

初始溶氧含量对功率超声波触发过氧化氢酶溶液初始成核的影响

张三强,周新丽*,戴澄,杨云

(上海理工大学 食品科学与技术研究所,上海,200093)

摘要 控制成核在食品结晶、冷冻冷藏、冷冻干燥、冷冻浓缩方面有着重要的意义,功率超声波是一种有效触发溶液初始成核的方法。该研究用平板接触超声法对不同溶氧浓度的过氧化氢酶(Catalase, CAT)溶液进行了超声触发初始成核,分析初始溶氧含量对CAT溶液超声触发成核温度、延迟时间的影响,并对两种高溶氧含量下CAT溶液超声触发成核形成的冰晶大小和分布进行了分析。结果显示,CAT溶液溶氧含量越高,超声触发成核所获得的最大成核温度越高,成核温度控制更准确,延迟时间更短。此外,溶氧含量高的溶液在相同触发温度下其平均冰晶尺寸小。

关键词 功率超声波;溶氧含量;初始成核;冰晶大小

冷冻是一种广泛应用于保存食品感官属性和营养价值的方法^[1]。其实质是水在过冷温度下转变为冰,这个过程决定了形成冰的形态、大小、分布,也决定了与冷冻相关过程(如冷冻干燥、冷冻浓缩)的有效性和冷冻食品的最终品质^[2-3]。在食品冷冻保藏中需要小冰晶的生成利于食品组织的保存,但在冷冻干燥和冷冻浓缩过程中希望大冰晶的生成以提高加工效率^[4-5]。而成核过程是一种随机自发的过程,形成的冰晶大小具有随机分布的特点。因此控制成核对食品冷冻及相关过程具有重要作用,目前一些新技术包括高压冷冻、超声辅助冻结、射频辅助冻结等用于控制成核过程^[6-8]。

功率超声波是一种低频率(20~100 kHz)高能量输出的超声波^[9]。自1964年CHALMERS^[10]首次发现超声作用可以促进纯水的初始成核以来,功率超声技术在食品冷冻中的各个方面的应用已经被报道,包括初始成核、控制冰晶体的尺寸、加快冻结速率以及改善冷冻食品的品质^[11-15]。NAKAGAWA^[16]等发现超声在较高温度下触发溶液成核可以获得较大的冰晶,利用此性质提高了冷冻干燥的干燥速率。此外,研究发现影响超声控制成核的因素包括辐照温度、超声强度、处理时间^[17],低温度下有利于超声触发成核,由于超声波热效应的存在,触发成核需要适宜的超声强度和处理时间。

除了以上对超声辅助冷冻有重要影响的因素外,溶液中气体含量对超声触发成核的影响也应当给予充分重视。ZHANG^[19]等发现含有大量气泡的溶液控制成核的重复性要比低气泡含量要好。JABBARI-HICHRI^[20]等研究发现,在相同的超声强度下,含气量高的溶液获得较为均匀的冰晶。由此可见,溶液中存在溶解的气体能够改善超声触发成核的效果。目前,气体对控制成核影响的研究主要在于气泡尺寸大小以及气泡含量上,关于溶解气体含量对液态食品中超声控制成核影响的研究还比较少,其影响规律还需要更多的机理分析和实验验证。

过氧化氢酶(Catalase, CAT)是一种广泛存在于动物、植物和微生物体内的末端氧化酶,它是生物体内重要的参与活性氧代谢过程的物质^[21]。用其作为模式蛋白模拟液态活性食品功率超声波控制成核,可以根据其活性的变化推测液态活性食品在控制成核过程中的变化^[22]。本研究以CAT溶液为研究对象,自行搭建平板超声辅助冻结装置,通过控制冷冻样品初始溶解氧含量,进行超声触发成核实验,探讨溶氧含量对超声触发成核温度以及成核有效性的影响,同时对高溶氧含量CAT溶液超声触发成核形成冰晶尺寸进行分析,期望为需要超声控制成核的液态食品的冷冻保存、冷冻干燥及冷冻浓缩过程优化提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

