

低场 NMR 研究 pH 对肌原纤维蛋白热诱导凝胶的影响

韩敏义^{1,2}, 费英¹, 徐幸莲¹, 周光宏¹

(¹南京农业大学国家肉品质量安全控制工程技术研究中心, 南京 210095; ²河北科技大学生物科学与工程学院, 石家庄 050018)

摘要:【目的】探讨 pH 对猪肉肌原纤维蛋白热诱导凝胶保水性及水的移动性影响。【方法】从猪肉中提取肌原纤维蛋白, 用低场 NMR (nuclear magnetic resonance) 研究 pH 对肌原纤维蛋白热诱导凝胶中水的 T₂ 弛豫性质的影响。同时用离心法测量 pH 对肌原纤维蛋白凝胶保水性 (water holding capacity, WHC) 影响。【结果】NMR 结果拟合后得到水有 4 个组分, 合并为对应水的 3 种状态即不可移动水、可移动水和自由水。随着 pH 升高, pH 偏离肌原纤维蛋白的等电点 (pI), 代表可移动水的 T₂ 弛豫时间显著增加, 其所占峰的面积和凝胶的 WHC 也随之增加。主成分分析结果发现, 处于等电点附近的样品在样品评分图上与其它 pH 样品显著不同。【结论】凝胶保水性的增加主要是可移动水的增加, 凝胶 WHC 增加的原因可能是肌原纤维凝胶后孔径增加, 从而可以容纳更多的水。

关键词: 猪肉肌原纤维蛋白凝胶; 保水性; 弛豫; pH

Heat-Induced Gelation of Myofibrillar Proteins as Affected by pH—A Low Field NMR Study

HAN Min-yi^{1,2}, FEI Ying¹, XU Xing-lian¹, ZHOU Guang-hong¹

(¹ National Center of Meat Quality of Safety Control, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095;

² College of Bioscience and Bioengineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018)

Abstract: 【Objective】 The objective of this study is to discuss the effect of pH on the water holding capacity (WHC) and water mobility of pork myofibrillar protein heat-induced gelation. 【Method】 Myofibrillar proteins were extracted from porcine muscle, and their heat-induced gelation water properties were characterized using low-field nuclear magnetic resonance (NMR) T₂ relaxometry. The WHC of the system was determined by centrifugation method. 【Result】 The NMR data was fitted to four components, which were merged into three states of water, i.e. immobile, mobile and free water. T₂ relaxation time, peak area, and WHC which attribute to mobile water increased as pH away from pI, the principal components analysis result showed that the sample near pI clustered differently from others. 【Conclusion】 Improvement of WHC could be ascribed to the increasing of the mobile water, and the possible increase of the myofibrillar protein gel network pore diameter may leads to more water could be entrapped.

Key words: pork myofibrillar protein gel; water holding capacity (WHC); relaxation; pH

0 引言

【研究意义】肌原纤维蛋白在肉类加工过程中起很重要的作用, 它的一个重要性质是在加热后形成凝胶, 凝胶的形成不仅与肉制品黏聚性和良好的质构有关^[1], 而且对产品赋形, 保留产品的水分起重要作用^[2]。蛋白质凝胶受其理化性质的影响, 例如蛋白质浓度、

加热温度和时间、离子强度和 pH^[3], 同时受其它添加剂的影响, 如转谷氨酰胺酶^[4], 多聚磷酸盐等^[5-6]。研究证实, pH 影响肉的保水性^[7-8], 而且一般认为 pH 是控制肉保水性的一个关键因子^[9], pH 对保水性影响的作用机理是它对于肌原纤维蛋白静电荷的影响^[10]。肌原纤维蛋白的等电点 (pI) 约为 5.2, 当 pH 偏离其等电点后, 保水性会增加^[11]。增加的原因是 pH 偏离等

收稿日期: 2008-09-12; 接受日期: 2008-11-05

基金项目: 国家“973”计划 (2006CB70821)、国家自然科学基金项目 (30771526)

作者简介: 韩敏义 (1975—), 男, 河北无极人, 讲师, 博士研究生, 研究方向为肉品加工与质量控制。Tel: 025-84395939; Fax: 025-84395939; E-mail: redleafnew@126.com。通信作者徐幸莲 (1962—), 女, 江苏吴江人, 教授, 研究方向为肉品加工与质量控制。Tel: 025-84395939; Fax: 025-84395939; E-mail: xlxu@njau.edu.cn

