

## PFG-NMR를 이용한 식품 및 생체의 수분이동 측정법

홍영식 · 이철호  
고려대학교 생명공학원

### Measurement of Water Movements in Food and Living Systems by Pulsed Field Gradient NMR

Young-Shick Hong and Cherl-Ho Lee

Graduate School of Biotechnology, Korea University

#### Abstract

Pulsed-field gradient NMR (PFG-NMR) is being widely applied to probe living tissues and biological cells structure for measurement of thermodynamic binding constants, membrane permeability and rates of transmembrane exchange processes. Water movements in biological systems and food matrices are important in the engineering aspect such as quality manipulation in food processing. The measurement of diffusion properties of water molecules in food systems is now possible using PFG-NMR, and the hydration properties and hydrodynamic properties of food materials can be accurately evaluated by this method. In this paper, we reviewed the theoretical basis and the applications of PFG-NMR spectroscopy in measurement of water movements in food systems.

**Key words:** PFG-NMR, water movement, diffusion properties, food and living systems

#### 서 론

물은 식품의 주요성분의 하나로 식품의 미생물학적 및 화학적 변화에 깊이 관여하며, 물리적, 관능적 특성을 결정하는 요인이기도 하다. 식품에서 물 함량은 건조식품의 6%이하에서 과채류의 90%이상에 이르기까지 다양하며, 존재하는 물의 상태는 물 자체의 구조나 식품성분과 물의 상호작용에 따라 다르다. 고체나 액체에서 물의 상태는 결합수와 자유수의 형태로 구분하며 수분활성도(water activity,  $a_w$ )로 표시한다(Scott, 1953, 1957). 용액 속에서 물과 용질 분자의 상호 결합은 수화(hydration)현상으로 설명되며 극성 분자들이 있을 때 이러한 상호작용은 수소결합에 의해 대부분 결합된다. 또한 물은 식품에 들어있는 이온( $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $Li^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $SO_4^{2-}$ ,

$PO_4^{3-}$ )들과도 강하게 수소 결합하여 hydration shell을 형성하기도 한다. 이와 같이 물은 식품 속에서 수소결합에 의한 내부 결합, 친수성 결합 그리고 소수성 결합에 의해 식품의 물성, 비열이나 열전도율, 물질 전달, 전기적 특성, 그리고 관능적 특성 등에 영향을 미친다. 생물체에서의 물은 영양성분의 전달 매체로, 대사물질의 이동매체로 그리고 생체구조와 형태를 유지하는데 필요한 팽압(turgor pressure) 조절 물질로 세포 내·외를 왕래하는 필수 물질이다. 물의 이동에 대한 기존의 연구는 주로 삼투압의 변화나 수분활성도의 측정으로 이루어졌으나 최근 핵자기공명(nuclear magnetic resonance, NMR)을 이용한 측정 기술의 발달로 분자 수준에서 물의 움직임을 감지할 수 있게 되었다. 본고에서는 NMR spectroscopy를 이용하여 물의 움직임과 확산을 측정하는 원리를 설명하고, 식품분야에서 어떻게 이용되는지를 소개하고자 한다.

Corresponding author: Cherl-ho Lee, Professor, Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Republic of Korea.  
Phone: 02-3290-3414, Fax: 02-973-9332  
E-mail: chlee@korea.ac.kr

#### 핵자기 공명의 원리

여기서 주로 다루고자 하는 물 분자는 다른 분자

와 같이 원자핵(nucleus)을 가지고 있으며, 이 원자핵은 전하(charge)를 가지고 있다. 전하를 가지고 있는 핵은 각운동량(angular momentum,  $J$ )을 가지며, 각운동량은 핵의 중심을 통과하는 축의 주위를 회전하는 것으로 설명될 수 있다. 이런 핵의 회전은 외부에서 주어지는 자기장(magnetic field,  $B_0$ )에 의해서 핵자기모멘트(nuclear magnetic moment,  $\mu$ )라는 방향성을 가지게 되고, 이 방향성은 핵스핀(nuclear spin,  $I$ ) 또는 핵스핀 양자수(nuclear spin quantum number)라는 개념에 의해 회전하고 있는 핵의 에너지를 나타내게 된다. 예를 들어 핵스핀 양자수( $I$ )가 "0"인 경우는 방향성이 없다는 것을 의미하며, 원자번호와 원자량이 짝수인  $^{12}\text{C}$ ,  $^{16}\text{O}$  그리고  $^{32}\text{S}$ 가 여기에 속한다. 핵 스핀 양자수( $I$ )가 1/2인  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$  등은 방향성이 있어서 외부자기장( $B_0$ )이 주어졌을 때 두 개의 에너지 상태(높은 에너지와 낮은 에너지 상태)로 분해되게 되는데, 이를 Zeeman effect라 한다(Fig. 1).

즉, 핵들이 각각의 에너지 차이에 해당하는 에너지를 흡수할 때 전이(transition)가 일어나는데, 핵자기 공명 현상을 일으키기 위해서는 이 에너지 차이를 나타내게 만들어야 한다. 에너지 차이는 외부자기장( $B_0$ )속에 핵들이 놓일 때 에너지 상태가 달라져서 Zeeman effect ( $2I+1$ )에 의해 스핀 양자수( $I$ )가 1/2인 경우 두 개의 에너지 상태로 나누어지게 되는 것이다. 이 두 에너지 상태의 차이인  $\Delta E$ 는 외부자기장( $B_0$ )의 크기에 비례하게 되며, NMR의 감도(sensitivity)는 이 외부자기장의 크기에 비례하게 된다. 즉 외부자기장이 크면 클수록 에너지 차이가 커져서 분해능이 높아진다.

자전(spinning)하고 있는 핵이 자기장을 받으면 자전에 의해 생긴 자기 쌍극자(magnetic dipole)가 외부의 자장과 일치하지 못하고 외부자장 축의 주위를 세차운동(precession)을 하게 된다(Fig. 2). 세차운

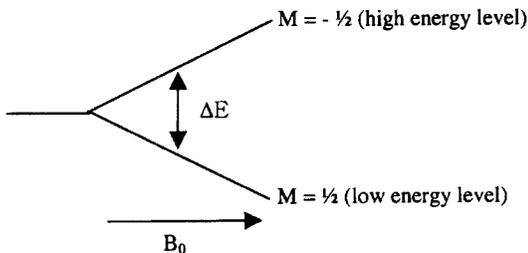


Fig. 1. Two energy levels by Zeeman effect with magnetic field  $B_0$ .

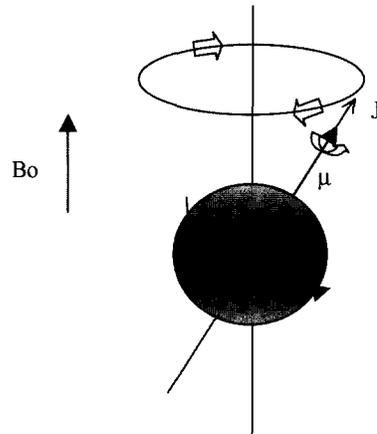


Fig. 2. A spinning charge with angular momentum  $J$ , such as a proton, gives rise to a magnetic moment  $\mu (= \gamma J)$ . In a magnetic field its axis of rotation precesses around the direction of the field, like a gyroscope.

동은 세차운동의 각속도(angular velocity)인 라모어 진동수(Larmor frequency,  $\omega_z$ )에 의해 수식으로 표현되며, 핵 고유의 값인 자기회전비(gyromagnetic ratio,  $\gamma$ )와 외부 자기장의 크기( $B_0$ )에 의해서 결정된다(Derome, 1989).

$$\omega_z = \gamma B_0 \quad (1)$$

라모어 진동수와 똑 같은 진동수를 외부로부터 주입했을 때 핵이 에너지를 흡수하여 높은 에너지 상태로 전이가 일어나게 되면, 이것을 공명(resonance)이라 부른다. 공명 현상은 라모어 진동수( $\omega_z$ )에 해당하는 라디오파(radio frequency, rf)를 라디오파 발생기(transmitter coil 또는 oscillator coil)를 통해서 외부자기장과는 직각 방향으로 주어질 때 일어난다. 이렇게 에너지 흡수가 최대로 일어난 후 에너지가 낮은 상태인 처음 상태로 되돌아가는 현상을 이완(relaxation)이라고 한다. 이완시간은 spin-lattice 이완시간( $T_1$ )과 spin-spin 이완시간( $T_2$ )으로 구분된다.  $T_1$ 은 세로 이완(longitudinal relaxation)에 의한 것이며,  $T_2$ 는 가로이완(transverse relaxation)에 의한 것이다. 자기공명에서 세차운동을 하는 모든 물질들은 자기장에서 이 두 가지의 고유한 이완시간을 가지며, 핵 주위의 환경과 시료의 물리적 성질에 따라 이완시간은 달라진다.

