

扫描探针技术在食品大分子纳米结构领域的应用

邓云^{1,2}, 肖晨龙², 朱立伟², 罗文²

(1. 上海交通大学陆伯勋食品安全研究中心, 上海 200240; 2. 上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240)

摘要: 简介了扫描隧道显微镜 (STM)、原子力显微镜 (AFM) 和扫描近场显微术 (SNOM) 的基本原理并比较了其优缺点, 重点阐述了 STM、AFM 和 SNOM 在食品中多糖、淀粉、蛋白质和脂质等大分子微观形貌和纳米结构的表征和操纵方面的研究发现和成果, 表明高清晰度、高分辨率的 STM、AFM 和 SNOM 非常适于食品中大分子在系统保持原生态或者不同状态条件下进行纳米级的结构研究。不断发展的扫描探针显微技术在食品工业中具有巨大发展潜力和广泛应用前景。

关键词: 食品, 纳米结构, 扫描探针技术, 应用, 生物大分子

doi: 10.3969/j.issn.1002-6819.2009.08.050

中图分类号: TS201, TB8

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2009)-8-0280-08

邓云, 肖晨龙, 朱立伟, 等. 扫描探针显微技术在食品大分子纳米结构研究中的应用[J]. 农业工程学报, 2009, 25(8): 280-287.

Deng Yun, Xiao Chenlong, Zhu Liwei, et al. Application of scanning probe microscopes to nanostructures of biomacromolecules in food systems[J]. Transactions of the CSAE, 2009, 25(8): 280-287. (in Chinese with English abstract)

0 引言

糖类、淀粉、蛋白质与脂肪分子作为功能性生物大分子, 在现代生物化学和分子生物学中占有极重要的地位, 也是食品工业的四大基础原料, 广泛应用于各种食品中。这些食品大分子虽具有复杂的结构, 但在组成方面却存在一种基本的简单性: 分子量较低的基本结构单位按一定的排列顺序构成复杂的空间结构, 最后形成多聚化合物; 大分子特定的微观结构特性决定了食品的功能性、宏观结构和形态等物理化学特性^[1]。在食品加工过程中, 温度、浓度、体系的 pH 值、离子强度、机械力 (压力、剪切、拉伸和超声波)、电场和磁场力等的变化将会引起食品大分子结构不同程度的变化, 也可获得多种功能性超分子结构^[2-4]。食品最终结构将依赖于怎样将化学、物理和加工干涉用于分子内和分子间力的平衡和体系内成分间的平衡。例如酪蛋白胶束的形成、蛋白质-多糖凝聚物、脂质体和胶体结构形成均是由纳米级分子自组装成粒子构成食品或存在于食品表面。控制食品大分子和小分子在食品基质中较大规模的组装能力将成为食品产品设计中的一部分。因此, 从宏观特性转移至中等和纳米级特性上来是食品创新的下一趋势的研究焦点^[5-6]。纳米尺度 (0.1~100 nm) 是介于宏观物体与微观分子之间的介观层次, 具有超乎寻常的光学、电学、磁学、力学的性质^[5]。科学家们对食品大分子的宏观结构和

特性已进行了广泛的研究, 但是对食品大分子纳米级结构的呈像和操作还处于初步阶段。扫描探针显微技术 (scanning probe microscopy, SPM) 是检测分子结构的有效工具, 运用先进的 SPM 对食品大分子进行纳米结构分析是从分子或原子水平解释大分子流变学、热学、电学和光学特性, 以及对食品功能性贡献等问题的基础。分析食品大分子结构与功效关系以及加工手段对食品分子结构和功效性的影响是研究开发新型食品新材料和产品、食品加工新工艺以及改进加工手段的基础。

1 扫描探针显微技术

对生物系统进行超微结构观察时, 必须考虑两个主要的试验因素: 样品本身的敏感性和图像对比度源^[7]。传统光学显微镜由于分辨极限的限制, 不具有亚微米甚至纳米尺度的光学分辨本领; 同时科学家们既希望显微镜可以在适于生物和食品系统等不同环境下工作, 又对检测样品无损伤。扫描探针显微镜 (SPM) 高分辨率及对样品的无破坏性等优点很好地满足了微观结构研究的要求, 可用于检测从相对较大的结构比如淀粉颗粒到亚分子结构比如蛋白质的次级结构等与食品相关的生物系统结构, SPM 在单分子探测、生物纳米光学及其他生物物理交叉学科上也有广泛的应用。SPM 是以各种利用探针与样品的不同相互作用来探测表面或界面在纳米尺度上表现出的物理性质和化学性质的显微术总称, 其中被应用最广泛的是扫描隧道显微镜 (scanning tunneling optical microscopy, STM), 原子力显微镜 (atomic force microscopy, AFM) 和扫描近场光学显微境 (scanning near-field optical microscopy, SNOM)^[8]。

1.1 扫描隧道显微镜 (STM)

1982 年, IBM 瑞士苏黎士实验室的 Binnig 和 Rohrer

收稿日期: 2008-08-20 修订日期: 2009-01-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30600420); 国家大学生创新计划项目 (08102483)

作者简介: 邓云 (1973-), 男, 重庆人, 主要从事食品物性及微观结构的研究。上海 上海交通大学农业与生物学院, 200240。

Email: y_deng@sjtu.edu.cn

研制出世界上第一台扫描隧道显微镜 (STM) [9]。STM 的主要原理是在直径为 50~100 nm 金属探针及导电样品间加约 2 mV~2 V 的电源, 并将两者距离维持在约为 0.5~1 nm 间, 金属针尖在样品表面上进行扫描时, 根据量子穿隧道效应产生隧道电流, 由于产生的隧道电流主要发生在针尖上最突出的一颗原子上, 因此 STM 具有原子级的横向解析力, 利用隧道电流为测量信号, 即可获得样品表面图像, 如图 1 所示 [10]。因此探针与样品必须能导电, 同时样品表面必须平整, 如此 STM 的应用范围因而受到限制。对于非导电的物质则要求样品覆盖一层导电薄膜, 但导电薄膜的粒度和均匀性难以保证, 且掩盖了物质表面的细节。STM 的空间分辨率较低, 获取数据速率较慢, 难以快速的控制原子和分子的结构。STM 的扫描模式有恒高度模式、恒电流模式和电流密度模式 3 种。恒高度模式扫描速度快、噪音小, 但不能用于观察表面起伏大于 1 nm 的样品。恒电流模式适用于观察表面形貌起伏较大的样品, 但有时对样品表面微粒之间的某些沟槽不能够准确检测, 分辨率较差。电流密度模式结合了前两种方法, 并引入了偏压调变, 该模式需要不断的开关反馈系统, 较费时。