电点后, 肌原纤维蛋白的正电荷或负电荷会增加, 形成更多的和周围水分子结合的氢键结合位点, 静电荷的增加也会造成肌丝的相互排斥, 使肌原纤维蛋白膨胀, 从而使更多的水保留其中^[12-13]。然而在纯化的肌原纤维蛋白热诱导凝胶体系中, 由于肌球蛋白的提取, 肌原纤维的结构被破坏, 肌原纤维的膨胀不再是保水的主要原因, 加热形成的三维凝胶网络结构取而代之, 网状结构依靠毛细管力把水保留在凝胶网孔中, 研究证明, pH 会影响凝胶的微观结构^[14]。【前人研究进展】NMR 在化学和生物研究中是一个不可多得的研究工具。NMR 是用频率为兆赫数量级的、能量极低的电磁波照射分子, 使电磁波能与暴露在强磁场中的磁性核相互作用, 引起磁性核在外磁场中发生磁能级的共振跃迁而产生吸收信号。这种核射频区电磁波的吸收称 NMR^[15]。NMR 根据分辨率可以分为高分辨率 (即高场) 和低分辨率 (即低场) 两种类型。前者探测样品的化学性质, 后者探测样品的物理性质, 例如在低场 ^1H NMR 中检测样品中水的状态。低场 NMR 可以用无损的方法研究水的移动性和分布, 国外报道了用 NMR 弛豫研究鲜猪肉的持水性及含水量和脂肪含量^[16-22], 从肌肉到食用肉的转化^[23-24], 烹调过程中水性质的变化^[25], 肉的结构与肌节长度和肌丝空间的相关关系^[26]等。【本研究切入点】在肌肉低场 NMR 测量中得到的两个主要参数是自旋-晶格弛豫时间 (用 T_1 来表示, 又称为纵向弛豫时间) 和自旋-自旋弛豫时间 (用 T_2 来表示, 又称为横向弛豫时间)。弛豫 (relaxation) 的含义为松弛、舒张, 放松。弛豫属性是自然界的固有属性, 任何物质系统中平衡时具有的状态称为平衡状态。系统在受到外界刺激或压力 (即激励) 时, 都会产生相应的系统变化 (即响应)。但当激励消失后, 系统都要恢复到原始平衡状态, 系统从激励状态恢复到原始状态的过程就叫弛豫过程。不同的系统受到不同激励回到平衡状态所需要的时间是不同的, 即弛豫有快有慢^[27]。 T_1 和 T_2 分别测量的是自旋和其环境及自旋本身的相互作用。在肉和肉制品中弛豫时间的测量中多用 T_2 来表示, 因为 T_2 变化范围较大^[28], 而且 T_2 比 T_1 对多种相态的存在更加敏感^[29], 它也可以区分不与固体颗粒相互作用或其溶剂作用的自由水和结晶水及物理化学键合的结合水或不可移动水^[29]。也有人认为 T_2 反映的是可交换的生物多聚体质子和水质子之间的化学交换以及自由水和水化水之间的化学渗透交换^[30-32]。但还没有 NMR 弛豫用于肌肉蛋白质凝胶研究中的报道。【拟解决的关键问题】本

文用低场 NMR 弛豫研究 pH 对肌原纤维蛋白热诱导凝胶中水的弛豫情况进行研究, 为肉制品的生产提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 主要试验材料与试剂

宰后 4 h 的猪肉里脊购于南京苜蓿园大街菜市场。剔除多余的脂肪和结缔组织, 切碎, 真空包装, 每袋约 100 g, 贮存于 -20°C 直到蛋白质提取。提取前肉样在 $0\sim 4^\circ\text{C}$ 解冻至少 10 h。EGTA 购于美国 Sigma 公司。Triton X100 购于美国 Amersco 公司。其它化学试剂最低为分析纯。

1.2 主要仪器与设备

Beckman Avanti J-E 冷冻离心机: 美国 Beckman Coulter 公司; Waring Blender 8010ES 高速度组织匀浆机: 美国 Waring 公司; Ultra Turrax T25 BASIS 高速匀浆器: 德国 IKA 公司; pH 211 台式酸度计: 葡萄牙 HANNA 公司; PQ001 台式 NMR 分析仪: 上海纽迈电子有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 肌原纤维蛋白的提取及凝胶的制备 肌原纤维蛋白的提取根据 Doerscher 等的方法^[33], 并根据 Goll 等的方法进行改进^[34]。100 g 解冻的肌肉用 Waring Blender 均浆后, 加入 4 倍体积的僵直提取缓冲液 (100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris, 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, pH 8.3)。均质的溶液 1 000 \times g 离心 20 min 收集沉淀。而后把沉淀分散在 4 倍体积的标准盐溶液 (standard salt solution, SSS) (100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGTA, 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaN_3 , pH 7.0), 而后 1 000 \times g 离心 10 min 收集沉淀, 重复 3 次, 在 2 次离心之间用 Ultra Turrax T25 高速分散器分散约 30 s。沉淀重新分散在 4 倍体积的 SSS 含 1% Triton X-100, 而后 1 500 \times g 离心 10 min 收集沉淀, 重复 2 次。而后沉淀加入 4 倍体积 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, 重复 2 次。最后沉淀加入 4 倍体积 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 1 500 \times g 离心 10 min 收集沉淀, 得到纯化的肌原纤维蛋白。蛋白质浓度用双缩脲法测定^[35], 使用牛血清蛋白作为标准蛋白, 提取的肌原纤维蛋白在 24 h 内用完。

