บทที่ 3
การดำเนินงานวิจัย

การดำเนินงานวิจัยครั้งนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 เป็นการหาปัจจัยและสภาวะที่เหมาะสมต่อการไฮโดรไลซิสกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ และส่วนที่ 2 เป็นการหาผลของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และกรดไขมันระเหยที่มีต่อประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซชีวภาพ ซึ่งดำเนินการโดยใช้ถังหมักแบบทีละเท ภายในอาคารห้องปฏิบัติการของภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยรายละเอียดของวิธีการดำเนินงานมีดังนี้

3.1 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา

3.1.1 กากมันสำปะหลัง

กากมันสำปะหลังที่ใช้ในการศึกษา มาจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง ห้างหุ้นส่วน ธนวัฒพืชผล จังหวัดกำแพงเพชร มีลักษณะแสดงดังตารางที่ 3.1 และรูปที่ 3.1 โดยในการทดลองนี้ใช้สารละลายกากมัน 2%TS ที่เตรียมโดยการเจือจางกากมันสำปะหลังเปียกด้วยน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดด้วยระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้อากาศจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังแห่งเดียวกันกับของกากมัน

ตารางที่ 3.1 ลักษณะของกากมันสำปะหลังที่ใช้ในการศึกษา (ค่าเฉลี่ย±ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน)

ตัวอย่าง	พีเอช	ของแข็งรวม (%TS)	ของแข็งระเหย (%VS)	ความชื้น (%)
กากมันที่ใช้ศึกษา	4.5±0.01	15.8±0.3	15.6±0.2	84.2±0.3

รูปที่ 3.1 กากมันสำปะหลังที่ใช้ในการศึกษา

3.1.2 เอนไซม์

เอนไซม์ที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ เอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์เพคติเนส จากบริษัท *Novozymes* เอนไซม์เซลลูเลสที่ใช้มีความเข้มข้น 700 NCU ต่อกรัมของเอนไซม์ เอนไซม์เพคติเนส 26,000 PGU ต่อมิลลิลิตรของเอนไซม์ การเตรียมเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำได้โดยการเจือจางด้วยน้ำกลั่น รายละเอียดแสดงไว้ในภาคผนวก ก

3.1.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักย่อยกากมันสำปะหลังเตรียมโดยใช้ตะกอนจากถังยูเอเอสบีของระบบบำบัดแบบไม่ใช้อากาศของฟาร์มสุกรสันติสุข ตำบลแม่ออน อำเภอสันกำแพง จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งมีลักษณะดังตารางที่ 3.2 วิธีการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ทำโดยการนำกากมันสำปะหลัง 2%TS มาหมักกับตะกอนในอัตราส่วน F/M = 0.5 เป็นเวลา 30 วัน โดยมีรายละเอียดแสดงในภาคผนวก ข

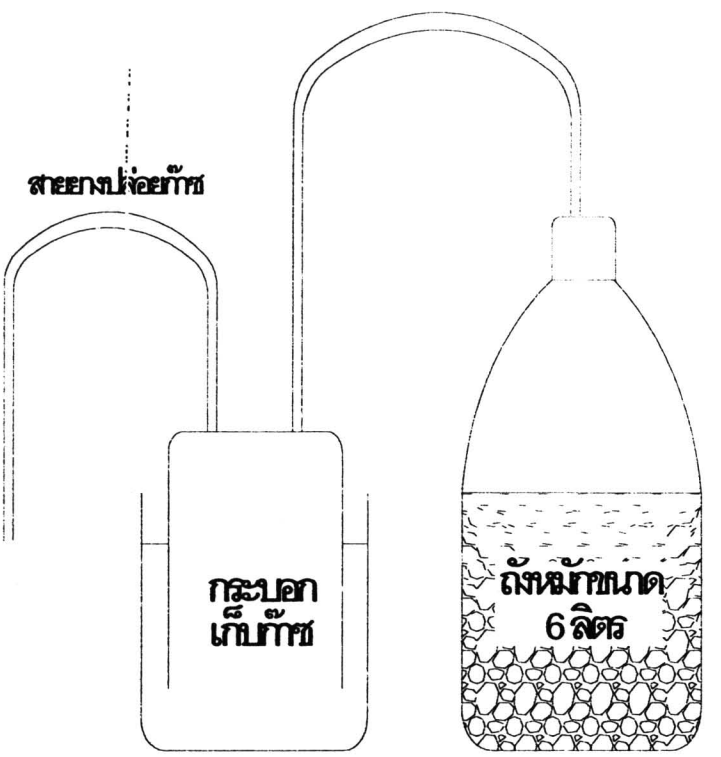
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ตารางที่ 3.2 ลักษณะของตะกอนจากฟาร์มสันติสุข

