# การผลิตโคเอนไซม์คิวเทนจากเศษเหลือทะลายปาล์มน้ำมันที่ผ่านการย่อย โดยเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* S10

# Production of Coenzyme $Q_{10}$ from Hydrolysate of Empty Fruit Bunch of Oil Palm by *Rhodobacter sphaeroides* S10

**อรุณี ประดิษฐคล้าย**[1] ดวงพร คันธโชติ[2]และ วรรณา ชูฤทธิ์[1]*

Arunee praditklay[1], Duangporn Kantachote[2] and Wanna choorit[1]

## บทคัดย่อ

การผลิตโคเอนไซม์คิวเทนเชิงพาณิชย์นิยมใช้การสังเคราะห์ทางชีวภาพ เพราะให้ผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทนในปริมาณสูงและต้นทุนการผลิตต่ำ ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี เช่น เทคนิคการคัดเลือกสายพันธุ์ การปรับปรุงสายพันธุ์ การปรับปรุงสภาวะการเพาะเลี้ยง รวมทั้งการเลือกใช้แหล่งคาร์บอนเหลือใช้ ในการทดลองการผลิต โคเอนไซม์คิวเทนโดยการเพาะเลี้ยง *Rhodobacter sphaeroides* S10 โดยใช้แหล่งคาร์บอนจากการย่อยเศษเหลือทะลายปาล์มน้ำมัน ภายใต้สภาวะที่มีอากาศและไม่มีแสง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าในอาหารที่ไม่มีการเติมสารส่งเสริมการผลิตโคเอนไซม์คิวเทนมีการผลิตโคเอนไซม์คิวเทน 6.25 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหาร และในอาหารที่มีการเติมนิโคติน 7.5 มิลลิโมลลาร์ ที่เวลา 76 ชั่วโมง และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 25 ไมโครโมลลาร์ ที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่ามีการผลิตโคเอนไซม์คิวเทนสูงสุด คือ 6.93 และ 7.79 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหาร ตามลำดับ หลังจากเลี้ยงเชื้อนาน 96 ชั่วโมง

## ABSTRACT

Commercial production of coenzyme Q10 via biological method has been drastically interested because the high yield and the low cost production of coenzyme Q10 can be achieved through many methods such as strain screening techniques, strain improvements, improvements of culture conditions and selection of by-product carbon sources. Coenzyme Q10 production by *Rhodobacter sphaeroides* S10 in hydrolysate of empty fruit brunch of oil palm were performed under aerobic and dark conditions, at a temperature of 35°C in this study. The results showed that 6.25 mg/L coenzyme Q10 was accumulated in the culture medium without addition of chemical agents. Additions 7.5 mM nicotine at 76 h cultivation and 25 μM hydrogen peroxide to the medium, at 48 h cultivation, maximum level of coenzyme Q10 were found to be 6.93 and 7.79 mg/L, respectively after 96 h cultivation.

Key Words: coenzyme Q 10, empty fruit bunch of oil palm, *Rhodobacter sphaeroides*

e-mail address: cwanna35@gmail.com

[1]หลักสูตรอุตสาหกรรมเกษตร (เทคโนโลยีชีวภาพ) สำนักวิชาเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จ.นครศรีธรรมราช 80161

[1]Program in Agro-industry (Biotechnology), School of Agricultural Technology, Walailak University, Nakhon Si Thammarat 80161

[2]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

[2]Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkhla 90112

## คำนำ

โคเอนไซม์คิวเทน หรือ ยูบิควิโนนเทน ประกอบด้วยส่วนหัว คือ 2,3-dimethoxy-methyl-benzoquinone และสายยาวของ monosaturated isoprenoid จำนวน 10 หน่วย พบได้ในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ โดยมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีของสิ่งมีชีวิต (Kalen *et al*., 1987; Kawamukai, 2002) ปัจจุบันมีการใช้โคเอนไซม์คิวเทนในด้านเภสัชกรรมและเครื่องสำอางอย่างกว้างขวาง มีการยอมรับให้ใช้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการบำบัดโรคหัวใจและโรคหลอดเลือด

