

娃哈哈®



食品微结构研究

在功能性饮料开发中的应用

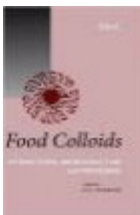
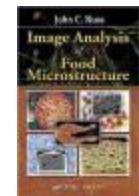
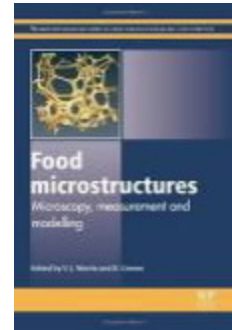
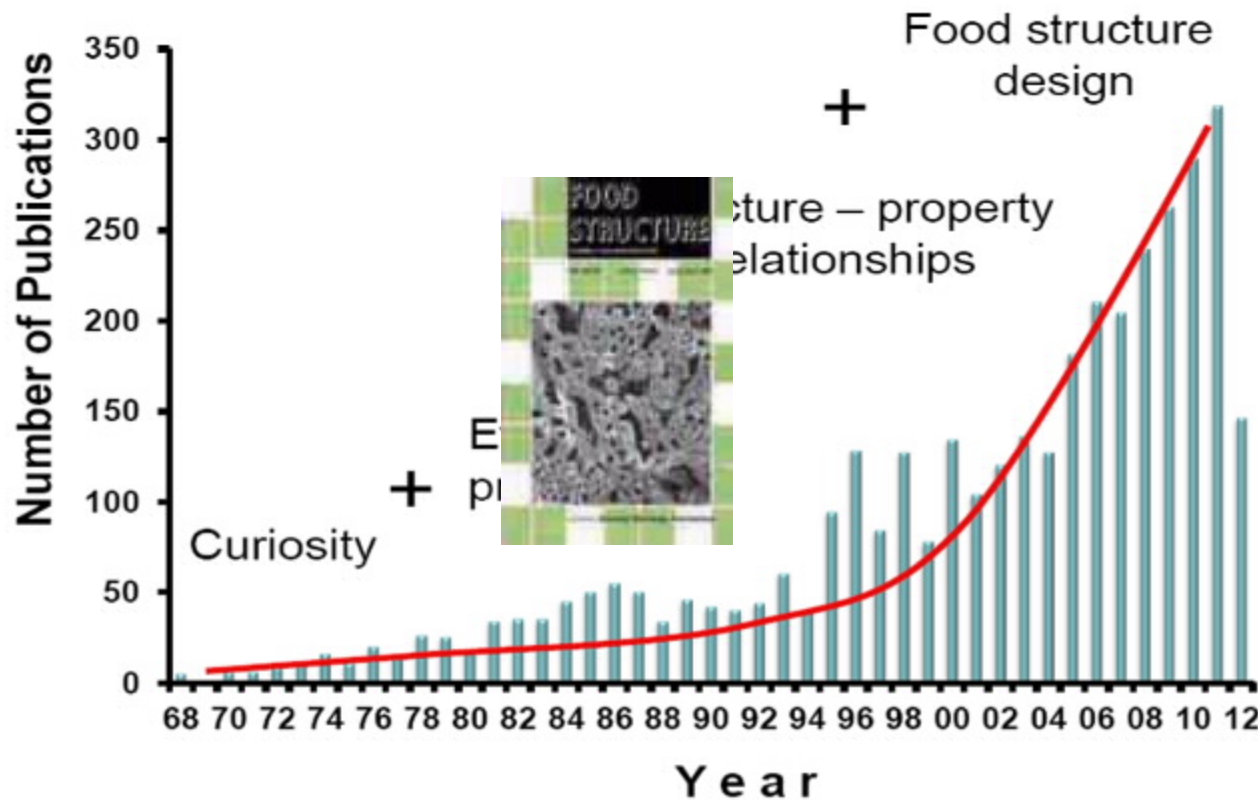
金世合

杭州娃哈哈研究院

内容介绍

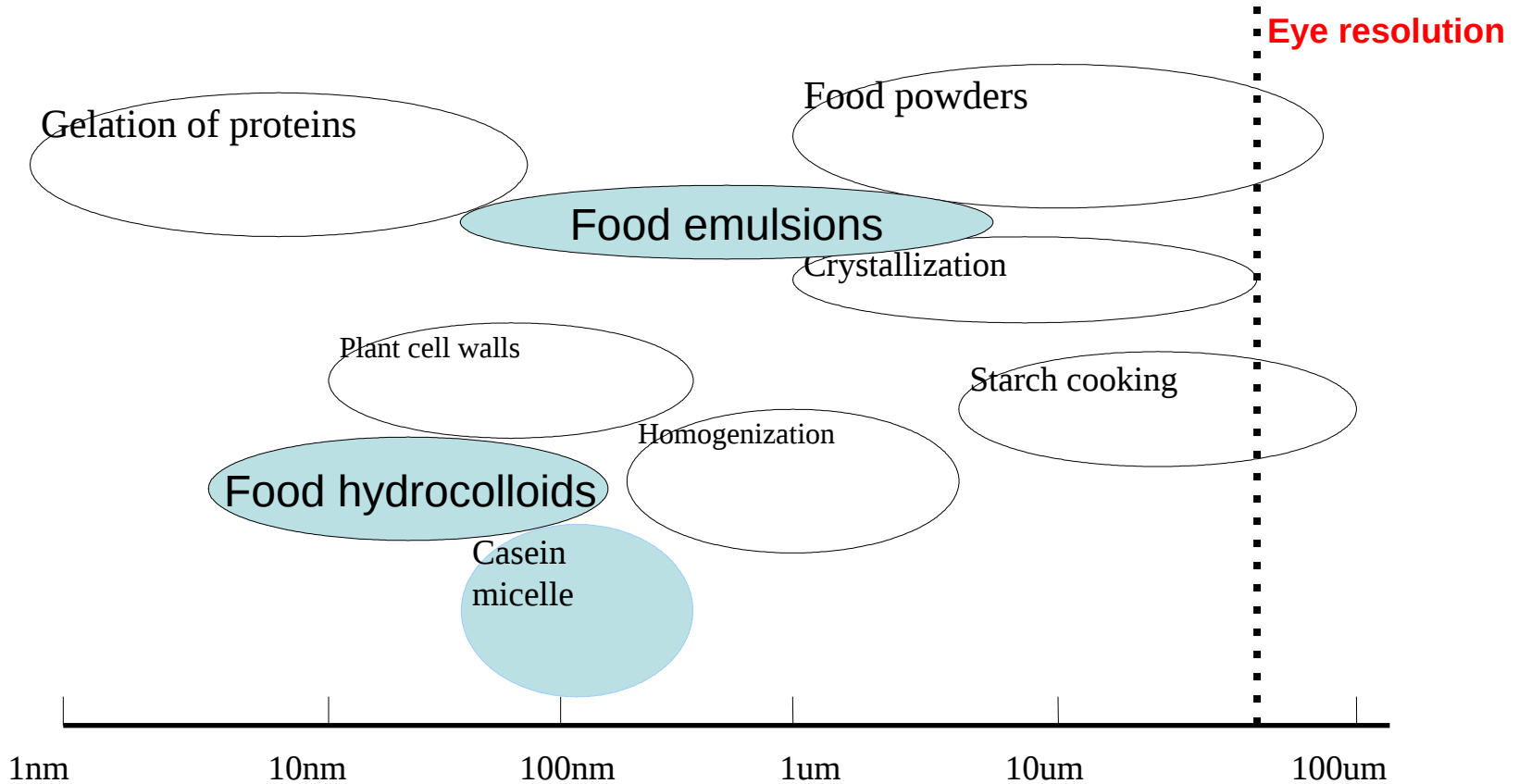
- 食品微结构研究概况
- 食品微结构研究的内容与手段
- 食品微结构研究在乳酸菌饮料的应用
- 食品微结构研究在发酵果蔬汁饮料的应用

食品工程正在进入显微结构时代！



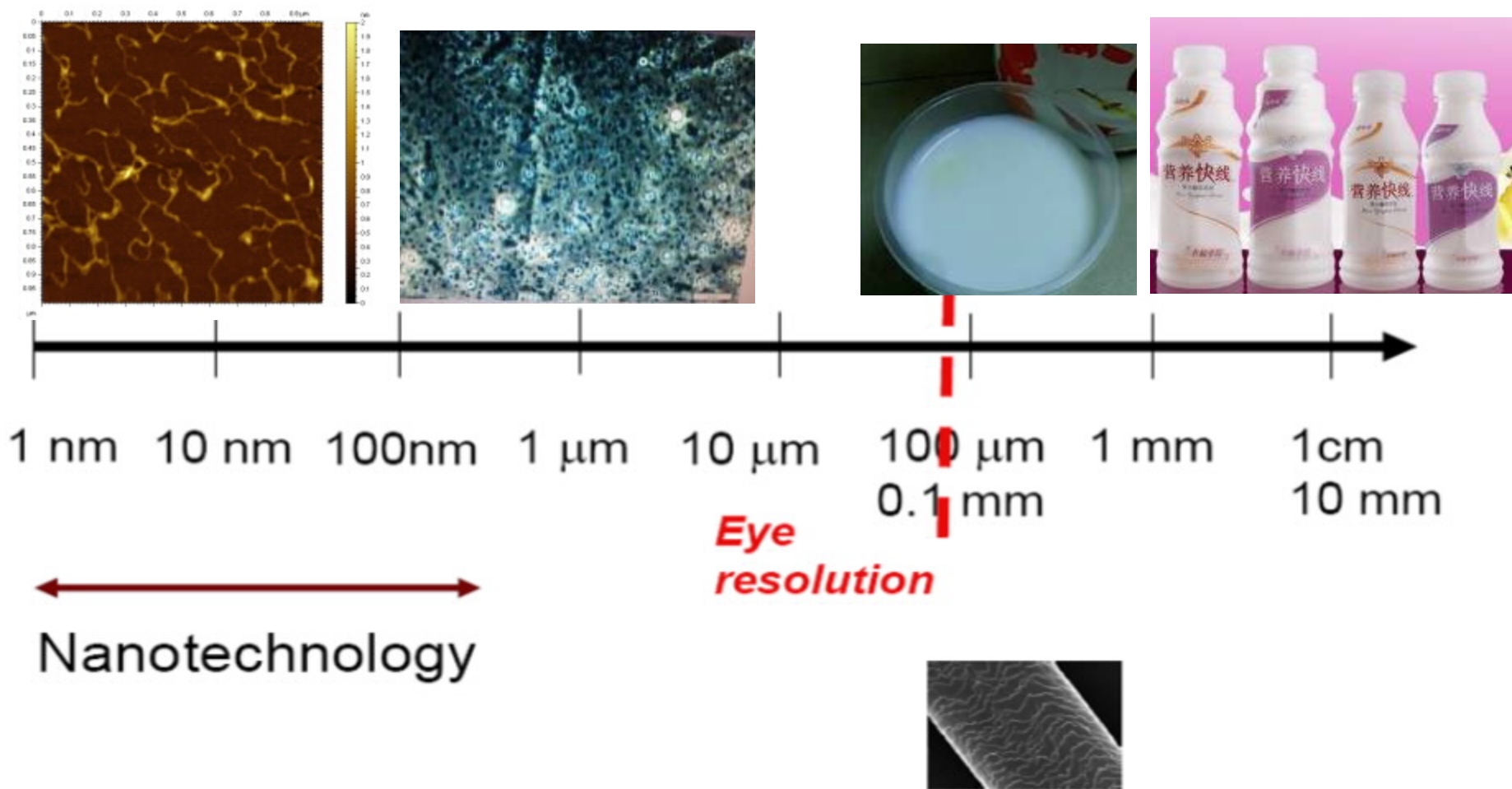
Food Microstructure: *the way in which elements are arranged in foods at the micro-level, their interactions and relation to properties.* --José Miguel Aguilera

为什么要研究食品微结构？



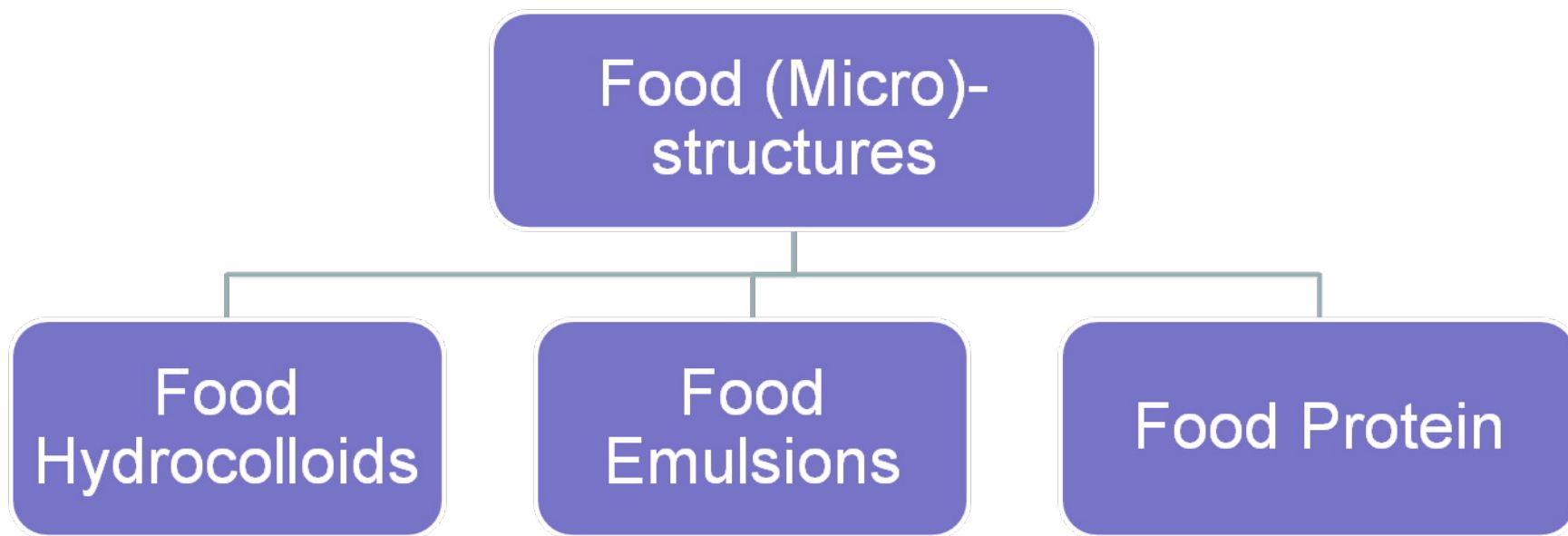
Scale of food processes and elements in the microstructure

乳饮料在不同尺度的结构情况

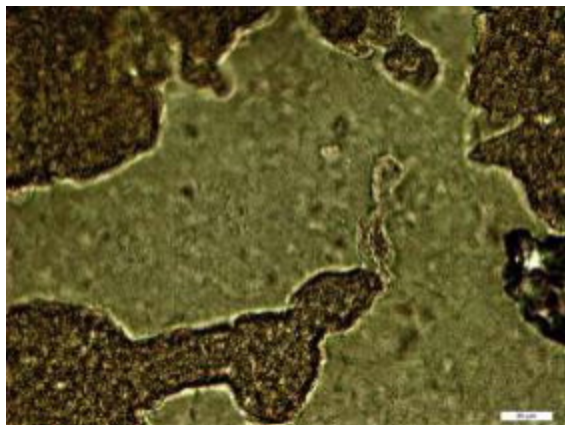


由于乳饮料等是一个高度均一的体系1 μ L结构情况能代表1L样品，非常合适开展食品微结构研究

食品微结构研究的主要对象 (饮料等为例)



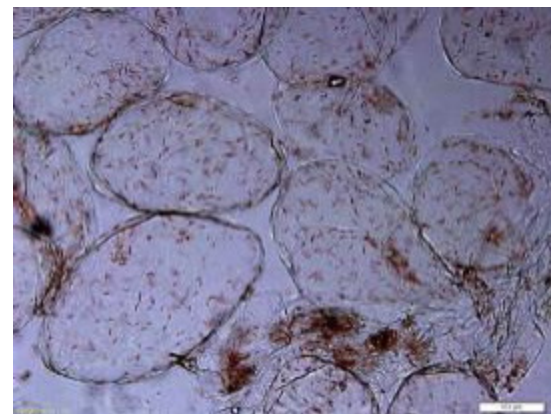
食品中各种不同的显微结构情况



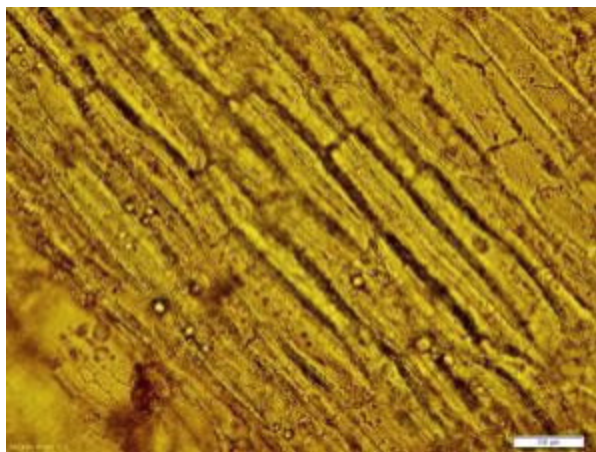
cheese



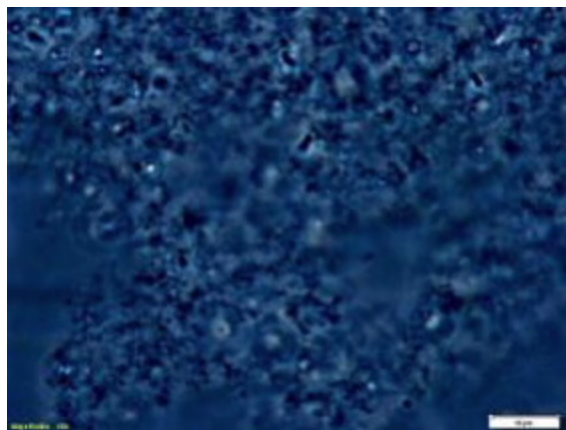
LAB drink



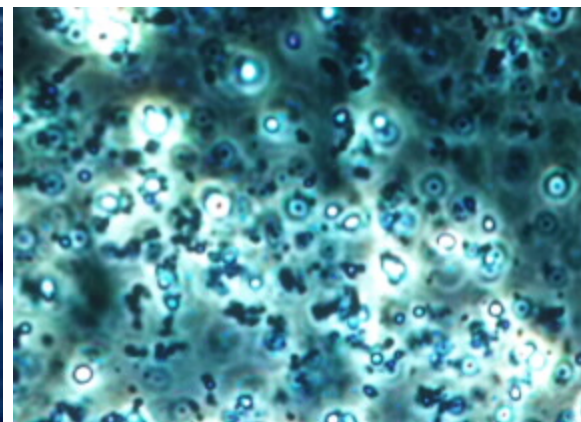
Fruit cell



Oat meal 燕麦片



Yogurt



Acidic milk drink

食品（微）结构研究常用设备情况

仪器主要分为显微放大设备，光散射设备和流变测量设备：

- Light microscopes (in different forms) 光学显微镜
 - CLSM（激光共聚焦显微镜）
- Electron microscopes: 电子显微镜
 - TEM（透射电镜）
 - SEM（扫描电镜）
- Atomic force microscopes (AFM)原子力显微镜
- Dynamic light scattering（DLS&SLS）动静态光散射仪
- Diffusing wave spectroscopy(DWS)扩散波谱仪
- Fourier Transform infrared spectroscopy(FTIR)（傅里叶红外光谱仪）
- Rheometer 流变仪
- texture analyzer和质构仪
- High speed centrifuger高速离心机

食品微结构研究方向设备情况



显微红外光谱
仪FTIR



流变仪



动态光散射仪DLS

食品微结构研究中 心Food Microstructure center



荧光显微镜



Olympus BX63光
学显微镜



差示扫描量热仪DSC



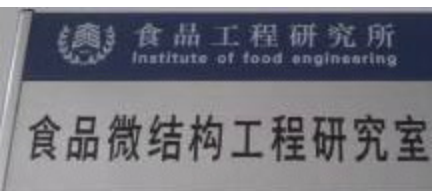
粒度测试仪



高速离心机

食品微结构研究方向

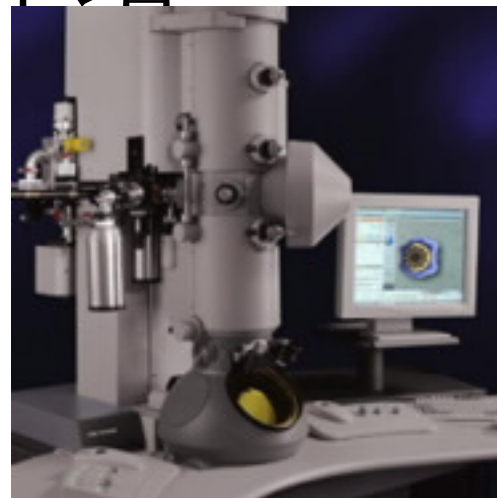
合作单位设备介绍



扫描电镜SEM



原子力显微镜AFM



透射电镜TEM



激光共聚焦显微镜CLSM



动静态光散射仪DLS



扩散波波谱仪DWS

食品微结构研究目前的主要课题

- 在申报的项目

微纳米纤维项目

国家自然科学基金 合作单位：华南理工大学

乳饮料中蛋白质与多糖之间相互作用项目

杭州市科技局项目 合作单位：浙江工商大学

在接洽的合作单位：南京大学

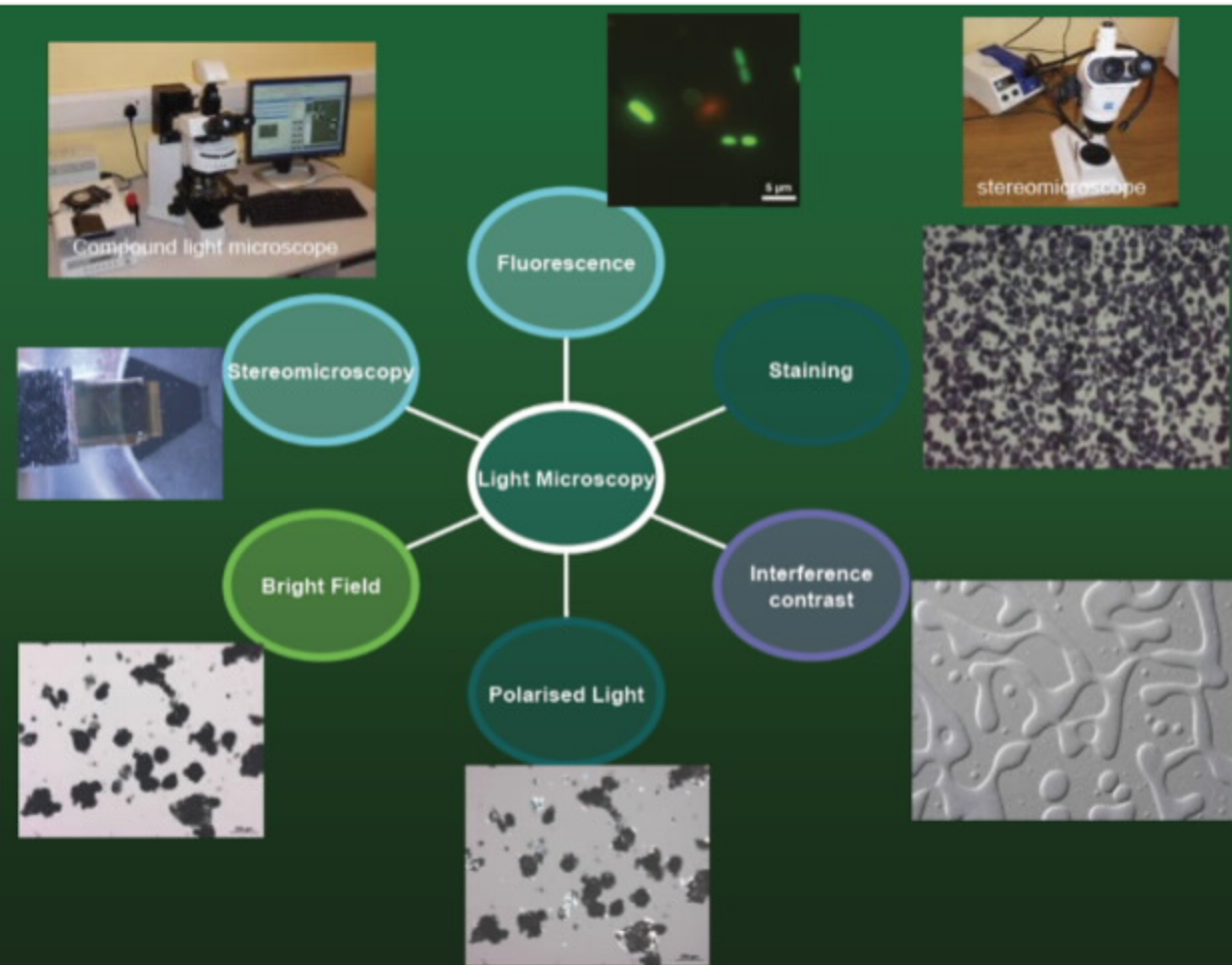
江南大学

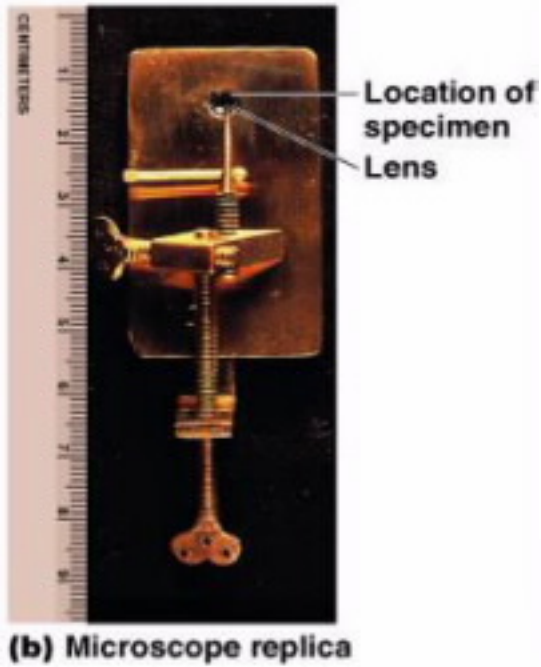
浙江大学电镜中心

光学显微镜的不同观察方式介绍

研究级的光学显微镜是食品微结构研究最重要的工具之一，主要的观察方法有以下几种：

明场观察方式，
暗场观察方式，
相差观察方式，
偏光观察方式，
荧光观察方式，
微分干涉观察方式，
激光共聚焦观察方式





光学显微镜

主要性能参数

分辨率、

放大率、

焦点深度、

和视场宽度等。

其中最重要的是分辨率。



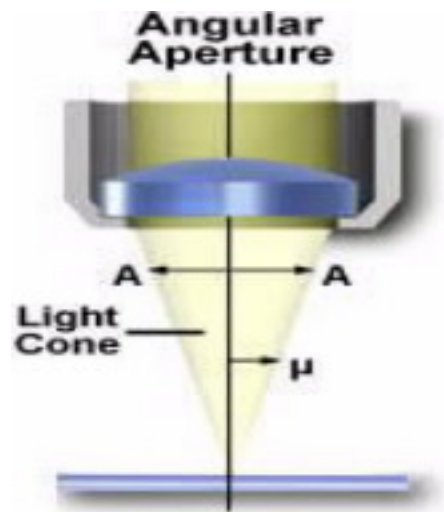
1. 数值孔径 (Numerical Aperture, NA)

也叫“镜口率”，简称NA值或A值。表示接物镜与被检样品之间介质的折射率（ n ）和孔径角半数的正弦乘积。

$$NA = n \cdot \sin \mu$$

很明显，折射率为达到大于1.0的数值孔径的限制因素。因此，为了获得更高的工作数值孔径的目标前面的镜头和试样之间的介质的折射率必须增加。显微镜现在的物镜是，使成像在另类媒体诸如水（折射率=1.33），甘油（折射率= 1.47），和浸油（折射率=1.51）。

最高的理论数值孔径获得的浸油是**1.51**（当 $\sin(\mu) = 1$ ）。然而，在实践中，大多数油浸物镜有一个最大的数值孔径为**1.4**，最常见的取值范围从1.0到1.35的数值孔径。



2. 分辨率 (Resolution)

显微镜的分辨率是指能被显微镜清晰区分的两个物点的最小间距

侧向分辨率: $dx, y = 0.61 \lambda / NA$; 轴向分辨率: $dz = 2 \lambda / NA^2$

λ 表示光的波长, NA是透镜的数值孔径, $NA = n \sin u/2$ 。n是透镜和样品之间的介质折射率, u是孔径角。这种限制就是光衍射极限, 是改进分辨率的起点;

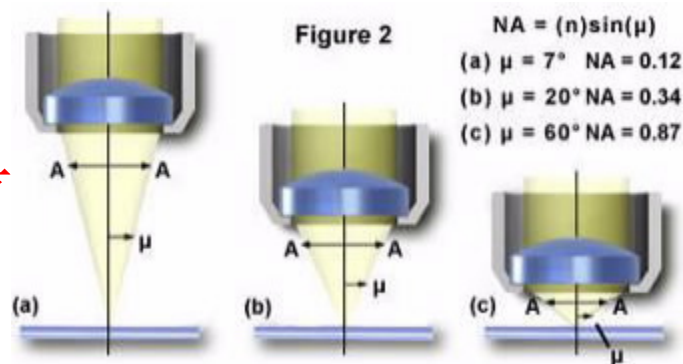
x、y向分辨率极限200nm, Z向分辨率极限500nm。

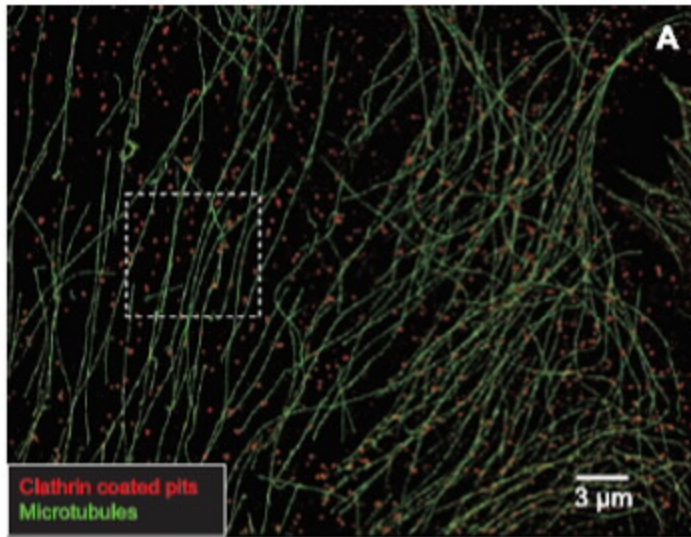
人眼的分辨率是 $100 \mu m$

研究级光学显微镜的最小分辨距离是 $0.2 \mu m$ CLSM是 $0.16 \mu m$

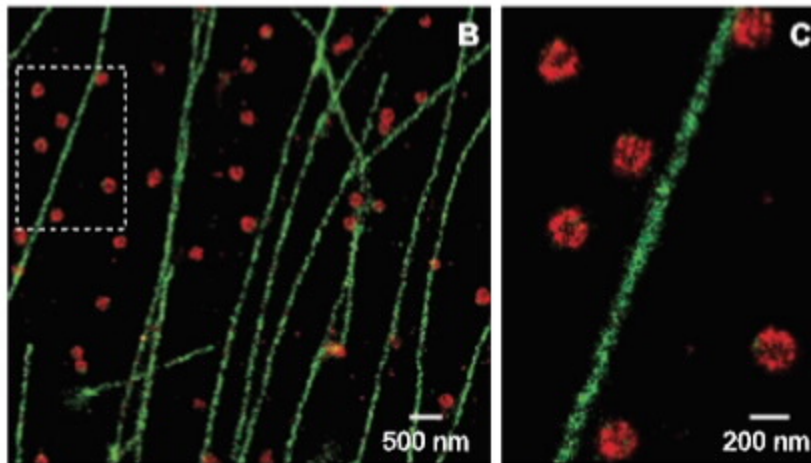
普通光学显微镜能清晰看到的最小物体 (光学显微镜的分辨率) 大约 $0.5 \mu m$ 大小的颗粒物。要提高分辨率, 即减小 σ 值, 可采取以下措施

- (1) 降低波长 λ 值, 使用短波长光源。可见光波长最小为380nm
- (2) 增大介质n值以提高NA值 ($NA = 2n \sin \mu$)。油镜采用的香柏油的折射率 (n) 为1.51和玻璃接近
- (3) 增大孔径角u值以提高NA值。
- (4) 增加明暗反差, 也是提高清晰度的一项有





随着显微技术的进步，目前超分辨的光学显微镜也出现了

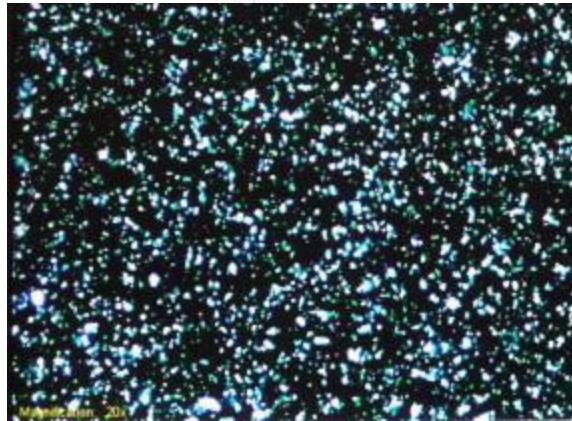
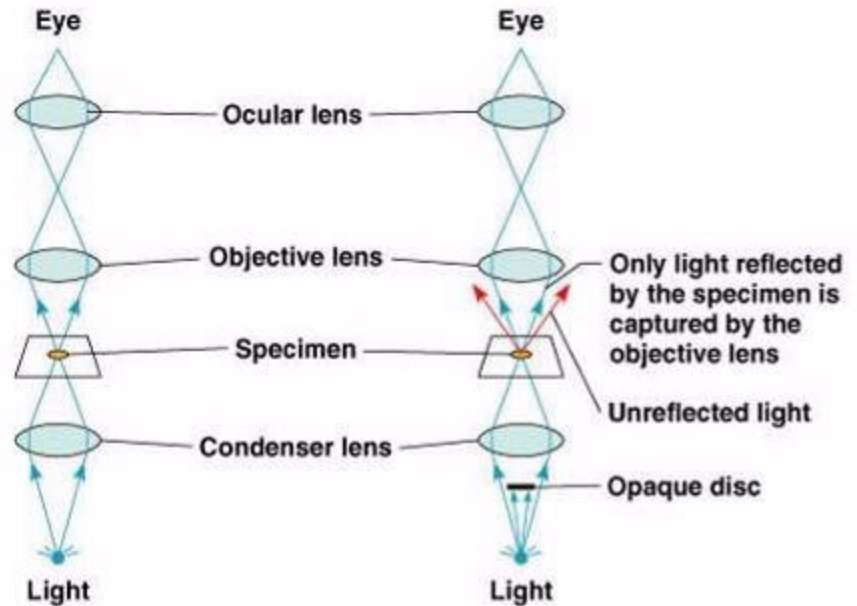


SCIENCE SEPTEMBER 2007

随机光学重构技术 (stochastic optical reconstruction microscopy, STROM) 等技术目前可以达到超分辨率的情况，突破常规显微镜的限制，达到超分辨率的情况

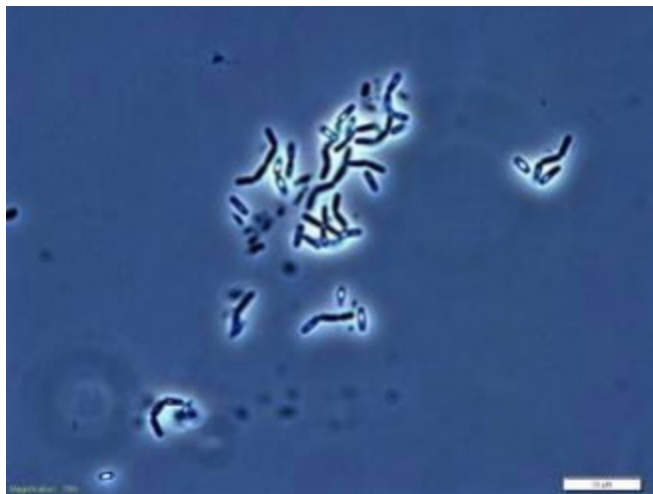
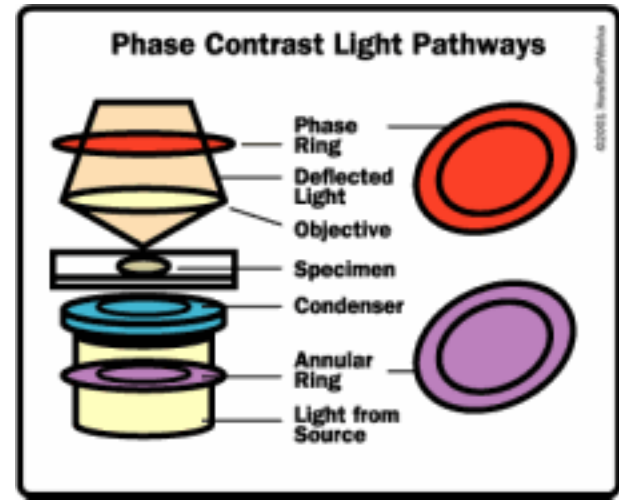
暗场观察方式

- 暗场观察是通过明暗对比将光线用遮光板挡住，在散射光条件下对样本进行观测

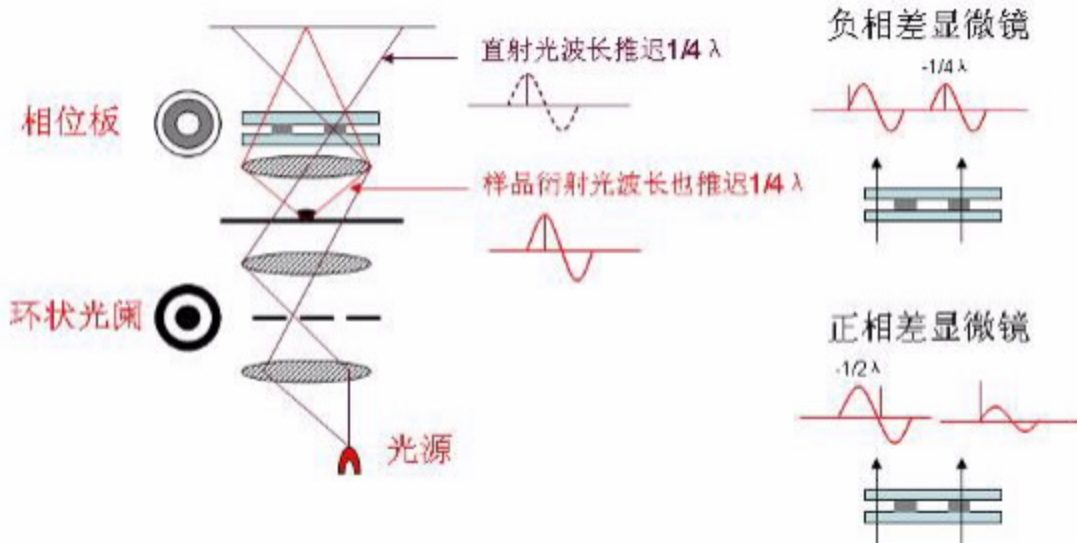


相差显微观察方式

- 人的眼睛只在光的波长(颜色)和振幅(亮度)变化时才能观察到被检的物体，而未经染色标本多为无色透明，当光波被通过时，其波长和振幅并没发生什么变化，所以无法辨认。为了观察活细胞的显微结构，就需要使用相差显微镜。
- 相差显微镜是一种将光线通过透明标本细节时所产生的光程差（即



显微镜。



不同成像手段对淀粉颗粒的研究

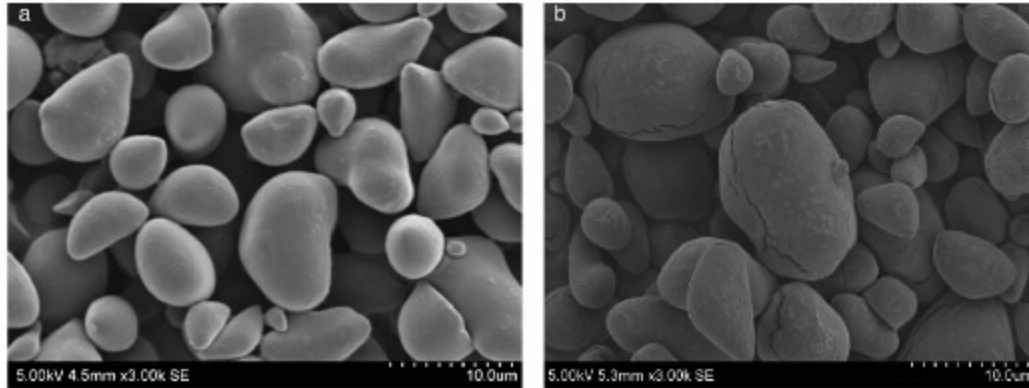
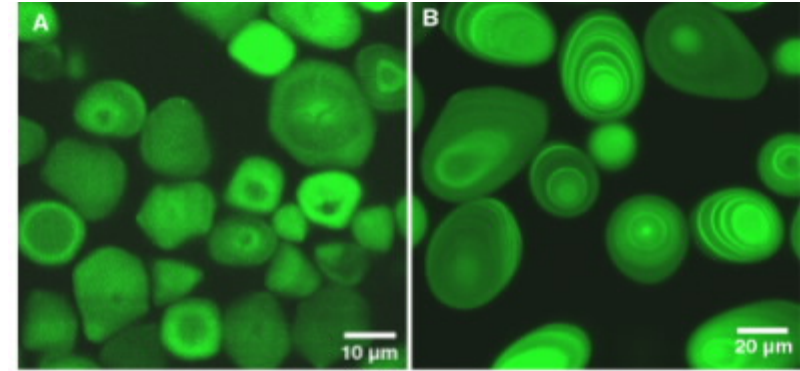
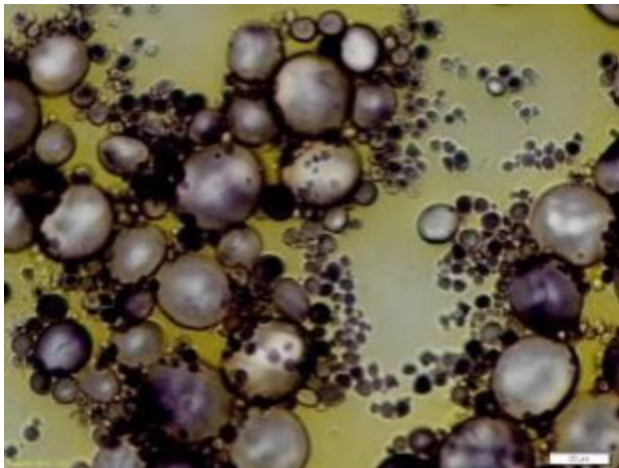


FIG. 5. SCANNING ELECTRON MICROGRAPHS OF CHESTNUT STARCH AND PHOSPHORYLATED CHESTNUT STARCH OF (A) NATIVE CHESTNUT STARCH AND (B) PHOSPHORYLATED CHESTNUT STARCH



A: corn starch

B: potato starch

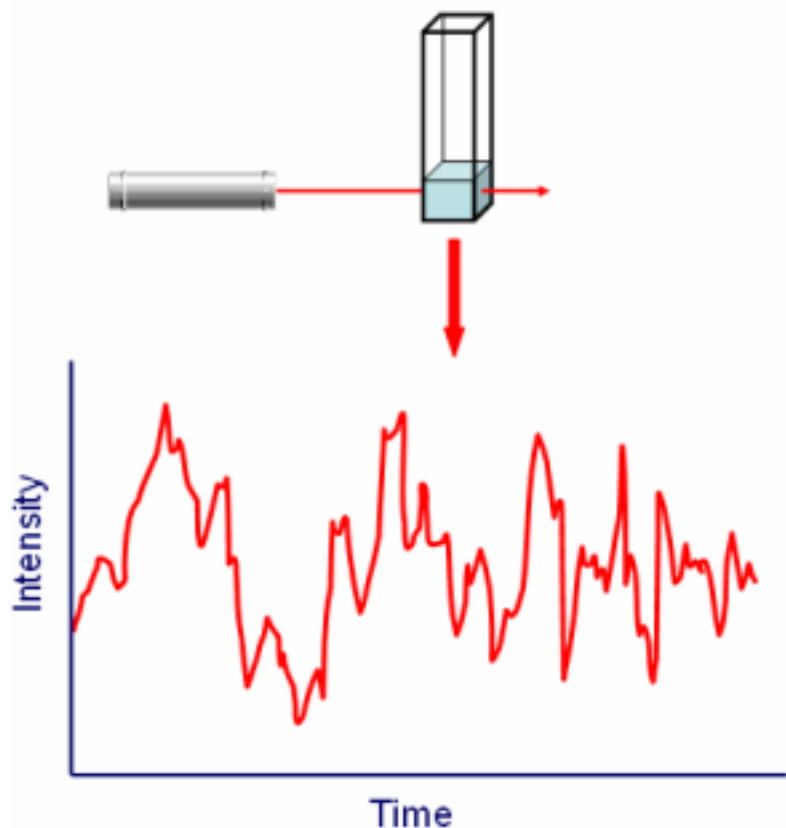


通过对比可以看出采用研究级光学显微镜也能得到比较好的图像，不同的成像方式能带给我们更多的样品细节，有利于我们对产品性质的把握



动态光散射

动态光散射测量依赖于时间的散射光强波动。由动态光散射可以得到粒子扩散速度的信息，进而从Stokes-Einstein方程得到流体力学半径 hydrodynamic diameter (D_H)



扩散系数D

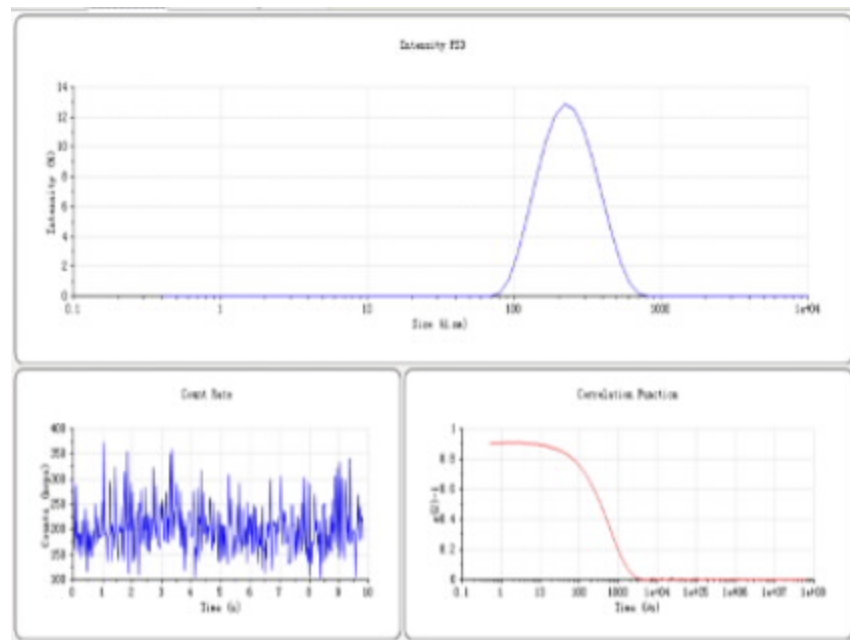
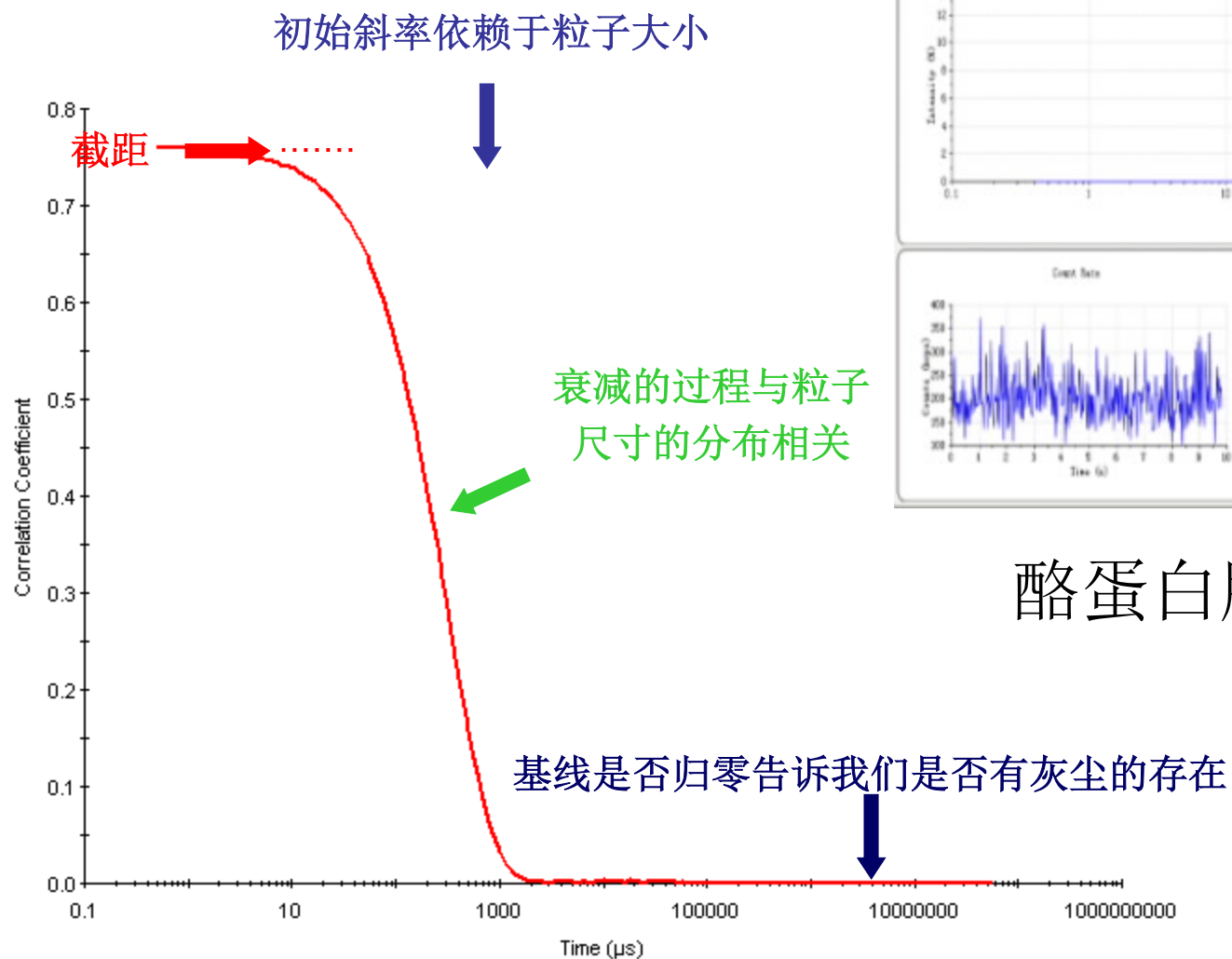
$$D = \frac{kT}{3 D_H}$$

k: 波尔兹曼常数,

T: 绝对温度,

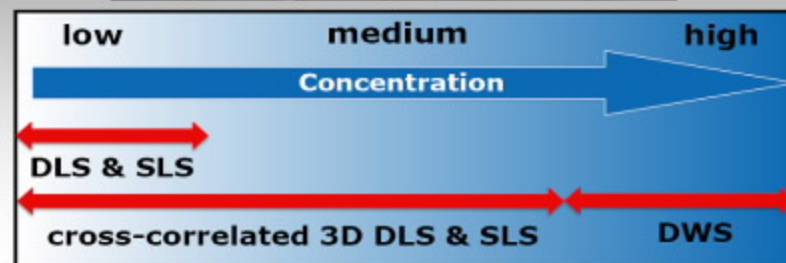
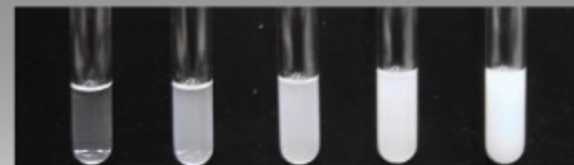
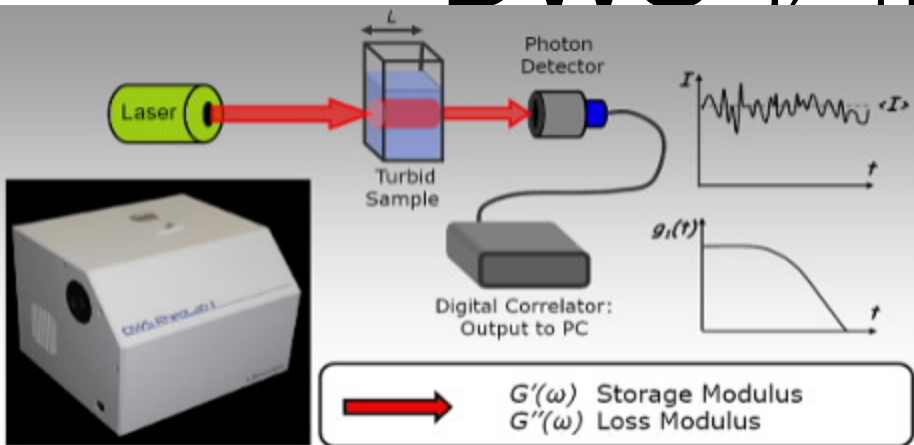
: 粘度

相关方程（曲线）



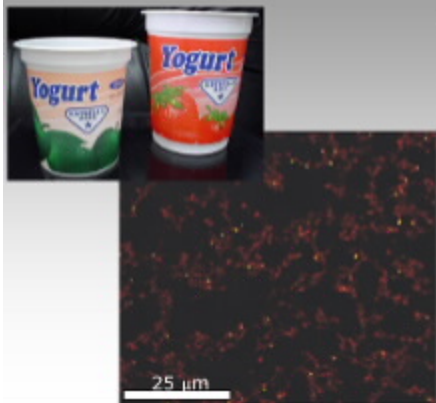
酪蛋白胶束的测试

DWS 扩散波谱仪

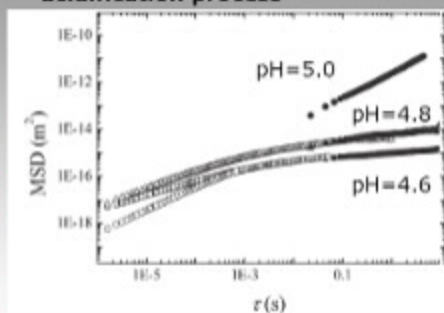


DWS: Requires multiple scattering!

