

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФИЗИКИ

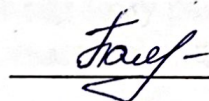
КАФЕДРА МЕДИЦИНСКОЙ ФИЗИКИ

Направление: 03.04.02 Физика
Профиль: Медицинская физика

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАНСЛЯЦИОННОЙ ПОДВИЖНОСТИ
МОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПОНЕНТ В ПИЩЕВОМ ПРОДУКТЕ НА
ОСНОВЕ АРАХИНА И МАНИОКИ

Студент 2 курса группы 06-019
«17» июня 2022 г.



(Баязитова Г.Д.)

Научный руководитель
д.ф.м.н, профессор
«17» июня 2022 г.



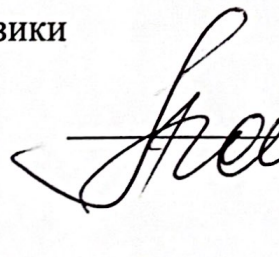
(Скирда В.Д.)

Научный консультант (*при наличии*)
к.ф.-м.н., старший преподаватель
«17» июня 2022 г.



(Мельникова Д.Л.)

Заведующий кафедрой медицинской физики
д.ф.-м.н., профессор
«17» июня 2022 г.



(Аганов А.В.)

Казань-2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	2
Глава 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СТРОЕНИЯ, СОСТАВА И СВОЙСТВ АРАХИНА И МАНИОКИ.....	5
Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	15
2.1 Метод ядерного магнитного резонанса.....	15
2.2 Метод ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля в исследовании самодиффузии.....	19
2.3 Объект исследования.....	25
Глава 3. САМОДИФФУЗИЯ МОЛЕКУЛ АРАХИНА В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ И В СМЕСИ С МУКОЙ МАНИОКИ.....	27
3.1 Вид ^1H ЯМР спектров для водных растворов арахина.....	27
3.2 Форма диффузионных затуханий для арахина в водных растворах.....	29
3.3 Зависимость формы диффузионных затуханий для водных растворов арахина от времени диффузии.....	39
3.4 Зависимость формы диффузионных затуханий для водных растворов арахина с добавлением муки маниоки от времени диффузии.....	42
3.5 Эффект добавления муки маниоки к водному раствору арахина в трансляционной подвижности на разных участках спектра.....	48
3.6 Исследование особенностей трансляционной подвижности молекул маниоки.....	50
3.7 Исследование особенностей трансляционной подвижности молекул арахина.....	60
ВЫВОДЫ.....	70

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день обостряющейся проблемой, стоящей перед человечеством, является снабжение населения нашей планеты полноценным пищевым белком. Несмотря на слабо развитую экономику некоторых стран, они обладают высоким приростом населения, на этом фоне человечество сталкивается с ограниченностью таких природных ресурсов как пресная вода, пахотные земли, пастбища [1].

Известно, что подавляющее большинство мирового населения претерпевает острый дефицит пищевого белка в рационе питания, который составляет порядка 20 млн. т/год [2]. Это в первую очередь относится к развивающимся странам, в которых люди получают в несколько раз меньше белков растительного и животного происхождения, чем в высокоразвитых странах. Дефицит в рационе питания многих необходимых для человеческого организма нутриентов (в том числе, белка), нагрузки психологического характера, ускорение темпа современной жизни и приводят к сокращению адаптационных возможностей человеческого организма, а также к появлению довольно обширного спектра алиментарнозависимых (вызванных нарушением питания) заболеваний [3]. В странах Африки эта проблема усугубляется дороговизной и, вследствие этого, малодоступностью для большинства населения эффективных лекарственных препаратов и медицинской помощи. В связи с обозначенным факторам в современной пищевой индустрии выделяется такое приоритетное направление, как развитие технологий создания пищевых продуктов с высокими функциональными свойствами на основе белков растительного происхождения.

