานว่า 95% ethanol สามารถสกัด CoQ₁₀ ได้ดีกว่าตัวทำละลาย n-propanol และ hexane (3:5) ในแบคทีเรีย *Rhodobacter sphaeroides* โดยไม่มีการทำลายเซลล์ก่อน (pretreatment) ทั้งนี้ อาจเป็นเนื่องจากความแตกต่างของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแต่ละ

สายพันธุ์ อีกทั้งผลการศึกษารั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า 95% ethanol มีประสิทธิภาพการสกัดน้อยกว่า isopropanol และ hexane (3:5) เนื่องจาก CoQ₁₀ เป็นสารที่ละลายในไขมัน มีความเป็นขี้ดต่ำ ตัวทำละลาย isopropanol และ hexane (3:5) จึงเหมาะสมต่อการสกัด CoQ₁₀ ที่มีความเป็นขี้ดใกล้เคียงกันกับ CoQ₁₀ มากกว่าตามหลักการ “Like dissolves like”

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อปริมาณ CoQ₁₀ พบว่าแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T สามารถผลิต CoQ₁₀ ได้ปริมาณมากกว่าแบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. LRY1-08 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ทั้งค่า CoQ₁₀ production และ Specific CoQ₁₀ content ในทุกวิธีของการสกัด ซึ่งสอดคล้องกับผลน้ำหนักรเซลล์แห้งที่ได้ ดังนั้น การเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ส่งผลต่อปริมาณการผลิต CoQ₁₀ จากผลการศึกษาวีธีการสกัดและเปรียบเทียบการผลิต CoQ₁₀ จากทั้งสองสายพันธุ์ จึงเลือกวิธีสกัดวิธีที่ 1 ที่ใช้ methanol และ 0.3% sodium chloride ที่ประกอบด้วย 1% Triton X-100 อัตราส่วน 10:1 และสกัดด้วยตัวทำละลาย isopropanol และ hexane (3:5) สำหรับใช้สกัด CoQ₁₀ จากเซลล์แบคทีเรียในการศึกษาต่อไป และเลือกสายพันธุ์แบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T ในการศึกษาปัจจัยของระยะเวลาการหมัก แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อไป

3. การศึกษาผลของระยะเวลาการหมักต่อปริมาณ CoQ₁₀ ที่ผลิตได้

จากการศึกษาผลของระยะเวลาการหมักโดยเปรียบเทียบระหว่าง 96 ชั่วโมงกับ 168 ชั่วโมง โดยเลือกจากระยะเวลาการหมักที่เหมาะสมของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นต่อปริมาณ CoQ₁₀ ที่ผลิตได้มากที่สุด และระยะเวลาของแบคทีเรีย *Methylobacterium* ที่สามารถเจริญได้ดี ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 5 พบว่า การหมักแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T ที่ 96 ชั่วโมง ให้ปริมาณ CoQ₁₀ production ซึ่งเป็นปริมาณ CoQ₁₀ ที่ผลิตได้ต่อเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรีย 1 ลิตร มากกว่าที่ใช้ระยะเวลาการหมัก 168 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับผลของเซลล์น้ำหนักรแห้งที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมงที่ให้น้ำหนักรเซลล์แห้งมากกว่าระยะเวลาหมักที่ 168 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เช่นกัน เนื่องจาก CoQ₁₀ อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ของทั้งเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายแล้ว ซึ่งสามารถสกัดออกมาได้จากเซลล์ทั้งสองแบบ ปริมาณ CoQ₁₀ ที่ได้จึงมีความสอดคล้องกับน้ำหนักรเซลล์แห้งซึ่งอาจมีทั้งเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายแล้ว สำหรับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่นับได้ที่ระยะเวลาการหมักทั้ง 96 และ 168 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตได้อย่างน้อยมากกว่า 250×10^{10} CFU/mL ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ทั้งสองระยะเวลายังมีเซลล์

แบคทีเรียที่มีชีวิตอยู่ โดยที่ 96 ชั่วโมงอาจจะมีเซลล์ที่มีชีวิตมากกว่าที่ 168 ชั่วโมง แต่ไม่สามารถระบุจำนวนเซลล์ได้อย่างแน่นอน อย่างไรก็ตาม น้ำหนักเซลล์แห้งของระยะเวลาการหมักที่ 168 ชั่วโมงควรมีค่าที่มากกว่าหรือไม่ต่างจากที่ 96 ชั่วโมง แต่จากผลการทดลองกลับมีค่าน้อยกว่า ซึ่งอาจเนื่องมาจากการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในแต่ละพลาสติกก็มีความแตกต่างกัน แม้ว่างานวิจัยนี้จะมีการควบคุมปัจจัย เช่น ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น การเขย่า อุณหภูมิ และมีการล้างเซลล์แบคทีเรียก่อนนำไปชั่ง แล้วก็ตาม

ส่วนค่า Specific CoQ₁₀ content พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากเป็นค่าที่แสดงปริมาณ CoQ₁₀ ที่ผลิตได้ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งชี้ให้เห็นว่า ปริมาณ CoQ₁₀ ที่ผลิตได้แปรผันตามปริมาณของเซลล์แบคทีเรียที่เจริญเติบโต การเจริญเติบโตของแบคทีเรียจะแบ่งเป็น 4 ช่วงคือ lag phase, log phase, stationary phase และ death phase (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2560) ซึ่งระยะเวลา 96 ชั่วโมงครอบคลุมช่วง log phase หรือช่วงที่มีการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนเซลล์แบคทีเรีย อีกทั้งยังเป็นช่วงที่อัตราการเจริญเติบโตสูงสุด และ stationary phase ที่มีการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่สภาวะคงที่ จากงานวิจัยของ Wang และคณะ, (2019) พบว่าปริมาณ CoQ₁₀ และการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Rhodobacter sphaeroides* จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 32 ชั่วโมงซึ่งได้ปริมาณ CoQ₁₀ เท่ากับ 58 มิลลิกรัมต่อลิตรและน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 24.50 กรัมต่อลิตร และจะเริ่มเจริญเติบโตช้าลงหรือเข้าสู่ช่วงสภาวะคงที่ จนครบ 96 ชั่วโมงได้ปริมาณ CoQ₁₀ 93.30 มิลลิกรัมต่อลิตรและน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 34.67 กรัมต่อลิตร ซึ่งระยะเวลา 96 ชั่วโมงเป็นระยะเวลาที่ปริมาณ glucose ลดลงเหลือ 1.01 กรัมต่อลิตรหรือหมดพอดี และสอดคล้องกับงานวิจัยที่แบคทีเรีย *Paracoccus denitrificans*, *Rhodospirillum rubrum* และ *Agrobacterium tumefaciens* ใช้ระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมงซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต CoQ₁₀ (Bule และ Singhal, 2011; Ha และคณะ, 2007; Tian และคณะ, 2010) และเมื่อระยะเวลามากขึ้นจะมีแนวโน้มที่หยุดการเจริญเติบโต และลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว (death phase) สาเหตุมาจากสารอาหารที่หมดไป ซึ่งระยะเวลา 168 ชั่วโมงอาจเป็นช่วงที่หยุดการเจริญเติบโตจึงส่งผลให้ผลิต CoQ₁₀ ลดลงไปด้วย อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ไม่สอดคล้องกับรายงานที่พบว่าแบคทีเรีย *Methylobacterium* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง glycerol peptone agar โดยใช้ระยะเวลาการหมัก 168 ชั่วโมงจะแสดงการเจริญเติบโตของโคโลนีที่ให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่ที่สุดถึง 1-3 มิลลิเมตร (Green, 2006) ทั้งนี้ อาจเป็นเนื่องจาก อาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

แตกต่างกัน จากการศึกษารสผลของระยะเวลาการหมักต่อปริมาณ CoQ₁₀ ที่ผลิตได้ จึงเลือกระยะเวลาการหมักที่ 96 ชั่วโมงเพื่อศึกษาปัจจัยของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อไป

ตารางที่ 5 ผลของระยะเวลาการหมักต่อปริมาณ CoQ₁₀ ที่ผลิตได้ น้ำหนักเซลล์แห้งและจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T (ค่าเฉลี่ย \pm SD, n = 9)

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	CoQ ₁₀ production (mg/L)*	Specific CoQ ₁₀ content (mg/g DCW)*	DCW (g/L)*	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/mL)
96	1.4370 \pm 0.06 ^a	0.8534 \pm 0.10 ^a	1.70 \pm 0.15 ^a	>250 \times 10 ¹⁰
168	1.1900 \pm 0.15 ^b	0.9152 \pm 0.14 ^a	1.31 \pm 0.15 ^b	>250 \times 10 ¹⁰

*ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน (a,b) ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างระยะเวลาการหมักที่แตกต่างกันต่อปริมาณ CoQ₁₀ และน้ำหนักเซลล์แห้ง (p<0.05)

และจะเห็นได้ว่าการศึกษานี้ให้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและ CoQ₁₀ production ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาวิธีการสกัดของวิธีที่ 1 ในแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T (รูปที่ 5 และตารางที่ 4) ทั้งนี้สาเหตุอาจมาจากปริมาณของการหมักแบคทีเรียที่แตกต่างกัน โดยในการศึกษาวิธีการสกัดจะหมักแบคทีเรียในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร แต่ในการศึกษาปัจจัยของระยะเวลาการหมักจะใช้ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เนื่องจากมีข้อจำกัดของเครื่องเขย่าสามารถบรรจุฟลาสก์ได้ปริมาณน้อยต่อการศึกษาแต่ละปัจจัยในคราวเดียว ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า ขนาดของฟลาสก์ที่ใช้ในการหมักมีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและปริมาณ CoQ₁₀ ที่ผลิตได้

4. การศึกษารสผลของแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นต่อปริมาณ CoQ₁₀ ที่ผลิตได้

4.1 การศึกษาแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณ CoQ₁₀

การศึกษารสผลของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณ CoQ₁₀ ที่ผลิตได้ ได้นำแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T ที่ได้คัดเลือกมาจากข้อ 2 เลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิด ได้แก่ methanol, glucose, sucrose และ fructose โดยความเข้มข้นของ

แหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดเท่ากับ 4 กรัมต่อลิตร โดยเลือกจากแหล่งคาร์บอนที่ให้ปริมาณ CoQ₁₀ เป็นอันดับแรกของสายพันธุ์อื่นและ methanol มีรายงานว่า เป็นแหล่งคาร์บอน 1 อะตอมที่แบคทีเรีย *Methylobacterium* สามารถเจริญเติบโตได้และใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) (Kim และคณะ, 1996) โดยกำหนดแหล่งไนโตรเจนเป็น yeast extract ความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร โดยนำเซลล์ไปสกัดด้วยวิธีที่ได้จากผลการทดลองในข้อ 2 ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 6 พบว่า แบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T สามารถใช้ glucose เป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ปริมาณ CoQ₁₀ production ได้มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อีกทั้งปริมาณ Specific CoQ₁₀ content และน้ำหนักรวมเซลล์แห้งมีปริมาณมากที่สุดเช่นกัน แหล่งคาร์บอนที่ให้ปริมาณ CoQ₁₀ รองลงมาคือ fructose, sucrose และ methanol ตามลำดับ แต่ methanol ให้น้ำหนักรวมเซลล์แห้งรองลงมาจาก glucose ตามด้วย fructose และ sucrose ตามลำดับ และพบว่า น้ำหนักรวมเซลล์แห้งที่ได้ไม่สอดคล้องกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่นับได้ โดยจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่นับได้จากแหล่งคาร์บอนเรียงจากมากไปน้อย ดังนี้ glucose, fructose, methanol และ sucrose ทั้งนี้อาจมาจากแบคทีเรียสามารถใช้ methanol ในการเจริญเติบโตได้ดีในช่วง log phase และลดอัตราการเจริญเติบโตลงเร็วกว่า fructose

ตารางที่ 6 ผลของชนิดแหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร ต่อปริมาณ CoQ₁₀ น้ำหนักรวมเซลล์แห้งและจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T (ค่าเฉลี่ย \pm SD, n = 6)

แหล่งคาร์บอน	CoQ ₁₀ production (mg/L)*	Specific CoQ ₁₀ content (mg/g DCW)*	DCW (g/L)*	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/mL)
Glucose	2.0336 \pm 0.47 ^a	1.2446 \pm 0.29 ^a	1.64 \pm 0.07 ^a	232 \times 10 ¹⁰
Sucrose	0.6203 \pm 0.09 ^c	0.8017 \pm 0.13 ^b	0.78 \pm 0.06 ^c	257 \times 10 ⁹
Fructose	1.1308 \pm 0.07 ^b	0.9826 \pm 0.06 ^{ab}	1.15 \pm 0.09 ^b	227 \times 10 ¹⁰
Methanol	0.3776 \pm 0.21 ^c	0.2584 \pm 0.14 ^c	1.49 \pm 0.23 ^a	269 \times 10 ⁹

*ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน (a-d) ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันต่อปริมาณ CoQ₁₀ และน้ำหนักรวมเซลล์แห้ง ($p < 0.05$)

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดมีผลต่อปริมาณ CoQ₁₀ ที่แตกต่างกันและส่งผลต่อการเจริญเติบโตที่ต่างกัน ในแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T ซึ่ง glucose ถูกใช้เป็นสารอาหารในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ของกระบวนการต่างๆ ได้แก่ การสร้างพลังงาน และการหายใจแบบใช้ออกซิเจน เป็นต้น โดย glucose เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการไกลโคไลซิส (Glycolysis) โดยได้ผลผลิตเป็น pyruvate และ ATP ซึ่ง pyruvate เป็นสารตั้งต้นในวิถี MEP ที่อยู่ในขั้นตอนของการสังเคราะห์หน่วยย่อย isoprenoid ของวิถีชีวสังเคราะห์ของ CoQ₁₀

สำหรับผลของ methanol มีรายงานว่าแบคทีเรีย *Methylobacterium* สามารถใช้ methanol เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตได้ดี (Green, 2006) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองนี้ แต่พบว่า methanol เป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ปริมาณ CoQ₁₀ ได้น้อยที่สุด ซึ่งแสดงให้เห็นว่า methanol สามารถเป็นแหล่งคาร์บอนที่ช่วยให้แบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T เจริญเติบโตได้และสามารถผลิต CoQ₁₀ ได้ แต่ไม่ใช่แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อปริมาณการผลิต CoQ₁₀ อาจเป็นเนื่องจาก methanol ไม่ได้เป็นสารตั้งต้นโดยตรงในกระบวนการชีวสังเคราะห์ CoQ₁₀ โดยผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนไม่สอดคล้องกับผลที่ได้จากการศึกษาแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นเลย แต่ให้ปริมาณ CoQ₁₀ ใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *Gluconobacter japonicus* ซึ่งใช้ sorbitol เป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ปริมาณ CoQ₁₀ สูงที่สุดเท่ากับ 2.21 ± 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร (Moghadami และคณะ, 2019) ดังนั้นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิต CoQ₁₀ จะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย จากงานวิจัยนี้ glucose เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิต CoQ₁₀ ของแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T มากที่สุด จึงเลือก glucose เพื่อนำไปศึกษาผลของความเข้มข้นต่อไป

