บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. ผลการคัดแยกคลอสตริเดียมที่สามารถผลิตบิวทานอลจากตัวอย่างดินในประเทศไทย

จากการคัดแยกคลอสตริเดียมจากดินตัวอย่างในประเทศไทย ในอาหารโพเตโตเด็กโตรส บรอท ตามวิธีการดังกล่าวในบทที่ 2 ข้อ 3.1 จากดินตัวอย่างทั้งหมด 50 ตัวอย่าง มี 32 ตัวอย่างดินที่มีเชื้อผลิตบิวทานอลได้ระหว่าง 0.16-7.62 กรัมต่อลิตร และเมื่อทำเชื้อให้บริสุทธิ์ พบว่ามี 13 สายพันธุ์ จาก 4 ตัวอย่างดินที่ผลิตบิวทานอลได้ในปริมาณสูงคือ 3.45-7.77 กรัมต่อลิตร ดังแสดงไว้ในตารางที่ 8 และรูปที่ 2

2. ผลการศึกษาเบื้องต้นถึงความสามารถในการผลิตบิวทานอลในอาหารแป้งมันสำปะหลังโดยคลอสตริเดียมที่คัดแยกได้ 13 สายพันธุ์

2.1 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตบิวทานอล

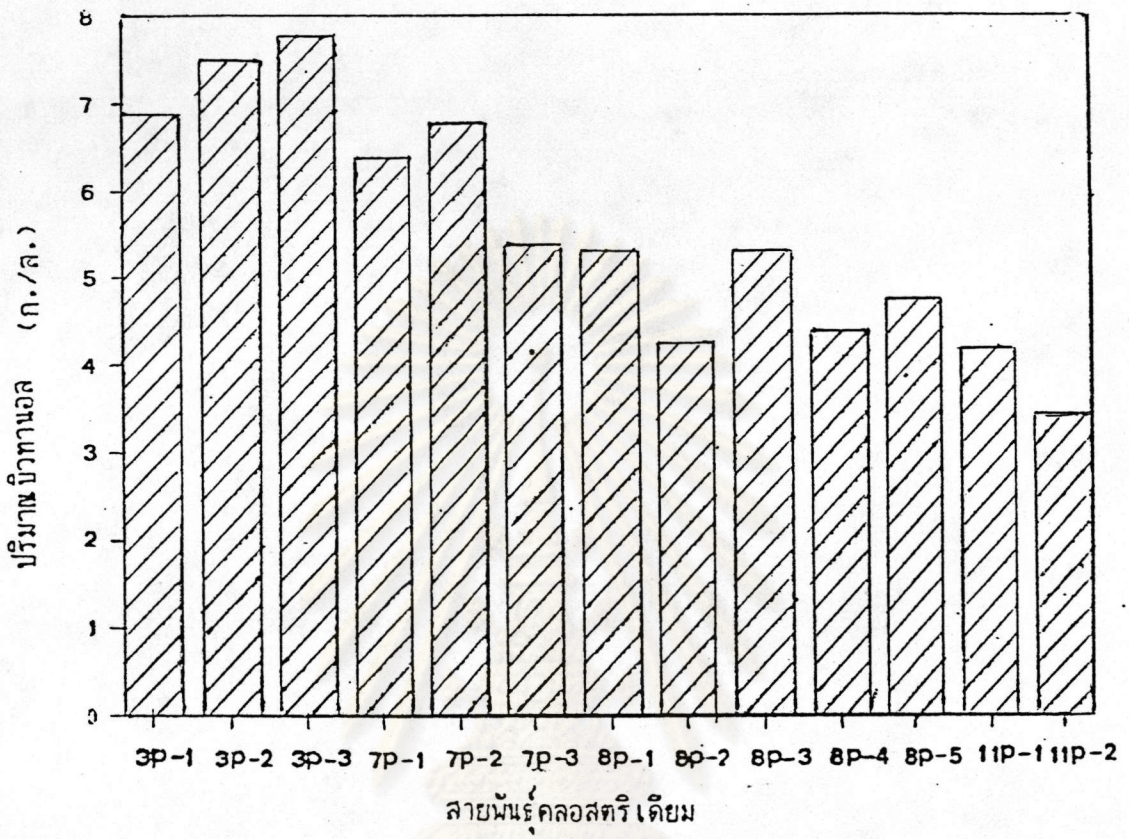
จากการเลี้ยงคลอสตริเดียมทั้ง 13 สายพันธุ์ ที่อุณภูมิต่าง ๆ กัน คือที่ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตบิวทานอลของคลอสตริเดียมทั้ง 13 สายพันธุ์ จะอยู่ในช่วง 30-37 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ผลิตบิวทานอลได้สูงสุด ยกเว้นคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 3p-3 อุณหภูมิที่ผลิตบิวทานอลได้สูงสุดอยู่ที่ 30 องศาเซลเซียส คลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2 ผลิตบิวทานอลได้สูงสุดคือ 6.81 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 3

ตารางที่ 8 สายพันธุ์ของคลอสตริเดียมที่ผลิตบิวทานอลได้ปริมาณสูงในอาหาร โฟเตโต เด็กโตรส บรอท

สายพันธุ์คลอสตริเดียม	แหล่งที่มา (จังหวัด)	ปริมาณบิวทานอล (ก./ล.)
3p-1	ชลบุรี	6.81
3p-2	"	7.51
3p-3	"	7.77
7p-1	ปทุมธานี	6.40
7p-2	"	6.79
7p-3	"	5.40
8p-1	ฉะเชิงเทรา	5.32
8p-2	"	4.27
8p-3	"	5.32
8p-4	"	4.39
8p-5	"	4.77
11p-1	กรุงเทพมหานคร	4.20
11p-2	"	3.45

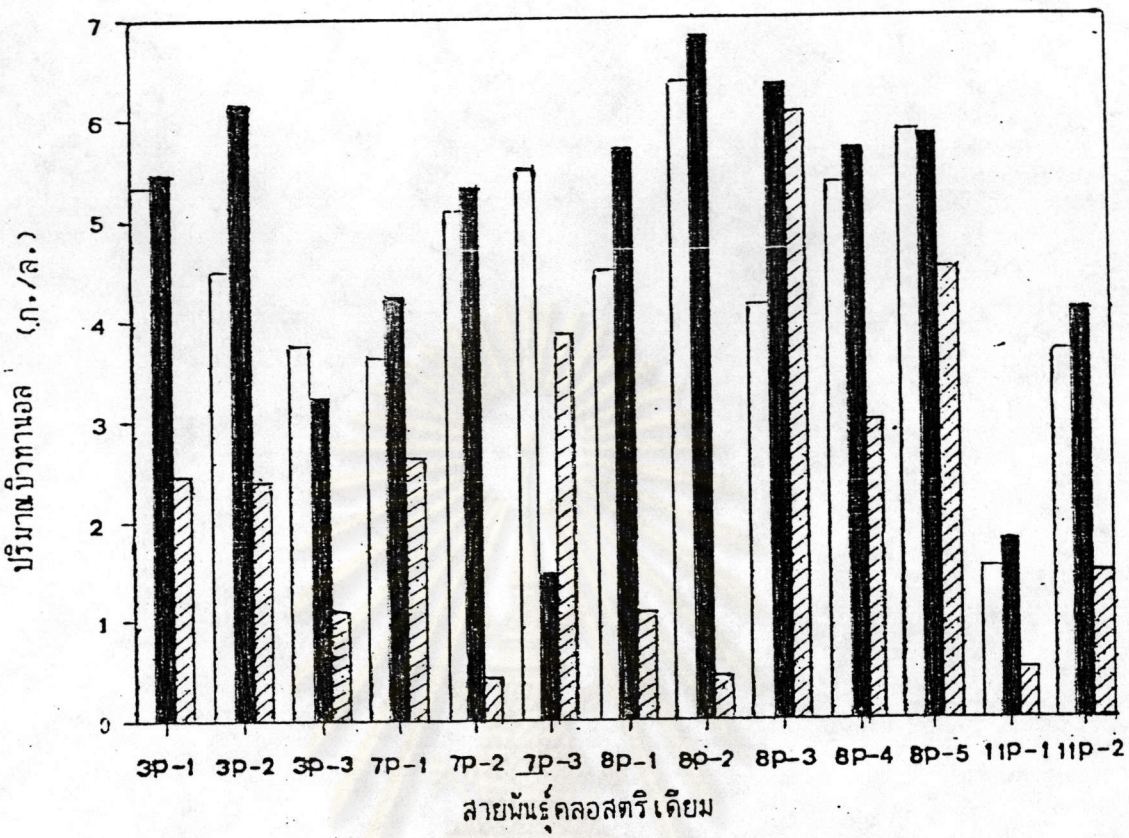
2.2 ผลการศึกษาปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตบิวทานอล

จากผลการผันแปรปริมาณแป้งมันสำปะหลังในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่าง 5-10% พบว่าคลอสตริเดียมทุกสายพันธุ์ ผลิตบิวทานอลได้สูงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแป้ง 7% ยกเว้นคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 3p-1 และ 3p-2 และพบว่าคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2 ผลิตบิวทานอลได้สูงสุดคือ 6.81, 7.29 และ 7.82 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแป้ง 5, 7 และ 10% ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 2 ปริมาณของบิวทานอลที่ผลิตได้ปริมาณสูงในอาหารโฟเตโต เด็กโตรส บรอท โดยคลอสตริเดียม 13 สายพันธุ์ ที่คัดแยกได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



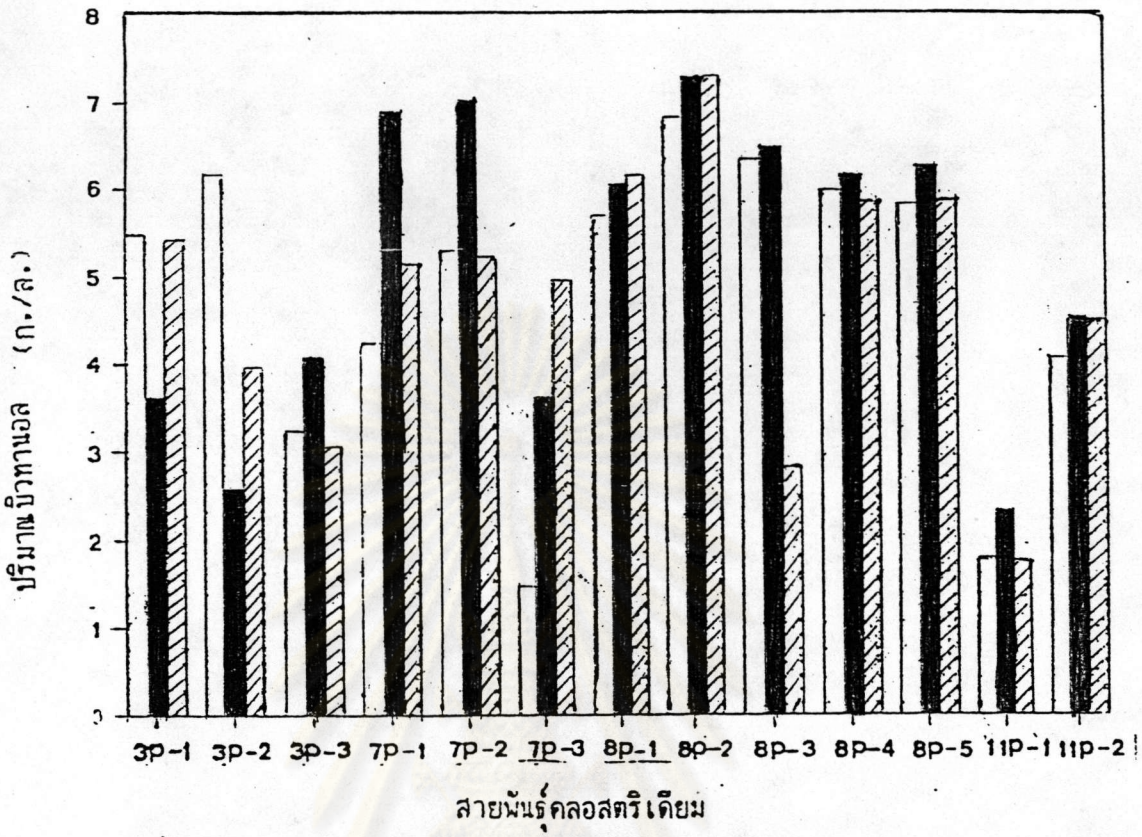
รูปที่ 3 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตบิวทานอล ในอาหารแป้งมันสำปะหลัง โดยคลอสตริเดียม 13 สายพันธุ์ ที่คัดแยกได้

อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4 ผลของปริมาณแป้งมันสำปะหลัง ต่อการผลิตบิวทานอล โดย คลอสตริเดียม 13 สายพันธุ์ ที่คัดแยกได้

แป้ง 5 เปอร์เซนต์

แป้ง 7 เปอร์เซนต์

แป้ง 10 เปอร์เซนต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากผลการทดลองในข้อ 2. พบว่าคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2 เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตบิวทานอลได้ในปริมาณสูงสุดในอาหารแป้งมันสำปะหลัง จึงเลือกคลอสตริเดียมสายพันธุ์นี้มาศึกษาการผลิตอาซีโตน-บิวทานอลในถังหมักต่อไป

3. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเพื่อผลิตอาซีโตน-บิวทานอลจากแป้งมันสำปะหลัง โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2 ในถังหมัก

3.1 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล

จากผลการทดลองในข้อ 2.1 คลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2 ผลิตบิวทานอลได้สูงที่อุณหภูมิระหว่าง 30-37 องศาเซลเซียส ในการทดลองนี้จึงศึกษาถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตอาซีโตน-บิวทานอลในถังหมัก ที่อุณหภูมิ 30, 35 และ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก. หมายเลข 3) ที่มีปริมาณแป้ง 5% ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 6.0 ไม่ควบคุมความเป็นกรดด่างในระหว่างการหมัก ผลการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 5, 6 และ 7 และสรุปผลการทดลองไว้ในตารางที่ 9

จากผลการทดลอง พบว่าที่อุณหภูมิ 30, 35 และ 37 องศาเซลเซียส ได้ตัวทำละลายรวม (บิวทานอล อาซีโตน เอธานอล) ใกล้เคียงกัน คือ 9.16, 10.65 และ 9.26 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยเฉพาะที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์นี้ผลิตบิวทานอลและอาซีโตนได้ในปริมาณสูงสุด คือ 7.0 และ 3.53 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

พฤติกรรมการเจริญเติบโตและการสร้างตัวทำละลายของคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2 ที่อุณหภูมิ 30, 35 และ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไม่ควบคุมความเป็นกรดด่าง จะมีลักษณะเหมือนกันดังนี้ ในระยะแรกคลอสตริเดียมจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (log phase) และสร้างกรด (อะเซติก และบิวทิริค) ออกมาในน้ำหมัก (fermentation broth) ทำให้ความเป็นกรดด่างลดลง และความเป็นกรดด่างลดลงต่ำสุดในชั่วโมงที่ 12 (pH 4.3-4.4) หลังจากนั้นคลอสตริเดียมจะหยุดการเจริญเติบโตและเริ่มคงที่ (stationary phase) ในระยะนี้จะสร้างตัวทำละลายเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ

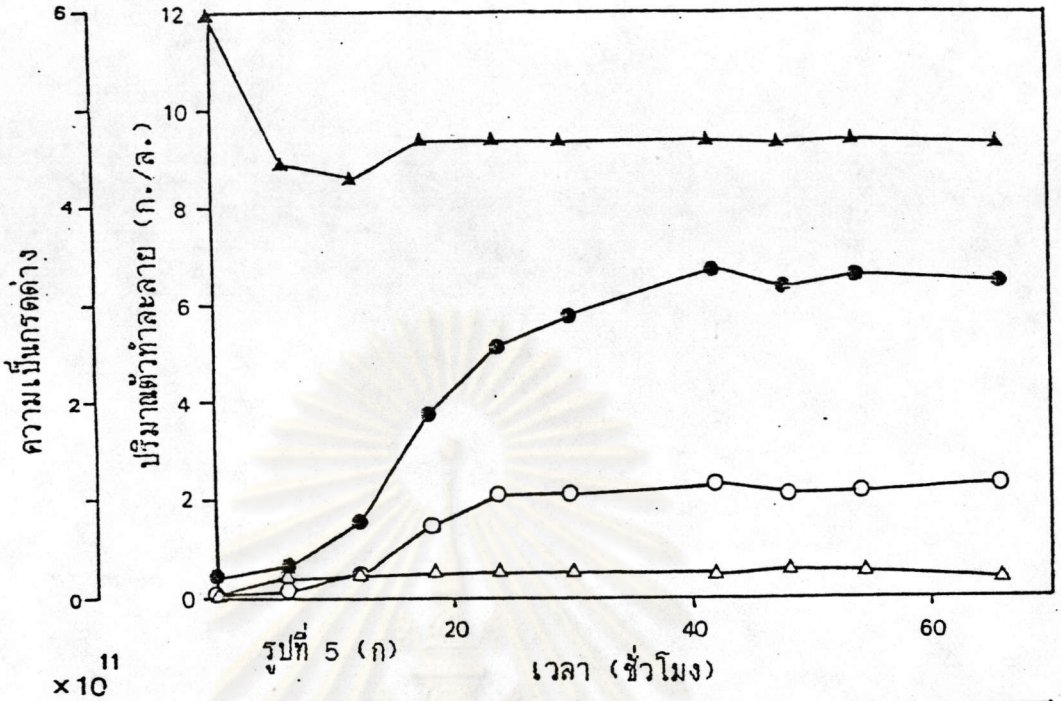
พร้อมกับกรดถูกใช้ไปในการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล ทำให้ความเป็นกรดด่างในน้ำหมักสูงขึ้นเล็กน้อยและคงที่ ปริมาณตัวทำละลายสูงสุดในชั่วโมงที่ 42