过氧化氢酶(牛肝, Sigma)、蔗糖(AR, 沪试)、磷酸盐缓冲液(pH7.2~7.4, sigma)、超纯水、7 mL西林

第一作者:硕士研究生(周新丽为通讯作者, E-mail: zjulily@163.com)。

基金项目:国家自然科学基金(51376132)

收稿日期:2015-08-13, 改回日期:2015-10-27

瓶、溶液过滤器(0.22 μm)。

1.2 仪器与设备

超声波发生器、不锈钢平板(200 mm \times 200 mm \times 1.5 mm)、喇叭形超声振子、冷冻干燥机、数据采集仪、T型热电偶、计时器、AZ-8402 便携式溶氧仪、金相体式显微镜、冷冻切片机等。

实验装置如图 1 所示。超声波辅助冻结系统由超声波发生器(29 kHz)、两个超声振子(60 W)、不锈钢平板组成。用铝箔法确定超声波系统中空化作用强烈的区域,然后在此区域增加一个紧固西林瓶的挡板,实验时将西林瓶置于两个挡板中间,为了防止西林瓶在超声振动时滑动、跳起。温度检测系统由 T 型热电偶、安捷伦数据采集仪和计算机组成。实验时将超声波辅助冻结系统直接置于冻干机搁板(作为制冷系统)上固定位置处。

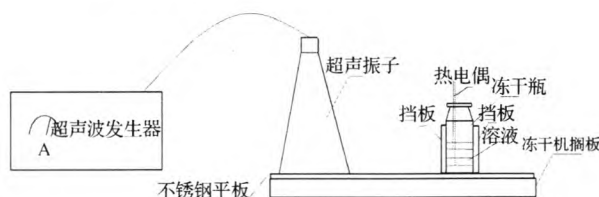


图 1 超声辅助冻结装置

Fig. 1 Ultrasonic assisted freezing device

1.3 实验方法

1.3.1 溶液制备

本研究选取过氧化氢酶作为模式蛋白,配制 1 mg/mL 的 CAT 溶液于磷酸盐缓冲液中(pH 7.2 ~ 7.4),冷冻保护剂选择质量分数 10% 的蔗糖溶液。CAT 溶液配制好后用 0.22 μm 孔径的过滤器过滤。用移液枪吸取 3 mL CAT 溶液移入 7 mL 的西林瓶中,瓶中溶液厚度为 8 mm。

将 AZ-8402 便携式溶氧仪的传感器放置在 CAT 溶液的几何中心位置处,测定 CAT 溶液的溶氧含量,五种溶氧浓度水平的溶液通过以下方法获取:

(1)低溶氧水平:溶氧含量为 3.98 mg/L,将配制好的 CAT 溶液置于冻干机真空室中,控制真空室压力为 10 kPa、搁板温度设置为 4 $^{\circ}\text{C}$ (防止酶过度失活),进行真空脱气 8 h;

(2)较低溶氧水平:溶氧含量为 6.23 mg/L,将配制好的 CAT 溶液置于冻干机真空室中,控制真空室压力为 10 kPa、搁板温度设置为 4 $^{\circ}\text{C}$,进行真空脱气 4 h;

(3)平衡溶氧水平:溶氧含量为 8.20 mg/L,将配制好的 CAT 溶液直接密封后放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中降温待用。

(4)较高溶氧水平:溶氧含量为 10.15 mg/L,将配制好的 CAT 溶液直接密封后放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中降温至 4 $^{\circ}\text{C}$ 后,实验前直接注入压缩空气。

(5)高溶氧水平:溶氧含量为 13.44 mg/L,将配制好的 CAT 溶液直接注入压缩空气,用液氮快速冷却但不要冻结。

1.3.2 实际声场强度测定方法

超声强度是描述超声换能器产生能量的度量,多种因素诸如:容器的尺寸和几何形状、传播介质的特性、阻抗匹配等都对超声强度产生影响。在测量实际超声声学特性的方法中,量热法是最简单、可靠的方法^[13]:用 T 型热电偶记录连续施加 10 min 超声 3 mL 纯水温度的变化。