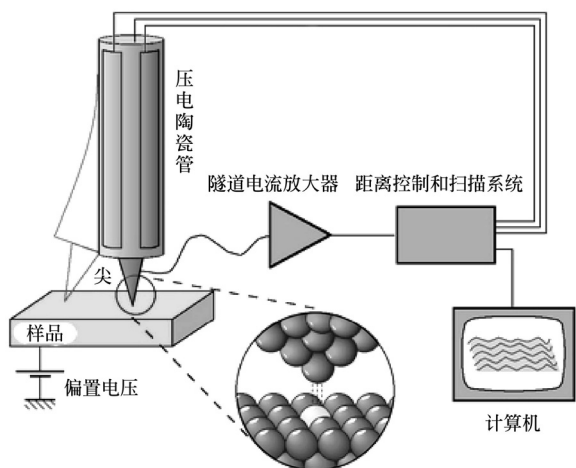


图 1 STM 的工作原理示意图

Fig.1 Schematic diagram of scanning tunneling optical microscopy (STM)

1.2 原子力显微镜 (AFM)

为了弥补 STM 不能直接观察非导电样品的缺憾, Binnig、Quate 和 Gerber 决定用微悬臂作为信号的传播媒介, 把微悬臂放在样品和 STM 的针尖之间, 于 1986 年推出了原子力显微镜 (AFM) [11]。AFM 由力检测部分、位置检测部分和反馈系统 3 个部分组成。在 AFM 操作中, 当以低功率镭射光打在悬臂末端上, 利用一组感光二极管检测器, 测量镭射光反射角的变化。当探针扫描过样品表面时, 由于反射的镭射光角度的变化, 感光二极管电流也随之变化, 根据测得的电流的变化, 可推算出悬臂被弯曲或歪斜的程度, 经输入电脑计算, 可产生样品表面三位空间的图像。通过记录微悬臂的形变量得出对应力值随针尖到基底表面距离变化的曲线, 来研究分子间的特异性相互作用力及其性质 [11-12], 如图 2 所示。

目前 AFM 有 3 种工作模式, 接触模式 (contact mode)、轻敲模式 (tapping mode) 和非接触模式 (non-contact mode)。接触模式工作时针尖与样品轻轻互接触 (约 2~3 nm), 这种方式对于较硬的材料有好的分辨率, 但对软样品则由于针尖在样品表面的直接作用导致对样品的破坏, 样品的碎片有可能污染针尖。非接触式工作时, 针尖与样品不是始终直接接触 (5~20 nm), 样品不会被损害, 但受空气中样品表面水面的影响, 其分辨率一般只有 50 nm, 在超高真空中可获得原子级分辨率。非接触模式不适用于在液体中呈像。轻敲式是以探针振荡的方式获取图像, 其分辨率介于前两者之间, 样品被损坏的几率降低, 但由于高频探针敲击, 探针易被损害。

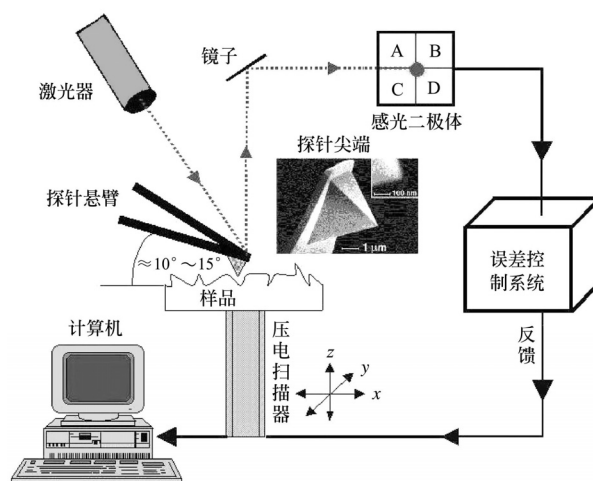


图 2 原子力显微镜工作示意图

Fig.2 Schematic diagram of atomic force microscopy (AFM)

AFM 与 STM 最大的差别在于并非利用电子隧道效应, 而是利用原子间的范德华力作用来呈现样品的表面特性。因此, AFM 除导电样品外, 还能够观测非导电样品的表面结构, 且不需要用导电薄膜覆盖, AFM 的样本可以是生理状态的各种物质, 在大气条件或溶液中都能进行且很少或不需对样品作前期处理, 这样就使 AFM 能观察任何活的生命样品及动态过程。AFM 在对生物大分子的特征和操作方面具有独特的优势。但是, AFM 受样品因素限制较大、针尖易磨损 (无法修复) 和污染。

1.3 扫描近场光学显微镜 (SNOM)

SNOM 应用近场光学原理突破了衍射分辨极限, 能够在介观和纳米尺度的材料表面收集光学信息, 是 SPM 家族中的重要成员之一。SNOM 在结构上和 STM、AFM 具有相似性, 一般包括探针、信号采集和处理、探针-样品间距反馈控制、X-Y 扫描以及图像处理几部分组成, 其工作原理如图 3 所示 [13-14]。在 SNOM 中, 一个光纤探针作为光和样品相互作用的收集器。与 AFM 相比, SNOM 探针是悬臂镀膜光纤探针而非金属钨丝探针, 在其末端有一个未被镀膜的次光波的孔径。当探针接近样品表面的时候由四象限探测器接收参考激光在微悬臂探针上产生反射光斑, 并由此确定探针和样品之间的距离进行反馈。探针通常不由光强度信号控制, 而由样品作用于探

针的剪切力控制。当探针与样品表面的距离在次光波长范围内时,所呈图像的空间分辨率约为 20 nm。剪切力调制是一种被证明可保证探针样品间距保持在亚波长范围内的可靠、稳定的非光学调制法。剪切力反馈模式是指在探针尖靠近样品的过程中,由于受到随间距不同而具有不同剪切力的阻碍,使得光纤头的振幅和相位均发生变化。测出探针振幅与相位的变化就可确定探针-样品间距的大小(约为 5~20 nm)。

SNOM 以探测样品表面微小区域内的光学信号作为主要的呈像手段,实现了超过衍射极限的分辨率,保持了光学检测的快速、无损、多种衬度等特点,可以原位、动态地研究许多介观生命体系的各种独特性质。目前,SNOM 在探测单个荧光分子的发光性质最为成功,特别是揭示分子在三维空间里移动或旋转的行为,而这些光

学信息是 STM 和 AFM 所不能提供的。表 1 比较了 STM、AFM 和 SNOM 的基本性能。

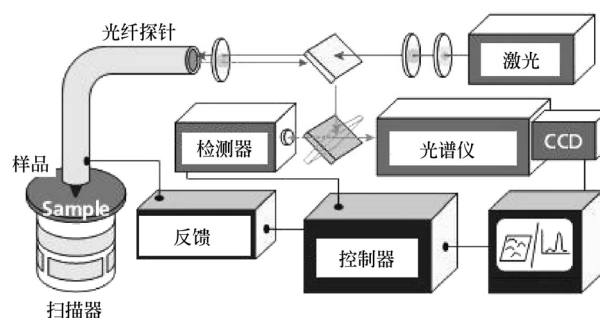


图 3 扫描近场光学显微镜工作示意图

Fig.3 Schematic diagram of scanning near-field optical microscopy (SNOM)

表 1 STM、AFM 和 SNOM 基本性能的比较

Table 1 Comparisons of basic properties for STM, AFM and SNOM

名称	基本原理	分辨率	工作环境	对样品 损坏程度	应用方面				
					形貌观测	物理量测定	操作	加工	蚀刻
STM	隧道效应	1Å(横向), 0.1Å(纵向)	大气、真空、液相、变温	无	是	是	是	是	是
AFM	原子、分子间作用力	约 1Å	大气、真空、液相、变温	无	是	是	是	是	是
SNOM	近场光学	nm 级	大气、真空、液相、变温	无	是	是			

2 碳水化合物的显微观察

碳水化合物的 SPM 呈像已经从整体的淀粉颗粒的 AFM 观察发展到了单个分子的 STM 表征^[15-20]。当然,通过传统光学技术也易清楚地看到淀粉颗粒。由于结构呈像在 x 、 y 和 z 方向上只有几微米的尺寸,所以可能导致因转换器的使用范围限制带来的一些问题。比如, Thomson 等^[17]研究发现某类特殊的淀粉颗粒的厚度超出了转换器 z 轴的范围。因此,必须对样品进行包埋处理,仅使样品部分暴露。Ridout 等^[18]发现 Nanoplast(合成树脂)包埋处理降低了 AFM 图像的对比度,不能观察到淀粉颗粒表面的生长环和单元结构,还可能改变淀粉颗粒内部的结构,使得由透射电镜或 AFM 观察到的结构不真实;而 Aradlite(环氧(类)树脂)包埋技术则提高了图像的对比度,能观察到表面的生长环和超级结构,同时还发现淀粉颗粒内弹性模量的差别可以引起图像对比度的变化,与部分结晶结构相关的结构单元的弹性模量越高,刚性越强,图像对比度将越高。淀粉颗粒内无定型区和结晶区区域的 AFM 图像会有显著差异。因此,AFM 的图像可以与扫描电镜(SEM)和透射电镜(TEM)的图像相互补充。Baldwin 等^[19]将绝干颗粒状小麦和玉米淀粉部分包埋到氰基丙烯酸酯的高聚物膜上,马铃薯和小麦淀粉颗粒的表面在 AFM 图像中具有显著不同的拓扑结构。马铃薯淀粉颗粒在一个较平的表面上有许多突起,而小麦淀粉颗粒的突起则要少得多。但是两者较平滑的表面结构的尺寸均在 10~50 nm 之间。Baker^[21]用 AFM 观察到玉米淀粉颗粒存在辐射型结构形态,中心位置是无规种脐(hilum)区域,周边是环绕的“生长圈”,且

“生长圈”的跨幅在 10~30 nm 间,与淀粉的超螺旋结构直径 18 nm 相近。Nordmark 等^[22]利用 AFM 的轻敲模式得到的高直链玉米淀粉的拓扑图像中淀粉颗粒内部的结晶区和无定型区清晰可辨,但在相移图像中则模糊不清;不过杨氏模量较大的结晶区在相移图像中显得较亮一些。Juszczak 等^[23]用 AFM 非接触式模式观察到玉米淀粉和木薯淀粉的颗粒表面比马铃薯淀粉颗粒要平滑,且后者颗粒表面有高达 1 μm 的突起。Tang 等^[20]将含有 25.5% 直链淀粉的小麦淀粉与含有 30.7% 直链淀粉的玉米淀粉的混合糊转移到 90℃ 的云母片上,在 AFM 下呈现清晰的拓展的网络结构,但将三棕榈酸甘油酯与淀粉糊混合后,AFM 图像呈现聚集结构而非网络结构。

类似的,纤维素的刚性特征也有助于呈现稳定的 AFM 图像,AFM 能够观察到分子水平的绿藻纤维素微纤维结构^[24]。AFM 和 STM 已被用于研究几种纤维素衍生物的结构,比如黏度不同的羟丙基纤维素,结果表明,当羟丙基纤维素水溶液在浓度足够大时观察到了胆甾型液晶相的存在。溶剂水的去除导致了带状结构的形成,这源于应力松弛结果。Fisher 等^[25]研究发现羟丙基纤维素在 AFM 图像中呈带状结构,且在样品的表面的带状结构还呈现三维特征。Tang 等^[26]利用 STM 观察了干燥的羟丙基纤维素中存在微纤维结构。形成分子(如羟丙基纤维素)的液晶稀溶液经过慢速干燥后,能够引取向分子形成“单层筏”(monolayer raft)。这种筏结构说明该纤维适于高分辨率的 STM 的观察,因为邻近的分子提供了分子的稳定性,且单层结构足够薄使得充足的电子能够转移。Fahlén 等^[27]用 AFM 观察了木纤维形成过程中次级壁的交联结构以及化学处理对纤维素聚集体的排列的影响。在

碱液中, 半纤维素有不同程度的损失, 纤维素聚集体大小主要由加热引起纤维素分子重新组合决定。未加工木纤维素聚集体平均侧链长度在 18 nm 左右, 加工后在 23 nm 左右。

在国内外, 将 SPM 用于多糖结构研究的报道较多。黄原胶多糖因其良好的溶液特性广泛用于食品和油回收工业中, Miles 等^[15]和 Wilkins 等^[28]用 STM 观察了未涂层和金属涂层下的黄原胶的纳米结构。金属涂层方法被证实为一种非常可靠的呈像方法, 但不能显示亚分子结构, 这是因为金属涂层颗粒尺寸限制了其分辨率。然而, 与透射电镜(TEM)相比, 对相同的投影样 STM 的分辨率有了极大的改善, 这是因为在 TEM 样品扫描中用于增加对比度的掠射角(glancing angle)投影产生的细粒比在 STM 样品扫描中将金属蒸发到样品表面产生的细粒大。涂层技术也被成功用于植物多糖的宏观结构和单个分子的纳米结构观察。STM 观察到空气干燥的 ι -和 κ -卡拉胶的结构尺寸与 x 衍射观察的大致一致^[29]。Morris 等^[30]用 AFM 研究了植物细胞壁、细胞壁多糖和凝胶的结构, 观察了 κ -角叉胶在水化膜中的分布, 得到了中华马蹄细胞壁、果胶分子、 κ -角叉胶的清晰的结构信息。Gad 等^[31]研究了活的微生物细胞的细胞壁多糖的图像特征, 通过 AFM 针尖的选择利用键-受体对之间的相互作用来推测多糖在活体微生物表面的位置。Round^[32]运用 AFM 测定了未成熟的番茄细胞壁中果胶多糖的结构, 第一次观测到番茄果胶结构中支链的存在, 不同于根据酶水解产物所推断的中性糖的侧链结构。分枝长度在 30~170 nm 之间并呈相对线性。这一工作表明在不均一溶液中, AFM 可以准确地确认出物质的结构, 而且所需样品量极少。Decho^[33]在 AFM 的轻敲模式下观察了藻酸盐聚集体的单个分子和凝胶基质的网络结构, 稀释的非离子型溶液中聚集体分子呈现扭结或方向上突然的右折, 并认为扭结是椅式构象的主链在 α -L-古罗糖(G)和 β -D-甘露糖(M)之间的连接。石磊等^[34]使用 AFM 观察虎眼万年青多糖的微观形貌, 发现其单一多糖 OCA-ba 呈多股紧密并行螺旋形排列。虫草多糖分子链呈分枝结构, 而且互相缠绕, 链之间通过糖单元不同的连接方式衍生出许多大大小小的环^[35]。杨宏顺^[36]用 AFM 分析了在贮藏中黄桃果胶的超微结构及降解机理, 在果胶大分子操纵方面取得了一些有意义的结果, 从果胶分子结构、降解机理到宏观质地变化, 初步揭示了果胶结构和果蔬质地的关系。

3 蛋白质的显微观察

蛋白质大分子是由多条肽链组成, 拥有一级、二级、三级和四级结构。SPM 在表征蛋白质的构象和分子间相互作用力的测量等研究中起着越来越重要的作用^[37]。比如蛋白聚合、组装、生物膜上蛋白的呈像、抗原-抗体识别等。

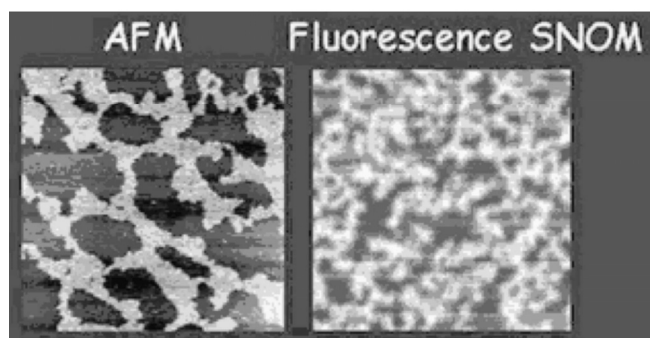
种子贮藏蛋白的 STM 呈像是 SPM 首次用于蛋白研究实例之一。Miles 等^[38]通过对小麦种子贮藏蛋白的 STM 观察, 发现高分子量的亚蛋白(subunit protein)呈现螺旋结构, 与蛋白质的氨基酸序列的 β -螺旋结构相一致,

这种结构对面团的弹性起着非常重要的作用。王志刚等^[39]利用 STM 与 ATM 直接观察到 A β 42 淀粉样蛋白易吸附在石墨台阶等缺陷处, 并纤维化且纤维上有分节现象。Hoppener 等^[40]利用 SNOM 观察到单个膜蛋白联合体生理溶液中单个小颗粒或者其他运载体穿透核膜孔复合体的全过程。Humphris 等^[41]观察到被消除双硫键作用的小麦球蛋白多肽是一些排列整齐的微纤维束状结构, 某些部位肽链上氨基酸在氢键作用下形成交织的网, 每个连接部位的高及宽是不尽相同的。郭云昌等^[42]通过 AFM 观察到玉米醇溶蛋白在纳米层次的结构: 醇溶蛋白以球状颗粒结构存在, 颗粒大小在 50~150 nm 之间。Regnault 等^[43]用 AFM 观察到牛乳中酪蛋白胶束悬浮液经 300 MPa 处理 15 min 后, 酪蛋白胶束的尺寸降到初始值的一半, 这与 TEM 观察结果相一致。Carrion-Vazquez 等^[44]研究了变性剂的化学法和 AFM 施力的机械法对蛋白质伸展的影响, 结果显示 2 种方法所得的结果基本相同(伸展速度常数分别为 10.9×10^{-4} 和 $3.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$)。其他研究者利用 AFM 观察到 β 淀粉样蛋白(A β)从自由盘绕状态向 β 片层和独立晶核聚合状态转变过程中构象的变化^[45]。AFM 呈像图也显示了鲢鱼鱼皮凝胶的纳米结构与其物理特性有一定的关系^[46-47]。

在食品系统中, 蛋白质和脂质分子在界面的复杂的相互作用是形成稳定的空气-水或油-水界面的主要障碍。蛋白质或脂质能够独立形成稳定的界面, 但它们的作用机理是不同的, 也是不兼容的。只有对这一过程的深刻理解才能对这些系统进行合理操控。共焦显微镜由于分辨率的限制而不能看到蛋白质被表面活性剂置换的机理^[48]。布儒斯特角显微镜(BAM)虽然能看到界面上结构泡沫的形成, 但也不能跟踪整个的置换过程^[49]。尽管高分辨率的 AFM 不能观察食品内部的界面, 但通过 Langmuir-Blodgett 技术可以将界面进行模拟并转移到云母底物上, 然后再用 AFM 呈像, 结果表明蛋白质和表面活性剂间的相分离实际上发生在单个界面上, 同时随着表面活性剂的添加表面压力也逐渐增加, 最终使 β -乳球蛋白逐渐被表面活性剂 Tween 20 所置换, 并且在蛋白质网络上产生了很多孔洞。在置换的早期阶段, 较小的表面活性剂需要使用 SNOM 才能观察混合蛋白质表面活性剂膜特征^[50-51]。图 4 比较了 AFM 和 SNOM 牛血清白蛋白-Tween 20 置换图像。SNOM 图像显示被标记的蛋白质可以被定位到 50 nm 的分辨率, 带有不同荧光物质的混合蛋白质膜可用于描绘膜的结构。Sunde 等^[52]在空气-水解界面的 II 型疏水蛋白层呈现重复出现的六边形模式而非小杆状的形态。Gunning 等^[53]研究了牛血清蛋白与 β -酪蛋白在十二烷烃/水和空气/水界面膜图像结构, 分散在十二烷烃/水界面的蛋白膜的 AFM 图像是由许多圆球状物组成的平整的网状结构, 还有海绵状结构, 其孔洞大小与网状结构中圆球状物的大小相似。分析表明圆状球体结构是单个牛血清蛋白分子, 界面膜的二维网状结构是由独立的蛋白质分子组成的。

扫描探针显微技术在蛋白质折叠研究也发挥了重要的作用。Oberhauser 等^[54]用 AFM 以实时呈像的方式观察

了在溶液状态下蛋白质的折叠。后来研究发现,与激光光镊技术(LOTs)研究 RNA 的折叠相比,AFM 研究蛋白质的折叠存在 2 个方面的困难或不足^[55]: 1) AFM 探针的硬度较高(是 LOTs 的 100 倍),极大增加了作用力的热波动,致使难以有效控制重折叠过程中作用力大小; 2) 由于探针与底物间的非专一性相互作用,使 AFM 在清楚地识别单个分子方面存在一定的困难。目前,许多研究团队为改善此缺陷付出了巨大的努力,并取得了一定的成果^[14]。



注: 图像大小 $5.0\ \mu\text{m} \times 5.0\ \mu\text{m}$ 。在 AFM 图像中, 对比度由蛋白质膜的厚度决定, 在 SNOM 图像中, 对比度由发生的荧光决定

图 4 AFM 和 SNOM 下牛血清白蛋白(BSA)-Tween 20 的置换图像

Fig.4 Comparative studies of the displacement between bovine serum albumin (BSA) and Tween 20 at air-water interface obtained by AFM and SNOM

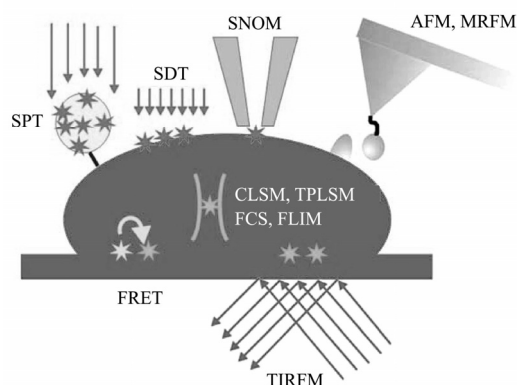
4 脂质的显微观察

SPM 是一种高分辨率的无损检测技术, 能够对脂质的表面形态进行定性测量, 实时研究脂质的表面纳米结构, 直接测量在纳米水平的物理特性, 且能够描绘在云母底物上的脂质膜的脱水和复水的图像以及优化膜沉淀比如脂质浓缩的关键参数^[56]。

Shibata-Seki 等^[57]用 AFM 测得了在溶液环境下底物上的脂质体, 呈气球状, 直径约为 $200 \sim 300\ \text{nm}$, 这一结果基本上与光散射显微镜测得的结果一致(平均直径为 $180\ \text{nm}$)。Dufrêne 等^[58]回顾了 AFM 观察支撑脂质膜的分子结构、在水环境中的脂质双层膜和在空气中单层或多层膜的结构、结构缺陷的形成、外部试剂(溶剂、离子、酶和抗菌剂)对膜结构的影响以及支撑脂质膜的形成, 主要讨论了分离相单分子膜的形状和分子构向、由不同脂质混合构成的膜以及由脂质与其他生物分子比如糖脂类、脂肽和蛋白质构成的膜的组织特征。Horicuchi 等^[59]用 SNOM 和 AFM 观察了被荧光标记的磷脂单层膜的形貌特征、摩擦、荧光特性和表面势的分布情况。Shiku 和 Dunn^[60]用高分辨率的 SNOM 展示涂有荧光染料的二棕榈酰磷脂酰胆碱磷脂膜单分子层的共存相中有明显的条纹存在。利用 SNOM 对细胞膜表面的蛋白分子, 脂质分子或拟脂质膜中的分子定位、标记或感染了其他分子或病毒的研究为研究者所关注^[61]。

测量质膜中总的脂质和蛋白质的流动性及其相互作

用是理解它们在细胞功能性中的复杂作用的关键。监控单个分子的结构是理解脂质和蛋白质在不同的复杂环境中发挥其作用的基础, 图 5 显示了观察细胞膜的高灵敏和高分辨率的呈像技术^[62]。



