

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2022.90106

降温速率对苹果细胞结构的影响

Microscopic experimental study on the influence of different cooling rates on the structure of apple cells

张哲 吴巧燕 陈佳楠 徐垚 计宏伟

ZHANG Zhe WU Qiao-yan CHEN Jia-nan XU Yao JI Hong-wei

(天津商业大学天津市制冷技术重点实验室, 天津 300134)

(Tianjin Key Laboratory of Refrigeration Technology, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China)

摘要:目的:找到苹果最适宜的降温速率。方法:利用低温冷台设备观测苹果组织细胞结构的变化及在降温前后其冻结温度的变化,同时对比分析其面积、圆度、周长、直径、变形度、体积、内压各参数的变化趋势。结果:随着降温速率的增大,苹果细胞的结冰温度逐渐降低,冻结时间逐渐缩短。苹果细胞7种形态学参数随之发生变化,且变化趋势一致,随降温速率增大先减小后增大。结论:苹果细胞适宜的降温速率为10 °C/min。

关键词:降温速率;组织损伤;形态学参数;胞内冰晶;果蔬细胞

Abstract: **Objective:** To find the most suitable cooling rate to meet people's requirements for apple storage quality at low temperature. **Methods:** The changes of apple tissue and cell structure were observed by low-temperature cold table equipment, and the changes of freezing temperature before and after cooling were compared and analyzed. Meanwhile, the changing trends of area, roundness, circumference, diameter, deformation, volume and internal pressure were compared and analyzed. **Results:** With the increase of cooling rate, the freezing temperature and freezing time of apple cells decreased gradually. The morphological parameters of apple cells changed with the increase of cooling rate, and the change trend was the same. **Conclusion:** The optimum cooling rate of apple cells was 10 °C/min.

Keywords: cooling rate; tissue damage; morphological parameters; intracellular ice crystals; fruit and vegetable cells

应用最广泛的最佳方式的果蔬食材贮运方式是低温贮藏^[1],在此过程中,细胞组织温度下降,细胞内冰晶体

出现、重结晶发生,进而给果蔬组织细胞带来损伤^[2],造成贮藏过程中品质劣变,降低营养价值^[3]。

国内外很多研究人员针对低温细胞损伤做出大量研究。Meryman等^[4]研究冷冻复温过程中对细胞的损伤机制,指明细胞外渗透压会引起细胞变形,复温过程现象与降温过程逆过程类似,水分向外渗透对细胞产生损伤。晏绍庆等^[5]分析马铃薯在速冻下对其细胞结构的影响,指出速冻导致细胞结构严重受损,降低了马铃薯片质地。黎继烈等^[6]指出板栗冻结缓慢使得冰晶局部集中,造成细胞局部损伤。张哲等^[7]研究葡萄冷冻—复温过程发现,复温速率越大,复温后对细胞的损坏越大。Prestamo等^[8]利用光学显微镜研究冷冻下细胞显微结构的损伤。鲁礼明等^[9]研究草莓圣女果在不同冷冻下的形态结构破坏情况,表明冷冻速率越快,解冻后的苹果圣女果形态结构保存越好。刘斌等^[10]和王鹏飞等^[11]分别研究了不同速冻速率对洋葱细胞结构、胡萝卜细胞的影响。Bank^[12]对酵母细胞进行快速冷却,采用冷冻—压裂技术观测细胞的结构,发现在迁移过程中酵母细胞从小冰晶体凝聚成重结晶。刘圣春等^[13]研究不同降温速率下蚕豆细胞结构的变化,慢冻比速冻细胞形态变化大。赵静^[14]研究表明加大冷冻速率,对葡萄细胞机械损伤小。吴锦涛等^[15]研究荔枝冻结规律以提高速冻荔枝商品质量。王雅博等^[16]研究得出冷却速率越慢对洋葱细胞内表皮细胞结构造成的机械损伤越大。

试验旨在从微观方面研究在温度载荷下果蔬细胞组织的损伤机理,利用低温显微镜系统观察降温速率对细胞变形程度的影响以及细胞内部的损伤演变过程,从形态学参数出发分析苹果的损伤规律。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

