

บทบาทของเชื้อจุลินทรีย์ คุณภาพของเถ้า และภาชนะที่ใช้ก่หม้อห้อม
ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนสีอินดิโกในระหว่างการผลิตสีย้อมห้อม
แบบธรรมชาติ เพื่อการผลิตสีย้อมแบบยั่งยืน

The Role of Microorganisms, Ash Quality and Hom's Dye Process
Containers in Indigo's Ability to Change Colors During the
Production of Natural Dye for the Production of Dye Sustainable

ณัฐพร จันทรฉาย* อัญศญา บุญประจวบ และ รัฐพงศ์ เดชพรหม

Nuttaporn chanchay* Ansaya Boonprajaub และ Ratthapong Dachprom

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ อำเภอร้องกวาง
จังหวัดแพร่ 54140

Agro-Industrial Biotechnology, Maejo University Phrae Campus, Rong Kwang, Phrae 54140

* Corresponding author: nuttapornchanchay@gmail.com

(Received: 25 August 2022; Revised: 1 December 2022; Accepted: 21 February 2023)

Abstract

The purpose of this research was to study microorganisms involve in processing of Hom's natural dye isolated from Kaewwanna (KW), Natural Fabric (TC), Hong Hom (HH), Pa Leung (PL) and Pa Ngiam (PG) shops. Ninety-five isolates of microorganisms were found but only 17 isolates were able to change Indigo blue to Leuco-indigo, especially TC228 from Natural Fabric shop provided the largest quantity of Leuco-indigo up to 9.5688 µg/ml and was classified in short gram-positive bacteria. After identifying species of TC228 by the nucleotide sequence of 16S rRNA, it was 99% identical to *Bacillus cereus* NR_115714.1 at length 1535 bp. To investigate the efficiency of Leuco-indigo changing, revealed that the sample added with TC228 provided more Leuco-indigo than sample without TC228 supplement. Moreover, the experimentation of appropriate containers for Hom's natural dye process was not statistically significant differences. And the experimentation of lye quality from filtered wood ashes found that mixed wood ashes provided the highest Leuco-indigo up to 157.08 µg/ml. Color quality in L* a* and b* value are equal to 1.030 -0.023 and 0.367, respectively. According to the results of this research, it can make convenience and quality control also enhancing to the new style products e.g. Hom's dye powder or Hom's dye kit.

Keywords: Natural dye, indigo blue, microorganism, natural dye production

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาจุลินทรีย์ที่มีผลต่อกระบวนการก่อกำหม้อหอมย้อมสีผ้า โดยคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากน้ำก่อกำหม้อร้านแก้ววรรณ (KW) ร้านผ้าธรรมชาติ (TC) ร้านโฮงฮ่อม (HH) ร้านป่าเหลือง (PL) และร้านป่าเหียง (PG) จากการศึกษาสามารถคัดแยกเชื้อได้ทั้งหมด 95 ไอโซเลท แต่พบเพียง 17 ไอโซเลท ที่สามารถเปลี่ยนสีอินดิโกไปเป็นลิวโคอินดิโก โดยไอโซเลท TC228 ให้ปริมาณลิวโคอินดิโกมากที่สุด คือ 9.5688 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งคัดแยกได้จากน้ำก่อกำหม้อร้านผ้าธรรมชาติ เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างเป็นท่อนสั้น จากการนำ TC228 ไปวิเคราะห์เพื่อระบุชนิด โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Bacillus cereus* NR_115714.1 ในฐานข้อมูลที่มีความยาว 1535 bp. มีค่าความเหมือนเท่ากับ 99% เพื่อพิสูจน์ประสิทธิภาพการเปลี่ยนเป็นลิวโคอินดิโก พบว่า ตัวอย่างที่มีการเติม TC228 ให้ประสิทธิภาพของน้ำก่อกำหม้อดีกว่าตัวอย่างที่ไม่ได้เติมเชื้อจุลินทรีย์ จากนั้นทดสอบลักษณะที่เหมาะสม พบว่า ลักษณะที่ใช้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติต่อกระบวนการเปลี่ยนเป็นลิวโคอินดิโกรวมถึงการย้อมติดสี และจากการศึกษาน้ำด่างจากซี้เก่าไม้ 7 ชนิด พบว่า น้ำด่างจากซี้เก่าไม้รวมให้ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนเป็นลิวโคอินดิโก สูงที่สุด คือ 157.08 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และให้ค่า L^* a^* และ b^* เท่ากับ 1.030 -0.023 และ 0.367 ตามลำดับ จากงานวิจัยสามารถสร้างความสะดวกในการใช้งาน รวมถึงการควบคุมคุณภาพน้ำย้อมสี นำไปสู่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์หอมผงหรือชุด Kit ย้อมสีสำเร็จรูป ซึ่งเป็นการยกระดับสินค้าหม้อหอม ของจังหวัดแพร่ สู่ระดับสากล

