

จลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาหมักใบคราม

ดร.ไพศาล คงคาฉุยฉาย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สกวรัตน์ หิรัญกิจมงคล

นิสิตปริญญาโท

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ดร.อรุณศิริ ชิตางกูร

อาจารย์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

จลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักใบคราม เพื่อใช้สังเคราะห์สีครามธรรมชาติ ถูกศึกษาโดยนำใบครามที่ผ่านการแช่แข็งไปหมักในน้ำกลั่น ที่อุณหภูมิ 30 °C, 40 °C และ 50 °C จนเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ระหว่างการหมัก สารประกอบอินดิแคน (indican) ในใบครามถูกเปลี่ยนเป็นสารประกอบอินดอกซิล (indoxyl) ซึ่งเมื่อออกซิไดซ์จะได้ผงสีครามหรืออินดิโก (indigo) ตกตะกอนแยกจากน้ำหมัก ปริมาณอินดิโกที่ได้ ณ เวลาใดๆ วัดได้ด้วยเครื่องยูวี-วิส-สเปกโตรโฟโตปฏิกิริยาการเกิดอินดอกซิลเป็นปฏิกิริยาดูดความร้อนมีอันดับปฏิกิริยาเท่ากับ 0.37 เมตร ซึ่งสามารถใช้คำนวณปริมาณอินดอกซิลที่เกิดจากการหมักได้ ผลการศึกษาพบว่า มีสมการค่าคงที่อัตราเร็ว คือ $k(h^{-1}) = (3.42 \times 10^{11} h^{-1}) e^{8840.5/T}$ และมีค่าพลังงานกระตุ้นของการเกิดปฏิกิริยา (E_a) เท่ากับ 17.6 กิโลแคลอรี/โมล

Kinetics of Fermentation of *Indigofera tinctoria*

Paisan Kongkachuichay

Assistant Professor

Department of Chemical Engineering

Kasetsart University

Skowrath Hirunkitmonkon

Master Student

Department of Chemical Engineering

Kasetsart University

Arunsiri Chitangkoon

Lecturer

Department of Chemistry

Chulalongkorn University

Abstract

The kinetics of fermentation of *Indigofera tinctoria* was studied in order to synthesize indigo, a natural blue dye. At first, the mature leaves were frozen to preserve the precursor and then fermented with distilled water. The fermentation was conducted at 3 varied temperatures of 30 40 and 50°C until the reaction was completed. During the fermentation, indican in leaves was changed to indoxyl, which then was oxidized to indigo. Subsequently, the amount of obtained indigo was measured by using UV-visible spectrophotometer. The results show that the reaction of indoxyl formation is endothermic reaction and has the order of 0.37. The equation of rate constant is $k(h^{-1}) = (3.42 \times 10^{11} h^{-1}) e^{8840.5/T}$ and the activation energy (E_a) is 17.6 kcal/mol.

บทนำ

สีครามหรือสีอินดิโก (CI Natural Blue 1)[1] เป็นสีที่ได้จากต้นคราม ซึ่งเป็นไม้พุ่ม ขนาดย่อม ต้นสูงไม่เกิน 4 ฟุต ใบเล็กกลมโต ดอกคล้ายดอกถั่วสีม่วง มีฝักเล็กๆ ยาวประมาณ 2 เซนติเมตร มีเมล็ดภายในคล้ายฝักถั่วเขียว[2] ขึ้นทั่วไปในเขตทวีปเอเชีย อเมริกากลาง บราซิล และยุโรป ในประเทศไทยพบมากในภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ [3] มีต้นครามไม่น้อยกว่า 24 พันธุ์ แต่มีอยู่ 2 พันธุ์ที่นิยมนำมาทำสีครามคือ *Indigofera tinctoria* Linn. และ *Indigofera suffruticosa* Mill.[4] สีคราม (indigo blue) ได้จากการนำเอาต้นครามมาแช่ในน้ำที่อุณหภูมิห้อง[5] หรือในน้ำอุ่น[2,3] จนกระทั่งเกิดการหมัก ในระหว่างการหมักจะเกิดการสลายตัวด้วยน้ำ (hydrolysis) ของอินดิแคน (indican) ที่อยู่ในต้นและใบครามโดยเอนไซม์ จากนั้นแยกเอากากของต้นครามออก และเติมอากาศเข้าไปในน้ำที่ได้จากการหมักโดยการตีให้เป็นฟองเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันระหว่างน้ำหมักกับอากาศ ในช่วงนี้สีของน้ำหมักจะเปลี่ยนจากสีเขียวเหลืองเป็นสีน้ำเงิน น้ำสีเขียวเหลืองเป็นสารประกอบระหว่างกลูโคสและอินดอกซิล (indoxyl)[6] หลังจากเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันแล้วจะได้อินดิโกตกตะกอนอยู่ก้นถังหมัก สีอินดิโกที่ได้มีปริมาณ 1.5–2.0 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักต้นครามสด[7] แปรตามพื้นที่ และพันธุ์ที่ปลูก

