

CRYOGENOUS DAMAGES IN FRUIT AND BERRIES AND THE METHODS OF CELLULAR STRUCTURES PROTECTION DURING FREEZING

G. Simakhina

National University of Food Technologies

Key words:

Fruit and berries

Cellular structures

Freezing

Cryogenous damages

Cryoprotection

Means for cryoprotection

Article history:

Received 07.07.2020

Received in revised form

21.07.2020

Accepted 04.08.2020

Corresponding author:

G. Simakhina

E-mail:

top_nuft@ukr.net

ABSTRACT

It is highly expedient either to process just harvested fruit and berries into final products, or to freeze them in order to retain fully their complex of biologically active substances. In other words, the purpose of freezing, as well as of any other method of preservation, is to minimize or at least retard the reactions that would worsen the quality of products and, finally, make them unfit for consumption. In particular, freezing allows overcome the development of microorganisms and avoid the biochemical transformations triggered by enzymes. Freezing is the perfect method of fruit and berry preservation from the viewpoint of both innovative technologies and safety of foodstuffs obtained.

There is only one regularity for all the biological objects, including fruit and berries: their cells may ruin in case the temperatures are zero of the centigrade and thereafter fall lower. This phenomenon may be categorized into damages (which are caused by an array of processes within cellular membrane during temperature shock increase) and cellular decay (which is a consequence of rapid freezing, when the intercellular liquid is crystallized and the cells are affected with the crystals). Should the frozen products contain many ruined cells, then defrosting may lead to losses of cellular juice, lower product quality and the fall of biological value. Therefore, it would be impossible to obtain good foodstuffs even from high-quality raw materials.

The results of numerous researches in the field of cryobiology accomplished by Ukrainian and foreign authors have in common the following: the crucial role in gaining cryoresistance of biological objects belong to natural cryoprotectors that comprise the main classes of organic and mineral substances (sugars, fats, alcohols etc.).

КРІОУШКОДЖЕННЯ ПЛОДІВ ТА ЯГІД І МЕТОДИ ЗАХИСТУ КЛІТИННИХ СТРУКТУР ПРИ ЗАМОРОЖУВАННІ

Г. О. Сімахіна

Національний університет харчових технологій

Зібрані плоди та ягоди доцільно відразу переробляти на готові продукти або заморожувати для повного збереження цінного комплексу біологічно активних речовин. Тобто мета заморожування, як і будь-якого іншого способу консервування, полягає в тому, щоб звести до мінімуму або хоча б сповільнити реакції, що погіршують якість продуктів і, врешті, роблять їх непридатними до вживання. Зокрема, заморожування дає змогу подолати розвиток мікроорганізмів і запобігти біохімічним перетворенням, що викликаються ферментами. Лише метод консервування плодово-ягідної продукції холодом є найбільш досконалим як з точки зору інноваційної технології, так і з позицій безпеки отриманої харчової продукції.

Для всіх біологічних об'єктів, зокрема й для плодово-ягідної сировини, існує одна закономірність — при охолодженні до 0°C і нижче під впливом від'ємних температур клітини можуть руйнуватись. У цьому явищі варто розрізняти як ушкодження, пов'язані з комплексом процесів у мембрані і клітині при розвитку температурного шоку, так і руйнування клітин, яке відбувається, коли при швидкому охолодженні кристалізується внутрішньоклітинний розчин і клітини руйнуються утвореними кристалами. Якщо заморожені продукти міститимуть багато зруйнованих клітин, то при дефростації втрачається клітинний сік, якість продукту погіршується, біологічна цінність різко падає. І навіть із найбільш якісної сировини неможливо отримати ідентичні продукти.

Результати численних досліджень у галузі кріобіології, виконаних вітчизняними і зарубіжними авторами, зводяться до одного висновку: у кріорезистентності біологічних об'єктів вирішальну роль відіграють захисні сполуки (цукри, жири, спирти) — кріопротектори, які охоплюють основні класи органічних і мінеральних сполук.