4.2 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณ CoQ₁₀

จากการศึกษาแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณ CoQ₁₀ ได้เลือก glucose ที่เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิต CoQ₁₀ ของแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T มากที่สุดมาศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อปริมาณ CoQ₁₀ ที่ผลิตได้ โดยปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของ glucose เป็น 2, 4, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร ซึ่งปรับเปลี่ยนความเข้มข้นลดลงและเพิ่มขึ้นจากสูตรเดิมเพื่อดูแนวโน้มของผลการศึกษาอย่างชัดเจน และกำหนดแหล่งไนโตรเจนเป็น yeast extract ความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร แล้วนำไปสกัดตามวิธีที่ได้จากผลการทดลองในข้อ 2 ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 7 พบว่า เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของ glucose จาก 2 กรัมต่อลิตรไปถึง 10 กรัมต่อ

ลิตร ปริมาณ CoQ₁₀ ที่ได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ glucose ไปถึง 20 กรัมต่อลิตร โดยความเข้มข้นของ glucose ที่ 10 กรัมต่อลิตรส่งผลต่อปริมาณ CoQ₁₀ production มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยความเข้มข้นของ glucose ที่ 2, 4 และ 20 กรัมต่อลิตรให้ปริมาณ CoQ₁₀ production ที่ไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 7 ผลความเข้มข้นของ glucose ต่อปริมาณ CoQ₁₀ น้ำหนักเซลล์แห้ง และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T (ค่าเฉลี่ย \pm SD, n = 9)

ความเข้มข้น ของ Glucose (g/L)	CoQ ₁₀ production (mg/L)*	Specific CoQ ₁₀ content (mg/g DCW)*	DCW (g/L)*	จำนวนเซลล์ที่มี ชีวิต (CFU/mL)
2	1.1144 \pm 0.20 ^b	0.8561 \pm 0.13 ^a	1.30 \pm 0.04 ^d	285 \times 10 ⁹
4	1.2459 \pm 0.23 ^b	0.7538 \pm 0.15 ^{ab}	1.66 \pm 0.06 ^c	241 \times 10 ¹⁰
10	2.1400 \pm 0.22 ^a	0.6227 \pm 0.07 ^{bc}	3.45 \pm 0.32 ^a	> 250 \times 10 ¹⁰
20	1.2523 \pm 0.17 ^b	0.5873 \pm 0.07 ^c	2.13 \pm 0.06 ^b	203 \times 10 ¹⁰

*ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน (a-d) ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างความเข้มข้นของ glucose ที่แตกต่างกันต่อปริมาณ CoQ₁₀ และน้ำหนักเซลล์แห้ง ($p < 0.05$)

ปริมาณของน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้มีปริมาณมากเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ glucose จนถึง 10 กรัมต่อลิตรและลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นถึง 20 กรัมต่อลิตรเช่นกัน โดยความเข้มข้นของ glucose 10 กรัมต่อลิตรให้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) รองลงมาคือความเข้มข้นของ glucose ที่ 20, 4 และ 2 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณ CoQ₁₀ ที่ผลิตได้แปรผันตามน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย โดยผลการนับจำนวนเซลล์มีชีวิตไม่สอดคล้องกับน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่นับได้จากความเข้มข้นของ glucose เรียงจากมากไปน้อย ดังนี้ 10, 4, 20 และ 2 ทั้งนี้อาจมาจากความเข้มข้นที่ 20 กรัมต่อลิตร ช่วยในการเจริญเติบโตได้ดีในช่วง log phase ส่งผลต่อสารอาหารไม่เพียงพอในระยะต่อไป จึงมีจำนวนเซลล์ที่ลดลง และผลของ Specific CoQ₁₀ content พบว่า ความเข้มข้นของ glucose ที่ 2 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง มีปริมาณมากที่สุดแต่ไม่แตกต่างกับความเข้มข้นที่ 4 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยมีแนวโน้มปริมาณ Specific CoQ₁₀ content ลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ glucose และเมื่อเปรียบเทียบกับ

กับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นพบว่า ปริมาณ CoQ₁₀ production ที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *Gluconobacter japonicus* ที่ใช้ sorbitol ถึง 100 กรัมต่อลิตร โดยให้ปริมาณ CoQ₁₀ สูงที่สุด เท่ากับ 2.53 ± 0.12 มิลลิกรัมต่อลิตร (Moghadami และคณะ, 2019) ซึ่งชนิดและความเข้มข้นของ แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์

เมื่อเปรียบเทียบผลของ glucose ความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร กับผลการศึกษานิตของ แหล่งคาร์บอนที่ใช้ glucose 4 กรัมต่อลิตรก่อนหน้านี้ (ตารางที่ 6) พบว่า ปริมาณ CoQ₁₀ production ที่ได้มีความแตกต่างกัน (2.0336 ± 0.47 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 1.2459 ± 0.23 มิลลิกรัมต่อลิตรแสดงค่าตามลำดับ) แต่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งปริมาณไม่แตกต่างกัน (1.64 ± 0.07 กรัมต่อลิตร และ 1.66 ± 0.06 กรัมต่อลิตรตามลำดับ) ซึ่งในการทดลองมีการควบคุมปัจจัยทาง กระบวนการหมักให้คงที่ ได้แก่ อุณหภูมิ pH และการเขย่า เป็นต้น แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสามารถ เจริญเติบโตได้ใกล้เคียงกันแต่ผลิต CoQ₁₀ ได้ปริมาณต่างกัน ซึ่งอาจเนื่องมาจากขั้นตอนการสกัดที่มี ช่วงระยะเวลาการหมักเหวี่ยงเพื่อเก็บชั้น organic phase ที่ไม่สามารถทำตัวอย่างทั้งหมดพร้อม กันได้ ทำให้ปริมาณ CoQ₁₀ ที่สกัดได้ในแต่ละครั้งแตกต่างกัน ดังนั้น ความเข้มข้นของ glucose ที่ เหมาะสมต่อปริมาณ CoQ₁₀ ที่ผลิตได้ของแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T คือ 10 กรัมต่อลิตร จึงเลือกนำไปศึกษานิตของแหล่งไนโตรเจนควบคู่กับความเข้มข้นต่อไป

5. การศึกษานิตและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อปริมาณ CoQ₁₀

การศึกษานิตและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อปริมาณ CoQ₁₀ ที่ผลิตได้ของ แบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T โดยศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน 2 แหล่ง คือ yeast extract ที่ความเข้มข้น 2, 4, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร และ CSL ที่ความ เข้มข้น 3.2, 6.4, 16, 32 และ 64 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นของสารที่ให้ปริมาณไนโตรเจน ที่เท่ากันตามลำดับ โดยคำนวณจาก yeast extract 15 g/L ให้ปริมาณไนโตรเจนเทียบเท่ากับ CSL 24 mL/L (Liu และคณะ, 2008) โดยชนิดของแหล่งไนโตรเจนเลือกจากแหล่งไนโตรเจนที่ให้ปริมาณ CoQ₁₀ สูงของสายพันธุ์อื่นและเพิ่มลดความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนจากสูตรเดิมเพื่อดูแนวโน้มของ ปริมาณ CoQ₁₀ ผลิตได้ และแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการศึกษานิตนี้ คือ glucose 10 กรัมต่อลิตร ซึ่งได้จาก ผลการทดลองในข้อ 4.2

ผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนแสดงดังตารางที่ 8 พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ yeast extract จาก 2 กรัมต่อลิตรไปถึง 10 กรัมต่อลิตร ปริมาณ CoQ₁₀ production ที่ได้เพิ่มขึ้นและลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ yeast extract ถึง 40 กรัมต่อลิตร ซึ่งความเข้มข้นที่ 10 กรัมต่อลิตร และ 20 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณ CoQ₁₀ production ที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ และรองลงมาคือ ความเข้มข้นของ yeast extract ที่ 40, 4 และ 2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และผลของปริมาณ CoQ₁₀ production ที่เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับผลของน้ำหนักเซลล์แห้งที่เพิ่มขึ้นเช่นกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ปริมาณ CoQ₁₀ แปรผันตามน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย โดยผลการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตพบว่า ที่ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร มีปริมาณเซลล์น้อยที่สุดซึ่งสอดคล้องกับน้ำหนักเซลล์แห้งที่น้อยที่สุดเช่นกัน และเมื่อพิจารณาค่า Specific CoQ₁₀ content ซึ่งเป็นปริมาณ CoQ₁₀ เทียบกับน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่า ความเข้มข้นของ yeast extract ที่ 2 และ 4 กรัมต่อลิตรมีปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และความเข้มข้นที่ 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณไม่แตกต่างกัน โดย yeast extract จะมีส่วนประกอบหลักเป็นกรดอะมิโน เปปไทด์ คาร์โบไฮเดรต และเกลือ ซึ่งอุดมไปด้วยไนโตรเจน แหล่งวิตามิน และมีสารกระตุ้นการเจริญเติบโตทำให้เหมาะกับการเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (Tian และคณะ, 2010) ซึ่งจะไปช่วยเรื่องการเจริญเติบโตและสร้างพลังงานให้กับเซลล์แบคทีเรีย และเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรีย *Rhodospirillum rubrum* ที่ใช้ yeast extract 1.29 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณ CoQ₁₀ production เท่ากับ 9.76 ± 0.13 มิลลิกรัมต่อลิตร (Tian และคณะ, 2010) จะเห็นว่าแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T ยังให้ปริมาณ CoQ₁₀ ที่น้อยกว่า แต่เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรีย *Gluconobacter japonicus* ที่ใช้ yeast extract ร่วมกับ peptone (20-20 กรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน ให้ปริมาณ CoQ₁₀ production 2.53 ± 0.12 มิลลิกรัมต่อลิตร (Moghadami และคณะ, 2019) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T ที่ใช้ yeast extract 10 และ 20 กรัมต่อลิตรในการศึกษานี้

ตารางที่ 8 ผลความเข้มข้นของ yeast extract และ CSL ต่อปริมาณ CoQ₁₀ น้ำหนักเซลล์แห้ง และ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T (ค่าเฉลี่ย \pm SD, n = 9)

แหล่ง ไนโตรเจน	ความ เข้มข้น	CoQ ₁₀ production (mg/L)**	Specific CoQ ₁₀ content (mg/g DCW)**	DCW (g/L)**	จำนวนเซลล์ที่ มีชีวิต (CFU/mL)
Yeast extract	2 g/L	1.2727 \pm 0.09 ^{c*}	1.0829 \pm 0.23 ^{a*}	1.22 \pm 0.24 ^{e*}	286 \times 10 ⁹
	4 g/L	1.8348 \pm 0.19 ^{b*}	1.0217 \pm 0.11 ^{a*}	1.80 \pm 0.08 ^{d*}	238 \times 10 ¹⁰
	10 g/L	2.7667 \pm 0.26 ^{a*}	0.7663 \pm 0.07 ^{b*}	3.62 \pm 0.20 ^{a*}	>250 \times 10 ¹⁰
	20 g/L	2.7000 \pm 0.20 ^{a*}	0.8148 \pm 0.08 ^{b*}	3.33 \pm 0.26 ^{a*}	>250 \times 10 ¹⁰
	40 g/L	1.7614 \pm 0.17 ^{b*}	0.7013 \pm 0.07 ^b	2.52 \pm 0.17 ^c	>250 \times 10 ¹⁰
Corn steep liquor	3.2 mL/L	0.1792 \pm 0.04 ^{D#}	0.2116 \pm 0.06 ^{C#}	0.87 \pm 0.15 ^{C#}	262 \times 10 ⁹
	6.4 mL/L	0.6295 \pm 0.40 ^{CD#}	0.3049 \pm 0.19 ^{B#}	2.05 \pm 0.15 ^{B#}	>250 \times 10 ¹⁰
	16 mL/L	1.7995 \pm 0.61 ^{A#}	0.3943 \pm 0.15 ^{A#}	4.79 \pm 1.04 ^{A#}	>250 \times 10 ¹⁰
	32 mL/L	1.3581 \pm 0.19 ^{AB#}	0.3516 \pm 0.15 ^{A#}	4.34 \pm 1.46 ^{A*}	>250 \times 10 ¹⁰
	64 mL/L	0.9778 \pm 0.16 ^{BC#}	-	-	166 \times 10 ⁸

**ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน (a-e) ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างความเข้มข้นของ yeast extract ที่แตกต่างกันต่อปริมาณ CoQ₁₀ และน้ำหนักเซลล์แห้ง (p<0.05) ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกัน (A-E) ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างความเข้มข้นของ CSL ที่แตกต่างกันต่อปริมาณ CoQ₁₀ และน้ำหนักเซลล์แห้ง (p<0.05) และสัญลักษณ์ที่แตกต่างกัน (*#) ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ให้ปริมาณไนโตรเจนเท่ากันต่อปริมาณ CoQ₁₀ และน้ำหนักเซลล์แห้ง (p<0.05)

เมื่อใช้ CSL เป็นแหล่งไนโตรเจนแสดงผลการศึกษาตารางที่ 8 พบว่า มีแนวโน้มเช่นเดียวกับ yeast extract คือเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ CSL จาก 3.2 mL/L จนถึง 16 mL/L พบว่า ปริมาณ CoQ₁₀ production เพิ่มขึ้นและลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ CSL จนถึง 64 mL/L โดยที่ความเข้มข้นของ CSL ที่ 16 mL/L ให้ปริมาณ CoQ₁₀ production มากที่สุด แต่ผลทางสถิติไม่แตกต่างกับความเข้มข้น 32 mL/L และปริมาณ CoQ₁₀ production ที่เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับผลของน้ำหนักเซลล์แห้งที่เพิ่มขึ้นเช่นกัน แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ CSL ถึง 64 mL/L แล้วปรับค่า pH

ของอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้เกิดการตกตะกอน จึงไม่สามารถชั่งน้ำหนักที่แท้จริงของเซลล์แห้งได้ และเมื่อนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต พบว่า ที่ความเข้มข้น 64 mL/L มีจำนวนเซลล์น้อยที่สุด ซึ่งคาดว่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ความเข้มข้นนี้จะมีค่าน้อยเช่นกัน รองลงมาคือที่ความเข้มข้น 3.2 mL/L ซึ่งสอดคล้องกับน้ำหนักเซลล์แห้งที่มีค่าน้อยกว่าที่ความเข้มข้นอื่นๆ โดย CSL หรือน้ำหมักข้าวโพดประกอบด้วยส่วนของข้าวโพดที่ละลายน้ำได้ ซึ่งเป็นแหล่งที่มีราคาถูก โดยมีองค์ประกอบเป็นโปรตีน กรดอะมิโน เปปไทด์ คาร์โบไฮเดรต เกลือแร่ วิตามิน และมีสารกระตุ้นการเจริญเติบโต ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนที่น่าสนใจที่สามารถนำมาใช้แทน yeast extract ได้ (Wang และคณะ, 2019; Yuan และคณะ, 2012) โดยจากการศึกษาแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* ที่ใช้ corn steep powder (30-40 กรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถให้ปริมาณ CoQ₁₀ production สูงที่สุดเมื่อเทียบกับแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่น (18.92 – 85.80 มิลลิกรัมต่อลิตร) (Ha และคณะ, 2007; Koo และคณะ, 2010; Yuan และคณะ, 2012)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง yeast extract กับ CSL ในความเข้มข้นที่ให้ปริมาณไนโตรเจนที่เท่ากัน พบว่า yeast extract ให้ปริมาณ CoQ₁₀ ทั้ง CoQ₁₀ production และ specific CoQ₁₀ content มากกว่า CSL อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนผลน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่า CSL ให้น้ำหนักเซลล์แห้งที่มากกว่า yeast extract ที่ทุกความเข้มข้น ยกเว้น ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 3.2 mL/L ซึ่งให้น้ำหนักเซลล์แห้งน้อยกว่า yeast extract ซึ่งแสดงให้เห็นว่า CSL ช่วยในการเจริญเติบโตได้ดี แต่มีผลต่อการสร้าง CoQ₁₀ ได้น้อยกว่า yeast extract ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจาก แม้ว่าองค์ประกอบของแหล่งไนโตรเจนทั้งสองจะอุดมไปด้วยกรดอะมิโน วิตามิน และสารกระตุ้นการเจริญเติบโต ที่เหมือนกัน แต่ชนิดและปริมาณของสารที่เป็นองค์ประกอบอาจจะแตกต่างกัน หรือมีกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบคนละชนิด โดย yeast extract ประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิด เช่น leucine, phenylalanine, aspartic และ glutamine เป็นต้น พร้อมทั้งแร่ธาตุต่างๆ (Kampen, 2014) ส่วน CSL มีกรดอะมิโน cysteine ซึ่ง yeast extract ไม่มี และ CSL ไม่มีกรดอะมิโน phenylalanine, aspartic และ glutamine เป็นองค์ประกอบ (Chiani และคณะ, 2010) โดย yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่สามารถช่วยส่งเสริมกับ glucose ได้ดีในการสร้าง CoQ₁₀ ดังนั้น yeast extract ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร จึงเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม เนื่องจากให้ปริมาณ CoQ₁₀ ของแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T มากที่สุด

จากผลการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้น glucose 10 กรัมต่อลิตร และ yeast extract 10 กรัมต่อลิตรตามลำดับ จึงเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับในความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อปริมาณ CoQ₁₀ ที่ผลิตได้ของแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T โดยให้ปริมาณ CoQ₁₀ production เท่ากับ 2.7667 ± 0.26 มิลลิกรัมต่อลิตร Specific CoQ₁₀ content เท่ากับ 0.7663 ± 0.07 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 3.62 ± 0.20 กรัมต่อลิตร



บทที่ 5

สรุปผลการศึกษา

การศึกษาเปรียบเทียบการผลิต CoQ₁₀ จากการหมักแบคทีเรียสายพันธุ์ *Methylobacterium* โดยศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ วิธีการสกัด ระยะเวลาการหมัก ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งสามารถสรุปผลการศึกษาได้ดังนี้

1. วิธีการสกัด โดยขั้นตอน pretreatment เป็นการทำลายโครงสร้างของเซลล์ก่อนการสกัด เพื่อให้ CoQ₁₀ ถูกสกัดออกมาได้ในปริมาณที่มากขึ้น โดยวิธีที่ใช้ methanol และ 0.3% sodium chloride ที่ประกอบด้วย 1% Triton X-100 อัตราส่วน 10:1 แล้วนำไปสกัดด้วยตัวละลาย isopropanol กับ hexane (3:5) ให้ปริมาณ CoQ₁₀ มากที่สุด ทั้งในแบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. LRY1-08 และ *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T แสดงให้เห็นว่าวิธีนี้เป็นวิธีที่เหมาะสมกับการสกัด CoQ₁₀ จากเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้ปริมาณมากที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบสายพันธุ์ของแบคทีเรียพบว่า *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T สามารถผลิต CoQ₁₀ ได้มากกว่า *Methylobacterium* sp. LRY1-08 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

2. การศึกษาระยะเวลาของการหมัก พบว่า ระยะเวลาที่ใช้ 96 ชั่วโมงเป็นระยะเวลาที่ให้ปริมาณการผลิต CoQ₁₀ มากที่สุด สำหรับแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T

3. แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนเป็นปัจจัยหลักในกระบวนการหมักแบคทีเรียที่มีต่อปริมาณ CoQ₁₀ ที่ผลิตได้ เนื่องจากเป็นแหล่งสารอาหารที่สำคัญ ช่วยในการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียและสามารถผลิต CoQ₁₀ ได้ โดยพบว่า glucose ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร และ yeast extract 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ ที่มีความเหมาะสมต่อการผลิต CoQ₁₀ ของแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T โดยให้ปริมาณ CoQ₁₀ production เท่ากับ 2.7667 ± 0.26 มิลลิกรัมต่อลิตร Specific CoQ₁₀ content เท่ากับ 0.7663 ± 0.07 มิลลิกรัมต่อกรัม และน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 3.62 ± 0.20 กรัมต่อลิตร

ข้อเสนอแนะเพิ่มเติมในงานวิจัยต่อไป

1. ควรมีการศึกษาปัจจัยอื่นที่ช่วยเพิ่มปริมาณ CoQ₁₀ ได้แก่ การตัดต่อทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย และการเพิ่มการสร้าง precursors ในวิธีการสังเคราะห์ CoQ₁₀ และการใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนร่วมกันหลายชนิด เป็นต้น

2. ควรมีการศึกษาวิธี pretreatment ในกระบวนการสกัด CoQ₁₀ จากเซลล์แบคทีเรียเพิ่มเติม เช่น การใช้สารละลายกรด-ด่าง การบด การใช้ freezing-thawing และการใช้เครื่องความดันสูง เป็นต้น



บรรณานุกรม



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

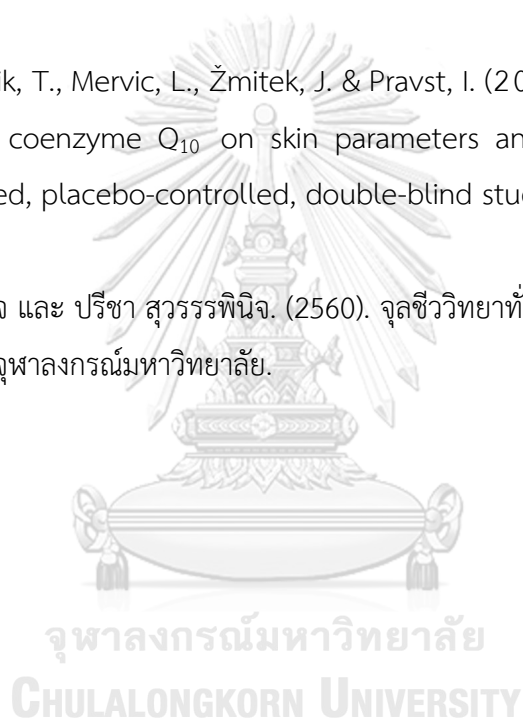
- Bacteriological Analytical Manual. (2001). Chapter 3: Aerobic plate count. [online]. Available from: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-3-aerobic-plate-count>. [2020, October 20]
- Borman, P. & Elder, D. (2017). Q2(R1) Validation of Analytical Procedures, *ICH Quality Guidelines* (eds A. Teasdale, D. Elder and R. W. Nims), 127-166.
- Bule, M. V. & Singhal, R. S. (2009). Use of carrot juice and tomato juice as natural precursors for enhanced production of ubiquinone-10 by *Pseudomonas diminuta* NCIM 2865. *Food Chemistry*, 116(1), 302-305.
- Bule, M. V. & Singhal, R. S. (2011). Fermentation kinetics of production of ubiquinone-10 by *Paracoccus dinitrificans* NRRL B-3785: Effect of type and concentration of carbon and nitrogen sources. *Food Science and Biotechnology*, 20(3), 607-613.
- Cao, X. L., Xu, Y. T., Zhang, G. M., Xie, S. M., Dong, Y. M. & Ito, Y. (2006). Purification of coenzyme Q₁₀ from fermentation extract: high-speed counter-current chromatography versus silica gel column chromatography. *Journal of Chromatography A* 1127(1-2), 92-96.
- Chiani, M., Akbarzadeh, A., Farhangi, A. & Mehrabi, M. R. (2010). Production of desferrioxamine B (Desferal) using corn steep liquor in *Streptomyces pilosus*. *Pakistan journal of biological sciences : PJBS*, 13(23), 1151-1155.
- Choi, G. S., Kim, Y. S., Seo, J. H. & Ryu, Y. W. (2005a). Restricted electron flux increases coenzyme Q₁₀ production in *Agrobacterium tumefaciens* ATCC4452. *Process Biochemistry*, 40(10), 3225-3229.
- Choi, J. H., Ryu, Y. W. & Seo, J. H. (2005b). Biotechnological production and applications of coenzyme Q₁₀. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(1), 9-15.
- Cluis, C. P., Pinel, D. & Martin, V. J. (2012). The production of coenzyme Q₁₀ in microorganisms. *Subcell Biochem*, 64, 303-326.
- de Dieu Ndikubwimana, J. & Lee, B. H. (2014). Enhanced production techniques, properties and uses of coenzyme Q₁₀. *Biotechnology Letters*, 36(10), 1917-1926.
- Green, P. N. (2006). *Methylobacterium*. In Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H. & Stackebrandt, E. (eds), *The Prokaryotes: Volume 5* :

- Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses*. New York, NY: Springer New York, 257-265.
- Green, P. N. (2015). *Methylobacterium*. In Whitman WB, Rainy F, Kämpfer P, et al., editors. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 1-8.
- Ha, S. J., Kim, S. Y., Seo, J. H., Oh, D. K. & Lee, J. K. (2007). Optimization of culture conditions and scale-up to pilot and plant scales for coenzyme Q₁₀ production by *Agrobacterium tumefaciens*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(5), 974-980.
- Inui, M., Ooe, M., Fujii, K., Matsunaka, H., Yoshida, M. & Ichihashi, M. (2008). Mechanisms of inhibitory effects of CoQ₁₀ on UVB-induced wrinkle formation in vitro and in vivo. *BioFactors*, 32(1-4), 237-243.
- Jaki, B. U., Franzblau, S. G., Cho, S. H. & Pauli, G. F. (2006). Development of an extraction method for mycobacterial metabolome analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(1), 196-200.
- Jeya, M., Moon, H. J., Lee, J. L., Kim, I. W. & Lee, J. K. (2010). Current state of coenzyme Q₁₀ production and its applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), 1653-63.
- Kampen, W. H. (2014). Chapter 4 - Nutritional Requirements in Fermentation Processes, in Vogel, H. C. & Todaro, C. M. (eds), *Fermentation and Biochemical Engineering Handbook (Third Edition)*. Boston: William Andrew Publishing, 37-57.
- Kantachote, D. & Choorit, W. (2012). Production of coenzyme Q₁₀ from hydrolysate of empty fruit bunch of oil palm by *Rhodobacter sphaeroides* S10. The 9Th National Kasetsart University Kamphaeng Saen Conference.
- Kelly, D. P., McDonald, I. R. & Wood, A. P. (2014). The Family *Methylobacteriaceae*. In Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E. & Thompson, F. (eds), *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 313-340.

- Kim, S. W., Kim, P., Lee, H. S. & Kim, J. H. (1996). High production of Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) from *Methylobacterium organophilum* under potassium limitation. *Biotechnology Letters*, 18(1), 25-30.
- 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*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74(4), 895-898.
- Kumar, A., Kaur, H., Devi, P. & Mohan, V. (2009). Role of coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) in cardiac disease, hypertension and Meniere-like syndrome. *Pharmacology & Therapeutics*, 124(3), 259-268.
- Lee, S. Q. E., Tan, T. S., Kawamukai, M. & Chen, E. S. (2017). Cellular factories for coenzyme Q₁₀ production. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 39.
- Lekphrom, R. & Charupong, S. (2013). Coenzyme Q₁₀: From basic chemistry to medical applications. *Srinagarind Medical Journal*, 28(4), 589-595.
- Littarru, G. P. & Lambrechts, P. (2011). Coenzyme Q₁₀: Multiple benefits in one ingredient. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 18, 76-82.
- Liu, Y. P., Zheng, P., Sun, Z. H., Ni, Y., Dong, J. J. & Zhu, L. L. (2008). Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresour Technol*, 99(6), 1736-1742.
- Moghadami, F., Fooladi, J. & Hosseini, R. (2019). Introducing a thermotolerant *Gluconobacter japonicus* strain, potentially useful for coenzyme Q₁₀ production. *Folia Microbiologica*, 64(4), 471-479.
- Neelapong, W., Phonyotin, B. & Sittikijyothin, W. (2018). Extraction of active compounds from Thai Herbs: steam distillation and solvent extraction. *The Journal of KMUTNB*, 28(4), 901-910.
- Patte, T. E., Cole, G. C. & Hanson, R. S. (1976). *Methylobacterium*, a New genus of facultatively methylotrophic bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 26(2), 226-229.
- Raekasin, N. (2013). Purification of coenzyme Q₁₀ from *Artemia* by chromatography and preservation. Master's thesis, Faculty of science, Prince of Songkla University.

- Seo, M. J., Im, E. M., Hur, J. H., Nam, J. Y., Hyun, C. G., Pyun, Y. & Kim, S. O. (2006). Production of coenzyme Q₁₀ by recombinant *E. coli* harboring the decaprenyl diphosphate synthase gene from *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 933-938.
- Seo, M. J. & 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.
- Shehadul Islam, M., Aryasomayajula, A. & Selvaganapathy, P. R. (2017). A review on macroscale and microscale cell lysis methods. *Micromachines*, 8(3), 83.
- Tian, Y., Yue, T., Yuan, Y., Soma, P. K. & Lo, Y. M. (2010). Improvement of cultivation medium for enhanced production of coenzyme Q₁₀ by photosynthetic *Rhodospirillum rubrum*. *Biochemical Engineering Journal*, 51(3), 160-166.
- Urakami, T. & Komagata, K. (1979). Cellular fatty acid composition and coenzyme Q system in gram-negative methanol-utilizing bacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 25(6), 343-360.
- Urakami, T. & Komagata, K. (1984). *Protomonas*, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 34(2), 188-201.
- Vaghari, H., Vaghari, R., Jafarizadeh, H. & Berenjian, A. (2016). Coenzyme Q₁₀ and its effective sources. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 12, 214-219.
- Wang, Y., Chen, S., Liu, J., Lv, P., Cai, D. & Zhao, G. (2019). Efficient production of coenzyme Q₁₀ from acid hydrolysate of sweet sorghum juice by *Rhodobacter sphaeroides*. *RSC Advances*, 9(39), 22336-22342.
- Wu, H.-S. & Tsai, J.-J. (2013). Separation and purification of coenzyme Q₁₀ from *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44(6), 872-878.
- Yen, H.-W. & 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(5), 600-604.

- Yoshida, H., Kotani, Y., Ochiai, K. & Araki, K. (1998). Production of ubiquinone-10 using bacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 44(1), 19-26.
- Yuan, Y., Tian, Y. & Yue, T. (2012). Improvement of coenzyme Q₁₀ production: mutagenesis induced by high hydrostatic pressure treatment and optimization of fermentation conditions. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1-8.
- Yuting, T., Tianli, Y., Jinjin, P., Yahong, Y., Juhai, L. & Martin Lo, Y. (2010). Effects of cell lysis treatments on the yield of coenzyme Q₁₀ following *Agrobacterium tumefaciens* fermentation. *Food Science and Technology International*, 16(2), 195-203.
- Žmitek, K., Pogačnik, T., Mervic, L., Žmitek, J. & Pravst, I. (2017). The effect of dietary intake of coenzyme Q₁₀ on skin parameters and condition: Results of a randomised, placebo-controlled, double-blind study. *BioFactors*, 43(1), 132-140.
- นางลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. (2560). จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 11. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.