#### 물분자의 운동이론

물 분자의 움직임은 회전성 움직임(rotational move-

ment)과 이동성 움직임(translational movement)의 두 가지로 나누어진다. 회전성 움직임은 rotational correlation time( $\tau_c$ )에 의해 측정되며, 이것은 물 분자가 한 라디안(radian)을 회전하는데 걸리는 시간으로 정의된다. 순수한 물은 실온(25°C)에서 correlation time 1-10 ps의 값을 가지며, 이 correlation time 으로부터  $T_1$ 과  $T_2$  이완시간이 계산된다. 반면에 이동성 움직임은 용액상태에서는 자기확산계수(self-diffusion coefficient, D)에 의해 설명된다. 물의 자기확산계수(D)는  $2.5 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$  의 값을 가진다. Fig. 3은 물의 회전성 및 이동성 움직임을 표현한 것이다.

### 물분자의 회전성 운동이론

핵자기공명에 의한 물 분자의 이완시간( $T_1$ : spin-lattice relaxation,  $T_2$ : spin-spin relaxation)의 측정은 결합된 물의 움직임과 다른 성분과의 상호 결합을 측정하는데 사용되며, 측정시간이 짧고 비파괴적 방법이라는 장점이 있다. 이완시간을 측정하는 방법을 흔히 relaxation NMR 또는 pulse NMR이라고 한다. 핵자기공명 현상을 기초로 하는 NMR은 크게 CW(Continuous Wave)-NMR과 pulse NMR로 나눌 수 있다. CW-NMR에서는 핵 하나씩을 공명현상을 일으키게 하기 위해서 각각의 핵에 해당하는 주파수가 다른 하나씩의 라디오파(Radio Frequency, RF)를 시료에 주입하는 경우, 또는 라디오파를 고정시키고 외부 자기장을 변화시켜주는 방법으로, 주로 핵들의 chemical shift 차이에 의해 분자 구조를 밝히는 데 사용된다. 반면에 pulse NMR은 chemical shift가 다른 여러 종류의 핵들을 여러 주파수의 라디오파로 구성되어 있는 펄스를 간헐적으로 주입하여 동시에 공명을 일으키는 방법으로 CW-NMR에 비해서는 진폭이 고른 즉 라디오파의 분포가 넓은

펄스를 이용하여야 한다. 이러한 펄스를 Radio frequency(RF) pulse라고 한다.

식품 중에 들어있는 물 분자의 이완시간( $T_1$ 과  $T_2$ )과 이와 관련된 물의 움직임은 식품의 특성을 평가하는 데 매우 유용하다. 예를 들어, 빵의 노화(staling)과정에서 물의 이완시간을 측정하여 물의 물리적 상태를 관찰해 보면, 저장기간 동안  $T_1$ 과  $T_2$ 가 모두 감소하여 물의 움직임이 감소하거나 전분 구조에 물의 결합이 증가하는 것을 나타낸다(Leung *et al.*, 1983; Chen *et al.*, 1997). 최근에는 pulse NMR로 이완시간을 측정하여 고분자 물질중의 교환성 proton과 물 proton사이의 화학적 치환속도를 계산함으로써 고분자물질에 결합되는 물 분자의 수화(hydration) 구조를 예측하기도 하며, 결합수와 자유수의 존재 또는 고분자물질의 젤 형성 과정을 설명하기도 한다(Okada *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003). Krishnan *et al.*(2003)은 밀 낱알의 수화(hydration) 단계별로 물의 이완시간을 측정하여 발아(germination)과정을 관찰하였으며, Godefroy *et al.*(2003)은 치즈의 가공 및 숙성 과정에서 단백질 matrix에 존재하는 물과 지방의 이완시간을 측정함으로써 치즈의 구조변화를 연구하였다. Kim과 Cornillon(2001)은 밀가루 반죽(wheat dough)의 혼합 시간에 따른 gluten matrix구조 변화를 물의 이완시간을 이용하여 측정한 결과 mixing 시간이 증가함에 따라 수분의 이완시간이 감소함으로써 물이 반죽구조에 결합하여 움직임이 감소함을 알 수 있었고, Choi와 Kerr(2003)은 밀전분 분산액에서 물의 이완시간은 수분활성도가 증가함에 따라 증가하였으며, 이는 수분의 plasticizing효과 때문이라고 보고하였다. 생물고분자 필름에서도 물의 이완시간에 의해서 필름의 plasticizing 특성을 평가하기도 한다(Choi *et al.*, 2003).

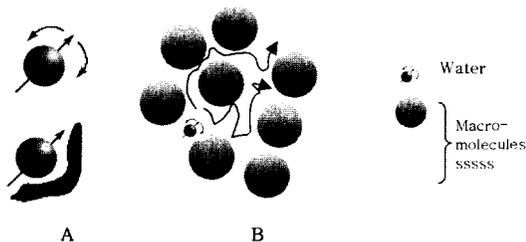


Fig. 3. A rotational and translational movements of water molecules with macromolecules: (A) Upper water rotates freely and down water represents hindered rotation with macromolecules, (B) The translational movement means diffusion.

### 물분자의 이동성 운동이론

식품의 건조, 추출, 증류, 흡수, 결정화, 염지 등 대부분의 단위조작들은 물질 전달(mass transfer)에 기초를 둔다. 물질전달은 하나의 계(phase)에서 일어날 수도 있고 두 개의 계에서 상호간에 일어날 수 있으며 그 확산계수는 Fick의 제 1법칙과 제 2법칙에서 구할 수 있다.

$$\text{Fick's first law: } J = -D \left( \frac{\partial C_A}{\partial x} \right) \quad (2)$$

여기서,  $C_A$ 는 물질 A의 농도이며,  $x$ 는 확산되는 거리 그리고  $D$ 는 확산계수(diffusion coefficient)이다. 이 확산계수는 그 system의 고유특성이며, 확산되는 물질과 medium의 상호작용에 의해 영향을 받는다. Fick의 제 1법칙은 확산계수는 농도에 영향을 받지 않고 일정하다는 가정을 포함하기 때문에, 고농도의 용질에서 적합하지 않다. 따라서 제 2법칙은 시간 의존형 확산 또는 불균일한 확산의 경우에 적용된다.

$$\text{Fick's second law: } \frac{\partial C_A}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C_A}{\partial x^2} \quad (3)$$

Einstein은 거대분자(macromolecules)들의 microscopic properties와 확산 현상을 연관시키고, 마찰계수(frictional coefficient)의 개념을 도입하였다.

$$\text{Einstein equation: } D = \frac{kT}{f} = \frac{RT}{Nf} \quad (4)$$

여기서  $k$ 는 볼츠만 상수(Boltzmann constant,  $J/K$ ),  $N$ 은 아보가드로 수(Avogadro number),  $R$ 은 기체상수,  $T$ 는 온도(K),  $f$ 는 마찰계수이다. 마찰계수는 분자의 크기와 모양과 직접적으로 관련된다. 분자가 고체의 구형 물질(solid sphere)이라고 가정하면, Stokes equation이 적용될 수 있고, 확산계수는 다음과 같이 표현될 수 있다.

$$\text{Stokes-Einstein equation: } D = \frac{kT}{6\pi\eta R_H} \quad (5)$$

여기서,  $\eta$ 는 용매의 점도(P),  $R_H$ 는 구형분자의 수동력학적 반지름(hydrodynamic or Stokes radius)이다. 대부분의 분자의 형태는 구형과는 다르기 때문에 확산계수는 실험적으로 측정된다. Stokes-Einstein 식은 분자의 이동성 확산계수(translational diffusion coefficient)를 설명하는 반면, Deybe-Stokes-Einstein 식은 회전성 확산계수(rotational diffusion coefficient,  $D_r$ )를 설명한다.

$$\text{Deybe-Stokes-Einstein equation: } D_r = \frac{kT}{8\pi\eta R_H^3} \quad (6)$$

위의 Stokes-Einstein의 관계식은 구형입자의 분자 크기를 측정하거나 이 구형입자들의 확산 시 이동하는 거리를 구하는데 사용되기도 한다.

$$z = (6Dt)^{1/2} \quad (7)$$

물론 한 시스템내에서의 모든 구형 입자들이 이 관계를 따르지는 않기 때문에 많은 입자들의 확산 시 이동하는 거리는 평균이동거리( $z$ )를 의미하는 root mean square (RMS) 거리로 정의한다.

물 분자의 확산 현상은 확산계수( $D$ )로 표현되며, 다음부터 설명될 pulsed-field gradient NMR(PFG-NMR)로 측정할 수 있다.

