

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ภูมิปัญญาท้องถิ่นของไทย เป็นภูมิปัญญาชาวบ้าน เป็นองค์ความรู้ที่แสดงให้เห็นถึง ความมีศักยภาพของบุคคล ชุมชน ในการดำรงชีวิต ภูมิปัญญาเหล่านี้ ถือว่าเป็นประโยชน์ต่อ ชุมชนและครอบครัวอย่างมาก ทำให้ประเทศไทยสามารถดำรงอยู่ได้จนทุกวันนี้ ภูมิปัญญา ท้องถิ่นในหลายด้านที่สามารถพัฒนาจนนำไปสู่การสร้างมูลค่าทางเศรษฐกิจ หรือใช้ในการ ดำรงชีวิตได้ไม่แตกต่างจากวิชาการสมัยใหม่ ผ้าไทยรวมถึงวัฒนธรรมการแต่งกายประจำถิ่น แสดงให้เห็นถึงภูมิปัญญาท้องถิ่นเกี่ยวกับการเลือกวัตถุดิบ กระบวนการผลิตที่สร้างสรรค์ ก็ได้ เครื่องแต่งกายที่ประณีตและคุ้มค่าต่อการใช้งาน ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพื่อพัฒนาองค์ความรู้ จากภูมิปัญญาท้องถิ่นเพื่อให้เกิดการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน ประไพ ทองเชิญ (2552) ได้ ติดตามภูมิปัญญาการย้อมผ้าด้วยสีครามธรรมชาติในภาคใต้ซึ่งเริ่มศึกษาในปี พ.ศ. 2546 ไม่พบ หลักฐานผ้าย้อมครามและไม่พบผู้ที่เคยทำสีคราม แต่ได้พบว่าภาคใต้เป็นแหล่งพืชหลักที่ให้สี คราม 3 สายพันธุ์ คือ ย่านคราม (*Marsdenia tintoria*) ชอบอากาศชื้นเลื้อยพันไม้ยืนต้น ข้างเคียง พบในสวนสมรม ในป่าที่บ้านคีรีวง นครศรีธรรมราช ชาวบ้านเรียก ครามไหมง พัทลุง สุราษฎร์ธานี ชาวบ้านเรียกเถาคราม ฮ่อม (*Strobilanthes flaccidifolius*) ชอบอากาศเย็นอยู่ใต้ ต้นไม้ร่มรำไรตลอดปี พบในสวนป่าเชิงเขาหลวงชาว บ้านคีรีวงเรียก ครามเหล็กขูด และพบที่ ปัตตานีชาวบ้านเรียกครามเขียว และ คราม (*Indigofera tintoria*) ชอบอากาศร้อนแล้งขึ้นอยู่ ในที่ โลงแจ้ง หรือที่โคกไม่มีน้ำท่วม ช้าง พบทั่วไปที่อำเภอควนเนียง สทิงพระ จะนะ จังหวัดสงขลา และในเมืองปัตตานี ชาวบ้าน เรียกครามถั่ว นักวิจัยชาวบ้านกลุ่มนี้จึงได้ฟื้นฟูกระบวนการย้อม ครามในวิถีผ้าพื้นบ้านภาคใต้ และได้เลือก คราม (*Indigofera tintoria*) ขึ้นที่กลุ่มทอผ้าบ้าน แพรกหา อ.ควนขนุน จ.พัทลุง

ภูมิปัญญาการย้อมผ้าด้วยสีครามธรรมชาติมี 3 ขั้นตอน ได้แก่ การสกัดสีครามจากต้น คราม การเตรียมสีครามด้วยกระบวนการหมัก และการย้อมผ้าด้วยสีคราม ซึ่งมีปัญหายากในการ ย้อมผ้าด้วยสีครามธรรมชาติคือ การเตรียมสีคราม ด้วย กระบวนการหมัก เพื่อย้อม เนื่องจากต้องใช้เวลานานและไม่สามารถควบคุมการเกิดสีได้ตามต้องการ พบว่าต้องใช้เวลา 15-20 วันจึงจะเกิดสีครามหรือบางครั้งไม่เกิดเลย การดูแลรักษาหม้อ หมักครามให้คงสภาพเดิม นั้น ทำได้ยาก (อนรรตน์ สายทอง, 2544 และ งามนิจ นนทโส, 2551) บุคคลที่มีประสบการณ์เท่านั้น จึงจะหมักครามให้เป็นสีเหลืองเข้ม และทำให้ผ้าที่ถูกย้อมเป็นสีเหลืองอ่อน พอสัมผัสกับอากาศ จะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีคราม การย้อมสีครามนั้นทำได้ยากเป็นกระบวนการที่ต้องใช้เวลาและการ เอาใจใส่ การเตรียมสีคราม ด้วยกระบวนการหมักเพื่อย้อม อาศัยกลุ่มจุลินทรีย์จากดิน และ

ตะกอนดินใต้แม่น้ำที่เลี้ยงต่อกันมาเพื่อเปลี่ยนสารสกัดจากต้นคราม (Indigo blue) ไปเป็นสารสีเหลือง (indigo white) ขั้นตอนนี้ใช้เวลาค่อนข้างนานในการเลี้ยง คุณภาพของสีไม่สม่ำเสมอ และมีความเสี่ยงจากการตายของจุลินทรีย์สูง เพื่อเพิ่มขีดความสามารถในการผลิต และความสะดวกในการเตรียมหม้อมีสีครามให้กับผู้ประกอบการสามารถเตรียมผลิตภัณฑ์สีครามได้อย่างสม่ำเสมอและมีคุณภาพสูง และใช้เวลาผลิตสั้นนั้น การเข้าใจการทำงานของจุลินทรีย์ในหม้อมักครามจึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการพัฒนา การเตรียมสีคราม ด้วยกระบวนการหมักเพื่อการย้อม

Park et al. (2012) ได้แยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถรีดิวซ์สีครามจากหม้อมักคราม ในประเทศเกาหลี หมักสารสีครามจากพืชตระกูล *Polygonum tinctorium* ได้จุลินทรีย์ 2 สายพันธุ์ คือ *Alkalibacterium* sp. A1 และ *Pseudomonas* sp. G5 ซึ่งมีความสามารถรีดิวซ์สีคราม และมีความเหมาะสมเป็นจุลินทรีย์ชอบด่างทำงานได้ดีที่ pH เท่ากับ 10 งามนิจ นนทโส (2551) ได้ศึกษาจุลินทรีย์จากหม้อมักครามในประเทศไทย หมักสารสีครามจากพืชตระกูล *Indigofera tinctoria* โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อในกลุ่ม mesophilic aerobic bacteria, mesophilic anaerobic bacteria, Alkaliphilic aerobic bacteria, Alkaliphilic anaerobic bacteria และ beta-glucosidase producing bacteria พบจำนวนประชากรเท่ากับ 1.2×10^5 , 8.5×10^4 , 0.8×10^4 , 5.5×10^4 และ 1.65×10^4 MPN/mL ตามลำดับ และได้แยกเชื้อที่มีความสามารถในการรีดิวซ์ อินดิโก ได้จำนวน 15 สายพันธุ์ แต่ไม่ประสบความสำเร็จในการพัฒนาเป็นกล้าเชื้อ เนื่องจาก จุลินทรีย์ที่แยกได้เป็นจุลินทรีย์ที่ปรับตัวให้เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีแต่ไม่ใช่จุลินทรีย์ที่ทำงานในหม้อมักคราม ดังนั้นเทคนิคที่ไม่พึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อจึงได้ถูกนำมาศึกษาองค์ประกอบของจุลินทรีย์ในหม้อมครามและใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการแยกเชื้อที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดสีคราม Zengler et al. (2002) ได้นำเทคนิคทางชีวโมเลกุล Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) มาศึกษาองค์ประกอบจุลินทรีย์ในตัวอย่างจากธรรมชาติและใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการแยกเชื้อจุลินทรีย์ โดยใช้ออกแบบสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ สภาวะที่เหมาะสมในการแยกเชื้อจุลินทรีย์ และสามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ได้ 82% จากตัวอย่างที่มีอยู่ในธรรมชาติ

งานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายที่จะพัฒนาผลิตภัณฑ์ กล้าเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในกระบวนการหมักครามให้มีคุณภาพของสีสม่ำเสมอ และมีความสะดวกในการเตรียมหม้อมีสีคราม โดยศึกษาองค์ประกอบของจุลินทรีย์ ในหม้อมคราม และจุลินทรีย์ที่เด่น ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) คัดแยกจุลินทรีย์ที่เด่นในหม้อมคราม และจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการรีดิวซ์อินดิโก (น้ำเงิน) ให้เป็นลิวโคอินดิโก (เหลือง) นำไปพัฒนาต้นกล้าเชื้อในการเตรียมสีครามเพื่อการย้อมผ้า ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นกระบวนการย้อมสีผ้าทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพและมีความเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

1.2 วัตถุประสงค์

- 1.2.1 เพื่อศึกษาบริบท แนวคิด หลักการ หลักฐานทางภูมิปัญญาตลอดจนการจัดการความรู้เกี่ยวกับกระบวนการทำสีครามและการย้อมสีครามของกลุ่มทอผ้าแพรกหาอำเภอกวนขนุน จังหวัดพัทลุง
- 1.2.2 เพื่อศึกษาจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการรีดิวซ์อินดิโก (น้ำเงิน) ให้เป็นลิวโคอินดิโก (เหลือง) ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล
- 1.2.3 เพื่อแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่เด่นในหม้อมักคราม และเกี่ยวข้องกับการรีดิวซ์อินดิโก (น้ำเงิน) ให้เป็นลิวโคอินดิโก (เหลือง) พัฒนาการเลี้ยงเชื้อ จนได้ต้นเชื้อ และสูตรต้นเชื้อในการย้อมสีคราม
- 1.2.4 เพื่อศึกษาวิธีการผลิตจุลินทรีย์ปริมาณมากโดยใช้อาหารราคาถูก และการผลิตต้นเชื้อผงแห้งเพื่อสะดวกต่อการใช้งาน และเก็บไว้ได้นาน
- 1.2.5 เพื่อสร้างบทเรียนวิทยาศาสตร์จากภูมิปัญญาท้องถิ่นโดยใช้เทคนิคการวิจัยแบบมีส่วนร่วมที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทำสีครามและจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง

1.3 ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายที่จะพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้นกล้าเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในกระบวนการหมักครามให้มีคุณภาพของสีสม่ำเสมอ และมีความสะดวกในการเตรียมหม้อเลี้ยงคราม โดยศึกษาองค์ประกอบของจุลินทรีย์ในหม้อคราม ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) และแยกจุลินทรีย์ที่เด่นและเกี่ยวข้องกับการรีดิวซ์อินดิโก (น้ำเงิน) ให้เป็นลิวโคอินดิโก (เหลือง) ที่ใช้กับผ้าย้อมคราม และ ศึกษาวิธีการผลิตจุลินทรีย์ปริมาณมากโดยใช้อาหารราคาถูก และการผลิตต้นเชื้อผงแห้งเพื่อสะดวกต่อการใช้งาน ส ำหรับบทเรียนวิทยาศาสตร์จากภูมิปัญญาท้องถิ่นโดยใช้เทคนิคการวิจัยแบบมีส่วนร่วมที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทำสีครามและจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของการวิจัย

สีครามเป็นผลิตภัณฑ์สีจากการสกัดสาร สีจากต้นคราม (*Indigofera tinctoria*) การย้อมสีครามโดยทั่วไปอาศัยจุลินทรีย์เพื่อเปลี่ยนสารสกัดจากต้นคราม (Indigo blue) ไปเป็นสารสีเหลือง (indigo white) จึงใช้เวลาในการหมักนาน คุณภาพของสีไม่สม่ำเสมอ และมีความเสี่ยงจากการตายของจุลินทรีย์ การทราบชนิดของจุลินทรีย์และเข้าใจการทำงานของจุลินทรีย์ในหม้อหมักคราม จะทำให้รู้วิธีการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในหม้อหมักครามให้ทำงานงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ตันคราม

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของตันคราม

สีครามหรืออินดิโกเป็นสีย้อมผ้าที่เก่าแก่ที่สุด คาดว่ามนุษย์รู้จักใช้มานานกว่า 2,500 ปีก่อนคริสตศักราช หรือประมาณตั้งแต่ยุคอียิปต์โบราณ การย้อมสีครามนี้ต้องอาศัยทั้งความเชี่ยวชาญ และความอดทนสูงมาก เพราะคุณสมบัติในการย้อมติดที่รวดเร็ว และติดทนนาน ผ้าย้อมครามมีคุณค่าและเป็นที่ต้องการ การย้อมสีครามมีอยู่กว้างขวางทั่วโลก พืชพรรณหลายชนิดที่สามารถนำมาย้อมสีครามได้ เช่น พืชตระกูล *Indigofera tinctoria* ใช้กันในประเทศอินเดีย และ จีน พืชตระกูล *Baptisia tinctoria* ใช้กันในอเมริกา พืชตระกูล *Lonchocarpus cyanescens* ใช้ในแอฟริกาตะวันตก พืชตระกูล *Polygonum tinctoria* ใช้ในญี่ปุ่นและเกาหลี พืชตระกูล *Isatis tinctoria* ใช้ในยุโรป ส่วนตันครามที่ใช้ในประเทศไทยคือ พืชตระกูล *Indigofera tinctoria* อยู่ในวงศ์ *Leguminosae* เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก สูง 1 เมตร กิ่งอ่อนมีขน มีขนยาวเท่ากัน ใบ เป็นใบประกอบ เรียงแบบเวียน หูใบรูปหอกยาว 1-1.5 มิลลิเมตร ผิวด้านนอกมีขนหนาแน่น ผิวด้านในเกลี้ยง ก้านใบยาว 2-3 เซนติเมตร มีขน แกนกลางด้านบนยาว (1.5) 4-7 เซนติเมตร ใบย่อยมี 7-11 ใบ เรียงตรงข้าม หูใบย่อยยาว 0.5 มิลลิเมตร รูปแถบ ก้านใบใบย่อยยาว 1.5-2 มิลลิเมตร มีขนหนาแน่น แผ่นใบรูปรีแกมไข่กลับแคบ ยาว 2.5-3 เซนติเมตร กว้าง 1.4-1.8 เซนติเมตร ปลายมนมีติ่งแหลม ยาว 0.5 มิลลิเมตร ฐานรูปลิ้น ขอบเรียบ หลังใบเกลี้ยง ท้องใบมีขน ขนยาวเท่ากัน เส้นแขนงใบมี 6-8 คู่โค้งจรดกัน เส้นกลางใบเว้าด้านบน หนูนด้านล่าง

ช่อดอก ยาว 1.5-8 มิลลิเมตร ออกที่ซอกใบ มีขน ใบประดับรูปสามเหลี่ยมยาว 1 มิลลิเมตร ปลายแหลม ขอบเป็นขนครุย ผิวด้านนอกมีขนหนาแน่น ผิวด้านในเกลี้ยง ก้านดอกย่อยยาว 1.5-2 มิลลิเมตร มีขนหนาแน่น กลีบเลี้ยง มีหลอดกลีบยาว 1 มิลลิเมตร กว้าง 0.5 มิลลิเมตร ปลายแหลม ขอบเป็นขนครุย ผิวด้านนอกมีขนหนาแน่น กลีบดอก สีชมพู กลีบกลางรูปรีแกมไข่กลับแคบ ยาว 5-6 มิลลิเมตร กว้าง 4 มิลลิเมตร ปลายแหลม ฐานรูปลิ้น ขอบเป็นขนครุย ผิวด้านนอกมีขนหนาแน่น ผิวด้านในเกลี้ยง กลีบคู่ข้างรูปไข่กลับแคบ ยาว 5-6 มิลลิเมตร กว้าง 4 มิลลิเมตร ปลายแหลม ฐานรูปลิ้น ขอบเป็นขนครุย ผิวด้านนอกมีขนหนาแน่น ผิวด้านในเกลี้ยง กลีบคู่ข้างรูปไข่กลับไม่สมมาตร ยาว 4.5-5 มิลลิเมตร กว้าง 2 มิลลิเมตร ก้านกลีบยาว 0.5 มิลลิเมตร ปลายมน ขอบเรียบ หรือเป็นขนครุยเล็กน้อย ฐานเบี้ยว ผิวด้านนอกมีขนที่ฐานเล็กน้อย ผิวด้านในเกลี้ยงกลีบคู่ล่าง ยาว 5-5.5 มิลลิเมตร กว้าง 2 มิลลิเมตร ปลายมน ฐานสอบเรียว ขอบเป็นขนครุย ผิวด้านนอกมีขนหนาแน่น ผิวด้านในเกลี้ยง เกสรเพศผู้มีหลอดเกสร

ยาว 4-4.5 มิลลิเมตร ก้านเกสรยาว 0.5-1 มิลลิเมตร อับเรณูยาว 0.5 มิลลิเมตร กว้าง 2 มิลลิเมตร เกสรเพศเมียมีรังไข่ขนาดหนึ่งมี 9-10 ออวูล ก้านเกสรเกสรฝักรูปทาง กระบอก เหยียดตรงยาว 20-28 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 3-5 มิลลิเมตร มีขนกระจายทั่วไป ฝักแห้งไม่แตก เมล็ดรูปทรงกระบอกยาว 0.5 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร เกสรมีนวลเป็นไม้ปลูกที่ระดับความสูง 5-1200 เมตร ช่วงการมีดอกตลอดปี (สว มัธยา , 2550)



คราม: *Indigofera tinctoria*



ครามเถา: *Marsdenia tinctoria* R



อ้อม: *Strobilanthes flaccidifolius*



ครามญี่ปุ่น: *Polygonum tinctorium*



ไวต์: *Isatis tinctoria*

ภาพที่ 2.1 พืชที่เป็นแหล่งสีครามธรรมชาติ

ที่มา: อนุรัตน์ สายทอง (2555)

ต้นครามมีอายุประมาณ 2-3 ปี เจริญได้ดีในดินร่วนปนทรายที่ระบายน้ำได้ดี ชอบแดดจัดไม่ชอบร่มเงา ชอบน้ำปานกลาง ระบบรากเป็นระบบรากแก้ว ลำต้นประกอบด้วยข้อและปล้องมีตาและตาออกเกิดขึ้นบริเวณข้อ แล้วเกิดเป็นข้อดอกในภายหลัง มีผลเป็นฝักมี ทั้งฝักตรงและฝักโค้ง (คล้ายฝักถั่วเขียวแต่เล็กกว่า) ฝักแห้งสีน้ำตาลอ่อน ฝักจะแตกง่าย ภายในฝักมีเมล็ดเรียงเป็นแถวฝักยาวประมาณ 3.5-8 เซนติเมตร ออกฝักเป็นกระจุก ภายในฝักมี 7-12 เมล็ด เมล็ดมีขนาดเล็กสีครีมอมเหลืองและสีน้ำตาลมีน้ำหนักเฉลี่ย 3.35-16.14 กรัมต่อ 1000 เมล็ด ขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด (อนุรัตน์ สายทอง, 2544)

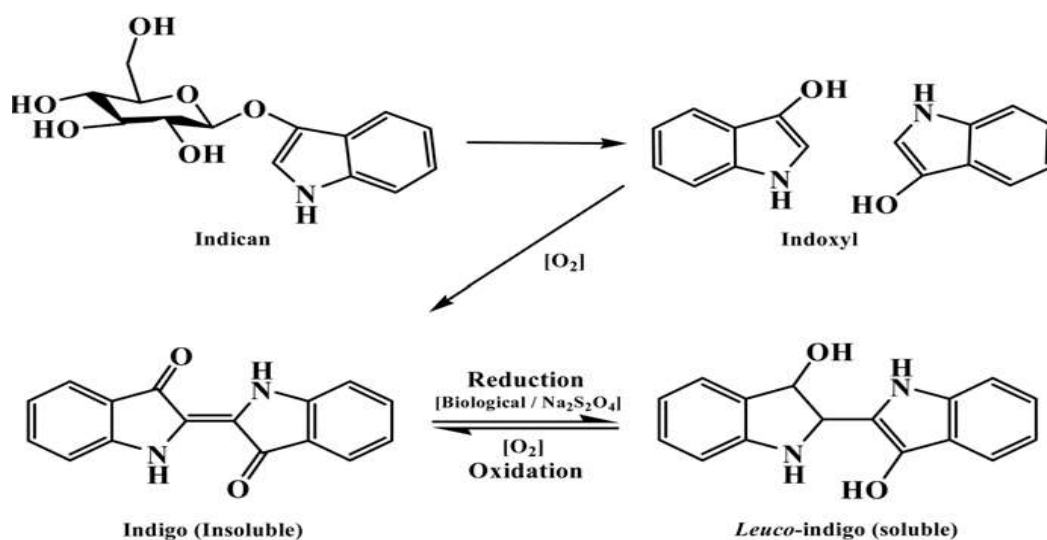
2.2 คุณสมบัติทางเคมีของสีครามธรรมชาติ

สีคราม (Indigo) ไม่ได้พบในใบครามแต่ได้มาจากสารตั้งต้น คือ อินดอกซิล (Indoxyl) ซึ่งพบในใบครามในรูปของอินดอกซิลเบต้ากลูโคไซด์ (Indoxy- β D-glucoside) หรือเรียกว่าอินดิแคน (Indican) ซึ่งจะถูกไฮโดรไลต์ด้วยเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส (β -glucosidase) ที่พบในใบครามเช่นกัน เมื่อใบครามถูกฉีกขาดหรือถูกเด็ดจากกิ่งหรือเมื่อใบแก่เต็มที่ จะปลดปล่อย Indoxyl และ 2 โมเลกุลของ Indoxyl จะถูกออกซิไดซ์ในสภาพที่มีออกซิเจนไปเป็นสีครามหรือ สีอินดิโก ซึ่งมีชื่ออื่น คือ อินดิโกทิน (Indigotin) หรือหากมีปริมาณออกซิเจนมากเกินไปจะทำให้ Indoxyl บางโมเลกุลเปลี่ยนเป็นไอซาติน (Isatin) จะรวมตัวกับ Indoxyl เป็นสารอินดิรูบิน (Indirubin) ซึ่งมีสีแดง (Maugard et al., 2002) ส่วนเอนไซม์ β -glucosidase ของใบคราม พบใน Stroma ของ chloroplast (Minami et al., 1997)

สีครามมีชื่อเคมี 2-(1,3-Dihydro-3-oxo-2H-indol-2-ylid-ene)-1,2-dihydro-3H-indol-3-one ชื่อทั่วไป Indigo dye หรือ Indigotin เป็นผลึกรูปเข็มสีม่วงหรือสีน้ำเงินระเหิดที่ 107 องศาเซลเซียส มีสมบัติไม่ละลายในน้ำ แอลกอฮอล์ อีเทอร์ และกรดเจือจางแต่ละลายได้ดีมากในสารละลายอะมีนและฟิรีนขณะเดือด ละลายได้ดีพอควรในกัวแอซิดิกแกลเซียลต้มเดือด ถ้าละลายในตัวทำละลายไม่มีขั้วจะปรากฏสีม่วงแดง แต่ถ้าละลายในตัวทำละลายมีขั้วจะปรากฏสีน้ำเงิน ถ้าให้ทำปฏิกิริยากับกัวซัลฟิวริกเย็น จะเกิดกรด disulphoinc ซึ่งทำให้อยู่ในรูปของเกลือโซเดียมได้ง่าย เรียกว่า Indigo carmine มีสีน้ำเงินเข้มใช้ย้อมติดสีดี จัดเป็นสีแอซิด (acid dye) มีกระบวนการย้อมต่างจากการย้อมครามซึ่งเป็นสีแวต (อัจฉราพร ไตรละสุต, 2527) Indigo blue ถูกรีดิวส์ในสารละลายต่างกลาย เป็นสารไม่มีสีเรียกว่า Indigo white ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร (ไพศาล และคณะ, 2543) ตัวรีดิวส์และต่างมีหลายคู่ ได้แก่ ไฮโดรซัลไฟต์โซเดียมไฮดรอกไซด์ ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4/\text{NaOH}$) ผุ่นผงสังกะสีในน้ำปูนใสอุ่นไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส ($\text{Zn}/\text{Ca}(\text{OH})_2$) หรือน้ำขี้เถ้าในน้ำปูนใส (ภูมิปัญญาท้องถิ่น) ส่วน Indigo white ถูกออกซิไดซ์ได้ง่ายมากด้วยออกซิเจนในอากาศกลับไปเป็น Indigo blue

สีครามหรือสีอินดิโก ไม่ละลายน้ำหรือในแอลกอฮอล์ หรือในกรดเจือจาง แต่ละลายในโครโรฟอร์มเอทิลอะซีเตท และเมื่อละลายในกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ซึ่ง จะเปลี่ยนเป็นสารอินดิโกคามีน (Indigo carmine) หากต้องการนำไปย้อมผ้าจะต้องทำการรีดิวส์อินดิโกไปเป็น indigo white หรือ leuco indigo ซึ่งไม่มีสีละลายได้น้ำ เมื่อนำไปย้อมผ้าขาวจะทำให้ผ้ามีสีเหลืองแกมเขียว แต่เมื่อผึ่งผ้าให้แห้งในอากาศสีผ้าจะเปลี่ยนเป็นสีคราม ของสีอินดิโก ในอุตสาหกรรมการย้อมผ้าสีครามจะใช้สารเคมีเป็น reducing agent ในสภาพต่างที่มี pH สูงมีค่าประมาณ 10.11 เช่น sodium dithionite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) ละลายใน sodium hydroxide (NaOH) เป็นต้น สีครามธรรมชาติถูกสกัดจากใบครามสดในรูปของสารต้นตอ (precursor) หลังจากนั้น เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีอีกหลายครั้ง จึงเกิดเป็นสีครามเกาะจับเสื้อผ้า สารต้นตอในใบครามคือสารอินดิแคน (indican หรือ indoxyl- β -D-glucoside) เป็นสารไม่มีสีและไม่ละลายน้ำ แต่เมื่อถูกแช่