สีอินดิโกเป็นสีแวท (vat dye)[6,8] ไม่ละลายน้ำต้องนำไปรีดิวซ์ในสภาพที่เป็นด่างจึงจะใช้ย้อมสีได้ สีอินดิโกเป็นสีที่เก่าแก่มาที่สุด มีหลักฐานการนำมาใช้ไม่น้อยกว่า 4,000 ปีมาแล้ว[3,6] แต่พบว่ายังไม่มีการศึกษาเรื่องเกี่ยวกับอัตราการเกิดปฏิกิริยาของกระบวนการหมักครามเพื่อให้ได้สี ดังนั้น ในบทความฉบับนี้จึงได้ทำการศึกษาปฏิกิริยาการหมักเพื่อที่จะหาอัตราการเกิดของปฏิกิริยาหลัก ค่าคงที่ของปฏิกิริยา อันดับของปฏิกิริยา และพลังงานกระตุ้นของการเกิดปฏิกิริยา เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการออกแบบเครื่องหมักและควบคุมการหมักต่อไป

การทดลอง

วัตถุดิบและสารเคมี

ต้นครามที่ใช้ในการทดลองเป็นพันธุ์ *Indigofera tinctoria* Linn. ได้เมล็ดพันธุ์จาก สถานีวิจัยหม่อนไหมลำตะคอง จ.นครราชสีมา นำมาปลูกที่มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน จ.นครปฐม ปลูกจนต้นโตประมาณ 3 ฟุต จึงเลือกเก็บเฉพาะใบแก่ (สีเขียวเข้ม) มา ใช้หมัก นอกจากนี้ใช้สื่อนิติโกสังเคราะห์ (บริสุทธิ์ 98%, บริษัท Fluka) เป็นสารเทียบความเข้มข้น $NaOH$ เป็นสารปรับสภาพให้เป็นด่างและ $Na_2S_2O_4$ เป็นตัวรีดิวซ์

