Journal of Science, Technology and Agriculture Research (JSTAR)
Year: 2027 Volume: 7 Issue: 2 Page: 95-105

JSTAR

Research Article

Evaluation of the Effectiveness of Cell-Protective Agents on the Survival of Lactic Acid Bacteria after Freeze-Drying

Premsuda Saman*

Biodiversity Research Center, Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Thailand

(*Corresponding author's e-mail: premsuda@tistr.or.th)

Received: 27 February, 2026; Revised: 21 April, 2026; Accepted: 25 April, 2026

Abstract

This study aimed to evaluate the effectiveness of four cell-protective agents, isomalto-oligosaccharides (IMO), fructo-oligosaccharides (FOS), trehalose (TRE), and skim milk (SM), on the viability of *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Pediococcus pentosaceus* following freeze-drying and subsequent storage at 4°C for 24 weeks. Initial cell concentrations were comparable across treatments (13 log CFU/g), but significant differences emerged over time. Two-way Repeated Measures ANOVA revealed that both cell-protective type and storage duration significantly influenced cell survival ($p < 0.05$). IMO consistently maintained the highest cell counts, with mean values at week 24 remaining superior to other treatments (*L. farciminis* = 11.23 log CFU/g, *L. acidophilus* = 10.66 log CFU/g and *P. pentosaceus* = 11.17 log CFU/g). TRE provided moderate protection, while FOS exhibited the lowest efficacy, with *L. acidophilus* declining to 9.40 log CFU/g at week 24. SM showed strain-dependent effects, performing comparably to IMO in some cases but less effectively in others. Overall, the findings demonstrate that IMO is the most effective cell-protective agent for sustaining probiotic viability during long-term storage.

Keywords: Cell-protective agent; Freeze-drying; Lactic acid bacteria

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินผลของสารปกป้องเซลล์ 4 ชนิด ได้แก่ Isomalto-oligosaccharide (IMO) Trehalose (TRE) Fructo-oligosaccharide (FOS) และ Skim milk (SM) ต่อความมีชีวิตของ *L. farciminis* *L. acidophilus* และ *P. pentosaceus* ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่าปริมาณเซลล์ตั้งต้นมีค่าใกล้เคียงกัน (13 log CFU/g) แต่เมื่อเวลาผ่านไปมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การวิเคราะห์ด้วย Two-way Repeated Measures ANOVA แสดงให้เห็นว่าทั้งชนิดสารปกป้องเซลล์และระยะเวลาเก็บรักษามีผลต่อความอยู่รอดของเซลล์ ($p < 0.05$) โดย IMO สามารถรักษาจำนวนเซลล์ได้สูงที่สุด โดยที่สัปดาห์ที่ 24 มีค่าเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มทดลองอื่น ๆ (*L. farciminis* = 11.23 log CFU/g *L. acidophilus* = 10.66 log CFU/g และ *P. pentosaceus* = 11.17 log CFU/g) TRE มีผลการปกป้องในระดับปานกลาง ขณะที่ FOS มีประสิทธิภาพต่ำที่สุด โดย *L. acidophilus* ลดลงเหลือเพียง 9.40 log CFU/g ที่สัปดาห์ที่ 24 ส่วน SM มีผลแตกต่างตามสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติก ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า IMO มีประสิทธิภาพสูงสุดในการเก็บรักษาเซลล์โพรไบโอติกในระยะยาว

คำสำคัญ: สารปกป้องเซลล์; การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง; แบคทีเรียกรดแลกติก

บทนำ

ปัจจุบันมีการนำจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์หรือโพรไบโอติกมาใช้ในอาหารและเครื่องดื่มเพิ่มมากขึ้น จึงมีการพัฒนาวิธีการและส่วนผสมเพื่อใช้ในการเก็บรักษาจุลินทรีย์ วิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze drying หรือ lyophilization) เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในการเก็บรักษาโพรไบโอติก วิธีนี้เป็นเทคนิคที่ทำให้จุลินทรีย์แห้งในสภาพเยือกแข็งภายใต้สุญญากาศ โดยการระเหิดน้ำแข็งออกจากเซลล์โดยตรงไม่ผ่านความร้อน อย่างไรก็ตามในด้านของความคงตัวของโพรไบโอติกที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งขึ้นอยู่กับวิธีการ สภาวะของการเก็บรักษาและสารปกป้องเซลล์ (Ibrahim et al., 2023) สารปกป้องเซลล์ (cell-protective agent) คือวัสดุหรือตัวกลางที่ใช้ห่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์เพื่อป้องกันการบาดเจ็บหรือการทำลายจากสภาวะแวดล้อม สารปกป้องเซลล์ที่นิยมใช้มากคือ นมพร่องมันเนย (skim milk) นอกจากนี้ยังมีการใช้สารคาร์โบไฮเดรตบางชนิดเป็นสารปกป้องเซลล์ ได้แก่ ไดแซ็กคาไรด์ เช่น ซูโครส (sucrose) แลคโตส (lactose) และทรีฮาโลส (trehalose) โอลิโกแซ็กคาไรด์ (oligosaccharides) และโพลีแซ็กคาไรด์ (polysaccharides) เช่น ไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (xylo-oligosaccharides) กาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (galactooligosaccharides) ฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (fructo-oligosaccharides) อินูลิน (inulin) มอลโตเดกซ์ทริน (maltodextrin) และสตาไคโอส (stachyose) (Ren et al., 2019; Siaterlis et al., 2009; Shu et al., 2019; Tymczyszyn et al., 2012; Yoha et al., 2023) หากเลือกใช้สารปกป้องเซลล์ได้เหมาะสมกับชนิดของจุลินทรีย์ จะช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อได้ดี ดังนั้น การใช้สารปกป้องเซลล์ที่มีคุณสมบัติส่งเสริมสุขภาพถือเป็นแนวทางที่น่าสนใจ โดยเฉพาะโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดที่มีคุณเป็นพรีไบโอติก สารนี้ไม่เพียงช่วยลดความเสียหายของจุลินทรีย์ระหว่างกระบวนการทำให้แห้งและการเก็บรักษา แต่ยังสนับสนุนการเจริญและการอยู่รอดของเชื้อโพรไบโอติกได้อย่างมีประสิทธิภาพ คุณสมบัติดังกล่าวสะท้อนให้เห็นถึงศักยภาพสูงของโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่เป็นพรีไบโอติกในการนำมาใช้เป็นสารปกป้องเซลล์ ทั้งในด้านประสิทธิภาพการทำงานและความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Isomaltooligosaccharides; IMO) เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีคุณสมบัติพรีไบโอติกที่สามารถส่งเสริมสุขภาพลำไส้และให้ประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์และสัตว์ (Goffin et al., 2011; Saman et al, 2012) IMO ประกอบด้วยหน่วยกลูโคซิลแซ็กคาไรด์ที่เชื่อมด้วยพันธะไกลโคซิดิกแบบ α-1,6 และอาจมีพันธะเชื่อมแบบ α-(1⟶4) ร่วมด้วย เช่น ไอโซมอลโตส (isomaltose) พาโนส (panose) ไอโซมอลโตไตรโอส (isomaltotriose) ไอโซมอลโตเตตระโอส (isomaltotetraose) ไอโซมอลโตเพนตะโอส (isomaltopentaose) ไนเจโรส (nigerose) โคจิโบส (kojibiose) และ IMO สายยาว (Bharti et al., 2015; Niu et al., 2017) ซึ่งคุณสมบัติพรีไบโอติกของ IMO มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ เช่น *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* ในลำไส้ใหญ่ ขณะเดียวกันยังช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค นอกจากนี้ IMO ยังมีศักยภาพในการปรับปรุงการทำงานของระบบทางเดินอาหาร เพิ่มการผลิตกรดไขมันสายสั้นและส่งเสริมการดูดซึมแร่ธาตุ การควบคุมคอเลสเตอรอลและการเสริมภูมิคุ้มกัน (Ketabi et al., 2011; Kothari et al., 2014; Rini et al, 2024) นอกจากนี้ IMO ยังมีคุณสมบัติพิเศษ เช่น ความหนืดต่ำ ความทนต่อการตกผลึกและความหวานที่ลดลง ทำให้ได้รับความสนใจในอุตสาหกรรมอาหาร ยาและเครื่องสำอาง (Bharti et al., 2015; Florowska et al., 2016) นอกจากนี้ มีรายงานเกี่ยวกับการใช้ IMO ในกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง โดยที่ IMO ช่วยให้โครงสร้างของผลิตภัณฑ์หลังการทำแห้งแบบเยือกแข็ง มีความแข็งแรง ไม่ยุบตัวง่าย (Zhang et al., 2022)