ภาคผนวก ก
ข้อมูลอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย

1. Methanol mineral salt medium (MMS)

K_2HPO_4	1.20 กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.62 กรัมต่อลิตร
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	0.05 กรัมต่อลิตร
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.20 กรัมต่อลิตร
NaCl	0.10 กรัมต่อลิตร
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
$(NH_4)_2SO_4$	0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	5.0 ไมโครกรัมต่อลิตร
$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	10.0 ไมโครกรัมต่อลิตร
$Na_2MoO_4 \cdot 5H_2O$	10.0 ไมโครกรัมต่อลิตร
H_3BO_3	10.0 ไมโครกรัมต่อลิตร
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	70.0 ไมโครกรัมต่อลิตร
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	5.0 ไมโครกรัมต่อลิตร
Agar	15.0 กรัมต่อลิตร

นำอาหารไป sterile ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที และเมื่ออุณหภูมิลดลงเหลือ 50 °C เติม vitamin solution ที่ผ่านการกรอง และเติม 0.1% (v/v) methanol แล้วปรับ pH เท่ากับ 7.0

- Vitamin solution

Thiamine hydrochloride	0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
Calcium pantothenate	0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
Nicotinic acid	0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
Biotin	1.0 ไมโครกรัมต่อลิตร
Riboflavin	0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
Vitamin B12	2.5 ไมโครกรัมต่อลิตร
<i>p</i> -aminobenzoic acid	10.0 ไมโครกรัมต่อลิตร
Folic acid	10.0 ไมโครกรัมต่อลิตร

Pyridoxal hydrochloride 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. Glycerol peptone agar (GP)

Glycerol	10.0 กรัมต่อลิตร
Peptone	10.0 กรัมต่อลิตร
Agar	15.0 กรัมต่อลิตร
pH 7.0	

3. R2A

Yeast extract	0.5 กรัมต่อลิตร
Proteose peptone	0.5 กรัมต่อลิตร
Casamino acid	0.5 กรัมต่อลิตร
Glucose	0.5 กรัมต่อลิตร
Soluble starch	0.5 กรัมต่อลิตร
K ₂ HPO ₄	0.3 กรัมต่อลิตร
Sodium pyruvate	0.3 กรัมต่อลิตร
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05 กรัมต่อลิตร
Agar	15.0 กรัมต่อลิตร
pH 7.0	

4. Glucose-yeast extract medium (ISP2)

Glucose	4.0 กรัมต่อลิตร
Yeast extract	4.0 กรัมต่อลิตร
Peptone	10.0 กรัมต่อลิตร
Agar	18.0 กรัมต่อลิตร
pH 7.0	

ภาคผนวก ข
ข้อมูลผลการนับจำนวนเซลล์

ตาราง ข-1 ผลการนับจำนวนเซลล์ของการศึกษาระยะเวลาการหมักต่อปริมาณ CoQ₁₀ ในแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T

ระยะเวลาการหมัก	โคโลนีที่นับได้			เชื้อแบคทีเรียทั้งหมด โดยประมาณ (CFU/mL)
	ความเข้มข้น 1: 10 ⁸	ความเข้มข้น 1: 10 ⁹	ความเข้มข้น 1: 10 ¹⁰	
96 ชั่วโมง	TNTC	TNTC	TNTC	> 250 × 10 ¹⁰
	TNTC	TNTC	TNTC	
	TNTC	TNTC	TNTC	
168 ชั่วโมง	TNTC	TNTC	TNTC	> 250 × 10 ¹⁰
	TNTC	TNTC	TNTC	
	TNTC	TNTC	TNTC	

*TNTC = too numerous to count

ตาราง ข-2 ผลการนับจำนวนเซลล์ของการศึกษาแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณ CoQ_{10} ในแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T

แหล่งคาร์บอน	โคโลนีที่นับได้			เชื้อแบคทีเรียทั้งหมด โดยประมาณ (CFU/mL)
	ความเข้มข้น 1: 10 ⁸	ความเข้มข้น 1: 10 ⁹	ความเข้มข้น 1: 10 ¹⁰	
glucose	TNTC	TNTC	232	232 × 10 ¹⁰
	TNTC	TNTC	TNTC	
	TNTC	TNTC	TNTC	
sucrose	TNTC	213	125	257 × 10 ⁹
	TNTC	170	107	
	TNTC	139	96	
fructose	TNTC	TNTC	225	227 × 10 ¹⁰
	TNTC	TNTC	230	
	TNTC	TNTC	227	
methanol	TNTC	204	97	269 × 10 ⁹
	TNTC	200	95	
	TNTC	201	93	

*TNTC = too numerous to count

ตาราง ข-3 ผลการนับจำนวนเซลล์ของการศึกษาความเข้มข้นของ glucose ต่อปริมาณ CoQ₁₀ ในแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T

ความเข้มข้นของ glucose (g/L)	โคโลนีที่นับได้			เชื้อแบคทีเรีย ทั้งหมด โดยประมาณ (CFU/mL)
	ความเข้มข้น 1: 10 ⁸	ความเข้มข้น 1: 10 ⁹	ความเข้มข้น 1: 10 ¹⁰	
2	TNTC	217	115	285 × 10 ⁹
	TNTC	212	109	
	TNTC	190	98	
4	TNTC	TNTC	245	241 × 10 ¹⁰
	TNTC	TNTC	237	
	TNTC	TNTC	242	
10	TNTC	TNTC	TNTC	> 250 × 10 ¹⁰
	TNTC	TNTC	TNTC	
	TNTC	TNTC	TNTC	
20	TNTC	TNTC	200	203 × 10 ¹⁰
	TNTC	TNTC	220	
	TNTC	TNTC	190	

*TNTC = too numerous to count

ตาราง ข-4 ผลการนับจำนวนเซลล์ของการศึกษาความเข้มข้นของ yeast extract ต่อปริมาณ CoQ₁₀ ในแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T

ความเข้มข้นของ yeast extract (g/L)	โคโลนีที่นับได้			เชื้อแบคทีเรีย ทั้งหมด โดยประมาณ (CFU/mL)
	ความเข้มข้น 1: 10 ⁸	ความเข้มข้น 1: 10 ⁹	ความเข้มข้น 1: 10 ¹⁰	
2	TNTC	200	110	286 × 10 ⁹
	TNTC	213	108	
	TNTC	208	106	
4	TNTC	TNTC	232	238 × 10 ¹⁰
	TNTC	TNTC	243	
	TNTC	TNTC	240	
10	TNTC	TNTC	TNTC	> 250 × 10 ¹⁰
	TNTC	TNTC	TNTC	
	TNTC	TNTC	TNTC	
20	TNTC	TNTC	TNTC	> 250 × 10 ¹⁰
	TNTC	TNTC	TNTC	
	TNTC	TNTC	TNTC	
40	TNTC	TNTC	TNTC	> 250 × 10 ¹⁰
	TNTC	TNTC	TNTC	
	TNTC	TNTC	TNTC	

*TNTC = too numerous to count

ตาราง ข-5 ผลการนับจำนวนเซลล์ของการศึกษาความเข้มข้นของ corn steep liquor ต่อปริมาณ CoQ₁₀ ในแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T

ความเข้มข้น ของ CSL (mL/L)	โคโลนีที่นับได้			เชื้อแบคทีเรีย ทั้งหมดโดยประมาณ (CFU/mL)
	ความเข้มข้น 1: 10 ⁸	ความเข้มข้น 1: 10 ⁹	ความเข้มข้น 1: 10 ¹⁰	
3.2	TNTC	197	99	262 × 10 ⁹
	TNTC	193	95	
	TNTC	190	91	
6.4	TNTC	TNTC	TNTC	> 250 × 10 ¹⁰
	TNTC	TNTC	TNTC	
	TNTC	TNTC	TNTC	
16	TNTC	TNTC	TNTC	> 250 × 10 ¹⁰
	TNTC	TNTC	TNTC	
	TNTC	TNTC	TNTC	
32	TNTC	TNTC	TNTC	> 250 × 10 ¹⁰
	TNTC	TNTC	TNTC	
	TNTC	TNTC	TNTC	
64	147	49	13	166 × 10 ⁸
	120	47	19	
	135	50	15	

*TNTC = too numerous to count

ภาคผนวก ค

ข้อมูลผลการศึกษาปัจจัยต่างๆต่อปริมาณ CoQ₁₀ production และ Specific CoQ₁₀ content รวมถึงน้ำหนักเซลล์แห้ง

ตาราง ค-1 น้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. LRY1-08 และ *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T ที่ได้จากขั้นตอนการศึกษาวีธีการสกัด CoQ₁₀

แบคทีเรีย	DCW (g/L)	ค่าเฉลี่ย	S.D.
<i>Methylobacterium</i> sp. LRY1-08	1.68	1.97	0.52
	2.57		
	1.66		
<i>Methylobacterium organophilum</i> NBRC 15689 ^T	4.20	4.30	0.11
	4.28		
	4.42		

ตาราง ค-2 ผลของวิธีการสกัดต่อปริมาณ CoQ₁₀ production และ Specific CoQ₁₀ content ของแบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. LRY1-08

วิธีการสกัด	CoQ ₁₀ production (mg/L)	ค่าเฉลี่ย	S.D.	Specific CoQ ₁₀ content (mg/g DCW)	ค่าเฉลี่ย	S.D.
1	0.9206	0.9173	0.05	0.4673	0.4656	0.03
	0.8638			0.4385		
	0.9676			0.4912		
2	0.2359	0.2320	0.04	0.1198	0.1178	0.02
	0.1860			0.0944		
	0.2740			0.1391		
3	0.3305	0.2818	0.06	0.1677	0.1431	0.03
	0.2182			0.1108		
	0.2969			0.1507		

ตาราง ค-3 ผลของวิธีการสกัดต่อปริมาณ CoQ₁₀ production และ Specific CoQ₁₀ content ของ
 แบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T

วิธีการสกัด	CoQ ₁₀ production (mg/L)	ค่าเฉลี่ย	S.D.	Specific CoQ ₁₀ content (mg/g DCW)	ค่าเฉลี่ย	S.D.
1	3.1925	3.0881	0.17	0.7424	0.7182	0.04
	2.8917			0.6725		
	3.1801			0.7396		
2	2.5647	2.6825	0.10	0.5965	0.6238	0.02
	2.7421			0.6377		
	2.7407			0.6374		
3	2.0308	1.9133	0.10	0.4723	0.4450	0.02
	1.8501			0.4303		
	1.8590			0.4323		

ตาราง ค-4 ผลของระยะเวลาการหมักต่อปริมาณ CoQ₁₀ production และ Specific CoQ₁₀ content รวมถึงน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	CoQ ₁₀ production (mg/L)	ค่าเฉลี่ย	S.D.	Specific CoQ ₁₀ content (mg/g DCW)	ค่าเฉลี่ย	S.D.	DCW	ค่าเฉลี่ย	S.D.
96	1.4409	1.4370	0.06	0.9417	0.8534	0.10	1.53	1.70	0.15
	1.4094			0.8147			1.73		
	1.4525			1.0602			1.37		
	1.4749			0.8428			1.75		
	1.5236			0.8608			1.77		
	1.4199			0.8402			1.69		
	1.5062			0.8414			1.79		
	1.3737			0.7426			1.85		
	1.3322			0.7360			1.81		
168	1.4491	1.1900	0.15	1.1147	0.9152	0.14	1.30	1.31	0.15
	0.8916			0.7249			1.23		
	1.1646			0.7465			1.56		
	1.1409			0.9275			1.23		
	1.3371			1.0365			1.29		
	1.1642			0.7659			1.52		
	1.1778			0.8991			1.31		
	1.2169			0.9507			1.28		
	1.1675			1.0711			1.09		

ตาราง ค-5 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณ CoQ₁₀ production และ Specific CoQ₁₀ content รวมถึงน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T

แหล่งคาร์บอน	CoQ ₁₀ production (mg/L)	ค่าเฉลี่ย	S.D.	Specific CoQ ₁₀ content (mg/g DCW)	ค่าเฉลี่ย	S.D.	DCW	ค่าเฉลี่ย	S.D.
glucose	1.3217	2.0336	0.47	0.8109	1.2446	0.29	1.63	1.64	0.07
	1.8742			1.0710			1.75		
	2.3929			1.4244			1.68		
	2.5786			1.6320			1.58		
	2.2840			1.3927			1.64		
	1.7502			1.1365			1.54		
sucrose	0.5372	0.6203	0.09	0.6551	0.8017	0.13	0.82	0.78	0.06
	0.7625			0.8764			0.87		
	0.5961			0.8279			0.72		
	0.6170			0.7911			0.78		
	0.5167			0.6711			0.77		
	0.6923			0.9890			0.70		
fructose	1.1340	1.1308	0.07	0.9692	0.9826	0.06	1.17	1.15	0.09
	1.1410			1.0971			1.04		
	1.0022			0.9455			1.06		
	1.1334			0.9214			1.23		
	1.2359			0.9809			1.26		
	1.1383			0.9813			1.16		

ตาราง ค-5 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณ CoQ₁₀ production และ Specific CoQ₁₀ content รวมถึงน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T (ต่อ)

แหล่งคาร์บอน	CoQ ₁₀ production (mg/L)	ค่าเฉลี่ย	S.D.	Specific CoQ ₁₀ content (mg/g DCW)	ค่าเฉลี่ย	S.D.	DCW	ค่าเฉลี่ย	S.D.
methanol	0.8027	0.3776	0.21	0.5352	0.2584	0.14	1.50	1.49	0.23
	0.3577			0.2861			1.25		
	0.2535			0.1950			1.30		
	0.2448			0.1688			1.45		
	0.3418			0.2263			1.51		
	0.2655			0.1390			1.91		

ตาราง ค-6 ผลของความเข้มข้นของ glucose ต่อปริมาณ CoQ₁₀ production และ Specific CoQ₁₀ content รวมถึงน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T

ความเข้มข้นของ glucose (mg/L)	CoQ ₁₀ production (mg/L)	ค่าเฉลี่ย	S.D.	Specific CoQ ₁₀ content (mg/g DCW)	ค่าเฉลี่ย	S.D.	DCW	ค่าเฉลี่ย	S.D.
2	1.2104	1.1144	0.20	0.9311	0.8561	0.13	1.30	1.30	0.04
	1.3213			1.0164					
	1.4492			1.0501					
	0.9552			0.7182					
	0.8885			0.7283					
	0.9502			0.7541					
	1.0800			0.8244					
	0.9537			0.7280					
	1.2215			0.9543					
4	1.7394	1.2459	0.23	1.0671	0.7538	0.15	1.66	1.66	0.06
	1.1656			0.7569					
	1.1972			0.7212					
	1.2137			0.7446					
	1.0551			0.6243					
	1.2724			0.7271					
	0.9631			0.5632					
	1.4833			0.8777					
	1.1235			0.7022					

ตาราง ค-6 ผลของความเข้มข้นของ glucose ต่อปริมาณ CoQ₁₀ production และ Specific CoQ₁₀ content รวมถึงน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T (ต่อ)

ความเข้มข้นของ glucose (mg/L)	CoQ ₁₀ production (mg/L)	ค่าเฉลี่ย	S.D.	Specific CoQ ₁₀ content (mg/g DCW)	ค่าเฉลี่ย	S.D.	DCW	ค่าเฉลี่ย	S.D.
10	2.4156	2.1400	0.22	0.6307	0.6227	0.07	3.83	3.45	0.32
	2.1179			0.5487			3.86		
	2.2402			0.5744			3.90		
	1.7909			0.5579			3.21		
	2.1699			0.6458			3.36		
	1.9572			0.5756			3.40		
	2.2965			0.7291			3.15		
	2.3772			0.7499			3.17		
	1.8947			0.5921			3.20		
20	1.0851	1.2523	0.17	0.5267	0.5873	0.07	2.06	2.13	0.06
	1.1244			0.5354			2.10		
	1.1350			0.5483			2.07		
	1.2552			0.5758			2.18		
	1.5533			0.6904			2.25		
	1.4881			0.7120			2.09		
	1.1378			0.5392			2.11		
	1.3253			0.6252			2.12		
	1.1663			0.5325			2.19		