ในน้ำ เอนไซม์ชนิดหนึ่งในใบคราม คือ บีตา-กลูโคซิเดส (β -glucosidase) จะช่วยให้อินดิแคนแตกออกเป็น 2 ส่วน คือ อินดอกซิล (Indoxyl) และกลูโคส สาร 2 ชนิดนี้เป็นสารไม่มีสี ละลายน้ำได้ ทั้งคู่จึงละลายในน้ำครามซึ่งมีพีเอชเท่ากับกับน้ำที่ใช้แช่ใบคราม ปฏิกริยาการเปลี่ยนอินดิแคนในใบครามไปเป็นอินดอกซิลและกลูโคสในน้ำคราม เป็นปฏิกริยาแบบ ดูดความร้อน ที่อุณหภูมิของการแช่ 30 , 40 และ 50 องศาเซลเซียส จะใช้เวลาในการแช่เพื่อให้ได้ปริมาณสีครามสูงสุดเป็น 18 , 15 และ 9.30 ชั่วโมงตามลำดับ (ไพศาล และคณะ, 2543) อินดอกซิลเป็นสารที่ถูกออกซิไดส์ได้ง่ายด้วยออกซิเจนในอากาศ ยิ่งทำให้สารละลายเป็นต่าง อินดอก ซิลยิ่งถูกออกซิไดส์ได้ง่ายกลายเป็นสาร Indigo blue ไม่ละลายน้ำ เมื่อเติมปูนขาวในน้ำครามและกวนแรงๆ ให้เกิดฟองมากๆ จึงเกิดเนื้อครามซึ่งก็คือ Indigo blue ที่เกาะจับอยู่กับอนุภาคของปูนขาว ตกตะกอนจมอยู่ก้นภาชนะ การเตรียมสีครามเป็นการทำให้ Indigo blue เปลี่ยนเป็น Indigo white ซึ่งละลายได้ในด่าง การเปลี่ยนแปลงนี้เป็นปฏิกริยารีดักชัน ซึ่งใช้ตัวรีดิวซ์ได้หลายชนิดดังกล่าวแล้ว อีกวิธีหนึ่งอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์ร่วมด้วย โดยแบคทีเรียชนิดบาซิลลัส เช่น *Bacillus alkaliphylus* ร่วมในกระบวนการหมัก ปฏิกริยารีดักชันของ Indigo blue เกิดขึ้นที่พีเอช 10.5-11 เมื่อเกิดสีครามในน้ำย้อม โดยสังเกตสีของน้ำย้อมเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเขียวปนเหลือง จึงทำการย้อมผ้าที่ชุบน้ำแล้วบิดจนหมาด indigo white ที่ละลายในน้ำย้อมจะแทรกซึมเข้าเนื้อผ้าจับเซลล์ลูโลสของใยผ้าด้วยพันธะไฮโดรเจน เมื่อยกผ้า ผ้าขึ้นจากน้ำย้อมสัมผัสกับอากาศ indigo white จะถูกออกซิไดส์โดยออกซิเจนในอากาศ กลับเป็น Indigo blue ถูกขังอยู่ภายในโครงสร้างของใยผ้าดั้งเดิม ใยไหมและขนสัตว์มีโครงสร้างทางเคมีเป็นพอลิเพปไทด์ จึงทำให้ย้อมด้วยสีครามได้ไม่ดีเท่าผ้าซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีเป็นเซลล์ลูโลส



ภาพที่ 2.2 การเปลี่ยนรูปโดยกระบวนการออกซิเดชันและรีดักชันของสีคราม

ที่มา: Park et al. (2012)

อย่างไรก็ตามการย้อมเส้นไหมที่อุณหภูมิต่ำ จะดูดซับสีดีกว่าการย้อมที่อุณหภูมิสูง แสดงว่าการย้อมสีครามเป็นกระบวนการคายความร้อน เมื่อย้อมที่อุณหภูมิสูงขึ้น การติดสีจะลดลง (ไพศาล และคณะ, 2543) การทำสีครามธรรมชาติเป็นปฏิกิริยาเคมีทุกขั้นตอน โดยใช้สารต้นต่อที่มีในใบคราม เอนไซม์ในใบคราม ออกซิเจนในอากาศ แบคทีเรียบาซิลลัสในธรรมชาติ ขี้เถ้า และปูนขาว ก็ได้จากธรรมชาติ ปฏิบัติอย่างต่อเนื่องในกระบวนการทำสีครามและการย้อมคราม

2.3 สภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการเตรียมน้ำย้อมคราม

กระบวนการทำสีครามและย้อมครามเป็นปฏิกิริยาเคมี มีการทำงานของจุลินทรีย์ในธรรมชาติเกี่ยวข้องด้วย กระบวนการผลิตสีครามแบบดั้งเดิมอาศัยกระบวนการหมักโดยอัลคาไลแบคทีเรีย (alkaliphilic bacteria) (Nakajima et al., 2005) ดังนั้นแต่ละขั้นตอนจึงเกิดขึ้นได้ในภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ สัดส่วนของวัตถุดิบ ชนิดของตัวทำละลาย ความเป็นกรด-ด่าง ของน้ำย้อม อุณหภูมิและระยะเวลา ซึ่งสภาวะเหล่านี้เป็นข้อจำกัดให้การทำสีคราม ทำยาก คนทำสีครามชั้นครูจึงมีบุคลิกพิเศษต่างจากคนทั่วไป ซึ่งเป็น เหตุผลหนึ่งที่ทำให้คนทำสีครามในปัจจุบันมีจำนวนน้อย คนโบราณมีความเชื่อว่า การทำสีครามและคนทำสีครามเป็นสิ่งลึกลับ เชื่อว่าหากใครเป็นเจ้าของหม้อครามมากกว่า 3 หม้อ จะทำให้เป็นผีปอบและเชื่อว่าคนทำสีครามเก่งหม้อครามไม่เหินเพราะเรียนคาถา ห้ามคนที่กำลังตั้งครภัก หรือคนที่กำลังมีประจำเดือนเข้าใกล้หรือแตะต้องหม้อคราม เพราะจะทำให้หม้อครามเหิน (ไม่เกิดสีในน้ำย้อม) ภาวะที่เหมาะสมต่างๆ ได้แก่ใบครามสดเท่านั้นที่แช่แล้วให้สีคราม และใบครามสดให้สีครามเพียง 0.4 % คนทำสีครามจึงต้องตื่นแต่เช้ามีดก่อนน้ำค้างเหือดหาย เพื่อไปเก็บใบครามจำนวนมาก เมื่อเก็บมาแล้วก็ต้องมัดเป็นพ่อนและแช่น้ำทันทีให้ท่วมใบครามพอดี หากเติมน้ำมากเกินไปจะทำให้เปลืองปูนขาวในขั้นตอนการตกตะกอน ภูมิปัญญาท้องถิ่นใช้มือกดใบครามในภาชนะเดิมให้น้ำท่วมหลังมือ ถือว่าพอดี ถ้าชั่ง ตวง วัด ด้วยเครื่องมือพบว่าใบครามพร้อมทั้ง 6.5 กิโลกรัม ใช้น้ำ 21 กิโลกรัม ภูมิปัญญาท้องถิ่นแช่ใบครามไว้ 12 ชั่วโมง แล้วกลับใบครามและแช่อีก 12 ชั่วโมง จึงแยกกากใบครามออกทิ้ง แต่บางคนแช่ 2-3 วัน กากใบครามที่ทับถมกันไว้ทำให้เกิดเห็ดมีลักษณะและรสชาติคล้ายเห็ดฟาง จากการศึกษาเอกสารและทดลองใน ห้องปฏิบัติการพบว่า การแช่ใบครามสดในน้ำเป็นปฏิกิริยา ไฮโดรไลซิสของ Indican กับ β -glucosidase (Minami et al., 1997) ซึ่งมีในใบครามสดปฏิกิริยาเป็นแบบดูดความร้อนนั่นคือน้ำที่อุณหภูมิ 50 40 และ 30 องศาเซลเซียส แช่ให้ได้สีคราม (Inoxyl) มากที่สุดใช้เวลา 18 15 และ 9.30 ชั่วโมง (ไพศาล และคณะ, 2543) แต่ถ้าต้มใบครามในน้ำเดือด 5 นาทีแล้วนำมาแช่จะไม่ได้สีครามเช่นเดียวกันกับการแช่ใบครามแห้ง ถ้าแช่ใบครามในน้ำอุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส นาน 12 18 และ 24 ชั่วโมงพบว่า เวลา 18 ชั่วโมงให้สีครามมากที่สุด ถ้าปั่นใบครามให้ละเอียดก่อนแช่พบว่า 12 ชั่วโมง ให้สีครามมากที่สุดและมากกว่าใบครามที่ไม่ปั่นที่แช่นาน 18 ชั่วโมง (อนุรัตน์ และคณะ, 2544) โดยปกติภูมิ

ปัญหาท้องถิ่นจะแช่ใบครามช่วงเดือนกรกฎาคม- สิงหาคม ที่ต้นครามมีอายุ 3-4 เดือน ซึ่งเป็นช่วงอายุที่ให้ปริมาณสีมากที่สุด การแช่ใบคราม 24 ชั่วโมงของภูมิปัญญาท้องถิ่น จึงเป็นเวลาที่ทำให้ได้สะดวกได้สีครามมาก หากแช่นานกว่านั้นนอกจากปริมาณสีครามจะลดลงแล้วจุลินทรีย์ซึ่งชอบน้ำตาลและสารอาหารอื่นในน้ำครามจะเจริญเติบโตอย่างดีทำให้น้ำครามเน่าและเหม็น รบกวนเพื่อนบ้าน หลังจากแช่ใบครามในเวลาพอเหมาะและแยกกากใบครามแล้ว

Park et al. (2012) ทำการคัดแยกและศึกษาลักษณะสมบัติของ Alkaliphilic และ Thermotolerant แบคทีเรีย ที่สามารถรีดิวซ์ Indigo (ไม่ละลายน้ำ) ให้เป็น Leucoindigo (ละลายน้ำ) จากสีย้อมอินโด (Indigo Dye Vat) และทำการคัดแยกเชื้อจากการหมัก *Polygonum tinctorium* เป็นพืชที่ให้สีคราม อายุ 6 ปี ได้นำมาแยกเชื้อเพื่อที่จะคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถลดสีครามที่ไม่ละลายน้ำ พบว่า 2 ไอโซเลต คือ A1 (*Alkalibacterium* sp.) และ G5 (*Pseudomonas* sp.) มีความสามารถในการรีดิวซ์คราม เชื้อที่คัดแยกได้ *Alkalibacterium* sp. A1 และ *Pseudomonas* sp. G5 มีคุณสมบัติเป็น alkaliphilic และทนร้อน ทำงานได้ดีที่ pH 10 และที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ได้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการลดสีที่ไม่ละลายน้ำจากการหมัก ทำให้เป็นเครื่องมือทางชีวภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย้อมโดยมีความเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

Yumoto et al. (2004) ได้เตรียมสีย้อมผ้าครามโดยนำใบครามญี่ปุ่น (*Polygonum tinctorum* Lour.) มาผึ่งให้แห้งในที่ร่ม แล้วจึงพรมน้ำให้เปียกเพื่อให้เหมาะกับการออกซิเดชันของแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (aerobic microbial oxidation) เพื่อช่วยในการผลิตสีอินดิโก จากนั้นจึงหมักต่อไปในสภาวะที่เป็นด่างสูงมาก pH สูงกว่า 10 ในสภาวะเช่นนี้ สีอินดิโกจะถูกเปลี่ยนเป็น Leucoindigo ซึ่งใช้ย้อมผ้าได้ พบแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ที่มีชื่อ *Alkalibacterium psychrotolerans* sp. Nov. มีคุณสมบัติเป็นแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง อยู่ได้ทั้งที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน เจริญได้ใน NaCl 0-17 pH 9-12 ไม่เจริญที่ pH 7-8 สามารถรีดิวซ์สีอินดิโกให้เป็นลิโคอินดิโก

2.4 ภูมิปัญญาท้องถิ่นในการเตรียมสีย้อมคราม

การย้อมสีครามเป็นภูมิปัญญาท้องถิ่นของชาวตะวันตกเฉียงเหนือที่ได้สืบทอดกันมาเป็นระยะเวลานาน โดยมีวิธีการเตรียมสีคราม (สีอินดิโก) จากต้นคราม (*Indigofera tinctoria* Linn) โดยการตัดต้นครามอายุระหว่าง 3-4 เดือน ซึ่งภูมิปัญญาที่ได้สั่งสมมาให้ตัดต้นครามในเวลาตอนเช้าจะให้สีครามที่ดี โดยยังคงให้ใบติดอยู่บนก้านและไม่ทำให้ใบครามฉีกขาด แล้วนำมาผึ่งในแสงในภาชนะบรรจุน้ำสะอาด ใช้วัตถุหนักๆ กดให้ต้นครามแช่ในน้ำเป็นเวลา 1 วัน จากนั้นจึงกลับให้ต้นครามที่อยู่ด้านบนลงไปอยู่ด้านล่าง แล้วหมักต่ออีก 1 วัน จากนั้นนำต้นครามออกจากภาชนะโดยใช้มือบีบใบครามให้สะเด็ดน้ำ แล้วเติมปูนขาวประมาณ 10-20 กรัม ต่อน้ำแช่ใบคราม 1 ลิตร จากนั้นคนให้ปูนขาวกระจายในน้ำแช่ใบคราม หากยังไม่มีฟองสีน้ำเงิน

เกิดขึ้น ก็ให้ทยอยเติมปูนขาวลงไปเรื่อยๆ พร้อมทั้งมีการกวนแรงๆ จนมีฟองสีน้ำเงินเกิดขึ้น เมื่อฟองอากาศยุบตัวลง ให้ทิ้งไว้ 1 คืน เพื่อให้ส่วนที่เป็นสีครามหรืออินดิโกตกตะกอนคราม ออกมา ผสมกับน้ำค้างที่ได้จากการ เฝ่าเหง้ากล้วยและก้านมะพร้าวแห้ง โดยผสมในสัดส่วน ตะกอนคราม 1 กิโลกรัม ต่อน้ำค้าง 3 ลิตร หมักไว้ประมาณ 20 วัน บางแห่งมีการเติม มะขามเปียก มะเฟือง น้ำซาวข้าว หรือน้ำตาลลงไปให้น้ำหมัก มีการเติมอากาศให้น้ำหมักหรือ เรียกว่าโจกคราม โดยการใช้ขันตักน้ำหมัก ยกขึ้นมาให้ สูง แล้วจึงเทลงในถังหมัก ทำหลายๆ ครั้งและทำทุกวันเมื่อสีน้ำหมักเป็นสีเหลืองอมเขียว มีฟองอากาศที่ผิวหน้าหมักเป็นสีน้ำเงิน แสดง ว่าพร้อมที่จะนำไปย้อมผ้าได้ (อนุรัตน์ สายทอง, 2544)

ภูมิปัญญาที่สืบทอดบอกกล่าวกันมาให้มันทั้งต้นและใบแช่ลงไปน้ำโดยไม่เด็ดใบ ครามให้หลุดออกจากกิ่งนั้น ต่อมา มีรายงานว่าการทำให้ใบครามฉีกขาดด้วยการเด็ดออกจากกิ่ง จะทำให้เอนไซม์ β -glucosidase ย่อยสลาย indican หรือ indoxyl- β D-glucoside เป็นอินดิโก และย่อยกลูโคสที่อยู่ในใบคราม ซึ่งมีผลทำให้ไม่สามารถสกัดอินดิโกออกมาโดยใช้น้ำเปล่าได้ (Stoker et al., 1998) แต่จากการรายงานของ Chanayath et al. (2002) ได้ผลิตสีครามจากต้น คราม (*Indigera tinctoria* Linn) และจากต้นฮ่อม (*Baphicacanthus cusia* Brem) พบว่าการตัด ต้นครามเป็นชิ้นเล็กๆ ก่อนนำไปแช่น้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้ได้สีอินดิโกในปริมาณมาก ลด กลิ่นเหม็นที่เกิดจากการหมักและง่ายต่อการกำจัดหลังจากการหมัก สารหลักที่พบในตะกอน คราม ได้แก่ อินดิโกและสารสีแดงชื่อ indurubin ซึ่งทั้ง 2 สารละลายได้ในโคโรฟอร์ม มีเพียง เฉพาะ indurubin เท่านั้นที่ละลายได้ในเมทานอล

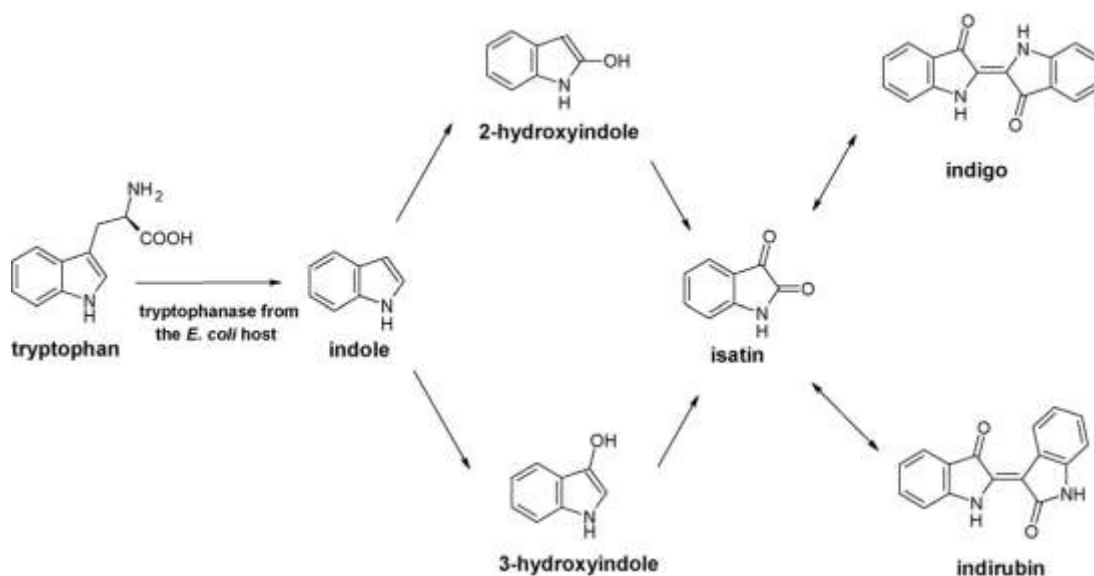
2.5 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการเตรียมสีครามเพื่อการย้อม

จุลินทรีย์มีบทบาทในการผลิตอินดิโก leuco indigo Padden et al. (1999) ได้แยก เชื้อจุลินทรีย์จากถังหมักผลิต leuco indigo จากใบโหวด (*Isatis tinctoria*) โดยนำใบโหวดที่บ่ม ไว้ 2 สัปดาห์หนัก 100 กรัม มาแช่ในน้ำประปาปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่ปรับ pH ให้มีค่า 9.0 ± 0.4 และมีอุณหภูมิ 50°C โดยหมักไว้เป็นเวลา 8 วัน แบคทีเรียที่แยกได้เป็นสปีชีส์ใหม่ชื่อ *Clostridium isatidis* sp. Nov. มีคุณสมบัติเป็นแกรมบวก เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 50°C ที่ pH 7.2 ± 0.2 ต่อมา ได้มีการศึกษากลไกของการรีดิวอินดิโกให้เป็น leuco indigo พบว่าเชื้อสามารถ ย่อยสลายเม็ดอินดิโกให้มีขนาดเล็กลงและทำให้ค่า Redox potential มีค่าต่ำลงถึง 660 mv (Nichoison and Johnm, 2005) ส่วนในประเทศญี่ปุ่นมีการเตรียมสีย้อมผ้าคราม โดยนำใบ ครามญี่ปุ่น (*Poligonum tinctorum* Lour) มาผึ่งให้แห้งในที่ร่ม แล้วจึงพรมน้ำ ให้เปียกเพื่อให้ เหมาะสำหรับกิจกรรมออกซิเดชันของแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (aerobic microbial oxidation) เพื่อช่วยในการผลิตอินดิโก จากนั้นจึงหมักต่อไปในสภาวะที่เป็นด่างสูง มาก pH สูงกว่า 10 ซึ่งในสภาพเช่นนี้ อินดิโกจะถูกเปลี่ยนเป็น leuco indigo ซึ่งใช้ย้อมผ้าได้

มีการแยกเชื้อจากหม้อครามที่เกาะฮอกไกโด ประเทศญี่ปุ่น พบแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ที่มีชื่อ *Alkavacterium psychrotokerans* sp. Nov. มีคุณสมบัติเป็นแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง facultative anaerobe เจริญได้ใน NaCl 0-17 % pH 9-12 ไม่เจริญที่ pH 7-8 สามารถรีดิวส์อินดิโกให้เป็น leuco indigo (Yumamoto et al., 2004) ต่อมาได้มีการแยกเชื้อแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ที่มีชื่อว่า *Alkavacterium iburiense* มีคุณสมบัติเป็นแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง Facultative anaerobe ความเข้มข้นของ NaCl ที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ในช่วง 3-13 % อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ในช่วง 30-37 °C

2.5.1 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสีอินดิโกจาก indole

ในปี ค.ศ. 1928 พบว่า *Pseudomonas indologenes* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ในดิน สามารถสร้างสาร indigotin หรือ สีอินดิโกจากสาร indole พบว่าเอนไซม์ของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการสร้างอินดิโก ได้แก่ tryptophanase และ naphthalene dioxygenase (NDO) ซึ่งพบในแบคทีเรียที่ย่อยสลายอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (aromatic hydrocarbon-degrading bacteria) แต่อินดิโกที่ผลิตได้มีจำนวนน้อยเนื่องจาก Han et al. (2008) ได้ใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการปรับปรุงพันธุ์แบคทีเรียที่ผลิต indigo จากกลูโคสซึ่งทนต่อ indole และสร้าง tryptophan ในระดับที่มากเกินไปเกินความต้องการของจุลินทรีย์เอง (overproduction)



ภาพที่ 2.3 วิธีการเปลี่ยน tryptophan ไปเป็นอินดิโก

ที่มา: Han et al. (2008)

จากการค้นพบว่ายีน flavin-containing monooxygenase (FMO) เป็นส่วนที่ควบคุมการผลิตอินดิโก โดย tryptophan เปลี่ยนไปเป็นอินโดล (Indole) โดยเอนไซม์ทริปโตเฟนเนส

(tryptophanase) ภายในเซลล์ *E. coli* และถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น 2-hydroxyindole, 3-hydroxyindole และ isatin โดยยีน FMO หลังจากนั้นจะเปลี่ยนเป็น indigo และอินดิรูบิน (indirubin) ในสภาวะที่มีออกซิเจน (ภาพที่ 3) จึงได้มีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตคราม (bio-indigo) โดย *E.coli* ที่มีชั้นยีน FMO พบว่า *E.coli* ที่มีชั้นยีน FMO จากเชื้อ *Methylophaga aminisulfidivorans* MP^T ที่แยกได้จากทะเล สามารถผลิตอินดิโกได้ 662 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหาร tryptophan หลังจากเลี้ยงไป 24 ชั่วโมง และสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอินดิโก คือ tryptophan 2.4 กรัมต่อลิตร yeast extract 4.5 กรัมต่อลิตร และ โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) 11.4 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ pH 7.0 สามารถผลิตอินดิโกได้ 920 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่อย่างไรก็ตามสีอินดิโกที่ผลิตได้มีจำนวนน้อย เนื่องจาก Han et al. (2008) ได้ใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการปรับปรุงพันธุ์แบคทีเรียที่ผลิตอินดิโกจากกลูโคสซึ่งทนต่ออินโดล และสร้าง tryptophan ในระดับที่มากเกินความต้องการของจุลินทรีย์เอง

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Chanayath et al. (2002) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดอินดิโกจากไบครามและไบฮ่อม คือ การตัดวัตถุดิบที่สดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วใส่ถุงผ้าหมักด้วยน้ำในถังที่มีฝาปิดมิดชิด เป็นระยะเวลา 1 วัน ได้ตะกอนสีประมาณ 0.005 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักไบสด 1 กรัม สารที่สกัดได้จากไบครามและไบฮ่อม เป็นสารกลุ่มอัลคาลอยด์ ที่มีองค์ประกอบหลักเป็นสารสีน้ำเงินและแดง สีน้ำเงิน คือ อินดิโก และสีแดง คือ อินดิรูบิน ซึ่งมีปริมาณเป็น 6.8 เท่า ของอินดิโก และมีความคงทนในบรรยากาศมากกว่า การแยกสีน้ำเงินและสีแดงในการแปรรูป พบว่าสารสีแดงสามารถละลายได้ดีในเมทานอล สารสีน้ำเงินละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม เมื่อใช้เมทานอลสกัดสีแดงจากผงสีแห้งครั้งที่ 1 จะมีสีน้ำเงินปนออกมากับสีแดงเพียงเล็กน้อย จากนั้นนำสารละลายนี้ไประเหยแห้งแล้วสกัดเมทานอลอีกครั้งพบว่าสีน้ำเงินปนออกมาน้อยลง เมื่อเทียบกับสารสกัดด้วยเมทานอลครั้งแรก วิธีสกัดนี้มีแนวโน้มที่จะนำไปประยุกต์ในอุตสาหกรรมแปรรูปสารสีน้ำเงิน และสารสีแดงเป็นสีย้อมสำเร็จรูป

