DOI:10.12441/spyswjs.20240127002　　[文章编号] 1673-1689(2024)12-0064-07

玻璃化转变温度和崩解温度对植物乳植杆菌冷冻干燥存活率的影响

戴丽君[1]　宋　馨[1]　夏永军[1]　艾连中[1,2]　王光强[1,2*]

(1. 上海理工大学健康科学与工程学院,上海 200093; 2. 上海理工大学公利医院医疗技术学院,上海 200093)

摘要:【目的】测定保护剂的玻璃化转变温度(T_g)和崩解温度(T_c)对植物乳植杆菌(*Lactobacillus plantarum, L. plantarum*)冷冻干燥存活率的影响。**【方法】**利用差示扫描量热(DSC)法和冷冻干燥显微镜(FDM)技术测定质量分数10%的蔗糖、质量分数10%的山梨醇以及PBS缓冲液等保护剂的T_g和T_c,并分析菌株在不同保护剂下的冷冻干燥存活率与T_g、T_c之间的关联性。**【结果】**保护剂菌悬液的T_g和T_c与菌株冷冻干燥存活率之间存在密切相关性。蔗糖组与山梨醇组和PBS组相比,T_g分别提高了7.2 ℃和7.7 ℃,T_c分别提高了8.0 ℃和8.8 ℃,且蔗糖组菌株的冷冻干燥存活率也最高,分别比山梨醇组和PBS组提高了49.2%和54.6%。进一步开发出高T_g的多糖复合保护剂,最佳复合保护剂的T_g和T_c相对于单一蔗糖保护剂分别提高了4.6 ℃和4.4 ℃,冷冻干燥存活率相对于单一蔗糖保护剂提高了28.2%。**【结论】**不同保护剂的T_g和T_c差异极大,并且T_g和T_c越高,菌株的冷冻干燥存活率越高。作者基于T_g开发了高效复合保护剂,有利于提高植物乳植杆菌冷冻干燥存活率。

关键词:植物乳植杆菌;保护剂;冷冻干燥;玻璃化转变温度;崩解温度

Efects of Glass Transition Temperature and Disintegration Temperature on Freeze-Drying Survival Rate of *Lactobacillus plantarum*

DAI Lijun[1]　*SONG Xin*[1]　*XIA Yongjun*[1]　*AI Lianzhong*[1,2]　*WANG Guangqiang*[1,2*]

(1. School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China; 2. School of Gongli Hospital Medical Technology, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: [**Objective**] To determine the effects of glass transition temperature(T_g) and collapse temperature(T_c) of protectants on the freeze-drying survival rate of *Lactobacillus plantarum*(*L. plantarum*). [**Method**] The T_g and T_c of protectants, such as 10% sucrose, 10% sorbitol, and PBS buffer, were measured by differential scanning calorimetry (DSC) and freeze-drying microscopy (FDM). [**Result**] The relationship of the freeze-drying survival rate of strains with the T_g and T_c of different protectants showed that there was a close relationship of the freeze-drying survival rate of strains with the T_g and T_c of the protectant suspension. Compared to sorbitol and PBS groups, the T_g of sucrose group increased by 7.2 and 7.7 ℃, respectively, while T_c increased by 8.0 and 8.8 ℃, respectively. The freeze-drying survival rate of the sucrose group was the highest, showing improvements of 49.2% and 54.6% over the sorbitol and PBS groups, respectively. Furthermore, a high T_g polysaccharide composite protectant was developed. The T_g and T_c of the optimal composite protectant increased by 4.6 ℃ and 4.4 ℃ compared to those of a single sucrose protectant, and the freeze-drying survival rate was 28.2% higher

基金项目:国家自然科学基金面上项目(32172186)。

通信作者:王光强(1985—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事益生菌及其保藏研究。E-mail:1015wanggq@163.com

收稿日期:2024-01-27　**修回日期:**2024-02-21

than that of a single sucrose protectant. [**Conclusion**] The results showed that the T_g and T_c of different protectants were very different. As the T_g and T_c became higher, the freeze-drying survival rate was higher. Based on T_g, a highly efficient composite protectant was developed, which was beneficial in improving the freeze-drying survival rate of *Lactobacillus plantarum*.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*; protectant; freeze-drying; glass transition temperature; collapse temperature