Ключові слова: *плодово-ягідна сировина, клітинні структури, заморожування, кріоушкодження, кріозахист, кріопротектори.*

Постановка проблеми. Останні кілька років асортимент замороженої плодово-ягідної продукції на вітчизняному ринку постійно розширюється [1], а попит на неї, за прогнозами аналітиків, щороку збільшується на 15—20%. Це пояснюється зростанням культури харчування населення, прагненням до здорового способу життя, а відтак, до здорового харчування, основою якого є плоди, ягоди, овочі.

Збільшення попиту на заморожені напівфабрикати з цієї сировини визначається також постійно зростаючою тенденцією до розширення мережі готельно-ресторанного та громадського харчування. В період, коли немає свіжої сировини (а це понад 6 місяців щороку), саме заморожені плодово-ягідні напівфабрикати

стають основою для виробництва холодних закусок, гарячих страв, десертів, салатів, ozdоби для кондитерських виробів, наповнювачів для кисломолочних продуктів, морозива; сировиною для отримання соків, морсів, напоїв тощо. Використання заморожених плодово-ягідних напівфабрикатів на підприємствах, у закладах ресторанного та громадського харчування має багато й інших переваг як з точки зору якості та безпеки замороженої продукції, так і щодо економічної складової.

Незважаючи на такі очевидні переваги виробництва та реалізації заморожених плодів та ягід, їхній ринок зростає значно повільніше, ніж овочів, оскільки отримана за традиційними технологіями плодово-ягідна продукція значно поступається свіжій сировині і за органолептичними показниками, і за якістю та безпекою. Недоліки традиційних технологій заморожування і в тому, що особливості структурних характеристик плодів та ягід [2] робить їх недостатньо стійкими до ушкоджуючої дії утворених кристалів льоду, тому й зниження якості такої продукції після дефростації виражено набагато істотніше, ніж для овочів. Це ж стосується втрати замороженими за існуючими технологіями плодами і овочами натурального кольору, аромату, смаку, а саме таким характеристикам приділяють найбільшу увагу споживачі [3].

Особливих умов вимагає заморожування ягід, зважаючи на їхню ніжну текстуру, істотні ушкодження і руйнування мембран клітин при кристалоутворенні. За існуючих технологій цей процес проходить дуже повільно, сприяючи формуванню великих кристалів льоду, які й руйнують клітини рослинних об'єктів, викликаючи істотні втрати клітинного соку при дефростації заморожених матеріалів [4], а отже, зниження їхньої біологічної цінності стосовно свіжої сировини.

Особлива увага приділяється розробленню нових, більш досконалих способів заморожування, зберігання та дефростації плодів, овочів, фруктів, які забезпечували б максимальне збереження у цільових продуктах усіх цінних біокомпонентів сировини, їхню повну безпеку для споживачів і високу ефективність. До таких інноваційних підходів слід віднести ряд нових методів швидкого заморожування [5; 6]; заморожування після часткової дегідратації води [7], що сприятливо впливає на збереження текстури рослинних тканин; попереднє осмотичне зневоднення ягід розчином сахарози перед заморожуванням, що підвищує якість продукції, оброблення ягід антиоксидантами для тривалого зберігання, оброблення зелених овочів композиціями антиоксидантів перед низькотемпературним зберіганням, розроблення комплексу кріозахисту рослинної сировини при холодильному консервуванні [8] тощо. Саме останній спосіб викликає найбільший інтерес, оскільки надає можливість запобігти кріоушкодженням рослинних клітин при заморожуванні, забезпечуючи високу якість заморожених напівфабрикатів при зберіганні та дефростації.

У промисловості зараз широкого розповсюдження набуло швидке або шокове заморожування плодовоовочевої сировини. Порівняно з традиційними технологіями, такий спосіб має певні переваги. Разом із тим практичний досвід показує, що одного лише швидкого або навіть шокового заморожування матеріалів недостатньо для отримання високоякісної плодово-ягідної продукції, яка після дефростації була б максимально ідентичною за всіма показниками свіжій сировині. Саме з'ясуванню цього явища присвячено цю статтю.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Для пояснення зазначених явищ зарубіжні і вітчизняні фахівці в галузі кріоконсервування клітинних суспензій

тканин та органів (Б. Люїс, Дж. Шерман, Т. Ней, А. Сміт, Дж. Левітт, П. Мейзур, Л. К. Лозина-Лозинський, А. М. Білоус, М. С. Пушкар, Є. А. Гордієнко, В. І. Грищенко) ввели поняття кріоушкодження клітин і клітин структур.

