

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้มีส่วนช่วยให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีทุกคน ทั้งด้าน
ข้อเสนอแนะทางวิชาการ แรงงาน หรืออำนวยความสะดวกในด้านเครื่องมือ สถานที่วิจัย
ขอขอบคุณนิสิตทั้งปริญญาตรี โท และ เอก ทุกคน ที่ช่วยทำงานวิจัยชิ้นนี้ให้ประสบผลสำเร็จ
คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณผู้ประกอบการกลุ่มทอผ้าแพรรหา อำเภอควนขนุน จังหวัดพัทลุง
สำหรับการให้ความอนุเคราะห์ข้อมูล กระบวนการทำสีย้อมคราม และตัวอย่างน้ำหมักหม้อคราม
ในการวิจัยครั้งนี้ สุดท้ายขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงสำหรับสำนักบริหารโครงการวิจัยใน
อุดมศึกษา และพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ที่ได้
สนับสนุนงบประมาณวิจัยทำให้โครงการวิจัยนี้สามารถดำเนินการแล้วเสร็จ

คณะผู้วิจัย

มีนาคม 2556

บทคัดย่อ

การย้อมสีครามของกลุ่มทอผ้าแพรวหา อำเภอกวนขนุน จังหวัด พัทลุง พบว่า กระบวนการย้อมสีครามประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนเตรียมเนื้อคราม ขั้นตอนการหมักคราม และขั้นตอนการย้อม น้ำหมักจากหม้อหมักเนื้อครามมีสภาพเป็นด่าง (pH=10.0) และมีปริมาณลิวโคอินดิโกสูง (320 มิลลิกรัมต่อลิตร) จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการรีดิวซ์อินดิโก (น้ำเงิน) ให้เป็นลิวโคอินดิโก (เหลือง) จากหม้อหมักครามมีทั้งแบคทีเรียและอาร์เคียที่พบเด่นด้วยแบคทีเรียในกลุ่ม *Atopostipes* sp. *Clostridium* sp. *Sporomusa acidovorans* *Amphibacillus* sp. *Alkalibacterium* sp. *Lactobacillus* sp. และ *Actinomycetales bacterium* ส่วนอาร์เคียเด่นด้วย *Haloterrigena* sp. และ Uncultured haloarchaeon clone แยกเชื้อจุลินทรีย์ที่เด่นในหม้อครามด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อได้จุลินทรีย์กลุ่มต้องการออกซิเจนจำนวน 59 สายพันธุ์ กลุ่มไร้ออกซิเจนจำนวน 37 สายพันธุ์ คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์อินดิโกบลูได้ 5 สายพันธุ์ คือ TSUI4 TSUI36 TSUI58 TSUII5 และ TSUII16 มีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์อินดิโกบลูไปเป็นลิวโคอินดิโกได้ร้อยละ 17 26.5 20.9 90.9 และ 41.8 ตามลำดับ เมื่อนำมาย้อมเส้นด้ายพบว่า สายพันธุ์ TSUII5 มีความสามารถในการย้อมติดสีมากที่สุดโดยจะให้เส้นด้ายเป็นสีน้ำเงินเข้ม ส่วนสายพันธุ์ TSUI4 TSUI36 TSUI58 และ TSUII16 จะย้อมไม่ค่อยติดสี ถ้าเชื้อผสมสายพันธุ์ TSUII5 ($OD_{485nm}=3.4$) แบบเดี่ยวเมื่อนำมาหมักคราม มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับแบบเชื้อผสมกับอีก 4 สายพันธุ์ ($OD_{485nm}=2.7-3.6$) สายพันธุ์ TSUII5 เหมาะที่จะนำมาเตรียมเป็นกล้าเชื้อสำหรับย้อมสีคราม TSUII5 จัดจำแนกด้วยยีน 16S rRNA มีความเหมือนกับสายพันธุ์ *Alkalibacterium* sp. ร้อยละ 98

คำสำคัญ: สีคราม การย้อมสีคราม จุลินทรีย์รีดิวซ์อินดิโกบลู การคัดแยกจุลินทรีย์ หม้อหมักคราม กระบวนการหมักสีคราม

Abstract

Indigo blue dyeing cloth process from Tambon Prekha group, Khunkhanun District, Phatthalung Province has three steps which the first one is contain of indigo blue preparation, second is indigo blue fermentation and last one is indigo blue dyeing. Indigo blue fermentation for dyeing process was containing of indigo dye, ash solution, tamarind solution and starch solution. Indigo blue fermentation broth was high alkalinity (pH=10.0) and high leuco indigo (320 mg/l). Microorganisms involve in conversion of indigo blue to leuco indigo were bacteria and archaea. Dominated bacteria was composed of *Atopostipes* sp., *Clostridium* sp., *Sporomusa acidovorans*, *Amphibacillus* sp., *Alkalibacterium* sp., *Lactobacillus* sp. and Actinomycetales bacterium. Dominated archaea was composed of *Haloterrigena* sp. and *Halobacterium* sp. 59 isolated of aerobic bacteria and 37 isolated of anaerobic bacteria were isolated from indigo fermentation dye vat. Isolated bacteria were screening for indigo blue reducing capability and found that 5 isolated (TSUI4, TSUI36, TSUI58, TSUII5 and TSUII16) shown high indigo blue reducing capability. Indigo blue reducing efficiency of TSUI4, TSUI36, TSUI58, TSUII5 and TSUII16 Isolated were 17%, 26.5%, 20.9%, 90.9% and 41.8%, respectively. Textile dyeing test found that isolated TSUII5 have the best dyeing property with strong blue color. Others isolated (TSUI4 TSUI36 TSUI58 and TSUII16) have week dying property with textile. TSUII5 isolated preservation in powder form still shown high indigo blue reducing activity ($OD_{485nm}=3.4$) same as fresh cultures ($OD_{485nm}=2.7-3.6$). TSUII5 isolated was suitable for indigo blue dyeing process. TSUII5 isolated has 16s rRNA gene 98% closely related to *Alkalibacterium* sp.