Nicholson et al. (2005) ได้ตรวจสอบ แบคทีเรียที่มีคว ามสามารถในการลดคราม สำหรับการพัฒนาและเป็นทางเลือกที่ยั่งยืนเป็นวิธีการทางเคมีเพื่อใช้เป็นสีย้อมผ้าฝ้ายนส์ พบว่า *Clostridium isatidis* มีความสามารถในการรีดิวคราม แต่ *Clostridium aurantibutyricum*, *Clostridium celatum* และ *Clostridium papyrosolvens* จะไม่เกี่ยวข้องกัน โดยสกัดสารจากรากต้นแมดเดอร์ที่อุดมไปด้วย anthraquinone-rich จะมีสารละลาย anthraquinone-2,6-disulfonic acid และกรดฮิวมัส โดยจะกระตุ้นให้เชื้อ *Clostridium isatidis* เกิดการลดคราม โดยจะสร้างค่า redox potentials -476 ถึง -602 มิลลิโวลต์

งามนิจ นนทโส (2551) ได้ศึกษาจุลินทรีย์โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อในหม้อหมักक्रम กลุ่ม mesophilic aerobic mesophilic anaerobic bacteria Alkaliphilic aerobic bacteria และ β -glucosidase producing bacteria ในหม้อหมักक्रम (หม้อนิล) พบจำนวนประชากรเท่ากับ 1.2×10^5 , 8.5×10^4 , 0.8×10^4 , 5.5×10^4 และ 1.65×10^4 MPN/ml ตามลำดับ ที่เวลา 48 ชั่วโมง และได้แยกเชื้อ ที่มีความสามารถในการรีดิวซ์สีอินดิโกได้จำนวน 15 สายพันธุ์ แต่ไม่ประสบความสำเร็จในการพัฒนาเป็นกล้าเชื้อ เนื่องจากแยกได้เชื้อจุลินทรีย์ปรับตัวให้เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีแต่ไม่ได้ทำงานได้จริงๆในหม้อหมักक्रम

Aino et al. (2010) ได้หมักक्रमแบบดั้งเดิมสำหรับสิ่งทอในประเทศญี่ปุ่นมีจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการลดสีครามโดยการวิเคราะห์โครงสร้างของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการลดสีครามโดยวิธี 16S rRNA โดยให้ *Halomonas* spp. เป็นเครื่องหมาย พบว่า *Amphibacillus* spp. จะมีความสอดคล้องกับการลดคราม แม้ว่าในรายงานระยะแรก *Alkalibacterium* spp. จะไม่เด่นในการหมักแต่จะเด่นในช่วง 10 เดือน เมื่อพิจารณาโดยการวิเคราะห์เกี่ยวกับการลดครามโดยได้ *Amphibacillus* spp. C40 และ *Oceanobacillus* spp. A21 แยกได้จาก การหมัก 10 เดือนและจากการหมัก 4 วันตามลำดับ ซึ่งนอกเหนือไปจาก *Alkalibacterium* spp. ยังมี *Amphibacillus* spp. และ *Oceanobacillus* spp. ที่มีบทบาทสำคัญในการลดครามในกระบวนการหมัก

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ศึกษากระบวนการ ย้อมสีครามของกลุ่มทอ ผ้าแพรวา อำเภอดอนขุน จังหวัด พัทลุง

ศึกษาวิจัยโดยออกแบบการวิจัยให้เป็นลักษณะงานวิจัยเชิงสำรวจแบบมีส่วนร่วม จากชุมชนเพื่อส่งเสริมให้ชาวบ้านเรียนรู้กระบวนการในการทำวิจัย และสามารถยกระดับภูมิปัญญาของตนเองที่มีอยู่ในท้องถิ่น เพื่อให้คนในชุมชนได้เห็นคุณค่าของทรัพยากรในพื้นที่ โดยข้อมูลที่ใช้ประกอบด้วยข้อมูลทุติยภูมิที่ได้จากการรวบรวมเอกสารทางวิชาการ ตำราเรียน บทความ ต่างๆ วารสาร เอกสารการประชุม สัมมนาและรายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องที่ได้จัดทำไว้แล้ว และ ข้อมูลปฐมภูมิที่ได้จากการสัมภาษณ์แบบเป็นทางการและไม่เป็นทางการ การจัดกลุ่มสนทนา การสังเกตจากกลุ่มทำครามพื้นบ้าน คุรุภูมิปัญญา ปราชญ์ชาวบ้าน และกลุ่มชาวบ้านในพื้นที่ ซึ่งข้อมูลที่ได้จะประกอบด้วยข้อมูลเชิงคุณภาพพร้อมกับข้อมูลเชิงปริมาณ ของการปลูก การทำ เนื้อคราม การเลี้ยงหม้อคราม การย้อมสี

3.2 ศึกษาจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการรีดิวซ์สีอินดิโก (น้ำเงิน) ให้เป็นลิวโคอินดิโก (เหลือง) ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

เก็บตัวอย่างจุลินทรีย์จากหม้อหมักครามที่ดี และส่วนผสมต่างๆของการหมัก มาวิเคราะห์ องค์ประกอบทางด้านเคมี และจุลชีว โดยองค์ประกอบทางเคมีวิเคราะห์ ปริมาณ Indigo blue (การรีดิวซ์สีคราม) ตามวิธีการของ Aino et al. (2010) pH โดย พีเอชมิเตอร์ ค่าความเป็นด่างทั้งหมด Total alkalinity ตามวิธีมาตรฐาน (APHA, 1998) องค์ประกอบทาง จุลชีววิเคราะห์ปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค DGGE

เทคนิค PCR-DGGE นำตัวอย่างน้ำหมัก จากหม้อครามของผู้ประกอบการมาปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งเก็บตะกอนเซลล์ไว้ (cell pellet) สำหรับ สกัดดีเอ็นเอ เมื่อได้ดีเอ็นเอให้เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส สำหรับใช้เป็น PCR Template (Ausubel et al., 1995) ทำการเพิ่มจำนวนชิ้น DNA ที่สกัดได้โดยใช้เทคนิค PCR (automated thermal cycle (Biorad, USA)) ใช้ชุดไพรเมอร์ forward primer 27F (5'-GTAGAGCTTACACTATATCGC AAACCTCCTA-3') และ reverse primer 1492r (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') Arch958r (5'-YCCGGCGTTGAMTCCAATT-3') และ Arch21f (5'-TTCCGGTTGATCCYGCCGGA-3') ตรวจสอบ PCR product ใน 1.5 % Agarose gel และนำ PCR Product ดังกล่าวไปใช้ในการทำ PCR ครั้งที่สองโดยใช้ไพรเมอร์ K517r (5'-ATTACCGCGCTGCTGG-3') และ L340f (5'-CCTACGGGAGG CAGCAG -3')

(with 40 bp GC clamp at the 5' end) (แบคทีเรีย) ไพรเมอร์ PARCH519r (5'-TTACCGCGGCKGCTG -3') และ PARCH340f-GC (5'-CCTACGGGGYGCASCAG -3') (with 40 bp GC clamp at the 5' end) (อาร์เคีย) (Muyzer et al., 1993) นำ PCR products ไปวิเคราะห์บน 1.5% Agarose gel (Kongjan et al., 2010) ใช้ PCR products ครั้งที่สอง วิเคราะห์บน 8% (v/v) Polyacrylamide gels, denaturant gradient ที่ร้อยละ 40–70, electrophoresis ที่ 70 โวลต์ นาน 16 ชั่วโมง ใน 0.5x TAE buffer ที่ 60 องศาเซลเซียส ย้อมสี DGGE gels ด้วย SYBR Green นาน 15 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GelDoc รุ่น XR 1708170 (Bio-Rad Laboratories, UK) ตัดแถบแบนดีเอ็นเอเด่นจากเจล DGGE และทำให้บริสุทธิ์ด้วย E.Z.N.A Cycle Pure Kit (Omega Bio-tek, USA) นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น แล้วส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ ผลที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของจุลินทรีย์อ้างอิง โดยใช้โปรแกรม SeqMatch ในฐานข้อมูล ribosomal database project (<http://rdp.cme.msu.edu/>) และ NCBI web interface (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

3.3 แยกเชื้อจุลินทรีย์จากหม้อหมกคราม และ พัฒนาการเป็นกล้าเชื้อย้อมสีคราม

นำน้ำหมักจากหม้อครามในช่วง เวลาที่การหมักมีปริมาณสารอินดิโกสูง มาแยกเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้ความรู้จากการศึกษาองค์ประกอบของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล มาออกแบบสูตรอาหารที่ใช้ในการแยกเชื้อ สภาวะที่เหมาะสมในการแยกเชื้อ เก็บโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหารไปศึกษาคุณสมบัติทางสรีระ รูปร่าง และปฏิกิริยาทางชีวเคมี และ พันธุกรรมของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ และนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการรีดิวซ์สีอินดิโกของแต่ละสายพันธุ์ที่คัดแยกได้

3.3.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่เด่นในหม้อคราม

นำน้ำหมักหม้อครามในช่วงเวลาที่มีการหมักมีปริมาณสาร ลิโคอินดิโกสูง มาแยก เชื้อแบคทีเรียด้วยอาหารแข็ง peptone/yeast extract/alkaline (PYA) ที่มีการเติมเบโปโดน 8 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์ 3 กรัมต่อลิตร ในบัฟเฟอร์ $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ เพื่อปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 10 (Aino et al., 2010) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยกลุ่มต้องการออกซิเจน แยกโดยวิธี Spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และกลุ่มไม่ต้องการออกซิเจน แยกโดยวิธี Pour plate บ่มใน Anaerobic jar เป็นเวลา 3-7 วัน เก็บโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหารไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วยอาหารชนิดเดียวกัน จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวที่ได้ไปศึกษา รูปร่าง สี ความสูง ขอบ พื้นผิว ของโคโลนีเดี่ยวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และเซลล์แบคทีเรียที่ได้จากโคโลนีเดี่ยวบนอาหารเลี้ยงเชื้อนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูรูปร่าง ขนาด และลักษณะการติดสี

แกรม (Padden et al., 2000) และนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการรีดิวซ์สีอินดิโกของแต่ละสายพันธุ์ที่คัดแยกได้

3.3.2 คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถ ในการรีดิวซ์ อินดิโกบลู เป็นลิวโคอินดิโก

นำเชื้อกลุ่มต้องการออกซิเจนทุกไอโซเลตที่คัดแยกได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว PYB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 7 วัน แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว PYB เติมอินดิโกบลู คัดเลือกสายพันธุ์ที่รีดิวซ์อินดิโกได้ดีที่ได้จากการจัดกลุ่มๆ ตามรูปร่างและการติดสีแกรม กลุ่มละ 2 สายพันธุ์ ไปเลี้ยงในอาหารเหลว PYB ในขวดซีรัม ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีเนื้อครีมเป็นส่วนประกอบ บ่มเป็นเวลา 7 วัน แล้วตรวจสอบความสามารถของแต่ละไอโซเลตที่คัดแยกได้ ในการเปลี่ยนสีจากอินดิโกบลูเป็นลิวโคอินดิโก เมื่อเปรียบเทียบกับหลอดที่ไม่ได้เติมเชื้อ ส่วนเชื้อกลุ่มไม่ต้องการออกซิเจนนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว PYB (ที่ผ่านการไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจน) บ่มไว้เป็นเวลา 7 วัน แล้วตรวจสอบความสามารถของแต่ละไอโซเลต ที่คัดแยกได้ ในการเปลี่ยนสีจากอินดิโกบลูเป็น ลิวโคอินดิโก ดูดสารละลาย ลิวโคอินดิโก ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงในแอนแอโรบิคเคียวต์ที่พันด้วยก๊าซไนโตรเจนแล้วและ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงมาตรฐานสีเหลืองที่ 485 นาโนเมตร (จิระศักดิ์ เกษรสุวรรณ, 2552)

3.3.3 ทดสอบประสิทธิภาพการรีดิวซ์อินดิโกบลูเป็นลิวโคอินดิโกของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

ทำการ เลี้ยงเชื้อ จุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ กลุ่มต้องการออกซิเจนและกลุ่มไม่ต้องการออกซิเจนในอาหารเหลว PYB ที่ไม่ใส่เนื้อครีม เลี้ยงจนอาหารขุ่น (DO600=1.0) ดูดจุลินทรีย์ในอาหารเหลวมา 2 มิลลิลิตรใส่ในอาหาร PYB ที่ผสมด้วยครีมบดละเอียด 5 กรัมต่อลิตร ในขวดซีรัม (เนื้อครีมที่นำไปอบที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส จนแห้ง แล้วนำมาบดจนละเอียด) บ่มไว้ 7 วัน จากนั้นนำมากรองด้วยเครื่องกรองลดความดัน แล้วนำส่วนที่เป็นของแข็งที่กรองได้นั้นไปอบที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส จนแห้งแล้วนำมาชั่งน้ำหนัก และนำเส้นด้ายดิบมาทดสอบการย้อมสีโดยการจุ่มลงไปในช่วงอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วให้เส้นด้ายดิบสัมผัสกับอากาศสังเกตสีที่เกิดขึ้นกับเส้นด้ายดิบ

3.4 การผลิตกล้าเชื้อจุลินทรีย์ และการผลิตกล้าเชื้อจุลินทรีย์ผงแห้ง

นำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ จำนวน 5 สายพันธุ์ มาพัฒนาเป็นกล้าเชื้อผสมโดย นำเชื้อบริสุทธิ์แต่ละตัวมาใช้ในรูปแบบเชื้อจุลินทรีย์เดี่ยวและเชื้อจุลินทรีย์ผสม (ตารางที่ 3.1) การใช้เชื้อจุลินทรีย์ผสมนำเชื้อจุลินทรีย์มาผสมกันโดยใช้โปรแกรม Response surface methodology ในการออกแบบการใช้เชื้อผสมที่เหมาะสมและสามารถใช้เป็นกล้าเชื้อในการเกิดสีครามได้ ผสมเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 5 สายพันธุ์ตามตารางที่ 3.1 เลี้ยงในอาหารเหลว PYB ในขวดซีรัม ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีเนื้อครีมเป็นส่วนประกอบ บ่มเป็นเวลา 7 วัน แล้วตรวจสอบความสามารถของแต่ละ

ละไอโซเลตที่คัดแยกได้ ในการเปลี่ยนสีจากอินดิโกบลูเป็นลิวโคอินดิโก โดยดูดสารละลายลิวโคอินดิโกปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงในแอนแอโรบิคเคียวที่พ่นด้วยก๊าซไนโตรเจนแล้วและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงมาตรฐานสีเหลืองที่ 485 นาโนเมตร (จิระศักดิ์ เกษรสุวรรณ, 2552)

ตารางที่ 3.1 การทดลองใช้จุลินทรีย์ผสมเป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นในการย้อมสีคราม

Run	TSUI4	TSUI36	TSUI58	TSUII5	TSUII16
1	0	1	1	1	1
2	1	0	1	1	1
3	1	1	0	1	1
4	1	1	1	0	1
5	1	1	1	1	0
6	1	0	0	0	0
7	0	1	0	0	0
8	0	0	1	0	0
9	0	0	0	1	0
10	0	0	0	0	1
11	1	1	0	0	0
12	1	1	1	0	0
13	1	0	1	0	0
14	1	0	0	1	0
15	1	0	0	0	1
16	0	1	1	0	0
17	0	1	0	1	0
18	0	1	0	0	1
19	0	0	1	1	0
20	0	0	1	0	1
21	1	0	1	0	1
22	1	1	1	0	0
23	1	0	1	1	0
24	1	0	0	1	1
25	0	1	1	1	0
26	0	1	0	1	1
27	0	0	1	1	1

3.5 สร้างบทเรียนวิทยาศาสตร์จากภูมิปัญญาการย้อมสีคราม

สร้างบทเรียนวิทยาศาสตร์จากภูมิปัญญาท้องถิ่นโดยใช้เทคนิคการวิจัยแบบมีส่วนร่วมที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทำสีครามและจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง โดยการทำแผนพับ ภูมิปัญญาการย้อมสีคราม วิธีการทำ และจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 กระบวนการย้อมสีครามของกลุ่มทอผ้าแพรกหา อำเภอควนขนุน จังหวัดพัทลุง

ผลการศึกษาโดยลงไปสำรวจในพื้นที่ พบว่ากลุ่มทอผ้าตำบลแพรกหา อำเภอควนขนุน จังหวัดพัทลุง เป็นกลุ่มที่ยังคงมีการส่งเสริมและอนุรักษ์กระบวนการทำสีคราม ย้อมสีคราม และการสอบถามผู้ที่ปลูกครามในท้องถิ่น พบว่าครามที่มีการปลูกเพื่อทำสีครามในพื้นที่มี 1 สายพันธุ์ คือครามฝักถั่ว ดังแสดงในภาพที่ 4.1 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ปลูกง่าย โตไว ไม่ต้องการน้ำมาก สามารถขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด มีระยะเวลาในการเก็บเกี่ยว 3-4 เดือน โดยการตัดกิ่งพร้อมใบนำไปแช่น้ำเป็นระยะเวลา 1 คืน และตากตะกอนด้วยปูนขาว โดยใช้ใบรวมกับก้านใบปริมาณ 10 กิโลกรัม สามารถหมักให้เนื้อคราม 1 กิโลกรัม โดยเนื้อครามที่ผลิตได้สามารถจำหน่ายได้ใน กิโลกรัมละ 200 บาท ซึ่งถือว่าราคาดี และยังเป็นที่ต้องการของตลาด ทั้งในกลุ่มที่ต้องการนำไปย้อมสีเสื้อผ้า และกลุ่มที่ต้องนำสีไปใช้ในการวาดรูปหรือในงานศิลปะ



ภาพที่ 4.1 ลักษณะชนิดของต้นคราม ฝักถั่วที่ปลูกเพื่อทำสีครามของกลุ่มทอผ้าตำบลแพรกหา อำเภอควนขนุน จังหวัดพัทลุง (ก) ลักษณะใบ (ข) ลักษณะฝัก

แต่อย่างไรก็ตามกลุ่มประชาชนที่มีบริบทหรือแนวคิดในการปลูกคราม เพื่อเป็นรายได้เสริมยังมีไม่มากนัก จากการสังเกตหลักฐานทางภูมิปัญญาตลอดจนการจัดการความรู้เกี่ยวกับกระบวนการทำสีครามของกลุ่มพบว่า การทำเนื้อสีครามสามารถทำได้ง่าย แต่มีน้อยคนที่สามารถเลี้ยงหม้อครามเพื่อให้ย้อมแล้วติดสีครามที่สวยงาม เนื่องจากต้องอาศัยความเอาใจใส่ สม่ำเสมอ การสังเกต และมีประสบการณ์ลองผิดลองถูกมาแล้วเป็นเวลาหลายปี กระบวนการย้อมสีครามที่ได้ศึกษาจากกลุ่มทอผ้าตำบลแพรกหา อำเภอควนขนุน จังหวัดพัทลุง พบว่า กระบวนการย้อมสีครามประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักๆ และมีส่วนผสม 5 ส่วน คือ เนื้อคราม น้ำต่าง น้ำสนิม มะขามเปียก และน้ำขาวข้าว (ภาพที่ 4.2)



ภาพที่ 4.2 ส่วนผสมของการหมักหม้อครามพร้อมย้อมของกลุ่มทอผ้าตำบลแพรกหา อำเภอควนขนุน จังหวัดพัทลุง (ก) เนื้อคราม (ข) น้ำขี้เถ้า (ค) น้ำมะขามเปียก (ง) น้ำสนิม

ขั้นตอนการย้อมสีคราม (ภาพที่ 4.3)

1) ขั้นตอนการเตรียมเนื้อคราม แช่ต้นครามสดในน้ำให้ได้น้ำคราม 1 คืบ โดยตัดต้นครามสดมามัดเป็นพ่อนพอดีกกับกำมือแล้ว จากนั้นเรียงมัดครามให้เป็นระเบียบลงในโอ่งโดยไม่ต้องกดให้แน่น บรรจุจนครามเต็มโอ่ง เติมน้ำจนท่วม ใช้มือกดลงประมาณ $\frac{3}{4}$ ของโอ่งแช่ไว้ 1 คืบ นำส่วนกากครามทิ้ง ได้น้ำครามสีเขียวปนเหลืองให้เติมปูนขาวผสมลงไป จนกระทั่งน้ำครามเป็นสีน้ำเงินและมีฟองให้หยุดเติมขาวและทำการตีคราม ใช้เวลาประมาณ 10-15 นาที จากนั้นพักน้ำครามที่มีฟองแล้วนี้ไว้ 1-3 คืบ โดยเนื้อครามจะแยกจมอยู่ชั้นล่าง ส่วนฟองที่แตก

ไม่หมดเกาะกันอยู่ที่ผิวหน้าของของเหลว รินของเหลวใสสีเหลืองทิ้ง เก็บเนื้อครามชั้นล่าง ซึ่งมีลักษณะสีน้ำเงินเหลวๆเหมือนโคลนเก็บไว้

2) ขั้นตอนการเตรียมหม้อครามพร้อมย้อม ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่สำคัญมากต่อการย้อมเพื่อให้ได้สีครามที่สวยงามและคงทน เนื่องจากต้องอาศัยจุลินทรีย์เปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของสีครามให้มีคุณสมบัติที่ดีต่อการย้อม ส่วนผสมที่สำคัญประกอบด้วย (ภาพที่ 4.2) เนื้อคราม 100 กรัม น้ำด่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร น้ำสนิมปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปูนกินหมาก 2 กรัม น้ำด่างหรือน้ำซีเถ่า 5 มิลลิลิตร น้ำมะขามเปียก 5 มิลลิลิตร และ น้ำขาวข้าว 20 มิลลิลิตร โดยเนื้อครามปริมาณ 100 กรัม หมักในหม้อครามเป็นเวลา 1 วัน สามารถย้อมเส้นใยได้จำนวน 1 จับ โดยผู้วิจัยได้เก็บตัวอย่างหม้อครามที่พร้อมย้อมสี น้ำสนิม และน้ำด่างไปศึกษาโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ในขั้นตอนต่อไป

3) ขั้นตอนการย้อม ขั้นตอนนี้ไม่ได้มีความยุ่งยากมากนัก โดยผู้ย้อมผ้าต้องใช้ถุงมือยางกันสีย้อมติดมือ นำเส้นด้ายจุ่มลงไปให้ท่วมน้ำในหม้อครามเป็นเวลาประมาณ 1 นาที จากนั้นบิดน้ำครามออกไปพอหมาดๆ แล้วทุบเส้นด้ายเข้าด้วยกันด้วยฝ่ามือ จากเส้นด้ายที่มีสีเหลืองอ่อนๆ ก็จะทำให้เกิดเป็นสีน้ำเงิน ซึ่งสามารถทำซ้ำจนให้ สีน้ำเงินที่เข้มเป็นที่พอใจได้ตามต้องการ จากนั้นนำเส้นด้ายที่ย้อมแล้วมาฟึ่งลมให้แห้งเป็นเวลา 1 วัน จากนั้นสามารถนำไปทอเป็นผ้าถุง หรือผ้าพันคอได้ตามต้องการ โดยกลุ่มนี้นำไปใช้ในการทอผ้าถุงและผ้าพันคอเป็นหลักโดยมีนายทุนนำเส้นด้ายมาให้และรับซื้อผลิตภัณฑ์ดังกล่าวไปจำหน่ายอีกต่อหนึ่ง



ภาพที่ 4.3 แสดงขั้นตอนกระบวนการย้อมสีครามที่ได้จากการสำรวจที่กลุ่มทอผ้าตำบลแพรกหา อำเภอกวนขนุน จังหวัดพัทลุง

การย้อมสีครามมีขั้นตอนที่ซับซ้อน ต้องอาศัยกลไกการออกไคซ์และรีดิวซ์ ทั้งนี้จากการที่สีครามไม่ละลายน้ำทำให้ไม่สามารถสัมผัสกับเส้นใยที่นำมาย้อมได้ดี ก่อนทำการย้อมจึงต้องเปลี่ยนให้อยู่ในรูปละลายน้ำ (ลิวโค) ให้เส้นใยดูดซับสีได้เต็มที่ หลังจากนั้นจะถูกออกซิไดซ์กลับเป็นรูปเดิม (ไม่ละลายน้ำ) ในเส้นใยที่ย้อมเสร็จแล้ว คำว่าลิวโคมาจากภาษากรีกแปลว่าสีขาว ซึ่งเป็นสีในถังกรดของการผลิตสีคราม (Bozic and Kokol., 2008) เมื่อนำใบครามมาแช่ในน้ำประมาณ 2 วัน จะได้สาร glucoside indicant เมื่อสัมผัสกับอากาศ Indican จะเปลี่ยนไปเป็น indoxyl และถูกออกซิไดซ์ต่อไปเป็นอินดิโก ก่อนจะถูกตกตะกอนด้วยสารละลายต่างหรือปูนขาวได้เป็นเนื้อคราม และมีการหมักด้วยจุลินทรีย์ที่ pH 10.0-11.5 ประมาณ 10 วัน เพื่อให้ได้ลิวโคอินดิโกซึ่งเป็นรูปที่ละลายน้ำจากอินดิโกที่ไม่ละลายน้ำในสภาวะที่มีด่าง ผ่านกระบวนการรีดักชันโดยแบคทีเรีย (Park et al., 2012)