超声消散在纯水中的实际功率:

$$P = MC_p \frac{dT}{dt} \quad (1)$$

实际消散在纯水中的超声强度 I_A (W/cm^2):

$$I_A = \frac{P}{A} \quad (2)$$

其中, P 是超声消散在纯水中的实际功率,W; M 为纯水的质量,kg; C_p 是纯水的比热容, $\text{J}/(\text{kg} \cdot ^{\circ}\text{C})$; $\frac{dT}{dt}$ 是受超声波作用后纯水温度上升的斜率, $^{\circ}\text{C}/\text{s}$; A 是冻干小瓶的横断截面积, cm^2 。

1.3.3 超声触发成核的方法

首先将超声平板放置于冻干机搁板上,开启冻干机,控制冻干机冷腔和超声平板温度至 4 $^{\circ}\text{C}$ 后,用移液枪将控制好溶氧浓度的 CAT 溶液移取 3 mL 置 7 mL 的西林瓶中,将西林瓶放置于两个挡板中间,将热电偶插入溶液几何中心位置处。关闭冷腔舱门,设置搁板温度为 -35 $^{\circ}\text{C}$,让搁板与不锈钢平板从 4 $^{\circ}\text{C}$ 开始降温。开启温度采集系统采集温度,数据采集仪每隔 1 s 采集 1 次温度。当溶液温度降至 -1 $^{\circ}\text{C}$ 时开启超声辐照 5 s,若未见成核现象,温度每降低 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 施加 5 s 超声波。预实验已经表明施加 5 s 超声波辐照不会引起溶液温度大幅升高。溶液成核后移去超声辅助冻结平板继续冷冻至 -35 $^{\circ}\text{C}$ 。根据温度采集仪采集到的冻结曲线读取成核温度和延迟时间。

1.3.4 冰晶大小的观察与计算方法

冻结后的 CAT 溶液继续冻结 3 h 后,打碎西林瓶取出冰块,在冷冻切片机 -30 $^{\circ}\text{C}$ 下切片,在冻结溶液

横向切出一个平滑的平面,立即放入低温槽中(-30°C),于配有 CCD 的金相体视显微镜下进行显微观察与拍照,冰晶照片用 Image Pro Plus 软件计算冰晶大小,本实验中采用蔗糖作为冷冻保护剂,蔗糖溶液能够生长成大的枝状冰晶,因此冰晶大小采用冰晶长度作为度量。

1.4 数据处理与分析

每组实验重复 3 次进行数据处理与分析,采用 Origin9.0 软件和 SPSS 13.0 软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 溶氧含量对超声触发最高成核温度的影响

经测定超声装置的实际声强为 $0.261\text{ W}/\text{cm}^2$,当溶液温度降至 -1°C 时开启超声辐照 5 s ,若未见成核现象,温度每降低 0.5°C 施加 5 s 超声波。图 2 为不同溶氧含量的 CAT 溶液在不施加超声以及施加超声时的成核温度。

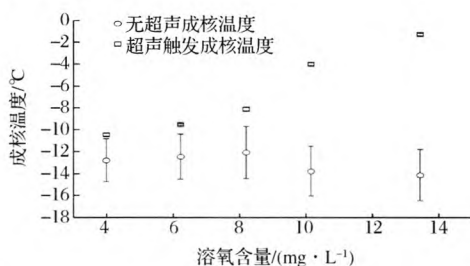


图2 溶氧含量对 CAT 溶液自发成核、触发成核温度的影响

Fig. 2 Effect of dissolved oxygen content on spontaneous nucleation and trigger nucleation temperature of the CAT solution