Yoghurt making process

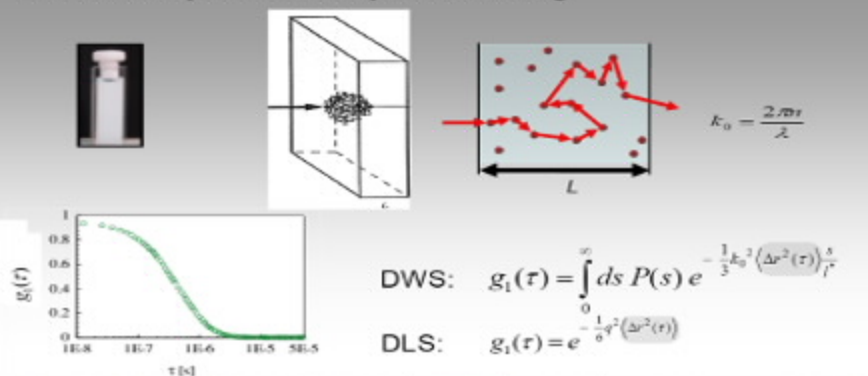


DWS and particle tracking during acidification process



Data from: A.S.B Cucheval et al., *Langmuir*, 25, (2009)

turbid sample => multiple scattering



DWS能够测试浓度较高的样品, 根据颗粒的均方位移(MSD)来计算颗粒的微流变特性.

酪蛋白胶束的结构与大小

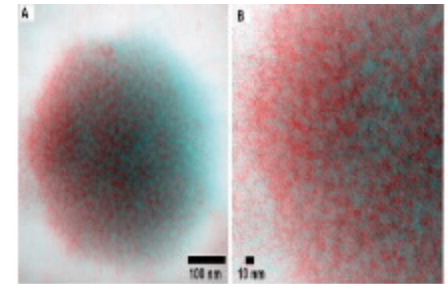
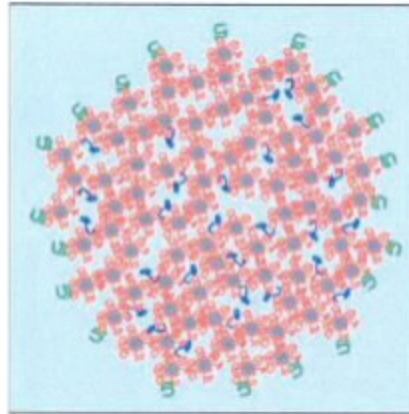
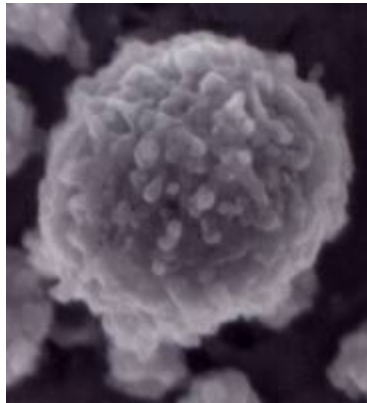
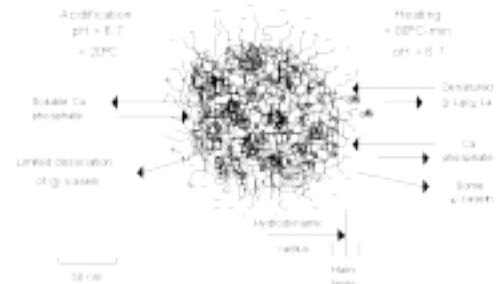
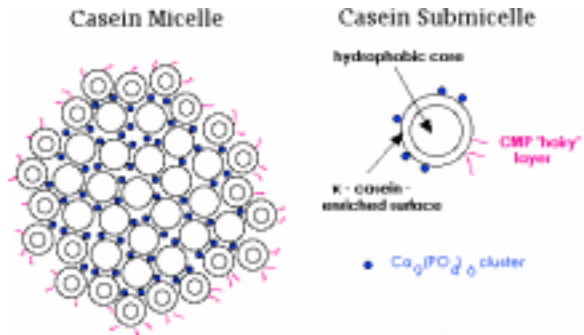


Figure 2. Anaglyphic version of transmission electron micrographs of (A) a freeze-dried unmodified and untagged casein micelle and (B) a highly magnified peripheral region of a casein micelle.

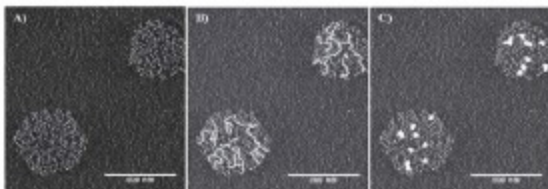
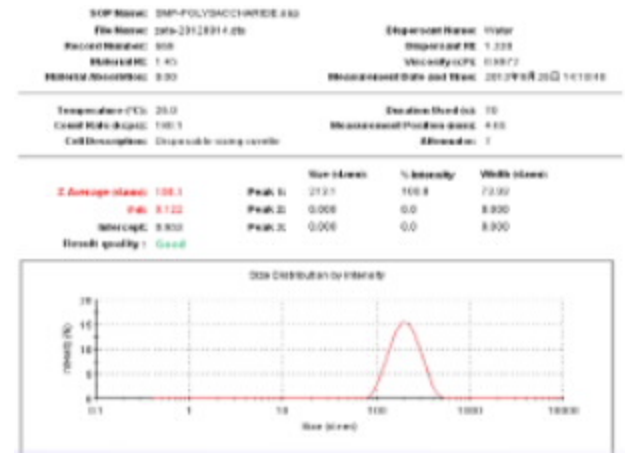
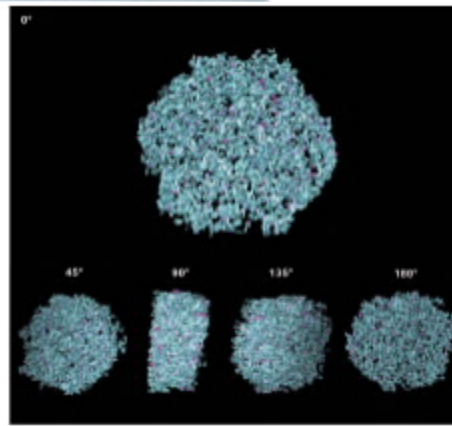


Figure 3. A) Slice (4.74 nm) through the center of 2 micelles from the cryo-transmission electron tomogram; B) highlighting of the internal cavities in the entire casein micelle in the same image; C) highlighting of the internal cavities in the entire casein micelle in the same image. Scale bar is 100 nm.



酪蛋白与乳清的透射电镜图谱

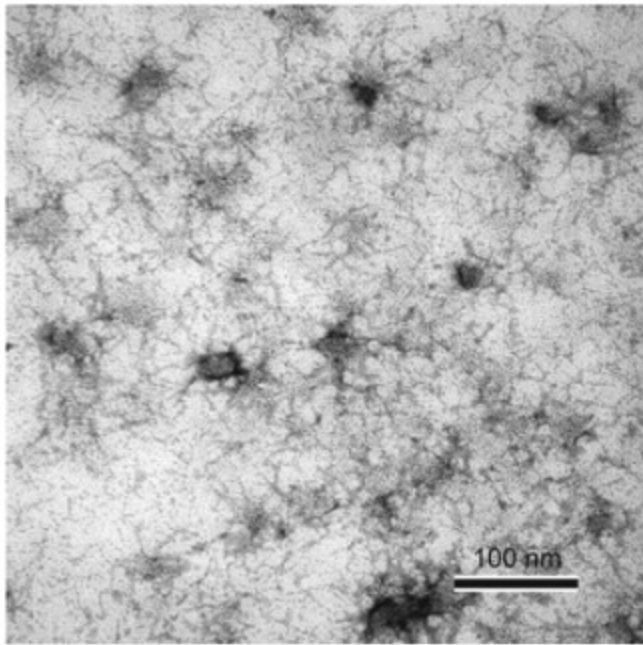


Fig. 6.9 Serum proteins obtained from the supernatant after centrifuging cold raw milk at $27,000\times g$ for 2 h and imaged as described in Fig. 6.2. Reprinted from Oommen (2004)

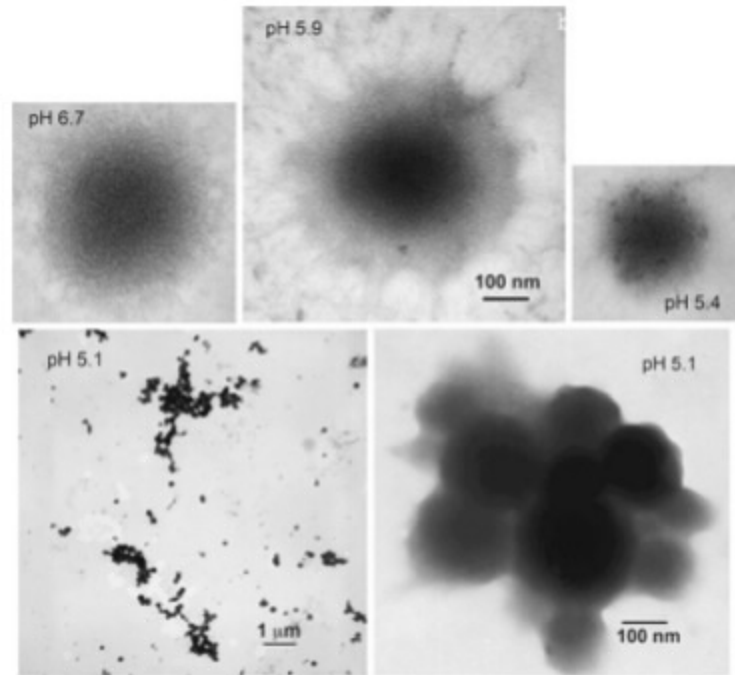
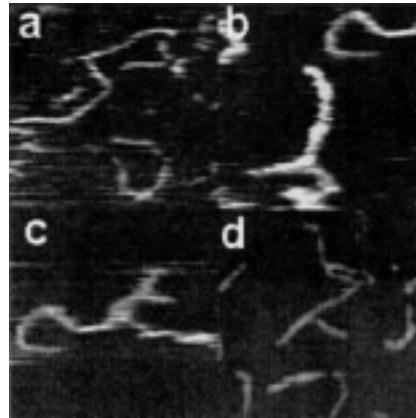
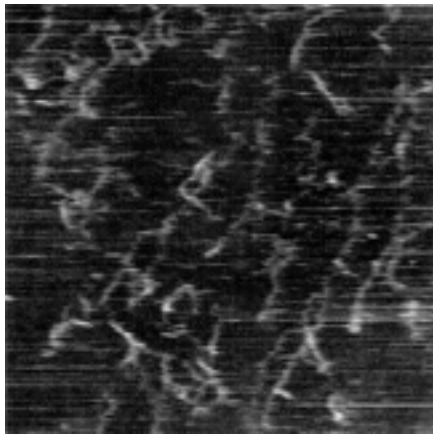


Fig. 6.11 Casein supramolecules from pasteurized skim milk (pH 6.7) and from the same milk acidified with glucono- δ -lactone and sampled at pH 5.9, 5.4, and 5.1 and

prepared and imaged as described in Fig. 6.2. Reprinted from Oommen (2004)

果胶的结构与大小 (AFM and DLS)



1 μm^2 image of CDTA-extracted pectin on mica

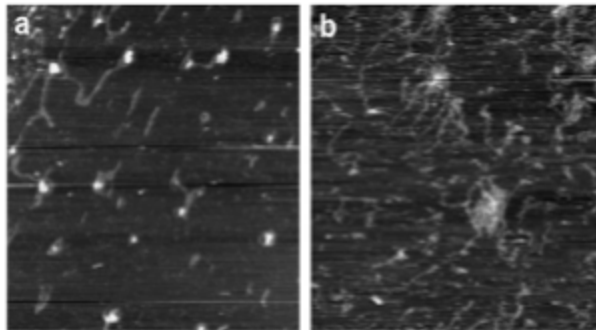
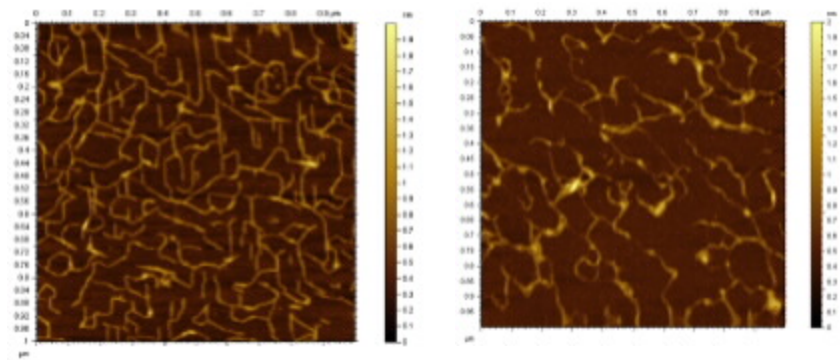
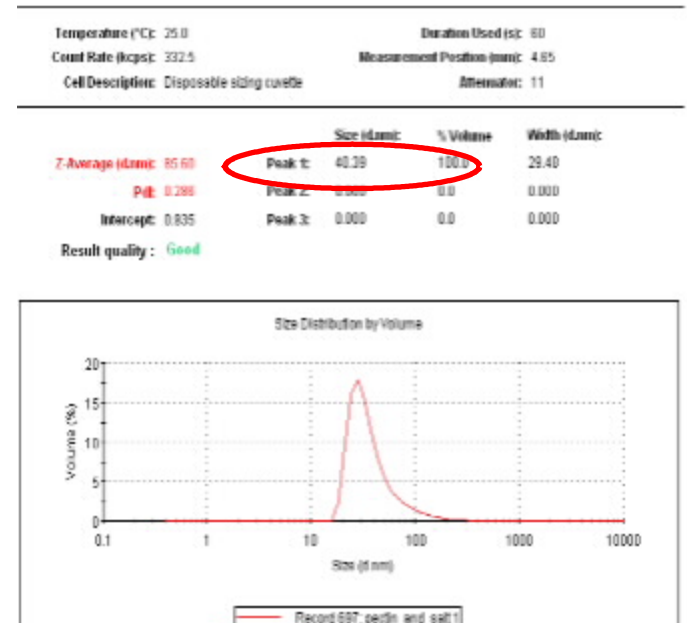


Fig. 8. Topographic AFM images of sugar beet pectin. The images show examples of the types of aggregates seen in the samples. Image sizes $1 \times 1 \mu\text{m}$. (a) Examples of linear aggregates of 'tadpoles'. (b) Micellar aggregates.



Pectin形貌□
(1 $\mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$)

果□和酪蛋白相互作用形貌□



黄原胶的结构情况

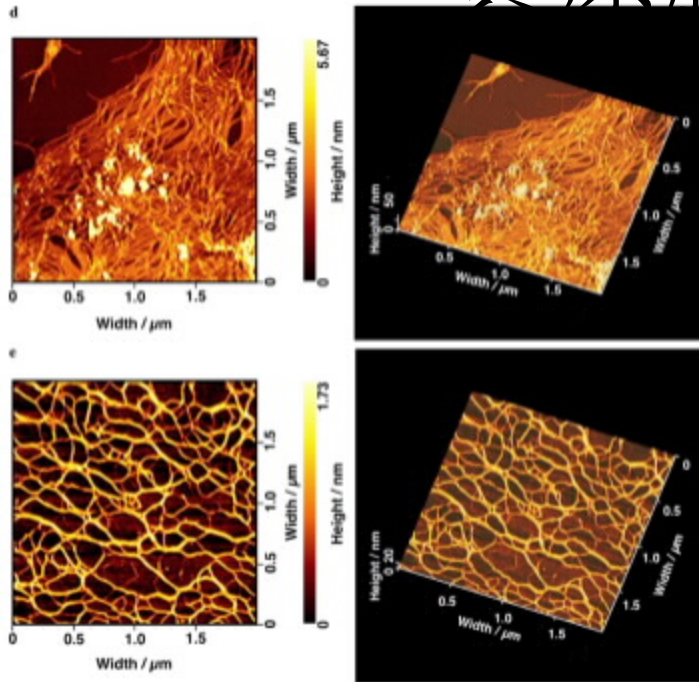


Fig. 3. AFM images of annealed xanthan gum with various annealing times at 40 °C (image size = 2 × 2 μm) (a) non-annealed, (b) 1 h, (c) 3 h, (d) 6 h, and (e) 24 h.