### PFG-NMR 측정원리

PFG NMR은 Stejska과 Tanner(1965)가 분자의 확산계수 (molecular self-diffusion coefficient,  $D$ )를 측정하기 위하여 처음 개발하여 소개한 것이다. 분자의 확산계수 측정은 PFG(pulsed-field gradient)와 pulse sequence를 접목 시킴으로써 가능해진다. Magnetic field gradient,  $g$ ,는 NMR의 주요자기장인  $B_0$ 와는 엄격히 구별되는 것으로서 측정하는 시료에서 나오는 신호를 받아서 컴퓨터로 보내는 receiver coil 바깥부분에 설치된 gradient coil에서  $B_0$ 와 같은 방향인  $z$ 방향으로 주어진다(Fig. 4). 핵 자기공명에서 핵 스핀에 대한 자기장(magnetic field,  $B_0$ )의 영향을 이해하는데 필요한 모든 핵자기공명이론은 Larmor equation(식 1)에서부터 시작한다.

Larmor frequency( $\omega_z$ , rad/s)에 대한 PFG-NMR에서의 magnetic field gradient,  $g_z$ ,의 효과는 다음과 같이 설명된다.

$$\omega_z = \gamma B_0 + \gamma g_z z \quad (8)$$

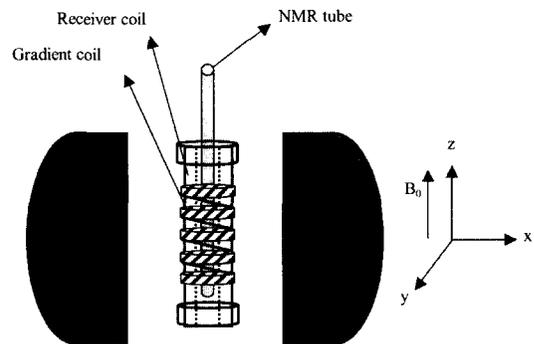


Fig. 4. A schematic depiction of a gradient coil for producing  $z$ -axis field gradient in superconducting magnets. This gradient field allows molecules to diffuse to the  $z$  axis and the receiver coil receive the signal as a voltage and then send to computer.

여기서  $B_0$ 는 z방향으로 주어지는 외부 자기장(T),  $g_z$ 는 z방향으로 주어지는 magnetic field gradient(T/m), z는 핵 스핀의 위치(m), 그리고  $\gamma$ 는 gyromagnetic ratio (rad T/s)이다. 핵 스핀의 위치에 의존하는 phase angle,  $\varphi_z$ (rad),은 다음과 같이 표현된다.

$$\varphi_z = \delta\gamma g_z z \quad (9)$$

여기서  $\delta$ 는 적용되는 gradient pulse의 지속시간(s)이다.

PGF-NMR에서 분자의 확산을 측정하는데 필요한 신호(signal)를 얻는 과정은 Fig. 5와 같다. 첫번째 90도의 rf(radio frequency)가 주어지면 net magnetization은 xy 평면에 놓여지게 되며, 핵 스핀들의 위상(phase)이 간섭 받게 된다. 그 다음 첫번째 gradient pulse는 핵 스핀들을 암호화(encode)한다. 이 ‘encode’라는 말은 gradient가 phase angle(식 9)에 의해 핵 스핀들의 위치를 실제적으로 표시(label)한다는 것을 의미한다. 암호화된 핵 스핀들은 일정한 확산시간(diffusion time,  $\Delta$ )이후 두번째 gradient pulse에 의

해 신호가 제거되지는 않고, 단지 신호만 감소하게 된다. 따라서 확산계수는 gradient의 크기와 지속시간( $\delta$ )만 알게 되면, 신호의 크기(Attenuation, A)로부터 계산된다. Fig. 5A의 실험방법은 Stejska와 Tanner (1965)에 의해 개발되어서 Stejska-Tanner sequence 또는 Hahn's spin echo라 불리며, PGF-NMR를 이용한 확산 실험의 가장 기본이 되는 sequence로써, PGSE의 약자로 쓰인다. 이 sequence에 의해 생성된 신호의 크기(A)는 다음 식에 의해서 표현된다.

$$A(2\tau, g) = A(2\tau, 0) \exp(-2\tau/T_2) \exp[-(\gamma^2 g^2 \delta^2) (\Delta - \delta/3)D] \quad (10)$$

여기서 D는 분자의 자기확산계수( $m^2/s$ ), g는 gradient의 크기( $g=g_z$ ),  $A(2\tau, g)$ 는 gradient가 주어졌을 때 신호의 크기,  $\Delta$ 는 sequence에서 두 gradients 간 시간이(s)며,  $\Delta - \delta/3$ 는 확산시간(diffusion time,  $t_d$ )이다.  $T_2$ 는 스핀-스핀 이완시간,  $A(2\tau, 0)$ 는 gradient

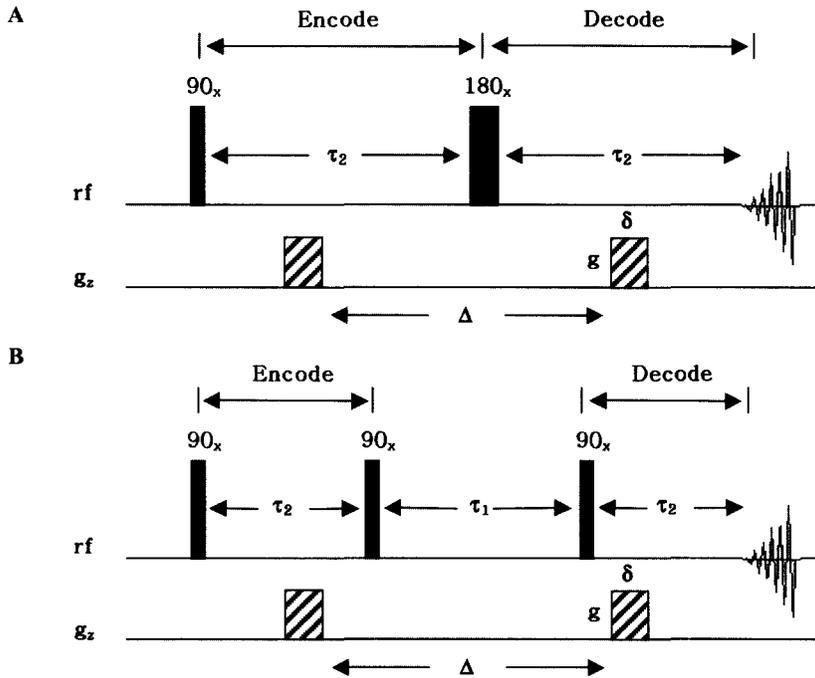


Fig. 5. The standard pulsed-gradient spin echo sequence (PGSE) (A) and stimulated echo sequence (STE) used for diffusion measurements (B). The back bars show the radio frequency (rf) and diagonal bars represent the gradient pulses ( $g_z=g$ ). The parameters are described throughout the text.

가 “0”일 때 신호의 크기로서 상수로 나타나며, 핵의 이완시간에 관여한다. 두 gradient pulses의 크기나 지속시간( $\delta$ )은 동일해야 한다.

PFG-NMR에 의한 확산계수 측정은 일반적으로 gradient의 크기( $g$ )를 증가시키면서 얻어지는 FID(Free Induction Decay)의 값에서 신호의 크기가 계산된다. 이때 신호의 값은  $\delta$  또는  $\Delta$ 에 의하여 영향을 받는다. 그러나 Fig. 5A에서 보여주는 PGSE sequence에 의한 확산계수 측정은 몇 가지 문제점을 가지고 있다. Magnetization (외부 자기장에 의해 여기(勵起)된 자기(磁氣) 모멘트의 단위체적당의 값,  $M$ )은  $xy$ 평면에서  $T_2$  이완시간 때문에 거대 분자들의 경우 이완을 일으키는 스핀이 급격하게 감소한다. 커플을 이루고 있는 스핀들의 신호는  $xy$ 평면에서 주파수가 변조(modulation)되기 때문에 스펙트럼이 음(-)의 값을 가질 수 있다. 이러한 PGSE 방법의 문제점을 해결하려면, Fig. 5B에서처럼 stimulated echo sequence (STE)를 이용하여  $xy$  평면에서 스핀이 소요하는 시간을 감소시키면 된다. 이 STE sequence는 180도 rf pulse가 주어지는 PGSE sequence 대신에 90도 rf pulse를 사용하여 magnetization이  $xy$  평면에서 소요되는 시간을 최소화 시킨다. STE sequence는 다음과 같이 신호크기(Attenuation,  $A$ )가 계산되며, 이로부터 자기확산계수(self-diffusion coefficient,  $D$ )를 계산할 수 있다.

$$A(2\tau_2 + \tau_1, g) = A(2\tau_2 + \tau_1, 0) \exp[-(2\tau_2/T_2) - (\tau_1/T_1)] \exp[-(\gamma^2 g^2 \delta^2)(\Delta - \delta/3)D] \quad (11)$$

여기서  $A(2\tau_2 + \tau_1, 0)$ 는 gradient가 “0”일 때의 신호값이다.  $T_1$ 은 longitudinal relaxation time이며,  $T_2$ 는 transverse relaxation time이다.