干粉发酵剂以其运输储存的便捷性、低成本以及出色的遗传稳定性在多个领域得到了广泛应用。然而，在冷冻干燥过程中，干粉发酵剂通常会受到生理损伤，甚至导致细胞死亡。这一现象的产生主要归因于膜完整性和流动性受损，以及关键酶、蛋白质和核糖核酸等生物大分子遭到破坏[1]。因此常加入蔗糖、海藻糖等保护剂以提高菌株的冷冻干燥存活率。在样品冷冻干燥过程中，这些保护剂可除去水并增加基质中的溶质浓度，从而使溶质获得良好的玻璃态特性[2]。玻璃态是一种高黏性状态，可将细胞结构嵌入其中，同时减少分子的迁移性和破坏性反应[3]。由单一化合物或混合物组成的保护剂显示出特有的玻璃化转变特性，糖的T_g定义为样品从玻璃态转化到橡胶态的二阶相变温度，液体黏度至少为1 013 Pa·s，低于该温度时液体黏度将急剧增加[4]。糖的T_g取决于糖的相对分子质量以及分子间的相互作用，一般来说，糖的T_g随着相对分子质量的增加而增加[5]。通常认为非晶产物在T_g以下具有较高的内部黏度，呈固态或玻璃态时是稳定的[6]；当温度升高到T_c以上时，材料的各种性质可能会发生变化，如分子流动性增加、黏度降低，通常会导致添加溶质的样品易结晶，使食品变质。因此，T_g决定了产品在储存期间的稳定性[7-9]。

在干燥过程中，含有保护剂的菌液在较高温度下进行初级干燥时容易塌陷，为了避免塌陷，需要控制在T_c以下。T_c定义为可见塌陷时的温度，通常取少量样品在显微镜下进行冷冻和干燥来模拟微型冷冻干燥过程，并用冷冻干燥显微镜测定[10]。在细菌悬液稳定性得以保证的情况下，尽可能提高干燥过程的温度（低于T_c）可加快干燥速度，缩短加工时间而不损伤菌体结构[11-12]。因此，优化保护剂配方从而获得更高的T_g和T_c，对于在冷冻干燥过程中提高菌株的存活率有重大意义。

ATP酶在细胞膜系统中扮演着至关重要的角色，它不仅能够催化ATP水解成ADP和游离磷酸根离子，也能催化该反应的逆反应，这一系列的反应涉及能量的释放与储存，是细胞维持正常生理功能所必需的[13]。ATP比酶活对于评估冷冻干燥过程中菌株的生理状态具有重要意义。ATP比酶活的高低可以反映菌株在冷冻干燥后细胞膜的完整性以及代谢活动的恢复情况。如果ATP比酶活较高，说明菌株在冷冻干燥过程中受到的损伤较小，细胞膜功能恢复良好，代谢活动正常；如果ATP比酶活较低，则可能意味着菌株在冷冻干燥过程中受到了较大的损伤，细胞膜功能受损，代谢活动受到抑制[14-16]。

目前已有大量关于T_g和T_c的研究，但是针对保护剂的T_g和T_c对菌株冷冻干燥存活率的影响机制还需深入研究，尤其是如何通过改变T_g和T_c得到高活性的复合保护剂。作者以3株植物乳植杆菌为研究对象，采用质量分数10%的蔗糖、质量分数10%的山梨醇和PBS缓冲液为保护剂，研究菌体悬液的T_g、T_c对菌株冷冻干燥存活率的影响，并以此为基础，设计新型的复合保护剂来提高菌株的冷冻干燥存活率。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

3株*L. plantarum*：作者所在课题组保藏；ATP酶测定试剂盒：南京建成生物工程研究所有限公司；MRS培养基、蔗糖、山梨醇、脂肪酸C18∶1：上海源叶生物试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

真空冷冻干燥机：FreeZone型，合臣科技（上海）有限公司；DSC：Pyris 6.0型，德国耐驰仪器（中国）有限公司；FDM：FDCS196型，比特乐医疗器械（深圳）有限公司；紫外分光光度计：UV2600型，岛津仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 *L. plantarum*活化培养

*L. plantarum*在固体MRS培养基中活化3代，将体积分数为1%的种子液接种于液体MRS培

养基中，分别在 18 ℃和 37 ℃培养箱中培养至对数期。

1.3.2 样品制备及冷冻干燥存活率计算

调节菌体浓度，使其 OD_{600} 值为 1。离心弃上清液，收集 2 mL 的 *L. plantarum* 菌泥用 PBS 缓冲液清洗 2 次，然后分别重悬于含 1 mL PBS 缓冲液、质量分数 10% 的蔗糖溶液和质量分数 10% 的山梨醇溶液中。于−40 ℃预冷 3 h 后进行真空干燥，干燥条件：−20 ℃干燥 13 h 20 min，然后升温至 25 ℃再干燥 2 h，真空度 20 Pa，冷阱温度−80 ℃。