คำสำคัญ: สีย้อมธรรมชาติ สีอินดิโก เชื้อจุลินทรีย์ ผลิตภัณฑ์สีย้อมธรรมชาติ

คำนำ

ปัจจุบันกระแสการตระหนักในการอนุรักษ์และส่งเสริมการใช้ภูมิปัญญาท้องถิ่นได้รับความนิยมมากขึ้น ซึ่งการย้อมผ้าจากสีที่ได้จากธรรมชาติเป็นภูมิปัญญาท้องถิ่นที่ทรงคุณค่า แต่ยังไม่ได้รับความสนใจและส่งเสริมมากเท่าที่ควร นับวันทั้งผู้ผลิตและผู้บริโภคจะยิ่งลดน้อยลง อาจด้วยเหตุที่การย้อมสีธรรมชาติค่อนข้างใช้ระยะเวลาหลายวันในการย้อมแต่ละครั้ง ญัฐพร (2564) กล่าวว่า กระบวนการย้อมผ้าหม้อหอมมีขั้นตอนที่หลากหลาย ที่สำคัญคือการหมักน้ำหม้อมที่ต้องใช้ระยะเวลาหลายชั่วโมง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับประสบการณ์ของผู้ย้อม จนกว่าจะได้สีที่โดดเด่นสวยงาม เวลาทองขึ้นเงา สีไม่ตก และยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ผู้ประกอบการส่วนใหญ่จึงหันมาใช้สารเคมีในการย้อม เนื่องจากต้นทุนที่ต่ำ สีที่ได้ติดทนนานกว่า และใช้ระยะเวลาน้อยกว่าหลายเท่าตัว ในทางกลับกัน คุณภาพของสีที่ได้จะไม่มีความเป็นธรรมชาติ อีกทั้งสารเคมียังเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม รวมถึงตัวผู้ย้อมเอง ซึ่งอาจนำไปสู่โรคภัยร้ายแรง เช่น โรคในระบบทางเดินหายใจ โรคผิวหนัง หรือโรคผิวหนังได้

จังหวัดแพร่เป็นจังหวัดหนึ่งที่มีชื่อเสียงในด้านการย้อมผ้าหม้อหอม นิตยา (2544) กล่าวว่า หม้อมสดเป็นวัตถุดิบที่สามารถนำมาสกัดสีอินดิโกได้ พืชที่ให้สีครามจะมีสารที่เรียกว่า “อินดิแคน (indican)” ซึ่งสามารถละลายน้ำได้แต่ไม่มีสี สารอินดิแคนเมื่อทำปฏิกิริยากับ

ไฮโดรเจนจะเกิดเป็นกลูโคสและสารอินดอกซิล (indoxyl) เมื่ออินดอกซิลรวมตัวกับก๊าซออกซิเจนในอากาศจะเกิดเป็นสารสีครามหรืออินดิโก (indigo) ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ แต่จะละลายได้ดีในด่าง ดังนั้น ในการก่อกำหม้อสำหรับย้อมผ้าสีครามจึงต้องมีการปรับสภาวะในหม้อนั้นให้สมดุล เช่น ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และปริมาณสารครามในสภาวะที่เหมาะสม สารครามถูกรีดตัวให้เป็นลิวโคอินดิโกซึ่งเป็นสีเหลืองและละลายน้ำได้ โดยลิวโคอินดิโกจะถูกดูดซับและติดที่เส้นใยผ้าและสัมผัสกับอากาศก็จะรวมตัวกับออกซิเจนในอากาศกลายเป็นสีน้ำเงินติดที่เส้นใยผ้า (Padden *et al.*, 1999; Nakajima *et al.*, 2005; ญัฐพร, 2564) โดยเฉพาะการย้อมผ้าของชาวตำบลทุ่งไธ้ง จังหวัดแพร่ ซึ่งเป็นกรรมวิธีเก่าแก่ที่ได้รับการสืบทอดมาจากบรรพบุรุษชาวไทยพวน แต่ในกระบวนการย้อมมีความผันผวนค่อนข้างสูง ส่งผลให้ลักษณะของสีน้ำหม้อมที่ได้ในแต่ละครั้งไม่มีความสม่ำเสมอ ญัฐพร (2564) พบว่า ฤดูกาลและสภาพดินที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ส่งผลต่อปริมาณและคุณภาพของสีหม้อหลังจากการก่อกำหม้อ รวมถึง Teanglum *et al.* (2012) รายงานว่า ทั้งอุณหภูมิ ระยะเวลา รวมถึงค่า pH ล้วนมีอิทธิพลต่อปริมาณของสีอินดิโกในกระบวนการหมัก จึงนำมาซึ่งข้อสังเกตของผู้วิจัยว่า “ในกระบวนการย้อมสีผ้าหม้อหอมนั้นอาจมีได้เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงกระบวนการทางเคมีเพียงอย่างเดียว แต่อาจเกี่ยวเนื่องกับกระบวนการทางชีวเคมีอันเนื่องมาจากการทำงานของ

จุลินทรีย์ด้วย” อีกทั้ง Park *et al.* (2012) พบว่า ในสภาวะค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสม จะมีกลุ่มแบคทีเรียเข้ามาเกี่ยวข้องในกระบวนการหมักสีย้อม ซึ่งมีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงของสีอินดิโก

เพื่อศึกษาการคัดแยก คัดเลือก และจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์จากน้ำก๋อหม้อหอม รวมถึงการระบุชนิดของเชื้อจุลินทรีย์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี 16S rRNA ร่วมกับการศึกษาชนิดของซีเล้าไม่ในการทำน้ำค้าง และชนิดของภาษาที่ใช้ในการก๋อหม้อร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์ที่ส่งผลต่อกระบวนการเปลี่ยนสีอินดิโกเป็นลิวโคอินดิโก เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพต่อคุณภาพของสีย้อมผ้าหม้อหอม และช่วยลดระยะเวลาของขั้นตอนการหมักน้ำก๋อหม้อ ซึ่งเป็นกรรมวิธีที่เป็นคุณประโยชน์จากการไม่สร้างมลพิษที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และดำรงไว้ซึ่งภูมิปัญญาการก๋อหม้อสีย้อมผ้าของชาวไทยพวน ตำบลทุ่งโฮ้ง อำเภอเมือง จังหวัดแพร่

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาบทบาทของจุลินทรีย์ต่อการย้อมผ้าหม้อหอม

การคัดแยก และคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย้อมสีย้อมแบบธรรมชาติ ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนสีอินดิโกไปเป็นลิวโคอินดิโก

นำน้ำก๋อหม้อหอมจากร้านที่ใช้แหล่งที่มาจากบ้านนายสว่าง สีต้อ 9/2 หมู่ 5 บ้านนาคุหา ตำบลสวนเขื่อน อำเภอเมือง จังหวัดแพร่ จำนวน 5 ร้าน คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์เกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) โดยการเจือจางตัวอย่างแบบลำดับ 10 เท่า จากนั้นเติมอินดิโกบลู ที่ pH 7 แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง โดยจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนสีอินดิโกไปเป็นลิวโคอินดิโก จะเจริญเติบโตและสร้างวงใส (Clear zone) จากนั้นแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ก่อนนำไปเก็บรักษา

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนสีอินดิโกในระหว่างกระบวนการย้อมหม้อแบบธรรมชาติด้วยวิธีการส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ทดสอบด้วยวิธี Gram stain คิดค้นโดย Hans Christian Gram นำมาประยุกต์ใช้ในการแยกแบคทีเรีย

เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ Gram negative ใช้ Safranin และ Gram positive ใช้ Gram iodine ในการย้อมสี

การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณลิวโคอินดิโกที่เกิดขึ้นโดยเชื้อจุลินทรีย์

ทดสอบด้วยการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้ออินดิแคนลงในหลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างวงใส (Clear zone) ที่ทำให้บริสุทธิ์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารละลายอิมมูโนตัวโซเดียมไดไทโอไนท์ที่ละลายอยู่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 นอร์มอล ปริมาตรหลอดละ 1 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

การระบุชนิดเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนสีอินดิโกไปเป็นลิวโคอินดิโกโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA

การสกัด DNA ของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกจากชุดสกัด The Gene JET Genomic DNA Purification kit ด้วยวิธี Column-based จากการปั่นเหวี่ยง เพื่อสกัด Genomic DNA จากนั้นตรวจสอบลักษณะของแถบ DNA ที่ได้ ด้วยแผ่น Agarose gel จากเครื่อง Electrophoresis แล้วเพิ่มปริมาณ 16S rRNA โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ (DNA purification) โดยตัดแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR นำมาสกัดด้วยวิธี Column-based เพื่อส่ง Purified PCR product ของ 16S rRNA ไปศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี DNA sequencing เพื่อวินิจฉัยเชื้อจุลินทรีย์จากการเปรียบเทียบลำดับเบสในฐานข้อมูลของ Gen Bank (National Center for biotechnology information (NCBI)) โดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLASTN)

การศึกษาชนิดของภาษาที่ใช้ในการก๋อหม้อหอม

เลือกภาษาตัวอย่าง จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ โองเคลือบ กระถางเคลือบ กระถางดินเผา และบ่อปูนเปลือย ในการก๋อหม้อหอม เพื่อวัดปริมาณค่า Leuco-indigo จากภาษาหม้อแต่ละชนิด โดยวิธี Spectrophotometric determination ด้วย Ethyl acetate method

การศึกษาคุณภาพของชนิดเชื้อที่เลือกที่เหมาะสมต่อการก่อหม้อห้อม

เลือกตัวอย่างเชื้อจากไม้ 7 ชนิด ได้แก่ กัลลวย เพกา มะขาม ไม้ มะพร้าว มะละกอ และยูคาลิปตัส เทียบกับเชื้อไม้รวม (ชุดควบคุม) โดยการแช่น้ำทิ้งไว้ 4-5 ชั่วโมง แล้วจึงตรวจสอบค่า pH ก่อนนำน้ำต้งไปใช้ เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลค่า Leuco-indigo และคุณภาพของสีย้อม ด้วยเครื่อง Hunter Lab จากน้ำต้งเชื้อแต่ละชนิด