ตาราง ค-7 ผลของความเข้มข้นของ yeast extract ต่อปริมาณ CoQ₁₀ production และ Specific CoQ₁₀ content รวมถึงน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T

ความเข้มข้นของ yeast extract (mg/L)	CoQ ₁₀ production (mg/L)	ค่าเฉลี่ย	S.D.	Specific CoQ ₁₀ content (mg/g DCW)	ค่าเฉลี่ย	S.D.	DCW	ค่าเฉลี่ย	S.D.
2	1.1732	1.2727	0.09	1.5236	1.0829	0.23	0.77	1.22	0.24
	1.2473			0.9745			1.28		
	1.3942			1.1154			1.25		
	1.2348			1.3137			0.94		
	1.3684			1.0861			1.26		
	1.3498			1.1155			1.21		
	1.2558			0.7848			1.60		
	1.2954			0.9455			1.37		
	1.1351			0.8868			1.28		
4	1.7647	1.8348	0.19	1.0084	1.0217	0.11	1.75	1.80	0.08
	1.8042			0.9913			1.82		
	2.0635			1.1725			1.76		
	1.8259			0.9316			1.96		
	2.0315			1.1349			1.79		
	1.6347			0.8789			1.86		
	1.4858			0.8792			1.69		
	1.9172			1.0955			1.75		
	1.9852			1.1029			1.80		

ตาราง ค-7 ผลของความเข้มข้นของ yeast extract ต่อปริมาณ CoQ₁₀ production และ Specific CoQ₁₀ content รวมถึงน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T (ต่อ)

ความเข้มข้นของ yeast extract (mg/L)	CoQ ₁₀ production (mg/L)	ค่าเฉลี่ย	S.D.	Specific CoQ ₁₀ content (mg/g DCW)	ค่าเฉลี่ย	S.D.	DCW	ค่าเฉลี่ย	S.D.
10	2.8136	2.7667	0.26	0.7543	0.7663	0.07	3.73	3.62	0.20
	2.7761			0.7932			3.50		
	2.9329			0.8013			3.66		
	2.7691			0.7082			3.91		
	2.8422			0.7661			3.71		
	3.0398			0.7958			3.82		
	2.8819			0.8551			3.37		
	2.1179			0.6034			3.51		
	2.7273			0.8190			3.33		
20	2.5271	2.7000	0.20	0.8396	0.8148	0.08	3.01	3.33	0.26
	2.8124			0.8654			3.25		
	2.7531			0.8768			3.14		
	3.0743			0.8709			3.53		
	2.8783			0.9225			3.12		
	2.5266			0.6756			3.74		
	2.4863			0.7674			3.24		
	2.6571			0.7220			3.68		
	2.5846			0.7928			3.26		

ตาราง ค-7 ผลของความเข้มข้นของ yeast extract ต่อปริมาณ CoQ₁₀ production และ Specific CoQ₁₀ content รวมถึงน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T (ต่อ)

ความเข้มข้นของ yeast extract (mg/L)	CoQ ₁₀ production (mg/L)	ค่าเฉลี่ย	S.D.	Specific CoQ ₁₀ content (mg/g DCW)	ค่าเฉลี่ย	S.D.	DCW	ค่าเฉลี่ย	S.D.
40	1.9532	1.7614	0.17	0.8005	0.7013	0.07	2.44	2.52	0.17
	1.5488			0.6220			2.49		
	1.8166			0.6465			2.81		
	1.9919			0.7781			2.56		
	1.9066			0.7088			2.69		
	1.5984			0.7011			2.28		
	1.7256			0.7503			2.30		
	1.7683			0.7017			2.52		
	1.5434			0.6029			2.56		

ตาราง ค-8 ผลของความเข้มข้นของ CSL ต่อปริมาณ CoQ₁₀ production และ Specific CoQ₁₀ content รวมถึงน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T

ความเข้มข้นของ CSL (mL/L)	CoQ ₁₀ production (mg/L)	ค่าเฉลี่ย	S.D.	Specific CoQ ₁₀ content (mg/g DCW)	ค่าเฉลี่ย	S.D.	DCW	ค่าเฉลี่ย	S.D.
3.2	0.2590	0.1792	0.04	0.3597	0.2116	0.06	0.72	0.87	0.15
	0.1779			0.2170			0.82		
	0.1472			0.1817			0.81		
	0.1733			0.1699			1.02		
	0.1684			0.1604			1.05		
	0.2086			0.1950			1.07		
	0.1375			0.2053			0.67		
	0.1848			0.2254			0.82		
	0.1559			0.1901			0.82		
6.4	0.3898	0.6295	0.40	0.1901	0.3049	0.19	2.05	2.05	0.15
	0.6006			0.2944			2.04		
	0.7184			0.3421			2.10		
	0.4047			0.2141			1.89		
	0.4060			0.2218			1.83		
	0.4233			0.2228			1.90		
	0.6877			0.3029			2.27		
	0.4054			0.1802			2.25		
	1.6295			0.7759			2.10		

ตาราง ค-8 ผลของความเข้มข้นของ CSL ต่อปริมาณ CoQ₁₀ production และ Specific CoQ₁₀ content รวมถึงน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T (ต่อ)

ความเข้มข้นของ CSL (mL/L)	CoQ ₁₀ production (mg/L)	ค่าเฉลี่ย	S.D.	Specific CoQ ₁₀ content (mg/g DCW)	ค่าเฉลี่ย	S.D.	DCW	ค่าเฉลี่ย	S.D.
16	0.2309	1.7995	0.61	0.0418	0.3943	0.15	5.52	4.79	1.04
	1.9150			0.2867			6.68		
	2.3138			0.3781			6.12		
	2.2311			0.5141			4.34		
	1.9925			0.4508			4.42		
	1.9529			0.4787			4.08		
	1.7549			0.4466			3.93		
	1.8301			0.4657			3.93		
	1.9741			0.4862			4.06		
32	1.4547	1.3581	0.19	0.4422	0.3516	0.15	3.29	4.34	1.46
	1.2892			0.5136			2.51		
	1.5479			0.6504			2.38		
	1.5738			0.2363			6.66		
	1.4969			0.2819			5.31		
	1.3874			0.2376			5.84		
	1.2956			0.2829			4.58		
	1.1654			0.2943			3.96		
	1.0117			0.2248			4.50		

ตาราง ค-8 ผลของความเข้มข้นของ CSL ต่อปริมาณ CoQ₁₀ production และ Specific CoQ₁₀ content รวมถึงน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T (ต่อ)

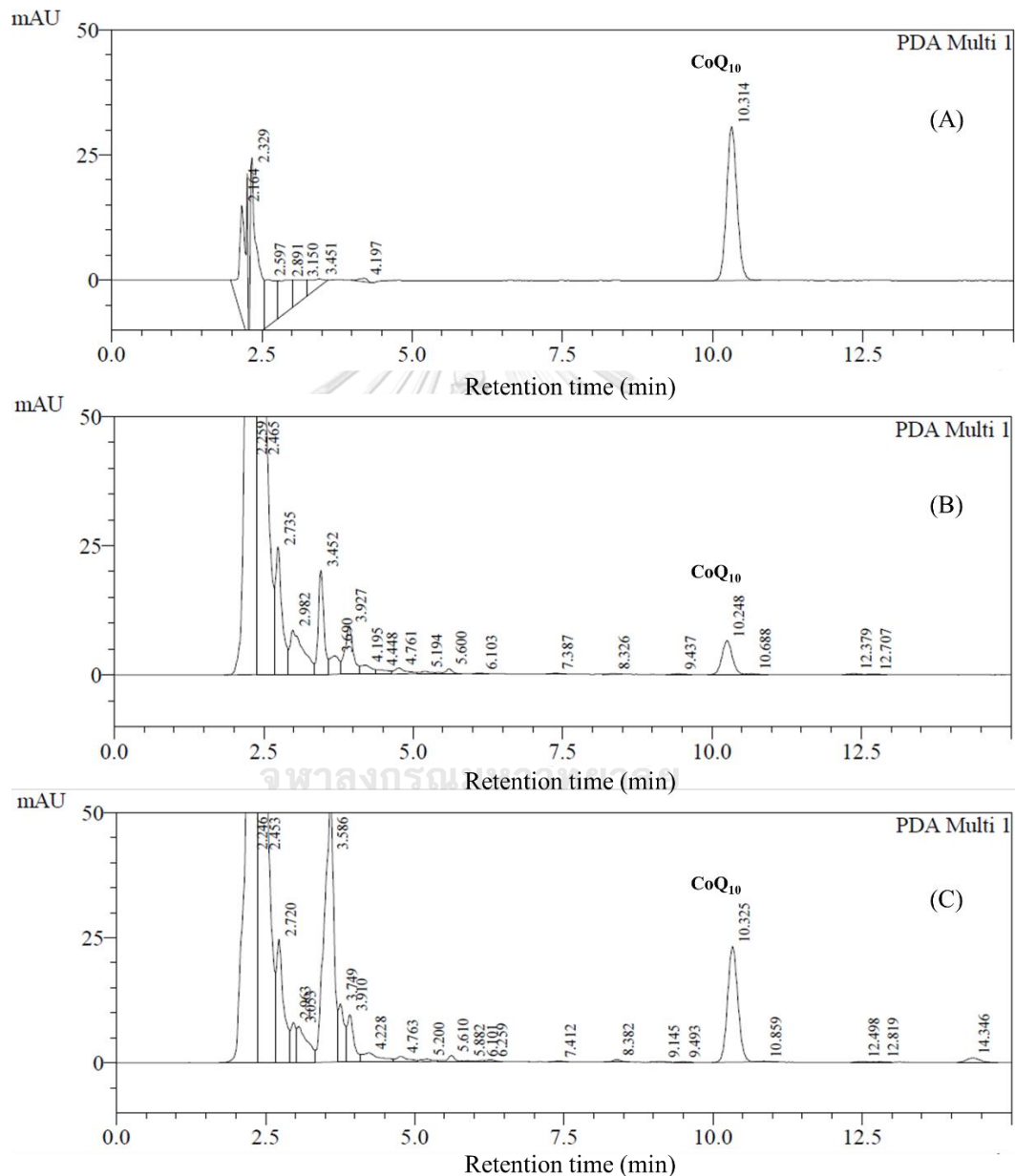
ความเข้มข้นของ CSL (mL/L)	CoQ ₁₀ production (mg/L)	ค่าเฉลี่ย	S.D.	Specific CoQ ₁₀ content (mg/g DCW)	ค่าเฉลี่ย	S.D.	DCW	ค่าเฉลี่ย	S.D.
64	0.9440	0.9778	0.16	-	-	-	-	-	-
	0.8103			-			-		
	0.7467			-			-		
	1.2232			-			-		
	1.0307			-			-		
	1.1792			-			-		
	0.8579			-			-		
	0.9168			-			-		
	1.0911			-			-		

ภาคผนวก ง

กราฟมาตรฐานและการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

การวิเคราะห์หาปริมาณ CoQ₁₀ ด้วยวิธี High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)

1. การวัดความจำเพาะ (Specificity)



รูป ง-1 แสดงโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน CoQ₁₀ (A) สารสกัด CoQ₁₀ จากแบคทีเรีย *Methylobacterium* strain LRY1-08 (B) และสารสกัด CoQ₁₀ จากแบคทีเรีย *Methylobacterium organophylum* NBRC 15689^T (C)

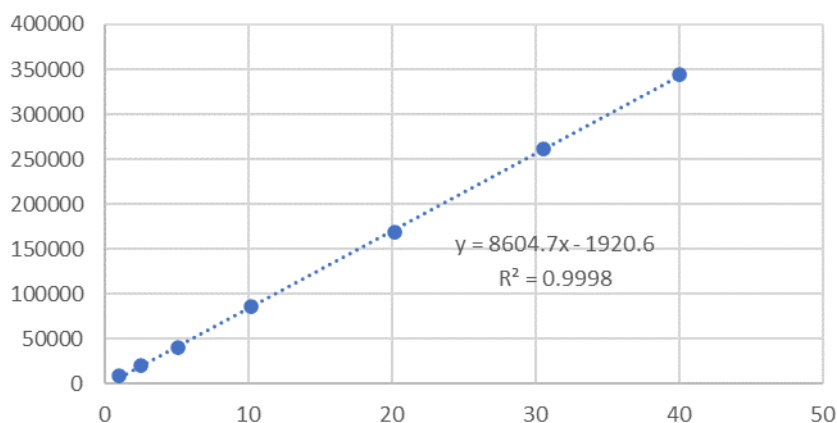
จากรูป ง-1 แสดงโครมาโตแกรมของการวิเคราะห์หาปริมาณ CoQ₁₀ ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าสารมาตรฐาน CoQ₁₀ มี retention time ประมาณ 10.314 นาที โดยสารสกัด CoQ₁₀ จากแบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. LRY1-08 มี retention time ประมาณ 10.248 นาทีและสารสกัด CoQ₁₀ จากแบคทีเรีย *Methylobacterium organophyllum* NBRC 15689^T มี retention time ประมาณ 10.325 นาที ซึ่งพีคของ CoQ₁₀ แยกได้อย่างชัดเจนและไม่ถูกรบกวนจากสารประกอบอื่น

2. ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity)

ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์แสดงถึงผลวิเคราะห์ที่เป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ในช่วงความเข้มข้นที่กำหนด และแปลผลเป็นสมการเส้นตรงเพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณสารในตัวอย่างได้ จากผลการวิเคราะห์แสดงดังตาราง ง-1 และกราฟที่พลอตระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นของ CoQ₁₀ แสดงดังรูปที่ ง-2 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1-40 mg/L โดยมีค่า coefficient of determination (r^2) เท่ากับ 0.9998

ตาราง ง-1 Peak area ของกราฟมาตรฐานของ CoQ₁₀ ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

ความเข้มข้น (µg/mL)	Peak area			ค่าเฉลี่ย	S.D.
	n1	n2	n3		
1.0	8742	9454	9367	9187.67	388.40
2.5	20255	20398	20548	20399.67	145.51
5.0	40892	40613	40371	40625.33	260.72
10.0	83016	91474	83236	85908.67	4820.98
20.0	167385	169353	169472	168736.67	1172.09
30.0	261463	260512	260766	260913.67	492.40
40.0	343697	344623	433019	344113.00	470.10



รูป ง-2 กราฟมาตรฐานของ CoQ₁₀ ที่ได้จากการวิเคราะห์วิธี HPLC

3. ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่วิธีทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้ในตัวอย่างอย่างถูกต้อง (limit of quantitation; LOQ) และการตรวจหาปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้ในตัวอย่าง (limit of detection; LOD)

ปริมาณต่ำที่สุดที่สามารถวัดได้ของ CoQ₁₀ คือ 0.3 µg/mL โดยมี %RSD < 2% แสดงดังตาราง ง-2 และค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่วิธีทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้ในตัวอย่างได้อย่างถูกต้องคือ 1.0 µg/L ซึ่งมี %Recovery อยู่ในช่วง 98-102% และ %RSD < 2% แสดงดังตาราง ง-3

ตาราง ง-2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้ของ CoQ₁₀ ด้วยวิธี HPLC

ความเข้มข้น (µg/mL)	Peak area			ค่าเฉลี่ย	S.D.	%RSD
	n ₁	n ₂	n ₃			
0.3	2136	2195	2177	2169.33	30.24	1.39

ตาราง ง-3 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้ในตัวอย่างอย่างถูกต้องของ CoQ₁₀ ด้วยวิธี HPLC