การสร้างกราฟมาตรฐาน

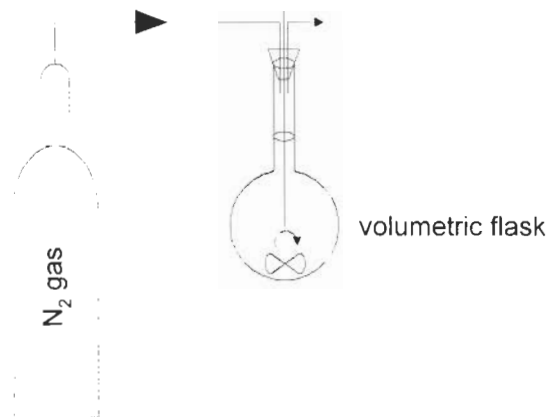
ในการทดลองนี้วัดความเข้มข้นของอินดิโกที่ได้จากการหมักโดยทางอ้อมคือ วัดค่า การดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารละลายอินดิโกที่ถูกรีดิวซ์ในด่างด้วยเครื่อง UV-vis. Spectrophotometer แล้วนำไปหาความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจากค่าการดูด กลืนแสงกับความเข้มข้นของอินดิโกสังเคราะห์ การสร้างกราฟมาตรฐานเริ่มจากหา λ_{max} ของ แสงที่ทำให้สารละลายดูดกลืนแสงสูงสุด จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานที่ มีความเข้มข้นต่างๆ เตรียมจากการรีดิวซ์อินดิโกสังเคราะห์ด้วย $Na_2S_2O_4$ และปรับสภาพน้ำให้ เป็นด่างด้วย $NaOH$ จากการทดลองเบื้องต้นพบว่า ปริมาณตัวรีดิวซ์และด่างที่พอดีกับปริมาณ อินดิโกคือ 1:135:135 โดยน้ำหนักของ อินดิโก : $NaOH$: $Na_2S_2O_4$ แต่เนื่องจากอินดิโกใน รูปรีดิวซ์ถูกออกซิไดซ์กลับเป็นรูปที่ไม่ละลายน้ำได้เร็วมาก จึงใช้ปริมาณตัวรีดิวซ์และด่างให้มาก เกินพอ คือ 1:250:250 โดยน้ำหนักของ อินดิโก : $NaOH$: $Na_2S_2O_4$ ใช้เวลารีดิวซ์ 60 นาที นอกจากนั้นยังป้องกันโดยการรีดิวซ์ในขวดวัดปริมาตรภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนดังรูป ที่ 1 จากข้อมูลที่ได้นำไปสร้างกราฟมาตรฐาน

การศึกษาจลนพลศาสตร์ของการหมักใบคราม

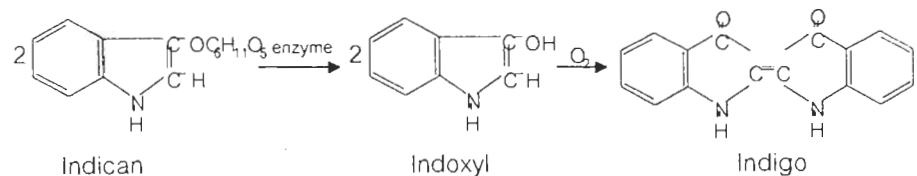
เนื่องจากต้องหมักใบครามด้วยเวลาที่ต่างกันคือ ตั้งแต่ 30 นาทีจนถึง 18 ชั่วโมง และต้องนำใบครามมาจากวิทยาเขตกำแพงแสนซึ่งไกลจากสถานที่ทดลองที่บางเขนมาก จึง เก็บใบครามสดมาครวระหลายๆ แล้วนำมาแช่แข็งไว้ เพื่อกันไม่ให้สารตั้งต้น (อินดิแคน) สลาย

ตัวและควบคุมสภาพของใบครามให้เหมือนกันในทุกการทดลอง จากการทดลองเบื้องต้นพบว่า ใบสดกับใบแช่แข็งให้ผลเหมือนกัน

ทำการหมักใบครามด้วยน้ำกลั่นในบีกเกอร์ที่ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 30 40 และ 50°C โดยวางไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ใช้เวลาหมักตั้งแต่ 30 นาทีจนการหมักสมบูรณ์ วัดปริมาณอินดอกซิลที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาต่างๆ โดยนำน้ำหมักไปกรองแยกกากออก แล้วพ่นพองอากาศเข้าไปในน้ำหมักเพื่อออกซิไดซ์อินดอกซิลเป็นอินดิโก ทำการรีดิวซ์อินดิโกที่ได้ตามวิธีที่กล่าวมาข้างต้น แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยการใช้กราฟมาตรฐานที่ทำขึ้นจะทราบค่าความเข้มข้นของอินดิโกที่ได้จากการหมักแต่ละครั้ง ซึ่งก็จะทราบค่าความเข้มข้นของอินดอกซิลจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นต่อเนื่องดังนี้[6]



