



การคัดแยกแบคทีเรียและการพัฒนาหัวเชื้อเพื่อการย้อมคราม

โดย

นางสาวกัญต์กนิษฐ สุขชะ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

การคัดแยกแบคทีเรียและการพัฒนาหัวเชื้อเพื่อการย้อมคราม

โดย

นางสาวกัญต์กนิษฐ์ สุขชะ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

BACTERIAL ISOLATION AND FEEDING DEVELOPMENT FOR INDIGO DYEING

BY

MISS KANKANIT SUKKA



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
FACULTY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
THAMMASAT UNIVERSITY

ACADEMIC YEAR 2019

COPYRIGHT OF THAMMASAT UNIVERSITY

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

วิทยานิพนธ์

ของ

นางสาวกัญต์กนิษฐ์ สุขชนะ

เรื่อง

การคัดแยกแบคทีเรียและการพัฒนาหัวเชื้อเพื่อการย้อมคราม

ได้รับการตรวจสอบและอนุมัติ ให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

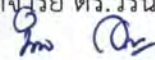
เมื่อ วันที่ 17 สิงหาคม พ.ศ. 2563

ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



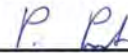
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรนันต์ นาคบรรพต)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์



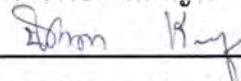
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิรมล ศากยวงศ์)

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์



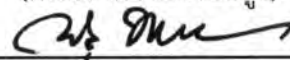
(รองศาสตราจารย์ ดร.เพ็ญวิสาข์ พิสิฐฐศักดิ์)

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์



(ดร.นิษาดา เจียรนัยกุล)

คณบดี



(รองศาสตราจารย์ ดร.ณัฐนนท์ หงส์วริทธิ์ธร)

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดแยกแบคทีเรียและการพัฒนาหัวเชื้อเพื่อการย้อมคราม
ชื่อผู้เขียน	นางสาวกัญต์กนิษฐ์ สุขชะ
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
สาขาวิชา/คณะ/มหาวิทยาลัย	สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิรมล ศากยวงศ์
ปีการศึกษา	2562

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพต่อกระบวนการย้อมอินดิโกเพื่อประยุกต์ใช้กับกระบวนการย้อมอินดิโกแบบธรรมชาติ จากการคัดแยกแบคทีเรียในน้ำย้อมอินดิโกพบแบคทีเรีย 18 ไอโซเลท เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์อินดิโกพบแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท ได้แก่ SKTU2, SKTU4, SKTU8, SKTU15 และ SKTU16 โดยพบว่าระยะเวลาในการบ่มแปรผันตรงกับปริมาณอินดิโกที่เกิดขึ้น หลังจากนั้นนำอินดิโกที่ได้วิเคราะห์ด้วยเทคนิค UV-visible spectrophotometry โครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง และ Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy พบว่าอินดิโกที่ได้จากแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ค่าระยะทางที่สารเคลื่อนที่ต่อระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (R_f) และโครงสร้างของหมู่ฟังก์ชันคล้ายคลึงกับอินดิโกมาตรฐาน จากการศึกษาตัวอย่างเซลล์แบคทีเรียไอโซเลท SKTU16 ด้วยเทคนิค Synchrotron-based Fourier transforms infrared microspectroscopy พบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Amide I ของ beta-sheet เพิ่มขึ้นภายในเซลล์แบคทีเรียที่บ่มกับสารละลายอินดิแคนซึ่งแตกต่างจากเซลล์แบคทีเรียที่ไม่ได้บ่มกับสารละลายอินดิแคน และเมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 18 ไอโซเลท มาศึกษาความสามารถในการรีดิวซ์อินดิโกเป็นลิโวอินดิโก พบแบคทีเรียเพียง 2 ไอโซเลท คือ SKTU3 และ SKTU4 ที่ให้ค่าความเข้มของสีผ้า (K/S) สูงสุดเท่ากับ 7.75 และ 7.13 ตามลำดับ การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพด้วยเทคนิคทางชีวเคมี และทางชีวโมเลกุลพบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม *Bacillus* sp. เมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลท SKTU4 และ SKTU16 ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งโดยมีมอลโทเดกซ์ทรินและกลีเซอรอลเป็นสารป้องกันความเย็น พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 47.86 และ 66.66 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยแบคทีเรียไอโซเลท SKTU16 ให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์อินดิโกเท่ากับ 2.96 มิลลิกรัมต่อลิตร และแบคทีเรียไอโซ

(2)

เลข SKTU4 ให้ประสิทธิภาพในการรีดิวซ์อินดิโกเท่ากับ 6.42 ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่ไม่ผ่านกระบวนการทำแห้ง

คำสำคัญ: การย้อมอินดิโกธรรมชาติ, อินดิแคน, อินดิโก, สารรีดิวซ์, หัวเชื้อ



Thesis Title	BACTERIAL ISOLATION AND FEEDING DEVELOPMENT FOR INDIGO DYEING
Author	Miss Kankanit Sukka
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department/Faculty/University	Department of Biotechnology Faculty of Science and Technology Thammasat University
Thesis Advisor	Assistant Professor Niramol Sakkayawong, Ph.D.
Academic Year	2019

ABSTRACT

The present study aimed to screen and identify bacteria for producing indigo dye from natural Indigo dyeing process. The samples were collected from 10 indigo dye pots (Nin Pots) at KramSakon shop, Sakon Nakhon province, Thailand. 18 bacterial isolates were discovered after the preliminary test in the selective medium at pH 12 for 48 hours. The five most efficient isolates produced indigo including SKTU2, SKTU4, SKTU8, SKTU15 and SKTU16. After that, Indigo from fermentation was characterized by UV-visible spectrophotometry technique, thin layer chromatography technique and Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy technique. Both R_f value and structure of functional groups of indigo obtained from 5 isolates are similar to the standard Indigo. Synchrotron-based Fourier transforms infrared microspectroscopy was used to examine the biomolecular transformation of the isolated SKTU16 cells after indigo fermentation. The results of the second derivative ATR spectra in 3200-2800 and 1800-920 cm^{-1} regions represented the increase in amide I of protein and phospholipids in fermented cells compared to control cells. In addition to this, we found that SKTU3 and SKTU4 are the most effective isolates that capable to convert an Indigo pigment to a water-soluble called leucoindigo and gave the maximum color yield (K/S) at 7.75 and 7.13, respectively. The effective bacterial strains were later identified by using biochemical characterization, and *16S rRNA* nucleotide sequence analysis and

compared with the NCBI database. The results indicated that most of bacterial strains were classified in Bacillus group. The percentage of cell viability of SKTU4 and SKTU16 isolates after freeze drying using maltodextrin and glycerol as cryoprotectant were 47.86 and 66.66, respectively. The efficient for producing Indigo dye by SKTU16 was 2.96 mg /l and the reducing property by SKTU4 was 6.42. There were no significantly difference when compared with the sample before freeze drying.

Keywords: Natural Indigo dyeing process, Indigo, Indican, Reducing agent, Feeding



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีเนื่องจากได้รับความกรุณาจากบุคคล หน่วยงาน และองค์กรต่าง ๆ ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณที่ช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิรมล ศากยวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้ความรู้ คำปรึกษา อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการทำวิทยานิพนธ์ นอกจากนี้ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรรณต์ นาคบรรพต ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.เพ็ญวิสาข์ พิสิษฐศักดิ์ และ ดร.นิชาดา เจียรนัยกุล กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ และแนวทางแก้ไขปัญหาต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการทำวิจัย ตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.เทพปัญญา เจริญรัตน์ และขอขอบคุณ สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ สาขาวิชาเคมี และ สาขาวิชาเทคโนโลยีวัสดุและสิ่งทอ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ได้ให้ความกรุณาแนะนำแนวทาง และเครื่องมือในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงตามเป้าหมาย

ขอขอบพระคุณ นางสาว สุกุณา สาระนันท์ ร้านครามสกล ที่อนุเคราะห์ช่วยเหลือสนับสนุนตัวอย่างในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ดร.กาญจนา ธรรมนุ นักวิทยาศาสตร์ระบบลำเลียงแสงประจำห้องปฏิบัติการระบบลำเลียงแสง BL4.1 ณ สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) จังหวัดนครราชสีมา ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ดร.เฉลิมวุธ สมปาก นาย ภาณุสรณ์ หุ่นทรัพย์ และนายสิทธิรักษ์ สุนทรารักษ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาและแนวทางการแก้ไขปัญหาในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ นางสาวเกตุนารินทร์ ปั้นเพ็ง นักวิทยาศาสตร์ประจำสาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ที่ให้กรุณาให้คำปรึกษาและอุปกรณ์ในการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวที่สนับสนุนและให้โอกาสในการศึกษาตลอดจนกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จ

นางสาวกัญต์กนิษฐ์ สุขชะ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	(1)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(3)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญตาราง	(10)
สารบัญภาพ	(11)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.5 สถานที่ทำการทดลอง	4
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 สีย้อม	5
2.1.1 สีย้อมสังเคราะห์หรือสีเคมี	6
2.1.2 สีย้อมธรรมชาติ	7
2.2 อินดิโก	8
2.2.1 การสกัดสีอินดิโก	9
2.2.1.1 อินดิโกจากพืช	9
2.2.1.2 อินดิโกสังเคราะห์	11

2.2.1.3 อินดิโกจากจุลินทรีย์	11
2.2.2 การรีดิวซ์อินดิโก	17
2.2.2.1 การรีดิวซ์อินดิโกด้วยแบคทีเรีย	17
2.2.2.2 การรีดิวซ์อินดิโกด้วยสารเคมี	19
2.2.3 กระบวนการย้อมอินดิโกธรรมชาติ	20
2.2.3.1 ข้อดีของกระบวนการย้อมอินดิโกธรรมชาติ	21
2.2.3.2 ข้อจำกัดของกระบวนการย้อมอินดิโกธรรมชาติ	22
2.2.4 ปฏิิกิริยาเคมีในกระบวนการย้อมอินดิโกธรรมชาติ	22
2.2.4.1 การสกัดอินดิโก	22
2.3 เทคนิคและเครื่องมือวิเคราะห์	24
2.3.1 การระบุสายพันธุ์แบคทีเรีย	24
2.3.2 การทำแห้งแบบเยือกแข็ง	25
2.3.3 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-vis spectrophotometer)	26
2.3.4 โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin-layer chromatography)	27
2.3.5 Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)	27
2.3.6 Infrared (IR) Spectroscopy and imaging	28
2.3.7 การวิเคราะห์ศักยภาพการเกิดออกซิเดชัน รีดักชัน	29
2.3.8 การวัดค่าสีและความเข้มสี	30
2.3.8.1 ระบบสี CIE L*a*b*	30
2.3.8.2 ความเข้มสี (K/S)	32
บทที่ 3 วิธีวิจัย	33
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	33
3.2 สารเคมี	34
3.3 วิธีดำเนินการวิจัย	36
3.3.1 การศึกษากระบวนการย้อมอินดิโกธรรมชาติ	36
3.3.2 การคัดแยกแบคทีเรียจากน้ำย้อมอินดิโก	36
3.3.2.1 การศึกษาลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยา	36

3.3.2.2 การศึกษาลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาใต้กล้องจุลทรรศน์	36
3.3.2.3 การคัดแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์	37
3.3.3 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการสังเคราะห์อินดิโก	37
3.3.3.1 การเตรียมกล้าเชื้อ	37
3.3.3.2 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์อินดิโก	38
3.3.3.3 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์	39
3.3.4 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการรีดิวซ์อินดิโก	40
3.3.4.1 การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรีย	40
3.3.4.2 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์อินดิโก	41
3.3.4.3 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ต่อการรีดิวซ์อินดิโกในกระบวนการย้อมอินดิโกธรรมชาติ	42
3.3.4.4 การศึกษาคุณสมบัติของผ้าหลังกระบวนการย้อม	43
3.3.5 การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ	43
3.3.5.1 การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีวเคมี	43
3.3.5.2 การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล	43
3.3.6 การพัฒนากล้าเชื้อแห้ง	44
3.3.6.1 การศึกษาการเจริญเติบโต	44
3.3.6.2 การทำแห้งแบบเยือกแข็ง	45
3.3.6.3 การศึกษาอัตราการรอดชีวิต	45
3.3.6.4 การทดสอบประสิทธิภาพในการสังเคราะห์อินดิโก	46
3.3.6.5 การทดสอบประสิทธิภาพในการรีดิวซ์อินดิโกในกระบวนการย้อมอินดิโกธรรมชาติ	46
3.3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	47
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	48
4.1 การศึกษากระบวนการย้อมอินดิโกธรรมชาติ	48

4.2 การเก็บตัวอย่างและการตัดแยกแบคทีเรียจากน้ำย้อมอินดิโก	50
4.3 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการสังเคราะห์อินดิโก	53
4.3.1 การตัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์อินดิโก	53
4.3.2 การวิเคราะห์ผลผลิตภัณฑ์	55
4.4 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการรีดิวซ์อินดิโก	63
4.4.1 การตัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์อินดิโก	63
4.4.2 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการรีดิวซ์อินดิโก	65
4.4.2.1 การศึกษาคุณสมบัติของผ้าหลังกระบวนการย้อม	68
4.5 การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ	74
4.5.1 การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพด้วยวิธีทางชีวเคมี	74
4.5.2 การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล	78
4.6 การพัฒนาการค้าเชื้อแห้ง	80
4.6.1 การศึกษาการเจริญเติบโต	80
4.6.2 การศึกษาอัตราการรอดชีวิต	80
4.6.3 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของกล้าเชื้อที่ทำแห้ง	81
4.6.3.1 การทดสอบประสิทธิภาพของกล้าเชื้อที่ทำแห้งแบบเยือกแข็งในการสังเคราะห์อินดิโก	81
4.6.3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของกล้าเชื้อที่ทำแห้งในการรีดิวซ์อินดิโก	83
4.6.3.3 การศึกษาคุณสมบัติของผ้าหลังกระบวนการย้อม	86
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	90
5.1 สรุปผลการวิจัย	90
5.2 ข้อเสนอแนะ	91
รายการอ้างอิง	92
ภาคผนวก	100

	(10)
ภาคผนวก ก การเตรียมสาร	100
ภาคผนวก ข การเตรียมกราฟมาตรฐาน	101
ภาคผนวก ค ข้อมูลที่ได้จากการวิจัย	103
ประวัติผู้เขียน	122



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	5
2.2	7
2.3	9
2.4	10
2.5	12
2.6	14
2.7	24
2.8	29
2.9	31
3.1	33
3.2	34
4.1	51
4.2	51
4.3	67
4.4	69
4.5	74
4.6	75
4.7	77
4.8	79
4.9	81
4.10	85
4.11	86

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 โครงสร้างทางเคมีของอินดิโก	9
2.2 ลักษณะใบครามและใบฮ่อม	11
2.3 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อินดิโก	11
2.4 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อินดิโกโดยเอนไซม์ cytochrome p450 monooxygenase	13
2.5 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อินดิโกโดยเอนไซม์ naphthalene dioxygenase	15
2.6 ปฏิกิริยาในการรีดิวซ์อินดิโก	17
2.7 การรีดิวซ์อินดิโกด้วยโซเดียมไฮโอไนท์	20
2.8 กระบวนการเปลี่ยนสารตั้งต้นที่พบในพืชเป็นสีอินดิโก	22
2.9 โครงสร้างอินดิรูบิน	23
2.10 ปฏิกิริยาการย้อมอินดิโกธรรมชาติ	23
2.11 CIELAB 1976 แสดง L, a, b color space	31
4.1 ลักษณะของใบคราม (ก) และฝักคราม (ข) ณ ร้านครามสกกล จังหวัดสกลนคร	48
4.2 การสกัดสีอินดิโกจากใบครามโดยการแช่ในน้ำสะอาด	49
4.3 ส่วนประกอบสำหรับการก่อกมย้อม	50
4.4 บริเวณเก็บตัวอย่างน้ำย้อมอินดิโก	49
4.5 ปริมาณอินดิโกในชั่วโมง 0, 24, 48, 72 และ 96 ของแบคทีเรียไอโซเลท SKTU2, SKTU4, SKTU8, SKTU15 และ SKTU16	54
4.6 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียไอโซเลท SKTU2, SKTU4, SKTU8, SKTU15 และ SKTU16	54
4.7 UV-Visible spectra ของสารละลายอินดิโกธรรมชาติ สารละลายอินดิโกสังเคราะห์และสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการบ่มแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท	56
4.8 แถบสีต่าง ๆ ของอินดิโกสังเคราะห์ อินดิโกธรรมชาติ และสารละลายผลิตภัณฑ์เมื่อวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง	57
4.9 FTIR spectra ของอินดิโกธรรมชาติ อินดิโกสังเคราะห์ และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการบ่ม แบคทีเรีย 5 ไอโซเลทกับสารละลายอินดิแคน	58

- 4.10 ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Synchrotron-based FTIR
microspectroscopy ของแบคทีเรีย ไอโซเลท SKTU16 ที่ระยะเวลา 0, 48
และ 96 ชั่วโมง 60
- 4.11 ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Synchrotron-based FTIR
microspectroscopy ของแบคทีเรีย ไอโซเลท SKTU16 ที่ระยะเวลา 48
และ 96 ชั่วโมง 63
- 4.12 เพอร์เซ็นต์ลิวโคอินดิโกสัมพัทธ์ที่เกิดขึ้นจากการบ่มแบคทีเรียไอโซเลท
SKTU1-SKTU18 63
- 4.13 ค่าพีเอชและค่าศักย์ไฟฟ้ามาตรฐานของน้ำย้อมอินดิโกที่ใช้โซเดียม
ไดไฮโอไนท์ แบคทีเรียไอโซเลท SKTU3 และ SKTU4 เป็นตัวรีดิวซ์ 66
- 4.14 แล็บสีต่าง ๆ ของอินดิโกสังเคราะห์ อินทรีย์ธรรมชาติ และสารละลาย
ผลิตภัณฑ์เมื่อวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง 73
- 4.15 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน
16S rRNA 79
- 4.16 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียไอโซเลท SKTU4 และ SKTU16 ในอาหาร
nutrient broth (NB) ค่าพีเอชเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้
สภาวะเขย่า 80
- 4.17 ปริมาณอินดิโกในชั่วโมง 0, 24, 48, 72 และ 96 ของแบคทีเรียไอโซเลท
SKTU16 ที่ไม่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งและ SKTU16 ที่ผ่าน
กระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง 82
- 4.18 ค่าพีเอช (ก) และค่าศักย์ไฟฟ้ามาตรฐาน (ข) ของน้ำย้อมอินดิโกที่เติม
แบคทีเรียไอโซเลท SKTU4 ที่ไม่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง
และแบคทีเรียไอโซเลท SKTU4 ที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกเป็นตัวรีดิวซ์
ระยะเวลา 7 วัน 84

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

อินดิโกหรือคราม (Indigo dye) เป็นสีย้อมธรรมชาติที่เก่าแก่ที่สุด นิยมใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมยา และอาหาร (Sandberg, และคณะ 1989) อินดิโกธรรมชาติ (natural Indigo dye) สกัดได้จากพืชสกุล *Indigofera* sp, *Isatis tinctorial*, *Stobilanthes cusia*, *Polygonum tinctoria* เป็นต้น (Minami และคณะ, 1997) สำหรับในประเทศไทยพบการใช้เพื่อการผลิตผ้าย้อมครามในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น จังหวัดสกลนคร จังหวัดอุดรธานี โดยผ้าย้อมครามนั้นเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีคุณสมบัติในการป้องกันแสงยูวี ดูดซับเหงื่อ และลดกลิ่นตัว เมื่อสวมใส่ในฤดูร้อนจะรู้สึกเย็นสบาย และสวมใส่ในฤดูหนาวจะรู้สึกอบอุ่น (อนุรัตน์, 2551) ดังนั้นผ้าย้อมครามจึงถือเป็นสินค้าที่มีความต้องการสูงทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ

กระบวนการย้อมอินดิโกธรรมชาติประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ ขั้นที่ 1 การสกัดอินดิโกจากต้นครามโดยนำส่วนลำต้นและใบมาผ่านกระบวนการหมักในน้ำสะอาดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง อินดิแคน (indican) สารไม่มีสีพบในส่วนของลำต้นและใบจะถูกไฮโดรไลซิส (hydrolysis) เป็นอินดอกซิล (indoxyl) และกลูโคส (glucose) ด้วยเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (beta-glucosidase) ที่พบภายในคลอโรพลาสต์ของต้นพืช (Minami และคณะ, 1997) จากนั้นอินดอกซิลจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation reaction) กับออกซิเจนในอากาศได้เป็นอินดิโก (indigo) ซึ่งเป็นสารที่มีสีน้ำเงิน แต่เนื่องจากกระบวนการสกัดอินดิโกนั้นต้องใช้เวลาในการสกัด ใช้ระยะเวลาในการที่พืชเติบโต ผลผลิตที่ได้ไม่สม่ำเสมอตลอดทั้งปี จึงทำให้อินดิโกที่สกัดได้นั้นมีปริมาณน้อยไม่เพียงพอต่อความต้องการ ขั้นที่ 2 การเตรียมน้ำย้อม นำอินดิโกที่สกัดได้มาเติมผสมกับส่วนผสมต่าง ๆ เช่น น้ำตาล มะขามเปียก ปูนแดง ขั้นตอนนี้จะอาศัยแบคทีเรียในกลุ่มแอนแอโรบิคแบคทีเรีย (anaerobic bacteria) เช่น *Alkalibacterium* sp. และ *Amphibacillus* sp. และแบคทีเรียในกลุ่มที่เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobes) อาทิเช่น *Oceanobacillus indicireducens*, *Fermentibacillus polygoni*, *Polygonibacillus indicireducens* และ *Paralkalibacillus indicireducens* แบคทีเรียเหล่านี้จะเปลี่ยนอินดิโกที่อยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำไปเป็นอินดิโกที่ละลายน้ำได้ที่เรียกว่า ลิวโคอินดิโก (leucoindigo) (Yamoto และคณะ, 2008; Hirota และคณะ, 2013; Hirota และคณะ, 2013; Hirota และคณะ, 2016; Hirota และคณะ, 2016; Hirota และคณะ, 2017) จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียดังกล่าวมีความสามารถในการถ่ายโอนอิเล็กตรอนจากภายในเซลล์ออกมาสู่ภายนอกเซลล์ให้กับอินดิโกจึงส่งผล

ให้อินดิโกเปลี่ยนรูปเป็นลิวโคอินดิโกได้ (Compton และคณะ, 2000) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าแบคทีเรียดังกล่าวสามารถปลดปล่อยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) และเอโซรีดักเทส (azoreductase) มาใช้ในกระบวนการรีดิวซ์อินดิโกได้อีกด้วย (Bozic และคณะ, 2008) สำหรับขั้นตอนในการเตรียมน้ำย้อมนั้นจะใช้ระยะเวลายาวนานถึง 1 สัปดาห์ คุณภาพสีที่ได้อาจไม่สม่ำเสมอและมีความเสี่ยงต่อการตายของแบคทีเรียภายในหม้อย้อม ขั้นสุดท้ายเป็นขั้นตอนการย้อม โดยลิวโคอินดิโกที่ละลายอยู่ในน้ำย้อมจะแทรกเข้าจับกับเส้นใยเซลลูโลสของผ้าด้วยพันธะไฮโดรเจน และเมื่อยกผ้าพ้นน้ำย้อมสัมผัสกับออกซิเจนในอากาศ ลิวโคอินดิโกจะถูกออกซิไดซ์กลับเป็นอินดิโกปรากฏสีน้ำเงินบนผิวหน้าของผืนผ้า

จากข้อมูลที่ได้กล่าวไปจะเห็นได้ว่ากระบวนการย้อมอินดิโกธรรมชาติมีข้อจำกัดหลายด้านจึงมีการนำอินดิโกสังเคราะห์ทางเคมี รวมถึงตัวรีดิวซ์เคมี อาทิ โซเดียมไดไทไธโอนท์ (sodium dithionite) มาใช้ในกระบวนการย้อมแต่พบว่าสารเคมีดังกล่าวเป็นพิษต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมอีกทั้งเมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาจะเกิดเป็นซัลไฟต์ (sulphite) ซัลเฟต (sulphate) และไธโอซัลเฟต (thiosulphate) ซึ่งสารเหล่านี้ส่งผลเสียต่อกระบวนการบำบัดน้ำเสียเนื่องจากมีฤทธิ์กัดกร่อน (Bozic และคณะ, 2008) รวมถึงในปัจจุบันกระแสความต้องการบริโภคสินค้าที่มาจากธรรมชาติและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมสูงขึ้น ด้วยสาเหตุเหล่านี้จึงทำให้กระบวนการย้อมอินดิโกธรรมชาติกลับมาเป็นที่นิยมอีกครั้ง การใช้แบคทีเรียในการสังเคราะห์อินดิโกและรีดิวซ์อินดิโกจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจเนื่องจากไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษทั้งต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม โดยจากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียที่ย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Han และคณะ, 2008) เช่น *Pseudomonas putida*, *Rhodococcus* sp. และ *Bacillus megaterium* สามารถปลดปล่อยเอนไซม์ในกลุ่มโมโนออกซีจีเนส (monooxygenase) และไดออกซีจีเนส (dioxygenase) เมื่อทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นแล้วเกิดการเปลี่ยนรูปเป็นอินดิโก (Keil และคณะ, 1987; Allen และคณะ, 1997; Lu และคณะ, 2006)

ดังนั้นวิทยานิพนธ์นี้จึงทำการศึกษาระบบการย้อมอินดิโกธรรมชาติ เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์อินดิโกและแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์อินดิโกให้อยู่ในรูปลิวโคอินดิโก จากน้ำย้อมอินดิโก ณ ร้านครามสกล จังหวัดสกลนคร และนำแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพที่คัดแยกได้มาพัฒนาเป็นกล้าเชื้อแห้งเพื่อนำมาประยุกต์ใช้กับกระบวนการย้อมอินดิโกธรรมชาติได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถลดข้อจำกัดที่เกิดขึ้นในกระบวนการย้อมได้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 เพื่อศึกษากระบวนการย้อมอินดิโกธรรมชาติ
- 1.2.2 เพื่อคัดแยก ศึกษาลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย และระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพโดยการใช้เทคนิคชีวเคมีและชีวโมเลกุล
- 1.2.3 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการสังเคราะห์อินดิโกและรีดิวซ์อินดิโกของแบคทีเรียที่คัดแยกได้
- 1.2.4 เพื่อพัฒนาหัวเชื้อแห้งที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการย้อมอินดิโกแบบธรรมชาติ

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1.3.1 ศึกษากระบวนการย้อมอินดิโกธรรมชาติ ณ ร้านครามสกล จังหวัดสกลนคร
- 1.3.2 คัดแยก ศึกษาลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย และระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพจากน้ำย้อมอินดิโก ด้วยเทคนิคทางชีวเคมีและชีวโมเลกุล
- 1.3.3 ศึกษาประสิทธิภาพในการสังเคราะห์อินดิโกและการรีดิวซ์อินดิโกของแบคทีเรียที่คัดแยกได้
- 1.3.4 ศึกษาผลิตภัณฑ์อินดิโกที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer เทคนิค Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy เทคนิค Thin layer chromatography (TLC) และเทคนิค Synchrotron-based Fourier transforms infrared microspectroscopy
- 1.3.5 ศึกษาคุณสมบัติของผ้าหลังกระบวนการย้อมโดยใช้แบคทีเรียที่คัดแยกเป็นตัวรีดิวซ์ด้วยเครื่อง Colour-Spectrophotometer
- 1.3.6 พัฒนาและทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแห้งในการประยุกต์ใช้กับกระบวนการย้อมอินดิโกธรรมชาติ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์อินดิโกและแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์อินดิโก
- 1.4.2 สามารถนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาพัฒนาเป็นหัวเชื้อแห้งที่ประยุกต์ใช้กับกระบวนการย้อมอินดิโกธรรมชาติได้อย่างมีประสิทธิภาพ และลดข้อจำกัดที่เกิดขึ้นจากกระบวนการย้อม
- 1.4.3 สามารถลดการใช้สารเคมีในกระบวนการย้อมอินดิโกธรรมชาติได้
- 1.4.4 เป็นแนวทางสำหรับผู้สนใจในการศึกษากระบวนการย้อมอินดิโกธรรมชาติ

1.5 สถานที่ทำการทดลอง

1.5.1 ร้านครามสกล 212 หมู่ 2 ตำบลห้วยยาง อำเภอเมืองสกลนคร จังหวัดสกลนคร

1.5.2 ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ (B401, B403 และ B407) ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีวัสดุและสิ่งทอ (C504) และห้องปฏิบัติการเคมี (C407) อาคารบรรยายเรียนรวม 5 คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี

1.5.3 ห้องปฏิบัติการระบบลำเลียงแสง BL4.1 สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) อาคารสิรินธรวิโชทัย อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา



บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สีย้อม

สีย้อม (dye) คือ สารประกอบอินทรีย์หรือสารประกอบอนินทรีย์ ที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 400-700 นาโนเมตร (visible spectrum) โครงสร้างประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันที่แสดงสมบัติเป็นสีที่เรียกว่า โครโมฟอร์ (chromophores) เช่น azo group (-N=N-), nitroso group (-N=O) และ nitro group (NO₂) และในโครงสร้างของสารประกอบ อาจประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันที่เรียกว่า ออกโซโครม (auxochrome) เช่น กรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acid) กรดซัลโฟนิค (sulfonic acid) หมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ซึ่งหมู่ฟังก์ชันเหล่านี้ จะทำให้สีย้อมมีคุณสมบัติในการละลายน้ำและสามารถยึดเกาะกับพื้นผิวของพอลิเมอร์ได้ (Abrahart, 1997) ในโครงสร้างของสารประกอบมีการเรียงสลับระหว่างพันธะคู่และพันธะเดี่ยวภายในโครงสร้าง การเรียงตัวลักษณะนี้จะทำให้สารประกอบมีการดูดกลืนแสงที่สูง นอกจากนี้มีการยับยั้งการเกิดเรโซแนนซ์ (resonance) ของอิเล็กตรอนในโครงสร้างจึงทำให้สารประกอบมีความเสถียรสูง

สีย้อมถูกใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมสิ่งพิมพ์ เป็นต้น (Silveira และคณะ, 2009) โดยสีย้อมมีความแตกต่างจากรงควัตถุ (pigment) เนื่องจากสีย้อมมีความสามารถในการละลายน้ำ หรือละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ แต่รงควัตถุไม่สามารถละลายได้ นอกจากนี้สีย้อมยังมีความจำเพาะต่อชนิดของพอลิเมอร์ที่จะเข้าทำปฏิกิริยาและทำให้เกิดสีขึ้นที่พื้นผิวของพอลิเมอร์ (Allen, 1971) การแบ่งประเภทของสีย้อม นิยมแบ่งตามวิธีการใช้งาน โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 11 ชนิด แสดงดังตารางที่ 2.1 นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งชนิดของสีย้อมด้วยแหล่งกำเนิดได้เป็น 2 ชนิด คือ สีย้อมสังเคราะห์ และ สีย้อมธรรมชาติ (Kumer และคณะ, 2011)

ตารางที่ 2.1 ประเภทของสีย้อมและเส้นใยที่เหมาะสมต่อการย้อม

ชนิดของสีย้อม	ชนิดของเส้นใยที่เหมาะสมต่อการย้อม
1. สีแอซิด (acid dyes)	เส้นใยขนสัตว์และเส้นใยไพลอน
2. สีเบสิค (basic dyes)	เส้นใยอะคริลิกและเส้นใยไพลอน
3. สีไดเรกต์ (direct dyes)	เส้นใยฝ้ายและเส้นใยเซลลูโลส
4. สีดีสเพอร์ส (disperse dyes)	เส้นใยโพลีเอสเตอร์และเส้นใยสังเคราะห์

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

ชนิดของสีย้อม	ชนิดของเส้นใยที่เหมาะสมต่อการย้อม
5. สีรีแอคทีฟ (reactive dyes)	เส้นใยฝ้าย เส้นใยเซลลูโลส และเส้นใยขนสัตว์
6. สีซัลเฟอร์ (Sulphur dyes)	เส้นใยฝ้ายและเส้นใยเซลลูโลส
7. สีแวนด์ (vat dye)	เส้นใยฝ้ายและเส้นใยเซลลูโลส
8. สีเอโซอิก (azoic acid)	เส้นใยขนสัตว์และเส้นใยไหม
9. สีอินเกรน (ingrain dye)	เส้นใยฝ้าย
10. สีมอดแดนต์ (mordant dye)	เส้นใยขนสัตว์
11. สีออกซิเดชัน (oxidation dye)	เส้นใยฝ้ายและเส้นใยขนสัตว์

ที่มา: วิโรจน์, 2560

2.1.1 สีย้อมสังเคราะห์หรือสีเคมี

สีย้อมสังเคราะห์ (synthetic dye) เป็นสีย้อมที่เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี และเป็นผลผลิตพลอยได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเลียมและอุตสาหกรรมน้ำมันถ่านหิน เมื่อน้ำมันดิบผ่านการกลั่นลำดับส่วนแล้ว จะได้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ไม่อิ่มตัว เช่น เบนซีน (benzene) โทลูอิน (toluene) แนฟทาลีน (naphthalene) ไซลีน (xylene) และพาราฟิน (paraffin) เป็นต้น จากนั้นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน จะถูกนำไปผ่านกระบวนการไนเตรชันและแอมมิเนชัน (nitration process and amination process) เพื่อเปลี่ยนให้เป็นสารตัวกลางที่ใช้ในการสังเคราะห์สีย้อมต่อไป

ข้อดีของสีย้อมสังเคราะห์คือ กระบวนการย้อมไม่ยุ่งยาก มีความเสถียรสูง เจดสีที่ได้มีความหลากหลายและมีคุณภาพที่คงที่ ติดทนนาน ละลายน้ำได้ดี ดูดซับกับพอลิเมอร์ ได้ง่ายกว่าสีธรรมชาติ รวมทั้งสีย้อมสังเคราะห์ยังซื้อหาได้ง่าย ราคาถูก จึงส่งผลให้สีย้อมสังเคราะห์ได้รับความนิยมสูง แต่จากรายงานการวิจัยพบว่า สีย้อมสังเคราะห์เป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อระบบนิเวศวิทยา (eco toxicity) และก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อมนุษย์ (human toxicity) เนื่องจากสารตั้งต้นที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์มีความเป็นพิษสูง เช่น ไนโตรเบนซีน (nitrobenzene) เบนซิดีน (benzidine) อะนิลีน (aniline) และสารอะโรมาติกอื่น ๆ ดังนั้นจึงมีการประกาศใช้ระเบียบกฎหมายในการยกเลิกการผลิตหรือการนำเข้าวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสีสังเคราะห์ในหลายประเทศ และการห้ามนำเข้าผลิตภัณฑ์ที่ถูกย้อมด้วยสีสังเคราะห์บางชนิด (Qu และคณะ, 2010)

2.1.2 สีย้อมธรรมชาติ

สีย้อมธรรมชาติ (natural dye) เป็นสีที่ได้จากทรัพยากรธรรมชาติ แบ่งตามแหล่งกำเนิดออกเป็น 3 กลุ่ม คือ 1. สีย้อมจากพืช (vegetable dyes) เป็นสีย้อมที่ได้จากส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ราก ใบ เปลือก ลำต้น เนื้อไม้ ดอก ผล และเมล็ด 2. สีย้อมจากสัตว์ (animal dyes) เป็นสีที่ได้จากซากสัตว์ หรือสารที่ขับออกมาจากตัวสัตว์ และ 3. สีย้อมจากแร่ธาตุ (mineral dyes) เป็นสีย้อมที่เกิดจากสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะ จำพวกเหล็ก โครเมียม ตะกั่ว ทองแดง (Amin และคณะ, 2020) นอกจากนี้ยังมีสีย้อมที่ได้จากจุลินทรีย์ เช่น รา ยีสต์ และแบคทีเรียอีกด้วย ตัวอย่างของสีย้อมธรรมชาติ แสดงดังตารางที่ 2.2

สีย้อมธรรมชาติมีข้อดีคือ เป็นทรัพยากรที่ใช้แล้วไม่หมดไป สร้างใหม่ทดแทนได้ ไม่เป็นพิษ ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคือง สามารถย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ และมีคุณสมบัติทางการแพทย์สามารถลดการเกิดมะเร็งผิวหนังเนื่องจากสามารถดูดกลืนแสงยูวี (UV) มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนัง (Arora และคณะ, 2017) แต่เนื่องจากสีย้อมธรรมชาติส่วนใหญ่ไม่ใช่สารบริสุทธิ์ ดังนั้นในกระบวนการย้อมแต่ละครั้งจะได้คุณภาพของสีที่ไม่สม่ำเสมอ รวมถึงสารสีที่ได้จากสิ่งมีชีวิตนั้น อาจอยู่ภายในเซลล์หรือนอกเซลล์ ดังนั้นจึงต้องมีกระบวนการสกัดเพื่อให้ได้สารสี ทำให้กระบวนการย้อมด้วยสีธรรมชาตินั้นใช้ระยะเวลายาวนานและมีความซับซ้อน

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างสีย้อมธรรมชาติที่ได้จาก พืช สัตว์ และแร่ธาตุ

	แหล่งสีย้อมธรรมชาติ	ส่วนที่ให้สี	สีที่ปรากฏ
พืช	สีเสียด (<i>Acacia catechu</i>)	เนื้อไม้	สีน้ำตาล
	แก่นขนุน (<i>Artocarpus heterophyllus</i>)	เนื้อไม้	สีเหลือง
	คราม (<i>Indigofera tinctoria</i>)	ใบ	สีน้ำเงิน
	ฮ่อม (<i>Strobilanthes cusia</i>)	ใบ	สีน้ำเงิน
	โวด (<i>Isatis tentoria</i>)	ใบ	สีน้ำเงิน
	สะเดา <i>Azadirachta indica</i>	ใบ	สีเขียว
	สมอ (<i>Terminalia chebula</i>)	ผล	สีดำ
	มะเกลือ (<i>Diospyros mollis</i>)	ผล	สีดำ
	กระเพรา (<i>Ocimum sanctum</i>)	ใบ	สีเขียว

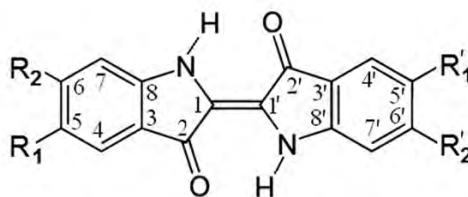
ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

	แหล่งสีย้อมธรรมชาติ	ส่วนที่ให้สี	สีที่ปรากฏ
สัตว์	แมลงโคชินิล (<i>Coccus cacti</i>)	ตัว	สีแดงเข้ม และสีชมพู
	ครั่ง (<i>Laccifer lacca</i>)	ตัว	สีแดง และสีน้ำตาล
	หอยมิวเร็กซ์ (<i>Muricoidea sp.</i>)	สารที่หลั่ง	สีม่วง
แร่ธาตุ	กราไฟท์ (graphit)		สีเทาหม่น
	ถ่าน (charcoal black)		สีดำ
	หินมัลลาฮีท (malachite)		สีเขียว
	ตะกั่วโครเมต (lead chromate)		สีเหลือง