采用平板菌落计数法测定冻干前后的活菌浓度。将冻干后的菌粉重新溶解于 1 mL 的 PBS 缓冲液中，稀释后涂布于 MRS 培养基，37 ℃培养 36~48 h，活菌浓度计算见式（1）。

$$S=\frac{N_A}{N_B}\times 100\% \quad (1)$$

式中：

S——冷冻干燥存活率，%；

N_A——冻干后的活菌浓度，CFU/mL；

N_B——冻干前的活菌浓度，CFU/mL。

复合保护剂组别为Ⅰ：质量分数 1% 大豆多糖+质量分数 10% 蔗糖；Ⅱ：质量分数 1% 大豆多糖+质量分数 10% 海藻糖；Ⅲ：质量分数 1% 大豆多糖+质量分数 10% 甘露醇+10% 蔗糖；Ⅳ：质量分数 1% 大豆多糖+质量分数 10% 甘露醇+质量分数 10% 海藻糖；Ⅴ：质量分数 1% 大豆多糖+质量分数 10% 甘露醇+质量分数 10% 海藻糖+质量分数 10% 蔗糖。

1.3.3 T_g 和 T_c 的测定

根据 Fonseca 等[17]的方法测定 T_g 和 T_c。T_g 的测定：称取 22.5 mg 的样品放入 DSC 中，从 25 ℃降温至 −70 ℃，速率为 10 ℃/min，持续 2 min，以 5 ℃/min 的速率升温至 25 ℃，T_g 为玻璃态向高弹态转变时的温度。T_c 的测定：用移液器吸取 2 μL 样品置于控温平台上，迅速降温至−45 ℃，维持 1 min 后升温至 25 ℃，速率为 2 ℃/min。通过自带的监测软件观察样品图像，升温中样品结构发生坍塌[18]时的温度为 T_c。