จากคุณสมบัติของ IMO ที่เป็นโอลิโกแซคคาไรด์เชิงซ้อน อีกทั้งยังมีบทบาทเป็นสารพรีไบโอติกที่สนับสนุนการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ คุณสมบัติเหล่านี้สะท้อนให้เห็นว่า IMO ไม่เพียงแต่ทำหน้าที่เป็นสารช่วยสร้างโครงสร้างในกระบวนการ freeze-drying เท่านั้น แต่ยังมีศักยภาพที่จะทำหน้าที่เป็นสารปกป้องเซลล์ได้ จึงเป็นแนวทางที่น่าสนใจในการนำ IMO มาทดลองใช้เพื่อเพิ่มความเสถียรและคุณภาพของผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพของสารปกป้องเซลล์ ได้แก่ IMO FOS TRE และ SM ในการรักษาเซลล์แบคทีเรียกรดแลกติกภายหลังการผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดยจะทำการตรวจวัดปริมาณการรอดชีวิตของแบคทีเรียในแต่ละกลุ่มทดลองตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ผลการศึกษาที่ได้คาดว่าจะมีประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมสารละลายปกป้องเซลล์

เตรียมสารละลาย Isomaltooligosaccharide (IMO) Trehalose (TRE) Fructooligosaccharide (FOS) และ Skim milk (SM) ความเข้มข้นร้อยละ 10 (w/v) ปริมาตร 900 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (Wang et al., 2025)

การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลกติกที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ *L. farciminis L. acidophilus* และ *P. pentosaceus* ซึ่งเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ถูกคัดเลือกจากลำไส้โค โดยสายพันธุ์เหล่านี้มีคุณสมบัติด้านโพรไบโอติกที่ดี จึงถูกนำมาใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาวิธีการเก็บรักษาเพื่อคงประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียในระยะยาว เตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก 3 สายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar (Merck, เยอรมนี) แยกโคโลนีเดี่ยว ๆ ของแต่สายพันธุ์ไปตรวจสอบลักษณะรูปร่างของเซลล์โดยการย้อมแกรม (El Ahmadi et al., 2025) นำโคโลนีของแต่ละสายพันธุ์เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปริมาณ 5 มิลลิลิตร บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้ใส่ลงในขวดอาหาร MRS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้ไปปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่อง centrifuge (AX-521, TOMY, ญี่ปุ่น) ที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ปลอดเชื้อความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ เตรียมสารละลายเซลล์โดยเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ตามความเหมาะสม โดยปรับค่าความขุ่น (optical density) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรให้เท่ากับ 1.0 (Han et al., 2024) ดูดสารละลายเซลล์ที่ได้ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 800 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้เซลล์ที่อยู่ในช่วงเจริญอย่างเต็มที่ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกน้ำเลี้ยงเชื้อและเก็บตะกอนเซลล์เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

การเตรียมผงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

นำเซลล์แบคทีเรียที่ได้แต่ละสายพันธุ์เติมลงในสารละลายปกป้องเซลล์ที่เตรียมไว้แต่ละชนิด ผสมให้เข้ากันแล้วเทลงในถาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปิดด้วยกระดาษฟอยล์ จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ด้วยเครื่อง Freeze dryer (Modulyo D, Thermo Fisher Scientific, สหรัฐอเมริกา) ใช้เวลา 2 วัน เพื่อให้ผงเซลล์แห้งสนิท บรรจุผงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละกลุ่มทดลองลงในถุงฟอยด์สุญญากาศ ถุงละ 1 กรัม กลุ่มทดลองละ 3 ซ้ำ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจนับปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตของแต่ละกลุ่มทดลองทุก ๆ 4 สัปดาห์ เป็นเวลา 24 สัปดาห์

การตรวจวัดปริมาณของแบคทีเรียกรดแลคติก

นำตัวอย่างผงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละกลุ่มทดลองมาตรวจนับปริมาณเซลล์รอดชีวิตของเชื้อในช่วงเวลาต่าง ๆ โดยทำการเจือจางผงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Drop plate technique (Naghili et al., 2013) โดยหยดสารละลายแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผ่านการเจือจางลงบนอาหาร MRS agar (Merck เยอรมัน) ทำการทดสอบ 3 ซ้ำในแต่ละกลุ่มทดลอง บ่มเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกในสภาวะไร้ออกซิเจนด้วย Anaerobic jar (Merck, เยอรมัน) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในการนับจำนวนโคโลนีให้เลือกใช้ระดับการเจือจางที่เหมาะสม โดยกำหนดช่วงจำนวนโคโลนีที่สามารถนับได้ระหว่าง 3–30 โคโลนีต่อจาน ซึ่งเป็นเกณฑ์ที่ช่วยให้การประเมินมีความแม่นยำ ลดความคลาดเคลื่อนจากการนับมากเกินไปหรือจำนวนน้อยเกินไป