烟台苹果:无损伤病害、大小一致、新鲜成熟,市售;

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:12172254,52106106);

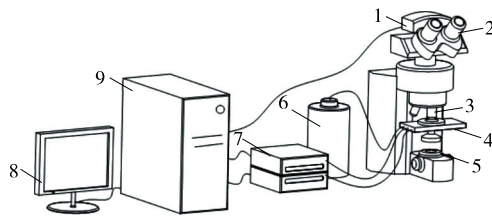
天津市研究生科研创新项目(编号:2021YJSS291)

作者简介:张哲(1975—),男,天津商业大学教授,博士。

E-mail: zhangzhe@tjcu.edu.cn

收稿日期:2021-12-11 **改回日期:**2022-04-06

低温显微镜系统(如图1所示):配有用于信息采集、储存的计算机,BX-43型生物显微镜(日本奥林巴斯公司),FDSC196型冷热台(英国林克曼科学仪器公司),Linksys32温度控制软件。



1. CCD照相机 2. 目镜 3. 物镜 4. FDSC196型冷热台 5. 光源 6. 液氮罐 7. 冷热台温度控制系统 8. 计算机 9. 主机

图1 低温显微镜系统

Figure 1 Cryogenic microscope system

1.2 方法

选取新鲜苹果,剥去外表皮,将苹果果肉切成厚度在190~200 μm 范围内,在气密内腔样品室的冷热台中放置装有果肉切片的载玻片,载玻片放置在高导热的银质加热元件上。控制系统指令由Linksys32软件设定发出,对腔体温度变化进行实时跟踪并调整。温度控制由液氮和电加热丝同时作用,控温偏差在 ± 0.1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$,精确控制降温、升温速率和某一点温度点的保持。设定降温速率分别为1,2,5,8,10,15,20,50,90 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。液氮流量是根据所设定的降温速率和苹果样品温度,通过铂金电阻的反馈计算液氮泵功率进行调整,液氮泵将液氮压缩后吹扫内腔,调整螺杆控制样品在X轴和Y轴移动。对样品进行观察分析时,使样品正好投射到物镜,可通过目镜观察,也利用显微镜上的高速摄像机将画面投到计算机显示器上,清晰观察苹果细胞结构变化,记录变化时的时间和温度。采集的微观细胞图片用Image Pro-plus 6.0软件进行处理分析,软件测量得到细胞的面积与周长。

1.2.1 当量直径及圆度计算 由式(1)、式(2)计算:

$$d = \sqrt{\frac{4A}{\pi}}, \quad (1)$$

$$S_R = \frac{4\pi A}{l^2}, \quad (2)$$

式中:

d ——当量直径, μm ;

S_R ——细胞圆度;

A ——细胞面积, μm^2 ;

l ——细胞周长, μm 。

1.2.2 细胞变形度计算 参照文献[17],由式(3)计算细胞变形度。

$$\epsilon = \gamma_a - \gamma_b, \quad (3)$$

式中:

ϵ ——细胞变形度;

γ_a ——细胞降温前长短轴之比, μm ;

γ_b ——细胞降温后长短轴之比, μm 。

1.2.3 体积及内压计算 由式(4)、式(5)计算:

$$V = \frac{l^3}{6\pi^2}, \quad (4)$$

$$\Delta P = \frac{hE\Delta l}{R(1-\gamma^2)2\pi r}, \quad (5)$$

式中:

V ——体积, m^3 ;

ΔP ——内压, N/m^2 ;

Δl ——果蔬细胞周长的变化量, m ;

E ——果蔬细胞壁弹性模量,取 2.67×10^7 N/m^2 ;

R ——变形后果蔬细胞的半径, m ;

h ——果蔬细胞壁厚度,取 1.26×10^{-6} m ;

γ ——果蔬细胞壁的 Poisson 比,取0.33。

2 结果与分析

2.1 苹果细胞的冷冻过程研究分析

图2分别为以1,2,5,8,10,15,20,50,90 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的降温速率利用低温显微镜将苹果细胞从室温20 $^{\circ}\text{C}$ 降温到-30 $^{\circ}\text{C}$ 的冷冻过程显微图。

