

利用低场核磁共振技术测定肌原纤维蛋白凝胶的保水性及其水分含量

李银, 李侠, 张春晖, 孙红梅, 董宪兵, 谢小雷, 王春青

(中国农业科学院农产品加工研究所, 农业部农产品加工重点实验室, 北京 100193)

摘要: 本研究借助低场核磁共振技术研究蛋白凝胶的保水性及水分含量, 并通过传统干燥法进行验证。结果表明: 通过低场核磁共振测定肌原纤维蛋白凝胶的横向弛豫时间 T_2 , 研究凝胶中结合水、不易流动水和自由水 3 种状态水的组成及分布, 自由水百分含量越高, 其保水性越低, 总水分含量越高; 借助核磁共振成像得到凝胶中水分子氢质子密度图谱可直观反映凝胶的水分含量及空间分布情况, 质子密度图灰度值越高, 凝胶水分含量越高; 传统干燥法的测定结果结合相关性分析表明低场核磁共振测得凝胶的不易流动水、自由水及灰度值与传统干燥法测得凝胶总水分含量相关系数分别为 0.96、0.96、0.97, 且均达到显著水平 ($p < 0.05$)。综上所述, 低场核磁共振技术能用于研究肌原纤维蛋白凝胶的保水性及其水分含量。

关键词: 肌原纤维蛋白凝胶; 低场核磁共振; 核磁共振成像; 保水性; 水分含量

文章编号: 1673-9078(2013)11-2777-2781

Water-holding Capacity and Water Content of Myofibrillar Protein Gel by Low-field Nuclear Magnetic Resonance

LI Yin, LI Xia, ZHANG Chun-hui, SUN Hong-mei, DONG Xian-bing, XIE Xiao-lei, WANG Chun-qing

(Institute of Agro-Products Processing Science & Technology, CAAS/Comprehensive Key Laboratory of Agro-Products Processing, Ministry of Agriculture, Beijing 100193, China)

Abstract: Low-field nuclear magnetic resonance (NMR) and traditional drying method were analyzed to determine water holding capacity (WHC) and water content of myofibrillar protein (MP) gel. The results showed that determination of the spin-spin relaxation time (T_2) of MP gel could reflect the compositions and distributions of the three states of water (bound water, immobile water and free water) in MP gel. The higher the free water percentage, the lower the WHC and the higher the water content. The proton density images of MP gels were obtained by magnetic resonance imaging (MRI), which could reflect the content and spatial distribution of water in MP gels. The higher the grey value of proton density image, the higher the water content of MP gel. Pearson's correlation analysis showed that the grey value, the contents of immobile and free water that measured by low-field NMR were significantly correlated with the results that measured by the traditional drying methods ($p < 0.05$), and the correlation coefficient were 0.97, 0.96 and 0.96, respectively. In conclusion, the low-field NMR technique can be used to determine WHC and water content of MP Gel.

Key words: myofibrillar protein gel; low-field nuclear magnetic resonance; magnetic resonance imaging; water-holding capacity; water content;

肌原纤维蛋白 (Myofibrillar protein, MP) 是肌肉中最重要的一类功能性蛋白, 主要包括肌球蛋白、肌动蛋白、肌球蛋白、原肌球蛋白和肌钙蛋白等, 在热诱导作用下这类蛋白可以形成三维网络结构的凝胶, 其凝胶特性的好坏决定着产品的产量、脂肪含量、质构及保水性 (water holding capacity, WHC) [1]。

收稿日期: 2013-07-14

基金项目: 国家自然科学基金(31271902, 31371797, 31301511); 农业(行业)科技专项 (200903012, 201303082, 201303083)

通讯作者: 张春晖 (1971-), 男, 博士, 研究员, 肉类科学研究

通常凝胶特性包括凝胶强度、质构特性及保水性等, 其中凝胶保水性是凝胶最重要的品质之一, 其会影响凝胶硬度、保油性及微观结构等其它凝胶特性[2]。通常凝胶保水性的测定都是采用离心法来评价, 即把待测凝胶样品放入离心管, 称量离心后水的挤出量。然而这种方法存在一定缺陷, 即测量过程中凝胶和水直接接触, 离心完成后凝胶可能会重新吸水而造成试验误差, 而且通过扫描电镜观察发现离心会破坏凝胶的微观结构。近年来, 低场核磁共振 (low-field nuclear magnetic resonance, NMR) 作为一种新型的无损检测

