

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Probiotic

ความหมายและคำจำกัดความของ Probiotic (วิศัย พรหมเทพ และสุภา ยศตะโคตร, 2553 อ้างอิงมาจาก Fuller, 1992)

ถูกนำมาใช้เป็นครั้งแรกในรายงานการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ของ Lilly และ Stillwell ในปี พ.ศ. 2508 เพื่อกล่าวถึงสารที่จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งขับออกมาและช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งซึ่งเป็นการทำงานที่ตรงข้ามกับการทำงานของยาปฏิชีวนะ (antibiotic) ที่จะทำลายจุลินทรีย์เกือบทุกชนิด

ในปีพ.ศ. 2517 Parker ได้ให้คำจำกัดความว่าโปรไบโอติกคือสิ่งมีชีวิตและสารเคมีที่มีผลต่อสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้คำจำกัดความล่าสุดซึ่งเสนอโดย Fuller ในปีพ.ศ. 2532 อธิบายคำว่าโปรไบโอติกคืออาหารเสริมซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตสามารถก่อประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่โดยการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในร่างกายคำว่าจุลินทรีย์ (micro-organism) หมายถึงสิ่งมีชีวิตซึ่งส่วนใหญ่มีขนาดเล็กมากจนมองด้วยตาเปล่าไม่เห็นที่อาจมีโทษหรือมีประโยชน์ต่อเราก็ได้แบ่งออกได้เป็น 4 ชนิดใหญ่ๆคือ ไวรัส ราหรือยีสต์ แบคทีเรียและพาราไซต์ ไวรัสเป็นจุลินทรีย์ที่มีขนาดเล็กที่สุดได้แก่ เชื้อเอดส์และงูสวัดเป็นต้น ราหรือยีสต์ได้แก่ โรคผิวหนังที่ขึ้นตามที่อับชื้นมักทำให้มีอาการคัน พาราไซต์ได้แก่ เชื้อไข้มาเลเรีย แบคทีเรียน่าจะเป็นคำที่รู้จักแพร่หลายมากที่สุดในบรรดาจุลินทรีย์ที่กล่าวมาแล้ว ตัวอย่างของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค ได้แก่ เชื้อวัณโรคเชื้อที่ทำให้เจ็บคอ หรือเชื้อที่ทำให้เราท้องเสียจากอาหารเป็นพิษเป็นต้น

แต่ยังมีแบคทีเรียที่ดีมีประโยชน์ต่อร่างกายเราได้แก่ แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกได้ซึ่งอาจเรียกว่าแลคติกแอซิดแบคทีเรียได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* *Enterococcus faecalis* *Streptococcus thermophilus* และ *Bifidobacterium bifidum* ซึ่งแบคทีเรียที่มีประโยชน์เหล่านี้จะอาศัยอยู่ในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ของเราตั้งแต่เราเกิดเป็นทารก ทำหน้าที่ช่วยย่อยอาหารและผลิตสารอาหารที่ดีมีประโยชน์ให้กับเราได้แก่ กรดอะมิโน กรดแลคติก พลังงาน วิตามินเค วิตามินบี และสารปฏิชีวนะธรรมชาติหลายชนิด (ธารารัตน์ ศุภศิริ, 2542)

จุลินทรีย์ Probiotic (วิศัย พรหมเทพ และสุภา ยศตะโคตร, 2553 อ้างอิงมาจาก Fuller, 1992)

จุลินทรีย์ Probiotic ไม่จำเป็นจะต้องเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ แต่ควรเป็นจุลินทรีย์ที่ส่งผลให้เกิดประโยชน์ต่อมนุษย์และสัตว์ ดังนั้นจึงมีการศึกษาจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆที่สามารถส่งเสริมสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ให้ดีขึ้น ได้แก่ แบคทีเรียสร้างกรดแลคติก และยีสต์ โดยแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียที่มีสมบัติเป็น Probiotic มากที่สุด แบคทีเรียสร้างกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารและส่งผลให้เกิดประโยชน์ในระบบ

นิเวศวิทยาของสัตว์ ดังนั้นแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกจึงมีความเหมาะสมเป็นอย่างยิ่งที่จะนำมาใช้เป็น Probiotic ดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่พบว่ามีการใช้เป็น Probiotic

<i>Lactobacillus species</i>	<i>Bifidobacterium species</i>	Other LAB	“Non-lactics” ^a
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Ent. Faecalis</i> ^b	<i>Bacillus cereus (toyoi)</i> ^b
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Ent. Faecium</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Sporolactobacillus</i>	<i>Propionibacterium</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>inlinus</i>	<i>freundenreichii</i> ^b
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. infantis</i>		<i>Saccharomyces</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. lactis</i> ^c		<i>cerevisiae (boulardii)</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. longum</i>		
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhammosus</i>			

^a ใช้ในการเตรียมยา ^b ใช้กับสัตว์ ^c Synonymous กับ *B. animalis*

ที่มา : Holzapfel *et al.* (2002)

คุณสมบัติ Probiotic

จุลินทรีย์จะนำมาผลิตเป็น Probiotic ต้องมีคุณสมบัติดังนี้ (วิศัย พรหมเทพ และ สุภา ยศตะโคตร, 2553 อ้างอิงมาจาก Salminen *et al.*, 1998a)

1. จุลินทรีย์ที่ใช้เป็น Probiotic ต้องผ่านการพิสูจน์แล้วว่าเป็นสายพันธุ์ที่ปลอดภัย (GRAS=Generally Recognized As Safe) จุลินทรีย์ Probiotic ที่ปลอดภัยต้องมีลักษณะดังต่อไปนี้ (วิศัย พรหมเทพ และสุภา ยศตะโคตร, 2553 อ้างอิงมาจาก Salminen *et al.*, 2000)

- แหล่งที่มาในการแยกเชื้อต้องเป็นแหล่งที่มีความปลอดภัย เมื่อตรวจสอบสกุล (genus) และสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ในเบื้องต้นต้องพบว่าเป็นสายพันธุ์ที่ปลอดภัย
- เป็นจุลินทรีย์ที่ไม่สร้างสารพิษ
- มีการยึดติดของจุลินทรีย์ภายในระบบทางเดินอาหาร
- จุลินทรีย์สายพันธุ์ที่เป็น Probiotic ต้องมีความสัมพันธ์กับเชื้อจุลินทรีย์หรือสายพันธุ์ชนิดเดียวกับแบคทีเรียประจำถิ่นในสัตว์เจ้าบ้าน

2. สามารถทนต่อน้ำดีและความเป็นกรดในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เจ้าบ้าน รวมทั้งสามารถดำรงชีวิตอยู่ในระบบทางเดินอาหารได้