ผลการวิจัยและวิจารณ์

การศึกษาทบทางของจุลินทรีย์ต่อการย้อมผ้าหม้อห้อม

การคัดเลือก และคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย้อมสีห้อมแบบธรรมชาติ ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนสีอินดิโกไปเป็นลิวโคอินดิโก

เลือกตัวอย่างน้ำก่หม้อจากร้านแก้ววรรณ (KW) ร้านผ้าธรรมชาติ (TC) ร้านโฮงฮ้อม (HH) ร้านป่าเหลือง (PL) และร้านป่าเห้งยม (PG) ซึ่งเป็นร้านที่มีแหล่งที่มาจากบ้านนายสว่าง สีต้อ เท่านั้น



Figure 1 The samples of microorganisms isolated from Hom's natural dye

น้ำก่หม้อจาก 5 ร้านค้า สามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียได้ 95 ไอโซเลท ประกอบด้วย ร้านแก้ววรรณ 19 ไอโซเลท ร้านผ้าธรรมชาติ 24 ไอโซเลท

ร้านโฮงฮ้อม 17 ไอโซเลท ร้านป่าเหลือง 12 ไอโซเลท และร้านป่าเห้งยม 23 ไอโซเลท

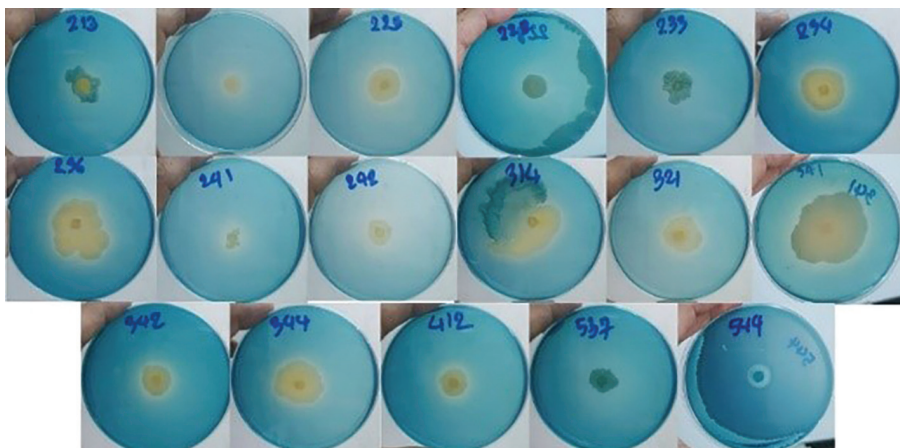


Figure 2 The samples of microorganisms able to change Indigo blue to Leuco-indigo and create clear zone on PDA

จากการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียทั้งหมด 95 ไอโซเลท สามารถคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนสีอินดิโกไปเป็นลิวโคอินดิโก ได้ 17 ไอโซเลท คือ ร้านผ้าธรรมชาติ 9 ไอโซเลท ได้แก่ TC213 TC224 TC225 TC228 TC233 TC234 TC236 TC241 และ TC242 ร้านโฮงฮ้อม 5 ไอโซเลท ได้แก่ HH314 HH321 HH341 HH342 และ HH344 ร้านป่าเหลือง 1 ไอโซเลท ได้แก่ PL412 ร้านป่าเหียงยม 2 ไอโซเลท ได้แก่ PG537 และ PG544 แต่ร้านแก้ววรรณไม่พบเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเปลี่ยนสีอินดิโกไปเป็นลิวโคอินดิโก

การศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนสีอินดิโกในระหว่างกระบวนการย้อมหม้อมแบบธรรมชาติด้วยวิธีการส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 17 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนสีอินดิโก ด้วยการส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากเชื้อจุลินทรีย์ที่ถูกคัดแยกและทำให้บริสุทธิ์เพื่อการย้อมติดสีแกรม สามารถจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ กลุ่มแบคทีเรียแกรมลบได้ 9 ไอโซเลท และกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกได้ 8 ไอโซเลท (Table 1)