方法被用于测定肌肉中的水分状态、分布及组成^[1]。由于测定方便快捷,并且对样品无损害,因此近年来也被广泛用于测定大豆中的水分状态及分布,牛肉干干燥过程中水分迁移规律等^[4-5];核磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)作为一种无损检测技术,能测定得到样品的氢质子密度与分布图,从而反映样品中的水分分布及含量^[6],有报道其能用于测定土豆中水分的空间分布及预测石榴的黑心病发病率等^[7-8]。目前用低场核磁共振技术研究蛋白凝胶的保水性及其水分含量的报道较少,因此,本文旨在研究低场核磁共振技术在测定蛋白凝胶保水性及其水分含量中的应用,为其在蛋白凝胶及凝胶类制品中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

实验用新鲜猪背最长肌(*longissimus*)肉样由北京五肉联有限公司提供,用于提取肌原纤维蛋白。实验所有试剂均最低为分析纯。乙二醇-双-(2-氨基乙醚)四乙酸(EGTA)购于美国 AMRESKO 公司;哌嗪-N,N'-2-乙磺酸(PIPES)及牛血清蛋白(BSA)购于美国 Sigma 公司;其它试剂均购于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 主要仪器与设备

CR22GII 高速冷冻离心机,日本日立公司;UV-1800 紫外可见分光光度计,日本岛津公司;Blender 7012G 搅拌机,美国 Waring 公司;电子天平,赛多利斯科学仪器,北京,有限公司;PHS-3C 雷磁 pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司;TXF200-S12 可编程恒温循环水浴锅,英国 Grant 公司;PQ-001 核磁共振仪,上海纽迈电子科技有限公司;MINI MR-60 核磁共振成像仪,上海纽迈电子科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 肌原纤维蛋白提取

参考李银等^[9]的方法从猪背最长肌中分离提取肌原纤维蛋白,将切碎的肉块与 4 倍体积的分离缓冲液(0.1 mol/L NaCl、10 mmol/L Na₃PO₄、2 mmol/L MgCl₂、1 mmol/L EGTA, pH 7.0)混合匀浆后离心(4 °C, 2000 g, 15 min),所得沉淀再重复洗涤,离心两次。随后再按上述操作作用 4 倍体积 0.1 mol/L NaCl 溶液洗涤,离心两次,并在最后一次离心前用两层纱布过滤再用 0.1 mol/L HCl 溶液将其 pH 调至 6.0,最后得到的蛋白膏于 4 °C 保藏,并在 24 h 之内用于分

析。蛋白质浓度用双缩脲法测定,采用牛血清蛋白作为标准蛋白。

1.3.2 凝胶制备

参考李银等的方法^[9]将提取的肌原纤维蛋白用含有 0.6 mol/L NaCl, 15 mmol/L 的 PIPES 缓冲液(pH 值 6.0)将其浓度调至 30 mg/mL 后,分别称取 5.0 g 的蛋白液于直径约 22mm,高度约 70 mm 的带盖色谱瓶中,在程序升温水浴锅中以 1 °C/min 线性升温速率从 20 °C 加热至 75 °C,并于 75 °C 保温 20 min 后,立即取出冷水浴后,于 4 °C 冰箱中放置 24 h 后,进行后续指标测定。

1.3.3 横向弛豫时间 T₂ 测定

将制得的蛋白凝胶分别于 500 r/min、1500 r/min、2500 r/min 条件下离心 10 min,去除离出的水分后用于核磁分析,同时将未经离心处理的蛋白凝胶作为空白对照。参考吴焯等^[10]的方法并稍加修改,采用低场 NMR 弛豫测定凝胶样品的横向弛豫时间 T₂。测定条件:质子共振频率为 22.6 MHz,测量温度为 32 °C。将在色谱瓶中形成的凝胶去除瓶盖及离心去掉的水分后直接放入直径 25 mm 核磁管中,随后立即放入 PQ-001 核磁共振仪中进行分析。测量参数为:τ-值(90°脉冲与 180°脉冲之间的时间)为 200 μs,重复扫描 4 次,重复间隔时间为 1000 ms,得到 8000 个回波,所得 CPMG 指数衰减曲线采用仪器自带的 MultiExp Inv Analysis 软件进行反演得到 T₂ 图谱,对各峰面积进行累计积分得到峰面积记为 P₂₁、P₂₂ 及 P₂₃,它们分别代表 T₂₁、T₂₂ 及 T₂₃ 三个组分水的百分含量。