1.3.4 ATP 比酶活的测定

采用 ATP 酶测定试剂盒测定 ATP 比酶活。

1.4 数据处理

采用 Excel 处理数据，用 GraphPad prism 9 绘图并进行单因素方差分析，$P<0.05$ 为差异显著。

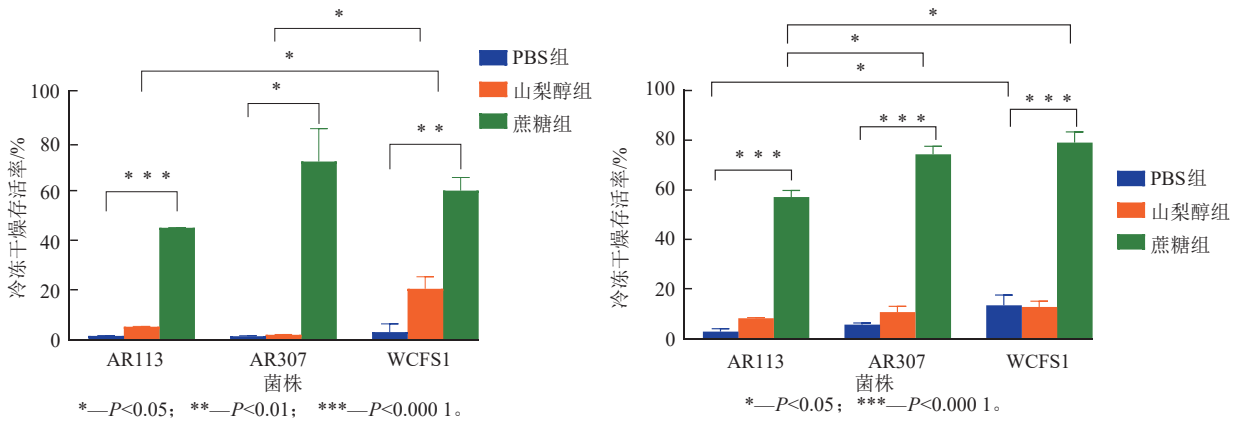
2 结果与讨论

2.1 单一保护剂下 T_g 和 T_c 的变化对 *L. plantarum* 冷冻干燥存活率的影响

在添加不同保护剂条件下，分别测定了 18 ℃和 37 ℃下 3 株 *L. plantarum* 的冷冻干燥存活率。如图 1 所示，与 PBS 组和山梨醇组相比，蔗糖组能明显提高 *L. plantarum* 的冷冻干燥存活率，山梨醇作为保护剂时，菌株的冷冻干燥存活率高于 PBS。培养温度对 3 株 *L. plantarum* 冷冻干燥存活率的影响不存在显著差异。其中，蔗糖作为保护剂的效果最为理想，冷冻干燥存活率提高了 40%~78%。18 ℃培养时，相比于 AR113 和 AR307，山梨醇能明显提高 WCFS1 的冷冻干燥存活率。在 37 ℃培养时，AR307 和 WCFS1 在蔗糖溶液中的冷冻干燥存活率显著高于 AR113，保护剂的差异也是影响菌株冷冻干燥存活率的因素之一。Kawai 等[19]发现蔗糖提高了干面包酵母的储存稳定性。Zhang 等[20]研究了多种保护剂对菌株冷冻干燥存活率的影响，为蔗糖能够提高菌株的冷冻干燥存活率提供了理论支撑。其他研究中也发现了蔗糖在冷冻干燥过程中对蛋白质和细胞膜的保护作用，以及在无水条件下对细胞膜流动性的维持功能[21-22]，为研究菌种的冷冻干燥存活率和细胞保护方面提供了依据。

将 *L. plantarum* 重悬在保护剂中，通过 DSC 测定 T_g。在 37 ℃培养时，与 PBS 组和山梨醇组相比，蔗糖组显著提高了菌悬液的 T_g，分别提高了 7.7 ℃和 7.2 ℃，而山梨醇组与 PBS 组无明显差异（见表 1）。如图 1 所示，在蔗糖组中，AR113 的冷冻干燥存活率提高至 57.2%，而在山梨醇组和 PBS 组中仅为 8.0% 和 2.6%。在冷冻干燥过程中，蔗糖对菌株冷冻干燥存活率的提升作用是通过提高 T_g 这一机制实现的，这与 Anzalone 等[23]的结果一致，他们使用不同质量分数的蔗糖溶液重悬脂质体，并在特定的降温速率下观察到了 T_g 在质量分数 5%~15% 蔗糖溶液中的变化。

用质量分数 10% 的蔗糖溶液重悬 AR113、AR307 以及 WCFS1，并分别在 18 ℃和 37 ℃下进行培养，结果发现不论是同一株菌在不同培养温度下还是不同菌株在相同培养温度下，其 T_g 都没有明显



*—P<0.05；**—P<0.01；***—P<0.000 1。

(a) 18 ℃培养时菌株的冷冻干燥存活率　　(b) 37 ℃培养时菌株的冷冻干燥存活率

图 1　单一保护剂下 *L. plantarum* 的冷冻干燥存活率

Fig. 1　Freeze-drying survival rates of *L. plantarum* under single protectants

表 1　不同保护剂下菌株的 T_g

Table 1　T_g of strains under different protectants

培养温度/℃	保护剂	T_g/℃		
		AR113	AR307	WCFS1
18	蔗糖	−33.40±0.45	−33.60±0.60	−33.00±0.60
	PBS	−41.00±0.63	—	—
	山梨醇	−40.50±0.58	—	—
37	蔗糖	−33.30±0.43	−33.10±0.50	−32.80±0.43
	PBS+C18∶1	−40.70±0.56	—	—
	山梨醇+C18∶1	−40.00±0.55	—	—
	蔗糖+C18∶1	−33.20±1.08	—	—