用 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 HCl 或 NaOH 把肌原纤维蛋白 (浓度为 40 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 溶于 0.6 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液中, pH 6.0) 的 pH 调到 5.5、6.0、6.5、7.0, 而后搅拌 5 min, 置于水浴锅内, 从 25°C 开始, 以 $1^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度升到 70°C , 而后在 70

℃保温 20 min。保温结束后,肌原纤维蛋白凝胶样品立即放到 0~4℃冰箱或冰浴中放置过夜,然后进行 NMR 弛豫和 WHC 的测定。

1.3.2 NMR 自旋-自旋弛豫时间 (T_2) 测量 测试条件为:质子共振频率为 22.6 MHz,测量温度为 32℃。约 2 g 的样品放入直径 15 mm 的核磁管,而后放入分析仪中。自旋-自旋弛豫时间 T_2 用 CPMG 序列进行测量^[36-37]。所使用的参数为: τ -值(90°脉冲和 180°脉冲之间的时间)为 200 μ s。重复扫描 32 次,重复间隔时间为 6.5 s 得到 12 000 个回波,得到的图为指数衰减图形,每个测试 4 次重复。

1.3.3 NMR T_2 数据的处理 NMR 弛豫测量得到的图为自由诱导指数衰减曲线,其数学模型为:

$$A(t) = \sum [A_0 i \exp(-t/T_{2i})] \quad (1)$$

式(1)中, $A(t)$ 为衰减到时间 t 时的幅值大小, A_0 为平衡时的幅值大小。 T_{2i} 为第 i 个组分的自旋-自旋弛豫时间。CPMG 指数衰减曲线用仪器自带的 MultiExp Inv Analysis 软件进行反演,得到 T_2 值。本软件使用综合迭代算法,结果为离散型与连续型相结合的 T_2 谱。反演的结果为生成弛豫图和各个弛豫过程的弛豫幅值、其对应时间常数(峰值)及其所占面积分数、每个峰起始时间和结束时间等。为了分析的方便,采用了弛豫图每个组分峰值对应的时间作为 T_2 ,而弛豫峰的宽度为基线上峰底的宽度。

1.3.4 保水性 (WHC) 的测量 WHC 通过 Kocher 和 Foegeding 的离心法测量^[38],肌原纤维蛋白凝胶在 0~4℃下用 10 000×g 离心 10 min,记录离心前后离心管的重量,离心出液体的重量。WHC 用公式(2)进行计算:

$$\text{WHC}(\%) = (\text{CG} - \text{ML}) / \text{CG} \times 100 \quad (2)$$

式(2)中,ML为离心过程中水分损失重量,CG为离心前凝胶的重量。每个处理 3 次重复。

1.3.5 统计分析 用 SAS 8.12 进行方差分析,如果方差分析效应显著,使用 Duncan multiple range test 进行多重比较($P < 0.05$)。用 Statistica 7 对 NMR 反演结果进行主成分分析(principal component analysis, PCA),从而在尽可能多的保留原始反演结果变异的前提下对反演结果进行降维处理。主成分(PC)的提取方法使用相关矩阵法,得到的结果为特征值、解释的方差和样品的评分图。如果 PC 的特征值大于 1,则该 PC 会被保留。为了表达的简洁,使用了 PC 系数的简化表示方法^[39]:如果 PC 系数的绝对值大于最大系数绝对值的 1/2,用“++”或“--”来表示;如果