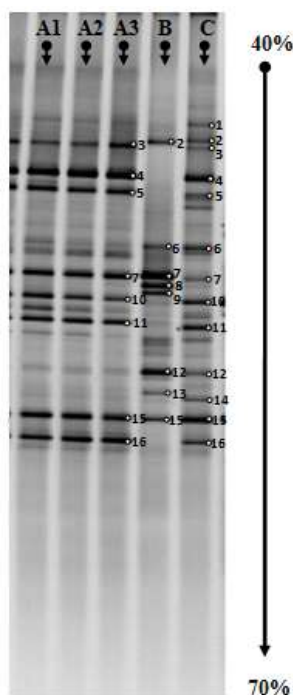
4.2 ศึกษาจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการรีดิวซ์สีอินดิโก (น้ำเงิน) ให้เป็น ลิวโคอินดิโก (เหลือง) ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และปริมาณ Indigo blue ในตัวอย่างน้ำหมักจากหม้อหมักเนื้อคราม จำนวน 3 ตัวอย่าง น้ำสนิม และน้ำด่าง อย่างละ 1 ตัวอย่าง พบว่าน้ำหมักในหม้อหมักครามมีสภาพเป็นด่าง มี pH เท่า 10.0 มีค่า total alkalinity เท่า 4.5 g CaCO₃/L และมีปริมาณลิวโคอินดิโกที่สูง (320 มิลลิกรัมต่อลิตร) (ตารางที่ 4.1) พบว่าเนื้อครามก่อนการหมักมีองค์ประกอบทางเคมีเป็น Indigo blue ปริมาณสูง ขณะที่ Leuco Indigo มีปริมาณเพียงเล็กน้อย ซึ่งพบว่าแตกต่างจากน้ำหมักหม้อครามที่มีองค์ประกอบ Leuco Indigo มากกว่า Indigo blue ส่วนน้ำด่างไม่พบองค์ประกอบสีดังกล่าว เมื่อศึกษาวัดค่าพีเอชและความเป็นด่างพบว่า มีพีเอชที่เป็นด่าง และมีความเป็นด่างเท่ากับ 10 ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีความเป็นบัฟเฟอร์สูง น้ำสนิมมีสภาพเป็นกรด

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างที่ได้จากส่วนผสมของการหมักครามเพื่อย้อมสี

Samples	Parameters			
	Indigo blue	Leuco Indigo	pH	Total alkalinity
	(mg/L)	(mg/L)		(g CaCO ₃ /L)
เนื้อคราม	2540	3.4	11.5	6.2
น้ำหมักหม้อคราม	50.2	320	10.0	4.5
น้ำสนิม	-	-	4.2	0.2
น้ำด่าง	-	-	12.2	9.1

ผลจากการศึกษาโครงสร้างจุลินทรีย์พบว่า มีทั้งแบคทีเรียและอาร์เคียที่เจริญเติบโตในหม้อक्रमตัวอย่าง โดยแบคทีเรียมีความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอมากกว่า 16 แถบดีเอ็นเอ (ภาพที่ 4.4) ซึ่งสอดคล้องกับชนิดของจุลินทรีย์ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 แบคทีเรียที่พบส่วนใหญ่เป็นกลุ่มที่มักพบเจริญเติบโตที่สภาวะต่างซึ่งสอดคล้องกับค่าพีเอชที่พบ กลุ่มแบคทีเรียที่พบในตัวอย่างหม้อक्रमมีจำนวนความหลากหลาย 8 แถบชนิดดีเอ็นเอ ประกอบด้วย *Uncultured Bacillus* sp., *Uncultured Atopostipes* sp., unclassified *Clostridiales* bacterium, *Sporomusa acidovorans*, *Uncultured Amphibacillus* sp., *Alkalibacterium* sp. uncultured *Lactobacillus* sp. และ *Uncultured Actinomycetales* bacterium ซึ่งจุลินทรีย์ที่พบในน้ำหมักหม้อक्रमพร้อมที่จะย้อมสีนี้ สอดคล้องกับจุลินทรีย์ที่พบในน้ำต่าง ซึ่งมีความหลากหลาย ของแถบดีเอ็นเอมากที่สุด 13 แถบชนิดดีเอ็นเอ และทั้งหมดสอดคล้องตรงกับประชากรจุลินทรีย์ทั้ง 8 ชนิด ที่พบในตัวอย่างน้ำหมักक्रम ในขณะที่ประชากรจุลินทรีย์ที่พบในน้ำสนิมมีทั้งหมด 8 แถบดีเอ็นเอ แต่สอดคล้องตรงกับแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างหม้อक्रमเพียง 2 ชนิดเท่านั้น ผลจากการทดลองนี้ทำให้ทราบว่า จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการย้อมสี น่าจะมาจากชนิดของน้ำต่าง ซึ่งน่าจะเป็นเหตุผลสำคัญที่ ในภูมิปัญญาที่ได้สั่งสมกันมาว่าจะต้องเลือกแหล่งของวัตถุดิบชนิดต่างๆ เช่น กาบมะพร้าวเผา แก้วของกล้วย เป็นต้น ถึงจะให้ย้อมสีติดดี



ภาพที่ 4.4 โครงสร้างประชากรแบคทีเรียที่ได้จากตัวอย่าง หม้อหมักक्रमพร้อมย้อม (A1, A2, A3) น้ำสนิม (B) และน้ำต่าง (C)

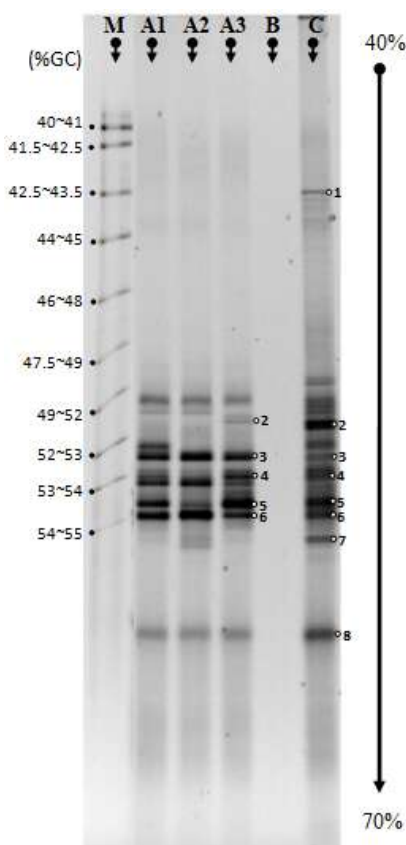
ตารางที่ 4.2 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่สอดคล้องกับแถบดีเอ็นเอที่ได้จากภาพที่ 4.4

Band	Affiliation strains	Accession No.	Identity (%)	Samples		
				หม้อคราม (A)	น้ำสนิม (B)	น้ำค้าง (C)
1	<i>Alkalibacterium</i> sp.	FJ157164.1	86	-	-	+
2	<i>Sporomusa aerivorans</i>	AJ506192	89	-	+	+
3	Uncultured <i>Bacillus</i> sp.	JF522197.1	79	+	-	+
4	Uncultured <i>Atopostipes</i> sp.	FJ495234.1	99	+	-	+
5	unclassified_Clostridiales bacterium	EF434361.1	87	+	-	+
6	<i>Atopostipes</i> sp.	GU429146.1	80	-	+	+
7	<i>Sporomusa acidovorans</i>	NR_025415.1	95	+	+	+
8	<i>Sporomusa</i> sp.	Y17760.1	90	-	+	-
9	unclassified_ "Ruminococcaceae	EU842952	87	-	+	-
10	Uncultured <i>Amphibacillus</i> sp.	AB533327.1	83	+	-	+
11	<i>Alkalibacterium</i> sp.	FJ876440.1	81	+	-	+
12	Uncultured <i>Lactobacillus</i> sp.	JF427854.1	78	-	+	+
13	<i>Clostridium</i> sp.	GQ906580	93	-	+	-
14	<i>Clostridium beijerinckii</i>	AB678395.1	99	-	-	+
15	uncultured <i>Lactobacillus</i> sp.	HM218840	80	+	+	+
16	Uncultured Actinomycetales bacterium	GQ351423.1	77	+	-	+

ในการศึกษาโครงสร้างจุลินทรีย์ในกลุ่มอาเคียร์ พบว่ามีความหลากหลายน้อย ซึ่งชนิดของอาเคียร์ที่พบได้แก่ *Haloterrigena* sp., Uncultured haloarchaeon clone และ *Haloterrigena turkmenica* ซึ่งก็สอดคล้องกับค่าพีเอชของตัวอย่าง โดยเชื้ออาเคียร์ที่พบเป็นกลุ่มที่ชอบความเค็ม และกลุ่มเชื่อน่าจะมาจากน้ำค้างเพราะไม่พบว่ามีจุลินทรีย์อื่น อาเคียร์เลยในตัวอย่างน้ำสนิม ดังแสดงในภาพที่ 4.5 และตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์อาเคียร์ที่สอดคล้องกับแถบดีเอ็นเอที่ได้จากภาพที่ 4.5

Band	Affiliation strains	Accession No.	Identity (%)	Samples		
				หม้อคราม (A)	น้ำสนิม (B)	น้ำค้าง (C)
1	<i>Haloterrigena</i> sp.	JF449429	94	-	-	+
2	<i>Haloterrigena</i> sp.	JF449429	97	+	-	+
3	<i>Haloterrigena</i> sp.	JF449428	95	+	-	+
4	<i>Haloterrigena</i> sp.	JF449433	96	+	-	+
5	Uncultured haloarchaeon clone	EF690637	96	+	-	+
6	<i>Haloterrigena turkmenica</i>	CP001860	90	+	-	+
7	<i>Haloterrigena</i> sp.	JF449427	97	-	-	+
8	<i>Haloterrigena</i> sp.	JF449428	97	-	-	+



ภาพที่ 4.5 โครงสร้างประชากรจุลินทรีย์แอเคียรีที่ได้จากตัวอย่าง หม้อหมักक्रमพร้อมย้อม (A1, A2, A3) น้ำสนิม (B) และน้ำค้าง (C)

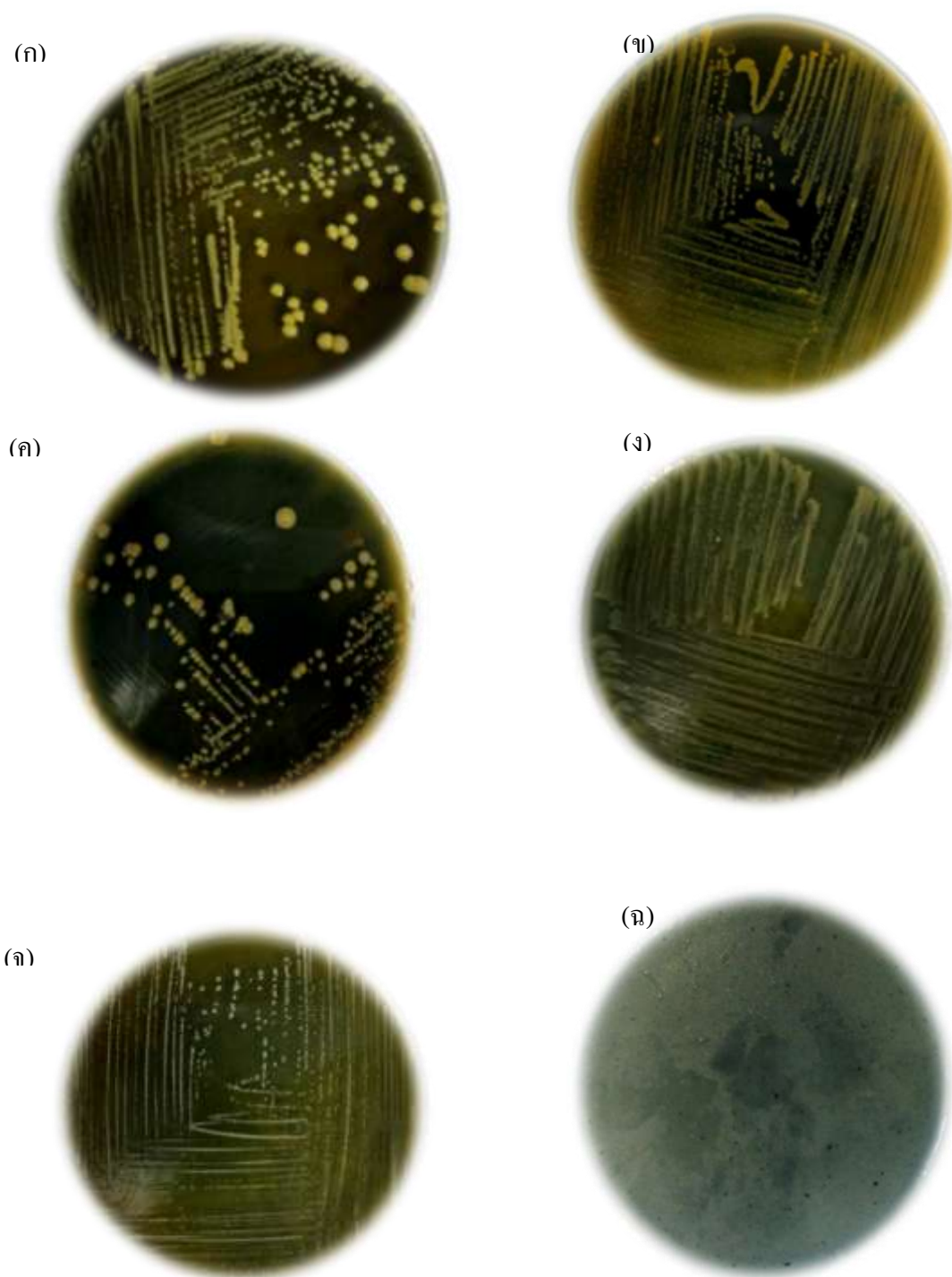
รายงานเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักक्रमก่อนหน้า มีหลากหลายสายพันธุ์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัสดุและสภาวะที่ใช้ในการหมัก สำหรับจุลินทรีย์ที่พบในหม้อหมักक्रमในการวิจัยนี้ สอดคล้องกับผลของการวิเคราะห์โครงสร้างประชากร แบคทีเรียและกิจกรรมการรีดิวซ์क्रमในหม้อหมักक्रमญี่ปุ่น พบว่า *Alkalibacterium* spp. และ *Amphibacillus* spp. มีความสำคัญในการรีดิวซ์क्रम สายพันธุ์ที่แยกได้จากการโคลน คือ *Alkalibacterium* และ *Amphibacillus* เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายรำข้าวสาลี (เติมในหม้อหมักक्रमเพื่อเป็นอาหารจุลินทรีย์) เช่น แป้ง ไซแลน และความสามารถในการย่อยสลายในสภาวะไร้อากาศ มีความสำคัญสำหรับการรีดิวซ์สีक्रम (Aino et al., 2010) Aino et al. (2010) ยังพบว่ารำข้าวสาลีที่เติมลงในการหมักส่งเสริมการเติบโตของ *Halomonas* spp. และ *Bacillus* เมื่อหมักไปนานใน *Halomonas* จะถูกแทนที่ด้วย *Amphibacillus* spp. ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการย้อมสีक्रम ซึ่งแสดงว่า *Amphibacillus* spp. เป็นแบคทีเรียหลักในการรีดิวซ์ (Aino et al., 2010)

4.3 การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากหม้อหมักครามและเกี่ยวข้องกับการย้อมสีคราม

4.3.1 แยกเชื้อกลุ่มต้องการออกซิเจนจากหม้อหมักครามโดยวิธี Spread plate

เชื้อจุลินทรีย์ 59 (TSUI1-TSUI59) ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 4.4 ที่แยกได้จากน้ำหมักหม้อคราม (ตารางที่ 4.4) โดยใช้อาหาร PYA ผสมเนื้อคราม พบว่าเชื้อมีสีโคโลนีทั้งหมด 5 สี คือ โคโลนีสีเหลืองเข้ม สีเหลืองทอง สีเหลืองขุ่น สีขาวเหลือง และโคโลนีสีขาว (ภาพที่ 4.6) แบคทีเรียกลุ่มต้องการออกซิเจนที่แยกได้ พบว่าลักษณะโคโลนีที่มีสีเหลืองทอง ติดสีแกรมลบ รูปร่างกลม มี 2 ไอโซเลต โคโลนีสีเหลืองขุ่น ติดสีแกรมลบ รูปร่างกลม มี 11 ไอโซเลต โคโลนีสีขาว ติดสีแกรมลบ รูปร่างกลม มี 5 ไอโซเลต โคโลนีสีขาวเหลือง ติดสีแกรมลบ รูปร่างกลม มี 4 ไอโซเลต โคโลนีสีเหลืองขุ่น ติดสีแกรมบวก รูปร่างท่อนสั้น มี 11 ไอโซเลต โคโลนีสีเหลืองขุ่น ติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม มี 10 ไอโซเลต โคโลนีสีเหลืองเข้ม ติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม 2 ไอโซเลต โคโลนีสีเหลืองขุ่น ติดสีแกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น มี 10 ไอโซเลต โคโลนีสีขาวเหลือง ติดสีแกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น มี 1 ไอโซเลต และโคโลนีสีขาว ติดสีแกรมบวก รูปร่างท่อนสั้น 3 ไอโซเลต และการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า แบคทีเรียปรับตัวได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

สำหรับโคโลนีกลม สีขาว และติดสีแกรมบวก มีรูปร่างท่อน และสามารถเจริญได้บนอาหารที่มี pH สูงๆ (เป็นด่างประมาณ 10) ที่คัดแยกได้จากกระบวนการผลิตคราม (*Polygonum tinctorium* Lour.) ในประเทศญี่ปุ่น 2 สายพันธุ์ คือ 41A และ 41C เมื่อนำมาวิเคราะห์ลำดับเบส 16S rRNA gene พบว่าอยู่ในจีนัส *Alkalibacterium* มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Alkalibacterium olivapovliticus* และ *Alkalibacterium psychrotolerans* ส่วนสายพันธุ์ M3^T เป็นสายพันธุ์ที่ปนเปื้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อ alkali broth ซึ่งเมื่อนำมาหาลำดับเบส พบว่าเป็นสายพันธุ์ใหม่ในจีนัส *Alkalibacterium* คือ *Alkalibacterium iburiense* (=JCM 12662T=NCIMB 14024T) ซึ่งสามารถรีดิวส์ครามได้ (Nakajima et al., 2005) เช่นเดียวกับการศึกษาการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากหมักหมักครามพื้นบ้านเกาหลี พบลักษณะโคโลนีจุลินทรีย์มีลักษณะเดียวกันกับหมักหมักครามในญี่ปุ่น (Park et al., 2012) จึงเป็นไปได้ว่าโคโลนีสีขาว ติดสีแกรมบวก รูปร่างท่อนสั้น 3 ไอโซเลต (ภาพที่ 4.6จ) ที่พบในงานวิจัยนี้อาจจะอยู่ในจีนัส *Alkalibacterium*



ภาพที่ 4.6 การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มต้องการออกซิเจนที่มีสีโคโลนีต่างๆ (ก) โคโลนีสีเหลืองเข้ม (ข) โคโลนีสีเหลืองทอง (ค) โคโลนีสีเหลืองขุ่น (ง) โคโลนีสีขาวเหลือง (จ) โคโลนีสีขาว (ฉ) อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมเชื้อ

ตารางที่ 4.4 การเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อ สีโคโลนี การติดสีแกรม รูปร่างและการเรียงตัวของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม ต้องการ ออกซิเจน ที่คัดแยกได้ TSUI1-TSUI59

Isolate	ลักษณะสีโคโลนี	การติดสีแกรม	รูปร่างและการเรียงตัว	ความสามารถในการรีดิวซ์สี อินดิโก
TSUI1	เหลืองทอง	แกรมลบ	กลม เป็นกลุ่ม	+++
TSUI2	เหลืองขุ่น	แกรมลบ	กลม เป็นกลุ่ม	++
TSUI3	ขาว	แกรมลบ	กลม เป็นกลุ่ม	++
TSUI4	เหลืองขุ่น	แกรมลบ	กลม เป็นกลุ่ม	+++
TSUI5	เหลืองขุ่น	แกรมลบ	กลม เป็นกลุ่ม	+++
TSUI6	เหลืองทอง	แกรมลบ	กลม เป็นกลุ่ม	++
TSUI7	เหลืองขุ่น	แกรมลบ	กลม เป็นกลุ่ม	++
TSUI8	ขาวเหลือง	แกรมลบ	กลม เป็นกลุ่ม	++
TSUI9	ขาวเหลือง	แกรมลบ	กลม เป็นกลุ่ม	+++
TSUI10	เหลืองขุ่น	แกรมบวก	ท่อนสั้น เป็นสาย	++
TSUI11	เหลืองขุ่น	แกรมบวก	ท่อนสั้น เป็นสาย	+++
TSUI12	ขาว	แกรมลบ	กลม เป็นกลุ่ม	++
TSUI13	เหลืองขุ่น	แกรมลบ	กลม เป็นกลุ่ม	+
TSUI14	เหลืองขุ่น	แกรมบวก	ท่อนสั้น อยู่เดี่ยว	+++
TSUI15	เหลืองขุ่น	แกรมบวก	ท่อนสั้น อยู่เดี่ยว	+++
TSUI16	เหลืองขุ่น	แกรมบวก	ท่อนสั้น อยู่เดี่ยว	+++
TSUI17	เหลืองขุ่น	แกรมบวก	กลม เป็นกลุ่ม	++
TSUI18	เหลืองขุ่น	แกรมบวก	ท่อนสั้น อยู่เดี่ยว	++
TSUI19	เหลืองเข้ม	แกรมบวก	กลม เป็นกลุ่ม	++
TSUI20	เหลืองขุ่น	แกรมลบ	ท่อนสั้น อยู่เดี่ยว	++
TSUI21	ขาวเหลือง	แกรมลบ	กลม เป็นกลุ่ม	+++
TSUI22	เหลืองขุ่น	แกรมลบ	กลม เป็นกลุ่ม	+++
TSUI23	เหลืองขุ่น	แกรมบวก	กลม อยู่เดี่ยว	+++
TSUI24	เหลืองขุ่น	แกรมบวก	กลม อยู่เดี่ยว	+++
TSUI25	ขาวเหลือง	แกรมลบ	กลม เป็นกลุ่ม	++
TSUI26	เหลืองขุ่น	แกรมบวก	ท่อนสั้น อยู่เดี่ยว	++
TSUI27	เหลืองขุ่น	แกรมบวก	ท่อนสั้น อยู่เดี่ยว	+++

ตารางที่ 4.4 การเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อ สีโคโลนี การติดสีแกรม รูปร่างของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม
ต้องการ ออกซิเจน ที่คัดแยกได้ TSUI1-TSUI59 (ต่อ)

Isolate	ลักษณะสี โคโลนี	การติดสีแ กรม	รูปร่างและการเรียง ตัว	ความสามารถใน การรีดิวซ์สี อินดิโก
TSUI28	เหลืองขุ่น	แกรมบวก	ท่อนสั้น เป็นสาย	++
TSUI29	ขาวเหลือง	แกรมลบ	ท่อนสั้น เป็นสาย	+++
TSUI30	เหลืองขุ่น	แกรมลบ	กลม อยู่เดี่ยว	+++
TSUI31	เหลืองขุ่น	แกรมบวก	กลม เป็นกลุ่ม	+++
TSUI32	เหลืองขุ่น	แกรมบวก	กลม เป็นกลุ่ม	+++
TSUI33	เหลืองขุ่น	แกรมบวก	กลม เป็นกลุ่ม	+++
TSUI34	เหลืองขุ่น	แกรมลบ	กลม เป็นกลุ่ม	+++
TSUI35	เหลืองขุ่น	แกรมบวก	ท่อนสั้น อยู่เดี่ยว	+++
TSUI36	เหลืองขุ่น	แกรมบวก	ท่อนสั้น อยู่เดี่ยว	+++
TSUI37	เหลืองขุ่น	แกรมบวก	กลม เป็นกลุ่ม	++
TSUI38	ขาว	แกรมบวก	ท่อนสั้น เป็นสาย	+++
TSUI39	ขาว	แกรมบวก	ท่อนสั้น เป็นสาย	+
TSUI40	เหลืองขุ่น	แกรมลบ	กลม เป็นกลุ่ม	+
TSUI41	เหลืองขุ่น	แกรมลบ	กลม อยู่เดี่ยว	+++
TSUI42	เหลืองขุ่น	แกรมลบ	ท่อนสั้น เป็นสาย	++
TSUI43	เหลืองขุ่น	แกรมลบ	ท่อนสั้น เป็นสาย	+++
TSUI44	เหลืองเข้ม	แกรมบวก	กลม เป็นกลุ่ม	++
TSUI45	เหลืองขุ่น	แกรมบวก	กลม เป็นกลุ่ม	+++
TSUI46	ขาว	แกรมลบ	กลม เป็นกลุ่ม	+++
TSUI47	เหลืองขุ่น	แกรมบวก	ท่อนสั้น อยู่เดี่ยว	+++
TSUI48	เหลืองขุ่น	แกรมลบ	ท่อนสั้น เป็นสาย	+++
TSUI49	เหลืองขุ่น	แกรมบวก	กลม เป็นกลุ่ม	++
TSUI50	ขาวขุ่น	แกรมลบ	กลม เป็นกลุ่ม	+++
TSUI52	เหลืองขุ่น	แกรมลบ	กลม เป็นกลุ่ม	+++
TSUI53	ขาว	แกรมบวก	ท่อนสั้น อยู่เดี่ยว	+++
TSUI54	ขาว	แกรมลบ	กลม เป็นกลุ่ม	+++
TSUI55	เหลืองขุ่น	แกรมบวก	ท่อนสั้น อยู่เดี่ยว	+++

