

# 脱水过程中无核白葡萄细胞膜脂相变及完整性的变化

张月<sup>1</sup>, 陈卫林<sup>1,2</sup>, 崔昭东<sup>1</sup>, 刘逸卓<sup>1</sup>, 柯青<sup>1</sup>, 谢伊代·吐尔逊<sup>1</sup>, 武运<sup>1,2</sup>, 黄文书<sup>1,2\*</sup>

(1. 新疆农业大学食品科学与药学院, 新疆乌鲁木齐 830052)

(2. 新疆果品采后科学与技术重点实验室, 新疆乌鲁木齐 830052)

**摘要:** 无核白葡萄在脱水过程中易褐变, 绿品级率降低。该试验通过无核白葡萄细胞膜脂相变、激光共聚焦扫描电镜的观察、荧光值的对比、丙二醛、相对电导率及褐变指数等指标, 探究 30 °C (1.5 m/s)、30 °C (0 m/s)、25 °C (1.5 m/s) 和 25 °C (0 m/s) 的脱水条件下褐变与未褐变的无核白葡萄细胞的膜脂相变和完整性的差异。结果表明: 无核白葡萄失水量达 60% 时, 细胞膜因氧化降解发生断裂, 细胞质及液泡中的内容物溶出, FM4-64 与受损的细胞膜结合产生大量的红色荧光物质, 红色荧光强度值升高; FDA 与酯酶结合的绿色荧光物质随细胞质溶出无法聚集, 绿色荧光强度降低, 细胞膜完整性破坏, 无核白葡萄出现不同程度褐变; 此时的荧光比值、丙二醛含量及相对电导率增幅较大。其中未褐变的葡萄细胞膜脂相变温度均低于脱水温度, 细胞膜处于液晶相, 液晶相可以保持细胞膜的结构, 具有优异稳定性; 褐变的葡萄样品则相反, 细胞膜处于凝胶相, 不利于细胞膜结构的稳定。而且褐变的葡萄荧光比值、丙二醛含量和相对电导率均高于未褐变的葡萄, 细胞膜破坏程度高于未褐变的葡萄。脱水过程中使细胞膜始终处于液晶相, 可以更好的维持细胞膜的结构, 并且提高脱水速率也可以降低褐变的产生, 此结果可为无核白葡萄在脱水过程减少褐变现象提供一定理论基础。

**关键词:** 无核白葡萄; 脱水; 细胞膜脂相变; 细胞膜完整性

文章编号: 1673-9078(2024)08-220-229

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.8.0572

## Changes in Membrane Lipid Phase Transitions and Membrane Integrity of Thompson Seedless Grape Under Conditions of Dehydration

ZHANG Yue<sup>1</sup>, CHEN Weilin<sup>1,2</sup>, CUI Zhaodong<sup>1</sup>, LIU Yizhuo<sup>1</sup>, KE Qing<sup>1</sup>, XIEYIDAI·Tuerxun<sup>1</sup>,

WU Yun<sup>1,2</sup>, HUANG Wenshu<sup>1,2\*</sup>

(1.College of Food Science and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)(2.Xinjiang Key Laboratory of Fruit Postharvest Science and Technology, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

**Abstract:** Thompson seedless grapes are prone to browning during dehydration, with their green grade rate decreasing as a result. In this study, laser confocal scanning electron microscopy, fluorescence value comparison, malondialdehyde, relative conductivity, and a browning index were used to determine the differences in the membrane lipid phase transition and integrity between browning and non-browning Thompson seedless grape cells under conditions of dehydration at 30 °C (1.5 m/s), 30 °C (0 m/s), 25 °C (1.5 m/s), and 25 °C (0 m/s). The results showed that when the water loss of Thompson seedless

引文格式:

张月,陈卫林,崔昭东,等.脱水过程中无核白葡萄细胞膜脂相变及完整性的变化[J].现代食品科技,2024,40(8):220-229.

ZHANG Yue, CHEN Weilin, CUI Zhaodong, et al. Changes in membrane lipid phase transitions and membrane integrity of thompson seedless grape under conditions of dehydration [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(8): 220-229.

收稿日期: 2023-05-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32060546)

作者简介: 张月 (1993-), 女, 硕士, 研究方向: 农产品加工, E-mail: 903268710@qq.com

通讯作者: 黄文书 (1975-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 农产品加工, E-mail: xjnd-hws@126.com

grapes reached 60%, the cell membrane was broken due to oxidative degradation, the contents of the cytoplasm and vacuoles were dissolved, and FM4-64 combined with the damaged cell membrane to produce a large number of red fluorescence substances. As a result, the red fluorescence intensity value was increased. The green fluorescent substances bound by FDA and esterase did not aggregate with cytoplasmic dissolution, the green fluorescence intensity decreased, the integrity of the cell membrane was destroyed, and the Thompson seedless grape showed varying degrees of browning. Simultaneously, the fluorescence ratio, malondialdehyde content, and relative conductivity increased greatly. Among these, the lipid phase transition temperature of the non-browning grape cell membrane was lower than the dehydration temperature, and the cell membrane was in the liquid crystal phase, maintaining the structure of the cell membrane and showing excellent stability. Browning grape samples, on the contrary, were characterized by cell membranes in the gel phase, which is not conducive to a stable cell membrane structure. Moreover, the fluorescence ratio, malondialdehyde content, and relative conductivity of browning grapes were higher than those of non-browning grapes, as well as the degree of cell membrane destruction. During the dehydration process, the cell membrane is always in the liquid crystal phase, which allows for a better maintenance of the cell membrane structure. An increase in the dehydration rate can also reduce the generation of browning. These findings provide a certain theoretical basis for reducing browning in the dehydration process of Thompson seedless grapes.

**Key words:** Thompson seedless grape; dehydration; cell membrane lipid phase transition; cell membrane integrity

在新疆无核白葡萄的种植面积达 90%，主要集中在吐鲁番、鄯善、哈密等地区<sup>[1]</sup>。无核白葡萄皮薄，含糖量高，易受机械损伤和腐烂，常制成葡萄干，但在脱水过程中易发生褐变，绿品级率低，影响经济效益。刘峰娟等<sup>[2,3]</sup>的研究表明无核白的褐变是细胞膜氧化降解，完整性遭到破坏，多酚物质（存在于液泡中）与多酚氧化酶（存在于细胞质中）的区室化分布被打破，发生了酶促褐变。

细胞膜的主要成分为磷脂和蛋白质，其中磷脂会直接影响细胞膜的完整性、渗透性和流动性。低温和脱水都可以导致磷脂从液晶相到凝胶相的转变。相转变是在某个温度时发生突变，这个临界温度  $T_m$  就是相变温度。温度低于  $T_m$  时，此时的结构为固相或凝胶相，温度高于  $T_m$  时，此时结构为流动相或液晶相。磷脂的相变可以调控生物膜的性质，改变蛋白质的结构，进而影响生物膜生理功能。当细胞膜由液晶相转变为凝胶相，细胞膜的透性增大，与细胞膜结合的抗氧化酶活性受到抑制，无法发挥正常的生理功能，细胞膜的完整性与功能受到破坏<sup>[4,5]</sup>。磷脂的相态转变也涉及到层状相到层状相，层状相到非层状相（六方相）的转变，因此影响膜脂相变的因素也很多<sup>[6]</sup>。例如：1. 脂质自身结构。Kheifets 等<sup>[7]</sup>构建了一个膜脂的微观模型，证明了液晶-凝胶相变是脂间范德华吸引、空间排斥和疏水张力相互作用的协同效应；Matsuki 等<sup>[8]</sup>比较了饱和磷脂酰乙醇胺（PE）双层膜与二酰基磷脂酰胆碱（PC）双层膜的热力学量，发现 PE 双层膜表现了

更高的相变温度，源于 PE 分子的极性头基团之间的强相互作用。2. 脂质含量的变化。脂肪酸根据其分子结构（链长和链不饱和度）会使双层膜凝胶到液晶的转变温度升高或降低<sup>[9]</sup>。Gautier 等<sup>[10]</sup>的研究中发现不饱和脂肪酸和环状脂肪酸含量较高的抗冻细胞在冷冻过程中表现出较低的脂质相变温度；不饱和脂肪酸分解的减缓，可以保护细胞膜结构的完整<sup>[2]</sup>。除此之外，还有温度、pH 值和金属离子等外部因素<sup>[11]</sup>。

在植物脱水的过程中，细胞膜也是脱水胁迫的第一位点<sup>[4]</sup>，活性氧的大量积累，加速了细胞膜脂过氧化和膜蛋白间的聚合，当超过伤害阈值会导致膜系统被破坏，电解质及某些小分子有机物大量渗漏，细胞膜的结构与功能受到破坏，细胞膜的完整性会随着脱水时间的增加遭受不同程度的破坏<sup>[9]</sup>。

王文文等<sup>[1]</sup>的研究表明脱水温度控制在 35 °C 以下为宜；张丽英等<sup>[12]</sup>的研究表明 30 °C 干燥下的无核白葡萄色泽最好；张利娟等<sup>[13]</sup>研究了 30 °C 热风干燥下无核白葡萄的褐变随脱水时间不断加深，其总酚含量和抗氧化活性不断下降。以前人的研究为根据，选择了 30 °C（1.5 m/s）、30 °C（0 m/s）、25 °C（1.5 m/s）和 25 °C（0 m/s）的脱水条件，通过细胞膜的膜脂相变和荧光标记的方法观察细胞膜的完整性，研究无核白葡萄脱水过程中，细胞膜的膜脂相变与完整性变化，以及未褐变与褐变的无核白葡萄在细胞膜稳定性和完整性方面的差异，为无核白葡萄脱水制干过程减少褐变现象提供一定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

无核白葡萄购于2021年8-9月乌鲁木齐市北园春市场,无机械损伤且可溶性固形物为 $20 \pm 1$  °Brix带蒂碧绿的无核白葡萄。

1-苯胺基-8-萘酸(1-Anilinonaphthalene-8-Sulfonic Acid Ammonium Salt, ANS)购于上海源叶生物科技有限公司;荧光素乙二酸(FDA)购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司;FM4-64购于上海市上海酶联生物科技有限公司;考马斯亮蓝购于北京索莱宝科技有限公司;水合茚三酮购于上海蓝季科技发展有限公司;磺基水杨酸购于天津市致远化学试剂有限公司;甲苯、冰醋酸、二巯基乙醇、磷酸、无水乙醇、硫酸均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

DHG-9420A型电热恒温鼓风干燥箱,上海申贤恒温设备厂;THZ-82A气浴恒温振荡器,江苏省金坛市医疗仪器厂;安捷伦Cary Eclipse荧光光度计;WTJCHT2021102201-LSM激光共聚焦显微镜,卡尔蔡司公司;DDS-307雷磁电导率仪,上海仪电科学仪器股份有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 原料处理

新鲜的无核白葡萄,含水量为79.29%,无机械损伤且可溶性固形物为 $20 \pm 2$  °Brix带蒂色泽碧绿的无核白葡萄,称取单粒质量为2.50~3.00 g,记录每颗葡萄重量。在30 °C (1.5 m/s)、30 °C (0 m/s)、25 °C (1.5 m/s)和25 °C (0 m/s)的条件下进行脱水,每个条件下分别获得失水量25%、50%、60%未褐变、60%褐变、75%未褐变和75%褐变的无核白葡萄。

#### 1.3.2 无核白葡萄细胞膜脂的相变

##### 1.3.2.1 细胞膜的提取

参照Wang等<sup>[14]</sup>的方法。称取5 g无核白葡萄,加入24 mL 50 mmol/L的磷酸缓冲液(pH值7.0,包含1 mmol/L的二巯基乙醇和0.1% Tween20)进行研磨,0 °C下静置提取30 min后四层纱布过滤,滤液于4 °C,10 000 r/min离心20 min,上清液即为所提取的细胞膜。

##### 1.3.2.2 细胞膜的流动性的测定

参考吕硕<sup>[15]</sup>的方法测定细胞膜的流动性。将ANS

用Tris-HCl缓冲液(pH值7.4)配成5 mmol/L的母液,使用前稀释母液至0.1 mmol/L。使0.1 mmol/L ANS加入细胞膜提取液中,ANS最终浓度为 $2.5 \times 10^{-2}$  mmol/L,蛋白质质量浓度100 mg/L,在25 °C恒温摇床标记30 min。用荧光分光光度计检测ANS荧光强度(激发波长385 nm,发射波长480 nm,狭缝宽度10 nm)。

##### 1.3.2.3 不同温度下无核白葡萄细胞膜脂相变温度

将细胞膜提取液,用气浴恒温振荡器在5、10、15、20、25、30、35和40 °C下分别振荡标记30 min,测定不同温度下细胞膜的ANS荧光强度。用绝对温度的倒数与相应的荧光强度对数做图。细胞膜的膜脂相变温度范围值有突变区。画一条直线与1,2两线分别交于 $I_1$ 和 $I_2$ , $I_1$ 和 $I_2$ 的平分点( $a=b$ )对应的温度就是相变温度,用 $T_1$ 表示。

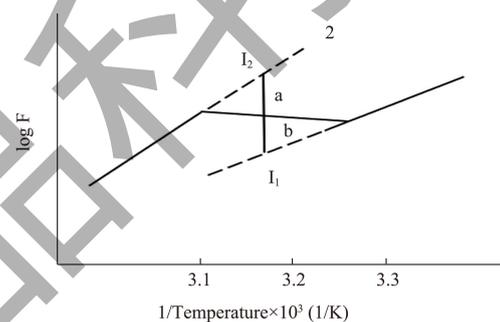


图1 膜相变过程中荧光强度的变化

Fig.1 Change of fluorescence intensity during phase transition of membrane

##### 1.3.3 细胞膜完整性的测定

荧光染料FM4-64可以与不完整的细胞膜特异性结合产生红色的荧光<sup>[16]</sup>,而FDA能与细胞膜内的酯酶发生水解产生绿色荧光物质在具有完整细胞膜的细胞内聚集。

激光共聚焦扫描电镜<sup>[17]</sup>的观察:将无核白葡萄切成带有果皮的薄片,厚度约为1 mm,放入FM4-64工作液中浸泡1 h后,然后在FDA溶液中浸泡10 min,用去离子水多次冲洗,使用激光共聚焦扫描电镜进行检测。FDA的激发光488 nm,发射光530 nm;FM4-64的激发光555 nm,发射光630 nm,不同处理间各荧光参数保持一致。

荧光比:用ZEN lite软件选取六个大小相似的细胞,将FM4-64与FDA的荧光强度相比,比值再与ESID的荧光强度相比。细胞膜完整时,因FDA产生的绿色荧光物质于细胞内聚集,呈绿色荧光;细胞膜破损时,与FM4-64结合产生的红色荧光物质大量积累,因此可通过荧光物质聚集的荧光强度

值来区别不同脱水条件下的细胞膜完整程度。

### 1.3.4 丙二醛含量的测定

参考曹建康等<sup>[18]</sup>的方法。称取 0.25 g 无核白葡萄，加入 5.0 mL 10% TCA，研磨匀浆后，于 4 °C、10 000 r/min 离心 20 min，取 2.0 mL 上清液（对照空白管中加入 2.0 mL 10% TCA 溶液代替提取液），然后加入 2.0 mL 0.67% TBA，混合后在沸水浴中煮沸 20 min，取出冷却后再离心一次。分别测定上清液在 450、532 和 600 nm 波长处的吸光度值。重复三次。

$$C=6.46 \times (A_{532} - A_{600}) - 0.56 \times A_{450} \quad (1)$$

式中：

$C$ ——丙二醛的含量， $\mu\text{mol/L}$ ；

$A_{450}$ 、 $A_{532}$ 、 $A_{600}$ ——分别为 450、532、600 nm 波长处的吸光度值。

### 1.3.5 相对电导率

参考曹建康等<sup>[18]</sup>的方法。切取无核白葡萄中间 2 mm 厚的薄片，称取 1.0 g，放入三角瓶中加入 10 mL 蒸馏水冲洗三次后，加入 50 mL 蒸馏水，真空渗透 10 min 使细胞间隙空气排出，蒸馏水进入细胞间隙，使组织圆片沉于瓶底，在 25 °C 摇床上振荡 1 h，用电导率仪测定溶液电导率。然后沸水浴 15 min，冷却至室温继续加蒸馏水至 50 mL，再测定其全渗透率。电导率为无核白葡萄初始电导率 ( $L_1$ ) 和全渗电导率 ( $L_0$ ) 的比值。公式为：

$$L = \frac{L_1}{L_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中：

$L$ ——相对电导率，%；

$L_1$ ——初始电导率；

$L_0$ ——全渗电导率。

### 1.3.6 褐变指数

参考刘峰娟等<sup>[2]</sup>的方法。每次随机选取 50 粒

葡萄，根据整颗葡萄的褐变面积大小将褐变程度分为 4 级；1 级：褐变面积为 0；2 级：褐变面积 < 50%；3 级：褐变面积  $\geq$  50%；4 级：全部褐变。公式为：

$$L = \sum \frac{m \times n}{M} \quad (3)$$

式中：

$L$ ——褐变指数；

$m$ ——褐变级数；

$n$ ——该级果数；

$M$ ——总果数。

### 1.3.7 数据处理与统计分析

利用 Excel 进行数据整理，Zen 3.4 (blue edition)、Origin 2018 软件分析绘图，SPSS ( $P < 0.05$ ) 进行显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 膜脂相变温度

如表 1 所示，无核白葡萄的细胞膜脂相变温度随脱水程度的增加呈上升趋势。未进行脱水的新鲜无核白葡萄细胞膜脂相变温度为 16.89 °C，低于室温，处于液晶相。当失水量达到 25%、50% 时，各脱水条件下的无核白葡萄细胞的膜脂相变温度均低于脱水温度，细胞膜仍处于液晶相，此时无核白葡萄无褐变产生。处于液晶相的细胞膜状态紧绷有序，向各向同性相转变的焓变较小，在这一过程中分子有序结构的变化幅度较小，结构稳定。无核白葡萄又含有大量具有手性特征的葡萄糖，其分子中的羟基 (-OH) 和 PE 的磷酸基团以氢键相互作用，可以促进液晶态 PE 脂质体结构的形成，增加了它对细胞膜的保护作用<sup>[19]</sup>，因此液晶态更有利于维持细胞膜的结构。

表 1 不同脱水条件下无核白葡萄细胞膜脂相变温度

Table 1 Membrane lipid transition temperature of Thompson seedless grape cells under different dehydration conditions

失水量/%	30 °C (1.5 m/s)		30 °C (0 m/s)		25 °C (1.5 m/s)		25 °C (0 m/s)	
0	16.89 ± 1.98 <sup>Ad</sup>		16.89 ± 1.98 <sup>Ac</sup>		16.89 ± 1.98 <sup>Ac</sup>		16.89 ± 1.98 <sup>Ac</sup>	
25	14.38 ± 3.55 <sup>Bd</sup>		20.02 ± 4.07 <sup>ABc</sup>		17.95 ± 1.13 <sup>ABc</sup>		21.90 ± 1.94 <sup>Ab</sup>	
50	23.97 ± 3.04 <sup>ABc</sup>		24.55 ± 1.98 <sup>Ab</sup>		20.01 ± 2.52 <sup>Bbc</sup>		21.32 ± 0.37 <sup>Bb</sup>	
60	26.28 ± 2.70 <sup>Abc</sup>	31.38 ± 0.91 <sup>ABab</sup>	25.71 ± 1.28 <sup>Ab</sup>	33.15 ± 2.08 <sup>Aa</sup>	24.85 ± 4.60 <sup>Ab</sup>	29.87 ± 0.41 <sup>Ba</sup>	23.99 ± 2.25 <sup>Ab</sup>	30.86 ± 0.91 <sup>ABa</sup>
75	26.87 ± 1.32 <sup>ABbc</sup>	32.65 ± 3.16 <sup>Aa</sup>	28.79 ± 0.82 <sup>ABba</sup>	32.60 ± 1.45 <sup>Aa</sup>	23.49 ± 2.21 <sup>Bb</sup>	29.95 ± 1.85 <sup>Aa</sup>	25.62 ± 1.93 <sup>ABb</sup>	32.19 ± 1.78 <sup>Aa</sup>

注：同一行不同的大写字母表示具有显著差异 ( $P < 0.05$ )；同一列不同小写字母表示具有显著差异 ( $P < 0.05$ )；失水量 60%、75% 左侧为未褐变无核白葡萄的膜脂相变温度，右侧为褐变无核白葡萄的膜脂相变温度。

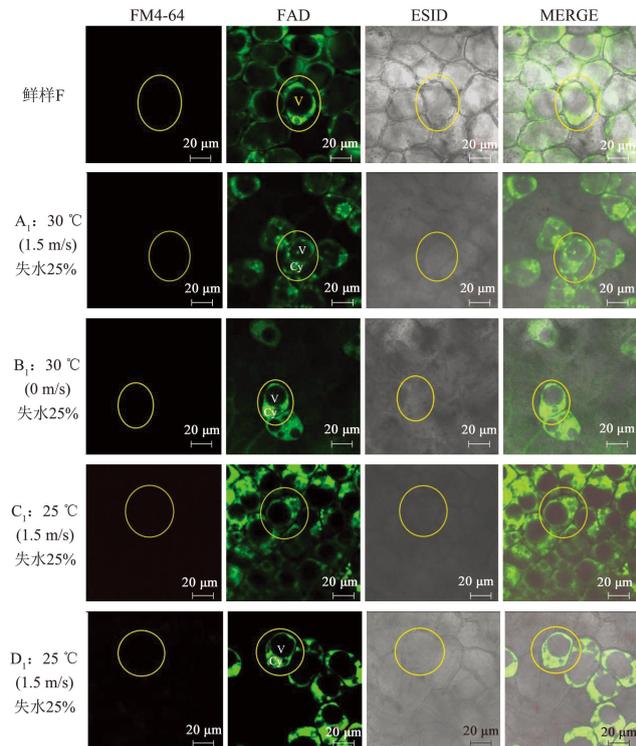


图 2 失水量 25% 时不同脱水条件下无核白葡萄细胞膜的完整性

Fig.2 Integrity of cell membrane of Thompson seedless grapes under different dehydration conditions at 25% water loss

注: V 为液泡, Cy 为细胞质。

但当失水量达到 60%，无核白葡萄出现褐变，其中未褐变的无核白葡萄的膜脂相变温度低于脱水温度，依旧处于液晶相；但褐变的无核白葡萄膜脂相变温度高于脱水温度，细胞膜处于凝胶相，凝胶相下的细胞膜透性增大，与细胞膜结合的抗氧化酶活性降低、生理代谢失衡、呼吸作用降低和活性氧大量积累等，使得细胞膜的结构和功能受到伤害<sup>[4]</sup>；失水量达到 75% 时，未褐变与褐变的细胞膜相态与失水量 60% 时的相态相一致。未褐变与褐变的细胞膜相态的差异，是由膜脂降解导致磷脂成份产生差异所造成的，这些差异成分不仅影响细胞膜的相态，也影响着细胞膜结构的稳定。例如神经酰胺会使双层膜结构发生重排，会促使细胞膜形成凝胶相结构；亚油酸和亚麻酸的含量增加，也有利于膜脂相变温度下降，还有磷脂酰基链上的不饱和度增加也可以降低膜脂相变温度，如二油酰基磷脂酰胆碱 (DOPC) 的相变温度就低于 1,2- 二棕榈酰 -sn-甘油 -3- 磷酸胆碱 (DPPC)<sup>[19]</sup>，并且这类具有较高不饱和脂肪酸指数的脂肪酸使细胞膜有更强的稳定性，从而使细胞膜脂在脱水过程中更容易维持液晶态，保持生物膜的生理功能等<sup>[4]</sup>。除此之外，膜

脂降解会造成磷脂酸 (PA) 的积累，游离脂肪酸 (FFA) 的积累会促进脂质的氧化自由基的形成加剧膜脂降解<sup>[20,21]</sup>；PC 的降低也会导致膜双层结构不稳定<sup>[22]</sup>。可以推测未褐变的无核白葡萄在神经酰胺，PA 和 FFA 的积累量低于褐变的葡萄，而有利于细胞膜维持在液晶态的 PE，不饱和脂肪酸 (亚油酸、亚麻酸等) 的含量高于褐变的无核白葡萄。

## 2.2 细胞膜的完整性

图 2~7 为激光共聚焦扫描电镜下观察到的无核白葡萄细胞。由图 2 可见，新鲜的无核白葡萄细胞内未见 FM4-64 与不完整细胞膜结合的红色荧光物质累积，但可以清晰地看到细胞质中的酯酶与 FDA 反应产生绿色荧光物质在具有完整细胞膜的细胞内聚集，其中液泡呈椭圆形位于细胞中间，体积占总体积的 80% 左右，从明场图中可以看到细胞与细胞之间清晰的轮廓，细胞膜结构完整。

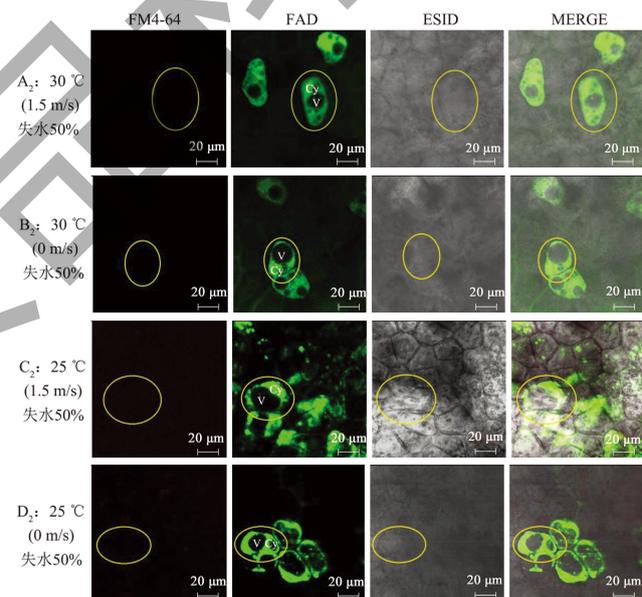


图 3 失水量 50% 时不同脱水条件下无核白葡萄细胞膜的完整性

Fig.3 Integrity of cell membrane of Thompson seedless grapes under different dehydration conditions at 50% water loss

注: V 为液泡, Cy 为细胞质。

当失水量为 25%，四种脱水条件下的细胞内无明显的 FM4-64 与不完整的细胞膜相结合的红色荧光物质积累，清晰可见绿色荧光物质在细胞内累积，液泡体积与鲜样相比略有缩小，表明细胞膜与液泡膜都具有完整性，未发生断裂，内容物也未溶出，液泡中的多酚物质和细胞质中的多酚氧化酶无接触，未有褐变产生。

由图 3 可见，无核白葡萄失水量达到 50% 时，

因脱水整个细胞体积缩小，液泡的体积也明显缩小，细胞中无明显的红色荧光物质积累，绿色荧光物质仍在细胞内累积，这表明了细胞膜仍具有完整性，未出现断裂，细胞质与液泡中的内容物未溶出，也未出现褐变产生。

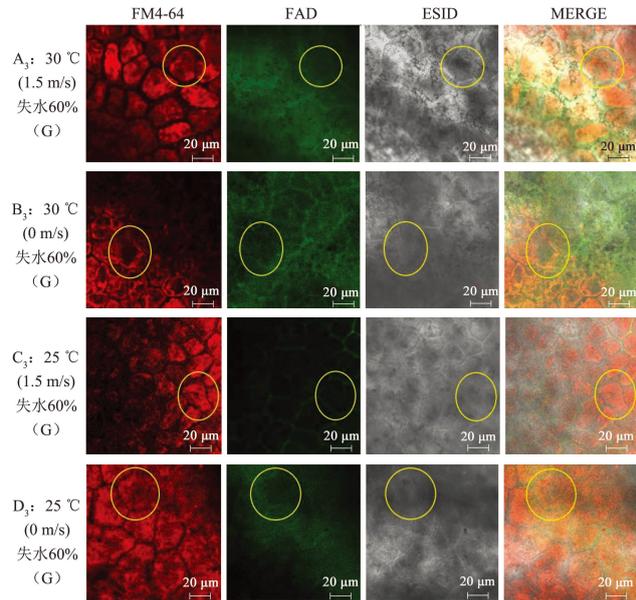


图4 失水量 60% 未褐变时不同脱水条件下无核白葡萄细胞膜的完整性

Fig.4 Integrity of cell membrane of Thompson seedless grapes under different dehydration conditions without browning at 60% water loss

注: G 表示未褐变的无核白葡萄。

由图4、5可见，失水量达到60%时，无核白葡萄出现了褐变，其中未褐变与褐变的无核白葡萄细胞，均有红色荧光物质产生并累积，而未见绿色荧光物质在细胞中累积，且红色荧光强度大于绿色荧光强度。表明了细胞膜因氧化降解受到不同程度损伤，细胞膜完整性破坏，出现断裂，FM4-64与不完整的细胞膜结合产生大量红色的荧光物质，细胞质溶出，FDA与酯酶结合产生的绿色荧光物质无法聚集在胞内。其中未产生褐变的无核白葡萄细胞轮廓模糊可见，液泡膜和细胞器膜降解，未降解破坏的部分未与FM4-64结合呈暗色，而褐变的无核白葡萄细胞中细胞膜轮廓几乎不可见。

由图6、7可见，失水量达到75%时，未褐变的无核白葡萄细胞与细胞之间的轮廓依稀可辨，FM4-64与受损断裂的细胞膜结合产生了红色荧光，但在单个具有模糊轮廓的细胞中央可以看到未与FM4-64结合的细胞膜呈暗色，液泡膜与其他细胞器膜未完全降解，FDA与酯酶结合的绿色荧光物质从

断裂的细胞膜中溶出分散，荧光强度降低。而褐变的无核白葡萄细胞与细胞之间的界限不清晰，细胞轮廓模糊，表明了细胞膜降解断裂，不具备完整性。

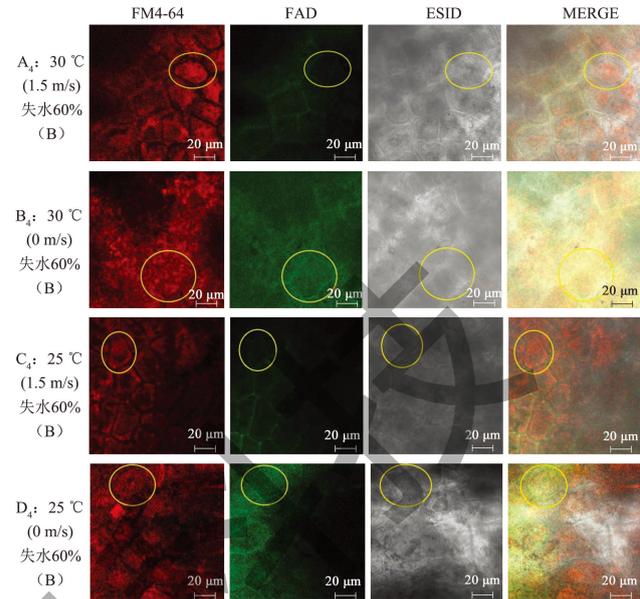


图5 失水量 60% 褐变时不同脱水条件下无核白葡萄细胞膜的完整性

Fig.5 Integrity of cell membrane of Thompson seedless grapes under different dehydration conditions with browning at 60% water loss

注: B 表示褐变的无核白葡萄。

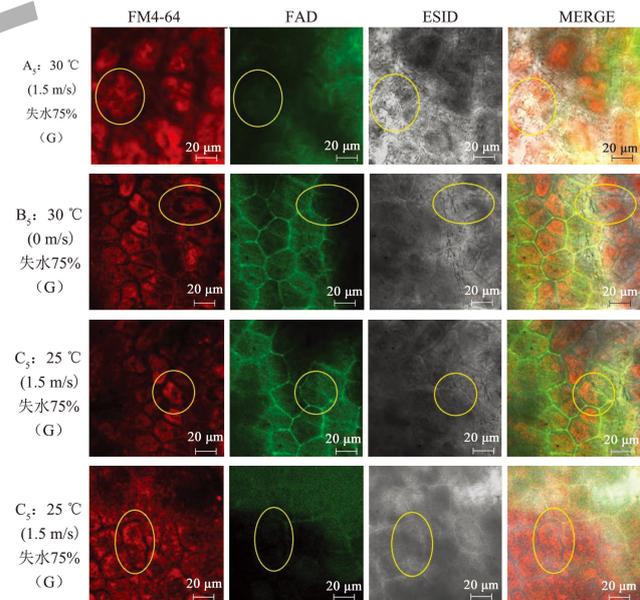


图6 失水量 75% 未褐变时不同脱水条件下无核白葡萄细胞膜的完整性

Fig.6 Integrity of cell membrane of Thompson seedless grapes under different dehydration conditions without browning at 75% water loss

注: G 表示未褐变的无核白葡萄。

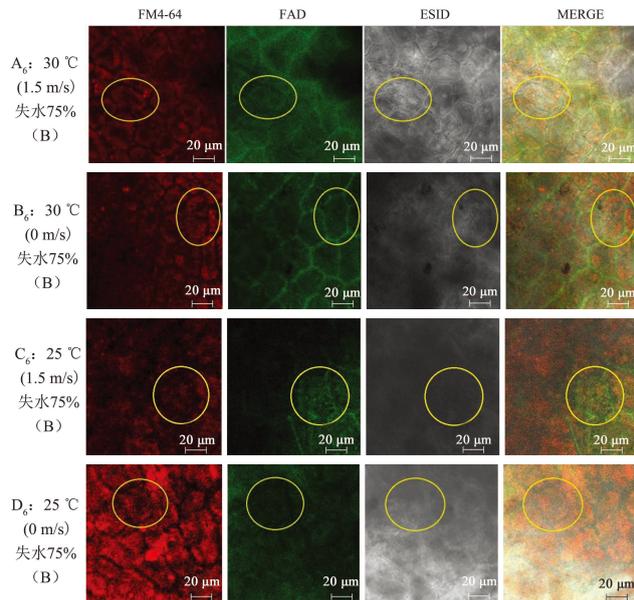


图 7 失水量 75% 褐变时不同脱水条件下无核白葡萄细胞膜的完整性

Fig.7 Integrity of cell membrane of Thompson seedless grapes under different dehydration conditions with browning at 75% water loss

注: B 表示褐变的无核白葡萄。

从以上观察可知, 在失水量 50%~60% 之间, 无核白葡萄细胞因膜氧化降解, 脂质成分变化和相边界的存在, 使得细胞膜表面曲率发生变化<sup>[23]</sup>, 出现断裂, 细胞质溶出, FDA 与酯酶结合产生的绿色荧光物质无法聚集, 并且 FM4-64 与不完整的细胞膜结合产生大量红色荧光物质, 无核白葡萄的产生不同程度的褐变, 说明了褐变与细胞膜的完整性相关。刘峰娟等<sup>[2]</sup>的研究也表明了无核白葡萄的褐变是由于

细胞膜完整性丧失, 多酚氧化酶与多酚物质的区室化分布打破, 两者接触产生褐变。随着脱水程度的增加, 细胞膜脂降解, 导致 PC 和 PE 含量的降低, PA 含量的积累, 其中 PA 的积累会影响细胞膜的完整性<sup>[24]</sup>。

FM4-64 与不完整的细胞膜结合产生红色荧光物质, 其荧光强度值可以间接表示细胞膜的破裂程度; FDA 与酯酶结合产生绿色荧光物质聚集在细胞内, 荧光强度值也可以表示细胞膜的完整程度。两者荧光强度比值越大说明细胞膜的破坏程度越大。如表 2 可知, 失水量达到 25% 时, 荧光比值处于较低值, 且四个条件下的荧光比值无显著性差异, 表明细胞膜因氧化降解受损程度较小, 与图 2 所观察到的细胞对应, 具有完整的细胞膜; 失水量达 50% 的荧光比值均有增大, 其中 30 °C (0 m/s) 条件下的荧光比值增加较显著, 由于温度较高且无风, 使得膜脂降解加快; 但失水量达 60% 时增幅均较大, 且各有差异, 对应图 4、5, 细胞膜与 FM4-64 相结合产生大量红色荧光, FDA 与酯酶结合的绿色荧光降低, 失水量 60% 的荧光比值突然增大, 进一步表明了此时细胞膜氧化降解程度加剧, 发生断裂, 完整性丧失; 失水量 75% 时, 荧光比值持续升高, 但褐变的无核白葡萄细胞膜荧光均大于未褐变的葡萄, 表明了未褐变的无核白葡萄细胞膜因氧化降解受损程度大于未褐变的葡萄; 并且还可以发现在相同失水量下四种脱水条件中 30 °C (1.5 m/s) 条件下的细胞膜荧光比值最低, 说明该条件下细胞膜因氧化降解受损程度较低, 与 FM4-64 相结合产生的红色荧光物质较少, 细胞膜结构维持的较好。

表 2 不同脱水条件下 FM4-64、FDA 和 ESID 的荧光强度比值

Table 2 Fluorescence intensity ratio of FM4-64, FDA and ESID under different dehydration conditions

失水量/%	30 °C (1.5 m/s)	30 °C (0 m/s)	25 °C (1.5 m/s)	25 °C (0 m/s)
0	0.011 ± 0.003 <sup>A</sup>	0.011 ± 0.003 <sup>A</sup>	0.011 ± 0.003 <sup>A</sup>	0.011 ± 0.003 <sup>A</sup>
25	0.012 ± 0.001 <sup>A</sup>	0.014 ± 0.002 <sup>A</sup>	0.049 ± 0.0126 <sup>A</sup>	0.015 ± 0.003 <sup>A</sup>
50	0.015 ± 0.004 <sup>B</sup>	0.368 ± 0.092 <sup>A</sup>	0.153 ± 0.127 <sup>B</sup>	0.250 ± 0.054 <sup>B</sup>
60(G)	0.624 ± 0.101 <sup>B</sup>	0.997 ± 0.025 <sup>A</sup>	0.671 ± 0.031 <sup>B</sup>	0.802 ± 0.133 <sup>C</sup>
60(B)	0.675 ± 0.088 <sup>B</sup>	1.338 ± 0.225 <sup>A</sup>	1.067 ± 0.193 <sup>A</sup>	1.192 ± 0.326 <sup>A</sup>
75(G)	0.780 ± 0.191 <sup>B</sup>	1.428 ± 0.222 <sup>A</sup>	1.260 ± 0.476 <sup>A</sup>	1.358 ± 0.266 <sup>A</sup>
75(B)	1.017 ± 0.090 <sup>B</sup>	1.858 ± 0.123 <sup>A</sup>	1.286 ± 0.125 <sup>A</sup>	1.667 ± 0.806 <sup>A</sup>

注: 同一行不同的大写字母表示具有显著差异 ( $P < 0.05$ ), G 表示未褐变的无核白葡萄, B 表示褐变的无核白葡萄。

### 2.3 丙二醛含量

丙二醛作为细胞膜氧化的最终产物，会结合细胞膜上的蛋白质，造成细胞膜结构与功能的损伤，破坏细胞膜的完整性，通过丙二醛含量测定，可以表示细胞膜受到破坏的程度<sup>[25]</sup>。随着脱水程度增加，无核白葡萄丙二醛含量呈上升趋势，如图8所示。在失水量为25%时，丙二醛的含量均处于较低水平，失水量达到50%时，30℃(0 m/s)条件下的丙二醛含量明显高于其他脱水条件，表明此条件下的细胞膜因氧化降解受损程度最大；失水量达到60%、75%时，丙二醛含量均有明显升高，尤其是褐变的无核白葡萄，其含量上升十分明显，表明了褐变的细胞膜因氧化降解受损程度严重。并且从图中也可以看出，各条件下的丙二醛累积量对比与表2荧光比值相对应，并且30℃(1.5 m/s)条件下的丙二醛含量一直处于较低水平，表明此条件下的细胞膜较完整。其次为25℃(1.5 m/s)、25℃(0 m/s)、30℃(0 m/s)。

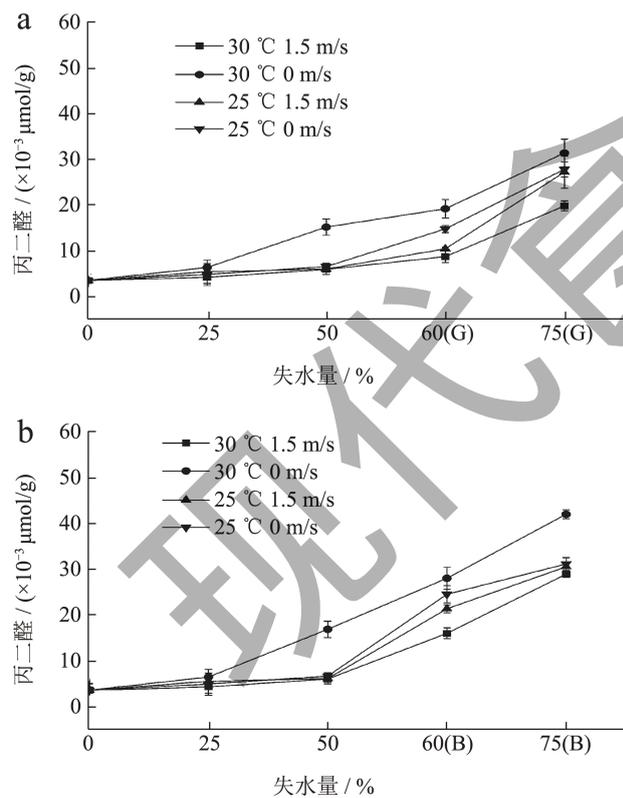


图8 无核白葡萄的丙二醛含量

Fig.8 Malondialdehyde content of Thompson seedless grapes

注：(a) 为未褐变的无核白葡萄，(b) 为褐变的无核白葡萄。图9同。

### 2.4 相对电导率

随着脱水程度的增加，细胞膜因氧化降解，结构遭到破坏，膜透性增大，无核白葡萄细胞膜的相对电导率越来越高<sup>[4]</sup>。如图9所示，失水量为25%、50%时，四种脱水条件下的相对电导率呈上升趋势，但各有差异，其中30℃(1.5 m/s)的增幅最小，30℃(0 m/s)的增幅最大；但失水量达60%时，四种脱水条件下的相对电导率迅速上升，表明细胞膜在失水量50%~60%过程中，细胞膜透性和结构受损程度较大，可以对应到图3~5，进一步说明了失水量到达60%时，细胞膜因氧化降解出现断裂，完整性遭到破坏；失水量达到75%时，其增速略有降低。其中未褐变的无核白葡萄的相对电导率均显著低于褐变的无核白葡萄，表明了褐变的无核白葡萄细胞膜选择透过性功能丧失，并且细胞膜结构的受损程度高于未褐变的葡萄。相同失水量下的相对电导率的大小排序与丙二醛含量的高低相对应，30℃(1.5 m/s)条件下的相对电导率也一直处于最低值，30℃(0 m/s)条件下的相对电导率一直处于最高值，表明了30℃(1.5 m/s)的条件下细胞膜的膜透性和膜结构的维持程度较好。

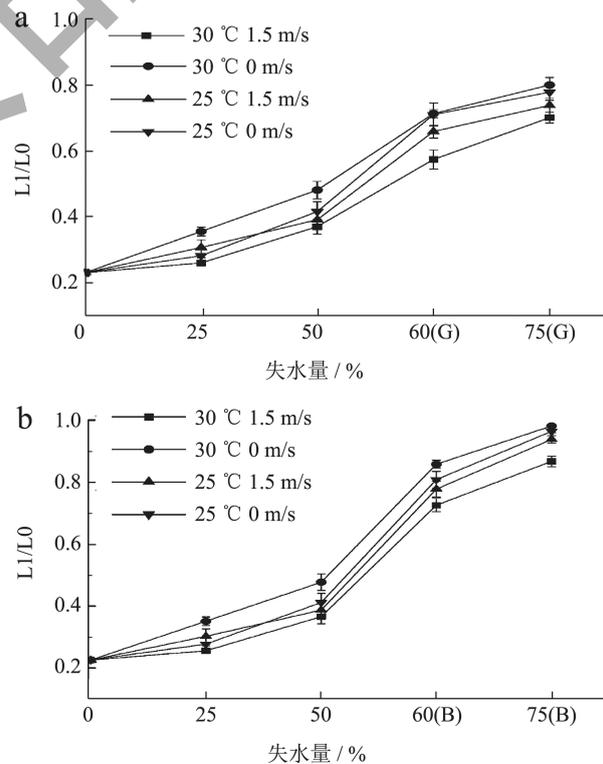


图9 无核白葡萄的相对电导率

Fig.9 Malondialdehyde content of Thompson seedless grapes

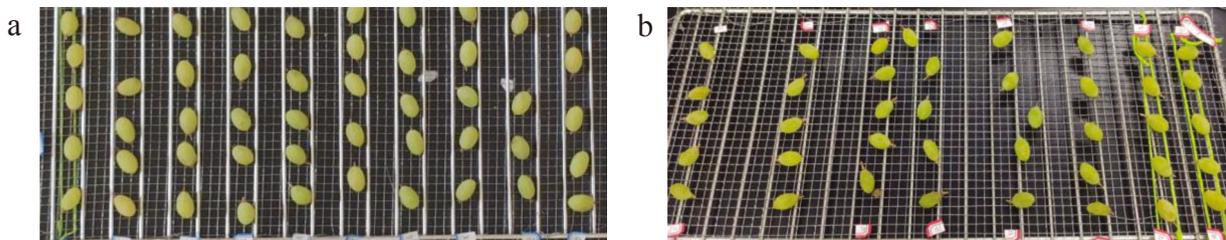


图 10 失水量 25% (a)、50% (b) 时的无核白葡萄

Fig.10 Thompson seedless grapes at 25% and 50% water loss

## 2.5 褐变指数

无核白葡萄失水量 25%、50% 时, 如图 10 所示, 没有产生肉眼可见的褐变, 因此褐变指数为 1; 失水量达到 60% 时, 无核白葡萄出现了不同程度的褐变, 随着脱水程度的增加, 褐变指数升高, 如表 3 所示。其中 30 °C (1.5 m/s) 的褐变指数最低, 未褐变的无核白葡萄达 70%, 其次是 25 °C (1.5 m/s)、25 °C (0 m/s)、30 °C (0 m/s)。说明了以增加风速的方式提高脱水速率可以降低褐变的发生。四个脱水条件下的褐变指数的大小排序均与表 2 的荧光比值、丙二醛含量的积累相一致, 进一步表明了褐变与细胞膜完整性相关。

表 3 失水量 60%、75% 时的无核白葡萄褐变指数

Table 3 Browning index of Thompson seedless grapes at 60% and 75% water loss

失水量	30 °C (1.5 m/s)	30 °C (0 m/s)	25 °C (1.5 m/s)	25 °C (0 m/s)
60%	1.30 ± 0.07 <sup>C</sup>	2.38 ± 0.08 <sup>A</sup>	1.35 ± 0.04 <sup>C</sup>	1.70 ± 0.09 <sup>B</sup>
75%	1.52 ± 0.02 <sup>D</sup>	2.60 ± 0.06 <sup>A</sup>	1.86 ± 0.05 <sup>C</sup>	2.09 ± 0.11 <sup>B</sup>