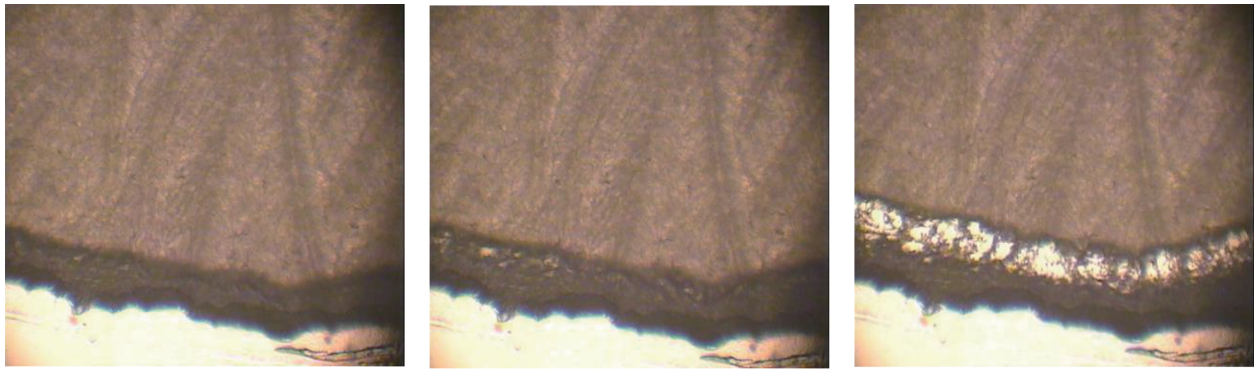
注：“—”表示未检测到。

差异。同时，在MRS液体培养基中额外添加1 g/L脂肪酸C18∶1并测定菌悬液的T_g，结果显示添加脂肪酸未能提高T_g。表明培养温度和菌株个体差异以及脂肪酸C18∶1都不影响菌株重悬液的T_g。

用PBS缓冲液、质量分数10%的山梨醇溶液以及质量分数10%的蔗糖溶液重悬*L. plantarum* AR113，通过FDM观察并拍照记录，可以清晰地看到样品在不同温度下的形态变化。如图2所示，样品未塌陷状态时没有出现亮斑；样品呈现微塌陷状态时开始出现亮斑，这时的温度称为T_c；当样品呈现明显塌陷时，亮斑变得越来越大。

在37 ℃培养时，相较于PBS缓冲液和质量分数10%的山梨醇溶液，质量分数10%的蔗糖溶液能明显提高菌悬液的T_c，分别提高了8.8 ℃和8.0 ℃，见表2。这表明提高T_c或许有助于提高菌种的冷冻干燥存活率，这与蔗糖的T_g结果一致，并且菌株差异以及培养温度对冷冻干燥存活率的影响并非由T_c引起。此外，添加脂肪酸C18∶1对*L. plantarum*的T_c也未表现出明显影响。

综上所述，提高T_g和T_c确实能够有效减少细



(a) 未塌陷　　(b) 微塌陷　　(c) 明显塌陷

图 2　*L. plantarum* AR113 的 FDM 图像

Fig. 2　FDM images of *L. plantarum* AR113

表 2 不同保护剂下 *L. plantarum* 的 T_c

Table 2 T_c of *L. plantarum* under different protectants

培养温度/℃	保护剂	T_c/℃		
		AR113	AR307	WCFS1
18	蔗糖	−32.20±0.40	−33.00±1.03	−31.50±1.05
37	PBS	−39.80±0.45	—	—
	山梨醇	−39.00±0.38	—	—
	蔗糖	−31.00±0.44	−31.70±0.46	−31.40±0.77
	PBS+C18:1	−39.60±0.67	—	—
	山梨醇+C18:1	−39.20±1.01	—	—
	蔗糖+C18:1	−30.50±0.57	—	—

注:“—”表示未检测到。

胞在低温下形成冰晶的风险,这对于保护细胞免受生理损伤至关重要,进而提高了菌株的冷冻干燥存活率。蔗糖作为一种有效的冷冻保护剂,其提高 *L. plantarum* 冷冻干燥存活率的关键机制就在于它能够显著提高 T_g 和 T_c,而并非是菌株差异和培养温度改变了冷冻干燥存活率。因此,开发能够提高 T_g 和 T_c 的保护剂配方是提高菌株冷冻干燥存活率的重要手段之一,以实现最佳的冷冻干燥效果。