1.3.4 核磁共振成像

参考 Liu^[11]的方法并稍加修改采用核磁共振成像(MRI)测定蛋白凝胶的质子密度图谱。将在色谱瓶中形成的凝胶去除瓶盖及离心去掉的水分后直接放入直径 60 mm 核磁管中,随后放入 MINI MR-60 核磁共振成像仪中进行成像分析。通过 MSE 成像序列得到凝胶的质子密度成像,测定条件为:重复等待时间(TR)=800 ms,回波时间(TE)=18.2 ms,中心频率(SF)=23.319 MHz,纵向视野宽度=50 mm,横向视野宽度=50 mm。通过拉莫尔定律: $v=\gamma B_0/2\pi$ 选择成像层面,通过信噪比及图像清晰度调节,本实验凝胶成像层面为四层,每层厚度为 1.8 mm,各层之间的间隔为 0.5 mm,得到的成像图谱由 8 次扫描重复累加而成。得到的质子密度图通过纽迈公司提供的 Image Evaluation 软件测定图像的灰度值。

1.3.5 凝胶水分含量测定

参考 GB/T 5009.3-2010 方法将蛋白凝胶直接放入 105 °C 烘箱中烘干至恒重,测定烘干前后样品的质量,

计算蛋白凝胶水分含量。

1.3.6 数据处理

采用 SAS 9.2 软件进行方差分析,采用多重比较分析法进行显著性分析。所有实验除核磁共振成像外其它均最少为 3 次重复,结果均表示为“平均值±标准差”。

2 结果与讨论

2.1 凝胶弛豫时间 T₂

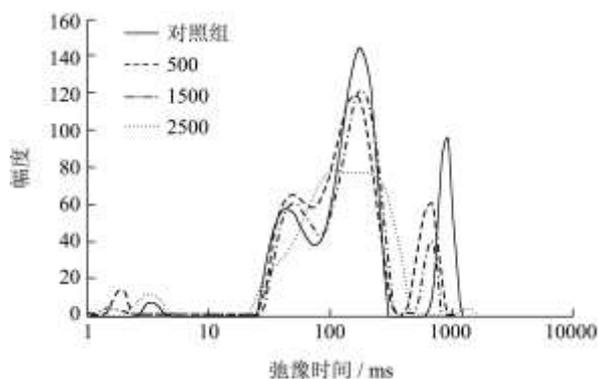


图 1 凝胶 T₂ 弛豫时间

Fig.1 T₂ of MP gels

表 1 凝胶中 3 种状态水的百分含量

Table 1 Percentages of three states of water in MP gels

转速/(r/min)	P ₂₁ /%	P ₂₂ /%	P ₂₃ /%
对照组	1.10±0.19 ^b	85.49±2.71 ^b	13.40±2.52 ^a
500	1.26±0.50 ^b	87.65±0.864 ^b	10.59±1.08 ^a
1500	1.49±0.07 ^b	93.10±0.54 ^a	5.41±0.61 ^b
2500	3.20±0.37 ^a	96.44±0.54 ^a	0.37±0.14 ^c

注: ^{a-c} 同一列的不同字母表示差异显著 (p<0.05)。

从肌原纤维蛋白凝胶的 T₂ 图谱可以看出(图 1),蛋白凝胶的 T₂ 在 1~10000 ms 弛豫时间内分布有 4 个峰,其中第 1 个峰代表凝胶中结合水 T₂₁;而第 2 个峰为第 3 个峰的肩峰,此部分 2 个峰代表凝胶中不易流动水 T₂₂,第 4 个峰代表凝胶中的自由水 T₂₃^[12]。其中 T₂₁ 为 1~10 ms, T₂₂ 为 10~600 ms 之间, T₂₃>600 ms, Diop 等用低场核磁得到的天然玉米淀粉凝胶 T₂ 图谱的 T₂₁ 也为 1~10 ms,而 T₂₃ 则出现在 352.11 ms 左右^[13], T₂ 数值上的差异可能是由于样品组成、核磁共振设备及测量参数的差异造成^[14]。各峰与横坐标面积百分比为各组分水所占百分含量,分别记为 P₂₁, P₂₂, P₂₃ (表 1)。从表 1 中结果可看出,当转速低于 500 r/min 时,离心对凝胶中水分影响不显著 (p>0.05);当转速达到 1500 r/min 时, P₂₂ 显著增加, P₂₃ 显著下降 (p<0.05);当转速达到 2500 r/min 时, P₂₁ 显著增加, P₂₃ 显著下降 (p<0.05)。这表明,当转速低于 500 r/min 时,由

