

П. П. Суханов, П. П. Крыницкий, А. Ю. Крыницкая,  
Г. А. Морозов

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

### СООБЩЕНИЕ 4. ЯМР МЕТКИ ДЛЯ АНАЛИЗА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ

*Ключевые слова:* микробиологические системы, ЯМР релаксометрия, молекулярное структурно-динамическое состояние.

*Представлены оригинальные и некоторые литературные данные о магнитно-релаксационных параметрах ряда нативных и модельных микробиологических объектов и их компонентов, позволяющие проводить сравнительный анализ молекулярного структурно-динамического состояния микробиологических систем in vivo и in vitro, в том числе и последствий любого воздействия на изучаемый биообъект.*

*Keywords:* microbiological systems, NMR relaxometry, molecular structural-dynamical state.

*Original and some literature data about magnetic relaxation parameters of a number of native and model microbiological objects and their components are presented. It enables to produce comparative analysis of molecular structural-dynamical state of microbiological systems in vivo and in vitro, including the consequences of any impact on the studying biological object.*

#### Введение

Ранее [1 - 3] было показано, что в системе ЯМР координат возможен анализ состава и строения микроорганизмов (МКО), а также их эволюции, включая процессы переноса флюидов в водополимерных системах биологического происхождения. Однако для повышения информативности подобных исследований необходимо опираться на ЯМР шкалу, охватывающую значения магнитно-релаксационных параметров (МРП) по крайней мере основных компонентов микроорганизмов. Настоящее сообщение частично решает эту задачу, одновременно продолжая серию работ по выявлению конкретных возможностей практического применения импульсных методик ЯМР в биотехнологических исследованиях [1 - 3].

#### Экспериментальная часть

Эксперименты проводились на серии модельных образцов – как индивидуальных соединений категории х.ч., так и специально приготовленных препаратов. К последним относятся:

- КЖ - культуральная жидкость – водная дисперсия МКО или иных биообъектов, содержащая от 0,3 до 1 мас. % твердого компонента;

- ДП - дрожжевой препарат – водная дисперсия дрожжей (в данном случае - выращенной на мелассе музейной культуры расы хлебопекарных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* – 509), содержащая до 3 мас. %% твердого компонента [1];

- паста - осадок, полученный после центрифугирования дрожжевого препарата (в данном случае при частотах вращения  $n_1 = 3000$  об/мин или  $n_2 = 6000$  об/мин с общим числом оборотов от 15000 до 120000) с последующим удалением надосадочной жидкости ( $\geq 90\%$  первоначального объема) [1];

- ДМ - дрожжевая масса (или дрожжи in vivo) – размороженная, но не обезвоженная, музейная культура дрожжей [1, 4];

- ВД – вакуумированные дрожжи – ДМ, обезвоженная вакууммированием;

- СДМ - сухая дрожжевая масса – ДМ, отцентрифугированная и высушенная по разработанной методике [1, 2];

- СДБ - сухая дрожжевая биомасса – ДМ, высушенная до постоянного веса [2];

- ДС – дрожжевая смесь (или дрожжи in vitro) - образец, полученный путем растирания в ступке ДМ (ДС<sub>ДМ</sub>) или СДМ (ДС<sub>СДМ</sub>) совместно с битым стеклом; представляет собой смесь компонентов дрожжевой структуры, как нативных, так и преобразованных в результате механической обработки (растирания);

- КС – клеточная стенка – образец, полученный путем растирания пасты в ступке совместно с битым стеклом (аналогично ДС) и дальнейшего центрифугирования полученной массы и ее сушки до постоянного веса (аналогично СДБ); предположительно содержит наиболее твердофазные (преимущественно высокомолекулярные) компоненты дрожжевой структуры, как нативные, так и преобразованные в результате последовательной механической (растирание и центрифугирование) и тепловой (сушка) обработки.