2.2 复合保护剂下 T_g 和 T_c 的变化及对菌株冷冻干燥存活率的影响

保护剂的 T_g 和 T_c 越高,其保护效果就越好。Linnenkugel 等[24]研究表明添加多糖和盐类都能提高单糖的 T_g。Rogers 等[25]研究表明多糖的存在提高了蔗糖溶液的 T_g,在冷冻乳制品体系中,多糖的添加提高了未冷冻阶段乳制品的黏度,从而减少了晶体的生长。杨智等[26]也得出糖类的塌陷温度和 T_g 均随样品质量分数的增大而增大。因此,将质量分数 1% 的大豆多糖与几种单一保护剂进行复配并测定冷冻干燥存活率,结合图 1 和图 3 可知,复合保护剂的效果显著优于单一蔗糖,并通过 DSC 和 FDM 测定复合保护剂对菌悬液 T_g 和 T_c 的影响(见表 3)。结果显示,AR307 的最佳组合为 III,冷冻干燥存活率达 81.0%;WCFS1 的最佳组合是 II,冷冻干燥存活率为 90.8%;AR113 最佳组合为 II,冷冻干燥存活率为 85.4%。在最佳复合保护剂中,37 ℃下菌悬液的 T_g 分别为 −28.70、−32.30、−29.20 ℃,分别比单一蔗糖溶液提高了 4.60、0.80、3.60 ℃。相较于单一蔗糖,最佳复合保护剂使 37 ℃下菌悬液的 T_c 均明显升高,AR113 培养组的 T_c 提高了 4.40 ℃,达到 −26.60 ℃;AR307 培养组的 T_c 提高至 −29.80 ℃,提高了 1.90 ℃;WCFS1 培养组的 T_c 提高至 −25.60 ℃,提高了 5.80 ℃。这表明在单一保护剂中添加多糖后便可以使之成为复合保护剂,可明显提高 T_g 和 T_c,进而明显增强对益生菌的保护效果。马丽等[27]优化了保护剂组合,使鼠李糖乳酪杆菌在冷冻干燥后的存活率达到了 96.4%。周雷进雨等[28]将质量分数分别为 15% 海藻糖、2% 硫代硫酸钠、15% 甘露醇、3% 山梨醇作为保护剂,冷冻后活菌浓度为 4.6×10^9 CFU/mL,得到的菌种存活率为 90%。随着保护剂的 T_g 和 T_c 提高,其保

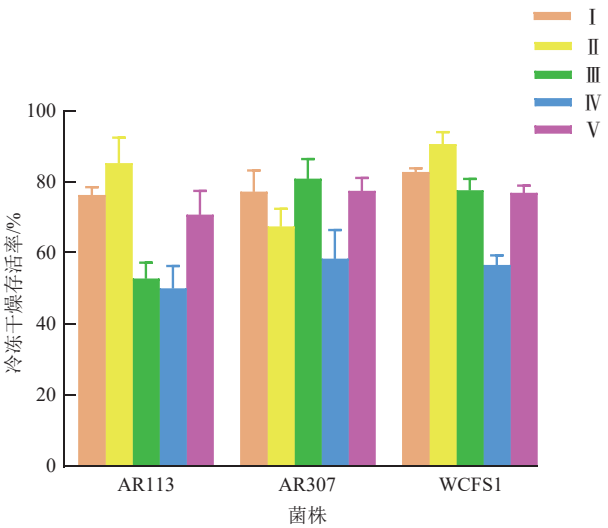


图 3 不同复合保护剂对 *L. plantarum* 冷冻干燥存活率的影响

Fig. 3 Effects of different composite protectants on the freeze-drying survival rate of *L. plantarum*

表 3 复合保护剂对菌悬液 T_g 和 T_c 的影响

Table 3 Effects of combinations of multiple protectants on T_g and T_c of the strain suspension

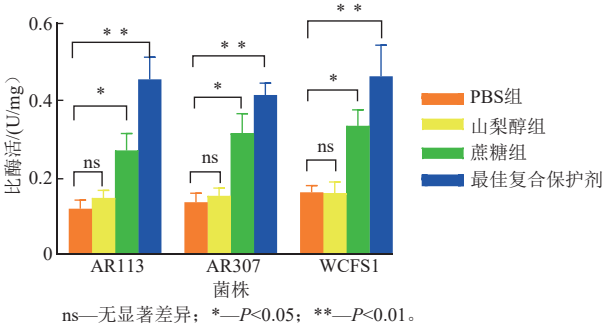
培养温度/℃	保护剂	T_g/℃			T_c/℃		
		AR113	AR307	WCFS1	AR113	AR307	WCFS1
37	II	−28.70±0.35	—	−29.20±0.88	−26.60±0.44	—	−25.60±0.57
	III	—	−32.30±0.46	—	—	−29.80±0.66	—

注:“—”表示未检测到。

护效果呈现增强的趋势，糖与糖之间的协同作用对提高 *L. plantarum* 的冷冻干燥存活率具有重要的作用。通过合理复配可以发挥各组分之间的互补优势，进一步增强保护效果。