Table 1 Configuration of microorganism colony with Gram stain technique

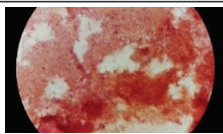
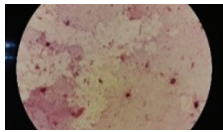
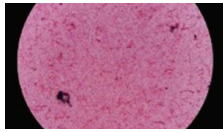
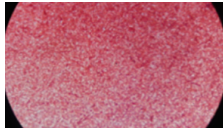
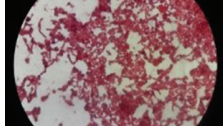
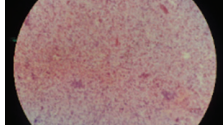
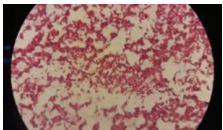
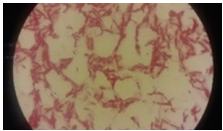
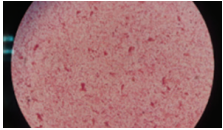
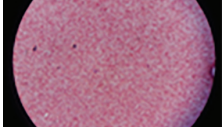
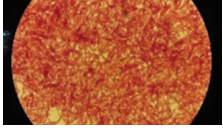
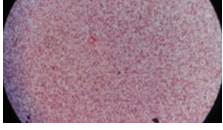
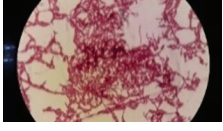
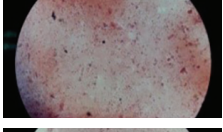
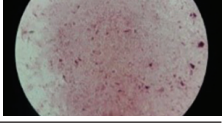
Isolate's Code	Configuration of colony	Configuration of microorganism	Sight under microscope at 1000X
TC213	Small Colonies, White Pigment, Round Entire Opaque	Short and small Gram-positive	
TC224	Small Colonies, Yellow Pigment, Entire Translucent	Short and small Gram-positive	
TC225	Irregular Flat	Short and small Gram-negative	
TC228	Small Colonies, Irregular Flat	Short Gram-negative	
TC233	Irregular Flat Opaque	Round Gram-positive	
TC234	Small Colonies, Opaque	Short and small Gram-negative	
TC236	Small Colonies, White Pigment, Round Entire Opaque	Short and small Gram-negative	

Table 1 Configuration of microorganism colony with Gram stain technique (Cont.)

Isolate's Code	Configuration of colony	Configuration of microorganism	Sight under microscope at 1000X
TC241	Irregular Opaque	Short and small Gram-positive	
TC242	White Pigment, Round Entire Opaque	Long and small Gram-positive	
HH314	Large Colonies, Irregular Opaque	Round and small Gram-negative	
HH321	Large Colonies, Irregular Glistening	Round and small Gram-negative	
HH34	Small Colonies, Round Entire	Large and long Gram-negative	
HH342	Small Colonies, White Pigment, Round Entire Opaque	Short and small Gram-negative	
HH344	Round Entire Opaque	Long Gram-positive	
PL412	White Pigment, Round Entire Opaque	Short and small Gram-positive	
PG537	Small Colonies, Yellow Pigment, Round Entire Opaque	Round and small Gram-positive	
PG544	Small Colonies, Yellow Pigment, Round Entire Glistening	Round and small Gram-negative	

การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณลิวโคอินดิโกที่สร้างขึ้นโดยเชื้อจุลินทรีย์

จากการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ ทั้ง 17 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนสีอินดิโกเป็นลิวโคอินดิโก พบว่า TC228 มีปริมาณลิวโคอินดิโกมากที่สุด รองลงมา คือ TC236 และ TC213 โดยมีปริมาณลิวโคอินดิโกที่ 9.5688 6.2704 และ 5.7343 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (Table 2)

Table 2 The quantity of Leuco-indigo created by Hom's dye microorganisms

Isolate's Code	Quantity of Leuco-indigo (µg/ml)
TC213	5.7343
TC224	4.9068
TC225	5.4196
TC228	9.5688
TC233	3.8228
TC234	5.1981
TC236	6.2704
TC241	5.2797
TC242	3.5664
HH314	5.2564
HH321	4.4755
HH341	3.4755
HH342	3.3100
HH344	4.9883
PL412	4.1725
PG537	5.1282
PG544	4.6737

ระบุชนิดเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนสีอินดิโกไปเป็นลิวโคอินดิโกโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA

วินิจฉัยลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธี DNA sequencing จากดีเอ็นเอของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้บริสุทธิ์ (DNA purification) โดยเปรียบเทียบลำดับเบสในฐานข้อมูล

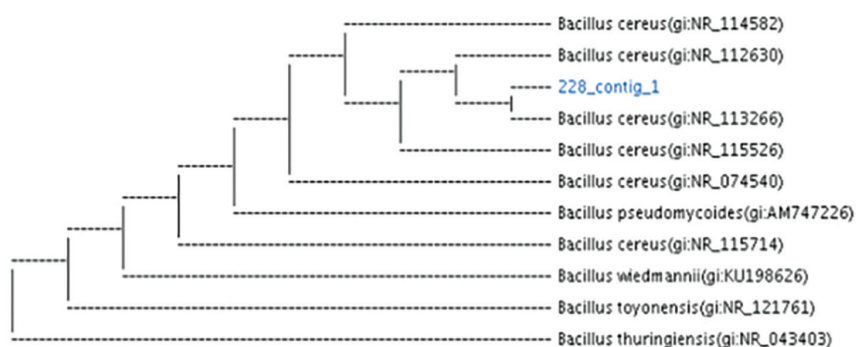


Figure 3 Phylogenetic tree of 16S rRNA sequence of isolate TC228

สามารถระบุชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ TC228 ในฐานข้อมูลซึ่งมีความใกล้เคียงกับ *Bacillus cereus* NR_115714.1 ที่ความยาว 1535 bp. มีความเหมือน เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์