Результаты проведенных при комнатных температурах ( $17 \div 27^\circ\text{C}$ ) измерений на ядрах водорода на частоте 19 Мгц охватывают интервал концентраций  $\text{H}_2\text{O}$  (в МКО или в модельных препаратах) от близких к нулю до 99,7 мас. %. Полная информация о применяемой аппаратуре и методиках ЯМР эксперимента изложена в работе [1], при этом используются следующие сокращения: КП – метод Карра-Парселла-Мейбума-Джилла, ССИ – спад свободной индукции, БП – метод бегущей последовательности [1].

#### Результаты и их обсуждение

Метод ЯМР-релаксометрии позволяет оценивать структурно-динамические последствия того или иного воздействия на микроорганизмы и

микробиологические системы (МБС) с их участием. Однако для этого необходимо представление о нормальном молекулярном структурно-динамическом (МСД) состоянии конкретного микробиологического объекта, которое *invitro* складывается из МРП отдельных моно-, олиго- и полимерных компонентов различной природы, а также низкомолекулярных соединений в его составе. Тогда сравнение их МРП с аналогичными параметрами нативного образца (МБС *invivo*)

позволяет выявить как различия между данными МБС в состояниях *invivo* и *invitro*, так и характер изменений, происходящих в них под тем или иным воздействием. Необходимые данные для первичного структурно-динамического анализа дрожжевых систем содержатся в табл. 1. Они получены в результате собственных измерений МРП соответствующих соединений и(или) композиций на их основе.

**Таблица 1 – МРП образцов, моделирующих состав дрожжевых систем**

№ п/п	МРП и методика их измерения Образец	T <sub>2</sub>		T <sub>1</sub> , с	D · 10 <sup>10</sup> , м <sup>2</sup> /с
		ССИ, мкс	КП, мс	БП	
1	ДП [1]	140*	1720 (95) 36 (5)	2,5	24
2	ДП после min. ^ центрифугирования	140*	165 (91) 4,2 (9)	-	-
3	Паста ^^	-	220 ÷ 900 (95 ÷ 25) 36 ÷ 180 (5 ÷ 75)	1,1± 0,15	15 ÷ 25 (0,65) 2 ÷ 5 (0,35)
4	Фосфатидилхолин (50% водный раствор лецитина)	-	500 (90) 70 (7) 7 (3)	-	-
5	Лецитин (фосфолипид)	125* [10]			
6	ДМ [1]	270* (64) 20*(36)	25 ÷ 36**	0,12	11 ÷ 16**
7	ДМ после 4 мес. хранения при +4 <sup>0</sup> С	220* (64) 20* (36)	2 (25) 0,48 (75)	<i>Примечание.</i> Значения МРП ЯМР фаз записаны сверху вниз в порядке возрастания скоростей (падения времен) релаксации. В скобках даны значения населенностей соот-ветствующих компонент в % (молярные доли протонов в составе протонных фаз относительно общего числа протонов в системе). * - неэкспоненциальный по форме (Гауссоподобный) спад свободной индукции, из которого T <sub>2</sub> определялось как время падения амплитуды сигнала ССИ в e раз; ** - значение зависит от влажности образца; *** - МРП тех же соединений или систем после ручного «сшивания» результатов измерений по двум методикам (ССИ и КП). ^ - минимальному (min) центрифугированию соот-ветствует 15000 оборотов центрифуги [1]; ^^ - МРП меняются пропорционально числу оборотов центрифуги [1]. ^^^ - амилоза – линейный полисахарид (ПС), амилопектин – разветвленный ПС.	
		2мс (20) *** 0,48мс (44) 20*мс (36)			
8	ВД	2000 (0,12) 40*(0,88)			
9	СДМ	88 (8) 40* (13) 20* (79)			
10	СДБ	40*			
11	ДС <sub>ВД</sub>	60 (37) 20* (63)			
12	ДС <sub>СДМ</sub>	33 (46) 12* (54)			
13	ДС <sub>СДМ</sub> + дополнит. центри- фугирование (10')	22			
14	КС	20* [1, 2]			
15	Манноза	41 (24) 12,5 (76)			
16	Глюкоза	24			
17	Сахароза	65 (68) 17 (32)			
18	Целлюлоза	41 (8) 12* (92)			
19	Белок казеиновый	71 (26) 20* (74)			
20	Крахмал [амилоза + амилопектин] ^^^	150*(70) 20* (30)	5,6 (30) 0,8 (70)		
		5,6мс (20) *** 0,8мс (50) 20*мс (30)			

Значения параметров, описывающих кинетическую кривую поперечной ядерной магнитной релаксации, качественно определяются двумя типами механизмов переноса ядерной

намагниченности [5]. Условно (по аналогии с процессами переноса субстанций в химико-технологических процессах [6]) их можно обозначить как конвективные (структурно-

ориентированные или твердофазные) и диффузионные (случайно-ориентированные или жидкофазные). Они дают свой вклад в значения всех ЯМР параметров в рамках любых измерительных методик и при любых физических состояниях образцов. Однако параметры, получаемые из ССИ и при измерениях коэффициента диффузии  $D$  особо чувствительны к процессам диффузии. И если в последнем случае это обстоятельство является достоинством соответствующей методики, то МРП жидкофазных систем значительно искажаются диффузией. В то же время измеренные по методике КП значения параметров поперечной релаксации ( $T_2^i$ ,  $P_2^i$ ) в тех же образцах меняются незначительно благодаря предусмотренной в рамках этой методики компенсации потерь намагниченности, обусловленных неупорядоченными микропотоками флюидов. В то же время при незначительной диффузии (в твердоподобных молекулярных системах) ССИ оказывается наиболее точным источником молекулярной структурно-динамической информации.

С учетом всего вышеизложенного попробуем прокомментировать некоторые данные из таблицы. Здесь наиболее интересна группа образцов с номерами от № 6 до № 14, характеризующая эволюцию магнитно – резонансных параметров (МРП) стандартных дрожжей (дрожжевой массы (ДМ)), а также моделирующих их состав соединений и препаратов, в зависимости от условий наблюдения (хранения) или приготовления. Например, хранение ДМ при температуре ниже комнатной (образцы № 6 и № 7) практически не влияет на состояние твердофазных структур, но при этом закономерно снижается подвижность водосодержащих компонентов, постепенно теряющих влагу в естественных (атмосферных) условиях.

Закономерности стимулированного обезвоживания нативных (*invivo*) МКО представлены образцами № 8 - № 10. Образец ВД (№ 8) – это консорциум стандартных (музейных и т.п.) дрожжей, обезвоженных без использования тепловой обработки, образец СДБ (№ 10) – аналогичный консорциум, обезвоженный до постоянного веса, а между ними – образец СДМ (№ 9), отличающийся от двух предыдущих образцов использованием стадии центрифугирования в процессе обезвоживания. При этом  $T_2^2(\text{ВД}) \approx T_2(\text{СДБ})$ , то есть времена релаксации твердых компонентов в исходных консорциумах МКО, обезвоженных различными по интенсивности способами (с применением и без тепловой обработки), совпадают. Отсюда можно предположить, что соответствующая менее подвижная фаза ( $T_2^2$  и  $P_2^2$ ) относится к содержимому клеток МКО, а фаза с параметрами  $T_2^1$  и  $P_2^1$  – это наиболее подвижная молекулярная среда, или локализованная вне микроорганизмов (то есть на их внешней поверхности), или(и) наиболее доступная для использованных методик сушки. Образец № 9 (СДМ) занимает промежуточное положение между образцами № 8 и № 9 по

жесткости внешнего воздействия на исходный МКО. Сравнение их МРП показывает, что обезвоживание с участием центрифуги и в более щадящем (по экспериментальным данным [1, 2]) режиме сушки, чем при получении СДБ, способствует росту структурно-динамического разрешения микробиологического объекта (увеличивается число различных по строению и(или) подвижности компонент). В этом случае идентифицируется не только наиболее подвижная (водо- и(или) липидосодержащая) МСД-фаза ( $T_2^1$ ,  $P_2^1$ ), но и из ранее обобщенной совокупности твердофазных структур ( $T_2^2$ ,  $P_2^2$ ) выделяется новая более жесткая компонента ( $T_2^3$ ,  $P_2^3$ ). Ее происхождение раскрывает следующая группа образцов - механические смеси компонентов тех же дрожжевых систем (МКО *invitro*, образцы № 11 – 13) и предполагаемого аналога клеточной стенки (образец № 14). Из их МРП следует, что механическая обработка в пределе приводит не только к насыщению образцов твердофазными компонентами, но и, по-видимому, к преобразованию клеточной стенки и(или) околклеточного пространства вплоть до разрешения в клеточной структуре наиболее жесткоцепной компоненты целлюлозной природы (образцы № 12 и № 18). А группа модельных соединений (образцы № 5, № 15 - № 20) демонстрируют спектр минимально возможных твердофазных соединений в составе МКО и одновременно подтверждают их возможное наличие в исследуемых дрожжевых массах.

Для сравнения обратимся к некоторым литературным источникам. Например, по данным [7], ССИ дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* представляет собой суперпозицию сигналов быстро затухающей гауссоподобной функции с осцилляцией  $S_G$  и длинной (медленно затухающей) экспоненциальной компоненты  $S_L$ :

$$S(t) = S_G + S_L = S_{\text{solid}}(t) + S_{\text{rot}}(t) + S_{\text{prot}}(t) + S_{\text{long}}(t),$$

где  $S_G = S_{\text{solid}}(t) + S_{\text{rot}}(t) + S_{\text{prot}}(t)$ ,

то есть  $S_G$  представляет собой сумму трех гауссоподобных функций, из которых минимум одна –  $S_{\text{solid}}(t)$  – функция с осцилляцией, возникающей вследствие того, что частотный ЯМР спектр твердых полисахаридов дает дублет с расстоянием между максимумами около 30 кГц [8]. При этом  $S_L = S_{\text{long}}(t)$ , причем эта компонента приписывается низкомолекулярным соединениям (в основном молекулам воды). Кроме того,  $S_{\text{rot}}(t)$  относят к протонам более подвижных (вращающихся) функциональных групп в составе полисахаридов (ПС), а  $S_{\text{prot}}(t)$  – к вкладу белковых молекул, и предполагается, что  $S_{\text{rot}}(t) \approx S_{\text{solid}}(t)$ , «...поскольку количество вращающихся функциональных групп полисахаридов напрямую связано с содержанием их малоподвижной фазы».

Таким образом, по данным [7 – 9], в быстро релаксирующую (начальную) часть ССИ вносят свой вклад сигналы как от углеводов (ПС), так и от белков. Характеристические времена релаксации

предполагаемых компонент (по-видимому, без учета времени парализации приемо-передающего тракта, составляющего 7 мкс [7]):

$$T_{2\text{prot}} \sim 8 - 16 \text{ мкс [8]}$$

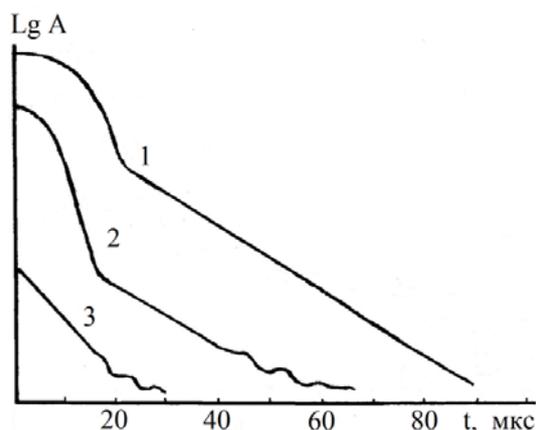
$$T_{2\text{solid}} \sim 11 - 17 \text{ мкс [9]}$$

$$T_{2\text{rot}} \sim 50 - 70 \text{ мкс [9]}$$

$T_{2\text{long}}$  - не менее нескольких сотен микросекунд [7].

При этом исходят из того, что значения  $T_2$  различных белков и полисахаридов в нативном твердом состоянии не превосходят 20 мкс [7 – 9].

Таким образом, параметры ЯМР различных твердофазных компонентов микробиологических структур в таблице количественно хорошо коррелируют с литературными источниками (хотя окончательная интерпретация и тех, и других допускает различные толкования) и могут служить опорными точками при первичном анализе структурно-динамического состояния микробиологических систем. Дополнительная информация о МСД состояниях образцов содержится в форме линий ЯМР. Для примера на рисунке представлена эволюция ССИ одного и того же биообъекта (дрожжевой массы) в различных состояниях.



**Рис. 1 – Спады свободной индукции модельных дрожжевых смесей (ДС): 1 – ДС<sub>ВД</sub> (образец № 11 в табл. 1), 2 – ДС<sub>СДМ</sub> (№ 12), 3 – ДС<sub>СДМ</sub> после дополнительного центрифугирования (№ 13)**

Таким образом, анализ литературных данных [3, 7 – 10] и МРП модельных образцов в таблице и на рисунке показывает, что две начальные (относительно короткие), (не)экспоненциальные по форме, компоненты наблюдаемых ССИ микроорганизмов с временами поперечной релаксации порядка 20 и 40 мкс, описывают широкий спектр поли-(ПС) и олигосахаридов (ОС), а также белковых (Б) молекул, в структуре как клеточных стенок, так и около- и внутриклеточного пространства (ВКП) дрожжей. Оставшаяся завершающая (наиболее длинная) компонента ССИ характеризует состояние относительно подвижных компонентов МКО олигомерной (фосфолипиды (ФЛ) и т.п.) или низкомолекулярной (вода и т.п.) природы. При этом одни и те же компоненты МКО

*in vivo* и *in vitro* закономерно различаются по своим МСД параметрам, а следовательно, и по взаимной упаковке. Это может быть связано не только с внешним воздействием на МКО (разрушением непрерывного контура КС *in vitro*), но и с характером локализации и функцией молекул воды на поверхности и во внутриклеточном пространстве МКО (особенно *in vivo*).

На основании имеющихся данных также можно высказать несколько общих соображений. Судя по пропорциональному изменению времен релаксации и формы ССИ при уменьшении влагосодержания в дрожжах (таблица, рисунок), можно предположить, что вода сравнительно равномерно распределена по объему дрожжевой клетки и, в том числе, сорбируется на поверхности ее полимерных компонентов, которые почти все (за исключением гидрофобных фрагментов («хвостов») фосфолипидов) обладают гидрофильными свойствами. Поэтому процессы поперечной ядерной магнитной релаксации во внутриклеточной воде в составе дрожжей способны протекать совместно и аналогично процессам в соответствующих полимерных «носителях» - как это наблюдается, например, в увлажненных нитратах целлюлозы [3]. Отсюда следует, что наблюдаемые экспериментальные параметры поперечной релаксации не содержат независимой информации о структурно-динамическом поведении только связанной воды (чего нельзя априори констатировать для процессов продольной релаксации), и отражают особенности конфигурации и конформации (упаковки) водоконтролируемого (водоступного) пространства. Отсюда, сравнивая значения МРП исследуемых и модельных образцов дрожжевых систем, можно по крайней мере на качественном уровне оценить относительные изменения, происходящие в структуре всего биообъекта.

Но предварительно определимся с рабочей структурно-динамической моделью дрожжевой клетки (ДК), которая схематически может быть описана следующими общими соотношениями, основанными на ее морфологии [4]. При дальнейшем анализе будем исходить из того, что наблюдаемая эволюция МРП отражает изменение в составе и(или) упаковке следующих основных компонентов:

$$ДК = КС + ВКП = ПС + ОС + Б + ФЛ + Н_2О$$

Например, исходя из данных таблицы можно предположить, что образец ДС<sub>СДМ</sub> (№ 12) представляет собой ДК без низкомолекулярных (наиболее подвижных) компонентов, а его ССИ представляет собой суперпозицию сигналов от ПС (12 мкс) и белка (33 мкс – эта величина формируется как усредненное значение  $T_2$  двухкомпонентного ССИ свободного белка (образец № 19)), а ССИ того же модельного образца после дополнительного центрифугирования (№ 13) можно интерпретировать как общий (усредненный) сигнал (а не простую суперпозицию сигналов) молекул

белка и ПС (22 мкс), которые в составе КС (образец № 14) формируют уже неэкспоненциальный сигнал с приблизительно тем же (20\* мкс) временем релаксации. Однако различие в форме линии ССИ свидетельствует о более плотной упаковке белково-полисахаридного комплекса в составе клеточной стенки МКО как *in vivo* (образец № 6), так и *in vitro* (образец № 14). При этом в составе белка и ПС в исследованных дрожжевых клетках содержится почти одинаковое количество протонов (в соотношении 46 : 54 – образец № 12).