โคเอนไซม์คิวเทน สามารถผลิตได้โดยวิธีการทางเคมี (Negishi *et al.,* 2002) กึ่งเคมี (Lipshutz *et al*., 2002) และทางชีวภาพ แต่การสังเคราะห์ทางชีวภาพของโคเอนไซม์คิวเทนจะมีความหลากหลายกว่าการสังเคราะห์ทางเคมีและกึ่งเคมี เพราะสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ทางชีวภาพมีหลายชนิด (Yoshida *et al*., 1998; Ha *et al.,* 2007; Tian *et al.,* 2010; Yen *et al.,* 2010) และสามารถเลือกใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูกเพื่อลดต้นทุนการผลิต ยิ่งกว่านั้นการสังเคราะห์ทางชีวภาพยังมีจุดเด่นหลายอย่างที่ทำให้สามารถเพิ่มผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทน เช่น การเพาะเลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิและระดับพีเอชที่เหมาะสม รวมทั้งการเติมสารเพื่อส่งเสริมการผลิต โคเอนไซม์คิวเทน การกลายพันธุ์และการตัดต่อพันธุกรรมของจุลินทรีย์ (Kuratsu *et al.,* 1984; Kuratsu and Inuzuka, 1985; Yoshida *et al*., 1998; Choi *et al.,* 2005; Ha *et al*., 2007; Seo *et al*., 2007; Yen and Chiu, 2007; Tian *et al.,* 2010) ด้วยเหตุผลดังกล่าวการผลิตเชิงพาณิชย์ของโคเอนไซม์คิวเทน จึงนิยมใช้การสังเคราะห์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ (Choi *et al.,* 2005) จุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าสามารถผลิตโคเอนไซม์คิวเทนปริมาณสูง เช่น *Agrobacterium tumefaciens*, *Paracoccus denitrificans*, *Rhodobacter sphaeroides* และ *Rhodospirillum rubrum* (Yoshida *et al*., 1998; Tian *et al.,* 2010)

จากรายงานของ Pattanamanee *et al*. (2012) กล่าวว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rhodobacter sphaeroides* S10 สามารถเจริญบนอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนหลายชนิด ในการทดลองครั้งนี้ได้เพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลทดังกล่าวในเศษเหลือทะลายปาล์มน้ำมัน ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนราคาถูกและเป็นของเสียที่มีปริมาณมาก

## อุปกรณ์และวิธีการ

### การเตรียมแหล่งอินทรีย์คาร์บอน

คัดเลือกเส้นใยเศษเหลือทะลายปาล์มน้ำมันที่ผ่านการลดขนาดด้วยเครื่อง Hummer mill เป็น 2 ขนาด ได้แก่ ขนาดน้อยกว่า 0.85 มิลลิเมตร และ 0.85-4.75 มิลลิเมตร โดยใช้เครื่องร่อนมวลละเอียด ย่อยลิกนินในเส้นใยด้วย 100 mM NaOH และ 1% $H_2O_2$ นาน 48 ชั่วโมง (Chai and Zhu, 1999; Misson *et al.,* 2009) จากนั้นนำเส้นใยเศษเหลือทะลายปาล์มน้ำมันหนัก 20 กรัม มาย่อยด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 6% (Pattanamanee *et al*., 2012) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เพื่อย่อยคาร์บอนโมเลกุลใหญ่ให้เป็นคาร์บอนโมเลกุลเล็ก จากนั้นแยกเส้นใยเศษเหลือทะลายปาล์มน้ำมันออกจากของเหลวโดยกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 ของเหลวที่กรองได้นำมาวัดพีเอช และวัดปริมาณ น้ำตาลกลูโคส ไซโลสและกรดแอซีติก ด้วยโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Pattanamanee *et al*., 2012)

**แบคทีเรียและการเตรียมกล้าเชื้อ**

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rhodobacter sphaeroides* S10 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลวสูตร GMY ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ปรับปรุงปริมาณการเติม Yeast extract เป็น 2.0 กรัม/ลิตร จากสูตร GM ของ Choorit *et al*. (2011) บ่มในสภาวะมีอากาศและไม่มีแสง เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

**การผลิตโคเอนไซม์คิวเทน**

เติมแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rhodobacter sphaeroides* S10 (จากวิธีการข้อ 2) ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0 ลงในอาหารเหลวสูตร Modified OM3 ที่มีแหล่งคาร์บอนจากการย่อยเส้นใยเศษเหลือทะลายปาล์มน้ำมันเข้มข้น 30 มิลลิโมลลาร์ ปริมาตร 270 มิลลิลิตร ซึ่งปรับปรุงปริมาณการเติม Yeast extract เป็น 2.0 กรัม/ลิตร และ L- glutamic acid เป็น 3.80 กรัม/ลิตร จากอาหารเหลวสูตร OM3 ของ pattanamanee *et al.* (2012) บรรจุ Modified OM3 ลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะมีอากาศและไม่มีแสง เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

