

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 водо-полимерных 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].

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 *invivo*) - 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 *invitro*) - образец, полученный путем растирания в ступке ДМ (ДСДМ) или СДМ (ДССДМ) 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 ($17 \div 270^\circ\text{C}$) измерений на ядрах водорода на частоте 19 Мгц охватывают интервал концентраций H_2O (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 Т2 Т1, с БП D · 1010, м2/ с ССИ, мкс КП, мс 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 +40С 220* (64) 20* (36) 2 (25) 0,48 (75)

Примечание. Значения МРП ЯМР фаз записаны сверху вниз в по-рядке возрастания скоростей (падения времен) релаксации. В скобках даются значения населенностей соот-ветствующих компонент в % (мольные доли протонов в составе протонных фаз относительно общего числа протонов в системе). * - неэкспоненциальный по форме (Гауссоподобный) спад свободной индукции, из которого Т2 определялось как время падения амплитуды сигнала ССИ в е раз; ** - значение зависит от влажности образца; *** - МРП тех же соединений или систем после руч-ного «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), амило-пектин - разветвленный ПС. 2мс (20) *** 0,48мс (44) 20*мкс (36) 8 ВД 2000 (0,12) 40*(0,88) 9 СДМ 88 (8) 40* (13) 20* (79) 10 СДБ 40* 11 ДСВД 60 (37) 20* (63) 12 ДССДМ 33 (46) 12* (54) 13 ДССДМ + 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*мкс (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 ($T2i$, $P2i$) 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 (*in vivo*) 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 $T22(ВД) \approx T2(СДБ)$, 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 ($T22$ и $P22$) относится к содержимому клеток МКО, а фаза с параметрами $T21$ и $P21$ - 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 различимых по строению и(или) подвижности компонент). В этом случае идентифицируется не только наиболее подвижная (водо- и(или) липидосодержащая) МСД-фаза (T21, P21), но и из ранее обобщенной совокупности твердофазных структур (T22, P22) выделяется новая более жесткая компонента (T23, P23). 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) околоклеточного 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 SG и длинной (медленно затухающей) экспоненциальной компоненты SL: $S(t) = SG + SL = S_{solid}(t) + S_{rot}(t) + S_{prot}(t) + S_{long}(t)$, где $SG = S_{solid}(t) + S_{rot}(t) + S_{prot}(t)$, то есть SG представляет собой сумму трех гауссоподобных функций, из которых минимум одна - $S_{solid}(t)$ - функция с осцилляцией, возникающей вследствие того, что частотный ЯМР спектр твердых полисахаридов дает дублет с расстоянием между максимумами около 30 кГц [8]. При этом $SL = S_{long}(t)$, причем эта компонента приписывается низкомолекулярным соединениям (в основном молекулам воды). Кроме того, $S_{rot}(t)$ относят к протонам более подвижных (вращающихся) функциональных групп в составе полисахаридов (ПС), а $S_{prot}(t)$ - к вкладу белковых молекул, и предполагается, что $S_{rot}(t) \approx S_{solid}(t)$, «...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]): $T2_{prot} \sim 8 - 16$ мкс [8] $T2_{solid} \sim 11 - 17$ мкс [9] $T2_{rot} \sim 50 - 70$ мкс [9] $T2_{long}$ - не менее нескольких сотен

микросекунд [7]. При этом исходят из того, что значения T2 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 эволюцию ССИ одного и того же биообъекта (дрожжевой массы) в различных состояниях. Рис. 1 - Спады свободной индукции модельных дрожжевых смесей (ДС): 1 - ДСВД (образец № 11 в табл. 1), 2 - ДССДМ (№ 12), 3μ - ДССДМ 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 (вододоступного) 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: $ДК = КС + ВКП = ПС + ОС + Б + ФЛ + H_2O$ Например, исходя из данных таблицы можно предположить, что образец ДССДМ (№ 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].