Таким образом, наблюдаемые по таблице и на рисунке закономерности эволюции МРП модельных дрожжевых систем по мере ужесточения действующих на них внешних факторов в целом хорошо коррелируют с ранее полученными экспериментальными данными для соответствующих нативных дрожжевых препаратов [1, 2].

### Литература

1. 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.239-245.
2. Суханов, П.П. Изучение структурно-динамического состояния дрожжевого препарата методом ЯМР релаксометрии. Сообщение 2. Влияние процесса сушки. / П.П. Суханов, А.Ю. Крыницкая, Е.В. Петухова, П.П. Крыницкий // Вестник Казан. технол. ун-та. – 2013. - № 8.- С.245-251.
3. Суханов, П.П. Изучение структурно-динамического состояния дрожжевого препарата методом ЯМР релаксометрии. Сообщение 3. Массоперенос во внутреннем пространстве нитратцеллюлозного аналога клеточной стенки. / П.П. Суханов, А.Ю. Крыницкая, Е.В. Петухова, П.П. Крыницкий // Вестник Казан. технол. ун-та. – 2013. – В печати.
4. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. / Б. Глик, Дж. Пас-тернак. - М.: Мир, 2002. – 589 с.
5. 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.
6. Разинов, А.И. Явления переноса. - Учебное пособие. / А.И. Разинов, Г.С. Дьяконов. – Казань, изд-во КГТУ, 2002. – 136 с.
7. Грунин, Л.Ю. Экспресс-метод определения белка в дрожжах и дрожжевых продуктах при помощи ЯМР релаксометра / Л.Ю. Грунин, А.В. Канарский, И.Н. Сочкова, З.А. Канарская, Р.А. Ахмадышин // Ж. Завод. лабор. Диагн. матер.- 2008. Т. 74.- № 1.–С.13–15.
8. Крушельницкий, А.Г. Молекулярная динамика белков и полипептидов. Исследование методом релаксационной и обменной ЯМР спектроскопии. / Дис. докт. физ.-мат. наук. – Казань, 2006. – 247 с.
9. Грунин, Л.Ю. Протонная магнитная релаксационная спектроскопия природных полимеров. / Дис. канд. хим. наук. – Йошкар-Ола, 1998. – 129 с.
10. Филиппов, А.В. Латеральная диффузия в липидных мембранах в присутствии холестерина. / А.В. Филиппов, В.Д. Скирда, М.А. Рудакова. – Казань: изд-во КФУ, 2010. – 221 с.

© **П. П. Суханов** – д-р хим. наук, профессор, КНИТУ, Paulpost3@yandex.ru; **П. П. Крыницкий** – аспирант, КНИТУ, Pavel211@yandex.ru; **А. Ю. Крыницкая** – канд. биол. наук, доцент, КНИТУ, Paulalla@yandex.ru; **Г. А. Морозов** – д-р техн. наук, профессор, КНИТУ, gmorozov@mail.ru; **Е. В. Петухова** – канд. биол. наук; доцент, КНИТУ, Petel07@yandex.ru.

© **P. P. Sukhanov** – Doctor of Chemical sciences, professor, KNRTU, Paulpost3@yandex.ru; **P. P. Krynitckiy** – post graduate student; KNRTU, Pavel211@yandex.ru; **A.Y. Krynitckaya** – PhD; associate professor, KNRTU, Paulalla@yandex.ru; **G. A. Morozov** – Doctor of Technical sciences, professor, KNRTU, gmorozov@mail.ru; **E. V. Petukhova** – PhD. associate professor; KNRTU, Petel07@yandex.ru.