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลไปวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างทรีทเมนต์ด้วย Two-way Repeated Measures ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดทดลองด้วย Least Significant Different (LSD) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.05$)

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

แบคทีเรียกรดแลกติกที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วย *L. farciminis L. acidophilus* และ *P.pentosaceus* ทั้ง 3 สายพันธุ์เมื่อเจริญบนอาหาร MRS agar พบว่า มีลักษณะโคโลนีเป็นวงกลม ขนาดเล็กและมีสีขาวคล้ายกัน (Figure 1) เชื้อ *L. farciminis*: เมื่อย้อมแกรมให้ผลเป็นแกรมบวก ติดสีน้ำเงินและมีรูปร่างเป็นแท่ง (Rods) และ *L. acidophilus*: ให้ผลแกรมบวกเช่นเดียวกัน ติดสีน้ำเงินและมีรูปร่างเป็นแท่ง (Rods) สำหรับเชื้อ *P. pentosaceus*: ให้ผลแกรมบวก ติดสีน้ำเงินแต่มีรูปร่างเป็นทรงกลม (Cocci) สำหรับการเตรียมกล้าเชื้อ แบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ถูกเลี้ยงในอาหารเหลว MRS อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำไปปั่นแยกเซลล์ เพื่อเข้าสู่กระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อไป

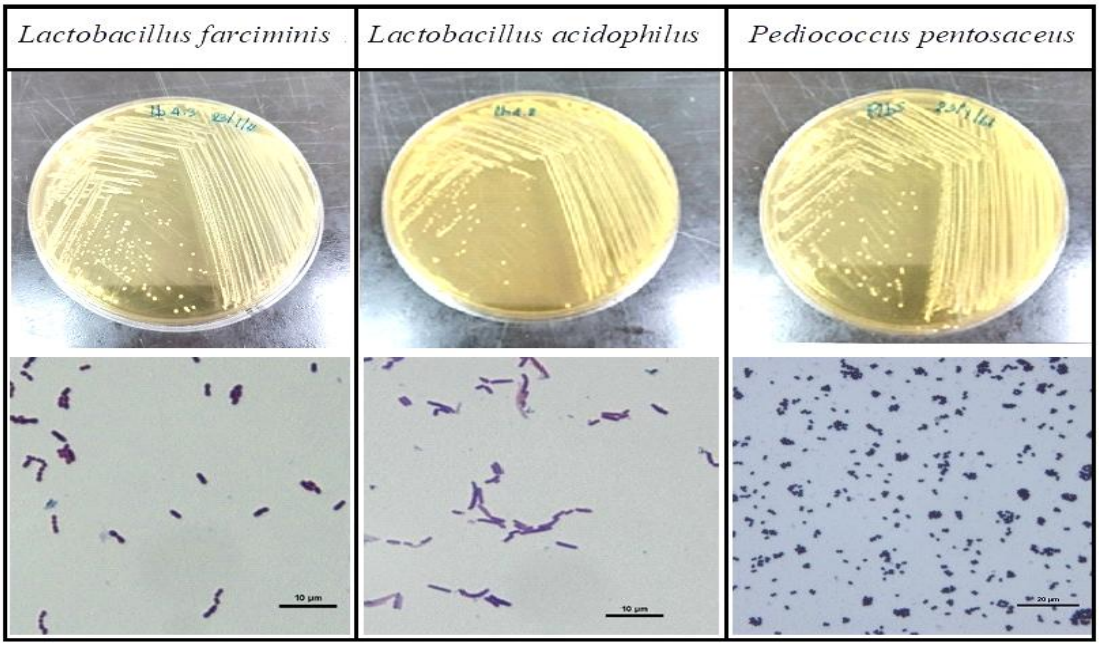


Figure 1 Three strains of lactic acid bacteria used for testing

จากการตรวจวัดปริมาณเซลล์ *L. farciminis* ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดยเปรียบเทียบสารปกป้องเซลล์ 4 ชนิด ได้แก่ IMO FOS TRE และ SM ผลการทดลองแสดงใน Figure 2 พบว่า ปริมาณเซลล์ตั้งต้นภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งในสารปกป้องเซลล์แต่ละชนิดมีค่าใกล้เคียงกัน (13.36-13.81 CFU/g) แต่จะลดลงแตกต่างกันไปในแต่ละกลุ่มทดลอง Table 1 แสดงผลการวิเคราะห์ด้วย Two-way Repeated Measures ANOVA และ LSD แสดงให้เห็นว่าชนิดของสารปกป้องเซลล์และเวลาเก็บรักษามีผลต่อความคงตัวของ *L. farciminis* อย่างมีนัยสำคัญ โดย IMO สามารถรักษาจำนวนเซลล์ได้สูงที่สุดตลอดการเก็บรักษา โดยค่าเฉลี่ยในแต่ละสัปดาห์ไม่แตกต่างจากค่าเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญในหลายช่วงเวลา และยังคงสูงกว่ากลุ่มทดลองอื่น ๆ โดยเฉพาะที่สัปดาห์ 24 (11.23 log CFU/g) ขณะที่ TRE แสดงผลการปกป้องในระดับ ปานกลาง โดยค่าเฉลี่ยในหลายช่วงเวลามีความแตกต่างจาก IMO และบางครั้งใกล้เคียงกับ FOS ส่วน FOS มีประสิทธิภาพ ต่ำกว่า IMO และ TRE โดยค่าเฉลี่ยในหลายช่วงเวลามีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับ IMO และ SM มีค่าเฉลี่ยต่ำที่สุด ในทุกช่วงเวลา โดยเฉพาะที่สัปดาห์ 24 (10.67 log CFU/g) และมีความแตกต่างทางสถิติจาก IMO อย่างชัดเจน