ความเข้มข้น (µg/mL)	ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ (µg/mL)						ค่าเฉลี่ย	S.D.	%CV
	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	n ₅	n ₆			
1.0	1.0160	1.0246	0.9946	1.0018	1.0152	1.0135	1.0110	0.01	1.07
	%recovery						ค่าเฉลี่ย	S.D.	%CV
	101.62	102.46	99.46	100.18	101.52	101.34	101.10	1.08	1.07

4. ความถูกต้อง (Accuracy)

ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์แสดงการวัดค่าที่วิเคราะห์ได้ใกล้เคียงกับค่าที่แท้จริง ทดสอบโดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน CoQ₁₀ ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน 3 ความเข้มข้นในช่วงที่ศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้น ทดสอบความเข้มข้นละ 3 ครั้ง คำนวณหา %recovery มีค่าอยู่ในช่วง 98-102% แสดงดังตาราง ง-4

ตาราง ง-4 ผลการวิเคราะห์ร้อยละการคืนกลับของ CoQ₁₀ ด้วยวิธี HPLC

ความเข้มข้น (µg/mL)	%Recovery			ค่าเฉลี่ย ± S.D.
	n ₁	n ₂	n ₃	
4	100.10	102.56	100.06	100.91 ± 1.43
8	100.22	100.84	100.39	100.48 ± 0.32
15	98.45	98.43	98.80	98.56 ± 0.21

5. ความแม่นยำ (Precision)

5.1 Within-run precision เป็นการทดสอบความแม่นยำของการวิเคราะห์ซ้ำกันของ CoQ₁₀ 3 ความเข้มข้น โดยทดสอบความเข้มข้นละ 3 ครั้ง ภายในคราวเดียวกัน โดยพบว่า %RSD มีค่าน้อยกว่า 2% ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด แสดงดังตาราง ง-5

ตาราง ง-5 ผลการวิเคราะห์ความแม่นยำภายในชุดของ CoQ₁₀ ด้วยวิธี HPLC

ความเข้มข้น (µg/mL)	ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ (µg/L)			ค่าเฉลี่ย	S.D.	%RSD
	n ₁	n ₂	n ₃			
4	4.049	4.036	4.034	4.039	0.01	0.20
8	8.039	8.066	8.047	8.051	0.01	0.17
15	14.86	14.87	14.90	14.88	0.02	0.13

5.2. Between-run precision เป็นการทดสอบความแม่นยำของการวิเคราะห์ซ้ำกันของ CoQ₁₀ 3 ความเข้มข้น โดยทดสอบความเข้มข้นละ 3 ครั้ง โดยวิเคราะห์ต่างวันกัน โดยพบว่า %RSD มีค่าน้อยกว่า 2% ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด แสดงดังตาราง ง-6

ตาราง ง-6 ผลการวิเคราะห์ความแม่นยำระหว่างชุดของ CoQ₁₀ ด้วยวิธี HPLC

ความเข้มข้น (µg/mL)	ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ (µg/L)			ค่าเฉลี่ย	S.D.	%RSD
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3			
4	4.036	4.040	4.069	4.048	0.02	0.43
8	8.051	8.0387	8.046	8.049	0.01	0.11
15	14.878	14.783	15.969	14.887	0.11	0.73

ภาคผนวก จ

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางที่ จ-1 ผลการทดสอบทางสถิติ Independent T-Test ของน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T และแบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. LRY1-08

Group Statistics

	Strain	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
DCW	<i>Methylobacterium</i> sp. LRY1-08	3	1.9700	.51971	.30006
	<i>M.organophilum</i> NBRC 15689 ^T	3	4.3000	.11136	.06429

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
DCW	Equal variances assumed	9.337	.038	-7.593	4	.002	-2.33000	.30687	-3.18200	-1.47800
	Equal variances not assumed			-7.593	2.183	.013	-2.33000	.30687	-3.54962	-1.11038

ตารางที่ จ-2 ผลการทดสอบทางสถิติ One-way ANOVA และ Tukey's multiple comparison test ของวิธีการสกัดต่อปริมาณ CoQ₁₀ ในแบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. LRY1-08

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
CoQ ₁₀ production	method1	3	.917333	.0519770	.0300090	.788215	1.046451	.8638	.9676
	method2	3	.231967	.0441317	.0254794	.122338	.341596	.1860	.2740
	method3	3	.281867	.0576396	.0332782	.138682	.425051	.2182	.3305
	method4	3	.000000	.0000000	.0000000	.000000	.000000	.0000	.0000
	Total	12	.357792	.3572671	.1031341	.130795	.584788	.0000	.9676
Specific CoQ ₁₀ Content	method1	3	.465667	.0263879	.0152351	.400115	.531218	.4385	.4912
	method2	3	.117767	.0224193	.0129438	.062074	.173459	.0944	.1391
	method3	3	.143067	.0292079	.0168632	.070510	.215623	.1108	.1677
	method4	3	.000000	.0000000	.0000000	.000000	.000000	.0000	.0000
	Total	12	.181625	.1813585	.0523537	.066395	.296855	.0000	.4912

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CoQ ₁₀ production	Between Groups	1.388	3	.463	232.175	.000
	Within Groups	.016	8	.002		
	Total	1.404	11			
Specific CoQ ₁₀ Content	Between Groups	.358	3	.119	232.415	.000
	Within Groups	.004	8	.001		
	Total	.362	11			

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Method	(J) Method	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
CoQ ₁₀ production	method1	method2	.6853667*	.0364498	.000	.568641	.802092
		method3	.6354667*	.0364498	.000	.518741	.752192
		method4	.9173333*	.0364498	.000	.800608	1.034059
	method2	method1	-.6853667*	.0364498	.000	-.802092	-.568641
		method3	-.0499000	.0364498	.550	-.166625	.066825
		method4	.2319667*	.0364498	.001	.115241	.348692
	method3	method1	-.6354667*	.0364498	.000	-.752192	-.518741
		method2	.0499000	.0364498	.550	-.066825	.166625
		method4	.2818667*	.0364498	.000	.165141	.398592
	method4	method1	-.9173333*	.0364498	.000	-1.034059	-.800608
		method2	-.2319667*	.0364498	.001	-.348692	-.115241
		method3	-.2818667*	.0364498	.000	-.398592	-.165141
Specific CoQ ₁₀ Content	method1	method2	.3479000*	.0184935	.000	.288677	.407123
		method3	.3226000*	.0184935	.000	.263377	.381823
		method4	.4656667*	.0184935	.000	.406444	.524889
	method2	method1	-.3479000*	.0184935	.000	-.407123	-.288677
		method3	-.0253000	.0184935	.550	-.084523	.033923
		method4	.1177667*	.0184935	.001	.058544	.176989
	method3	method1	-.3226000*	.0184935	.000	-.381823	-.263377
		method2	.0253000	.0184935	.550	-.033923	.084523
		method4	.1430667*	.0184935	.000	.083844	.202289
	method4	method1	-.4656667*	.0184935	.000	-.524889	-.406444
		method2	-.1177667*	.0184935	.001	-.176989	-.058544
		method3	-.1430667*	.0184935	.000	-.202289	-.083844

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ จ-3 ผลการทดสอบทางสถิติ One-way ANOVA และ Tukey's multiple comparison test ของวิธีการสกัดต่อปริมาณ CoQ₁₀ ในแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
CoQ ₁₀ production	method1	3	.917333	.0519770	.0300090	.788215	1.046451	.8638	.9676
	method2	3	.231967	.0441317	.0254794	.122338	.341596	.1860	.2740
	method3	3	.281867	.0576396	.0332782	.138682	.425051	.2182	.3305
	method4	3	.000000	.0000000	.0000000	.000000	.000000	.0000	.0000
	Total	12	.357792	.3572671	.1031341	.130795	.584788	.0000	.9676
Specific CoQ ₁₀ Content	method1	3	.465667	.0263879	.0152351	.400115	.531218	.4385	.4912
	method2	3	.117767	.0224193	.0129438	.062074	.173459	.0944	.1391
	method3	3	.143067	.0292079	.0168632	.070510	.215623	.1108	.1677
	method4	3	.000000	.0000000	.0000000	.000000	.000000	.0000	.0000
	Total	12	.181625	.1813585	.0523537	.066395	.296855	.0000	.4912

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CoQ ₁₀ production	Between Groups	1.388	3	.463	232.175	.000
	Within Groups	.016	8	.002		
	Total	1.404	11			
Specific CoQ ₁₀ Content	Between Groups	.358	3	.119	232.415	.000
	Within Groups	.004	8	.001		
	Total	.362	11			

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Method	(J) Method	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
CoQ ₁₀ production	method1	method2	.6853667 [*]	.0364498	.000	.568641	.802092
		method3	.6354667 [*]	.0364498	.000	.518741	.752192
		method4	.9173333 [*]	.0364498	.000	.800608	1.034059
	method2	method1	-.6853667 [*]	.0364498	.000	-.802092	-.568641
		method3	-.0499000	.0364498	.550	-.166625	.066825
		method4	.2319667 [*]	.0364498	.001	.115241	.348692
	method3	method1	-.6354667 [*]	.0364498	.000	-.752192	-.518741
		method2	.0499000	.0364498	.550	-.066825	.166625
		method4	.2818667 [*]	.0364498	.000	.165141	.398592
	method4	method1	-.9173333 [*]	.0364498	.000	-1.034059	-.800608
		method2	-.2319667 [*]	.0364498	.001	-.348692	-.115241
		method3	-.2818667 [*]	.0364498	.000	-.398592	-.165141
Specific CoQ ₁₀ Content	method1	method2	.3479000 [*]	.0184935	.000	.288677	.407123
		method3	.3226000 [*]	.0184935	.000	.263377	.381823
		method4	.4656667 [*]	.0184935	.000	.406444	.524889
	method2	method1	-.3479000 [*]	.0184935	.000	-.407123	-.288677
		method3	-.0253000	.0184935	.550	-.084523	.033923
		method4	.1177667 [*]	.0184935	.001	.058544	.176989
	method3	method1	-.3226000 [*]	.0184935	.000	-.381823	-.263377
		method2	.0253000	.0184935	.550	-.033923	.084523
		method4	.1430667 [*]	.0184935	.000	.083844	.202289
	method4	method1	-.4656667 [*]	.0184935	.000	-.524889	-.406444
		method2	-.1177667 [*]	.0184935	.001	-.176989	-.058544
		method3	-.1430667 [*]	.0184935	.000	-.202289	-.083844

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ จ-4 ผลการทดสอบทางสถิติ Independent T-Test ของการเปรียบเทียบระหว่างชนิดของ
แบคทีเรียต่อปริมาณ CoQ₁₀ production ที่สกัดด้วยวิธีเดียวกัน

Group Statistics

CoQ ₁₀ production					
	strains	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Method 1	<i>Methylobacterium</i> sp. LRY1-08	3	.917333	.0519770	.0300090
	<i>Methylobacterium</i> <i>organophilum</i> NBRC 15689 ^T	3	3.088100	.1702004	.0982652
Method 2	<i>Methylobacterium</i> sp. LRY1-08	3	.231967	.0441317	.0254794
	<i>Methylobacterium</i> <i>organophilum</i> NBRC 15689 ^T	3	2.682500	.1020202	.0589014
Method 3	<i>Methylobacterium</i> sp. LRY1-08	3	.281867	.0576396	.0332782
	<i>Methylobacterium</i> <i>organophilum</i> NBRC 15689 ^T	3	1.913300	.1018552	.0588062
Method 4	<i>Methylobacterium</i> sp. LRY1-08	3	.000000	.0000000 ^a	.0000000
	<i>Methylobacterium</i> <i>organophilum</i> NBRC 15689 ^T	3	.000000	.0000000 ^a	.0000000

a. t cannot be computed because the standard deviations of both groups are 0.

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means							
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper	
Method 1	Equal variances assumed	6.730	.060	-21.128	4	.000	-2.1707667	.1027453	-2.4560333	-1.8855001	
	Equal variances not assumed			-21.128	2.370	.001	-2.1707667	.1027453	-2.5528893	-1.7886440	
Method 2	Equal variances assumed	4.057	.114	-38.185	4	.000	-2.4505333	.0641761	-2.6287148	-2.2723519	
	Equal variances not assumed			-38.185	2.723	.000	-2.4505333	.0641761	-2.6670334	-2.2340333	
Method 3	Equal variances assumed	2.158	.216	-24.145	4	.000	-1.6314333	.0675693	-1.8190357	-1.4438310	
	Equal variances not assumed			-24.145	3.162	.000	-1.6314333	.0675693	-1.8403753	-1.4224914	

CoQ10 production

ตารางที่ จ-5 ผลการทดสอบทางสถิติ Independent T-Test ของการเปรียบเทียบระหว่างชนิดของแบคทีเรียต่อปริมาณ Specific CoQ₁₀ content ที่สกัดด้วยวิธีเดียวกัน

Group Statistics

Specific CoQ₁₀ content

	strains	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Method 1	<i>Methylobacterium</i> sp. LRY1-08	3	.917333	.0519770	.0300090
	<i>Methylobacterium organophilum</i> NBRC 15689 ^T	3	3.088100	.1702004	.0982652
Method 2	<i>Methylobacterium</i> sp. LRY1-08	3	.231967	.0441317	.0254794
	<i>Methylobacterium organophilum</i> NBRC 15689 ^T	3	2.682500	.1020202	.0589014
Method 3	<i>Methylobacterium</i> sp. LRY1-08	3	.281867	.0576396	.0332782
	<i>Methylobacterium organophilum</i> NBRC 15689 ^T	3	1.913300	.1018552	.0588062
Method 4	<i>Methylobacterium</i> sp. LRY1-08	3	.000000	.0000000 ^a	.0000000
	<i>Methylobacterium organophilum</i> NBRC 15689 ^T	3	.000000	.0000000 ^a	.0000000

a. t cannot be computed because the standard deviations of both groups are 0.