由图 2 可以看出,不施加超声时溶氧含量为 3.98,6.23,8.20,10.15,13.44 mg/L 的溶液的成核温度都很低,分别为 $-12.30 \pm 1.90^{\circ}\text{C}$ 、 $-12.38 \pm 2.17^{\circ}\text{C}$ 、 $-12.51 \pm 2.38^{\circ}\text{C}$ 、 $-13.90 \pm 2.26^{\circ}\text{C}$ 、 $-14.30 \pm 2.34^{\circ}\text{C}$,并且随机发生在一定温度范围内偏差较大。说明溶液中不同的气体含量本身并不能提高溶液的成核温度以及改变成核的随机性。但是在施加超声后,溶氧含量为 3.98,6.23,8.20,10.15,13.44 mg/L 的溶液的最高成核温度分别为 $-10.47 \pm 0.14^{\circ}\text{C}$ 、 $-9.54 \pm 0.09^{\circ}\text{C}$ 、 $-8.13 \pm 0.15^{\circ}\text{C}$ 、 $-4.01 \pm 0.12^{\circ}\text{C}$ 、 $-1.29 \pm 0.11^{\circ}\text{C}$,由于超声对成核的控制作用,不同溶氧含量的 CAT 溶液的成核温度都明显提高并且温度偏差很小。值得关注的是,随着溶氧含量的增加,溶液最大成核温度显著增加。溶液充气后最

大成核温度比未充气对照组溶液(8.20 mg/L)明显提高了 4.27°C (10.15 mg/L)和 6.84°C (13.44 mg/L);当溶液脱气后最大成核温度比未充气对照组溶液(8.20 mg/L)降低了 1.41°C (6.23 mg/L)和 2.34°C (3.98 mg/L)。说明在超声的作用下,溶液的气体含量对溶液的成核温度的影响变得非常显著。一般认为超声在过冷水中作用形成的空化气泡是促进冰晶生成的重要原因,溶液充气后溶液中会存在大量溶解气体和气泡,超声作用时会形成大量空化气泡,促进冰晶形成,因而充气溶液能在较高成核温度(低过冷度)下能成核。利用溶氧含量高的溶液可以在较宽的过冷范围内控制成核的性质,将给成核过程带来更多的选择性,既可以在较高成核温度下控制成核加快冷冻干燥速率以及冷冻浓缩浓缩率,又可以在低成核温度下控制成核改善冷冻保存食品的品质。

2.2 溶氧含量对超声触发成核有效性的影响

为研究不同溶氧水平下超声控制成核的有效性,对充气后两种溶液和未充气对照组进行超声控制成核实验,测量其超声触发及溶液成核的延迟时间和温度差。

图 3 为不同触发温度下两种充气溶液与未充气对照组(8.20 mg/L)超声控制成核的延迟时间。从中可以看出在相近的触发温度范围内($-7 \sim -9^{\circ}\text{C}$)两种充气溶液的延迟时间(10.15 mg/L : $0.7 \sim 1.3\text{ s}$; 13.44 mg/L : $0.7 \sim 1\text{ s}$)要比对照组溶液的延迟时间($2.3 \sim 3.3\text{ s}$)短。比较两种充气溶液之间在较高触发温度下($-6 \sim -1^{\circ}\text{C}$)超声触发与溶液成核之间的延迟时间也存在差异,其中在相同触发温度下(-5°C)高溶氧含量(13.44 mg/L) 1.3 s 的延迟时间要比较高溶氧含量(10.15 mg/L) 2.7 s 的延迟时间明显缩短,溶液含有高溶氧含量缩短了超声空化泡生长、振荡及崩溃这个过程的时间,因而其触发成核延迟时间缩短。

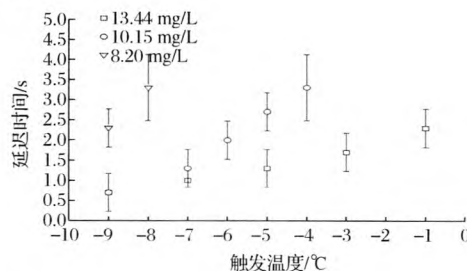


图3 不同超声触发温度下控制成核的延迟时间

Fig. 3 Delay time of controlling nucleation at different ultrasonic trigger temperatures