ตารางที่ 4.4 การเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อ สีโคโลนี การติดสีแกรม รูปร่างของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม
ต้องการ ออกซิเจน ที่คัดแยกได้ TSUI1-TSUI59 (ต่อ)

Isolate	ลักษณะสี โคโลนี	การติดสีแ กรม	รูปร่างและการเรียง ตัว	ความสามารถใน การรีดิวซ์สี อินดิโก
TSUI56	เหลืองขุ่น	แกรมบวก	ท่อนสั้น อยู่เดี่ยว	++
TSUI57	ขาว	แกรมลบ	กลม เป็นกลุ่ม	++
TSUI58	เหลืองขุ่น	แกรมลบ	ท่อนสั้น เป็นสาย	++
TSUI59	เหลืองขุ่น	แกรมลบ	ท่อนสั้น อยู่เดี่ยว	++
หมายเหตุ	+	หมายถึง	ไม่เปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อ	
	++	หมายถึง	เปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อปานกลาง	
	+++	หมายถึง	เปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อมาก	

4.3.2 แยกเชื้อแบคทีเรียกลุ่มไม่ต้องการออกซิเจนจากหม้อหมักครามโดยวิธี

Pour plate

เมื่อทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มไร้อากาศจากหม้อหมักคราม บนอาหารแข็ง PYA ผสม
เนื้อคราม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วันใน anaerobic jar พบว่าโคโลนี
เชื้อจุลินทรีย์ที่พบมีสีน้ำตาลขาว (ภาพที่ 4.7) จำนวน 23 ไอโซเลต (TSUI1-TSUI11) (ตารางที่
4.5)



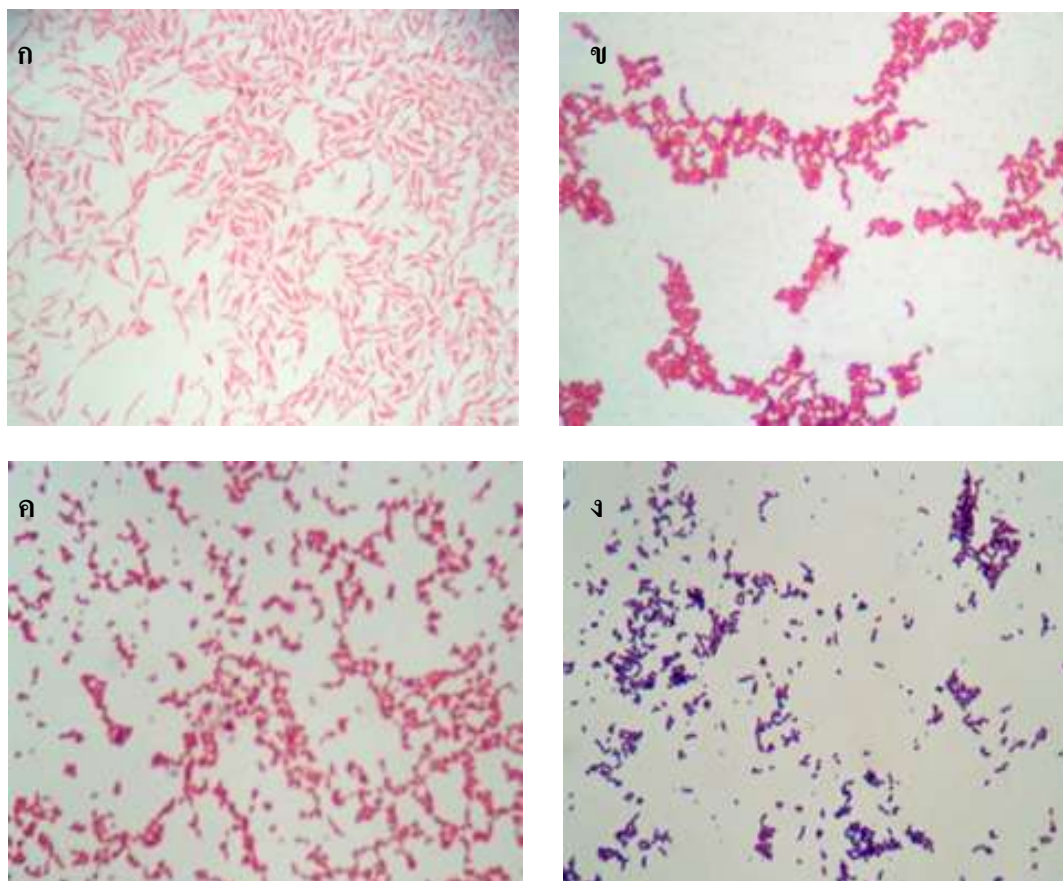
ภาพที่ 4.7 ลักษณะของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มไม่ต้องการออกซิเจนที่เลี้ยงบนอาหาร PYA

ตารางที่ 4.5 การเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อ สีโคโลนี การติดสีแกรม รูปร่าง ของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม
ไม่ต้องการออกซิเจน ที่คัดแยกได้ TSUII1-TSUII23

Isolate	สีโคโลนี	การติดสีแกรม	รูปร่างและการเรียงตัว	ความสามารถในการรีดิวซ์สีอินดิโก
TSUII1	สีน้ำชาขำ	แกรมลบ	แท่งยาว เป็นสาย	+
TSUII2	สีน้ำชาขำ	แกรมลบ	แท่งยาว เป็นสาย	+
TSUII3	สีน้ำชาขำ	แกรมลบ	ท่อนสั้น เป็นสาย	+
TSUII4	สีน้ำชาขำ	แกรมบวก	ท่อนสั้น เป็นสาย	+
TSUII5	สีน้ำชาขำ	แกรมลบ	ท่อนสั้น เป็นสาย	++
TSUII6	สีน้ำชาขำ	แกรมบวก	ท่อนสั้น เป็นสาย	++
TSUII7	สีน้ำชาขำ	แกรมบวก	ท่อนสั้น เป็นสาย	+
TSUII8	สีน้ำชาขำ	แกรมบวก	ท่อนสั้น เป็นสาย	+
TSUII9	สีน้ำชาขำ	แกรมบวก	ท่อนสั้น เป็นสาย	+
TSUII10	สีน้ำชาขำ	แกรมลบ	ท่อนสั้น เป็นสาย	+
TSUII11	สีน้ำชาขำ	แกรมลบ	กลม เป็นกลุ่ม	+
TSUII12	สีน้ำชาขำ	แกรมบวก	ท่อนสั้น เป็นสาย	+
TSUII13	สีน้ำชาขำ	แกรมบวก	ท่อนสั้น เป็นสาย	+
TSUII14	สีน้ำชาขำ	แกรมลบ	ท่อนสั้น เป็นสาย	+
TSUII15	สีน้ำชาขำ	แกรมบวก	ท่อนสั้น เป็นสาย	+
TSUII16	สีน้ำชาขำ	แกรมลบ	ท่อนสั้น เป็นสาย	++
TSUII17	สีน้ำชาขำ	แกรมลบ	ท่อนสั้น เป็นสาย	+
TSUII18	สีน้ำชาขำ	แกรมลบ	ท่อนสั้น เป็นสาย	+
TSUII19	สีน้ำชาขำ	แกรมลบ	ท่อนสั้น เป็นสาย	+
TSUII20	สีน้ำชาขำ	แกรมลบ	ท่อนสั้น เดี่ยว	+
TSUII21	สีน้ำชาขำ	แกรมลบ	ท่อนสั้น เป็นสาย	+
TSUII22	สีน้ำชาขำ	แกรมลบ	ท่อนสั้น เดี่ยว	+
TSUII23	สีน้ำชาขำ	แกรมลบ	ท่อนสั้น เป็นสาย	+
หมายเหตุ	+	หมายถึง	ไม่เปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อ	
	++	หมายถึง	เปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อปานกลาง	
	+++	หมายถึง	เปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อมาก	

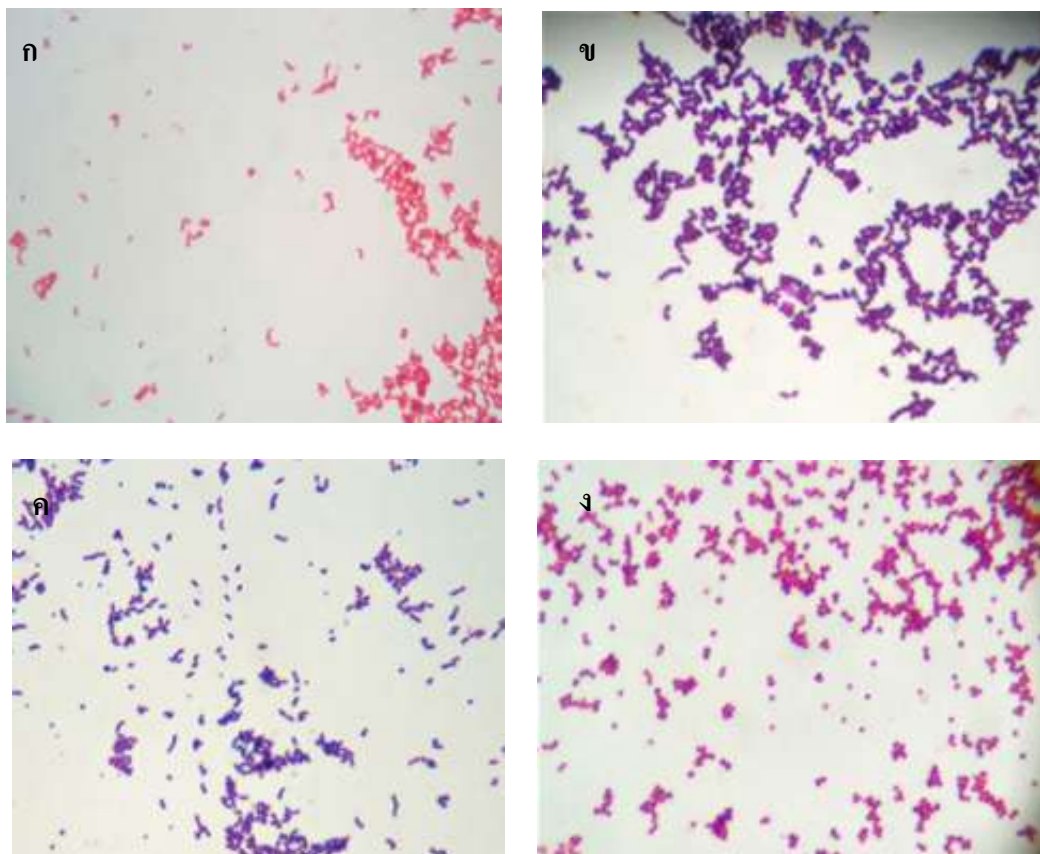
4.3.3 การศึกษารูปร่างของเชื้อ

การศึกษารูปร่างของเชื้อกลุ่มไม่ต้องการออกซิเจนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า เชื้อจุลินทรีย์เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างกลม 1 ไอโซเลต 9 ไอโซเลต เป็นท่อนสั้น แกรมบวก ส่วนอีก 11 ไอโซเลต ติดสีแกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น และติดสีแกรมลบ เป็นแท่งยาว 2 ไอโซเลต (ภาพที่ 4.8)



ภาพที่ 4.8 เชื้อกลุ่มไม่ต้องการออกซิเจน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยายภาพ 1000 เท่า (ก) แท่งยาว แกรมลบ ต่อกันเป็นสาย (ข) ท่อนสั้น แกรมลบ ต่อกันเป็นสาย (ค) กลม แกรมลบ ต่อกันเป็นสาย (ง) ท่อนสั้น แกรมบวก เดี่ยว

การศึกษารูปร่างของเชื้อกลุ่มต้องการออกซิเจนภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างกลม 22 ไอโซเลต และ 17 ไอโซเลต มีท่อนสั้น แกรมบวก ส่วนอีก 11 ไอโซเลต แกรมบวก มีรูปร่างกลม และแกรมลบ ท่อนสั้น 9 ไอโซเลต (ภาพที่ 4.9)



ภาพที่ 4.9 เชื้อกลุ่มต้องการออกซิเจน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยายภาพ 1000 เท่า
(ก) แกรมลบ ท่อนสั้น ต่อกันเป็นสาย (ข) แกรมลบ กลม อยู่เป็นกลุ่ม (ค) แกรมลบ
ท่อนสั้น ต่อกันเป็นสาย (ง) แกรมลบ กลม อยู่เป็นกลุ่ม

สำหรับแบคทีเรียรีดิวซ์โครมแยกได้ครั้งแรกโดย Takahara and Tanabe (1960) เมื่อศึกษา taxonomy แล้วพบว่า เป็นสายพันธุ์ใหม่ โดยตั้งชื่อว่า *Bacillus alkaliphiles* แต่ยังไม่ได้รับการรับรองว่าเป็นสายพันธุ์ใหม่ สายพันธุ์ที่แยกได้สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ pH สูง แต่การเก็บรักษาอย่างไม่ถูกวิธีหรือเก็บรักษาที่ไม่ดีทำให้ไม่สามารถนำมาศึกษาหรือประยุกต์ใช้ได้ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่จะระบุสายพันธุ์โดยลำดับเบสยีน 16S rRNA ประมาณ 40 ปี หลังจากแยกเชื้อแบคทีเรียจากหม้อหมักโครมได้โดย Takahara ในปี 2000 Padden et al. (2000) รายงานว่าเป็นแบคทีเรียไร้อากาศแกรมบวก และเป็นแบคทีเรียชอบร้อน ที่สามารถรีดิวซ์โครมได้ จากการหมัก woad vat ในยุคกลางยุโรป ซึ่งสายพันธุ์ที่แยกได้สามารถเจริญได้ดีที่ pH 5.9-9.9 (pH เริ่มต้น) โดยมี pH ที่เหมาะสมคือ 7.2 ± 0.2 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ไอโซเลตเป็นสายพันธุ์ใหม่กลุ่มไร้อากาศ *Clostridium isatidis* และมีการแยกเชื้อจากหม้อโครมที่เกาะออกไกโด ประเทศญี่ปุ่น พบแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ที่มีชื่อ *Alkalibacterium psychrotokerans* sp. Nov. มีคุณสมบัติเป็นแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง facultative anaerobe เจริญได้ที่ pH 9-12 ไม่เจริญที่

pH 7-8 สามารถรีดิวส์อินดิโกให้เป็นลิวโคอินดิโก (Yumoto et al., 2004) ต่อมาได้มีการแยกเชื้อแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ที่รีดิวส์อินดิโก *Alkavacterium iburiense* มีคุณสมบัติเป็นแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง เป็น Facultative anaerobe เจริญในความเข้มข้นของ NaCl ที่เหมาะสมในช่วงร้อยละ 3-13 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ในช่วง 30-37 องศาเซลเซียส (Nakajima et al., 2005) และเพื่อให้ทราบถึงความสามารถในการรีดิวส์สีครามของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ ได้ทำการจัดกลุ่มเชื้อต้องการออกซิเจน เพื่อที่จะคัดเลือกไปทดสอบความสามารถในการรีดิวส์ Indigo blue เป็น Leuco indigo ในอาหาร PYB (ตารางที่ 4.6) สามารถแยกตามลักษณะสีโคโลนีได้ 5 สี คือ โคโลนีสีเหลืองทอง แกรมลบคัดเลือกเพื่อนำไปทดสอบ 2 ไอโซเลต (ไอโซเลต 1 และ 6) โคโลนีสีเหลืองขุ่นแกรมลบลักษณะกลม 2 ไอโซเลต (ไอโซเลต 4 และ 60) ลักษณะท่อนสั้น 2 ไอโซเลต (ไอโซเลต 26 และ 58) แกรมบวก ลักษณะท่อนสั้น 2 ไอโซเลต (ไอโซเลต 16 และ 36) ลักษณะกลม 2 ไอโซเลต (ไอโซเลต 23 และ 45) โคโลนีสีเหลืองเข้ม ลักษณะกลม สามารถติดสีแกรม บวกมีเพียงแค่ 2 ไอโซเลตเท่านั้น (ไอโซเลต 19 และ 44) โคโลนีสีขาวแกรมลบ ลักษณะกลม 2 ไอโซเลต (ไอโซเลต 3 และ 57) ส่วนแกรมบวกท่อนสั้น เลือก 2 ไอโซเลต 38 และ 53 และโคโลนีสีขาวเหลืองติดสีแกรมลบเท่านั้น มีทั้งลักษณะกลม (เลือก 2 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต 9 และ 25) และท่อนสั้นพบเพียง 1 ไอโซเลต (ไอโซเลต 29)

ตารางที่ 4.6 เชื้อต้องการออกซิเจน เมื่อแบ่งตามสีโคโลนี การย้อมสีแกรม และรูปร่าง (ตัวเลข หน้า = ไอโซเลตที่คัดเลือกที่จะนำไปทดสอบการรีดิวส์อินดิโกเป็นลิวโคอินดิโก)

สีโคโลนี	การย้อมสีแกรม	รูปร่าง	ไอโซเลต
เหลืองทอง	แกรมลบ	กลม	1,6
เหลืองขุ่น	แกรมลบ	กลม	2,4,5,7,22,30,34,40,41,50,60
		ท่อนสั้น	20,26,27,42,43,48,51,56,58,59
	แกรมบวก	ท่อนสั้น	10,11,16,18,28,35,36,47,55,14,15
		กลม	13,17,23,24,31,32,33,37,45,49
เหลืองเข้ม	แกรมบวก	กลม	19,44
สีขาว	แกรมลบ	กลม	3,12,46,54,57
	แกรมบวก	ท่อนสั้น	38,39,53
สีขาวเหลือง	แกรมลบ	กลม	8,9,21,25
		ท่อนสั้น	29

4.3.4 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการรีดิวซ์ Indigo blue เป็น

Leuco indigo

เชื้อจุลินทรีย์กลุ่มต้องการออกซิเจนที่แยกได้จากหม้อหมักครามบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PYA ทั้ง 59 ไอโซเลต ซึ่งสามารถจัดกลุ่มตามรูปร่างเชื้อจุลินทรีย์ การติดสีแกรม และสีโคโลนี ได้ทั้งหมด 11 กลุ่ม (5 กลุ่มใหญ่ ตามลักษณะสีโคโลนี) ส่วนเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มไม่ต้องการออกซิเจนสามารถแยกได้ทั้งหมด 23 ไอโซเลต เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการรีดิวซ์สีครามนำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกไว้ทั้ง 20 ไอโซเลต มาเลี้ยงในอาหารเหลว PYB ที่บรรจุในขวดซีรั่มซึ่งไร้อากาศ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มต้องการออกซิเจนที่สามารถรีดิวซ์สีอินดิโกโดยอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเขียวอ่อนมีเพียงแค่ 3 ไอโซเลต (TSUI4 TSUI36 และTSUI58) ส่วนจุลินทรีย์กลุ่มไม่ต้องการออกซิเจนมีเพียง 2 ไอโซเลต (TSUII5 และTSUII16) ที่สามารถรีดิวซ์สีอินดิโกได้ โดยเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลืองอมเขียว (ภาพที่ 4.10) ผลการทดลองพบว่าเชื้อที่สามารถเปลี่ยนอาหารเหลวจากสีน้ำเงินซึ่งมีส่วนประกอบของเนื้อคราม โดยเนื้อครามจะเป็นแหล่งพลังงานให้แบคทีเรียใช้ โดยเปลี่ยนเป็นสีเขียวนอ่อนอมเหลือง ซึ่งเกิดจาก Indigo blue ถูกรีดิวซ์ในสารละลายต่าง ทำให้กลายเป็น Indigo white ซึ่งจะมีสีเขียวนอ่อนอมเหลือง และเมื่อนำเชื้อมาวัดค่าการดูดกลืนสีมาตรฐานสีเหลืองที่ 485 นาโนเมตร พบค่าการดูดกลืนแสงมากเพราะสามารถรีดิวซ์ Indigo ได้ดีกว่าค่าการดูดกลืนแสงน้อย และพบว่าการรีดิวซ์ของ Indigo blue ใช้เวลานานในการเปลี่ยนเป็น Leuco indigo ซึ่งต้องใช้เวลาจนถึงจะเปลี่ยนสีซึ่งจะมากกว่าการบ่มเชื้อทั่วไป คือมากกว่า 7 วัน ซึ่งจะมีความสอดคล้องกับเวลาที่ใช้ในการรีดิวซ์ Indigo blue เพื่อการย้อมสีผ้าแบบภูมิปัญญาท้องถิ่น คือใช้เวลาหมักมากกว่า 48 ชั่วโมง (อนุรัตน์ สายทอง, 2544) ซึ่งจะเห็นได้ว่าเมื่อเวลาผ่านไปหลายสัปดาห์ปริมาณการรีดิวซ์ Indigo blue เป็น Leuco indigo จะเพิ่มมากขึ้นด้วยอาจจะเกิดจากปริมาณจุลินทรีย์ที่เพิ่มปริมาณมากขึ้นเช่นกัน

สำหรับจุลินทรีย์มีบทบาทในการเปลี่ยนอินดิโกเป็นลิวโคอินดิโกที่มีการรายงานมาก่อนหน้านี้ โดย Padden et al. (2000) ได้แยกเชื้อจุลินทรีย์จากถังหมักผลิตลิวโคอินดิโกจากใบโหระพา (*Isatis tinctoria*) โดยนำใบโหระพาที่บ่มไว้ 2 สัปดาห์หนัก 100 กรัม มาแช่ในน้ำประปาปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่ปรับ pH ให้มีค่า 9.0 ± 0.4 และมีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยหมักไว้เป็นเวลา 8 วัน พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้เป็นสปีชีส์ใหม่ชื่อ *Clostridium isatidis* sp. Nov. มีคุณสมบัติเป็นแกรมบวก เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่ pH 7.2 ± 0.2 ต่อมาได้มีการศึกษากลไกของการรีดิวซ์อินดิโกให้เป็นลิวโคอินดิโก พบว่าเชื้อสามารถย่อยสลายเมดิสีอินดิโกให้มีขนาดเล็กลงและทำให้ค่า Redox potential มีค่าต่ำลงถึง 660 mv (Nicholson. and John. 2005)

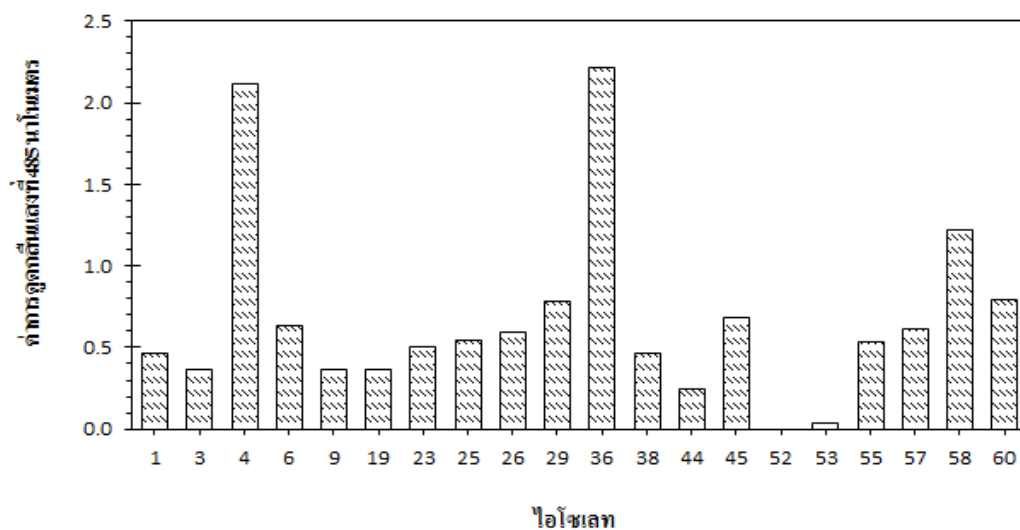


ภาพที่ 4.10 ความสามารถในการรีดิวซ์ Indigo blue เป็น Leuco indigo ของเชื้อกลุ่มต้องการออกซิเจน TSUI36 TSUI4 และ TSUI58 กลุ่มไม่ต้องการออกซิเจน TSUII5 และ TSUII 16 เมื่อเทียบกับอาหาร PYB ไม่เติมเชื้อจุลินทรีย์