Probiotic เป็นจุลินทรีย์ที่ต้องทางผ่านและอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ที่บริโภค Probiotic เข้าไป ในสภาวะแวดล้อมแรกที่สุดผลกระทบต่อการทำงานของ Probiotic คือ สภาวะแวดล้อมในกระเพาะอาหารที่มีความเป็นกรดเบสต่ำ และการหลั่งน้ำดีในลำไส้เล็กสามารถทำลายผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ ซึ่งมีส่วนประกอบส่วนใหญ่เป็นสารประเภทไลปิด และกรดไขมัน ดังนั้น Probiotic จึงต้องสามารถที่จะทนต่อน้ำดีและความเป็นกรดในทางเดินอาหารของสัตว์ได้ ความสามารถทนต่อน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติกมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายประการ

3. สามารถยึดติดกับผนังลำไส้ของสัตว์เจ้าบ้าน และแข่งขันการยึดติดกับจุลินทรีย์ก่อโรค การยึดติดของจุลินทรีย์กับผนังลำไส้ของสัตว์เจ้าบ้านเป็นปัจจัยหนึ่งในการคัดเลือกจุลินทรีย์ Probiotic นอกเหนือจากคุณสมบัติการทนต่อกรด น้ำดี และการต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรค เนื่องจาก การยึดติดกับลำไส้ทำให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถเพิ่มจำนวนได้ภายในระบบทางเดินอาหาร กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์เจ้าบ้านช่วยในการซ่อมแซมผนังทางเดินอาหาร และต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรค

การศึกษาแบบจำลองการยึดติดผนังลำไส้ของ Probiotic ในสัตว์เจ้าถิ่นมีวิธีการศึกษาหลายวิธี แต่ที่นิยม คือ ศึกษาเกี่ยวกับชั้นของเยื่อผนังลำไส้ เนื่องจากการยึดติดของ Probiotic จะเกิดขึ้นที่บริเวณชั้นของเยื่อผนังลำไส้ เยื่อผนังลำไส้ที่นำมาทำการศึกษามีได้จากแหล่งต่างๆ เช่นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เซลล์ไลน์ Caco-2 และ HT-29 ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับเซลล์ไขมัน แต่สามารถหลั่งเยื่อ (mucus) ผนังลำไส้ได้ เนื้อเยื่อบริเวณลำไส้หรืออุจจาระเป็นต้น

การแข่งขันการยึดติดบนเยื่อทางเดินอาหารของแบคทีเรีย Probiotic สามารถยึดติดกับลำไส้แบบเฉพาะเจาะจงและแบบไม่เฉพาะเจาะจง การยึดติดแบบเฉพาะเจาะจงจะเกิดขึ้นก็ต่อเมื่อแบคทีเรียเกาะยึดติดกับบริเวณจำเพาะ (receptor) ของเยื่อผนังลำไส้เท่านั้น ส่วนการยึดติดแบบไม่เฉพาะเจาะจงจะเป็นการยึดติดโดยอาศัยลักษณะการมีขั้ว (hydrophobic) หรือโดยแรงไฟฟ้าสถิต (วิศัย พรหมเทพ และสุภา ยศตะโคตร, 2553 อ้างอิงมาจาก Lonson and Conway, 1992)

4. ความสามารถในการเพิ่มจำนวนในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ได้มากโดยมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นน้อย

5. ผลิตภัณฑ์ต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรคที่เป็นจุลินทรีย์ภายในระบบทางเดินอาหาร

- กรดอินทรีย์ (Organic acid)

ได้มีการศึกษาการใช้ *L. salivarius* และ *L. plantarum* ที่เป็น Probiotic ทางการค้าสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Escherichia coli* *Salmonella typhimurium* และ *Clostridium perfringens* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผลิตจากอาหารไก่ได้ โดยพบว่า ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรสดังกล่าวเป็นผลสืบเนื่องมาจากแบคทีเรีย *L. salivarius* และ *L. plantarum* มีการหมักสารอาหารพวกคาร์โบไฮเดรต แล้วผลิตกรดอะซิติก กรดโพรไพโอนิก และกรดแลคติกเพิ่ม

มากขึ้น ความเป็นกรดและเบส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผลิตจากอาหารไกลดลง ทำให้แบคทีเรียก่อโรคไม่สามารถเจริญได้ (วิศิษฐ์ พรหมเทพ และสุภา ยศตะโคตร, 2553 อ้างอิงมาจาก Murry *et al.*, 2004)

- ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide)

ในสภาวะที่มีออกซิเจนแบคทีเรียกรดแลกติกสามารถผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นสารออกซิไดซ์ มีผลทำให้โปรตีนในชั้นไขมันของเซลล์เมมเบรน และโปรตีนภายในเซลล์ของแบคทีเรีย โครงสร้างของกรดนิวคลีอิกและโปรตีนในเซลล์เปลี่ยนไป จนไม่สามารถทำหน้าที่ได้ พบว่า ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.12 มิลลิโมล/ลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม *Lactococci* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อความเข้มข้นมากกว่า 1.5 มิลลิโมล/ลิตร จะทำให้เซลล์ตาย

- คาร์บอนไดออกไซด์ (Carbondioxide)

กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของคาร์บอนไดออกไซด์เกิดจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เข้าไปแทนที่ก๊าซออกซิเจน ทำให้ความเป็นกรดเบสทั้งภายในและภายนอกเซลล์ลดลง ทำให้จุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนไม่สามารถเจริญเติบโตและตายในที่สุด

6.ทนต่ออุณหภูมิสูง

การผลิต Probiotic ในระดับอุตสาหกรรมโดยส่วนใหญ่จะใช้วิธีการ Spray- dried ผสมกับอาหาร และส่วนประกอบต่างๆ เนื่องจากสะดวกในการรักษาและขนส่ง แต่ในขั้นตอนของการผลิต Probiotic ซึ่งใช้ความร้อนสูง ส่งผลให้เซลล์เกิดการสูญเสีย

