

ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการหมักในขั้นตอนเดียว

ด้วยเชื้อ *Schizosaccharomyces pombe* และกลุ่มเชื้อรา

โดยใช้สับسترจากหญ้าเนเปียร์บางชนิด

Optimal Conditions for Ethanol Production by

Simultaneous saccharification and fermentation Using *Schizosaccharomyces pombe* and Fungal Consortium with Selected Napier Grass Substrate

อดุลย์สมาน สุขแก้ว*, ปัทมา พิศภักดิ์

Adulsman Sukkaew*, Pattama Pisapak

คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา ยะลา ประเทศไทย

Faculty of Science, Technology, and Agriculture, Yala Rajabhat University, Yala, Thailand

จุฑามาศ แก้วมณี

Jutamas Kaewmanee

คณะสาธารณสุขศาสตร์และสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา ยะลา ประเทศไทย

Faculty of Public Health and Allied Health Sciences, Yala Rajabhat University, Yala, Thailand

วสันตนาวิน หรินทร์ปพนวิช

Wasantanawin Harinppanwich

คณะวิทยาการจัดการ มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา ยะลา ประเทศไทย

Faculty of Management Science, Yala Rajabhat University, Yala, Thailand

* Corresponding author E-mail: adulsman.s@yru.ac.th

Received 21 May 2025; Revised 15 August 2025; Accepted 15 September 2025

บทคัดย่อ

ความเป็นมาและวัตถุประสงค์ : การผลิตเอทานอลจากชีวมวลลิกโนเซลลูโลสเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมเนื่องจากเป็นการใช้ทรัพยากรหมุนเวียน ลดการพึ่งพาเชื้อเพลิงฟอสซิล และลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม หญ้าเนเปียร์ (*Pennisetum purpureum*) เหมาะสำหรับการผลิตเอทานอลเนื่องจากมีปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสสูง เจริญเติบโตเร็ว เพาะปลูกง่าย การแปรสภาพลิกโนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลหมักโดยใช้กระบวนการไฮโดรไลซิสร่วมกับการหมักในขั้นตอนเดียวช่วยลดการยับยั้งเอนไซม์จากการสะสมน้ำตาลและเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการหมักในขั้นตอนเดียวด้วยเชื้อ *Schizosaccharomyces pombe* และกลุ่มเชื้อรา โดยใช้สับسترจากหญ้าเนเปียร์ที่คัดเลือกได้

วิธีดำเนินการวิจัย : ออกแบบการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยนำหญ้าเนเปียร์มาปรับสภาพด้วยกรดกรดซัลฟิวริก 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เวลา 60 นาที จาก

นั้นนำตัวอย่างมาแปรสภาพโดยใช้ไมโครเวฟที่ 700 วัตต์ เวลา 15 นาที เติมน้ำโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ 20 U บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้น นำมาหมักด้วยกระบวนการหมักในขั้นตอนเดียวโดยใช้ยีสต์ *S. pombe* ร่วมกับเชื้อรา โดยใช้กลุ่ม *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp. และ *penicillium* sp. ตามสูตรอาหารสำหรับการหมักต่างกันทั้งหมด 8 สูตร

ผลการวิจัย : การหมักหญ้าเนเปียร์ด้วยกระบวนการหมักขั้นตอนเดียวโดยใช้ยีสต์ *S. pombe* ความเข้มข้น 10% ร่วมกับเชื้อรา *Trichoderma* sp. ความเข้มข้น 5% เป็นเวลา 102 ชั่วโมง ให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุดที่ 69.91 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเหลืออยู่ 5.10 องศาบริกซ์ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือ 45.23 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง หลังการกลั่นครั้งที่ 4 ได้ความเข้มข้นเอทานอล 88.29 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรต่อปริมาตร

สรุป : การเพาะเลี้ยงร่วมระหว่างยีสต์ *Schizosaccharomyces pombe* และเชื้อรา *Trichoderma* sp. ภายใต้เงื่อนไขการหมักที่เหมาะสมทำให้ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากหญ้าเนเปียร์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้ พบการลดลงอย่างต่อเนื่องของน้ำตาลรีดิวซ์และของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นเอทานอล

การนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงปฏิบัติ : ผลการวิจัยนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเอทานอลจากวัสดุชีวมวลในระดับอุตสาหกรรมขนาดเล็กถึงขนาดใหญ่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพื้นที่ที่มีหญ้าเนเปียร์เป็นพืชพลังงานในท้องถิ่น เป็นการเพิ่มมูลค่าให้แก่ทรัพยากรชีวภาพในชุมชน พร้อมทั้งเป็นแนวทางในการพัฒนาระบบการจัดการวัสดุชีวมวลอย่างยั่งยืน

คำสำคัญ : หญ้าเนเปียร์, การผลิตเอทานอล, Simultaneous saccharification and fermentation (SSF), *Schizosaccharomyces pombe*

Abstract

Background and Objectives: Ethanol production from lignocellulosic biomass has attracted considerable interest due to the use of renewable resources, reduction of dependence on fossil fuels, and mitigation of environmental impacts. Napier grass (*Pennisetum purpureum*) is well-suited for ethanol production because of its high cellulose and hemicellulose contents, rapid growth rate, and ease of cultivation. The conversion of lignocellulose into fermentable sugars involving hydrolysis, when combined with fermentation in a single step, can reduce enzyme inhibition caused by sugar accumulation, leading then to enhanced production efficiency. The objective of the present research was therefore to investigate optimal conditions for ethanol production via the Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) method using *Schizosaccharomyces pombe* and fungal consortia, with selected Napier

grass as the substrate.

Methodology: Completely Randomized Design (CRD) was used to schedule the experiments. Substrate was pretreated with 0.5% sulfuric acid at 140 °C for 60 minutes, followed by microwave treatment at 700 W for 15 minutes. Cellulase enzyme was then added at a concentration of 20 U; incubation was then conducted for 48 hours. Subsequently, the mixture was subject to Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) using *Schizosaccharomyces pombe* in combination with fungal strains from the genera *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, and *Penicillium*. Eight different fermentation formulations were tested.