เพื่อพิสูจน์ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนสีอินดิโกไปเป็นลิวโคอินดิโกของเชื้อจุลินทรีย์ TC228 พบว่า มีการสร้างลิวโคอินดิโกได้สูงถึง 157.080 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีหัวเชื้อจุลินทรีย์ แม้ในสภาวะที่ค่า pH ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ในส่วนของคุณภาพสี โดยตัวอย่างน้ำก๋อหม้อที่มีหัวเชื้อจุลินทรีย์ให้ค่า L^* a^* และ b^* ที่ต่ำที่สุด คือ 1.030 -0.023 และ 0.367 ตามลำดับ แสดงถึงคุณภาพสีที่มีความเข้ม รวมถึงความเป็นสีน้ำเงิน และเขียว ที่มากกว่าเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่หัวเชื้อจุลินทรีย์ในการก๋อหม้อห่อหมก (Table 3)

Table 3 Effect of TC228 on pH value, color quality and Leuco-indigo quantity

Treatment	pH	Leuco-indigo	L* a* and b*		
			L*	a*	b*
Control (Without TC228)	10.835 ^a	93.680 ^b	23.453 ^a	-4.603 ^b	-6.310 ^b
TC228 Supplement	10.593 ^a	157.080 ^a	1.030 ^b	-0.023 ^a	0.367 ^a
F-test	*	*	*	*	*

Remarks: The English letter superscripted after the figures shows the vertical comparison among the study areas.

การศึกษานิตของภาชนะที่ใช้ในการก๋อหม้อห่อหมก

สภาพแวดล้อมนับเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีความสำคัญต่อกระบวนการก๋อหม้อ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ TC228 พบว่า ในภาชนะกระถางดินเผา มีการสร้างลิวโคอินดิโกสูงที่สุด คือ 85.443 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แม้ในสภาวะที่ค่า pH ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Table 4)

Table 4 Effect of different containers used in Hom's natural dye process to pH value, color quality and Leuco-indigo quantity

Treatment	Before processing				After processing			
	Temp.	pH	Temp.	pH	Leuco-indigo	L*	a*	b*
Coated jar	24.5 ^a	10.902 ^a	22 ^a	10.920 ^a	75.315 ^a	2.52 ^a	-5.55 ^a	-6.747 ^a
Coated pot	24 ^a	10.835 ^a	23 ^a	10.895 ^a	65.221 ^a	2.053 ^a	-5.68 ^a	-7.813 ^a
Clay pot	23 ^a	10.935 ^a	21 ^a	11.087 ^a	85.443 ^a	2.97 ^a	-4.83 ^a	-6.54 ^a
Cement pot	21.5 ^a	10.813 ^a	25 ^a	10.537 ^a	65.594 ^a	2.383 ^a	-5.79 ^a	-7.69 ^a
Buried Coated pot	23 ^a	11.107 ^a	22 ^a	11.043 ^a	77.733 ^a	2.753 ^a	-4.453 ^a	-8.327 ^a
Buried Clay pot	22 ^a	10.888 ^a	22 ^a	10.297 ^a	59.301 ^a	2.803 ^a	-5.363 ^a	-6.333 ^a
F-test	ns							

Remarks: The English letter superscripted after the figures shows the vertical comparison among the study areas.



Figure 4 Color quality of Hom's natural dye with Hunter lab system

อีกทั้งน้ำก่หม้อห้อมที่ได้จากกระถางดินเผาให้ค่าที่บ่งบอกถึงคุณภาพสี L^* a^* และ b^* เท่ากับ 2.97 -4.83 และ -6.54 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เมื่อวิเคราะห์ภาพขณะตัวอย่างทั้ง 6 ทริตเมนต์ ที่ใช้ในการทดสอบ พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

การศึกษาคุณภาพของชนิดขี้เถ้าที่เหมาะสมต่อการก่หม้อห้อม

ในกระบวนการก่หม้อห้อม น้ำด่างจากขี้เถ้าเป็นปัจจัยหลักในการปรับสมดุลค่า pH ให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมต่อเชื้อจุลินทรีย์ TC228 พบว่า น้ำด่างจากขี้เถ้าไม่รวม ให้ประสิทธิภาพการเปลี่ยนเป็นลิวโคอินดิโกสูงที่สุด คือ 157.08 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แม้ในสภาวะที่ค่า pH ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ อีกทั้งน้ำก่หม้อที่ใช้น้ำด่างจากขี้เถ้าไม่รวม ให้ค่าคุณภาพสี L^* a^* และ b^* เท่ากับ 1.030 -0.023 และ -0.367 ตามลำดับ (Table 5)

Table 5 Effect of lye from filtered wood ash used in Hom's natural dye process on pH value, color quality and Leuco-indigo quantity