#### 물의 확산속도와 population 계산

Gradient( $g$ )를 증가시키면서 얻어지는 PFG-NMR의 Attenuation은 (식) 10과 11에서처럼 표현되며, 식 양쪽을 상용로그를 취해주면 자기확산계수( $D$ )인 기울기가 구해진다.

Fig. 6A는 gradient가 증가함에 따라 순수한 물의 Attenuation이 감소하는 signal decay를 보여주는 stack plot이다. Fig. 6B는 (식) 11에 의해서 mono-exponential fitting을 한 결과이다. 어떤 단일물질이

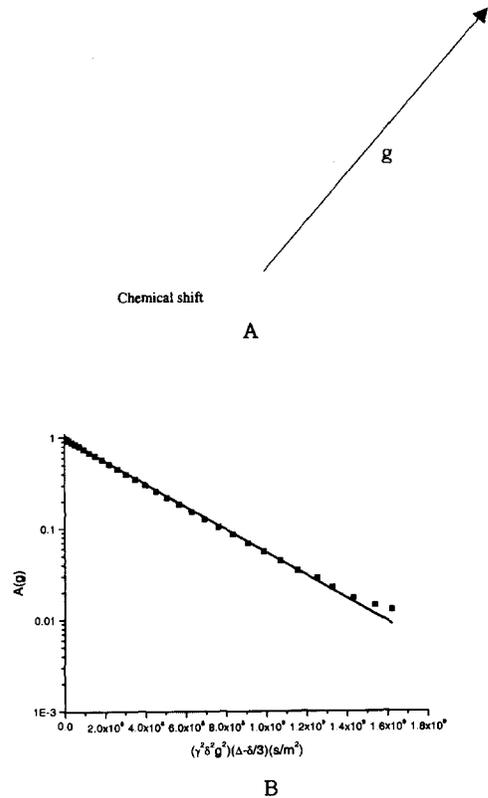


Fig. 6. Effect of gradient amplitude on  $^1\text{H}$  NMR resonances in a diffusion experiment. (A) As the gradient amplitude is increased, the attenuation of free water is decreased. (B) The data on a natural log scale (y-axis) to show the NMR data fit to the linear version of Eq.11. The self-diffusion coefficient of bulk or free water has value of  $2.7 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$  at  $30^\circ\text{C}$ .

처해있는 환경에 따라 두 가지 이상의 확산계수를 가질 수 있다. 예를 들어, 세포 내부의 물과 세포 외에 존재하는 물은 서로 다른 확산계수를 가질 수 있다.

위에서 언급한 이론적인 계산식들을 활용하여 세포내의 수분 이동을 나타내는 물의 자기확산계수( $D$ )와 확산속도가 다른 물 분획의 양을 나타내는 population( $p$ )값을 계산할 수 있다.

Cho *et al.*(2003)은 Fig. 5B에서 소개된 STE sequence를 이용하여 클로렐라 세포 내외의 수분 확산계수를 측정하였다. Fig. 7A는 클로렐라 세포내의 경우 수분 분자들의 대표적인 diffusional decay curve를 보여주고 있다. 이 커브를 successive residual method로 해석한 결과 (식) 12를 3요소 지수식으로

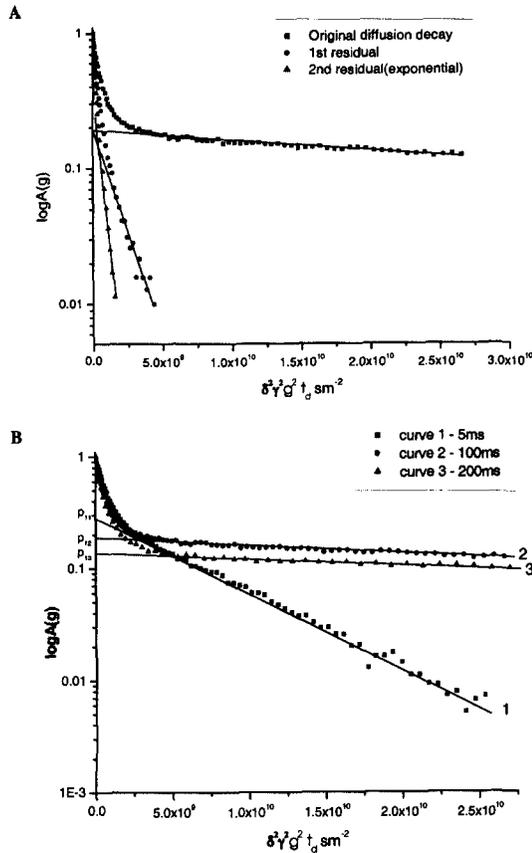


Fig. 7. The diffusion decay of water molecules in *Chlorella* sp. (A) Diffusion decay when  $t_d$  is 100ms,  $\delta$  is 210ms and  $g_{max}$  is 9.65 T/m. (B) Diffusion decay obtained at different diffusion time:  $t_d$ : 1-5 ms ( $\delta=900 \mu\text{s}$ ,  $g_{max}=9.65 \text{ T/m}$ ), 2-100 ms ( $\delta=201 \mu\text{s}$ ,  $g_{max}=9.65 \text{ T/m}$ ), 3-200 ms ( $\delta=250 \mu\text{s}$ ,  $g_{max}=9.65 \text{ T/m}$ ). Measurement temperature is 30 °C.

fitting할 수 있으며, 이로부터 3종류의 자기확산계수  $D_{s1}$ ,  $D_{s2}$ ,  $D_{s3}$ 와 population 값  $p_1$ ,  $p_2$ ,  $p_3$ 를 얻을 수 있다.  $D_{s3}$ 의 값은  $2.7 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ 로 30°C에서 자유수 (bulk water)의 자기확산계수 값과 일치한다.

$$A(g) = \sum_{i=1}^m p_i \cdot \exp[-\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3) D_{si}]$$

$$\sum_{i=1}^m p_i = 1 \quad (12)$$

여기서  $D_{si}$ 는  $i$  성분의 자기확산계수이고,  $p_i$ 는 확

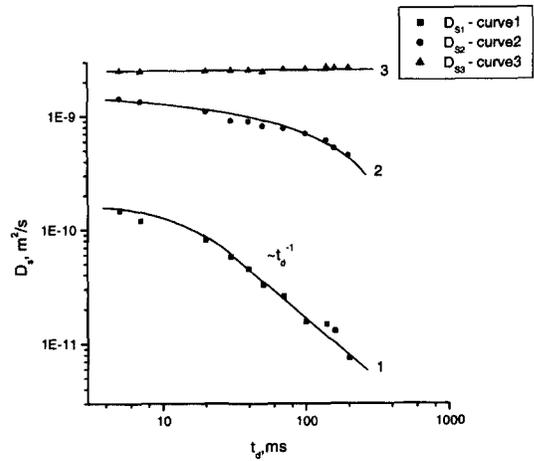


Fig. 8. The experimental dependence of self-diffusion coefficients  $D_{s1}$ ,  $D_{s2}$ ,  $D_{s3}$  on the diffusion time  $t_d$  of water molecules in *Chlorella* sp. The temperature of measurements is 30°C.

산계수  $D_{si}$ 로 표시되는 성분의 분량을 나타내며  $i$  구간의 population이라고 칭한다.

확산시간( $t_d$ )을 달리하였을 때 diffusional decay curve를 분석하여 보면 Fig. 7B에서와 같이 자기확산계수  $D_{s1}$ ,  $D_{s2}$ 와 population 값  $p_1$ ,  $p_2$ 는 확산시간에 따라 변화는 값을 알 수 있다. Fig. 8에 의하면  $D_{s1}$ 과  $D_{s2}$ 는 확산시간이 증가할수록 감소하지만 세포밖의 bulk water에 있는 자유수의 확산계수  $D_{s3}$ 는 확산시간에 의존하지 않음을 알 수 있다. Population 값  $p_1$  과  $p_2$ 는 확산시간에 따라 감소하였으나  $p_3$ 는 거의 일정함을 알 수 있다. 이것은 세포내부 ( $D_{s1}$ )와 세포외부( $D_{s2}$ )에 위치한 물은 그 이동이 제한 받은 환경에 처해 있음을 의미하며, 이와 같이 확산시간에 의존하는(diffusion time dependent) 제한 확산(restricted diffusion)으로부터 세포내 제한구역의 이동거리 (restricted region distance)를 구하여 세포 내부직경을 유추할 수 있다(Fig. 9). 세포외(extracellular) 일부 수분의 확산시간의존성은 페이스트 상태의 클로렐라 세포사이에 cluster에서의 수분의 자기확산계수로 해석 할 수 있다.

Fig. 10에서 보여주는 것과 같이 효모 세포에서도 클로렐라와 유사한 diffusional decay curve가 얻어진다. 자기확산계수, 와 population 값  $p_1$ ,  $p_2$  값이 확산시간에 따라 변하였다(Suh et al., 2003). 효모 세포내(intracellular) 수분의 자기확산계수는 효모의 배양시간에 따라 변하였다. 즉 지수적 증식기

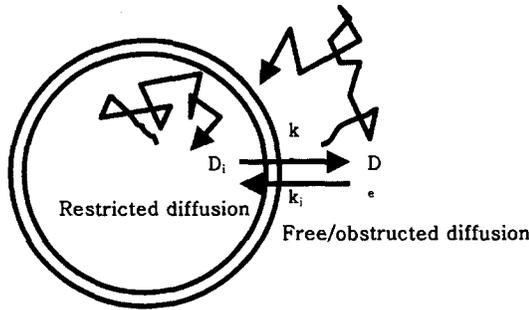


Fig. 9. Transmembrane exchange and diffusion of a diffusing molecule in a cell. The intra- and extracellular diffusion coefficients of the molecule are denoted by  $D_i$  and  $D_e$ , and the influx and efflux rate constants for exchange of the molecule through the membrane denoted by  $k_i$  and  $k_e$ , respectively.

(exponential growth phase, EGP)의 세포와 정체기 (stationary growth phase, SGP) 세포의 세포내 수분 확산계수( $D_{s1}$ )는 유의적인 차이를 보여 지수적 증식기에 있는 효모 세포의 수분확산계수가 정체기 세포에 비하여 높게 나타난다. 반면 세포외에 형성되어 있는 cluster내 수분 확산계수( $D_{s2}$ )는 세포의 배양시간에 따라 크게 변하지 않음을 알 수 있다(Table 1).

제한확산에 의한 세포크기 추정

세포벽을 통과하는 수분의 자기확산계수(D)와 population(p)이 확산시간의존성일 때 이 자기확산계수와 population은 세포의 크기(cell size, a), 세포내

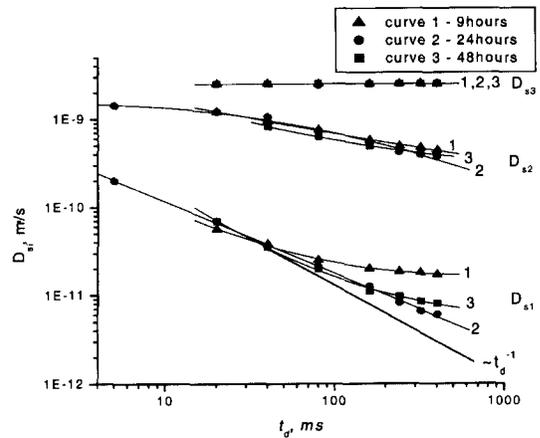


Fig. 10. The experimental dependences of water self-diffusion coefficients  $D_{s1}$ ,  $D_{s2}$  and  $D_{s3}$  on diffusion time  $t_d$  for the yeast harvested after 9 h (MGP), 24 h (EGP) and 48 (SGP) incubation curves 1, 2 and 3, respectively. The straight line shows dependence  $D_s \cdot t_d^{-1}$ . The insertion in figure 11 is ideal dependence of self-diffusion coefficient on  $t_d$  in pore system (Suh *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2004). The intracellular diffusion of water indicates the restriction diffusion having size of 2.3, 3.0 and 2.7  $\mu\text{m}$  at MGP, EGP and SGP, respectively. The extracellular diffusion of water also indicate the restriction diffusion for dense yeast suspension and the restricted size was 17, 20, 15  $\mu\text{m}$  at MGP, EGP and SGP, respectively.

수분의 체류시간(residence time,  $\tau$ ) 및 교환속도 상수(exchange rate constant,  $k$ ) 그리고 세포벽 투과도(membrane permeability,  $P^d$ )의 계산이 가능하게 한다.

확산시간( $t_d$ )이 증가함에 따라 자기확산계수가 감소할 때를 제한확산(restriction diffusion)이라하며 확

Table 1. The values of yeast cell size  $a^n$  obtained from PFG-NMR, cell sizes  $a^n$  and volume-to-surface ratio  $V/S$  determined by electron microscopy, residence time  $\tau$ , exchange rate constant  $k$ , and cell wall permeability  $P^d$  determined by eq. (16) from dependence  $D^{sd}(t_d)$ , and permeability  $P^{sd}$  calculated using  $k$  from  $p(t_d)$  by eq. (15) and  $V/S$  from electron microscopic data. These data correspond to not extracellular but intracellular diffusion (Suh *et al.*, 2003)

Incubation Time, hour	$a$ ( $\mu\text{m}$ )	$a^n$ ( $\mu\text{m}$ )	$V/S(\text{m})$	$\tau$ (ms)	$k$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$P^{sd}$ (m/s)	$P^d$ (m/s)
9	$2.3 \pm 0.2$	$4.1 \pm 1 = a$	$1.7 \times 10^{-6}$	$240 \pm 25$	$4.2 \pm 0.4$	$(7 \pm 0.7) \times 10^{-6}$	$(6.3 \pm 0.6) \times 10^{-6}$
		$2.9 \pm 1 = b$					
		$3.5 \pm 1 = (a+b)/2$					
24	$3 \pm 0.2$	$4.9 \pm 0.5 = a$	$5.4 \times 10^{-7}$	$450 \pm 40$	$2.2 \pm 0.2$	$(1.2 \pm 1) \times 10^{-6}$	$(8.4 \pm 0.8) \times 10^{-7}$
		$3.6 \pm 0.3 = b$					
		$4.2 \pm 0.4 = (a+b)/2$					
48	$2.7 \pm 0.2$	$4.4 \pm 0.8 = a$	$7.3 \times 10^{-7}$	$400 \pm 40$	$2.5 \pm 0.3$	$(1.6 \pm 0.2) \times 10^{-6}$	$(1.5 \pm 0.2) \times 10^{-6}$
		$3.3 \pm 0.8 = b$					
		$3.1 \pm 0.8 = (a+b)/2$					

\* $a^n$  was calculated as average cell size  $(a+b)/2$  where a is cell size in longitudinal direction, b is the cell size in transversal direction.

산시간이 무한히 길 때는 자기확산계수가 “0”값에 근접 할 것이다(Callaghan, 1991). 이 확산시간에 의존(diffusion time dependent)하는 제한확산을 통하여 구조적으로 보다 유용한 정보를 유추할 수 있다. 식품에서 예를 들어보면, 사과조직에서 pore의 크기와 사과조직의 부피에 대한 면적 비율(Reiger *et al.*, 2004), 세포내의 물 분자의 restricted diffusion을 통하여 빵의 제조나 술 제조에 주로 쓰이는 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)의 세포막 투과도와 세포 크기를 PFG-NMR를 이용하여 측정할 수 있다(Suh *et al.*, 2003; Hong과 Lee, 2004). Fig. 9에서는 세포내부에서의 제한확산을 설명하는 모식도를 보여 주고 있다. 세포 내부뿐만 아니라 세포 외부에서도 제한확산이 관찰되어 세포외부에서 제한된 부분의 크기가 계산된다(Suh *et al.*, 2003; Hong과 Lee, 2004). 이는 고농도로 농축된 세포들이 모여서 cluster를 이루기 때문이며, 이러한 제한확산은 적혈구의 경우에도 고밀도로 농축이 되었을 때(pellet형태) 세포 내에서뿐만 아니라 세포외부에서 관찰되기도 한다(Waldek *et al.*, 1997).

확산시간( $t_d$ )이 증가함에 따라 물의 확산 속도가 감소하는 제한확산구역(restricted diffusion region)의 크기는 실험적으로 측정된 자기확산계수(D)보다는 Fig. 11에서 보여주는 II지역에서 얻어지는 effective self-diffusion coefficient( $D^{eff}$ )에 의해서 계산된다. Effective self-diffusion coefficient( $D^{eff}$ )는 self-diffusion coefficient(D)가  $t_d^{-1}$ 에 비례할 때 아래의 (식) 13을 scaling approach함으로써 얻어질 수 있다.

$$D^{eff} = \frac{[D(t_d) - D_p] \cdot D_0}{D_0 - D(t_d)} \quad (13)$$

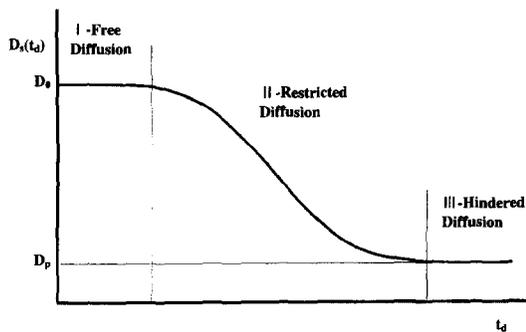


Fig. 11. Idealized dependence of water self-diffusion coefficient on diffusion time in the pore systems with permeable walls (Valiullin *et al.*, 1997).

여기서  $D(t_d)$ 는 각 확산시간( $t_d$ )에서의 자기 확산 계수,  $D_p$ 는 확산시간이 무한으로 증가할 때의 자기 확산계수 그리고  $D_0$ 는 확산시간이 “0”일때의 자기 확산계수이다. (식) 13에 의해서 계산된 확산계수 ( $D^{eff}$ )를 식 7에 대입하면 restriction size 즉 세포의 내부직경( $a$ )이 계산된다. 제한구역의 크기(restriction size)를 (식) 7에 의하여 구하면 각 확산시간에 따라 제한구역 크기가 일정하게 계산되지 않지만, (식) 14에서 얻어지는 제한구역크기는 각 확산시간에서 일정하게 계산되어 현미경 관찰에서 얻어지는 size와 매우 일치함을 보여줄 수 있다.

$$a = (6D^{eff}t_d)^{1/2} \quad (14)$$

Cho *et al.*(2003)은 PFG-NMR를 이용하여 클로렐라 세포의 크기는  $3.3 \pm 0.3 \mu\text{m}$ 로 Fig. 12A의 TEM 사진에서 측정된 크기  $5 \mu\text{m}$ 보다 다소 작게 나타났다고 보고하였다. TEM사진은 세포의 외경을 나타내는 반면 세포내 수분확산계수( $D_{s1}$ )에 의해서 계산된 세포의 크기는 세포 내부직경이므로 이 두 값의 차이는 세포벽의 두께가 된다. Fig. 12B는 물에 분산된 클로렐라 세포 덩어리(cluster)의 모양이다. 이 세포 덩어리는 세포의 수분확산계수( $D_{s2}$ )에 의하여 계산되며 단일 세포크기보다는 약 5배 큰 것으로 계산되었다. Suh *et al.*(2003)은 배양시간에 따른 효모 세포크기를 계산한 결과 지수적 증식기에서  $2.3 \mu\text{m}$ 이던 것이 지수적 증식이 끝나는 24시간 배양에서는  $3.0 \mu\text{m}$ 로 증가하였다고 보고 하였다(Table 1). Hong *et al.*(2004)은  $3.0 \mu\text{m}$ 크기의 효모세포는  $50^\circ\text{C}$ ,  $60^\circ\text{C}$ ,  $70^\circ\text{C}$ 에서 가열되는 동안 각각  $2.5 \mu\text{m}$ ,  $2.3 \mu\text{m}$ ,  $2.1 \mu\text{m}$ 으로 감소함을 PFG-NMR를 통하여 측정하기도 하였다.

### 세포막 투과도의 계산

세포벽 투과도(membrane permeability,  $P$ )를 계산하는 방법은 두 가지로 나눌 수 있다. 첫번째는 세포 안에서 확산되는 분자가 머무르는 시간(residence time,  $\tau$ )과 세포의 표면적(S)에 대한 부피(V)의 비율에 의해서 투과도( $P^{eff}$ )가 계산된다(식 15).

$$P^{eff} = k \frac{V}{S}, \quad k = 1/\tau \quad (15)$$

$$p = p(0) \cdot (-t_d/\tau)$$

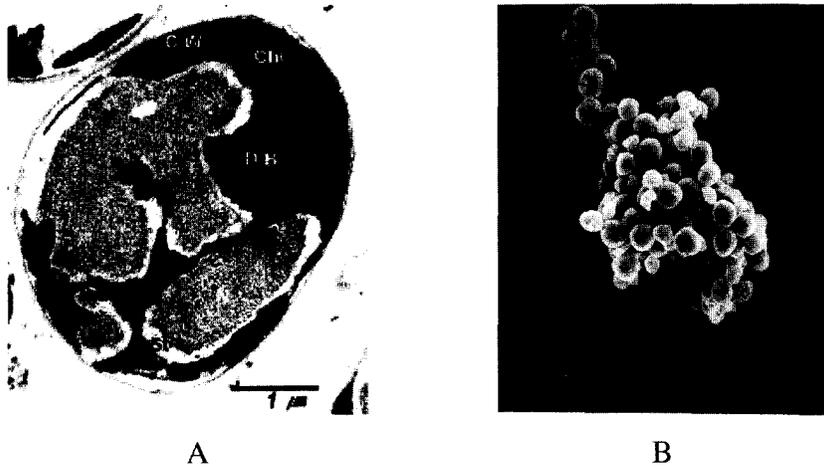


Fig. 12. Photography of *Chlorella* cell by TEM (A) and SEM (B). Scale bar corresponds to  $1\ \mu\text{m}$  for TEM and  $9.7\ \mu\text{m}$  for SEM. C.W: Cell Wall, D.B: Dense Body, St: Starch (Cho *et al.*, 2003).

여기서  $p$ 는 식 12에서 설명된 확산계수에 해당하는 물질 분획이며,  $p(0)$ 는 확산시간( $t_d$ )가 “0”일 때 해당하는 물질분획이다.

두번째는 식 13에서 설명된  $D_p$ ,  $D_0$  그리고  $a$ 의 상관관계를 이용하여 투과도( $P^d$ )가 계산된다 (식 16).

$$\frac{1}{D_p} = \frac{1}{D_0} + \frac{1}{P^d \cdot a} \quad (16)$$

Suh *et al.*(2003)은 Fig. 4B에 소개된 STE sequence를 이용하여 효모의 각 성장단계에서 세포 내부의 확산속도 측정을 이용하여 세포의 크기 및 물의 세포막 투과도(permeability)를 계산하였다. 효모의 성장기(mid exponential growth phase, MGP)에서  $6.3 \pm 0.6 \times 10^{-6}$  m/s의 세포막 투과도가 성장이 끝난 단

계(end of exponential growth phase, EGP)에서는  $8.4 \pm 0.8 \times 10^{-6}$  m/s로 증가하고, 정지기(stationary growth phase, SGP)에서는  $1.5 \pm 0.2 \times 10^{-6}$  m/s로 물의 세포벽 투과도가 감소함을 알 수 있었다. 이와 같이 PFG-NMR은 미생물의 성장 단계별에 따른 세포벽 투과도의 변화를 측정을 가능하게 하고 있다. Hong과 Lee(2004)는 가열 방법에 따른 효모에서 물의 세포막 투과도를 PFG-NMR를 이용하여 측정할 결과 가열 온도가 증가함에 따라 물의 세포벽 투과도가 증가하고, 수욕가열과 충전(ohmic) 가열의 효과를 세포벽 투과도를 이용하여 비교한 결과 ohmic 가열이 효과적이었다는 것을 알 수 있었고, 수욕 가열과 충전(ohmic)가열 동안에 세포 밖으로 용출되는 단백질과 총당 함량(Yoon *et al.*, 2002)을 비교한 결과와 일치함을 보여주었다(Table 2).

Table 2. The water permeabilities calculated and the amount of released cellular materials determined (Hong *et al.*, 2004)

Samples	$P_1^d$ (m/s)	$P_1^{d\beta}$ (m/s)	Exuded cellular materials	
			protein ( $\mu\text{g/ml}$ )	total sugar contents (mg/ml)
Fresh yeast cell(SC)				
27°C	$6.7 \pm 0.7 \times 10^{-7}$	$9.1 \pm 1.0 \times 10^{-7}$	35.7	8.5
Water bath heating(CH)				
50°C	$2.4 \pm 0.3 \times 10^{-6}$	$9.5 \pm 1.0 \times 10^{-7}$	60.7	18.7
70°C	$4.8 \pm 0.5 \times 10^{-6}$	$2.9 \pm 0.3 \times 10^{-6}$	135.7	33.6
Ohmic heating(OH)				
50°C	$2.1 \pm 0.3 \times 10^{-6}$	$1.2 \pm 0.1 \times 10^{-6}$	71.4	22.1
70°C	$8.3 \pm 1.0 \times 10^{-6}$	$1.9 \pm 0.2 \times 10^{-6}$	185.7	48.5

## 기타 식품생물공학관련 연구 현황

PFG-NMR방법은 porous media (Stallmach and Karger, 1999; Menzel *et al.*, 2000; Song, 2003; Karger *et al.*, 2003)나 biological membrane (Trampel *et al.*, 2002; Xia *et al.*, 1995)에서의 물질 확산 및 투과도를 측정하는 연구뿐만 아니라 식품의 wheat starch 젤, 치즈 그리고 빵(Ohtsuka *et al.*, 1994; Callaghan *et al.*, 1983; Umbach *et al.*, 1992; Ohtsuka *et al.*, 1996; Callaghan *et al.*, 1983, Roudaut *et al.*, 1998)과 같은 조직내에서 수분, 지방 또는 당과 같은 물질의 확산현상을 측정하는데 그 사용범위가 확대되고 있다.