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบผลที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5% ที่อุณหภูมิ 30, 35 และ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 6.0 ไม่ควบคุมความเป็นกรดด่าง โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2

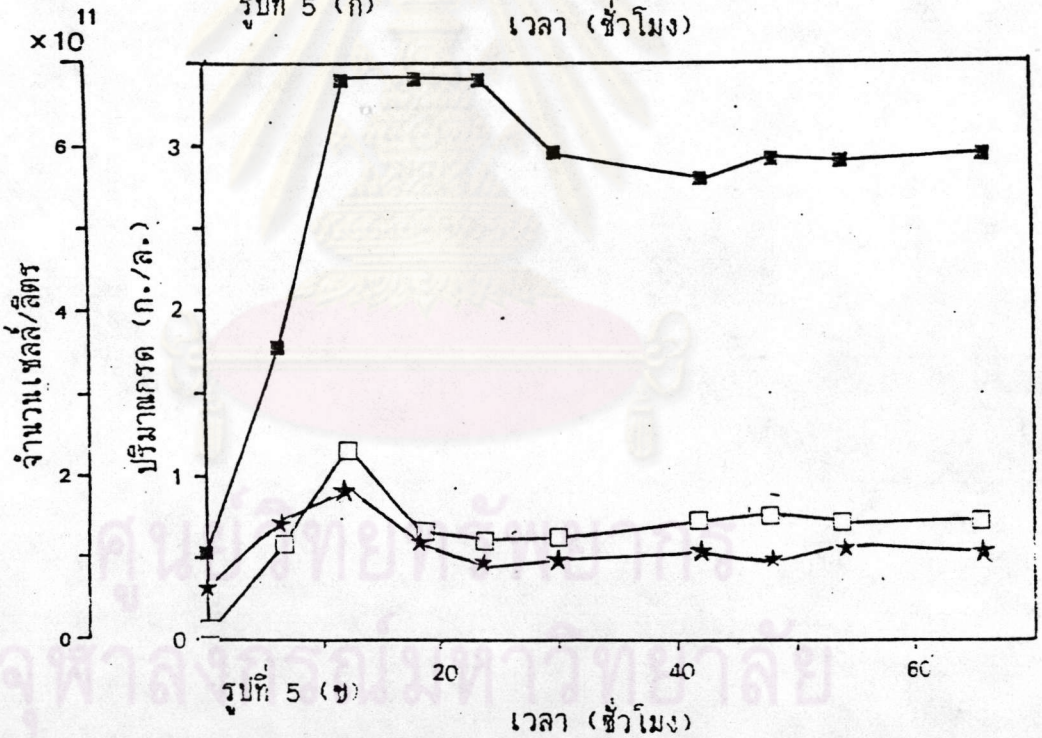
รายการเปรียบเทียบ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)		
	30	35	37
1. ความเข้มข้นสูงสุดของบิวทานอล อาซิโตน เอธานอล (ก./ล.)	6.49, 2.21, 0.46	7.0, 3.53, 0.12	6.13, 2.97, 0.16
2. ความเข้มข้นของกรดอะเซติกและกรดบิวทิริค (ก./ล.)	0.52, 0.73	0.20, 0.49	0.25, 0.65
3. ปริมาณเซลล์สูงสุด (จำนวนเซลล์/ล.)	3.41×10^{11}	6.66×10^{11}	3.05×10^{11}
4. ความเป็นกรดด่างต่ำสุดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	4.30	4.22	4.40
5. ระยะเวลาที่ผลิตบิวทานอลได้สูงสุด (ชั่วโมง)	42	42	42

3.2 ผลของความเป็นกรดด่างต่อการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล

ผลการทดลองการหมักเพื่อผลิตอาซีโตน-บิวทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก. หมายเลข 3) ที่มีปริมาณแป้ง 5% อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 5.5, 6.0 และ 6.5 ตามลำดับ แสดงไว้ในรูปที่ 8, 9 และ 10 และสรุปผลการทดลองไว้ในตารางที่ 10



รูปที่ 5 (ก)

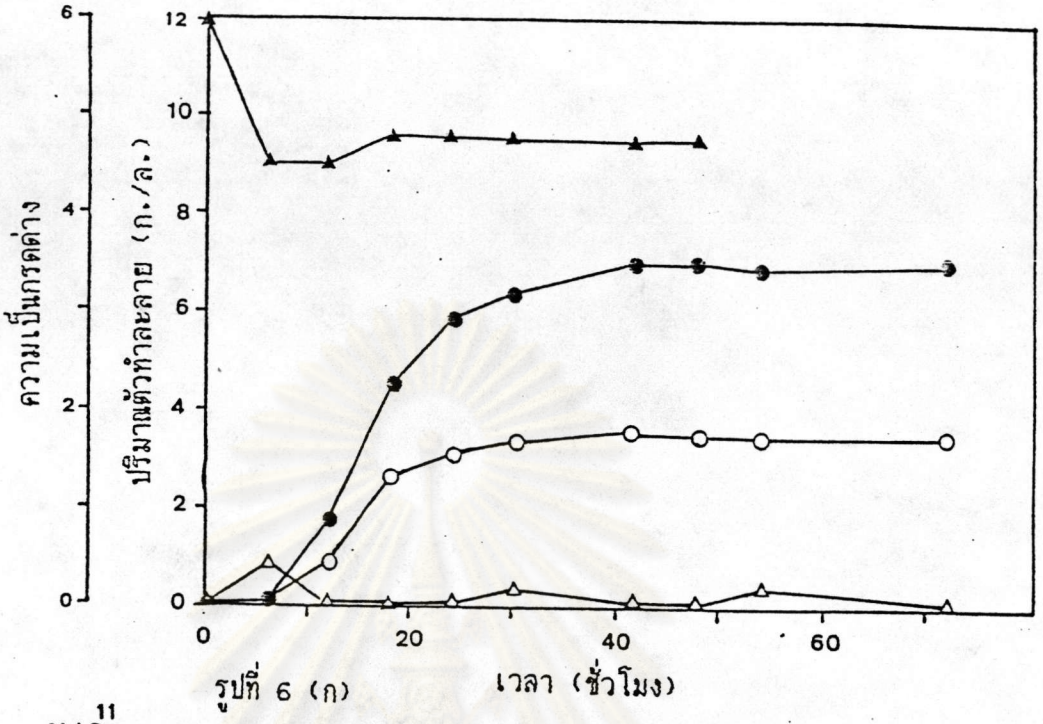


รูปที่ 5 (ข)

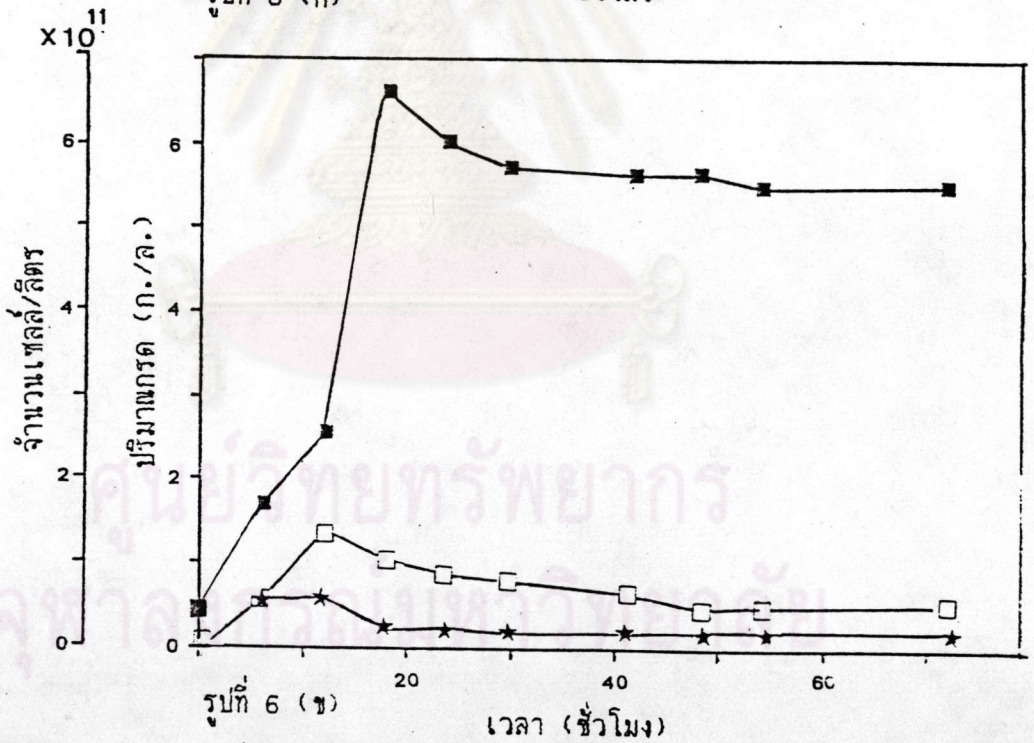
รูปที่ 5 ปริมาณตัวทำละลายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5% ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 6.0 โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8b-2

(ก) ● บิวทานอล
○ อาซิโตน
△ เอธานอล
▲ ความเป็นกรดด่าง

(ข) □ กรดบิวทิริค
★ กรดอะเซติก
■ จำนวนเซลล์



รูปที่ 6 (ก)

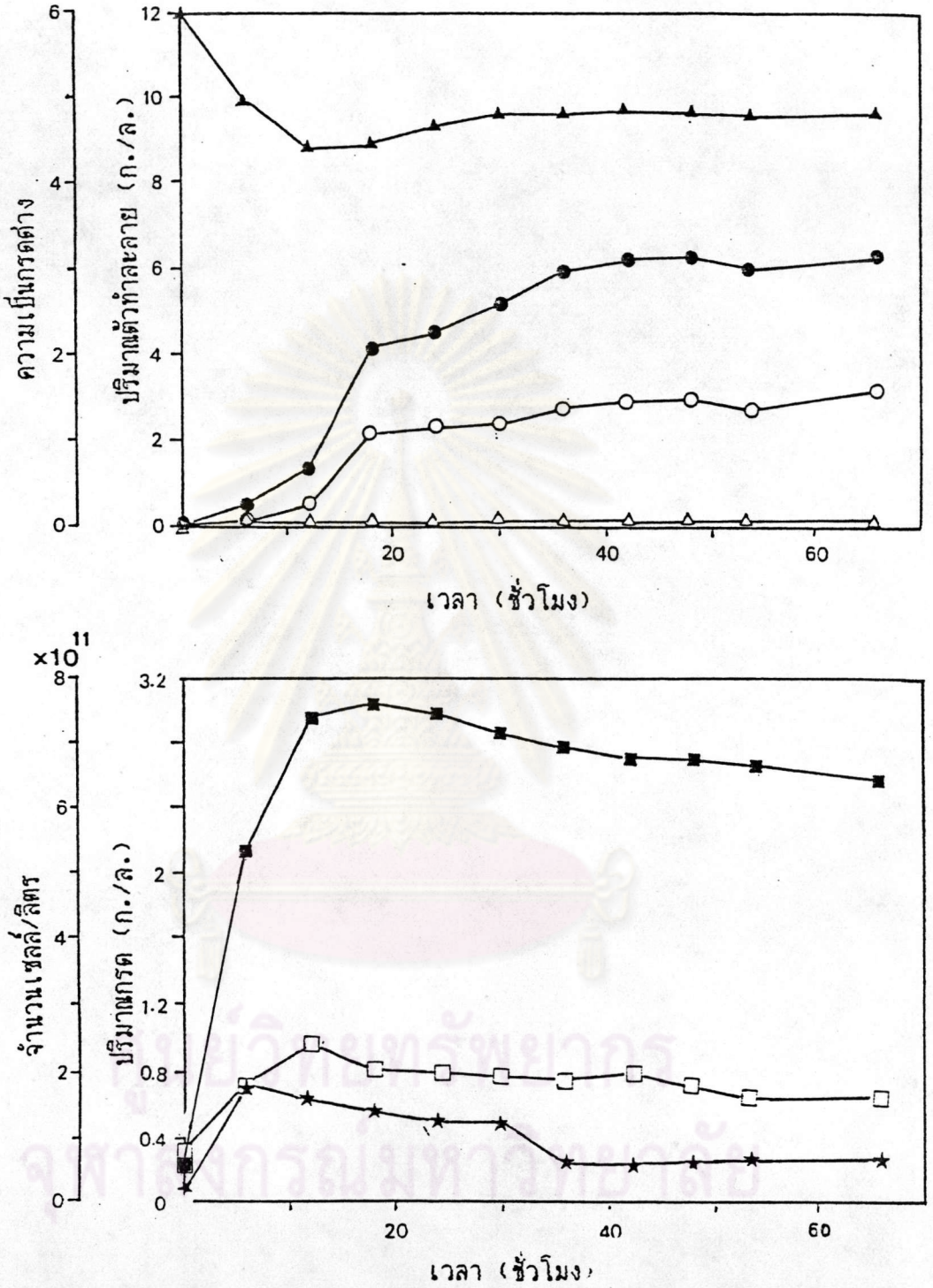


รูปที่ 6 (ข)

รูปที่ 6 ปริมาณตัวทำละลายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5% ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 6.0 ไม่ควบคุมความเป็นกรดด่าง โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ BB-3

(ก) ● บิวทานอล
○ อาซีโตน
△ เอธานอล
▲ ความเป็นกรดด่าง

(ข) □ กรดบิวทิริค
★ กรดอะเซติก
■ จำนวนเซลล์



รูปที่ 7 ปริมาณตัวทำละลายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5%
ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 6.0
ไม่ควบคุมความเป็นกรดด่าง โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ Sp-2

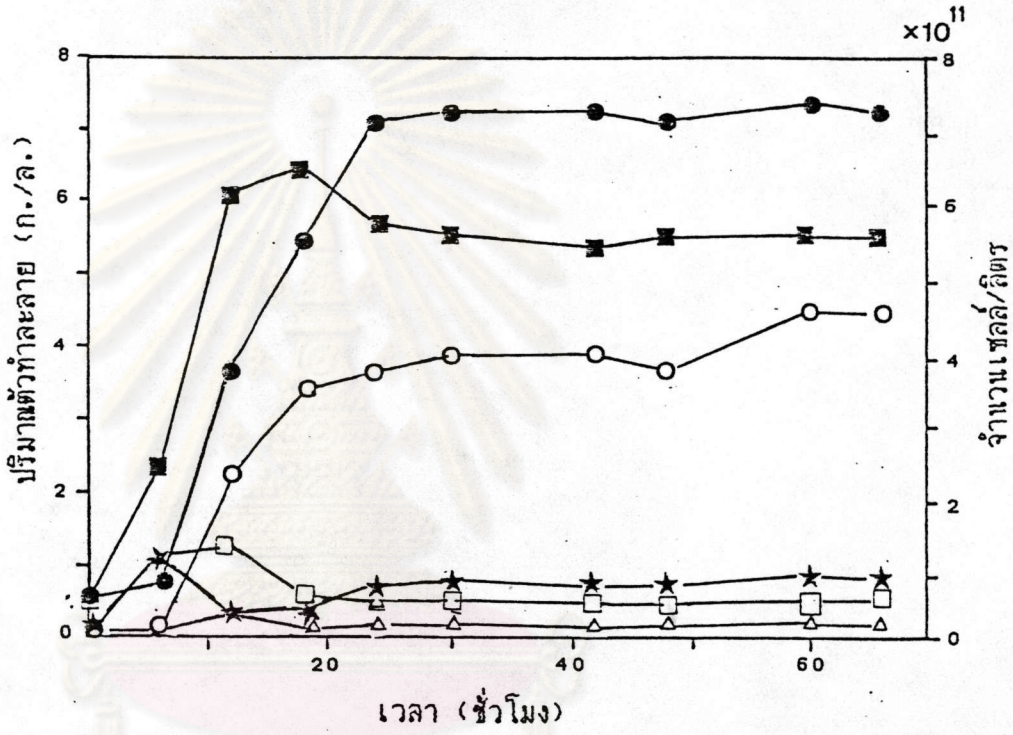
(ก) ● บิวทานอล
○ อาซีโตน
△ เอธานอล
▲ ความเป็นกรดด่าง