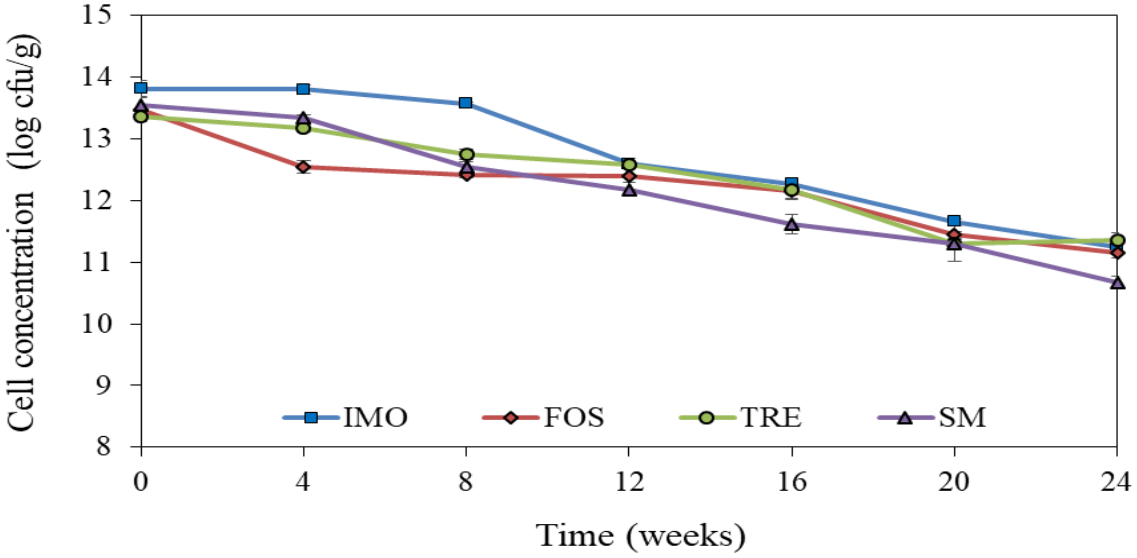


Figure 2 Comparison of the survival of *L. farciminis* when using IMO, FOS, TRE and SM as cell-protective agents during storage at 4°C

Table 1 Cell concentration of *L. farciminis* during storage at 4°C

Time (weeks)	IMO (log CFU/g)	FOS (log CFU/g)	TRE (log CFU/g)	SM (log CFU/g)
0	13.81 ± 0.12^{a}	13.47 ± 0.06^{a}	13.36 ± 0.09^{a}	13.54 ± 0.12^{a}
4	13.79 ± 0.07^{a}	12.54 ± 0.11^{b}	13.18 ± 0.07^{a}	13.33 ± 0.05^{a}
8	13.56 ± 0.03^{a}	12.42 ± 0.05^{b}	12.74 ± 0.08^{b}	12.53 ± 0.09^{b}
12	12.59 ± 0.08^{a}	12.39 ± 0.21^{ab}	12.58 ± 0.07^{a}	12.17 ± 0.11^{b}
16	12.27 ± 0.08^{a}	12.15 ± 0.12^{ab}	12.17 ± 0.16^{ab}	11.61 ± 0.16^{b}
20	11.66 ± 0.03^{a}	11.44 ± 0.05^{ab}	11.30 ± 0.28^{b}	11.30 ± 0.06^{b}
24	11.23 ± 0.11^{a}	11.15 ± 0.09^{ab}	11.35 ± 0.11^{a}	10.67 ± 0.10^{b}

Values are expressed as mean ± SD. Means sharing the same superscript letter within the same row are not significantly different ($p > 0.05$). Means with different superscript letters within the same row indicate significant differences ($p < 0.05$), according to LSD test following Two-way Repeated Measures ANOVA

Figure 3 แสดงจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของ *L. acidophilus* ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดยใช้สารปกป้องเซลล์ 4 ชนิด ได้แก่ IMO FOS TRE และ SM พบว่า ในแต่ละกลุ่มทดลองจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตจะลดลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา Table 2 แสดงผลการวิเคราะห์ด้วย Two-way Repeated Measures ANOVA พบว่า ทั้งปัจจัยเวลาและชนิดสารปกป้องเซลล์มีผลต่อความอยู่รอดของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในช่วงเริ่มต้นทุกทรีตเมนท์มีจำนวนเซลล์ใกล้เคียงกัน (13.12–13.59 log CFU/g) โดยไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่เมื่อเวลาผ่านไปพบความแตกต่างชัดเจน โดย FOS มีจำนวนเซลล์ลดลงมากที่สุดตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 และยังคงต่ำที่สุดตลอดการทดลอง โดยที่สัปดาห์ที่ 24 มีค่าเฉลี่ยเพียง 9.40 log CFU/g ซึ่งแตกต่างจาก IMO และ SM อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ TRE มีผลการปกป้องในระดับปานกลาง โดยค่าเฉลี่ยสูงกว่า FOS แต่ต่ำกว่า IMO และ SM ในหลายช่วงเวลา โดย IMO สามารถรักษาจำนวนเซลล์ได้สูงที่สุดตลอดการเก็บรักษา โดยที่สัปดาห์ที่ 24 ยังคงมีค่าเฉลี่ย 10.66 log CFU/g ซึ่งสูงกว่า FOS และ TRE อย่างมีนัยสำคัญ ส่วน SM ก็มีประสิทธิภาพในการรักษาความมีชีวิตของเซลล์เช่นกัน โดยค่าเฉลี่ยใกล้เคียงกับ IMO ในหลายช่วงเวลา