В настоящее время в компании «Nutriset group», занимающейся проблемой голодания в развивающихся странах, проводятся работы по созданию технологий и рецептур продуктов с использованием источников растительных белков для жителей развивающихся стран Африки. При этом, выбор источника сырья обусловлен спецификой местных растительных ресурсов. Подобный подход при создании продуктов питания, содержащих

белки растительного происхождения, уже активно используется, например, в Индии – широкое применение получили белки земляного ореха и маиса, в странах Европы – соевые белки.

Тем не менее, при применении растительных компонентов, в частности белка арахина, в пищевых целях в странах Африки возникают некоторые проблемы, связанные с непригодностью к употреблению в пищу продуктов, которые достаточно длительное время хранили (подвергнувшись длительному хранению). Известно, что одним из ключевых факторов, влияющих на срок хранения продукции, является его физическая структурированность. Одним из способов регулирования этого функционального свойства, является частичная модификация продукта, например, добавка различных ферментов, белков, содержащих высокомолекулярные соединения (полисахаридов и т.п.), способствующих структурообразованию. Подобная «добавка» в продукцию, приготовленную на основе растительных компонент, приводит к связыванию молекул воды, что влечет за собой изменение подвижности воды и влияет на консистенцию продукта. Это, в свою очередь, способствует предотвращению потери влаги при замораживании/оттаивании продукта, а также при его долгосрочном хранении или длительной транспортировке.

Для стран Африки наиболее доступным гелеобразующим пищевым агентом является крахмал из корней клубнеплодного тропического растения кассава или также называемого маниокой (лат. *Mánihot esculénta*). Как известно, крахмал является многофункциональной добавкой, которая способствует текстурным свойствам многих пищевых продуктов и используется в качестве загустителя, гелеобразующего агента, коллоидного стабилизатора, удерживающего влагу агента, адгезива и наполнителя [5]. Кроме этого, нативные формы крахмала представляют из себя смесь полисахаридов, в которой около 25% амилозы – линейный полимер единиц ангидроглюкозы с молекулярной массой приблизительно между 40 кДа и 340 кДа – и 75% амилопектина, состоящего из цепей ангидроглюкозы со многими точками ветвления и молекулярным весом порядка 80 000 кДа. И амилоза, и

амилопектин в ЖКТ (желудочно-кишечном тракте) человека легко расщепляются с образованием моносахаридов – глюкозы, поэтому являются усваиваемыми компонентами пищи и источником энергии.

Поэтому изучение организации надмолекулярных структур арахина в водных растворах, а также влияние добавления типичного крахмала из маниоки на структурообразование арахина в водных растворах, было бы полезно для лучшего понимания механизма их взаимодействия и путей улучшения свойств продуктов питания.

Несмотря на широкое промышленное применение и некоторые захватывающие биологические последствия, комплексообразование между полисахаридами и белками остается интригующей и важной темой исследования. Знание их взаимодействия важно не только для экономически эффективного использования функциональных ингредиентов, но и для разработки новых продуктов питания, контроля и улучшения структур пищевых ингредиентов и текстурных свойств готовых продуктов. Таким образом, систематические работы все еще необходимы для дальнейшего раскрытия взаимосвязи между физико-химическими параметрами, такими как исходное соотношение белок / полисахарид.

Целью данной работы является изучение особенностей трансляционной подвижности и надмолекулярной организации в пищевом продукте на основе арахина, а также смеси арахина и муки маниоки с использованием комплекса методик ЯМР с ИГМП.

Работа проведена на оборудовании ФЦКП ФХИ КФУ спектрометре Bruker AVANCE 400 МГц, оптимизированного для микротомографии, твердого тела и самодиффузии.