การเพิ่มผลผลิตโคเอนไซม์คิวเทนทำโดยเติม นิโคติน 7.5 มิลลิโมลลาร์ (Singh *et al.,* 1973) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 25 ไมโครโมลลาร์ (Seo and Kim, 2010) ที่เวลา 48, 76 และ 96 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลา 96 ชั่วโมงเพื่อวัดค่าพีเอช ความเข้มข้นเซลล์ (Yoshida *et al.,* 1998; Ha *et al.,* 2007; Yen *et al.,* 2010) ความเข้มข้นน้ำตาลไซโลส กลูโคส และ กรดแอซีติก ด้วยโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (แสดงผลแหล่งคาร์บอนทั้งสาม ในรูปคาร์บอนรวม) (Pattanamanee *et al*., 2012) และวัดปริมาณโคเอนไซม์คิวเทน (Yen *et al*., 2010)

## ผลการทดลองและวิจารณ์

**แหล่งอินทรีย์คาร์บอนจากเส้นใยเศษเหลือทะลายปาล์มน้ำมัน**

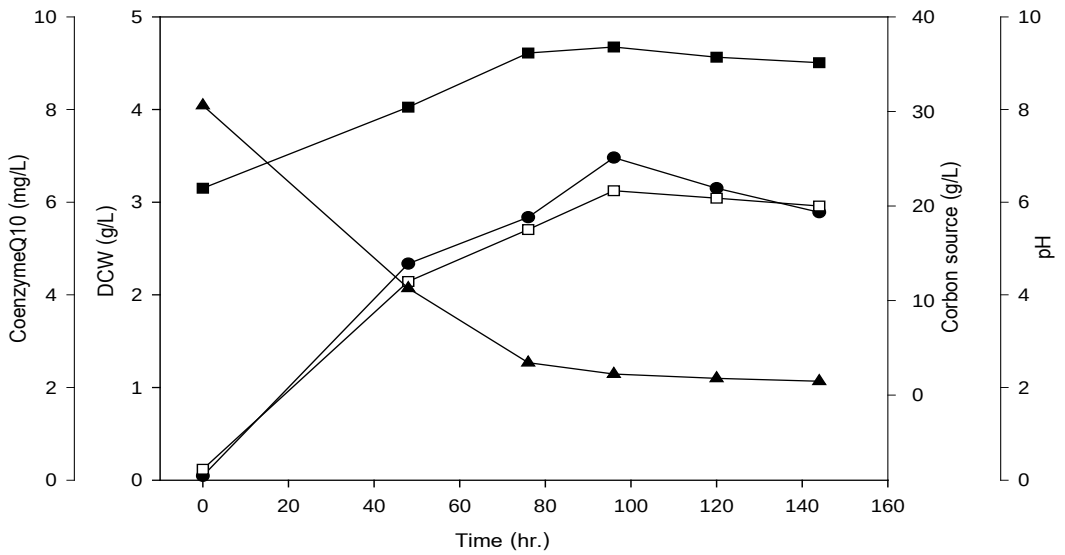
แบ่งเส้นใยเศษเหลือทะลายปาล์มน้ำมันออกเป็นสองกลุ่ม กลุ่มที่ 1 ขนาดน้อยกว่า 0.85 มิลลิเมตร และกลุ่มที่ 2 ขนาด 0.85-4.75 มิลลิเมตร จากนั้นนำเส้นใยทั้งสองกลุ่มมาผ่านการย่อยลิกนินด้วย 100 mM NaOH และ 1% $H_2O_2$ นาน 48 ชั่วโมง พบว่าประสิทธิภาพในการย่อยลิกนินของเส้นใยกลุ่มที่ 1 และ 2 เท่ากับ 71.73 และ 13.19 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ Doherty *et al.* (2011) กล่าวว่าโครงสร้างหลักของเส้นใยเศษเหลือทะลายปาล์มน้ำมันมีเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินหุ้มอยู่นอกสุดของเส้นใย โดยลิกนินจะเชื่อมกับเฮมิเซลลูโลสด้วยพันธะโควาเลนต์ การเติมสารเคมีทั้งสองชนิดข้างต้นมีผลให้ลิกนินหลุดออกจากเส้นใยง่ายขึ้น (Ibrahim *et al.,* 2005; Mission *et al.,* 2009) ในการทดลองนี้พบว่าเส้นใยที่ผ่านการย่อยลิกนินมีสีขาว และเมื่อนำเส้นใยไปย่อยด้วยกรดได้ของเหลวจากการย่อยดังแสดงในตารางที่ 1 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไซโลส กลูโคสและกรดแอซีติกในเส้นใยที่ผ่านและไม่ผ่านการย่อยลิกนิน พบว่าการย่อยลิกนินมีผลให้ปริมาณไซโลสเพิ่มขึ้น มาจากลิกนินซึ่งเป็นองค์ประกอบของเส้นใยด้านนอกสุดหลุดออกจากเส้นใย ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการย่อยเส้นใยด้วย 6% $H_2SO_4$ ดียิ่งขึ้น แต่อย่างไรก็ตามในกระบวนการย่อยลิกนินด้วย NaOH และ $H_2O_2$ มีผลในการลดปริมาณลิกนินและเฮมิเซลลูโลสบางส่วนด้วย (Misson *et al*., 2009) ทำให้เมื่อนำเส้นใยที่ผ่านการลดลิกนินมาย่อยด้วย 6% $H_2SO_4$ จึงพบปริมาณของกลูโคสและกรดแอซีติกลดลง