ที่มา: Yusuf, 2017

2.2 อินดิโก

ครามหรืออินดิโก (indigo dye, indigo blue, indigotin) เป็นสีย้อมธรรมชาติที่เก่าแก่ที่สุด จัดอยู่ในกลุ่มสีย้อมประเภทสีแวม (vat dye) นิยมใช้ในการย้อมเส้นใยฝ้าย เส้นใยไหม โดยสีย้อมอินดิโกจะให้เฉดสีปรากฏเป็นสีน้ำเงิน (Maugard และคณะ, 2002) โครงสร้างทางเคมีของอินดิโกประกอบด้วย วงแหวนอะโรมาติกเฮเทอโรไซคลิกประเภทอินโดล (heterocyclic indole ring) จำนวน 2 วง ต่อกันด้วยพันธะคู่ในตำแหน่งตรงกันข้าม (trans isomer) และหมู่คาร์บอนิล (carbonyl group) (Volkov และคณะ, 2020) แสดงดังภาพที่ 2.1 นอกจากนี้ อินดิโกมีสมบัติเป็นสารโพลีเมอร์ (polymeric) และมีขั้วสูง จึงส่งผลให้อินดิโกมีจุดหลอมเหลวสูงถึง 300 องศาเซลเซียส และมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ แต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น คลอโรฟอร์ม (chloroform) ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide) (Clark และคณะ, 1993) นอกจากนี้เฉดสีที่ปรากฏนั้นจะขึ้นกับสถานะแวมล้อม เช่น ในสถานะแก๊สอินดิโกจะอยู่ในรูปของโมโนเมอร์ปรากฏสีแดง เมื่ออยู่ในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วจะปรากฏสีม่วง และเมื่ออยู่ในรูปของแข็งหรือในตัวทำละลายที่มีขั้วจะปรากฏสีน้ำเงิน (Christie, 2007)



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของอินดิโก โดย R แทนหมู่ฟังก์ชัน
ที่มา: Volkov และคณะ, 2020

2.2.1 การสกัดอินดิโก

2.2.1.1 อินดิโกจากพืช

อินดิโกสามารถสกัดได้จากพืชชนิดต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 2.3 โดยภายในใบพืชสกุล *Indigofera* สกุล *Polygonum* และสกุล *Stobilanthes* จะพบสารอินดิแคน (indican) หรือ (indoxyl- β -D-glucoside) และในพืชสกุล *Isatis* จะพบสารอินสแตนบี (isatan B) หรือ (indoxyl- β -ketogluconate) (Epstein และคณะ, 1967) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตสีย้อมอินดิโกธรรมชาติ

ตารางที่ 2.3 พืชที่ให้อินดิโก

วงศ์ (family)	พืช	ถิ่นที่ปลูก
<i>Leguminosae</i>	<i>Indigofera tinctoria</i>	เอเชียตะวันออกเฉียงใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้
<i>Leguminosae</i>	<i>Indigofera suffruticosa</i>	อเมริกากลางและอเมริกาใต้
<i>Leguminosae</i>	<i>Indigofera arrecta</i>	อเมริกากลางและอเมริกาใต้
<i>Crusiferae</i>	<i>Isatis tinctoria</i>	เอเชียตะวันออกเฉียงใต้และอเมริกาเหนือ
<i>Polygonaceae</i>	<i>Polygonum tinctoria</i>	เอเชียตะวันออกเฉียงใต้และอเมริกาเหนือ
<i>Acanthaceae</i>	<i>Stobilanthes cusia</i>	ญี่ปุ่น ไต้หวัน และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

ที่มา: Chavan, 2015

สำหรับประเทศไทย พบพืชที่นิยมใช้ในการสกัดอินดิโกได้แก่ ครามฝักตรง (*Indigofera tinctoria* Mill) ครามฝักงอ (*Indigofera tinctoria* Linn) พบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น จังหวัดสกลนคร จังหวัดอุดรธานี และ ฮ่อม (*Stobilanthes cusia*) พบมากในภาคเหนือ เช่น จังหวัดแพร่ จังหวัดลำปาง ลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาของครามและฮ่อมแสดงดังตารางที่ 2.4 และ ภาพที่ 2.2

ตารางที่ 2.4 ลักษณะของพืชที่ให้อินดิโกที่พบในประเทศไทย

ชื่อท้องถิ่น	ครามฝักตรง	ครามฝักงอ	ฮ่อม
ชื่อวิทยาศาสตร์	<i>Indigofera tinctoria</i> Mill.	<i>Indigofera tinctoria</i> Linn.	<i>Stobilanthes cusia</i>
วงศ์	Leguminosae	Leguminosae	Acanthaceae
ลักษณะต้น	เป็นพุ่ม กว้าง 140 เซนติเมตร สูง 170 เซนติเมตร	เป็นพุ่ม กว้าง 200 เซนติเมตร สูง 220 เซนติเมตร	เป็นพุ่ม ลำต้นตั้งตรง สูง 100 เซนติเมตร
ลักษณะใบ	ใบประกอบแบบขนนก เรียงสลับ ใบย่อยเป็นรูปวงรีปลายแหลมมีติ่ง	ใบประกอบแบบขนนก เรียงสลับ ใบย่อยเป็นรูปวงไข่ปลายใบมน	ใบเดี่ยว รูปวงรี ขอบใบหยัก ปลายและโคนใบเรียวแหลม
ลักษณะดอก	กลีบดอกมีสีชมพู ลักษณะเป็นช่อ ออกที่บริเวณตาข้าง	กลีบดอกมีสีชมพู ลักษณะเป็นช่อ ออกที่บริเวณซอกใบ	กลีบดอกมีสีม่วง รูปทรงคล้ายระฆัง ออกที่บริเวณซอกใบ
ลักษณะฝัก	ฝักขนาดเล็ก มีสีเขียว ปลายยึดตรง ไม่มีขน	ฝักขนาดเล็ก มีสีเขียว ปลายโค้งงอ	
สีเมล็ด	สีเหลือง	สีน้ำตาลเกือบดำ	สีน้ำตาล
ระยะเวลาให้สี	3 เดือน	3 เดือน	24 เดือน

ที่มา : อนุรัตน์, 2551



(ก)

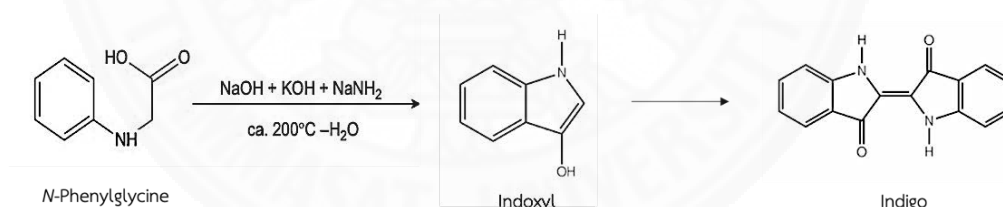
(ข)

ภาพที่ 2.2 ลักษณะของใบคราม (ก) ลักษณะของใบฮ่อม (ข)

ที่มา: อนุรัตน์, 2551

2.2.1.2 อินดิโกสังเคราะห์

อินดิโกสังเคราะห์ เป็นสีที่เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี โดยใช้ N-phenylglycine ทำปฏิกิริยากับโซเดียมเอไมด์ (sodium amide) ในสภาวะที่เป็นต่าง ผน อุณหภูมิ 300 องศาเซลเซียส เกิดเป็นสารอินดอกซิล จากนั้นสารอินดอกซิลจะเกิดการออกซิไดซ์ด้วยออกซิเจน เกิดเป็นอินดิโก (Meksi และคณะ, 2007) ปฏิบัติการสังเคราะห์ แสดงได้ดังภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 ปฏิบัติการสังเคราะห์อินดิโก

ที่มา: Meksi และคณะ, 2007

2.2.1.3 อินดิโกจากจุลินทรีย์

การสังเคราะห์อินดิโกจากจุลินทรีย์เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีความสนใจ เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูง ใช้เวลาไม่นาน และไม่ขึ้นกับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เมื่อเปรียบเทียบกับ การการสกัดอินดิโกจากพืช สภาวะในการเกิดกระบวนการและสารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์ไม่ ก่อให้เกิดมลพิษต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม ซึ่งแตกต่างจากการสังเคราะห์อินดิโกด้วยกระบวนการทาง เคมี จากการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถสังเคราะห์อินดิโกได้ โดยพบว่าจุลินทรีย์ส่วน

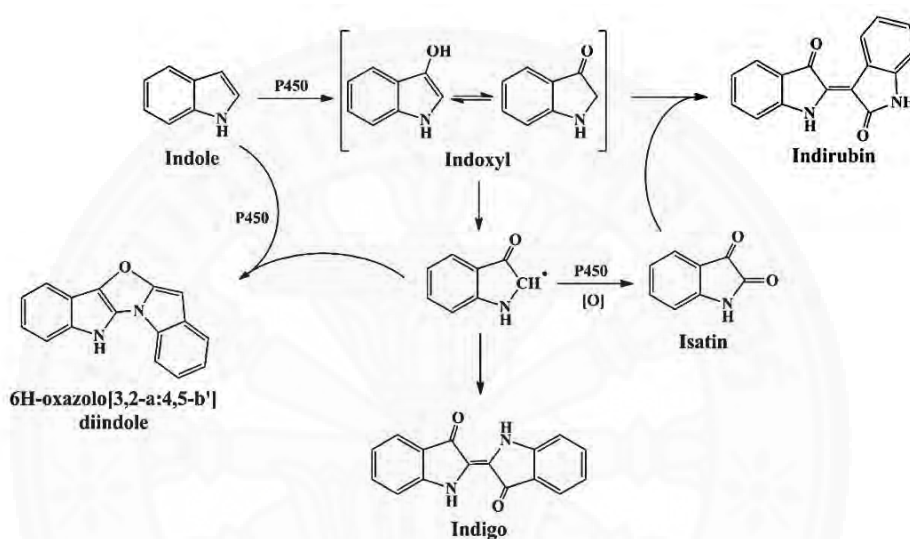
ใหญ่เป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่สามารถย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (aromatic hydrocarbon-degrading bacteria) (Han และคณะ, 2008) โดยแบคทีเรียดังกล่าวสามารถปลดปล่อยเอนไซม์ในกลุ่ม oxygenase ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ เอนไซม์ monooxygenase และ dioxygenase เข้าทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น แล้วเกิดการเปลี่ยนรูปเป็นอินดีโก ตัวอย่างแบคทีเรียได้แก่ แบคทีเรียที่มีความสามารถย่อยสลายแนฟทาลีน (*Pseudomonas putida* PgG7 (Ensley และคณะ, 1983) แบคทีเรียที่มีความสามารถย่อยสลายสไตรีน *Pseudomonas putida* S12 และ *Pseudomonas putida* CA-3 (O'Connoe และคณะ 1997) ซึ่งเอนไซม์ monooxygenase ที่สามารถสังเคราะห์อินดีโกได้มีการเร่งปฏิกิริยาโดยการเติมออกซิเจน 1 โมเลกุล เข้ากับสารตั้งต้นในการเกิดปฏิกิริยาและการถ่ายโอนอิเล็กตรอน จะต้องใช้ NADH, NADPH และ โคแฟกเตอร์ เช่น ferredoxin และ flavin reductase โดยตัวอย่างเอนไซม์ monooxygenase ที่พบในจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์อินดีโก แสดงดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 เอนไซม์ monooxygenase ที่พบในจุลินทรีย์

เอนไซม์	จุลินทรีย์ที่พบ	อ้างอิง
Xylene oxygenase	<i>Pseudomonas putida</i> MT53	Keil และคณะ, 1987
Toluene-4-monooxygenase	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Yen และคณะ, 1991
Monooxygenase	<i>Rhodococcus</i> sp.	Allen และคณะ, 1997
Styrene monooxygenase	<i>Pseudomonas putida</i> S12	O'Connor และคณะ, 1997
Fatty-acid hydroxylase P450 BM-3	<i>Bacillus megaterium</i>	Li และคณะ, 2000
2-hydroxybiphenyl 3-monooxygenase	<i>Pseudomonas azelaica</i>	Meyer และคณะ, 2002
Flavin monooxygenases	<i>Methylophaga</i> sp.	Hack และคณะ, 2003
Cytochrome P450 BM-3 mutant	<i>Bacillus megaterium</i>	Lu และคณะ, 2006

ที่มา: Han, และคณะ 2008

ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์อินดิโกโดยเอนไซม์ cytochrome P450 monooxygenase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบได้ในแบคทีเรีย รา พืช และสัตว์ จะเร่งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์อินดิโกโดยการเติมหมู่ไฮดรอกซิล 1 โมเลกุล ให้กับสารตั้งต้นเกิดเป็น อินโดซิล (Indoxyl) และเมื่อ อินโดซิล ถูกออกซิไดซ์จะเปลี่ยนรูปเป็นอินดิโก นอกจากนี้ยังเกิดผลิตภัณฑ์ อื่น ๆ ได้แก่ อินดิรูบิน (indirubin) และ 6H-oxazolo [3,2-a:4,5-b'] diindole ปฏิกิริยาในการเปลี่ยน อินโดล (indole) ให้เป็นอินดิโกด้วยเอนไซม์ cytochrome P450 monooxygenase แสดงดังภาพที่ 2.4



ภาพที่ 2.4 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อินดิโกโดยเอนไซม์ cytochrome p450 monooxygenase

ที่มา: Gillam และคณะ, 2000

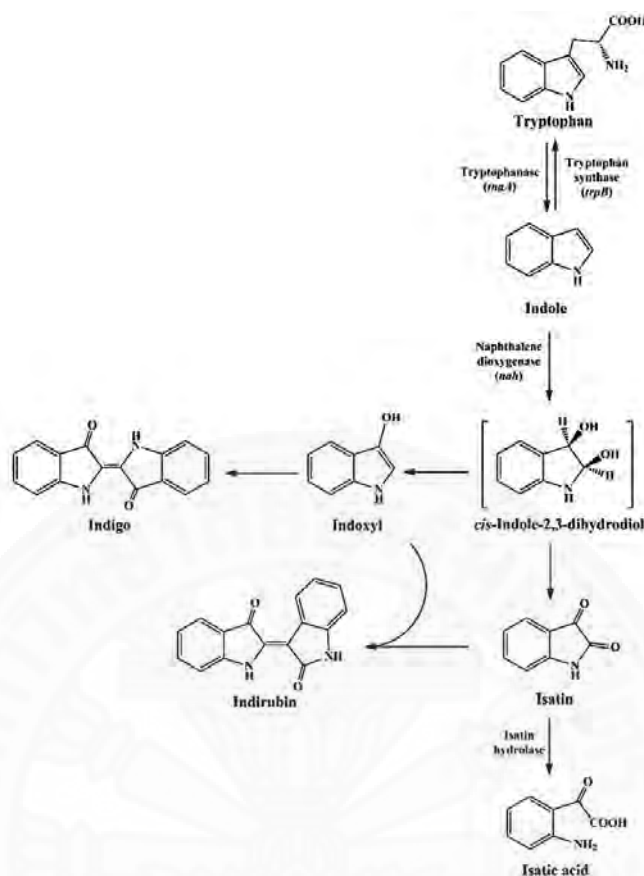
นอกจากนี้ยังมี เอนไซม์ dioxygenase ที่สามารถสังเคราะห์อินดิโกได้ โดยตัวอย่างเอนไซม์ dioxygenase ที่พบในจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์อินดิโก แสดงดังตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 เอนไซม์ dioxygenase ที่พบในจุลินทรีย์

เอนไซม์	จุลินทรีย์ที่พบ	อ้างอิง
Naphthalene dioxygenase	<i>Pseudomonas putida</i>	Ensley และคณะ, 1983
Toluene dioxygenase	<i>Pseudomonas putida</i>	Zylstra และคณะ, 1989
Naphthalene dioxygenase	<i>Pseudomonas</i> sp. and <i>Bacillus brevis</i>	Wu และคณะ, 1989
Tetralin dioxygenase	<i>Sphingomonas</i> <i>macrogoltabida</i>	Royo และคณะ, 2005

ที่มา: Han, และคณะ 2008

เมื่อทำการโคลนยีน *NDO* ซึ่งเป็นยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ naphthalene dioxygenase จาก *P. Putida* PpG7 ให้แสดงออกใน *E. coli* พบว่า เอนไซม์ tryptophanase จาก *E. coli* เปลี่ยน ทริปโตเฟน (tryptophan) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นให้เป็น อินโดล จากนั้น อินโดล จะถูก ออกซิไดซ์เป็น อินโดซิล ด้วยเอนไซม์ naphthalene dioxygenase และเกิดการออกซิไดซ์กับ ออกซิเจนในอากาศได้เป็นอินดิโก ปฏิกริยาการสังเคราะห์อินดิโกโดยเอนไซม์ naphthalene dioxygenase แสดงดังภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.5 ปฏิกริยาการสังเคราะห์อินดิโกโดยเอนไซม์ naphthalene dioxygenase

ที่มา: Ensley และคณะ, 1983

จะเห็นได้ว่าในการสังเคราะห์อินดิโกจากแบคทีเรียที่เรียนั้นนอกจากจะได้อินดิโกแล้วยังได้ผลิตภัณฑ์อื่น เช่น อินดิรูบิน ซึ่งเป็น heterodimerization ของ ไอซาทิน (isatin) และ 3-hydroxyindole โดยผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นดังกล่าวก่อให้เกิดปัญหาในการประยุกต์ใช้การสังเคราะห์อินดิโกจากแบคทีเรียในอุตสาหกรรม

Ensley และคณะ (1983) ได้ทำการโคลนชิ้นส่วนพลาสมิด (plasmid) NAH7 จาก *Pseudomonas putida* PpG7 แสดงออกใน *Escherichia coli* HB101 แล้วเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมทริปโตเฟนและอินโดล พบว่ากระบวนการสร้างอินดิโกเกิดจากเอนไซม์ 2 ชนิดคือ tryptophanase และ naphthalene dioxygenase โดยเอนไซม์ tryptophanase จาก *E.coli* จะเปลี่ยนทริปโตเฟนให้อยู่ในรูปของสารประกอบอินโดล จากนั้นเอนไซม์ naphthalene dioxygenase ที่เกิดจากชิ้นส่วน DAN ที่โคลนเข้าไปจะเปลี่ยนอินโดล เป็น cis-indole-2 3-dihydrodiol และถูก dehydrated เป็นอินโดซิล และเกิดการ dimerizes ไปเป็นอินดิโก

Eaton และคณะ (1995) ศึกษาการสร้างอินดิโกด้วยเอนไซม์ dioxygenase จาก *Pseudomonas putida* F1 และ *Pseudomonas putida* S12 ในอาหาร minimal medium ที่มีการเติม indole carboxylate ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ พบว่าเมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครโมโตกราฟีแบบแผ่นบาง โดยมีเฟสเคลื่อนที่คือ คลอโรฟอร์มและอะซิโตน ในอัตราส่วน 97:3 จะเกิดแถบของสารประกอบทั้งหมด 2 แถบ คือ แถบสีน้ำเงินมีค่า rate of flow (R_f) เท่ากันกับอินดิโก คือ 0.58 และ แถบสีแดง มีค่า R_f เท่ากันกับอินดิรูบินคือ 0.42

Solaiman และคณะ (1996) ศึกษาการสร้างอินดิโก โดยทำการโคลนยีน rhodococcal indole oxygenase gene (*ido*) ซึ่งเป็นยีนที่กำหนดการสร้างอินดิโก เข้าไปใน *Streptococcus thermophilus* ST128 และ *Escherichia coli* DH5 โดยใช้ expression vectors ที่ประกอบด้วย *S. thermophilus* plasmid replicon (*pER8*) และ promoters (sP1 และ ST p2201) จากนั้นวิเคราะห์ยีนที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค northern blot พบว่าไม่พบยีนที่กำหนดการสร้างอินดิโกใน *Escherichia coli* DH5

Conner และคณะ (1997) ได้ทำการศึกษาความสามารถในการเปลี่ยนสารประกอบอินโดลและสารประกอบสไตรีน (styrene) ไปเป็นอินดิโก ของ *Pseudomonas putida* S12 และ *Pseudomonas putida* CA-3 ซึ่งทั้ง 2 สายพันธุ์นี้เป็นสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบสไตรีน โดยการปลดปล่อยเอนไซม์ styrene monooxygenase (SMO) จากการศึกษาพบว่าเมื่อทำการเติมสารประกอบอินโดล ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกับสารประกอบสไตรีนลงในอาหารแข็ง (arginine-indole agar) แบคทีเรียสามารถเปลี่ยนสารประกอบอินโดลไปเป็นอินดิโกได้มากกว่าการเติมสารประกอบสไตรีนลงในอาหารแข็ง (arginine-styrene agar) ส่วนในอาหารเหลวพบว่า (arginine broth) แบคทีเรียมีความสามารถในการเปลี่ยนสารประกอบสไตรีนไปเป็นอินดิโกได้มากกว่าการเติมสารประกอบอินโดล

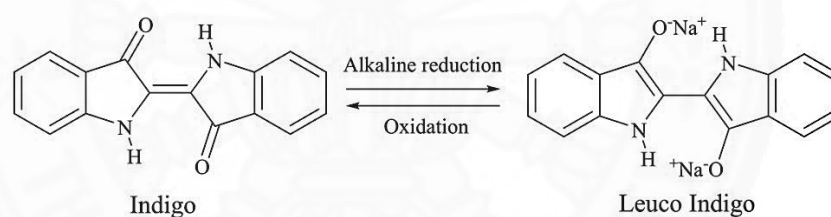
Pathak และ Madamwar (2009) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของ *Pseudomonas* sp. HOB1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายแนฟทาลีน (naphthalene) ในการผลิตรงควัตถุสีฟ้าเมื่อเติมสารประกอบอินโดล ลงในอาหารเพาะเลี้ยง จากการศึกษาคุณสมบัติของรงควัตถุดังกล่าวด้วยเทคนิค high-pressure thin-layer chromatography และ spectroscopic techniques พบว่ารงควัตถุดังกล่าวมีคุณสมบัติสอดคล้องกับ อินดิโก โดยแบคทีเรียไอโซเลทดังกล่าวสามารถผลิตอินดิโกได้ 246 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 8 ชั่วโมง และเมื่อนำอินดิโกไปย้อมบนผ้าฝ้ายพบว่า ให้ค่าความเข้มข้น (K/S) เท่ากับ 3

Dua และคณะ (2014) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของ *Pseudomonas* sp. HAV-1 ที่คัดแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันในการผลิตอินดิโกโดยทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ในอาหาร Bushnell haas broth (BHB) ที่เติมแนฟทาลีนและอินโดล

ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ปมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าว สามารถผลิตอินดิโกได้ 412 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเวลา 20 ชั่วโมง และเมื่อทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเพาะเลี้ยง เพื่อการผลิตอินดิโกโดยใช้เทคนิค วิธีพื้นผิวแบบตอบสนอง (response surface methodology) พบว่าจะสามารถผลิตอินดิโกได้ 700 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเวลา 20 ชั่วโมง เมื่อเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเป็น 14 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร และปริมาณอินโดล (indole) เป็น 7 มิลลิโมลาร์

2.2.2 การรีดิวซ์อินดิโก

อินดิโกเป็นสีที่ไม่ละลายน้ำจึงถูกจัดอยู่ในสีย้อมประเภทสีแวต (vat dye) ดังนั้นในการนำไปใช้ประโยชน์ ต้องมีกระบวนการเปลี่ยนอินดิโกให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำที่เรียกว่า ลิวโคอินดิโก (leucoindigo) โดยปฏิกิริยาในการรีดิวซ์อินดิโกนี้จะเกิดในสภาวะที่เป็นด่าง จากนั้นเมื่อลิวโคอินดิโกสัมผัสกับออกซิเจนในอากาศ จะเปลี่ยนรูปกลับไปอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ แสดงดังภาพที่ 2.6 กระบวนการที่ใช้ในการรีดิวซ์อินดิโกนั้นมีหลากหลายวิธีเช่น การรีดิวซ์อินดิโกด้วยแบคทีเรียโดยกระบวนการหมัก การรีดิวซ์อินดิโกด้วยสารเคมี และการรีดิวซ์อินดิโกด้วยปฏิกิริยาทางไฟฟ้าเคมี เป็นต้น



ภาพที่ 2.6 ปฏิกิริยาในการรีดิวซ์อินดิโก

ที่มา: Saikhao, 2018

2.2.2.1 การรีดิวซ์อินดิโกด้วยแบคทีเรีย

การรีดิวซ์อินดิโกด้วยแบคทีเรีย เป็นกระบวนการที่ได้รับความสนใจในการนำมาประยุกต์ใช้ในภาคอุตสาหกรรมเนื่องจากไม่ใช้อุณหภูมิที่สูงในการเกิดปฏิกิริยา ไม่ก่อให้เกิดผลพลอยได้จากปฏิกิริยาที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม กระบวนการหมักด้วยแบคทีเรียถูกนำมาใช้ในการรีดิวซ์อินดิโกโดยการใส่ส่วนผสมต่าง ๆ อาทิ ผลไม้สุก รำข้าว ลงในน้ำต่างที่ได้จากขี้เถ้า หรือน้ำปุ๋ยหมักร่วมกันทิ้งไว้เป็นระยะเวลาตาม โดยกระบวนการดังกล่าวไม่สามารถควบคุมคุณภาพของเฉดสีหรือระยะเวลาในการรีดิวซ์ได้ เนื่องจากต้องอาศัยความสามารถของแบคทีเรียในการเกิดปฏิกิริยา (Blackbutn และคณะ, 2009)

Padden และคณะ (1999) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียจากกระบวนการหมักอินดิโกจากใบไวด (woad) แล้วทำการระบุสายพันธุ์พบว่า เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Clostridium isatidis* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอยู่ที่ 49-52 องศาเซลเซียส และค่าพีเอชที่เหมาะสมคือ 7.2 แต่เมื่ออยู่ในสภาวะรีดิวซ์อินดิโก ค่าพีเอชที่เหมาะสมจะเท่ากับ 9

Nicholson และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษากระบวนการหมักใบไวด พบว่ารากของต้นแมดเดอร์ (madder powder) ซึ่งเป็นองค์ประกอบในกระบวนการหมักใบไวด สามารถกระตุ้นแบคทีเรียในการรีดิวซ์อินดิโกได้โดยอาศัยการเปลี่ยนคุณสมบัติของพื้นผิวอินดิโก เนื่องจากมีสารแอนทราควิโนน (anthraquinone) เป็นองค์ประกอบ

Compton และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษากลไกในการรีดิวซ์อินดิโกโดยการต่อชั่วคราวบนอิเล็กโทรด กับ *Clostridium isatidis* โดยพบว่าแบคทีเรียดังกล่าวมีปฏิสัมพันธ์โดยตรงกับอนุภาคอินดิโก ไม่ต้องอาศัยตัวกลาง แต่ยังไม่มีการศึกษากลไกทางชีวเคมีในการถ่ายโอนอิเล็กตรอนจากภายในเซลล์ไปยังตัวรับอิเล็กตรอนภายนอกเซลล์

Yumoto และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษากระบวนการเตรียมอินดิโกโดยนำพืช *Polygonum tinctorum* Lour. มาผึ่งให้แห้งในที่ร่ม แล้วพรมน้ำให้เปียก จากนั้นจึงหมักต่อไปในสภาวะที่เป็นด่างค่าพีเอชมากกว่า 10.0 อินดิโกจะถูกเปลี่ยนเป็นลิวโคอินดิโก เมื่อทำการคัดแยกแบคทีเรียพบแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่คือ *Alkalibacterium psychrotolerans* sp. Nov. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่ง เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ค่าพีเอชอยู่ในช่วง 10.0-12.0 ซึ่งมีความสามารถรีดิวซ์อินดิโกให้เป็นลิวโคอินดิโก

Nicholson และคณะ (2005) ทำการศึกษาแบคทีเรียจากกระบวนการย้อมอินดิโกพบแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ได้แก่ *Clostridium isatidis*, *Clostridium aurantibutyricum*, *Clostridium celatum* และ *Clostridium papyrosolvens* จากการศึกษาประสิทธิภาพในการรีดิวซ์อินดิโกพบว่า *Clostridium isatidis* มีความสามารถในการรีดิวซ์อินดิโก มีค่า redox potentials อยู่ในช่วง -476 ถึง -602 มิลลิโวลต์ นอกจากนี้ยังพบว่าสารจากรากของต้นแมดเดอร์ ได้แก่ anthraquinone-2,6-disulfonic acid และกรดฮิวมัส จะกระตุ้นให้แบคทีเรียที่รีดิวซ์อินดิโกได้

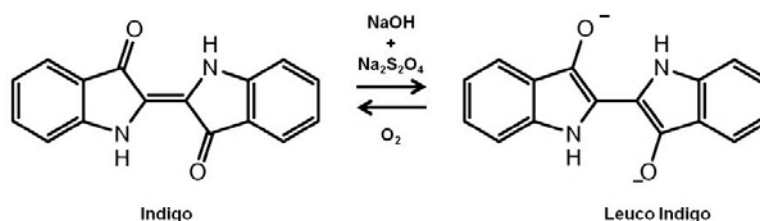
Bozic และคณะ (2008) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ dehydrogenase และ azoreductase ในการรีดิวซ์อินดิโก พบว่า เอนไซม์ azoreductase จาก *Bacillus subtilis* มีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์อินดิโกที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชอยู่ในช่วง 7.0-11.0 นอกจากนี้ Pricelius และคณะ (2007) ยังพบว่าค่าความเข้มข้นของสีผ้าและคุณสมบัติความทนทานของสีผ้าหลังกระบวนการย้อม ขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ ค่าพีเอช เวลา และชนิดของผ้าที่ใช้ย้อม ดังนั้นจึงแสดงได้ว่าเอนไซม์ azoreductase สามารถรีดิวซ์อินดิโกได้

Aino และคณะ (2010) ทำการศึกษาแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย้อมอินดิโก (indigo fermentation) เมื่อทำการระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยวิธี denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) และวิเคราะห์ clone library ด้วย PCR-amplified *16s rRNA* gene พบว่าแบคทีเรีย *Amphibacillus* spp. strain C40 และ *Oceanobacillus* spp. Strain A21 มีบทบาทต่อการรีดิวซ์อินดิโกในน้ำย้อมช่วงแรกของการย้อมอายุประมาณ 4 วัน และ *Alkalibacterium* spp. มีบทบาทต่อการรีดิวซ์อินดิโกในน้ำย้อมอายุประมาณ 10 เดือน

Park และคณะ (2012) ทำการคัดเลือกและศึกษาสมบัติในการเติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง (alkaliphilic) และสมบัติในการทนความร้อนสูง (thermotolerant) ของแบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์อินดิโกให้เป็นลิวโคอินดิโกจากสีย้อมอินดิโก (indigo dye vat) พบแบคทีเรีย 2 ไอโซเลท คือ A1 (*Alkalibacterium* sp.) และ G5 (*Pseudomonas* sp.) มีความสามารถในการรีดิวซ์อินดิโก และมีคุณสมบัติเป็น alkaliphilic bacteria นอกจากนี้ยังสามารถทนความร้อนสูงได้อีกด้วย แบคทีเรียดังกล่าวสามารถรีดิวซ์อินดิโกได้ดีที่ค่าพีเอชเท่ากับ 10.0 ที่ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

2.2.2.2 การรีดิวซ์อินดิโกด้วยสารเคมี

โซเดียมไดไธโอไนต์ (sodium dithionite) หรือ โซเดียมไฮโดรซัลไฟต์ (sodium hydrosulphite) เป็นสารเคมีที่นิยมใช้เป็นตัวรีดิวซ์ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ เพื่อเปลี่ยนรูปสีย้อมที่อยู่ในรูปของที่ไม่ละลายน้ำให้ละลายน้ำ เมื่อโซเดียมไดไธโอไนต์ละลายในน้ำหรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จะปลดปล่อยไฮโดรเจนออกมาทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอนิล (C=O) ในโครงสร้างของสีให้อยู่ในรูปของสารประกอบลิวโค (CH-OH) หรือแอลกอฮอล์แบบทุติยภูมิ (Shore, 1995) อุณหภูมิที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาจะอยู่ในช่วง 30-60 องศาเซลเซียส ปฏิกิริยาในการรีดิวซ์อินดิโกด้วยโซเดียมไดไธโอไนต์ แสดงดังภาพที่ 2.7 ซึ่งข้อดีของการใช้โซเดียมไดไธโอไนต์คือ ใช้ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาสั้น คุณภาพของสีย้อมที่ได้มีความแน่นอน สามารถประยุกต์ใช้ได้ดีกับสีย้อมหลากหลายชนิด (Bozic, 2008) แต่จากการศึกษาพบว่าการใช้โซเดียมไดไธโอไนต์เป็นตัวรีดิวซ์ ก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เช่น ซัลไฟต์ (sulphite) ซัลเฟต (sulphate) และไฮโอซัลเฟต (thio sulphate) นอกจากนี้ยังส่งผลกระทบต่อกระบวนการบำบัดน้ำเสียและก่อให้เกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ (hydrogen sulfide) ซึ่งเป็นแก๊สพิษ (Cegarra และคณะ, 1992; Anbu และคณะ, 2007)



ภาพที่ 2.7 การรีดิวซ์อินดิโกด้วยโซเดียมไฮไดรอกไซด์

ที่มา : Buscio, 2014

2.2.3 กระบวนการย้อมอินดิโกธรรมชาติ

กระบวนการย้อมอินดิโกธรรมชาติ ประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้ 1. การสกัดอินดิโก 2. การเตรียมน้ำย้อมหรือการก่หม้อ และ 3. การย้อมสี กระบวนการย้อมอินดิโกธรรมชาติในแต่ละประเทศ จะมีวิธีการที่แตกต่างกันหลัก ๆ ในขั้นตอนการสกัดอินดิโกและกระบวนการเตรียมน้ำย้อม โดยกระบวนการย้อมจะขึ้นกับทรัพยากรธรรมชาติที่มี ลักษณะภูมิประเทศ และภูมิปัญญาของประเทศนั้น ๆ (Chavan, 2015)

ประเทศอินเดีย การสกัดอินดิโกจะทำการสกัดจากต้นครามสกุล *I. tinctoria* โดยทำการตัดต้นครามแล้วมัดให้เป็นพ่อน บรรจุลงในถังซีเมนต์สีเหลี่ยมจัตุรัส สูงประมาณ 3 ฟุต เติมน้ำให้ท่วม แล้วทำการแช่ไว้เป็นเวลา 10-15 ชั่วโมง จะได้ส่วนสีเหลืองจากนั้นตีให้เกิดฟอง ส่วนสีเหลืองจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้ตกตะกอน กำจัดส่วนใสด้านบนออกแล้วนำตะกอนที่ได้ไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อทำการกำจัดสิ่งปนเปื้อนที่อยู่ในตะกอนอินดิโก กรองตะกอนด้วยถุงผ้าขนสัตว์หรือถุงผ้าแคนวาสแบบหยาบ ทูบเพื่อรีดน้ำออกจากตะกอนแล้วนำไปตากให้แห้ง ขั้นตอนการก่หม้อ เติมน้ำขาวปริมาณ 250 กรัม ซี้เถ้าปริมาณ 500 กรัม เมล็ดละหุ่ง (casetosa seed) ปริมาณ 500 กรัม ลงในน้ำปริมาตร 2 ลิตร ต้มให้เดือดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติมตะกอนอินดิโกที่เตรียมได้ ปริมาณ 500 กรัม ลงไป นำส่วนผสมทั้งหมดที่เตรียมได้ใส่ลงในหม้อดินแล้วหุ้มปากหม้อด้วยผ้า ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดกระบวนการหมักเป็นเวลา 7-10 วัน เพื่อให้สีเปลี่ยนเป็นสีเหลือง นำผ้าจุ่มลงในหม้อแล้วยกขึ้นสัมผัสอากาศ ย้อมซ้ำเพื่อให้ได้สีน้ำเงินที่เข้มตามต้องการ (Chavan, 2015)

ประเทศญี่ปุ่น สกัดอินดิโกจากพืชสกุล *Polygonum* โดยนำพืชตากให้แห้งแล้วผสมกับแกลบของข้าวสาเล่ ปูนขาว และน้ำค้างที่เตรียมได้จากซี้เถ้า จากนั้นหมักทิ้งไว้เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อทำให้เกิดสี เรียกผลิตภัณฑ์ที่หมักได้ว่า sukumo ขั้นตอนก่หม้อ เติมน้ำขาว ปริมาณ 1 ลิตร ใส่ข้าวสาเล่ เหล้าสาเก ซี้เถ้า ปูนขาว ลงในน้ำ หมักทิ้งไว้จนเกิดฟอง นำผ้าจุ่มลงในน้ำย้อมเป็นเวลา 15-30 นาที ยกผ้าขึ้นสัมผัสกับอากาศจะเกิดสีฟ้าขึ้นบนผ้า (Chavan, 2015)

สำหรับประเทศไทย สกัดอินดิโกจากพืช สกุล *I. tinctoria* หรือต้นคราม โดยมีขั้นตอน ดังนี้ ตัดกิ่งใบคราม มาล้างน้ำให้เป็นฟอง แล้วจัดเรียงลงในโอ่งมังกร ถังพลาสติก หรือภาชนะอื่น ๆ ที่บรรจุน้ำ ในอัตราส่วน ครามสด 50 กิโลกรัมต่อน้ำ 100 ลิตร เป็นเวลา 10-12 ชั่วโมง แล้วทำการ พลิกด้านล่างขึ้นมาไว้ด้านบน เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง แยกมัดกิ่งใบครามออกจะได้น้ำแช่ใบคราม ซึ่งมีลักษณะสีเขียวแกมเหลือง เรียกส่วนนี้ว่า น้ำคราม จากนั้นเติมปูนขาวลงในน้ำคราม ใช้นิ้วหรือไม้ไผ่ กวนในทิศทางเดียวกันจนเกิดฟองสีน้ำเงิน กวนต่อไปจนฟองมีขนาดใหญ่และแตกตัวเร็วตั้งทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง จะเกิดการแยกชั้นระหว่างเนื้ออินดิโกและส่วนใส จากนั้นกรองด้วยผ้าจะได้ตะกอนเหนียวสีน้ำเงินเข้ม ในการเตรียมน้ำย้อมและการก่หม้อ เตรียมน้ำขี้เถ้าหรือน้ำค้างโดยนำเหง้ากล้วย เปลือกผล ทุเรียน และทางมะพร้าวมาสับให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ เผารวมกันให้เป็นเถ้า ใช้น้ำพรหมให้ไฟดับ จากนั้นนำขี้เถ้า บรรจุลงในภาชนะที่เจาะรูด้านล่างจนเต็ม เติมน้ำกรองเอาน้ำขี้เถ้าเพื่อใช้ในการก่หม้อต่อไป ทำ ความสะอาดถังพลาสติกหรือโอ่งดินให้สะอาด จากนั้นเติมเนื้ออินดิโกปริมาณ 1.5 กิโลกรัม และน้ำ ต่าง (น้ำขี้เถ้า) ปริมาตร 3 ลิตร ลงในถังกวนให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วเติมน้ำมะขามเปียกปริมาตร 3 ลิตร ที่เตรียมในอัตราส่วนมะขามเปียกแคะเมล็ด 100 กรัม ต่อน้ำ 3 ลิตร กวนผสมให้เข้ากัน โฉกเข้า และเย็น เมื่อน้ำย้อมมีสีเขียวอมเหลือง และเกิดฟองสีน้ำเงินบนผิวน้ำย้อม นั้นแสดงว่าน้ำย้อมสามารถ ใช้อย่างได้แล้ว จึงทำการย้อมสี โดยนำเส้นใยฝ้ายที่ผ่านการกำจัดไขมันด้วยการต้มในน้ำเดือด แชลงใน น้ำย้อม จากนั้นขยี้เส้นใยฝ้ายตามรอบวงของใจฝ้ายด้วยแรงขยี้ที่สม่ำเสมอ โดยขณะที่ขยี้เส้นใย จะต้องจุ่มอยู่ในน้ำย้อมเสมอ ทำการบิดแล้วสะบัดเส้นใยฝ้ายให้สัมผัสกับอากาศ เส้นใยฝ้ายจะค่อย ๆ เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน หากต้องการสีเข้มต้องนำเส้นใยย้อมซ้ำในหม้อครามใบอื่น ๆ เมื่อทำ การย้อมเสร็จจะต้องทำการเติม เนื้ออินดิโก 1 กรัม น้ำต่างและน้ำมะขามเปียก 100 มิลลิลิตร น้ำตาลทรายแดง 20 กรัม เพื่อเป็นการรักษาหม้อย้อมให้มีสี และสามารถใช้อย่างได้ดังเดิม