분자 특히 물의 자기 확산계수를 통하여, Kuo *et al.*(2003)은 냉동되지 않은 치즈에서의 물의 확산계수 냉동된 치즈에서의 물의 확산계수 차이, pasta filata의 첨가 여부에 따른 물의 확산계수의 차이를 측정함으로써 치즈의 구조를 예측하였다. 지방이 첨가되어 있지 않은 단백질 제품인 casein과 casein gel에서의 물의 확산계수는 자유수(free water)에 비하여 감소하였으나, 자기확산계수와 확산 거리관계식(식 7)에 따라 이 감소된 물은 confined 나 restricted되지 않고 일정 거리를 자유롭게 이동한다고 설명하였다(Mariette *et al.*, 2003; Metais *et al.*, 2002). Reiger *et al.*(2004)은 건조된 사과에서 물의 확산계수를 측정한 결과 사과 내부에서의 점도를 증가시키는 설탕과 같은 사과에 녹아있는 물질들이 건조가 진행되면서 농도가 증가되어 물의 자기 확산계수를 감소 시킨다는 것을 보고 하였으며, porous apple matrix에서 restricted water에 의해 pore size와 부피에 대한 면적비를 계산하였다. Glycerol에 첨가된 빵에서도 감소된 물의 확산계수를 통하여 빵의 구조가 단단해 짐을 알 수 있었다(Baik *et al.*, 2003).

최근 Benga *et al.*(2000, 2003)은 PFG-NMR로 인간을 포함한 여러 가지 동물들의 적혈구 수분투과도를 측정 비교하였으며, Waldeck *et al.*(1995)은 같은 방법으로 혈중 콜레스테롤이 적혈구 세포막의 수분 확산도에 미치는 영향을 조사하였다. Zakharchenko *et al.*(1998)도 PFG-NMR을 이용하여 땅콩에서의 물과 오일의 자기 확산계수를 측정하여, 오일이 restricted diffusion에 해당함을 밝혀내고 땅콩 세포에서 내부 세포막에 둘러 쌓여 있는 오일이 저장되는 cavity 크기가 1.2  $\mu\text{m}$  그리고 외부 세포막에 둘러 쌓여 있는 물의 restricted diffusion에 의해 3.0

$\mu\text{m}$ 의 땅콩 세포의 크기를 계산하였으며, 땅콩 세포막은 물은 통과시키지만 오일은 통과시키지 못한다는 것을 발견하였다. Schoberth *et al.*(2000)은 *Corynebacterium glutamicum*의 수분확산 투과도를 측정하여 1  $\mu\text{m}$ 이하의 세균과 같은 아주 작은 세포내 공간에서의 수분확산계수의 측정도 가능성을 보여주었다

## 앞으로의 전망

PFG-NMR은 확산을 유발시키는 gradient 장치를 low-resolution NMR (LR-NMR)에 장착하는 방식으로 제작 됐지만, 최근에는 high-resolution NMR (HR-NMR)에도 이러한 gradient 장치가 추가되어 아주 정밀한 결과를 얻을 수 있게 되었다. 하지만, HR-NMR에서의 gradient 세기 ( $g=1.5 \text{ T/m}$ )는 LR-NMR에서의 세기( $g=10\sim 200 \text{ T/m}$ )에 비해 아주 약한 편이다. 이는 HR-NMR에서 LR-NMR에와 동일한 크기의 gradient가 적용될 경우 LR-NMR에서처럼 일정한 자기장 유지가 힘들기 때문이다. 아직 상업적으로 판매하는 HR-NMR의 단점이라는 하나 앞으로 HR-NMR에서도 높은 크기를 발생시키는 gradient 장치가 개발될 것이라 기대된다. 강한 gradient는 분자 크기가 작은 물질보다는 상대적으로 확산속도가 아주 느린( $\ll 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ ) 고분자(polymer) 물질의 확산 속도 측정에 효과적이다(Galvosas *et al.*, 2001; Trampel *et al.*, 2002; Fischer *et al.*, 2004). HR-NMR은 분자의 확산 측정 시 낮은 gradient 크기에도 불구하고 높은 해상도의 장점을 이용하여 비교적 확산 속도가 높은 ( $10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ ) 물질들의 확산속도 측정에 사용되고 있다. High-resolution에 의한 혼합물에서의 각 물질들의 chemical shift에 대한 높은 감도를 가지는 HR-NMR은 각 물질들의 신호를 분리해 내기 때문에 동시에 각 물질들의 확산계수를 동시에 측정할 수 있다. HR-NMR을 이용한 분자의 확산 실험 시에는 LR-NMR에서와 같이 pulse sequences들이 동일하게 쓰이며, 각 실험 조건이나 측정하고자 하는 물질의 특성에 적합한 pulse sequences를 선택 또는 개발하여 보다 정확한 확산계수를 측정해야 한다(Pelta *et al.*, 1998). 최근에는 PFG-NMR이라는 이름이 DOSY(diffusion ordered spectroscopy) NMR이라 불리기도 한다. 이러한 DOSY 실험은 식품분야에서도 적용되기 시작하여, Fig. 13에서와 보는 바와 같이  $\tau$ -carrageenan 젤에서 향기성분인 ethyl butanoate와 linalool의 자기 확산계수를 측정하여 이 향기 성분들이  $\tau$ -carrageenan의 젤

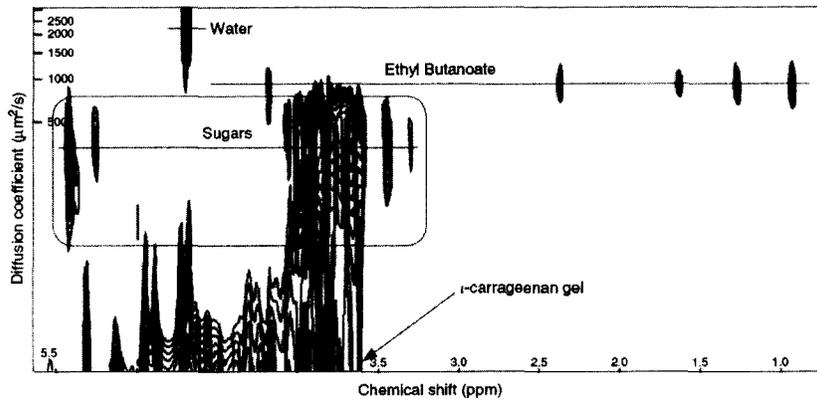


Fig. 13.  $^1\text{H}$  DOSY spectrum of ethyl butanoate in  $\tau$ -carrageenan (1%, w/w) matrix with 0.3% (w/w) NaCl at 303 K (Gostan *et al.*, 2004). PGSE experiments were measured using BPPLIED sequence at frequency of 600 MHz for proton. The gradient was calibrated to 0.475 T/m.

상태에 미치는 영향을 보고 하고 있으며(Gostan *et al.*, 2004), 과일 주스와 맥주에서 확산계수가 다른 물질들을 분리하기도 하여(Gil *et al.*, 2004), 앞으로 식품분야에서도 DOSY를 이용한 식품성분들의 확산계수를 측정함으로써 보다 유용한 정보를 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

