

หมักกรรมโดยนำถุงไบโครามแห้ง 5 กรัมที่ผ่านการแช่ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 10 นาทีไปแช่ในซัสเพนชันของดินจากบริเวณเขื่อนจุฬาภรณ์ซึ่งผสมกับ basal medium 100 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชม พบว่าค่า pH ลดลงเมื่อเวลาหมักเพิ่มขึ้น มีปริมาณสีอินดิโกสูงสุด 0.0158 µg /ml เมื่อหมักไบโครามเป็นเวลา 12 ชั่วโมงและจะลดลงเรื่อยๆเมื่อเวลาหมักนานขึ้น จำนวน Mesophilic aerobic bacteria, Mesophilic anaerobic bacteria, Alkaliphilic aerobic bacteria, Alkaliphilic anaerobic bacteria และ β-glucosidase producing bacteria เมื่อเริ่มต้นหมักมีจำนวนใกล้เคียงกันเท่ากับ 3.95×10^2 , 6.50×10^2 , 3.50×10^2 , 2.45×10^2 , 2.45×10^2 MPN /ml ตามลำดับ และมีจำนวนสูงสุดที่เวลาบ่ม 12 ชั่วโมงเช่นกันเท่ากับ 1.2×10^5 , 8.5×10^4 , 0.80×10^4 , 5.50×10^4 MPN /ml ยกเว้น β-glucosidase producing bacteria มีจำนวนสูงสุดที่เวลาบ่ม 48 ชั่วโมงเท่ากับ 1.65×10^4 MPN /ml เนื่องจากแบคทีเรียทั้ง 4 กลุ่มแรกนี้มีจำนวนและการเปลี่ยนแปลงใกล้เคียงกัน บ่งชี้ได้ว่าแบคทีเรียเดียวกันที่เจริญได้ทั้งที่ pH 7 และ pH 10 จึงควรจัดเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกันที่เจริญได้ทั้งในที่ที่มีอากาศและไม่มีอากาศที่สร้างเอนไซม์ β-glucosidase ได้เก็บเชื้อบริสุทธิ์ β-glucosidase producing bacteria เป็นจำนวน 20 ไอโซเลทซึ่งสร้างอินดิโกับลูในปริมาณ 180.256 µg / ml ถึง 581.282 µg / ml ประกอบด้วย 18 ไอโซเลทที่สร้างเฉพาะสีอินดิโก ส่วนอีก 2 ไอโซเลทสร้างทั้งสีอินดิโกและ indirubin แต่มีเพียง 8 ไอโซเลทที่สามารถรีดิวเป็นอินดิโกไวท์ได้อย่างสมบูรณ์ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ 5 ไอโซเลทและอีก 15 ไอโซเลทเป็นแบคทีเรียแกรมบวก

เตรียมรีดิวสีครามโดยนำถุงไบโครามออกจากน้ำหมัก เติมน้ำขาว 2 กรัม กลูโคส 1 กรัม แล้วเติมน้ำด่างที่ได้จากแก้วไบเมพรวาแห้งจนทำให้น้ำหมักมีค่า pH 10 จากนั้นจึงเติมอากาศโดยใช้ปั๊มอากาศสำหรับตู้ปลาเป็นเวลา 3 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชม. พบว่าค่า pH ของน้ำหมักกรรมลดลงเรื่อยๆ มีค่าต่ำสุดชั่วโมงที่ 48 มีค่า pH เท่ากับ 5.64 สีครามไม่ได้ถูกรีดิวไปเป็น leuco indigo ภายในเวลาหมัก 48 ชั่วโมง จำนวน Mesophilic aerobic indigo reducing bacteria, mesophilic anaerobic indigo reducing bacteria และ Alkalophilic aerobic indigo reducing bacteria เมื่อเริ่มต้นหมักมีจำนวนใกล้เคียงกัน 2.45×10^2 , 2.45×10^2 , 1.65×10^2 MPN /ml และมีจำนวนสูงสุดที่เวลาบ่ม 12 ชั่วโมงเท่ากับ 8.50×10^4 , 2.45×10^5 , 8.50×10^4 MPN /ml ตามลำดับ ได้เก็บเชื้อบริสุทธิ์ mesophilic aerobic indigo reducing bacteria เป็นจำนวน 20 ไอโซเลท ซึ่งสร้างอินดิโกับลูในปริมาณ 91.538 µg / ml ถึง 529.487 µg / ml ประกอบด้วย 17 ไอโซเลทที่สร้างเฉพาะสีอินดิโก ส่วนอีก 3 ไอโซเลท สร้างทั้งสีอินดิโกและ indirubin เป็นแบคทีเรียแกรมบวกทั้งหมด

The 5 g of indigo dry leaves in cotton sac treated with 100 °C hot water for 10 minutes. The sac immersed in 100 ml basal medium mixed with soil suspension from Chulaporn Dam area, then incubation at 30 °C for 48 hour. The results showed that pH decreased corresponding to the increase of incubation period. The highest indigo concentration was 0.0158 µg /ml at 12 hour of fermenting process and decrease while the increase of fermenting period. The initial number of mesophilic aerobic bacteria, mesophilic anaerobic bacteria, alkaliphilic aerobic bacteria, alkaliphilic anaerobic bacteria and β-glucosidase producing bacteria were almost the same value as 3.95×10^2 , 6.50×10^2 , 3.50×10^2 , 2.45×10^2 , 2.45×10^2 MPN /ml, respectively. The highest population of 3 groups bacteria were detected nearly the same as 1.20×10^5 , 8.50×10^4 , 5.50×10^4 MPN /ml at 12 hour of fermenting period, respectively. The β-glucosidase producing bacteria number had highest count at 48 hour as 1.65×10^4 MPN /ml. Since, the population of 4 groups bacteria were changed in the same pattern. Therefore, they could be the same bacteria which survive both pH 7 and 10. They were alkalitolerant bacteria, facultative anaerobe which produce β-glucosidase. The 20 pure culture of β-glucosidase producing bacteria was collected. These isolates produced indigo blue in the range of 180.256 µg /ml to 581.282 µg/ml. The 18 isolates produced only indigo blue while 2 isolates produced the mixture of indigo blue and indirubin and only 8 isolates could reduced indigo blue to leucoindigo. There were 5 gram positive bacteria and 15 gram negative bacteria.

The process of indigo reduction was done by take out the dry leaves indigo sac, 2 g of lime, 1 g of glucose were added, then adjust pH to 10 with lime solution from dry leaves coconut ash accompany with aeration by small air pump for 3 minutes, incubation at 30 °C for 48 hour. The initial number of mesophilic aerobic indigo reducing bacteria, mesophilic anaerobic indigo reducing bacteria and alkaliphilic aerobic indigo reducing bacteria were 2.45×10^2 , 2.45×10^2 , 1.65×10^2 MPN /ml. The highest population of 3 groups bacteria were detected as 8.50×10^4 , 2.45×10^5 , 8.50×10^4 MPN /ml at 12 hour of fermenting period, respectively. The 20 pure culture of indigo reducing bacteria was collected. These isolates produced indigo blue in the range of 91.538 µg /ml to 529.487 µg/ml. The 17 isolates produced only indigo blue while 3 isolates produced the mixture of indigo blue and indirubin. All of isolates were gram positive bacteria.