(ข) □ กรดบิวทิริค
★ กรดอะเซติก
■ จำนวนเซลล์

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบผลที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5% ของคลอสตริเดียม สายพันธุ์ 8p-2 เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 5.5, 6.0 และ 6.5 ตามลำดับ

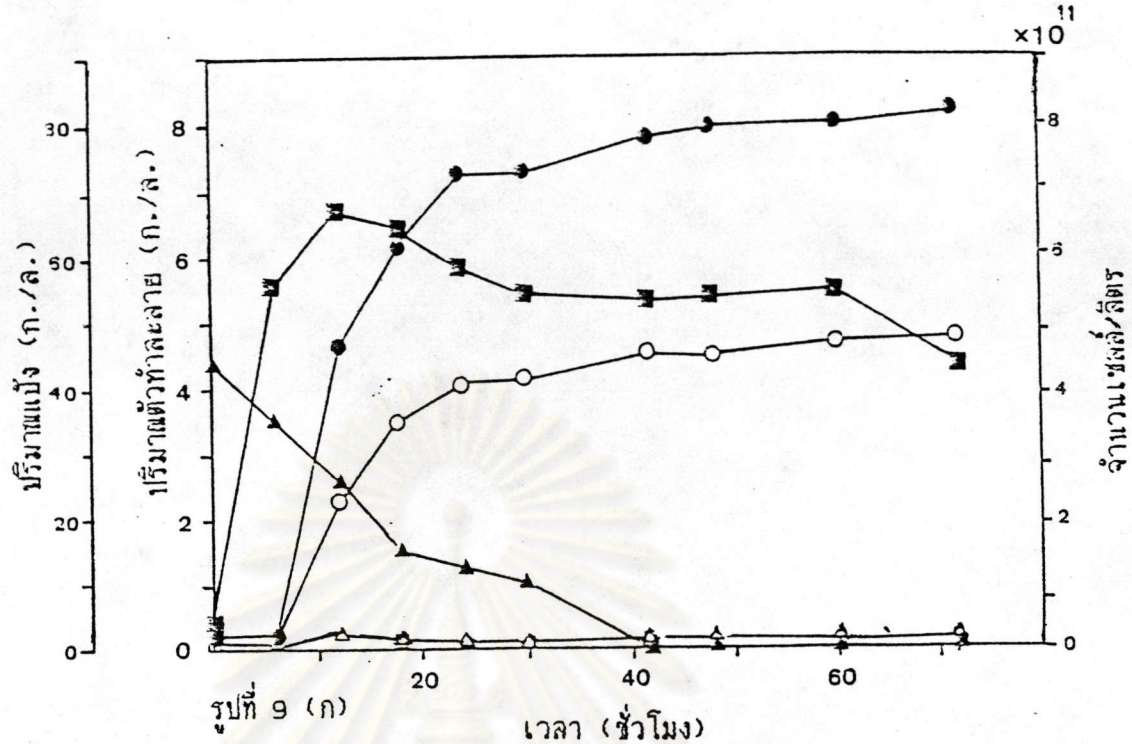
	ค่าความเป็นกรดด่าง		
	5.5	6.0	6.5
1. ความเข้มข้นสูงสุดของบิวทานอล อาซิโตน เอธานอล (ก./ล.)	7.30,4.16,0.15	7.97,4.59,0.14	7.89,4.51,0.12
2. ความเข้มข้นของกรดอะเซติก และกรดบิวทิริค (ก./ล.)	0.50, 0.79	0.47, 0.12	0.51, 0.15
3. ปริมาณเซลล์สูงสุด (จำนวนเซลล์/ล.)	6.46×10^{11}	6.70×10^{11}	6.78×10^{11}

จากผลการทดลองพบว่า ผลผลิตตัวทำละลายรวมที่ได้จากการหมักที่ควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 5.5, 6.0 และ 6.5 มีค่าเป็น 11.61, 12.70 และ 12.52 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากผลการหมักในสภาวะที่ไม่ควบคุมความเป็นกรดด่าง และการหมักในสภาวะควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 5.5 พบว่าน้ำหมัก (fermentation broth) มีความหนืด (viscosity) เมื่อเทียบกับการหมักในสภาวะควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 6.0 และ 6.5

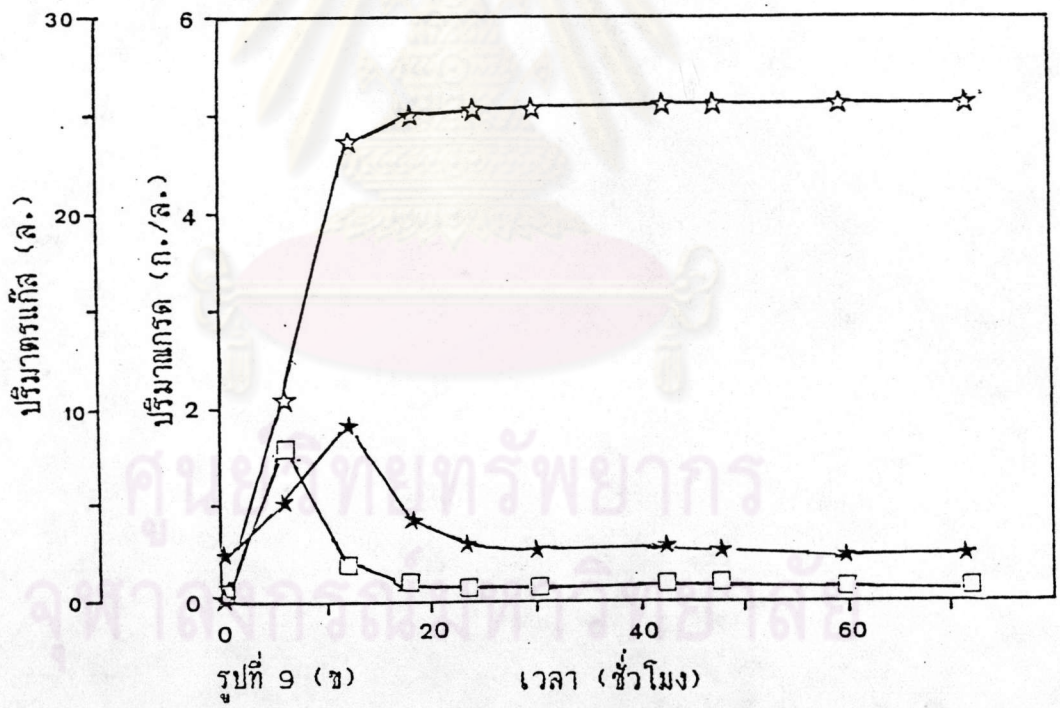


รูปที่ 8 ปริมาณตัวทำละลายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5% ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 5.5 โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2

● บิวทานอล
○ อาซีโตน
△ เอธานอล
□ กรดบิวทิริค
★ กรดอะเซติก
■ จำนวนเซลล์



รูปที่ 9 (ก)

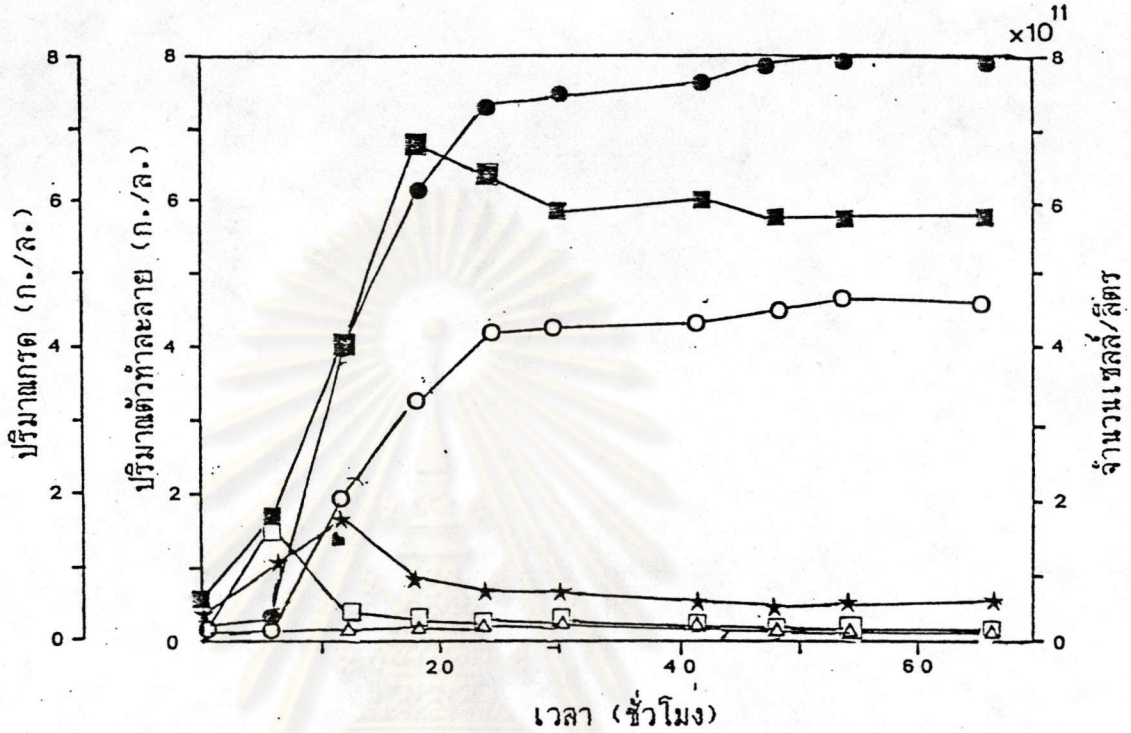


รูปที่ 9 (ข)

รูปที่ 9 ปริมาณตัวทำละลายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5% ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 6.0 โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2

(ก) ● บิวทานอล
○ อาซีโตน
△ เอธานอล
▲ ปริมาณแป้ง
◙ จำนวนเซลล์

(ข) □ กรดบิวทิริค
★ กรดอะเซติก
☆ ปริมาตรแก๊ส



รูปที่ 10 ปริมาณตัวทำละลายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5% ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 6.5 โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2

- ● บิวทานอล
- ○ อาซีโตน
- △ เอธานอล
- □ กรดบิวทิริค
- ★ กรดอะเซติก
- ■ จำนวนเซลล์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 ผลการศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของแป้งมันสำปะหลังต่อการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล

จากผลการทดลองในข้อ 2.2 คลอสตริเดียมสายพันธ์ 8p-2 ผลิตบิวทานอลได้สูงในอาหารที่มีปริมาณแป้งมันสำปะหลัง 5-7% ในการทดลองนี้จึงศึกษาถึงปริมาณแป้งที่เหมาะสมต่อการผลิตอาซีโตนบิวทานอลในถังหมัก โดยแปรผันปริมาณแป้ง 4, 5 และ 7% ตามลำดับ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดด่างเป็น 6.0 ผลการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 11, 9 และ 12 และสรุปผลการทดลองไว้ในตารางที่ 11

ในการทดลองนี้ได้ศึกษาพฤติกรรมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยการนับจำนวนเซลล์และวัดปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้น พบว่าจำนวนเซลล์ที่นับได้ตามระยะเวลาต่าง ๆ จะสัมพันธ์กันกับปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้น จึงสามารถใช้ปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นติดตามการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้อีกวิธีหนึ่ง และปริมาณแก๊สที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นสูงสุด จะบ่งชี้ถึงการเจริญเติบโตได้สูงสุดของจุลินทรีย์

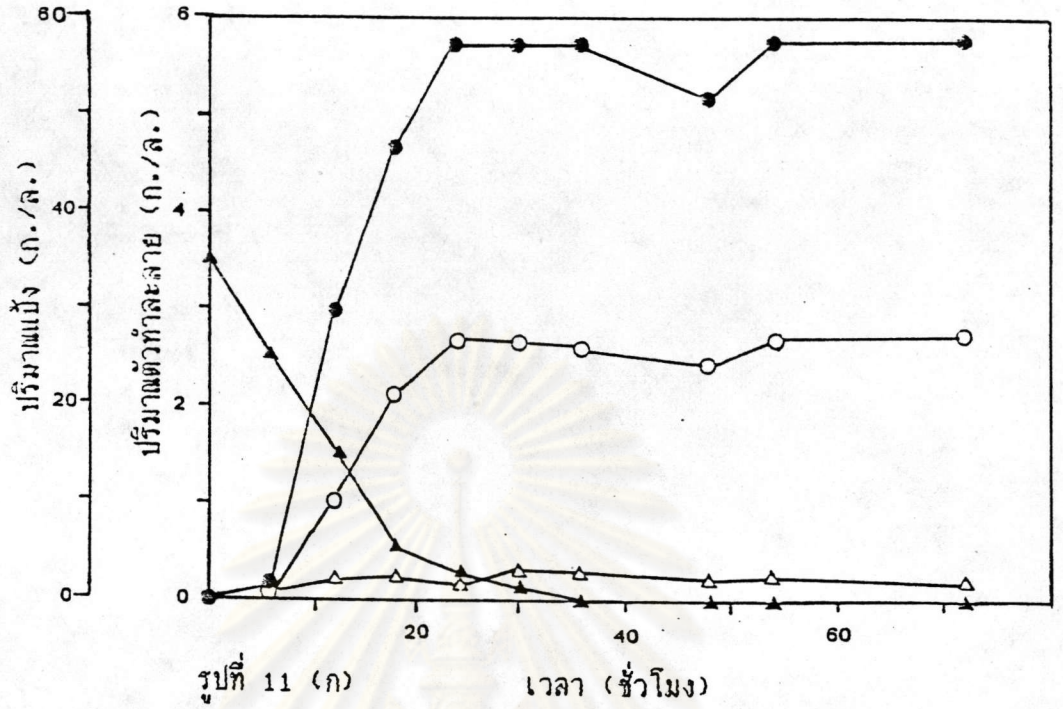
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลัง พบว่าปริมาณแป้งมันสำปะหลังหลังการอบฆ่าเชื้อจะลดลง เนื่องจากมีปริมาณแป้งมันสำปะหลังบางส่วนสลายไปเป็นน้ำตาล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแป้ง 4% หลังการอบฆ่าเชื้อเมื่อวิเคราะห์ปริมาณแป้ง พบว่าปริมาณแป้งจะลดลงเหลือ 3.55% ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณ 5% หลังการอบฆ่าเชื้อพบว่ามีปริมาณแป้งเหลือ 4.5% และตรวจพบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 0.44% (รูปที่ 22) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแป้ง 7% หลังการอบฆ่าเชื้อจะมีปริมาณแป้งเหลือ 6.45%

จากผลการทดลองพบว่าปริมาณแป้งที่เหมาะสมคือ 50 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณตัวทำละลายสูงสุด คือ บิวทานอล 7.97 กรัมต่อลิตร อาซีโตน 4.59 กรัมต่อลิตร เปอร์เซนต์การเปลี่ยนแป้งเป็นผลผลิตเป็น 27.23 เมื่อหมักในอาหารแป้ง 40 กรัมต่อลิตร จะให้ตัวทำละลายรวมเป็น 8.63 กรัมต่อลิตร คลอสตริเดียมใช้แป้งหมดภายใน 36 ชั่วโมง เปอร์เซนต์การเปลี่ยนแป้งเป็นผลผลิตเป็น 21.26% เมื่อหมักในอาหารแป้ง 70 กรัมต่อลิตร คลอสตริเดียมสร้างตัวทำละลายลดลงเมื่อเทียบกับการหมักในอาหารที่มีแป้ง 5% เปอร์เซนต์การเปลี่ยนแแป้งเป็นผลผลิตเป็น 19.0 มีปริมาณแป้งที่เหลือจากการหมัก 16 กรัมต่อลิตร