У [9] наведено таке визначення: «Під кріоушкодженням слід розуміти структурно-функціональні зміни при зниженні температури нижче рівня, до якого адаптований біологічний об'єкт, тобто процеси, що відбуваються в клітинах або тканинах в циклі їх низькотемпературного консервування».

Згідно з цим визначенням, на біооб'єкти в процесі заморожування негативний вплив справляють кристали льоду, надмірна дегідратація, гіперконцентрування солей, зміни рН тощо. Вивчення ролі кожного з цих чинників у кріоушкодженні клітин і тканин привело до появи численних концепцій та гіпотез, що по-різному трактують механізм дії того чи іншого ушкоджуючого чинника та його роль у руйнуванні структур біооб'єкта при заморожуванні-відігріванні.

В ушкодженні клітин, викликаних кристалізацією, на перших етапах досліджень основну увагу приділяють позаклітинному льоду. Однак суперечливість результатів і висновків щодо його ролі залишається нез'ясованою і досі [10]. А подальші дослідження показали, що кристали льоду можуть утворювались не лише в міжклітинному просторі, а й усередині клітин [11].

За дослідженнями П. Мейзура внутрішньоклітинна кристалізація відбувається, коли клітина переохолоджена до температури, за якої у протоплазмі виникають осередки кристалів критичного розміру і міститься вільна вода. К. Діллер не лише підтверджує ці результати, а й уточнює, що виникненню кристалів всередині клітин можна запобігти, коли внутрішньоклітинний розчин при заморожуванні знаходиться в стані малих переохолоджень. А це досягається лише завдяки повільному зниженню температури. І якщо ймовірність внутрішньоклітинної кристалізації дорівнює нулю при повільному заморожуванні, то вона досягає одиниці (максимуму) — при швидкому [12].

Цей висновок дає цілком об'єктивне пояснення тому фактові, що швидке і шокове заморожування, створюючи умови для утворення дрібнокристалічного льоду при заморожуванні плодової сировини, все ж допускає наявність кріоушкоджень мікроструктур біологічних об'єктів. Це відбувається за рахунок того, що при швидкому заморожуванні клітина не встигає зневоднитись і відбувається кристалізація внутрішньоклітинного розчину.

Мета статті: узагальнення сучасних відомостей у галузі кріобіології та медицини з точки зору можливості кріозахисту біологічних структур, у тому числі плодів і ягід, при заморожуванні шляхом попереднього оброблення матеріалів розчинами індивідуально підібраних кріопротекторів для вдосконалення існуючих технологій швидкого заморожування сировини.

Викладення основних результатів дослідження. З наведеного огляду літературних джерел зрозуміло, що для всіх біологічних об'єктів, у тому числі й для плодово-ягідної сировини, існує одна закономірність: при охолодженні до 0°C і нижче під впливом від'ємних температур клітини можуть руйнуватись. У цьому явищі варто розрізняти як ушкодження, пов'язані з комплексом процесів у мембрані і клітині при розвитку температурного шоку [8], так і руйнування клітин, пов'язані з дією від'ємних температур. В останньому випадку це відбувається, коли кристалізується поза- і внутрішньоклітинний розчин, а клітини руйнуються утвореними кристалами.

Для нас важливим є саме цей випадок, оскільки у зруйнованих клітинах інтенсивно діють пероксидази, а найголовніше полягає в тому, що заморожені продукти перед вживанням або подальшим переробленням піддаються розморожуванню (дефростації). І якщо заморожені продукти міститимуть багато зруйнованих клітин, то при дефростації втрачається клітинний сік, якість продукту погіршується, біологічна цінність різко падає. І навіть із найбільш якісної сировини неможливо отримати ідентичні продукти.