注: SNOM: 扫描近场显微镜; AFM: 原子力显微镜; MRFM: 分子识别力显微镜; SPT: 单粒子追踪术; SDT: 单染色示踪术; CLSM: 共聚焦扫描显微镜; TPLSM: 双光子激光扫描显微镜; FRET: 荧光共振能量转移技术; FLIM: 荧光寿命显微像分析; FCS: 荧光相关光谱; TIRFM: 全内反射荧光显微镜

图 5 高灵敏度高分辨率的细胞膜的呈像方法

Fig.5 Overview of ultra-sensitive and ultra-resolution imaging methods for cell membranes

5 结 语

食品品质与其感官(形状、大小和色泽)和力学(质地)特性有关, 这些特性取决于食品组成成分的分子结构以及食品的微观和宏观结构。尤其, 食品的组成成分(碳水化合物、蛋白质和脂肪)的超微结构和相互作用决定了食品的质地。鉴于食品微观结构是由组成成分的本质特性和加工决定, 因而食品加工可以看作是从食品组成成分获得理想微观结构的一种方式。为此对食品微观结构的了解必须先于对品质的调控。SPM 的主要优势在于能够在各种环境中工作、产生高分辨率的图像且对样品无损坏, 这对食品大分子的纳米结构的观察和操作以及对样品的生物化学过程的实时跟踪提供了可能。

目前, 为了呈像生物结构, 一系列新技术被开发。由于无法在非导体上操作, STM 目前主要用于基础性学术研究。对软样品而言, AFM 的非接触和轻敲模式是非常重要的。SNOM 的力调制呈像模式在确定样品的局部模量方面有广泛的应用。力敏感性和扫描速率的不断加将提高更多的便利, 尤其是对大的软性样品(比如细胞等)结构观察。AFM 有独特的优势, 但仍存在不足, 比如无法观察细胞、细胞器内部形态, 因此在实际研究过程中, 可将 AFM 与其他仪器设备如透射电镜、激光共聚焦显微镜、核磁共振、X 射线晶体衍射等结合应用, 以期获得更为全面、真实的结果。作为 SPM 技术之一的 SNOM 在食品大分子的研究有着巨大的潜力。SNOM 兼具有 AFM 和共聚焦显微镜的优点, 可同时获得样品的形貌像和光学像, 这样可对得到的结果进行对比分析。与 AFM 相比, SNOM 还具有很多缺陷, 针尖的空间分辨率与光通量的矛盾就是不易解决的, 如果要

利用 SNOM 对生物大分子进行操作则难度就更大。为了填补 SNOM 拓扑像分辨率的缺陷, 人们常把 SNOM 与 AFM 结合起来使用。本质上讲, SNOM 有与传统的远场光学显微镜相同的作用, 不同的在于 SNOM 有次波长的分辨率。SNOM 为生物系统的荧光或近红外光谱成像提高了更多的机会。

总之, SPM 以其独特的优越性成为表征食品大分子物质纳米结构, 阐明大分子结构和功能关系的新工具。随着技术的不断完善, 在提高样品的成像分辨率、实现生化反应动态过程中大分子的实时识别等方面将会得到更大的发展。另一方面 SPM 技术的发展与其他技术的联用将进一步提高对食品大分子物质纳米结构研究的综合能力。这对食品工业中新产品的开发、食品配方和加工工艺的优化等提供坚实的理论指导。

[参 考 文 献]

- [1] Aguilera J M. Microstructure and food product engineering [J]. Food Technology, 2000, 54(11): 56—65.
- [2] 邓云, 吴颖, 杨铭铎, 等. 煎炸油中产生的极性成分对食品微观结构和质构的影响[J]. 农业工程学报, 2004, 20(6): 160—164.
Deng Yun, Wu Ying, Yang Mingduo, et al. Effects of polar components in frying oil on microstructure and texture of fried food[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2004, 20(6): 160—164. (in Chinese with English Abstract)
- [3] Deng Y, Zhao Y. Effect of pulsed vacuum and ultrasound osmopretreatments on glass transition temperature, texture, microstructure and calcium penetration of dried apples (Fuji)[J]. WT-Food Science and Technology, 2008, 41(9): 1575—1585.
- [4] Deng Y, Zhao Y. Texture, microstructure and calcium distribution in fresh-cut apples associated with vacuum impregnation[Z]. Chicago: 2007 IFT, 2007.
- [5] 张涛, 江波, 沐万孟. 纳米技术及其在食品中的应用研究进展[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(23): 7078—7079.
Zhang Tao, Jiang Bo, Mu Wanmeng. Research advance of nanotechnology and its application in food[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2007, 35(23): 7078—7079. (In Chinese with English Abstract)
- [6] Weiss J, Takhistov P, McClements D J. Functional materials in food nanotechnology[J]. Journal of Food Science, 2006, 71(9): R106—R116.
- [7] Miles M J, McMaster T J. Protein assemblies and single molecules imaged by STM, in STM and SFM in Biology (Marti O and Amrein M, eds)[M]. San Diego: Academic Press, 1993: 177—204.
- [8] 王锐, 李道火, 黄永攀, 等. 扫描探针显微技术及其在纳米科技中的应用[J]. 激光与光电子学进展, 2003, 40(9): 49—52.
Wang Rui, Li Daohuo, Huang Yongpan, et al. Application of scanning probe microscopy in nano technology[J]. Laser and Optoelectronics Progress, 2003, 40(9): 49—52. (in Chinese with English Abstract)
- [9] Binnig G, Rohrer H. Scanning tunneling microscopy[J]. Helvetica Physica Acta, 1982, 55(6): 726—735.
- [10] 詹捷, 冯晓娟, 唐志良, 等. 扫描隧道显微镜系统[J]. 重庆大学学报: 自然科学版, 2001, 24(3): 137—144.
Zhan Jie, Feng Xiaojuan, Tang Zhiliang, et al. System of scanning tunneling microscope[J]. Journal of Chongqing University: Natural Science Edition, 2001, 24(3): 137—144. (in Chinese with English Abstract)
- [11] Binnig G, Quate C F, Gerber C. Atomic force microscopy[J]. Helvetica Physica Acta, 1986, 56(9): 930—933.
- [12] 朱杰, 孙润广. 原子力显微镜的基本原理及其方法学研究[J]. 生命科学仪器, 2005, 3(1): 22—26.
Zhu Jie, Sun Runguang. Introduction to atomic force microscope and its manipulation[J]. Life Science Instruments, 2005, 3(1): 22—26. (in Chinese with English Abstract)
- [13] Betzig E, Trautmann J K. Near-field optics-microscopy, spectroscopy, and surface modification beyond the diffraction limit[J]. Science, 1992, 257(5067): 189—265.
- [14] Saiki T, Narita Y. Nano-optical imaging spectroscopy: recent advances in scanning near field optical microscopy[J]. JASP International, 2002, 5: 22—29.
- [15] Miles M J, Lee I, Atkins E D T. Molecular resolution of polysaccharides by scanning tunneling microscopy[J]. Journal of Vacuum Science & Technology, 1991, 9(2): 1206—1209.
- [16] Miles M J, McMaster T J, Carr H J, et al. Scanning tunnelling microscopy of biomolecules[J]. Journal of Vacuum Science & Technology, 1990, 8(1): 698—702.
- [17] Thomson N H, Miles M J, Ring S G, et al. Real-time imaging of enzymic degradation of starch granules by atomic force microscopy[J]. Journal of Vacuum Science & Technology, 1994, 12(2): 1565—1568.
- [18] Ridout M J, Gunning A P, Parker M L, et al. Using AFM to image the internal structure of starch granules[J]. Carbohydrate Polymers, 2002, 50(2): 123—132.
- [19] Baldwin P M, Adler J, Davies M C, et al. High resolution imaging of starch Granule surfaces by atomic force microscopy[J]. Journal of Cereal Science, 1998, 27(3): 255—265.
- [20] Tang M C, Copeland L. Investigation of starch etrogradation using atomic force microscopy[J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 70(1) : 1—7.
- [21] Baker A A, Miles M J, Helbert W. Internal structure of starch granule revealed by AFM[J]. Carbohydrate Research, 2001, 330(2): 249—256.
- [22] Nordmark T S, Ziegler G R. Structural features of non-granular spherulitic maize starch[J]. Carbohydrate Research, 2002, 37(16): 1467—1475.
- [23] Juszczak L, Fortuna T, Krok F. Non contact atomic force microscopy of starch granules, Part II: potato and tapioca starches[J]. Starch, 2003, 55(1): 8—18.
- [24] Hanley S J, Giasson J, Revol J F, et al. Atomic force microscopy of cellulose microfibrils-comparison with transmission electron-microscopy[J]. Polymer, 1992, 33(21): 4639—4642.
- [25] Fisher H, Miles M J, Odell J A. Atomic force microscopy of the banded structure of lyotropic polymers[J].

- Macromolecular Chemistry and Physics Rapid Communications, 1994, 15(11): 815–821.
- [26] Tang S L, McGhie A J, Suna A. Molecular-resolution imaging of insulating macromolecules with the scanning tunneling microscope via a non-tunnelling, electric-field induced mechanism[J]. Physical Review, 1993, 47(2): 3850–3856.
- [27] Fahlén J, Salmén L. Cross-sectional structure of the secondary wall of wood fibers as affected by processing[J]. Journal of Materials Science, 2003, 38(1): 119–126.
- [28] Wilkins M J, Davies M C, Jackson D E, et al. Comparison of scanning tunneling microscopy and transmission electron microscopy image data of a microbial polysaccharide[J]. Ultramicroscopy, 1993, 48(1/2): 197–201.
- [29] Lee I, Atkins E D, Miles M J. Visualization of the algal polysaccharide carrageenan by scanning tunneling microscopy[J]. Ultramicroscopy, 1992, 42/43/44: 1107–1112.
- [30] Morris V J, Gunning A R, Kirby A R, et al. Atomic force microscopy of plant cell walls, plant cell wall polysaccharides and gels[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 1997, 21(1-2): 61–66.
- [31] Gad M, Itoh A, Ikai A. Mapping cell wall polysaccharides of living microbial cells using atomic force microscopy[J]. Cell Biology International, 1997, 21(11): 697–706.
- [32] Round A N, Macdougall A J, Ring S G, et al. Unexpected branching in pectin observed by atomic force microscopy[J]. Carbohydrate Research, 1997, 303(3): 251–253.
- [33] Decho A W. Imaging an alginate polymer gel matrix using atomic force microscopy[J]. Carbohydrate Research, 1999, 315(3/4): 330–333.
- [34] 石磊, 王勇, 石勇, 等. 虎眼万年青多糖的原子力显微镜观察[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2003, 29(1): 32–34. Shi Lei, Wang Yong, Shi Yong, et al. Observation of polysaccharide from ornithogalum caudatum ait. under atomic force microscope[J]. Journal of Jilin University: Medicine Edition, 2003, 29(1): 32–34. (in Chinese with English Abstract)
- [35] 王秀艳, 董丽松. 原子力显微镜在多糖结构研究中的进展[J]. 高分子通报, 2004, (1): 50–56. Wang Xiuyan, Dong Lisong. Advances in study on the structure of polysaccharide by atomic force microscopy[J]. Chinese Polymer Bulletin, 2004, (1): 50–56. (In Chinese with English Abstract)
- [36] 杨宏顺. 果蔬气调冷藏下表皮和果胶超微结构与品质变化[D]. 上海: 上海交通大学, 2005. Yang Hongshun. Effects of Controlled Atmosphere on Epidermic and Pectic Ultrastructure and Quality of Postharvest Fruits and Vegetables[D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2005. (in Chinese with English Abstract)
- [37] Horber J K H, Miles M J. Scanning probe evolution in biology[J]. Science, 2003, 302(5647): 1002–1005.
- [38] Miles M J, Carr H J, McMaster T J, et al. Scanning tunneling microscopy of wheat seed storage protein reveals details of an unusual supersecondary[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(1): 68–71.
- [39] 王志刚, 万立骏, 周纯青, 等. β -淀粉样蛋白在石墨表面吸附及凝聚结构的 STM 和 AFM 研究[J]. 科学通报, 2002, 47(12): 908–911. Wang Zhigang, Wan Lijun, Zhou Chunqing, et al. Study of β -amyloid adsorption and aggregation on graphite by STM and AFM[J]. Chinese Science Bulletin, 2002, 47(12): 908–911. (in Chinese with English Abstract)
- [40] Hoppener C, Siebrasse J P, Peters R, et al. High-resolution near field optical imaging of single nuclear pore complexes under physiological conditions[J]. Biophysical Journal, 2005, 88(5): 3681–3688.
- [41] Humphris A D L, McMaster T J, Miles M J, et al. Atomic force microscopy study of interactions of HMW subunits of wheat glutenin[J]. Cereal Chemistry, 2000, 77(2): 107–110.
- [42] 郭云昌, 刘钟栋, 安宏杰, 等. 基于 AFM 的玉米醇溶蛋白的纳米结构研究[J]. 郑州工程学院学报, 2004, 25(4): 9–11. Guo Yunchang, Liu Zhongdong, An Hongjie, et al. Study on nanostructure of maize zein by AFM[J]. Journal of Zhengzhou Institute of Technology, 2004, 25(4): 9–11. (in Chinese with English Abstract)
- [43] Regnault S, Thiebaud M, Dumay E, et al. Pressurisation of raw skim milk and of a dispersion of phosphocaseinate at 9°C or 20°C: Effects on casein micelle size distribution[J]. International Dairy Journal, 2004, 14(1): 55–68.
- [44] Carrion-Vazquez M, Oberhauser A F, Fowler S B. Mechanical and chemical unfolding of a single protein: a comparison[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(7): 3694–3699.
- [45] 何昆, 张德添, 张学敏, 等. 原子力显微镜在生物医学中的应用[J]. 军事医学科学院院刊, 2002, 26(2): 139–143. He Kun, Zhang Detian, Zhang Xuemin, et al. Application of atomic force microscope to biomedicine[J]. Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences, 2002, 26(2): 139–143. (in Chinese with English Abstract)
- [46] Yang H S, Wang Y F, Zhou P, et al. Effects of alkaline and acid pretreatment on the physical properties and nanostructures of the gelatin from channel catfish skins[J]. Food Hydrocolloids, 2008, 22(8): 1541–1550.
- [47] Wang Y F, Yang H S, Regenstein J M. Characterization of fish gelatin at nanoscale using atomic force microscopy[J]. Food Biophysics, 2008, 3(2): 269–272.
- [48] Heertje I, Nederlof J, Hendrickx H A C M, et al. The observation of the displacement of emulsifiers by confocal scanning laser microscopy[J]. Food Structure, 1990, 9(4): 305–316.
- [49] Patino J M R, Sanchez C C, Nino M R R. Analysis of β -casein-monopalmitin mixed films at the air–water interface[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1999, 47(12): 4998–5008.
- [50] Gunning A P, Mackie A R, Kirby A R, et al. Scanning near-field optical microscopy of phase separated regions in a mixed interfacial protein (BSA) surfactant (Tween 20) film[J]. Langmuir, 2001, 17(6): 2013–2018.
- [51] Morris V J. Probing molecular interactions in foods[J]. Trends in Food Science & Technology, 2004, 15(6): 291