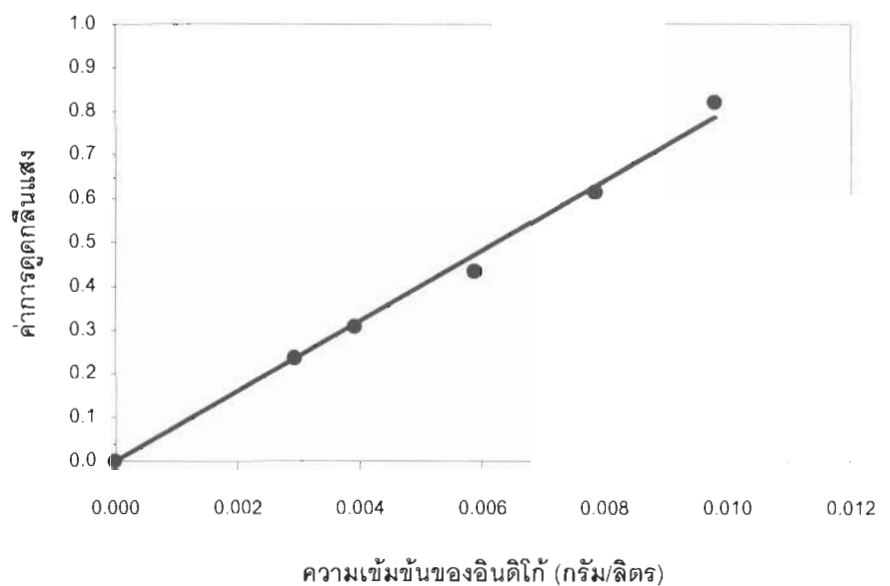
รูปที่ 1 อุปกรณ์ที่ใช้ในรีดิวซ์อินดิโก



ปฏิกิริยาแรกเป็นการเปลี่ยนสารอินดิแคนในใบครามเป็นอินดอกซิล เป็นปฏิกิริยาหลักที่ต้องการศึกษาจนพบศาสตร์ ส่วนปฏิกิริยาที่สองเป็นปฏิกิริยาออกซิเดชันอินดอกซิลได้อินดิโกที่ไม่ละลายน้ำ ดังนั้น ปริมาณอิน-ดอกซิลที่เกิดจะเป็นสองเท่าของอินดิโกที่วัดได้

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการวัดค่าความยาวคลื่นของสารละลายรีดิคซ์พบว่า ที่ค่าความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด จึงใช้ค่านี้ในการวัดตลอดการทดลอง กราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นแสดงไว้ในรูปที่ 2 โดยเลือกช่วงข้อมูลที่มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงเพื่อความแม่นยำในการวัดผลการวัดปริมาณสีที่เกิดขึ้นเมื่อใช้อุณหภูมิการหมักที่แตกต่างกัน คือ 30 40 และ 50°C พบว่า เวลาที่ใช้ในการหมักเพื่อให้ได้ปริมาณสีสูงสุดมีค่าลดลงคือ 18 15 และ 9.30 ชั่วโมงตามลำดับ แสดงว่าปฏิกิริยาการเกิดอินโดกซิลเป็นแบบดูดความร้อน (endothermic reaction) ความร้อนที่เพิ่มขึ้นจึงช่วยเร่งให้ปฏิกิริยาเกิดเร็วขึ้น



รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายรีดิคซ์อินดิโก

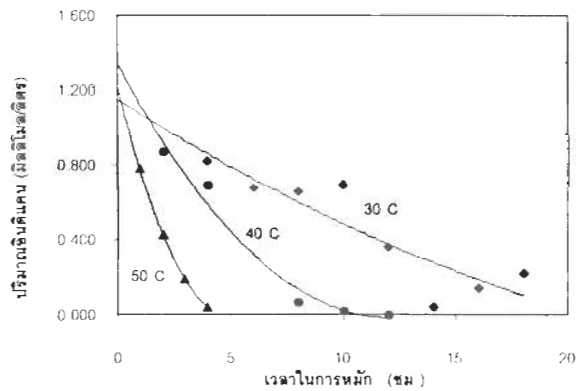
จากปริมาณอินดิโกที่วัดได้สามารถคำนวณหาปริมาณอินดิแคนที่หายไปเนื่องจากปฏิกิริยาการหมักที่เวลาใดๆ ดังแสดงในรูปที่ 3 จากรูปเมื่อหาค่าความชันของเส้นกราฟแต่ละ