Independent Samples Test

Specific CoQ10 content

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means							
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	Lower	Upper
Method 1	Equal variances assumed	6.730	.060	-21.128	4	.000	-2.1707667	.1027453	-2.4560333	-1.8855001
	Equal variances not assumed			-21.128	2.370	.001	-2.1707667	.1027453	-2.5528893	-1.7886440
Method 2	Equal variances assumed	4.057	.114	-38.185	4	.000	-2.4505333	.0641761	-2.6287148	-2.2723519
	Equal variances not assumed			-38.185	2.723	.000	-2.4505333	.0641761	-2.6670334	-2.2340333
Method 3	Equal variances assumed	2.158	.216	-24.145	4	.000	-1.6314333	.0675693	-1.8190357	-1.4438310
	Equal variances not assumed			-24.145	3.162	.000	-1.6314333	.0675693	-1.8403753	-1.4224914

ตารางที่ จ-6 ผลการทดสอบทางสถิติ Independent T-Test ของระยะเวลาการหมักต่อปริมาณ CoQ₁₀ และน้ำหนักเซลล์แห้งในแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T

Group Statistics

	Day	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
DCW	4day	9	1.6989	.15366	.05122
	7day	9	1.3122	.14541	.04847
Content	4day	9	.853378	.0991247	.0330416
	7day	9	.915211	.1446780	.0482260
Production	4day	9	1.437033	.0612619	.0204206
	7day	9	1.189967	.1512093	.0504031

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
DCW	Equal variances assumed	.061	.808	5.483	16	.000	.38667	.07052	.23717	.53616
	Equal variances not assumed			5.483	15.952	.000	.38667	.07052	.23714	.53620
Specific CoQ ₁₀ content	Equal variances assumed	2.106	.166	-1.058	16	.306	-.0618333	.0584593	-.1857615	.0620949
	Equal variances not assumed			-1.058	14.155	.308	-.0618333	.0584593	-.1870878	.0634211
CoQ ₁₀ Production	Equal variances assumed	1.577	.227	4.543	16	.000	.2470667	.0543827	.1317805	.3623528
	Equal variances not assumed			4.543	10.557	.001	.2470667	.0543827	.1267561	.3673772

ตารางที่ จ-7 ผลการทดสอบทางสถิติ One-way ANOVA และ Tukey's multiple comparison test ของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณ CoQ₁₀ และน้ำหนักเซลล์แห้งในแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
CoQ ₁₀ Production	glucose	6	2.033600	.4693287	.1916026	1.541070	2.526130	1.3217	2.5786
	fructose	6	1.130800	.0745134	.0304200	1.052603	1.208997	1.0022	1.2359
	sucrose	6	.620300	.0934237	.0381401	.522258	.718342	.5167	.7625
	methanol	6	.377667	.2135372	.0871762	.153573	.601760	.2448	.8027
	Total	24	1.040592	.6935305	.1415663	.747739	1.333444	.2448	2.5786
Specific CoQ ₁₀ content	glucose	6	1.244583	.2947062	.1203133	.935308	1.553859	.8109	1.6320
	fructose	6	.982567	.0606898	.0247765	.918877	1.046257	.9214	1.0971
	sucrose	6	.801767	.1264975	.0516424	.669016	.934518	.6551	.9890
	methanol	6	.258400	.1447204	.0590819	.106525	.410275	.1390	.5352
	Total	24	.821829	.4049626	.0826626	.650828	.992830	.1390	1.6320
DCW	glucose	6	1.6367	.07394	.03018	1.5591	1.7143	1.54	1.75
	fructose	6	1.1533	.08847	.03612	1.0605	1.2462	1.04	1.26
	sucrose	6	.7767	.06282	.02565	.7107	.8426	.70	.87
	methanol	6	1.4867	.23330	.09524	1.2418	1.7315	1.25	1.91
	Total	24	1.2633	.36041	.07357	1.1111	1.4155	.70	1.91

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CoQ ₁₀ Production	Between Groups	9.662	3	3.221	45.985	.000
	Within Groups	1.401	20	.070		
	Total	11.063	23			
Specific CoQ ₁₀ content	Between Groups	3.134	3	1.045	32.784	.000
	Within Groups	.637	20	.032		
	Total	3.772	23			
DCW	Between Groups	2.629	3	.876	48.915	.000
	Within Groups	.358	20	.018		
	Total	2.988	23			

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Type of carbon	(J) Type of carbon	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
CoQ ₁₀ Production	glucose	fructose	.9028000 [†]	.1527928	.000	.475143	1.330457
		sucrose	1.4133000 [†]	.1527928	.000	.985643	1.840957
		methanol	1.6559333 [†]	.1527928	.000	1.228276	2.083591
	fructose	glucose	-.9028000 [†]	.1527928	.000	-1.330457	-.475143
		sucrose	.5105000 [†]	.1527928	.016	.082843	.938157
		methanol	.7531333 [†]	.1527928	.000	.325476	1.180791
	sucrose	glucose	-1.4133000 [†]	.1527928	.000	-1.840957	-.985643
		fructose	-.5105000 [†]	.1527928	.016	-.938157	-.082843
		methanol	.2426333	.1527928	.407	-.185024	.670291
	methanol	glucose	-1.6559333 [†]	.1527928	.000	-2.083591	-1.228276
		fructose	-.7531333 [†]	.1527928	.000	-1.180791	-.325476
		sucrose	-.2426333	.1527928	.407	-.670291	.185024
Specific CoQ ₁₀ content	glucose	fructose	.2620167	.1030698	.083	-.026469	.550502
		sucrose	.4428167 [†]	.1030698	.002	.154331	.731302
		methanol	.9861833 [†]	.1030698	.000	.697698	1.274669
	fructose	glucose	-.2620167	.1030698	.083	-.550502	.026469
		sucrose	.1808000	.1030698	.324	-.107686	.469286
		methanol	.7241667 [†]	.1030698	.000	.435681	1.012652
	sucrose	glucose	-.4428167 [†]	.1030698	.002	-.731302	-.154331
		fructose	-.1808000	.1030698	.324	-.469286	.107686
		methanol	.5433667 [†]	.1030698	.000	.254881	.831852
	methanol	glucose	-.9861833 [†]	.1030698	.000	-1.274669	-.697698
		fructose	-.7241667 [†]	.1030698	.000	-1.012652	-.435681
		sucrose	-.5433667 [†]	.1030698	.000	-.831852	-.254881

Multiple Comparisons (ต่อ)

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Type of carbon	(J) Type of carbon	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
DCW	glucose	fructose	.48333 [*]	.07728	.000	.2670	.6996
		sucrose	.86000 [*]	.07728	.000	.6437	1.0763
		methanol	.15000	.07728	.243	-.0663	.3663
	fructose	glucose	-.48333 [*]	.07728	.000	-.6996	-.2670
		sucrose	.37667 [*]	.07728	.000	.1604	.5930
		methanol	-.33333 [*]	.07728	.002	-.5496	-.1170
	sucrose	glucose	-.86000 [*]	.07728	.000	-1.0763	-.6437
		fructose	-.37667 [*]	.07728	.000	-.5930	-.1604
		methanol	-.71000 [*]	.07728	.000	-.9263	-.4937
	methanol	glucose	-.15000	.07728	.243	-.3663	.0663
		fructose	.33333 [*]	.07728	.002	.1170	.5496
		sucrose	.71000 [*]	.07728	.000	.4937	.9263

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ จ-8 ผลการทดสอบทางสถิติ One-way ANOVA และ Tukey's multiple comparison test ของความเข้มข้นของ glucose ต่อ CoQ₁₀ และน้ำหนักรเซลล์แห้งในแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
CoQ ₁₀ Production	2g/L	9	1.114444	.1955537	.0651846	.964129	1.264760	.8885	1.4492
	4g/L	9	1.245922	.2350059	.0783353	1.065281	1.426564	.9631	1.7394
	10g/L	9	2.140011	.2189728	.0729909	1.971694	2.308328	1.7909	2.4156
	20g/L	9	1.252278	.1696024	.0565341	1.121910	1.382646	1.0851	1.5533
	Total	36	1.438164	.4592389	.0765398	1.282780	1.593548	.8885	2.4156
Specific CoQ ₁₀ Content	2g/L	9	.856100	.1331203	.0443734	.753775	.958425	.7182	1.0501
	4g/L	9	.753811	.1462614	.0487538	.641385	.866238	.5632	1.0671
	10g/L	9	.622689	.0735366	.0245122	.566164	.679214	.5487	.7499
	20g/L	9	.587278	.0715472	.0238491	.532282	.642274	.5267	.7120
	Total	36	.704969	.1521040	.0253507	.653505	.756434	.5267	1.0671
DCW	2g/L	9	1.2989	.04457	.01486	1.2646	1.3331	1.22	1.38
	4g/L	9	1.6556	.06327	.02109	1.6069	1.7042	1.54	1.75
	10g/L	9	3.4533	.31898	.10633	3.2081	3.6985	3.15	3.90
	20g/L	9	2.1300	.06325	.02108	2.0814	2.1786	2.06	2.25
	Total	36	2.1344	.84341	.14057	1.8491	2.4198	1.22	3.90

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CoQ ₁₀ Production	Between Groups	6.020	3	2.007	47.165	.000
	Within Groups	1.361	32	.043		
	Total	7.382	35			
Specific CoQ ₁₀ Content	Between Groups	.413	3	.138	11.083	.000
	Within Groups	.397	32	.012		
	Total	.810	35			
DCW	Between Groups	24.003	3	8.001	286.415	.000
	Within Groups	.894	32	.028		
	Total	24.897	35			

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Concentration of glucose	(J) Concentration of glucose	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
CoQ ₁₀ Production	2g/L	4g/L	-.1314778	.0972348	.538	-.394922	.131967
		10g/L	-1.0255667*	.0972348	.000	-1.289011	-.762122
		20g/L	-.1378333	.0972348	.498	-.401278	.125611
	4g/L	2g/L	.1314778	.0972348	.538	-.131967	.394922
		10g/L	-.8940889*	.0972348	.000	-1.157533	-.630645
		20g/L	-.0063556	.0972348	1.000	-.269800	.257089
	10g/L	2g/L	1.0255667*	.0972348	.000	.762122	1.289011
		4g/L	.8940889*	.0972348	.000	.630645	1.157533
		20g/L	.8877333*	.0972348	.000	.624289	1.151178
	20g/L	2g/L	.1378333	.0972348	.498	-.125611	.401278
		4g/L	.0063556	.0972348	1.000	-.257089	.269800
		10g/L	-.8877333*	.0972348	.000	-1.151178	-.624289
Specific CoQ ₁₀ Content	2g/L	4g/L	.1022889	.0525146	.229	-.039992	.244570
		10g/L	.2334111*	.0525146	.001	.091130	.375692
		20g/L	.2688222*	.0525146	.000	.126541	.411103
	4g/L	2g/L	-.1022889	.0525146	.229	-.244570	.039992
		10g/L	.1311222	.0525146	.080	-.011159	.273403
		20g/L	.1665333*	.0525146	.017	.024252	.308814
	10g/L	2g/L	-.2334111*	.0525146	.001	-.375692	-.091130
		4g/L	-.1311222	.0525146	.080	-.273403	.011159
		20g/L	.0354111	.0525146	.906	-.106870	.177692
	20g/L	2g/L	-.2688222*	.0525146	.000	-.411103	-.126541
		4g/L	-.1665333*	.0525146	.017	-.308814	-.024252
		10g/L	-.0354111	.0525146	.906	-.177692	.106870

Multiple Comparisons (ต่อ)

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Concentration of glucose	(J) Concentration of glucose	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
DCW	2g/L	4g/L	-.35667*	.07879	.000	-.5701	-.1432
		10g/L	-2.15444*	.07879	.000	-2.3679	-1.9410
		20g/L	-.83111*	.07879	.000	-1.0446	-.6176
	4g/L	2g/L	.35667*	.07879	.000	.1432	.5701
		10g/L	-1.79778*	.07879	.000	-2.0112	-1.5843
		20g/L	-.47444*	.07879	.000	-.6879	-.2610
	10g/L	2g/L	2.15444*	.07879	.000	1.9410	2.3679
		4g/L	1.79778*	.07879	.000	1.5843	2.0112
		20g/L	1.32333*	.07879	.000	1.1099	1.5368
	20g/L	2g/L	.83111*	.07879	.000	.6176	1.0446
		4g/L	.47444*	.07879	.000	.2610	.6879
		10g/L	-1.32333*	.07879	.000	-1.5368	-1.1099

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



ตารางที่ จ-9 ผลการทดสอบทางสถิติ One-way ANOVA และ Tukey's multiple comparison test ของความเข้มข้นของ yeast extract ต่อ CoQ₁₀ และน้ำหนักรวมเซลล์แห้งในแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
CoQ ₁₀ Production	2g/L	9	1.272667	.0877366	.0292455	1.205226	1.340107	1.1351	1.3942
	4g/L	9	1.834744	.1897943	.0632648	1.688856	1.980633	1.4858	2.0635
	10g/L	9	2.766756	.2612386	.0870795	2.565950	2.967561	2.1179	3.0398
	20g/L	9	2.699978	.1962562	.0654187	2.549122	2.850834	2.4863	3.0743
	40g/L	9	1.761422	.1712705	.0570902	1.629772	1.893072	1.5434	1.9919
	Total	45	2.067113	.6115547	.0911652	1.883382	2.250845	1.1351	3.0743
Specific CoQ ₁₀ content	2g/L	9	1.082878	.2257107	.0752369	.909381	1.256374	.7848	1.5236
	4g/L	9	1.021689	.1104038	.0368013	.936825	1.106553	.8789	1.1725
	10g/L	9	.766267	.0737713	.0245904	.709561	.822972	.6034	.8551
	20g/L	9	.814778	.0809978	.0269993	.752517	.877038	.6756	.9225
	40g/L	9	.701322	.0681638	.0227213	.648927	.753718	.6029	.8005
	Total	45	.877387	.1925375	.0287018	.819542	.935231	.6029	1.5236
DCW	2g/L	9	1.2178	.23915	.07972	1.0339	1.4016	.77	1.60
	4g/L	9	1.7978	.07775	.02592	1.7380	1.8575	1.69	1.96
	10g/L	9	3.6156	.19963	.06654	3.4621	3.7690	3.33	3.91
	20g/L	9	3.3300	.25802	.08601	3.1317	3.5283	3.01	3.74
	40g/L	9	2.5167	.16934	.05645	2.3865	2.6468	2.28	2.81
	Total	45	2.4956	.93205	.13894	2.2155	2.7756	.77	3.91

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CoQ ₁₀ Production	Between Groups	15.017	4	3.754	104.395	.000
	Within Groups	1.439	40	.036		
	Total	16.456	44			
Specific CoQ ₁₀ content	Between Groups	.993	4	.248	15.555	.000
	Within Groups	.638	40	.016		
	Total	1.631	44			
DCW	Between Groups	36.637	4	9.159	230.894	.000
	Within Groups	1.587	40	.040		
	Total	38.224	44			

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Concentration of Yeast extract	(J) Concentration of Yeast extract	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
CoQ ₁₀ Production	2g/L	4g/L	-.5620778 [*]	.0893968	.000	-.817403	-.306752
		10g/L	-1.4940889 [*]	.0893968	.000	-1.749414	-1.238763
		20g/L	-1.4273111 [*]	.0893968	.000	-1.682637	-1.171986
		40g/L	-.4887556 [*]	.0893968	.000	-.744081	-.233430
	4g/L	2g/L	.5620778 [*]	.0893968	.000	.306752	.817403
		10g/L	-.9320111 [*]	.0893968	.000	-1.187337	-.676686
		20g/L	-.8652333 [*]	.0893968	.000	-1.120559	-.609908
		40g/L	.0733222	.0893968	.923	-.182003	.328648
	10g/L	2g/L	1.4940889 [*]	.0893968	.000	1.238763	1.749414
		4g/L	.9320111 [*]	.0893968	.000	.676686	1.187337
		20g/L	.0667778	.0893968	.944	-.188548	.322103
		40g/L	1.0053333 [*]	.0893968	.000	.750008	1.260659
	20g/L	2g/L	1.4273111 [*]	.0893968	.000	1.171986	1.682637
		4g/L	.8652333 [*]	.0893968	.000	.609908	1.120559
		10g/L	-.0667778	.0893968	.944	-.322103	.188548
		40g/L	.9385556 [*]	.0893968	.000	.683230	1.193881
	40g/L	2g/L	.4887556 [*]	.0893968	.000	.233430	.744081
		4g/L	-.0733222	.0893968	.923	-.328648	.182003
		10g/L	-1.0053333 [*]	.0893968	.000	-1.260659	-.750008
		20g/L	-.9385556 [*]	.0893968	.000	-1.193881	-.683230

Multiple Comparisons (a_{ia})