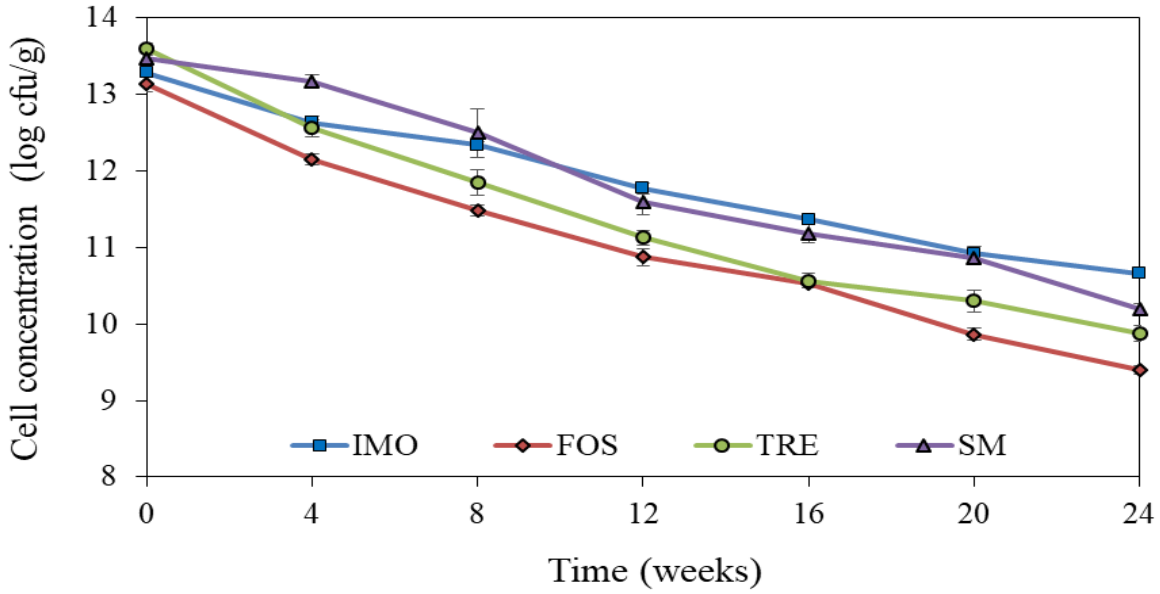


Figure 3 Comparison of the survival of *L. acidophilus* when using IMO, FOS, TRE and SM as cell-protective agents during storage at 4°C

Table 2 Cell concentration of *L. acidophilus* during during storage at 4°C

Time (weeks)	IMO (log CFU/g)	FOS (log CFU/g)	TRE (log CFU/g)	SM (log CFU/g)
0	13.27 ± 0.16^{a}	13.12 ± 0.10^{a}	13.59 ± 0.08^{a}	13.47 ± 0.08^{a}
4	12.63 ± 0.08^{a}	12.14 ± 0.08^{b}	12.55 ± 0.11^{a}	13.17 ± 0.08^{a}
8	12.33 ± 0.04^{a}	11.48 ± 0.07^{b}	11.85 ± 0.17^{b}	12.49 ± 0.31^{a}
12	11.77 ± 0.07^{a}	10.87 ± 0.11^{b}	11.12 ± 0.09^{b}	11.59 ± 0.17^{a}
16	11.36 ± 0.06^{a}	10.53 ± 0.06^{b}	10.56 ± 0.09^{b}	11.18 ± 0.13^{a}
20	10.92 ± 0.09^{a}	9.86 ± 0.08^{b}	10.29 ± 0.14^{b}	10.85 ± 0.06^{a}
24	10.66 ± 0.07^{a}	9.40 ± 0.05^{b}	9.87 ± 0.11^{b}	10.19 ± 0.08^{a}

Values are expressed as mean ± SD. Means sharing the same superscript letter within the same row are not significantly different ($p > 0.05$). Means with different superscript letters within the same row indicate significant differences ($p < 0.05$), according to LSD test following Two-way Repeated Measures ANOVA

Figure 4 แสดงจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของ *P. pentosaceus* เมื่อผ่านกระบวนการการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยใช้สารปกป้องเซลล์ 4 ชนิด ได้แก่ IMO FOS TRE และ SM พบว่า จำนวนเซลล์ของ *P. pentosaceus* มีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาเก็บรักษา โดย Table 3 แสดงผลการวิเคราะห์ด้วย Two-way Repeated Measures ANOVA พบว่าทั้งปัจจัยเวลาและชนิดสารปกป้องเซลล์มีผลต่อความอยู่รอดของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.05$) ในช่วงเริ่มต้นทุกกลุ่มทดลองมีจำนวนเซลล์ใกล้เคียงกัน (13.29–13.66 log CFU/g) โดยไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่เมื่อเวลาผ่านไปพบว่า FOS และ TRE มีจำนวนเซลล์ลดลงมากที่สุดตั้งแต่สัปดาห์ที่ 8 เป็นต้นไป และยังคงต่ำที่สุดตลอดการทดลอง โดยที่สัปดาห์ที่ 24 มีค่าเฉลี่ยเพียง 10.19 และ 10.14 log CFU/g ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจาก IMO และ SM อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ IMO สามารถรักษาจำนวนเซลล์ได้สูงที่สุด

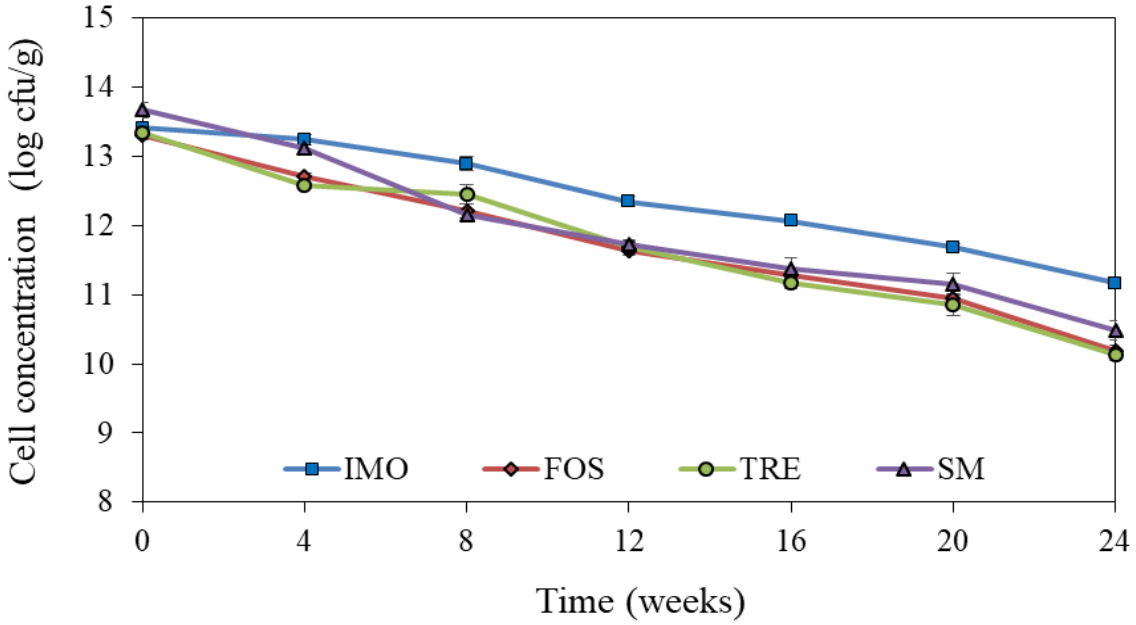


Figure 4 Comparison of the survival of *P. pentosaceus* when using IMO, FOS, TRE and SM as cell-protective agents during storage at 4°C