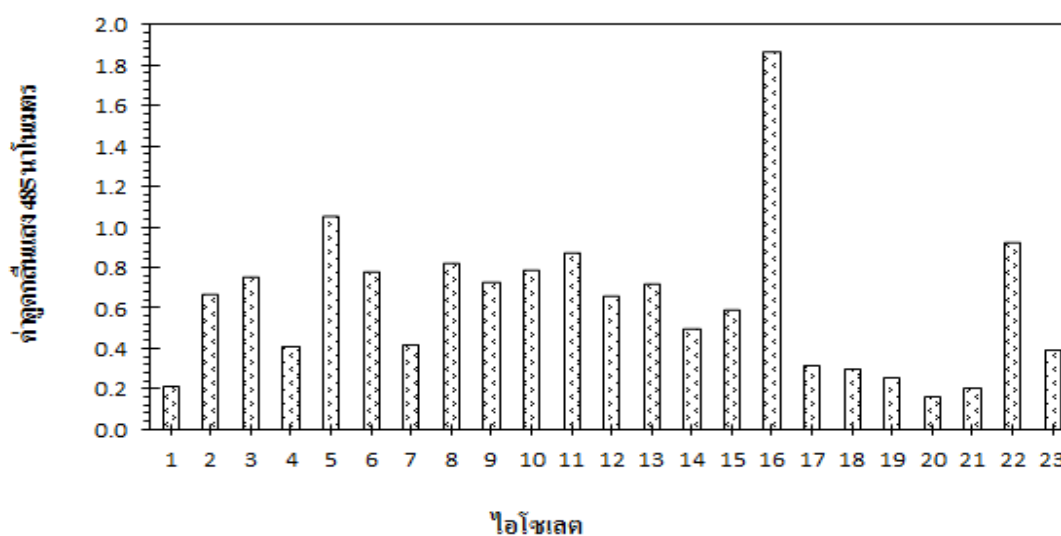
ในกระบวนการเตรียมสีย้อมครามของจังหวัดพัทลุง โดยนำใบคราม (*Indigofera tinctoria* Linn) มาแช่น้ำเพื่อให้เหมาะสำหรับกิจกรรมออกซิเดชันของแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (aerobic microbial oxidation) เพื่อช่วยในการผลิตสีอินดิโก จากนั้นจึงหมักต่อไปในสภาวะที่เป็นด่างสูงมาก pH สูงกว่า 10 ซึ่งในสภาวะเช่นนี้สีอินดิโกจะถูกเปลี่ยนเป็นลิวโคอินดิโก ซึ่งใช้ย้อมผ้าได้ เช่นเดียวกับกระบวนการเตรียมสีย้อมครามในประเทศญี่ปุ่น โดยนำใบครามญี่ปุ่น (*Poligonum tinctorum* Lour) มาผึ่งให้แห้งในที่ร่ม แล้วจึงพรมน้ำให้เปียกเพื่อให้เหมาะสำหรับกิจกรรมออกซิเดชันของแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจน (Yumoto et al., 2004)

และเมื่อทำการตรวจสอบกิจกรรมการรีดิวส์สีอินดิโก (สีน้ำเงิน) ไปเป็นลิวโคอินดิโก (สีเหลือง) โดยนำเชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว PYB ไปวัดกิจกรรมการรีดิวส์ที่ค่าการดูดกลืนแสง 485 นาโนเมตร พบว่าจุลินทรีย์ต้องการออกซิเจนไอโซเลต 36 (แกรมบวก รูปร่างท่อนสั้น) ให้ค่าดูดกลืนแสงที่ 485 นาโนเมตร (สีเหลือง) สูงที่สุด สามารถเปลี่ยน Indigo blue เป็น Leuco indigo โดยอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเขียวอ่อนอมเหลือง รองลงมาเป็นไอโซเลต 4 (แกรมลบ รูปร่างกลม) และ 58 (แกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น) ตามลำดับ ส่วนไอโซเลตอื่นๆ สีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนแปลงได้น้อย (ภาพที่ 4.11) ส่วนจุลินทรีย์ไม่ต้องการออกซิเจนไอโซเลตที่ 16 (แกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น) ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 485 นาโนเมตรสูงที่สุด โดยอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเขียวอ่อนอมเหลือง รองลงมาเป็นไอโซเลต 5 (แกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น) และ 22 (แกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น) ตามลำดับ (ภาพที่ 4.12) ส่วนไอโซเลตอื่นเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อได้เพียงเล็กน้อย และจุลินทรีย์ไม่ต้องการออกซิเจนสามารถรีดิวส์สีครามได้ต่ำกว่า

จุลินทรีย์ต้องการออกซิเจน จากผลการทดลองสังเกตได้ว่า จุลินทรีย์ติดสีแกรมลบมีกิจกรรมการรีดิวซ์สีครามได้ดีทั้งในสภาวะมีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน



ภาพที่ 4.11 แผนภูมิแสดงเชื้อกลุ่มต้องการออกซิเจน เมื่อนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงมาตรฐานสีเหลืองที่ 485 นาโนเมตร โดยดูความเข้มข้นของ Indigo blue ที่เปลี่ยนเป็น Leuco indigo



ภาพที่ 4.12 แสดงเชื้อกลุ่มไม่ต้องการออกซิเจน เมื่อนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงมาตรฐานสีเหลือง ที่ 485 นาโนเมตร โดยดูความเข้มข้นของ Indigo blue ที่เปลี่ยนเป็น Leuco indigo

4.3.5 การทดสอบประสิทธิภาพการรีดิวซ์ Indigo blue เป็น Leuco indigo ของ จุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

ในการทดสอบประสิทธิภาพการรีดิวซ์ครามของจุลินทรีย์ที่แยกได้ทั้งกลุ่มต้องการ ออกซิเจนและไม่ต้องการออกซิเจน ที่ได้คัดเลือกไว้ในการทดลองที่ผ่านมาโดยคัดเลือกจาก ความสามารถในการรีดิวซ์ Indigo blue เป็น Leuco indigo โดยเชื่อที่ค่าดูดกลืนแสงที่ 485 นาโนเมตร สูง ดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 เชื้อที่คัดเลือกที่จะนำมาทดสอบปริมาณการรีดิวซ์ Indigo blue

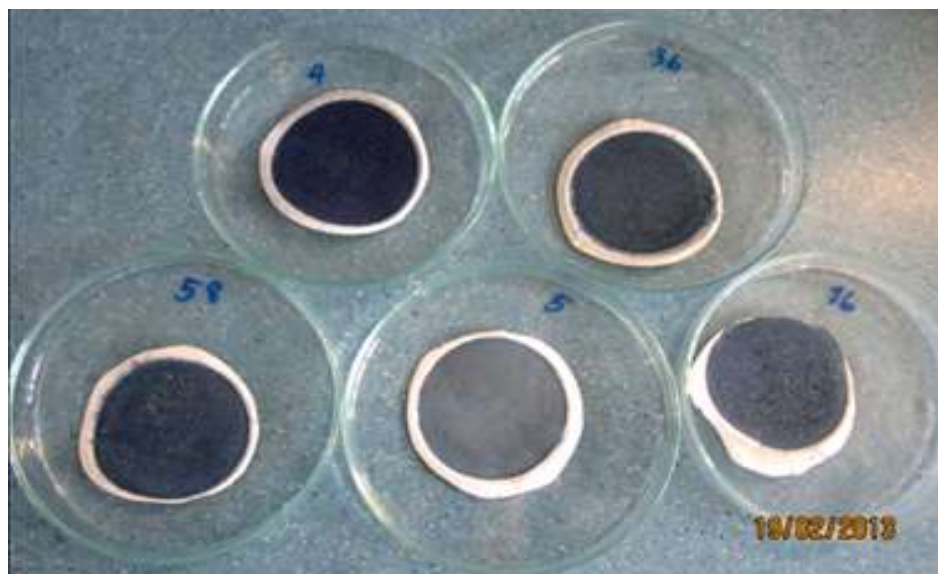
ไอโซเลต	การติดสีแกรม	รูปร่างเชื้อ	สีโคโลนีเชื้อ	ค่า OD _{485 nm}
TSUI4	แกรมลบ	กลม	เหลืองขุ่น	1.056
TSUI36	แกรมบวก	ท่อนสั้น	เหลืองขุ่น	1.222
TSUI58	แกรมลบ	ท่อนสั้น	เหลืองขุ่น	1.118
TSUII5	แกรมลบ	ท่อนสั้น	น้ำขาวขำ	2.213
TSUII16	แกรมลบ	ท่อนสั้น	น้ำขาวขำ	1.870

ตารางที่ 4.8 ปริมาณของแข็งที่เหลือและประสิทธิภาพการรีดิวซ์ Indigo blue เป็น Leuco indigo

ไอโซเลต	ของแข็งเริ่มต้น (กรัม)	ของแข็งที่เหลือ (กรัม)	ประสิทธิภาพการรีดิวซ์ (%)
TSUI4	0.25	0.2075	17.00
TSUI36	0.25	0.1836	26.56
TSUI58	0.25	0.1976	20.96
TSUII5	0.25	0.0247	90.92
TSUII16	0.25	0.1454	41.84

การทดลองเริ่มต้นโดยเติมเชื้อที่คัดเลือกไว้ในอาหารเหลว PYB ที่ไม่ใส่เนื้อคราม อบแห้ง (อบแห้งที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส แล้วนำมาบดจนละเอียด) บ่มไว้ 7 วัน จากนั้น นำมากรองด้วยเครื่องกรอง นำส่วนที่เป็นของแข็งที่กรองได้นั้นไปอบที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส จนแห้งแล้วนำมาชั่งน้ำหนัก แล้วนำเส้นด้ายดิบมาทดสอบการย้อมสีโดยการจุ่มลงไป

ในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ ปล่อยให้เส้นด้ายดิบสัมผัสกับอากาศ สังเกตสีที่เปลี่ยนดังแสดงในภาพที่ 4.13



ภาพที่ 4.13 ตะกอนครามที่เหลือจากการรีดิวซ์ Indigo blue เป็น Leuco indigo ที่ผ่านการอบที่ อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส

จากตารางที่ 4.8 ไอโซเลต TSUII5 มีประสิทธิภาพการรีดิวซ์ Indigo blue เป็น Leuco indigo มากที่สุดที่ 90.9 % และ TSUI4 ย้อมติดของสีได้น้อยที่สุด (17%) โดย TSUII16 TSUII36 และ TSUII58 มีประสิทธิภาพการย้อมใกล้เคียงกัน โดยมีประสิทธิภาพการรีดิวซ์ Indigo blue เป็น Leuco indigo คือ 41.8% 26.5% และ 20.9% ตามลำดับ (ภาพที่ 4.14) และมีปริมาณของแข็งคงเหลือที่ได้จากการกรองอาหารเหลว PYB ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลต คือ TSUII5 TSUII16 TSUII36 TSUII58 และ TSUI4 B4 มีปริมาณของแข็งคงเหลือ 0.0247 กรัม 0.1454 กรัม 0.1836 กรัม 0.1975 กรัม และ 0.2075 กรัม ตามลำดับ จากปริมาณของแข็งเริ่มต้น 0.2500 กรัม ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับตะกอนครามที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสจนแห้งแล้วพบว่า จะมีความสอดคล้องกัน คือ ตะกอนครามยังมีสีเข้มมาก น้ำหนักคงเหลือจะมาก ประสิทธิภาพการรีดิวซ์ Indigo blue เป็น Leuco indigo จะน้อย ซึ่งจะตรงกันข้ามกับตะกอนครามยังมีสีจาง น้ำหนักคงเหลือจะน้อย ประสิทธิภาพการรีดิวซ์ Indigo blue เป็น Leuco indigo จะมาก (ภาพที่ 4.14) ทั้งนี้เมื่อจุ่มเส้นด้ายดิบลงในขวดเชื้อ Indigo white ติดกับเส้นด้ายดิบแล้วเมื่อให้เส้นด้ายดิบสัมผัสกับอากาศก็จะถูกออกซิไดซ์ด้วยออกซิเจนในอากาศแล้วทำให้ Indigo white กลายเป็น Indigo blue การย้อมติดสีจึงกลายเป็นสีน้ำเงิน



ภาพที่ 4.14 การย้อมสีเส้นด้ายดิบด้วยเชื้อที่คัดแยกได้ทั้ง 5 ไอโซเลต

4.4 การผลิตกล้าเชื้อจุลินทรีย์ และการผลิตกล้าเชื้อจุลินทรีย์ผงแห้ง

การเตรียมกล้าเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้จุลินทรีย์ 1 สายพันธุ์และจุลินทรีย์ผสมหลายสายพันธุ์ จุลินทรีย์สายพันธุ์ TSUII5 มีความสามารถในการรีดิวซ์สี Indigo blue ได้ดีที่สุดไม่ว่าจะใช้ในรูปแบบเชื้อเดี่ยว หรือ เชื้อผสม ความสามารถในการรีดิวซ์สี Indigo blue ของสายพันธุ์ TSUII5 รูปแบบเชื้อเดี่ยว ($OD_{485nm}=3.4$) หรือ เชื้อผสม ($OD_{485nm}=2.9-3.6$) ผสมกับทั้ง 4 สายพันธุ์มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกันกับการใช้สายพันธุ์ TSUII5 ในรูปแบบเชื้อเดี่ยว ดังนั้น การเตรียมกล้าเชื้อและการทำผงจึงเลือกเฉพาะสายพันธุ์ TSUII5 ไปใช้

4.5 สร้างบทเรียนวิทยาศาสตร์จากภูมิปัญญาการย้อมสีคราม

สร้างบทเรียนวิทยาศาสตร์จากภูมิปัญญาท้องถิ่นโดยใช้เทคนิคการวิจัยแบบมีส่วนร่วมที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทำสีครามและจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง โดยการทำแผนพับ ภูมิปัญญาการย้อมสีคราม วิธีการทำ และจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง (ภาพที่ 4.15)

ตารางที่ 4.9 ปริมาณการรีดิวซ์ Indigo blue ของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือก แบบผสมและแบบเดี่ยว

Run	TSUI4	TSUI36	TSUI58	TSUII5	TSUII16	OD _{485nm}
1	0	1	1	1	1	3.2
2	1	0	1	1	1	3.6
3	1	1	0	1	1	3.4
4	1	1	1	0	1	0.7
5	1	1	1	1	0	2.9
6	1	0	0	0	0	0.5
7	0	1	0	0	0	0.7
8	0	0	1	0	0	0.6
9	0	0	0	1	0	3.4
10	0	0	0	0	1	0.4
11	1	1	0	0	0	0.6
12	1	1	1	0	0	0.8
13	1	0	1	0	0	0.4
14	1	0	0	1	0	2.7
15	1	0	0	0	1	0.9
16	0	1	1	0	0	0.5
17	0	1	0	1	0	2.6
18	0	1	0	0	1	0.4
19	0	0	1	1	0	2.7
20	0	0	1	0	1	0.6
21	1	0	1	0	1	0.5
22	1	1	1	0	0	0.8
23	1	0	1	1	0	3.1
24	1	0	0	1	1	3.5
25	0	1	1	1	0	3.1
26	0	1	0	1	1	3
27	0	0	1	1	1	3.3

ต้นคราม (Indigofera tinctoria Linn.)

ต้นครามอยู่ในวงศ์ Leguminosae เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก สูง ๑ เมตร ผลเป็นฝักยาวแบน มีขนปกคลุมทั่วทั้งต้น ใบเป็นคู่ขนานตรงข้าม ใบยาวประมาณ ๑-๒ ซม. ดอกเป็นช่อสีม่วงอมฟ้า ออกดอกเป็นช่อสั้นๆ ตามซอกใบและปลายกิ่ง ผลเป็นฝักยาวแบน มีขนปกคลุมทั่วทั้งฝัก



จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับคราม

การหมักคราม

กระบวนการทำครามและย้อมครามเป็นปฏิกิริยาเคมี ซึ่งการย้อมครามจะเกิดขึ้นในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงและมีความชื้นสูง ซึ่งจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย้อมครามได้แก่ Bacillus subtilis, Aspergillus niger, และ Trichoderma reesei

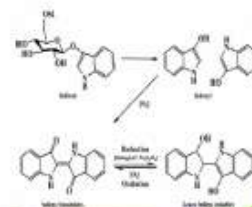


คราม

ภูมิปัญญาสืบทอดจากรุ่นสู่รุ่น

สีย้อมคราม

คราม (Indigo) เป็นสีย้อมธรรมชาติที่ได้จากพืชคราม (Indigofera tinctoria) ซึ่งพบในธรรมชาติในรูปของอินดิกลูซีน (Indigotin) หรืออินดิกลูซีน (Indigo) ซึ่งจะถูกไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เบคทีเรีย (Bacterial Indigoase) ที่พบในธรรมชาติของพืชครามหรือจากจุลินทรีย์ที่หมักพืชครามเพื่อผลิตอินดิกลูซีน (Indigo) และอินดิกลูซีน (Indigo) จะถูกออกซิไดส์เพื่อผลิตอินดิโก (Indigo) ซึ่งเป็นสีย้อมธรรมชาติ





๑. ปลูกครามในแปลง

๒. เก็บเกี่ยวคราม

๓. สบครามจนขาว

๔. แช่ครามในน้ำ

๕. แช่ครามในน้ำ

๖. แช่ครามในน้ำ

๗. แช่ครามในน้ำ

๘. แช่ครามในน้ำ

ภูมิปัญญาท้องถิ่นในการทำสีย้อมคราม

สีย้อมครามทำจากพืชคราม (Indigofera tinctoria) ซึ่งพบในธรรมชาติในรูปของอินดิกลูซีน (Indigotin) หรืออินดิกลูซีน (Indigo) ซึ่งจะถูกไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เบคทีเรีย (Bacterial Indigoase) ที่พบในธรรมชาติของพืชครามหรือจากจุลินทรีย์ที่หมักพืชครามเพื่อผลิตอินดิกลูซีน (Indigo) และอินดิกลูซีน (Indigo) จะถูกออกซิไดส์เพื่อผลิตอินดิโก (Indigo) ซึ่งเป็นสีย้อมธรรมชาติ

เมื่อครามได้ผลิตสีย้อมครามแล้วจะหมักครามในน้ำเพื่อผลิตครามในน้ำ (Indigo dye) ซึ่งสามารถย้อมผ้าได้ โดยนำครามในน้ำไปแช่ผ้าที่ต้องการย้อมครามในน้ำครามในน้ำ (Indigo dye) แล้วนำผ้าที่แช่ครามในน้ำไปตากแดดเพื่อให้ครามในน้ำแห้งและกลายเป็นสีย้อมคราม (Indigo dye) ซึ่งสามารถย้อมผ้าได้

ภาพที่ 4.15 แสดงแผ่นพับ ภูมิปัญญาการย้อมสีคราม วิธีการทำ และจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

ภูมิปัญญาการย้อมผ้าด้วยสีครามธรรมชาติมี 3 ขั้นตอน ได้แก่การสกัดสีครามจากต้นคราม การเตรียมสีครามด้วยกระบวนการหมัก และการย้อมผ้าด้วยสีคราม ซึ่งมีปัญหายุ่งยากในการย้อมผ้าด้วยสีครามธรรมชาติคือการเตรียมสีคราม ด้วยกระบวนการหมักเพื่อการย้อม เนื่องจากต้องใช้เวลานานและไม่สามารถควบคุมการเกิดสีได้ตามต้องการ พบว่าต้องใช้เวลา 15-20 วันจึงจะเกิดสีครามหรือบางครั้งไม่เกิดเลย การดูแลรักษาหม้อหมักครามให้คงสภาพเดิมนั้นทำได้ยาก (อนรุจน์ สายทอง, 2544 และ งามนิจ นนทโส, 2551) บุคคลที่มีประสบการณ์เท่านั้นจึงจะหมักครามให้เป็นสีเหลืองเข้ม และทำให้ผ้าที่ถูกย้อมเป็นสีเหลืองอ่อน พอสัมผัสกับอากาศจะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีคราม การย้อมสีครามนั้นทำได้ยากเป็นกระบวนการที่ต้องใช้เวลาและการเอาใจใส่ การเตรียมสีคราม ด้วยกระบวนการหมักเพื่อการย้อม อาศัยกลุ่มจุลินทรีย์จากดิน และตะกอนดินใต้แม่น้ำที่เลี้ยงต่อๆกันมาเพื่อเปลี่ยนสารสกัดจากต้นคราม (Indigo blue) ไปเป็นสารสีเหลือง (leuco indigo) ขั้นตอนนี้ใช้เวลาค่อนข้างนานในการเลี้ยง คุณภาพของสีไม่สม่ำเสมอ และมีความเสี่ยงจากการตายของจุลินทรีย์สูง เพื่อเพิ่มขีดความสามารถในการผลิต และความสะดวกในการเตรียมหม้อเลี้ยงครามให้กับผู้ประกอบการสามารถเตรียมผลิตภัณฑ์สีครามได้อย่างสม่ำเสมอและมีคุณภาพสูง และใช้เวลาผลิตสั้น นั้น การเข้าใจการทำงานของจุลินทรีย์ในหม้อหมักครามจึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการพัฒนาการเตรียมสีคราม ด้วยกระบวนการหมักเพื่อการย้อม งานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายที่จะพัฒนาผลิตภัณฑ์ กล้าเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในกระบวนการหมักครามให้มีคุณภาพของสีสม่ำเสมอ และมีความสะดวกในการเตรียมหม้อเลี้ยงคราม โดยศึกษาองค์ประกอบของจุลินทรีย์ ในหม้อคราม และจุลินทรีย์ที่เด่น ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) คัดแยกจุลินทรีย์ที่เด่นในหม้อคราม และจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการรีดิวซ์อินดิโก (น้ำเงิน) ให้เป็นลิวโคอินดิโก (เหลือง) นำไปพัฒนาต้นกล้าเชื้อในการเตรียมสีครามเพื่อการย้อมผ้าด้วยเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นกระบวนการย้อมสีผ้าทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพและมีความเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

ศึกษาวิจัยโดยออกแบบการวิจัยให้เป็นลักษณะงานวิจัยเชิงสำรวจแบบมีส่วนร่วม จากชุมชนเพื่อส่งเสริมให้ชาวบ้านเรียนรู้กระบวนการในการทำวิจัย และสามารถยกระดับภูมิปัญญาของตนเองที่มีอยู่ในท้องถิ่น เพื่อให้คนในชุมชนได้เห็นคุณค่าของทรัพยากรในพื้นที่ โดยข้อมูลที่ใช้ประกอบด้วยข้อมูลทุติยภูมิที่ได้จากการรวบรวมเอกสาร ทางวิชาการ ตำราเรียน บทความต่างๆ วารสาร เอกสารการประชุม สัมมนาและรายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องที่ได้จัดทำไว้แล้ว และข้อมูลปฐมภูมิที่ได้จากการสัมภาษณ์แบบเป็นทางการและไม่เป็นทางการ การจัดกลุ่มสนทนากลุ่ม การสังเกตจากกลุ่มทำครามพื้นบ้าน ครัวภูมิปัญญา ปราชญ์ชาวบ้าน และกลุ่มชาวบ้านในพื้นที่ซึ่ง

ข้อมูลที่ได้จะประกอบด้วยข้อมูลเชิงคุณภาพร่วมกับข้อมูลเชิงปริมาณ ของการปลูก การทำเนื้อ
 คราม การเลี้ยงหม้อคราม การย้อมสี เก็บตัวอย่างจุลินทรีย์จากหม้อหมักครามที่ดี และส่วนผสม
 ต่างๆของการหมัก มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางด้านเคมี และจุลชีววิ โดยองค์ประกอบทางเคมี
 วิเคราะห์ ปริมาณ Indigo blue (การรีดิวซ์สีคราม) ตามวิธีการของ Aino et al. (2010) pH โดย
 ฟิเอชมิเตอร์ ค่าความเป็นด่างทั้งหมด Total alkalinity ตามวิธีมาตรฐาน (APHA, 1998)
 องค์ประกอบทางจุลชีววิเคราะห์ปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค DGGE นำน้ำหมัก
 จากหม้อครามในช่วงเวลาที่มีการหมักมีปริมาณสารอินดิโกสูง มาแยกเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้ความรู้
 จากการศึกษาองค์ประกอบของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล มาออกแบบสูตรอาหารที่ใช้
 ในการแยกเชื้อ สภาวะที่เหมาะสมในการแยกเชื้อ เก็บโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหารไปศึกษา
 คุณสมบัติทางสรีระ รูปร่าง และปฏิกิริยาทางชีวเคมี และ พันธุกรรมของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้
 และนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการรีดิวซ์สีอินดิโกของแต่ละสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ สร้าง
 บทเรียนวิทยาศาสตร์จากภูมิปัญญาท้องถิ่นโดยใช้เทคนิคการวิจัยแบบมีส่วนร่วมที่เกี่ยวข้อง กับ
 กระบวนการทำสีครามและจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง โดยการทำแผ่นพับ ภูมิปัญญาการย้อมสีคราม
 วิธีการทำ และจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง

การย้อมสีครามของกลุ่มทอผ้าแพรวกา อำเภอกวนขนุน จังหวัดพัทลุง พบว่า
 กระบวนการย้อมสีครามประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนเตรียมเนื้อคราม ขั้นตอนการหมัก
 คราม และขั้นตอนการย้อม น้ำหมักจากหม้อหมักเนื้อครามมีสภาพเป็นด่าง (pH=10.0) และมี
 ปริมาณลิวโคอินดิโกสูง (320 มิลลิกรัมต่อลิตร) จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการรีดิวซ์สีอินดิ
 โก (น้ำเงิน) ให้เป็นลิวโคอินดิโก (เหลือง) จากหม้อหมักครามมีทั้งแบคทีเรียและอาร์เคียที่พบ
 เติบโตด้วยแบคทีเรียในกลุ่ม *Atopostipes* sp. *Clostridium* sp. *Sporomusa acidovorans*
Amphibacillus sp. *Alkalibacterium* sp. *Lactobacillus* sp. และ *Actinomycetales bacterium*
 ส่วนอาร์เคียเด่นด้วย *Haloterrigena* sp. และ *Haloarchaeon* sp. แยกเชื้อจุลินทรีย์ที่เด่นในหม้อ
 ครามด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อได้จุลินทรีย์กลุ่มต้องการออกซิเจนจำนวน 59 สายพันธุ์ กลุ่มไร้ออก
 ซิเจนจำนวน 37 สายพันธุ์ คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์สีอินดิโกได้ 5
 สายพันธุ์ คือ TSUI4 TSUI36 TSUI58 TSUII5 และ TSUII16 มีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์สีอิน
 ดิโกไปเป็นลิวโคอินดิโกได้ร้อยละ 17 26.5 20.9 90.9 และ 41.8 ตามลำดับ เมื่อนำมาย้อม
 เส้นด้ายดิบพบว่า สายพันธุ์ TSUII5 มีความสามารถในการย้อมติดสีมากที่สุดโดยจะให้เส้นด้าย
 ดิบเป็นสีน้ำเงินเข้ม ส่วนสายพันธุ์ TSUI4 TSUI36 TSUI58 และ TSUII16 จะย้อมไม่ค่อยติดสี
 กล้าเชื้อผสมสายพันธุ์ TSUII5 ($OD_{485nm}=3.4$) แบบเดี่ยวเมื่อนำมาหมักครามมีสภาพ
 ใกล้เคียงกับแบบเชื้อผสมกับอีก 4 สายพันธุ์ ($OD_{485nm}=2.7-3.6$) สายพันธุ์ TSUII5 เหมาะที่จะ
 นำมาเตรียมเป็นกล้าเชื้อสำหรับย้อมสีคราม TSUII5 จัดจำแนกด้วยยีน 16S rRNA มีความ
 เหมือนกับสายพันธุ์ *Alkalibacterium* sp. ร้อยละ 98 สำหรับเชื้อที่ไม่ต้องการออกซิเจนจากการ
 ตรวจสอบการเจริญในสภาพของ anaerobic jar อาจจะประกอบด้วยจุลินทรีย์กลุ่ม facultative

anaerobic หากต้องการทราบว่าเป็นจุลินทรีย์กลุ่มไร้อากาศควรต้องมีการทดสอบการเจริญในสภาวะที่มีอากาศอีกครั้ง

การค้นพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Alkalibacterium* sp. TSUII5 เป็นแบคทีเรียหลักที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย้อมสีครามของกลุ่มย้อมผ้าแพรรหา พัทลุง นักวิจัยได้นำจุลินทรีย์ชนิดนี้มาทำเป็นกล้าเชื้อผงและได้ทดลองใช้กับกลุ่มซึ่งให้ผลเป็นที่น่าพอใจเตรียมได้รวดเร็ว ให้สีสูงง่ายต่อการดูแล และไม่ต้องเลี้ยงอยู่ตลอดเวลา และการขยายผลโดยการสร้าง บทเรียนวิทยาศาสตร์จากภูมิปัญญาท้องถิ่นโดยใช้เทคนิคการวิจัยแบบมีส่วนร่วมที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทำสีครามและจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง โดยการทำแผ่นพับ ภูมิปัญญาการย้อมสีครามวิธีการทำ และจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง ทำให้ชาวบ้านและนักเรียนในพื้นที่เข้าใจกระบวนการทำครามมากขึ้น และสนใจที่จะทำผ้าย้อมสีครามเพราะเตรียมได้ง่าย

ผลผลิต

1. Singkhala, A., Mamimin, C., Birkeland, N.K. and O-Thong, S. 2013. Bacteria and archaea community characterization of indigo fermentation from Thailand indigo dye vat. The 5th international conference on fermentation technology for value added agricultural Products, August 21st-23st, Khon Kaen Thailand.
2. สมพงศ์ โอทอง, เบญจวรรณ บัวขวัญ และ ชลธิชา มามิมิน. 2556. นวัตกรรมจากภูมิปัญญาท้องถิ่นในมรดกทางวัฒนธรรมของการพัฒนาต้นเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในกระบวนการผลิตสีครามจากต้นครามและการเก็บรักษาสีครามในสภาพที่เหมาะสมต่อการใช้งาน . HERP conference, พิษณุโลก ประเทศไทย.
3. สมพงศ์ โอทอง และ เบญจวรรณ บัวขวัญ. 2555. นวัตกรรมจากภูมิปัญญาท้องถิ่นในมรดกทางวัฒนธรรมของการพัฒนาต้นเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในกระบวนการผลิตสีครามจากต้นครามและการเก็บรักษาสีครามในสภาพที่เหมาะสมต่อการใช้งาน . HERP conference, เชียงใหม่ ประเทศไทย.

รางวัล

1. Poster Presentation Award 2013. The 5th international conference on fermentation technology for value added agricultural Products, August 21st-23st, Khon Kaen Thailand.

รายงานสรุปการเงิน
เลขที่โครงการ (R-11/2554A10562037)
โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ
สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา มหาวิทยาลัยทักษิณ
โครงการนวัตกรรมจากภูมิปัญญาท้องถิ่นในมรดกทางวัฒนธรรมของการ พัฒนากล้าเชื้อจุลินทรีย์
เพื่อใช้ในการกระบวนการหมักสีครามจากต้นครามและ
การเก็บรักษาสีครามในสภาพที่เหมาะสมต่อการย้อม

รายนามคณะผู้วิจัย

- 1) **ดร. สมพงศ์ โอทอง** หัวหน้าโครงการ
 สถานที่ทำงาน สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง 93110
 โทรศัพท์/ โทรสาร 074-693992
- 2) **นางสาวเบญจวรรณ บัวขวัญ** ผู้ร่วมวิจัย
 สถานที่ทำงาน วิทยาลัยภูมิปัญญาชุมชน มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง จังหวัดพัทลุง 93110
 โทรศัพท์ 074-685255 โทรสาร 074685256
- รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่...1 กันยายน 2554. ถึงวันที่..31 สิงหาคม 2555
 ระยะเวลาการดำเนินการ 1 ปี.เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 กันยายน 2554 ถึง วันที่31 สิงหาคม 2555

รายจ่าย

หมวด	รายจ่ายสะสม จากรายงาน ครั้งก่อน	ค่าใช้จ่าย งวดปัจจุบัน	รวมค่าใช้จ่าย สะสมจนถึง งวดปัจจุบัน	งบประมาณ รวมทั้งโครงการ	คงเหลือ (หรือเกิน)
1. ค่าตอบแทน	6,000	30,000	36,000	36,000	0
2. ค่าจ้าง	72,000	0	72,000	72,000	0
3. ค่าวัสดุ	117,000 0	0	117,000	117,000	0
4. ค่าใช้สอย	45,000	0	45,000	45,000	0
5. ค่าใช้จ่ายจัดประชุม	30,000	0	30,000	30,000	0

รวม 300,000 บาท

จำนวนเงินที่ได้รับและจำนวนเงินคงเหลือ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1	150,000 บาท	เมื่อ.....
งวดที่ 2	120,000 บาท	เมื่อ.....
งวดที่ 2	30,000 บาท	เมื่อ.....

รวม 300,000 บาท

.....
 (ดร.สมพงศ์ โอทอง)
 ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

.....
 ลงนามเจ้าหน้าที่การเงินโครงการ

บรรณานุกรม

- งามนิจ นนทโส . (2547). Systematic Bacteriology laboratory. ขอนแก่น: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัย ขอนแก่น.
- จิระศักดิ์ เกษรสุวรรณ. (2552). “การวิเคราะห์สารสีผสมอาหารที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารโดยไม่ใช้เครื่องวัดสี”, วารสารวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม. 10(1), 1-14.
- ประไพ ทองเชิญ. (2552). การกลับมาของสีครามภาคใต้. กรุงเทพฯ: สำนักกองทุนสนับสนุนการวิจัย.
- ไพศาล คงกาญจาย อรุณศิริ ชิตางกูร และเจลิยว หมดอ้ว . (2543). รายงานโครงการวิจัยการพัฒนาเทคนิคการย้อมไหมด้วยสีธรรมชาติจากครามและครั่ง . กรุงเทพฯ : สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.
- สไว มัฐผา. (2550). อนุกรมวิธานและการใช้ประโยชน์ของพืชสกุลคราม (วงศ์ถั่ว) ในประเทศไทย.วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- อนุรัตน์ สายทอง . (2544). “การผลิตสีครามจากต้นคราม ตอนที่ 1 ต้นครามและสีคราม ”, วิทยาศาสตร์. 55(1), 55-60.
- อัจฉราพร ไสละสุต. (2527). คู่มือการย้อม. กรุงเทพฯ: เทคนิค 19 การพิมพ์.
- Aino, K., Narihiro, T., Minamida, K., Kamagata, Y., Yoshimune, K. and Yumoto, I. (2010). “Bacterial community characterization and dynamics of indigo fermentation”, Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology. 74, 174-183.
- APHA AWWA and WEF. (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21th edition. Washington DC: American Public Health Association.
- Ausubel, F.M., Brent, R, Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1995). Short protocols in molecular biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology. 3rd edition. New York: Wiley & Sons.
- Bozic, M. and Kokol, V. (2008). “Ecological alternatives to the reduction and oxidation processes in dyeing with vat and sulphur dyes”, Dyes and Pigments. 76, 299-309.
- Chanayath, N., Lhieochaiphant, S. and Phutrakul, S. (2002). “Pigment extraction techniques from the leaves of *Indigofera tinctoria* Linn. and *Baphicacanthus*

- cusia* brems. and chemical structure analysis of their major components”, Chiang Mai University Journal. 1(2), 149-160.
- Han, H.G., Shin, J.H. and Kim, W.S. (2008). “Optimization of bio-indigo production by recombinant *E. coli* harboring *fmo* gene”, Enzyme and Microbial Technology. 42, 617-623.
- Kongjan, P., O-Thong, S., Kotay, M., Min, B. and Angelidaki, I. (2010). “Biohydrogen production from wheat straw hydrolysate by dark fermentation using extreme thermophilic mixed culture”, Biotechnology and Bioengineering. 105, 899–908
- Maugrad, T.; Enaud, E., de la Sayette; A., Cholsy, P. and Legoy, M.D. (2002). “ β -glucosidase catalyzed hydrolysis from leaves of *Polygonum tinctorium*”, Biotechnology Progress. 18, 1104-1108.
- Minami, Y., Takao, H., Kanafuji, T., Miura, K., Kondo, M., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M. and Matsubara, H. (1997). “Beta-Glucosidase in the indigo plant: intracellular localization and tissue specific expression in leaves”, Plant and Cell Physiology. 38(9), 1069-1074.
- Muyzer, G., De Waal, E.C. and Uitterlinden, A.G. (1993). “Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA”, Applied and Environmental Microbiology. 59, 695–700.
- Nakajima, K., Hirota, K., Nodasaka, Y. and Yumoto, I. (2005). “*Alkalibacterium iburiense* sp. nov., an obligate alkaliphile that reduces an indigo dye”, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 55, 1525–1530.
- Nicholson, S.K. and John, P. (2005). “The mechanism of bacteria indigo reduction”, Applied Microbiology and Biotechnology. 68(1), 117-123.
- Padden, N.A., John, P., Collins, D.M., Hutson, R. and Hall, R.A. (2000). “Indigo-reducing *Clostridium isatidis* isolated from a variety of sources, including a 10th-century viking dye vat”, Journal of Archaeological Science. 27, 953-956.
- Park, S., Ryu, Y.J., Seo, J. and Hur, G.H. (2012). “Isolation and Characterization of Alkaliphilic and thermotolerant bacteria that reduce insoluble indigo to soluble leuco-indigo from indigo dye vat”, Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry. 55, 83-88.

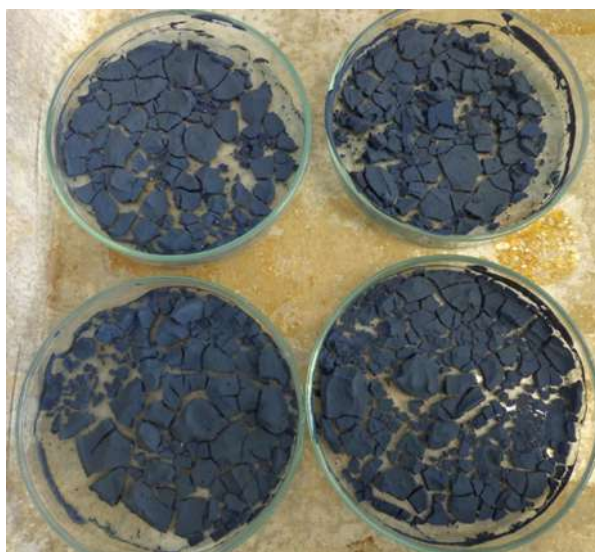
- Stoker, K.G., Cooke, D.T. and Hill, D.J. (1998). "An improved method for the large-scale processing of woad (*Isatis tinctoria*) for possible commercial production of woad indigo", Journal of Agricultural Engineering Research. 71, 315-320.
- Yumoto, I., Hirota, K., Nodasaka, Y., Yokota, Y., Hoshino, T. and Nakajima, K. (2004). "Alkalibacterium psychrotolerans sp. nov., a psychrotolerant obligate alkaliphile that reduces an indigo dye. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 54: 2379-2583.
- Zengler, K., Toledo, G., Rappe', M., Elkins, J., Mathur, E.J., Short, J.M. and Keller, M. (2002). "Cultivating the uncultured", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 99(24), 15681–15686.
- Takahara, Y. and Tanabe, O. (1960). "Studies on the reduction of indigo in industrial fermentation vat (VII)", Journal of Fermentation Technology. 38, 329–331.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก ลักษณะสีย้อมครามและผ้าที่ได้จากการย้อมด้วยสีย้อมครามธรรมชาติ



ภาพผนวกที่ ก1 ตัวอย่างผ้าที่ย้อมจากการหมักครามของ นางกัญญาณี สงคง



ภาพผนวกที่ ก2 เนื้อครามที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส แล้วนำไปบดละเอียด

ประวัตินักวิจัยและคณะ

1. ดร.สมพงศ์ โอทอง

- | | |
|---------------------------|--|
| 1. ชื่อ-สกุล ภาษาไทย | นายสมพงศ์ โอทอง |
| ภาษาอังกฤษ | Mr. Sompong O-Thong |
| 2. หมายเลขประจำตัวประชาชน | 3 8013 00957 791 |
| 3. ที่อยู่ | 132 หมู่ที่ 13 ต.ปลายพระยา อ.ปลายพระยา จ.กระบี่ |
| 4. หมายเลขโทรศัพท์ | 074-693992 ต่อ 2261 (ที่ทำงาน)
0887906992 (มือถือ) |
| 5. E-mail | sompong.o@gmail.com |
| 6. ตำแหน่งปัจจุบัน | อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา (พนักงานมหาวิทยาลัย) |
| 7. สังกัด | ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ
หมายเลขโทรศัพท์/โทรสาร 074-693992 |
| 8. ประวัติการศึกษา | |
| พ.ศ. 2550 | ปร. ด. (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ |
| ชื่อวิทยานิพนธ์ | Optimization and microbial community analysis for production of biohydrogen from palm oil mill effluent by thermophilic fermentative process |
| พ.ศ. 2546 | วท. ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ |
| ชื่อวิทยานิพนธ์ | Study on microbial consortiums from commercial and natural microbial inocula for treating shrimp farming wastewater by using molecular biological techniques |
| พ.ศ. 2544 | วท. บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยทักษิณ เกียรตินิยมอันดับสอง |
| ชื่อโครงการวิจัย | Ammonia removal from saline wastewater by nitrifying bacteria in sequencing batch reactor. |

9.รางวัล

- | | |
|-----------|--|
| พ.ศ. 2550 | วิทยานิพนธ์ระดับดีเยี่ยม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ |
| พ.ศ. 2550 | วิทยานิพนธ์ระดับดีเด่น สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย |
| พ.ศ. 2551 | รับเชิญทำวิจัย ณ ประเทศ ญี่ปุ่น ด้วยทุน JSPS |
| พ.ศ. 2552 | วิทยานิพนธ์ระดับดีเยี่ยม สภาวิจัยแห่งชาติ |
| พ.ศ. 2553 | การแสดงผลงานแบบโปสเตอร์ระดับดีเยี่ยม Asian Biohydrogen, Taiwan |

10. สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา): เทคโนโลยีชีวภาพ
กระบวนการหมัก เทคโนโลยีชีวภาพพลังงาน ผลิตภัณฑ์ทดแทนจากมวลชีวภาพ
ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ เทคโนโลยีชีวภาพสิ่งแวดล้อม กระบวนการและระบบ
บำบัดน้ำเสีย การศึกษาแบคทีเรียชอบร้อน เทคนิคทางด้านอนุวิทยาศาสตร์ทางด้าน
สิ่งแวดล้อม

11. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

10.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย:

1. การพัฒนากระบวนการผลิตพลังงานชีวมวลจากต้นปาล์มอย่างมีประสิทธิภาพ (2553-2554)
2. ศักยภาพทางชีวภาพของจุลินทรีย์ชอบร้อนจากบ่อน้ำพุร้อนในเขตภาคใต้สำหรับการผลิตไบโอฟูเอล (2552-2554)
3. การพัฒนากระบวนการผลิตเอทานอลจากเศษอาหาร โดยการหมักร่วมยีสต์และแบคทีเรีย (2553-2554)

10.2 ผู้ร่วมโครงการวิจัย:

1. กลุ่มวิจัยเพื่อการพัฒนากระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากวัตถุดิบมวลชีวภาพโดยจุลินทรีย์ (สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาแห่งชาติ ปี พ.ศ. 2550-2553)
2. การวิจัยและพัฒนากระบวนการบำบัดไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งแบบน้ำหมุนเวียน (2551-2553)
3. การผลิตไฮโดรเจนและมีเทน (ไบโอไฮเทน) จากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้กระบวนการหมักไร้อากาศแบบสองขั้นตอนที่อุณหภูมิสูงและการประยุกต์ใช้ไบโอไฮเทน (ต.ค. 2553-ต.ค. 2556)

10.3 งานวิจัยที่ทำสำเร็จแล้ว:

1. การพัฒนากระบวนการผลิตพลังงานชีวมวลจากต้นปาล์มอย่างมีประสิทธิภาพ (2552-2553)
2. กลุ่มวิจัยเพื่อการพัฒนากระบวนการผลิต ไฮโดรเจนจากวัตถุดิบมวลชีวภาพโดยจุลินทรีย์ (สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาแห่งชาติ ปี พ.ศ. 2550-2553)

Publications

- O-Thong S. 2010. Enhanced biohydrogen production from palm oil mill effluent with alkalification pretreated by *Thermoanaerobacterium*-rich sludge. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* (accepted manuscript).
- O-Thong S., Fang C., Boe K., Angelidaki I. Thermophilic anaerobic co-digestion of pretreated empty fruit bunches with palm oil mill effluent for efficient biogas production. *Applied Energy* 2011 (accepted manuscript).
- Kongjan P., O-Thong S., Angelidaki I. [Performance and microbial community analysis of two-stage process with extreme thermophilic hydrogen and thermophilic methane production from hydrolysate in UASB reactors.](#) *Bioresour. Technol.* (2011), doi:10.1016/j.biortech.2010.12.009. (Impact factor 4.5).
- O-Thong S., Hniman A., Prasertsan P., Imai T. Biohydrogen production from cassava starch processing wastewater by thermophilic mixed cultures. *Int J Hydrogen Energy* 2010, [doi:10.1016/j.ijhydene.2010.12.053](#) (Impact factor 3.95).
- Hasyim R., Imai T., Reungsang A., O-Thong S. Extreme-thermophilic biohydrogen production by an anaerobic heat treated digested sewage sludge culture. *Int J Hydrogen Energy* 2010, [doi:10.1016/j.ijhydene.2010.06.079](#) (Impact factor 3.95)
- Hniman A., O-Thong S., and Prasertsan P. Developing a thermophilic hydrogen producing microbial consortia from geothermal spring for efficient utilization of xylose and glucose mixed substrates. *Int J Hydrogen Energy.* 2010, [doi:10.1016/j.ijhydene.2010.09.067](#). (Impact factor 3.95)
- Pattra S., Lay C. H., Lin C. Y., O-Thong S., Reungsang A. [Performance and population analysis of hydrogen production from sugarcane juice by non-sterile continuous stirred tank reactor augmented with *Clostridium butyricum*.](#) *Int J Hydrogen Energy.* 2010; in press: doi:10.1016/j.ijhydene.2010.05. (Impact factor 3.95)
- Kongjan P., O-Thong S., Kotay M., Min B. and Angelidaki I. Biohydrogen production from wheat straw hydrolysate by dark fermentation using extreme thermophilic mixed culture. *Biotechnology and Bioengineering* 2010; in press: 10.1002/bit.22616. (Impact factor 4.0)

- Sittijunda S., Reungsang A., O-Thong S. Biohydrogen production from poultry slaughterhouse sludge with dual digestion pretreatment. *Int J hydrogen energy* 2009; 35 (24): 13427-13434. ⁴ Impact factor 3.95
- Prasertsan P., O-thong S. and Birkeland N.K. Optimization and microbial community analysis for production of biohydrogen from palm oil mill effluent by thermophilic fermentative process. *Int J hydrogen energy* 2009; 34: 7448-7459. ⁴ Impact factor 3.95
- Zhao C.X., O-Thong S., Karakashev D., Lu W.J., Wang H.T., Angelidaki I. [High yield simultaneous hydrogen and ethanol production under extreme-thermophilic \(70 °C\) mixed culture environment.](#) *Int J hydrogen energy* 2009; 34 (14): 5657-5665. ⁴ Impact factor 3.95
- O-Thong S, Prasertsan P, Birkeland NK. Evaluation of methods for preparing thermophilic hydrogen producing seeds from anaerobic digested sludge with microbial communities aspects. *Bioresour Technol* 2009; 100: 909-918. ⁴ Impact factor 4.10
- O-Thong S, Prasertsan P, Karakashev D, Angelidaki I. High-rate continuous hydrogen production by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2 immobilized on thermo-treated methanogenic granules. *Int J Hydrogen Energy* 2008; 33: 6498-6508. ⁴ Impact factor 3.95
- O-Thong S, Prasertsan P, Karakashev D, Angelidaki I. Specific detection of *Thermoanaerobacterium* spp., *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, and *Caldicellulosiruptor* spp. in thermophilic biohydrogen producing system by fluorescent in situ hybridization (FISH). *Int J Hydrogen Energy* 2008; 33: 6082-6091. ⁴ Impact factor 3.95.
- O-Thong S, Prasertsan P, Karakashev D, Angelidaki I. Thermophilic fermentative hydrogen production by the newly isolated *Thermoanerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2. *Int J Hydrogen Energy* 2008; 33: 1204-1214. ⁴ Impact factor 3.95.
- O-Thong S, Prasertsan P, Intrasingkha N, Dhamwichukorn S, Birkeland NK. Optimization of simultaneous thermophilic fermentative hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent by *Thermoanaerobacterium*-

rich sludge. *Int J Hydrogen Energy* 2008; 33: 1221-1231. ^๔ Impact factor 3.95

O-Thong S, Prasertsan P, Intrasungkha N, Dhamwichukorn S, Birkeland NK. Improvement of biohydrogen production and pollution reduction from palm oil mill effluent with nutrient supplementation at thermophilic condition using an anaerobic sequencing batch reactor. *Enzyme Microb Technol* 2007; 41: 583-590. ^๔ Impact factor 2.7

Niha N, Siriwat P, O-Thong S, Sukrakarn N, Intrasungkha N. Modification of nitrate determination in saline wastewater by using the copper-cadmium reduction column method and commercial nitrite test kit, Merck Ltd. *Thai Environ Eng J* 2005; 19: 113-121. ^๔ Impact factor 0

O-Thong S, Songsang S, Jaubongo S, Prasertsan P, Intrasungkha N. A field survey of microbial products used in marine shrimp cultivation and preliminary evaluation of their wastewater treatment efficiency. *Thaksin Univ J* 2004; 7: 1-12. ^๔ Impact factor 0

O-Thong S, Jiapakdee R, Intrasungkha N. Wastewater generated from marine shrimp feed and its treatment potential by internal filter system. *Thaksin Univ J* 2003; 6: 41-53. ^๔ Impact factor 0

Submitted manuscripts

O-Thong S., Prasertsan P., Hniman A. 2010. Production of hydrogen and methane from palm oil mill effluent using a two-stage anaerobic digestion process. Submitted to *Int J Hydrogen Energy*.