Tukey HSD

Specific CoQ ₁₀ content	2g/L	4g/L	.0611889	.0595477	.841	-.108885	.231263
		10g/L	.3166111*	.0595477	.000	.146537	.486685
		20g/L	.2681000*	.0595477	.001	.098026	.438174
		40g/L	.3815556*	.0595477	.000	.211482	.551629
	4g/L	2g/L	-.0611889	.0595477	.841	-.231263	.108885
		10g/L	.2554222*	.0595477	.001	.085348	.425496
		20g/L	.2069111*	.0595477	.010	.036837	.376985
		40g/L	.3203667*	.0595477	.000	.150293	.490440
	10g/L	2g/L	-.3166111*	.0595477	.000	-.486685	-.146537
		4g/L	-.2554222*	.0595477	.001	-.425496	-.085348
		20g/L	-.0485111	.0595477	.925	-.218585	.121563
		40g/L	.0649444	.0595477	.810	-.105129	.235018
	20g/L	2g/L	-.2681000*	.0595477	.001	-.438174	-.098026
		4g/L	-.2069111*	.0595477	.010	-.376985	-.036837
		10g/L	.0485111	.0595477	.925	-.121563	.218585
		40g/L	.1134556	.0595477	.331	-.056618	.283529
	40g/L	2g/L	-.3815556*	.0595477	.000	-.551629	-.211482
		4g/L	-.3203667*	.0595477	.000	-.490440	-.150293
		10g/L	-.0649444	.0595477	.810	-.235018	.105129
		20g/L	-.1134556	.0595477	.331	-.283529	.056618
DCW	2g/L	4g/L	-.58000*	.09389	.000	-.8482	-.3118
		10g/L	-2.39778*	.09389	.000	-2.6659	-2.1296
		20g/L	-2.11222*	.09389	.000	-2.3804	-1.8441
		40g/L	-1.29889*	.09389	.000	-1.5670	-1.0307
	4g/L	2g/L	.58000*	.09389	.000	.3118	.8482
		10g/L	-1.81778*	.09389	.000	-2.0859	-1.5496
		20g/L	-1.53222*	.09389	.000	-1.8004	-1.2641
		40g/L	-.71889*	.09389	.000	-.9870	-.4507
	10g/L	2g/L	2.39778*	.09389	.000	2.1296	2.6659
		4g/L	1.81778*	.09389	.000	1.5496	2.0859
		20g/L	.28556*	.09389	.032	.0174	.5537
		40g/L	1.09889*	.09389	.000	.8307	1.3670
	20g/L	2g/L	2.11222*	.09389	.000	1.8441	2.3804
		4g/L	1.53222*	.09389	.000	1.2641	1.8004
		10g/L	-.28556*	.09389	.032	-.5537	-.0174
		40g/L	.81333*	.09389	.000	.5452	1.0815

Multiple Comparisons (ต่อ)

Tukey HSD

DCW	40g/L	2g/L	1.29889 [*]	.09389	.000	1.0307	1.5670
		4g/L	.71889 [*]	.09389	.000	.4507	.9870
		10g/L	-1.09889 [*]	.09389	.000	-1.3670	-.8307
		20g/L	-.81333 [*]	.09389	.000	-1.0815	-.5452



ตารางที่ จ-10 ผลการทดสอบทางสถิติ One-way ANOVA และ Tukey's multiple comparison test ของความเข้มข้นของ corn steep liquor ต่อปริมาณ CoQ₁₀ และน้ำหนักเซลล์แห้งในแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T

Descriptives

CoQ₁₀ production

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
CoQ ₁₀ production	3.2 mL/L	9	.179178	.0366106	.0122035	.151036	.207319	.1375	.2590
	6.4 mL/L	9	.629489	.3973047	.1324349	.324093	.934884	.3898	1.6295
	16 mL/L	9	1.799478	.6142903	.2047634	1.327292	2.271663	.2309	2.3138
	32 mL/L	9	1.358067	.1863417	.0621139	1.214832	1.501302	1.0117	1.5738
	64 mL/L	9	.977767	.1647427	.0549142	.851134	1.104399	.7467	1.2232
	Total	45	.988796	.6569851	.0979376	.791415	1.186176	.1375	2.3138

ANOVA

CoQ₁₀ Production

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	14.204	4	3.551	29.671	.000
Within Groups	4.787	40	.120		
Total	18.992	44			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CoQ₁₀ Production
Tukey HSD

(I) Concentration of CSL	(J) Concentration of CSL	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
3.2 mL/L	6.4 mL/L	-.4503111	.1630824	.062	-.916089	.015467
	16 mL/L	-1.6203000*	.1630824	.000	-2.086078	-1.154522
	32 mL/L	-1.1788889*	.1630824	.000	-1.644667	-.713111
	64 mL/L	-.7985889*	.1630824	.000	-1.264367	-.332811
6.4 mL/L	3.2 mL/L	.4503111	.1630824	.062	-.015467	.916089
	16 mL/L	-1.1699889*	.1630824	.000	-1.635767	-.704211
	32 mL/L	-.7285778*	.1630824	.001	-1.194356	-.262799
	64 mL/L	-.3482778	.1630824	.225	-.814056	.117501
16 mL/L	3.2 mL/L	1.6203000*	.1630824	.000	1.154522	2.086078
	6.4 mL/L	1.1699889*	.1630824	.000	.704211	1.635767
	32 mL/L	.4414111	.1630824	.071	-.024367	.907189
	64 mL/L	.8217111*	.1630824	.000	.355933	1.287489
32 mL/L	3.2 mL/L	1.1788889*	.1630824	.000	.713111	1.644667
	6.4 mL/L	.7285778*	.1630824	.001	.262799	1.194356
	16 mL/L	-.4414111	.1630824	.071	-.907189	.024367
	64 mL/L	.3803000	.1630824	.156	-.085478	.846078
64 mL/L	3.2 mL/L	.7985889*	.1630824	.000	.332811	1.264367
	6.4 mL/L	.3482778	.1630824	.225	-.117501	.814056
	16 mL/L	-.8217111*	.1630824	.000	-1.287489	-.355933
	32 mL/L	-.3803000	.1630824	.156	-.846078	.085478

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Specific CoQ ₁₀ Content	3.2 mL/L	9	.866667	.1450862	.0483621	.755144	.978190	.6700	1.0700
	6.4 mL/L	9	2.047778	.1540923	.0513641	1.929332	2.166224	1.8300	2.2700
	16 mL/L	9	4.786667	1.0445932	.3481977	3.983721	5.589612	3.9300	6.6800
	32 mL/L	9	4.336667	1.4617541	.4872514	3.213063	5.460270	2.3800	6.6600
	Total	36	3.009444	1.8524778	.3087463	2.382656	3.636233	.6700	6.6800
DCW	3.2 mL/L	9	.8667	.14509	.04836	.7551	.9782	.67	1.07
	6.4 mL/L	9	2.0478	.15409	.05136	1.9293	2.1662	1.83	2.27
	16 mL/L	9	4.7867	1.04459	.34820	3.9837	5.5896	3.93	6.68
	32 mL/L	9	4.3367	1.46175	.48725	3.2131	5.4603	2.38	6.66
	Total	36	3.0094	1.85248	.30875	2.3827	3.6362	.67	6.68

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Specific CoQ ₁₀ Content	Between Groups	93.927	3	31.309	38.267	.000
	Within Groups	26.182	32	.818		
	Total	120.109	35			
DCW	Between Groups	93.927	3	31.309	38.267	.000
	Within Groups	26.182	32	.818		
	Total	120.109	35			

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Concentration of CSL	(J) Concentration of CSL	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Specific CoQ ₁₀ Content	3.2 mL/L	6.4 mL/L	-1.181111 [*]	.4263993	.044	-2.336381	-.025841
		16 mL/L	-3.920000 [*]	.4263993	.000	-5.075270	-2.764730
		32 mL/L	-3.470000 [*]	.4263993	.000	-4.625270	-2.314730
	6.4 mL/L	3.2 mL/L	1.181111 [*]	.4263993	.044	.025841	2.336381
		16 mL/L	-2.738889 [*]	.4263993	.000	-3.894159	-1.583619
		32 mL/L	-2.288889 [*]	.4263993	.000	-3.444159	-1.133619
	16 mL/L	3.2 mL/L	3.920000 [*]	.4263993	.000	2.764730	5.075270
		6.4 mL/L	2.738889 [*]	.4263993	.000	1.583619	3.894159
		32 mL/L	.4500000	.4263993	.719	-.705270	1.605270
	32 mL/L	3.2 mL/L	3.470000 [*]	.4263993	.000	2.314730	4.625270
		6.4 mL/L	2.288889 [*]	.4263993	.000	1.133619	3.444159
		16 mL/L	-.4500000	.4263993	.719	-1.605270	.705270
DCW	3.2 mL/L	6.4 mL/L	-1.18111 [*]	.42640	.044	-2.3364	-.0258
		16 mL/L	-3.92000 [*]	.42640	.000	-5.0753	-2.7647
		32 mL/L	-3.47000 [*]	.42640	.000	-4.6253	-2.3147
	6.4 mL/L	3.2 mL/L	1.18111 [*]	.42640	.044	.0258	2.3364
		16 mL/L	-2.73889 [*]	.42640	.000	-3.8942	-1.5836
		32 mL/L	-2.28889 [*]	.42640	.000	-3.4442	-1.1336
	16 mL/L	3.2 mL/L	3.92000 [*]	.42640	.000	2.7647	5.0753
		6.4 mL/L	2.73889 [*]	.42640	.000	1.5836	3.8942
		32 mL/L	.45000	.42640	.719	-.7053	1.6053
	32 mL/L	3.2 mL/L	3.47000 [*]	.42640	.000	2.3147	4.6253
		6.4 mL/L	2.28889 [*]	.42640	.000	1.1336	3.4442
		16 mL/L	-.45000	.42640	.719	-1.6053	.7053

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ จ-11 ผลการทดสอบทางสถิติ Independent T-Test ของการเปรียบเทียบระหว่าง yeast extract กับ corn steep liquor ในความเข้มข้นที่ให้ปริมาณไนโตรเจนที่เท่ากัน ต่อปริมาณ CoQ₁₀ และน้ำหนักเซลล์แห้งในแบคทีเรีย *Methylobacterium organophilum* NBRC 15689^T

Group Statistics

Concentration 2g/L and 3.2mL/L

	Type of nitrogen	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
CoQ ₁₀ production	yeast extract	9	1.272667	.0877366	.0292455
	CSL	9	.179178	.0366106	.0122035
Specific CoQ ₁₀ content	yeast extract	9	1.082878	.2257107	.0752369
	CSL	9	.866667	.1450862	.0483621
DCW	yeast extract	9	1.2178	.23915	.07972
	CSL	9	.8667	.14509	.04836

Independent Samples Test

Concentration 2g/L and 3.2mL/L

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
CoQ ₁₀ production	Equal variances assumed	6.691	.020	34.506	16	.000	1.0934889	.0316895	1.0263101	1.1606677
	Equal variances not assumed			34.506	10.704	.000	1.0934889	.0316895	1.0235046	1.1634731
Specific CoQ ₁₀ content	Equal variances assumed	.700	.415	2.417	16	.028	.2162111	.0894398	.0266072	.4058150
	Equal variances not assumed			2.417	13.647	.030	.2162111	.0894398	.0239152	.4085071
DCW	Equal variances assumed	.516	.483	3.766	16	.002	.35111	.09324	.15345	.54877
	Equal variances not assumed			3.766	13.186	.002	.35111	.09324	.14997	.55226

Group Statistics

Concentration 4g/L and 6.4mL/L

	Type of nitrogen	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
CoQ ₁₀ production	yeast extract	9	1.834744	.1897943	.0632648
	CSL	9	.629489	.3973047	.1324349
Specific CoQ ₁₀ content	yeast extract	9	1.021689	.1104038	.0368013
	CSL	9	2.047778	.1540923	.0513641
DCW	yeast extract	9	1.7978	.07775	.02592
	CSL	9	2.0478	.15409	.05136

Independent Samples Test

Concentration 4g/L and 6.4mL/L

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
CoQ ₁₀ production	Equal variances assumed	1.098	.310	8.212	16	.000	1.2052556	.1467700	.8941170	1.5163941
	Equal variances not assumed			8.212	11.470	.000	1.2052556	.1467700	.8838262	1.5266849
Specific CoQ ₁₀ content	Equal variances assumed	.531	.477	-16.239	16	.000	-1.0260889	.0631871	-1.1600395	-.8921383
	Equal variances not assumed			-16.239	14.500	.000	-1.0260889	.0631871	-1.1611741	-.8910036
DCW	Equal variances assumed	3.316	.087	-4.345	16	.001	-.25000	.05753	-.37196	-.12804
	Equal variances not assumed			-4.345	11.825	.001	-.25000	.05753	-.37556	-.12444

Group Statistics

Concentration 10g/L and 16mL/L

	Type of nitrogen	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
CoQ ₁₀ production	yeast extract	9	2.766756	.2612386	.0870795
	CSL	9	1.799478	.6142903	.2047634
Specific CoQ ₁₀ content	yeast extract	9	.766267	.0737713	.0245904
	CSL	9	4.786667	1.0445932	.3481977
DCW	yeast extract	9	3.6156	.19963	.06654
	CSL	9	4.7867	1.04459	.34820

Independent Samples Test

Concentration 10g/L and 16mL/L

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
CoQ ₁₀ production	Equal variances assumed	1.384	.257	4.347	16	.000	.9672778	.2225105	.4955767	1.4389789
	Equal variances not assumed			4.347	10.802	.001	.9672778	.2225105	.4764381	1.4581174
Specific CoQ ₁₀ content	Equal variances assumed	27.758	.000	-11.518	16	.000	-4.0204000	.3490650	-4.7603847	-3.2804153
	Equal variances not assumed			-11.518	8.080	.000	-4.0204000	.3490650	-4.8239636	-3.2168364
DCW	Equal variances assumed	20.024	.000	-3.304	16	.004	-1.17111	.35450	-1.92262	-.41961
	Equal variances not assumed			-3.304	8.584	.010	-1.17111	.35450	-1.97901	-.36321

Group Statistics

Concentration 20g/L and 32mL/L

	Type of nitrogen	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
CoQ ₁₀ production	yeast extract	9	2.699978	.1962562	.0654187
	CSL	9	1.358067	.1863417	.0621139
Specific CoQ ₁₀ content	yeast extract	9	.814778	.0809978	.0269993
	CSL	9	4.336667	1.4617541	.4872514
DCW	yeast extract	9	3.3300	.25802	.08601
	CSL	9	4.3367	1.46175	.48725

Independent Samples Test

Concentration 20g/L and 32mL/L

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
CoQ ₁₀ production	Equal variances assumed	.052	.823	14.876	16	.000	1.3419111	.0902095	1.1506756	1.5331466
	Equal variances not assumed			14.876	15.957	.000	-1.3419111	.0902095	1.1506339	1.5331883
Specific CoQ ₁₀ content	Equal variances assumed	16.917	.001	-7.217	16	.000	-3.5218889	.4879988	-4.5564002	-2.4873776
	Equal variances not assumed			-7.217	8.049	.000	-3.5218889	.4879988	-4.6460218	-2.3977560
DCW	Equal variances assumed	12.407	.003	-2.035	16	.059	-1.00667	.49478	-2.05556	.04223
	Equal variances not assumed			-2.035	8.498	.074	-1.00667	.49478	-2.13611	.12277

Group Statistics

Concentration 40g/L and 64mL/L

	Type of nitrogen	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
CoQ ₁₀ production	yeast extract	9	1.761422	.1712705	.0570902
	CSL	9	.977767	.1647427	.0549142

Independent Samples Test

Concentration 40g/L and 64mL/L

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
CoQ ₁₀ production	Equal variances assumed	.009	.927	9.893	16	.000	.7836556	.0792140	.6157294	.9515818
	Equal variances not assumed			9.893	15.976	.000	.7836556	.0792140	.6157088	.9516023

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ณัฐธิดา มิ่งระโกชน์
วัน เดือน ปี เกิด	19 ตุลาคม 2536
สถานที่เกิด	จังหวัดราชบุรี
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมี) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ที่อยู่ปัจจุบัน	2/47 able condo ซ.ลาดพร้าว 27 แขวงจันทระเกษม เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY