

# 二氧化碳导致鸭梨褐变与细胞内钙的关系

刘野<sup>1</sup>, 胡小松<sup>2,\*</sup>, 张飞<sup>3</sup>

(1.北京工商大学化学与环境工程学院, 北京 100048; 2.中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083;  
3.国家粮食储备局西安油脂科学研究设计院, 陕西 西安 710082)

**摘要:** 为了研究 CO<sub>2</sub> 导致鸭梨果实褐变与细胞内钙的关系, 采用高压二氧化碳(HPCD)对鸭梨进行短时处理。结果表明: 经过 HPCD 处理后, 鸭梨细胞内的水溶性钙和膜结合钙含量随处理时间延长逐渐降低; 果胶酸钙和碳酸钙总含量、草酸钙含量、磷酸钙含量逐渐升高; X 射线衍射结果表明碳酸钙含量有所升高; 超微观察显示细胞结构已被破坏, 果实发生严重褐变。因此, HPCD 处理改变了鸭梨细胞内钙的存在状态和部位, 使细胞质膜的透性增大, 加速了果实的褐变。

**关键词:** 高压二氧化碳; 鸭梨; 褐变; 细胞结构; 钙含量

## Relationship between Carbon Dioxide-induced Browning and Intracellular Calcium in Yali Pears (*Pyrus bretschneideri* Rehd.)

LIU Ye<sup>1</sup>, HU Xiao-song<sup>2,\*</sup>, ZHANG Fei<sup>3</sup>

(1. College of Chemical and Environmental Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China;  
2. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;  
3. Xi'an Oils & Fats Research & Design Institute, State Administration of Grain Reserve of China, Xi'an 710082, China)

**Abstract:** Yali pears were subjected to short-time high-pressure carbon dioxide (HPCD) treatment in order to explore the relationship between their CO<sub>2</sub>-induced browning and intracellular calcium. After HPCD treatment, the content of water soluble and membrane-bound calcium decreased, whereas the contents of calcium oxalate, calcium phosphate, calcium pectate and calcium carbonate increased in Yali pears as the HPCD treatment time increased. An increase in the content of carbonate calcium was also confirmed by X-ray diffraction analysis after HPCD treatment. Moreover, the structure of brown Yali pears was destroyed, which was examined by transmission electron microscope (TEM). Therefore, HPCD treatment can change the types and distribution of calcium in Yali pear cells, increase cell permeability, and accelerate the browning of fruits.

**Key words:** high pressure carbon dioxide; Yali pear; browning; cell structure; calcium content

中图分类号: TS255.3; O521.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)13-0062-04

钙离子是植物体内一种重要的营养元素, 是调节植物代谢系统的重要因子之一<sup>[1]</sup>。钙可以有效防止水果腐烂、保持果实硬度和减少乙烯释放。缺钙会导致许多生理失调症并引发病理病害, 如果实开裂、组织呈水渍状、细胞发生干燥的空腔式凹陷和幼嫩组织坏死<sup>[2]</sup>。并且钙对果蔬的品质有着重要的影响<sup>[3-4]</sup>。钙是连接果实细胞壁中聚半乳糖醛酸和半乳糖醛酸鼠李糖的中介, 这种结构聚合度越高, 果胶结构越牢固<sup>[5]</sup>。钙还是果实细胞膜的结构物质, 钙与磷脂和蛋白质结合有利于保持膜的完整性和稳定性<sup>[6]</sup>。另外, 钙还能使原生质水化性降

低, 保持原生质的正常状态。

鸭梨贮藏过程中果实的褐变可能是由于膜功能损伤, 引起代谢的分室作用遭到破坏所致<sup>[7]</sup>。但目前对于贮藏过程中鸭梨果实的褐变机理还没有定论。本实验采用高压二氧化碳(high pressure carbon dioxide, HPCD)对鸭梨进行短时处理, 模拟鸭梨贮藏过程中 CO<sub>2</sub> 对细胞造成的影响, 考察处理后鸭梨果实中钙存在状态的变化。在一定程度上为贮藏过程中二氧化碳导致鸭梨果实褐变提供依据。

收稿日期: 2010-09-18

基金项目: 国家“863”计划项目(2007AA100405)

作者简介: 刘野(1981—), 男, 讲师, 博士, 主要从事食品非热加工技术研究。E-mail: liuyecau@126.com

\* 通信作者: 胡小松(1961—), 男, 教授, 博士, 主要从事食品安全理论与技术、果蔬加工关键技术与产业化研究。

E-mail: caucfsne@yahoo.com.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

鸭梨采自北京密云不老屯镇黄土坎村, 树龄 10 年, 实验所用均为不套袋鸭梨。

碳酸钠、氯化钠、氯化钙、乙酸、盐酸、乙二醇四乙酸均为分析纯 北京化工厂; 聚乙烯吡咯烷酮 国药集团化学试剂有限公司; 盐酸维拉帕米、盐酸氯丙嗪 (CPZ)、 $\beta$ -巯基乙醇、2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES) 美国 Sigma 公司。

### 1.2 仪器与设备

DDS-II 电导率仪 上海精密仪器厂; 高压二氧化碳处理装置(型号 CAU-HPCD-1, 专利号: ZL200520132590.X) 中国农业大学研制; TAS-986 型原子吸收光谱仪 北京普析通用仪器有限责任公司; JEOL-100S 型透射电子显微镜 日本 JEOL 电子株式会社; CP100MX 型超速离心机 日本日立公司; D/max-2550 粉末 X 射线衍射仪 日本 Rigaku 公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 鸭梨组织圆片减压浸泡实验

用直径 1cm 的打孔器取鸭梨果肉, 用手术刀片将其切成厚度为 2~3mm 的组织圆片。分别迅速投入装有纯净水、5mol/L 碳酸钠、3mol/L 氯化钙、5mol/L EDTA、100 $\mu$ mol/L 盐酸维拉帕米和 100 $\mu$ mol/L CPZ 溶液(各溶液体积均为 1000mL)的玻璃真空干燥器中。干燥器顶端连接真空泵在 0.098MPa 的压力下进行减压浸泡。减压浸泡时间分别为 3、6、9、12min。处理后取出, 用滤纸吸干组织圆片表面水分。参照王文辉等<sup>[8]</sup>的方法测定鸭梨组织圆片的相对电导率。

#### 1.3.2 鸭梨果实的 HPCD 处理

选取大小适中的鸭梨整果放入 HPCD 处理釜, 加盖密封。设定压强为 30MPa, 温度为 25℃, 充入 CO<sub>2</sub> 达到设定压强, 分别处理 10、20、30、40min。处理达到设定时间后, 为避免高压对鸭梨细胞造成的破坏, 经过 15min 缓慢泄压后取出, 进行钙素测定和电镜观察。

#### 1.3.3 鸭梨果实中不同形态钙的测定

4 种不同形态钙测定参考龚云池等<sup>[9]</sup>方法, 稍做修改。称取 10g 冻样, 采用逐级提取法, 即分别用去离子水、1mol/L 氯化钠、2% 乙酸和 5% 盐酸分别逐级提取水溶性钙、果胶钙和碳酸钙、草酸钙、磷酸钙。用原子吸收光谱进行上述几种形态钙含量的测定。钙含量以果实干基计, 单位  $\mu$ g/g, 每个样品重复 3 次。

#### 1.3.4 鸭梨果实中膜结合钙含量的测定

采用 Yapa 等<sup>[10]</sup>的方法提取鸭梨果实细胞的膜结合钙。取鸭梨果实样品 5g 于 15mL 提取缓冲液(含 0.25mol/L 蔗糖、20mmol/L Tris-HCl (pH7.5)、3mmol/L EDTA、

3mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇、1g 聚乙烯吡咯烷酮)中制成匀浆, 用 4 层纱布过滤后在 1500  $\times$  g 离心 15min。上清液在 15000  $\times$  g 离心 30min, 保留沉淀。上清液在 100000  $\times$  g 离心 1h, 分别把沉淀部分用悬浮缓冲液(含 0.125mol/L 蔗糖、1mmol/L Tris-MES (pH7.2)、3mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇)进行悬浮。加入盐酸使其最终浓度为 0.1mol/L, 将混合液振荡 1h 后在 1500  $\times$  g 离心 10min, 所得上清液用滤纸过滤, 定容到 50mL。用原子吸收光谱测定膜结合钙含量。

#### 1.3.5 果实中碳酸钙的 X 射线衍射分析

取 HPCD 处理前后的鸭梨果实充分烘干, 用粉碎机将其研磨成粉末, 并过 100 目筛。称取 100mg 压片, 供 X 射线衍射分析。

X 射线衍射仪采用 Cu K $\alpha$  辐射, 石墨单色器, 40kV、150mA,  $2\theta$ 扫描范围 3°~80°, 扫描速度 8°/min, 步长 0.02°。

#### 1.3.6 果肉细胞钙的亚细胞分布与超微结构观察

参照周卫等<sup>[11]</sup>的方法, 稍做修改。将处理前后的果实样品切成 0.5mm  $\times$  0.3mm 的组织块, 迅速投入用质量分数 2% 的焦锑酸钾(pH 7.6, 用 100mmol/L pH 7.1 的磷酸缓冲液配制)配制的体积分数 3% 戊二醛固定液中, 室温固定 4h, 然后用含质量分数 2% 焦锑酸钾的磷酸缓冲液(pH7.6)洗涤 3 次, 每次 30min, 将洗涤过的材料转移至用质量分数 2% 焦锑酸钾缓冲液(pH7.6)配制的质量分数 1% 锇酸中, 4℃固定过夜, 先用重蒸水(pH10.0)冲洗 3 次, 再用重蒸水浸洗 2 次, 每次 30min, 随后经体积分数 30%、50%、70%、80%、90%、100% 丙酮系列脱水, 环氧丙烷过渡, 环氧树脂 SPURR 包埋-聚合, LKB-V 型超薄切片机切片, 切片经醋酸双氧铀染色, 在透射电子显微镜下进行钙的细胞化学和超微结构的观察与照相。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同溶液减压浸泡对鸭梨组织圆片电导率的影响

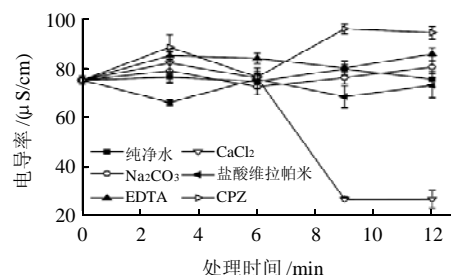


图1 不同溶液减压浸泡对鸭梨组织圆片电导率的影响

Fig.1 Effect of vacuum drench in different solutions on relative conductivity of Yali pear tissues

在几种溶液中, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 的 CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> 可以与鸭梨果实细胞内的 Ca<sup>2+</sup> 结合; EDTA 同样也是 Ca<sup>2+</sup> 的螯合剂; CaCl<sub>2</sub>

可以增加细胞内的  $\text{Ca}^{2+}$  含量；盐酸维拉帕米是钙离子通道阻断剂，可以阻止果实组织中  $\text{Ca}^{2+}$  进出细胞；CPZ 是钙调素拮抗剂，可以阻止  $\text{Ca}^{2+}$  与钙调素的结合，扰乱细胞的生理功能。由图 1 可知，在减压浸泡实验中，只有浸泡  $\text{CaCl}_2$  的组织圆片的电导率在处理 6min 后发生了显著降低 ( $P < 0.05$ )。这是由于  $\text{CaCl}_2$  增加了细胞内的  $\text{Ca}^{2+}$  含量，一部分  $\text{Ca}^{2+}$  结合到细胞内的质膜上，降低了细胞的透性。而浸泡了 CPZ 的组织圆片处理 6min 以后的电导率有所升高 ( $P < 0.05$ )。说明 CPZ 阻止了  $\text{Ca}^{2+}$  行使正常的生理功能，导致质膜透性的增加。而浸泡 EDTA 的组织圆片处理 6min 后电导率升高 ( $P < 0.05$ ) 同样是由于  $\text{Ca}^{2+}$  被螯合扰乱了细胞代谢，引起质膜透性的增加。而经过纯净水、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$  和盐酸维拉帕米浸泡过的组织圆片虽然在处理过程中电导率有所波动，但是总体上没有发生较大变化，处理 12min 时电导率与未处理样品差异不显著 ( $P > 0.05$ )。说明这 3 种物质对细胞内质膜上钙含量影响较小。

通过上述实验可以看出，增加细胞内的  $\text{Ca}^{2+}$  含量有助于保持鸭梨果实细胞的完整性，使细胞的透性降低；若细胞内的  $\text{Ca}^{2+}$  被螯合，则细胞的正常生理代谢紊乱，导致细胞的透性增加。因此，钙是鸭梨组织细胞内一种重要的元素。

## 2.2 HPCD 处理对鸭梨果实内不同形态钙离子含量的影响

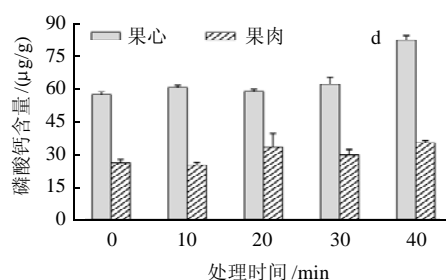
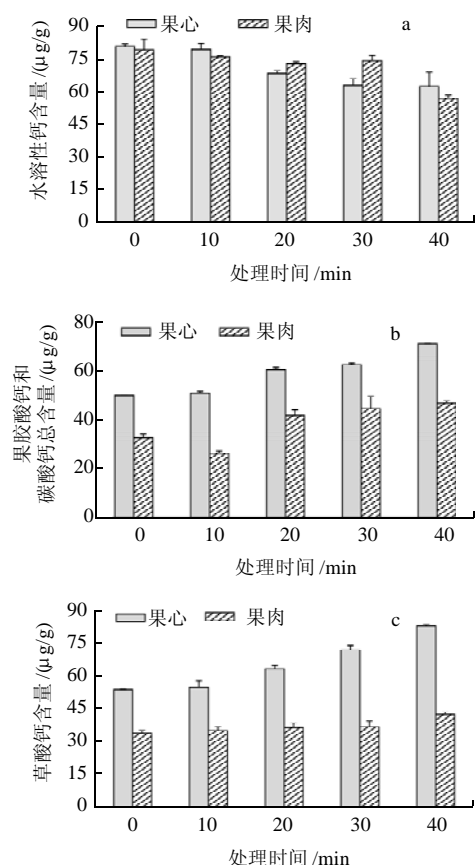


图2 HPCD 处理不同时间对鸭梨果肉和果心中不同形态钙含量的影响

Fig.2 Effect of HPCD treatment on calcium content in different forms in Yali pear flesh and core

由图 2a 可知，经过处理后，果肉和果心中的水溶性钙含量均有不同程度的降低 ( $P < 0.05$ )，并且随着处理时间的延长水溶性钙含量逐渐下降 ( $P < 0.05$ )。这是由于  $\text{CO}_2$  进入鸭梨细胞后与细胞中的游离态钙结合生成  $\text{CaCO}_3$  沉淀。这一结论与图 2b 中所呈现的趋势是一致的。随着处理时间的延长，鸭梨果肉和果心细胞中果胶酸钙和碳酸钙的总含量均逐渐增加 ( $P < 0.05$ )。并且从图 2b、2c 和 2d 可知，果心细胞中几种形态钙的含量显著高于果肉 ( $P < 0.05$ )。这是由于  $\text{CO}_2$  在鸭梨果心细胞中溶解度更大<sup>[12]</sup>，更易于上述几种形态钙的形成。另外，从图 2c、2d 可知，鸭梨果肉细胞中两种形态钙的含量基本保持不变 ( $P > 0.05$ )；而果心细胞中草酸钙和磷酸钙的含量分别随着处理时间的延长呈逐渐增加的趋势 ( $P < 0.05$ )。这是由于  $\text{CO}_2$  与果心细胞质膜上的钙结合形成  $\text{CaCO}_3$  导致质膜透性的增加。这样使分布在果心细胞内不同部位的草酸根、磷酸根和  $\text{Ca}^{2+}$  相结合的机会增大，从而使上述两种形态钙的含量增加。

## 2.3 HPCD 处理对鸭梨果实内膜结合钙离子含量的影响

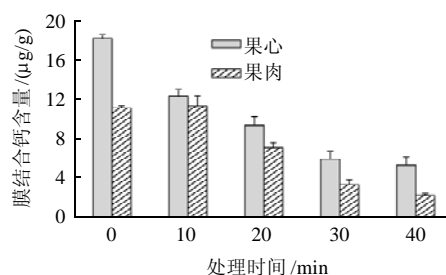


图3 HPCD 处理不同时间对鸭梨果肉和果心中膜结合钙含量的影响

Fig.3 Effect of HPCD treatment on membrane-bound calcium content in Yali pear flesh and core

由图 3 可知，鸭梨果心中膜结合钙的含量明显高于果肉细胞 ( $P < 0.05$ )。并且随着处理时间的延长，果肉和果心中膜结合钙的含量均逐渐降低 ( $P < 0.05$ )。说明  $\text{CO}_2$  进入细胞后可以螯合细胞质膜上的钙，形成  $\text{CaCO}_3$  沉淀。这与鸭梨组织圆片浸泡实验中 EDTA 对细胞质膜上钙的螯合作用是类似的。膜结合钙含量的降低导致质膜完整性被破坏，质膜的透性增大使位于细胞不同区域

的物质相结合的机会增大,在理论上为鸭梨的酶促褐变创造了条件。

#### 2.4 X射线衍射分析 HPCD 处理前后鸭梨果实中碳酸钙含量的变化

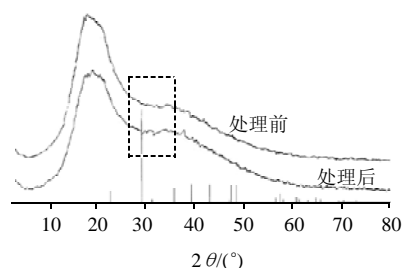


图4 HPCD 处理前后鸭梨果实粉末4射线衍射图谱

Fig.4 X-ray diffraction pattern of Yali pear fruits with and without HPCD treatment

通过检索国际粉末衍射数据库(ICDD),获得碳酸钙成分的标准衍射数据。分析 HPCD 处理前后鸭梨果实粉末衍射图谱(图4)中的碳酸钙主特征峰( $29.41^\circ$ 、 $35.97^\circ$ )的变化。结果表明, HPCD 处理后鸭梨样品中的碳酸钙含量略高于未处理样品。这与图2b所示的结果是一致的。进一步印证了  $\text{CO}_2$  进入鸭梨细胞后会与  $\text{Ca}^{2+}$  或膜结合钙结合生成  $\text{CaCO}_3$  沉淀。

#### 2.5 HPCD 处理前后鸭梨果实细胞的超微结构观察

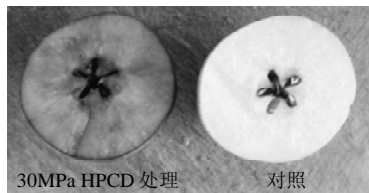
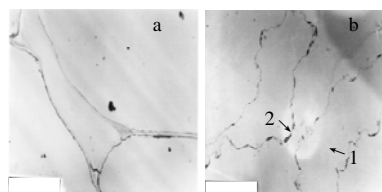


图5 HPCD 处理前后鸭梨果实颜色的变化

Fig.5 Color change of Yali pear fruits with and without HPCD treatment

由图5可知, HPCD 处理前鸭梨的果肉和果心呈白色;而经 30MPa、40min 处理后果肉和果心已发生了严重的褐变。这与前人关于高浓度二氧化碳可以导致果实褐变的结论是一致的<sup>[14-15]</sup>。但本研究还要考虑压力对鸭梨果实细胞的影响。有研究表明, 200MPa 以上的超高压处理会导致植物细胞结构的变化<sup>[16-17]</sup>。因为本研究所采用的压力为 30MPa, 远低于 200MPa, 所以压力对鸭梨细胞结构的影响相对较小。

为考察 HPCD 处理后鸭梨细胞结构的变化, 采用投射电镜对鸭梨细胞进行观察。在图6a、6b中, 结合于细胞膜上的黑色物质为焦磷酸钙沉淀。HPCD 处理前, 鸭梨的细胞完好无损, 细胞膜与细胞壁紧密相连, 钙均匀分布于细胞膜上。而经过 HPCD 处理后, 鸭梨细胞发生了明显的质壁分离现象, 并且细胞膜发生了破裂(图6b-1处)。同时钙在细胞膜上的均匀分布也被打破, 图6b-2为焦磷酸钙聚集形成的颗粒。



a.对照; b.30MPa HPCD 处理。

图6 HPCD 处理前后鸭梨果肉细胞超微结构的变化

Fig.6 Ultrastructure change of Yali pear flesh with and without HPCD treatment

### 3 结论

通过不同溶液减压浸泡鸭梨组织圆片实验可以看出钙在保持细胞质膜的完整性方面具有重要的作用。经过 HPCD 处理以后, 鸭梨果肉和果心细胞中水溶性钙和膜结合钙含量随着处理时间的延长而降低; 果胶酸钙和碳酸钙、草酸钙、磷酸钙的含量随着处理时间的延长而升高。并且处理后鸭梨的果实发生明显的褐变, 细胞超微观察显示细胞已受到严重破坏。因此, 可以推断  $\text{CO}_2$  进入鸭梨细胞后形成  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  与细胞质膜上钙结合导致细胞透性增大, 从而促进了果胶酸根、草酸根和磷酸根与钙的结合; 同时膜结合钙和水溶性钙与  $\text{CO}_3^{2-}$  的结合使碳酸钙的含量增加。另外, 细胞质膜透性的增大使位于液泡内的酚类物质与位于细胞质中的多酚氧化酶接触引起酶促褐变的机会增大了<sup>[13]</sup>。HPCD 处理后影响了细胞内钙的分布和形态, 导致了鸭梨果实的严重褐变。

#### 参考文献:

- [1] BANGERTH F. Calcium-related physiological disorders of plants[J]. Ann Rev Phytopathol, 1979, 17: 97-122.
- [2] 许孝堂. 钙素营养与果实品质及耐贮性的关系[J]. 内蒙古农业科技, 2000(5): 34-35.
- [3] 蒋依辉, 易干军, 孟祥春, 等. 钙处理结合壳聚糖涂膜对芒果贮藏品质的影响[J]. 食品科学, 2009, 30(22): 369-372.
- [4] 朱国英, 张阔, 刘成连, 等. 钙营养对甜樱桃果实品质形成的影响[J]. 北方园艺, 2008(10): 39-41.
- [5] 张承林. 果实品质与钙素营养[J]. 果树科学, 1996, 13(2): 119-123.
- [6] 关军锋.  $\text{Ca}^{2+}$  对苹果果实细胞膜透性、保护酶活性和保护物质含量的影响[J]. 植物学通报, 1999 (1): 73-75.
- [7] MARSCHNER H. 高等植物的矿质营养[M]. 李春俭, 张福锁, 曹一平, 等, 译. 北京: 中国农业大学, 2001: 119-206.
- [8] 王文辉, 李振茹, 王志华, 等. 套袋黄冠梨黑点病与钙素营养和果实衰老的关系[J]. 果树学报, 2005, 22(6): 658-661.
- [9] 龚云池, 徐季娥, 吕瑞江. 梨果实中不同形态钙的含量及其变化的研究[J]. 园艺学报, 1992, 19(2): 129-134.
- [10] YAPA P A, KAWASAKI T, MATSUMOTO H. Changes of some membrane-associated enzyme activities degradation of membrane phospholipids in cucumber roots due to  $\text{Ca}^{2+}$  starvation[J]. Plant Cell Physiol, 1986, 27(2): 223-232.
- [11] 周卫, 林葆. 花生缺钙症状与超微结构特征的研究[J]. 中国农业科学, 1996(4): 53-57.
- [12] 闫师杰. 鸭梨采后果实褐变的影响因素及发生机理的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
- [13] 鞠志国, 朱广廉, 曹宗巽. 莱阳红梨果实褐变与多酚氧化酶及酚类物质区域化分布的关系[J]. 植物生理学报, 1988, 14(4): 356-361.
- [14] 孙蕾, 王大明, 乔勇进, 等. 果实褐变机理及研究进展[J]. 经济林研究, 2002, 20(2): 92-94.
- [15] 郝利平, 寇晓虹. 梨果实采后果实褐变与细胞膜结构变化的关系[J]. 植物生理学通讯, 1998, 34(6): 471-474.
- [16] PRYSTAMO G, ARROYO G. High hydrostatic pressure effects on vegetable structure[J]. J Food Sci, 1998, 63(5): 1-4.
- [17] 谭俊峰, 林智, 郭丽, 等. 超高压对茶鲜叶的细胞结构、多酚氧化酶活性及主要化学成分的影响[J]. 食品科学, 2007, 28(9): 78-82.