Main Results: Fermentation of Napier grass via the Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) process using *S. pombe* at a concentration of 10% in combination with *Trichoderma* sp. at a concentration of 5% for 102 hours yielded a maximum ethanol production of 69.91 g/L. The total soluble solids content remained at 5.10 °Brix, while the residual reducing sugar content was 45.23 mg/g dry weight. After the fourth distillation, the ethanol concentration reached 88.29% v/v.

Conclusions: Co-cultivation of the yeast *Schizosaccharomyces pombe* and the fungus *Trichoderma* sp. under optimized fermentation conditions significantly enhanced the efficiency of ethanol production from Napier grass. A continuous decrease in reducing sugars and total soluble solids was observed during fermentation, corresponding to the increase in ethanol concentration.

Practical Application: The findings of the present study can be applied to the development of ethanol production technologies from biomass materials at scales ranging from small to large industrial operations. In regions where Napier grass is locally cultivated as an energy crop, the approach offers a potential to produce renewable energy, reduce dependence on fossil fuels, and add value to community bioresources. Furthermore, it provides a strategic framework for the sustainable management of biomass resources.

Keywords: Napier Grass, Ethanol Production, Simultaneous saccharification and fermentation (SSF), *Schizosaccharomyces pombe*

Introduction

เอทานอลเป็นผลผลิตที่ได้จากกระบวนการหมักทางชีวภาพโดยอาศัยจุลินทรีย์เป็นตัวกลางที่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้ได้เป็นเอทานอล [1-3] เอทานอลสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบทางการเกษตรและผลิตผลพลอยได้จากการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ชานข้าวฟ่างหวาน ชังข้าวโพด และหญ้าเนเปียร์ ซึ่งมีอยู่ในปริมาณมาก หาได้ง่ายและราคาถูก แต่การนำมาใช้ประโยชน์ยังอยู่ในวงจำกัด พืชชีวมวลดังกล่าวมีองค์

ประกอบหลักที่สำคัญประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งจะทนต่อการย่อยสลายมาก หญ้าเนเปียร์ (*Pennisetum purpureum*) เป็นพืชอาหารสัตว์และพืชพลังงานชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพสูง โดยเฉพาะในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย เช่น จังหวัดนครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี พัทลุง ปัตตานี ยะลา และสงขลา เนื่องจากภูมิอากาศร้อนชื้น ปริมาณน้ำฝนสูง และพื้นที่เพาะปลูกเหมาะสม ทำให้หญ้าเนเปียร์สามารถให้ผลผลิตชีวมวลสดได้สูงถึง 75–100 ตันต่อเฮกตาร์ต่อปี และมีปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสรวมมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้ง [4, 7, 11] นอกจากนี้ยังมีลักษณะเด่น ได้แก่ การเจริญเติบโตเร็ว ตัดได้ 4–6 ครั้งต่อปี ต้นทุนการผลิตต่ำ ไม่แย่งพื้นที่ปลูกพืชอาหารหลัก และมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สามารถคัดเลือกพันธุ์ให้เหมาะสมกับการผลิตพลังงาน ซึ่งในคุณสมบัติของหญ้าเนเปียร์เป็นทางเลือกหนึ่งที่เหมาะสมสำหรับการผลิต เอทานอลเชื้อเพลิง เนื่องจากมีปริมาณชีวมวลสูงต่อพื้นที่เพาะปลูก โครงสร้างลิกโนเซลลูโลสชัดเจน ได้แก่ เซลลูโลส 30–50 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 19–26 เปอร์เซ็นต์ และ ลิกนิน 8–17 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเหมาะสำหรับการการแปรสภาพ ย่อยสลายและการหมัก เป็นพืชที่สามารถปลูกได้ตลอดทั้งปี [8] ดังนั้นในการผลิตเอทานอลจากพืชชีวมวลดังกล่าวจึงมีขั้นตอนการผลิตที่ซับซ้อนมากกว่าการผลิตจากวัตถุดิบที่เป็นน้ำตาลและแป้ง โดยทั่วไปประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก ได้แก่ การแปรสภาพวัตถุดิบ การย่อยด้วยกรดหรือเอนไซม์ และการหมักน้ำตาลที่ได้ให้เป็นเอทานอล ในกระบวนการผลิตแบบปกติที่เรียกว่า Conventional Fermentation (CF) จะต้องมีการแยกส่วนประกอบต่าง ๆ ออกจากกัน โดยเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบที่มีมากและเมื่อผ่านการย่อยสลายจะได้เป็นน้ำตาลกลูโคส จากนั้นจึงเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลโดยสายพันธุ์แบคทีเรียหรือยีสต์ ต่อมาได้มีการพัฒนากระบวนการผลิตโดยการลดขั้นตอนด้วยวิธี Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) โดยรวมขั้นตอนการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์และการหมักน้ำตาลให้เป็นเอทานอลเข้าด้วยกัน [1, 4–7] เป็นการลดการสะสมของน้ำตาลและสารประกอบอื่นที่เกิดจากการย่อยสลายที่อาจกระทบต่อประสิทธิภาพในการผลิต เอทานอลของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทานอลมีหลายสปีชีส์ โดยใช้ยีสต์ *S. pombe* หรือ *Saccharomyces cerevisiae* มีผลการศึกษาส่วนใหญ่พบว่าผลผลิตเอทานอลเพียง 15–35 กรัมต่อลิตร และยังไม่มีการศึกษาที่ใช้เทคนิคการหมักร่วมจุลินทรีย์หลายชนิดหรือการประเมินศักยภาพในสภาพแวดล้อมจริงของภาคใต้ นอกจากนี้ยังขาดการใช้สายพันธุ์ยีสต์ที่ทนต่อความเข้มข้นเอทานอลสูงกว่า 80% v/v โดยเฉพาะเชื้อ *S. pombe* ที่สามารถหมักเป็นเอทานอลโดยสามารถใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่มีคาร์บอน 5 และ 6 อะตอม แต่ทั้งนี้ถ้าหากมีการศึกษาสภาวะการย่อยสลายและการหมักที่ดีก็เป็นแนวทางหนึ่งในการพัฒนาศักยภาพของเอทานอลที่มี ปริมาณความเข้มข้นของเอทานอลที่สูงขึ้น ในการประยุกต์ใช้เอทานอลสามารถประยุกต์ได้ในหลากหลายอุตสาหกรรมไม่ว่าจะเป็นอุตสาหกรรมพลังงาน อุตสาหกรรมเกษตร อุตสาหกรรมการแพทย์ และอุตสาหกรรมอาหาร เป็นต้น สามารถนำมาเป็นส่วนผสมหรือตัวทำละลายในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้ เช่น แก๊สโซฮอล์ไบโอดีเซล สารฆ่าเชื้อ และสารสกัด เป็นต้น ปัจจุบันมีการศึกษาการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์มีเพื่อผลิตผลผลิตต่าง ๆ เพื่อใช้ประโยชน์ เอทานอลเป็นผลผลิตหนึ่งที่มีมูลค่า นอกจากนี้สามารถใช้แหล่งพลังงานทดแทนได้อีกด้วย โดยเอทานอลมีสูตรทางเคมี $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ สามารถผลิต 80–95 เปอร์เซ็นต์ ได้จากกระบวนการหมักที่เหลือได้จาก

การสังเคราะห์ขึ้นมา (Synthesis) [8-10] ซึ่งจุลินทรีย์จึงมีความสำคัญอย่างมากต่อกระบวนการผลิตในการทำหน้าที่ย่อยสลายวัตถุดิบ เพื่อให้มีขนาดเล็กลงจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ต่าง ๆ และเปลี่ยนให้กลายเป็นเอทานอล ซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้ายจากกระบวนการ [5, 7-8, 11]

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจในการพัฒนานวัตกรรมการผลิตเอทานอลจากหญ้าเนเปียร์ด้วยการใช้จุลินทรีย์ร่วม ได้แก่ ยีสต์ *S. pombe* ร่วมกับเชื้อรา *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp. และ *penicilium* sp. ในกระบวนการหมักในขั้นตอนเดียว โดยออกแบบสูตรการหมัก 8 สูตร เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอลโดยใช้กระบวนการหมักในขั้นตอนเดียวด้วยเชื้อ *S. pombe* และเชื้อราต่างชนิดต่างกันโดยใช้แหล่งสับสเตรทจากหญ้าเนเปียร์จากภาวะที่คัดเลือกได้โดย ผลที่คาดว่าจะได้รับคือสามารถผลิตเอทานอลที่มีความเข้มข้นสูงกว่าเดิม เพื่อช่วยเพิ่มความเป็นไปได้ศักยภาพในการขยายผลสู่ระดับกึ่งอุตสาหกรรมในพื้นที่ภาคใต้และในการใช้หญ้าเนเปียร์เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพเชิงพาณิชย์ในอนาคตต่อไป

Materials and methods

การเตรียมหญ้าเนเปียร์

นำหญ้าเนเปียร์นำมาหั่นให้มีขนาด 4-5 เซนติเมตร จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาบดละเอียดด้วยเครื่องบดตัวอย่างให้มีขนาดเล็กลง แล้วนำมาร่อนด้วยเครื่องร่อนขนาดตัวอย่างอัตรา 100-250 ไมโครเมตร จากนั้นบรรจุในถุงพลาสติกแล้วเก็บไว้ในตู้ดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้องและวิเคราะห์ความชื้น [11, 12-14]

การศึกษาภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอลโดยวิธี Simultaneous saccharification and fermentation ด้วยเชื้อ *S. pombe* และ กลุ่มเชื้อรา โดยใช้สับสเตรทจากหญ้าเนเปียร์ที่คัดเลือกได้

นำตัวอย่างหญ้าเนเปียร์จากที่เตรียมได้นำมาแปรรูปสภาพด้วยกรดกรดซัลฟูริก 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เวลา 60 นาที ด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ แล้วนำมาแปรรูปด้วยความร้อนโดยใช้ไมโครเวฟ ที่ 700 วัตต์ เวลา 15 นาที ตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิแล้วเติมเอนไซม์เซลลูเลส ที่ 20 U บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาหมักด้วยวิธีกระบวนการหมักในขั้นตอนเดียวโดยใช้เชื้อยีสต์ *S. pombe* ร่วมกับเชื้อรา โดยใช้กลุ่ม *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp. และ *penicilium* sp. ตามสูตรอาหารสำหรับการหมักต่างกันทั้งหมด 8 สูตร (Table 1) ทำการหมักและควบคุมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างทุก ๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง นำมาวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอล จากนั้นนำมากลั่นเอทานอลให้บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นด้วยเครื่องกลั่นลำดับส่วน ทำการศึกษาอุณหภูมิที่ 90 องศาเซลเซียส โดยกำหนดระยะเวลาในการกลั่น 70 นาที โดยทำการกลั่นทั้งหมด 4 รอบ แล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC) Agilent 6890 Series โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอล เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเอทานอล

กับพื้นที่ได้กราฟ จากนั้นกรองตัวอย่างบรรจุในขวด วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลโดยคำนวณจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน โดยใช้ภาวะการวิเคราะห์ประกอบด้วย ฮีเลียม อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ก๊าซไฮโดรเจน 45 มิลลิลิตรต่อนาที air zero 450 มิลลิลิตรต่อนาที และ split flow 20 มิลลิลิตรต่อนาที คอลัมน์ชนิด Wax เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ความยาว 30 เมตร อุณหภูมิสูงสุด 250 องศาเซลเซียส อุณหภูมิหัวฉีด 70 องศาเซลเซียส อุณหภูมิ FID 150 องศาเซลเซียส [15-20, 22] โดยทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ โดยตะกอนที่คัดเลือกได้จากกระบวนการหมักนำมาส่งด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) และ วิเคราะห์หาเอกลักษณ์ด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (FT-IR)

Table 1 Fermentation medium formulation for Simultaneous saccharification and fermentation (SSF)

No	Fermentation Medium Formulation	Initial Inoculum Level (%)	Initial Fungal Inoculum Level (%)
A	Malt extract 3 g/L, yeast extract 3 g/L, peptone 5 g/L, and adjust the volume with the selected pretreated Napier grass slurry to a final volume of 1 liter.	5	<i>Trichoderma</i> sp. (10)
B		5	<i>Penicillium</i> sp. (10)
C		5	<i>Rhizopus</i> sp. (10)
D		5	<i>Aspergillus</i> sp. (10)
E		10	<i>Trichoderma</i> sp (5)
F		10	<i>Penicillium</i> sp. (5)
G		10	<i>Rhizopus</i> sp. (5)
H		10	<i>Aspergillus</i> sp. (5)

Results and discussion

ผลของการศึกษาภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอลโดยวิธีกระบวนการหมักในขั้นตอนเดียวด้วยเชื้อ *Schizosaccharomyces pombe* และ กลุ่มเชื้อรา โดยใช้สับสเตรทจากหญ้าเนเปียร์ที่คัดเลือกได้

การหมัก Simultaneous saccharification and fermentation โดยใช้เชื้อยีสต์ *S. pombe* ร่วมกับเชื้อรา โดยใช้ กลุ่ม *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp. และ *penicillium* sp. ตามสูตรอาหารสำหรับการหมักต่างกันทั้งหมด 8 การทดลอง ประกอบด้วย Malt extract 3 กรัมต่อลิตร, Yeast extract 3 กรัมต่อลิตร, Peptone 5 กรัมต่อลิตร และ ปรับปริมาตรด้วยสับสเตรทของหญ้าเนเปียร์ที่ปรับสภาพที่คัดเลือกได้ให้เท่ากับ 1 ลิตร ควบคุมการหมักแบบ SSF ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างทุก ๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ซึ่งการทดลองพบว่าภาวะที่ดีที่สุดของการหมักเอทานอลคือการใช้เชื้อยีสต์ *Schizosaccharomyces pombe* 10 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อ *Trichoderma* sp. 5 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมง

ที่ 102 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 69.91 ± 5.69 กรัมต่อลิตร (Figure 1) ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด และ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เหลือ 5.10 ± 0.85 องศาบริกซ์ และ 45.23 ± 3.65 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของหญ้าเนเปียร์ (Figure 2-4)

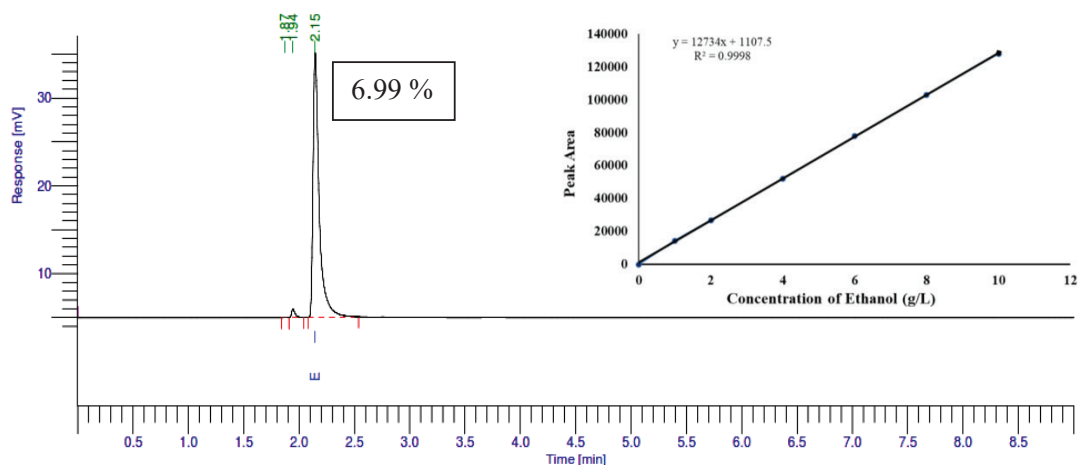


Figure 1 Maximum ethanol content of pretreated Napier grass subjected to Simultaneous saccharification and fermentation using *S. pombe* in combination with fungi, including *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., and *Penicillium* sp., as analyzed by Gas Chromatography (GC)

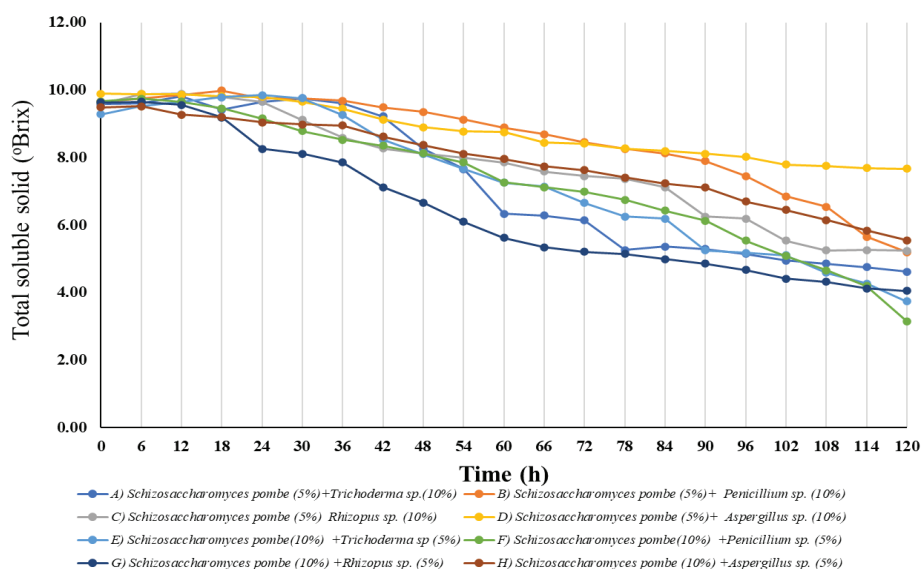


Figure 2 Total soluble solids contents of pretreated Napier grass subjected to Simultaneous saccharification and fermentation using *S. pombe* in combination with fungi, including *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., and *Penicillium* sp.

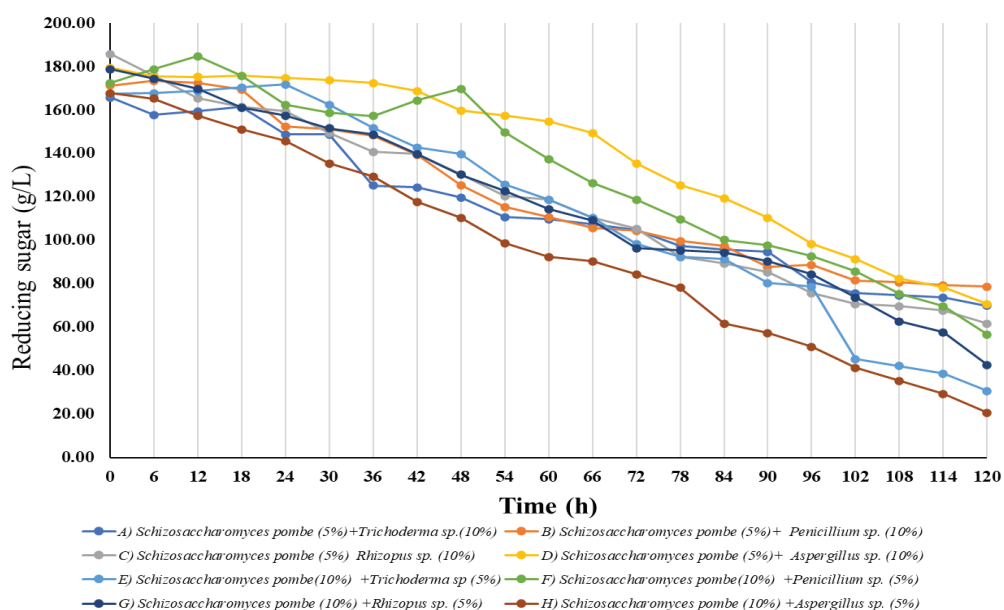


Figure 3 Reducing sugar contents of pretreated Napier grass subjected to Simultaneous saccharification and fermentation using *S. pombe* in combination with fungi, including *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., and *Penicillium* sp.

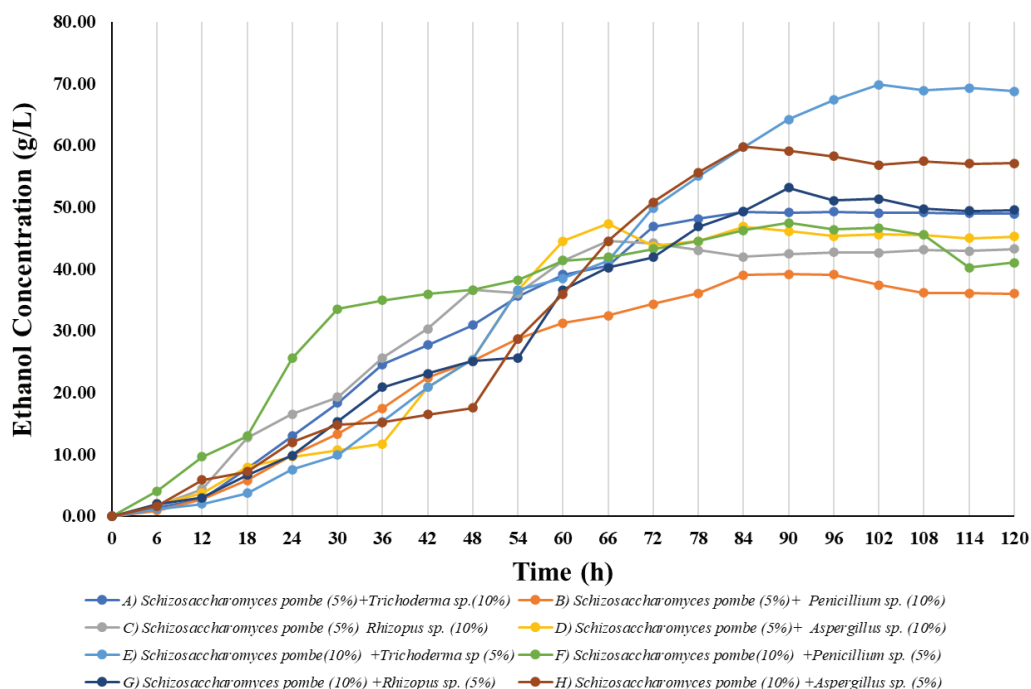


Figure 4 Ethanol contents of pretreated Napier grass subjected to Simultaneous saccharification and fermentation using *S. pombe* in combination with fungi, including *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., and *Penicillium* sp.