由图2(a)~图2(e)可知,在1,2,5,8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 降温速率下,苹果细胞出现变形,体积变小。溶质损伤和胞内冰损失是损伤细胞的两个主要因素^[18],细胞在比较低的降温速率下会受到溶质损失。慢冻下细胞间隙产生冰晶,冰晶生长挤压细胞使其变形,随着冰晶的形成,细胞外部的溶液质量摩尔浓度高于细胞内部,从而细胞间隙产生高渗透压。随着时间的推进,细胞内水分通过细胞膜向外流失,导致细胞萎缩。但是未造成细胞破裂,这是因为纤维素、半纤维素等微观元素的存在,在植物细胞壁中起骨架支撑作用,赋予细胞壁优异的韧性和抗拉强度^[19]。由图2(f)~图2(h)可知,在10,15,20,50,90 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的5种降温速率之下,组织细胞未大幅度变形,由于在细胞外和细胞内同时达到结晶条件形成无数分布均匀小冰晶,平衡了压力,苹果细胞的外形特征仍有明显差别,表现为挤压细胞间隙,细胞扩张。这与徐茂等^[20]在快速冻结时对烤甘薯生理指标的影响中的结论一致。

2.2 苹果细胞的结晶时间和结冰温度

在细胞不断冷冻下,细胞内部冰晶体的瞬间形成产生光的散射现象,导致显微镜视野变暗,观察显微图像变暗的点,确定为苹果细胞的结冰点。由图2可知,苹果细胞在由1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 降温速率增大到90 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的降温速率时,对应冻结温度由-16.833 $^{\circ}\text{C}$ 降低到-25.144 $^{\circ}\text{C}$,温度降幅达到49.37%。由图3可知,对应结冰时间由2 078 s 减少到54 s,持续时间也大大缩短。在较高降温速率下的苹果细胞的温度载荷高于较低降温速率下的载荷,苹果细胞过冷度大,相变时间短,迅速形成大量细小的冰



图 2 苹果组织细胞变化情况

Figure 2 Changes of apple tissue cells

晶,释放潜热大。但是在较高降温速率的降温过程中,较大的温度载荷使得细胞内部水分无法及时渗透到细胞外部^[21-22]。所以细胞内水分暂未向外流动就受到温度载荷作用的影响,形成冰晶,导致细胞机械损伤。结冰温度随降温速率的增加逐渐降低,结冰时间随降温速率增加而减小。在 1 °C/min 到 90 °C/min 降温速率变化中,当降温速率 < 8 °C/min 时,结冰时间变化幅度大。而当降

温速率 > 8 °C/min 时,结冰时间变化较小,见图 4。

2.3 苹果细胞的一维形态学参数分析

由图 5、图 6 可知,苹果细胞周长变化量和当量直径随降温速率的增大呈先骤降后增大的趋势。苹果组织细胞在 1 °C/min 的降温速率下周长变化量和当量直径变化量最大是 11.9%,在 90 °C/min 的降温速率下周长变化量最大是 11.2%,变化均大于 10%。由于水形成冰时体积