图4为两种充气CAT溶液与未充气对照组(8.20 mg/L)超声触发温度与成核温度之间温差。可以看出发现在相近的触发温度范围内($-7 \sim -9$ °C)两种充气溶液的温差(10.15 mg/L: $0.1 \sim 0.21$ °C; 13.44 mg/L: $0.11 \sim 0.13$ °C)明显小于未充气对照组溶液的温差($0.22 \sim 0.35$ °C)。并且两种充气溶液之间在较高触发温度下($-6 \sim -1$ °C)超声触发与溶液成核温差也存在差异,比较两种充气溶液在相同成核温度 -5 °C下,高溶氧含量(13.44 mg/L)CAT溶液超声触发成核温差为 0.14 °C明显小于较高溶氧含量下(10.15 mg/L)的温差 0.56 °C。根据图3充气溶液具有更短的成核延迟时间,因而温差较小,另一方面超声作用时的热效应也可导致高溶氧含量下更小的成核温差出现。

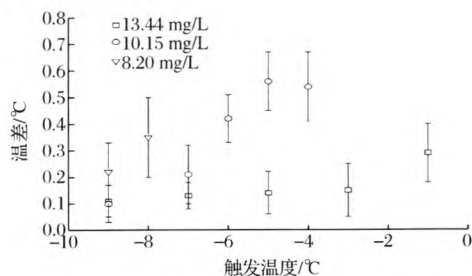


图4 不同超声触发温度下触发温度与成核温度的温差
Fig. 4 Differences between trigger temperature and nucleation temperature at different ultrasonic trigger temperatures

由此可见溶液充气后可以提高溶液超声控制成核的有效性,其延迟时间更短,温度控制更准确,可以向液体食品中充入气体的方法来改善超声的控制成核。

2.3 溶氧含量对冰晶大小的影响

对溶氧含量为10.15 mg/L的CAT溶液在 $-4, -5, -6, -7, -9$ °C超声触发成核;溶氧含量为13.44 mg/L的CAT溶液在 $-1, -3, -5, -7, -9$ °C超声触发成核,测定其形成的冰晶大小。

图5为两种充气溶液及无超声对照组超声触发成核冻结后形成冰晶的平均大小。可以看出两种充气溶液超声触发成核后均可以提高形成冰晶的平均大小。在相同的触发温度下高溶氧水平(13.44 mg/L)溶液触发成核形成的冰晶平均大小要比较高溶氧水平(10.15 mg/L)溶液形成的冰晶平均大小要小 $18.82 \sim 31.90$ μm,可见溶液中的初始含气量对超声触发成核形成的平均冰晶大小有显著影响。

结合图6中两种充气溶液在 -7 °C触发温度下

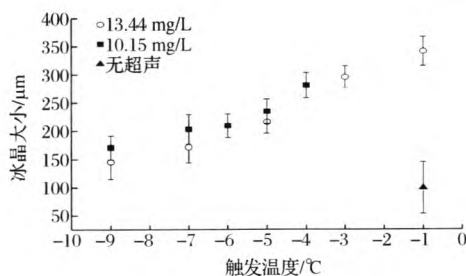


图5 高溶氧CAT溶液超声触发温度和平均冰晶大小的关系

Fig. 5 Relationship between the trigger temperature and the average size of ice crystals in dissolved oxygen content of CAT solution