Table 3 Cell concentration of *P. pentosaceus* during during storage at 4 °C

Time (weeks)	IMO (log CFU/g)	FOS (log CFU/g)	TRE (log CFU/g)	SM (log CFU/g)
0	13.41 ± 0.05^{a}	13.29 ± 0.04^{a}	13.33 ± 0.10^{a}	13.66 ± 0.11^{a}
4	13.24 ± 0.07^{a}	12.71 ± 0.04^{b}	12.57 ± 0.03^{b}	13.11 ± 0.09^{a}
8	12.89 ± 0.11^{a}	12.20 ± 0.11^{b}	12.45 ± 0.13^{b}	12.15 ± 0.10^{b}
12	12.34 ± 0.07^{a}	11.64 ± 0.04^{b}	11.68 ± 0.11^{b}	11.73 ± 0.04^{b}
16	12.06 ± 0.06^{a}	11.28 ± 0.05^{b}	11.17 ± 0.08^{b}	11.37 ± 0.16^{b}
20	11.69 ± 0.05^{a}	10.94 ± 0.06^{b}	10.85 ± 0.16^{b}	11.15 ± 0.15^{b}
24	11.17 ± 0.07^{a}	10.19 ± 0.08^{b}	10.14 ± 0.09^{b}	10.49 ± 0.14^{b}

Values are expressed as mean ± SD. Means sharing the same superscript letter within the same row are not significantly different ($p > 0.05$). Means with different superscript letters within the same row indicate significant differences ($p < 0.05$), according to LSD test following Two-way Repeated Measures ANOVA

กระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง สามารถแบ่งออกเป็นสามขั้นตอนหลัก ได้แก่ การแช่แข็ง การระเหิด และการดูดซับ (Wang et al., 2021) โดยน้ำแข็งและโมเลกุลน้ำที่ถูกยึดติดจะถูกกำจัดออกผ่านกระบวนการระเหิดและการดูดซับตามลำดับ (Cui et al., 2018; Velly et al., 2015) อย่างไรก็ตาม ระหว่างกระบวนการดังกล่าว เซลล์แบคทีเรียมักได้รับความเสียหายจากทั้งการแช่แข็งและการทำให้แห้ง (Miao et al., 2016) ความเสียหายนี้สามารถอธิบายได้จากสองสาเหตุหลัก คือ การเปลี่ยนแปลงสภาวะทางกายภาพของลิพิดในเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งส่งผลให้เยื่อหุ้มสูญเสียความสมบูรณ์ และการสูญเสียการทำงานของโปรตีนและเอนไซม์ที่สำคัญ เพื่อหลีกเลี่ยงความเสียหายดังกล่าว จึงจำเป็นต้องมีการควบคุมปัจจัยเสี่ยง เช่น ความเร็วและอุณหภูมิของกระบวนการทำแห้ง รวมถึงการใช้สารปกป้องเซลล์ที่เหมาะสม (Chen et al., 2015; Van Engeland et al., 2025) การเก็บรักษาเซลล์แบคทีเรียแบบผงแห้งต้องทำให้ความชื้นลดลงจนเกือบหมด เพื่อให้เซลล์หยุดเจริญเติบโตแต่ยังมีชีวิตอยู่ และควรเก็บในภาชนะปิดสนิท ป้องกันความชื้นและแสง ที่อุณหภูมิเย็นจะสามารถเก็บรักษาเซลล์ให้รอดชีวิตได้มาก (Senaratne & Jayaweera, 2024) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้เลือกเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นวิธีที่สะดวกและประหยัด เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก โดยทั่วไปสารปกป้องเซลล์ที่เป็นคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ น้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์ ไดแซ็กคาไรด์ โพลีแซ็กคาไรด์ ทำหน้าที่ลดการเกิดผลึกน้ำแข็งที่ทำลายเซลล์ ช่วยให้จุลินทรีย์มีอัตราการอยู่รอดสูงขึ้น แต่บางกรณีน้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์ หรือไดแซ็กคาไรด์สามารถถูกหมักด้วยแบคทีเรียกรดแลกติกก่อนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จึงส่งผลให้ค่า pH ของสารแขวนลอยแบคทีเรียลดลงต่ำกว่า 5.0 กรดเหล่านี้ทำให้ความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียลดลง เนื่องจากทำความเสียหายต่อ ATPase, β-galactosidase และความลื่นไหลของเยื่อหุ้มเซลล์ (Cui et al., 2018) ดังนั้นการเลือกใช้สารพรีไบโอติกที่เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ หรือ โพลีแซ็กคาไรด์ จึงช่วยลดปัญหาการสร้างกรดที่อาจจะทำให้เกิดความเสียหายกับเซลล์แบคทีเรีย สำหรับ skim milk เป็นสารป้องกันเซลล์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ซึ่งทำงานโดยการสร้างชั้นเคลือบที่แข็งแรงและมีความหนืดรอบเซลล์แบคทีเรีย ชั้นเคลือบนี้ช่วยลดความดันออสโมติกระหว่างสภาพแวดล้อมภายในและภายนอกเซลล์ ป้องกันการเกิดออกซิเดชันของโปรตีนและเอนไซม์ รวมถึงความเสียหายต่อกรดนิวคลีอิก และลดการบาดเจ็บของเซลล์ (Cruz et al., 2025)

จากผลการทดลองใน Figure 2- 4 แสดงให้เห็นว่าการใช้สารปกป้องเซลล์มีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลกติกภายหลังจากกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดยเฉพาะ IMO ที่สามารถเพิ่มการรอดชีวิตได้มากกว่าสารปกป้องเซลล์อื่น ๆ IMO มีคุณสมบัติเป็น oligosaccharide ที่สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับโปรตีนและ peptidoglycan บนผนังเซลล์แบคทีเรียกรดแลกติก สร้างชั้นป้องกันรอบผนังเซลล์จึงลดการสัมผัสโดยตรงกับสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ IMO ช่วยให้เซลล์ทนต่อแรงดันออสโมติกและการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ส่งผลให้แบคทีเรียกรดแลกติกมีอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้น เมื่อผ่านกระบวนการ freeze-drying (Chapot-Chartier & Kulakauskas, 2014) การลดลงของจำนวนเซลล์ระหว่างการเก็บรักษาสามารถอธิบายได้จากหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้องที่เซลล์ได้รับ ได้แก่ ความเสียหายจากการแช่แข็ง เกิดจากการสร้างผลึกน้ำแข็งภายในและรอบ ๆ เซลล์ ซึ่งสามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และโครงสร้างภายใน ทำให้เซลล์สูญเสียความสมบูรณ์ (Wang et al., 2025) ความเครียดจากการสูญเสียน้ำในขั้นตอนการทำแห้งส่งผลให้โปรตีนและเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลงโครงสร้าง สูญเสียการทำงานตามปกติ (Karan et al., 2025) การเกิดออกซิเดชัน ระหว่างการเก็บรักษาอาจทำให้เกิดอนุมูลอิสระซึ่งทำลาย

