

П. П. Суханов, А. Ю. Крыницкая, Е. В. Петухова,  
П. П. Крыницкий

## ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ДРОЖЖЕВОГО ПРЕПАРАТА МЕТОДОМ ЯМР РЕЛАКСОМЕТРИИ.

### СООБЩЕНИЕ 2. ВЛИЯНИЕ ПРОЦЕССА СУШКИ

*Ключевые слова:* дрожжевой препарат, обезвоживание, сушка, ЯМР релаксометрия, структурно-динамическое состояние.

*Методом ЯМР релаксометрии показано, что конечный состав и структурно-динамическое состояние осадка (пасты) центрифугированного дрожжевого препарата существенно зависят как от длительности сушки, так и от его состояния перед сушкой, которое определяется режимом центрифугирования. В результате теплового и механического воздействия состав пасты может измениться качественно – от дрожжевой массы различной влажности до биомассы, включающей в себя продукты взаимодействия компонент протоплазмы, выделившейся из микроорганизмов в процессе интенсивного центрифугирования.*

*Keywords:* yeast preparation, dewatering, drying, NMR relaxometry, structural-dynamical state.

*It is shown by NMR relaxation method, that the final composition and structural-dynamical state of the centrifuged yeast preparation pellet (paste) essentially depend either from the drying duration, or from its state before drying, which is determined by the centrifugation regime. The paste composition, as the result of heat and mechanical impact, can change qualitatively – from yeast mass of different moisture content up to a biomass, including the products of interaction of protoplasm components, which have been extracted from microorganisms during the intensive centrifugation.*

### Введение

Ядерный магнитный резонанс (ЯМР) давно и успешно применяется для анализа строения и поведения диамагнитных молекулярных систем. На этом физическом явлении основан целый ряд аналитических методик, одна из которых - ЯМР - релаксометрия [1] – может использоваться как метод неразрушающего контроля и(или) мониторинга структурно-динамического состояния любой динамической системы микроскопического уровня. Это особенно ценно при анализе эволюции микроорганизмов (МКО), поскольку низкоэнергетические ( $\ll$  кТ) зондирующие электромагнитные импульсы меггерцового (вплоть до гигагерцового) диапазона не способны внести ощутимых возмущений в текущее состояние даже таких высокоорганизованных и особо чувствительных к внешним воздействиям объектов, как молекулярно-биологические системы (МБС) [2]. В то же время анализ полученных методом ЯМР-релаксометрии параметров строения и молекулярной подвижности биомассы или ее отдельных компонентов дополняет и облегчает интерпретацию экспериментальных данных о процессах и(или) механизмах метаболизма МКО.

Данная публикация продолжает освещать результаты анализа методом ЯМР-релаксометрии характера воздействия физико-механических факторов, используемых для концентрирования водных суспензий (то есть центрифугирования и сушки), на структурно-динамическое (СД) состояние компонентов микробиологических препаратов. Этап центрифугирования рассмотрен в работе [3], где также изложена необходимая информация об использованной аппаратуре и методиках ЯМР эксперимента.

### Экспериментальная часть

В работе применяли дрожжевой препарат, содержащий 3 грамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (раса 509), используемых в хлебопекарной промышленности, на литр воды. При культивировании дрожжей применялись две среды. Твердая среда использовалась для хранения музейной культуры, получения свежей культуры дрожжей и посевного материала. Жидкая питательная среда применялась при выращивании культуры. В качестве твердой питательной среды (ПС) использовалась среда агар Сабуро, в состав которого входит пептон ферментативный 12 г/л, экстракт кормовых дрожжей 5 г/л, D(+) глюкозы 30,5 г/л, NaCl 5 г/л, агар 9 г/л. Для дальнейшего использования среды, после смешения всех компонентов, колбу нагревали на водяной бане до полного растворения агара и стерилизовали 30 мин. при  $P = 0,5$  атм. [4]. В качестве ПС для культивирования дрожжей была выбрана среда Сабуро следующего состава: глюкоза 40 г, пептон питательный 10 г, вода 1000 мл. После полного растворения в воде жидкая ПС стерилизовалась в автоклаве при тех же условиях, что и твердая ПС. Дополнительные растворы микроэлементов и витаминов в питательные среды не вводились.

При проведении структурно-динамического анализа МБС в качестве опорных меток использовались: дрожжи, обезвоженные вакууммированием после разморозки (сухая дрожжевая масса (СДМ)) и сухая дрожжевая биомасса ((СДБ) - дрожжи, высушенные до постоянного веса), а также клеточная стенка *in vitro*, полученная путем растирания пасты в ступке совместно со стеклом и дальнейшего центрифугирования полученной массы и ее сушки до постоянного веса [5].

Следующим этапом концентрирования (обезвоживания) дрожжевого препарата (ДП) является сушка пасты, полученной путем центрифугирования. Для этого ДП центрифугировали при частотах вращения  $n_1 = 3000$  об/мин и  $n_2 = 6000$  об/мин (центрифуга ОПН-8) в течение 5 - 20 минут, после чего удалялась надосадочная жидкость ( $\geq 90\%$  первоначального объема) и каждый полученный осадок (пасту) делили на 3 части. Первая часть исследовалась в пастообразном виде ранее [1]; вторая и третья части перед ЯМР - измерениями помещались в сушильный шкаф (низкотемпературную лабораторную электропечь SNOL 67/350) на 10 и 20 минут соответственно при температуре  $78^\circ\text{C}$  (стандартный режим сушки микроорганизмов [5]).

### Результаты и их обсуждение

На рис. 1 показана зависимость релаксационных параметров, характеризующих конечное структурно-динамическое состояние паст, от интенсивности механического воздействия при центрифугировании и длительности последующей сушки. Сравнение данных рис. 1 для стадии сушки с аналогичными данными для процесса центрифугирования [3] показывает, что после сушки времена поперечной релаксации (и, соответственно, молекулярная подвижность) исходных паст вследствие резкого падения концентрации влаги уменьшились на два - три порядка и в целом существенно зависят от времени сушки ( $t_c$ ). При этом наблюдаемые значения длинных времен поперечной релаксации  $T_2^1$  (рис. 1а) при  $t_c = 10$  минут ( $10'$ ) уменьшаются пропорционально числу оборотов центрифуги  $N$  и обратно пропорционально частоте ее вращения  $n$ , различаясь почти на порядок при изменении  $n$  вдвое. При  $t_c = 20'$  значения  $T_2^1$  уже не зависят от  $n$  и с увеличением  $N$  не уменьшаются, как при  $t_c = 10'$ , а растут вплоть до области  $N \sim 80000 \div 90000$  оборотов (об.) центрифуги, где значения функций  $T_2^1(N)$  для различных времен сушки совпадают. При дальнейшем росте  $N$  ( $N > 80000$  об.) значения  $T_2^1$  при всех  $n$  и  $t_c$  уменьшаются симбатно функции  $T_2^1(N)$  для значений параметров обезвоживания ( $n_2, 10'$ ).

Функция  $T_2^2(N)$  для ( $n_1, 10'$ ) изменяется симбатно  $T_2^1(N)$  для ( $n, 10'$ ). В остальных случаях значения  $T_2^2(N)$  меняются в интервале от  $T_2$  клеточной стенки до  $T_2$  сухой дрожжевой (био)массы и в первом приближении обратно пропорциональны  $n$  и  $t_c$ . При этом при ( $n_2, 20'$ ), то есть в условиях максимального физико-химического воздействия на ДП, в спаде поперечной намагниченности (СПН) проявляется промежуточная компонента («фаза») с параметрами  $T_2'^2$  и  $P_2'^2$  (рис. 1б).

Характерно, что значения населенностей коротких времен релаксации ( $P_2^2$  и  $P_2'^2$  (рис. 1 б)), описывающие состояние наименее подвижных структур при  $n_2$ , с увеличением  $N$  меняются антибатно ( $P_2^2$  плавно падает, а  $P_2'^2$  растет), но их сумма ( $P_2^2 + P_2'^2$ ) остается приблизительно постоянной и равной 80%, что, как и значения  $T_2^1$ , приблизи-

тельно соответствует релаксационным параметрам СДМ - сухой дрожжевой массы (консорциума дрожжей, обезвоженного без использования тепловой обработки), причем  $T_2^2(\text{СДМ}) \approx T_2^2(\text{СДБ})$ , то есть

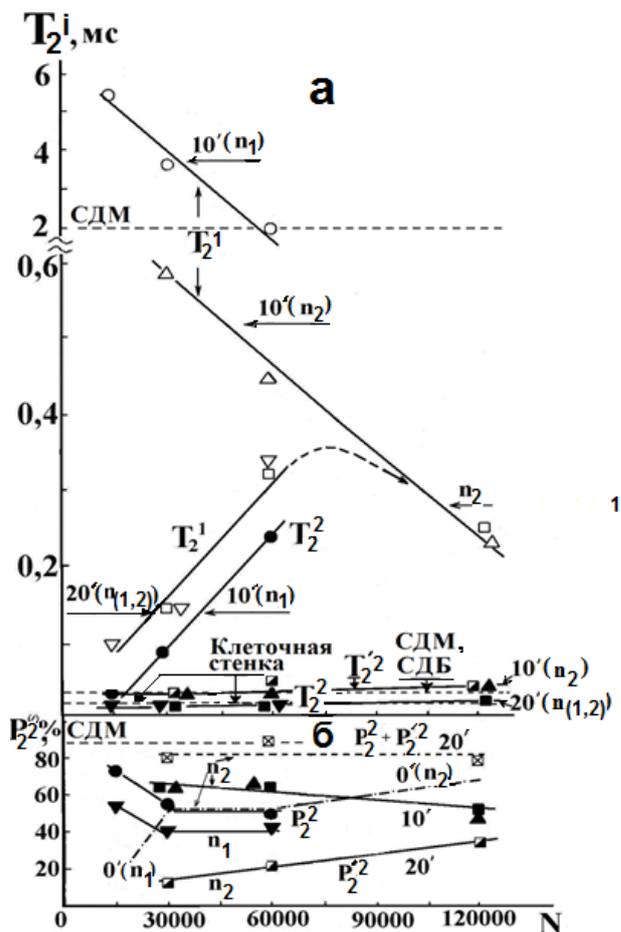


Рис. 1 - Зависимость ЯМР параметров пасты дрожжевого препарата от числа оборотов центрифуги ( $N$ ) при различных частотах ее вращения ( $n_1 = 3000$  об/мин ( $\circ, \nabla$ ),  $n_2 = 6000$  об/мин ( $\triangle, \square$ )) и временах последующей сушки ( $t_1 = 10$  мин. ( $\circ, \triangle$ ),  $t_2 = 20$  мин. ( $\nabla, \square$ ),  $0'$  - без сушки). Значки с более затемненным полем описывают менее подвижную СД фазу. Прерывистые линии соответствуют ЯМР параметрам указанных компонентов и (или) условий воздействия на МБС; а - времена поперечной релаксации  $T_2^1, T_2^2$  со штрихом - время релаксации, промежуточное между  $T_2^1$  и  $T_2^2$ ; б -  $P_2^2$  - населенность короткой компоненты СПН (со временем релаксации  $T_2^2$ ),  $P_2'^2$  со штрихом - населенность промежуточной компоненты СПН

времени релаксации аналогичного СДМ консорциума МКО, обезвоженного уже с применением тепловой обработки. Отсюда можно предположить, что обе менее подвижные фазы относятся к содержанию клеток, а фаза с параметрами  $T_2^1$  и  $P_2^1$  - это наиболее подвижная молекулярная среда, локализованная вне МКО. Поскольку  $T_2^2 \approx T_2$  клеточной стенки, причем  $T_2^2(n_2, 20') = T_2^2(\text{КС})$ , то естественно предположить, что параметры  $T_2'^2$  и  $P_2'^2$  характе-

ризуют более мобильное, по сравнению с клеточной стенкой, состояние внутриклеточных структур.