อุณหภูมิจะได้อัตราการหายไปของอินดิแคน ($-r_{indican}$) เขียนสมการอัตราเร็วปฏิกิริยาให้อยู่ในรูปทั่วไปดังนี้

$$-r_{indican} = -\frac{dC_{indican}}{dt} = kC_{indican}^{\alpha} \quad (1)$$

และ

$$\ln(-r_{indican}) = \ln k + \alpha \ln C_{indican} \quad (2)$$



รูปที่ 3 การเปลี่ยนแปลงอินดิแคนระหว่างการหมัก

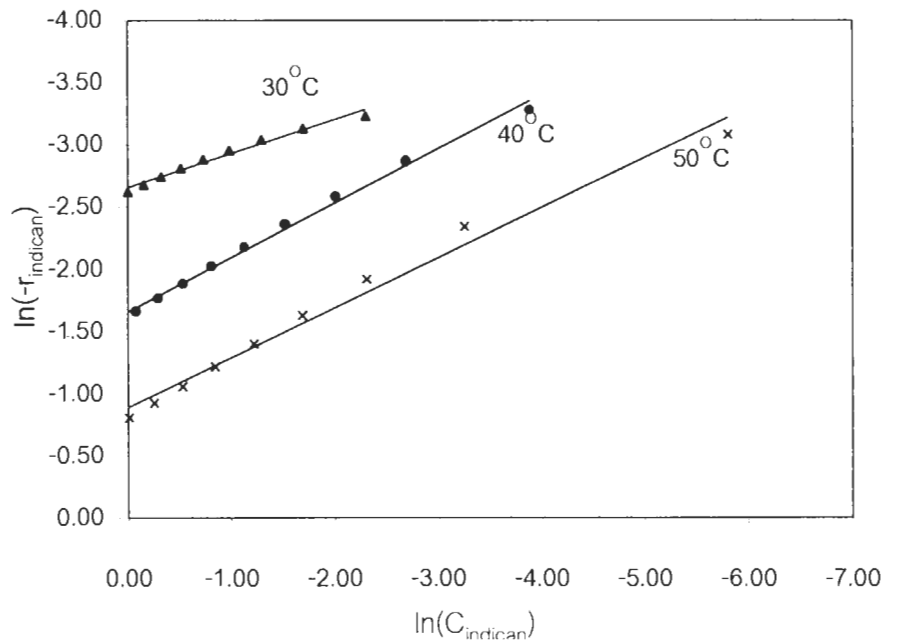
จากข้อมูลระหว่าง $-r_{indican}$ กับความเข้มข้นของอินดิแคน ($C_{indican}$) ที่สอดคล้องกัน จากสมการที่ (2) เมื่อพล็อต $\ln(-r_{indican})$ กับ $\ln(C_{indican})$ จะได้กราฟดังรูปที่ 4 ความชันของกราฟคือ อันดับของปฏิกิริยา (order of reaction, α) เมื่อเฉลี่ยค่าที่ได้จาก 3 อุณหภูมิพบว่า α มีค่าเท่ากับ 0.37 และจุดตัดแกน y คือ ค่าคงที่อัตราเร็ว (rate constant, k) ที่อุณหภูมิต่างๆ ซึ่งสรุปไว้ในตารางที่ 1 จากกฎของอาร์เรเนียส[9]

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} \right) \quad (3)$$

สร้างกราฟระหว่าง $\ln(k)$ กับ $1/T$ ดังรูปที่ 5 จากค่าความชันของกราฟได้ค่าพลังงานกระตุ้นของการเกิดปฏิกิริยา (E_a) เท่ากับ 17.6 กิโลแคลอรี/โมล และจากจุดตัดแกน y ได้ค่า k_0