โปรตีนและกรดนิวคลีอิกส่งผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ (Haindl et al., 2020) นอกจากนี้ อุณหภูมิและความชื้นในการเก็บรักษามีบทบาทสำคัญต่อความเสถียรของเซลล์ หากสภาวะไม่เหมาะสมจะเร่งการเสื่อมสลายของเซลล์ได้ (Musi et al., 2026) รวมทั้งปริมาณสารปกป้องเซลล์ไม่เพียงพอจะทำให้เซลล์สูญเสียความมีชีวิตเพิ่มขึ้น (Cruz et al., 2025)

จากงานวิจัยของ Shin et al. (2023) ได้รายงานว่าการใช้สารป้องกันการเยือกแข็ง soy peptone ร่วมกับ trehalose และ maltodextrin สามารถปกป้องเซลล์ *L. plantarum* ได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ sucrose และ sorbitol นอกจากนี้ งานวิจัยของ Wang et al. (2021) ได้รายงานว่าสารป้องกันเซลล์ชนิดโมเลกุลใหญ่ (macromolecular cryoprotectants) สามารถคงสภาพแบคทีเรีย *Lactiplantibacillus plantarum* AR113 ได้ดีกว่า trehalose ที่เป็นสารป้องกันเซลล์ชนิดโมเลกุลเล็ก ผลงานวิจัยเหล่านี้สอดคล้องกับผลการทดลองที่สารคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่เช่น IMO สามารถป้องเซลล์ได้ดีกว่าสารโมเลกุลเล็ก trehalose (Figure 4) อย่างไรก็ตาม FOS ให้ผลการปกป้องเซลล์ไม่ดีเท่ากับ IMO ซึ่งอาจอธิบายได้จากความจำเพาะของสารปกป้องเซลล์ต่อสายพันธุ์จุลินทรีย์ เนื่องจากสารปกป้องเซลล์ชนิดเดียวกันอาจให้ผลแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์แบคทีเรีย และสายพันธุ์เดียวกันอาจตอบสนองแตกต่างกันต่อสารปกป้องเซลล์ที่ต่างชนิด (Table 1-3) นอกจากนี้ IMO มีคุณสมบัติ hygroscopic มีความสามารถในการดูดซับและเก็บรักษาความชื้นจากสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ทำให้มีศักยภาพในการใช้เป็นสารช่วยปกป้องเซลล์หรือโปรตีนในกระบวนการทำแห้ง และเป็น oligosaccharide ที่มีพันธะ α-(1$\longrightarrow$6) ซึ่งอาจมีศักยภาพในการสร้าง amorphous glassy matrix ห่อหุ้มและตรึงเซลล์หรือโปรตีน เอาไว้ในสภาวะที่เสถียรได้ (Carpenter & Crowe, 1988)

สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า IMO เป็นสารปกป้องเซลล์ที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถเพิ่มการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลกติกในกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จึงมีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมอาหารและอาหารสัตว์ อย่างไรก็ตามควรที่จะทำการทดสอบคุณสมบัติของ IMO เพิ่มเติม เช่น คุณสมบัติด้านความปลอดภัย ความเป็นพิษต่อเซลล์ การต่อต้านอนุมูลอิสระ หรือการใช้สารปกป้องเซลล์หลายชนิดร่วมกัน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเก็บรักษาเซลล์จุลินทรีย์ให้ดียิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

Bharti, S. K., Krishnan, S., Kumar, A., Gupta, A. K., Ghosh, A. K., & Kumar, D. (2015). Mechanism-based antidiabetic activity of fructo- and isomalto-oligosaccharides: Validation by in vivo, in silico and in vitro interaction potential. *Process Biochemistry, 50*(3), 317–327. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.10.014

Chapot-Chartier, M.P., & Kulakauskas, S. (2014). Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories, 13*(Suppl 1), S9. https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S9

Chen, H., Chen, S. W., Li, C. N., & Shu, G. (2015). Response surface optimization of lyoprotectant for *Lactobacillus bulgaricus* during vacuum freeze-drying. *Preparative Biochemistry & Biotechnology, 45*(5), 463–475. https://doi.org/10.1080/10826068.2014.923451

Cruz, M. G. D., Silva, A. M. S. D., Prada-Mejia, K. D., Koolen, H. H. F., Tavares, G. C., & Valladão, G. M. R. (2025). Skim milk as a multifunctional cryoprotectant for fish probiotic *Enterococcus* spp.: Impact on viability during lyophilization and long-term storage. *Microorganisms, 13*(11), 2486. https://doi.org/10.3390/microorganisms13112486

Cui, S., Hang, F., Liu, X., Xu, Z., Liu, Z., Zhao, J., Zhang, H., & Chen, W. (2018). Effect of acids produced from carbohydrate metabolism in cryoprotectants on the viability of freeze-dried *Lactobacillus* and prediction of optimal initial cell concentration. *Journal of Bioscience and Bioengineering, 125*(5), 513–518. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.12.009

El Ahmadi, K., Haboubi, K., El Allaoui, H., El Hammoudani, Y., Bouhrim, M., Eto, B., Shahat, A. A., & Herqash, R. N. (2025). Isolation and preliminary screening of lactic acid bacteria for antimicrobial potential from raw milk. *Frontiers in Microbiology, 16,* 1565016. https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1565016

Florowska, A., Krygier, K., Florowski, T., & Dłu**ż**ewska, E. (2016). Prebiotics as functional food ingredients preventing diet-related diseases. *Food & Function, 7*(5), 2147–2155. https://doi.org/10.1039/c5fo01459j

Goffin, D., Delzenne, N., Blecker, C., Hanon, E., Deroanne, C., & Paquot, M. (2011). Will isomalto-oligosaccharides, a well-established functional food in Asia, break through the European and American market? The status of knowledge on these prebiotics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 51*(4), 394–409. https://doi.org/10.1080/10408391003628955

Haindl, R., Neumayr, A., Frey, A., & Kulozik, U. (2020). *Impact of cultivation strategy, freeze-drying process, and storage conditions on survival, membrane integrity, and inactivation kinetics of Bifidobacterium longum.* Folia Microbiologica, 65, 1039–1050. https://doi.org/10.1007/s12223-020-00815-3