于转速较小,凝胶中极少一部分的自由水被除去,但未达到显著水平 (p>0.05);当转速达到 1500 r/min 时,蛋白凝胶中的自由水被部分除去,从而导致不易流动水的相对百分含量显著增加 (p<0.05),结合水相对含量也增加,但未达到显著水平 (p>0.05);当转速达到 2500 r/min 时,蛋白凝胶中的自由水被大量除去,导致凝胶中结合水和不易流动水相对百分含量均显著增加 (p<0.05)。

自由水是蛋白凝胶中结合最不紧密的水,也是离心等外界处理最易除去的水,该部分水相对百分含量越高则离心等处理时凝胶损失的水越多,蛋白凝胶的保水性也越低。天然状态下,肌原纤维蛋白凝胶中自由水含量大致为 13.4%,当凝胶中自由水百分含量低于此值时,则表明蛋白凝胶中自由水已遭到损失。因此,可以通过低场核磁技术测定蛋白凝胶 T₂ 值分析蛋白凝胶中 3 种状态水的分布及组成,从而预测凝胶的保水性及其水分含量。同样,通过低场核磁技术测定凝胶类制品贮藏过程中 T₂ 值的变化,可以推测贮藏过程中凝胶类制品保水性及其水分含量的变化,从而预测凝胶制品的品质。

2.2 凝胶核磁共振成像

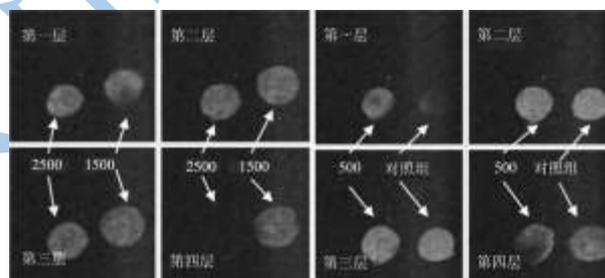


图 2 凝胶质子密度图

Fig.2 Proton density images of gels

核磁共振成像是一种无损检测的新方法,能得到样品内部的质子密度图,反映样品中氢质子的分布,通常氢质子越密集的区域,质子密度图谱越亮,表明该区域水分含量越高,因此通过测定图谱的灰度值可以反映样品的水分含量^[7-8,14]。本研究中测定质子密度成像时,成像层面选定为四层(图 2),第一层和第四层反映凝胶样品表面区域的质子密度分布,第二层和第三层反映凝胶中间区域的质子密度分布,四层质子密度成像图为一组,对应一个凝胶样品 4 个层面的氢质子分布。第一组图左侧为 2500 r/min 离心后的蛋白凝胶,右侧为 1500 r/min 离心后的蛋白凝胶,第二组图左侧为 500 r/min 离心后的蛋白凝胶,右侧为对照组蛋白凝胶(如图 2 所示)。

从图 2 可看出,四个样品凝胶中间区域(第二层

和第三层)亮度均高于凝胶表层区域(第一层和第四层),这表明蛋白凝胶中间区域水分含量高于表层。由于凝胶样品并非规则的圆柱型,导致表层成像不规则,因此,核磁共振成像图谱中第二层和第三层的成像更具可比性。观察图谱可看出随着转速的增大,凝胶中心区域的亮度逐渐下降,即凝胶水分含量下降,这表明凝胶中的水分被离心逐渐除去,转速越大,被除去的水分越多。