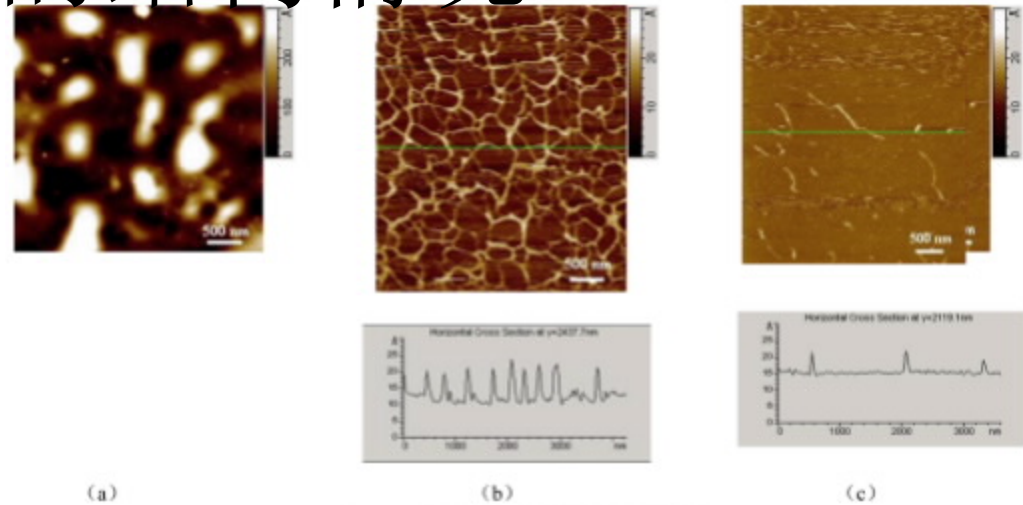
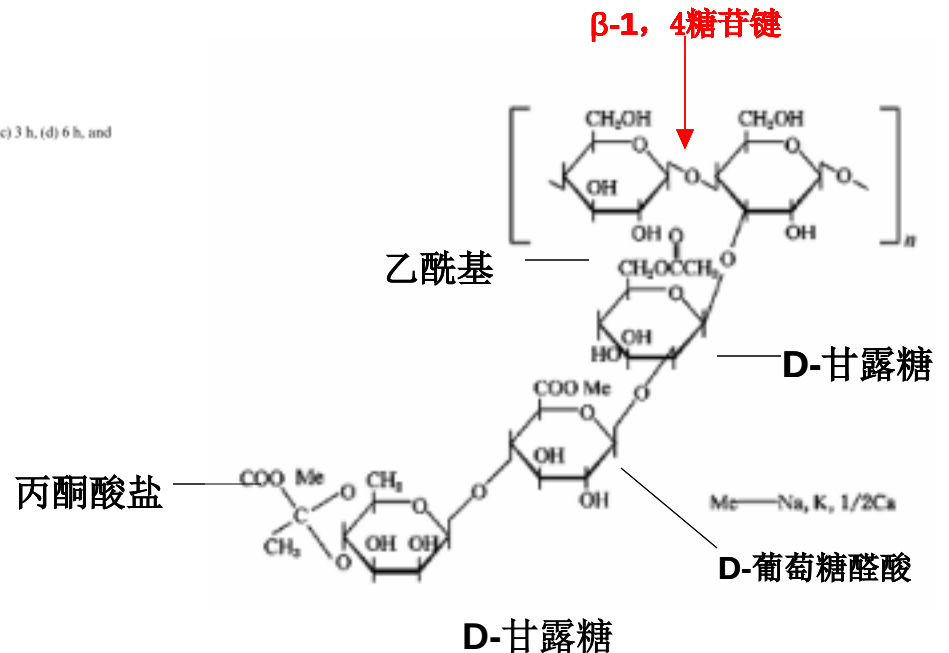
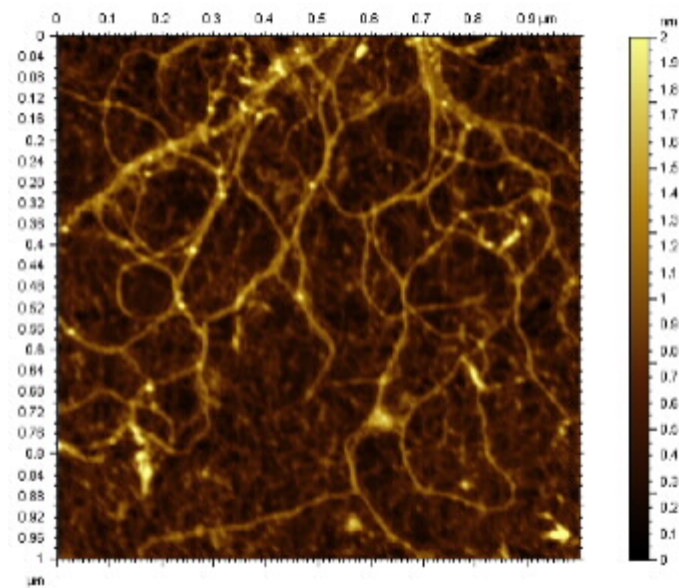
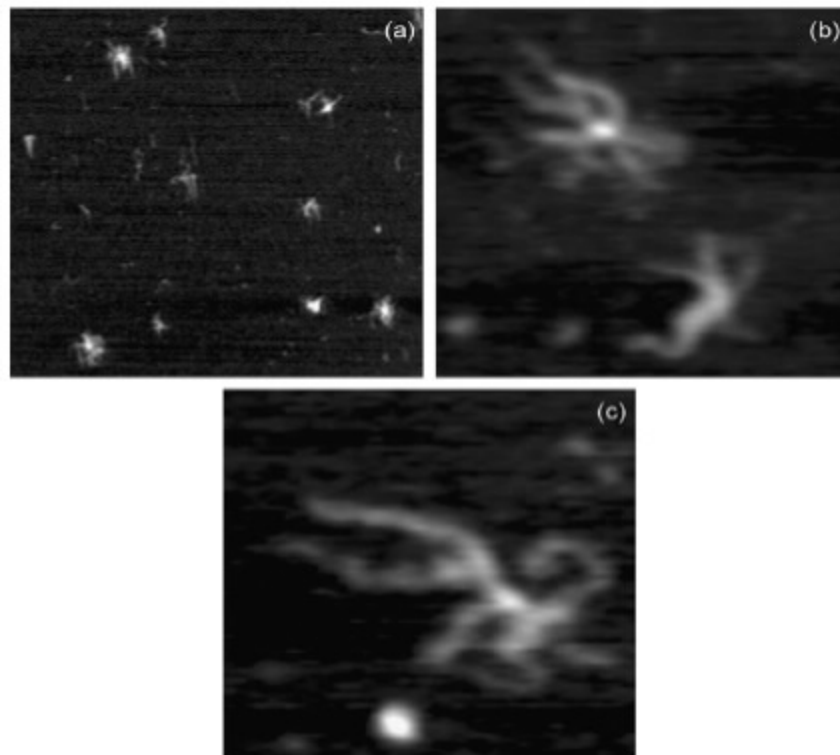


图 2 不同浓度下的黄原胶分子形貌图

• **黄原胶**其分子结构组成为D-葡萄糖、D-甘乳糖、D-葡萄糖醛酸、乙酸和丙酮酸组成的“五糖重复单元”结构聚合体，分子摩尔比为2.8:3:1.7:0.51-0.63，分子量为 2×10^6 - 2×10^7 D之间。



SSPS (大豆多糖) 的AFM图像与分子模型



SPSS形貌图 (1µm×1µm)

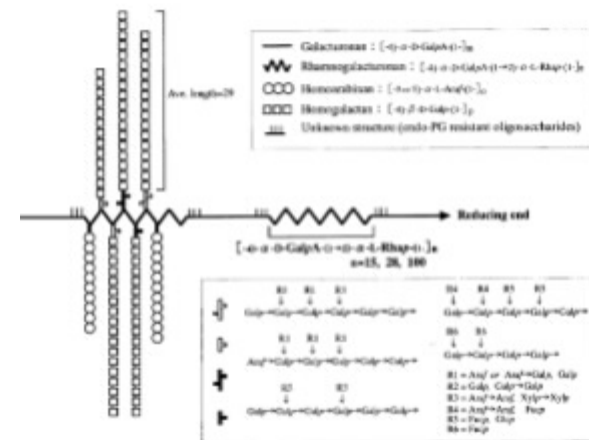
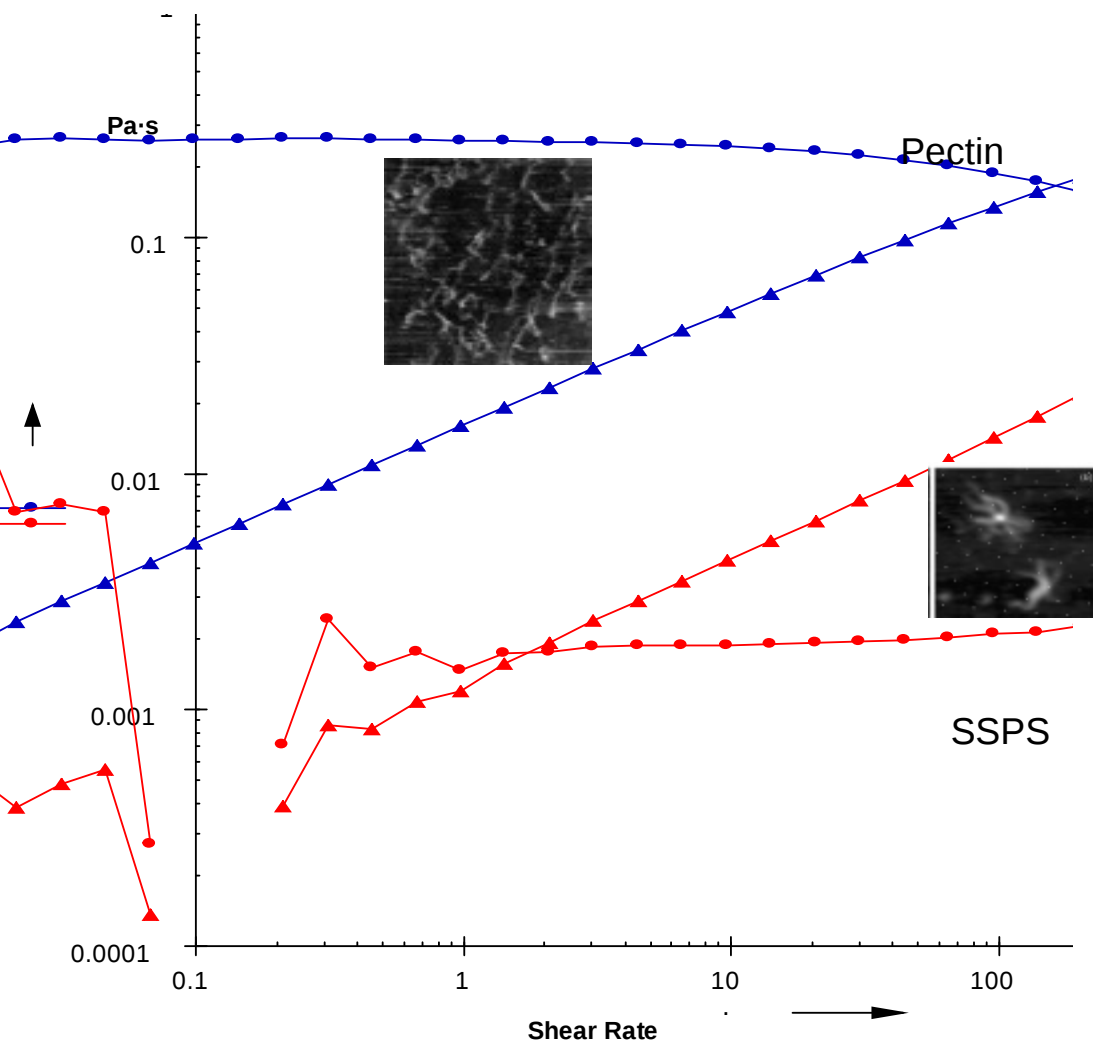


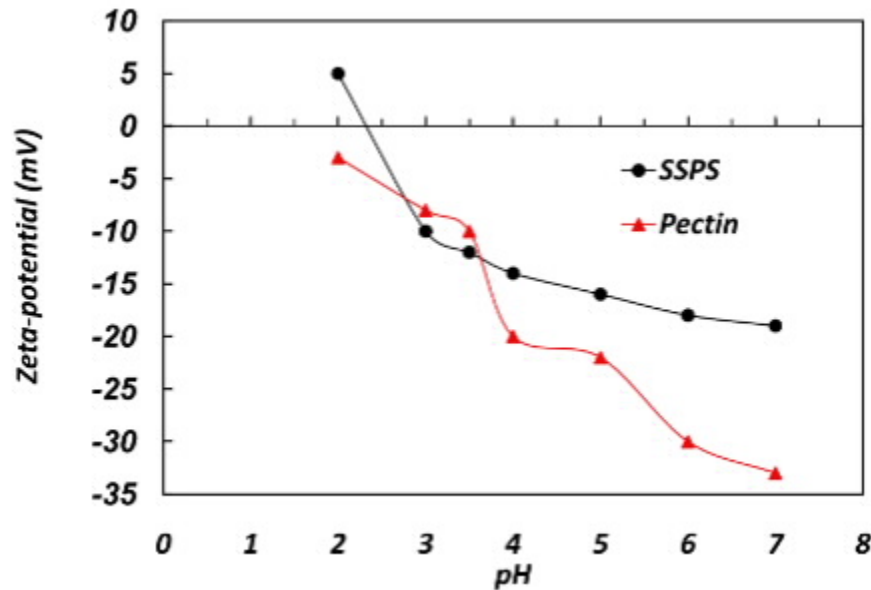
Fig. 3. Image of soybean polysaccharide deposited from a 1 µg/mL solution containing 2 mM Tween 20. Image size: (a) 1 µm×1 µm; (b) 200 nm×200 nm; (c) 150 nm×150 nm.

Pectin and SSPS 的流变学特性

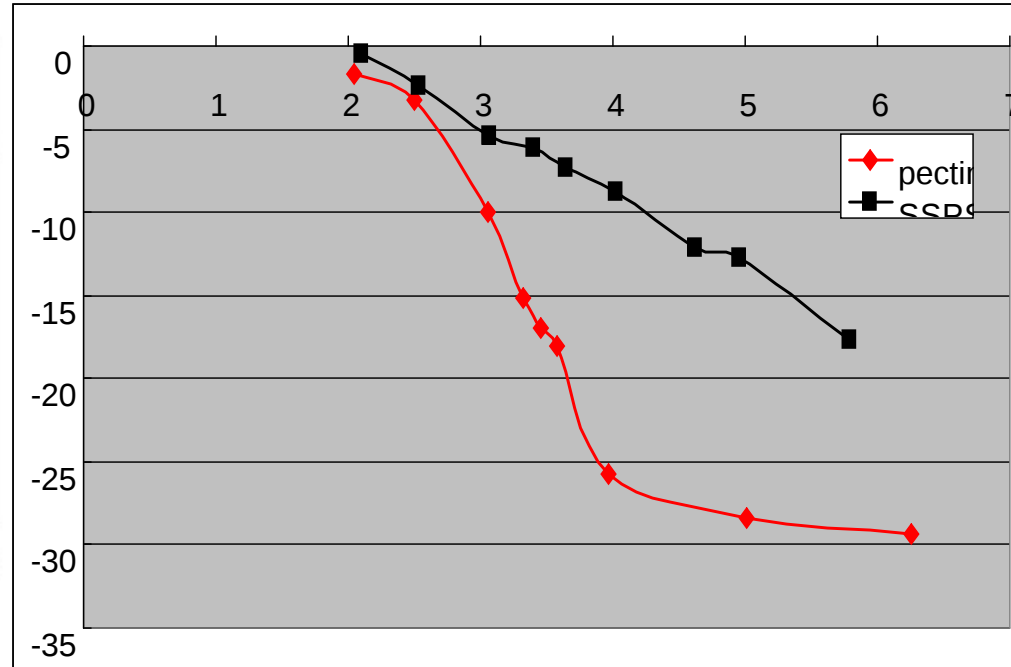


通□□□数
 据，1.5%果□的
 粘度大大高
 于1.5%大豆多糖
 的粘度，同□也
 □□不同的分支
 □□与□品的粘
 度有很大差□性

果胶和大豆多糖的Zeta电位随PH变化情况



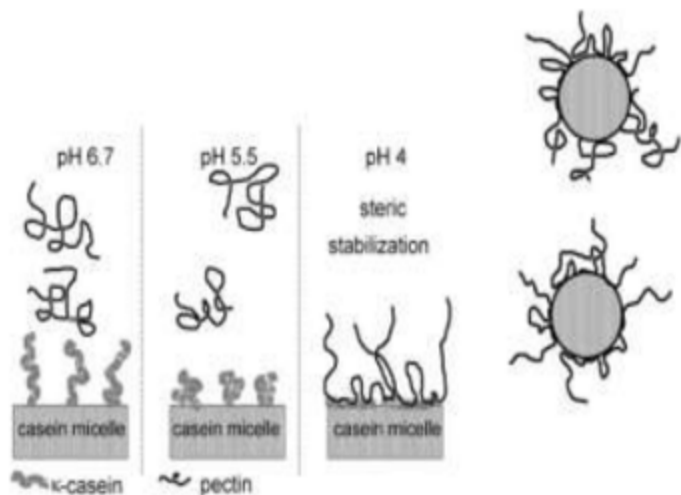
1% water solution



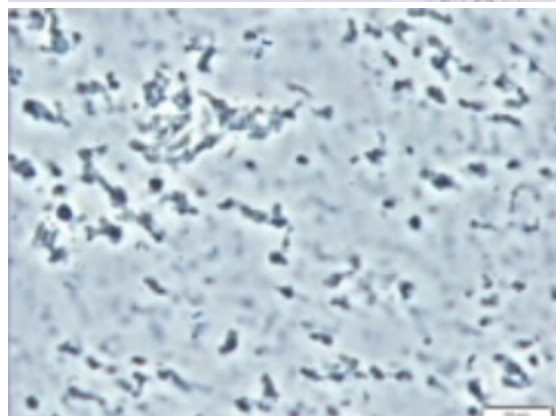
0.3% water solution

通过上图能明显看出果胶的zeta电位要高于大豆多糖(ssps), 二者的基本单位都是由半乳糖醛酸基团引起的. 并随着PH值的下降, zeta电位接近零, 随着氢离子浓度增加, 半乳糖醛酸的羧基解离度下降, 越接近电中性.