Han, D., Bao, X., Wang, Y., Liao, X., Wang, K., Chen, J., Li, X., Yang, Z., & Wang, Y. (2024). The impact of lactic acid bacteria inoculation on the fermentation and metabolomic dynamics of indigenous Beijing douzhi microbial communities. *Frontiers in Microbiology, 15,* 1435834 https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1435834

Ibrahim, I., Ayariga, J. A., Xu, J., Boakai, R. K., Ajayi, O. S., & Owusu-Kwarteng, J. (2023). A comparative study of skimmed milk and cassava flour on the viability of freeze-dried lactic acid bacteria as starter cultures for yogurt fermentation. *Foods, 12*(6), 1207. https://doi.org/10.3390/foods12061207

Karan, D., Sharma, D., Kanwal, A., & Kanwar, N. (2025). Freeze-drying: Increasing probiotic stability. In D. Gugulothu, S. Sharma, & M. K. Chauhan (Eds.), *Freeze-drying technology in pharmaceutical and biomedical product development: Impact, progress and challenges of lyophilization* (pp. 349–368). Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-95-0221-9

Ketabi, A., Dieleman, L. A., & Gänzle, M. G. (2011). Influence of isomalto-oligosaccharides on intestinal microbiota in rats. *Journal of Applied Microbiology, 110*(5), 1297–1306. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04984.x

Kothari, D., Patel, S., & Goyal, A. (2014). Therapeutic spectrum of nondigestible oligosaccharides: Overview of current state and prospect. *Journal of Food Science, 79*(8), R1491–R1498. https://doi.org/10.1111/1750-3841.12536

Miao, Z., Zhao, Y., & Huo, X. (2016). Assessment and determination of lyoprotectant for survival of freeze-dried *Lactobacillus rhamnosus*. *Acta Universitatis Cibiniensis, Series E: Food Technology, 20*(1), 105–113. https://doi.org/10.1515/aucft-2016-0009

Musi, V., Aiello, E., Arena, M. P., Grieco, S., Sangiorgi, F., Russo, P., Fiocco, D., Capozzi, V., & Spano, G. (2026). Freeze-drying effects on viability and cellular stability in a subset of sourdough lactic acid bacteria strains. *Current Microbiology, 83*, 76. https://doi.org/10.1007/s00284-025-04673-5

Naghili, H., Tajik, H., Mardani, K., Razavi Rouhani, S. M., Ehsani, A., & Zare, P. (2013). Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests. *Veterinary research forum: an international quarterly journal*, *4*(3), 179–183. https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4312378/

Niu, D., Qiao, J., Li, P., Tian, K., Liu, X., Singh, S., & Lu, F. (2017). Highly efficient enzymatic preparation of isomalto-oligosaccharides from starch using an enzyme cocktail. *Electronic Journal of Biotechnology, 26*, 46–51. https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.12.002

Ren, H., Zentek, J., & Vahjen, W. (2019). Optimization of production parameters for probiotic *Lactobacillus* strains as feed additive. *Molecules, 24*(18), 3286. https://doi.org/10.3390/molecules24183286

Rini, D. M., Xu, W., & Suzuki, T. (2024). Current research on the role of isomaltooligosaccharides in gastrointestinal health and metabolic diseases. *Preventive Nutrition and Food Science, 29*(2), 93–105. https://doi.org/10.3746/pnf.2024.29.2.93

Saman, P., Chaiongkarn, A., Moonmangmee, S., & Artjariyasripong, S. (2012). Prebiotic isomalto-oligosaccharide production from economic crops of Thailand. *Asia-Pacific Journal of Science and Technology, 17*(5), 794–799. https://so01.tci-thaijo.org/index.php/APST/article/view/83290

Senaratne, W. M. T. N., & Jayaweera, J. A. A. S. (2024). Comparison of microbial preservation methods: A narrative review. *Germs, 14*(4), 375–386. https://doi.org/10.18683/germs.2024.1447

Shin, D., Elbegbayar, E., Baek, Y., Jeong, E., Lee, K., Kang, K., Lee, K., & Lee, H. G. (2023). Effects of different cryoprotectants on the viability of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* CJLP133 during long-term storage. *Journal of Food Measurement and Characterization, 17*(1), 1–8. https://doi.org/10.1007/s11694-023-01863-2

Shu, G., Xin, Y., Chen, L., Dan, H., Zhangteng, L., & Chen, H. (2019). Comprehensive optimization of composite cryoprotectant for *Saccharomyces boulardii* during freeze-drying and evaluation of its storage stability. *Preparative Biochemistry & Biotechnology, 49*(9), 846–857. https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1630649

Siaterlis, A., Deepika, G., & Charalampopoulos, D. (2009). Effect of culture medium and cryoprotectants on the growth and survival of probiotic lactobacilli during freeze drying. *Letters in Applied Microbiology, 48*(3), 295–301. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02529.x

Tymczyszyn, E. E., Sosa, N., Gerbino, E., Hugo, A., Gómez-Zavaglia, A., & Schebor, C. (2012). Effect of physical properties on the stability of *Lactobacillus bulgaricus* in a freeze-dried galacto-oligosaccharides matrix. *International Journal of Food Microbiology, 155*(3), 217–221. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.008

Van Engeland, C., Haut, B., & Debaste, F. (2025). A closer look at the potential mechanisms of action of protective agents used in the drying of microorganisms: A review. *Microorganisms, 13*(2), 435. https://doi.org/10.3390/microorganisms13020435

Wang, G., Luo, L., Dong, C., Zheng, X., Guo, B., Xia, Y., Tao, L., & Ai, L. (2021). Polysaccharides can improve the survival of *Lactiplantibacillus plantarum* subjected to freeze-drying. *Journal of Dairy Science, 104*(3), 2606–2614. https://doi.org/10.3168/jds.2020-19110

Wang, J., Wu, P., Dhital, S., Yu, A., & Chen, X. D. (2025). *Impact of freezing and freeze-drying on Lactobacillus rhamnosus GG survival: Mechanisms of cell damage and the role of pre-freezing conditions and cryoprotectants.* Foods, 14(10), 1817. https://doi.org/10.3390/foods14101817

Yoha, K. S., Moses, J. A., & Anandharamakrishnan, C. (2023). Effect of different drying methods on the functional properties of probiotics encapsulated using prebiotic substances. *Applied Microbiology and Biotechnology, 107*(4), 1575–1588. https://doi.org/10.1007/s00253-023-12398-3

Zhang, Z., Sun, N., Chen, J., & Li, X. (2022). Determination of glass transition temperature of IMO/D-mannitol aqueous solution and analysis of collapse phenomenon during freeze-drying process of solution. *Science and Technology of Food Industry, 43*(4), 33–40. https://doi.org/10.1111/ijfs.16111