2.3　冷冻干燥对 *L. plantarum* ATP 比酶活的影响

添加不同单一保护剂及最佳复合保护剂后，在37 ℃下培养3株菌，菌悬液冷冻干燥后测得的ATP比酶活如图4所示。结果表明，蔗糖组的ATP比酶活显著高于山梨醇组和PBS组，而山梨醇组和PBS组之间没有显著差异。可能是由于蔗糖提高了 T_g 和 T_c，能更有效地保护细胞膜结构和功能，从而保持较高的ATP比酶活，而山梨醇和PBS在这些方面效果稍差。此外，最佳复合保护剂组的ATP比酶活高于单一蔗糖、山梨醇和PBS，这也与 T_g、T_c 和菌株冷冻干燥存活率的测定结果一致。因此，蔗糖和最佳复合保护剂可以通过提高 T_g 和 T_c，减少细胞在低温下的冰晶形成，保护细胞的膜结构和内部代谢系统，维持ATP的比酶活，从而提高菌株的冷冻干燥存活率。



ns—无显著差异；*—P<0.05；**—P<0.01。

图4　不同保护剂对 *L. plantarum* ATP 比酶活的影响

Fig. 4　Effects of different protectants on the ATP-specific enzyme activity of *L. plantarum*

3　结论

以3株 *L. plantarum* AR113、AR307、WCFS1为研究对象，采用PBS缓冲液、质量分数均为10%的山梨醇溶液和蔗糖溶液作为保护剂，分析了冷冻干燥过程中 T_g、T_c、菌株冷冻干燥存活率和ATP比酶活的变化。结果表明，T_g 和 T_c 与冷冻干燥存活率呈正相关。与PBS和山梨醇相比，蔗糖提高 T_g 和 T_c 的效果更好，显著提升了 *L. plantarum* 的冷冻干燥存活率。同时，也进一步证明菌株间的个体差异、脂肪酸C18:1的添加以及菌株培养温度并非是影响 T_g 和 T_c 的主导因素。此外，ATP比酶活的数据表明，T_g 和 T_c 的上升有助于维持更高的比酶活，从而减轻冷冻干燥过程中细胞的损伤，有效保护胞内物质。综上所述，相较于PBS和山梨醇，蔗糖作为保护剂的效果更佳，通过显著提升 T_g 和 T_c，进而增强ATP比酶活，从而显著提高 *L. plantarum* 的冷冻干燥存活率。因此，选择具有高 T_g 和 T_c 的保护剂，尤其是复合保护剂，是提升菌株冷冻干燥存活率的有效策略。该研究为今后开发更高效、更稳定的冷冻干燥保护剂提供了参考。

参考文献

[1] ISLAM M Z, HOSSAIN F, ALI M H, et al. Relationship between antimicrobial peptides-induced cell membrane damage and bactericidal activity [J]. Biophysical Journal, 2023, 122(24): 4645-4655.

[2] DUPAS J, BALDEWECK F, MEUNIER V. Experimental study on the impact of key material properties on flowability of sucrose and maltodextrin[J]. Journal of Food Engineering, 2024, 364: 111802.

[3] MIKAJIRI S, SOGABE T, CAO R D, et al. Glass transition behavior of carnosine and its impact as a protectant on freeze-dried lactic acid bacteria[J]. Food Biophysics, 2022, 17: 1-9.

[4] FALTUS M, BILAVCIK A, ZAMECNIK J. Vitrification ability of combined and single cryoprotective agents[J]. Plants, 2021, 10(11): 2392.

[5] KASHIWAKURA Y, SOGABE T, HIYAMA Y, et al. Prediction and control of glass transition temperature for hydrogenated starch hydrolysates and its impact on the texture modification of gummy[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 126: 107467.

[6] 徐斐，戴军，王璋，等. 碳水化合物对浓缩橙汁的玻璃化转变温度和黏度的影响[J]. 无锡轻工大学学报，2000，19(3)：236-239.
XU F, DAI J, WANG Z, et al. Effects of carbohydrates on glass transition temperature and viscosity of concentrated orange juice[J]. Journal of Wuxi University of Light Industry, 2000, 19(3): 236-239.(in Chinese)

[7] LINNENKUGEL S, PATERSON A H J, HUFFMAN L M, et al. Prediction of the glass transition temperature of low molecular weight components and polysaccharide mixtures [J]. Journal of Food Engineering, 2021, 292: 110345.

[8] LINNENKUGEL S, PATERSON A H J, HUFFMAN L M, et al. Prediction of the effect of water on the glass transition temperature of low molecular weight and polysaccharide mixtures[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 128: 107573.