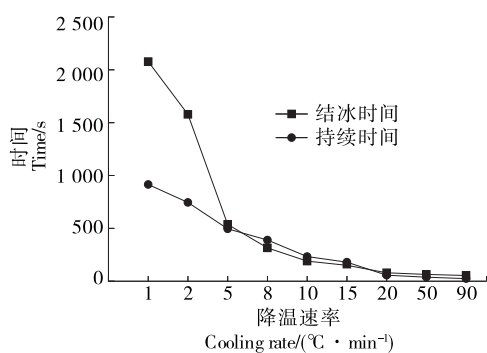


图3 不同降温速率下苹果细胞的冻结时间与持续时间

Figure 3 Freezing time and duration of apple cells at different cooling rates

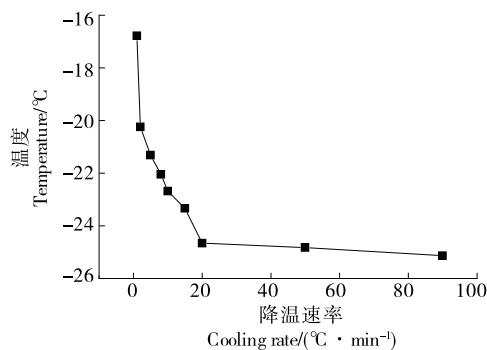


图4 结冰温度

Figure 4 Freezing temperature

要增大9%~10%,细胞必受到机械损伤^[23],当冷却速率比较小或者超级大时,苹果细胞内形成块状大冰晶,细胞变形度增大,细胞组织损伤严重,果蔬品质降低。当在2 °C/min到20 °C/min降温速率区间时,苹果细胞变形度均小于4%,认定组织细胞状态较好,是因为有细胞壁的保护,果蔬细胞仍具有良好柔韧性。当在低于2 °C/min和高于20 °C/min降温速率区间时,对细胞机械损伤较大,见图5~图7。

2.4 苹果细胞的二维形态学参数分析

由图8可知,细胞面积变化量随降温速率的不断增大先减小后增大。苹果面积变化量最高37.69%是在降温速率为90 °C/min的降温过程中,此时细胞损伤严重。苹果面积变化量在10%以下说明细胞损伤小,由图8可知,在2 °C/min到20 °C/min的降温过程中,苹果面积变化量<10%。由图9可知,在降温速率比较低的情况下,苹果细胞圆度变化呈波动状态,前后差距明显。在高于20 °C/min的降温过程中,伴随着降温速率的增加,苹果细胞圆度波动变小,走势愈加缓慢。