เท่ากับ 3.41×10^{11} ชม.⁻¹ สูตรท้ายสามารถเขียนสมการอัตราเร็วของการหมักอินดิแคนไปเป็นอินดอกซิลได้ดังนี้

$$k = 3.41 \times 10^{11} e^{-8.840.5/T} \quad (4)$$

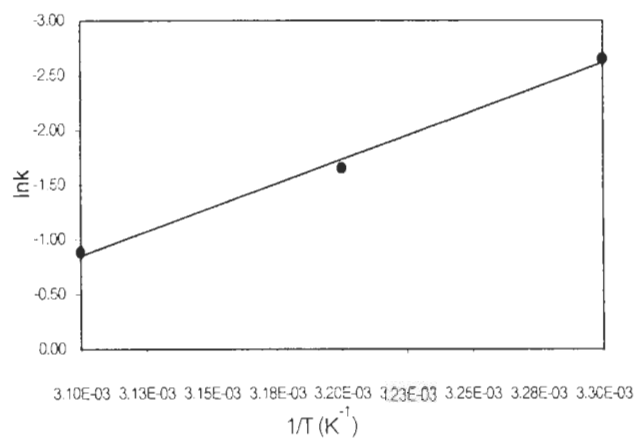


รูปที่ 4 กราฟระหว่าง $\ln(-r_{\text{indican}})$ กับ $\ln(C_{\text{indican}})$

ตารางที่ 1

ค่าคงที่อัตราเร็ว (k) ที่ได้จากกราฟในรูปที่ 4

อุณหภูมิ (°ซ)	ค่าคงที่อัตราเร็ว, k (ชม. ⁻¹)
30	0.070
40	0.190
50	0.411

รูปที่ 5 กราฟระหว่าง $\ln(k)$ กับ $1/T$

สรุป

จากการทดลองหมักใบครามที่อุณหภูมิ 30 40 และ 50°C พบว่า ปฏิกิริยาการเกิดอินดอกซิลเป็นปฏิกิริยาดูดความร้อนมีอันดับปฏิกิริยาเท่ากับ 0.37 มีสมการค่าคงที่อัตราเร็วคือ $k(h^{-1}) = (3.42 \times 10^{11} h^{-1}) e^{8840.5/T}$ และมีค่าพลังงานกระตุ้นของการเกิดปฏิกิริยา (E_a) เท่ากับ 17.6 กิโลแคลอรี/โมล

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยนี้ และสถานีวิจัยหม่อนไหมลำตะคอง จ. นครราชสีมา ที่ให้เมล็ดพันธุ์คราม

เอกสารอ้างอิง

- [1] S. Budavari, **The Merck Index**, 12th ed., Merck & Co., Inc., New York, 1996.

- [2] วนิตา สุบรรณแสงณี, สมควร ศวิตชาติ และ ประเชิญ สร้อยทองคำ **สีธรรมชาติจากพืชและสัตว์ในประเทศไทย** กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ, 2531
- [3] A.J. Cofrancesco, **Dyes Natural Encyclopedia of Chemical Technology**, 2nd ed., 1972, p. 614-629.
- [4] วิทย์ เทียงบุญธรรม, **พจนานุกรมสมุนไพรไทย** พิมพ์ครั้งที่ 1, 2531.
- [5] S.Y. Kamat and D.V. Alat, **Natural Dyes-A dying Craft**, Indian Textile J. **100**(6): p. 66-70. (1990).
- [6] E.R. Trotman, **Dyeing and Chemical Technology of Textile Fibres**, 5th ed., Charles Griffin & Co. Ltd., London, 1975, p. 441-444.
- [7] R. Smith and S. Wagner, **Dyes and The Environmental is Natural Better**, Amer Dyestuff Rep. **80**(9): p. 32-34 (1991).
- [8] R.H. Peter, **Textile Chemistry**, The Physical Chemistry of Dyeing. Vol 3, Elsevier Scientific Publishing, Amsterdam, 1975.
- [9] H.S. Fogler, **Elements of Chemical Reaction Engineering**, 3rd ed., Prentice-Hall, Upper Saddle River, New Jersey, 1999.