[9] SRITHAM E，GUNASEKARAN S．Thermal evaluation of sucrose-maltodextrin-sodium citrate bioglass：glass transition temperature[J]．Food Hydrocolloids，2016，60：589-597．

[10] HORN J，FRIESS W．Detection of collapse and crystallization of saccharide，protein，and mannitol formulations by optical fibers in lyophilization[J]．Frontiers in Chemistry，2018，6：1-9．

[11] MEISTER E，SASIĆ S，GIESELER H．Freeze-dry microscopy：impact of nucleation temperature and excipient concentration on collapse temperature data[J]．AAPS PharmSciTech，2009，10：582-588．

[12] PISANO R，ARSICCIO A，NAKAGAWA K，et al．Tuning，measurement and prediction of the impact of freezing on product morphology：a step toward improved design of freeze-drying cycles[J]．Drying Technology，2019，37（5）：579-599．

[13] 张申奥，陈飞龙，陈博，等．常见盐渍食品中嗜盐微生物分布及其胞外酶活[J]．食品与生物技术学报，2023，42（8）：38-45．
ZHANG S A，CHEN F L，CHEN B，et al．Distribution of halophilic microorganisms in commercial salted-foods and production of extracellular enzymes[J]．Journal of Food Science and Biotechnology，2023，42（8）：38-45．（in Chinese）

[14] WEISSERT V，RIEGER B，MORRIS S，et al．Inhibition of the mitochondrial ATPase function by IF1 changes the spatiotemporal organization of ATP synthase[J]．Biochimica et Biophysica Acta（BBA）-Bioenergetics，2021，1862（1）：148322．

[15] LITTY D，MÜLLER V．ATP synthesis in an ancient ATP synthase at low driving forces[J]．PANS，2022，119（19）：e2201921119．

[16] GUO H，SUZUKI T，RUBINSTEIN J L．Structure of a bacterial ATP synthase[J]．eLife，2019，8：e43128．

[17] FONSECA F，PASSOT S，CUNIN O，et al．Collapse temperature of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* suspensions and protective media[J]．Biotechnology Progress，2004，20（1）：229-238．

[18] 于小青．植物乳植杆菌在冷冻干燥过程中生理损伤及保护策略的研究[D]．上海：上海理工大学，2021．

[19] KAWAI K，SATO K，LEE K，et al．Effects of glass transition and hydration on the biological stability of dry yeast[J]．Journal of Food Science，2021，86（4）：1343-1353．

[20] ZHANG P F，XING X N，WANG X，et al．Comparison of fatty acid analysis with serotype and pulsed-field gel electrophoresis for typing *Salmonella* isolated from retail foods and human[J]．Journal of Food Safety，2014，34（4）：388-395．

[21] CHEN L C，XUE S W，DAI B H，et al．Sucrose osmotic self-oscillation drives membrane permeability[J]．Journal of Agricultural and Food Chemistry，2023，71（19）：7557-7565．

[22] WANG A Y，LIN J，ZHONG Q X．Synergistic effects of whey protein isolate and amorphous sucrose on improving the viability and stability of powdered *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514[J]．LWT-Food Science And Technology，2020，118：108722．

[23] ANZALONE A V，RANDOLPH P B，DAVIS J R，et al．Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA[J]．Nature，2019，576（7785）：149-157．

[24] LINNENKUGEL S，PATERSON A H J，HUFFMAN L M，et al．The effect of polysaccharide blends and salts on the glass transition temperature of the monosaccharide glucose[J]．Journal of Food Engineering，2022，322：110961．

[25] ROGERS M A，ROOS Y H，GOFF H D．Structural heterogeneity and its effect on the glass transition in sucrose solutions containing protein and polysaccharide[J]．Food Hydrocolloids，2006，20（6）：774-779．

[26] 杨智，李代禧，张燕等．冷冻干燥过程中重要参数塌陷温度的研究[J]．应用化工，2014，43（5）：962-965．
YANG Z，LI D X，ZHANG Y，et al．The important parameters in the process of freeze-drying[J]．Applied Chemical Industry，2014，43（5）：962-965．（in Chinese）

[27] 马丽，刘会平，徐乙文，等．响应面法优化鼠李糖乳杆菌TUST006培养基的研究[J]．现代食品科技，2010，26（7）：717-720．
MA L，LIU H P，XU Y W，et al．Optimization of the medium composition for production of *Lactobacillus rhamnosus* TUST006 by response surface methods[J]．Modern Food Science and Technology，2010，26（7）：717-720．（in Chinese）

[28] 周雷进雨，马精阳，袁月明，等．干酪乳杆菌复合冻干保护剂工艺优化[J]．饲料工业，2023，44（22）：86-93．
ZHOU L J Y，MA J Y，YUAN Y M，et al．Optimization of complex lyophilized protective agent for *Lactobacillus casei*[J]．Feed Industry，2023，44（22）：86-93．（in Chinese）

（责任编辑：史润东东）