- 297.
- [52] Sunde M, Kwan A, Matthews J, et al. Structural analysis of hydrophobins[J]. *Micron*, 2008, 39(7): 773—784.
- [53] Gunning A P, Wilde P J, Clark D C, et al. Atomic force microscopy of interfacial protein film[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1996, 183(20): 600—602.
- [54] Oberhauser A F, Marszalek P E, Carrion-Vazquez M, et al. Single protein misfolding events captured by atomic force microscopy[J]. *Nature Structural Biology*, 1999, 6(11): 1025—1028.
- [55] Ritort F. Single-molecule experiments in biological physics: methods and applications[J]. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 2006, 18(32): R531—R583.
- [56] Pompeo G, Girasole M, Cricenti A, et al. AFM characterization of solid-supported lipid multilayers prepared by spin-coating[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 1712(1): 29—36.
- [57] Shibata-Seki T, Masai J, Tagawa T, et al. In-situ atomic force microscopy study of lipid vesicles adsorbed on a Substrate[J]. *Thin Solid Films*, 1996, 273(1/2): 297—303.
- [58] Dufrêne Y F, Lee G U. Advances in the characterization of supported lipid films with the atomic force microscope[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1509(1/2): 14—41.
- [59] Horiuchi Y, Yagi K, Hosokawa T, et al. Imaging of various surface properties of fluorescently labelled phospholipid Langmuir-Blodgett films with a combined scanning probe microscope[J]. *Journal of Microscopy*, 1999, 194(2/3): 467—471.
- [60] Shiku H, Dunn R C. Domain formation in thin lipid films probed with near-field scanning optical microscopy[J]. *Journal of Microscopy*, 1999, 194(2/3): 455—460.
- [61] Hollars C W, Dunn R C. Submicron fluorescence, topology, and compliance measurements of phase-separated lipid mono-layers using tapping-mode near-field scanning optical microscopy[J]. *Journal of Physical Chemistry*, 1997, 101(33): 6313—6317.
- [62] Vigh L, Escibó P V, Sonnleitner A, et al. The significance of lipid composition for membrane activity: New concepts and ways of assessing function[J]. *Progress in Lipid Research*, 2005, 44(5): 303—344.

Application of scanning probe microscopes to nanostructures of biomacromolecules in food systems

Deng Yun^{1,2}, Xiao Chenlong², Zhu Liwei², Luo Wen²

(1. *SJTU-Bor Luh Food Safety Center, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;*

2. *School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)*

Abstract: The principles, advantages and disadvantages of scanning tunnel microscope (STM), atomic force microscopy (AFM) and scanning near-field optical microscope (SNOM) were introduced and compared. The current applications of STM, AFM and SNOM to imaging and manipulating nanostructure of biomacromolecules, such as polysaccharides, starch, proteins and lipids were focused in food systems. These show that STM, AFM and SNOM provide a basis for examining the macromolecular structure of foods under different conditions, and that they have a great potential prospect in the mapping of structure of food system.

Key words: food products, nanostructures, scanning probe microscopy, applications, biomacromolecule