Провідні вітчизняні кріобіологи Є. Гордієнко та інші називають виникнення і ріст внутрішньоклітинних кристалів летальними чинниками для клітин, тож радять на практиці здійснювати різні багатоетапні програми заморожування, спрямовані на поступове зневоднення клітин і зниження таким чином ушкоджуючої дії фізико-хімічних чинників на біооб'єктів. З цієї ж метою автори при консервуванні матеріалів досягли можливості загальмувати розвиток утворення кристалів всередині клітин, заморожуючи біооб'єкти під захистом різних сполук, названих кріопротекторами, які сприяють модифікації структури рідкої фази і характеру її кристалоутворення [13]. Саме цей спосіб ми використали для вдосконалення технології заморожування плодово-ягідної сировини, оскільки незалежно від механізму руйнування клітин їхньої цілісності можна досягти за допомогою кріопротекторів.

У [9] зазначається: «Кріопротекторами називають сполуки, які здатні запобігати розвиткові ушкоджень біологічних об'єктів при їх заморожуванні і подальшому відігріванні». Загальними властивостями кріопротекторів дослідники вважають наявність у їхній структурі полярних молекул, здатних взаємодіяти як із молекулами води, металами, солями, так і з компонентами мембран і біополімерами. Важливою властивістю кріопротекторів є також їхня здатність впливати на процеси кристалізації, сприяючи формуванню дрібнокристалічного льоду, якому не властиві сильні поля напруги. Зміна структури льоду під дією кріопротекторів знижує ступінь механічного впливу на цитоплазматичні структури мембрани.

За наявності кріопротектора виморожування фракції води з кріозахисного середовища перебігає в широкій температурній зоні й завершується при концентрації невимерзлої води до 20...30%. При збільшенні вихідного (до заморожування) вмісту кріопротектора у середовищі зв'язування солей та інших речовин збільшується, що перешкоджає їх концентруванню до критичних, згубних для клітини величин.

Отже, за наявності кріопротекторів солі або зовсім не концентруються до ушкоджуючих меж, або ж ці межі досягаються в зоні температур, при яких ушкодження розвиваються повільно.

За літературними даними, найбільш дослідженими є кріопротектори [14]. З групи одноатомних спиртів — етанол; з групи багатоатомних спиртів — гліцерин, сорбіт; з групи вуглеводів — глюкоза, фруктоза, сахароза, лактоза; з групи оксидів — диметилсульфоксид (ДМСО); з групи амінокислот — гліцин; з групи органічних кислот — лимонна; з групи полімерних сполук — декстрин, гідроксиетилкрахмаль (ГЕК); з групи білків — желатин; з групи солей — хлористий магній, сульфат натрію, цитрати натрію і калію. Також ефективним є використання комбінації кріопротекторів із числа перерахованих.

Отже, наведені кріопротектори охоплюють основні класи органічних і мінеральних сполук, кріозахисну дію яких при заморожуванні клітин і тканин людини

і тварин досліджували відомі зарубіжні та вітчизняні вчені, починаючи з 50-х років минулого століття (A. Carrow, J. Lovelock, J. Dobbler, J. Rostan, K. Polge, Au. Smith, D. Bishop, D. Robson, M. Whither, М. Максимов, А. Бернштейн, О. Білоус, В. Грищенко, М. Пушкар).

Дж. Лавлок (1954) запропонував класифікувати відомі на той час кріопротектори на непроникаючі (екзоцелюлярні), проникаючі (ендоцелюлярні) та змішаного типу. Непроникаючі протектори діють ззовні клітин, утворюючи навколо плазматичної мембрани своєрідну оболонку і сприяючи таким чином формуванню дрібнокристалічного льоду.

Проникаючі кріопротектори викликають зв'язування частини поза- і внутрішньоклітинної фракції вільної води, внаслідок чого її кристалізація сповільнюється, а концентрація електролітів поза і всередині клітини знижується. У зв'язку з цим проникаючі кріопротектори називають пасиваторами процесу ініціювання кристалоутворення.

До проникаючих у клітину сполук відносять гліцерин, диметилсульфоксид, представників одно- та багатоатомних спиртів, деякі із низькомолекулярних цукрів, наприклад, глюкозу. До непроникаючих — аміди кислот, високомолекулярні сахариди, білки, полімерні сполуки. І як уже зазначалося, загальною властивістю і проникаючих, і непроникаючих кріопротекторів є їхня здатність сприяти утворенню дрібнокристалічного льоду і запобігати можливості внутрішньоклітинної кристалізації води.