注: 同一行不同的大写字母表示具有显著差异 ( $P < 0.05$ )。

## 3 结论

新鲜的无核白葡萄细胞膜呈液晶相, 随脱水时间的增加, 膜脂成份因氧化降解发生变化, 细胞膜的相态也发生转变。失水量达到 60% 时, 细胞膜发生断裂, 细胞质与液泡中的内容物溶出, FDA 与酯酶相结合的绿色荧光物质无法聚集在完整的细胞内, 荧光强度降低; FM4-64 与破损的细胞膜结合产生大量红色的荧光物质, 细胞膜完整性丧失, 无核白葡萄出现褐变。此时, 未褐变的无核白葡萄细胞膜脂相变温度低于脱水温度, 细胞膜处于液晶相, 细胞膜脂的流动性降低, 成份组成更有利于细胞膜结构的稳定和完整, 如 PE, 不饱和脂肪酸 (亚油酸、亚麻酸等) 和 PC 等含量相较于处于凝胶态的褐变

的无核白葡萄较高, 而神经酰胺、PA 和 FFA 等的含量较低, 而两者在脂质成份上的具体差异需进一步研究。综上所述, 细胞膜始终处于液晶相更有利于细胞结构的稳定, 并且此状态下的脂质组成也有助于维持细胞膜结构的完整, 降低褐变的发生。而且未褐变的无核白葡萄荧光比值、丙二醛含量及相对电导率均低于褐变的无核白葡萄, 且差异较大, 也间接说明无核白的褐变与细胞膜结构的完整性相关。另外 30 °C (1.5 m/s) 条件下, 无核白葡萄褐变指数最低, 未褐变率达 70%, 也表明了提高脱水速率可以降低褐变的发生。

## 参考文献

- [1] 王文文, 马锦陆, 宋生建, 等. 无核白葡萄热风干制过程非酶褐变的研究 [J]. 食品工业, 2021, 42(10): 118-122.
- [2] 刘峰娟, 冯作山, 孟阳, 等. 脱水速度对“无核白”葡萄果皮褐变和细胞超微结构的影响 [J]. 食品科学, 2016, 37(6): 220-225.
- [3] 李晓丽, 陈计峦, 范盈盈, 等. 无核白葡萄干制过程中酚类物质的变化及其与褐变的关系 [J]. 食品科学, 2019, 40(7): 27-32.
- [4] 匡小勇, 林育钊, 范中奇, 等. 采后果蔬冷害与膜脂代谢的关系研究进展 [J]. 亚热带农业研究, 2020, 16(1): 60-64.
- [5] 吕麟琳, 程顺昌, 高超, 等. 1-MCP 对冷胁迫“香蕉李”磷脂组分和冷害影响研究 [J]. 包装工程, 2019, 40(17): 1-7.
- [6] BAGATOLLI, L A, STOCK R P. Lipids, membranes, colloids and cells: a long view [J]. Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes, 2021, 1863(10): 1-10.
- [7] KHEYFETS B, GALIMZYANOV T, MUKHIN S. Microscopic description of thermodynamics of lipid membrane at liquid-gel phase transition [J]. Jetp-Letters, 2018, 107(11): 718-724.
- [8] MATSUKI H, ENDO S, SUEYOSHI R, et al. Thermotropic and barotropic phase transitions on diacylphosphatidylethanolamine bilayer membranes [J]. Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes, 2017, 1859(7): 1222-1232.
- [9] MATSUKI H, KATO K, OKAMOTO H, et al. Ligand

- partitioning into lipid bilayer membranes under high pressure: implication of variation in phase-transition temperatures [J]. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2017, 209: 9-18.
- [10] GAUTIER J, PASSOT S, PENICAUD C, et al. A low membrane lipid phase transition temperature is associated with a high cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* *CFL1* [J]. *Journal of Dairy Science*, 2013, 96(9): 5591-5602.
- [11] 孙海源.若干二元磷脂体系相行为与相变机理研究[D].北京:清华大学,2017.
- [12] 张英丽,江英,陈计峦,等.无核葡萄干燥特性的研究[J].*食品工业科技*,2009,30(11):72-73,76.
- [13] 张利娟,师俊玲.无核白葡萄热风干燥过程中总酚与抗氧化活性的变化[J].*食品科学*,2013,34(5):55-59.
- [14] WANG J, CHEN W, NIAN H J. Inhibition of polyunsaturated fatty acids synthesis decreases growth rate and membrane fluidity of *Rhodospiridium kratochvilovae* at low temperature [J]. *Lipids*, 2017, 52(8): 729-735.
- [15] 吕硕.SIMAPK4基因敲除对番茄果实抗冷性的影响[D].泰安:山东农业大学,2020.
- [16] AVILA R, TAMARIZ E, MEDINA-VILLALOBOS N, et al. Effects of near infrared focused laser on the fluorescence of labelled cell membrane [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 1-11.
- [17] 林一欣.人工老化对甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.) 种子脂质组的影响[D].郑州:河南农业大学,2017.
- [18] 曹建康,姜微波,赵玉梅.果蔬采后生理生化实验指导[M].北京:中国轻工业出版社,2007.
- [19] 孙润广,郝长春,常怡光,等.鞘氨醇与DPPC, DPPE单层膜的热力学特性及形态观察 [J]. *化学学报*, 2009, 67(15):1808-1814.
- [20] ABDUL W, ALIYU S R, LIN L L, et al. Family-four aldehyde dehydrogenases play an indispensable role in the pathogenesis of *Magnaporthe oryzae* [J]. *Chemicals and Chemistry*, 2018, 9: 1-12.
- [21] WANG Y J, ZHANG X Y, HUANG G R, et al. Dynamic changes in membrane lipid composition of leaves of winter wheat seedlings in response to PEG-induced water stress [J]. *Bmc Plant Biology*, 2020, 20(1): 1-15.
- [22] SUN H J, ZHOU X, ZHOU Q, et al. Disorder of membrane metabolism induced membrane instability plays important role in pericarp browning of refrigerated 'Nanguo' pears [J]. *Food Chemistry*, 2020, 320: 1-10.
- [23] SELYUTINA O Y, SHELEPOVA E A, PARAMONOVA E D, et al. Glycyrrhizin-induced changes in phospholipid dynamics studied by <sup>1</sup>H NMR and MD simulation [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2020, 686: 1-8.
- [24] HONG K Q, YAO Q S, GOLDING J B, et al. Low temperature storage alleviates internal browning of 'Comte de paris' winter pineapple fruit by reducing phospholipid degradation, phosphatidic acid accumulation and membrane lipid peroxidation processes [J]. *Food Chemistry*, 2023, 404: 1-10.
- [25] JAFARI M, SHAHSAVAR A R, TALEBI M, et al. Exogenous melatonin protects lime plants from drought stress-induced damage by maintaining cell membrane structure, detoxifying ROS and regulating antioxidant systems [J]. *Horticulturae*, 2022, 8(3): 1-20.