2.5 苹果细胞的三维形态学参数

细胞受均匀温度载荷时,细胞形变和细胞内压的变化具有相关性^[24],由图10可知,在90 °C/min的降温速率下,因为降温速率比较高,水分快速冻结导致冰晶体的

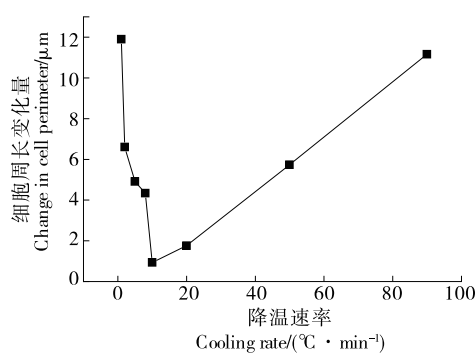


图5 苹果细胞周长变化量

Figure 5 Variation of cell perimeter in apple

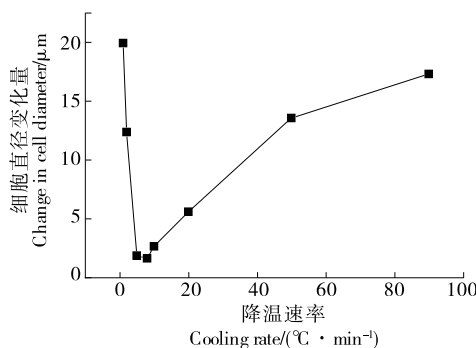


图6 苹果细胞当量直径变化量

Figure 6 Changes in the equivalent diameter of apple cells

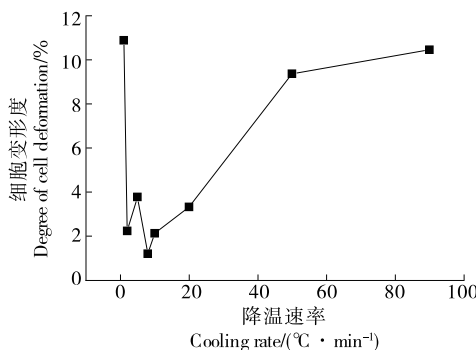


图7 苹果细胞变形度

Figure 7 Degree of cell deformation in apple

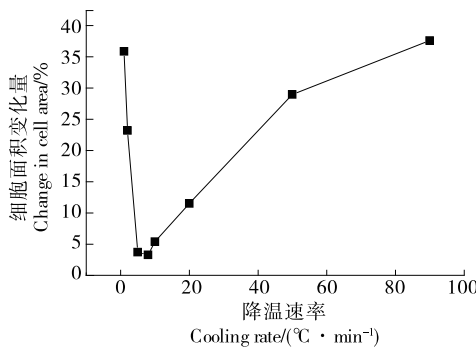


图8 苹果细胞面积变化量

Figure 8 Change in cell area of apple

出现和生长。由于水形成冰时体积会变成原来的 1.1~1.2 倍^[25],故体积变化大,变化量高达 37.4%。由图 11 可知,在 1 °C/min 的降温速率下,因为缓慢冻结,细胞在渗透压作用下流失水分,冰晶持续长大挤压细胞间隙^[26-27],导致体积变化,体积变化量高达 28%。结合图 10 和图 11 可知,在 10 °C/min 降温速率处细胞体积变化量都达到最小状态,仅为 2.8%和 1.69%。

综上,细胞形态学参数变化量>10%的细胞损伤严重,故在 9 种不同降温速率中舍弃使参数变化量在 10%以上的降温速率,得出 10 °C/min 是其最佳降温速率。

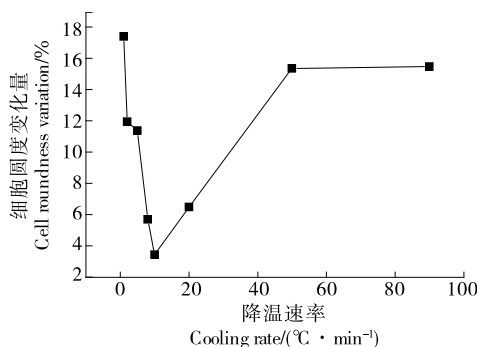


图 9 苹果细胞圆度变化量

Figure 9 Changes of apple cell roundness

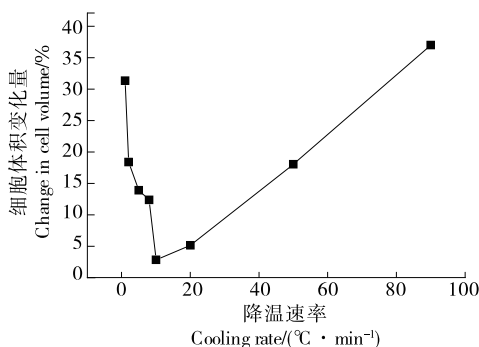


图 10 苹果细胞体积变化量

Figure 10 Changes of cell volume in apple

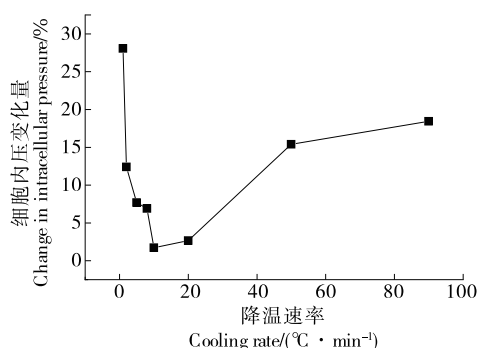


图 11 苹果细胞内压变化量

Figure 11 Changes of intracellular pressure in apple cells

3 结论

对苹果细胞在 1,2,5,8,10,15,20,50,90 °C/min 的冷却速率下进行细胞结构观测,研究细胞损伤机理,得出以下结论:

(1) 在处理苹果冷冻冷藏过程中引发的果蔬细胞损伤问题时,利用得到的苹果细胞最佳降温速率,可以更好地避免温度载荷造成的细胞损伤,尽量减少苹果干耗问题,提高苹果的实用价值和商业价值。

(2) 苹果细胞的结冰温度随冷冻速率的增加而降低,冻结时间也大大缩短。在 1 °C/min 到 90 °C/min 的降温区间中,温度降幅达 49.37%,而对应的结冰时间仅为原来的 1.7%。