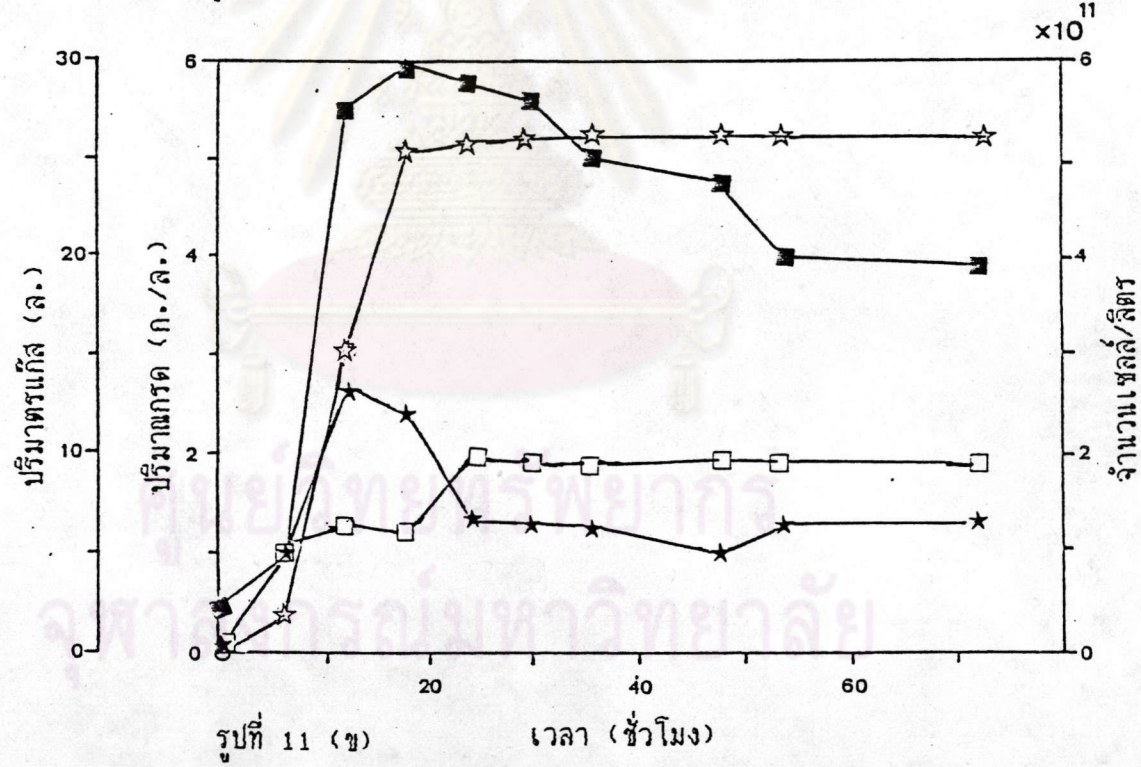
ตารางที่ 11 เปรียบเทียบผลที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 4, 5 และ 7% ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดด่างเป็น 6.0 โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2

	ปริมาณแป้งมันสำปะหลัง (% น้ำหนักต่อปริมาตร)		
	40	50	70
1. ความเข้มข้นสูงสุดของบิวทานอล อาซิโดน เอธานอล (ก./ล.)	5.73,2.67,0.23	7.97,4.59,0.14	6.57,3.33,0.36
2. ความเข้มข้นของกรดอะเซติก และกรดบิวทิริค (ก./ล.)	1.29, 1.93	0.50, 0.14	2.93, 0.93
3. ปริมาณแป้งที่ถูกใช้ไป (ก./ล.)	39.90	46.63	54.0
4. ปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นทั้งหมด (ล.)	26.10	25.55	28.85
5. ปริมาณเซลล์สูงสุด (จำนวนเซลล์/ ล.)	5.97×10^{11}	6.70×10^{11}	7.33×10^{11}
6. เปอร์เซนต์การเปลี่ยนเป็นผลผลิต (% conversion yield)	21.62	27.23	19.0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 11 (ก)

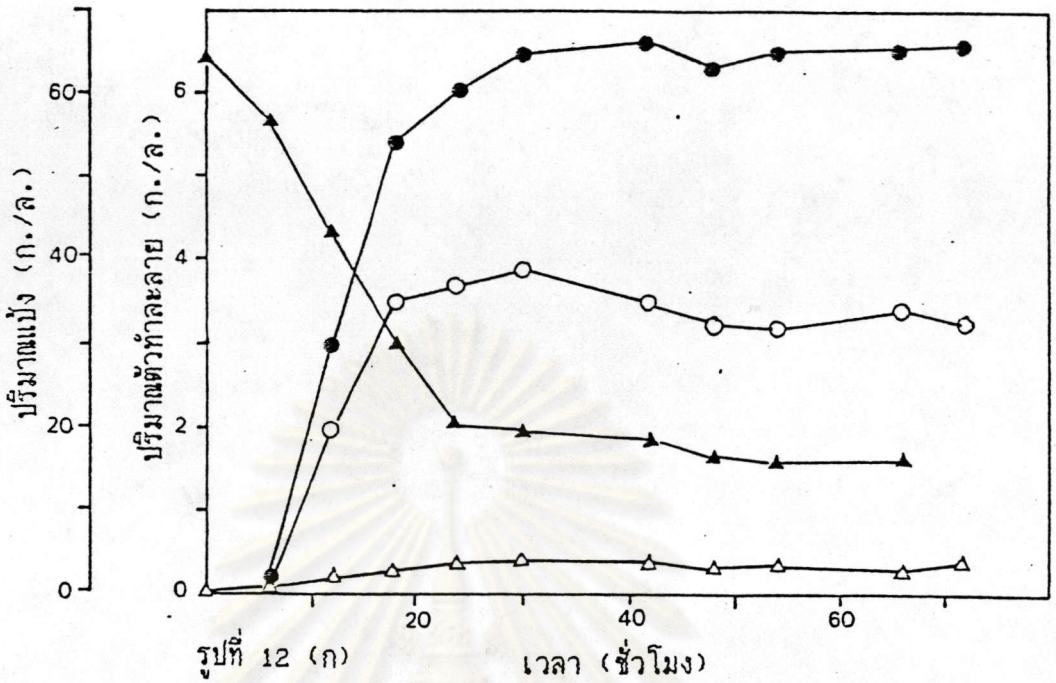


รูปที่ 11 (ข)

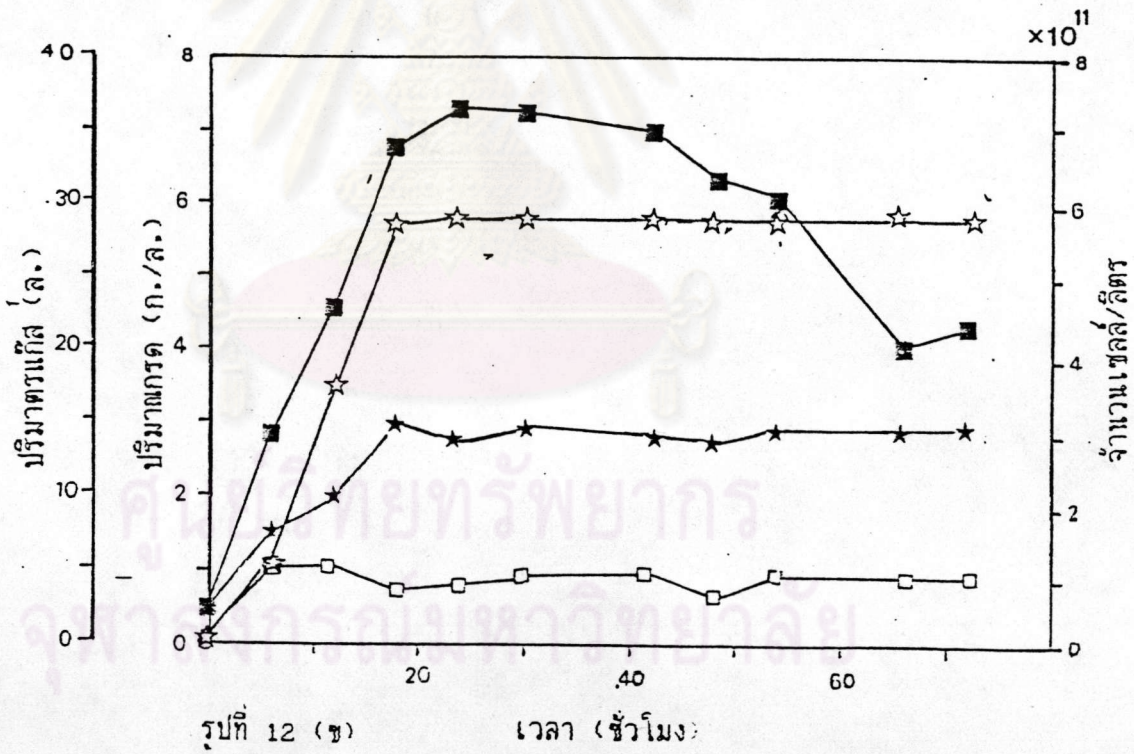
รูปที่ 11 ปริมาณตัวทำละลายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 4% ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 6.0

(ก) ● บิวทานอล ○ อาซิโตน △ เอธานอล ▲ ปริมาณแป้ง

(ข) □ กรดบิวทิริค ★ กรดอะเซติก ☆ ปริมาตรแก๊ส ■ จำนวนเซลล์



รูปที่ 12 (ก)



รูปที่ 12 (ข)

รูปที่ 12 ปริมาณตัวทำละลายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 7% ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 6.5

(ก) ● บิวทานอล
○ อาซีโตน
△ เอธานอล
▲ ปริมาณแป้ง

(ข) □ กรดบิวทิริค
★ กรดอะเซติก
☆ ปริมาตรแก๊ส
■ จำนวนเซลล์

3.4 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล

3.4.1 ผลของสารสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล

ผลการทดลองการหมักเพื่อผลิตอาซีโตน-บิวทานอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก. หมายเลข 3) ที่มีปริมาณแป้ง 5% อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 6.0 แปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์ 0.2-0.8% แสดงไว้ในรูปที่ 9, 13, 14, 15 และ 16 และสรุปผลการทดลองไว้ในตารางที่ 12

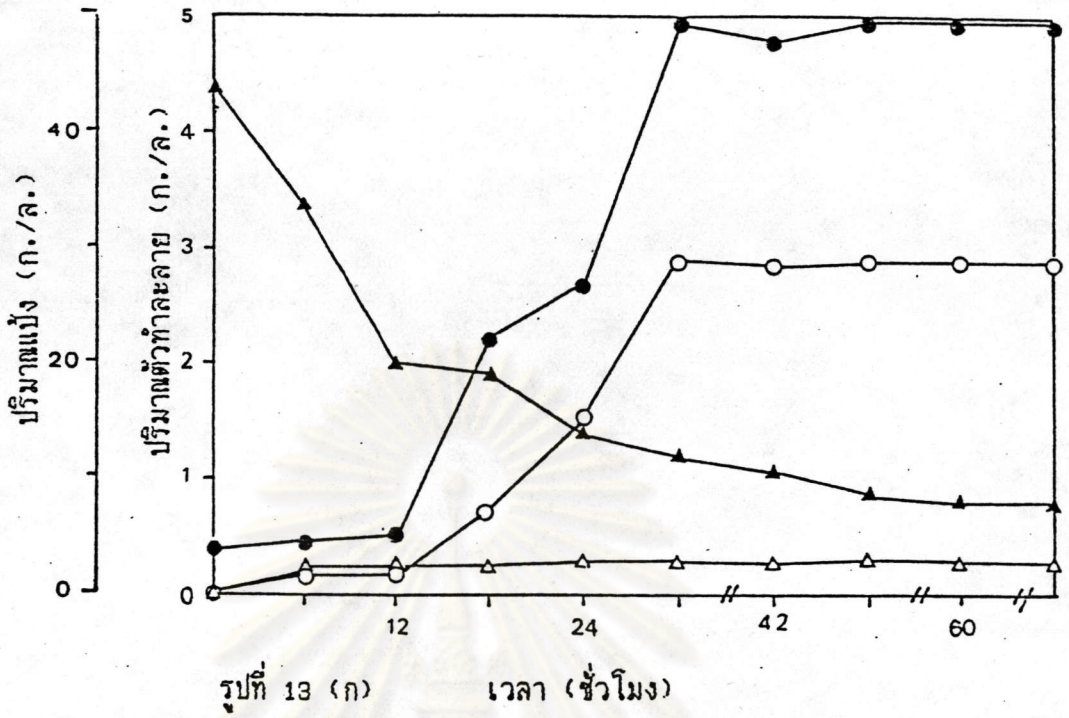
พบว่าสารสกัดจากยีสต์มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตของบิวทานอลและอาซีโตน และการเจริญเติบโตของคลอสตริเดียมสายพันธุ์ BP-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดจากยีสต์ 0.8% จะให้ปริมาณบิวทานอลสูงสุดคือ 8.53 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อเปรียบเทียบผลต่างของปริมาณตัวทำละลายรวมที่ผลิตได้ต่อผลต่างของปริมาณของสารสกัดจากยีสต์ที่ใช้ พบว่าปริมาณสารสกัดจากยีสต์ที่ใช้ปริมาณ 0.5% จะเหมาะสมที่สุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

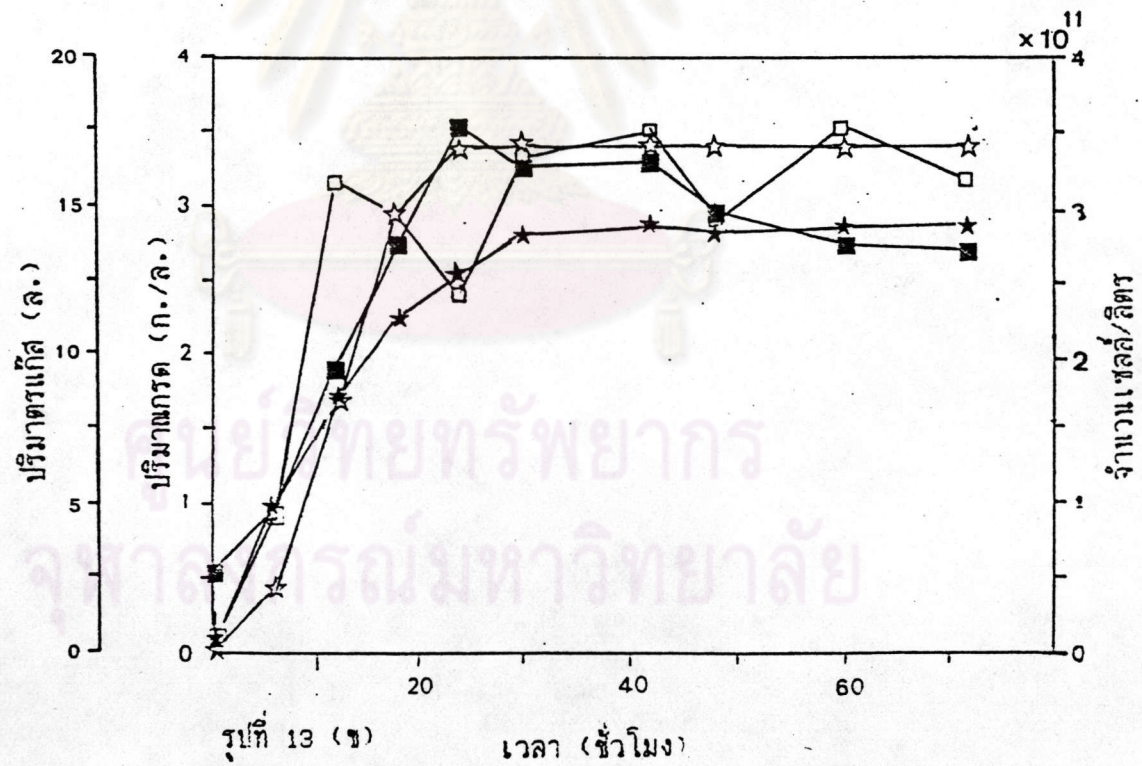
ตารางที่ 12 เปรียบเทียบผลที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5 เปอร์เซนต์ ที่มีปริมาณสารสกัดจากยีสต์ 0.2, 0.4, 0.5, 0.6 และ 0.8% ตามลำดับ โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดด่างเป็น 6.0

	สารสกัดจากยีสต์ (%)				
	0.2	0.4	0.5	0.6	0.8
1. ความเข้มข้นสูงสุดของบิวทานอล อาซิโตน เอธานอล (ก./ล.)	4.57,2.53,0.29	6.55,3.42,0.29	7.60,3.50,0.64	7.97,4.59,0.14	8.53,4.07,0.31
2. ความเข้มข้นของกรดอะเซติก และกรดบิวทาริค (ก./ล.)	2.86, 3.40	2.11, 1.24	2.15, 2.53	0.50, 0.14	2.51, 2.48
3. ปริมาณแป้งที่ใช้ไป (ก./ล.)	41	43.6	47	46.63	47.60
4. ปริมาณเซลล์สูงสุด (จำนวนเซลล์/ลิตร)	3.49×10^{11}	3.66×10^{11}	6.16×10^{11}	6.70×10^{11}	6.83×10^{11}
5. ปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้นทั้งหมด (ล.)	15.10	16.00	24.40	25.55	28.70
6. เปอร์เซนต์การเปลี่ยนแป้งเป็นผลิตภัณฑ์	18.02	23.53	25.00	27.23	27.12
7. ผลต่างของตัวทำละลายรวมที่ผลิตได้ต่อผลต่างของปริมาณสารสกัดจากยีสต์ที่ใช้	1.43	1.48	0.95	0.21	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 13 (ก)