2.2.3.1 ข้อดีของกระบวนการย้อมอินดิโกธรรมชาติ

1. ปลอดภัยต่อผู้ผลิต ผู้บริโภค และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจาก กระบวนการดังกล่าวไม่ใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพหรือสารเคมีที่เป็นโลหะหนักจึงไม่ ก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์พลอยได้ที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม
2. สามารถใช้อย่างซ้ำได้หลายครั้ง ไม่จำเป็นต้องทิ้งน้ำย้อมที่ทำการเตรียม เอาไว้แล้ว โดยการโฉกให้อากาศหรือการเติมส่วนผสมลงไป เพื่อให้แบคทีเรียในน้ำย้อมสามารถทำงาน ได้
3. ช่วยลดการขาดดุลการค้าของประเทศเนื่องจากใช้ทรัพยากรที่มีอยู่ใน ท้องถิ่น ลดการนำเข้าจากต่างประเทศ
4. ฟื้นฟูและอนุรักษ์องค์ความรู้ อันเป็นภูมิปัญญาที่ทรงคุณค่าไม่สูญหาย

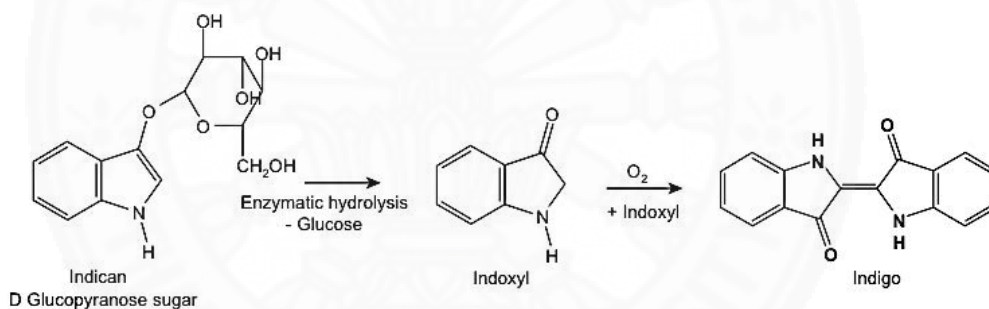
2.2.3.2 ข้อจำกัดของกระบวนการย้อมอินดิโกธรรมชาติ

1. กระบวนการมีความยุ่งยากซับซ้อนและใช้ระยะเวลานาน เช่น ระยะเวลาในการปลูกพืชเพื่อใช้ในการสกัดสี รวมถึงระยะเวลาในกระบวนการเตรียมน้ำย้อม
2. คุณภาพของสีไม่สม่ำเสมอ เนื่องจากใช้วัตถุดิบจากธรรมชาติจึงทำให้ไม่สามารถควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบได้ ดังนั้นในแต่ละครั้งของการย้อมจึงได้ผ้าที่สีไม่เหมือนเดิมและมีค่าความคงทนต่ำ

2.2.4 ปฏิริยาเคมีในกระบวนการย้อมอินดิโกธรรมชาติ

2.2.4.1 การสกัดอินดิโก

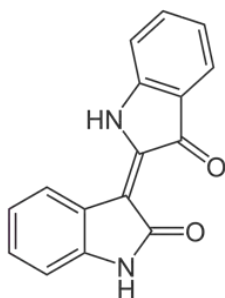
เมื่อแช่ใบพืชในน้ำที่อุณหภูมิห้อง จะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) โดยเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส (β -glucosidase) ที่พบภายในคลอโรพลาสต์ (chloroplast) (Minami และคณะ, 1997) ของใบพืช ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาล (sugar) และอินดอกซิล (indoxyl) จากนั้นอินดอกซิลจะเปลี่ยนเป็นอินดิโกอย่างรวดเร็วด้วยปฏิกิริยา oxidative dimerization กับออกซิเจนในอากาศ (Clark และคณะ, 1993) กระบวนการเปลี่ยนสารตั้งต้นในพืชเป็นอินดิโก แสดงดังภาพที่ 2.8



ภาพที่ 2.8 กระบวนการเปลี่ยนสารตั้งต้นในพืชเป็นอินดิโก

ที่มา : Clark และคณะ, 1993

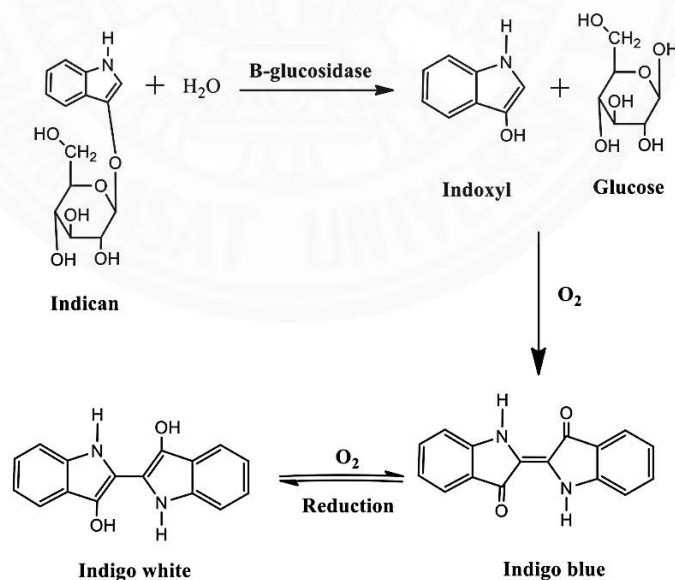
ในการสกัดอินดิโกด้วยพืชเหล่านี้ จะได้อินดิรูบิน (indirubin) ออกมาด้วย โดยอินดิรูบิน เป็นสารสีแดงที่ไม่สามารถใช้ในการย้อมได้ เนื่องจากในระหว่างการเตรียมน้ำย้อม ซึ่งเป็นสภาวะต่างจะแตกตัวออกเป็น pseudo-indoxyl กับ oxindole ซึ่ง pseudo-indoxyl นี้จะเกิดการออกซิไดซ์กลับไปเป็นอินดิโกได้ โครงสร้างอินดิรูบิน แสดงดังภาพที่ 2.9



ภาพที่ 2.9 โครงสร้าง อินดิรูบิน

ที่มา: Maugard และคณะ, 2002

จากนั้นในกระบวนการเตรียมน้ำย้อมจะเป็นการทำให้อินดิโกที่อยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำเปลี่ยนเป็นลิวโคอินดิโกซึ่งเป็นรูปที่ละลายน้ำ เมื่อน้ำย้อมพร้อมที่จะย้อมจะสังเกตได้จากสีน้ำเงินเปลี่ยนเป็นสีเขียวปนเหลืองหรือสีเหลือง และเมื่อทำการย้อม ลิวโคอินดิโกที่ละลายอยู่ในน้ำย้อมจะเข้าจับกับเซลลูโลสของเส้นใยผ้าด้วยพันธะไฮโดรเจน เมื่อยกผ้าขึ้นสัมผัสกับอากาศ ลิวโคอินดิโกจะถูกออกซิไดส์โดยออกซิเจนในอากาศ กลายเป็นอินดิโกที่ไม่ละลายน้ำซึ่งไว้ในโครงสร้างของเส้นใยทำให้เส้นใยเกิดเป็นสีฟ้าหรือสีน้ำเงินปฏิกิริยาในการย้อมอินดิโกธรรมชาติแสดงดังภาพที่ 2.10



ภาพที่ 2.10 ปฏิกิริยาการย้อมอินดิโกธรรมชาติ

ที่มา: อนุรัตน์, 2555














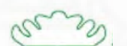



2.3 เทคนิคและเครื่องมือวิเคราะห์

2.3.1 การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรีย

การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรีย (identification) สปีชีส์ (species) หรือสายพันธุ์ภายในสปีชีส์ (strain) สามารถทำได้หลากหลายวิธีดังนี้

1. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) เป็นการศึกษารูปร่างของเซลล์ ชนิดของสปอร์ ลักษณะของเส้นใย การส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้สีย้อม เช่น การย้อมแกรม (Gram's stain) วิธีการที่นิยมมากที่สุดคือการศึกษาลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยตาเปล่า โดยลักษณะการสร้างโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียแสดงดังตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 ลักษณะการสร้างโคโลนีของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ลักษณะ	รูปร่าง					
รูปร่าง (form)	 punctiform	 circular	 filamentous	 irregular	 rhizoid	 spindle
ความสูง (elevation)	 flat	 raised	 convex	 pulvinate	 umbonate	
ขอบ (edge)	 entire	 undulate	 lobate	 erose	 filamentous	 curled
ลักษณะ ผิวหน้า (surface)	เรียบ (smooth)	ขรุขระ (Rough)	วงแหวนซ้อน (concentric ally ringed)	ลูกคลื่น ลักษณะไม่ แน่นอน (contour ed)	รอยย่น (Rugose)	

ที่มา: Salle, 1973

2. การทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test) เป็นการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาชีวเคมีของกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียในการใช้สารตั้งต้นเพื่อการเจริญเติบโต และการผลิตสารต่าง ๆ เช่น การใช้กลูโคส แลคโตส และแหล่งคาร์บอนอื่น ๆ การใช้ไนโตรเจน การสร้างก๊าซ การสร้างกรด ขั้นตอนในการทดสอบทำได้โดยนำสารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรียใส่ลงในหลุมที่มีการเติมสารตั้งต้น จากนั้นนำไปบ่มตามอุณหภูมิที่กำหนด อ่านผลเป็นบวกสำหรับแบคทีเรียที่มีการใช้สารตั้งต้น และอ่านผลเป็นลบสำหรับแบคทีเรียที่ไม่มีการใช้สารตั้งต้น นำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลักษณะทางสรีระวิทยาของแบคทีเรียหรือวิเคราะห์โดยโปรแกรม เช่น apiweb™

3. การทดสอบทางชีวโมเลกุล (DNA sequence) เป็นวิธีที่อาศัยฐานข้อมูลทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย หรือการเปรียบเทียบกับแบคทีเรียมาตรฐาน เช่น การตัดด้วยเอนไซม์ (restriction enzyme) หรือการหาลำดับเบส (sequence) โดยยีนที่นิยมนำมาเปรียบเทียบคือ ยีน *16s rRNA* ซึ่งเป็นยีนที่มีหน้าที่ในการสร้างไรโบโซมหน่วยย่อยที่มีขนาด 16S

Hirota และคณะ (2017) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการรีดิวซ์อินดิโกจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ Bps-1, Bps-2 และ Bps-3 จากน้ำย้อมในกระบวนการย้อมอินดิโกธรรมชาติ จากนั้นทำการระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วย ยีน *16S rRNA* พบว่า แบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 3 ไอโซเลท มีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus pseudofirmus* DSM 8715, *Bacillus lindianensis* DSM 26864 และ *Bacillus alcalophilus* DSM 485T ตามลำดับ โดยแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทนี้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่ง สามารถเคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลา

Hirota และคณะ (2018) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการรีดิวซ์อินดิโกจากน้ำย้อมในกระบวนการย้อมอินดิโกธรรมชาติ พบแบคทีเรียจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ BF-1, BF-2 และ BF-4 เมื่อใช้ยีน *16S rRNA* ในการระบุสายพันธุ์ พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทมีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus maritimus* DSM 100413T, *Bacillus persicus* DSM 25386T และ *Bacillus rigiliprofundii* LMG 28275T ตามลำดับ

2.3.2 การทำแห้งแบบเยือกแข็ง

การทำแห้งเยือกแข็ง (freeze drying) คือ การทำให้น้ำระเหิดไปจากสารแขวนลอยของจุลินทรีย์ที่ผ่านการแช่แข็งแล้วในสภาพสุญญากาศ จุลินทรีย์จะอยู่ในสภาพที่แห้งและแข็ง (Gherna, 1994) โดยกระบวนการนี้จะช่วยให้อัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์สูงขึ้นและระยะเวลาในการเก็บรักษายาวนานขึ้น การทำแห้งแบบเยือกแข็งประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ 1. การแช่แข็ง (pre-freezing) เป็นกระบวนการลดอุณหภูมิของตัวอย่างให้ต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง เพื่อลดระยะเวลาในการทำแห้งแบบเยือกแข็ง 2. การทำแห้งขั้นแรก (primary drying) เป็นการระเหิดน้ำให้กลายเป็นไอด้วยการลดความดันบรรยากาศ ทำให้ผลึกน้ำแข็งที่อยู่ภายในตัวอย่างระเหิดกลายเป็นไอออกจากตัวอย่าง ส่งผลให้ตัวอย่างแห้ง และ 3. การระเหิดขั้นสอง (secondary drying) ขั้นตอนนี้เป็นการอบเพื่อให้ลด

ความชื้นของตัวอย่าง อย่างไรก็ตามในระหว่างกระบวนการทำแห้งนั้นจะต้องมีการทำให้สารแขวนลอยเซลล์อยู่ในสภาพแข็ง ซึ่งอาจก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ โดยผลึกน้ำแข็งอาจทำให้เซลล์แตก และสูญเสียความสามารถในการเป็นเยื่อเลือกผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดการแพร่ของน้ำออกจากเซลล์ ทำให้เซลล์เกิดการสูญเสียน้ำ และอาจส่งผลให้จุลินทรีย์ตายในที่สุด (Steponkus, 1984) ดังนั้นการทำแห้งจึงต้องมีสารป้องกันความเย็น ซึ่งเป็นสารที่ลดปัจจัยที่ทำให้เกิดการเสียหายเนื่องจากน้ำแข็ง สารป้องกันความเย็นสามารถแบ่งออกได้ 2 ชนิด คือ

1. ชนิดที่สามารถเจาะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ สารป้องกันความเย็นชนิดนี้จะเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กโดยมักมีขนาดน้อยกว่า 100 ดาลตัน ทำหน้าที่ปกป้องเซลล์โดยลดขนาดของผลึกน้ำแข็งและลดการขาดน้ำของเซลล์ (McGann, 1978) ตัวอย่างสารป้องกันความเย็นชนิดนี้คือ กลีเซอรอล (glycerol) ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) เป็นต้น

2. ชนิดที่ไม่สามารถเจาะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ สารป้องกันความเย็นชนิดนี้จะเป็นสารโมเลกุลใหญ่ มีหน้าที่ช่วยยับยั้งการเกิดของน้ำแข็งและลดการสูญเสียน้ำเช่นเดียวกับสารป้องกันความเย็นชนิดที่สามารถเจาะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ แต่สารป้องกันความเย็นชนิดนี้จะมีความเป็นพิษที่น้อยกว่า (McGann, 1978) ตัวอย่างของสารป้องกันความเย็นชนิดนี้คือ ซูโครส (sucrose) นมปลอดมันเนย (skim milk) และ มอลโตเดกซ์ตริน (maltose dextrin) เป็นต้น

Snin และคณะ (2001) ได้ทำการศึกษาสารป้องกันความเย็นที่เหมาะสมในการเก็บแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากทะเลด้วยการแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส โดยสารป้องกันความเย็นที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ กลีเซอรอลและไดเมธิลซัลฟอกไซด์ ที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่า สารทั้งสองชนิดนี้สามารถป้องกันความเย็นได้ดี ให้การอยู่รอดของแบคทีเรียที่สูงโดยอัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียนั้นจะขึ้นกับชนิดของแบคทีเรียด้วย

ปิยะวรรณ และคณะ (2554) ได้ทำการศึกษาการผลิตหัวเชื้อ *Bacillus subtilis* เพื่อการผลิตผลิตภัณฑ์ถั่วหมักด้วยวิธีการระเหิดแห้ง พบว่าการทำแห้งโดยการระเหิดแห้งโดยใช้สารป้องกันความเย็นคือ มอลโตเดกซ์ตริน ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ให้อัตราการรอดอยู่ที่ร้อยละ 84.24 เมื่อวิเคราะห์คุณสมบัติของกล้าเชื้อที่ผลิตได้โดยการหมักในอาหารเหลวและถั่วเหลืองเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าให้ความสม่ำเสมอในกระบวนการหมักและมีประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตเอนไซม์ที่ดี ซึ่งมีความเป็นไปได้ในการใช้เป็นกล้าเชื้อเพื่อผลิตถั่วเหลืองหมักต่อไป

2.3.3 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-vis spectrophotometer)

UV-vis Spectrophotometer เป็นเครื่องมือที่ใช้ในวิเคราะห์สารตัวอย่างโดยอาศัยหลักการดูดกลืนรังสีของสารตัวอย่างที่อยู่ในช่วง ultra violet (UV) และ visible (VIS) ความยาวคลื่นแสงประมาณ 190-1000 นาโนเมตร โดยที่ความยาวคลื่นแสงจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณและชนิดของสารที่อยู่ในตัวอย่างเมื่อทำการวัดปริมาณของแสงที่ผ่านหรือสะท้อนมาจากตัวอย่างเทียบกับแสง

จากแหล่งกำเนิดที่ความยาวคลื่นแสงที่ระดับความยาวคลื่นต่าง ๆ ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารจะแปรผันตรงกับจำนวนโมเลกุลที่มีการดูดกลืนแสง ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิคนี้ในระบุชนิดและปริมาณของสารต่าง ๆ ที่มีอยู่ในตัวอย่างได้ (ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2563)

2.3.4 โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (thin-layer chromatography; TLC)

โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง เป็นเทคนิคที่ใช้แยกสารผสม เพื่อตรวจสอบจำนวนและความบริสุทธิ์ของสารประกอบที่มีอยู่ในสารผสม โดยอาศัยหลักการการแบ่งปันสารระหว่างตัวดูดซับชนิดแข็ง (solid adsorption) ซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสนิ่ง (stationary phase) กับตัวทำละลาย (developing solvent) ซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เมื่อนำแผ่น TLC ที่จุดสารที่ต้องการแยกลงบนปลายด้านหนึ่ง จุ่มลงในภาชนะที่บรรจุตัวทำละลาย ตัวทำละลายจะเคลื่อนที่พาสารบนตัวดูดซับขึ้นไปตามแผ่น TLC โดยการซึมตามรูเล็ก (capillary action) ในขณะเดียวกันตัวดูดซับจะพยายามดึงหรือยึดสารนั้นไว้ จึงเห็นได้ว่าสารที่ต้องการทดสอบจะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าตัวทำละลาย สำหรับการวิเคราะห์ผลจะทำการตรวจหาจุดบนแผ่น TLC ซึ่งสามารถใช้ตาเปล่าในการตรวจหาจุด หากสารประกอบตัวอย่างที่ทำการแยกนั้นมีสี แต่หากสารประกอบตัวอย่างที่ทำการแยกนั้นไม่มีสีจะต้องใช้เทคนิคต่าง ๆ เช่น การมองแผ่น TLC ภายใต้แสง UV โดยใช้เครื่อง ultraviolet lamp การอบด้วยไอของไอโอดีน หรือการสเปรย์ด้วยสารละลายวานิลลิน (vanillin reagent) เป็นต้น (Cai, 2014)

อัตราส่วนของระยะทางจากจุดเริ่มต้นที่สารนั้นเคลื่อนที่ต่อระยะทางสูงสุดที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ จะมีค่าคงที่ ที่เรียกว่า rate of flow (R_f) ซึ่งเป็นค่าเฉพาะตัวของสารแต่ละชนิด โดยค่า R_f จะเปลี่ยนแปลงไปตามชนิดของตัวดูดซับ ชนิดของตัวทำละลาย

2.3.5 Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

เป็นวิธีการวิเคราะห์หาชนิด ปริมาณสาร และศึกษาโครงสร้างของสารตัวอย่างโดยการวัดการดูดกลืนแสงของสารในช่วง infrared (IR) เมื่อโมเลกุลของสารตัวอย่างดูดกลืนรังสีอินฟราเรดเข้าไปจะทำให้พันธะในโมเลกุลเกิดการสั่นและการหมุน โดยโมเลกุลจะดูดกลืนรังสีอินฟราเรดที่ความถี่ของรังสีอินฟราเรดเท่ากับความถี่ในการสั่นของโมเลกุลของสาร โดยสารแต่ละชนิดนั้นจะมีค่าความถี่ของการสั่นที่จำเพาะและแตกต่างกันไปทำให้สามารถนำเทคนิคนี้มาใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างและชนิดของสารได้โดยช่วงความยาวคลื่น $1500-4000\text{ cm}^{-1}$ จะบ่งบอกถึงหมู่ฟังก์ชันของโมเลกุลเช่น -OH, C=O, N-N และ CH_3 และในช่วงความยาวคลื่น $400-1500\text{ cm}^{-1}$ จะเป็นช่วง fingerprint region จะมีลักษณะของสเปกตรัมที่เฉพาะเจาะจงของสารแต่ละตัวการแสดงผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้แสดงเป็นความสัมพันธ์ระหว่าง wavenumber กับ transmittance ซึ่งเรียกว่า Infrared spectrum (นภดล, 2554)

2.3.6 Infrared (IR) Spectroscopy and imaging

Infrared Spectroscopy เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์ตรวจสอบโมเลกุลของสาร โดยอาศัยหลักการเกี่ยวกับการสั่น (vibration) ของโมเลกุลของสารจากการได้รับพลังแสงอินฟราเรด ซึ่งคลื่นความถี่ที่จำเพาะของโมเลกุลหนึ่ง ๆ จะทำให้เกิดพีค (peak) ที่ตำแหน่งเลขคลื่น (wave number) แสดงผลเป็นความสัมพันธ์ของความถี่หรือ Wave Number กับค่าการส่งผ่านของแสง เรียกว่า IR Spectrum สำหรับการนำแสงซินโครตรอนย่านพลังงานอินฟราเรดมาใช้กับเทคนิค Infrared Spectroscopy ร่วมกับการใช้กล้องจุลทรรศน์ หรือที่เรียกว่า Synchrotron-based Fourier transforms infrared microspectroscopy เป็นการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของเทคนิค Infrared Spectroscopy ให้มีความสามารถนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีขนาดเล็กหรือตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่ำมาก ๆ เนื่องจากมีคุณสมบัติของแสงซินโครตรอนที่ให้ความเข้มและความสว่างจ้าของแสงสูงกว่าแหล่งกำเนิดแสงทั่วไปมาก นอกจากนี้ยังช่วยให้ผลการวิเคราะห์ที่ได้มีอัตราส่วนระหว่างสัญญาณและสัญญาณรบกวน (signal/noise ratio) ที่ดีขึ้น โดยไม่สูญเสียรายละเอียดเชิงพื้นที่ (spatial resolution) และยังช่วยลดระยะเวลาตรวจวิเคราะห์เมื่อเทียบกับการใช้ Conventional IR source ในทางชีววิทยาช่วงที่จะใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์ส่วนใหญ่เป็นช่วงอินฟราเรดกลาง (mid-IR) เป็นส่วนใหญ่ สเปกตรัมการดูดกลืนของแสงอินฟราเรดจะมีประโยชน์อย่างมากในงานวิจัยด้านตัวอย่างทางชีววิทยา โดยสามารถวัดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน ไขมัน หรือกรดนิวคลีอิกซึ่งจะมีสเปกตรัมการดูดกลืนอยู่ในช่วงที่แตกต่าง (กาญจนา, 2010)

FTIR spectroscopy สามารถนำมาใช้วิเคราะห์ โปรตีน กรดไขมัน คาร์โบไฮเดรต กรดนิวคลีอิก และไลโปโพลีแซคคาไรด์ เป็นต้น ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลัก ของเซลล์แบคทีเรียได้โดยพิจารณาความแตกต่างเชิงปริมาณ ความเข้มและกว้างของสเปกตรัม ร่วมกับการระบุตำแหน่งเลขคลื่นความถี่จำเพาะ ซึ่งจะทำให้สามารถแยกความแตกต่างของเซลล์แบคทีเรียได้ (Davis, 2010) หมู่ฟังก์ชันที่สัมพันธ์กับสเปกตรัมการสั่นของโมเลกุลหลักของแบคทีเรียที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสีอินฟราเรด แสดงดังตารางที่ 2.8

ตารางที่ 2.8 หมู่ฟังก์ชันของสารชีวเคมีที่สัมพันธ์กับสเปกตรัมการสั่นของโมเลกุลหลักของแบคทีเรีย

เลขคลื่น (cm ⁻¹)	หมู่ฟังก์ชันของสารชีวโมเลกุล
3200	N-H stretching of amide A in proteins
2957	C-H asymmetric stretching of -CH ₃ in fatty acids
2919	C-H asymmetric stretching of > CH ₂ in fatty acids
2870	C-H symmetric stretching of -CH ₃ in fatty acids
2850	C-H symmetric stretching of > CH ₂ in fatty acids
1740	C=O stretching of lipid esters
1695-1675	Amide I band component of proteins
1655	Amide I of α -helical structure of proteins
1637	Amide I of β -plated sheet structure of proteins
1550-1520	Amide II band of proteins
1468	C-H deformation of > CH ₂ in lipids
1400	C=O symmetric stretching of COO ⁻ group in amino acids fatty acids
	Amide III band components of proteins
1305-1200	P=O asymmetric stretching in DNA, RNA and phospholipids
1245	P=O symmetric stretching in DNA, RNA and phospholipids
1080	Finger print region

ที่มา: Chonanant, 2017

2.3.7 การวิเคราะห์ศักยภาพการเกิดออกซิเดชัน รีดักชัน (oxidation reduction potential, Eh)

เป็นเทคนิคในการวัดความสามารถในการปฏิกิริยาออกซิเดชัน (การสูญเสียอิเล็กตรอน) และรีดักชัน (ปฏิกิริยาการรับอิเล็กตรอน) ของสารที่รับอิเล็กตรอนที่เรียกว่า ตัวออกซิไดซ์ (oxidizing agent) สารที่ให้อิเล็กตรอนที่เรียกว่า ตัวรีดิวซ์ (reduction agent) เมื่อเกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนจากสารชนิดหนึ่งไปยังสารอีกชนิดหนึ่ง จะเกิดความต่างศักย์ ซึ่งวัดได้ด้วยเครื่องมือวัดความต่างศักย์ มีหน่วยเป็น มิลลิโวลต์ (mV) สารที่มีความสามารถเป็นตัวออกซิไดซ์ที่ดี จะมีค่า Eh เป็นบวกมาก

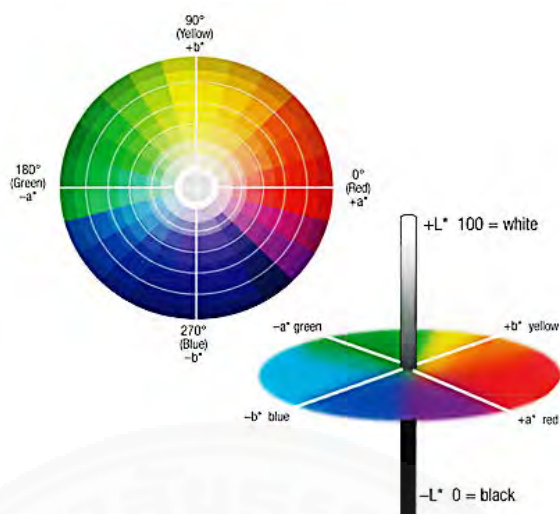
ในทางตรงข้ามสารที่เป็นตัวรีดิวซ์ที่ดีจะมีค่า Eh เป็นลบมากความต้องการค่า Eh ของจุลินทรีย์การเจริญของจุลินทรีย์ต้องมีปฏิกิริยาออกซิเดชัน รีดักชัน เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้ได้พลังงานมาใช้ในเซลล์ จุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจน เช่น ราทุกชนิด และแอโรบิกแบคทีเรีย ต้องการค่า Eh เป็นบวก (สภาพออกซิไดซ์) และขณะที่จุลินทรีย์กลุ่มนี้เจริญจะทำให้สภาพแวดล้อมมีสภาพเป็นออกซิไดซ์ลดลง ทำให้ค่า Eh ของอาหารลดลง นอกจากนี้สารที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น เช่น ไฮโดรเจนซัลไฟด์ก็มีผลทำให้ค่า Eh ลดลง

2.3.8 การวัดสีและความเข้มสี

สีคือคุณสมบัติเชิงแสงที่บ่งบอกลักษณะภายนอกของผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ และถูกนำมาเป็นตัวแปรหนึ่งในการกำหนดมาตรฐานของผลิตภัณฑ์ การพรรณนาหรือการสื่อสารสีให้ผู้อื่นรับรู้และเข้าใจง่าย จะนิยมใช้ 3 สิ่งประกอบกัน 1. เฉดสี (hue) ซึ่งจะระบุเป็นสี เช่น แดง เขียว ม่วง น้ำเงิน ส้ม ฯลฯ 2. ความสว่าง (value หรือ lightness หรือ brightness) ซึ่งจะเป็นสิ่งที่กำหนดว่า วัตถุหรือสีนั้นสว่างหรือมืด (dark) เมื่อเทียบกับสิ่งอื่น ๆ 3. ความอิ่มตัว (chroma หรือ saturation) จะระบุความสดของสีหรือความบริสุทธิ์ของสี (saturation หรือ vividness) หากสีอิ่มตัวน้อยหรือไม่สดใส เรียกว่า สีตุ่น (dull color)

2.3.8.1 ระบบสี CIE L*a*b* หรือ CIELAB

CIELAB เป็นระบบการวัดสีที่สามารถบอกความแตกต่างของสีได้อย่างสม่ำเสมอ และใกล้เคียงกับความแตกต่างของสีที่ตามองเห็น การอ่านผลนั้นจะแสดงเป็นค่า L* หมายถึงค่าความสว่าง (Lightness) ค่า a* ใช้กำหนดสีแดงหรือสีเขียว ค่า b* ใช้กำหนดสีเหลืองหรือสีน้ำเงิน นอกจากนี้ในระบบ CIELAB ยังมีการเชื่อมค่า a และ b เข้ากับ hue และ chroma โดยกำหนด color term อีก 2 ตัว คือ hue angle (h°) เป็นตัวเลขที่ระบุว่าสีมีตำแหน่งใดบนกราฟโดยมีหน่วยเป็นองศา และ chroma (C^*) จะบ่งบอกถึงความอิ่มตัวของสี ลักษณะ Color space ของระบบ สี CIE L*a*b* แสดงดังภาพที่ 2.8 และการอ่านผลแสดงดังตารางที่ 2.11



ภาพที่ 2.11 CIELAB 1976 แสดง L^* , a^* , b^* color space
ที่มา: Afonso และคณะ, 2017

ตารางที่ 2.9 ความหมายของตัวแปรจากการวัดสีในระบบ CIELAB

ตัวแปร	ค่าที่อ่านได้	ความหมาย
L^*	0	วัตถุที่มีสีมืดหรือสีดำ
	100	วัตถุที่มีสีสว่างหรือสีขาว
a^*	+	วัตถุที่มีสีแดง
	-	วัตถุที่มีสีเขียว
b^*	+	วัตถุที่มีสีเหลือง
	-	วัตถุที่มีสีน้ำเงิน
h°	0°	วัตถุเป็นสีแดง
	90°	วัตถุเป็นสีเหลือง
	180°	วัตถุเป็นสีเขียว
	270°	วัตถุเป็นสีน้ำเงิน

2.3.8.2 ความเข้มสี (K/S)

ความเข้มสี (K/S) คือค่าที่คำนวณจากค่าการสะท้อนแสงตามทฤษฎีของ Kubelka-Munk โดยมีพารามิเตอร์ที่สำคัญ 2 ค่า คือ K และ S โดยค่า K คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชั้นตัวอย่าง ค่า S คือ ค่าการกระเจิงแสงของชั้นตัวอย่าง สำหรับงานวัสดุสิ่งทอจะถือว่าไม่มีการกระเจิงแสงในวัสดุที่ย้อมติดสีเพราะสีที่ใช้อยู่จะละลายเข้าไปอยู่ในเนื้อเดียวกันกับวัสดุที่ใช้อยู่ ดังนั้นค่า K และ S ของสีและของวัสดุจะถือเป็นค่าเดียวกัน ค่า K/S สามารถคำนวณได้จากสมการที่ 2.1

$$K/S = \frac{(1-R)^2}{2R} \quad (2.1)$$

โดยค่า K/S จะเป็นค่าที่เฉพาะแต่ละความยาวคลื่นด้วย โดยจะนิยมนวัดกันที่ ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ของแต่ละสี เช่น สีเหลืองจะอยู่ที่ 420 นาโนเมตร สีแดงอยู่ที่ 520 นาโนเมตร สีน้ำเงินจะอยู่ที่ 620 นาโนเมตร สำหรับเครื่องมือที่ใช้การวัดสีและความเข้มสีนั้นจะใช้เครื่องมือที่เรียกว่า color spectrophotometer

บทที่ 3 วิธีการวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย แสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

อุปกรณ์เครื่องมือ	ยี่ห้อ/บริษัท	รุ่น	ประเทศ
1. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker)	Scilution	SL-s150	ไทย
2. เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่งไฟฟ้า (electric balance)	Mettler	AE200	สหรัฐอเมริกา
3. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งไฟฟ้า (electric balance)	Marshall Scientific	MettlerAE200	สหรัฐอเมริกา
4. เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge)	Dupont	Sorvall	สหรัฐอเมริกา
5. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)	Gibthai	Bioline	ไทย
6. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer)	Scientific	560E	สหรัฐอเมริกา
7. เครื่องหมุนเหวี่ยงสารขนาดเล็ก (microcentrifuge)	IWAKI	TCF-12	ญี่ปุ่น
8. เครื่อง UV-vis spectrophotometer	Shimadzu	UV-1601	ออสเตรเลีย
9. เครื่อง vis-spectrophotometer	Mapada Instruments	V-1200	จีน
10. เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter)	Scientific	IQ 240	สหรัฐอเมริกา
11. เครื่องนึ่งไอน้ำ (autoclave)	Tomy	ES-315	ญี่ปุ่น
12. เครื่องวัดกระแสไฟฟ้า (ORP Prob)	SI Analytics	Xylem	เยอรมัน

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

อุปกรณ์เครื่องมือ	ยี่ห้อ/บริษัท	รุ่น	ประเทศ
13. เครื่อง microplate spectrophotometer	Tecan	Sunrise	ออสเตรีย
14. เครื่อง FTIR spectroscopy	Perkin Elmer	FTIR-GX	เยอรมัน
15. เครื่องเทียบสี (colour spectrophotometer)	X-rite	Color i5	สหรัฐอเมริกา
16. เครื่อง Synchrotron-based FTIR microspectroscopy	Bruker optics	Ettlingen	เยอรมัน
17. เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dry)	Gold Sim	CVCFD 8-5 P	สหรัฐอเมริกา
18. ตู้ดูดควัน (fume hood)	Wiwatsan Lab	Microflow	ไทย
19. ตู้ปลอดเชื้อ (biosafety cabinet)	Astecmicroflow	microflow	สหรัฐอเมริกา
20. กล้องจุลทรรศน์ (microscope)	Sprcemde	CH30RF200	ญี่ปุ่น
21. ตู้เย็นแช่แข็ง (freezer refrigerator)	Scientific	THLSF-PC997	สหรัฐอเมริกา
22. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)	Binder	ED240 oven	สหรัฐอเมริกา

3.2 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัยแสดงดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 สารเคมี

สารเคมี	ยี่ห้อ/บริษัท	ประเทศ
1. กรดอะซิติก (CH_3COOH)	RCI Labscan	ไทย
2. กลีเซอรอล ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$)	Merck	เยอรมนี
3. กลีเซอรอล ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$)	Merck	เยอรมนี
4. กลูโคส ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	Biomark	อินเดีย

ตารางที่ 3.2 (ต่อ)

สารเคมี	ยี่ห้อ/บริษัท	ประเทศ
5. คลอโรฟอร์ม (CHCl ₃)	RCI Labscan	ไทย
6. คริสตัลไวโอเลต (C ₂₅ N ₃ H ₃₀ Cl)	RCI Labscan	ไทย
7. ซาฟรานิน (C ₂₀ H ₁₉ N ₄ Cl)	RCI Labscan	ไทย
8. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	Merck	เยอรมนี
9. โซเดียมคาร์บอเนต (Na ₂ CO ₃)	Biomark	อินเดีย
10. โซเดียมไดไฮโอไนต์ (Na ₂ S ₂ O ₄)	KEMAUS	ออสเตรเลีย
11. โซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO ₃)	Biomark	อินเดีย
12. โซเดียมอะซิเตรต (C ₂ H ₃ NaO ₂)	Biomark	อินเดีย
13. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	Merck	เยอรมนี
14. ไตคลอโรมีเทน (CH ₂ Cl ₂)	Merck	เยอรมนี
15. ไตเมทิลซัลฟอกไซด์ (CH ₃) ₂ SO	RCI Labscan	ไทย
16. ผงวุ้น (ager)	-	ไทย
17. เพปโตน (peptone)	Merck	เยอรมนี
18. โพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr)	Merck	เยอรมนี
19. มอลโตเด็กซ์ทริน	เคมีภัณฑ์	ไทย
20. เมทานอล (CH ₃ OH)	RCI Labscan	ไทย
21. แป้ง (soluble starch)	Biomark	อินเดีย
22. สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	Himedia	อินเดีย
23. อาหารเลี้ยงเชื้อ (nutrient broth)	Himedia	อินเดีย
24. อินดิโกคาร์มิน (C ₁₆ H ₈ Na ₂ O ₈ S ₂)	TCI	ญี่ปุ่น
25. อินดิโกสังเคราะห์ (C ₁₆ H ₁₀ N ₂ O ₂)	TCI	ญี่ปุ่น

ตารางที่ 3.2 (ต่อ)