PC 系数的绝对值小于最大系数绝对值的 1/2 而大于最大系数绝对值的 1/4 用“+”或“-”来表示。

2 结果与分析

2.1 pH 对肌原纤维蛋白凝胶 NMR T_2 弛豫时间的影响

不同 pH 下肌原纤维蛋白热诱导凝胶 NMR T_2 弛豫行为见图 1。

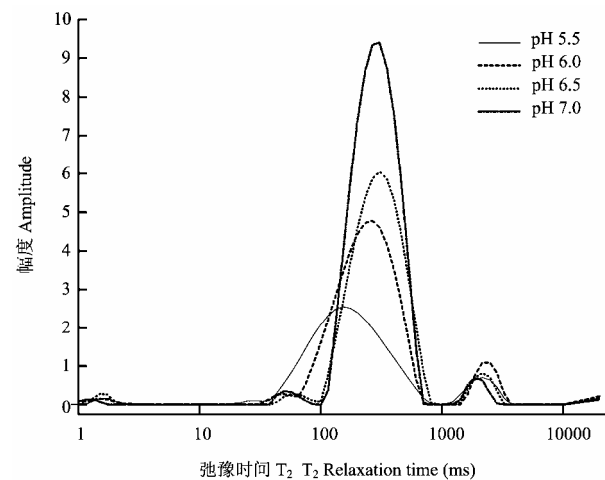


图 1 pH 对肌原纤维蛋白凝胶横向弛豫时间 T_2 的影响

Fig. 1 Effect of pH on transverse relaxation times (T_2) of myofibrillar proteins heat-induced gelation

从图 1 可以看出, T_2 弛豫的特点是在几毫秒的位置有 1 个小峰,在 27~305 ms 有大峰,在 2 s 左右的位置也有明显的成分出现。而且随着 pH 增加,主要成分明显向高的弛豫时间方向进行迁移。拟合后的肌原纤维蛋白凝胶中 NMR 弛豫图有 4 个峰,分别对应于 4 种水的状态,即不可移动水(化合水)、中度可移动水、可移动水和自由水,这与用 NMR 测量的乳清蛋白与卵蛋白中一致^[40]。但是由于前两个峰的积分面积很小所以图中不易看出。第 1 个峰的峰值随 pH 增加时变化不大($P > 0.05$),峰值 T_{21} 的范围为 1.2~1.7 ms,代表了凝胶体系中与蛋白质等大分子结合的水。第 2 和第 3 个峰总称为可移动水,随着 pH 的升高, T_{22} 和 T_{23} 都显著增加($P < 0.05$)。 T_{22} 从 27 ms 增加到 50 ms, T_{23} 从 158 增加到 305 ms (图 2)。第 4 个峰的峰值范围 T_{24} 为 1 944~2 396 ms。 T_2 随 pH 的增加而增加说明水的移动性也增加了。

2.2 pH 对肌原纤维蛋白凝胶 WHC 的影响

pH 对肌原纤维蛋白凝胶 WHC 的影响见图 3。肉

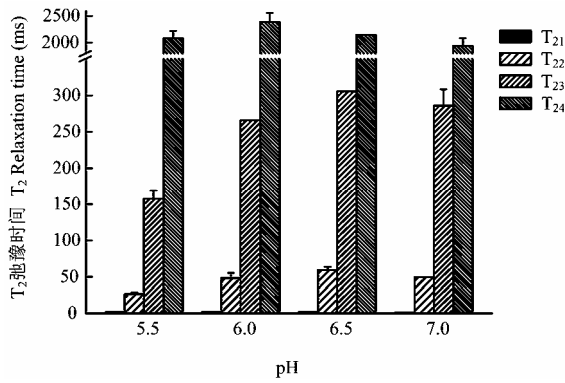


图 2 pH 对肌原纤维蛋白凝胶 T₂₂ 弛豫时间的影响

Fig. 2 Effect of pH on T₂₂ relaxation of myofibrillar protein heat-induced gelation

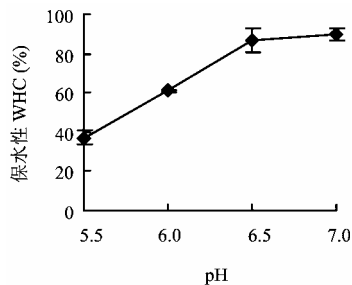


图 3 pH 对肌原纤维蛋白凝胶 WHC 的影响

Fig. 3 Effect of pH on the WHC of myofibrillar protein heat-induced gelation

的含水量约为 75%，WHC 表明了蛋白质结合水的能力，对于肉和肉制品的加工特性、产量及成本起很重要的作用^[28,41]。因此肉类工业千方百计要提高肉和肉制品的保水性。在热诱导凝胶过程中，肌原纤维蛋白中的主要成分肌球蛋白经过变性聚集而相互交联，形成有序三维网状结构把水包埋在其中。从图 3 可以看出，随着 pH 的增加，肌原纤维蛋白凝胶的保水性显著提高 ($P < 0.05$)，从 37.10% 提高到 89.77%，最大的 WHC 对应的 pH 为 7.0。肌原纤维蛋白 pH 与 WHC 的关系和肌球蛋白 pH 与 WHC 的关系类似，Liu 等的结果肌球蛋白热诱导凝胶的最低 WHC 31.2% 对应 pH 为 5.5，而最大值在 pH 7.0~9.0^[42]。用鸡胸肉的结果也证明高 pH (7.0~7.4) 比低 pH (6.4~6.8) 保留更多的水^[43]。当 pH 增加远离肌原纤维蛋白的等电点时，系统中的负电荷增加，因此凝胶网络中蛋白质分子之间会产生静电排斥，给水提供了更多的结合位点，也

增加了水化的表面积^[10]。另外从图 1 中的峰面积看，第 2 个和第 3 个峰的峰面积都随 pH 的增加而增加，分别从 1.1% 和 87.9% 增加到 2.0% 和 94.9%，因此肌原纤维蛋白凝胶保水性的增加是第 2 和第 3 个峰所代表的水的状态，这部分水统称为可移动水，这与肉的保水原理是相同的。

2.3 NMR 反演结果的主成分分析

NMR 反演结果数据量很大，包括各个弛豫过程的弛豫幅值、其对应时间常数（峰值）及其所占面积分数、每个峰起始时间和结束时间等，而且这些参数之间可能存在共线性。因此，有必要对其进行主成分分析来进行降维。因为第 1 个峰代表化合水，各个 pH 处理间没有显著差异 ($P > 0.05$)，因此只对第 2、3 和 4 个峰参数进行了主成分分析。主成分保留的标准为其特征值大于 1。表 1 为肌原纤维蛋白凝胶 NMR T₂ 反演结果的前 3 个主成分情况。前 3 个主成分可以解释变异方差的 95%，每个 NMR 反演结果变量对主成分的贡献情况见表 2，为了表达的简洁，PC 的系数用了一个简单的方法来表示^[39]，第 1 主成分主要与第 2、3 个峰的参数相关程度比较高，而这两个峰代表可移动水，因此第 1 主成分可代表可移动水。第 2 个主成分主要是与第 4 个峰呈负相关，因此可以认为第 2 主成分为自由水。图 4 为不同 pH 处理的样品主成分分析的样品评分图，根据样品在评分图上的位置可以进行比较。处于等电点附近的 pH 5.5 处理与其它 pH 明显分开，而且都处于第 1 主成分负的一端，高 pH 处理位于第 1 主成分的右端。也说明了 pH 5.5 处理组有较低的 T₂₂ 和 T₂₃。

表 1 NMR 反演结果的前 3 个主成分特征值及解释方差

Table 1 Principal component (PC) solutions of NMR inversion data

主成分 PC	特征值 Eigen value	解释方差 Variance (%)	累积解释方差 Cumulative (%)
1	7.28	60.65	60.65
2	3.098	25.76	86.41
3	1.05	8.72	95.12

3 讨论

肌原纤维蛋白对于肉的功能性质尤其是保水性和持水性具有很重要的作用。肌原纤维蛋白热诱导凝胶 NMR T₂ 弛豫测量结果显示，在弛豫图有 4 个峰出现

表 2 NMR 反演结果的主成分分析中前 3 个主成分与各参数的系数

Table 2 Principal component (PC) coefficients for NMR inversion data included in the principal component analysis

参数 Parameter	系数 Coefficient		
	主成分 1 PC1	主成分 2 PC2	主成分 3 PC3
第 2 个峰起始时间 Onset time of the second peak	++		+
第 2 个峰峰值(T ₂₂) Peak value time of the second peak (T ₂₂)	++	-	+
第 2 个峰结束时间 End time of the second peak	++		
第 2 个峰面积分数 Proportion of the second peak	++	--	+
第 3 个峰起始时间 Onset time of the third peak	++		
第 3 个峰峰值(T ₂₃) Peak value time of the third peak (T ₂₃)	++	-	
第 3 个峰结束时间 End time of the third peak	-	++	++
第 3 个峰面积分数 Proportion of the third peak	++	+	-
第 4 个峰起始时间 Onset time of the fourth peak	+	--	-
第 4 个峰峰值(T ₂₄) Peak value time of the fourth peak (T ₂₄)		--	
第 4 个峰结束时间 End time of the fourth peak	--	--	
第 4 个峰面积分数 Proportion of the fourth peak	--	-	

“++”或“-”表示 PC 系数的绝对值大于最大系数绝对值的 1/2; “+”或“-”表示 PC 系数的绝对值小于最大系数绝对值的 1/2 而大于最大系数绝对值的 1/4。正号表示正相关, 负号表示负相关

Double signs represent a PC coefficient greater than half the maximum coefficient in absolute value. Single signs indicate a coefficient between a fourth and a half of the largest absolute value. Positive signs mean positive-correlated contributions, whereas negative signs, negative-correlated contributions