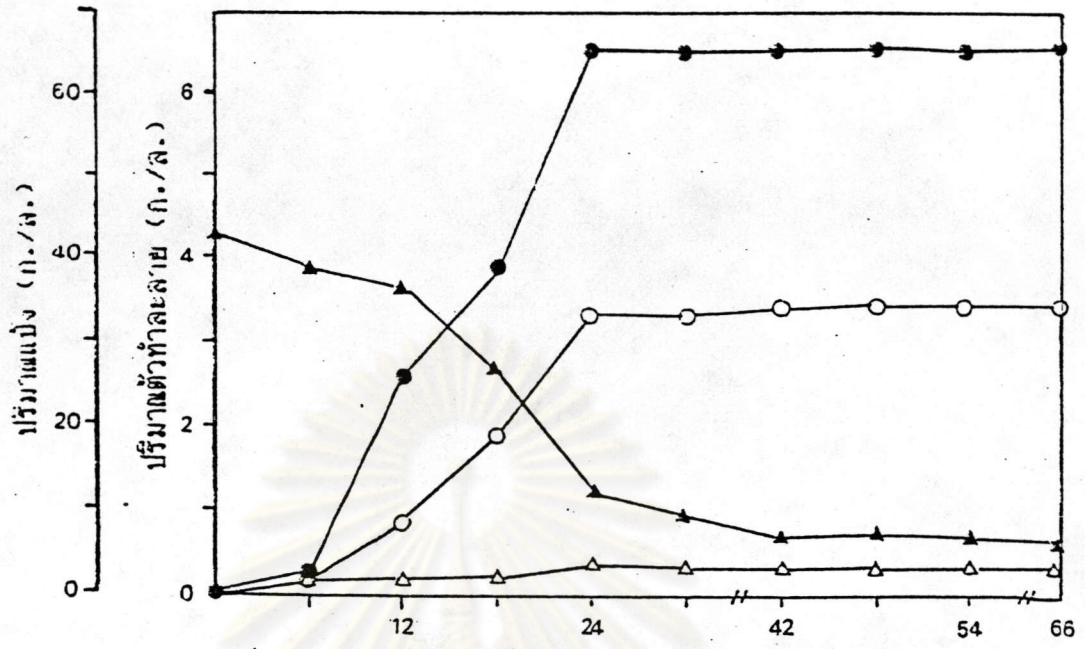
รูปที่ 13 (ข)

รูปที่ 13 ปริมาณตัวทำละลายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5% ที่เติมสารสกัดจากยีสต์ 0.2% อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียล ความเป็นกรดด่าง 6.0 โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2

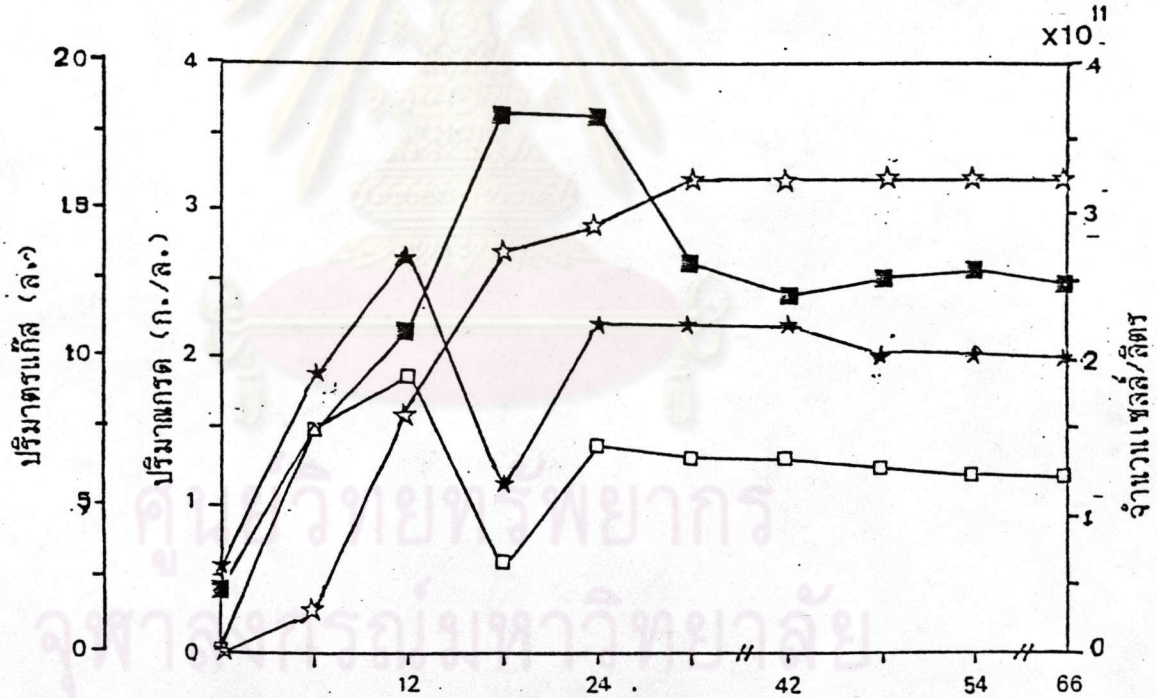
(ก) ● บิวทานอล
○ อาซิโตน
△ เอธานอล

(ข) □ กรดบิวทิริค
★ กรดอะเซติก
☆ ปริมาตรแก๊ส
■ จำนวนเซลล์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 14 (ก)

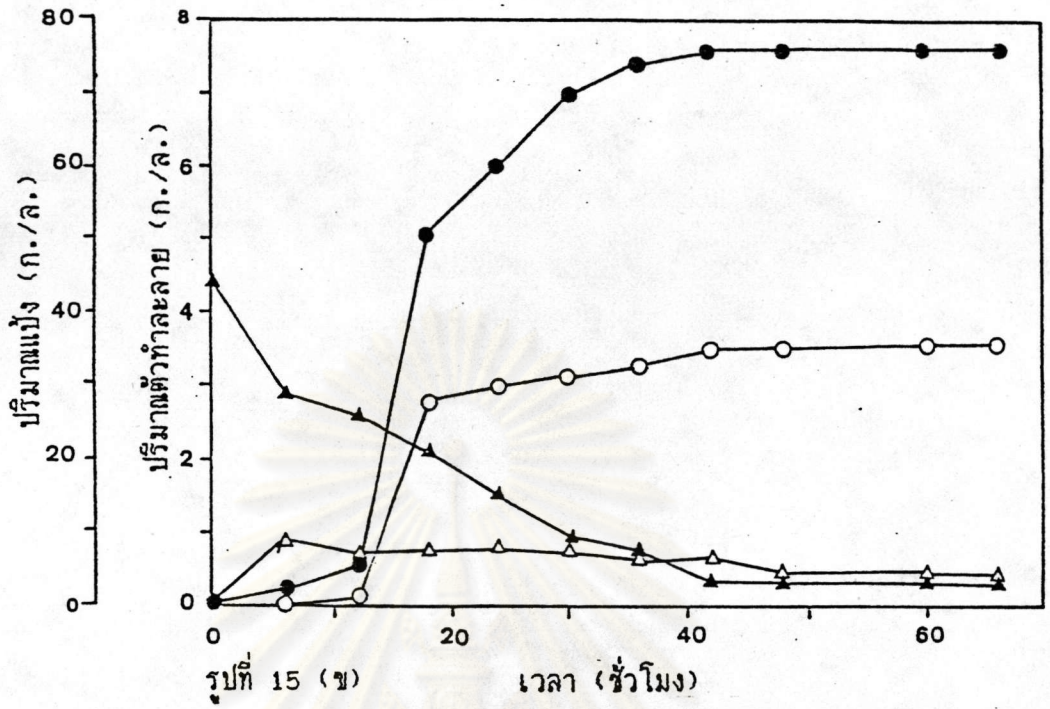


รูปที่ 14 (ข)

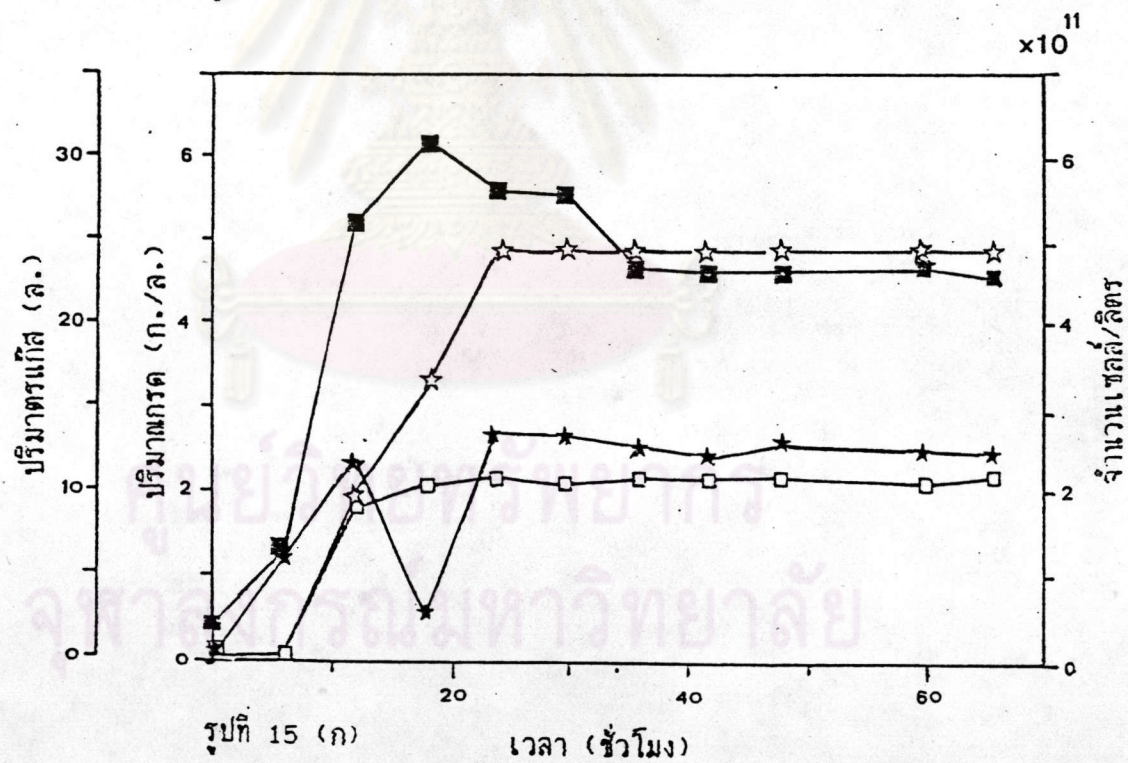
รูปที่ 14 ปริมาณตัวทำละลายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5% ที่เติมสารสกัดจากยีสต์ 0.4% อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่าง 6.0 โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2

(ก) ● บิวทานอล
○ อาซีโตน
△ เอธานอล
▲ ปริมาณแป้ง

(ข) □ กรดบิวทิริค
★ กรดอะเซติก
☆ ปริมาตรแก๊ส
■ จำนวนเซลล์



รูปที่ 15 (ข)

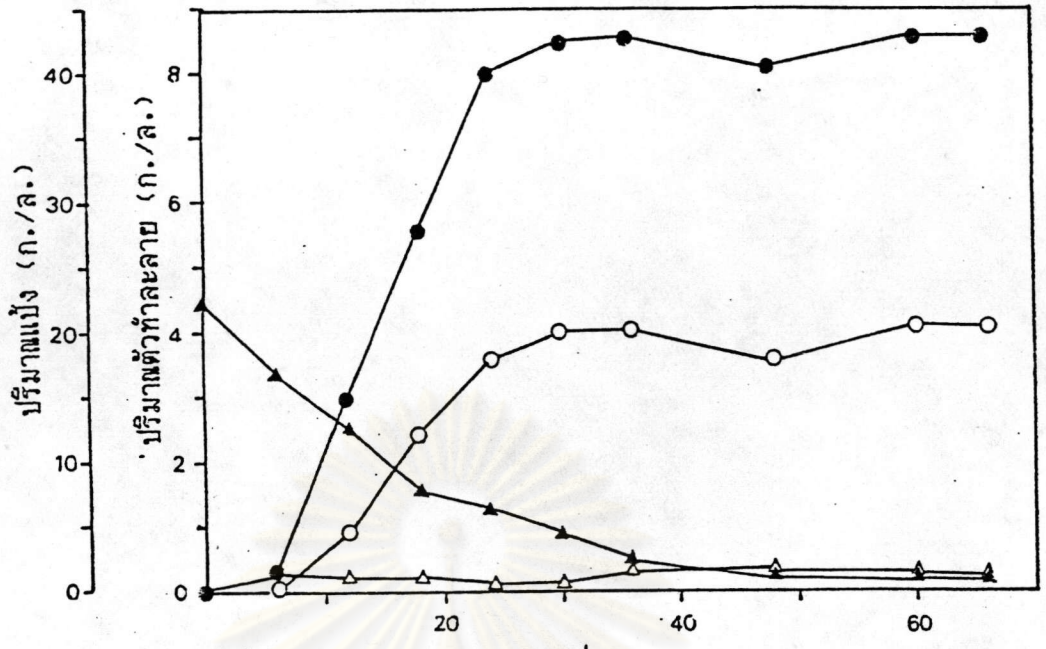


รูปที่ 15 (ก)

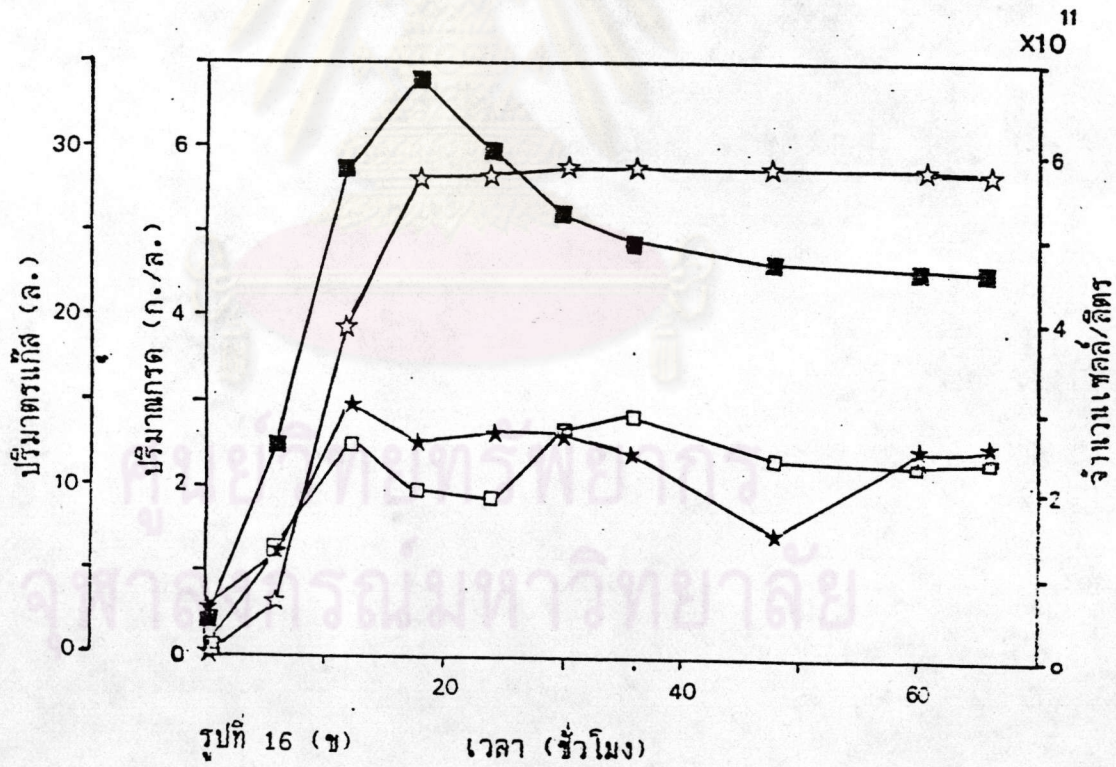
รูปที่ 15 ปริมาณตัวทำละลายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5% ที่เติมสารสกัดจากยีสต์ 0.5% อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่าง 6.0 โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2

(ก) ● บิวทานอล ○ อาซิโตน △ เอธานอล ▲ ปริมาณแป้ง

(ข) □ กรดบิวทิริค ★ กรดอะเซติก ☆ ปริมาตรแก๊ส ■ จำนวนเซลล์



รูปที่ 16 (ก)



รูปที่ 16 (ข)

รูปที่ 16 ปริมาณตัวทำละลายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5% ที่เติมสารสกัดจากยีสต์ 0.8% อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่าง 6.0 โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2

(ก) ● บิวทานอล
○ อาซิโตน
△ เอธานอล
▲ ปริมาณแป้ง

(ข) □ กรดบิวทิริค
★ กรดอะเซติก
☆ ปริมาตรแก๊ส
■ จำนวนเซลล์

3.4.2 ผลของการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกับสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน

โดยทั่วไปในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จะใช้แอมโมเนียมซัลเฟตหรือแอมโมเนียมอะซิเตดเป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณ 0.20-0.22% (21) ในงานวิจัยนี้ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน และพบว่าสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ทำให้คลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2 เจริญเติบโตได้ดี สามารถเพิ่มผลผลิตอาซีโตนและบิวทานอลได้ (ผลการทดลองในข้อ 3.4.1) แต่เนื่องจากสารสกัดจากยีสต์มีราคาแพง การทดลองนี้จึงศึกษาการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ โดยแปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์เป็น 0.2, 0.4, 0.5 และ 0.6% และเสริมสร้างด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 0.2% ในแต่ละการทดลอง ควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 6.0 ผลการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 17, 18, 19 และ 20 และสรุปผลการทดลองไว้ในตารางที่ 13

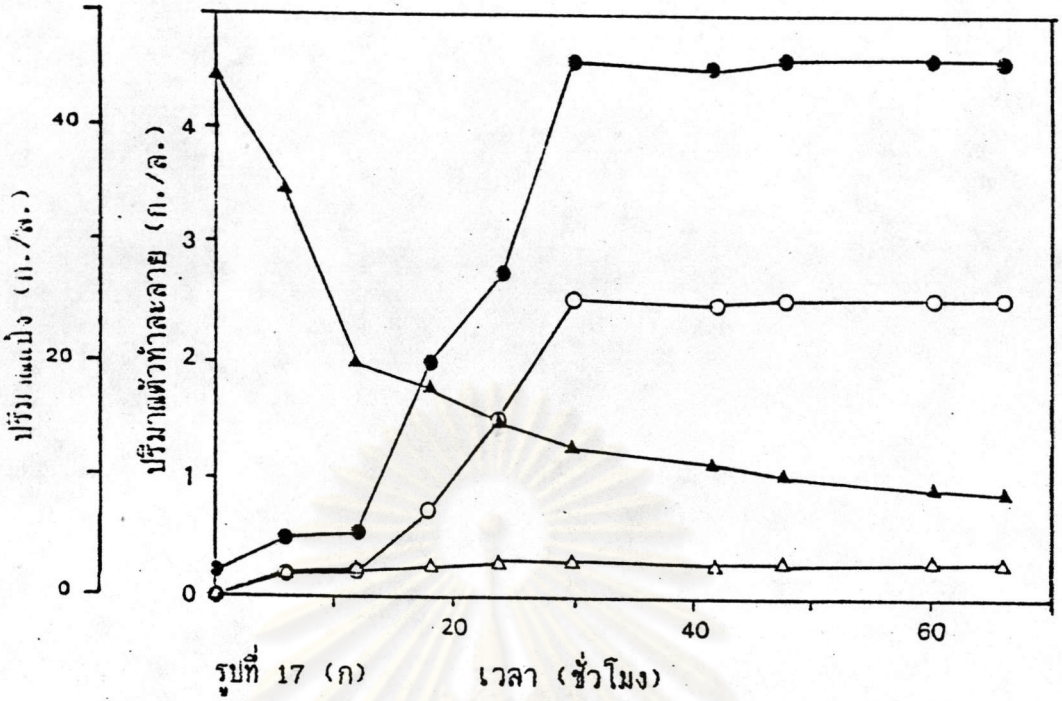
จากผลการทดลองเมื่อเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.2% ร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ 0.2% เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าได้ตัวทำละลายรวมเป็น 8.10 กรัมต่อลิตร และเมื่อเทียบกับการเติมเฉพาะสารสกัดจากยีสต์ 0.2% (ตารางที่ 12) จะเห็นได้ว่าจะได้ตัวทำละลายเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 0.2% แต่การเติมแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 0.2% ร่วมกันกับสารสกัดจากยีสต์ในปริมาณ 0.4, 0.5 และ 0.6% พบว่าจะได้ตัวทำละลายรวมเป็น 10.12, 11.1 และ 11.1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการเติมเฉพาะสารสกัดจากยีสต์เป็น 0.4, 0.5 และ 0.6% (ตารางที่ 12) พบว่าการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.2% จะได้ตัวทำละลายลดลง

จากผลการทดลองในข้อ 3.4.1 และ 3.4.2 สรุปได้ว่าสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนและปัจจัยการเจริญ (growth factor) ที่จำเป็นและเพียงพอสำหรับคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2 ในการผลิตอาซีโตน-บิวทานอลจากแป้งมันสำปะหลัง และไม่สามารถใช้แอมโมเนียมซัลเฟตแทนสารสกัดจากยีสต์ได้

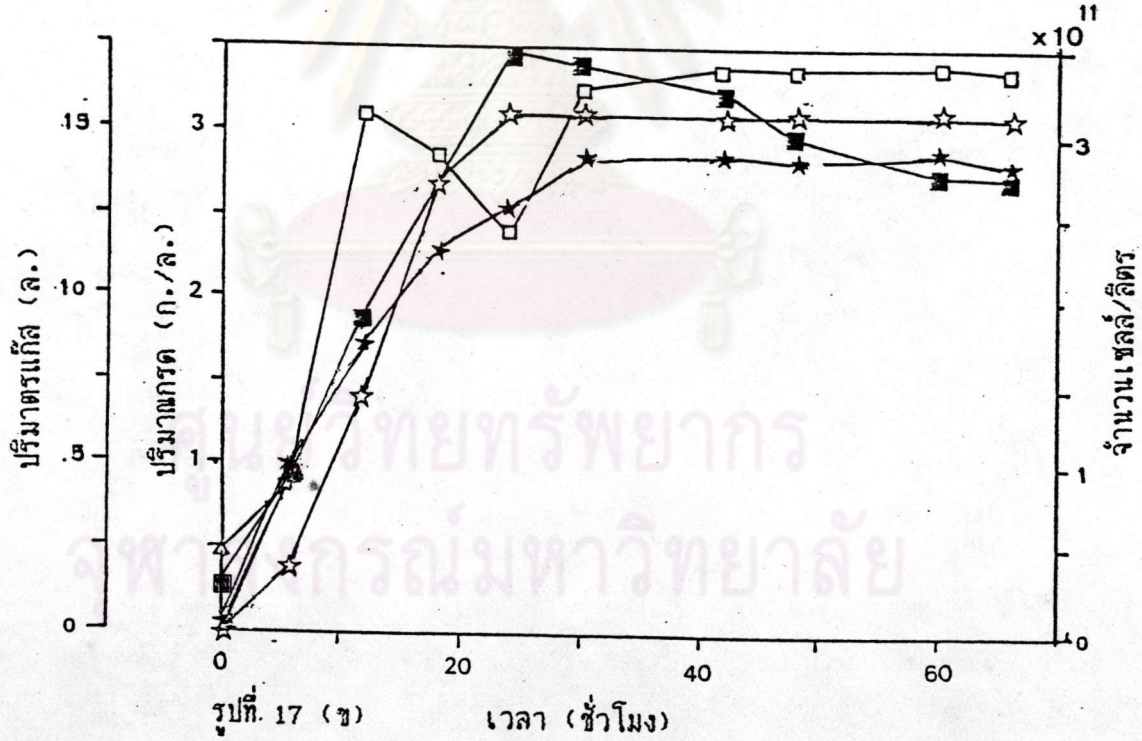
ตารางที่ 13 เปรียบเทียบผลที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5% ที่เติมสารสกัดจากยีสต์เป็น 0.2, 0.4, 0.5 และ 0.6% ตามลำดับ ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต0.2%ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดด่างเป็น 6.0 โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2

	สารสกัดจากยีสต์ + แอมโมเนียมซัลเฟต (%)			
	0.2+0.2	0.4+0.2	0.5+0.2	0.6+0.2
1. ความเข้มข้นสูงสุดของบิวทานอล อาซีโตน เอธานอล (ก./ล.)	4.94,2.89,0.30	6.62,3.27,0.23	7.47,3.28,0.35	7.61,3.27,0.23
2. ความเข้มข้นของกรดอะเซติก และกรดบิวทีริค (ก./ล.)	2.86, 3.30	2.83, 1.41	2.08, 2.78	2.48, 1.0
3. ปริมาณแป้งที่ใช้ไป (ก./ล.)	41.1	47	46.8	46.75
4. ปริมาณเซลล์สูงสุด (จำนวนเซลล์/ลิตร)	3.50×10^{11}	3.33×10^{11}	5.66×10^{11}	5.07×10^{11}
5. ปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นทั้งหมด (ล.)	17.05	19.45	23.35	24.45
6. เปอร์เซนต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์	19.78	21.53	23.71	23.74

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 17 (ก)



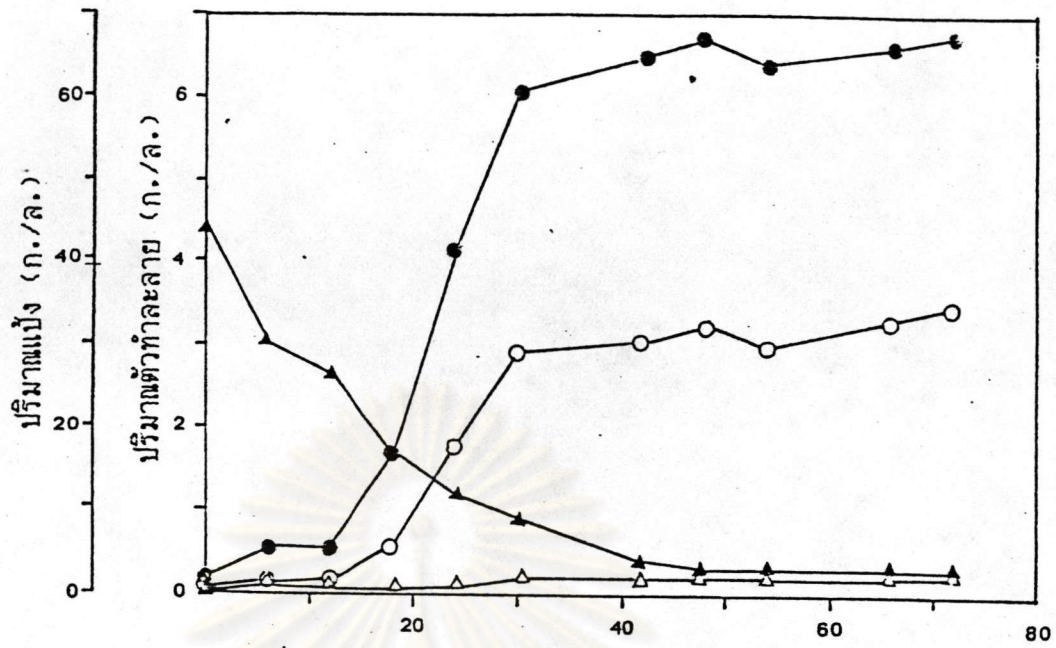
รูปที่ 17 (ข)

รูปที่ 17 ปริมาณตัวทำละลายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5% ที่เติมสารสกัดจากยีสต์ 0.2% และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.2% อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่างเป็น 6.0 โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2

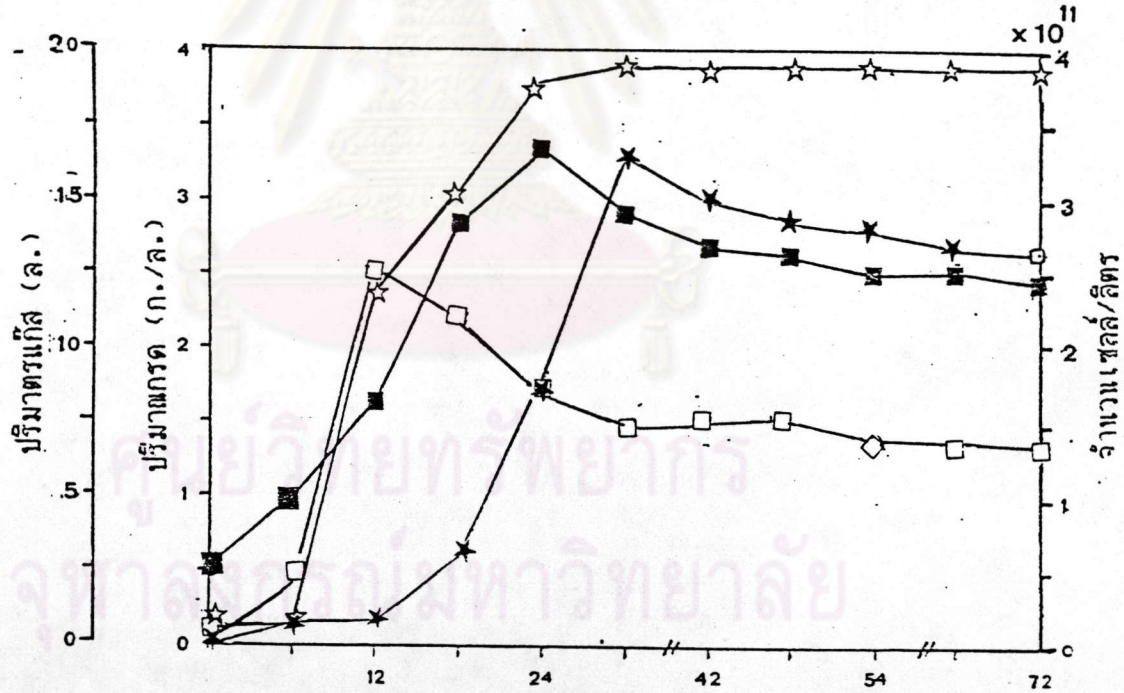
(ก) ● บิวทานอล
○ อาซีโตน
△ เอธานอล
▲ ปริมาณแป้ง

(ข) □ กรดบิวทิริค
★ กรดอะเซติก
☆ ปริมาตรแก๊ส
■ จำนวนเซลล์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 18 (ก) เวลา (ชั่วโมง)

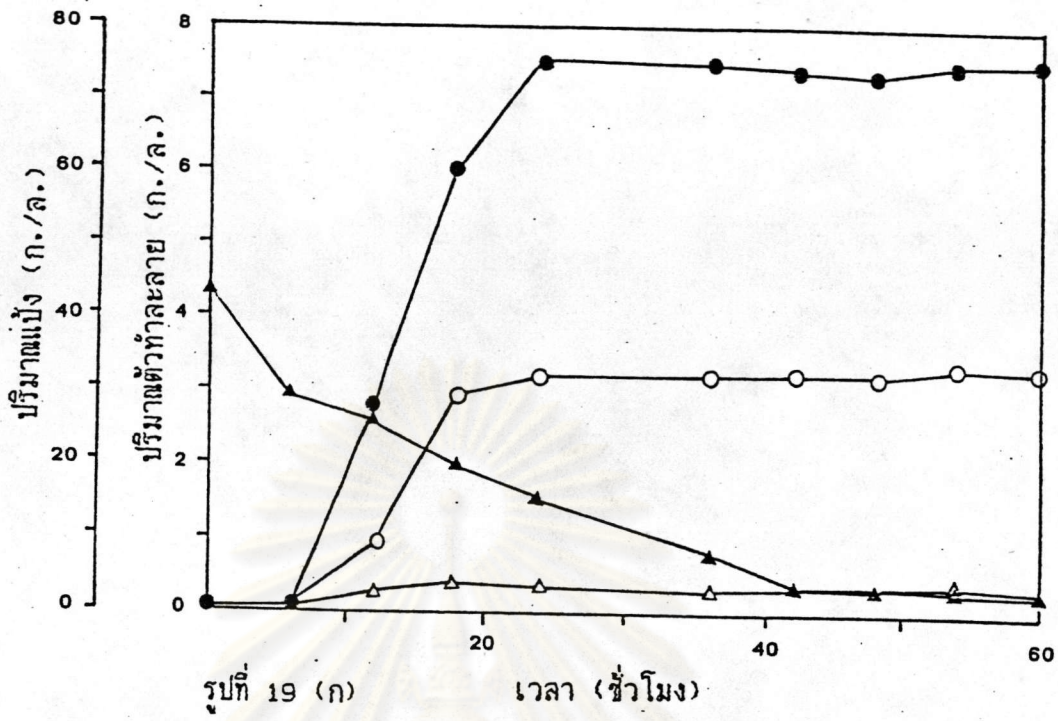


รูปที่ 18 (ข) เวลา (ชั่วโมง)