(3) 随着降温速率的不断增大,苹果细胞周长、面积和体积均是先减小后增大的趋势。细胞内压随细胞体积而变化。

(4) 最好在贮运过程将降温速率控制在 10~20 °C/min。

参考文献

- [1] 张素文. 玻璃态下冻结、冻藏及其后续解冻对西兰花品质的影响研究[D]. 无锡: 江南大学, 2007: 1-9.
ZHANG S W. Effects of freezing, frozen storage and subsequent thawing on quality of Broccoli in Glassy State[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2007: 1-9.
- [2] 韩道财, 张长峰, 段荣帅, 等. 食品快速冷冻新技术研究进展[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(5): 171-176.
HAN D C, ZHANG C F, DUAN R S, et al. Development of new rapid freezing technology for food[J]. Food Research and Development, 2016, 37(5): 171-176.
- [3] 蔡路昀, 台瑞瑞, 曹爱玲, 等. 冷冻因素对水产品品质的影响及冷冻保鲜的研究进展[J]. 食品工业科技, 2018, 39(20): 308-313.
CAI L Y, TAI R R, CAO A L, et al. Effects of freezing factors on quality of aquatic products and research progress in freezing preservation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(20): 308-313.
- [4] MERYMAN H T, WOLSTENHOIME O E W, O'CONNOR M. The exceeding of a minimum tolerable cell volume in hypertonic suspension as a cause of freezing injury[C]// The Frozen Cell: A Ciba Foundation Symposium. London: [s.n.], 1970: 51-64.
- [5] 晏绍庆, 彭海柱, 华泽钊, 等. 预处理和速冻贮藏对马铃薯片质构特性的影响[J]. 上海理工大学学报, 2000, 22(3): 202-205.
YAN S Q, PENG H Z, HUA Z Z, et al. Effects of pretreatment and quick freezing on texture properties of potato chips[J]. Journal of the University of Shanghai for Science and Technology, 2000, 22(3): 202-205.
- [6] 黎继烈, 陈永安, 唐松元, 等. 速冻对板栗仁细胞结构的影响与酶活性变化的研究[J]. 林业科技开发, 2002, 16(2): 37-38.
LI J L, CHEN Y A, TANG S Y, et al. Effects of quick freezing on the cell structure and enzyme activity of Chestnut Kernel [J].