สารเสริมชีวิต

เป็นผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์หรือจุลินทรีย์ซึ่งใช้เป็นอาหารได้โดยตรงหรืออาจใช้เป็น Food หรือ Feed additives สำหรับมนุษย์และสัตว์ได้ โดยมีคำจำกัดความหมายถึง "A live microbial feed supplement which beneficially affects the host animal by improving its intestinal microbial balance" (วิศิษฐ์ พรหมเทพ และสุภา ยศตะโคตร, 2553 อ้างอิงมาจาก Fuller *et al.*, 1992) โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตสารเสริมชีวิตอยู่ในกลุ่ม *Lactobacilli* *Streptococci* และ Yeast สารเสริมชีวิตที่ผสมในอาหารสัตว์มีทั้งชนิดที่มีจุลินทรีย์ชนิดเดียวและชนิดที่มีจุลินทรีย์ตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป เช่น *Lactobacillus* sp. กับ *Streptococcus* sp. ทั้งนี้เพื่อให้สามารถได้ประโยชน์จากผลิตภัณฑ์สารเสริมชีวิตสูงสุด จากการศึกษาถึงกลไกการทำงานของจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นสารเสริมชีวิตในอาหารสัตว์ที่มีผลต่อสัตว์นั้นพบว่า น่าจะเกิดจากการไปกีดการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์ ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ในลำไส้ โดยเฉพาะการทำงานของเอนไซม์และช่วยกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ดังตาราง 2 ซึ่งแสดงถึงกลไกที่น่าจะเป็นไปได้ในการทำงานของจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นสารเสริมชีวิตในอาหารสัตว์

ตาราง 2 กลไกการทำงานที่เป็นประโยชน์และโทษของจุลินทรีย์ Probiotic

Response	Proposed mechanisms	Main site of action
Beneficial Suppression of harmful bacteria	(1) production of antibacterial compounds	S and SI
	(2) competition for nutrients	S SI and LI
	(3) competition for colonization sites	S, SI
Microbial/host metabolism	(1) production of enzymes which support digestion (e.g., lactase)	S and SI
	(2) decreased production of ammonia amines or toxic enzymes	S and SI
	(3) improved gut-wall function	SI and LI
Improved immune response of host	(1) increased antibody levels	SI and LI
	(2) increased macrophage activity	SI and LI
Detrimental Competition for nutrients with host	(1) consumption of glucose	S and SI
	(2) consumption of amino acids	S and SI

S = stomach; SI = small intestine; LI = large intestine.

ที่มา : วิศัย พรหมเทพ และสุภา ยศตะโคตร (2553) อ้างอิงมาจาก Fuller *et al.* (1989)

ข้อดีของการใช้สารเสริมชีวนะในอาหารสัตว์

การใช้สารเสริมชีวนะผสมในอาหารสัตว์นั้นพบว่า ช่วยทำให้สัตว์มีการเจริญเติบโตดีขึ้น สัตว์แข็งแรงไม่ป่วย ช่วยลดการใช้จ่ายปฏิชีวนะในสัตว์และยังเป็นการรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร โดยประโยชน์ของการใช้การเสริมชีวนะ มีดังนี้

1. ช่วยให้ระบบย่อยอาหารดีขึ้น และมีการดูดซึมอาหารได้ดีขึ้น
2. ใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตแทนสารปฏิชีวนะ
3. ช่วยป้องกันโรคในสัตว์ เพราะสัตว์มีภูมิคุ้มกันดีขึ้น
4. ช่วยลดปัญหาการดื้อยาในสัตว์ และปัญหาสารตกค้างในเนื้อสัตว์

ลักษณะของจุลินทรีย์ที่จะนำมาใช้เป็นสารเสริมชีวนะ

การนำจุลินทรีย์มาผลิตเป็นสารเสริมชีวนะควรจะต้องคำนึงถึงคุณสมบัติดังนี้

1. เป็นสายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคและไม่เป็นพิษหรือสร้างสารพิษ
2. เป็นสายพันธุ์ที่ทนต่อสภาพกรด ในกระเพาะอาหารและลำไส้และสามารถถูก metabolize ในลำไส้ได้ดี

3. มีความคงตัวและมีชีวิตอยู่ได้ในสภาพการเก็บรักษาและการใช้งานจริงในฟาร์ม
4. ทำให้สัตว์เจริญเติบโตและมีความต้านทานต่อโรคดีขึ้น
5. ไม่ตกค้างในซากสัตว์และไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม
6. สามารถผลิตได้จำนวนมาก ในระดับอุตสาหกรรม

จุลินทรีย์กลุ่ม *Lactobacilli* จัดได้ว่าเป็นจุลินทรีย์ที่ถูกนำมาใช้เป็นสารเสริมชีวนะมากที่สุดและมีคุณสมบัติที่เหมาะสม จากการศึกษาพบว่า *Lactobacillus* sp. มีผลต่อการลดลงของคลอเรสเตอรอลของสัตว์และยังช่วยลดการสร้าง N-compounds ในลำไส้ ซึ่งก่อให้เกิด carcinogen ได้ ดังตาราง 3

ตาราง 3 ผลของจุลินทรีย์ Probiotic ต่อเมตาบอลิซึมของเซลล์เจ้าบ้าน

Target host	Probiotic	Response	Authors
Pigs	<i>L. acidophilus</i>	Decreased serum cholesterol	Gilliland <i>et al.</i> (1985)
Calves	<i>L. acidophilus</i>	Formation of inhibitory bile acids	Gilliland and Speck (1977)
Pigs	<i>L. acidophilus</i>	Decreased amine production	Hill <i>et al.</i> (1970a),
Humans			Goldin and Gorbach (1984)
Humans	<i>L. acidophilus</i>	Decreased production of carcinogenic	Goldin <i>et al.</i> (1980)
		N-compounds	Goldin and Gorbach (1984a)
Rats	<i>L. bulgaricus</i>	Hydrolytic enzymes	Gravie <i>et al.</i> (1984)
Chicks	<i>L. acidophilus</i>	which improve digestion	Champ <i>et al.</i> (1983),
Pigs			Jonsson and Hemmingsson (1991)
Pigs	<i>Lactobacillus</i> sp.	Increased activity of brush-border enzymes	Collington <i>et al.</i> (1990)

ที่มา : วิจัย พรหมเทพ และสุวภา ยศตะโคตร (2553) อ้างอิงมาจาก Salminen *et al.* (1993)

การตรึงเซลล์

ความหมายของเซลล์ที่ถูกตรึง (ปาจารย์ เรื่องกลับ, 2549)

เซลล์ที่ถูกตรึง (Immobilized cells) หมายถึง เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกจำกัดขอบเขตหรือสถานที่ทางฟิสิกส์ให้อยู่ในบริเวณที่ทำให้จุลินทรีย์ไม่สูญเสียความสามารถในการเป็นตัวเร่งและสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้หลายครั้งหรือใช้ได้อย่างต่อเนื่อง โดยเซลล์ที่ถูกตรึงอาจอยู่ในสภาพเซลล์ที่กำลังเจริญเซลล์ระยะพักหรือเซลล์ที่ตายแล้วก็ได้

ประวัติการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ (ปาจริย์ เรื่องกลับ, 2549)