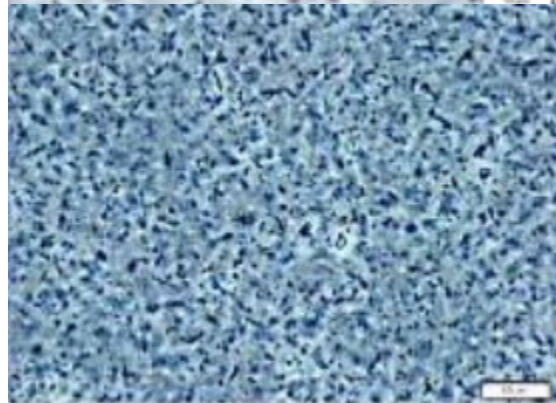
酪蛋白与果胶相互作用随PH变化情况



PH6.6左右时，酪蛋白和果胶都带负电荷，在体系中发生了耗散絮凝的情况

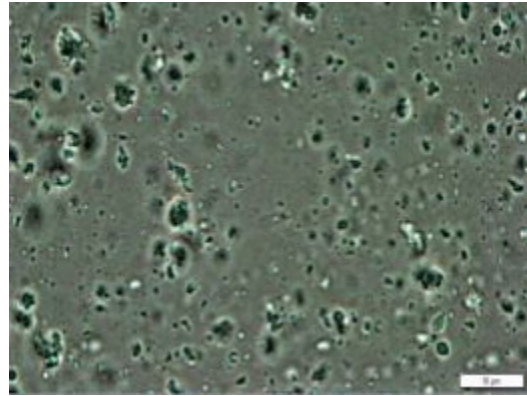
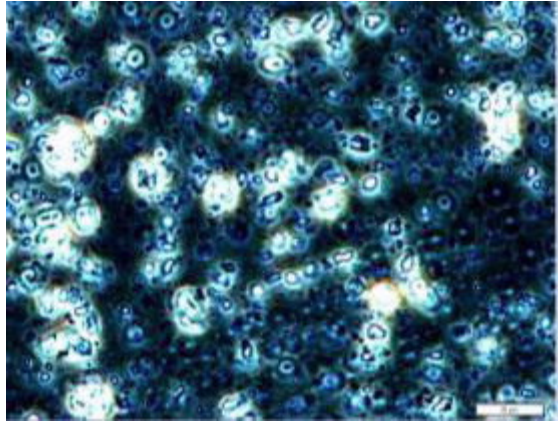


PH5.2左右时，酪蛋白的负电荷减弱，和果胶开始发生作用

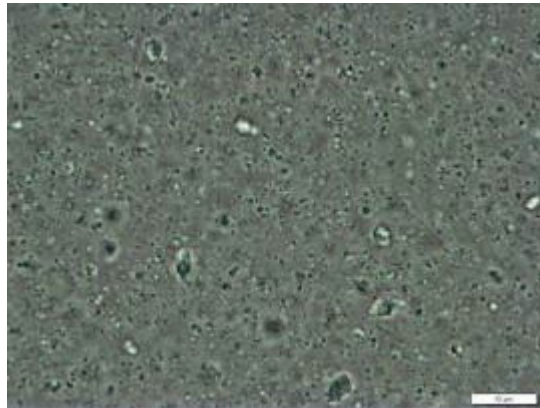
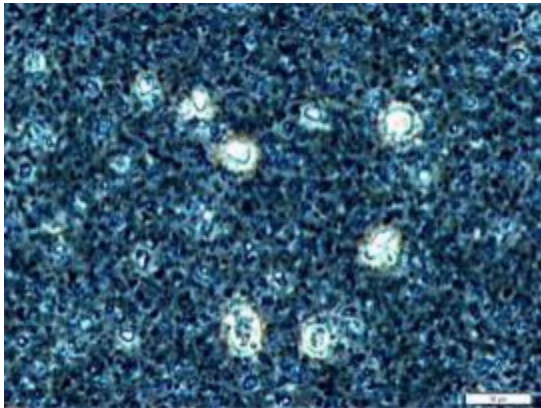


PH4.6以下，酪蛋白开始带正电荷与果胶进行吸附，并发生静电排斥，体系开始变得稳定

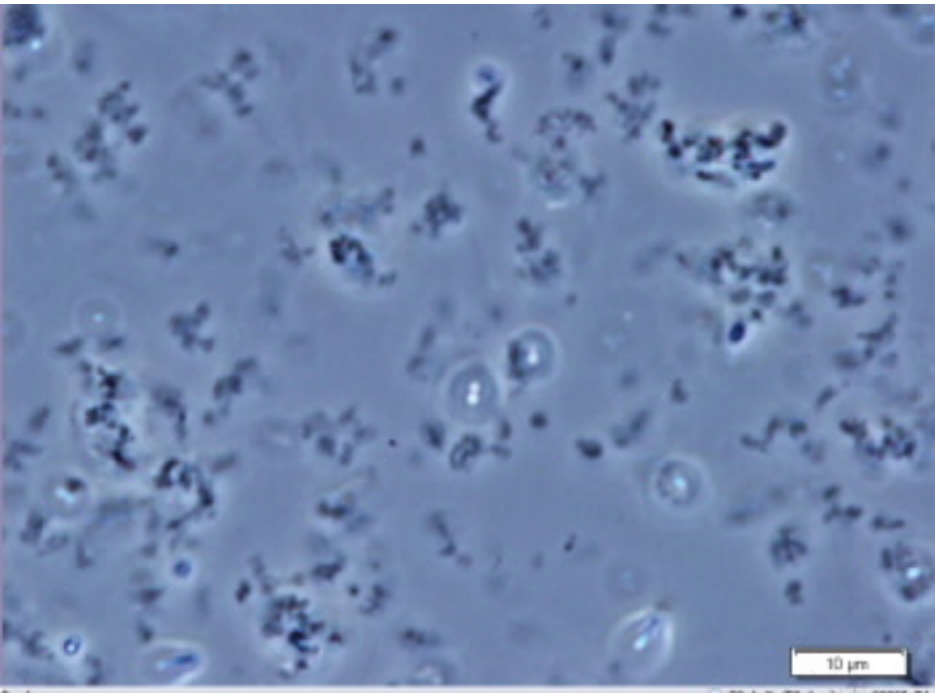
不同工艺的显微结构图片



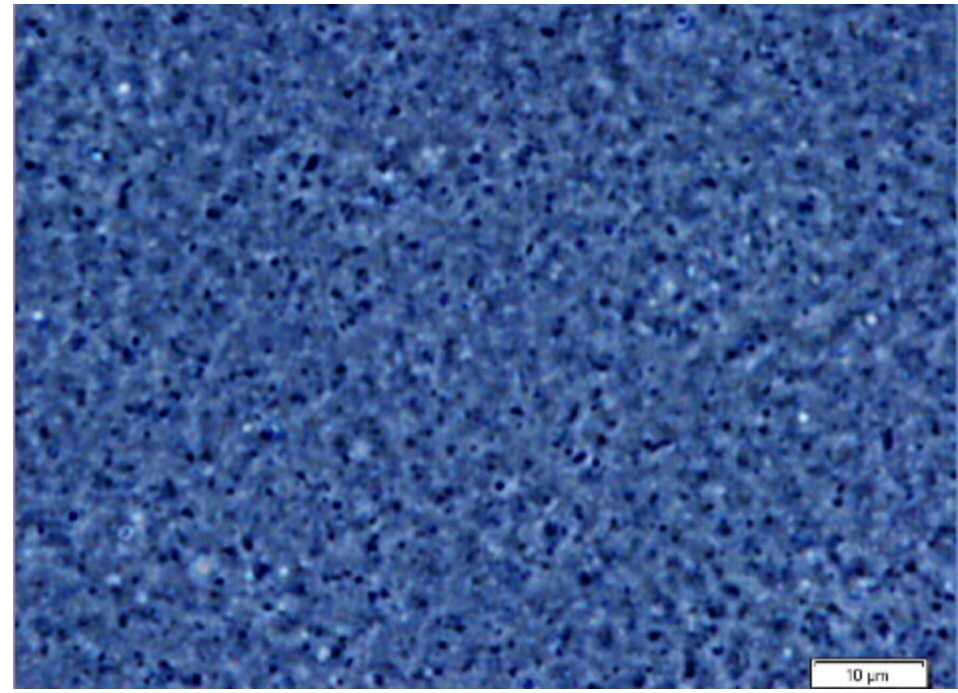
- 不同工艺的乳饮料显微结构研究, 图片显示, 颗粒无物的分布和形态有明显的变化



乳料中蛋白质颗粒的显微观察情况

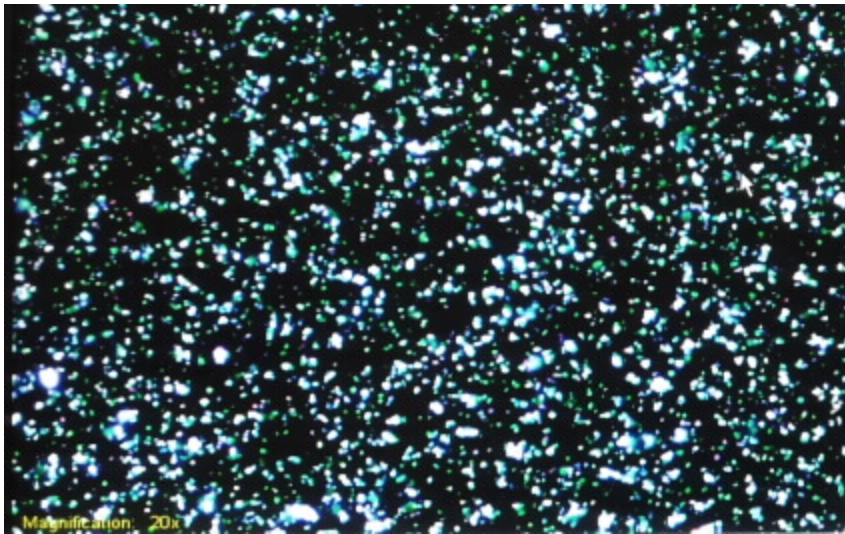


乳料中颗粒分布不均匀，存在明显的聚集体，产品稳定性差

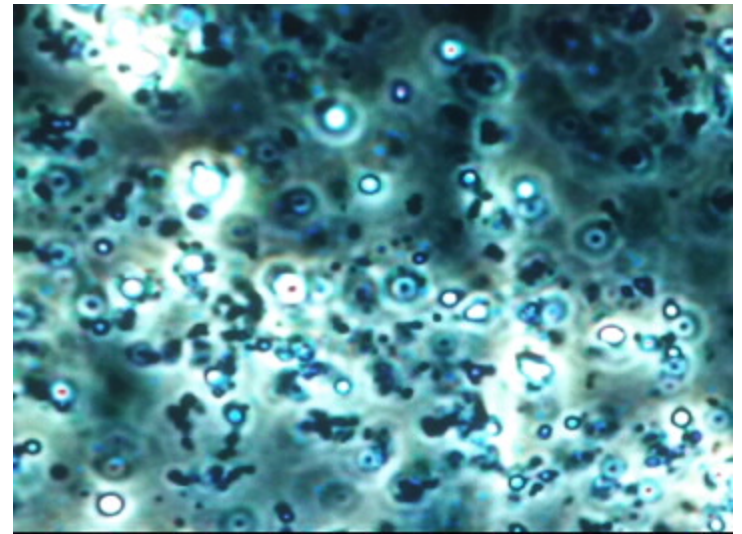


乳饮料中蛋白质颗粒均匀分布，产品稳定性好

不同显微结构研究方式在乳饮料中的应用微视频



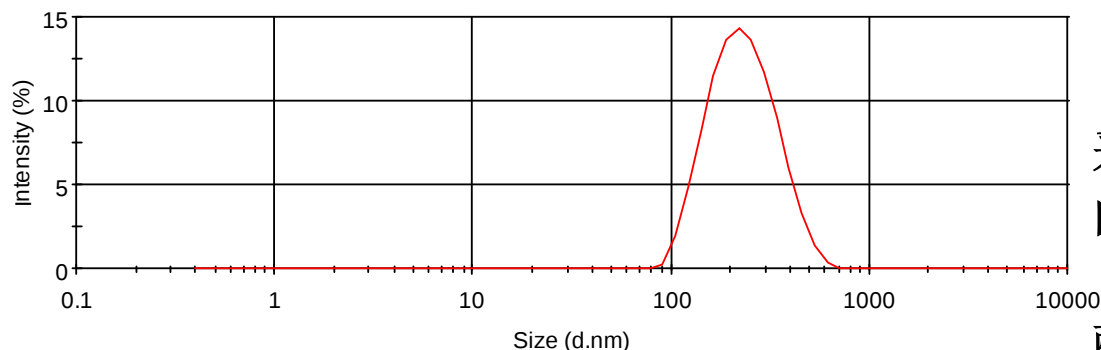
暗场观察方式



相差观察方式

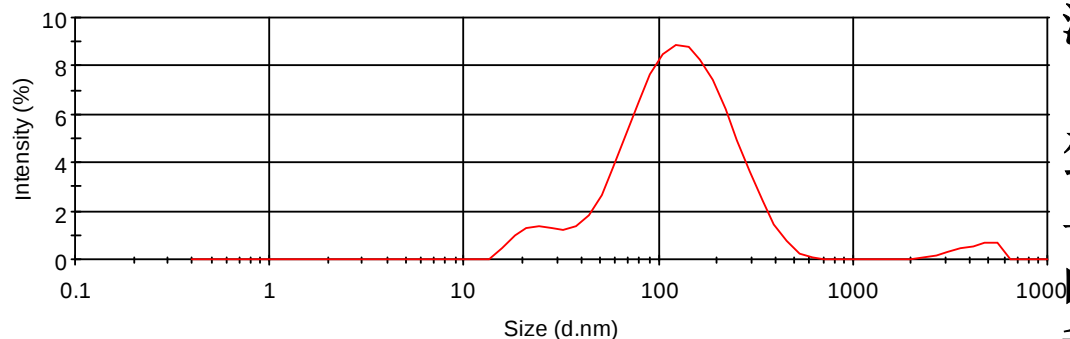
酪蛋白溶液和大豆多糖相互作用粒径测试结果

Size Distribution by Intensity



采用动态光散射仪 (DLS) 对微粒的粒径测试进行测试结果

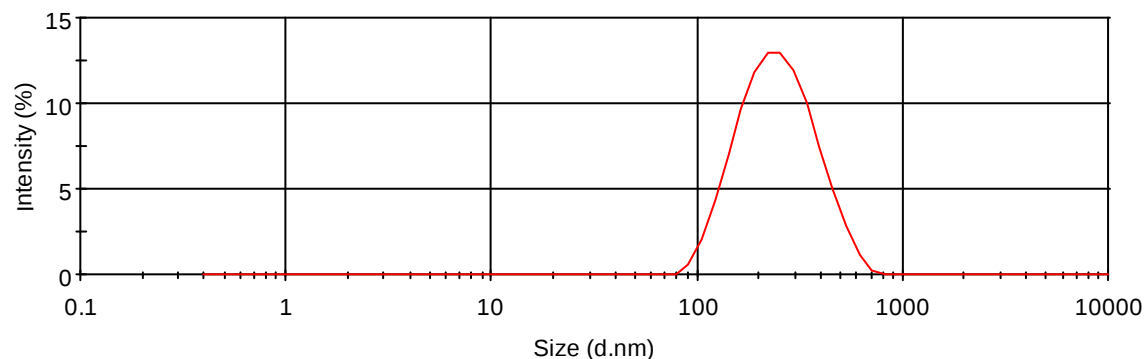
脱脂奶溶液粒径为**213.8nm**



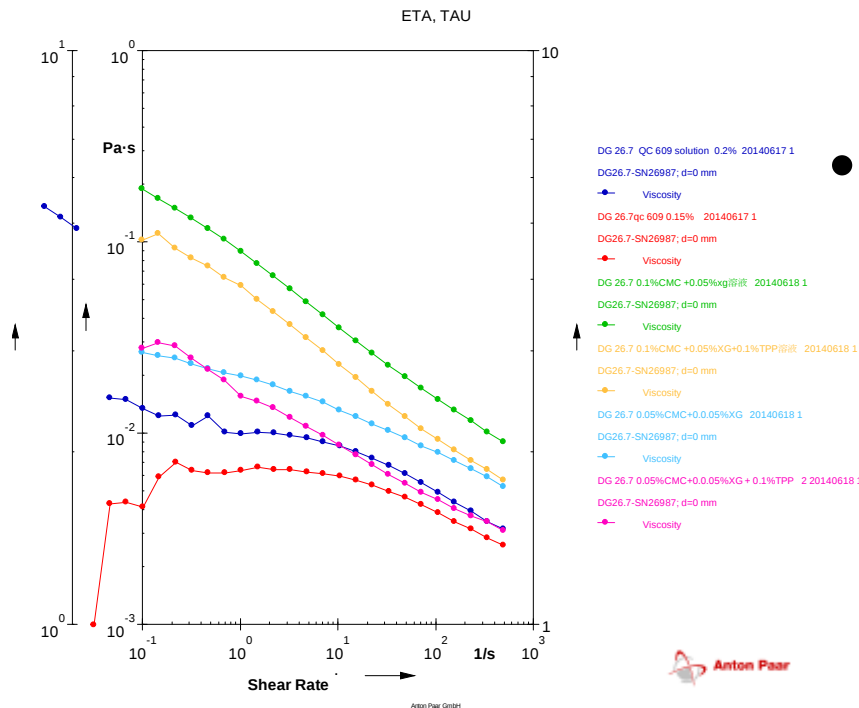
酸处理后的溶液粒径为**99.13nm**

添加SSPS的后的粒径变化为**211.3nm**

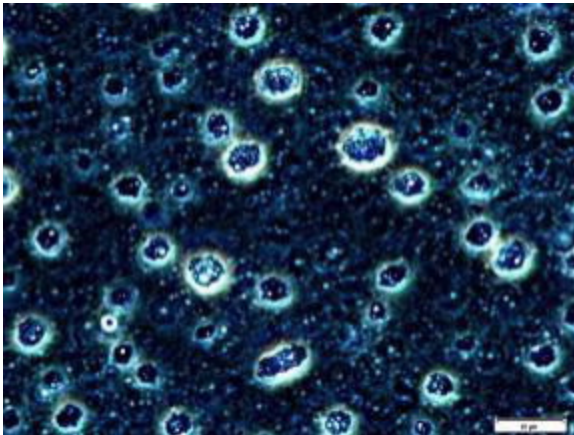
通过实验能明显看到酸性溶液中蛋白质粒径变小, 并带明显的正电荷与带负电荷的大豆多糖吸附, 通过多糖的分支结构具有的空间位阻, 达到体系稳定.