ซึ่งผลการศึกษาเป็นไปในทำนองเดียวกันของงานวิจัย Qureshi และคณะ [21] ที่ได้ใช้เห็ดราเพียรีโดยการไฮโดรไลซิสและการหมักแบบ saccharification and fermentation (SSF) พร้อมกัน ส่งผลให้การผลิตเอทานอล เท่ากับ 30.6 ± 0.4 g/L แต่ผลจากการศึกษาวิจัยพบว่าได้เอทานอลที่สูงกว่าเป็นสองเท่า ทั้งนี้อาจเนื่องจากการแปรสภาพสองขั้นตอนโดยใช้ทั้งวิธีทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ ร่วมกัน และในส่วนของกระบวนการหมัก ได้มีการใช้เชื้อผสมระหว่างเชื้อ *S. pombe* ร่วมกับเชื้อรา โดยใช้กลุ่ม *Trichoderma* sp. ซึ่งอาจเป็นไปได้ที่เชื้อดังกล่าวสามารถตัดพันธะของเซลลูโลสของเห็ดราเพียรีซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็นกลูโคสและยีสต์สายพันธุ์ดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลได้สูงกว่าด้วยกลไกการหมักและการเปลี่ยนกลุ่มเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส จากการศึกษาโดยการนำเอทานอลที่ได้จากการหมักที่คัดเลือกได้นำมากลั่นที่อุณหภูมิ 78 องศาเซลเซียส จำนวน 3 รอบพบว่า รอบแรกได้ความเข้มข้นของเอทานอลเท่ากับ 28.25 ± 3.65 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรโดยปริมาตร รอบที่ 2 ได้ปริมาณความเข้มข้นของเอทานอลเท่ากับ 67.58 ± 6.97 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรโดยปริมาตร และรอบที่ 3 ได้ปริมาณความเข้มข้นของเอทานอลสูงถึง 88.29 ± 3.19 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรโดยปริมาตร นอกจากนี้ผลของตะกอนที่ได้นำมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) และ วิเคราะห์หาเอกลักษณ์ของคาร์บอกซิลเมธิลเซลลูโลสด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรมิเตอร์ (FT-IR) โดยโครงสร้างพื้นผิวของตะกอนที่ได้จากกระบวนการหมักเอทานอลด้วยกระบวนการหมักในขั้นตอนเดียวโดยใช้ *S. pombe* ร่วมกับเชื้อรา กลุ่ม *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., และ *Penicillium* sp. จากการส่องด้วย SEM พบว่าพื้นผิวของตะกอนมีโครงสร้างที่มีการแตกหักและเป็นรูพรุนอย่างชัดเจน ซึ่งเกิดจากกระบวนการแปรสภาพและย่อยสลายโดยใช้กรด ความร้อน และเอนไซม์มาช่วยสลายโครงสร้างของเห็ดราเพียรีและเมื่อนำสับเสรพนำมาหมักด้วยเชื้อตาม Table 1 ซึ่งผลมาจากการย่อยสลายของโครงสร้างลิกโนเซลลูโลสระหว่างกระบวนการหมัก และลักษณะปรากฏของเส้นใยและอนุภาคที่มีรูปร่างไม่เป็นระเบียบแสดงถึงการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสบางส่วนที่ได้จากกระบวนการหมักเอทานอล [13, 15] นอกจากนี้ลักษณะที่หยาบและไม่เป็นระเบียบของพื้นผิวสะท้อนถึงการทำลายโครงสร้างลิกโนเซลลูโลสซึ่งอาจเป็นไปได้เกิดจากการทำงานของเอนไซม์จากกลุ่มเชื้อรา [18] โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Trichoderma* sp. ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลส ทำให้เกิดการตัดพันธะและเปลี่ยนโครงสร้างโพลีแซคคาไรด์เป็นน้ำตาล [7, 15, 21] และจาก Figure 5 แสดงให้เห็นว่าการเกิดรูพรุน (Porosity) ที่เห็นได้ชัดในภาพ SEM เป็นผลมาจากการย่อยสลายเชิงเอนไซม์ ซึ่งช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสของตะกอน และการเพิ่มพื้นที่ผิวนี้นำมาส่งผลให้เกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์และสารตั้งต้นเพิ่มขึ้น ซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการปลดปล่อยน้ำตาลและหลังจากกระบวนการหมักและการกลั่น ตะกอนที่เหลืออาจประกอบไปด้วยลิกนินและสารประกอบที่ไม่สามารถหมักได้ ซึ่งส่งผลให้โครงสร้างมีลักษณะไม่สม่ำเสมอ [9, 17]

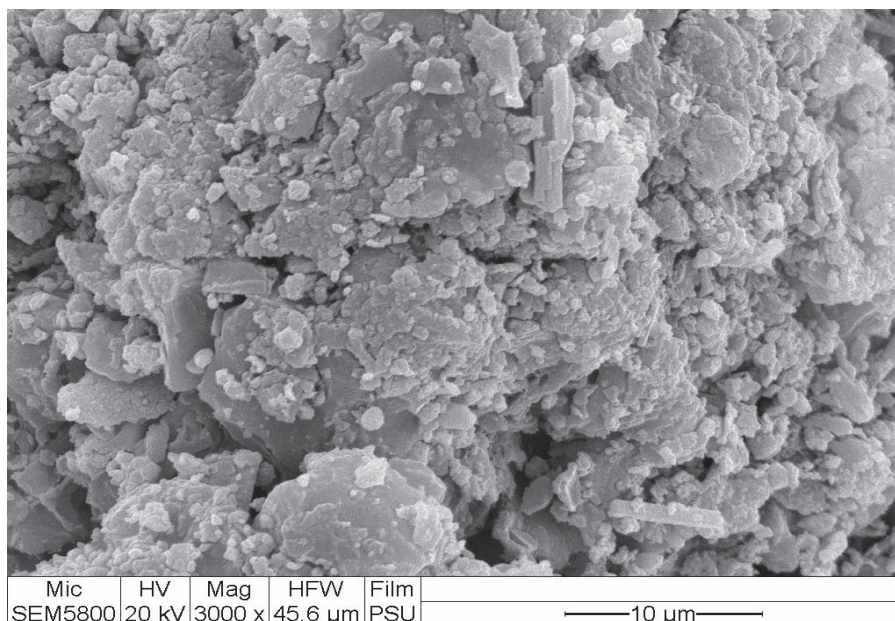


Figure 5 SEM micrograph of residue obtained from Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) process of pretreated Napier grass using *S. pombe* and a fungal consortium (*Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., and *Penicillium* sp.)

ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ FT-IR ของตะกอนที่ได้จากกระบวนการหมักเอทานอล พบว่าสัญญาณการดูดกลืนแสงในช่วง $3500\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งได้บ่งชี้ถึงความคงอยู่ของหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเซลลูโลส ขณะที่สัญญาณในช่วง $2920\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$ และ $1500\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$ แสดงถึงการสั่นสะเทือนของพันธะ C-H ของเมทิลีนและเมทิล สัญญาณในช่วง $1740\text{--}1715\text{ cm}^{-1}$ บ่งบอกถึงการเกิดหมู่คาร์บอนิล (C=O) จากการออกซิเดชันของลิกนินหรือกรดอินทรีย์ ส่วนสัญญาณในช่วง $1200\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ สะท้อนถึงพันธะ C-O-C และ C-OH ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของโครงสร้างโพลีแซคคาไรด์และอีเทอร์ นอกจากนี้ สัญญาณในช่วง $900\text{--}700\text{ cm}^{-1}$ ยืนยันถึงการคงอยู่ของโครงสร้างอโรแมติกจากลิกนิน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโครงสร้างลิกโนเซลลูโลสยังไม่ถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์และมีการตกค้างของสารประกอบอินทรีย์จากการหมักเอทานอลและการแปรสภาพของเซลลูโลสจากกระบวนการแปรสภาพทั้งกรด ความร้อน และเอนไซม์ (Figure 6)

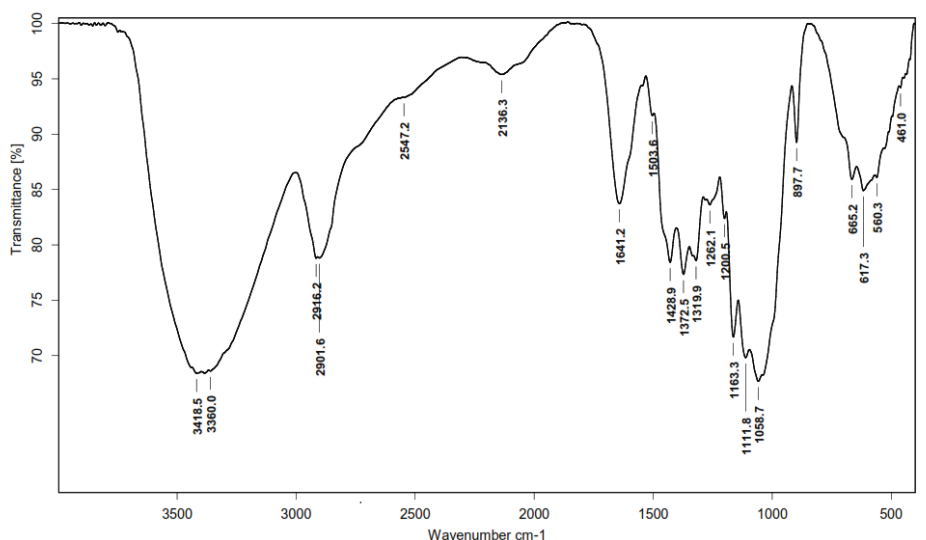


Figure 6 FTIR spectrum of residue obtained from ethanol fermentation process via Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of pretreated Napier grass using *S. pombe* in combination with a fungal consortium (*Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., and *Penicillium* sp.)

Conclusions

การศึกษาวินิจฉัยพบว่าภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอทานอลจากหญ้าเนเปียร์ด้วยกระบวนการหมักในขั้นตอนเดียวคือการใช้ยีสต์ *S. pombe* 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับเชื้อรา *Trichoderma* sp. 5 เปอร์เซ็นต์ หมักเป็นเวลา 102 ชั่วโมง ซึ่งให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุด 69.91 ± 5.69 กรัมต่อลิตร โดยมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเหลือ 5.10 ± 0.85 องศาบริกซ์ และน้ำตาลรีดิวซ์เหลือ 45.23 ± 3.65 กรัมต่อลิตร การกลั่นเอทานอลที่ได้จากการหมักดังกล่าวให้ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับรอบ คือ รอบที่ 1 28.25 ± 3.65 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรโดยปริมาตร รอบที่ 2 67.58 ± 6.97 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรโดยปริมาตร และรอบที่ 3 สูงสุดที่ 88.29 ± 3.19 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรโดยปริมาตร การตรวจสอบลักษณะตะกอนหมักด้วย SEM พบโครงสร้างที่มีรูพรุนไม่สม่ำเสมอ ซึ่งคาดว่าเป็นผลจากการย่อยสลายบางส่วนของเซลล์โลสและการคงเหลือของลิกนินที่ไม่สามารถเกิดจากกระบวนการหมักได้ และผลการวิเคราะห์ FT-IR ยืนยันว่ามีโครงสร้างลิกโนเซลลูโลสที่ยังไม่ถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์และมีสารประกอบอินทรีย์ตกค้าง ซึ่งสรุปได้ว่าการผลิตเอทานอลจากหญ้าเนเปียร์สามารถทำได้อย่างมีประสิทธิภาพภายใต้ภาวะที่เหมาะสม แต่ยังมีข้อจำกัดด้านการย่อยสลายลิกนินซึ่งควรได้รับการปรับปรุงในงานวิจัยต่อไป

Acknowledgements

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนวิจัยจากงบประมาณด้านวิจัยและนวัตกรรม ประเภท Fundamental Fund ประจำปีงบประมาณ 2565 และข้อมูลจากโครงการเรื่อง การเพิ่มศักยภาพกระบวนการพัฒนาเอทานอลจาก

หม้าเนเปียร์ด้วยวิธี Simultaneous saccharification and fermentation ด้วยเชื้อ *Schizosaccharomyces pombe* และ กลุ่มเชื้อรา สำหรับใช้ผลิตฟิล์มอาหารเสริมสารสกัดเมล็ด ลูกหยี ใช้ห่อไส้กรอกไก่ นักวิจัยขอแสดงความขอบคุณต่อสมาคมนักวิจัยชายแดนใต้สำหรับการสนับสนุนด้านสถานที่ดำเนินการวิจัย และขอขอบคุณบุคลากรคณะวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลาที่ให้การสนับสนุน กำลังใจ และความช่วยเหลืออย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการดำเนินงานวิจัย

References

1. He, C.-R., Kuo, Y.-Y. and Li, S.-Y. 2017. Lignocellulosic butanol production from Napier grass using semi-simultaneous saccharification fermentation. *Bioresource Technology*, 231, 101-108.
2. Jose, D., Vasudevan, S., Venkatachalam, P., Maity, S.K., Septevani, A.A., Gupta, M. and Sriaryanun, M. 2024. Effective deep eutectic solvent pretreatment in one-pot lignocellulose biorefinery for ethanol production. *Industrial Crops and Products*, 222, 119626.
3. Wang, H., Ma, H.F., Jin, C., Ma, J.X., Li, X., Tang, L.X. and Si, J. 2025. Hydrothermal pretreatment and fungal degradation to facilitate the enzymatic saccharification of Eucalyptus grandis. *Industrial Crops and Products*, 227, 120845.
4. Intasit, R., Khunrae, P., Meeinkuirt, W. and Soontorngun, N. 2022. Fungal pretreatments of Napier grass and sugarcane leaves for high recovery of lignocellulosic enzymes and methane production. *Industrial Crops and Products*, 180, 114706.
5. Ismail, K.S.K., Matano, Y., Sakihama, Y., Inokuma, K., Nambu, Y., Hasunuma, T. and Kondo, A. 2022. Pretreatment of extruded Napier grass by hydrothermal process with dilute sulfuric acid and fermentation using a cellulose-hydrolyzing and xylose-assimilating yeast for ethanol production. *Bioresource Technology*, 343, 126071.
6. Srivastava, N., Singh, P., Srivastava, M., Lal, B., Singh, R., Ahmad, I. and Gupta, V.K. 2024. A review on the scope and challenges of *Saccharum spontaneum* waste in the context of lignocellulosic biomass for sustainable bioenergy applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 199, 114477.
7. Jomnonkhaow, U., Imai, T. and Reungsang, A. 2024. Microwave-assisted acid and alkali pretreatment of Napier grass for enhanced biohydrogen production and integrated biorefinery potential. *Chemical Engineering Journal Advances*, 20, 100672.

8. Mohapatra, S., Mishra, C., Behera, S.S. and Thatoi, H. 2017. Application of pretreatment, fermentation and molecular techniques for enhancing bioethanol production from grass biomass–A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 78, 1007-1032.
9. Zhou, Z., Peng, S., Jing, Y., Wei, S., Zhang, Q., Ding, H. and Li, H. 2023. Exploration of separate hydrolysis and fermentation and simultaneous saccharification and co-fermentation for acetone, butanol, and ethanol production from combined diluted acid with laccase pretreated Puerariae Slag in *Clostridium beijerinckii* ART44. *Energy*, 279, 128063.
10. Ko, C.-H., Yu, F.-C., Chang, F.-C., Yang, B.-Y., Chen, W.-H., Hwang, W.-S. and Tu, T.-C. 2017. Bioethanol production from recovered napier grass with heavy metals. *Journal of Environmental Management*, 203, 1005-1010.
11. Kongkeitkajorn, M.B., Yaemdeeka, R., Chaityota, I., Hamsupo, K., Orintara, A. and Reungsang, A. 2021. Bioethanol from Napier grass employing different fermentation strategies to evaluate a suitable operation for batch bioethanol production. *Energy Conversion and Management: X*, 12, 100143.
12. Naveed, M.H., Khan, M.N.A., Mukarram, M., Naqvi, S.R., Abdullah, A., Haq, Z.U. and Mohamadi, H.A. 2024. Cellulosic biomass fermentation for biofuel production: Review of artificial intelligence approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 189, 113906.
13. Antunes, F.A.F., Machado, P.E.M., Rocha, T.M., Melo, Y.C.S., Santos, J.C. and da Silva, S.S. 2021. Column reactors in fluidized bed configuration as intensification system for xylitol and ethanol production from napier grass (*Pennisetum Purpureum*). *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, 164, 108399.
14. Panakkal, E.J., Cheenkachorn, K., Chueter, S., Tantayotai, P., Raina, N., Cheng, Y.-S. and Sriariyanun, M. 2022. Optimization of deep eutectic solvent pretreatment for bioethanol production from Napier grass. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, 54, 102856.
15. Burman, N.W., Sheridan, C.M. and Harding, K.G. 2019. Lignocellulosic bioethanol production from grasses pre-treated with acid mine drainage: Modeling and comparison of SHF and SSF. *Bioresource Technology Reports*, 7, 100299.
16. Jomnonkhaow, U., Sittijunda, S. and Reungsang, A. 2021. Enhanced Simultaneous saccharification and fermentation of Napier grass and Napier silage for two stage bio-hydrogen and methane production using organosolv and hydrothermal. *Materials*

Chemistry and Physics, 267, 124614.

17. Pensri, B., Aggarangsi, P., Chaiyaso, T. and Chandet, N. 2016. Potential of Fermentable Sugar Production from Napier cv. Pakchong 1 Grass Residue as a Substrate to Produce Bioethanol. *Energy Procedia*, 89, 428-436.
18. Wu, Y., Wang, Z., Ma, X. and Xue, C. 2021. High temperature Simultaneous saccharification and fermentation of corn stover for efficient butanol production by a thermotolerant *Clostridium acetobutylicum*. *Process Biochemistry*, 100, 20-25.
19. Phitsuwan, P., Sakka, K. and Ratanakhanokchai, K. 2016. Structural changes and enzymatic response of Napier grass (*Pennisetum purpureum*) stem induced by alkaline pretreatment. *Bioresource Technology*, 218, 247-256.
20. Pratto, B., Chandgude, V., de Sousa, R., Cruz, A.J.G. and Bankar, S. 2020. Biobutanol production from sugarcane straw: Defining optimal biomass loading for improved ABE fermentation. *Industrial Crops and Products*, 148, 112265.
21. Qureshi, N., Singh, V., Liu, S., Ezeji, T.C., Saha, B.C. and Cotta, M.A. 2014. Process integration for simultaneous saccharification, fermentation, and recovery (SSFR): Production of butanol from corn stover using *Clostridium beijerinckii* P260. *Bioresource Technology*, 154, 222-228.
22. Sukkaew, A., Kaewmanee, J. and Harinppanwich W. 2025. Enhancing napier grass degradation efficiency through microwave pretreatment and cellulase enzyme application. *ASEAN Journal of Scientific and Technological Reports*, 28, e257505-e.