测定图像灰度值可直观反映样品的水分含量,图像越亮灰度值越大,表明样品含水量越高。通过仪器自带的 Image Evaluation 软件测得图 2 中四个样品第三层的灰度值依次分别为: 23、24、26、27,即转速越大蛋白凝胶灰度值越小,这表明随着转速的增大,蛋白凝胶的水分含量不断减少。因此,通过核磁共振成像测定蛋白凝胶质子密度图也能直观反映凝胶中水分含量的多少及离心过程中凝胶水分的变化。

2.3 凝胶水分含量

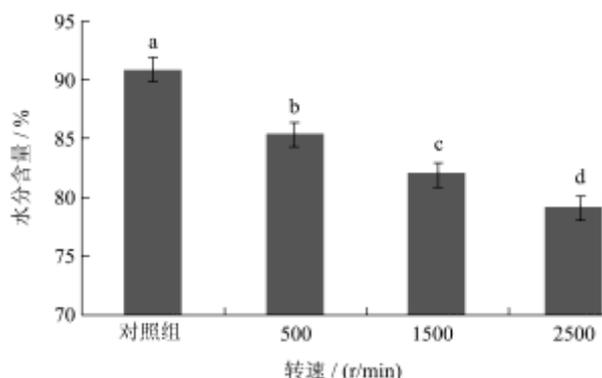


图 3 凝胶水分含量

Fig.3 Water content of gels

为研究低场核磁技术能否成功测定肌原纤维蛋白凝胶保水性及其水分含量,本研究同时采用传统烘干法测定不同离心处理后蛋白凝胶的水分含量,从图 3 结果可以看出,离心后凝胶总水分含量下降,而且转速越大,离心挤出水分越多,则所得蛋白凝胶水分含量越低。蛋白凝胶中的结合水是与蛋白质大分子紧密结合或参与大分子组成的那部分水,烘干法无法除去这部分水。因此,通过烘干法测定的水分含量为蛋白凝胶中自由水与不易流失水的总含量。上述蛋白凝胶 T_2 值测定结果表明,离心会除去蛋白凝胶中的自由水,当转速不断增大,一部分不易流动水“态变”为自由水,并最终被离心除去,从而导致蛋白凝胶水分含量不断下降,且转速越大,离心时挤出水分越多,凝胶保水性越低(表 1);凝胶质子密度图谱灰度值不断下降也表征蛋白凝胶水分含量下降(图 2)。即通过传统的烘干法测定的蛋白凝胶水分含量与低场核磁技

术测得的结果相吻合,进而验证低场核磁技术可以用于测定蛋白凝胶及凝胶制品的保水性及其水分含量。

2.4 相关性分析

表 2 各指标之间的相关性分析

Table 2 Correlation analysis among indices

	转速	水分含量	P ₂₁	P ₂₂	P ₂₃	灰度
转速	1.0	-0.95*	0.91	0.99*	-0.99**	-0.99*
水分含量		1.0	-0.79	-0.96*	0.96*	0.97*

注: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

为进一步研究低场核磁技术能否正确测定蛋白凝胶的保水性及其水分含量,对低场核磁测定的结果与传统干燥法测定结果进行相关性分析(表 2),结果显示, P_{21} 代表的凝胶中结合水的含量与干燥法测定的水分含量之间的相关性较小,且不显著($r = -0.79$, $p > 0.05$); P_{22} (不易流动水百分含量)与凝胶总水分含量显著负相关($r = -0.96$, $p < 0.05$); P_{23} (自由水百分含量)与凝胶总水分含量显著正相关($r = 0.96$, $p < 0.05$);灰度值与凝胶总水分含量显著正相关($r = 0.97$, $p < 0.05$)。

由于 P_{21} 代表蛋白凝胶中与蛋白质大分子结合紧密的结合水,该部分水所占比例极小($P_{21} < 4\%$),通常离心或烘干均不易被除去,因此其与传统干燥法测得的水分含量间相关性不大; P_{22} 和 P_{23} 代表的自由水和不易流动水是蛋白凝胶的主要组成水,也是离心或烘干时较易流失的水,其能较好的反应蛋白凝胶的离心保水力及其水分含量,因此其与传统干燥法测得的水分含量显著相关;核磁成像测得的灰度值直观反映蛋白凝胶的总体水分分布及含量,其与传统干燥法测得的水分含量也显著相关。这表明,低场核磁技术可以准确的测定蛋白凝胶的水分组成、分布及其含量。