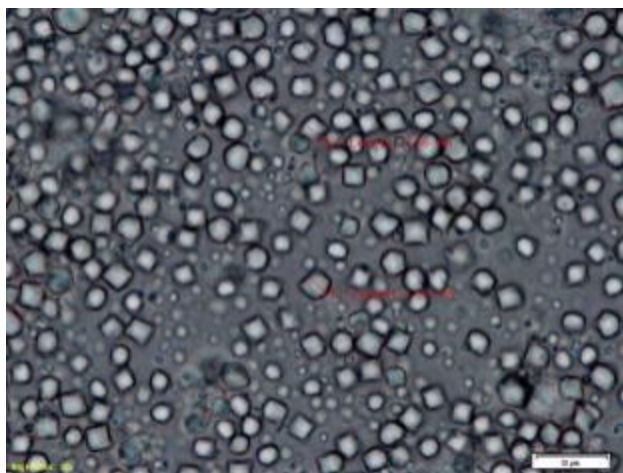
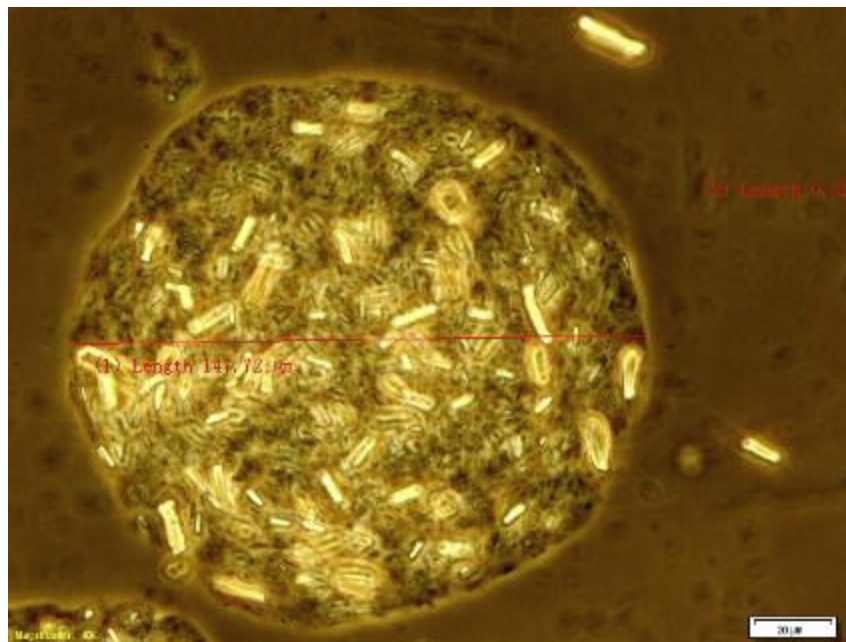
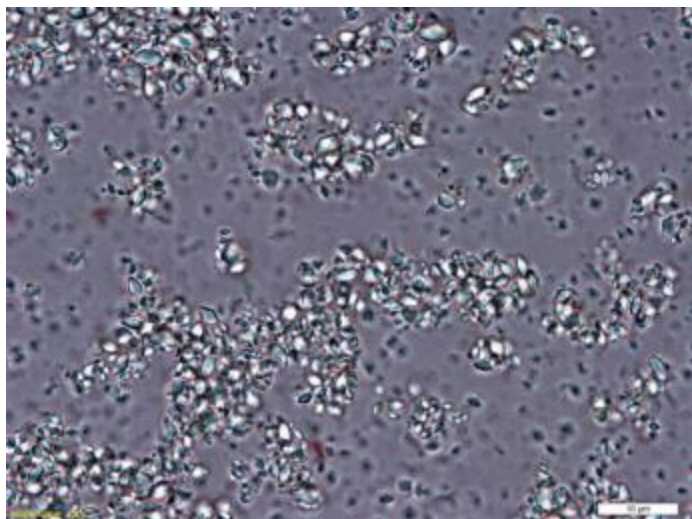
黄原胶在乳饮料的应用情况



- 通过流变学测试和显微观察相结合的方式，能很直观的看出胶体和酪蛋白胶束的相互作用情况。下图能明显看出胶体和酪蛋白胶束出现了排斥絮凝，导致蛋白胶束出现了明显的聚集情况。该情况在流变学上也得到了反映。

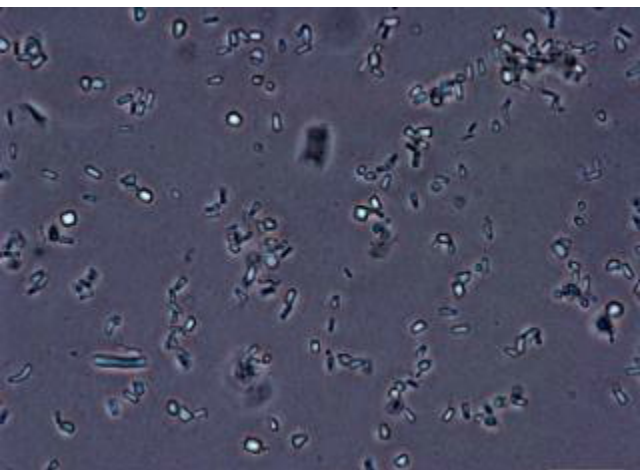


饮料中常见的晶体情况介绍

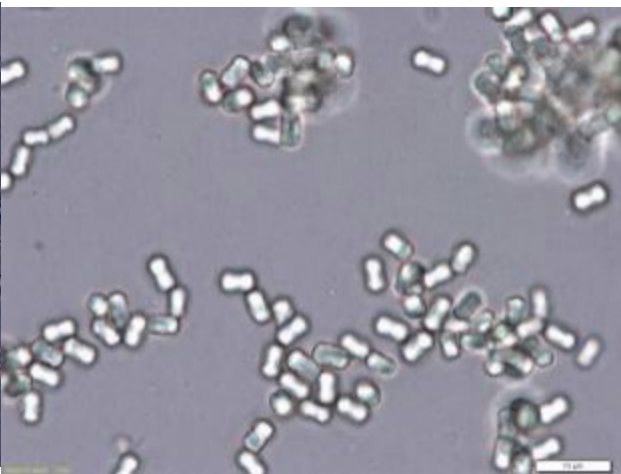


饮料中的晶体主要常见为微晶纤维素的晶体，以及草酸钙等晶体，在饮料中特别是植物相关的饮料中几乎都存在草酸钙晶体的情况。在晶体的存在，由于比重差较大，一般都会沉淀到瓶底部。通过显微镜检，能快速判定产品的变化情况

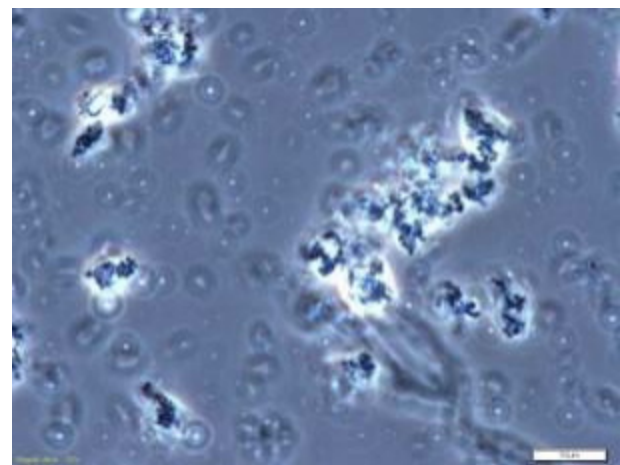
奶咖饮料沉淀物的分析



奶咖饮料瓶底的沉淀物



盐晶体放大



盐晶体用稀盐酸溶液处理后消失

奶咖沉淀物中存在较多的盐晶体物质，利用草酸钙不溶于柠檬酸，乙酸溶液而溶于稀盐酸溶液的特性，比较容易区分。主要原因是咖啡中含有少量的草酸，加入奶液后容易与奶液中的钙结合形成草酸钙，由于草酸钙的溶解度极低，容易沉淀到瓶底形成草酸钙白色沉淀。

食品微结构研究在发酵果蔬汁饮料的应用

乳酸菌果蔬汁饮料

- 概念核心：乳酸菌发酵，果蔬更健康
- 技术创新点：1、乳酸菌发酵
2、好喝的不一样的果汁饮料
- 概念辅助备选：植物乳酸菌发酵植物饮料

含天然 β -胡萝卜素

果汁含量大

50-55%
发酵作用

发酵作用 = 生物化学反应

发酵底物 $\xrightarrow{\text{微生物}}$ 产物 + 能量 (ATP: 三磷酸腺苷)

发酵产物: 酸, 细菌素, 生物多糖, 维生素合成, 氨基酸...

益处

- 改进食物的保鲜
- 改进营养属性 (血糖指数下降, 氨基酸含量增加, 矿物质的生物利用度改进)
- 感官属性的改善 (产生风味属性, 色泽和质构的改善)

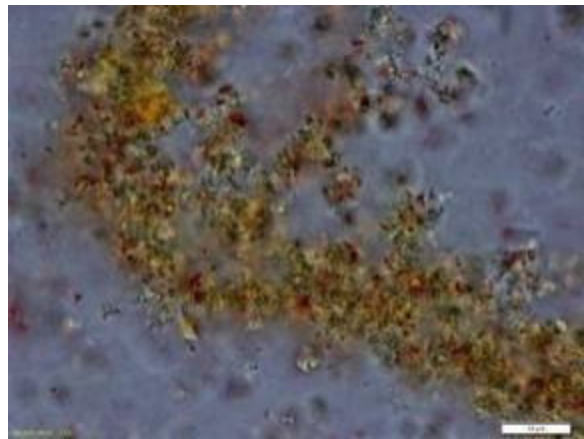
益生菌

- 活性微生物能够在足够数量下能够为宿主获得一种或多种健康益处' (激活免疫系统, 改善肠道微生态...).