O-Thong S, Prasertsan P, Intrasungkha N, Birkeland N.K. 2010. Microbial community analysis of thermophilic mixed culture sludge for biohydrogen production. Submitted to *J Appl Microbiol*.

Ye X., Kongjan P., O-Thong S. and Angelidaki I. 2010. Hydrogen and methane production from molasses desugarized soluble (MDS) in thermophilic two stage anaerobic process. Submitted to *Bioresource and Technology*.

Kongjan P., O-Thong S. and Angelidaki I. 2010. Continuous biohydrogen production from xylose by thermophilic mixed culture fermentation in-up flow anaerobic reactors. Submitted to *Int J Hydrogen Energy*.

Kongjan P., O-Thong S. and Angelidaki I. 2010. Biohydrogen production from molasses desugarized soluble (MDS) in the thermophilic fermentation with load shock pretreated-digested manure. Submitted to *Int J Hydrogen Energy*.

Presentations

Hasyim R., Imai T. and O-Thong S. 2010. Fermentative hydrogen production from sago starch by thermophilic enriched culture from hot spring in Southern Thailand *Proceedings of the Environmental Research Event 2010, CQ University, Rockhampton, QLD.*

Intharachood M. and O-Thong S. 2010. Biohydrogen production from cassava starch manufacturing wastewater by thermophilic bacteria. CNWEG 2010, 11-12 February 2010 JB hotel Songkla, Thailand.

Khrueamala R., Katemai W. and O-Thong S. 2010. Isolation of cellulose-degrading bacteria and application for bioethanol production from oil palm trunk. CNWEG 2010, 11-12 February 2010 JB hotel Songkla, Thailand.

Beraheang A., Katemai W. and O-Thong S. 2010. Bioethanol production from old oil palm trunk juice by co-culture of yeast and bacteria. CNWEG 2010, 11-12 February 2010 JB hotel Songkla, Thailand.

Thongdamyu P., Intrasingkha N. and O-Thong S. 2010. Development of ethanol production from canteen food waste by co-culture of yeast and bacteria. CNWEG 2010, 11-12 February 2010 JB hotel Songkla, Thailand.

O-Thong S., Prasertsan P., Karakashev D. and Angelidaki I. 2009. 16S rRNA-targeted probes for specific detection of *Thermoanaerobacterium* spp., *Thermoanaerobacterium Thermosaccharolyticum*, and *Caldicellulosiruptor* spp. by fluorescent in situ hybridization in biohydrogen producing systems. CHE-USDC Congress II, 2009. 27-29 August 2009 Dusit Thani Pattaya hotel Thailand.

Hniman A., O-Thong S. and Prasertsan P. 2009. Community analysis of thermophilic hydrogen-producing bacteria from Southern Thailand geothermal spring enriched with xylose and glucose. Fervaap 2009, 26-28 August 2009 Khon Kaen, Thailand.

- O-Thong S. and Reungsang A. 2009. Potential of using mixed microflora enriched from cattle manure for biohydrogen production from lignocellulosic biomass. Fervaap 2009, 26-28 August 2009 Khon Kaen, Thailand.
- O-Thong S. 2009. Optimization of key parameters for hydrogen production from xylose by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2. Fervaap 2009, 26-28 August 2009 Khon Kaen, Thailand.
- Kongjan P., O-Thong S. and Angelidaki I. 2009. Continuous biohydrogen production from xylose by thermophilic mixed culture fermentation with up-flow anaerobic reactors. Fervaap 2009, 26-28 August 2009 Khon Kaen, Thailand
- Pattra S., Imai T., O-Thong S. and Reungsang A. 2009. Optimization of process parameters on methane production from hydrogenogenic effluent by response surface methodology, Fervaap 2009, 26-28 August 2009 Khon Kaen, Thailand.
- O-thong S., Prasertsan P. and Imai T. 2009. Bioprospecting thermophilic microorganisms from southern Thailand geothermal spring for biohydrogen production from xylose, The 10th Asian hydrogen energy conference AHEC 2009, 8-10 april 2009, Daegu, South Korea.
- Hniman A., Prasertsan P. and O-thong S. 2009. Biohydrogen production from cellulose by syntrophic co-culture of baillus sp. and *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2, The 10th Asian hydrogen energy conference AHEC 2009, 8-10 april 2009, Daegu, South Korea.
- O-Thong S., Prasertsan P., Karakashev D. and Angelidaki I. 2009. Bioaugmentation of an upflow biofilm biohydrogen producing reactors under extreme thermophilic condition for improvement of the hydrogen yield and start up time. BIT's 2nd annual world congress of industrial biotechnology, 5-7 april 2009, seoul South Korea.
- Zhao C.X., O-Thong S., Karakashev D., Lu W.J., Wang H.T., Angelidaki I. 2008. Effect of substrate concentration, pH and nutrient on extreme-thermophilic hydrogen and ethanol production by mixed cultures. The 2008 Asian Biohydrogen Symposium, 26-28 December 2008, Harbin, China.

- Sittijunda S., Reungsang A., O-Thong S. 2008. Biohydrogen production from poultry slaughterhouse sludge with dual digestion pretreatment. The 2008 Asian Biohydrogen Symposium, 26-28 December 2008, Harbin, China.
- O-Thong S., Prasertsan P., Hniman A. 2008. Production of hydrogen and methane from palm oil mill effluent using a two stage anaerobic digestion process. The 2008 Asian Biohydrogen Symposium, 26-28 December 2008, Harbin, China.
- O-Thong S., Prasertsan P., Intrasingkha N., Danle H., Birkeland N.K. 2008. Isolation and microbial community analysis of a thermophilic mixed culture sludge for biohydrogen production. TSB 2008: Biotechnology for global care, 14-17 October 2008, Mahasarakham, Thailand.
- Prasertsan P., O-Thong S. and Birkeland N.K. 2008. Thermophilic biohydrogen production from palm oil mill effluent by mixed culture community using anaerobic sequencing batch reactor (ASBR). International Workshop on Biohydrogen Technology, 6-9 February 2008, Kharagpur, India.
- O-Thong S., Prasertsan P., Karakashev D. and Angelidaki, I. 2008. Specific detection of *Thermoanaerobacterium* spp., *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, and *Caldicellulosiruptor* spp. in thermophilic biohydrogen producing system by fluorescent in situ hybridization (FISH). International Workshop on Biohydrogen Technology, 6-9 February 2008, Kharagpur, India.
- O-Thong S., Prasertsan P., Karakashev D. and Angelidaki, I. 2007. High-rate continuous hydrogen production by natural immobilized *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* strain PSU-2 as biofilm on treated methanogenic granules. World Congress on Anaerobic Digestion. 23-27 September 2007, Brisbane, Australia.
- Prasertsan P., O-Thong S., Intrasingkha N., Dhamwichukorn S. and Nils-Kåre Birkeland. 2007. Thermophilic biohydrogen production from palm oil mill effluent with anaerobic sequencing batch reactor and microbial community structure. The 2nd Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products Conference. 23-25 May 2007, Khonkhen University, Thailand.
- Prasertsan P., O-Thong S., Intrasingkha N., Dhamwichukorn S. and Nils-Kåre Birkeland. 2006. Optimization of simultaneous thermophilic fermentative

hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent by *Thermoanaerobacterium*-rich sludge. IWA World Water Congress. 20-25 October 2006, Beijing China.

O-Thong S., Prasertsan P. 2005. Effect of inoculum source and high temperature on biohydrogen production from palm oil mill effluent using anaerobic mixed cultures. RGJ Seminar Series XXXV: Science Technology and Medicines. 19 August 2005, Prince of Songkla University.

O-Thong S., Intrasungkha N. and Prasertsan P. 2005. Evaluation on the impact of *Bacillales* and *Lactobacillales* augmentation for shrimp farming wastewater improvement by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). 1st IWA-ASPIRE. Conference. 10th –15th July, 2005, Singapore.

Nihah N., Siri watt P., Somjit K., O-Thong S. and Intrasungkha, N. 2004. Modified nitrate determination in saline wastewater by using the cadmium-copper reduction column method incorporating with commercial nitrite test kit (Merck Ltd.). 3rd National Environmental Conference. 28-30 January, 2004. Songkhla, Thailand.

Pochkumnurd N., O-Thong S. and Intrasungkha N. 2004. Effect of C to N ratio on bacterial population dynamics in marine shrimp farming wastewater treatment using sequencing batch reactor (SBR) system. 3rd National Environmental Conference. 28-30 January, 2004. Songkhla, Thailand.

Intrasungkha N., Nihah N., Siri watt P. Ponpay S. and O-Thong S. 2004. Complete nitrogen removal in saline wastewater using two-step sequencing batch reactors. 3rd National Environmental Conference. 28-30 January, 2004. Songkhla, Thailand.

O-Thong S., Pratummanee M., Suksatit S. and Wattanachant C. 2004. Chlorine types and water supply quality on chlorine solubility efficiency to protect pathogenic bacteria and mastitis situation in dairy farms at Paphayom, Phatthalung province. 3rd Southern Animal Science Conference. 18-19 August, 2004. Hat-Yai, Songkhla, Thailand.

Suksatit S., O-Thong S., Odon V. and Wattanachant C. 2004. Preliminary study on microorganisms population change in acidified milk. 3rd Southern Animal Science Conference. 18-19 August, 2004. Hat-Yai, Songkhla, Thailand.

- Suksatit S., O-Thong S., Pratummanee M., Chaicay J., Intrasingkha N., Wattanachant C. 2004. Bulk milk quality analysis in microbiology and milk compositions aspect of dairy farms at Paphayom district, Phatthalung province. 3rd Southern Animal Science Conference. 18-19 August, 2004. Hat-Yai, Songkhla, Thailand.
- Pratummanee M., Sataporn J., Laechan J., O-Thong S., Suksatit S., Intrasingkha N. and Wattanachant C. 2004. Ratio and relationship of *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., total coliform and *Escherichia coli* found in raw mastitis milks. 3rd Southern Animal Science Conference. 18-19 August, 2004. Hat-Yai, Songkhla, Thailand.
- O-Thong S., Prasertsan P. and Intrasingkha N. 2003. Comparison of simultaneous organic carbon and ammonia – nitrogen removal efficiencies from shrimp farming wastewater using commercial and natural microbial inocula in sequencing batch reactor. AsianWaterqual2003 Conference. 19-23 October, 2003. Bangkok, Thailand.
- O-Thong S., Songsang S., Jaubongo S., Prasertsan P. and Intrasingkha N. 2002. Survey of microbial inocula used in shrimp cultivation and preliminary evaluation of their treatment efficiency of shrimp farm effluent in Songkhla province. Thao Ngam Science Consortium Conference. 24-25 November, 2002, Phitsanulok, Thailand.
- Paungfoo C., O-Thong S., Prasertsan P., Intrasingkha N and Bhamidimarri R. (2001). Ammonia removal from saline wastewater by nitrifying bacteria in sequencing batch reactor. Proceeding of Thailand Science and Technology Conference 27th 16-18 October, 2001. Songkhla Thailand.
- Paungfoo C., O-Thong S., Rokaerd S., Prasertsan P., Intrasingkha N and Bhamidimarri R. (2001). Comparison between ammonia removal efficiencies of natural and commercial nitrifying bacteria in saline wastewater by sequencing batch reactor, Proceeding of Thailand Biotechnology Conference, 7-9 November 2001, Bangkok, Thailand.

2. นางสาวเบญจวรรณ บัวขวัญ

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวเบญจวรรณ บัวขวัญ)

เลขบัตรประชาชน 3901100167486

ชื่อ – นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) MISS BENJAWAN BUAKWAN

1.2 ตำแหน่งวิชาการ -

1.3 ตำแหน่งบริหาร หัวหน้าอาศรมภูมิปัญญาสุขภาพะ

1.4 ที่อยู่ทำงาน วิทยาลัยภูมิปัญญาชุมชน มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง ตำบล พนางตุง อำเภอควนขนุน จังหวัดพัทลุง 93150 โทร 074-693976 โทรสาร 074 – 685255

1.5 ที่อยู่บ้าน 12/7 หมู่ที่ 2 ซอย 13 ถนนกาญจนวนิช ตำบลคอหงส์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา รหัสไปรษณีย์ 90110 โทรศัพท์/โทรสารที่ (บ้าน) 074 -445591 ,01-4798202

1.6 ประวัติการศึกษา ศิลปศาสตรมหาบัณฑิต สาขาไทยคดีศึกษา

1.7 ประสบการทำงาน

1.7.1 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องผลงานวิจัย

1) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงการถือครองที่ดินใน เขตตำบลบ้านพรุ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ได้รับการพิจารณาจากคณะกรรมการสอบปริญาณิพนธ์ วิชาเอกไทยคดีศึกษา คณะมนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ ให้เป็นผลงานวิจัยได้ระดับดีเยี่ยม และได้รับการคัดเลือกให้ได้ทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาประจำปี 2541 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

2) การเมืองท้องถิ่นบริเวณลุ่มทะเลสาบสงขลา พ.ศ. 2439-2534 ปีที่พิมพ์เผยแพร่ 2546 สถานภาพในการทำวิจัย เป็น ผู้ช่วยวิจัย

3) ศึกษาคุณภาพชีวิตชาวบ้านชุมชนประมงแหลมนก ตำบลบานา อำเภอเมือง จังหวัดปัตตานี ซึ่งได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยด้านวัฒนธรรมศึกษา จากเงินรายได้ส่วนกลาง ประจำปีงบประมาณ 2546 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี ปีที่แล้วเสร็จ 2547 สถานภาพในการทำวิจัย เป็นนักวิจัย

4) ศึกษารวบรวมภูมิปัญญาพื้นบ้านจังหวัดปัตตานี ซึ่งได้รับทุนสนับสนุนการวิจัย จากเงินรายได้ส่วนกลาง ประจำปีงบประมาณ 2547 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี ปีที่แล้วเสร็จ 2547 สถานภาพในการทำวิจัย เป็นผู้ร่วมวิจัย

5) สถานการณ์งานวิจัยด้านภูมิปัญญาท้องถิ่นที่เกี่ยวข้องกับระบบ สุขภาพและ แนวโน้มการวิจัยในอนาคต ซึ่งได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก สวรส . ภาคใต้ มอ. ปีที่แล้วเสร็จ 2547 สถานภาพในการทำวิจัย เป็นผู้ร่วมวิจัย

6) ศึกษาวิถีชีวิตชุมชนประมงแหลมนก ตำบลบานา อำเภอเมือง จังหวัดปัตตานี ซึ่งได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากทุนส่งเสริม นักวิจัยรุ่นใหม่จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการ

วิจัยร่วมกับสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กำลังดำเนินการ สถานภาพในการทำวิจัย เป็นนักวิจัย

7) การจัดทำฐานข้อมูลและข้อเสนอยุทธศาสตร์เบื้องต้นในการพัฒนากลุ่มผลิตผ้าคลุมผมสตรีและกลุ่มกะปิเยาะห้ในสามจังหวัดชายแดนภาคใต้ ซึ่งได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ปีที่แล้วเสร็จ 2548 สถานภาพในการทำวิจัย เป็นผู้ร่วมวิจัย

8) โครงการวิจัยสำรวจพิพธิภคณท์การเรยนรู้ในเครือขาย : ภาคใต้ ซึ่งได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันพิพธิภคณท์การเรยนรู้แห่ง ชาติ ปีที่แล้วเสร็จ 2549 สถานภาพในการทำวิจัย เป็นผู้ร่วมวิจัย

9) โครงการสร้างเครือขายการมีส่วนร่วมกับชุมชน กรณีศึกษาพัฒนาข้าวเพื่อสุขภาพของผู้ผลิตและผู้บริโภค ปีที่แล้วเสร็จ 2551 สถานภาพในการทำวิจัย เป็นนักวิจัย

10) โครงการพัฒนธรรมคนได้กับการจัดการสุขภาวะ ซึ่งได้รับทุนจากสถาบันวิจัยระบบสุขภาพภาคใต้ (สวรส.) ปีที่แล้วเสร็จ เมษายน 2552 สถานภาพในการทำวิจัย เป็นผู้บริหารงานวิจัย และนักวิจัยหลักประเด็นพัฒนธรรมการดูแลสุขภาพ

11) โครงการของเล่นการละเล่นของเด็กรอบลุ่มทะเลสาบสงขลาเพื่อการจัดการศึกษา ซึ่งได้รับทุนจากงบทำนุบำรุงศิลปวัฒนธรรมปี 2553 มหาวิทยาลัยทักษิณ ปีที่แล้วเสร็จ กันยายน 2553 สถานภาพในการทำวิจัย เป็นผู้บริหารงานวิจัยและนักวิจัย

12) โครงการของเล่นการละเล่นของเด็กรอบลุ่มทะเลสาบสงขลาการจัดการศึกษาเพื่อสุขแท้ วยปัญญา ซึ่งได้รับทุนจากโครงการสุขแท้ด้วยปัญญา เครือขายพุทธิกา ร่วมกับสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยการสร้างเสริมสุขภาพ ปีที่แล้วเสร็จ มีนาคม 2554 สถานภาพในการทำวิจัย เป็นผู้บริหารงานวิจัยและนักวิจัย

1.7.2 ประสบการณ์ที่เกี่ยวกับการบริหารงานการวิจัย

1) ผู้ช่วยหัวหน้าโครงการภูมิปัญญาทักษิณจากวรรณกรรมและพฤติกรรม เป็นโครงการที่ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากฝ่ายนโยบายชาติและความสัมพันธ์ข้ามชาติ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) โดยมีศาสตราจารย์สุธีวงศ์ พงศ์ไพบูลย์ เป็นหัวหน้าโครงการ มีนักวิชาการท้องถิ่น นักวิจัย และชาวบ้านและผู้ที่เกี่ยวข้องกับการวิจัยเข้าร่วมโครงการไม่น้อยกว่า 200 คน

2) เลขานุการโครงการแผนที่ภูมิทัศน์ภาคใต้ : ฐานเศรษฐกิจและทุนวัฒนธรรม เป็นโครงการที่ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากฝ่ายนโยบายชาติและความสัมพันธ์ข้ามชาติ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) โดยมีศาสตราจารย์สุธีวงศ์ พงศ์ไพบูลย์ เป็นหัวหน้าโครงการ

- 3) ผู้ช่วยหัวหน้าโครงการโครงสร้างและพลวัตวัฒนธรรมภาคใต้กับการพัฒนา โดยมีเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ศาสตราจารย์สุริยงค์ พงศ์ไพบูลย์ เป็นหัวหน้าโครงการ ภายใต้การสนับสนุนทุนของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
- 4) เลขานุการ และคณะกรรมการฝ่ายวิชาการโครงการสารานุกรมวัฒนธรรมไทย ภาคใต้ ของมูลนิธิสารานุกรมวัฒนธรรมไทย ฉบับปี พ.ศ.2542
- 5) ผู้ช่วยวิจัยโครงการภูมิปัญญาการนำคนสู่เนื้อธรรมของท่านพุทธทาสภิกขุ ภายใต้กลุ่ม “โครงการภูมิปัญญาทักษิณจากรรณกรรมและพฤติกรรม”
- 6) หัวหน้ากลุ่มงานศึกษาวิจัยสถาบันวัฒนธรรมศึกษากัลยาณิวัฒนา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี

1.8 ผลงานวิชาการอื่น ๆ

1.8.2 หนังสือ

เบญจวรรณ บัวขวัญ . ตัวตลกหนึ่งทะเล : นามลักษณ์แห่งชีวิต. สงขลา : มหาวิทยาลัยทักษิณ, 2552

1.8.2.2 ผลงานบทความวิชาการตีพิมพ์เผยแพร่หนังสือ วารสาร และบทความวิทยุ ดังนี้

1) ผลงานบทความวิชาการตีพิมพ์ในหนังสือ

เบญจวรรณ บัวขวัญ. “ขับ ยอดแก้ว,” ในสารานุกรมวัฒนธรรมไทยภาคใต้ เล่ม 4. หน้า 1897-1900. กรุงเทพฯ: มูลนิธิสารานุกรมวัฒนธรรมไทย ธนาคารไทยพาณิชย์, 2542.

เบญจวรรณ บัวขวัญ. “บุญรอบ ศรีวิชัย,” ในสารานุกรมวัฒนธรรมไทยภาคใต้ เล่ม 9. หน้า 4077-4078. กรุงเทพฯ: มูลนิธิสารานุกรมวัฒนธรรมไทย ธนาคารไทยพาณิชย์, 2542.

เบญจวรรณ บัวขวัญ. “นาฬิกาเครื่องเก่า,” ในสารานุกรมวัฒนธรรมไทยภาคใต้ เล่ม 8. หน้า 3760-3762. กรุงเทพฯ: มูลนิธิสารานุกรมวัฒนธรรมไทย ธนาคารไทยพาณิชย์, 2542.

เบญจวรรณ บัวขวัญ. “ปู่จั้งจัน,” ในสารานุกรมวัฒนธรรมไทยภาคใต้ เล่ม 10. หน้า 4633-4635. กรุงเทพฯ: มูลนิธิสารานุกรมวัฒนธรรมไทย ธนาคารไทยพาณิชย์, 2542.

เบญจวรรณ บัวขวัญ. “พิพิธภัณฑ์สถานแห่งชาติชุมพร,” ในสารานุกรมวัฒนธรรมไทยภาคใต้ เล่ม 11. หน้า 5437-5443. กรุงเทพฯ: มูลนิธิสารานุกรมวัฒนธรรมไทย ธนาคารไทยพาณิชย์, 2542.

เบญจวรรณ บัวขวัญ. “ราษฎร์อุปถัมภ์วัด,” ในสารานุกรมวัฒนธรรมไทยภาคใต้ เล่ม 13. หน้า 6549-6555. กรุงเทพฯ: มูลนิธิสารานุกรมวัฒนธรรมไทย ธนาคารไทยพาณิชย์, 2542.

เบญจวรรณ บัวขวัญ. “ลัทธิ หนูประดิษฐ์,” ในสารานุกรมวัฒนธรรมไทยภาคใต้ เล่ม 14. หน้า 6790-6792. กรุงเทพฯ: มูลนิธิสารานุกรมวัฒนธรรมไทย ธนาคารไทยพาณิชย์, 2542.

เบญจวรรณ บัวขวัญ. “ศุ บุญเลี้ยง,” ในสารานุกรมวัฒนธรรมไทยภาคใต้ เล่ม 15. หน้า 7521-7522. กรุงเทพฯ: มูลนิธิสารานุกรมวัฒนธรรมไทย ธนาคารไทยพาณิชย์, 2542.

เบญจวรรณ บัวขวัญ. “หอสมุดแห่งชาติกาญจนาภิเษกสงขลา,” ในสารานุกรมวัฒนธรรมไทยภาคใต้ เล่ม 16. หน้า 8545-8546. กรุงเทพฯ: มูลนิธิสารานุกรมวัฒนธรรมไทย ธนาคารไทยพาณิชย์, 2542.

เบญจวรรณ บัวขวัญ. “อัมพร ด้วยปาน,” ในสารานุกรมวัฒนธรรมไทยภาคใต้ เล่ม 18. หน้า 8874-8876. กรุงเทพฯ: มูลนิธิสารานุกรมวัฒนธรรมไทย ธนาคารไทยพาณิชย์, 2542.

2) **ผลิตบทความตีพิมพ์ในวารสาร ตรีตรัง** เช่น วันตรุษจีน : ชาวจีนภาคใต้, สूरียุปราคา: มืดกลางวันที่โคกโพธิ์, แหมและต้มปรุง: กีฬาพื้นบ้านสันตนาการล้ำค่าของชาวพอแม็ง, นิทานพื้นบ้านภาคใต้: กระบวนการเรียนรู้

3) **ผลิตบทความวิทยุเผยแพร่ในรายการบ้านนี้ชื่อศรีตรังช่วงอนุรักษ์วัฒนธรรม** มไทยสถานีวิทยุมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี เช่น หนังสือбуд, คติความเชื่อเรื่องศาสดารัฐของชาวดั, กาหลอ, มุขตลกในวรรณกรรมลายลักษณ์ประเภทนิทาน, วัฒนธรรมไทยคือหัวใจของชาติ, ข้าว:วิถีของชาวไทย, วันตรุษจีน :ชาวจีนภาคใต้, เหล็กขุด :เครื่องมือขุดมะพร้าวพื้นบ้าน, ตะเกียงเก่าปัตตานี, วันอนุรักษ์มรดกไทย, วันสงกรานต์ภาคใต้, หัตถกรรมพื้นบ้านภาคใต้, สถาบันวัฒนธรรมศึกษากัลยาณิวัฒนา, นิทานพื้นบ้านภาคใต้, กลิ่น:ประเพณีที่สำคัญของพุทธศาสนิกชน, ปกิณกะวัฒนธรรมภาคใต้ที่เกี่ยวข้องกับช้าง, เส้า :เครื่องมือในการควบคุมช้าง, อาหารการกิน : ภูมิปัญญาไทย, ภูมิปัญญาชาวบ้าน : ธาตุเจ้าเรือน, ดนตรีพื้นบ้านภาคใต้ตอนล่าง, ตีอตรีกับการบำบัดโรคภัยไข้เจ็บชาวไทยมุสลิม, เครื่องรางของขลังในสังคมไทย, วัฒนธรรมการชมศิลปะ และผลิตบทความวิทยุในรายการภูมิปัญญาทุกวันพุธ ของสถานีวิทยุมหาวิทยาลัยทักษิณ