Об этом же свидетельствует непрерывный рост функции  $P_2^2(N)$ , которая качественно повторяет аналогичную зависимость для процесса насыщения МКО избыточным количеством жидкости при центрифугировании [3]. В то же время при  $N \geq 30000$  об. функция  $P_2^2(N)$  для 6000 об/мин ( $n_2$ ) одинакова для времен сушки  $t_c > 0$ , как и ход зависимости  $P_2^2(N)$  для  $t_c = 0$  и  $t_c = 10'$  при 3000 об/мин ( $n_1$ ), хотя обе закономерности и антибаты относительно друг друга. И если значения функции  $P_2^2(N)$  для  $n_1$  ( $P_2^2(N, n_1)$ ) обратно пропорциональны времени сушки, причем ее ход при  $N \geq 30000$  об. совпадает с поведением образцов для  $t_c = 0$ , то при  $N < 30000$  об. функция  $P_2^2(N)$  для  $t_c = 0$  ( $P_2^2(N, 0')$ ) ведет себя антибатно аналогичным функциям для  $t_c > 0$ . В результате при  $N \sim 80000$  об. наблюдается пересечение не только функций  $T_2^1(N, n_2, 10')$ ,  $T_2^1(N, n, 20')$  и  $T_2^2(n_1, 10')$  (рис. 1а), но и  $P_2^2(N, 0')$  и  $P_2^2(N, 10')$  (рис. 1б), то есть состав пасты при нулевом времени высокотемпературной сушки (или в условиях естественной сушки при комнатных температурах) в этой точке оказывается приблизительно равным ее составу после высокотемпературной сушки в течение 10 минут. Это позволяет предположить, что последствия центрифугирования при значениях  $N$ , не превышающих 80000 об., в сочетании с последующей принудительной (при повышенной температуре) сушкой в течение 10 минут, для морфологии и физиологии МКО будут незначительными.

Таким образом, структурно-динамическое состояние пасты после сушки при повышенной температуре существенно зависит не только от ее длительности, но и от исходного (перед сушкой) СД состояния пасты, которое, в свою очередь, определяется параметрами центрифугирования дрожжевого препарата. Рассмотрим эту ситуацию более детально с учетом сформулированных ранее [3] последствий центрифугирования для ДП.

I.  $0 < N \leq 15000$ . Область «разгона» консорциума МКО (то есть диспергирования твердофазной компоненты суспензии и ее концентрирования на поверхности ротора центрифуги).

II.  $15000 < N \leq 60000$ . Область концентрирования осадка и начального «набухания» твердофазной компоненты суспензии (то есть поглощения воды микроорганизмами).

III.  $N > 60000$ . Область интенсивного набухания и последующего начального «плазмолиза» МКО вследствие необратимого разрушения клеточной стенки и вытекания содержимого клетки (протопласта) в окружающую водную среду.

Следовательно, состав пасты по мере увеличения длительности и интенсивности центрифугирования меняется качественно – от совокупности водосодержащих компонент с различной степенью взаимосвязи  $H_2O$  с МКО (от внешней ассоциации до внутренней локализации) - вплоть до выделения высоковязких клеточных структур (протоплазмы) и внутриклеточной воды из состава МКО во внешнюю среду. Тогда, с учетом этой и содержащейся

на рис. 1 информации, данные ЯМР релаксометрии по обеим стадиям принудительного обезвоживания (центрифугирования и сушки при повышенной температуре) можно систематизировать в виде структурно-динамической схемы (модели), представленной на рис. 2.

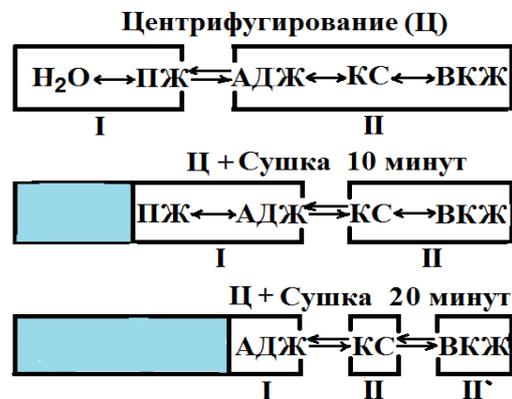


Рис. 2 - Структурно-динамическая модель поведения компонентов паст дрожжевого препарата по мере их центрифугирования и сушки. Используемые сокращения: КС – клеточная стенка, ВКЖ – внутриклеточная жидкость, АДЖ – адсорбированная жидкость, ПЖ – поровая жидкость; I – наиболее подвижная СД фаза с параметрами  $T_2^1, P_2^1, D^1, P_d^1$ ; II – наименее подвижная СД фаза с параметрами  $T_2^2, P_2^2, D^2, P_d^2$ ; II' – заторможенная (промежуточная между I и II) фаза с параметрами  $T_2^2, P_2^2$ ; ↔ символ «быстрого», → ← символ более «медленного»(промежуточного) межмолекулярного и(или) межпротонного обмена, то есть обмена СД состояниями между однотипными молекулами и(или) протонами, локализованными в различном окружении. Синее (серое) пространство – символ воды, удаленной из пасты при сушке