สารเคมี	ยี่ห้อ/บริษัท	ประเทศ
26. อินดิแคน (C ₇ H ₁₇ NO ₆)	TCL	ญี่ปุ่น
27. เอทานอล (C ₂ H ₅ OH)	RCI Labscan	ไทย
28. ไอโอดีน (I ₂)	RCI Labscan	ไทย
29. เฮกเซน (Hexane)	RCI Labscan	ไทย

3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.3.1 การศึกษากระบวนการย้อมอินดิโกธรรมชาติ

ทำการศึกษาระบวนการย้อมอินดิโกธรรมชาติ ณ ร้านครามสกล อำเภอเมืองสกลนคร จังหวัดสกลนคร โดยศึกษาวัตถุดิบที่ใช้และขั้นตอนในการย้อม

3.3.2 การคัดแยกแบคทีเรียจากน้ำย้อมอินดิโก

เก็บตัวอย่างน้ำย้อมอินดิโกธรรมชาติภายในหม้อย้อม ณ ร้านครามสกล อำเภอเมืองสกลนคร จังหวัดสกลนคร โดยการโจกน้ำย้อม 10 ครั้ง และเก็บน้ำย้อมบริเวณผิวหน้าหม้อย้อม ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ตัวอย่างที่ได้นำมาวัดค่าพีเอชด้วยเครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) จากนั้นเจือจางตัวอย่างด้วยโซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride, NaCl) ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับการเจือจาง 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ และ 10⁻⁸ เท่า ทำการคัดแยกแบคทีเรียโดยการปิเปตสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารแข็ง nutrient agar (NA) ค่าพีเอชเท่ากับ 12.0 แล้วใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยม (glass spreader) เกลี่ยสารละลายตัวอย่าง ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มในตู้บ่มเชื้อ (incubator) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็งมาศึกษาลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาต่อไป

3.3.2.1 การศึกษาลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาได้แก่ รูปร่าง (form) ริมขอบ (edge) ลักษณะผิวหน้า (surface) และสีของโคโลนีแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็ง nutrient agar (NA) ค่าพีเอชเท่ากับ 12.0 (Cappuccino และคณะ, 1999) จากนั้นคัดเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาแตกต่างกันมาคัดแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์ต่อไป

3.3.2.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาใต้กล้องจุลทรรศน์

นำท่วงเชี่ยเชื้อ (inoculating loop) เชี่ยโคโลนีแบคทีเรียลงบนแผ่นสไลด์ (microscope slide) เกลี่ยให้เป็นเยื่อบาง ๆ ที่เรียกว่า รอยสเมียร์ (smear) ทำการตรึงรอยสเมียร์ ด้วยการนำแผ่นสไลด์ ลงผ่านเหนือเปลวไฟอย่างรวดเร็ว จากนั้นทำการหยดสีย้อมคริสตัลไวโอเลต (crystal violet) ให้ทั่วรอยสเมียร์ ทิ้งไว้ 1 นาที เมื่อครบเวลาล้างออกด้วยน้ำประปา ชับน้ำให้แห้ง และหยดสารละลายไอโอดีน (iodine) ลงบนรอยสเมียร์ เมื่อครบเวลา 1 นาที ทำการล้างออกด้วยน้ำประปา จากนั้นชะล้างสีย้อมคริสตัลไวโอเลตส่วนเกินด้วยเอทานอล (ethanol) ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ล้างด้วยน้ำประปาอีกครั้ง และทำการหยดสีย้อมซาฟรานิน (safranin O) ลงบนรอยสเมียร์ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำประปา ชับให้แห้ง (Brock และคณะ, 1999) จากนั้นหยด immersion oil ลงบนรอยสเมียร์ ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า โดยเปรียบเทียบกับตัวควบคุมบวกและตัวควบคุมลบ คือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 ตามลำดับ

3.3.2.3 การคัดแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์

นำโคโลนีของแบคทีเรียที่มีลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน มาขีด (cross streak) บนอาหารแข็ง nutrient agar (NA) ค่าพีเอชเท่ากับ 12.0 จากนั้นบ่มในตู้บ่มเชื้อ (incubator) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็งมาขีดซ้ำอีกครั้ง (restreak) แล้วทำการเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ โดยการปิเปตอาหาร nutrient broth (NB) ที่มีกลีเซอรอล (glycerol) ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ผสมอยู่ ลงบนโคโลนีของแบคทีเรียผสมให้เข้ากัน เก็บในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก ภายในตู้แช่เยือกแข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป สำหรับแบคทีเรียที่คัดแยกได้นี้ได้รับการรับรองโดยคณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เลขที่ใบรับรอง 041/2560

3.3.3 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการสังเคราะห์อินดิโก

3.3.3.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียโดยเชี่ยเชื้อลงบนอาหาร nutrient agar (NA) ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 7 บ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชี่ยแบคทีเรีย 1 โคโลนี ลงในอาหารเหลว nutrient broth (NB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) ด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำกล้าเชื้อที่ได้คำนวณปริมาณความขุ่นเซลล์เริ่มต้นด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง vis-spectrophotometer ปรับความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นให้เท่ากับ 9.0×10^8 CFU/ml ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.582 ด้วยการเจือจางกับอาหารเหลว nutrient broth (NB) จากนั้นนำกล้าเชื้อ

ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) ด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เพื่อตกตะกอนเซลล์แบคทีเรีย และล้างตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3 ครั้ง จะได้ตะกอนเซลล์ที่จะใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพในการสังเคราะห์อินดิโกต่อไป

3.3.3.2 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์อินดิโก

นำตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่คัดแยกจากน้ำย้อมอินดิโก ณ ร้านครามสกกล จำนวน 18 ไอโซเลท เติมนลงในสารละลายอินดิแคน (indican) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 7 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเชื้อ (incubator) ทำการเก็บสารละลายตัวอย่างในช่วงเวลาที่ 0, 6, 12, 18 และ 24 โดยการปิเปตต์สารละลายตัวอย่างขึ้นลงในหลอดทดลองจำนวน 30 ครั้ง เพื่อให้ indoxyl เกิดการออกซิไดซ์ไปเป็นอินดิโกด้วยออกซิเจนในอากาศจากนั้นปิเปตต์สารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ (microcentrifuge tube) แล้วหมุนเหวี่ยงตัวอย่างด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge) ที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกส่วนใสและตะกอน เทส่วนใสทิ้งและเติมไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ความเข้มข้น 99.99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในตะกอนผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (vortex mixer) นำสารละลายผลิตภัณฑ์ที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 618 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer จากนั้นคำนวณปริมาณอินดิโกที่เกิดขึ้นโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของอินดิโกที่ระดับความเข้มข้น 10-50 มิลลิกรัมต่อลิตร (Due และคณะ, 2014) โดยเปรียบเทียบกับชุดทดลองควบคุมที่ไม่มีการเติมสารละลายอินดิแคน พร้อมทั้งศึกษาจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดโดยการปิเปตต์สารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาทำการเจือจางที่ระดับการเจือจาง 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} และ 10^{-6} แล้วปิเปตต์สารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารแข็ง nutrient agar (NA) ค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 เปลี่ยนให้ทั่วผิวหน้าอาหารแข็งโดยใช้เทคนิค (spread plate) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียในจานเพาะเลี้ยงที่มีโคโลนีจำนวน 30-300 โคโลนี แล้วคำนวณจำนวนแบคทีเรีย (CFU/ml) ด้วยสมการที่ 3.1 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตกับปริมาณอินดิโกที่เกิดขึ้น โดยแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์อินดิโกได้สูงจะถูกคัดเลือกเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป (ดัดแปลงจาก Song และคณะ, 2010)

วิธีคำนวณจำนวนแบคทีเรีย (CFU/ml)

$$\text{CFU/ml} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่อจานอาหาร}}{\text{ระดับการเจือจาง} \times \text{ปริมาตรที่ปิเปตต์}} \quad (3.1)$$

3.3.3.3 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์

(1) การวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer

นำสารละลายผลิตภัณฑ์ที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ค่าความยาวคลื่นแสงในช่วง 200-700 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer เปรียบเทียบกับสารละลายอินดิโกสังเคราะห์และสารละลายอินดิโกธรรมชาติ (วิธีการเตรียมดังภาคผนวก ก) (Tachimoto, 1993)

(2) การศึกษาองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (thin layer chromatography; TLC)

นำสารละลายผลิตภัณฑ์ที่ได้จุดลงบนแผ่น TLC (stationary phase) ด้วยหลอดแคปิลลารีขนาดเล็ก (capillary) โดยจุดให้ห่างจากขอบล่างประมาณ 1.5 เซนติเมตร และทำให้แห้งด้วยเครื่องเป่าลมร้อน จากนั้นนำแผ่น TLC ที่เตรียมได้ จุ่มในภาชนะแก้วที่บรรจุตัวทำละลาย (mobile phase) ที่ประกอบด้วยคลอโรฟอร์ม เฮกเซน และเมทานอล ในอัตราส่วน (14:7:1) ปริมาตรต่อปริมาตร ปิดฝาภาชนะให้สนิทเพื่อให้ภายในภาชนะอิ่มตัวด้วยไอของสารละลาย เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่เกือบถึงขอบบนของแผ่น TLC ให้นำแผ่นออกจากภาชนะ พร้อมกับขีดแนวของตัวทำละลาย (solvent front) ตรวจสอบแถบสารสำคัญที่เกิดขึ้นบนแผ่น TLC จากนั้นทำสัญลักษณ์ของตำแหน่งสารที่ปรากฏเปรียบเทียบกับผลที่ได้กับสารละลายอินดิโกสังเคราะห์ และสารละลายอินดิโกธรรมชาติ ด้วยการคำนวณค่าคงที่อัตราไหล (rate of flow, R_f) สมการที่ 3.2 (Laitonjam และคณะ, 2011)

วิธีการคำนวณค่าคงที่อัตราไหล

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}} \quad (3.2)$$

(3) การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเครื่อง Fourier transform infrared Spectroscopy

นำตะกอนผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทำแห้งด้วยการระเหยน้ำออกในตู้อบลมร้อน (hot air oven) อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเข้าตู้ดูดความชื้น (desiccator) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์โดยนำตัวอย่างที่ผ่านการทำแห้ง 1 มิลลิกรัม ผสมกับโพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr) 100 มิลลิกรัม บดให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วใส่ลงในชุดเตรียมตัวอย่าง เปลี่ยนให้พื้นผิวสม่ำเสมอ จากนั้นทำการอัดตัวอย่างให้เป็นแผ่นฟิล์มบาง ๆ ด้วยเครื่องอัดไฮดรอลิก (hydraulic press) ทำการยึดตัวอย่างที่ได้ด้วยแผ่นเซลล์ และนำตัวอย่างเข้าเครื่อง FTIR spectrometer ณ ห้องปฏิบัติการเคมี C407 สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต นำผลที่ได้วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม WIN-IR easy และ IR Mentor pro 6.5 (BIO-RAD Laboratories) โดยศึกษาช่วงเลขคลื่นที่ $4000-400\text{ cm}^{-1}$ ทำการพิจารณาลักษณะสเปกตรัม หมู่ฟังก์ชันของตัวอย่างผลิตภัณฑ์เปรียบเทียบกับอินดิโกสังเคราะห์ และอินดิโกธรรมชาติ

(4) การศึกษาเซลล์ของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์อินดิโกสูงที่สุดด้วยเครื่อง Synchrotron-based FTIR microspectroscopy

นำตะกอนเซลล์แบคทีเรียไอโซเลท SKTU16 โดยแบคทีเรียไอโซเลทดังกล่าวเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสังเคราะห์อินดิโกสูงที่สุด เติมนลงในสารละลายอินดิแคนความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 7 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0, 48 และ 96 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เทส่วนใสทิ้งทำการล้างตะกอนเซลล์ด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นล้างผลึกโซเดียมคลอไรด์ออกจากตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อจำนวน 3 ครั้ง ทำการละลายตะกอนเซลล์และปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นให้มีค่าที่เหมาะสมด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ หยดตัวอย่างเซลล์แบคทีเรียลงบน KBr window แล้วนำไปใส่ในตู้ดูดความชื้นนาน 30 นาที นำตัวอย่างที่เตรียมได้มาทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Synchrotron-based FTIR microspectroscopy ที่กำลังขยาย 36 เท่า ณ ห้องปฏิบัติการระบบลำแสงแสง BL4.1 สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) โดยวิเคราะห์ช่วงสเปกตรัมที่เลขคลื่น $4000-400\text{ cm}^{-1}$ ความละเอียดที่ 6 cm^{-1} นำสเปกตรัมทั้งหมดที่ได้ไปวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม OPUS 7.5 (optics Bruker) เพื่อคัดเลือกช่วงของสเปกตรัมที่เลขคลื่น $3200-2800\text{ cm}^{-1}$ และ $1800-920\text{ cm}^{-1}$ จากนั้นนำสเปกตรัมที่ได้ในแต่ละตัวอย่างมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Unscrambler X 10.5 (CAMO, Oslo, Norway) เพื่อวิเคราะห์ผลการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบภายในเซลล์และองค์ประกอบทางชีวเคมีของเซลล์แบคทีเรียในชั่วโมงที่ 0, 48 และ 96 ชั่วโมง โดยมีเซลล์แบคทีเรียไอโซเลท SKTU16 ที่ไม่เติมน้ำอินดิแคนเป็นทรีตเมนต์ควบคุม

3.3.4 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการรีดิวซ์อินดิโก

3.3.4.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารแข็ง nutrient agar (NA) ค่าพีเอชเท่ากับ 12 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเชื้อ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น cấyแบคทีเรีย 1 โคโลนี ลงในอาหารเหลว clostridial nutrient medium (CNM) มีส่วนประกอบได้แก่ peptone 10 กรัมต่อลิตร yeast extract 13 กรัมต่อลิตร glucose 5.0 กรัมต่อลิตร soluble starch 1.0 กรัมต่อลิตร sodium chloride 5.0 กรัมต่อลิตร sodium acetate 3.0 กรัมต่อลิตร agar 0.5 กรัมต่อลิตร ที่ละลายในสารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนต บัฟเฟอร์ (bicarbonate carbonate buffer)

ค่าพีเอชเท่ากับ 10.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) ด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Aino และคณะ, 2001) จากนั้นนำกล้าเชื้อที่ได้ คำนวณปริมาณความขุ่นเซลล์เริ่มต้นด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง vis-spectrophotometer ปรับความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นให้เท่ากับ 9.0×10^8 CFU/ml ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.582 ด้วยการเจือจางกับอาหารเหลว clostridial nutrient medium (CNM) จะได้กล้าเชื้อแบคทีเรียที่จะนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

3.3.4.2 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์อินดิโก

เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร ลงใน 96 well plate ที่บรรจุอาหาร clostridial nutrient medium (CNM) ที่เติมอินดิโกคาร์มีน (indigo carmine) ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 270 ไมโครลิตร จากนั้นพันพาราฟิล์มโดยรอบ 96 well plate แล้วบรรจุลงถุงซิปล็อค ทำการดูดอากาศออกด้วยปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเชื้อ (incubator) บันทึกผลการทดลอง ในวันที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 420 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader โดยมีโซเดียมไดไธโอนท์ (sodium dithionite) ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร เป็นทริตเมนต์ควบคุมบวก จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ลิวโคอินดิโกสัมพัทธ์ที่เกิดขึ้นด้วยสมการที่ 3.3

วิธีคำนวณเปอร์เซ็นต์ลิวโคอินดิโกสัมพัทธ์

$$\text{Relative luecoindigo (\%)} = \frac{OD_s}{OD_c} \times 100 \quad (3.3)$$

เมื่อ OD_s คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่มีแบคทีเรียเป็นตัวรีดิวซ์

OD_c คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่มีโซเดียมไดไธโอนท์เป็นตัวรีดิวซ์

3.3.4.3 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ต่อการรื้อฟื้นอินดิโกในกระบวนการย้อมอินดิโกธรรมชาติ

(1) การเตรียมกล้าเชื้อ

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลทที่ SKTU3 และ SKTU4 ซึ่งเป็นไอโซเลทที่มีความสามารถในการรื้อฟื้นอินดิโกสูงที่สุดบนอาหาร nutrient agar (NA) ค่าพีเอชเท่ากับ 12.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเชื้อ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อแบคทีเรีย 1 โคโลนี ลงในอาหารเหลว nutrient Broth (NB) ค่าพีเอช 12.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) ด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำกล้าเชื้อที่ได้คำนวณปริมาณความขุ่นเซลล์เริ่มต้นด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง vis-spectrophotometer ปรับความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นให้เท่ากับ 9.0×10^8 CFU/ml ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.582 ด้วยการเจือจางกับอาหารเหลว nutrient broth จากนั้นนำกล้าเชื้อ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร มาหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) ด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เพื่อตกตะกอนเซลล์แบคทีเรีย และล้างตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3 ครั้ง จะได้ตะกอนเซลล์ที่จะใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพในการรื้อฟื้นอินดิโกต่อไป

(2) การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการรื้อฟื้นอินดิโก

เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ SKTU3 และ SKTU4 ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร ลงในน้ำย้อมอินดิโกที่เตรียมขึ้นที่ประกอบด้วย อินดิโกธรรมชาติที่เติมปูนขาว (วิธีการเตรียมดังภาคผนวก ก) ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ปูนแดง ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร น้ำต่าง 100 มิลลิลิตร และน้ำมะขามเปียก 100 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเชื้อ เก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 โดยการปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร วัดค่าพีเอช ด้วยเครื่องวัดค่าพีเอช และค่าศักย์ไฟฟ้ามาตรฐานของการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ด้วยหัววัดกระแสไฟฟ้า (ORP Prob) ที่ต่อเข้ากับเครื่องวัดค่าพีเอช พร้อมทั้งบันทึกสีของน้ำย้อมที่เปลี่ยนแปลงไป จากนั้นนำผ้าขนาด 5.0x5.0 ตารางเซนติเมตร จุ่มลงในสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำตัวอย่างผ้าชิ้นสัมผัสกับอากาศและปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องจะได้ตัวอย่างผ้าที่จะใช้ในการศึกษาขั้นถัดไปโดยมีโซเดียมไดไธโอนัท (sodium dithionite) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร เป็นทรีตเมนต์ บวก และน้ำย้อมอินดิโกที่ไม่มีการเติมสารรีดิวซ์เป็น ทรีตเมนต์ควบคุม (สรารุณี, 2557; Tachimoto, 1993; Aino, 2010)

3.3.4.4 การศึกษาคุณสมบัติของผ้าหลังกระบวนการย้อม

(1) การศึกษาสีของผ้าด้วยเครื่อง Color spectrophotometer

ศึกษาค่าความเข้มสี (K/S) ค่าความสว่างของสี (L*) ค่าความอิ่มตัวของสี (C*) และเฉดสี (a*, b*, h°) ของตัวอย่างผ้าด้วยเครื่อง color spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสงในช่วง 360-750 นาโนเมตร ณ ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีวัสดุและสิ่งทอ C504 อาคารบรรยายเรียนรวม 5 คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

(2) การศึกษาองค์ประกอบของส่วนสกัดจากผ้าตัวอย่างด้วยโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (thin layer chromatography; TLC)

นำตัวอย่างผ้าขนาด 2.0x2.0 ตารางเซนติเมตร แช่ในไตรคลอโรมีเทนและเมทานอล ในอัตราส่วน (1:1) ปริมาตรต่อปริมาตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายของส่วนสกัดที่ได้จุดลงบนแผ่น TLC (stationary phase) ด้วยหลอดแคปิลลารีขนาดเล็ก (capillary) โดยจุดให้ห่างจากขอบล่างประมาณ 1.5 เซนติเมตร และทำให้แห้งด้วยเครื่องเป่าลมร้อน นำแผ่น TLC ที่เตรียมได้ จุ่มในภาชนะแก้วที่บรรจุ ไตรคลอโรมีเทน (mobile phase) ปิดฝาภาชนะให้สนิทเพื่อให้ภายในภาชนะอิ่มตัวด้วยไอของสารละลาย เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่เกือบถึงขอบบนของแผ่น TLC ให้นำแผ่นออกจากภาชนะ พร้อมกับขีดแนวของตัวทำละลาย (solvent front) ตรวจสอบแถบสารสำคัญที่เกิดขึ้นบนแผ่น TLC จากนั้นทำสัญลักษณ์ของตำแหน่งสารที่ปรากฏ เปรียบเทียบผลที่ได้กับสารละลายอินดิโกธรรมชาติ ด้วยการคำนวณค่าคงที่อัตราไหล (rate of flow, R_f) ด้วยสมการที่ 3.2 (Laitonjam และคณะ, 2011; ศุภกร และคณะ, 2561)

3.3.5 การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ

3.3.5.1 การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพด้วยวิธีทางชีวเคมี

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท SKTU2, SKTU4, SKTU8, SKTU15 และ SKTU16 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์อินดิโก และแบคทีเรียไอโซเลท SKTU3 และ SKTU4 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์อินดิโก บนอาหาร nutrient agar (NA) ค่าพีเอชเท่ากับ 12.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมกล้ำเชื้อลงในอาหารชุดทดสอบ API50CHB และ API20E บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บันทึกผลลงบนแบบฟอร์มแล้ววิเคราะห์ผลด้วย Apiweb software

3.3.5.2 การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท SKTU2, SKTU4, SKTU8, SKTU15 และ SKTU16 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์อินดิโก และแบคทีเรียไอโซเลท SKTU3 และ SKTU4 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์อินดิโก บนอาหาร nutrient agar (NA) ค่าพีเอชเท่ากับ 12.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเชื้อ (incubator) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากนั้นเชื้อโคลนนิ่งของแบคทีเรียจำนวน 1 โคลนนิ่ง ลงในสารละลาย Tris-EDTA บัฟเฟอร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (vortex mixer) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer แล้วทำการเจือจางสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จะได้ดีเอ็นเอแม่แบบที่จะใช้ในการวิเคราะห์ จากนั้นทำการวิเคราะห์ยีน *16S rRNA* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ (universal primer) F27 (forward primer) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' และ R1492 (reverse primer) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3' โดยการปิเปตต์สารละลายตัวอย่าง ดีเอ็นเอแม่แบบ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในหลอดพีซีอาร์ (PCR tube) ที่มีบัฟเฟอร์ (PCR buffer) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร deoxy nucleotide triphosphate (dNTP) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 4 ไมโครลิตร แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl₂) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ (F27) ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ (R1492) ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (Taq polymerase) ปริมาตร 1.3 ไมโครลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้เท่ากับ 40 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (vortex mixer) นำไปเกิดปฏิกิริยาภายในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycler โดยตั้งอุณหภูมิต่าง ๆ ที่ใช้ดังนี้ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 51 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทำซ้ำจำนวน 26 รอบ (cycle) และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ (PCR product) ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสไปแยกขนาดของดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำการย้อมเจลอะกาโรสด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาดนำเจลอะกาโรสที่ได้ไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง UV-transilluminator ส่งผลิตภัณฑ์ไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท macrogen ประเทศเกาหลีใต้ หลังจากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบกับยีน *16S rRNA* ของแบคทีเรียที่รายงานในฐานข้อมูล NCBI โดยใช้ โปรแกรม BLAST แล้วสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA 6.06 โดยเลือกวิธีการสร้างแบบจำลองแผนภูมิของ neighbor - joining

3.3.6 การพัฒนากล้าเชื้อแห้ง

3.3.6.1 การศึกษาการเจริญเติบโต

นำแบคทีเรียไอโซเลท SKTU16 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์อินดิโกสูงที่สุดและแบคทีเรียไอโซเลท SKTU4 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการ

รีดิวซ์อินดิโกสูงที่สุด โดยแบคทีเรียดังกล่าวเป็นสายพันธุ์ที่ไม่จัดอยู่ในบัญชีรายชื่อเชื้อโรคที่ประสงค์ควบคุมตามมาตรา 18 (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข, 2561) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง nutrient agar (NA) ค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในตู้บ่มเชื้อ (incubator) จากนั้นเชยแบคทีเรียจำนวน 1 โคโลนี ลงในอาหารเหลว nutrient broth (NB) เชยเข้าบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) ด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างที่ระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 และ 24 ชั่วโมง โดยการปิเปตตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าความขุ่นเซลล์ ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นเซลล์กับเวลา

3.3.6.2 การทำแห้งแบบเยือกแข็ง

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์อินดิโกไอโซเลท SKTU16 และแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์อินดิโกไอโซเลท SKTU4 บนอาหารแข็ง nutrient agar (NA) ค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชยแบคทีเรีย 1 โคโลนี ลงในอาหารเหลว nutrient broth (NB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 เชยเข้าบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) ด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยแบคทีเรียไอโซเลท SKTU16 ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 18 ชั่วโมง และแบคทีเรียไอโซเลท SKTU4 ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 16 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตส่วนใสทิ้งและนำตะกอนเซลล์เติมลงในสารละลายมอลโทเดกซ์ทรินและกลีเซอรอลความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งไอน้ำ (autoclave) นำสารแขวนลอยที่ได้ใส่ลงในภาดอลูมิเนียมแล้วนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างมาทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งแบบเยือกแข็งด้วยเครื่อง freeze dryer ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ความดัน 0 มิลลิบาร์ เมื่อครบเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่ได้ในถุงซิปล็อค ภายในตู้ดูดความชื้น (desiccator) (ปิยะวรรณและคณะ, 2554)

3.3.6.3 การศึกษาอัตราการรอดชีวิต

(1) การคำนวณจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด

นำกล้าเชื้อก่อนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง และกล้าเชื้อที่ทำแห้งแบบเยือกแข็ง ปริมาตร 0.1 กรัม ที่ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้กล้าเชื้อที่ทำแห้งแบบเยือกแข็งที่ระดับการเจือจางเท่ากับ 10^{-1} มาทำการเจือจางที่ระดับการเจือจาง 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} และ 10^{-6} ปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารแข็ง nutrient agar (NA)

ค่าพีเอชเท่ากับ 7 เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารแข็งโดยใช้เทคนิค (spread plate) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียในงานเพาะเลี้ยงที่มีโคโลนีจำนวน 30-300 โคโลนี แล้วคำนวณจำนวนแบคทีเรีย (CFU/ml) ด้วยสมการที่ 3.1 จากนั้นนำจำนวนแบคทีเรีย (CFU/ml) ที่คำนวณได้มาคำนวณอัตราการรอดชีวิตด้วยสมการที่ 3.4

วิธีการคำนวณอัตราการรอดชีวิต

$$\text{อัตราการรอดชีวิต (\%)} = (100 \times N/N_0) \quad (3.4)$$

เมื่อ N = จำนวนแบคทีเรียต่อมิลลิเมตร (CFU/ml) หลังกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

N_0 = จำนวนแบคทีเรียต่อมิลลิเมตร (CFU/ml) ก่อนกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

3.3.6.4 การทดสอบประสิทธิภาพในการสังเคราะห์อินดิโก

นำตะกอนเซลล์แบคทีเรียไอโซเลท SKTU16 ความเข้มข้น 9×10^8 CFU/ml และแบคทีเรียไอโซเลท SKTU16 ที่ทำแห้งแบบเยือกแข็งปริมาณ 5.6 กรัม เติมนลงในสารละลายอินดิแคน ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 7 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเชื้อเก็บสารละลายตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0, 6, 12, 18 และ 24 โดยการเปิดสารละลายตัวอย่างขึ้นลงภายในหลอดทดลองจำนวน 30 ครั้ง เพื่อให้ indoxyl เกิดการออกซิไดซ์ไปเป็นอินดิโกด้วยออกซิเจนในอากาศจากนั้นเปิดสารละลายตัวอย่างปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโครเซ็นติพีวัก หมุนเหวี่ยงตัวอย่างด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดเล็กที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาทีเพื่อแยกส่วนใสและตะกอนที่ส่วนใสทิ้ง เติมนโดเมททิลซัลฟอกไซด์ ความเข้มข้น 99.99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในตะกอนจากนั้นวัดปริมาณอินดิโกเกิดขึ้นโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 618 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง vis-spectrophotometer โดยมีสารละลายอินดิแคนเป็นตัวควบคุม จากนั้นคำนวณปริมาณอินดิโกที่เกิดขึ้นโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของอินดิโกที่ระดับความเข้มข้น 10-50 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสังเคราะห์อินดิโกระหว่างกล้าเชื้อก่อนการทำแห้งและหลังการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

3.3.6.5 การทดสอบประสิทธิภาพการในรีดิวซ์อินดิโกในกระบวนการย้อมอินดิโกธรรมชาติ

เติมน้ำเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SKTU4 ความเข้มข้น 9×10^8 CFU/ml และแบคทีเรียไอโซเลท SKTU4 ที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งปริมาณ 10 กรัม ลงในน้ำย้อมอินดิโกที่เตรียมขึ้นปริมาตร 200 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยอินดิโกธรรมชาติปริมาณ 15 เปอร์เซ็นต์

น้ำหนักต่อปริมาตร ปูนแดงปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร น้ำต่าง 100 มิลลิลิตร และน้ำมะขามเปียก 100 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเชื้อ (incubator) เก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัดค่าพีเอช ด้วยเครื่อง pH meter และค่าศักย์ไฟฟ้ามาตรฐานของการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ด้วยหัววัดกระแสไฟฟ้า (ORP Prob) ที่ต่อเข้ากับเครื่องวัดค่าพีเอช พร้อมทั้งบันทึกสีของน้ำย้อมที่เปลี่ยนแปลงไป จากนั้นนำผ้าขนาด 5.0x5.0 ตารางเซนติเมตร จุ่มลงในสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำตัวอย่างผ้าขึ้นสัมผัสกับอากาศและปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จะได้ตัวอย่างผ้าที่จะใช้ในการศึกษาขั้นถัดไปโดยมีน้ำย้อมอินดิโกที่ไม่มีการเติมสารรีดิวซ์เป็นทริตเมนต์ควบคุม

(1) การทดสอบสีผ้าฝ้ายหลังการย้อม

(1.1) การศึกษาสีของผ้าด้วยเครื่อง Color spectrophotometer

ศึกษาค่าความเข้มสี (K/S) ค่าความสว่างของสี (L*) ค่าความอิ่มตัวของสี (C*) และเฉดสี (a*, b*, h°) ด้วยเครื่อง color spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสงในช่วง 360-750 นาโนเมตร ณ ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีวัสดุและสิ่งทอ C504 อาคารบรรยายเรียนรวม 5 คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

3.3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (analysis of variance) ตามแบบแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) และหาค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ด้วยวิธี Duncan's multiple range test โดยใช้โปรแกรม SPSS version 16.0

บทที่ 4

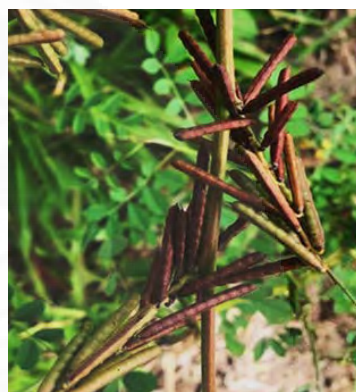
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การศึกษากระบวนการย้อมอินดิโกธรรมชาติ

จากการศึกษากระบวนการย้อมอินดิโกด้วยกระบวนการธรรมชาติ ณ ร้านครามสกล จังหวัดสกลนคร พบว่าสายพันธุ์ครามที่ใช้คือ ครามฝักตรง (*Indigofera tinctorial* Mill) ใช้เมล็ดในการขยายพันธุ์ มีระยะการเก็บเกี่ยวประมาณ 3-4 เดือน ลักษณะของต้นครามฝักตรงแสดงในภาพที่ 4.1



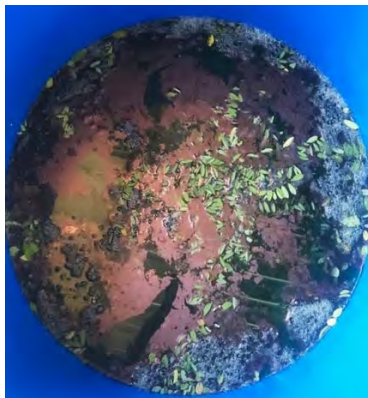
(ก)



(ข)

ภาพที่ 4.1 ลักษณะของใบคราม (ก) และฝักคราม (ข) ณ ร้านครามสกล จังหวัดสกลนคร

กระบวนการย้อมอินดิโกประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักคือ 1. การเตรียมเนื้ออินดิโก 2. การก่อกหม้อ และ 3. การย้อม ในขั้นตอนการเตรียมเนื้ออินดิโก จะตัดต้นครามในส่วนของลำต้นเหนือพื้นดินประมาณ 10 เซนติเมตร จากนั้นนำใบ ลำต้น และกิ่ง จัดเรียงลงในถังพลาสติก เติมน้ำสะอาดให้ท่วมแช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงในภาพที่ 4.2 เมื่อครบเวลาแยกกากใบออกให้เหลือแต่น้ำที่มีสีน้ำเงินอมเขียว ซึ่งเกิดจากอินดิแคนในใบครามเปลี่ยนรูปเป็นอินโดซิลและกลูโคส จากนั้นกวนให้เกิดฟองขึ้น กระบวนการนี้เป็นกระบวนการเติมอากาศเข้าไปให้เกิดการออกซิไดซ์เปลี่ยนรูปสารอินโดซิลให้เป็นอินดิโก จากนั้นเติมปูนขาวในอัตราส่วน 200 กรัมต่อต้นครามสด 10 กิโลกรัม กวนผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้เพื่อให้ตกตะกอนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำผ้าขาวบางมากรองแยกตะกอนจะได้เนื้ออินดิโกเพื่อใช้ในกระบวนการก่อกหม้อในขั้นตอนถัดไป



ภาพที่ 4.2 การสกัดสีอินดิโกจากใบครามโดยการแช่ในน้ำสะอาด

ขั้นตอนการก่หม้อ นำส่วนประกอบสำหรับการก่หม้อได้แก่เนื้ออินดิโก ปูนแดง น้ำตาลทราย น้ำมะขามเปียก และน้ำค้างที่เตรียมได้จากข้อ 4.3 มาผสมให้เข้ากันในโองดินเผา จากนั้นโจกน้ำย้อมให้เกิดฟอง ในทุก ๆ วันจนน้ำย้อมเปลี่ยนเป็นสีเหลือง กระบวนการนี้ใช้ระยะเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ ซึ่งมักพบปัญหาในเรื่องของหม้อตาย คือ อินดิโกไม่อยู่ในรูปลิควโคอินดิโกที่พร้อมย้อม



ภาพที่ 4.3 ส่วนประกอบสำหรับการก่หม้อย้อม

ในขั้นตอนการย้อม นำผ้าฝ้ายที่ผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกโดยการต้มในน้ำค้างที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส แช่ลงในน้ำสะอาดบิดให้พองมาดจุ่มลงในหม้อย้อมแล้วบีบผ้าเพื่อให้สีซึมผ่านเส้นใย จากนั้นยกผ้าขึ้นเพื่อสัมผัสอากาศ ตากให้แห้งแล้วล้างด้วยน้ำสะอาดอีกครั้ง ขั้นตอนนี้สามารถทำการย้อมซ้ำได้ เพื่อให้ได้สีเข้มตามความต้องการ

4.2 การเก็บตัวอย่างและการตัดแยกแบคทีเรียจากน้ำย้อมอินดิโก

จากการเก็บตัวอย่างน้ำย้อมอินดิโกจากหม้อย้อมอินดิโก ณ ร้านครามสกด ดังภาพที่ 4.4 พร้อมทั้งการวัดค่าพีเอช โดยใช้เครื่องวัดค่าพีเอช พบว่าค่าพีเอชโดยเฉลี่ยของน้ำย้อมอินดิโกเท่ากับ 12.0 แสดงผลดังตารางที่ 4.1 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของสมพงศ์และคณะ (2555) ที่พบว่าค่าพีเอชของน้ำย้อมอินดิโกของกลุ่มทอผ้าแพรงหา อำเภอกวนขนุน จังหวัดพัทลุง มีสถานะเป็นด่างโดยมีค่าพีเอชเฉลี่ยเท่ากับ 10.0 ดังนั้นในกระบวนการตัดแยกแบคทีเรียจากน้ำย้อมอินดิโกจึงเลือกใช้อาหาร nutrient agar (NA) ค่าพีเอชเท่ากับ 12.0 ในการตัดแยกแบคทีเรีย จากนั้นนำตัวอย่างน้ำย้อมอินดิโกมาเจือจางด้วยโซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride, NaCl) ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับการเจือจาง 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} และ 10^{-8} เท่า เกลี่ยสารละลายตัวอย่างให้ทั่วผิวหน้าอาหารแข็งบ่มภายในตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็งมาศึกษาลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยา พบว่าสามารถตัดแยกแบคทีเรียได้จำนวน 18 ไอโซเลท แสดงผลดังตารางที่ 4.2 โดยทั้ง 18 ไอโซเลทเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะเป็นรูปท่อน สอดคล้องกับงานวิจัยของ พิชญพร และคณะ (2018) ที่ทำการตัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากกระบวนการหมักฮ่อมแบบธรรมชาติ พบจุลินทรีย์ 160 ไอโซเลทที่มีความสามารถในการเปลี่ยนสีอินดิโกเป็นลิวโคอินดิโกได้ โดยพิจารณาจากการสร้างโซนใสบนอาหารแข็ง เมื่อทำการศึกษาลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาพบว่า แบคทีเรียที่มีความสามารถในการเปลี่ยนอินดิโกเป็นลิวโคอินดิโกสูงที่สุดจำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ไอโซเลท L4นก3(-2)I1, L1ป1(-3)I1, L4นก3(-2)I3, L4นก4(-3)I2, L2ป2(-2)I2 และ L1ป4(-2)I3 โดยไอโซเลท L1ป1(-3)I1, L4นก4(-3)I2, L2ป2 (-2)I2 และ L1ป4(-2)I3 มีลักษณะเป็นรูปท่อน และไอโซเลท L4นก3(-2)I1, L1ป1(-3)I1 มีลักษณะเป็นรูปวงรี



ภาพที่ 4.4 บริเวณเก็บตัวอย่างน้ำย้อมอินดิโก

ตารางที่ 4.1 ค่าพีเอชของน้ำย้อมอินดิโกภายในหม้อย้อมอินดิโก ณ ร้านครามสกล

หม้อย้อมอินดิโก	ค่าพีเอช
1	11.78 ± 0.15
2	12.03 ± 0.38
3	11.92 ± 0.00
4	11.78 ± 0.13
5	11.96 ± 0.05
6	12.07 ± 0.01
7	12.04 ± 0.03
8	12.34 ± 0.21
9	11.69 ± 0.17
10	12.08 ± 0.05
เฉลี่ย	12.09 ± 0.12

ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำย้อมอินดิโก

ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี				ลักษณะสัณฐานใต้กล้องจุลทรรศน์
	รูปร่าง (form)	สี (color)	ขอบ (edge)	ผิวหน้า (surface)	
SKTU1	circular	white	undulate	smooth	rod shape gram-positive
SKTU2	Irregular	white	undulate	smooth	rod shape gram-positive
SKTU3	Irregular	white	undulate	smooth	rod shape gram-positive
SKTU4	circular	white	undulate	smooth	rod shape gram-positive
SKTU5	Irregular	white	undulate	smooth	rod shape gram-positive