Глава 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СТРОЕНИЯ, СОСТАВА И СВОЙСТВ АРАХИНА И МАНИОКИ

На сегодняшний день арахис является одним из основных продуктов питания во всем мире. Важной особенностью являются его питательные свойства и способность расти на почвах, слишком бедных для других культур. Это третья по величине масличная культура в мире после сои и хлопка. Арахис, содержащий большое количество масла, так же отличился содержанием белка, в отличие от других бобовых культур. Поэтому такие организации, как ВОЗ и ЮНИСЕФ, рекомендуют арахис для борьбы с недоеданием в развивающихся странах [6]. При частичном извлечении арахисового масла из жареного арахисового семени получается сухой порошок, называемый арахисовой мукой. В последние несколько десятилетий арахисовая мука все чаще используется в качестве пищевого ингредиента в связи с тем, что процентное соотношение питательных веществ в арахисовой муке является наиболее выгодным по сравнению с жареным арахисом.

Безмасляная арахисовая мука после экстракции особенно насыщена белком высокого качества (50–55%), который является недорогим и недостаточно используемым побочным продуктом в отрасли производства арахисового масла, которая обеспечивает те же диетические преимущества арахиса с высоким содержанием незаменимых аминокислот [7]. Низкое отношение аминокислот Лейцин/Аргинин в растительных белках уже давно признано обладающим антиатерогенным (препятствующими развитию атеросклероза) действием [8]. Высокие уровни L-Аргинина в арахисе, приводящие к очень низкому соотношению Лейцин/Аргинин и почти отсутствию антипитательных факторов, увеличивают его потенциальную пользу для здоровья [9]. Арахисовая мука обычно состоит примерно из 40 - 50% белка, 10-30% жира и 20-30% углеводов, некоторые из которых являются клетчаткой [10], жареный арахис, в свою очередь, содержит приблизительно от 25% до 30% белка, 50% жир и 20% углеводов / клетчатки (вес.) [11, 12]. Именно из арахисовой муки выделяется первичная белковая фракция семян арахиса,

называемая арахином [13]. Известно [62], что белки земляного ореха представляют собой сложную смесь полипептидов, в основном состоящих из фракций арахина, конарахина I и конарахина II [14,15]. При этом считается [63], что каждая из фракций также состоит из 6 белковых субъединиц. Также известно, что полипептиды арахина имеют молекулярную массу в промежутке от 20 кДа до 45 кДа [64]. На сегодняшний день арахин имеет коммерческое значение, и в значительной степени уже охарактеризован [16-21].

Таблица 1.1 Аминокислотный состав арахина [64]

Аминокислота	Содержание (грамм/100 грамм арахина)
Аспарагиновая кислота	12.07
Треонин	2.47
Серин	4.11
Глутаминовая кислота	19.51
Пролин	2.38
Глицин	3.49
Аланин	3.79
Валин	4.03
Метионин	0.07
Изолейцин	3.31
Лейцин	6.23
Тирозин	3.30
Фенилаланин	5.34
Лизин	2.14
Гистидин	2.00
Аргинин	9.42
Всего	86.00

Для текстуры и стабильности многочисленных пищевых продуктов важны вызванные теплом реологические модификации составов на основе белков и предыдущие исследования показали, что белковые растворы, приготовленные с изолятом (белковая смесь высокой очистки) белка арахиса, образуют гели при соответствующих условиях. Процесс гелеобразования и

факторы, влияющие на него, изучались на животных белках, таких как желатин [22-24] и фибрин [25], а также на растительных белках, таких как соевые белки [26-28]. Способность гелеобразования является одним из значимых функциональных свойств белков и имеет широкое промышленное применение.

Известно, что факторами, регулирующими гелеобразование, являются концентрация белка, температура нагревания, интервал нагревания, температура охлаждения нагретого раствора, рН, ионная сила и диэлектрическая проницаемость среды [29]. Гелеобразование является следствием формирования в объеме жидкой системы пространственной или молекулярной сетки (каркаса) за счет межмолекулярных сил (главным образом водородных связей), образующих мостики между разветвленными или линейными полимерными молекулами, и лишаящая систему текучести, а также придающая этой системе некоторые свойства твердого тела. Это вид агрегации, которому присущи хорошо сбалансированные взаимодействия полимер-полимер и полимер-растворитель. При этом образующийся гель может быть возвращен в состояние золя при нагревании. Точка перехода геля в состояние золя, может быть рассмотрена как мера прочности образовавшегося геля.