พารามิเตอร์	เชื้อตะกอนจุลินทรีย์ (มก./ล.)
พีเอช	7.4
ซีโอดี, มก./ล.	63,750
ของแข็งรวม มก./ล.	86,300
ของแข็งระเหย มก./ล.	57,821
ของแข็งแขวนลอยระเหย มก./ล.	57,090
กรดไขมันระเหย มก./ล. กรดอะซิติก	155
อัลคาไลนิตี้ มก./ล. แคลเซียมคาร์บอเนต	1,400

3.1.4 ภาชนะที่ใช้หมัก

ภาชนะที่ใช้หมักเป็นขวดพลาสติกโพลีเอทิลีนเทเรฟทาเลตมีฝาปิด สำหรับขวดหมักขนาด 1.5 ลิตร จะทำการเจาะช่องต่อสายยางเพื่อระบายก๊าซทิ้งไปดังรูปที่ 3.3ก ส่วนขวดหมักขนาด 6 ลิตร มีการเจาะช่องต่อสายยางเข้ากับอุปกรณ์วัดปริมาตรก๊าซที่ได้จากการหมัก ดังรูปที่ 3.2 และ 3.3ข โดยแต่ละขวดจะมีอุปกรณ์เก็บก๊าซชีวภาพที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาแบบอาศัยหลักการแทนที่น้ำ ซึ่งอุปกรณ์เก็บก๊าซที่ใช้เป็นกระบอกพลาสติกพอลีคาร์บอเนต ขนาด 0.5 ลิตร น้ำในขวดเก็บก๊าซจะถูกปรับให้มีค่าพีเอชน้อยกว่า 4 เพื่อป้องกันการละลายของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์



รูปที่ 3.2 แบบจำลองขวดหมักและขวดเก็บก๊าซชีวภาพ

(ก) ขวดหมักขนาด 1.5 ลิตร

(ข) ขวดหมักขนาด 6 ลิตร

รูปที่ 3.3 ขวดหมักและขวดเก็บก๊าซที่ใช้ในการทดลอง

3.2 การหาปัจจัยและสภาวะที่เหมาะสมต่อการไฮโดรไลซิสกากมันด้วยเอนไซม์

3.2.1 การออกแบบการทดลอง

การหาปัจจัยและสภาวะที่เหมาะสมของการทำงานของเอนไซม์ทำโดยใช้แบบแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลสองระดับ (2-level factorial design) สำหรับปัจจัยและระดับของแต่ละปัจจัยที่เลือกได้แสดงในตารางที่ 3.3 โดยทำการออกแบบให้มี 1 บล็อก และมีการทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง 6 ครั้ง ได้แผนการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.4 รวมมีการทดลองทั้งหมด 22 การทดลอง

ตารางที่ 3.3 ปัจจัยและระดับการทดลองแบบแฟคทอเรียลสองระดับ

ปัจจัย	ระดับ		จุดกึ่งกลาง
	1	2	
ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส (NCU/กรัมกากแห้ง)	5	30	15
ปริมาณเอนไซม์เพคติเนส (PGU/กรัมกากแห้ง)	50	200	125
พีเอช	3	6	4.5
เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ (ชั่วโมง)	2	6	4