**ตารางที่ 1** ไฮโดรไลเซทจากการย่อยด้วยกรดของเส้นใยเศษเหลือทะลายปาล์มน้ำมันที่ผ่านและไม่ผ่านการย่อยลิกนิน

| ตัวอย่าง ไฮโดรไลเซท | ชนิดของคาร์บอน | ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร) | ความเข้มข้น (มิลลิโมลลาร์) |
|---|---|---|---|
| | Xylose | 14.26 | 94.99 |
| ไม่ผ่านการย่อยลิกนิน | Glucose | 6.75 | 37.47 |
| | Acetic acid | 1.44 | 23.98 |
| รวม | | 22.45 | 156.44 |
| | Xylose | 19.38 | 129.09 |
| ผ่านการย่อยลิกนิน | Glucose | 2.96 | 16.43 |
| | Acetic acid | 0.29 | 4.83 |
| รวม | | 22.63 | 150.35 |

**การผลิตโคเอนไซม์คิวเทน**

จากการวัดปริมาณโคเอนไซม์คิวเทนที่เวลา 0 48 76 96 120 และ 144 ชั่วโมง ของการเพาะเลี้ยง *Rhodobacter sphaeroides* S10 ในอาหาร Modified OM3 ที่มีแหล่งคาร์บอนจากไฮโดรไลเซทที่ผ่านการย่อยลิกนิน 30 มิลลิโมลลาร์ ภายใต้สภาวะมีอากาศและไม่มีแสง ที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่าช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยวเซลล์เพื่อให้ได้ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทนสูงที่สุด (6.25 มิลลิกรัม/ลิตร) คือ 96 ชั่วโมง ซึ่งเซลล์จะอยู่ในช่วง stationary phase (ภาพที่ 1) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Yen and Shih, (2009), Kien *et al*. (2010), Yen *et al*. (2010) ซึ่งกล่าวว่าการผลิตโคเอนไซม์คิวเทนเกิดควบคู่กับการผลิตเซลล์




**ภาพที่ 1** ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทน (□) น้ำหนักเซลล์แห้ง (●) พีเอช (■) และปริมาณคาร์บอนรวม (▲) หลังการเพาะเลี้ยง *Rhodobacter sphaeroides* S10 ในอาหาร Modified OM3 ภายใต้สภาวะมีอากาศและไม่มีแสง ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทน หลังการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rhodobacter sphaeroides* S10 ที่เติมนิโคตินความเข้มข้น 7.5 mM ลงในอาหารที่เวลา 48, 76 และ 96 ชั่วโมง พบว่าการทดลองที่มีการเติมนิโคตินที่เวลา 76 ชั่วโมง มีปริมาณโคเอนไซม์คิวเพิ่มขึ้น 0.68 มิลลิกรัม/ลิตร (จาก 6.25 เป็น 6.93 มิลลิกรัม/ลิตร) และมีปริมาณโคเอนไซม์คิวเทนจำเพาะสูงสุด คือ 2.16 มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักเซลล์แห้ง (ตารางที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Singh *et al.* (1973) ที่กล่าวว่าการเติมนิโคตินลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* ทำให้ยับยั้งการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์กลุ่ม Spheroidene และ Hydroxyspheroidene ทั้งนี้วิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ของแบคทีเรียสกุลนี้เริ่มจาก Neurosporene, Spheroidene และ Hydroxyspheroidene ตามลำดับ ดังนั้นเมื่อยับยั้งการสังเคราะห์ Spheroidene และ Hydroxyspheroidene พบว่านิโคตินทำให้มีการสะสม Neurosporene มากขึ้น จึงส่งผลให้มีโอกาสที่จะมีปริมาณสารตั้งต้นสำหรับการสร้างโคเอนไซม์คิวเทนมากขึ้น