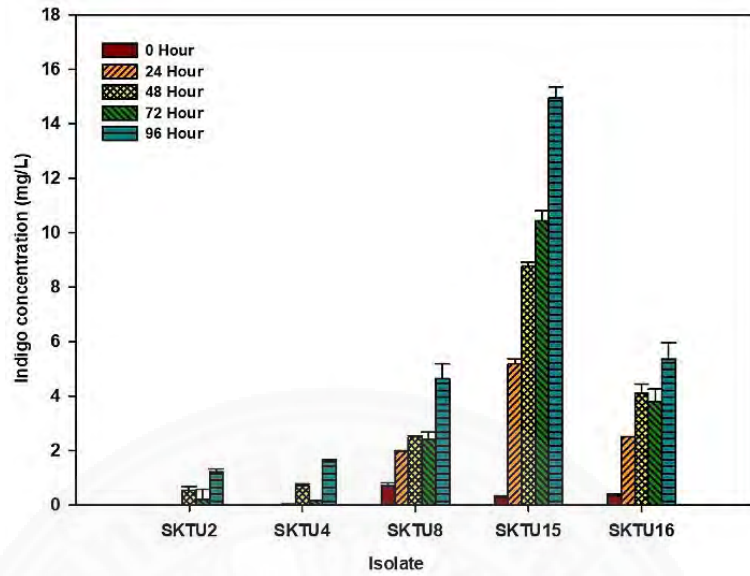
ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี				ลักษณะสัณฐานใต้กล้องจุลทรรศน์
	รูปร่าง (form)	สี (color)	ขอบ (edge)	ผิวหน้า (surface)	
SKTU6	Irregular	white	entire	smooth	rod shape gram-positive
SKTU7	Irregular	white	undulate	smooth	rod shape gram-positive
SKTU8	circular	white	undulate	smooth	rod shape gram-positive
SKTU9	punctiform	white	undulate	smooth	rod shape gram-positive
SKTU10	punctiform	white	undulate	smooth	rod shape gram-positive
SKTU11	circular	white	undulate	smooth	rod shape gram-positive
SKTU12	punctiform	white	entire	smooth	rod shape gram-positive
SKTU13	punctiform	white	undulate	smooth	rod shape gram-positive
SKTU14	punctiform	white	undulate	smooth	rod shape gram-positive
SKTU15	circular	white	undulate	smooth	rod shape gram-positive
SKTU16	punctiform	white	undulate	smooth	rod shape gram-positive
SKTU17	punctiform	white	undulate	smooth	rod shape gram-positive
SKTU18	circular	white	undulate	smooth	rod shape gram-positive

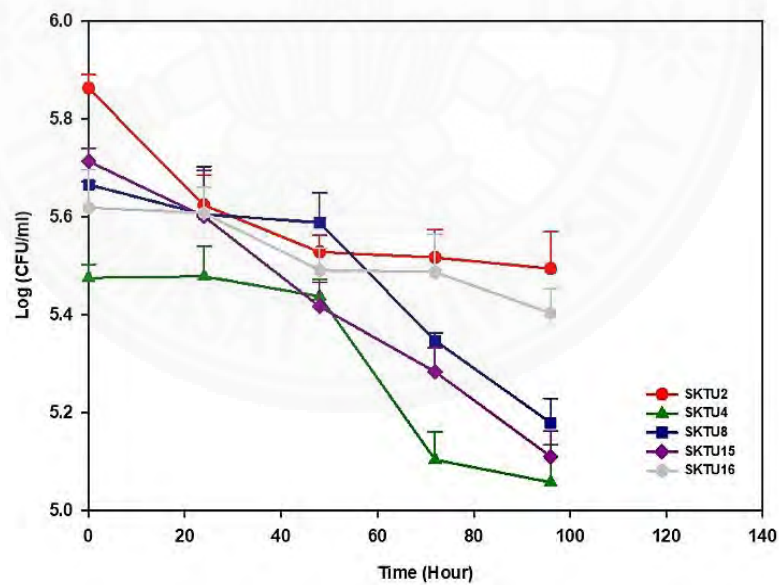
4.3 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการสังเคราะห์อินดิโก

4.3.1 การตัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์อินดิโก

นำตะกอนเซลล์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำย้อมอินดิโกจำนวน 18 ไอโซเลท บ่มกับสารละลายอินดิแคนความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส วัดปริมาณอินดิโกที่เกิดขึ้นในช่วงที่ 0, 24, 48, 72 และ 96 โดยนำตัวอย่างไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที จากนั้นเติมไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ความเข้มข้น 99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในตะกอนตัวอย่างเพื่อละลายอินดิโกที่เกิดขึ้น วัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 618 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของอินดิโก ในช่วง 10-50 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาปริมาณอินดิโกที่แบคทีเรียสังเคราะห์ขึ้นที่ 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณอินดิโกที่แบคทีเรียสังเคราะห์ขึ้นมีแนวโน้มสัมพันธ์กับเวลาอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แสดงในภาพที่ 4.5 โดยในช่วงที่ 96 ชั่วโมงแบคทีเรียสามารถสังเคราะห์อินดิโกได้สูงสุด เมื่อเทียบกับในช่วงอื่น ๆ ดังนั้นจึงเลือกระยะเวลาดังกล่าวมาใช้ในการพิจารณาหาไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์อินดิโกโดยพบว่าแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูง 5 ไอโซเลท ได้แก่ แบคทีเรีย SKTU15 สามารถสังเคราะห์อินดิโกได้สูงสุด เท่ากับ 15.18 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง รองมาคือ แบคทีเรีย SKTU16 สามารถสังเคราะห์อินดิโกได้สูงสุด เท่ากับ 5.58 มิลลิกรัมต่อลิตร และแบคทีเรีย SKTU8, SKTU4 และ SKTU2 สามารถสังเคราะห์อินดิโกได้สูงสุด เท่ากับ 4.87, 1.80 และ 1.43 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด (ภาพที่ 4.6) พบว่าเมื่อระยะเวลาเพิ่มมากขึ้นจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อย สอดคล้องกับงานวิจัยของ Pathak และคณะ (2009) ที่ศึกษาการสังเคราะห์อินดิโกจาก *Pseudomonas sp.* HOB1 ด้วยเอนไซม์ naphthalene dioxygenase โดยมีอินโดลเป็นสารตั้งต้นพบว่าแบคทีเรียดังกล่าวมีการสังเคราะห์อินดิโกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยให้ค่าอินดิโกสูงสุดที่ 246 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นปริมาณอินดิโกจะมีค่าลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดโดยพบว่าที่เวลา 10 ชั่วโมงแบคทีเรียมีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็วซึ่งอาจเกิดจากปริมาณอินดิโกที่เพิ่มมากขึ้นมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตเนื่องจากโครงสร้างอินดิโกมีผลยับยั้งการสร้างชั้นเปปทิโดไกลแคนซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียจึงควรศึกษาถึงผลของอินดิโกต่อการเจริญเติบโตเพิ่มเติมและแนวทางในการแก้ไขปัจจัยดังกล่าวเพื่อเพิ่มผลผลิตที่ได้ให้สูงขึ้น



ภาพที่ 4.5 ปริมาณอินดิโกที่ 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงของแบคทีเรียไอโซเลท SKTU2, SKTU4, SKTU8, SKTU15 และ SKTU16

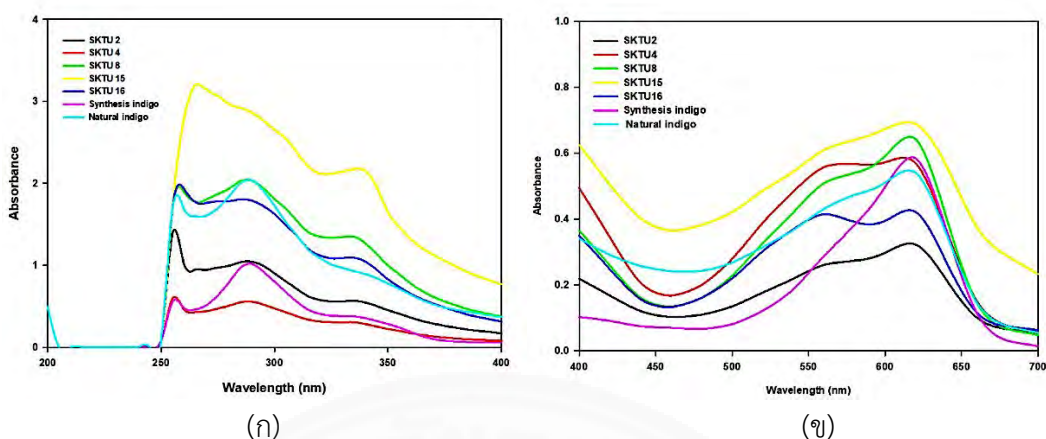


ภาพที่ 4.6 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียไอโซเลท SKTU2, SKTU4, SKTU8, SKTU15 และ SKTU16

4.3.2 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์

(1) การวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer

เมื่อนำสารละลายผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการบ่มแบคทีเรียไอโซเลท SKTU2, SKTU4, SKTU8, SKTU15 และ SKTU16 กับสารละลายอินดิแคนที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลา 96 ชั่วโมง มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสงในช่วง 200-700 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer เปรียบเทียบกับสารละลายอินดิโกสังเคราะห์ และสารละลายอินดิโกธรรมชาติ ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.7 พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงสารละลายอินดิโกสังเคราะห์และสารละลายอินดิโกธรรมชาติมีค่าสูงสุดในช่วง visible เท่ากับ 615 นาโนเมตร และในช่วง ultraviolet เท่ากับ 290 นาโนเมตร เมื่อพิจารณาสารละลายผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการบ่มแบคทีเรียไอโซเลท SKTU2, SKTU4, SKTU8, SKTU15 และ SKTU16 กับสารละลายอินดิแคนมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วง visible เท่ากับ 615, 615, 615, 610 และ 615 นาโนเมตร และในช่วง ultraviolet เท่ากับ 290, 290, 290, 285 และ 290 นาโนเมตร ตามลำดับ โดยค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการบ่มแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลททั้งในช่วง visible และช่วง ultraviolet ไม่แตกต่างจากค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายอินดิโกสังเคราะห์และสารละลายอินดิโกธรรมชาติ จากการรายงานของ Due และคณะ (2014) ที่ทำการศึกษาการสังเคราะห์อินดิโกจาก *Pseudomonas* sp. HAV-1 โดยมีอินโดลเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์พบว่าเมื่อวิเคราะห์คุณสมบัติของอินดิโกที่สังเคราะห์ได้ ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer อินดิโกที่สังเคราะห์ได้มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วง UV เท่ากับ 285 นาโนเมตร และช่วงค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วง visible เท่ากับ 620 นาโนเมตร สอดคล้องกับค่าการดูดกลืนแสงของอินดิโกมาตรฐานสังเคราะห์ นอกจากนี้จากการรายงานของศุภกรณ์และคณะ (2560) ที่ศึกษาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วง visible ของอินดิโกสังเคราะห์ อินดิโกธรรมชาติที่ไม่เติมปูนแดง และอินดิโกธรรมชาติที่เติมปูนแดง มาละลายด้วยสารละลายผสมของไตรคลอโรมีเทนและเมทานอลอัตราส่วน 1:1 พบว่าอินดิโกสังเคราะห์มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 608 นาโนเมตร อินดิโกธรรมชาติที่ไม่เติมปูนแดงค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 607 นาโนเมตร และในอินดิโกธรรมชาติที่เติมปูนแดงพบค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด 2 ตำแหน่งคือ 607 และ 553 นาโนเมตร ซึ่งคาดว่าเป็นอินดิรูบินเนื่องจากสารดังกล่าวมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 552 นาโนเมตร (สุรีย์และคณะ, 2543)

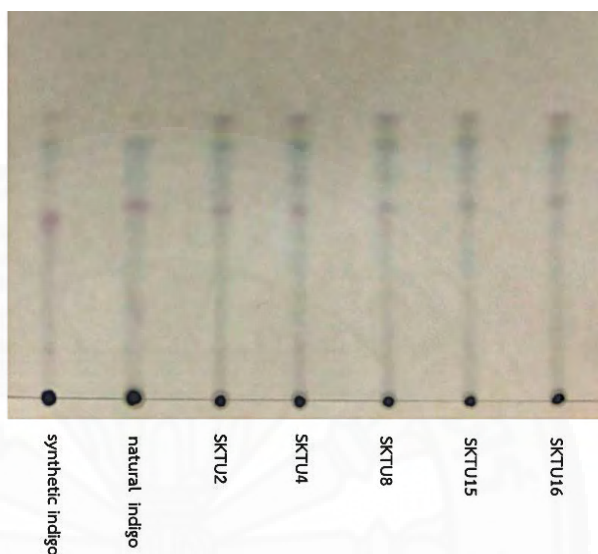


ภาพที่ 4.7 UV-visible spectra ของสารละลายอินดิโกธรรมชาติ สารละลายอินดิโกสังเคราะห์และ สารละลายผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการบ่มแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท ความยาวคลื่นแสง 200-400 นาโนเมตร (ก) ความยาวคลื่นแสง 400-700 นาโนเมตร (ข)

(2) การศึกษาองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (thin layer chromatography; TLC)

นำสารละลายผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการบ่มแบคทีเรียไอโซเลท SKTU2, SKTU4, SKTU8, SKTU15 และ SKTU16 กับสารละลายอินดิแคน พร้อมทั้งสารละลายอินดิโกสังเคราะห์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์และสารละลายอินดิโกธรรมชาติ ศึกษาองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์โดยมีเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยคลอโรฟอร์ม เฮกเซน และเมทานอล ในอัตราส่วน (14:7:1) ปริมาตรต่อปริมาตร ผลการศึกษาแสดงในภาพที่ 4.8 พบว่าสารละลายอินดิโกสังเคราะห์ สารละลายอินดิโกธรรมชาติ และสารละลายผลิตภัณฑ์ มีสารที่เป็นองค์ประกอบหลักคล้ายคลึงกันจำนวน 2 สาร ได้แก่ สารสีแดง มีค่าระยะทางที่สารเคลื่อนที่ต่อระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (R_f) เท่ากับ 0.65 และสารสีน้ำเงินมีค่า R_f เท่ากับ 0.70 นอกจากนี้สารละลายตัวอย่างยังพบองค์ประกอบหลักที่เป็นสารสีแดงซึ่งไม่พบในสารละลายอินดิโกสังเคราะห์ และสารละลายอินดิโกธรรมชาติ มีโดยค่า R_f เท่ากับ 0.92 จากการวิจัยของ Kim และคณะ (2017) ศึกษาการสังเคราะห์อินดิโก โดย *Escherichia coli* ที่ได้รับการถ่ายยีน *CYP102A* จาก *Streptomyces cattleya* จากการศึกษาองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค TLC พบว่า อินดิโกมาตรฐานมีองค์ประกอบหลัก 2 สารคือ สารสีแดง และสารสีน้ำเงิน ส่วนผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้มีองค์ประกอบหลัก 1 สารคือ สารสีน้ำเงิน ซึ่งมีค่า R_f เท่ากับอินดิโกมาตรฐาน และ จากงานวิจัยของ Laitonjam และ Wangkheirakpam (2011) ทำการศึกษาองค์ประกอบหลักใน *Strobilanthes flaccidifolius* Need. และ *indigofera tinctorial* Linn. พบว่าสารประกอบที่ได้จากการหมักพืชทั้ง 2 ชนิด มีองค์ประกอบเป็นสารสีแดงและสีน้ำเงิน

เมื่อทำการศึกษาสารสีดังกล่าวด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบางพบว่าสารสีแดงมีค่า R_f เท่ากับ 0.88 และสารสีน้ำเงินมีค่า R_f เท่ากับ 0.76 แสดงให้เห็นว่าค่า R_f ของสารละลายผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการบ่มแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลทกับสารละลายอินดิแคน มีค่า R_f เท่ากับอินดิโกสังเคราะห์ที่มีความบริสุทธิ์ 98 เปอร์เซ็นต์และอินดิโกธรรมชาติ

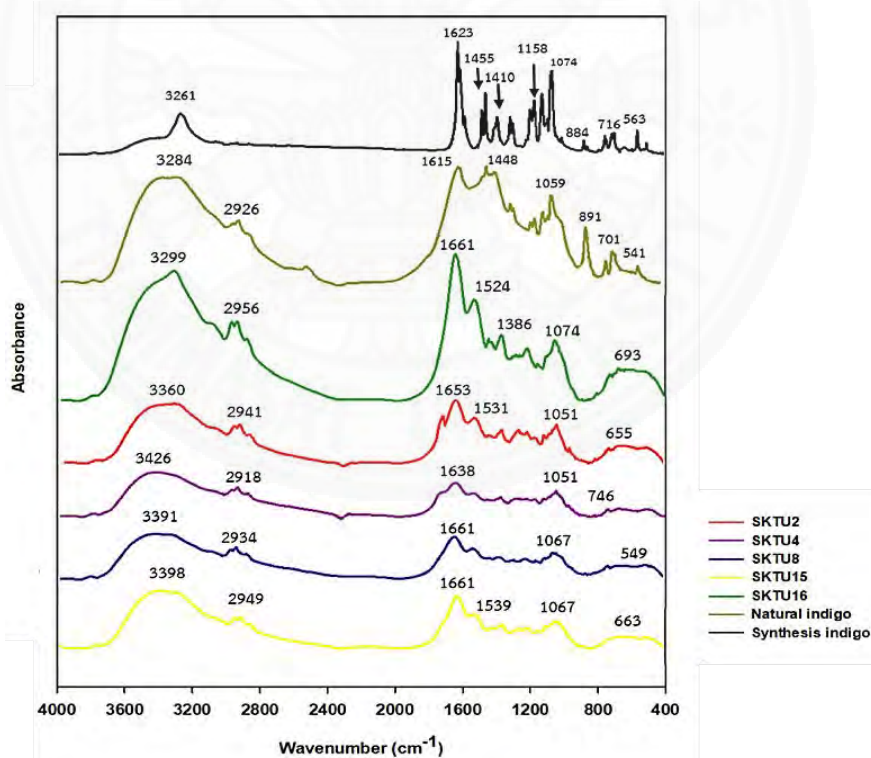


ภาพที่ 4.8 แถบสีต่าง ๆ ของอินดิโกสังเคราะห์ อินดิโกธรรมชาติ และสารละลายผลิตภัณฑ์เมื่อวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง

(3) การวิเคราะห์ หมู่ฟังก์ชันด้วยเครื่อง Fourier transform infrared Spectroscopy

ศึกษาหมู่ฟังก์ชันที่เกิดขึ้นของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการบ่มแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลทกับสารละลายอินดิแคน พร้อมทั้งอินดิโกสังเคราะห์ และอินดิโกธรรมชาติ ด้วยเครื่อง FTIR spectroscopy และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม WIN-IR easy และ IR Mentor pro (Bio-RAD Laboratories) แสดงผลสเปกตรัมของ FTIR ในภาพที่ 4.9 พบว่าสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการบ่มแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลทกับสารละลายอินดิแคน ที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง มีหมู่ฟังก์ชันที่สัมพันธ์กับหมู่ฟังก์ชันของอินดิโกสังเคราะห์และอินดิโกธรรมชาติ พบว่าปรากฏหมู่ amide N-H stretching ที่ความยาวคลื่น $3100-3500\text{ cm}^{-1}$ หมู่ C=O stretching ที่ความยาวคลื่น $1640-1690\text{ cm}^{-1}$ หมู่ C=C stretching ที่ความยาวคลื่น $1400-1600\text{ cm}^{-1}$ หมู่ amine C-N stretching ที่ความยาวคลื่น $1080-1360\text{ cm}^{-1}$ และหมู่ aromatic C-H stretching ที่ความยาวคลื่น $860-680\text{ cm}^{-1}$ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Due และคณะ (2014) ที่ได้ทำการศึกษาการสังเคราะห์สีอินดิโกจาก

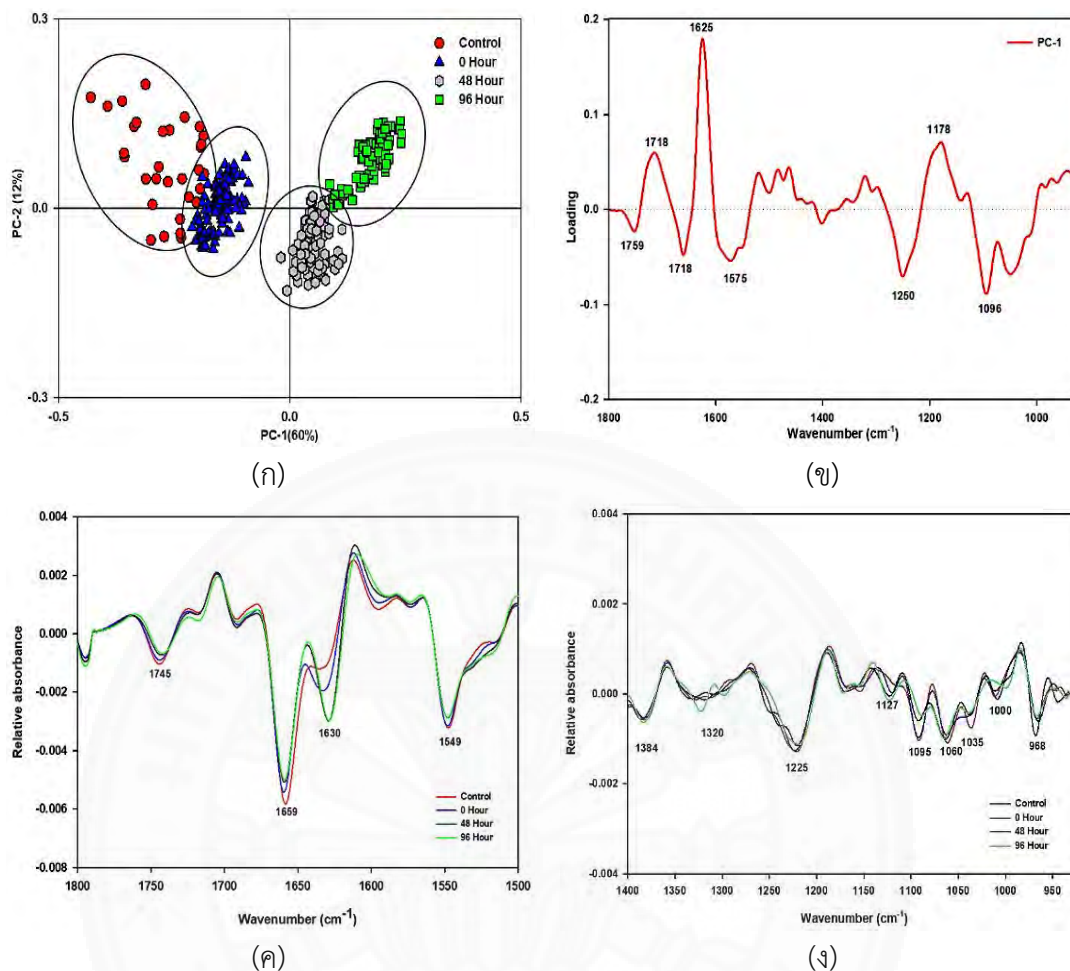
Pseudomonas sp. HAV-1 โดยใช้อินดิโกลเป็นสารตั้งต้นพบว่าเมื่อศึกษาหมู่ฟังก์ชันของตัวอย่างอินดิโกที่แบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวสังเคราะห์ได้พบหมู่ N-H stretching ของ Secondary amine ที่เลขคลื่น 3398 cm^{-1} หมู่ C=O stretching ต่อกับ C=C ที่เลขคลื่น 1617 cm^{-1} หมู่ amine C-N stretching ที่เลขคลื่น $1350\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ และ aromatic C-H stretching ที่เลขคลื่น $735\text{-}770\text{ cm}^{-1}$ เมื่อพิจารณาหมู่ฟังก์ชัน C-H stretching ที่ความยาวคลื่น $2950\text{-}2880\text{ cm}^{-1}$ พบเพียงในอินดิโกลธรรมชาติและสารตัวอย่าง จากการวิจัยของ zixin และคณะ (2019) รายงานว่าเลขคลื่นบริเวณ 2924 cm^{-1} แสดงหมู่ฟังก์ชันของ C-H stretching ที่มีความสัมพันธ์กับสารอินดิรูบิน อย่างไรก็ตาม ระหว่างกระบวนการเตรียมผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ที่ไม่มีขั้นตอนในการกำจัดเซลล์แบคทีเรียออกก่อนการวิเคราะห์ซึ่งอาจทำให้หมู่ฟังก์ชันที่ปรากฏมีองค์ประกอบหลักของเซลล์แบคทีเรียร่วมอยู่ด้วยได้ซึ่งมีการยืนยันจากงานวิจัยของ chirapond และคณะ (2017) ที่ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบหลักของเซลล์แบคทีเรียด้วยเทคนิค FTIR พบว่าจะปรากฏ หมู่ amide N-H stretching ที่ความยาวคลื่น 3200 cm^{-1} และหมู่ C=O stretching ที่ความยาวคลื่น 1400 cm^{-1}



ภาพที่ 4.9 FTIR spectra ของอินดิโกลธรรมชาติ อินดิโกสังเคราะห์ และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการบ่มแบคทีเรีย 5 ไอโซเลทกับสารละลายอินดิแคน

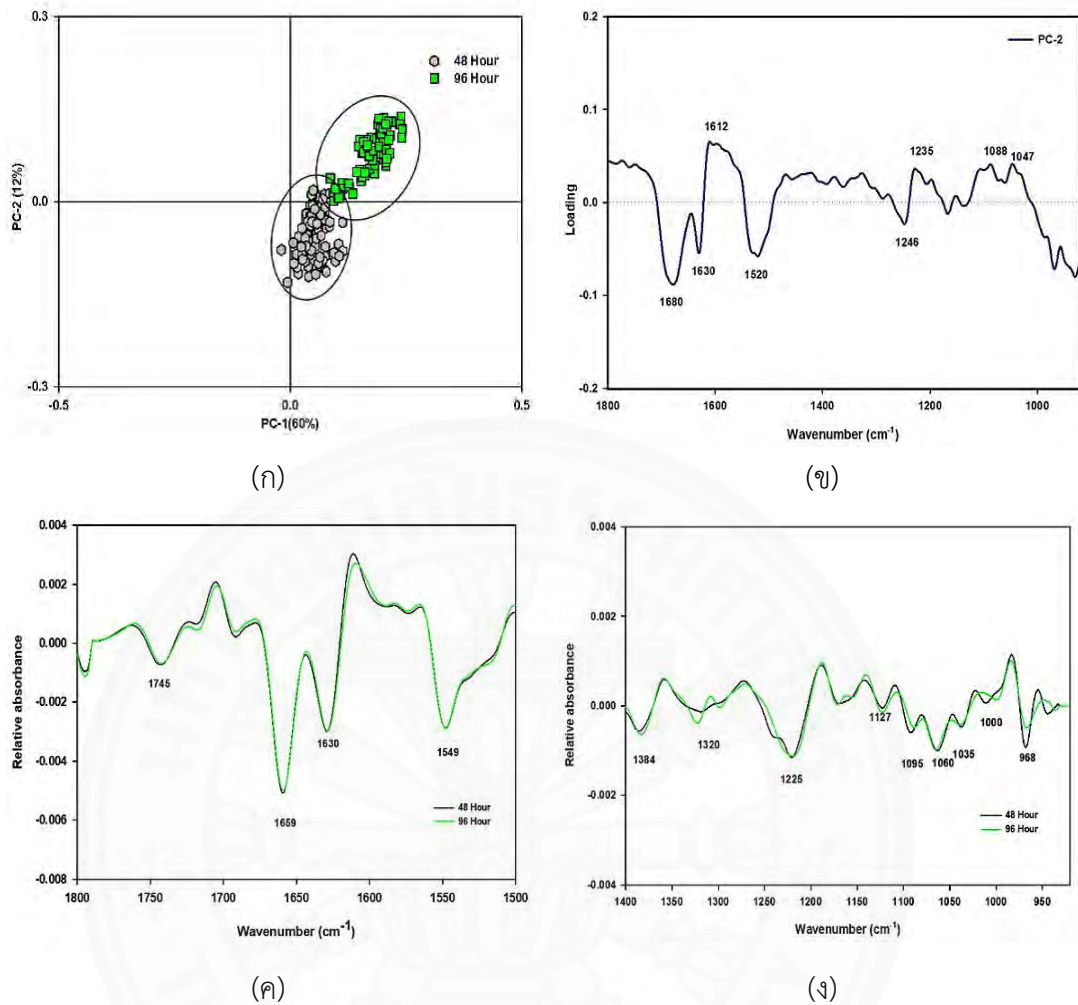
(4) การศึกษาเซลล์ของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์อินดิโกสูงที่สุดด้วยเครื่อง Synchrotron-based FTIR microspectroscopy

ศึกษาองค์ประกอบภายในเซลล์และองค์ประกอบทางชีวเคมีที่มีการเปลี่ยนแปลงไประหว่างกระบวนการสังเคราะห์อินดิโกของเซลล์แบคทีเรียไอโซเลท SKTU16 ที่บ่มในสารละลายอินดิแคนความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ในชั่วโมงที่ 0, 48 และ 96 ชั่วโมง โดยเครื่อง Synchrotron-based FTIR microspectroscopy แสดงในภาพที่ 4.10 โดยผล PCA analysis ของเซลล์แบคทีเรียไอโซเลท SKTU16 ที่ชั่วโมงต่าง ๆ สามารถแยกได้โดยอาศัยแกน PC-1 และ PC-2 มีค่าเท่ากับ 60 และ 12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากภาพสามารถแบ่งกลุ่มสิ่งทดลองออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย Control และเซลล์แบคทีเรียไอโซเลท SKTU16 ที่บ่มในสารละลายอินดิแคน ในชั่วโมงที่ 0 และ กลุ่มที่ 2 เซลล์แบคทีเรียไอโซเลท SKTU16 ที่บ่มในสารละลายอินดิแคน ในชั่วโมงที่ 48 และ 96 เมื่อพิจารณา PCA loading plot ซึ่งแสดงในภาพ 4.10 (ข) พบว่าเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น positive loading plot จาก PC-1 แสดงเลขคลื่นที่ตำแหน่ง 1718, 1625 และ 1178 cm^{-1} มีความสัมพันธ์กับหมู่ฟังก์ชันของ C=O stretching ของกรดนิวคลีอิก beta-sheet structure ของ Amide I และ C=C stretching, C-O-H, C=O stretching ของสารประกอบคาร์โบไฮเดรต ตามลำดับ มีแนวโน้มสูงขึ้น ซึ่งสัมพันธ์กับผล Average the secondary derivative spectra of protein regions ที่แสดงในภาพที่ 4.10 (ค) และ Average the secondary derivative spectra of carbohydrate and nucleic acid regions ที่แสดงในภาพที่ 4.10 (ง) จะเห็นได้ว่าระหว่างกระบวนการสังเคราะห์อินดิโกโดยแบคทีเรีย SKTU16 beta-sheet structure ของ Amide I มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด



ภาพที่ 4.10 ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Synchrotron-based FTIR microspectroscopy ของแบคทีเรียไอโซเลท SKTU16 ที่ระยะเวลา 0, 48 และ 96 ชั่วโมง แสดง Principal component PCA analysis (ก) PCA loading plot (ข) Average the secondary derivative spectra of protein regions ($1800-1600\text{ cm}^{-1}$) (ค) Average the secondary derivative spectra of carbohydrate and nucleic acid regions ($1300-920\text{ cm}^{-1}$) (ง)

จากการศึกษาองค์ประกอบภายในเซลล์และองค์ประกอบทางชีวเคมีที่มีการเปลี่ยนแปลงไประหว่างกระบวนการสังเคราะห์อินดิโกของเซลล์แบคทีเรียไอโซเลท SKTU16 ที่บ่มในสารละลายอินดิแคนความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ในชั่วโมงที่ 48 และ 96 ชั่วโมง ผลแสดงในภาพที่ 4.11 โดยผล PCA analysis ของเซลล์แบคทีเรียไอโซเลท SKTU16 ที่ชั่วโมงที่ 48 และ 96 สามารถแยกได้โดยอาศัยแกน PC-2 มีค่า 12 เปอร์เซนต์ จากภาพสามารถแบ่งกลุ่มสิ่งทดลองออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเซลล์แบคทีเรียไอโซเลท SKTU16 ที่บ่มในสารละลายอินดิแคน ในชั่วโมงที่ 48 และ เซลล์แบคทีเรียไอโซเลท SKTU16 ที่บ่มในสารละลายอินดิแคน ในชั่วโมงที่ 96 เมื่อพิจารณา PCA loading plot ซึ่งแสดงในภาพ 4.11 (ข) พบว่าเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น positive loading plot จาก PC-2 แสดงเลขคลื่นที่ตำแหน่ง 1612, 1235, 1088 และ 1047 cm^{-1} มีความสัมพันธ์กับหมู่ฟังก์ชันของ beta-sheet structure ของ Amide I, Amide III ของโปรตีน, C-O-C stretching ของ aliphatic esters และ C=O stretching ของกรดอะมิโน และกรดไขมัน ตามลำดับ มีแนวโน้มสูงขึ้นซึ่งสัมพันธ์กับผล Average the secondary derivative spectra of protein regions ที่แสดงในภาพที่ 4.11 (ค) และ Average the secondary derivative spectra of carbohydrate and nucleic acid regions ที่แสดงในภาพที่ 4.11 (ง)



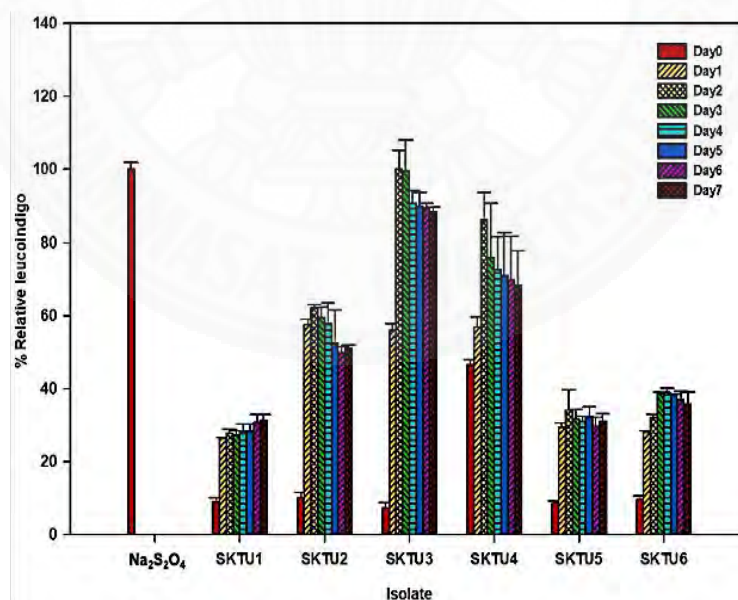
ภาพที่ 4.11 ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Synchrotron-based FTIR microspectroscopy ของแบคทีเรียไอโซเลท SKTU16 ที่ระยะเวลา 0, 48 และ 96 ชั่วโมง แสดง Principal component PCA analysis (ก) PCA loading plot (ข) Average the secondary derivative spectra of protein regions ($1800-1600\text{ cm}^{-1}$) (ค) Average the secondary derivative spectra of carbohydrate and nucleic acid regions ($1300-920\text{ cm}^{-1}$) (ง)

4.4 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการรีดิวซ์อินดิโก

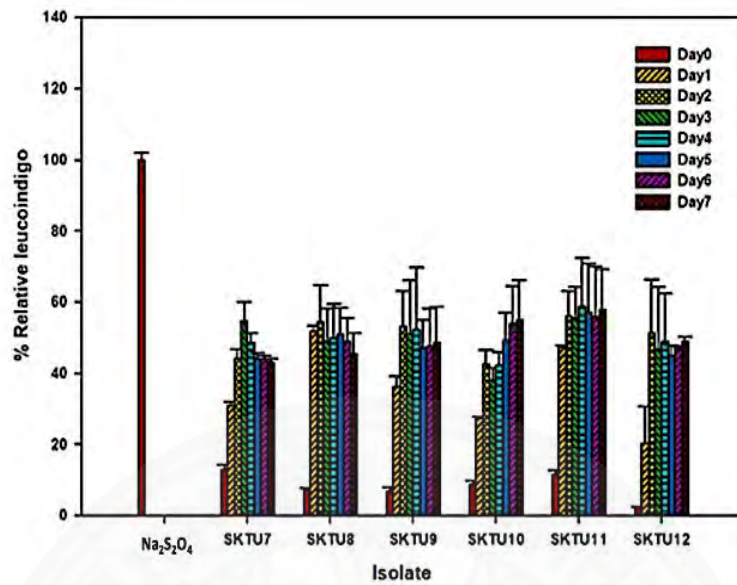
4.4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์อินดิโก

นำกล้าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 18 ไอโซเลท ที่คัดเลือกได้จากน้ำย้อมอินดิโก ณ ร้านครามสกล ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร เติมนลงในอาหาร Clostridial nutrient medium (CNM) ที่เติมอินดิโกคาร์มีน (indigo carmine) ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บันทึกผลการทดลอง ในวันที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 420 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ลิวโคอินดิโกสัมพันธ์เทียบกับเปอร์เซ็นต์ลิวโคอินดิโกสัมพันธ์จากโซเดียมไดไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร ซึ่งเป็นสารรีดิวซ์มาตรฐาน แสดงผลในภาพที่ 4.12 พบว่ามีแบคทีเรีย 2 ไอโซเลท คือ SKTU3 และ SKTU4 ที่มีเปอร์เซ็นต์ลิวโคอินดิโกสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นเทียบกับลิวโคอินดิโกสัมพันธ์จากโซเดียมไดไฮดรอกไซด์ให้ค่ามากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ โดยในวันที่ 2 ของการทดลองแบคทีเรียไอโซเลท SKTU3 ให้ค่าเปอร์เซ็นต์ลิวโคอินดิโกสัมพันธ์สูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรียไอโซเลท SKTU4 ให้ค่าเปอร์เซ็นต์ลิวโคอินดิโกสัมพันธ์สูงสุดเท่ากับ 86 เปอร์เซ็นต์ จึงเลือกแบคทีเรียไอโซเลท SKTU3 และ SKTU4 มาศึกษาประสิทธิภาพในการรีดิวซ์อินดิโกต่อไป