- Forestry Science and Technology Development, 2002, 16(2): 37-38.
- [7] 张哲, 赵静, 田津津. 冷冻—复温过程中葡萄细胞结晶变化研究[J]. 农业机械学报, 2016, 47(5): 211-217.
- ZHANG Z, ZHAO J, TIAN J J. Study on the changes of grape cell crystallization during freezing-rewarming process[J]. Journal of Agricultural Machinery, 2016, 47(5): 211-217.
- [8] PRÉSTAMO G, FUSTER C, RISUEÑO M C. Effects of blanching and freezing on the structure of carrots cells and their implications for food processing[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1998, 77(2): 223-229.
- [9] 鲁礼明, 张中俊, 李芳, 等. 不同冻结方式对水果形态结构破坏情况的实验研究[J]. 日用电器, 2020(11): 52-56.
- LU L M, ZHANG Z J, LI F, et al. Experimental study on damage of fruit morphological structure by different freezing methods [J]. Household Appliances, 2020(11): 52-56.
- [10] 刘斌, 周晓静, 王瑞星, 等. 冻结速率对洋葱细胞的影响[J]. 热科学与技术, 2014, 13(1): 22-28.
- LIU B, ZHOU X J, WANG R X, et al. Effect of freezing rate on onion cells[J]. Thermal Science and Technology, 2014, 13(1): 22-28.
- [11] 王鹏飞, 邸倩倩, 刘斌, 等. 速冻速率对胡萝卜细胞结构参数的影响[J]. 食品工业科技, 2015, 36(10): 125-129.
- WANG P F, DI Q Q, LIU B, et al. Effect of quick freezing rate on cell structure parameters of carrot[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(10): 125-129.
- [12] BANK H. Visualization of freezing damage structural alterations during warming[J]. Cryobiology, 1973, 10(2): 157-170.
- [13] 刘圣春, 张子涵, 代宝民, 等. 冷驱动下蚕豆细胞结构变化规律实验研究[J]. 热科学与技术, 2018, 17(1): 21-26.
- LIU S C, ZHANG Z H, DAI B M, et al. Experimental study on the change rule of VICIA FABA cell structure under cold driving[J]. Thermal Science and Technology, 2018, 17(1): 21-26.
- [14] 赵静. 葡萄冷冻—复温过程中细胞结晶和相变过程的研究[D]. 天津: 天津商业大学, 2016: 9-18.
- ZHAO J. studies on cell crystallization and phase transformation in the rewarming process of frozen grapes[D]. Tianjin: Tianjin University of Commerce, 2016: 9-18.
- [15] 吴锦铸, 胡卓炎, 黄志良, 等. 荔枝冻结规律探讨及速冻加工技术[J]. 食品与发酵工业, 2001(3): 40-43.
- WU J Z, HU Z Y, HUANG Z L, et al. Lychee freezing law and quick freezing processing technology[J]. Food and Fermentation Industry, 2001(3): 40-43.
- [16] 王雅博, 诸凯, 代宝民, 等. 冷却速率对洋葱内表皮细胞结构的影响[J]. 制冷学报, 2018, 39(6): 129-134.
- WANG Y B, ZHU K, DAI B M, et al. Effect of cooling rate on cell structure of onion inner epidermis[J]. Journal of Refrigeration, 2018, 39(6): 129-134.
- [17] 胡新, 姚亚明, 王鹏, 等. 不同冻结和解冻方式对猪肉品质的影响[J]. 食品工业科技, 2017, 38(19): 278-283.
- HU X, YAO Y M, WANG P, et al. Effects of different freezing and thawing methods on pork quality[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(19): 278-283.
- [18] MANSOORI G A. Kinetics of water loss from cells at subzero centigrade temperatures[J]. Cryobiology, 1975, 12(1): 34-45.
- [19] 金克霞, 江泽慧, 刘杏娥, 等. 植物细胞壁纤维素纤维聚集体结构研究进展[J]. 材料导报, 2019, 33(17): 2 997-3 002.
- JIN K X, JIANG Z H, LIU X E, et al. Advances in research on the structure of cellulose fiber aggregates in plant cell wall [J]. Materials Report, 2019, 33(17): 2 997-3 002.
- [20] 徐茂, 向敏, 王子涵, 等. 冻结速率对烤甘薯品质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(13): 217-224.
- XU M, XIANG M, WANG Z H, et al. Effect of freezing rate on quality of baked sweet potato[J]. Food and Fermentation Industry, 2020, 46(13): 217-224.
- [21] MAZUR P. Physical factors implicated in the death of microorganisms at subzero temperatures[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 1960, 67: 610-629.
- [22] 徐焱. 贮运过程中果蔬细胞组织损伤机理微观实验研究[D]. 天津: 天津商业大学, 2019: 49.
- XU Y. Microcosmic experimental study on the damage mechanism of fruit and vegetable cell tissue during storage and transportation[D]. Tianjin: Tianjin University of Commerce, 2019: 49.
- [23] 高永毅. 植物的细胞力学行为研究及在水果机械损伤研究中的应用[D]. 北京: 中国农业大学, 2003: 10-32.
- GAO Y Y. Study on mechanical behavior of plant cells and its application in fruit mechanical damage research[D]. Beijing: China Agricultural University, 2003: 10-32.
- [24] 谢艳琦, 诸凯, 王雅博. 冷冻过程中洋葱细胞胞内冰晶的生长行为研究[J]. 工程热物理学报, 2018, 39(7): 1 563-1 567.
- XIE Y Q, ZHU K, WANG Y B. Growth behavior of ice crystals in onion cells during freezing[J]. Journal of Engineering Thermophysics, 2018, 39(7): 1 563-1 567.
- [25] WU N, PITTS M J. Development and validation of a finite element model of an apple fruit cell [J]. Postharvest Biology and Technology, 1999, 16(1): 1-8.
- [26] 姜耀邦. 静磁场对食品冷冻过程影响的实验研究[D]. 济南: 山东大学, 2014: 12.
- LOU Y J. An experimental study of the effects of static magnetic fields on food freezing processes[D]. Jinan: Shandong University, 2014: 12.
- [27] 陈聪, 杨大章, 谢晶. 速冻食品的冰晶形态及辅助冻结方法研究进展[J]. 食品与机械, 2019, 35(8): 220-225.
- CHEN C, YANG D Z, XIE J. Research progress on ice crystal morphology and auxiliary freezing methods of quick-frozen food[J]. Food & Machinery, 2019, 35(8): 220-225.