### Структурно-динамическая схема (модель) процесса принудительного обезвоживания дрожжевого препарата

Модель основана на предположении, что в водосодержащей микробиологической системе скорость обменных процессов с участием молекул  $H_2O$  в различных состояниях определяет количество, состав и наблюдаемые релаксационные параметры фаз [6 - 9]. При этом под различными видами «водной фазы» понимаются все возможные жидкофазные компоненты, а не только вода как таковая. При этом «быстрый» (для данной системы (↔)) обмен предполагает, что в данных условиях время жизни релаксирующей частицы в одном состоянии (окружении) много меньше длительности процесса релаксации, в течение которого она способна многократно сменить свое окружение (что определяет скорость обмена), тем самым формируя усредненные по времени «однофазные» области. Более «медленный» (→ ←) обмен предполагает сближение времен жизни в определенном СД состоянии со

временем (длительностью) процесса релаксации, и в зависимости от соотношения этих параметров оказывает существенное влияние на наблюдаемые времена релаксации и населенности вплоть до выделения из них релаксационных параметров индивидуальных «фаз», иногда близких по своему составу к термодинамическим фазам, в рамках которых времена жизни в них оказываются не менее длительности процесса релаксации [8].

Необходимо отметить, что в исследованных центрифугированных системах «фазность» релаксационных процессов проявляется только по мере спин-спиновой релаксации, а в ходе спин-решеточной релаксации соотношение скоростей релаксации и обмена таково, что во всех исследованных композициях соблюдаются условия быстрого обмена и наблюдается единое (усредненное) время релаксации  $T_1$  [3]. Но при этом скорость обмена в процессах спин-спиновой релаксации ( $T_2$ ) и соответствующие им СД образования в данных микробиологических системах (пастах) зависят от параметров тепломеханического концентрирования дрожжевого препарата ( $n$ ,  $N$ ,  $t_c$ ) и меняются по мере центрифугирования и сушки, что и отражено на рис. 2. Видно, что по мере ужесточения тепломеханических факторов сокращается количество жидко(-водо-) содержащих структур, а также характер (масштаб и(или) механизм) обменных процессов в них и между ними – от преимущественно *протонного* (на адсорбированных поверхностях или в водной среде) к *протонно-молекулярному* (через поверхность клеточной стенки (КС)) вплоть до преимущественно *молекулярного* (через поровые каналы КС и(или) через поровое пространство, образованное слоями жидкости между слоями микроорганизмов (ПЖ)), с участием *локализованных* (например, в пределах клеточной стенки), *диффузионно ограниченных* (например, в поровом пространстве КС или ПЖ) [6], а также *пространственно неограниченных* протоносодержащих компонентов (например, во всем объеме «свободной» (блочной) воды). Особенно интересна последняя схема (центрифугирование + сушка в течение 20 минут), согласно которой в данных условиях наблюдается СД расслоение внутриклеточного пространства и(или) нарушение проницаемости клеточной стенки (падение скорости обменных процессов преимущественно вследствие падения конвективной скорости переноса воды через КС [10, 11]) даже в III области центрифугирования. Это свидетельствует о том, что достаточно интенсивная принудительная сушка способна подавить встречный (конкурирующий) процесс интенсивного набухания и начального «плазмолиза» МКО в III области центрифугирования, по-видимому, вследствие полимеризации олигомерных компонентов протоплазмы, инициированной как межцепными процессами в водной среде, так и(или) воздействием повышенной температуры [2, 12].

Таким образом, из полученных результатов следует, что для приготовления образцов пасты дрожжевого препарата с исходным содержанием микробиологической массы  $\sim 3\%$ , предназначенных для дальнейшего использования в качестве

МБС и(или) для сравнительного анализа их структурно-динамического состояния методом ЯМР релаксометрии, можно рекомендовать придерживаться следующих значений технологических параметров:

- **время сушки**  $t_c \sim 10$  мин. при числе оборотов центрифуги  $N \sim 60000 \div 80000$ , откуда

- **время центрифугирования**  $t_{ц} \sim 20 \div 27$  мин.

при частоте вращения центрифуги  $n = 3000$  об/мин, и  $t_{ц} \sim 10 \div 13,5$  мин. при  $n = 6000$  об/мин.