形成冰晶大小累积分布频率图中可以看出,13.44 mg/L高溶氧水平的溶液在较小冰晶(< 237.27 μm)分布的频率较高,而10.15 mg/L较高溶氧水平的溶液在较大冰晶(> 237.27 μm)的分布频率较高。这也印证了前面的分析,溶液充气后含有高的气体含量增加了超声空化泡的形成,同时高气体含量也加快了空化周期内空化泡的膨胀和崩溃^[23],这些增加的空化泡促进了更多的晶核产生,使得相同体积的溶液最终形成的冰晶体数目增加而平均冰晶大小减小。此外,两种充气溶液在此触发温度下形成的冰晶均比无超声对照组要大,因而两种溶氧条件下进行超声触发成核都可获得较大冰晶。因此在利用充气法作为提高超声触发成核效率的同时也要考虑溶液中气体含量对形成冰晶大小分布的影响,这对于需超声控制冰晶大小的冷冻干燥和冷冻浓缩来说非常重要。

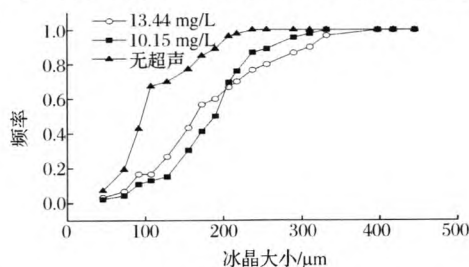


图6 不同触发温度下冰晶大小的累积分布频率图

Fig. 6 The cumulative distribution frequency of ice crystal size at different trigger temperature

3 结论

本文研究了CAT溶液中初始溶氧含量对超声触发成核的影响,结果显示CAT溶液溶氧含量越高,超声触发成核所获得的最大成核温度越高,高溶氧含量溶液可以在较宽的过冷范围内控制成核。增加溶氧

含量可以提高超声触发成核的有效性,其温度控制更准确,延迟时间更短。此外,高溶氧水平的溶液在超声触发成核后产生的冰晶平均尺寸较小,在较小冰晶分布的频率较高。以上结论为需要超声控制成核的液态食品的冷冻保存、冷冻干燥及冷冻浓缩过程优化提供参考。