**ตารางที่ 2** ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทนหลังการเพาะเลี้ยง *Rhodobacter sphaeroides* S10 ในอาหาร Modified OM3 ที่มีการเติมและไม่เติมนิโคติน 7.5 มิลลิโมลลาร์ นาน 96 ชั่วโมง

| เวลาที่เติมสาร (ชม.) | โคเอนไซม์คิวเทน (มิลลิกรัม/ลิตร) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร) | โคเอนไซม์คิวเทนจำเพาะ (มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักเซลล์แห้ง) |
|---|---|---|---|
| ไม่เติมนิโคติน | 6.25 | 3.48 | 1.80 |
| 48 | 6.52 | 3.19 | 2.04 |
| 76 | 6.93 | 3.21 | 2.16 |
| 96 | 6.91 | 3.50 | 1.97 |

ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทนหลังการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rhodobacter sphaeroides* S10 ที่เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลลาร์ ที่เวลา 48 76 และ 96 ชั่วโมง พบว่าการทดลองที่มีการ

เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ดีกว่าการไม่เติมสารดังกล่าว การเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เวลา 48 ชั่วโมงมีการผลิตโคเอนไซม์คิวเทนเพิ่มขึ้น 1.54 มิลลิกรัม/ลิตร (จาก 6.25 เป็น 7.79 มิลลิกรัม/ลิตร) และ มีปริมาณโคเอนไซม์คิวเทนจำเพาะสูงสุด คือ 2.21 มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Seo and Kim (2010) กล่าวว่าเมื่อเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 10 - 100 ไมโครโมลลาร์ จะมีการผลิตโคเอนไซม์คิวเทนปริมาณสูงกว่าการทดลองที่ไม่มีการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

**ตารางที่ 3** ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทนหลังการเพาะเลี้ยง *Rhodobacter sphaeroides* S10 ในอาหาร Modified OM3 ที่มีการเติมและไม่เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 25 ไมโครโมลลาร์ นาน 96 ชั่วโมง

| เวลาที่เติมสาร (ชม.) | โคเอนไซม์คิวเทน (มิลลิกรัม/ลิตร) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร) | โคเอนไซม์คิวเทนจำเพาะ (มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักเซลล์แห้ง) |
|---|---|---|---|
| ไม่เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ | 6.25 | 3.48 | 1.80 |
| 48 | 7.79 | 3.52 | 2.21 |
| 76 | 7.06 | 3.48 | 2.03 |
| 96 | 6.81 | 3.49 | 1.95 |

## สรุป

จากการทดลองพบว่า *Rhodobacter sphaeroides* S10 สามารถผลิตโคเอนไซม์คิวเทนในอาหารที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนที่ได้จากการย่อยเศษเหลือทะลายปาล์มน้ำมันได้ ทำให้สามารถนำของเสียมาใช้ประโยชน์และลดต้นทุนในการผลิตโคเอนไซม์คิวเทนอีกด้วย นอกจากนี้ยังสามารถเติมนิโคตินและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตโคเอนไซม์คิวเทนได้

## เอกสารอ้างอิง

Chai, X.S. and J.Y Zhu. 1999. A direct and spectrophotometric method for on-line pulp kappa number determination. *In* **Tappi Engineering/Process and Product Quality Conference**, Anaheim, CA, September 12–16.

Choi, J.H., Y.W. Ryu and J.H. Seo. 2005. Biotechnological production and applications of coenzyme $Q_{10}$. **Applied Microbiology and Biotechnology** 68: 9- 15.