3 结论

3.1 通过以上研究发现,通过测定低场核磁 T_2 值可以反映肌原纤维蛋白凝胶的水分状态和组成,结合低场核磁共振成像技术测定蛋白凝胶的质子密度可以反映蛋白凝胶的水分分布,从而综合分析肌原纤维蛋白凝胶保水性和凝胶中的水分组成、分布及含量。同时与传统干燥法的测定结果进行对比分析发现低场核磁共振技术与传统技术的测定结果高度吻合;相关性分析结果也显示,低场核磁技术测定结果与传统烘干法测定结果存在显著相关性。

3.2 综上所述,低场核磁共振技术可以方便、快捷、准确、无损的测定肌原纤维蛋白凝胶的保水性,水分组成、分布及含量。因此,本研究为低场核磁共振技

术在蛋白凝胶及凝胶类制品中的应用提供了理论依据。

致谢：感谢上海纽迈电子科技有限公司黄柏林工程师对本研究中低场 NMR 提供的支持和帮助。

参考文献

- [1] Liu G, Xiong Y L, Butterfield D A. Chemical, physical and gel-forming properties of oxidized myofibrils and whey- and soy-protein isolates [J]. *Food Chemistry and Toxicology*, 2000, 65(5): 811-818
- [2] Puolanne E, Halonen M. Theoretical aspects of water-holding in meat [J]. *Meat Science*, 2010, 86: 151-165
- [3] Bertram H C, Schafer A, Rosenfold K, et al. Physical changes of significance for early post mortem water distribution in porcine *M. longissimus* [J]. *Meat Science*, 2004, 66: 915-924
- [4] Chen F L, Wei Y M, Zhang B. Characterization of water state and distribution in textured soybean protein using DSC and NMR [J]. *Journal of Food Engineering*, 2010, 100 (3): 522-526
- [5] Li X, Ma L Z, Tao Y, et al. Low field-NMR in measuring water mobility and distribution in beef granules during drying process [J]. *Advanced Materials Research*, 2012, 550: 3406-3410
- [6] Ruan R S, Litchfield B. Determination of water distribution and mobility inside maize kernels during steeping using magnetic resonance imaging [J]. *Cereal Chemistry*, 1992, 69(1): 13-17
- [7] Thybo A K, Andersen H J, Karlsson A H, et al. Low-field NMR relaxation and NMR-imaging as tools in differentiation between potato sample and determination of dry matter content in potatoes [J]. *Swiss Society of Food Science and Technology*, 2003, 36: 315-322
- [8] Zhang L, McCarthy M J. Black heart characterization and detection in pomegranate using NMR relaxometry and MR imaging [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2012, 67: 96-101
- [9] 李银,李侠,张春晖,等.羟自由基导致肉类肌原纤维蛋白氧化和凝胶性降低[J].*农业工程学报*,2013,29(12):286-292
- [10] Li Y, Li X, Zhang C H, et al. Oxidation and decrease of gelling properties for meat myofibrillar protein induced by hydroxyl radical [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2013, 29(12): 286-292
- [10] 吴焯,许柯,徐幸莲,等.低场核磁共振研究pH值对兔肌球蛋白热凝胶特性的影响[J].*食品科学*,2010,31(9):6-11
- [11] Wu Y, Xu K, Xu X L, et al. Effect of pH on gelation properties of rabbit myosin [J]. *Food Science*, 2010, 31(9): 6-11
- [11] Liu J J, Zhu K K, Ye T, Wan S L, et al. Influence of konjac glucomannan on gelling properties and water state in egg white protein gel [J]. *Food Research International*, 2013, 51: 437-443
- [12] Goetz J, Koehler P. Study of the thermal denaturation of selected proteins of whey and egg by low resolution NMR [J]. *Food Science and Technology*, 2005, 38 (5): 501-512
- [13] Diop C I K, Li H L, Chen P, et al. Properties of maize starch modified by ball milling in ethanol medium and low field NMR determination of the water molecular mobility in their gels [J]. *Journal of Cereal Science*, 2012, 56: 321-331
- [14] Yang H, Ding L, An L, et al. Ad-f heteronuclear complex for dual-mode phosphorescence and magnetic resonance imaging [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(33): 8591-8599