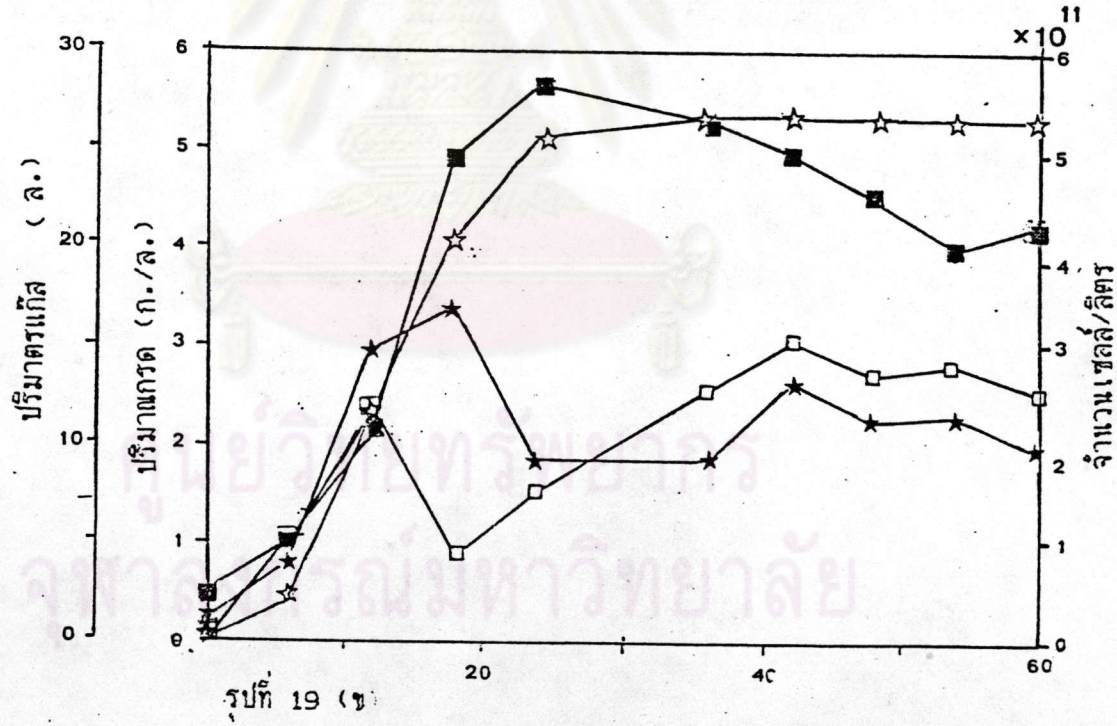
รูปที่ 18 ปริมาณตัวทำละลายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5% ที่เติมสารสกัดจากยีสต์ 0.4% และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.2% อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่างเป็น 6.0 โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2

(ก) ● บิวทานอล
○ อาซิโตน
△ เอธานอล
▲ ปริมาณแป้ง

(ข) □ กรดบิวทิริค
✱ กรดอะเซติก
☆ ปริมาตรแก๊ส
■ จำนวนเซลล์



รูปที่ 19 (ก)

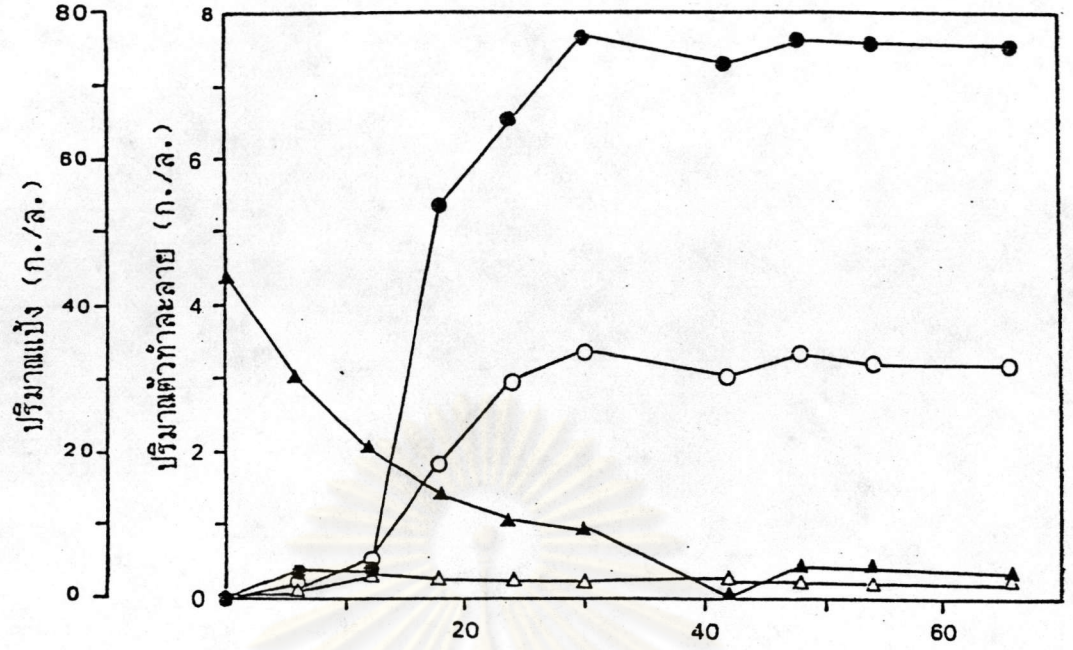


รูปที่ 19 (ข)

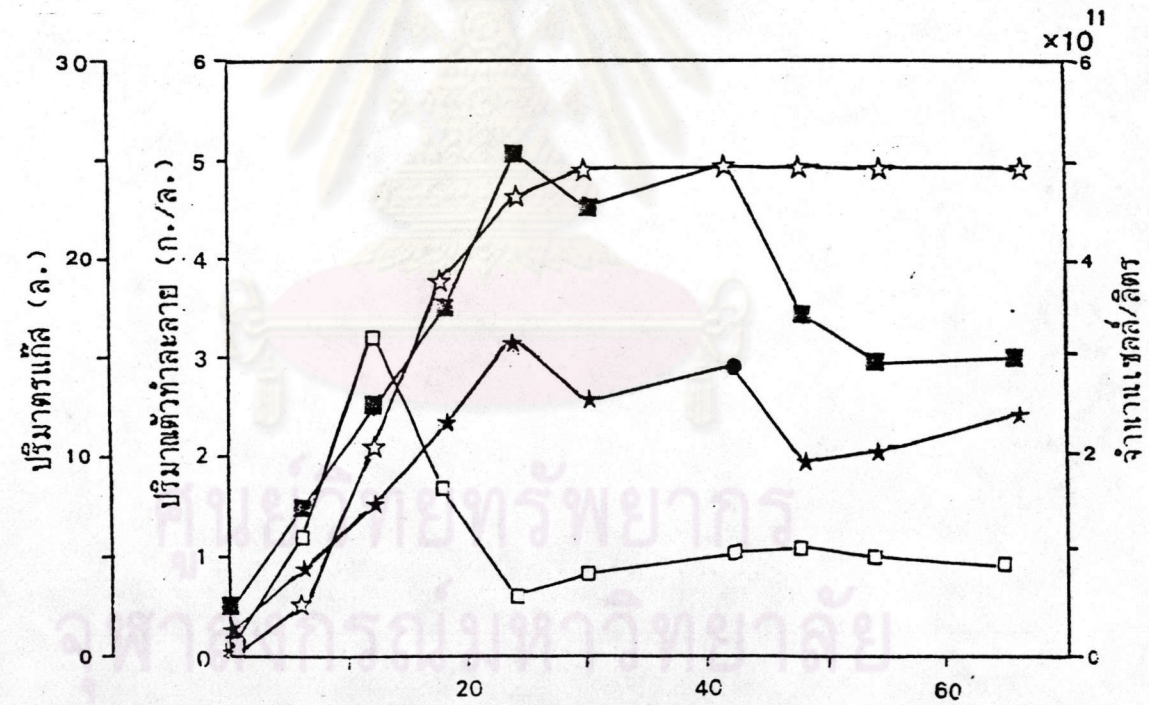
รูปที่ 19 ปริมาณตัวทำละลายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5% ที่เติมสารสกัดจากยีสต์ 0.5% และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.2% อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่างเป็น 6.0 โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2

(ก) ● บิวทานอล
○ อาซีโตน
△ เอธานอล
▲ ปริมาณแป้ง

(ข) □ กรดบิวทิริค
★ กรดอะเซติก
☆ ปริมาตรแก๊ส
■ จำนวนเซลล์



รูปที่ 20 (ก)



รูปที่ 20 (ข)

รูปที่ 20 ปริมาณตัวทำละลายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5%
ที่เติมสารสกัดจากยีสต์ 0.6% และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.2%
อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่างเป็น 6.0
โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2

(ก) ● บิวทานอล
○ อาซีโตน
△ เอธานอล
▲ ปริมาณแป้ง

(ข) □ กรดบิวทิริค
✶ กรดอะเซติก
☆ ปริมาตรแก๊ส
■ จำนวนเซลล์

3.5 ผลของแมกนีเซียมซัลเฟต($MgSO_4.7H_2O$) ต่อการผลิตอาซิโตน-บิวทานอล

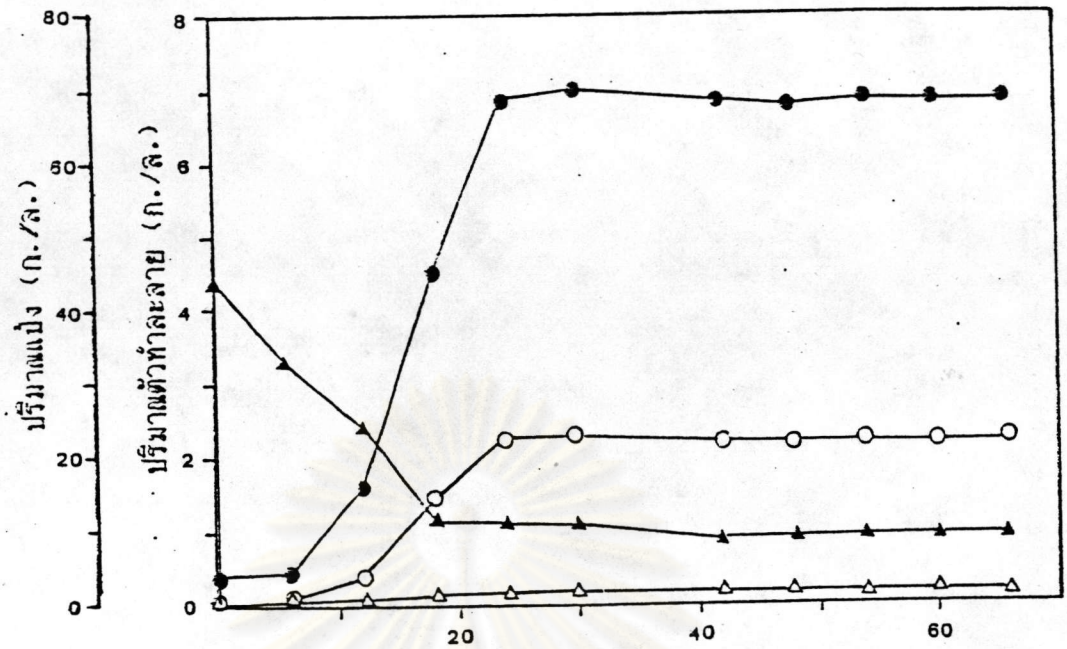
ผลของแมกนีเซียมซัลเฟตต่อการผลิตอาซิโตน-บิวทานอล โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก. หมายเลข 3) ที่มีปริมาณแป้ง 5% ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ 0.5% หมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 6.0 ผลการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 21, 19, 22 และ 23 และตารางที่ 14

พบว่า แมกนีเซียมซัลเฟตมีผลต่อการผลิตอาซิโตน บิวทานอล และการเจริญเติบโตของเซล เมื่อไม่เติมแมกนีเซียมในอาหารเลี้ยงเชื้อจะได้ตัวทำละลายรวมเป็น 9.26 กรัมต่อลิตร และให้ปริมาณกรดรวม 6.57 กรัมต่อลิตร ปริมาณแป้งที่ถูกใช้ไปเหลือ 40.5 กรัมต่อลิตร % การเปลี่ยนแป้งเป็นตัวทำละลายเป็น 22.86 ปริมาณแมกนีเซียมที่เหมาะสมต่อการผลิตอาซิโตน-บิวทานอล และการเจริญเติบโตคือ 0.03% ให้ตัวทำละลายสูงสุดคือ 14.03 กรัมต่อลิตร % การเปลี่ยนแป้งเป็นตัวทำละลายเป็น 29.22 การเจริญเติบโตของคลอสตริเดียมสูงสุดคือ 9.85×10^{11} เซลล์ต่อลิตร ปริมาณแก๊สสูงสุด 31.25 ลิตร

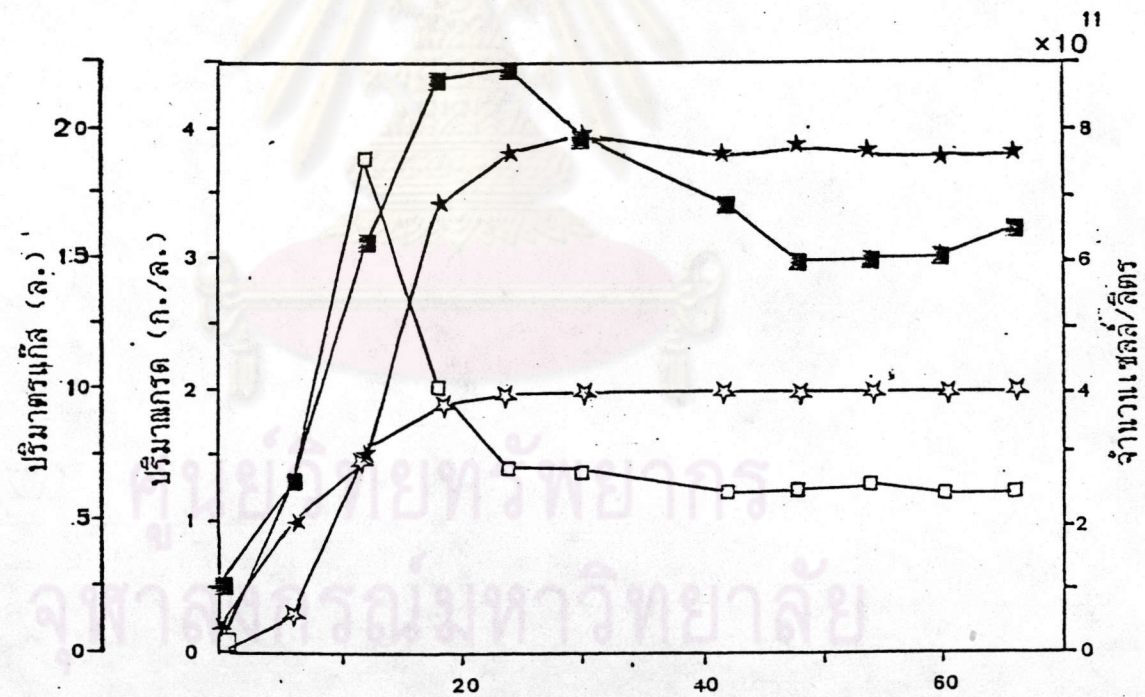
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบผลที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5 เปอร์เซนต์ ที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟตเป็น 0.00, 0.02, 0.03 และ 0.04% ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่างเป็น 6.0 โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2

	ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต (%)			
	0.00	0.02	0.03	0.04
1. ความเข้มข้นของบิวทานอล อาซีโตน เอธานอล (ก./ล.)	6.84,2.23,0.19	7.60,3.50,0.64	9.82,3.95,0.26	8.13,3.27,0.17
2. ความเข้มข้นของกรดอะเซติก และกรดบิวทิริค (ก./ล.)	3.81 2.76	2.15 2.53	1.46 0.69	1.42 2.76
3. ปริมาณแป้งที่ใช้ไป (ก./ล.)	40.5	47.0	48.0	48.0
4. ปริมาณเซลล์สูงสุด (จำนวนเซลล์/ลิตร)	4.49×10^{11}	6.16×10^{11}	9.85×10^{11}	9.35×10^{11}
5. ปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้นทั้งหมด (ล.)	9.90	24.05	31.25	34.75
6. เปอร์เซนต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์	22.86	25.00	29.22	25.06



รูปที่ 21 (ก)

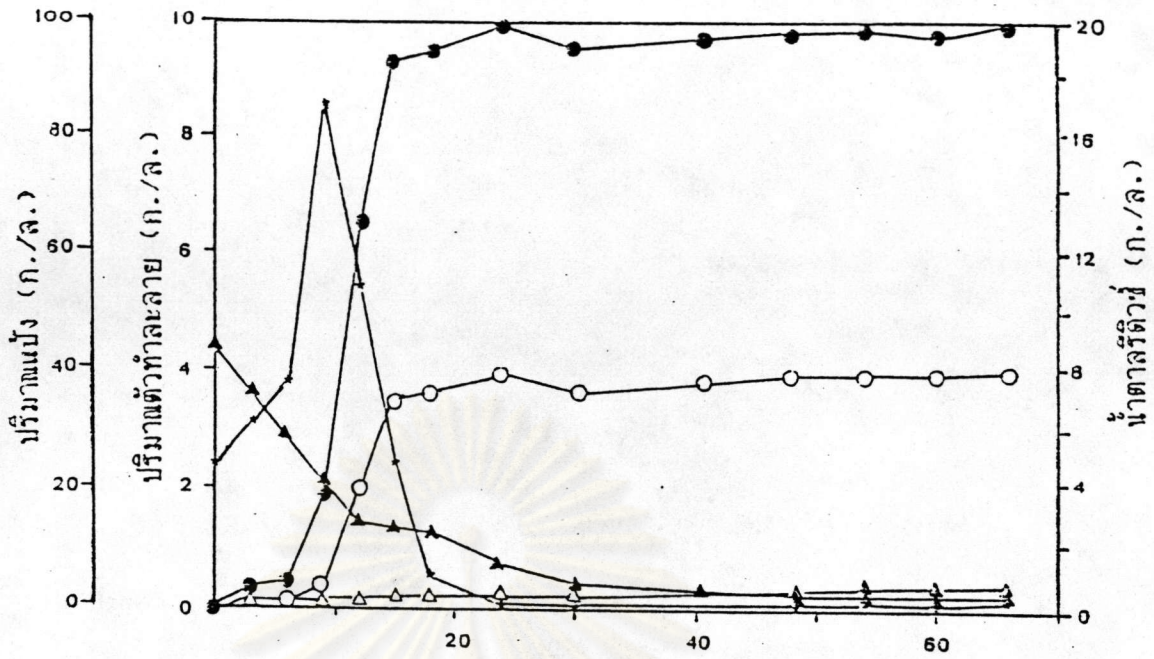


รูปที่ 21 (ข)