Choorit, W., A. Saikeur, P. Chodok, P. Prasertsan and D. Kantachote. 2011. Production of biomass and extracellular 5-aminolevulinic acid by *Rhodoseudomonas palustris* KG31 under light and dark conditions using volatile fatty acid. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 111(6): 658-64.

Doherty W.O.S., P. Mousavioun and C.M. Fellows. 2011 Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin

polymers. **Industrial Crops and Products** 33: 259-276.

Ha, S.J., S.Y. Kim, J.H. Seo, D.K. Oh and J.K. Lee. 2007. Optimization of culture conditions and scale-up to pilot and plant scales for coenzyme Q10 production by *Agrobacterium tumefaciens*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 74: 974- 980.

Ibrahim, M.N.M., W.D.W. Rosli and S.B. Chuah. 2005. Monitoring quality of soda black liquar of oil palm empty fruit bunch fibers in terms of storage tems of storage time and temperature. **Journal of technology** 42(C): 21-22.

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

Kawamukai, M. 2002. Biosynthesis, bioproduction, and novel roles of ubiquinone. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 94: 511-517.

Kien, N.B., I-S. Kong, M-G. Lee and J.K. Kim. 2010. Coenzyme Q10 production in a 150-l reactor by a mutant strain of *Rhodobacter sphaeroides*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** 37: 521- 529.

Kuratsu, Y. and K. Inuzuka. 1985. Factors a Vecting broth viscosity and coenzyme $Q_{10}$ production by *Agrobacterium* species. **Applied Microbiology and Biotechnology** 21: 55–59.

Kuratsu, Y., M. Sakurai, H. Hagino and K. Inuzuka. 1984. Aeration–agitation event on coenzyme $Q_{10}$ production by *Agrobacterium* species. **Journal of Fermentation and Bioengineering** 62: 305–308.

Lipshutz, B.H., P. Mollard, S.S. PfeiVer and W. Chrisman. 2002. A short, highly efficient synthesis of coenzyme $Q_{10}$. **Journal of the American Chemical Society** 124: 14282–14283.

Misson, M., R. Haron, M.F.A Kamaroddin and N.A.S. Amin. 2009. Pretreatment of empty palm fruit bunch for production of chemicals via catalytic pyrolysis. **Bioresource Technology** 100: 2867-2873.

Negishi, E., S.Y. Lou, C. Xu and S.A. Huo. 2002. novel, highly selective, and general methodology for the synthesis of 1,5-diene-containing oligoisoprenoids of all possible geometrical combinations exemplified by an iterative and convergent synthesis of coenzyme $Q_{10}$. **Organic Letters** 4: 261–264.

Pattanamanee, W., W. Choorit, C. Deesan, S. Sirisansaneeyakul and Y. Chisti. 2012. Photofermentive production of biohydrogen from oil palm waste hydrolysate. **International journal of hydrogen energy** 37: 4077- 4087.

Seo, M-J. and S-O Kim. 2010. Effect of Limited Oxygen Supply on Coenzyme Q10 Production and Its Relation to Limited Electron Transfer and Oxidative Stress in *Rhizobium radiobacter* T6102. **Journal of Microbiology and Biotechnology** 20(2): 346- 349.

Singh R. K., Ben-Aziz A., G. Britton and T. W.Goodwin. 1973. Biosynthesis of Spheroidene and Hydroxyspheroidene in *Rhodopseudomonas* Species: Experinients with Nicotine as Inhibitor. **Biochemical journal** 132: 649-652.

Tian, Y., T. Yuea, Y. Yuana, P.K. Somab and Y.M. Loa. 2010. Improvement of cultivation medium for enhanced production of coenzyme Q10 by photosynthetic *Rhodospirillum rubrum*. **Biochemical Engineering Journal** 51: 160–166.

West, D.D. 2000. **Synthesis of coenzyme Q10, Ubiquinone**. US 6,686,485 B2.

Yen, H.W. and C.H. Chiu. 2007. The in Xuences of aerobic-dark and anaerobic-light cultivation on $CoQ_{10}$ production by *Rhodobacter sphaeroides* in the submerged fermenter. **Enzyme and Microbial Technology** 41: 600–604.

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

Yen, H-W and T-Y Shih. 2009. Coenzyme Q10 production by *Rhodobacter sphaeroides* in stirred tank and in airlift bioreactor. **Journal Bioprocess and Biosystems Engineering** 32: 711-716.

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