การใช้เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงเริ่มมีมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1823 Schuetzenbach ได้ทำการผลิตน้ำส้มสายชูแบบเร็วโดยใช้ฟิล์มจุลินทรีย์ที่ติดอยู่บนเศษไม้ หลังจากนั้นมาไม่มีผู้สนใจ จนกระทั่งเริ่มมีการพัฒนาเกี่ยวกับการใช้เอนไซม์เพื่อเป็นตัวเร่งในอุตสาหกรรมและมีการศึกษาเกี่ยวกับการตรึงเอนไซม์เพื่อให้ใช้ได้นานและสะดวกขึ้นและทำให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นตัวเร่งในอุตสาหกรรมมากขึ้น

ในปี ค.ศ.1959 Hattori และ Furusaka ได้ตรึงเซลล์ที่มีชีวิตของ *Escherichia coli* และ *Azotobacter agile* โดยยึดไว้บนโตรีกซ์-1 พบว่า เซลล์ที่ถูกตรึงสามารถออกซิไดส์กลูโคสและกรดซัคซินิกได้ ต่อมาในปี ค.ศ.1966 Mosbach ได้ตรึงเซลล์ *Umbilicaria pustulata* ด้วยโพลีอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) พบว่า ความสามารถของเอนไซม์ orsellenic acid decarboxylate ยังคงมีอยู่ในระหว่างการทดลองเป็นเวลานานกว่า 3 เดือน หลังจากนั้นก็มีรายงานเกี่ยวกับเซลล์ที่ถูกตรึงเพิ่มมากขึ้นจนกระทั่งในปี ค.ศ.1973 Chibata ได้ประสบความสำเร็จในการใช้เซลล์ที่ถูกตรึงในอุตสาหกรรมการผลิตกรดแอลแอสพาร์ติกซึ่งนับว่าเป็นอุตสาหกรรมแห่งแรกของโลกที่ใช้ระบบเซลล์ที่ถูกตรึง

ข้อดีและข้อเสียของเซลล์ที่ถูกตรึงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ (ปาจริย์ เรื่องกลับ, 2549)

1. เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อดีคือ สามารถใช้ซ้ำในระบบกะหรือระบบต่อเนื่องได้ง่ายกว่า มีโอกาสปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นได้น้อยลง การแยกผลผลิตทำได้ง่ายกว่าเซลล์ที่ถูกตรึงซึ่งเป็นเซลล์ในระยะพักต้องการพลังงานน้อยเพียงเพื่อรักษาสภาพความอยู่รอดทำให้ได้ผลผลิตสูงกว่าการใช้เซลล์อิสระ

2. เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อเสียคือ เซลล์อาจสูญเสียความสามารถบางส่วนในระหว่างการตรึง

วิธีการตรึงเซลล์ (ปาจริย์ เรื่องกลับ, 2549)

วิธีการตรึงเซลล์จะสามารถทำได้หลายวิธีดังนี้

1. การตรึงเซลล์ด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent binding method) เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรึงเอนไซม์เนื่องจากได้ผลดีแต่ไม่นิยมใช้ในการตรึงเซลล์เนื่องจากจำเป็นต้องใช้สารเคมีซึ่งมักมีพิษจึงอาจทำให้เซลล์ตายและเอนไซม์ถูกทำลายได้ การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้เป็นการเชื่อมเซลล์โดยตรงกับสารพาหะ โดยสารที่ใช้เป็นตัวยึดจับนั้นสามารถเชื่อมต่อกับหมู่อะตอมซึ่งเป็นส่วนประกอบที่ผิวเซลล์เช่น หมู่อะมิโน หมู่คาร์บอกซิล หมู่ไฮดรอกซิล หมู่ซัลฟไฮไดรล หมู่อิมิดาโซล หรือหมู่ฟีนอลของโปรตีน วิธีนี้มีข้อดีคือ เซลล์จะเชื่อมอยู่กับผิวหน้าของตัวนำอย่างสม่ำเสมอมีความคงตัวดีและมีการรั่วไหลของเซลล์ได้น้อย แต่ก็มีข้อเสียคือ การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้ค่อนข้างรุนแรงเนื่องจากการสร้างพันธะโควาเลนต์ตามปกติจำเป็นต้องใช้สารตัวนำที่มีการดัดแปลงโดยใช้สารเคมีซึ่งมักจะมีความเป็นพิษและอาจทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถได้วิธีนี้จึงเหมาะสำหรับการตรึงเซลล์ในกรณีที่

ต้องการเอนไซม์เพียงชนิดเดียวและเอนไซม์ที่ต้องการเป็นเอนไซม์ภายในเซลล์ซึ่งไม่ต้องสัมผัสกับสารเคมีที่ใช้ในระหว่างการเตรียม

2. การตรึงเซลล์ด้วยวิธีการดูดติด (adsorption method) เป็นวิธีการตรึงเซลล์โดยให้เซลล์ดูดซับอยู่กับสารที่เป็นตัวนำของแข็งซึ่งแรงยึดระหว่างเซลล์จุลินทรีย์กับผิวของแข็งอาจจะเป็นพันธะไอออนิก พันธะไฮโดรโฟบิก หรือพันธะไฮโดรเจน โดยอาศัยหลักธรรมชาติทางเคมีเนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียหรือยีสต์ประกอบด้วย diaminopimelic acid และ hexosamine ซึ่งสามารถเกิดแรงดึงดูดระหว่างประจุกับตัวนำที่ใช้ได้โดยแรงดูดซับจะขึ้นอยู่กับขนาดและอายุของเซลล์รวมทั้งปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องกับการตรึงเซลล์วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายแต่แรงดูดซับค่อนข้างอ่อนและมีการสูญเสียเซลล์ได้ง่ายเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่ากรด-ด่าง ความแรงของไอออน การไหลของน้ำ การเกิดฟองอากาศและเมื่อมีการแบ่งเซลล์ ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่เหมาะสำหรับการตรึงเซลล์ในกรณีที่ต้องการผลผลิตที่ปราศจากการปนเปื้อนของเซลล์แต่ก็อาจปรับปรุงแรงดูดซับให้สูงขึ้นได้โดยทำการเชื่อมโยงหลังการดูดซับ นอกจากนี้การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้ยังมีอัตราการดูดซับเซลล์ต่อหนึ่งหน่วยของตัวนำค่อนข้างต่ำแต่ก็อาจแก้ไขได้โดยการใช้สารที่มีรูพรุนเป็นตัวดูดซับ