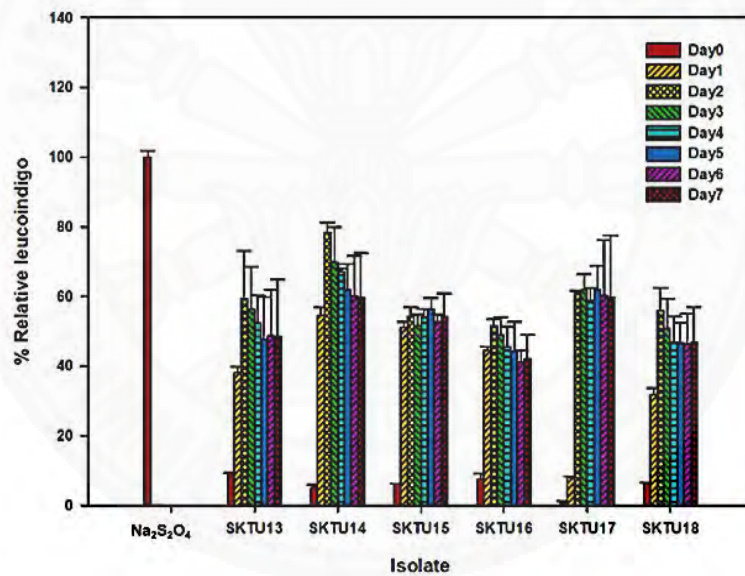
(ก)



(จ)



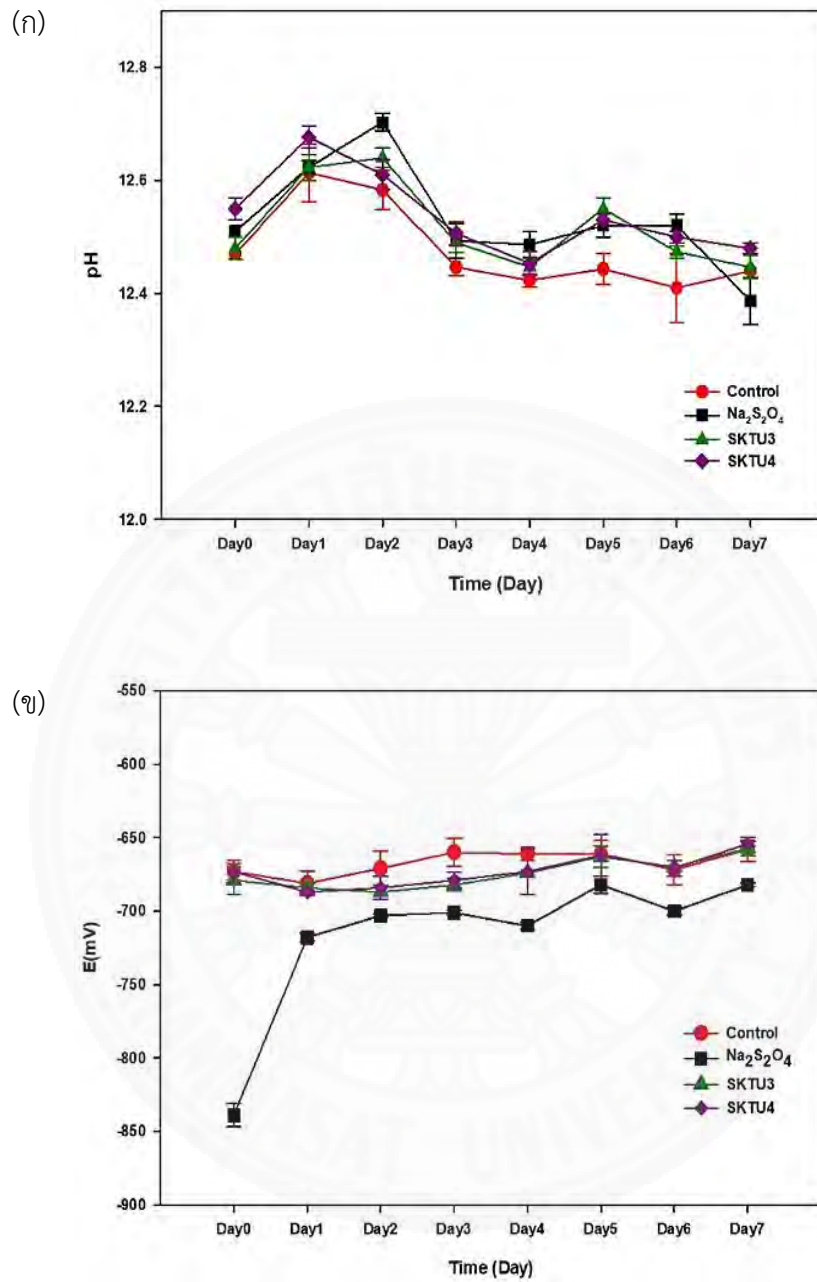
(ค)



ภาพที่ 4.12 เปอร์เซนต์ลิวโคอินดิโกสัมพัทธ์ที่เกิดขึ้นจากการบ่มแบคทีเรียไฮโซเลท SKTU1-SKTU6 (ก) SKTU10-SKTU18 (ข) SKTU1-SKTU6 (ค) ในอาหาร clostridial nutrient medium ที่เติมอินดิโกคาร์มีนความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร ระยะเวลา 7 วัน











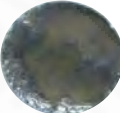
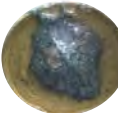
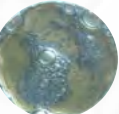








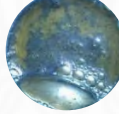



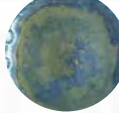

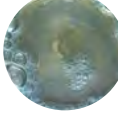


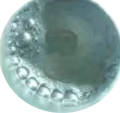

4.4.2 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการรีดิวซ์อินดิโก

เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SKTU3 และ SKTU4 ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรโดยปริมาตร ลงในน้ำย้อมอินดิโกที่เตรียมขึ้นปริมาตร 200 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยอินดิโกธรรมชาติปริมาณ 15 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ปูนแดงปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร น้ำตาล 100 มิลลิลิตร และน้ำมะขาม 100 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเชื้อ (incubator) ทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัดค่าพีเอช ด้วยเครื่องวัดค่าพีเอช และค่าศักย์ไฟฟ้ามาตรฐานของปฏิกิริยารีดอกซ์ด้วยหัววัดกระแสไฟฟ้า (ORP Prob) ที่ต่อเข้ากับเครื่องวัดค่าพีเอช แสดงในภาพที่ 4.13 (ก) และ 4.13 (ข) ตามลำดับ พบว่าค่าพีเอชน้ำย้อมอินดิโกมีสถานะเป็นต่างตลอดระยะเวลา 7 วัน โดยมีค่าอยู่ในช่วง 12.4-12.6 ค่าพีเอชน้ำย้อมอินดิโกที่เติมแบคทีเรียไอโซเลท SKTU3 และ SKTU4 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 0-2 โดยค่าพีเอชจะเปลี่ยนจาก 12.48 และ 12.55 ไปเป็น 12.64 และ 12.61 ตามลำดับ จากนั้นค่าพีเอชจะมีแนวโน้มลดลงในวันที่ 3-4 โดยมีแนวโน้มสอดคล้องกับค่าศักย์ไฟฟ้ามาตรฐานของการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ ซึ่งจะมีค่าลดต่ำลง ในวันที่ 0-1 โดยจะเปลี่ยนจาก -679 และ -674 ไปเป็น -684 และ -681 มิลลิโวลต์ ตามลำดับ และจากตารางที่ 4.3 เมื่อทำการพิจารณาสีของน้ำย้อมอินดิโกพบว่าที่เวลา 0 วัน น้ำย้อมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย (ชุดควบคุม) และน้ำย้อมที่เติมแบคทีเรียไอโซเลท SKTU3 และ SKTU4 มีสีน้ำเงินอมเขียวจากนั้นน้ำย้อมในขวดที่เติมแบคทีเรียไอโซเลท SKTU3 และ SKTU4 จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมเขียวในวันที่ 1 ส่วนน้ำย้อมในชุดควบคุมจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมเขียวในวันที่ 2 แล้วจะเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำเงินอมเขียวในวันที่ 4-7 ซึ่งแตกต่างจากน้ำย้อมที่เติมโซเดียมไดไฮโอไนท์พบว่าจะมีสีเหลืองในวันที่ 0-4 ซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sarawut และคณะ (2014) ที่ทำการคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในเร่งกระบวนการหมักและรักษาสภาพน้ำย้อมอินดิโกจากตัวอย่างน้ำย้อม พบว่าน้ำย้อมอินดิโกที่เติมเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จะมีการเปลี่ยนแปลงสีจากสีน้ำเงินอมเขียวเป็นสีเหลืองในวันที่ 2-8 และจะเปลี่ยนกลับเป็นสีน้ำเงินอมเขียวในวันที่ 9-14 ส่วนน้ำย้อมอินดิโกที่ไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์จะมีการเปลี่ยนสีจากสีน้ำเงินอมเขียวไปเป็นสีเหลืองในวันที่ 2-7 และเปลี่ยนกลับเป็นสีเขียวในวันที่ 8-14 ส่วนค่าพีเอชในวันที่ 1 ทั้งในน้ำย้อมอินดิโกที่ไม่มีการเติมจุลินทรีย์และเติมจุลินทรีย์จะอยู่ในช่วง 12-12.8 จากนั้นค่าพีเอชจะค่อยๆ ลดลงและจะมีค่าค่อนข้างคงที่ประมาณ 12 จนถึงวันสุดท้ายของกระบวนการหมัก และจากงานวิจัยของ Aino และคณะ (2010) ที่ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์อินดิโก พบว่าน้ำย้อมอินดิโกที่มีการเติมแบคทีเรียจะมีค่าศักย์ไฟฟ้ามาตรฐานเท่ากับ -440 มิลลิโวลต์ ในวันแรกของการศึกษาจากนั้นค่าศักย์ไฟฟ้ามาตรฐานจะลดต่ำลงโดยมีค่าอยู่ในช่วง -630 ถึง -670 มิลลิโวลต์ ในวันที่ 2-7 และจะมีค่าเพิ่มมากขึ้น ในวันที่ 8-10 จากการศึกษาจะเห็นได้ว่าค่า พีเอชของน้ำย้อมจะมีค่าสัมพันธ์กับค่าศักย์ไฟฟ้ามาตรฐาน



ภาพที่ 4.13 ค่าพีเอช (ก) และค่าศักย์ไฟฟ้ามาตรฐาน (ข) ของน้ำย้อมอินดิโกที่ใช้ โซเดียมไดไฮโอไนท์ แบคทีเรียไอโซเลท SKTU3 และ SKTU4 เป็นตัวรีดิวซ์ ระยะเวลา 7 วัน

ตารางที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงของสีน้ำข้อมินติโกในระยะเวลา 7 วัน









เวลา (วัน)	สารรีดิวซ์			
	Control	Control+Na ₂ S ₂ O ₄	Control+SKTU3	Control+SKTU4
0				
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				

4.4.2.1 การศึกษาคุณสมบัติของผ้าหลังกระบวนการย้อม









(1) การศึกษาสีของผ้าด้วยเครื่อง Color spectrophotometer

เมื่อนำผ้าขนาด 5.0x5.0 เซนติเมตร จุ่มลงในน้ำย้อมปริมาณ 15 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที นำผ้าสัมผัสกับอากาศและปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นวิเคราะห์ค่าความสว่าง (L^*) ค่าความอิ่มตัวของสี (C^*) โทนสี (a^* , b^* , h°) และค่าความเข้มสี (K/S) ของตัวอย่างผ้าด้วยเครื่อง Color Spectrophotometer แสดงผลดังตารางที่ 4.4 เมื่อพิจารณาค่ามุม (h°) พบว่าผ้าตัวอย่างแสดงเฉดสีสีน้ำเงินเขียวโดยให้ค่ามุมอยู่ในช่วงระหว่าง 253.42° - 272.86° ซึ่งสอดคล้องกับค่า a^* เป็นลบแสดงเฉดสีเขียว และ b^* เป็นลบแสดงเฉดสีน้ำเงิน โดยตัวอย่างผ้ามีค่าความสว่าง (L^*) และค่าความอิ่มตัวของสี (C^*) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อพิจารณาค่าความเข้มสี (K/S) พบว่าในวันที่ 1 ค่าความเข้มสีได้จากการย้อมโดยมีโซเดียมไดโธไอโอไนท์เป็นตัวรีดิวซ์มีค่าสูงสุด เท่ากับ 13.07 ส่วนการใช้แบคทีเรียไอโซเลท SKTU3 และ SKTU4 เป็นตัวรีดิวซ์ ให้ค่าความเข้มสีสูงสุด ในวันที่ 3 โดยมีค่าเท่ากับ 7.75, 7.13 ตามลำดับ โดยพบว่าการใช้โซเดียมไดโธไอโอไนท์และการใช้แบคทีเรียในการรีดิวซ์ให้ค่าความเข้มสีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ







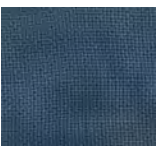

ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างผ้าหลังกระบวนการย้อมด้วยเครื่อง Color Spectrophotometer

วัน	ตัวอย่าง	L*	a*	b*	C*	h°	K/S	ตัวอย่างผ้า
1	Control	55.19 ^a	-4.09	-18.31	18.76 ^b	257.40°	1.81 ^c	
	Na ₂ S ₂ O ₄	33.98 ^c	-2.01	-22.63	22.72 ^a	264.93°	13.07 ^a	
	SKTU3	62.24 ^a	-4.06	-16.78	17.26 ^b	256.39°	4.63 ^b	
	SKTU4	46.26 ^b	-3.83	-22.02	22.35 ^a	260.13°	4.08 ^b	
2	Control	63.24 ^a	1.38	-27.60	27.63 ^b	272.86°	1.58 ^c	
	Na ₂ S ₂ O ₄	35.99 ^c	-2.23	-21.46	21.58 ^c	264.07°	12.38 ^a	
	SKTU3	45.87 ^b	-4.48	-20.43	20.91 ^c	257.64°	5.69 ^b	
	SKTU4	47.52 ^b	-0.61	-30.99	31.00 ^a	271.13°	5.74 ^b	





ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

(วัน)	ตัวอย่าง	L*	a*	b*	C*	h°	K/S	ตัวอย่างผ้า
3	Control	59.17 ^a	-2.99	-16.15	16.43 ^b	259.51°	1.86 ^c	
	Na ₂ S ₂ O ₄	32.06 ^c	-2.12	-20.41	20.52 ^a	264.08°	10.72 ^a	
	SKTU3	41.74 ^b	-4.14	-21.02	21.42 ^a	258.87°	7.75 ^b	
	SKTU4	43.45 ^b	-3.73	-22.82	23.12 ^a	260.71°	7.13 ^b	
4	Control	55.59 ^a	-4.01	-17.76	18.21 ^c	257.26°	2.88 ^c	
	Na ₂ S ₂ O ₄	38.64 ^c	-0.54	-25.18	25.19 ^a	268.78°	8.48 ^a	
	SKTU3	48.47 ^b	-0.42	-28.40	28.40 ^a	269.16°	4.87 ^b	
	SKTU4	45.66 ^b	-3.62	-21.74	22.04 ^b	260.55°	4.58 ^b	

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

วัน	ตัวอย่าง	L*	a*	b*	C*	h°	K/S	ตัวอย่างผ้า
5	Control	60.23 ^a	-2.91	-12.75	13.08 ^c	257.16°	1.73 ^c	
	Na ₂ S ₂ O ₄	41.90 ^c	-4.00	-20.85	21.23 ^a	259.14°	8.26 ^a	
	SKTU3	49.74 ^b	-4.88	-16.38	17.09 ^b	253.42°	2.53 ^b	
	SKTU4	51.22 ^b	-4.69	-17.22	17.85 ^b	254.75°	3.31 ^b	
6	Control	55.80 ^a	-3.55	-12.04	12.55 ^b	253.57°	1.86 ^c	
	Na ₂ S ₂ O ₄	45.98 ^c	-3.99	-18.06	18.05 ^a	257.54°	6.20 ^a	
	SKTU3	53.36 ^a	-4.78	-16.79	17.46 ^a	254.10°	2.98 ^b	
	SKTU4	50.95 ^b	-4.60	-16.26	16.89 ^a	254.21°	3.02 ^b	

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

วัน	ตัวอย่าง	L*	a*	b*	C*	h°	K/S	ตัวอย่างผ้า
7	Control	63.02 ^a	-0.55	-17.54	17.54 ^b	268.22°	1.09 ^b	
	Na ₂ S ₂ O ₄	51.11 ^c	-1.73	-23.57	23.63 ^a	265.79°	2.82 ^a	
	SKTU3	57.95 ^b	-1.68	-16.33	16.42 ^b	264.12°	1.17 ^b	
	SKTU4	64.45 ^a	-1.14	-15.74	15.78 ^b	265.84°	1.24 ^b	

หมายเหตุ : อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่แสดงในแต่ละคอลัมน์ บ่งชี้ความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยการวิเคราะห์แบบ Duncan's new multiple range test

: L* หมายถึง ค่าแสดงความสว่างของสี อยู่ในช่วง 0-100 (0 หมายถึงมืด ถ้า 100 หมายถึงสว่าง)

: h° หมายถึง ค่ามุมของสี 0 องศา (สีแดง) 90 องศา (สีเหลือง) 180 องศา (สีเขียว) และ 270 องศา (สีน้ำเงิน)

: C* หมายถึง ค่าที่บอกถึงความอิ่มตัวของสี

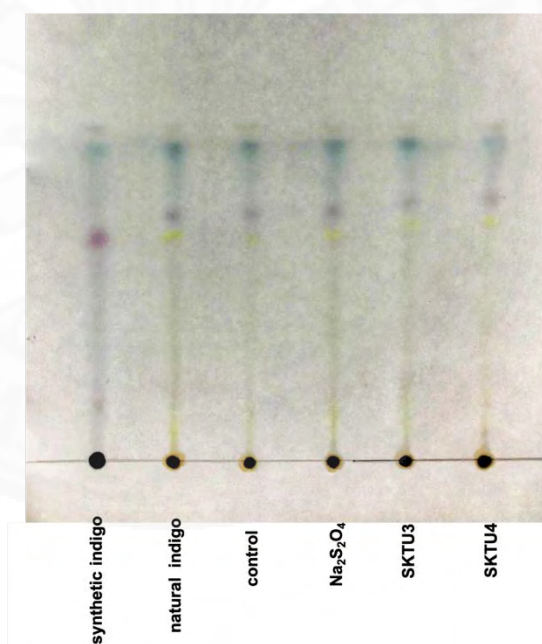
: a* หมายถึง แสดงสีแดงและสีเขียว (ถ้า a เป็นบวกหมายถึงสีแดง และถ้า a เป็นลบ หมายถึงสีเขียว)

: b* หมายถึง แสดงสีเหลืองและสีน้ำเงิน (ถ้า b เป็นบวกหมายถึงสีเหลือง และถ้า b เป็นลบ หมายถึงสีน้ำเงิน)

(2) การศึกษาองค์ประกอบของส่วนสกัดจากผ้าย้อมอินดิโกด้วยโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (thin layer chromatography; TLC)

นำสารละลายของส่วนสกัดที่ได้จากการนำตัวอย่างผ้าขนาด 2.0x2.0 ตารางเซนติเมตร สารละลายอินดิโกสังเคราะห์ สารละลายอินดิโกธรรมชาติที่มีการเติมปูนขาว แขนงในสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 99.98 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นจุดลงบนแผ่น โดยมีเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยคลอโรฟอร์ม เฮกเซน และเมทานอล ใน

อัตราส่วน (14:7:1) ปริมาตรต่อปริมาตร ผลการศึกษาแสดงในภาพที่ 4.14 พบว่าสารละลายอินดิโกสังเคราะห์ สารละลายอินดิโกธรรมชาติที่มีการเติมปูนขาว และสารละลายส่วนสกัดของตัวอย่างผ้า มีสารที่เป็นองค์ประกอบหลักคล้ายคลึงกันจำนวน 2 สาร ได้แก่ สารสีแดง มีค่าระยะทางที่สารเคลื่อนที่ต่อระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (R_f) เท่ากับ 0.77 และสารสีน้ำเงินมีค่า R_f เท่ากับ 0.88 นอกจากนี้สารละลายอินดิโกธรรมชาติที่มีการเติมปูนขาว และสารละลายส่วนสกัดของตัวอย่างผ้ายังพบองค์ประกอบหลักที่เป็นสารสีเหลือง ซึ่งไม่พบในสารละลายอินดิโกสังเคราะห์ โดยค่า R_f เท่ากับ 0.75 จากการรายงานของศุภกรณ์และคณะ (2560) ที่ศึกษาองค์ประกอบของส่วนสกัดจากผ้าหลังกระบวนการย้อมด้วยอินดิโกธรรมชาติที่มีการเติมปูนแดง ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง พบตำแหน่งการแยกของสาร 2 บริเวณ คือ สารสีฟ้า ซึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0.42 และ สารสีแดงซึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0.26 แสดงให้เห็นว่า ค่า R_f ของสารละลายส่วนสกัดที่ได้จากตัวอย่างผ้าที่ใช้โซเดียมไดไฮโอไนต์ แบคทีเรีย SKTU3 และแบคทีเรีย SKTU4 เป็นตัวรีดิวซ์ มีค่า R_f เท่ากับอินดิโกสังเคราะห์ที่มีความบริสุทธิ์ 98 เปอร์เซ็นต์และอินดิโกธรรมชาติที่มีการเติมปูนขาว



ภาพที่ 4.14 แถบสีต่าง ๆ ของอินดิโกสังเคราะห์ อินดิโกธรรมชาติที่เติมปูนขาว และสารละลายส่วนสกัดจากตัวอย่างผ้าเมื่อวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง

4.5 การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ

4.5.1 การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพด้วยวิธีทางชีวเคมี

การทดสอบสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพด้วยวิธีทางชีวเคมีโดยชุดทดสอบ API20E และชุดทดสอบ API50CHB ซึ่งมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในการใช้ระบุสายพันธุ์ในแบคทีเรีย สกุลบาซิลลัสและแบคทีเรียแกรมลบที่มีรูปร่างเป็นแท่งในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* และ *Vibrionaceae* (API reference guide, 2019) จากตารางที่ 4.5 และ 4.6 การทดสอบทางชีวเคมีทั้งหมด 61 การทดสอบพบแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพทั้ง 6 ไอโซเลท มีความสามารถในการใช้สารตั้งต้นเพื่อเกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีได้แตกต่างกัน และเมื่อนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย Apiweb software พบว่าแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพที่คัดแยกได้ดังกล่าว จัดอยู่ในกลุ่ม *Bacillus sp.* แสดงผลดังตารางที่ 4.7 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของพิชญารักษ์และคณะ (2560) ที่ทำการคัดแยกแบคทีเรียจากกระบวนการหมักฮ่อมแบบธรรมชาติโดยจากนั้นทำการระบุสายพันธุ์ด้วยวิธีทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API50CHL พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้จัดอยู่ในกลุ่ม *Bacillus sp.* และ *Enterobacteriaceae* อย่างไรก็ตาม เพื่อให้เกิดความแม่นยำในการระบุสายพันธุ์แบคทีเรียมากขึ้น ควรระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีวเคมี ร่วมกับวิธีอื่น ๆ อาทิ การระบุสายพันธุ์ด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล

ตาราง 4.5 ผลการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีโดยชุดทดสอบ API20E

การทดสอบ	ผลการทดสอบ					
	SKTU2	SKTU3	SKTU4	SKTU8	SKTU15	SKTU16
2-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside	+	-	-	-	-	-
L-arginine	-	-	-	-	-	-
L-lysine	-	-	-	-	-	-
L-ornithine	-	-	-	-	-	-
Trisodium citrate	-	-	+	-	-	-
sodium thiosulfate	-	-	-	-	-	-
Urea	-	-	-	-	-	-
L-tryptophane	-	+	-	-	-	-
L-tryptophane (indole product)	-	-	-	-	-	-
sodium pyruvate	+	+	+	+	+	+

ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

การทดสอบ	ผลการทดสอบ					
	SKTU2	SKTU3	SKTU4	SKTU8	SKTU15	SKTU16
Gelatin	+	-	+	+	-	+
D-glucose	+	-	+	+	-	+
D-mannitol	+	-	-	+	-	+
D-sorbitol	-	-	-	-	-	-
L-rhamnose	-	-	-	-	-	-
D-sucrose	-	+	-	-	-	-
D-melibiose	+	-	+	+	-	+
Amygdalin	+	+	+	+	-	+
L-arabinose	+	-	-	+	-	+

หมายเหตุ: + แสดงถึง แบคทีเรียมีความสามารถในการใช้สารนั้น ๆ เป็นสารตั้งต้น
 - แสดงถึง แบคทีเรียไม่มีความสามารถในการใช้สารนั้น ๆ เป็นสารตั้งต้น

ตารางที่ 4.6 ผลการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีโดยชุดทดสอบ API50CHB

การทดสอบ	ผลการทดสอบ					
	SKTU2	SKTU3	SKTU4	SKTU8	SKTU15	SKTU16
Control	-	-	-	-	-	-
Glycerol	-	+	-	-	-	-
Erythritol	-	+	-	-	-	-
D-Arabinose	-	+	-	-	-	-
L-Arabinose	-	+	-	-	-	-
Ribose	-	-	+	-	-	+
L-Xylose	-	+	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-
Methyl xyloside	-	+	-	-	-	-
Galactose	-	+	-	-	-	-
D-Glucose	-	+	-	-	-	-
D-Fructose	+	+	+	+	-	+
D-Mannose	+	-	+	+	-	+

ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

การทดสอบ	ผลการทดสอบ					
	SKTU2	SKTU3	SKTU4	SKTU8	SKTU15	SKTU16
L-Sorbose	+	+	-	+	-	+
Rhamnose	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	+	-	-	+	-	+
μ-Methyl-mannoside	-	-	-	-	-	+
μ-Methyl-D-glucoside	-	-	-	-	+	-
N-Acetylglucosamine	-	-	-	-	-	-
Amygdalin	-	+	+	-	-	+
Arbutin	-	+	-	-	+	-
Aesculin	-	+	+	+	-	+
Esculin	+	+	+	+	+	+
Salicin	-	-	+	+	-	+
Cellobiose	+	+	+	-	-	-
Maltose	-	+	+	-	-	-
Lactose	-	+	-	-	-	-
Melibiose	-	+	-	-	-	-
L-Arabitol	-	+	-	-	-	-
Gluconate	-	-	-	-	-	-
2-Ketogluconate	-	+	-	-	-	-
5-Ketogluconate	-	+	-	-	-	-
Sucrose	+	-	+	+	-	+
Trehalos	+	-	+	+	-	+
Inulin	-	-	-	-	-	-
Melezitose	-	-	-	-	-	-
D-Raffinose	-	+	-	-	-	-
Starch	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

การทดสอบ	ผลการทดสอบ					
	SKTU2	SKTU3	SKTU4	SKTU8	SKTU15	SKTU16
Glycogen	-	+	-	-	-	-
Xylitol	-	+	-	-	-	-
β -Gentiobiose	-	+	-	-	-	-
D-Turanose	-	-	-	-	-	-
D-Lyxose	-	-	-	-	-	-
D-Tagatose	-	-	-	-	-	-
D-Fucose	-	-	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-	-	-

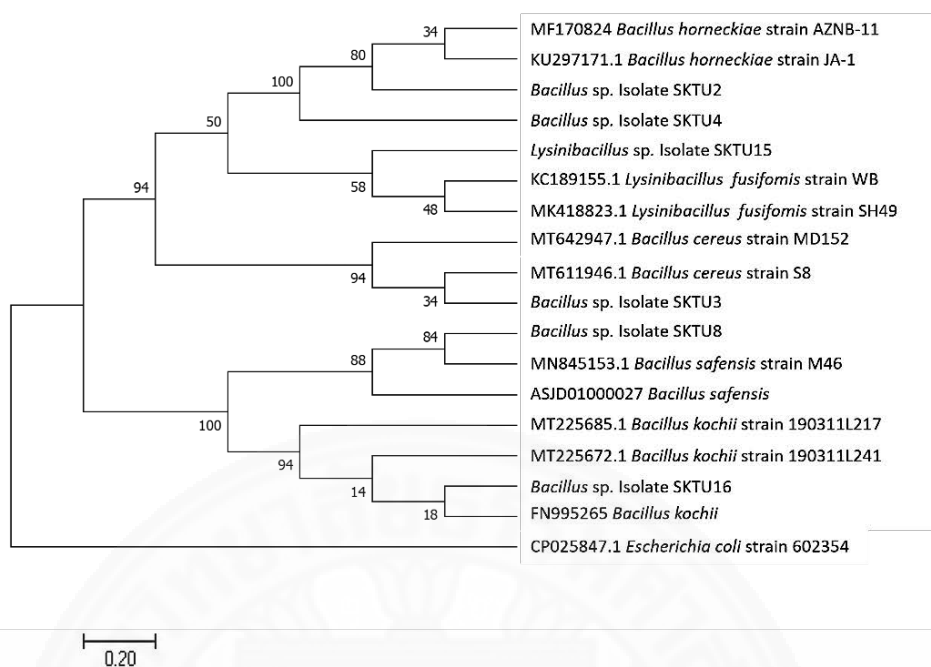
หมายเหตุ: + แสดงถึง แบคทีเรียมีความสามารถในการใช้สารนั้น ๆ เป็นสารตั้งต้น
 - แสดงถึง แบคทีเรียไม่มีความสามารถในการใช้สารนั้น ๆ เป็นสารตั้งต้น

ตารางที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์สายพันธุ์แบคทีเรียด้วยวิธีทางชีวเคมี

ไอโซเลท	ผลการวิเคราะห์	ค่าความเหมือน (เปอร์เซ็นต์)
SKTU2	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	83.5
SKTU3	<i>Bacillus firmus</i>	99.8
SKTU4	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	96.6
SKTU8	<i>Brevibacillus sp.</i>	92.1
SKTU15	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	98.6
SKTU16	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	96.6

4.5.2 การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rRNA* ของแบคทีเรียไอโซเลท SKTU2, SKTU3, SKTU4, SKTU8, SKTU15 และ SKTU16 เทียบกับฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology information (NCBI) แสดงผลดังตารางที่ 4.8 โดยพบว่าแบคทีเรียไอโซเลท SKTU2, SKTU3, SKTU4, SKTU8, SKTU15 และ SKTU16 อยู่ในสกุล *Bacillus* sp. สอดคล้องกับงานวิจัยของพิชญากรณ์และคณะ (2560) ที่ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์อินดิโกจากกระบวนการหมักฮ่อมแบบธรรมชาติโดยจากนั้นทำการระบุสายพันธุ์ด้วยวิธีการหาลำดับเบสของยีน *16S rRNA* เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพบว่าแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพที่คัดแยกได้มีความเหมือนกับ *Bacillus* sp. จำนวน 2 ไอโซเลท *Streptomyces* sp. 1 ไอโซเลท *Bacillus flexus* 1 ไอโซเลท *Bacillus aryabhathi* 1 ไอโซเลท และ *Bacillus subtilis* จำนวน 1 ไอโซเลท และจากภาพที่ 4.15 เมื่อวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ โดยสร้างแบบจำลองแผนภูมิด้วยวิธี maximum likelihood (ML) พบว่า สามารถจำแนกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ได้เป็น 2 รูปแบบ เมื่อดูความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ทดสอบที่ทราบ สปีชีส์จำนวน 11 สายพันธุ์ วิเคราะห์ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ทราบสปีชีส์จำนวน 6 ไอโซเลทพบว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. Isolate SKTU2 และ *Bacillus* sp. Isolate SKTU4 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *Bacillus horneckiae* แบคทีเรีย *Bacillus* sp. Isolate SKTU3 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *Bacillus cereus* แบคทีเรีย *Bacillus* sp. Isolate SKTU8 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *Bacillus safensis* แบคทีเรีย *Lysinibacillus* sp. Isolate SKTU15 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *Lysinibacillus fusiformis* และแบคทีเรีย *Bacillus* sp. Isolate SKTU16 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *Bacillus kochii* ซึ่งการระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลทแสดงดังตารางที่ 4.8



ภาพที่ 4.15 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณยีน *16S rDNA* ของแบคทีเรียไอโซเลท SKTU2, SKTU4, SKTU8, SKTU15, SKTU16 (แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์อินดิโก) และ ไอโซเลท SKTU3, SKTU4 (แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์อินดิโก) ที่สร้างด้วยวิธี maximum likelihood (ML) โดยกำหนดค่า bootstrap เท่ากับ 1,000 replication

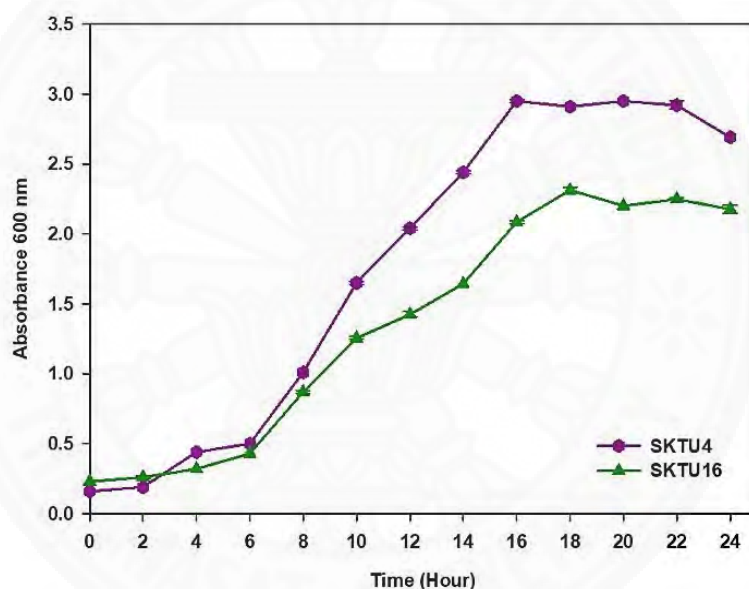
ตารางที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์สายพันธุ์แบคทีเรียด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

ไอโซเลท	เปอร์เซ็นต์ความเหมือน	Accession number	สกุลและชนิดของแบคทีเรีย
SKTU2	100.00	MK658868	<i>Bacillus horneckiae</i>
SKTU3	100.00	MK629724	<i>Bacillus cereus</i>
SKTU4	98.89	MK659957	<i>Bacillus horneckiae</i>
SKTU8	100.00	MK652862	<i>Bacillus safensis</i>
SKTU15	98.89	MK652860	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>
SKTU16	98.89	MH031767	<i>Bacillus kochii</i>

4.6 การพัฒนากล้าเชื้อแห้ง

4.6.1 การศึกษาการเจริญเติบโต

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียไอโซเลท SKTU4 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์อินดิโกเป็นลิวโคอินดิโกและแบคทีเรียไอโซเลท SKTU16 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์อินดิโก ในอาหาร nutrient broth (NB) ค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะเขย่า ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.16 พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท SKTU4 และ SKTU16 มีระยะเจริญเติบโตเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) ในช่วงเวลา 16 ชั่วโมง และ 18 ชั่วโมง ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกระยะเวลาดังกล่าวในการเตรียมกล้าเชื้อเพื่อใช้ในกระบวนการทำแห้งซึ่งเป็นระยะเวลาที่เซลล์แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตอย่างสมบูรณ์



ภาพที่ 4.16 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียไอโซเลท SKTU4 และ SKTU16 ในอาหาร nutrient broth (NB) ค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะเขย่า

4.6.2 การศึกษาอัตราการรอดชีวิต

เมื่อนำตัวอย่างแบคทีเรียไอโซเลท SKTU4 และ SKTU16 ที่ทำแห้งแบบเยือกแข็งโดยมีมอลโทเดกซ์ทรินความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรที่ผสมกับกลีเซอรอลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรเป็นสารป้องกันความเย็น ปริมาตร 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วทำการเจือจางที่ระดับการเจือจาง 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} และ 10^{-6} แล้วปิเปตต์สารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารแข็ง nutrient agar (NA) ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ

7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่เกิดขึ้น แล้วคำนวณจำนวนแบคทีเรียต่อ (CFU/ml) และอัตราการรอดชีวิตเปรียบเทียบกับแบคทีเรียไอโซเลท SKTU4 และ SKTU16 ที่ไม่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งแสดงดังตารางที่ 4.9 จากการทดลองพบว่า แบคทีเรียไอโซเลท SKTU4 ที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็งมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 1.2×10^7 CFU/ml และมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 46.86 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรียไอโซเลท SKTU4 ที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็งมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 1.6×10^8 CFU/ml และมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 66.66 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นได้ว่าอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียไอโซเลท SKTU4 มีค่าต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงควรศึกษาถึงชนิดของสารปกป้องความเย็นที่เหมาะสมเพื่อลดการทำลายของเซลล์และเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเซลล์แบคทีเรีย

ตารางที่ 4.9 การรอดชีวิตของแบคทีเรียไอโซเลท SKTU 4 และ SKTU 16 ที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

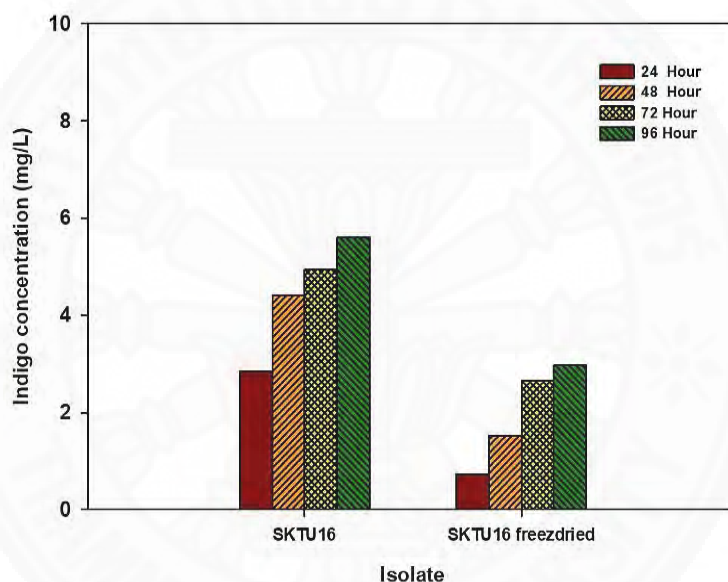
ไอโซเลทแบคทีเรีย	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (CFU/ml)	% อัตราการรอดชีวิต
SKTU4 ที่ไม่ทำแห้งแบบเยือกแข็ง	2.4×10^7	100
SKTU4 ที่ทำแห้งแบบเยือกแข็ง	1.2×10^7	47.86
SKTU16 ที่ไม่ทำแห้งแบบเยือกแข็ง	2.4×10^8	100
SKTU16 ที่ทำแห้งแบบเยือกแข็ง	1.6×10^8	66.66

4.6.3 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของกล้าเชื้อที่ทำแห้ง

4.6.3.1 การทดสอบประสิทธิภาพของกล้าเชื้อแบคทีเรียที่ทำแห้งแบบเยือกแข็งในการสังเคราะห์อินดิโก

นำตะกอนเซลล์ของแบคทีเรียไอโซเลท SKTU16 ความเข้มข้น 9×10^8 CFU/ml และแบคทีเรียไอโซเลท SKTU16 ที่ทำแห้งแบบเยือกแข็งปริมาตร 5.6 กรัม บ่มกับสารละลายอินดิแคนความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส วัดปริมาณอินดิโกที่เกิดขึ้นในชั่วโมงที่ 0, 24, 48, 72 และ 96 โดยนำตัวอย่างไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที จากนั้นเติมไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในตะกอนตัวอย่างเพื่อละลาย