ตารางที่ 3.4 การทดลองแบบแฟคทอเรียลสองระดับ

Run Order	Run Number	จุดกึ่งกลาง	เอนไซม์เซลลูเลส (NCU/ก.กากแห้ง)	เอนไซม์เพคติเนส (PGU/ก.กากแห้ง)	พีเอช	เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา (ชั่วโมง)
1	1	1	5.0	200	6.0	6
10	2	1	5.0	50	3.0	6
4	3	1	30.0	200	6.0	2
12	4	0	15	125	4.5	4
18	5	1	5.0	200	3.0	2
7	6	0	15	125	4.5	4
9	7	1	30.0	200	3.0	6
3	8	1	5.0	50	6.0	2
16	9	1	30.0	50	3.0	2
17	10	0	15	125	4.5	4
21	11	1	30.0	50	6.0	6
15	12	1	5.0	200	6.0	2
11	13	1	5.0	50	6.0	6
13	14	0	15	125	4.5	4
2	15	1	30.0	50	3.0	6
6	16	1	5.0	200	3.0	6
8	17	1	5.0	50	3.0	2
19	18	0	15	125	4.5	4
14	19	1	30.0	200	6.0	6
5	20	0	15	125	4.5	4
20	21	1	30.0	200	3.0	2
22	22	1	30.0	50	6.0	2

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

3.2.2 ขั้นตอนการทดลอง

สำหรับรายละเอียดขั้นตอนการทดลองในแต่ละครั้งเริ่มจากเตรียมสารละลายกากมัน 2%TS โดยนำกากมันสำปะหลัง 38.1 กรัม ผสมกับน้ำแป้งที่ผ่านการบำบัดด้วยระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้อากาศ 261.9 มิลลิลิตร ได้สารละลายกากมัน 2%TS จำนวน 300 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วทำการวัดพีเอชของสารละลายกากมันเริ่มต้น จากนั้นปรับพีเอชให้มีค่าตามที่ต้องการด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยเลือกใช้ความเข้มข้นที่ทำให้ปริมาณสารกรดหรือเบสที่ใช้เติมไม่เกิน 10 % ของปริมาตรสารละลายกากมัน แล้วทำการเติมเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์เพคติเนสลงไป ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันตามต้องการ จากนั้นปล่อยให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยา โดยใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาต่างๆ กัน ในสภาวะที่มีการกวนสมบูรณ์ แล้วจึงทำการเก็บตัวอย่างสารละลายภายหลังสิ้นสุดการทดลอง นำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอนเอส (Dinitrosalicylic Colorimetric Method) โดยรายละเอียดการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์แสดงไว้ในภาคผนวก ข และนำไปหากรดไขมันระเหยด้วยวิธีมาตรฐานของ APHA, 2005

3.3 การศึกษาผลของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และกรดไขมันระเหยที่มีต่อประสิทธิภาพของการผลิตก๊าซชีวภาพ

3.3.1 สภาวะการเดินระบบที่เลือกศึกษา

การหาผลของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และกรดไขมันระเหยที่มีต่อประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซชีวภาพ ได้ทำโดยการคัดเลือกสภาวะการทำงานของเอนไซม์ที่ทำให้เกิดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากน้อยต่างกัน 5 สภาวะ จากผลการทดลองในหัวข้อ 3.2 เพื่อนำมาใช้ในการเดินระบบการหมักกากมันสำปะหลังแบบทีละเท โดยสภาวะการเดินระบบที่เลือกศึกษาแสดงดังตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 สภาวะการเดินระบบที่เลือกศึกษา

สภาวะที่	เซลลูเลส NCU/ก.*	เพคติเนส PGU/ก.*	พีเอช	เวลา ชม.
1	สภาวะควบคุม			
2	5	50	6	2
3	30	50	6	6
4	30	50	3	6
5	30	200	3	6
6**	30	50	6	6