3. การล้อมรอบด้วยเนื้อเยื่อเหลว (liquid membrane encapsulation) หมายถึงการล้อมรอบเซลล์ด้วยเนื้อเยื่อเหลวเป็นวิธีการตรึงเซลล์ไว้ในหยดของเหลว ทำโดยการผสมสารละลายแขวนลอยของเซลล์เข้ากับสารผสมของน้ำมันเซอร์เฟกแทนท์ สารเพิ่มความแข็งและไอออนที่ช่วยให้มีการขนส่งสารอาหารได้ดีขึ้น กวนผสมด้วยความเร็ว 600 รอบต่อนาที และควบคุมอุณหภูมิของสารผสมไว้ที่ 18 องศาเซลเซียส จะได้อิมัลชันแล้วเทลงในสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในบัฟเฟอร์วิธีนี้สามารถตรึงเซลล์ได้ 500 – 600 เซลล์ในหยดของเหลว

4. การตรึงเซลล์ด้วยวิธีการดักจับ (entrapment) เป็นการดักจับเซลล์ด้วยสารพาหะที่มีลักษณะเป็นเจลซึ่งอาจจะเป็นสารอินทรีย์ที่พบในธรรมชาติหรือได้จากการสังเคราะห์ การตรึงเซลล์โดยวิธีดักจับไว้ในสารพาหะสามารถทำได้หลายวิธีดังนี้ ผสมสารละลายแขวนลอยของเซลล์เข้ากับสารละลายพอลิเมอร์เหลวในภาชนะ จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นและตัดเจลให้มีขนาดเล็กกลึงเป็นรูปลูกบาศก์ วิธีนี้วิธีที่ง่ายแต่ได้ขนาดของเซลล์ตรึงที่ไม่สม่ำเสมอซึ่งจะทำให้สารละลายอาหารไหลผ่านไม่สะดวก เมื่อบรรจุเซลล์ตรึงลงในคอลัมน์ใช้สารผสมของเซลล์กับสารละลายพอลิเมอร์กดผ่านเข็มฉีดยาลงในสารละลายของเกลือทำให้เม็ดพอลิเมอร์คงรูปอยู่ได้วิธีนี้จะให้เม็ดของเซลล์ตรึงมีขนาดสม่ำเสมอแต่วิธีนี้ไม่เหมาะกับการเตรียมในปริมาณมากและเหมาะที่จะใช้กับสารพาหะบางชนิดเท่านั้นสารพาหะที่นิยมใช้กันมากคือ โซเดียมอัลจิเนตและแคปตา-คาร์ราจีแนน

สารพาหะที่ใช้ตรึงเซลล์ (carrier) (ปาจรีย์ เรื่องกลีบ, 2549)

มีสารหลายชนิดที่สามารถใช้จับยึดหรือตรึงเซลล์ได้ซึ่งสารแต่ละชนิดมีความเหมาะสมในการตรึงเซลล์ได้แตกต่างกัน สารเหล่านี้บางชนิดจะมีกลุ่มฟังก์ชันนัลที่สามารถจับกับผนังเซลล์ได้ ในการเลือกใช้สารพาหะเพื่อทำการตรึงเซลล์จะอาศัยการสังเกตประกอบกับความชำนาญ

สารพาหะที่ใช้ในการตรึงเซลล์จุลินทรีย์แบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ สารพาหะที่เป็นสารอินทรีย์และสารพาหะที่เป็นสารอนินทรีย์ (ปาจริย์ เรื่องกลับ, 2549 อ้างอิงมาจาก Kolot *et al.*, 1981) แต่ที่นิยมใช้กันมากคือ สารอินทรีย์เนื่องจากมีกลุ่มฟังก์ชันจำนวนมากที่สามารถทำปฏิกิริยากับกลุ่มต่างๆ ของผนังเซลล์ซึ่งส่วนมากได้แก่กลุ่มอะมิโนคาร์บอกซิลและไฮดรอกซิล

1. สารอินทรีย์

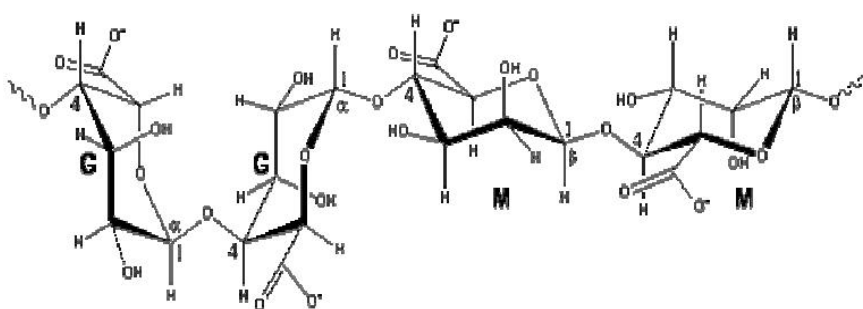
สารอินทรีย์ที่นิยมใช้เป็นพาหะในการตรึงเซลล์จัดแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มคือ พอลิแซ็กคาไรด์ โปรตีน และพอลิเมอร์สังเคราะห์ เทคนิคในการตรึงเซลล์ที่ใช้สารพาหะเหล่านี้คือการดูดติด (adsorption) การยึดโดยใช้พันธะโควาเลนต์ การเชื่อมโยง การดักจับ (entrapment) และการล้อมรอบด้วยเนื้อเยื่อเหลว (liquid membrane encapsulation)

2. สารอนินทรีย์

สารอนินทรีย์ที่ใช้เป็นพาหะในการตรึงเซลล์เป็นสารประกอบออกไซด์ที่พบในธรรมชาติเช่น อลูมินา (alumina) ซิลิกา (silica) แก้วเซรามิกส์ทราย นอกจากนี้ยังมีสารที่เป็นอนุพันธ์ของสารเหล่านี้ซึ่งได้จากปฏิกิริยา coupling กับโลหะ โดยทั่วไปสารพาหะประเภทนี้จะทนต่ออุณหภูมิสูงเมื่อผสมกับตัวทำละลายจะมีลักษณะข้นเหนียวและบริเวณผิวของสารเหล่านี้จะถูกไฮโดรไลซ์ทำให้มีกลุ่มไฮดรอกซิลเกิดขึ้นซึ่งจะสามารถจับเข้ากับกลุ่มคาร์บอกซิลและกลุ่มอะมิโนของผนังเซลล์ได้เทคนิคที่นิยมใช้สารอนินทรีย์เป็นพาหะในการตรึงเซลล์ได้แก่ การดูดติด (adsorption) และการใช้พันธะโควาเลนต์

สารพาหะที่นำมาใช้ในการตรึงเซลล์ในการวิจัยครั้งนี้ (ปาจริย์ เรื่องกลับ, 2549)

อัลจีเนต (alginate) เป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่ใช้กันมาก โครงสร้างของอัลจีเนต ดังภาพ 1