Treatment	pH	Leuco-indigo	L* a* and b*		
			L*	a*	b*
Control (Mixed ashes)	10.593	157.080 ^a	1.030 ^b	-0.023 ^b	0.367 ^d
Banana trees ash	11.487	149.540 ^a	14.157 ^d	-1.640 ^a	-2.147 ^b
Banana stalks ash	11.707	142.860 ^b	0.783 ^a	0.447 ^c	0.013 ^e
Banana Leaves ash	11.090	134.980 ^d	0.600 ^a	0.987 ^d	-1.007 ^c
<i>Oroxylum indicum</i> ash	10.647	121.000 ^e	0.450 ^a	0.727 ^d	0.283 ^d
Tamarind trees ash	11.160	140.020 ^c	0.507 ^a	0.233 ^c	-1.237 ^c
Tamarind Leaves ash	10.570	107.690 ^f	0.970 ^b	0.390 ^c	0.137 ^d
Bamboo ash	10.863	105.870 ^f	1.797 ^c	0.407 ^c	-3.840 ^a
Coconut shell ash	11.027	142.000 ^b	1.057 ^b	-0.993 ^b	0.470 ^e
Papaya ash	11.003	136.340 ^d	0.797 ^a	0.693 ^d	-0.747 ^d
Eucalyptus ash	10.747	139.450 ^c	0.300 ^a	0.987 ^d	-0.660 ^d
F-test		*	*	*	*

Remarks: The English letter superscripted after the figures shows the vertical comparison among the study areas.

การศึกษาในครั้งนี้พบว่าในน้ำก๋อหม้อหอมแบบธรรมชาติ จากร้านค้าตัวอย่าง 5 ร้านค้า พบเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสิ้น 95 ไอโซเลท แต่มีเพียง 17 ไอโซเลท ที่สามารถเปลี่ยนสีอินดิโกไปเป็นลิวโคอินดิโก โดยการเจริญเติบโตและสร้างวงใส (Clear zone) สนิช (2483) พบว่า สารลิวโคอินดิโกไม่มีสี ละลายน้ำดี สามารถแทรกซึมและเกาะติดในเนื้อผ้า หลังการย้อมเมื่อผ้าสัมผัสกับออกซิเจน จะถูกออกซิไดซ์กลับไปเป็นสีน้ำเงิน ซึ่งไอโซเลท TC228 ที่แยกได้จากร้านผ้าธรรมชาติ (TC) มีปริมาณลิวโคอินดิโกสูงที่สุด คือ 9.5688 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งสามารถระบุชนิด พบว่า มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus cereus* NR_115714.1 ซึ่งแตกต่างจาก Park *et al.* (2012) ที่ได้ทำการทดลองและตรวจสอบ พบว่า เป็นแบคทีเรีย *Alkalibacterium* sp. และ *Pseudomonas* sp. รวมถึงศูนย์คราม (2560) รายงานว่า พบแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus alkaliphylus* จากธรรมชาติในกระบวนการก๋อหม้อ นอกจากนั้น Padden *et al.* (1999) พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium isatidis* sp. Nov. มีความสามารถในการผลิตลิวโคอินดิโกได้เช่นกัน ในสภาวะที่เหมาะสมของค่า pH อยู่ระหว่าง 10-13 ซึ่งในสภาวะที่เป็นด่างสูง (pH > 10) สีอินดิโกจะถูกเปลี่ยนเป็นลิวโคอินดิโกซึ่งสามารถซึมผ่านเข้าไปในผ้าได้ (Yumoto *et al.*, 2004) ร่วมกับสภาพแวดล้อมดินเผาสามารถเปลี่ยนเป็นลิวโคอินดิโกสูงถึง 85.443 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่ง นิตยา (2544) กล่าวว่า ภาชนะที่ใช้หมักจะต้องเป็นถึงที่มีฝาปิดสนิท รวมถึงอุณหภูมิและกัญญาณัตน์ (2556) กล่าวว่า ภาชนะที่ใช้หมักสามารถเป็นหม้อหรือโอ่งก็ได้ นอกจากนั้นน้ำต่างจากข้า้เถาไม่รวมสามารถให้ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนเป็นลิวโคอินดิโกได้สูงที่สุด คือ 157.08 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สนิชลักษณ์ (2487) นำพืชเนื้ออ่อนมาผึ่งแดดให้หมาดแล้วเผาจนเป็นเถาสีขาว นำมาใส่อ่างที่มีน้ำและกวนให้ทั่ว ก่อนตั้งทิ้งไว้ 4-5 ชั่วโมง นำน้ำที่ได้ไปกรองให้สะอาดจึงจะนำไปใช้งานได้ อีกทั้งคุณภาพของสีผ้าที่ได้จากการย้อมต่อผลค่า L^* , a^* และ b^* ซึ่งเป็นค่าการบ่งบอกประสิทธิภาพการให้สี สามารถบ่งบอกถึงความคงทนในการย้อมสีของสีต่อสภาวะต่าง ๆ ได้ ญัฐพร (2564) กล่าวว่า ค่า L^* (ค่าความสว่าง) ยิ่งต่ำ สีของหม้อจริงจะมีความเข้มมาก ค่า a^* โดยค่าบวกจะให้เป็นสีแดง แต่ค่าลบจะให้เป็นสีเขียว และค่า b^* โดยค่าบวกจะให้เป็นสีเหลือง แต่ค่าลบจะให้เป็นสีน้ำเงิน ด้วยองค์ความรู้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการลด

กระบวนการผลิตผ้าหม้อหอมให้ใช้ระยะเวลาสั้นลง การช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและควบคุมคุณภาพของผ้าหม้อหอมให้ได้มาตรฐานในแต่ละรอบการผลิต ทั้งความคงที่ในการติดสี และการควบคุมระดับของสีในแต่ละครั้งของการย้อม โดยสามารถพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์หม้อผง หรือชุด Kit ย้อมสีสำเร็จรูป เพื่อให้เป็นการสร้างมูลค่าทางเศรษฐกิจต่อสังคม รวมถึงการใช้ทรัพยากรสิ่งแวดล้อมที่มีอยู่อย่างจำกัดให้เกิดประโยชน์สูงสุดและเกิดการพัฒนาอย่างยั่งยืน

สรุปผลการวิจัย

จากการวิจัยการแยก คัดเลือก และจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ นำไปสู่การค้นพบ *Bacillus cereus* NR_115714.1 ให้ประสิทธิภาพการเปลี่ยนสีลิวโคอินดิโกในน้ำก๋อหม้อที่ดีที่สุด ร่วมกับภาชนะกระถางดินเผา และน้ำต่างจากข้า้เถาไม่รวม สามารถให้ประสิทธิภาพในการก๋อหม้อหอมได้ดีที่สุด ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้จะสร้างคุณประโยชน์จากการนำองค์ความรู้ทางชีววัฒนธรรมไปประยุกต์ใช้ ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่มีบทบาทที่สำคัญต่อกระบวนการก๋อหม้อหอม โดยช่วยส่งเสริมคุณภาพสีย้อม รวมถึงสามารถควบคุมคุณภาพสีให้มีความสม่ำเสมอ และการลดระยะเวลาในการก๋อหม้อ ส่งผลให้ผู้ประกอบการหันกลับมาส่งเสริมกระบวนการก๋อหม้อหอมด้วยวิถีธรรมชาติแบบดั้งเดิมร่วมกับชีววัฒนธรรมการใช้จุลินทรีย์เป็นหัวเชื้อบริสุทธิ์ร่วมในการก๋อหม้อ โดยปราศจากการใช้สารเคมีดำรงไว้ซึ่งความเป็นอัตลักษณ์ของชาวตำบลทุ่งไธ้ง อำเภอเมือง จังหวัดแพร่ อย่างยั่งยืนสืบไป

เอกสารอ้างอิง

- ญัฐพร จันทรฉาย. 2564. หม้อหอมแพร่ย้อมธรรมชาติเชิงพาณิชย์. สมาร์ท โคตติง แอนด์ เซอร์วิส, เชียงใหม่.
- นิตยา ชะนะญาติ. 2544. การพัฒนาการสักรินดิโกจากครามและอ้อมเพื่อใช้ในการย้อมสีธรรมชาติ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ศูนย์คราม. 2560. สีครามราชแห่งสีย้อมธรรมชาติ. ศูนย์คราม, มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร.
- สนิช ม. สีนาคโยธารักษ์. 2483. การทำสีน้ำเงินผงจากครามและการย้อมผ้าด้วยคราม. วิทยาศาสตร์ 5(4): 330-334.

- อุดมวิทย์ ไวยาการ และกัญญรัตน์ จำปาทอง. 2556. หม้อห้อม (ม่อฮ่อม) อีกหนึ่งภูมิปัญญาไทย. หนังสือพิมพ์กสิกร 86(1): 11-16.
- Nakajima, K., K. Hirota, Y. Nodasaka and I. Yumoto. 2005. *Alkalibacterium ibriense* sp. Nov., and obligate alkaliphile that reduce an indigo dye. International journal of systematic and evolutionary microbiology 55(4): 1525-1530. Available: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63487-0>.
- Padden, A.N., V.M. Dillon, J. Edmonds, M.D. Collins, N. Alvarez and P. John. 1999. An indigo-reducing moderate thermophile from a woad vat, *Clostridium isatidis* sp. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 49(3): 1025-1031. Available: <https://doi.org/10.1099/00207713-49-3-1025>.
- Park, S., Y.J. Ryu, J. Seo and G.H. Hur. 2012. Isolation and Characterization of Alkaliphilic and thermotolerant bacteria that reduce insoluble indigo to soluble leuco-indigo from indigo dye vat. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 55: 83-88.
- Teanglum, A., S. Teanglum and A. Saithong. 2012. Selection of Indigo Plant Varieties and Other Plants that Yield Indigo Dye. *Procedia Engineering* 32: 184-190. Available: <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.01.1255>.
- Yumoto, I., K. Hirota, Y. Nodasaka, Y. Yokota, T. Hoshino and K. Nakajima. 2004. *Alkalibacterium psychrotolerans* sp. Nov., a psychrotolerant obligate alkaliphile that reduces an indigo dye. International journal of systematic and evolutionary microbiology 54(6): 2379-2583. Available: [doi:10.1099/ijs.0.63130-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.63130-0).