Keywords: Indigofera, indigo blue dying, indigo blue reducing bacteria, isolation, indigo blue fermentation

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	3
1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ต้นคราม	4
2.2 คุณสมบัติทางเคมีของสีครามธรรมชาติ	6
2.3 สภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการเตรียมน้ำย้อมคราม	8
2.4 ภูมิปัญญาท้องถิ่นในการเตรียมน้ำย้อมคราม	10
2.5 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการเตรียมน้ำย้อมครามเพื่อการย้อม	10
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	12
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	14
3.1 ศึกษากระบวนการทำสีครามของกลุ่มทอผ้าแพรวกา อำเภอดวน ขนุน จังหวัดพัทลุง	14
3.2 ศึกษาจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการกับการปลดปล่อยสี ครามจากใบครามและการรีดิวซ์สีอินดิโก (น้ำเงิน) ให้เป็น ลิโค อินดิโก (เหลือง) ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล	14
3.3 แยกเชื้อจุลินทรีย์ที่เด่นในหม้อคราม และ เกี่ยวข้องกับการเกิดสี คราม พัฒนาการเลี้ยงเชื้อ จนได้ต้นเชื้อ และสูตรต้นเชื้อในการ ผลิตสีคราม	15
3.4 สร้างบทเรียนวิทยาศาสตร์จากภูมิปัญญาการทำคราม	16
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปราย	18
4.1 กระบวนการทำสีครามของกลุ่มทอผ้าแพรวกา อำเภอดวนขนุน จังหวัดพัทลุง	18

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการปลดปล่อยสีครามจากใบครามและการรีดิวซ์สีอินดิโก (น้ำเงิน) ให้เป็น ลิวโคอินดิโก (เหลือง) ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล	21
4.3 แยกเชื้อจุลินทรีย์ที่เด่นในหม้อคราม และ เกี่ยวข้องกับการเกิดสีคราม	25
4.4 การผลิตกล้าเชื้อจุลินทรีย์และการผลิตกล้าเชื้อผงแห้ง	39
4.5 สร้างบทเรียนวิทยาศาสตร์จากภูมิปัญญาการย้อมสีคราม	39
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	42
บรรณานุกรม	44
ภาคผนวก	47

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1	การทดลองใช้จุลินทรีย์ผสมเป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นในการย้อมสีคราม
ตารางที่ 4.1	องค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างที่ได้จากส่วนผสมของการหมักครามเพื่อย้อมสี
ตารางที่ 4.2	ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่สอดคล้องกับแถบดีเอ็นเอที่ได้จากภาพที่ 4.4
ตารางที่ 4.3	ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์แอเคียร์ที่สอดคล้องกับแถบดีเอ็นเอที่ได้จากภาพที่ 4.5
ตารางที่ 4.4	การเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อ สีโคโลนี การติดสีแกรม รูปร่างของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มต้องการ ออกซิเจน ที่คัดแยกได้ TSUI1-TSUI59
ตารางที่ 4.5	การเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อ สีโคโลนี การติดสีแกรม รูปร่างของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มไม่ต้องการออกซิเจน ที่คัดแยกได้ TSUII1-TSUII23
ตารางที่ 4.6	เชื้อต้องการออกซิเจน เมื่อแบ่งตามสีโคโลนี การย้อมสีแกรม และรูปร่าง (ตัวเลขหนา = ไอโซเลตที่คัดเลือกที่จะนำไปทดสอบการรีดิวซ์อินดิโกเป็นลิวโคอินดิโก)
ตารางที่ 4.7	เชื้อที่คัดเลือกที่จะนำมาทดสอบปริมาณการรีดิวซ์ Indigo blue
ตารางที่ 4.8	ปริมาณของแข็งที่เหลือน้ำและประสิทธิภาพการรีดิวซ์ Indigo blue เป็น Leuco indigo
ตารางที่ 4.9	ปริมาณการรีดิวซ์ Indigo blue ของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแบบผสมและแบบเดี่ยว

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2.1	5
ภาพที่ 2.2	7
ภาพที่ 2.3	11
ภาพที่ 4.1	19
ภาพที่ 4.2	20
ภาพที่ 4.3	21
ภาพที่ 4.4	23
ภาพที่ 4.5	25
ภาพที่ 4.6	27
ภาพที่ 4.7	30
ภาพที่ 4.8	32
ภาพที่ 4.9	33
ภาพที่ 4.10	36
ภาพที่ 4.11	37

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 4.12 แสดงเชือกกลุ่มไม่ต้องการออกซิเจน เมื่อนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงมาตรฐานสีเหลือง ที่ 485 นาโนเมตร โดยดูความเข้มข้นของ Indigo blue ที่เปลี่ยนเป็น Leuco indigo	37
ภาพที่ 4.13 ตะกอนครามที่เหลือจากการรีดิวซ์ Indigo blue เป็น Leuco indigo ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส	39
ภาพที่ 4.14 การย้อมสีเส้นด้ายด้วยเชื้อที่คัดแยกได้ทั้ง 5 ไอโซเลต	40
ภาพที่ 4.15 แสดงแผ่นพับ ภูมิปัญญาการย้อมสีคราม วิธีการทำ และจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง	42