说明在凝胶中有 4 种组分的水, 但第 2、3 个峰可以合并统称为可移动水。本研究采用了与 Bertram 等^[44]不同的对 NMR 原始数据的处理算法, 但由于基于同样的数学模型, 所以得到结果一致, 都是得到 3 种水的组分, 而且 pH 对组分 T₂ 弛豫时间的影响也一致。T₂ 的弛豫模式也与肉的 T₂ 弛豫行为类似^[17-18,26], 证实了主要的 T₂ 分布反映肌原纤维内部水的性质^[17], 也说明肉中肌原纤维结构内的水主要由毛细管作用保持^[45]。在加热过程中, 肌原纤维蛋白溶解、变性、聚集、蛋白质解折形成凝胶, 此时由于肌原纤维的结构被破坏, 提供毛细作用的成了凝胶的孔径, 凝胶孔径的增加会使水的移动性增加。Brownstein 和 Tarr^[46]认为在诸如

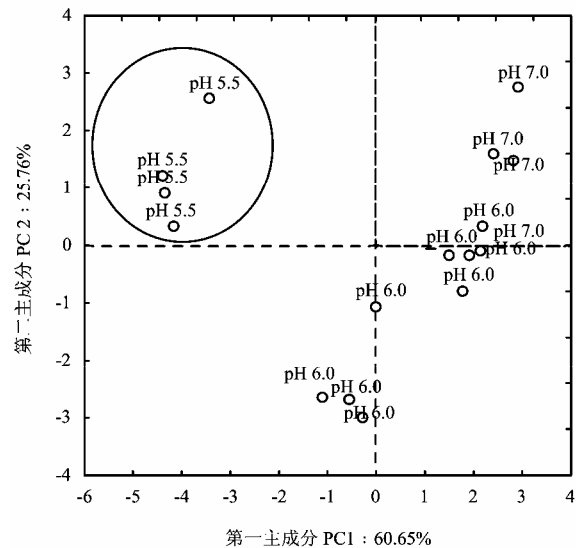


图 4 不同 pH 处理的第 1、2 主成分评分图

Fig. 4 Principal component scores for different pH samples in principal components 1-2

肉等非均一体系中, 水和大分子的交换过程决定了弛豫的速度, 可以认为大分子是表面。表面积和体积比决定了弛豫速度。因此, 粗丝和细丝距离的增加导致了弛豫时间的延长^[46]。肌原纤维蛋白凝胶过程与 pH 有关^[43], 本研究发现肌原纤维蛋白凝胶的 NMR T₂ 弛豫时间, 随 pH 的增加而提高 (图 2)。Feng 和 Hultin 通过电镜比较了 pH 6.4 和 7.0 的鸡肉糜凝胶, 发现在 pH 7.0 时凝胶有较大的孔径^[47], 造成本研究中高 pH 时弛豫速度的增加。

在肉制品中, T₂ 弛豫与制品中含水量相关^[21,48], 目前还没有很好的回归方程来用 T₂ 弛豫时间对 WHC 或含水量进行定量, pH 也会影响 NMR 弛豫衰减的信号强度或 T₂ 的积分峰面积, 因此, 这两个变量也许可以对 WHC 或含水量进行定量, 但是 pH 对它们的影响并不是线性的。所以定量还是有些困难, 这些都是下一步研究的目标。

4 结论

随着 pH 升高, pH 偏离肌原纤维蛋白的等电点 (pI), 代表可移动水的 T₂ 弛豫时间显著增加, 其所占峰的面积和凝胶的 WHC 也随之增加, 说明凝胶保水性的增加主要是这部分水。主成分分析结果发现, 处于等电点附近的样品在样品评分图上与其它 pH 样品显著不同, WHC 增加的原因可能是肌原纤维凝胶

的膨胀而后孔径增加,从而可以容纳更多的水。NMR T_2 弛豫研究可以用于蛋白质凝胶中水的性质研究。

致谢: 感谢上海纽迈电子科技有限公司经理杨培强对本研究中 NMR 的支持和帮助。

References

- [1] Xiong Y L. Structure-function relationships of muscle protein (M) // Damodaran S, Paraf A. ed. *Food Protein and Their Application*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1997: 341-392.
- [2] Bertram H C, Kristensen M, Østdal H, Baron C P, Young J F, Andersen H J. Does oxidation affect the water functionality of myofibrillar proteins? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(6): 2342-2348.
- [3] Hua Y F, Cui S W, Wang Q, Mine Y, Poysa V. Heat induced gelling properties of soy protein isolates prepared from different defatted soybean flours. *Food Research International*, 2005, 38(4): 377-385.
- [4] Ionescu A, Aprodu I, Daraba A, Porneala L. The effects of transglutaminase on the functional properties of the myofibrillar protein concentrate obtained from beef heart. *Meat Science*, 2008, 79(2): 278-284.
- [5] Knight P, Parsons N. Action of NaCl and polyphosphates in meat processing: Responses of myofibrils to concentrated salt solutions. *Meat Science*, 1988, 24(4): 275-300.
- [6] Han M Y, Lin L J, Xu X L, Zhou G H. *Effect of pyrophosphates on heat-induced gelation properties of myosin from rabbit skeletal muscles (C)* // Zhou G H, Zhang W L. ed. *Proceedings of 53rd International Congress of Meat Science and Technology*. 5-10th, August, 2007, Beijing: China Agricultural University Press, China. 2007: 237-239.
- [7] Bendall J R, Wismer-Pedersen J. Some properties of the fibrillar proteins of normal and watery pork muscle. *Journal of Food Science*, 1962, 27(2): 144-159.
- [8] Penny I F. The influence of pH and temperature on the properties of myosin. *Biochemical Journal*, 1967, 104(2): 609-615.
- [9] Bendall J R, Swatland H J. A review of the relationships of pH with physical aspects of pork quality. *Meat Science*, 1988, 24(2): 85-126.
- [10] Hamm R. Functional properties of the myofibrillar system and their measurements (M) // Bechtel P J. ed. *Muscle as Food*. New York: Academic Press, 1986: 135-199.
- [11] Offer G, Knight P. The structural basis of water-holding in meat Part 1: General principles and water uptake in meat processing (M) // Lawrie R. ed. *Developments in Meat Science*. London: Elsevier Applied Science, 1988: 63-172.
- [12] Offer G, Trinick J. On the mechanism of water holding in meat: The swelling and shrinking of myofibrils. *Meat Science*, 1983, 8(4): 245-281.
- [13] Wilding P, Hedges N, Lillford P J. Salt-induced swelling of meat: The effect of storage time, pH, ion-type and concentration. *Meat Science*, 1986, 18(1): 55-75.
- [14] Hermansson A M, Harbitz O, Langton M. Formation of two types of gels from bovine myosin. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 1986, 37(1): 69-84.
- [15] 沈淑娟. 波谱分析法. 上海: 华东化工学院出版社, 1992: 86-146. Shen S J. *Spectral Analysis*. Shanghai: College of Chemical Engineering of East China Press, 1992: 86-146. (in Chinese)
- [16] Bertram H C, Dønstrup S, Karlsson A H, Andersen H J, Stødkilde-Jørgensen H. *Post mortem* energy metabolism and pH development in porcine *M. longissimus dorsi* as affected by two different cooling regimes. A ^{31}P -NMR spectroscopic study. *Magnetic Resonance Imaging*, 2001, 19(7): 993-1000.
- [17] Bertram H C, Karlsson A H, Rasmusen M, Pedersen O D, Dønstrup S, Andersen H J. Origin of multiexponential T_2 relaxation in muscle myowater. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(6): 3092-3100.
- [18] Bertram H C, Dønstrup S, Karlsson A H, Andersen H J. Continuous distribution analysis of T_2 relaxation in meat—an approach in the determination of water-holding capacity. *Meat Science*, 2002, 60(3): 279-285.
- [19] Bertram H C, Andersen H J, Karlsson A H, Horn P, Hedegaard J, Nørgaard L, Engelsen S B. Prediction of technological quality (cooking loss and Napole Yield) of pork based on fresh meat characteristics. *Meat Science*, 2003, 65(2): 707-712.
- [20] Brown R J S, Capozzi F, Cavani C, Cremonini M A, Petracci M, Placucci G. Relationships between ^1H NMR relaxation data and some technological parameters of meat: A chemometric approach. *Journal of Magnetic Resonance*, 2000, 147(1): 89-94.
- [21] Brøndum J, Munck L, Henckel P, Karlsson A, Tornberg E, Engelsen S B. Prediction of water-holding capacity and composition of porcine meat by comparative spectroscopy. *Meat Science*, 2000, 55(2): 177-185.
- [22] Tornberg E, Andersson A, Göransson Å, von Seth G. Water and fat distribution in pork in relation to sensory properties (M) // Puolanne E, Demeyer D I, Ruusunen M, Ellis S. ed. *Pork quality, Genetic and Metabolic Factors*. Oxon: CAB International, 1993: 239-258.
- [23] Bertram H C, Karlsson A H, Andersen H J. The significance of