При этом для соблюдения стандартности процедуры при подготовке серии гомологичных образцов предпочтительнее пользоваться одними и теми же выбранными значениями  $n$  и  $N$ . Отклонение от оптимального режима в сторону более жестких (более высоких) значений препаративных параметров ( $n$ ,  $N$  (что соответствует определенному времени центрифугирования  $t_{ц}$ ),  $t_c$ ) чревато необратимыми изменениями в МКО, а ослабление оптимального режима (уменьшение значений  $n$ ,  $N$ (или  $t_{ц}$ ),  $t_c$ ) увеличивает вероятность получения образцов с нестабильным составом и низкой воспроизводимостью свойств.

Полученные результаты позволяют стандартизировать и повысить эффективность молекулярного структурно-динамического анализа микроорганизмов и препаратов на их основе по крайней мере в исследованиях методом ЯМР релаксометрии [13].

## Литература

1. Фаррар, Т. Импульсная и Фурье-спектроскопия ЯМР: пер. с англ. под ред. Э.И. Фе-дина. / Т. Фаррар, Э. Беккер. – М.: Мир, 1973. - 164 с.
2. Б. Глик, Дж. Пастернак. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. / М.: Мир, 2002. – 589 с.
3. Суханов, П.П. Изучение структурно-динамического состояния дрожжевого препарата методом ЯМР релаксометрии. Сообщение 1. Влияние процесса центрифугирования / П.П. Суханов, А.Ю. Крыницкая, Е.В. Петухова, П.П. Крыницкий // Вестник Казан. технол. ун-та. – 2013. №8. С. 239-243.
4. Слюсаренко, Т.П. Лабораторный практикум по микробиологии пищевых производств / Т.П. Слюсаренко – М.: Легкая и пищ. пром., 1984. - 208 с.
5. Методы общей бактериологии. В трех томах. Т. 2. / Под редакцией Ф. Герхардта и др. - М.: Мир, 1984. – 470 с.
6. Tanner, J.E. Restricted Self-Diffusion of Protons in Colloidal Systems by the Pulsed-Gradient Spin-Echo Method / J.E. Tanner, E.O. Stejskal//J.Chem.Phys.,1968.–V.49.- P.1768.
7. Resing, H.A. Apparent Phase-Transition Effect in the NMR Spin-Spin Relaxation Time Caused by a Distribution of Correlation Times. / H.A. Resing // J. Chem. Phys., 1965. – V. 43. - № 2. – P. 669.
8. Zimmerman, J.R. Nuclear Magnetic Resonance Studies in multiple phase Systems: lifetime of a water molecule in an absorbing phase on silicagel. / J.R. Zimmerman, W.E. Britten. // J. Phys. Chem., 1957. - V.61. - № 9 – P. 1328 - 1333.
9. Вашман, А.А. Ядерная магнитная релаксационная спектроскопия. / А.А. Вашман, И.С. Пронин // М.: Энерго-атомиздат, 1986. - 232 с.
10. Сибгатуллин, Т.А. Совместный анализ диффузионного и релаксационного поведения воды в клетках мякоти яблока./ Т.А. Сибгатуллин, А.В. Анисимов, Р.А. de Jager и др.// Биофизика. – 2007. –Т. 52. - № 2. – С. 268 – 276.
11. Сибгатуллин, Т.А. Трансляционная динамика воды в

цитоплазме клеток паренхимы плода *Malus domestica*. Исследование импульсным методом ЯМР. / Т.А. Сибгатуллин, Ф.Дж. Вергельт, А.В. Анисимов, Х. Ван Ас. // Доклады РАН. – 2006. –Т. 411. - № 3. – С. 427 – 429.

12. Суханов, П.П. Особенности процессов структурирования в гетероцепных олигомерах (по данным ЯМР).

/ П.П. Суханов // Вестник Казан. технол. ун-та. - 2005.- №2 - Ч. II. С. 126 – 156.

13. Крыницкая, А.Ю. Влияние ЭМИ КВЧ на активность препарата «Фитоспорин» / А.Ю. Крыницкая, П.П. Суханов, Е.В. Петухова и др. // Вестник Казан. технол. ун-та. – 2011. - № 7. – С. 181-184.

---

© **П. П. Суханов** – д.х.н., проф. КНИТУ, Paulpost3@yandex.ru; **А. Ю. Крыницкая** – к.б.н., доц. КНИТУ, Paulalla@yandex.ru; **Е. В. Петухова** – к.б.н., доц. КНИТУ, Petel07@yandex.ru; **П. П. Крыницкий** – студ. КНИТУ.