На сегодняшний день известно, что арахин образует термообратимый гель ниже рН 3,8 и в концентрациях выше 7,5% (вес.) [30]. Kella и Poola (1985) показали, что это происходит, когда арахин нагревают при 90° С в течение 15 минут и затем охлаждают до 5° С в течение 24 часов, но на сегодняшний день известны и другие способы приготовления геля. Сила белкового геля зависит от концентрации поперечных связей, которые образуются при взаимодействии белка с белком. Когда концентрация арахина увеличивается, количество поперечных связей, образующихся на единицу объема геля, увеличивается, что приводит к увеличению прочности геля [22]. Eldridge & Ferry (1954) также наблюдали аналогичный эффект с желатиновыми гелями. Вероятно, что определенные поперечные связи (гидрофобные связи), которые, как известно, зависят от температуры, предпочтительнее при более высоких, чем при более

низких температурах. Эти сшивки объясняют повышенную прочность геля при более высоких температурах. Температура, при которой нагревался раствор белка, оказывает влияние на точку перехода геля в состояние золя: по мере того как температура охлаждения увеличивается, температура точки перехода из геля в состояние золя увеличивается линейно в пределах 7,5-10%; ниже 7,5% образования геля не наблюдалось [29].

Для обеспечения стабильного качества изготавливаемых продуктов используют многофункциональные добавки. Наиболее доступной и широко используемой добавкой является крахмал. Известно [5,32,33], что крахмал используется в качестве загустителя, гелеобразующего агента, коллоидного стабилизатора, удерживающего воду агента, адгезива и наполнителя. Белок и крахмал, как обязательные биомакромолекулы, играют важную роль в ежедневной диете каждого человека и влияют на структуру пищевых продуктов из-за их способности образовывать гель [31].

Крахмал, синтезируемый растительными клетками, состоит из двух типов полимеров: амилопектина (порядка 80%) и амилозы (порядка 20%) [34]. Каждый полисахарид, в свою очередь, состоит из мономера — α глюкозы. Амилоза и амилопектин соединяются цепочками при помощи $\alpha(1 \rightarrow 4)$ — гликозидных связей. Молекулу амилозы составляют 200-1000 структурных единиц. После того, как выстраивается линейная структура, закручивается спираль, на каждый виток которой приходится по 6 остатков глюкозы.

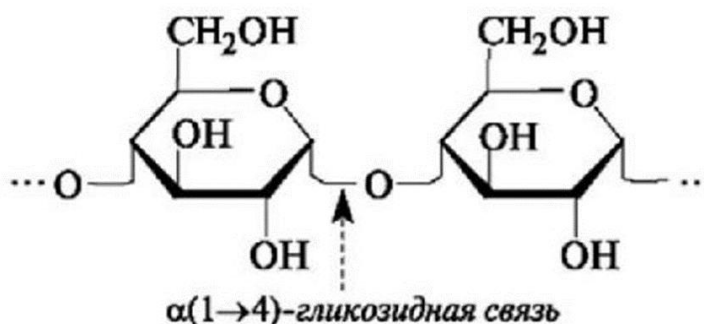


Рис. 1.1. Структурная формула амилозы

Амилопектин же представляет из себя разветвленную цепь, которая включает в себя от 6 до 40 тысяч звеньев.