参 考 文 献

- [1] XU Y X, SISMOUR E, PAO S, et al. Textural and microbiological qualities of vegetable soybean (edamame) affected by blanching and storage conditions [J]. *Journal of Food Processing & Technology*, 2012(3): 2-6.
- [2] ALIZADEH E, CHAPLEAU N, De-LAMBALLERIE M, et al. Impact of freezing process on salt diffusivity of seafood: application to Salmon (*Salmo salar*) using conventional and pressure shift freezing [J]. *Food & Bioprocess Technology*, 2009, 2(3): 257-262.
- [3] KIANI H, SUN D W. Water crystallization and its importance to freezing of foods: a review [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2011(22): 407-426.
- [4] MIYAWAKI O. Analysis and control of ice crystal structure in frozen food and their application to food processing [J]. *Food Science & Technology Research*, 2001, 7(1): 1-7.
- [5] KENTISH S, HAO F. Applications of power ultrasound in food processing [J]. *Food Science and Technology International*, 2014, 5: 263-284.
- [6] SMITH N A S, ÁNGEL M R. Generalized enthalpy model of a high-pressure shift freezing process [J]. *Proceedings of the Royal Society A Mathematical Physical & Engineering Sciences*, 2012, 468(2 145): 2 744-2 766.
- [7] DEORA N S, MISRA N N, DESWAL A, et al. Ultrasound for improved crystallisation in food processing [J]. *Food Engineering Reviews*, 2013, 5(1): 36-44.
- [8] ANESE M, MANZOCCO L, PANOZZO A, et al. Effect of radiofrequency assisted freezing on meat microstructure and quality [J]. *Food Research International*, 2012, 46(1): 50-54.
- [9] RASTOGI N K. Opportunities and challenges in application of ultrasound in food processing. [J]. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 2011, 51(8): 705-722.
- [10] CHALMERS B. Principles of solidification [M]. New York: John Wiley & Sons, 1964.
- [11] XU B, ZHANG M, BHANDARI B, et al. Influence of power ultrasound on ice nucleation of radish cylinders during ultrasound-assisted immersion freezing [J]. *International Journal of Refrigeration*, 2014, 46: 1-8.
- [12] KIANI H, ZHANG Z, SUN D W. Effect of ultrasound irradiation on ice crystal size distribution in frozen agar gel samples [J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2013, 18(2): 126-131.
- [13] SACLIER M, PECZALSKI R, ANDRIEU J. Effect of ultrasonically induced nucleation on ice crystals' size and shape during freezing in vials [J]. *Chemical Engineering Science*, 2010, 65(10): 3 064-3 071.
- [14] BING L, SUN D W. Effect of power ultrasound on freezing rate during immersion freezing of potatoes [J]. *Journal of Food Engineering*, 2002, 55(3): 277-282.
- [15] ISLAM M N, ZHANG M, ADHIKARI B, et al. The effect of ultrasound-assisted immersion freezing on selected physicochemical properties of mushrooms [J]. *International Journal of Refrigeration*, 2014, 42(3): 121-133.
- [16] NAKAGAWA K, HOTTOT A, VESSOT S, et al. Influence of controlled nucleation by ultrasounds on ice morphology of frozen formulations for pharmaceutical proteins freeze-drying [J]. *Chemical Engineering & Processing*, 2006, 45(9): 783-791.
- [17] TAO Y, SUN DW. Enhancement of food processes by ultrasound: a review. [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2015, 55(4): 570-594.
- [18] CHOW R, BLINDT R, CHIVERS R, et al. The sonocrystallisation of ice in sucrose solutions: primary and secondary nucleation. [J]. *Ultrasonics*, 2003, 41(8): 595-604.
- [19] ZHANG X, INADA T, TEZUKA A. Ultrasonic-induced nucleation of ice in water containing air bubbles. [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2003, 10(2): 71-76.
- [20] JABBARI-HICHRI A, PECZALSKI R, LAURENT P. Ultrasonically triggered freezing of aqueous solutions: Influence of initial oxygen content on ice crystals' size distribution [J]. *Journal of Crystal Growth*, 2014, 402: 78-82.
- [21] 刘冰, 梁婵娟. 生物过氧化氢酶研究进展 [J]. *中国农学通报*, 2005, 21(5): 223-224.
- [22] PASSOT S, TRELEA I C, MARIN M, et al. Effect of controlled ice nucleation on primary drying stage and protein recovery in vials cooled in a modified freeze-dryer [J]. *Journal of Biomechanical Engineering*, 2009, 131(7): 65-84.
- [23] HU F, SUN D W, GAO W, et al. Effects of pre-existing bubbles on ice nucleation and crystallization during ultrasound-assisted freezing of water and sucrose solution [J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2013, 20(4): 161-166.

Influence of initial oxygen content on initial nucleation of Catalase solution triggered by power ultrasound

ZHANG San-qiang, ZHOU Xin-li^{*}, DAI Cheng, YANG Yun

(University of Shanghai for Science and Technology, Institute of Food Science and Technology, Shanghai 200093, China)

ABSTRACT Control nucleation is of great significance in crystallization, freezing, freeze-drying and freeze-concentration. Power ultrasound is an effective method to trigger initial nucleation of solution. The flat contact ultrasonic method was used to trigger the initial nucleation of different dissolved oxygen concentration of Catalase solution. The influence of initial oxygen in CAT solution on ultrasound triggered nucleation temperature and delay time were analyzed. Meanwhile, the size and distribution of ice crystals prepared with two kinds of high dissolved oxygen concentration of Catalase solution were analyzed. The results showed that the higher dissolved oxygen concentration of Catalase solution, the higher nuclear temperature obtained by ultrasonic triggered. High dissolved oxygen solution can form nucleus at low degree of supercooling with accurate temperature control and shorter delay time. And also the ice crystals of high dissolved oxygen content solution were relatively smaller at the same trigger temperature.

Key words power ultrasound; oxygen content; initial nucleation; ice crystal size