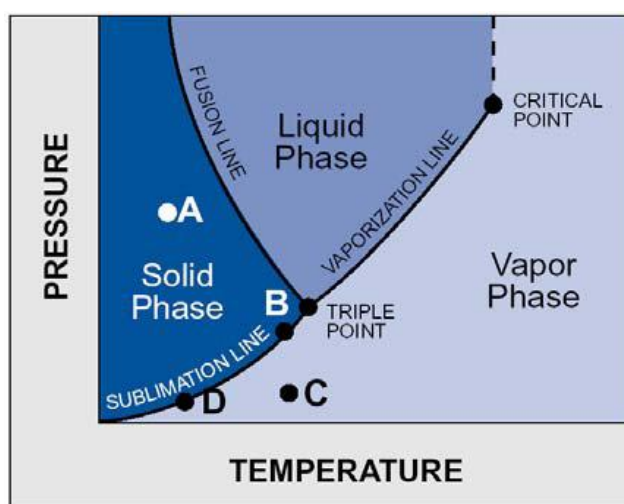
ภาพ 1 โครงสร้างทางเคมีของอัลจีเนต

ที่มา: ปาจริย์ เรื่องกลับ (2549) อ้างอิงมาจาก Chaplin *et al.* (2005)

อัลจีเนตประกอบไปด้วยกลุ่มคาร์บอกซิลในแต่ละหน่วยย่อย (โมโนแซ็กเคอไรด์) ที่จะไปยึดจับกับไอออนของโลหะบางชนิดเช่น แคลเซียมไอออน คอปเปอร์ไอออน เป็นต้น ทำให้ได้เจลที่มีความเสถียรและตรึงเซลล์ได้ในสภาพที่ไม่รุนแรงเป็นผลให้เซลล์ส่วนมากไม่ตายลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่ตรึงจะเป็นเม็ดกลม เติรียมได้โดยการดูดสารละลายผสมของเซลล์กับสารละลายอัลจีเนตผ่านเข็มฉีดยาและรองรับหยดของสารเหล่านี้ด้วยสารละลายของแคลเซียมคลอไรด์ที่เย็น เม็ดเจลที่ได้จะมีความแข็งแรงเนื่องจากแคลเซียมไอออนจะเข้าไปแทนที่โซเดียมไอออนของโซเดียมอัลจีเนต นอกจากนี้ความแข็งแรงของเม็ดเจลจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและชนิดของโซเดียมอัลจีเนต

การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

การทำแห้งในสภาพแช่แข็งเป็นการทำให้อาหารเย็นจนน้ำกลายเป็นน้ำแข็งก่อนนำไประเหิดกลายเป็นไอน้ำโดยไม่ผ่านการกลายเป็นของเหลวภายใต้สภาวะที่เหมาะสมคือความดันต่ำและอุณหภูมิต่ำ เมื่อพิจารณา phase diagram ของน้ำดังภาพ 2 ถ้าน้ำอยู่ในสภาวะที่มีความดันสูงและอุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส จะมีสถานะเป็นของแข็งถ้าลดความดันรอบๆ น้ำแข็งจนเกือบเป็นสุญญากาศ (ต่ำกว่า 4.58 มิลลิเมตรปรอท) น้ำในสภาวะของแข็งจะเปลี่ยนเป็นไอน้ำโดยการระเหิดจากหลักการนี้ สามารถนำไปใช้ทำให้อาหารแห้งได้โดยนำอาหารมาแช่เย็นที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุด triple point ของสารละลายในอาหาร สารละลายในอาหารจะกลายเป็นน้ำแข็งแล้วนำอาหารแช่แข็งที่ได้ไปไว้ในสภาวะที่มีความดันต่ำที่มีการควบคุมให้คงที่หลังจากนั้นจะเกิดการระเหิดของน้ำแข็งในเนื้ออาหารหรือสารละลายที่แข็งตัวอย่างต่อเนื่องตลอดเวลาจนกระทั่งน้ำที่อยู่ในอาหารเกือบทั้งหมดถูกถ่ายเทออกไปอาหารก็จะแห้ง ซึ่งการระเหิดของน้ำแข็งนี้ต้องใช้ความร้อนจำนวนหนึ่งเท่ากับ heat of sublimation ของน้ำ (ประมาณ 1,200 btu/lb. ของน้ำ)



ภาพ 2 phase diagram ของน้ำบริสุทธิ์

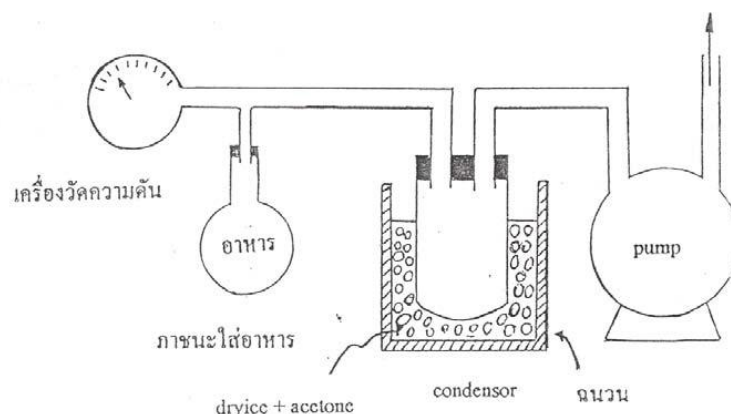
ที่มา : Van Arsdel (1973)

ในขบวนการทำแห้งในวิธีการนี้ต้องใช้การระเหิดของน้ำจากแหล่งความร้อนซึ่งความร้อนจะถ่ายเทเข้าไปยังผิวของชิ้นน้ำแข็งในชิ้นอาหารได้โดยวิธีการต่างๆ เช่น การนำหรือการแผ่รังสีความร้อนและไอน้ำที่เกิดจากการระเหิดจะถ่ายเทออกมาและถูกจับโดยเครื่องควบแน่นอุณหภูมิต่ำ (refrigerated condenser)

อุปกรณ์ในการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Van Arsdel, 1973)