Однак механізм захисної дії кріопротекторів вивчено недостатньо. Інформація про те, що і як має змінюватись у клітинах біооб'єктів, постійно поповнюється новими даними, в основному в галузях кріобіології та кріомедицини.

Ці дослідження показали, що захисні сполуки використовують у складі кріозахисних середовищ — водних розчинів кріопротекторів [14], а вибір кріопротекторів для кожної клітинної фракції необхідно проводити індивідуально, оскільки універсальних принципів підбору або синтезу кріопротектора із заданими властивостями досі не існує.

Обираючи кріопротектори для попереднього оброблення плодів та ягід перед заморожуванням, ми виходили із встановлених на основі огляду літературних джерел рекомендацій щодо необхідності підбору кріозахисних сполук для кожного предмета дослідження індивідуально. Чутливість клітин і тканин різних плодів та ягід є різною до впливу низьких температур (і пов'язаних з ними фізичних і механічних процесів), а від вдалого вибору кріопротектора, його концентрації, тривалості контакту із заморожуваними матеріалами безпосередньо залежить якість і споживчі характеристики отриманої продукції [8].

Вище зазначалося, що спосіб швидкого заморожування не гарантує високої якості отриманих продуктів, особливо після їх дефростації. Причини цього: частковий перерозподіл вологи при заморожування; внутрішньоклітинна кристалізація води, летальна для клітин; травмування мікроструктури об'єктів кристалами льоду. І лише використання кріопротекторів як засобів запобігання кріошкодженню клітин надає можливість захистити їх від руйнівної дії кристалів льоду, мінімізувати втрати клітинного соку при дефростації, забезпечуючи загалом високі біологічні та споживчі характеристики заморожених напівфабрикатів.

Щоправда, такий підхід до технологій заморожування досі не знайшов розповсюдження у вітчизняних харчових технологіях та й за кордоном. Лише дослідження одеських науковців [15] орієнтовані на розроблення методів кріозахисту.

Методи кріопротекції виявилися ефективними і для захисту дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* [16]. Як кріопротектори обрано диметилсульфоксид і гліцерил. Підвищення життєдіяльності дріжджових клітин встановлено їх озонуванням до та після кріоконсервування.

Фахівці інституту проблем кріобіології та кріомедицини (Харків) з'ясували, що при заморожуванні еритроцитів, попередньо оброблених кріопротекторами, забезпечується висока стабільність еритроцитів у процесах заморожування-відтаювання, адже зберігаються їхні осмотичні, антиоксидантні та морфологічні властивості. Це виявилось особливо ефективним при використанні комбінації кріопротекторів — проникаючих і непроникаючих [13].

Як бачимо, основний внесок у вивчення механізмів кріоушкоджень клітин біологічних об'єктів, як і раніше, роблять фахівці в галузі кріобіології та кріомедицини. Та оскільки природні біологічні об'єкти у медицині та сільськогосподарській сировині мають подібний хімічний склад і будову клітин, зрозумілою є обґрунтованість та доцільність використання набутого вченими-кріобіологами досвіду в харчових технологіях. І оскільки таких спроб поки що дуже мало, то кожне дослідження в цьому напрямі сприятиме розвитку та застосуванню нових ефективних методів заморожування, основним призначенням яких є збереження у цільовому продукті максимальної кількості біокомпонентів рослинної сировини.

Висновки

У цілому в розвинених країнах накопичено значний теоретичний і практичний досвід виробництва швидкозаморожених продуктів. В Україні низькотемпературні технології швидкозамороженої харчової продукції не досягли ще бажаного рівня як за обсягами виробництва, так і за його апаратурним обладнанням.

При заморожуванні біологічних об'єктів згубними чинниками для клітин є виникнення і ріст внутрішньоклітинних кристалів льоду, тому в практичних умовах кріоконсервування клітинних суспензій людини і тварин, різноманітних тканин і органів, репродуктивних клітин рослин тощо застосовують багатоетапні програми заморожування, спрямовані на поступове зневоднення клітин і зниження рівня ушкоджуючого впливу фізико-хімічних чинників на біооб'єкти.