## 문헌

- Baik, M.Y. and P. Chinachoti. 2003. Water self-diffusion coefficient and staling of white bread as affected by glycerol. *Cereal Chem.* **80**: 740-744
- Benga, G.H., P.W. Kuchel, B.E. Chapman, G.C. Cox, I. Chiran and C.H. Gallagher. 2000. Comparative cell shape and diffusional water permeability of red blood cells from Indian elephant (*Elephas maximus*) and man (*Homo sapiens*). *Comp. Haematol. Int.* **10**: 1-8
- Benga, G.H., B.E. Chapman, G.C. Cox and P.W. Kuchel. 2003. Comparative NMR studies of diffusional water permeability of red blood cells from different species. *Little Penguin, Eudyptula minor. Cell Biol. Int.* **27**: 921-928
- Callaghan, P.T., K.W. Jolley, J. Lelievre and R.B.K. Wong. 1983. Nuclear magnetic resonance studies of wheat starch pastes. *J. Colloid Interface Sci.* **92**: 332-337
- Callaghan, P.T. 1991. Principles of NMR Microscopy. Clarendon Press, Oxford
- Callaghan, P.T. and K.W. Jolley. 1983. Humphrey RS, Diffusion of fat and water in cheese as studied by pulsed field gradient nuclear magnetic resonance. *J. Colloid Interface Sci.* **93**: 521-529
- Chen, P.L., Z. Long, R. Ruan and T.P. Labuza. 1997. Nuclear magnetic resonance studies of water mobility in bread during storage. *Lebensm. -Wiss. U.-Technol.* **30**: 178-183
- Cho, C.H., Y.S. Hong, K. Kang, V.I. Volkov, V. Skirda, C.Y. Lee and C.H. Lee. 2003. Water self-diffusion in *Chlorella* sp. Studied by pulse field gradient NMR. *Magn. Reson. Imaging* **21**: 1009-1017
- Choi, S.G. and W.L. Kerr. 2003.  $^1\text{H}$  NMR studies of molecular mobility in wheat starch. *Food Res. Int.* **36**: 341-348
- Choi, S.G., K.M. Kim, M.A. Hanna, C.L. Weller and W.L. Kerr. 2003. Molecular dynamics of soy-protein isolate films plasticized by water and glycerol. *J. Food Sci.* **68**: 1-7
- Derome, A.E. 1989. Modern NMR techniques for chemistry research. Pergamon Press, Oxford
- Farrar, T.C. and E.D. Becker. 1971. Pulse and Fourier Transform NMR - Introduction to Theory and Methods. Academic Press, Inc., New York and London
- Fischer, E. and R. Kimmich. 2004. Constant time steady gradient NMR diffusometry using the secondary stimulated echo. *J. Magn. Reson.* **166**: 273-279
- Galvosas, P., F. Stallmach, G. Seiffert, J. Kärger, U. Kaess and G. Majer. 2001. Generation and application of ultra-high-intensity magnetic field gradient pulses for NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **151**: 260-268
- Gil, A.M., I. Durate, E. Cabrita, B.J. Goodfellow, M. Spraul and R. Kerssebaum. 2004. Exploratory applications of diffusion ordered spectroscopy to liquid foods: an aid towards spectral assignment. *Anal. Chim. Acta* **506**: 215-223
- Godefroy, S., J.P. Korb, L.K. Creamer, P.J. Watkinson and P.T. Callaghan. 2003. Probing protein hydration and aging of food materials by the magnetic field dependence of proton spin-lattice relaxation times. *J. Colloid Interf. Sci.* **267**: 337-342

- Gostan, T., C. Moreau, A. Juteau, A. Guichard and M.A. Delsuc. 2004. Measurement of aroma compound self-diffusion in food models by DOSY. *Magn. Reson. Chem.* **42**: 496-499
- Hong, Y.S. and C.H. Lee. 2004. Effect of heat treatment on water permeability of yeast cell as measured by Pulsed Field Gradient (PFG) NMR Spectroscopy. ICEF9, Montpellier, France
- Kärger, J., F. Stallmach and S. Vasenkov. 2003. Structure-mobility relations of molecular diffusion in nanoporous materials. *Magn. Reson. Imaging* **21**: 185-191
- Kim, Y.R. and P. Cornillon. 2001. Effects of temperature and mixing time on molecular mobility in wheat dough. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* **34**: 417-423
- Krishnan, P., D.K. Joshi, S. Nagarajan and A.V. Moharir. 2004. Characterization of germinating and non-germinating wheat seeds by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. *Eur. Biophys. J.* **33**: 76-82
- Kuo, M.I., M.E. Anderson and S. Gunasekaran. 2003. Determining effects of freezing on pasta filata and non-pasta filata mozzarella cheeses by nuclear magnetic resonance imaging. *J. Dairy Sci.* **86**: 2525-2536
- Leung, H.K., J.A. Magnuson and B.J. Bruinsmaa. 1983. Water binding of wheat flour doughs and breads as studied by deuterium relaxation. *J. Food Sci.* **48**: 95-99
- Mariette, F., D. Topgaard, B. Jönsson and O. Söderman. 2002. <sup>1</sup>H NMR diffusometry study of water in casein dispersion and gels. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 4295-4302
- Menzel, M.I., S.I. Han, S. Stapf and B. Blamich. 2000. Characterization of the pore structure and anisotropic self-diffusion in salt water ice. *J. Magn. Reson.* **143**: 376-381
- Métais, A. and F. Mariette. 2003. Determination of water self-diffusion coefficient in complex food products by low field <sup>1</sup>H PFG-NMR: comparison between the standard spin-echo sequence and the T<sub>1</sub>-weighted spin-echo sequence. *J. Magn. Reson.* **165**: 265-275
- Ohtsuka, A. and T. Watanabe. 1996. The network structure of gellan gum hydrogels based on the structural parameters by the analysis of the restricted diffusion of water. *Carbohydr. Polym.* **30**: 135-140
- Ohtsuka, A., T. Watanabe and T. Suzuki. 1994. Gel structure and water diffusion phenomena in starch gels studied by pulsed field gradient stimulated echo NMR. *Carbohydr. Polym.* **25**: 95-100
- Okada, R., S. Matsukawa and T. Watanabe. 2002. Hydration structure and dynamics in pullulan aqueous solution based on <sup>1</sup>H NMR relaxation time. *J. Mol. Struct.* **602-603**: 473-483
- Pelta, M.D., H. Barjat, G.A. Morris, A.L. Davis and S.J. Hammond. 1998. Pulse sequences for high-resolution diffusion-ordered spectroscopy (HR-DOSY). *Magn. Reson. Chem.* **36**: 706-714
- Reiger, M., K. Knörzer, H. Schubert and H.P. Schuchmann. 2004. Water distribution and mobility in food during microwave vacuum drying studied by magnetic resonance. ICEF9, Montpellier, France
- Roudaut, G., D. van Dusschoten, H. Van As, M.A. Hemminga and M. Le Meste. 1998. Mobility of lipids in low moisture bread as studied by NMR. *J. Cereal Sci.* **28**: 147-155
- Schoberth, S.M., N.K. Bär, R. Krämer and J. Karger. 2000. Pulsed high-field gradient in vivo NMR spectroscopy to measure diffusional water permeability in *Corynebacterium glutamicum*. *Anal. Biochem.* **279**: 100-105
- Scott, W.J. 1953. Water relations of *Staphylococcus aureus* at 30°C. *Aust. J. Biol. Sci.* **6**: 549-564
- Scot, W.J. 1957. Water relations of food spoilage microorganisms. *Adv. Food Res.* **7**: 83-124
- Song, Y.Q. 2003. Using intermolecular magnetic fields to obtain pore size distributions of porous media. *Concept. Magnetic Res.* **18(A)**: 97-110
- Stallmach, F. and J. Karger. 1999. The potentials of pulsed field gradient NMR for investigation of porous media. *Adsorption* **5**: 117-133
- Stejskal, E.O. and J.E. Tanner. 1965. Spin diffusion measurements: Spin echoes in the presence of time-dependent field gradient. *J. Chem. Phys.* **42**: 288-292
- Suh, K.J., Y.S. Hong, V.D. Skirda, V.I. Volkov, C.Y. Lee and C.H. Lee. 2003. Water self-diffusion behavior in yeast cells studied by pulsed field gradient NMR. *Biophys. Chem.* **104**: 121-130
- Trampel, R., J. Schiller, L. Naji, F. Stallmach, J. Kärger and K. Arnold. 2002. Self-diffusion of polymers in cartilage as studied by pulsed field gradient NMR. *Biophys. Chem.* **97**: 251-260
- Umbach, S.L., E.A. Davis, J. Gordon and P.T. Callaghan. 1992. Water self-diffusion coefficients and dielectric properties determined for starch-gluten-water mixtures heated by microwave and by conventional methods. *Cereal Chem.* **69**: 637-642
- Valiullin, R.R., V.D. Skirda, S. Stapt and R. Kimmich. 1997. Molecular exchange processes in partially filled porous glass as seen with NMR diffusometry. *Phys. Rev. E* **55**: 2664-2671
- Waldek, A.R., P.W. Kuchel, A. Lennon and B.E. Chapman. 1997. NMR diffusion measurements to characterize membrane transport and solute binding. *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.* **30**: 39-68
- Waldeck, A.R., M.H. Nouri-Sorkhabi, D.R. Sullivan and P.W. Kuchel. 1995. Effects of cholesterol on transmembrane water diffusion in human erythrocytes measured using pulsed field gradient NMR. *Biophys. Chem.* **55**: 197-208
- Xia, Y., T. Farquhar, N. Burton-Wurster, M. Vernier-Singer, G. Lust and L.W. Jelinski. 1995. Self-diffusion monitors degraded cartilage. *Arch Biochem Biophys* **10**: 323-328
- Yoon, S.W., C.Y. Lee, K.M. Kim and C.H. Lee. 2002. Leakage of cellular materials from *Saccharomyces cerevisiae*

siae by ohmic heating. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 183-188  
Zakhartchenko, N.L., V.D. Skrida and R.R. Valiullin. 1998. Self-diffusion of water in peanuts investigated by PFG-

NMR. *Magn. Reson. Imaging* **16**: 583-586  
Zhang, H., K. Nishinari, M.A.K. Williams, T.J. Foster and I.T. Norton. 2002. A molecular description of the gelation mechanism of curdlan. *Int. J. Biol. Macromol.* **30**: 7-16