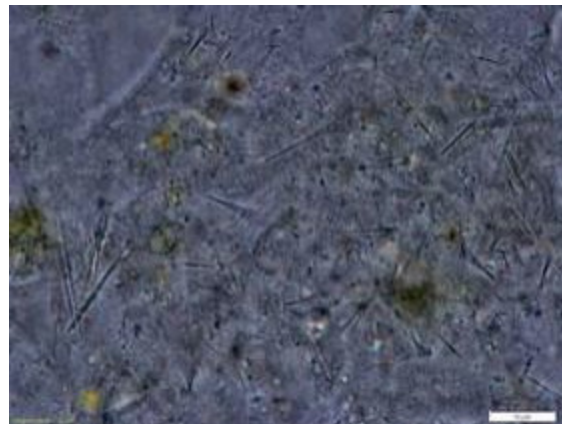
防腐剂



复合果蔬汁中果肉的显微结构



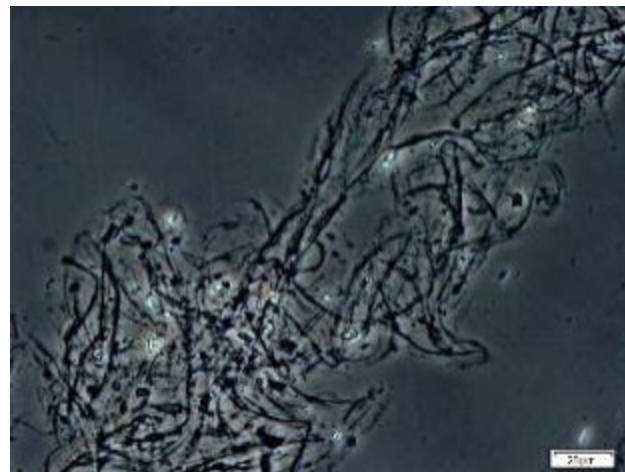
胡萝卜汁中的果肉情况



浓缩橙汁中的果肉情况

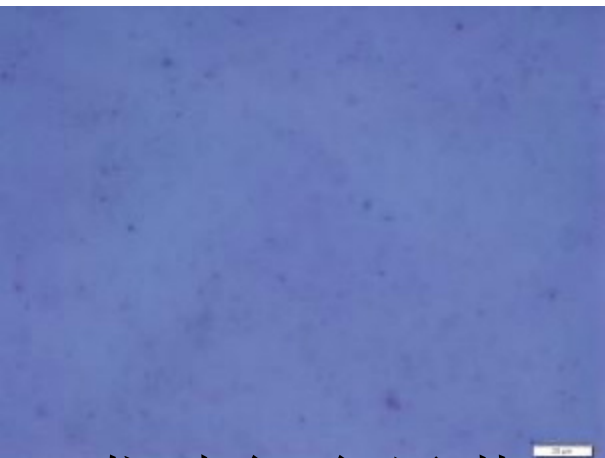


浓缩橙汁果肉中的导管

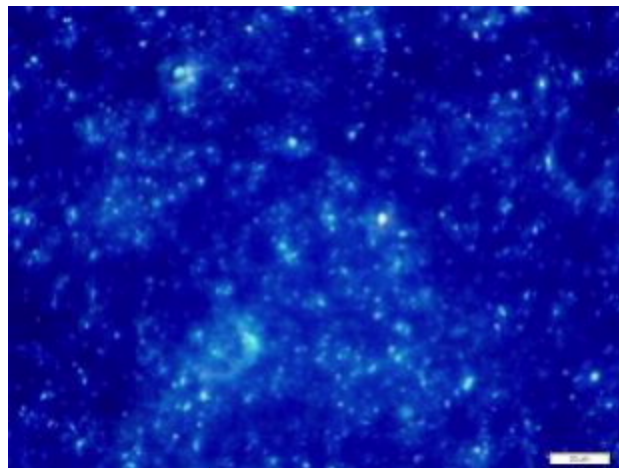


芒果汁中果肉情况

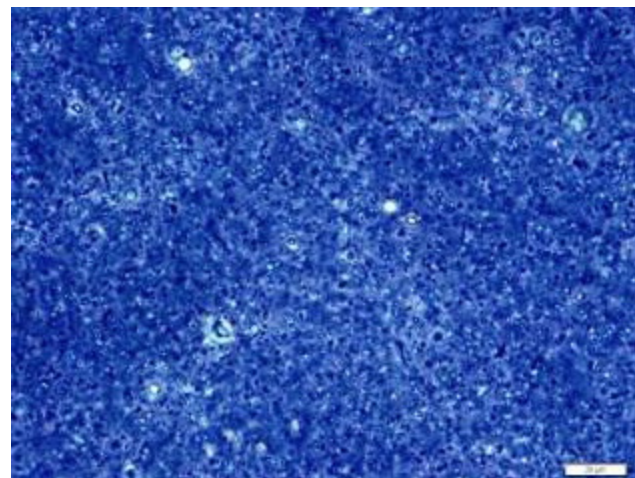
复合果蔬的悬浮性能进行研究



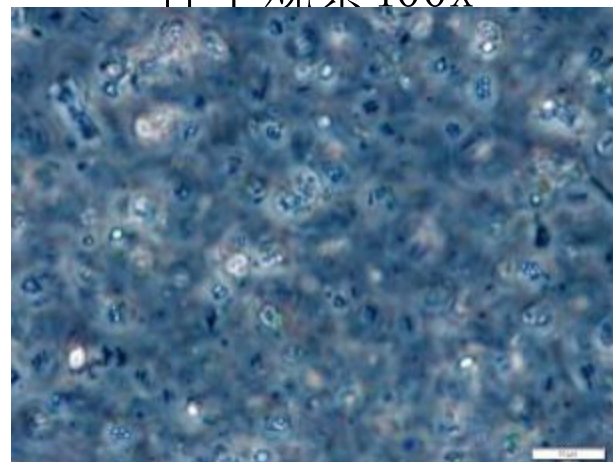
发酵复合果蔬
汁直接观
察400X



发酵复合果蔬
汁改进后观
察400X

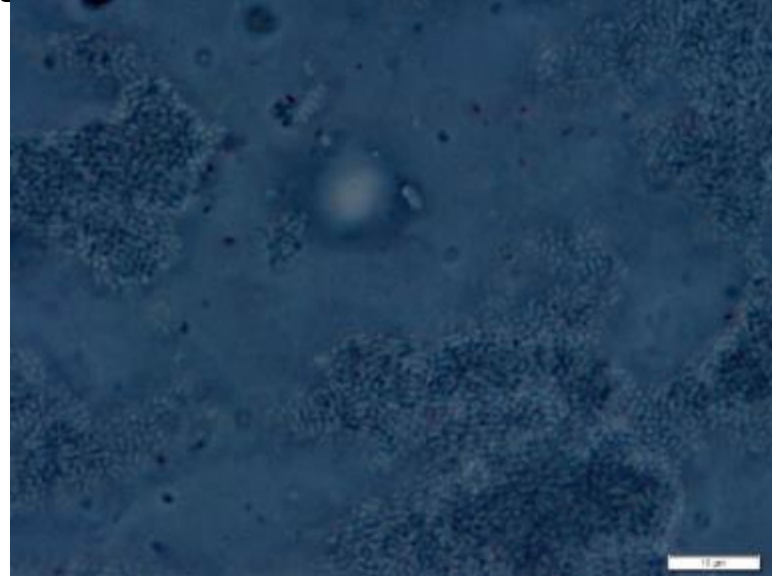
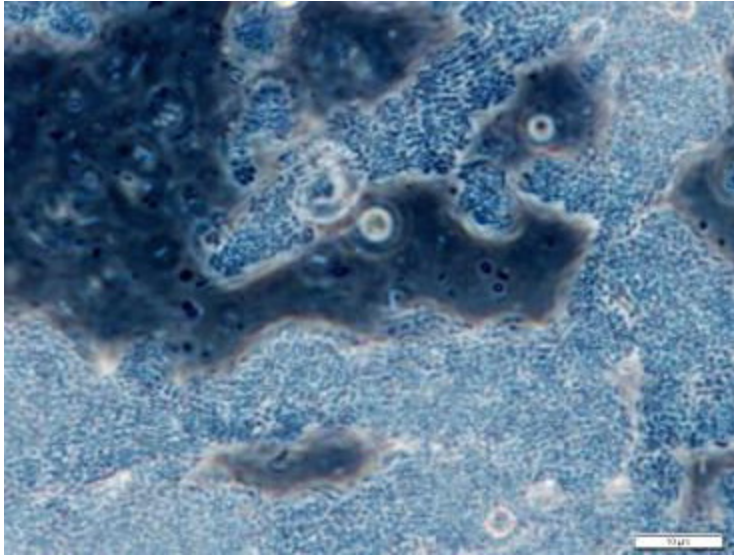


发酵复合果蔬汁相差条
件下观察400x

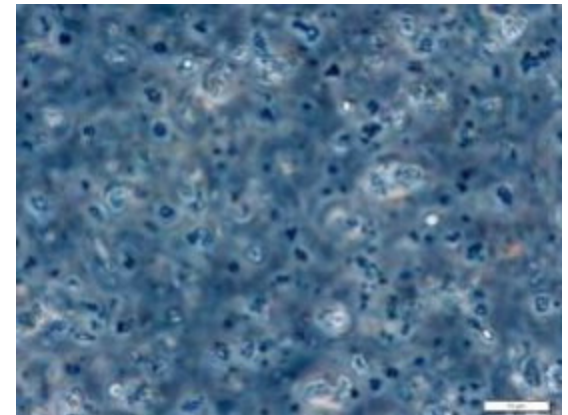
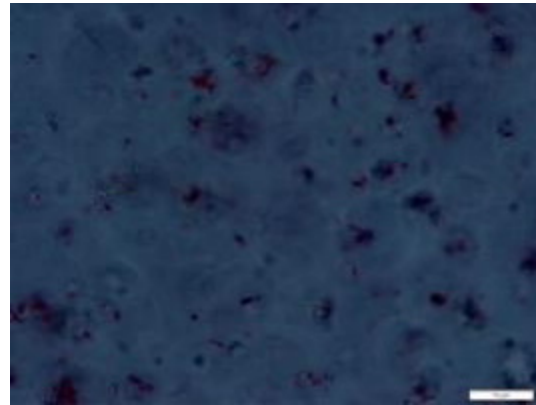
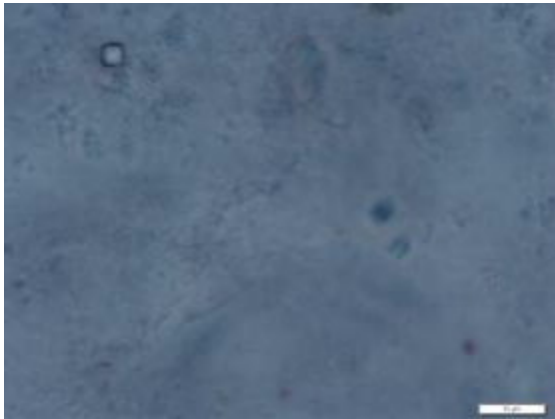


相差条件下观察1000x

发酵果蔬汁饮料中沉淀物分析

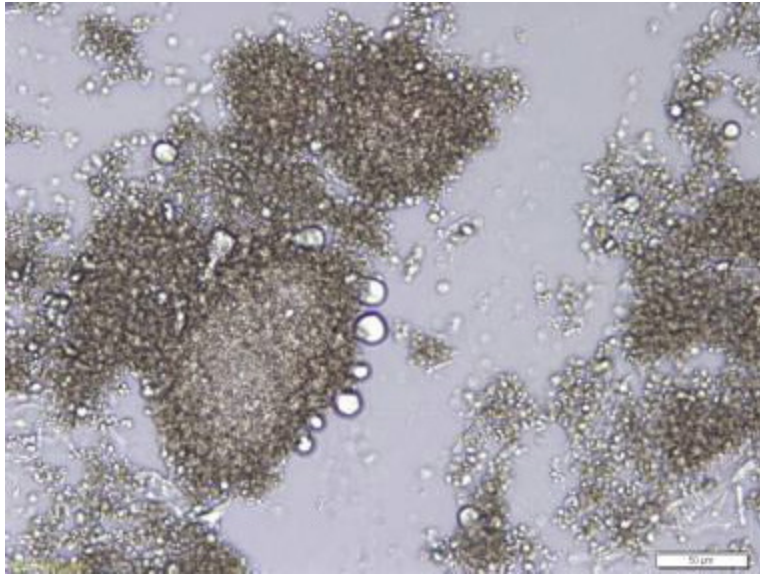


- 出现的白色沉淀情况分析主要是菌体情况

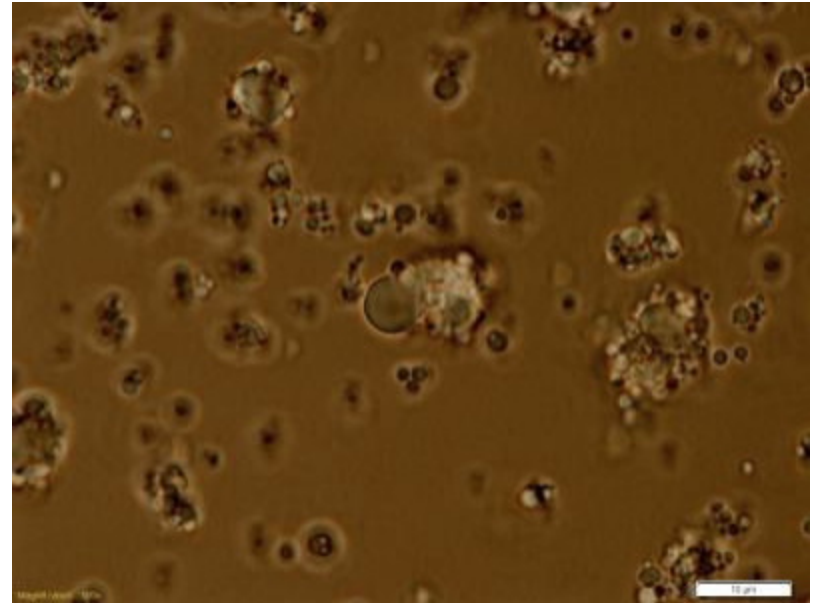


- 出现的红色沉淀情况分析主要是菌体和胡萝卜色素聚集的情况

椰子汁饮料开发过程中的应用

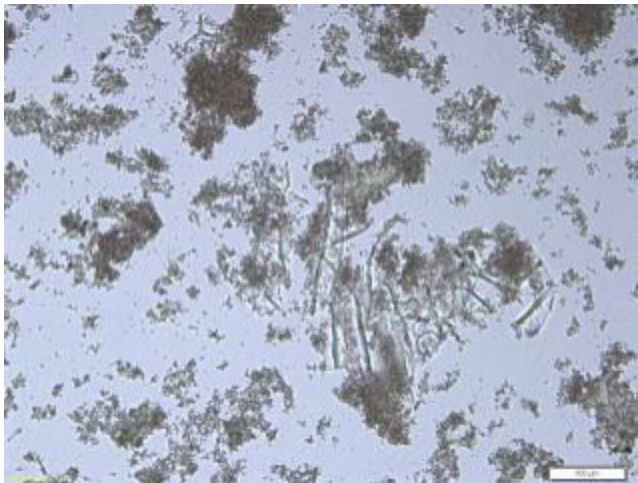


椰子原浆200X

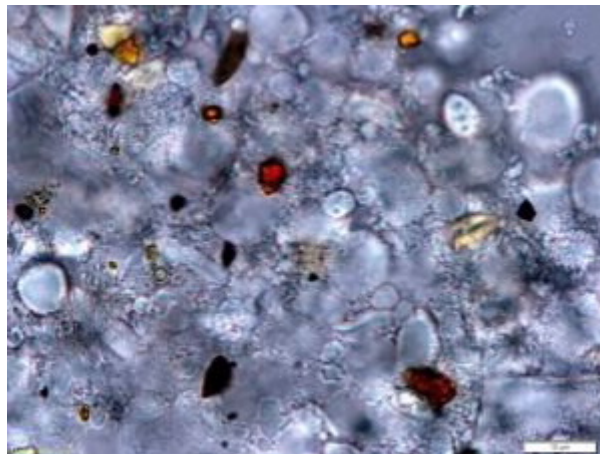


椰子汁乳化均匀后1000X

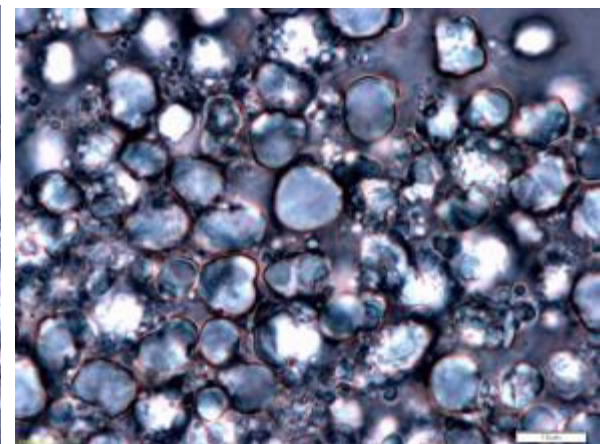
椰子汁样品的沉淀物样品分析



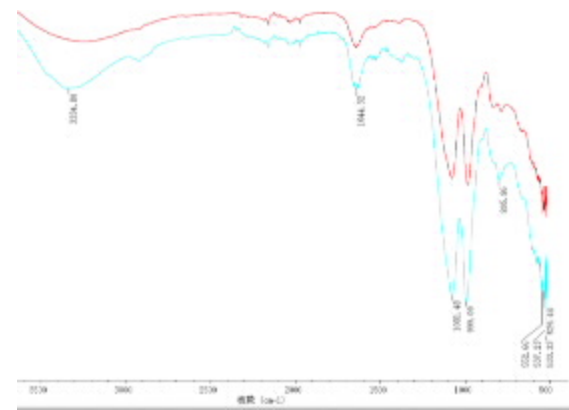
椰子汁果肉细
胞200x



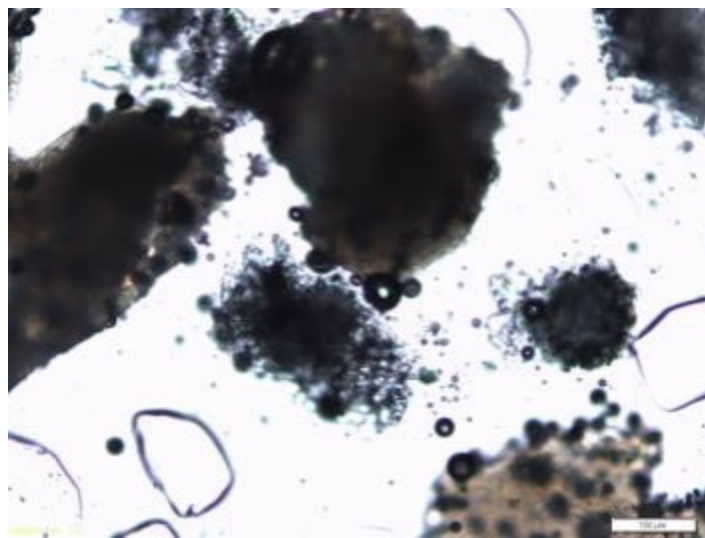
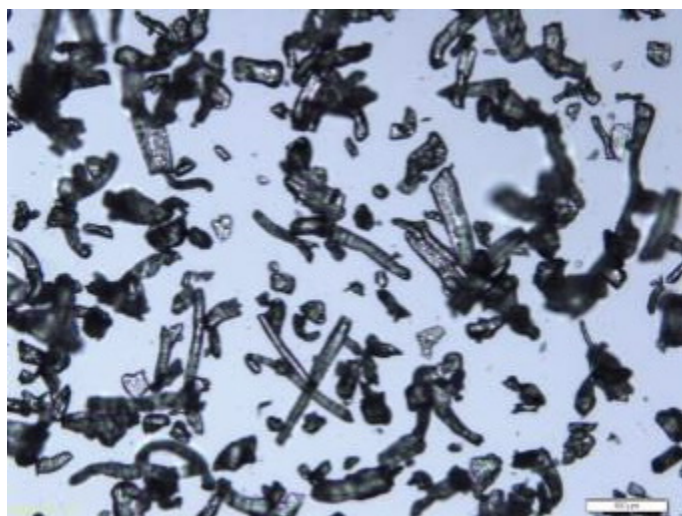
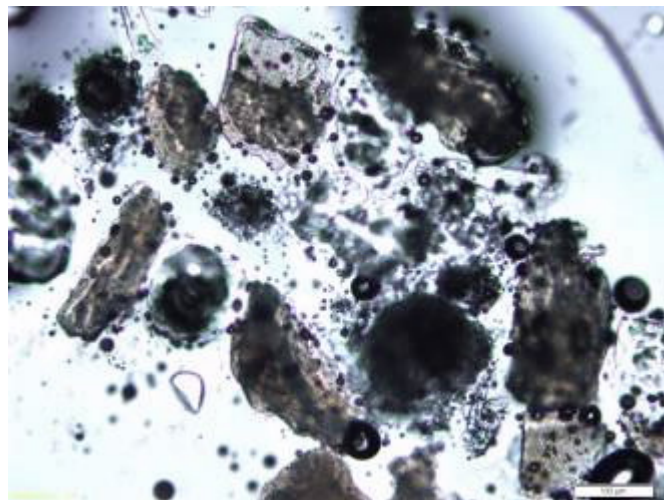
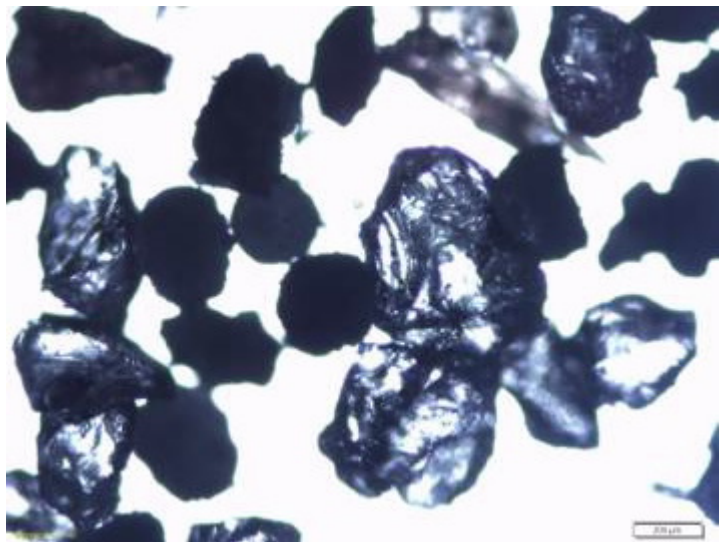
椰子汁黑色杂质情
况1000x



椰子汁中植酸钙
镁1000x



复合型固体粉末等解析应用



结论

- 通过开展显微结构的研究能显著提高我们对食品的认知和提高我们开发产品的能力
- 食品的质构状况均存在内在的显微特性结构
- 通过充分对显微结构的研究，能有利于新的结构构建，建立良好的乳化稳定体系
- 食品微结构研究能协助解决工艺等过程中出现的复杂问题如结焦，悬浮和沉淀等。

非常感谢大家的关注
敬请批评指正！