- cooling rate on water dynamics in porcine muscle from heterozygote carriers and non-carriers of the halothane gene—a low-field NMR relaxation study. *Meat Science*, 2003, 65(4): 1281-1291.
- [24] Bertram H C, Schäfer A, Rosenfold K, Andersen H J. Physical changes of significance for early post mortem water distribution in porcine *M. longissimus*. *Meat Science*, 2004, 66(4): 915-924.
- [25] Bertram H C, Engelsen S B, Busk H, Karlsson A H, Andersen H J. Water properties during cooking of pork studied by low-field NMR relaxation: effects of curing and the RN—gene. *Meat Science*, 2004, 66(2): 437-446.
- [26] Bertram H C, Purslow P P, Andersen H J. Relationship between meat structure, water mobility, and distribution: a low-field nuclear magnetic resonance study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(4): 824-829.
- [27] 汪红志, 张学龙, 武 杰. 核磁共振成像技术实验教程. 北京: 科学出版社, 2008.
Wang H Z, Zhang X L, Wu J. *MRI Experimental Guide*. Beijing: Science Press, 2008. (in Chinese)
- [28] Trout G R. Techniques for measuring water-binding capacity in muscle foods—A review of methodology. *Meat Science*, 1988, 23(4): 235-252.
- [29] Hinrichs R, Götz J, Noll M, Wolfschoon A, Eibel H, Weisser H. Characterisation of the water-holding capacity of fresh cheese samples by means of low resolution nuclear magnetic resonance. *Food Research International*, 2004, 37(7): 667-676.
- [30] Hills B P, Takacs S F, Belton P S. The effects of proteins on the proton N. M. R. transverse relaxation time of water. *Molecular Physics*, 1989, 67(4): 919-937.
- [31] Hills B P, Takacs S F, Belton P S. The effects of proteins on the proton N. M. R. transverse relaxation times of water. *Molecular Physics*, 1989, 67(4): 903-918.
- [32] Hills B P, Takacs S F, Belton P S. A new interpretation of proton NMR relaxation time measurements of water in food. *Food Chemistry*, 1990, 37(2): 95-111.
- [33] Doerscher D R, Briggs J L, Lonergan S M. Effects of pork collagen on thermal and viscoelastic properties of purified porcine myofibrillar protein gels. *Meat Science*, 2004, 66(1): 181-188.
- [34] Goll D E, Young R B, Stromer M H. Separation of subcellular organelles by differential and density gradient centrifugation (C) // *Proceedings of the Reciprocal Meat Conference(27th)*. 16-19 June 1974, Texas A & M University, College Station, Texas, Published by National Live Stock and Meat Board, Chicago, Illinois USA, 1974: 250.
- [35] Gornall A G, Bardawill C J, David M M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *The Journal of Biological Chemistry*, 1949, 177(2): 751-766.
- [36] Carr H Y, Purcell E M. Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments. *American Journal of Physiology*, 1954, 94(3): 630-638.
- [37] Meiboom S, Gill D. Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. *The Review of Scientific Instruments*, 1958, 29(8): 688-691.
- [38] Kocher P N, Foegeding E A. Microcentrifuge-based method for measuring water-holding of protein gels. *Journal of Food Science*, 1993, 58(5): 1040-1046.
- [39] Jolliffe I T. *Principal Component Analysis* (M). New York: Springer. 2002: 63-77.
- [40] Göetz J, Koehler P. Study of the thermal denaturation of selected proteins of whey and egg by low resolution NMR. *LWT - Food Science and Technology*, 2005, 38(5): 501-512.
- [41] Rosenfold K, Andersen H J. Factors of significance for pork quality—a review. *Meat Science*, 2003, 64(3): 219-237.
- [42] Liu R, Zhao S M, Xiong S B, Xie B J, Qin L H. Role of secondary structures in the gelation of porcine myosin at different pH values. *Meat Science*, 2008, 80(3): 632-639.
- [43] Kristinsson H G, Hultin H O. Role of pH and ionic strength on water relationships in washed minced chicken-breast muscle gels. *Journal of Food Science*, 2003, 68(3): 917-922.
- [44] Bertram H C, Kristensen M, Andersen H J. Functionality of myofibrillar proteins as affected by pH, ionic strength and heat treatment—a low-field NMR study. *Meat Science*, 2004, 68(2): 249-256.
- [45] Offer G, Knight P. The structural basis of water-holding in meat Part 2: Drip losses (M) // Lawrie R. ed. *Developments in Meat Science*. London: Elsevier Applied Science, 1988: 172-243.
- [46] Brownstein K R, Tarr C E. Importance of classical diffusion in NMR studies of water in biological cells. *Physical Review A*, 1979, 19(6): 2446-2453.
- [47] Feng Y M, Hultin H O. Effect of pH on the rheological and structural properties of gels of water-washed chicken-breast muscle at physiological ionic strength. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49 (8): 3927-3935.
- [48] Jepsen S M, Pedersen H T, Engelsen S B. Application of chemometrics to low-field ¹H NMR relaxation data of intact fish flesh. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1999, 79(13): 1793-1802.