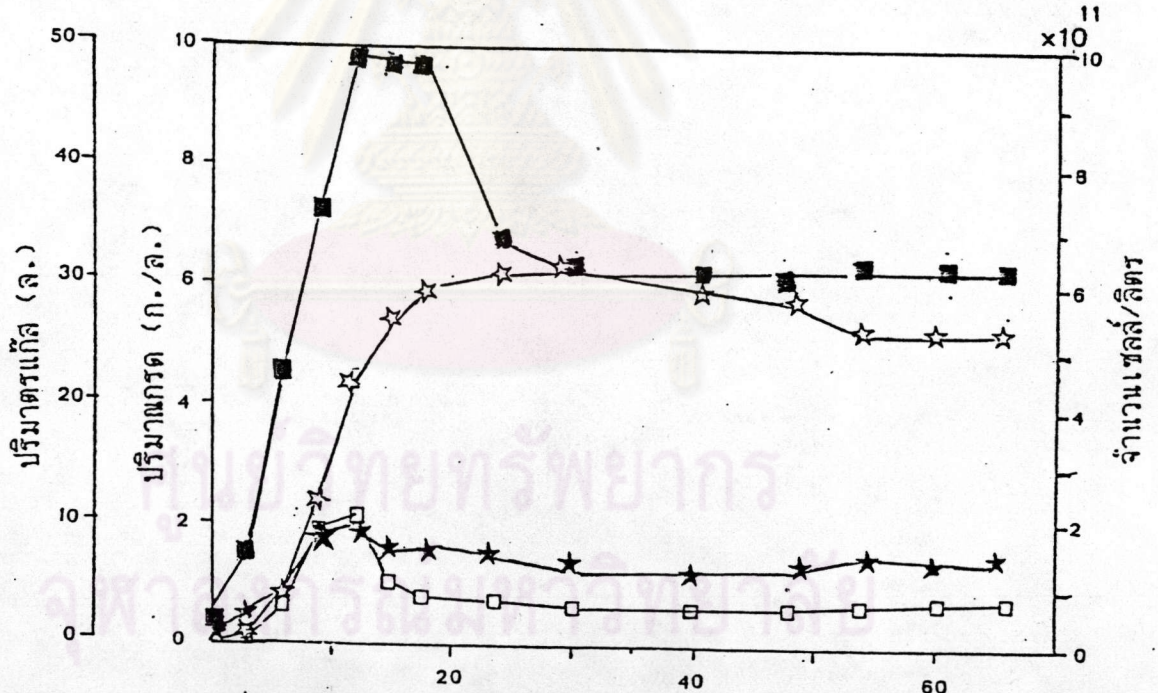
รูปที่ 21 ปริมาณตัวทำละลายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5% ที่เติมสารสกัดจากยีสต์ 0.5% และไม่เติมแมกนีเซียมซัลเฟส อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่างเป็น 6.0 โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2

(ก) ● บิวทานอล
○ อาซิโตน
△ เอธานอล
▲ ปริมาณแป้ง

(ข) □ กรดบิวทิริค
★ กรดอะเซติก
☆ ปริมาตรแก๊ส
■ จำนวนเซลล์



รูปที่ 22 (ก)

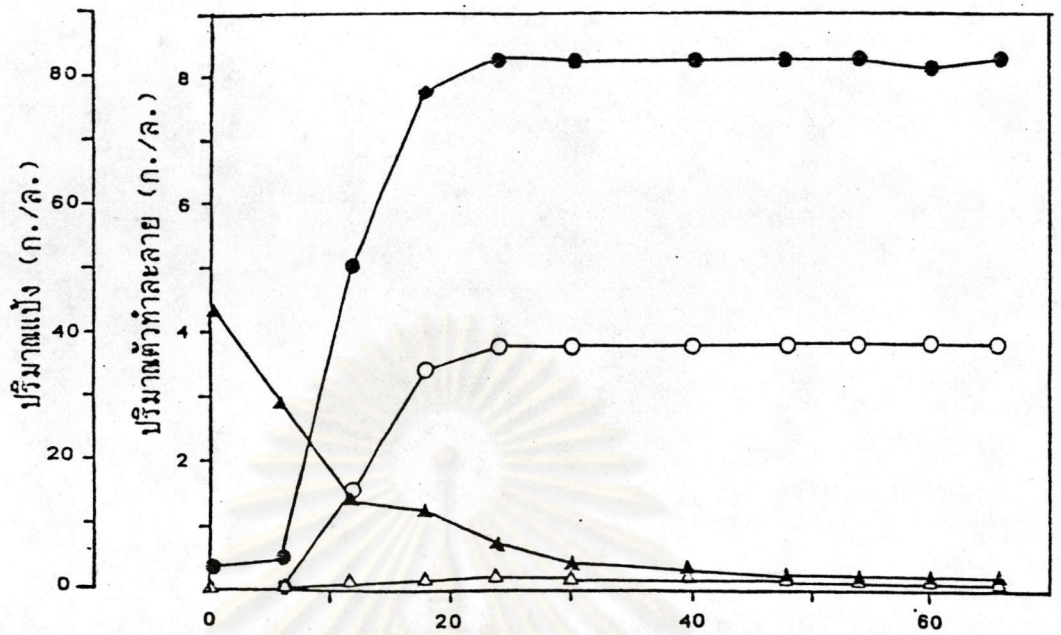


รูปที่ 22 (ข)

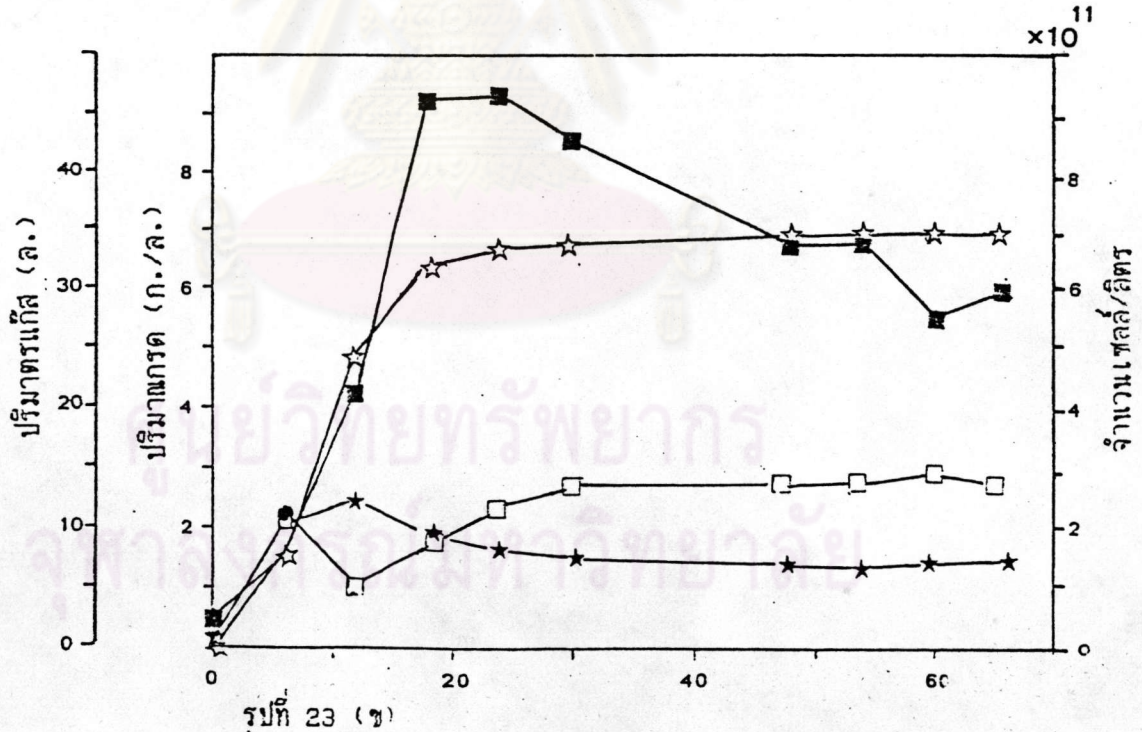
รูปที่ 22 ปริมาณตัวทำละลายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5% ที่เติมสารสกัดจากยีสต์ 0.5% และเติมแมกนีเซียมซัลเฟส 0.03% อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่างเป็น 6.0 โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2

(ก) ● บิวทานอล
○ อาซีโตน
△ เอธานอล
▲ ปริมาณแป้ง
★ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

(ข) □ กรดบิวทิริค
★ กรดอะเซติก
☆ ปริมาตรแก๊ส
■ จำนวนเซลล์



รูปที่ 23 (ก)



รูปที่ 23 (ข)

รูปที่ 23 ปริมาณตัวทำละลายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5% ที่เติมสารสกัดจากยีสต์ 0.5% และเติมแมกนีเซียมซัลเฟส 0.04% อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่างเป็น 6.0 โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2

(ก) ● บิวทานอล
○ อาซีโตน
△ เอธานอล
▲ ปริมาณแป้ง

(ข) □ กรดบิวทิริค
★ กรดอะเซติก
☆ ปริมาตรแก๊ส
■ จำนวนเซลล์

4. ผลการศึกษาพฤติกรรมการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา การผลิตอาซิโตน-บิวทานอล ของคลอสตริเดียมสายพันธุ์ BP-2

ผลการศึกษาพฤติกรรมการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา การผลิตอาซิโตน-บิวทานอล ในสภาวะการหมักที่เหมาะสมคือ อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก. หมายเลข 3) ที่มีปริมาณแป้งมันสำปะหลัง 5% สารสกัดจากยีสต์ 0.5% แมกนีเซียมซัลเฟต 0.03% ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 6.0 แสดงไว้ในรูปที่ 22 การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาแสดงไว้ในตารางที่ 15 และองค์ประกอบของแก๊สแสดงไว้ในตารางที่ 16

พบว่า คลอสตริเดียมสายพันธุ์ BP-2 เจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในระยะ 12 ชั่วโมงแรก ฟองแก๊สเริ่มปรากฏในชั่วโมงที่ 3 และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว รูปร่างของเซลล์รูปแท่งเคลื่อนที่เร็วใน 3 ชั่วโมงแรก และหยุดเคลื่อนที่ในชั่วโมงที่ 9 คลอสตริเดียมใช้แป้งโดยย่อยสลายอย่างรวดเร็ว ตรวจพบน้ำตาลรีดิวซ์ในปริมาณสูงในน้ำหมัก และเริ่มสร้างกรดทำละลาย ปริมาณกรด (บิวทิริค อะเซติก) จะถูกสร้างขึ้นในปริมาณสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 และคลอสตริเดียมเริ่มสะสมกลานูโลสภายในเซลล์ เซลล์โตขึ้น

ในชั่วโมงที่ 12-18 การเจริญเติบโตของคลอสตริเดียมเริ่มคงที่ เซลล์ทั้งหมดมีรูปร่างโตขึ้น เรียกลักษณะนี้ว่า Clostridiel form หรือรูปร่างแบบซิการ์ (ciger) อัตราการใช้แป้งลดลง น้ำตาลรีดิวซ์น้อยลง ในระยะนี้คลอสตริเดียมจะสร้างอาซิโตน-บิวทานอล อย่างรวดเร็ว ปริมาณกรดจะลดลง

ในชั่วโมงที่ 18-24 เซลล์หยุดการเจริญเติบโต (จำนวนเซลล์จะคงที่ ปริมาตรแก๊สรวมจะสูงสุด) เซลล์จะสร้างสปอร์ภายในเซลล์ซึ่งมีรูปร่างแบบซิการ์ อัตราการสร้างอาซิโตน-บิวทานอลเริ่มคงที่ ปริมาณกรดที่ลดลงจะคงที่

ในชั่วโมงที่ 24-30 เซลล์จะสลายตัวเอง (autolysis) เหลือแต่สปอร์อิสระ การสร้างอาซิโตน-บิวทานอลจะคงที่

ตารางที่ 15 การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2 ตามระยะเวลา ในระหว่างการหมัก

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	สัณฐานวิทยา
0-3	เซลล์รูปร่างเป็นแท่ง เคลื่อนที่รวดเร็ว
3-9	เซลล์รูปร่างแท่ง เริ่มเคลื่อนที่ช้าลง และไม่เคลื่อนที่ในชั่วโมงที่ 9
9-12	เซลล์เริ่มสะสมกลานูโลส เซลล์เริ่มโตขึ้น
12-18	ลักษณะเซลล์จะเป็นแบบ Clostridial form คือ เซลล์จะพองออก หรือเรียกรูปร่างนี้ว่า "cigar shaped"
18-24	เซลล์เริ่มสร้างสปอร์ภายในเซลล์ที่มีรูปร่างแบบ cigar
24 -> 30	เซลล์เริ่มสลายตัว (lysis) และจะเป็นสปอร์อิสระในชั่วโมงที่ 30

ตารางที่ 16 องค์ประกอบของแก๊สตามระยะเวลา ที่ได้จากการหมักเพื่อผลิตอาซีโตน-บิวทานอล โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาตรรวมของแก๊ส	องค์ประกอบ(%โดยปริมาตร)	
		H_2	CO_2
0	0	0	0
6	15.00	61.75	38.25
12	22.50	53.00	46.50
18	29.75	24.00	76.00
24	31.00	12.25	88.00

5. การจำแนกชนิดของคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2

คลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2 เมื่อเลี้ยงในอาหารโพเตโต เด็กโตรส อาร์กา อายุเชื้อ 48 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญที่ศึกษา คือลักษณะโคโลนี สีโคโลนี ขนาดของโคโลนี ลักษณะและตำแหน่งของสปอร์ การสร้างกลานูโลส (granulose) การติดสีกรัม ผลการศึกษาแสดงไว้ในตารางที่ 17 และผลการศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยาแสดงไว้ในตารางที่ 18

ตารางที่ 17 ลักษณะสัณฐานวิทยาและลักษณะการเจริญของคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2

ลักษณะที่ศึกษา	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
1. รูปร่างโคโลนี	โคโลนีกลม ขอบไม่เรียบ
2. ขนาดของโคโลนี	เส้นผ่าศูนย์กลาง 1-3 มม.
3. สีของโคโลนี	สีครีม หรือขาวอมเทา
4. รูปร่างและตำแหน่งสปอร์	สปอร์รูปไข่ (oval) อยู่ค่อนไปทางปลาย (subterminal)
5. การสร้างกลานูโลส (granulose)	สะสมกลานูโลสภายในเซล
6. การติดสีกรัม	กรัมบวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 18 ลักษณะทางสรีระวิทยาของคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2

ลักษณะที่ศึกษา	ลักษณะทางสรีระวิทยา
1. การสร้างเอนไซม์คะตาเลส	ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส
2. ความสัมพันธ์กับออกซิเจน	ไม่ต้องการออกซิเจน (Anaerobe)
3. การย่อยเจลาติน	ไม่ย่อยสลายเจลาติน
4. การรีดิวซ์ไนเตรต	ไม่รีดิวซ์ไนเตรด
5. การเคลื่อนที่ของเซลล์	เซลล์เคลื่อนที่
6. การใช้สารคาร์โบไฮเดรต	
เป็นแหล่งคาร์บอน	
แป้ง	ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้
กลูโคส	"
แรฟฟิโนส	"
ดูซิทอล	"
ไซโลส	"
ทรีฮาโลส	"
แลคโตส	"

จากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะบางประการทางสรีระวิทยาของคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2 นำมาเปรียบเทียบกับหลักการจำแนกแบคทีเรียตามหลักการของ Bergey (30) พบว่าคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2 มีลักษณะต่างๆ บางประการที่ได้ศึกษาคล้ายกันกับ Clostridium butylicum อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถจัดจำแนกชนิดของคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2 ได้