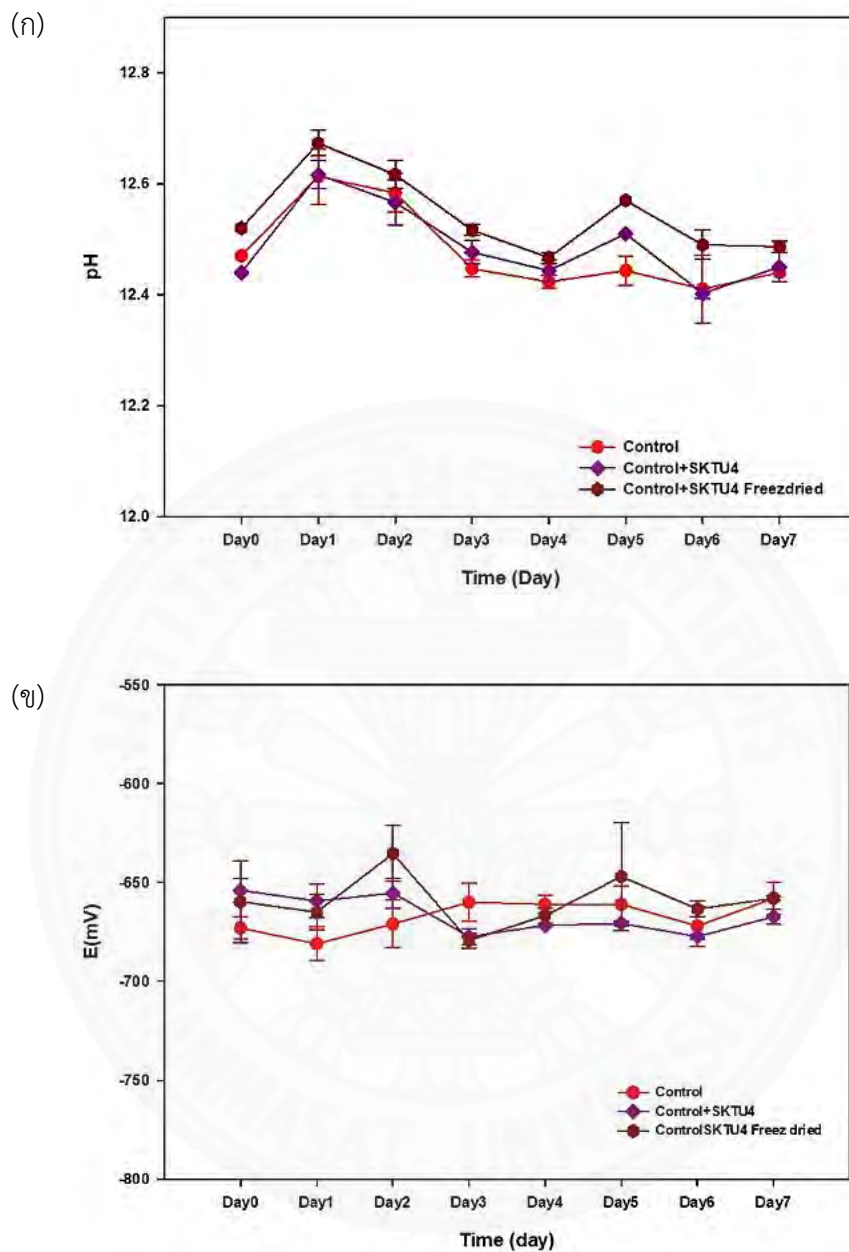
อินดิโกที่เกิดขึ้น วัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 618 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของอินดิโก ในช่วง 10-50 มิลลิโมลาร์ ผลการศึกษาปริมาณอินดิโกที่สังเคราะห์ได้จากแบคทีเรียไอโซเลท SKTU16 และไอโซเลท SKTU16 ที่ทำแห้งแบบเยือกแข็ง แสดงผลในภาพที่ 4.17 โดยแบคทีเรียไอโซเลท SKTU 16 สามารถสังเคราะห์อินดิโกได้สูงสุดเท่ากับ 5.59 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่ชั่วโมงที่ 96 ส่วนแบคทีเรียไอโซเลท SKTU16 ที่ทำแห้ง สามารถสังเคราะห์อินดิโกได้สูงสุดเท่ากับ 2.96 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ชั่วโมงที่ 96 ซึ่งปริมาณอินดิโกที่สังเคราะห์ขึ้นมีแนวโน้มสัมพันธ์กับเวลา จากการศึกษาพบว่าเมื่อแบคทีเรียผ่านกระบวนการทำแห้งจะทำให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์อินดิโกลดลง 1.88 เท่า ที่เวลา 96 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.17 ปริมาณอินดิโกในชั่วโมง 0, 24, 48, 72 และ 96 ของแบคทีเรียไอโซเลท SKTU16 ที่ทำแห้งแบบเยือกแข็งและ SKTU16 ที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง


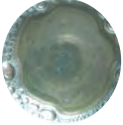
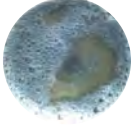
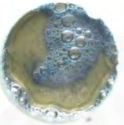
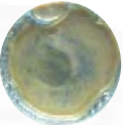
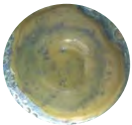

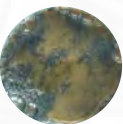
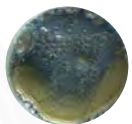
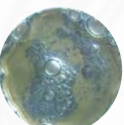
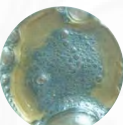
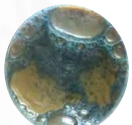












4.6.3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของกล้าเชื้อแบคทีเรียที่ทำแห้งในการรีดิวซ์อินดิโก

เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SKTU4 ความเข้มข้น 9×10^8 CFU/ml และแบคทีเรียไอโซเลท SKTU4 ที่ทำแห้งแบบเยือกแข็งปริมาณ 10 กรัม ลงในน้ำย้อมอินดิโกที่เตรียมขึ้น ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย อินดิโกธรรมชาติปริมาณ 15 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ปูนแดงปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร น้ำค้าง 100 มิลลิลิตร และน้ำมะขาม 100 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเชื้อ (incubator) ทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัดค่าพีเอช ด้วยเครื่อง pH meter และค่าศักย์ไฟฟ้ามาตรฐานของการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ด้วยหัววัดกระแสไฟฟ้า (ORP Prob) ที่ต่อเข้ากับเครื่องวัดพีเอช แสดงในภาพที่ 4.18 (ก) และ 4.18 (ข) จากการศึกษาพบว่าค่าพีเอชของน้ำย้อมอินดิโกที่เตรียมได้มีสภาวะเป็นด่าง โดยค่าพีเอชของน้ำย้อมอินดิโกที่มี แบคทีเรียไอโซเลท SKTU4 ที่ทำแห้ง มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงวันที่ 1 จากนั้นค่าพีเอชจะมีแนวโน้มลดลงในวันที่ 2-7 สอดคล้องกับค่าพีเอชของน้ำย้อมอินดิโกชุดควบคุม และน้ำย้อมอินดิโกที่เติมแบคทีเรียไอโซเลท SKTU4 เมื่อพิจารณาค่าศักย์ไฟฟ้ามาตรฐานของการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์พบว่าน้ำย้อมอินดิโกที่เติมแบคทีเรียไอโซเลท SKTU4 ที่ทำแห้ง ให้ค่าศักย์ไฟฟ้าต่ำสุดเท่ากับ -675 มิลลิโวลต์ ในวันที่ 3 ของการทดลองสอดคล้องกับค่าพีเอชของน้ำย้อมอินดิโกชุดควบคุมและน้ำย้อมอินดิโกที่เติมแบคทีเรียไอโซเลท SKTU4 เมื่อทำการพิจารณาสีของน้ำย้อมอินดิโกพบว่าที่เวลา 0 วัน น้ำย้อมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย (ชุดควบคุม) และน้ำย้อมที่เติมแบคทีเรียไอโซเลท SKTU4 และ SKTU4 ที่ผ่านการทำแห้ง มีสีน้ำเงินอมเขียวจากนั้น น้ำย้อมในขวดที่เติมแบคทีเรียไอโซเลท SKTU4 และ SKTU4 ที่ทำแห้งแบบเยือกแข็ง จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมเขียวในวันที่ 1-4 ส่วนน้ำย้อมในขวดควบคุมจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมเขียวในวันที่ 1-3 จากนั้นน้ำย้อมจะเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำเงินอมเขียว



ภาพที่ 4.18 ค่าพีเอช (ก) และค่าศักย์ไฟฟ้ามาตรฐาน (ข) ของน้ำย้อมอินดิโกที่มีแบคทีเรียไอโซเลท SKTU4 ที่ไม่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง และแบคทีเรียไอโซเลท SKTU4 ที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกเป็นตัวรีดิวซ์ ระยะเวลา 7 วัน

ที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลงของสีน้ำย้อมอินดิโกในระยะเวลา 7 วัน




เวลา (วัน)	สารรีติวซ์		
	Control	Control+SKTU4	Control+SKTU4 freezdried
0			
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			

4.6.3.3 การศึกษาคุณสมบัติของผ้าหลังกระบวนการย้อม










(1) การศึกษาสีของผ้าด้วยเครื่อง Color spectrophotometer

เมื่อนำผ้าขนาด 5.0x5.0 เซนติเมตร จุ่มลงในน้ำย้อมปริมาณ 15 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที นำผ้าสัมผัสกับอากาศและปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นศึกษาค่าความสว่าง (L^*) ค่าความอิ่มตัวของสี (C^*) โทนสี (a^* , b^* , H°) และค่าความเข้มสี (K/S) ของตัวอย่างผ้า ด้วยเครื่อง Color Spectrophotometer แสดงผลดังตารางที่ 4.11 เมื่อพิจารณาค่ามุม (h°) พบว่าผ้าตัวอย่างแสดงเฉดสีสีน้ำเงินเขียวโดยให้ค่ามุมอยู่ในช่วงระหว่าง 252.97° - 272.86° ซึ่งสอดคล้องกับค่า a^* เป็นลบแสดงเฉดสีเขียว และ b^* เป็นลบแสดงเฉดสีน้ำเงิน โดยตัวอย่างผ้าค่าความสว่าง (L^*) และค่าความอิ่มตัวของสี (C^*) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อพิจารณาค่าความเข้มสี (K/S) พบว่าในวันที่ 3 ค่าความเข้มสีได้จากการย้อมโดยมีแบคทีเรียไอโซเลท SKTU4 และแบคทีเรียไอโซเลท SKTU4 ที่ผ่านการทำให้แห้งแบบเยือกแข็งเป็นตัวรีดิวซ์มีค่าสูงสุด เท่ากับ 5.86 และ 6.42 โดยพบว่าการใช้แบคทีเรียไอโซเลท SKTU4 และแบคทีเรียไอโซเลท SKTU4 ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็งให้ค่าความเข้มสีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ


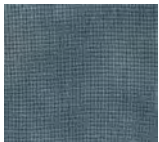

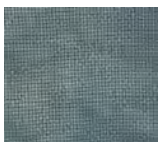

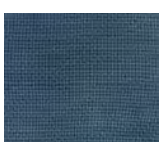
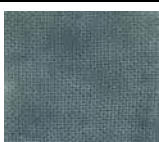
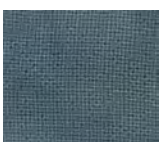

ตารางที่ 4.11 ผลการศึกษาตัวอย่างผ้าหลังกระบวนการย้อมด้วยเครื่อง Color spectrophotometer

เวลา (วัน)	ตัวอย่าง	L^*	a^*	b^*	C^*	h°	K/S	ตัวอย่างผ้า
	control	55.19 ^a	-4.09	-18.31	18.76 ^a	257.40 ^o	1.81 ^c	
1	SKTU4	49.80 ^b	-0.01	-29.39	29.39 ^a	269.98 ^o	4.04 ^a	
	SKTU4 Freeze dried	51.83 ^a	-3.76	-21.43	21.76 ^b	260.06 ^o	2.77 ^b	

ตารางที่ 4.11 (ต่อ)

เวลา (วัน)	ตัวอย่าง	L*	a*	b*	C*	h°	K/S	ตัวอย่างผ้า
2	control	63.24 ^a	-1.38	-27.6	27.63 ^b	272.86°	1.58 ^c	
	SKTU4	47.73 ^b	-0.08	-29.99	29.99 ^a	269.84°	5.63 ^a	
	SKTU4 Freeze dried	50.54 ^b	-0.20	-29.97	29.97 ^a	269.62°	4.63 ^b	
3	control	59.17 ^a	-2.99	-16.15	16.43 ^c	259.51°	1.86 ^b	
	SKTU4	45.94 ^b	-3.70	-22.47	22.77 ^b	260.65°	5.86 ^a	
	SKTU4 Freeze dried	46.52 ^b	-0.14	-31.29	31.29 ^a	270.26°	6.42 ^a	
4	control	55.59 ^a	-4.01	-17.76	18.21 ^b	257.26°	2.88 ^c	
	SKTU4	54.45 ^a	-0.95	-25.47	25.49 ^a	267.86°	3.18 ^b	
	SKTU4 Freeze dried	47.33 ^b	-4.14	-20.09	20.51 ^b	258.34°	4.88 ^a	

ตารางที่ 4.11 (ต่อ)

เวลา (วัน)	ตัวอย่าง	L*	a*	b*	C*	h°	K/S	ตัวอย่างผ้า
5	Control	60.23 ^a	-2.91	-12.75	13.08 ^b	257.16°	1.73 ^a	
	SKTU4	57.76 ^a	-3.98	-14.58	15.12 ^b	254.72°	2.083 ^b	
	SKTU4 Freeze dried	46.84 ^b	-4.32	-19.68	20.15 ^a	257.63°	4.095 ^a	
6	Control	55.80 ^a	-3.55	-12.04	12.55 ^c	253.57°	1.86 ^b	
	SKTU4	60.50 ^a	-0.58	-20.91	20.91 ^a	268.40°	1.39 ^c	
	SKTU4 Freeze dried	51.99 ^b	-4.47	-14.60	15.27 ^b	252.97°	2.76 ^a	
7	Control	63.02 ^b	-0.55	-17.54	17.54 ^a	268.22°	1.09 ^b	
	SKTU4	68.52 ^a	-0.20	-14.38	14.38 ^b	270.79°	0.91 ^b	
	SKTU4 Freeze dried	63.16 ^b	-0.79	-15.64	15.66 ^b	267.12°	1.48 ^a	

- หมายเหตุ : อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่แสดงในแต่ละคอลัมน์ บ่งชี้ความแตกต่างทางสถิติที่ ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยการวิเคราะห์แบบ Duncan's new multiple range test
- : L* หมายถึง ค่าแสดงความสว่างของสี อยู่ในช่วง 0-100 (0 หมายถึงมืด ถ้า 100 หมายถึงสว่าง)
 - : h^o หมายถึง ค่ามุมของสี 0 องศา (สีแดง) 90 องศา (สีเหลือง) 180 องศา (สีเขียว) และ 270 องศา (สีน้ำเงิน)
 - : C* หมายถึง ค่าที่บอกถึงความอิ่มตัวของสี
 - : a* หมายถึง แสดงสีแดงและสีเขียว (ถ้า a เป็นบวกหมายถึงสีแดง และถ้า a เป็นลบ หมายถึงสีเขียว)
 - : b* หมายถึง แสดงสีเหลืองและสีน้ำเงิน (ถ้า b เป็นบวกหมายถึงสี เหลือง และถ้า b เป็นลบ หมายถึงสีน้ำเงิน)



บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

กระบวนการย้อมอินดิโก ณ ร้านครามสกล จังหวัดสกลนคร เริ่มต้นจากการสกัดอินดิโกจากครามฝักตรง (*Indigofera tinctorial* Mill) จากนั้นทำการก่อกมย้อมที่มีส่วนผสมประกอบด้วย เนื้อคราม ปูนแดง มะขามเปียก และน้ำต่าง โดยค่าพีเอชของน้ำย้อมอินดิโกเฉลี่ยเท่ากับ 12.0 ซึ่งแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย้อมอินดิโกประกอบด้วยแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์อินดิโก และแบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์อินดิโก

จากการคัดแยกแบคทีเรียจากน้ำย้อมอินดิโกบนอาหาร nutrient agar (NA) ค่าพีเอชเท่ากับ 12.0 พบแบคทีเรียจำนวน 18 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีลักษณะรูปร่างท่อน นำมาศึกษาประสิทธิภาพในการสังเคราะห์อินดิโก พบแบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลทที่มีความสามารถในการสังเคราะห์อินดิโกได้สูงสุดที่ 96 ชั่วโมง เมื่อนำอินดิโกตัวอย่างที่แบคทีเรียสังเคราะห์ได้ไปศึกษาคุณสมบัติด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง และFTIR spectroscopy พบว่าอินดิโกตัวอย่างที่แบคทีเรียสังเคราะห์ได้มีคุณสมบัติสอดคล้องกับอินดิโกมาตรฐาน นอกจากนี้ยังพบว่าในระยะเวลากการหมักที่เพิ่มมากขึ้นแบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบภายในเซลล์และองค์ประกอบทางชีวเคมี

เมื่อศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำย้อมอินดิโกในการรีดิวซ์อินดิโก พบว่าแบคทีเรีย 2 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์อินดิโกสูงกว่าชุดทดลองควบคุมเมื่อพิจารณาจากความเข้มข้นและลักษณะของสีน้ำย้อมอินดิโก รวมถึงเมื่อระบุสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยเทคนิคซีวโมเลกุล และเทคนิคชีวเคมีพบว่าแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพการสังเคราะห์อินดิโกและรีดิวซ์อินดิโกจัดอยู่ในกลุ่ม *Bacillus* sp.

นอกจากนี้ เมื่อนำแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์อินดิโกและรีดิวซ์อินดิโกซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่จัดอยู่ในรายชื่อเชื้อโรค มาผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งโดยใช้มอลโทเดกซ์ทริน ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และกลีเซอรอลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารป้องกันความเย็นพบว่า มีอัตราการรอดชีวิตที่ต่ำเมื่อเทียบกับกลุ่มแบคทีเรียที่ไม่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็งและประสิทธิภาพในการสังเคราะห์อินดิโกมีค่าลดลงเล็กน้อย ประสิทธิภาพในการรีดิวซ์อินดิโกมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียก่อนกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

ดังนั้นงานวิจัยในการพัฒนาหัวเชื้อนี้ชี้ให้เห็นว่า แบคทีเรียไฮโซเลต SKTU4 และ SKTU16 สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการย้อมอินดิโกธรรมชาติได้จริงซึ่งจะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพลดข้อจำกัด และลดระยะเวลาในกระบวนการย้อมอินดิโกธรรมชาติได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1. การเก็บตัวอย่างเพื่อการคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพควรเก็บตัวอย่างจากหลาย ๆ แหล่งเช่น น้ำหมักใบจากขั้นตอนการหมักใบครามสด, วัสดุดิบที่ใช้, น้ำทิ้งหลังกระบวนการย้อม

5.2.2. ในขั้นตอนการเก็บตัวอย่างของสารตัวอย่างที่แบคทีเรียสังเคราะห์ได้ควรมีขั้นตอนในการกำจัดเซลล์แบคทีเรียออก อาทิ การกรอง เพื่อลดอิทธิพลของเซลล์แบคทีเรียที่อยู่ในสารตัวอย่าง

5.2.3 ควรเพิ่มการศึกษาชนิดของสารป้องกันความเย็นที่ใช้ในกระบวนการทำแห้งเพื่อเพิ่มอัตราการรอดให้สูงขึ้น เช่น การใช้ซูโครส นมปราศจากมันเนย

5.2.4 ควรเพิ่มการศึกษาวีธีในกระบวนการทำแห้ง อาทิ การทำแห้งแบบพ่นฝอย เพื่อคงประสิทธิภาพของและเพิ่มอัตราการรอดของกล้าเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง

รายการอ้างอิง

หนังสือและบทความในหนังสือ

- Api Reference Guide, 2019, bioMérieux. Durham.
- Abrahart, E.N., 1977, Dyes and their Intermediates, Chemical publishing, New York.
- Allen, R.L.M., 1971, Colour chemistry, Thomas nelson and sons Ltd, London.
- Brock, T.D., 1999, Milestones in Microbiology, American Society for Microbiology, Washington DC.
- Cai, L., 2014, Thin Layer Chromatography, Wiley Online Library, New Jersey
- Cappuccino, J.G. and Sherman, N., 1999, Microbiology: a laboratory manual, Pearson Education, California.
- Cegarra, J., Puente, P. and Valldeperas, J., 1992, The Dyeing of Textile Material, Textilia, Italy.
- Chavan R.B., 2015, Denim Manufacture, finishing and applications, Woodhead publishing, Sawston.
- Ghera, R.L., 1994, Culture preparation, Method for general and molecular biology American society for microbiology, Washington DC.
- Sandberg, G., 1989, Indigo Textiles: Technique and History, A & C Black, London.
- Shore, J., 1995, Cellulosic Dyeing, Bradford, Manchester.
- Salle, A.J., 1973, Fundamental principles of bacteriology, McGraw-Hill Book, New York.

บทความวารสาร

- กาญจนา ธรรมนุ, 2010, เทคนิค FTIR Spectrometer และ microscope ในงานวิเคราะห์และวิจัย, Technology Promotion Association, 37: 95-96.
- พิชญาพร ภูัญญาพัช, ธวัชชัย ชัยธวัชวิถิ และเอกอาทิตย์ ฤทธิ์เดชขึง, 2561, การคัดแยกและการระบุสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์เพื่อการผลิตสีย้อมแบบธรรมชาติ, วารสารวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร, 35: 45-54.
- วิโรจน์ สารการโศล, 2560, มลภาวะและอันตรายของน้ำทิ้งจากการย้อมผ้า, วารสารสิ่งแวดล้อม, 1: 7-14.
- อนุรัตน์ สายทอง, 2555, โหมย้อมครามธรรมชาติ, วารสารวิทยาศาสตร์ มข., 40(2): 423-435.

- Afoso, T., Moresco, R., Uarrota, V.G., Navarro, B.B., Nunes, E.C., Maraschin, M. and Rocha, M., 2017, UV-Vis and CIELAB Based chemometric Characterization of *Manihot esculenta* Carotenoid Contents, *Journal of integrative bioinformatic*, 14: 1-13.
- Allen, C.R., Boyd, D.R. and Larkin, M.J., 1997, Metabolism of naphthalene, 1-naphthol, indene, and indole by *Rhodococcus* sp. strain NCIMB12038, *Applied and environmental microbiology*, 63: 151-155.
- Amin, N., Adell, S., Ahamd, T., Muneer M. and Haji, A., 2020, Sustainable application of cochineal-based anthraquinone dye for the coloration of bio-mordanted silk fabric. *Environmental science and pollution research*, 27: 6851-6860.
- Anbu K.M., Patil, K., Muthukumaran, A. and Chavan, R.B., 2007, Review of the process development aspects of electrochemical dyeing: its impact and commercial applications, *Coloration Technology*, 123: 143-151.
- Arora, J., Agarwal, P. and Gupta, G., 2017, Rainbow of natural dyes on textiles using plants extracts: Sustainable and eco-friendly processes, *Green and Sustainable Chemistry*, 7: 35-47.
- Bartholomew, J.W. and Mittwer, T., 1949, A simplified Bacterial Spore Stain, *Stain technology*, 25: 1-2.
- Blackburn, R.S., Bechtold, T. and John, P., 2009, The development of indigo reduction methods and pre-reduced indigo products, *Coloration technology*, 125: 193-207.
- 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.
- Brown, D., 1987, Effects of colorants in the aquatic environment, *Ecotoxicology and environmental safety*, 13: 139-147.
- Buscio, V., Crespi, M. and Bouzán, G.C., 2014, A critical comparison of methods for the analysis of Indigo in dyeing liquors and effluents, *Materials*, 7: 6184-6193.
- Chander, M. and Arora, D.S., 2007, Evaluation of some white-rot fungi for their potential to decolourize industrial dyes, *Dyes and pigments*, 72: 293-298.
- Christie, R.M., 2007, Why is indigo blue, *Biotechnic & Histochemistry*, 82: 51-56.
- Chonanant, C., Jearanaikoon, P. and Tippayawat, P., 2017, Applications of FTIR technique in biomedical sciences, *Thammasat medical journal*, 17: 641-652.

- Clark, R.J.H., Cooksey, C.J., Daniels, M.A.M. and Withnall, R., 1993, Indigo woad and tyrian purple: important vat dyes from antiquity to present, *Endeavour*, 17: 191-199.
- Compton, R.G., Perkin, S.J., Gamblin, D.P., Davis, J., Marken, F., Padden, A.N. and John, P., 2000, *Clostridium isatidis* colonised carbon electrodes: voltammetry evidence for direct solid state redox processes, *New journal of chemistry*, 24: 179-181.
- Davis, R., Mauer, L.J., 2010, Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy: A rapid tool for detection and analysis of foodborne pathogenic bacteria. *Current Research, Technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*, 2010: 1582-94.
- Dua, A., Chauhan, K. and Pathak, H., 2014, Biotransformation of Indigo pigment by indigenously isolated *Pseudomonas* sp. HAV-1 and assessment of its antioxidant property, *Hindawi publishing corporation biotechnology research international*, 2014: 1-6.
- Ensley, B.D., Ratzkin, B.J., Osslund, T.D., Simon, M.J., Wackett, L.P. and Gibson, D.T., 1983, Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo, *Science*, 222: 167-169.
- Epstein, E., Nabors, M.W. and Stowe, B. B., 1967, Origin of indigo in woad, *Nature*, 216: 547-549.
- Forgaces, E., Cserthati, T. and Oros G., 2004, Removal of synthetic dyes from wastewater, *Environment international*, 30: 953-971.
- Gillam, E.M., Notley, L.M., Cai, H., DeVoss, J.J. and Guengerich, F.P., 2000, Oxidation of indole by cytochrome P450 enzymes, *Biochemistry*, 39: 13817-13824.
- Hack, S.C., Jin, K.K. and Eun, H.C., 2003, A novel flavin-containing monooxygenase from *Methylophage* sp. strain SK1 and its indigo synthesis in *Escherichia coli*, *Biochemical and biophysical research communications*, 2003, 306: 930-936.
- Han, X., Wang, W. and Xiao, X., 2008, Microbial biosynthesis and biotransformation of indigo and indigo-like pigment, *Chinese journal of biotechnology*, 24: 921-926.
- Hirota, K., Aino, K., Nodasaka, Y. and Yumoto I., 2013, *Oceanobacillus indicireducens* sp. nov., a facultative alkaliphile that reduces an indigo dye, *International Journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63: 1437-1442.

- Hirota, K., Aino, K., Nodasaka, Y., Morita, N. and Yumoto, I., 2013, *Amphibacillus indicireducens* sp. nov., an alkaliphile that reduces an indigo dye, International journal of systematic and evolutionary microbiology, 63: 464-469.
- Hirota, K., Aino, K. and Yumoto, I., 2016, *Fermentibacillus polygona* gen nov., sp. nov., an alkaliphile that reduces indigo dye, International Journal of systematic and evolutionary microbiology, 66: 2247–2253.
- Hirota, K., Okamoto, T., Matsuyama, H. and Yumoto, I., 2016, *Polygonibacillus indicireducens* gen. nov., sp. nov., an indigo-reducing and obligate alkaliphile isolated from indigo fermentation liquor for dyeing, International journal of systematic and evolutionary microbiology, 66: 4650–4656.
- Hirota, K., Nishita, M., Matsuyama, H. and Yomoto, I., 2017, *Paralkalibacillus indicireducens* gen., nov., sp. nov., an indigo-reducing obligate alkaliphile isolated from indigo fermentation liquor used for dyeing, International journal of systematic and evolutionary microbiology, 67: 4050-4056.
- Hirota, K., Nishita, M., Tu, Z., Matsuyama, H. and Yomoto, I., 2018, *Bacillus fermenti* sp. nov., an indigo-reducing obligate alkaliphile isolated from indigo fermentation liquor for dyeing, International journal of systematic and evolutionary microbiology, 68: 1123-1129.
- Jin, X., Liu, G., Xu, Z. and Tao, W., 2007, Decolorization of a dye industry effluent by *Aspergillus fumigatus* XC6, Applied microbiology and biotechnology, 74: 39-43
- Ju, Z., Sun, J. and Liu, Y., 2019, Molecular Structures and Spectral Properties of Natural Indigo and Indirubin: Experimental and DFT studies, Molecular, 24:1-14.
- Kell, H., Saint, C.M. and Williams P.A., 1987, Gene organization of the first catabolic operon of TOL plasmid pWW53 production of indigo by the *xyLA* gene product, Journal of bacteriology, 169: 764-770.
- Kim, H.J., Jang, S., Kim, J. and Yang, H.Y., 2017 Biosynthesis of indigo in *Escherichia coli* expressing self-sufficient CYP102A from *Streptomyces cattleya*, Dye and pigments, 140: 29-35.
- Kumar, A. and Konar, A., 2011, Dyeing of Textiles with Natural Dyes, Natural dyes, 10: 30-56.

- Laitonjam, W.S. and Wangkheirakpam, S.D., 2011, Comparative study of the major components of the indigo dye obtained from *Strobilanthes flaccidifolius* Nees. and *Indigofera tinctoria* Linn, International journal of plant physiology and biochemistry, 3: 108-116.
- Levine, W.G., 1991, Metabolism of azo dyes: implication for detoxification and activation, Drug metabolism Review, 23: 253-309.
- Li, Q.S., Schwaneberg, U. and Fischer, P., 2000, Directed evolution of the fatty-acid hydroxylase P450 B M-3 into an indole-hydroxylating catalyst, Chemistry-A European Journal, 26: 1531-1536.
- Lu, Y., Mei, L.H. and Sheng, Q., 2006, Indigo formation from indole by recombinant *E. coli* synthesizing cytochrome P450 BM-3 mutants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 16: 1047-1051.
- Maugard, T., Enaud, E., de La Sayette, A., Choisy, P., and Legoy, M. D., 2002, β -Glucosidase-catalyzed hydrolysis of indican from leaves of *Polygonum tinctorium*, Biotechnology progress, 18: 1104-1108.
- McGann, L.E., 1987, Differing action of penetrating and non-penetrating cryoprotective agents, Cryobiology, 15: 382-390.
- Meksi, N., Kechida, M., and Mhenni, F., 2007, Cotton dyeing by indigo with the borohydride process: effect of some experimental conditions on indigo reduction and dyeing quality, Chemical. Engineering journal, 131: 187-193.
- Meyer, A., Wursten, M. and Schmid, A., 2002, Hydroxylation of indole by laboratory evolved 2-hydroxybiphenyl 3-monooxygenase, Journal of biological chemistry, 2002, 277: 34161-34167.
- Minami, Y., Takao, H., Kanafuji, T., Miura, K., Kondo, M., Hara Nishimura, I. and Matsubara, H., 1997, beta-glucosidase in the indigo plant: Intracellular localization and tissue specific expression in leaves, Plant and cell physiology, 38: 1069-1074.
- Nicholson, S.K. and John, P., 2005, The mechanism of bacterial indigo reduction, Applied microbiology and biotechnology, 68: 117-123.

- O'Connor, K.E., Dobson, A.D.W. and Hartmans, S., 1997, Indigo formation by microorganisms expressing styrene monooxygenase activity, *Applied and environmental microbiology*, 63: 4287-4291.
- Padden, A.N., Dillon, V.M., Edmonds, J., Collins, M.D., Alvarez, N. and John, P., 1999, An indigo-reducing moderate thermophile from a woad vat, *Clostridium isatidis* sp. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 49: 1025-1031.
- Pearce, C.I., Loyd, J.R. and Guthrie, J.T., 2003, The removal of color from textile wastewater using whole bacterial cell: a review, *Dyes and pigments*, 58: 179-196.
- Pricelius, S., Held, C., Murkovic, M., Bozic, M., Kokol, V., Cavaco, P., A. and Guebitz, G.M., 2007, Enzymatic reduction of azo and indigoid compounds, *Applied microbiology and biotechnology*, 77: 321-327.
- Qu, Y., Pi, W., Ma, Y., Zhou, J. and Zhang, X., 2010, Influence and optimization of growth substrates on indigo formation by a novel isolation *Acinetobacter* sp. Pp-2, *Bioresource technology*, 101: 4527-4532.
- Royo, J.L., Moreno, R.E. and Cebolla, A., 2005, Stable long-term indigo production by overexpression of dioxygenase genes using a chromosomal integrated cascade expression circuit, *Journal of biological chemistry*, 116: 113-124
- Saikhao, L., Setthayanond, J., Karpkird, T. and Bechtold, T., 2018, Green reducing agents for indigo dyeing on cotton fabrics, *Cleaner production*, 197: 106-113.
- Shin, H.P., Lee, H.S. and Lee, H.K., 2001, preservation of heterotrophic bacteria by using a deep-freezing method, *Journal of microbiology*, 39: 240-243.
- Silveira, E., Moeques, P.P., Silva, S.S., Lima, J.L, Porto, A.L.F. and Tambourgi E.B., 2009, Selection of *Pseudomonas* for industrial Textile Dye Decolourization, *International biodeterioration & biodegradation*, 63: 230-235.
- Steponkus, P.L., 1984, Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation, *Annual review of psychology*, 35: 543-584.
- Tachimoto, M., 1993, Sodium requirement in indigo fermentation, *Bulletin of RIAR, Ishikawa agricultural college*, 3: 42-51.
- Umbuzeiro, G.A., Freeman, H., Warren, S.H., Oliveira, D.P., Terao, Y., Watanabe, T. and Claxton, L.D., 2005, The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cristais River, *Chemosphere*, 60: 55-64.

- Volkov, V.V., Chelli, R., Righini, R. and Perry, C.C., 2020, Indigo chromophores and pigment: structure and dynamics, *Dye and pigments*, 172: 1-12.
- Yen, K.M., Karl, M. and Blatt, L.M., 1991, Cloning and characterization of a *Pseudomonas mendocina* KR1 gene cluster encoding toluene-4-monooxygenase, *Journal of bacteriology*, 173: 5315–5327.
- Yumoto, I., Hirota, K., Nodasaka, Y., Tokiwa, Y. and Nakajima, K., 2008, *Alkalibacterium indicireducens* sp. nov., an obligate alkaliphile that reduces indigo dye, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58: 901-905
- Yusuf, M., Shabbir, M. and Mohammad, F., 2017, Natural colorants: Historical, processing and sustainable prospects, *Natural products and bioprospecting*, 7: 123-145.
- Wu, Y., Zhang, S.Q. and Ma, G.H., 1989, Study on biosynthesis of indigo involving transferring naphthalene plasmid DNA from *Pseudomonas* to *E. coli*, *Journal of genetics and genomics*, 16: 318-324.
- Zylstra, G.J. and Gibson, D.T., 1989, Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1, Nucleotide sequence of the todC1C2BADE genes and their expression in *Escherichia coli*, *Journal of biological chemistry*, 264: 1494-1496.

วิทยานิพนธ์และรายงานวิจัย

- ปิยะวรรณ กาสลัก และปิยะภรณ์ อิศรานุวัฒน์ , 2554, เทคโนโลยีการผลิตหัวเชื้อ *Bacillus subtilis* เพื่อการผลิตผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก, รายงานการวิจัย, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- ศุภกรณ์ อัจหาญ และสุตกมล ลาโสภา, 2560, การพัฒนากระบวนการย้อมครามสกนนครด้วยกระบวนการทางเคมี, รายงานวิจัย, มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร.
- สรารุณี สิทธิกุล, วีระ นาคผู้, กรปณต อนุกานนท์ และ สรยุทธ ผาแสนเงิน, การคัดแยก การจำแนก และการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการย้อมสีคราม, รายงานวิจัย, มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม.
- อนุรัตน์ สายทอง, 2551, การศึกษาการพัฒนาสีย้อมผ้าจากครามสกนนคร, รายงานโครงการวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร.

สื่ออิเล็กทรอนิกส์

- ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ, UV/VIS Spectroscopy, แหล่งที่มา : https://www.nanotec.or.th/th/?page_id=575, 6 กรกฎาคม 2563.

ประกาศ

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข, 2561, รายชื่อเชื้อโรคที่ประสงค์ควบคุมตามมาตรา 18, 135: 6-125.





ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีการเตรียมสาร

1. การเตรียมอินดิโกธรรมชาติ

นำใบครามอายุ 3 เดือน ปริมาณ 100 กรัม แช่ในน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นแยกกากใบออก แล้วนำสารละลายสีน้ำเงินที่ได้มาทำการเพิ่มอากาศบนเครื่องกวนสาร (stirrer) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 1 บนเครื่องกรองแบบสุญญากาศ นำกระดาษกรองที่ได้ไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปดูดความชื้นภายในตู้อบดูดความชื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้อินดิโกธรรมชาติเพื่อในการวิเคราะห์

2. การเตรียมอินดิโกธรรมชาติที่มีการเติมปูนขาว

นำใบครามอายุ 3 เดือน ปริมาณ 100 กรัม แช่ในน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นแยกกากใบออก แล้วนำสารละลายสีน้ำเงินที่ได้มาทำการเพิ่มอากาศบนเครื่องกวนสาร (stirrer) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมปูนขาว ปริมาณ 50 กรัม ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 1 บนเครื่องกรองแบบสุญญากาศ นำกระดาษกรองที่ได้ไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปดูดความชื้นภายในตู้อบดูดความชื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้อินดิโกธรรมชาติที่เติมปูนขาวเพื่อใช้ในการวิเคราะห์

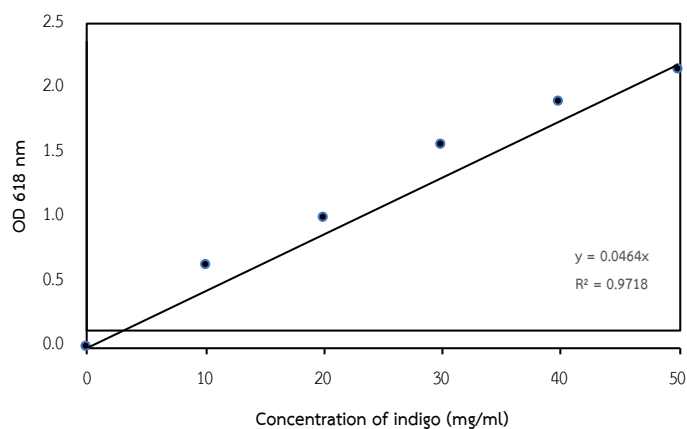
ภาคผนวก ข
การเตรียมกราฟมาตรฐาน

1. การเตรียมกราฟมาตรฐานของอินดิโก

เจือจางอินดิโกสังเคราะห์ให้มีความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยไตรเมทิลซิลฟอกไซด์ จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นสูงสุด 618 นาโนเมตร เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของอินดิโกและค่าการดูดกลืนแสง โดยให้แกน X แทนความเข้มข้นของอินดิโก และแกน Y แทนค่าการดูดกลืนแสง

ตารางที่ ข-1 ข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่าง ๆ ของอินดิโก กับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด 618 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของสี (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	
0	0.00	0.00	0.00	0.000
10	0.631	0.619	0.622	0.624±0.006
20	0.984	0.984	0.985	0.984±0.001
30	1.526	1.57	1.59	1.562±0.003
40	1.928	1.844	1.892	1.888±0.042
50	2.118	2.148	2.139	2.135±0.015

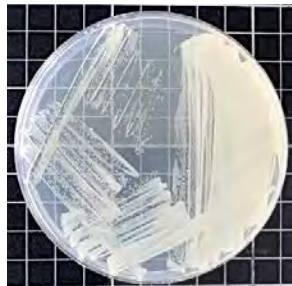


ภาพที่ ข-1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่าง ๆ ของอินดิโก กับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด 618 นาโนเมตร

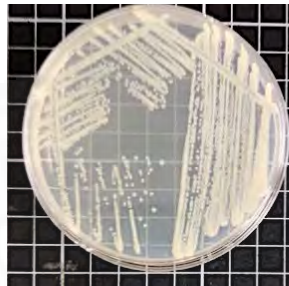
ภาคผนวก ค
ข้อมูลที่ได้การทดลอง

1. การศึกษาลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ตารางที่ ค-1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำย้อมอินดิโก ณ ร้านครามสกล



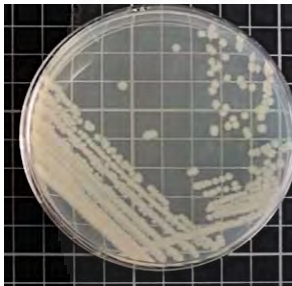
SKTU1



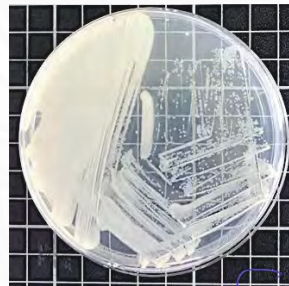
SKTU2



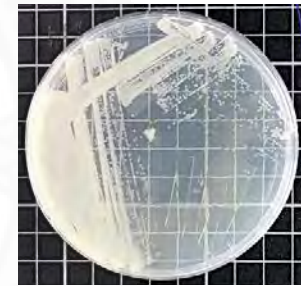
SKTU3



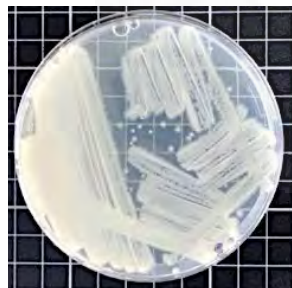
SKTU4



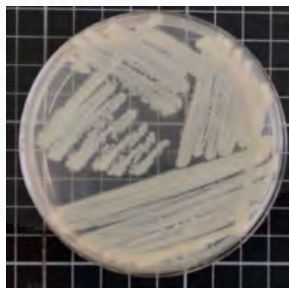
SKTU5



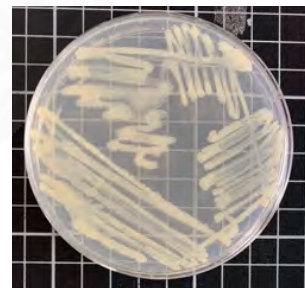
SKTU6



SKTU7



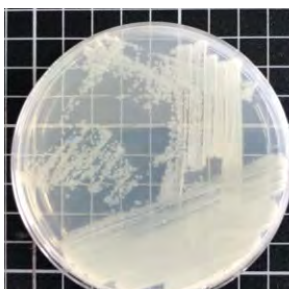
SKTU8



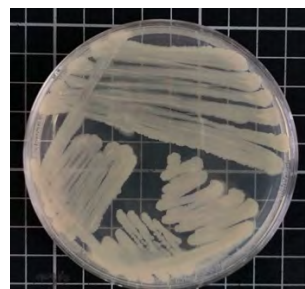
SKTU9



SKTU10

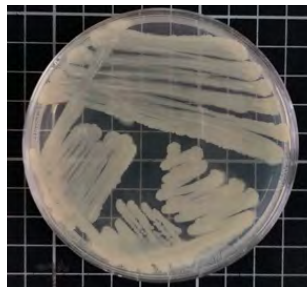


SKTU11

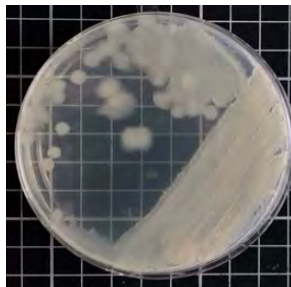


SKTU12

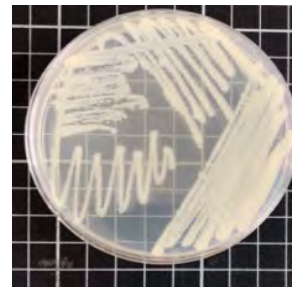
ตารางที่ ค-1 (ต่อ)



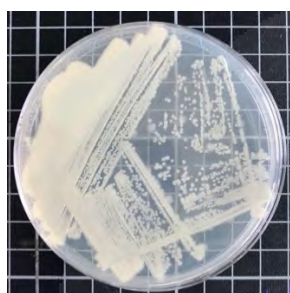
SKTU13



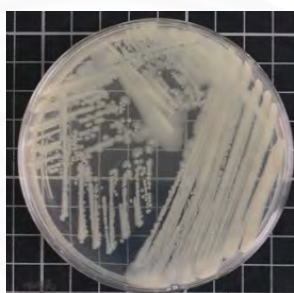
SKTU14



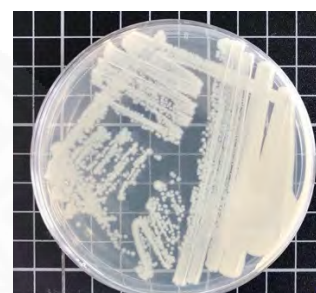
SKTU15



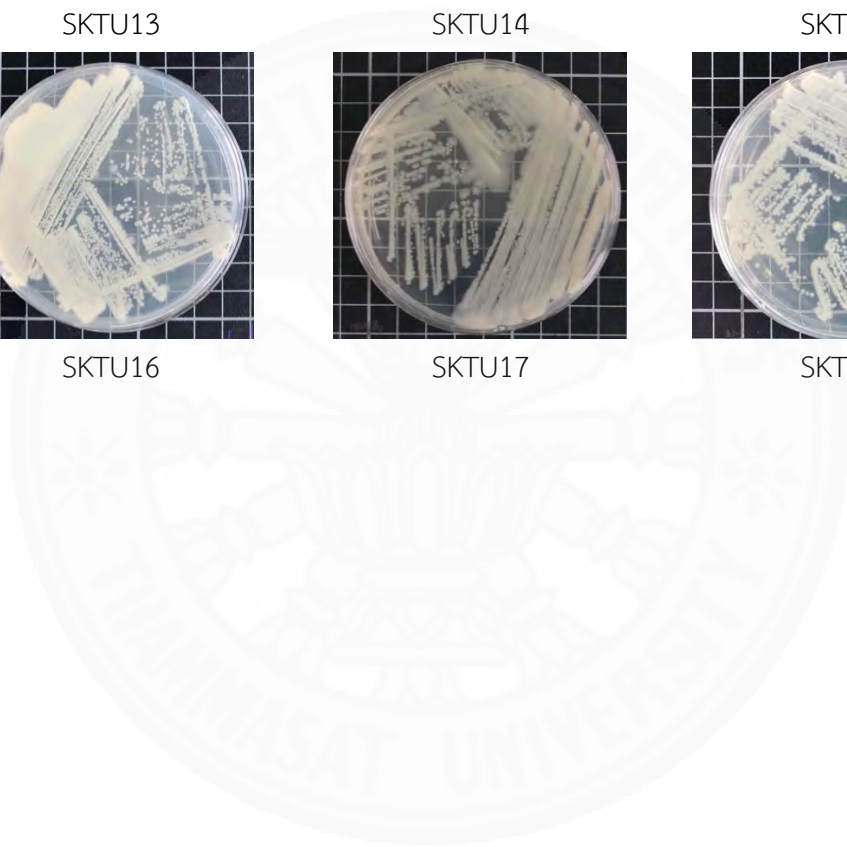
SKTU16



SKTU17



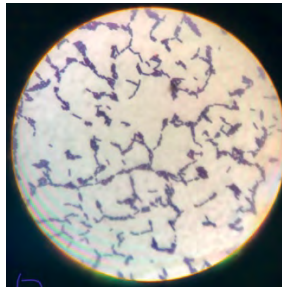
SKTU18



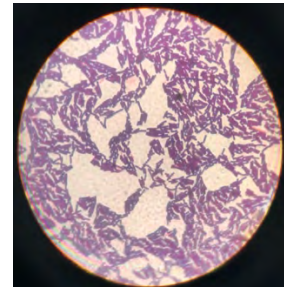
ตารางที่ ค-2 ลักษณะทางด้านสีฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้



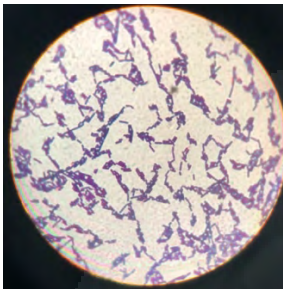
SKTU1



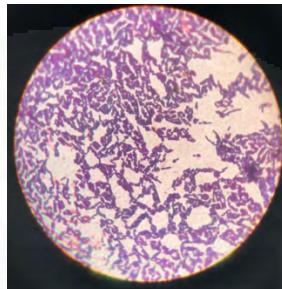
SKTU2



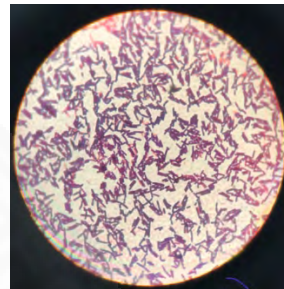
SKTU3



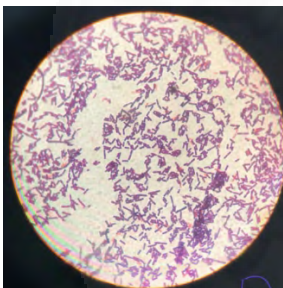
SKTU4



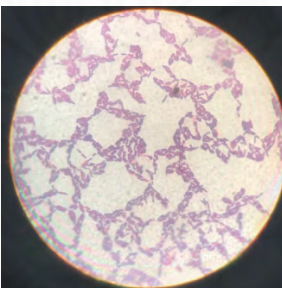
SKTU5



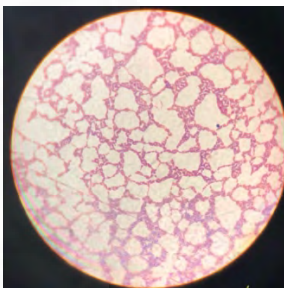
SKTU6



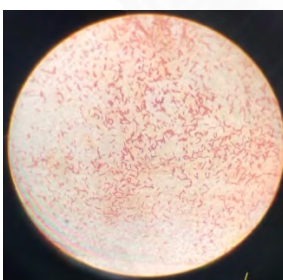
SKTU7



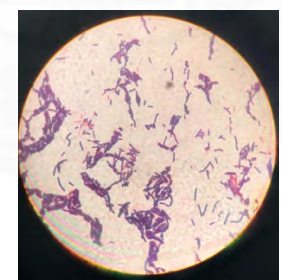
SKTU8



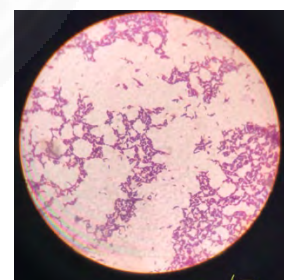
SKTU9



SKTU10

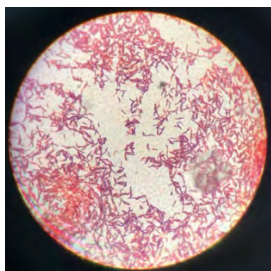


SKTU11

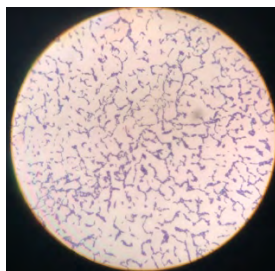


SKTU12

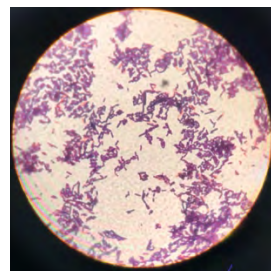
ตารางที่ ค-2 (ต่อ)



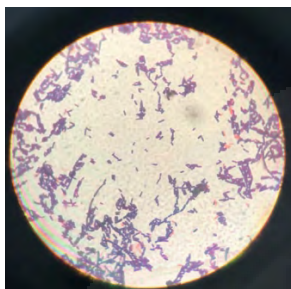
SKTU13



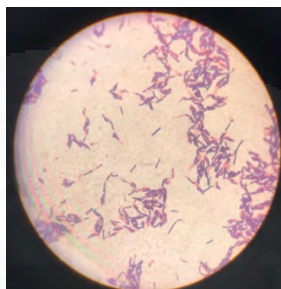
SKTU14



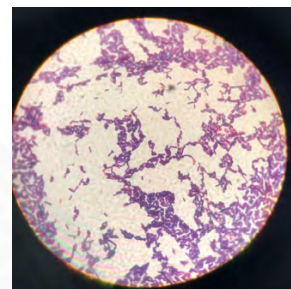
SKTU15



SKTU16



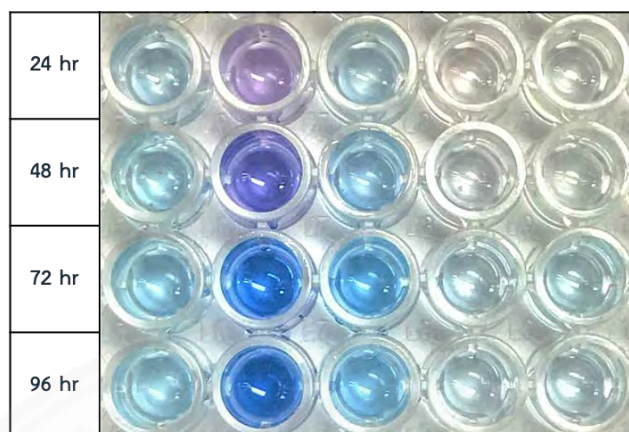
SKTU17



SKTU18



2. การตัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์อินดิโกจากน้ำย้อมอินดิโก



ภาพที่ ค-1 ลักษณะของอินดิโกที่สังเคราะห์จากแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ ไอโซเลท SKTU2, SKTU4, SKTU8, SKTU15 และ SKTU16

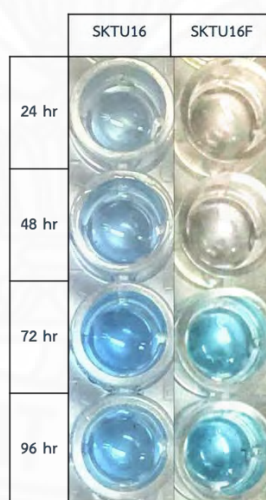
ตารางที่ ค-3 ข้อมูลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 618 นาโนเมตร ของการสังเคราะห์อินดิโก

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง				
	SKTU2	SKTU4	SKTU8	SKTU15	SKTU16
24	0.00±0.6	0.00±0.03	1.95±0.04	5.17±0.18	2.49±0.09
48	0.54±0.12	0.71±0.04	2.51±0.03	8.76±0.14	4.09±0.34
72	0.19±0.37	0.15±0.02	2.39±0.26	10.44±0.37	3.80±0.45
96	1.20±0.11	1.58±0.05	4.64±0.52	14.95±0.39	5.35±0.60

ตารางที่ ค-4 ข้อมูลการเจริญเติบโตของแบคทีเรียไอโซเลท SKTU2, SKTU4, SKTU8, SKTU15, SKTU16

เวลา (ชั่วโมง)	Log (CFU/ml)				
	SKTU2	SKTU4	SKTU8	SKTU15	SKTU16
0	5.91±0.02	5.60±0.07	5.86±0.02	5.47±0.04	5.60±0.06
24	5.70±0.09	5.61±0.05	5.62±0.06	5.43±0.05	5.66±0.09
48	5.21±0.04	5.40±0.04	5.42±0.13	5.47±0.00	5.58±0.06
72	5.18±0.05	5.48±0.07	5.58±0.05	5.03±0.04	5.34±0.01
96	5.40±0.05	5.59±0.04	5.59±0.07	5.05±0.03	5.17±0.14

3. การศึกษาประสิทธิภาพในการสังเคราะห์อินดิโกของแบคทีเรียที่ผ่านกระบวนการทำแห้ง



ภาพที่ ค-2 ลักษณะของอินดิโกที่สังเคราะห์จากแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ ไอโซเลท SKTU16 และ SKTU16 Freeze dried

ตารางที่ ค-5 ข้อมูลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 618 นาโนเมตร ของการสังเคราะห์อินดิโก

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง	
	SKTU15	SKTU15 Freeze dried
24	0.393	0.176
48	0.555	0.273
72	0.708	0.306
96	0.983	0.347

4. การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการรีดิวซ์อินดิโก

ตารางที่ ค-6 ข้อมูลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร ของการรีดิวซ์อินดิโก

ตัวอย่าง	เวลา (วัน)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Na ₂ S ₂ O ₄	100.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
SKTU1	8.94	26.29	27.75	27.17	28.44	28.42	30.71	31.32
SKTU2	10.11	57.48	62.18	59.52	57.84	52.39	49.79	51.02
SKTU3	7.22	55.88	100.17	99.71	90.73	89.94	89.44	88.30
SKTU4	46.63	56.86	86.16	75.97	72.71	71.05	69.90	68.30
SKTU5	8.62	29.37	34.17	31.69	31.08	32.52	29.69	31.10
SKTU6	9.58	28.08	31.88	38.57	38.92	38.42	36.88	35.70
SKTU7	12.98	31.01	44.12	54.69	48.71	44.26	44.09	42.96
SKTU8	7.33	51.77	54.56	48.99	49.94	50.99	49.02	45.50
SKTU9	7.00	36.34	53.10	51.06	52.32	47.04	47.57	48.74
SKTU10	8.79	27.55	42.59	38.04	42.20	49.04	53.79	55.04
SKTU11	11.70	47.35	56.12	55.63	58.81	57.12	55.74	57.86

ตารางที่ ค-6 (ต่อ)

Isolate	วัน (เวลา)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
SKTU12	2.40	20.40	51.15	46.87	48.95	44.87	47.17	48.94
SKTU13	9.05	38.11	59.19	56.28	52.29	47.68	48.69	48.38
SKTU14	5.08	54.61	78.22	69.76	67.10	61.90	60.21	59.48
SKTU15	6.26	51.06	54.39	51.53	53.89	56.39	52.69	54.19
SKTU16	7.63	44.62	51.66	48.89	45.64	44.36	41.06	42.18
SKTU17	0.99	8.08	60.92	61.83	58.74	61.88	60.29	59.76
SKTU18	6.31	31.82	55.92	50.75	46.90	46.70	46.42	46.94

5. การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพด้วยเทคนิคชีวเคมี

LOW DISCRIMINATION								
Strip	API 50 CHB V4.0							
Profile	+ + + + + + + + +							
Note	POSSIBILITY OF <i>Bacillus megaterium</i>							
Significant taxa	% ID	T	Tests against					
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	83.5	0.52	FRU 98%	MAL 88%	ONPG 1%			
<i>Bacillus firmus</i>	9.2	0.5	ARB 4%	SAL 1%	MAL 92%	SAC 77%		
			ONPG 18%					
<i>Brevibacillus non reactive</i>	6.3	0.38	GLU 23%	NAG 6%	ARB 2%	SAL 2%		
			TRE 8%	ONPG 19%				
Next taxon	% ID	T	Tests against					
<i>Bacillus cereus 2</i>	0.3	0.32	RIB 77%	FRU 99%	SAL 24%	MAL 100%		
			ONPG 1%					

ภาพที่ ค-3 ผลการระบุสายพันธุ์แบคทีเรียไอโซเลต SKTU2 ด้วย Apiweb software

GOOD IDENTIFICATION							
Strip	API 50 CHB V4.0						
Profile	-----+ - + - +-----+ -						
Note							
Significant taxa	% ID	T	Tests against				
Bacillus non reactive	92.1	0.62	MDM 1%	AMY 1%	ESC 19%		
Next taxon	% ID	T	Tests against				
Brevibacillus non reactive	6.0	0.56	MDM 0%	AMY 1%			

ภาพที่ ค-7 ผลการระบุสายพันธุ์แบคทีเรียไอโซเลท SKTU15 ด้วย Apiweb software

GOOD IDENTIFICATION							
Strip	API 50 CHB V4.0						
Profile	-----+ + + - +-----+ + +-----+ + + -						
Note							
Significant taxa	% ID	T	Tests against				
Brevibacillus laterosporus	96.6	0.6	NAG 98%	MAL 88%	SAC 5%		
Next taxon	% ID	T	Tests against				
Geobacillus thermoglucosidasius	1.8	0.58	MAL 100%				

ภาพที่ ค-8 ผลการระบุสายพันธุ์แบคทีเรียไอโซเลท SKTU16 ด้วย Apiweb software

6. การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล

6.1 *Bacillus horneckiae* strain SKTU2 16S ribosomal RNA gene, partial

LOCUS MK658868 446 bp DNA linear BCT 30-APR-2019
 DEFINITION *Bacillus horneckiae* strain SKTU2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION MK658868
 VERSION MK658868.1
 KEYWORDS .
 SOURCE *Cytobacillus horneckiae*
 ORGANISM *Cytobacillus horneckiae*
 Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; *Cytobacillus*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 446)
 AUTHORS sukka,k.,sakkayawong,N., thanananta,T. and sompark,C.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (20-MAR-2019) Biotechnology, Thammasat university,
 Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology,
 Rangsit Centre, 99 Moo.18, Tumbon. Kl, Khlong Luang, Pathum Thani 12120, Thailand
 COMMENT ##Assembly-Data-START##
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
 ##Assembly-Data-END##
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..446
 /organism=" *Cytobacillus horneckiae*"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="SKTU16"
 /isolation_source="Indigo dye pot"
 /db_xref="taxon:549687"
 rRNA <1..>446
 /product="16S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 taaacgcgaa gaaccttacc aggtcttgac gatctttctg ggccttttcc
 tagagatagg
 61 aatttcccct tcgggggaca ggagtgacag gtggtgcatg gttgtcgtca
 gctcgtgtcg
 121 tgagatggtg ggtaaagtcc cgcaacgagc gcaacccttg atcttagttg
 ccagcattca
 181 gttgggcact ctaaggtgac tgccggtgac aaaccggagg aaggtgggga
 tgacgtcaaa
 241 tcatcatgcc cttatgacc tgggctacac acgtgctaca atggatggta
 caaagggcag
 301 caaaaccgcg aggttaagcg aatcccataa aaccattctc agttcggatt
 gcaggctgca
 361 actcgcctgc atgaagccgg aatcgctagt aatcgcggat ccagcatgcc
 cgcggtgaat
 421 acgttcccgg gccttgatca caccga

6.2 *Bacillus cereus* strain SKTU3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

LOCUS MK629724 730 bp DNA linear BCT 30-APR-2019
 DEFINITION *Bacillus cereus* strain Sktu3 16S ribosomal RNA gene,
 partial sequence.
 ACCESSION MK629724
 VERSION MK629724.1
 KEYWORDS .
 SOURCE *Bacillus cereus*
 ORGANISM *Bacillus cereus*
 Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae;
Bacillus;
Bacillus cereus group.
 REFERENCE 1(bases 1 to 730)
 AUTHORS sukka,k., sakkayawong,N. and thanananta,T.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (14-MAR-2019) Biotechnology, Thammasat
 university,
 Department of Biotechnology, Faculty of Science and
 Technology,
 Rangsit Centre, 99 Moo.18, Tumbon. Kl, Khlong Luang,
 Pathum Thani
 12120, Thailand
 COMMENT ##Assembly-Data-START##
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
 ##Assembly-Data-END##
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..730
 /organism="Bacillus cereus"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="C1"
 /isolation_source="Indigo dye pot"
 /db_xref="taxon:1396"
 rRNA <1..>730
 /product="16S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 acatgcaagt cgagcgaatg gattaagagc ttgctcttat gaagttagcg
 gcggacgggt
 61 gagtaacacg tgggtaacct gcccataaga ctgggataac tccgggaaac
 cggggctaata
 121 accggataac attttgaacc gcatggttcg aaattgaaag gcggcttcgg
 ctgtcactta
 181 tggatggacc cgcgtcgcac tagctagtgt gtgaggtaac ggctcaccaa
 ggcaacgatg
 241 cgtagccgac ctgagagggg gatcggccac actgggactg agacacggcc
 cagactccta
 301 cgggaggcag cagtagggaa tcttccgcaa tggacgaaag tctgacggag
 caacgccgcg
 361 tgagtgatga aggctttcgg gtcgtaaaac tctgttgtaa gggaagaaca
 agtgctagtt
 421 gaataagctg gcaccttgac ggtacctaac cagaaagcca cggctaacta
 cgtgccagca
 481 gccgcggtaa tacgtaggtg gcaagcgta tccggaatta ttgggcgtaa
 agcgcgcgca
 541 ggtggtttct taagtctgat gtgaaagccc acggctcaac cgtggagggt
 cattggaaac

601 tgggagactt gagtgcagaa gaggaagtg gaattccatg tgtagcggtg
aaatgcgtag
661 agatatggag gaacaccagt ggcgaaggcg actttctggt ctgtaactga
cactgaggcg
721 cgaaagcgtg



6.3 *Bacillus horneckiae* strain SKTU4 16S ribosomal RNA gene, partial

LOCUS MK659957 444 bp DNA linear BCT 31-MAY-2019
 DEFINITION *Bacillus horneckiae* strain SKTU4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION MK659957
 VERSION MK659957.1
 KEYWORDS .
 SOURCE *Cytobacillus horneckiae*
 ORGANISM *Cytobacillus horneckiae*
 Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; *Cytobacillus*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 444)
 AUTHORS sukka,k., sakkayawong,N., thanananta,T. and sompark,C.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (20-MAR-2019) Biotechnology, Thammasat university, Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Rangsit Centre, 99 Moo.18, Tumbon. Kl, Khlong Luang, Pathum Thani 12120, Thailand
 COMMENT ##Assembly-Data-START##
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
 ##Assembly-Data-END##
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..444
 /organism="Cytobacillus horneckiae"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="SKTU20"
 /isolation_source="Indigo dye pot"
 /db_xref="taxon:549687"
 rRNA <1..>444
 /product="16S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 tttaacgcga aaggacctta ccaggtcttg gggatcttc tgacaatcct
 agagatagga
 61 cgttcccctt cgggggacag agtgacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc
 tcgtgtcgtg
 121 agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc aacccttgat cttagttgcc
 agcattcagt
 181 tgggcactct aaggtgactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg
 acgtcaaadc
 241 atcatgcccc ttatgacctg ggctacacac gtgctacaat ggatggtaca
 aagggtgca
 301 agaccgcgag gtttagccaa tcccataaaa ccattctcag ttcggattgc
 aggctgcaac
 361 tcgcctgcat gaagccggaa tcgctagtaa tcgcggatca gcatgccccg
 cggatgaatac
 421 gttcccgggc cttgtacaca ccga

6.4 *Bacillus safensis* strain SKTU8 16S ribosomal RNA gene, partial

LOCUS MK652862 1399 bp DNA linear BCT 30-APR-2019
 DEFINITION *Bacillus safensis* strain SKTU8 16S ribosomal RNA gene,
 partial
 sequence.
 ACCESSION MK652862
 VERSION MK652862.1
 KEYWORDS .
 SOURCE *Bacillus safensis*
 ORGANISM *Bacillus safensis*
 Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae;
 Bacillus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1399)
 AUTHORS sukka,k., sakkayawong,N. and thanananta,T.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (20-MAR-2019) Biotechnology, Thammasat
 university,
 Department of Biotechnology, Faculty of Science and
 Technology,
 Rangsit Centre, 99 Moo.18, Tumbon. Kl, Khlong Luang,
 Pathum Thani
 12120, Thailand
 COMMENT ##Assembly-Data-START##
 Sequencing Technology:: Sanger dideoxy sequencing
 ##Assembly-Data-END##
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1399
 /organism="Bacillus safensis"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="SKTU9"
 /isolation_source="Indigo dye pot"
 /db_xref="taxon:561879"
 rRNA <1..>1399
 /product="16S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 tcgagcggac agaagggagc ttgctcccgg atgtagcgg cggacgggtg
 agtaacacgt
 61 gggtaacctg cctgtaagac tgggataact ccgggaaacc ggagctaata
 ccgatagtt
 121 ccttgaaccg catggttcaa ggatgaaaga cggtttcggc tgtcacttac
 agatggaccc
 181 gcggcgcatt agctagttgg tggggtaatg gctcaccaag gcgacgatgc
 gtagccgacc
 241 tgagaggggtg atcggccaca ctgggactga gacacggccc agactcctac
 gggagggcagc
 301 agtagggaat cttccgcaat ggacgaaagt ctgacgggagc aacgccgcgt
 gagtgatgaa
 361 ggttttcgga tcgtaaagct ctggtgtag ggaagaacaa gtgcgagagt
 aactgctcgc
 421 accttgacgg tacctaacca gaaagccacg gctaactacg tgccagcagc
 cgcggtaata
 481 cgtaggtggc aagcgttgct cggaattatt gggcgtaaag ggctcgcagg
 cggtttctta
 541 agtctgatgt gaaagcccc ggctcaaccg gggaggggtca ttggaaactg
 ggaaacttga

601 gtgcagaaga ggagagtgga attccacgtg tagcggtgaa atgcgtagag
atgtggagga
661 acaccagtgg cgaaggcgac tctctggtct gtaactgacg ctgaggagcg
aaagcgtggg
721 gagcgaacag gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgagtg
ctaagtgtta
781 ggggggtttcc gccccttagt gctgcagcta acgcattaag cactccgcct
ggggagtacg
841 gtcgcaagac tgaaactcaa aggaattgac gggggcccgc acaagcggtg
gagcatgtgg
901 ttttaattcga agcaacgcga agaaccttac caggtcttga catcctctga
caaccctaga
961 gatagggctt tcccttcggg gacagagtga caggtggtgc atggttgcg
tcagctcgtg
1021 tcgtgagatg ttgggttaag tcccgaacg agcgcaacc ttgatcttag
ttgccagcat
1081 tcagttgggc actctaaggt gactgccggt gacaaaccgg aggaaggtgg
ggatgacgtc
1141 aatcatcat gcccttatg acctgggcta cacacgtgct acaatggaca
gaacaaaggg
1201 ctgcgagacc gcaaggttta gccaatcca taaatctggt ctcagttcgg
atcgcagtct
1261 gcaactcgac tgcgtgaagc tggaatcgct agtaatcgcg gatcagcatg
ccgcggtgaa
1321 tacgttcccg ggccttgta acaccgcccg tcacaccacg agagtttgca
acaccgaag
1381 tcggtgaggt aacctttat
//

6.5 *Lysinibacillus fusiformis* strain SKTU15 16S ribosomal RNA gene,

LOCUS MK652860 560 bp DNA linear BCT 30-APR-2019
 DEFINITION *Lysinibacillus fusiformis* strain SKTU15 16S ribosomal RNA gene,
 partial sequence.
 ACCESSION MK652860
 VERSION MK652860.1
 KEYWORDS .
 SOURCE *Lysinibacillus fusiformis*
 ORGANISM *Lysinibacillus fusiformis*
 Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae;
Lysinibacillus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 560)
 AUTHORS sukka,k., sakkayawong,N. and thanananta,T.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (20-MAR-2019) Biotechnology, Thammasat
 university,
 Department of Biotechnology, Faculty of Science and
 Technology,
 Rangsit Centre, 99 Moo.18, Tumbon. Kl, Khlong Luang,
 Pathum Thani
 12120, Thailand
 COMMENT ##Assembly-Data-START##
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
 ##Assembly-Data-END##
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..560
 /organism="Lysinibacillus fusiformis"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="SKTU8"
 /isolation_source="Indigo dye pot"
 /db_xref="taxon:28031"
 rRNA <1..>560
 /product="16S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 gtttagcggcg gacgggtgag taacacgtgg gcaacctgcc ctatagattg
 ggataactcc
 61 gggaaaccgg ggctaatacc gaataatctc ttttgcctca tggtgcaaaa
 ctgaaaggcg
 121 gtttcggctg tcaacttttg atggaccgc gtcgcattag ctagtgtggtg
 aggtaacggc
 181 tcaccaaggc gacgatgcgt agccgacctg agagggtgat cggccacact
 gggactgaga
 241 cacggcccag actcctacgg gaggcagcag tagggaatct tccacaatgg
 acgaaagtct
 301 gatggagcaa cgccgcgtga gtgatgaagg ttttcggatc gtaaaactct
 gttggttaggg
 361 aagaacaagt gctatatgaa ctggctgtac cctggccgga ccttattaa
 aagccccgg
 421 taaattcctg gccaccacc cggtaatacc taagttggca gcggtgatcc
 gaatttatgg
 481 gcctaaagcc cgcccaaggt gtctttttaa tcttaagtta aaaccaacg
 gttcaccgtg
 541 gaagggtctt tgaaactggg
 //

6.6 *Bacillus kochii* strain SKTU16 16S ribosomal RNA gene, partial

LOCUS MH031767 1492 bp DNA linear BCT 13-MAR-2018
 DEFINITION *Bacillus kochii* strain SKTU16 16S ribosomal RNA gene, partial
 sequence.
 ACCESSION MH031767
 VERSION MH031767.1
 KEYWORDS .
 SOURCE *Cytobacillus kochii*
 ORGANISM *Cytobacillus kochii*
 Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; *Cytobacillus*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1492)
 AUTHORS Sukka,K., Sakkayawong,N. and Thanananta,T.
 TITLE Type of bacteria and modants for indigo dyed fabric quality
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1492)
 AUTHORS Sukka,K., Sakkayawong,N. and Thanananta,T.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (08-MAR-2018) Biotechnology, Thammasat University,
 Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology,
 Rangsit Centre, 99 Moo.18, Tumbon. Kl, Khlong Luang, Pathum Thani
 12120, Thailand
 COMMENT ##Assembly-Data-START##
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
 ##Assembly-Data-END##
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1492
 /organism="Cytobacillus kochii"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="SKTU5"
 /isolation_source="Indigo dye pot"
 /db_xref="taxon:859143"
 /country="Thailand"
 rRNA <1..>1492
 /product="16S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 cctttgggcc caacgttccg aggccgaatc ttgaggggag cttgctccca
 aagattagcg
 61 ggcggacggg tgagtaacac gtgggcaacc tgcctgtaag actgggataa
 ctccgggaaa
 121 ccggggctaa tactggataa tatcttttta tacatatagg aagattgaaa
 gatggttctg
 181 ctatcactta cagatggtgg ctgcgcgctg cgccattagg ctaggctggt
 gaggtaacg
 241 ctcaccaagg cgacagatgc gtagccgacc ttgagagggt ggatcgggcc
 acaaatggga
 301 cctgagacac ggcccagaat ctctacggga gggcagcagg tagggaatct
 tccgcaatgg
 361 aagaaaggtc tgacggaggc aacgccgcgt tgagtggatg aaaggttttc
 ggaatccgta

421 aaactctggt gttaagggaa gaacaagtat ctggaggtaa ctgccggtac
cttgacggta
481 ccctaaccag aaaagccacg gctaactacg gtgccagca gccgcggtaa
atacgtaggt
541 ggcaagcggt gtccggaatt attgggcgta aagcgcgcgc agggcggttc
cttaagtctg
601 atgtgaaagc cccacggctc aaccgtggag ggtcattgga aacttgggga
acttgagtgc
661 agaagaggaa agtggaaatt caagtgtagc ggtgaaatgc gtagagattt
ggaggaacac
721 cagtggcgaa ggcgactttc tggctctgtaa ctgacgctga ggcgcgaaag
cgtggggagc
781 aaacaggatt tagataccct ggtagtccac gccgtaaacy atgagtgcta
agtgttagag
841 ggtttccgcc ctttagtgct gcagcaaacy cattaagcac tccgcctggg
gagttacgga
901 cgcgcaaggt tgaaactcaa aggaattgac gggggccccg ccacaagcgg
tggagagcat
961 gtggtttaat tcgaagcaac gcgaagaacc ttaccaggtc ttgacatcct
ctgacaatcc
1021 tagagatagg acgttcccct tcgggggaca gagtgacagg tgggtgcatgg
ttgtcgtcag
1081 ctcgtgctgt gagatgttgg gttaagtccc gcaacgagcg caaccctga
tcttagttgc
1141 cagcattcag ttgggcactc taaggtgact gccggtgaca aaccggagga
aggtggggat
1201 gacgtcaaat catcatgccc cttatgacct gggctacaca cgtgctacaa
tggatggtac
1261 aaagggctgc aagaccgca ggtttagcca atcccataaa accattctca
gttcggattg
1321 taggctgcaa ctcgcctaca tgaagccgga atcgctagta atcgcggtac
agcatgccgc
1381 ggtgaatacg ttccccggcc ttgtacacac cgccccgtcac accacgagag
tttgaacac
1441 ccgaagtcgg tggggtaacc ttttggaagc ccagccgcc taaattgggt ga
//

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวกัญต์กนิษฐ์ สุขชนะ
วันเดือนปีเกิด	30 พฤศจิกายน 2537
วุฒิการศึกษา	ปีการศึกษา 2559: วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ตำแหน่ง	-
ทุนการศึกษา	พ.ศ. 2562: ทุนนำเสนอผลงานวิทยานิพนธ์/สารนิพนธ์ใน ต่างประเทศและในประเทศ พ.ศ. 2560: ทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2560-2561
ผลงานทางวิชาการ	กัญต์กนิษฐ์ สุขชนะ, เฉลิมวุธ สมปาก, ชีระชัย ธนนานันต์ และ นิรมล ศากยวงศ์, 2562, การคัดแยก แบคทีเรียจากน้ำย้อมครามในหม้อย้อมและดินบริเวณย้อมครามเพื่อประยุกต์ใช้ในการย้อมและ บำบัดน้ำเสีย, Thai journal of Science and Technology, 5:552-564. Sukka, K., Thumanu, K., Jearanaikoon, N. and Sakkayawong, N., 2019, Bacterial Isolation for indigo dyeing kit, Synchrotron Light Research Institute (Public Organization) Annual User Meeting 2019: 1st May 2019; The Sukosol Hotel Bangkok, Thailand. Sukka, K., Jearanaikoon, N. and Sakkayawong, N., 2019, Bacterial Isolation from Indigo Dye Pot for Indigo dye Production Development, Annual Conference of The International Conference on Life Science and Biological Engineering: 18 December 2019; Kyoto research Park, Japan.
ประสบการณ์ทำงาน	พ.ศ. 2560-2562: ผู้ช่วยสอนปฏิบัติการชีววิทยา สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต พ.ศ. 2560-2561: ผู้ช่วยวิจัยในการวิจัยเรื่อง ชนิดของ แบคทีเรียและสารช่วยติดสีต่อคุณภาพผ้าย้อมคราม