* น้ำหนักกากแห้ง

** ไม่ได้ทำการปรับพีเอชให้เป็นกลางก่อนนำไปหมักก๊าซ

3.3.2 ขั้นตอนการเดินระบบ

ในการดำเนินการที่แต่ละสภาวะ เริ่มจากการนำสารละลายกากมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 2%TS มาทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ตามสภาวะที่เลือก ภายหลังครบกำหนดเวลาทำปฏิกิริยาแล้วได้ทำการปรับพีเอชให้เป็นกลาง ทำการเติมยูเรียและไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เพื่อเป็นสารอาหาร ในปริมาณที่ทำให้อัตราส่วน COD : N : P เท่ากับ 100 : 1.1 : 0.2 จากนั้นจึงนำสารละลายมาผสมกับเชื้อจุลินทรีย์ในอัตราส่วน 0.5 ต่อ 1 ของของแข็งระเหย แล้วทำการบรรจุสารละลายในขวดหมัก ไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจนนาน 3 นาทีก่อนปิดขวดให้สนิท ทำการหมักเป็นเวลา 5, 10, 20 และ 30 วัน สำหรับการหมัก 5, 10 และ 20 วัน ใช้ขวดหมักขนาด 1.5 ลิตร โดยไม่มีการวัดปริมาณก๊าซ ส่วนการหมัก 30 วัน ใช้ขวดขนาด 6 ลิตรที่ต่อเข้ากับอุปกรณ์วัดก๊าซ เพื่อทำการวัดปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้นทุกวัน (ทำซ้ำ 2 ครั้ง รวมมีขวดทั้งหมดอย่างน้อย 48 ขวด)

เมื่อทำการหมักครบตามเวลาที่กำหนด จึงทำการเก็บตัวอย่างสารละลาย โดยการเก็บตัวอย่างสำหรับการหมัก 5, 10 และ 20 วัน จะระบายก๊าซทิ้งไปและทำการตรวจวัดเฉพาะลักษณะของกากมันหลังการหมักตามเวลาที่กำหนด โดยนำตัวอย่างไปวิเคราะห์หา ซีโอดี พีเอช ปริมาณของแข็งรวม ปริมาณของแข็งระเหย อัลคาไลนิตี้ และกรดไขมันระเหยง่าย ด้วยวิธีการที่แสดง

รายละเอียดในหัวข้อ 3.3 สำหรับการหมัก 30 วัน จะทำการวัดปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้นทุกวันจนครบ 30 วัน ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซและตรวจวัดลักษณะของกากมันหลังการหมักด้วย โดยการทดลองทั้งหมดนี้ได้ทำการเปรียบเทียบกับสภาวะควบคุม ซึ่งใช้สารละลายกากมันสำปะหลัง 2%TS ที่ไม่ผ่านการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ใดๆ มาปรับพีเอชให้เป็นกลาง เติมสารละลายอาหารแล้วหมักกับเชื้อจุลินทรีย์ในอัตราส่วนที่เท่ากัน

3.4 วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

รายละเอียดวิธีการวิเคราะห์ตัวอย่างแสดงดังในตารางที่ 3.6 โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างในการศึกษานี้ได้ใช้วิธีมาตรฐานของ APHA, 2005

ตาราง 3.6 วิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง

พารามิเตอร์	วิธีวิเคราะห์
ของแข็งรวม	การชั่งน้ำหนัก
ของแข็งระเหย	การชั่งน้ำหนัก
พีเอช	พีเอชมิเตอร์
น้ำตาลรีดิวซ์	ดีเอนเอส
กรดไขมันระเหย	การกลั่น
อัลคาไลนิตี้	การไตเตรท
ซีโอดี	การรีฟลักซ์แบบเปิด
ปริมาณก๊าซ	การแทนที่น้ำ
องค์ประกอบของก๊าซ	ก๊าซโครมาโทกราฟี