เครื่องมือประกอบด้วยส่วนสำคัญ 4 ส่วนคือ

1. ภาชนะสำหรับใส่อาหาร (chamber or shelves) ที่ใช้แช่แข็งและแข็งตัวแล้ว
2. คอนเดนเซอร์ (condenser) เป็นส่วนที่มีอุณหภูมิต่ำมากทำหน้าที่เป็นตัวจับไอน้ำที่เกิดจากการระเหิดของน้ำแข็งในชิ้นอาหารโดยไอน้ำจะควบแน่นกลายเป็นน้ำแข็งเกาะอยู่ที่คอนเดนเซอร์โดยอุณหภูมิของคอนเดนเซอร์จะถูกควบคุมด้วยอุปกรณ์ซึ่งประกอบด้วยภาชนะจุ่มอยู่ในสารทำความเย็นเช่นน้ำแข็งแห้งผสมกับอะซิโตนและมีฉนวนล้อมรอบเพื่อควบคุมอุณหภูมิไม่ให้เกิน - 50 องศาเซลเซียส
3. ปั๊ม (pump) ทำหน้าที่ดูดอากาศและไอน้ำบางส่วนที่ไม่ถูกจับไว้โดยคอนเดนเซอร์ออกไปเพื่อให้ภายในเครื่องมีความดันต่ำและคงที่ตลอดเวลา
4. เครื่องวัดความดันภายในเครื่อง (gauge) เนื่องจากการทำแห้งในสภาพแช่แข็งเกิดในสภาวะที่เกือบเป็นสุญญากาศ ดังนั้นเครื่องมือทุกส่วนจะต้องปิดสนิทไม่มีรูรั่วซึ่งอาจตรวจได้จากการอ่านค่าความดันในเครื่องถ้าความดันเพิ่มขึ้นไม่คงที่ ณ ค่าที่ตั้งไว้แสดงว่ามีรอยรั่วทำให้อากาศเข้าไปได้ดังภาพ 3



ภาพ 3 เครื่องมืออย่างง่ายของวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง
ที่มา : Van Arsdel (1973)

ขั้นตอนของการทำแห้งในสภาพแช่แข็ง (Van Arsdel, 1973)

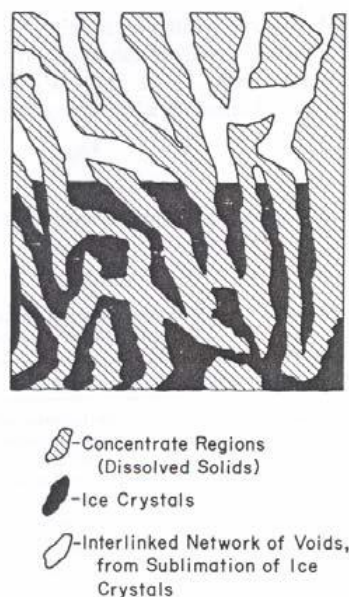
การทำแห้งในสภาพแช่แข็ง ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนใหญ่ๆ คือ การแช่แข็ง (freezing stage) และการทำแห้ง (freeze drying)

ก. การแช่แข็ง (freezing stage)

การแช่แข็งเป็นการทำให้สารละลายหรือน้ำเกือบทั้งหมดที่มีอยู่ในอาหารถูกเปลี่ยนสถานะกลายเป็นของแข็ง ซึ่งทำโดยการลดอุณหภูมิของเซลล์ให้ต่ำกว่าจุดเยือกแข็งของสารละลายที่อยู่ในเซลล์โดยทั่วไปแล้วน้ำที่เป็นส่วนประกอบในเซลล์จะมีส่วนประกอบอื่นๆ เช่น โปรตีนละลายอยู่ซึ่งส่งผลให้สารละลายในเซลล์ เหล่านี้มีจุดเยือกแข็งต่ำกว่าน้ำบริสุทธิ์เมื่อนำเซลล์มาทำให้เย็นลงจนต่ำกว่าจุดเยือกแข็งของน้ำ (0 องศาเซลเซียส) น้ำจะแยกตัวออกกลายเป็นผลึกน้ำแข็ง ผลึกน้ำแข็งนี้เกิดมาจากน้ำบริสุทธิ์เมื่อน้ำแยกน้ำออกมาจะทำให้สารละลายที่เหลือมีความเข้มข้นสูงขึ้น จุดเยือกแข็งของน้ำที่มีสารละลายอื่นปนจึงมีจุดเยือกแข็งต่ำลงไป โดยเซลล์จะเริ่มแข็งตัวจากด้านนอกเข้าไปหาจุดศูนย์กลางผลึกน้ำแข็งจะเกิดมากที่สุดระหว่างอุณหภูมิ -0.8 ถึง -5 องศาเซลเซียส การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิระยะนี้จะเป็นอย่างช้าๆหลังจากนี้จึงเปลี่ยนแปลงไปอย่างรวดเร็ว อัตราเร็วในการแช่แข็งจะได้ผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่และมีปริมาตรเพิ่มขึ้นมากจึงเกิดการดันผนังเซลล์ให้แตกได้ทำให้โครงสร้างของเซลล์เสียไป ถ้านำเซลล์ไปแช่แข็งอย่างช้าๆมาทำให้ละลายจะได้เนื้อเซลล์ที่มีลักษณะเหลวและในทางตรงกันข้ามอัตราการแช่แข็งที่เร็วจะได้ผลึกน้ำแข็งที่เล็กเป็นจำนวนมากจึงนิยมทำการแช่แข็งอย่างรวดเร็ว ในการแช่แข็งจะมีน้ำในเซลล์อยู่จำนวนเล็กน้อยที่ไม่ได้กลายเป็นผลึกน้ำแข็งแม้ว่าจะทำให้อุณหภูมิลดต่ำลงถึง -40 องศาเซลเซียส น้ำในส่วนนี้เรียกว่า bound water มีหน้าที่กั้นโมเลกุลของโปรตีนไม่ให้มาอยู่ใกล้กันเกินไปโดยยึดกับโมเลกุลของโปรตีนด้วยพันธะไฮโดรเจนถ้ามีการแยก bound water ออกจะทำให้โมเลกุลของโปรตีนที่อยู่ใกล้กันจะรวมตัวกันด้วยแรงดึงดูดไฟฟ้าสถิต (electrostatic force) และเกิดพันธะอิกซันระหว่างโมเลกุลของโปรตีน ทำให้อาหารเกิดการหดตัวและกระด้าง ดังนั้นการแช่แข็งโดยทั่วไปจะมีเฉพาะน้ำที่เป็นอิสระ (free water) เท่านั้นที่กลายเป็นน้ำแข็ง

ข. การทำแห้ง (freeze drying)

เป็นการกำจัดความชื้นในรูปของน้ำแข็งเกือบทั้งหมดที่มีอยู่ในเซลล์ออกไปภายใต้สภาวะที่ควบคุมไว้โดยหลังจากเซลล์ถูกแช่แข็งแล้วความชื้นในรูปน้ำแข็งจะถูกระเหิด (sublimation) กลายเป็นไอน้ำเรียกขั้นตอนนี้ว่า “primary drying stage” ซึ่งมีการเคลื่อนที่ออกไปจากเซลล์ และอีกส่วนหนึ่งคือน้ำที่ไม่ได้อยู่ในรูปที่แข็งตัวนั้นจะมีการเคลื่อนที่ออกไปอยู่ใน condenser ในรูปน้ำแข็ง ซึ่งเรียกขั้นตอนนี้ว่า “secondary drying stage” ดังภาพ 4 การระเหิดของน้ำออกจากเซลล์