З цієї ж метою широкого розповсюдження набуло використання різноманітних складних середовищ, кріопротекторів, мембранних і метаболічних стабілізаторів. Тому перспективним є застосування в холодильних технологіях недорогих і ефективних кріопротекторів (у тому числі природних), здатних підтримувати цілісність клітин плодоовочевої сировини в циклах заморожування-зберігання-відігрів, що забезпечує високу якість і біологічну цінність харчової продукції.

Заморожування рослинних матеріалів під захистом кріопротекторів відчутно гальмує розвиток внутрішньоклітинного льодоутворення, оскільки кріопротектори здатні модифікувати структуру рідкої фази і характер кристалізації

води. Завдяки цьому лід, який формується, має дрібнокристалічну структуру зі слабкими полями напруженості й нездатний руйнувати рослинні клітини.

Подальший прогрес у галузі розроблення холодкових технологій для харчової промисловості, пов'язаних із заморожуванням біологічних об'єктів різного ступеня складності під захистом штучних і природних кріопротекторів, здійснюється на основі вивчення як механізмів кріоушкоджень тканин рослинної сировини та методів щодо їх запобігання, так і особливостей взаємодії біокомпонентів сировини з кріопротекторами на молекулярному і клітинному рівнях.

Література

1. Шубина Г. Рынок замороженных полуфабрикатов. *Продукты & Ингредиенты*. 2012. № 8(94). С. 14—17.
2. Сербін А. Г., Сіра Л. М., Слободянок Т. О. Фармацевтична ботаніка: підруч. для вузів. Вінниця: Нова Книга, 2015. 488 с.
3. Цапалова И. Э., Губина М. Д., Голуб О. В., Позняковский В. М. Экспертиза дикорастущих плодов, ягод и травянистых растений. *Качество и безопасность: учебник*. Москва: ИНФРА-М, 2017. 463 с.
4. Смит О. Биологическое действие замораживания и переохлаждения / пер. с англ. Москва: Изд-во иностранной литературы, 2003. 272 с.
5. Антонов А. А., Венгер К. П. Технико-экономическая оценка работы скороморозильных аппаратов. *Мясная индустрия*. 2002. № 7. С. 45—47.
6. Ручьев А. С. Совершенствование производства быстрозамороженной растительной продукции с использованием жидкого и газообразного азота: диссертация канд. техн. наук: 05.18.04. Москва, 2003. 152 с.
7. Белінська С., Клячин І. Трансформація форм води при зберіганні та заморожуванні квасолі стручкової овочевої. *Товари і ринки*. 2015. № 1. С. 154—162.
8. Українець А. І., Сімахіна Г. О., Науменко Н. В., Камінська С. В. Заморожені плодово-ягідні напівфабрикати: якість, ефективність, безпека: монографія. Київ: Видавництво «Сталь», 2019. 324 с.
9. Белоус А. М., Гриценко В. И. Кробиология. Киев: Наукова Думка, 1994. 430 с.
10. Minetti M., Ceccarini M., Maria A., Di Stasi M. Role of membrane thermotropic properties on hypotonic hemolysis and hypertonic cryohemolysis of human red blood cells. *I. Cells. Biochem.* 1984. № 25. P. 61—72.
11. Stiles W. On the cold death on plants. *Protoplasma*. 1988. № 9. P. 459—468.
12. Diller K. R. Intracellular freezing: effect of extracellular supercooling. *Cryobiology*. 1987. № 4. P. 69—81.
13. Гордиенко Е. А., Осецкий А. И., Розанов Л. Ф. Научное обоснование способов низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. *Проблемы кробиологии*. 1997. № 1—2. С. 67—71.
14. Пушкарь Н. С., Шраго М. И., Белоус А. М. Кріопротектори. Киев: Наук. думка. 1999. 204 с.
15. Доценко Н. В. Проблеми захисту рослинної сировини за допомогою кріопротекції. *Зб. наук. праць ОДАХТ*. Вип. 18. 1998. С. 38—41.
16. Рамазанов В. В., Дейнеко Т. И., Воловельская Е. Л., Коптелов В. А., Бондаренко В. А. Свойства эритроцитов, замороженных в комбинированной среде с полиэтиленгликолем и диметилсульфоксидом. *Biotechnologia Acta*. 2012. Т. 5, № 2. С. 106—114.