ภาพ 4 ลักษณะโครงสร้างของอาหารเหลวที่มีการทำแห้งด้วยวิธีการอบแห้งแบบแช่เยือกแข็ง
ที่มา : Van Arsdel (1973)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปาจริย์ เรืองกลับ (2549) ได้ศึกษาการยืดอายุของโปรไบโอติกสำหรับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำโดยใช้เทคนิคการดักจับโดยแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* LP 64 ซึ่งเป็นโปรไบโอติก มีการคัดเลือกสารพาหะที่ใช้ในการดักจับจากพอลิเมอร์ 4 ชนิด คือ โซเดียมอัลจีเนต ไคโทซานคาร์ราจีแนน เซลลูโลส และอะซิเตต พบว่าโซเดียมอัลจีเนตเป็นสารพาหะที่เหมาะสมที่สุดในการดักจับ *Lactobacillus plantarum* LP 64 และใช้สารละลายโซเดียมอัลจีเนตความเข้มข้น 3 % ความเร็วการกวน 800 รอบต่อนาที เมื่อศึกษาอายุการเก็บรักษาของเม็ดผสมแป้งข้าวเจ้า แป้งมันสำปะหลัง และแป้งข้าวโพดก่อนทำแห้งด้วยเครื่องฟลูอิดไรเซอร์แบบแปรผันเวลาในการทำแห้ง 15 30 และ 45 นาที จากนั้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสสามารถเก็บรักษาเม็ดเชื้อทั้ง 3 ชนิดได้นานกว่า 180 วันและยังคงความสามารถการผลิตกรดสูง ส่วนเม็ดเชื้อที่เก็บที่อุณหภูมิห้องสามารถเก็บรักษาเม็ดเชื้อได้นาน 60 วันแต่ความสามารถการผลิตกรดลดลงตามระยะเวลาในการเก็บ นอกจากนี้เม็ดเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีปริมาณความชื้นสูงกว่าเม็ดเชื้อที่เก็บรักษา ณ อุณหภูมิห้องเล็กน้อย เนื่องจากเม็ดเชื้อที่เก็บรักษา ณ อุณหภูมิห้องใส่ในโถดูดความชื้น

มังกร โรจน์ประภากรและอุไรลักษณ์ พงษ์เกษ (2551) ได้พัฒนาผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกสำหรับกุ้งด้วยการหุ้มเซลล์โดยนำแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* LP 64 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกสำหรับกุ้ง ได้เพาะเลี้ยงในอาหาร MRS และหุ้มด้วยอัลจีเนตเพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตจากการศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมอัลจีเนต (1.5 2.0 และ 3.0 %) และความเร็วการกวน

(400 600 และ 800 รอบ/นาที่) ต่อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเม็ดแบคทีเรียและปริมาณของเซลล์ รอดชีวิตของแบคทีเรียที่หุ้มได้ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมของการหุ้มแบคทีเรียด้วยวิธีอิมัลชันคือ สารละลายโซเดียมอัลจีเนตความเข้มข้น 3.0 % และความเร็วการกวน 800 รอบ/นาที่ ซึ่งให้ค่า ประสิทธิภาพการหุ้มเซลล์และปลดปล่อยเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดถึง 96.57% ของปริมาณเซลล์เริ่มต้น

สุขใจ ชูจันทร์และศิริประภา มั่นตรง (2551) ได้ศึกษาการเพิ่มผลผลิตกรดแลกติกจากเวย์โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์และการผลิต กรดแลกติก พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์คือระยะทางระหว่างปลายสายยางถึงผิวหน้า ของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 15 เซนติเมตร ความเข้มข้นของโซเดียมแอลจีเนตร้อยละ 2 และ สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก คือความเข้มข้นของเวย์ ร้อยละ 90 (ปริมาตรต่อปริมาตร) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและอัตราการกวนของใบพัดในถังหมัก 100 รอบต่อนาที การผลิตกรด แลกติกในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 6.51 กรัมต่อลิตรที่ 72 ชั่วโมง ผล การผลิตกรดแลกติก 0.195 กรัมต่อกรัมซับสเตรต อัตราการผลิตกรดแลกติก 0.090 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง การผลิตกรดแลกติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส กวนด้วยใบพัด อัตรา 100 รอบต่อนาที ควบคุมพีเอช 6.5 พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 8.16 กรัมต่อลิตรที่ 48 ชั่วโมง ผลการผลิตกรดแลกติก 0.212 กรัมต่อกรัมซับสเตรตและอัตราการผลิตกรดแลกติก 0.170 กรัมต่อลิตรชั่วโมง

Lee และ Heo (2000) ได้ศึกษาการพัฒนาผลิตภัณฑ์ด้วยการหุ้มเซลล์ โดยนำแบคทีเรีย *Bifidobacterium longum* KCTC 3128 และ HLC 3742 หุ้มเซลล์ด้วยอัลจีเนต ที่ระดับความ เข้มข้นของโซเดียมอัลจีเนตต่างๆ คือ 2 3 และ 4% พบว่า ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจีเนต ทุกะระดับ มีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์ทั้งหมด และไม่มีมีความแตกต่างกัน

Bekers *et al.* (2001) ใช้โซเดียมอัลจีเนตในการดักจับเซลล์ *Zymomonas mobiles* เพื่อ ผลิตเอทานอลเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระพบว่าการผลิตเอทานอลของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึง ให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน

Bučko *et al.* (2005) ได้ศึกษาทดลองตรึงเซลล์ *Nocardia tartarican* ที่ผลิตเอนไซม์ cisepoxysuccinatehydrolase ด้วยโซเดียมอัลจีเนต เซลลูโลสซัลเฟต โพลีเมทิลีน โคกวินดิน เพื่อ เปลี่ยน epoxysuccinate ให้เป็น L-(+)- tartaric acid นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้โซเดียม อัลจีเนตในการตรึงเซลล์ยีสต์เซลล์พืชและเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

Hamsupo (2005) ได้พัฒนาผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUBAC 5 โดย ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเจริญ และทำแห้ง พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเจริญ คือ Basal medium เป็นเวลา 12 ชั่วโมงและการทำแห้งหั่วเชื้อแบบ spray drying อัตราการรอดชีวิต ของเซลล์สูงสุด ถึง 92.5%

Costa *et al.* (2002) พบว่า *Pentoea agglomerans* ที่เก็บอุณภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะมีปริมาณเซลล์แบคทีเรียลดลงเพียง 0.5 CFU/ml เมื่อเก็บรักษาไว้ 90 วัน ในขณะที่เก็บรักษาไว้ที่อุณภูมิห้อง จะมีปริมาณแบคทีเรียลดลง 3 CFU/ml ที่เวลาเก็บรักษา 28 วัน