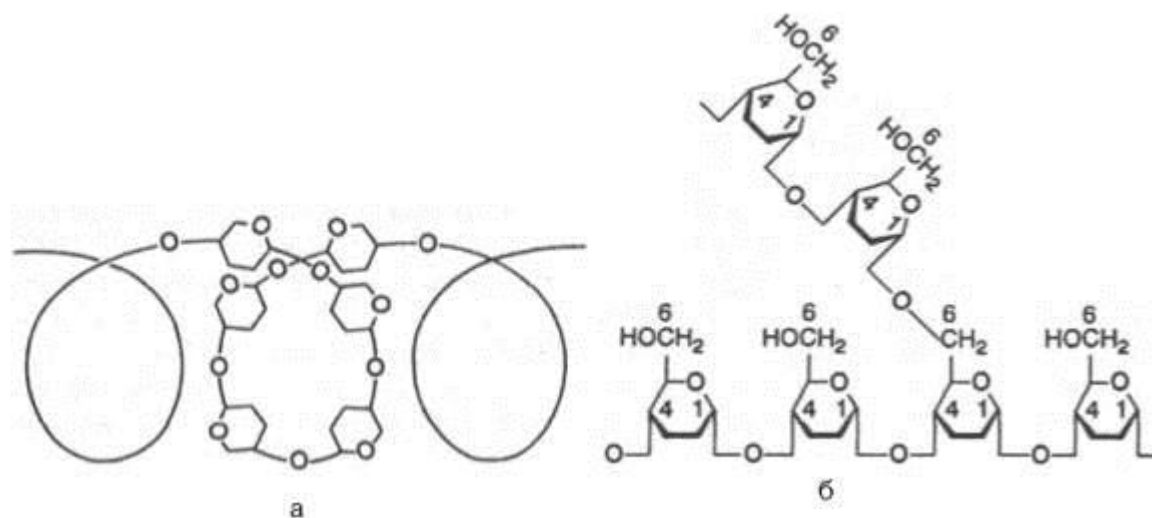


Рис. 1.2. Структура крахмала: а - амилоза с характерной для нее спиральной структурой; б - амилопектин, образующий в точках ветвления связи типа 1-6

В холодной воде крахмал является нерастворимым, но при растворении в горячей воде амилопектин набухает, а амилоза начинает растворяться. Растворившиеся молекулы амилозы связываются друг с другом водородными связями, образуя гель.

Известно, что на прочность геля, влагоудерживающую способность, реологические свойства и микроструктуру по-разному влияют различные типичные нативные крахмалы, что указывает на потенциал и возможность применения этих типичных нативных крахмалов в качестве добавочного агента для изменения текстурных свойств различных продуктов [36]. Молекулярная масса оказывает существенное влияние на вязкость раствора. При увеличении молекулярной массы вязкость раствора полимера также увеличивается. Когда молекулярная масса достигает критического значения, происходит запутывание цепи, и раствор полимера проявляет тенденцию проявлять неньютоновское поведение при низких скоростях сдвига. Аналогично, распределение молекулярной массы оказывает большое влияние на реологию. Например, разветвленные полимеры (амилопектин и гуммиарабик) имеют тенденцию

давать более стабильные водные растворы, которые не будут ретроградными или осажденными [37-45].

Также известно, что тапиоковый крахмал улучшает прочность геля и способность удерживать воду композитного геля при 80 ° С [46]. Тапиока — зернистый крахмалистый продукт, который получают из корней маниок (лат. *Mánihot esculénta*). Крахмал маниоки имеет круглые или усеченные гранулы (≈ 32 мкм) и представляет собой рассыпчатый порошок белого или слегка кремового цвета нерастворимый в холодной воде. Химическая формула тапиокового крахмала выглядит следующим образом: $(C_6H_{10}O_5)_n$. По своему химическому составу и строению крахмал принадлежит классу углеводов. Это полисахарид, состоящий из амилозы и амилопектина, мономером которых является альфа-глюкоза. Данный полисахарид прекрасно усваивается организмом. Крахмал тапиоки своими свойствами очень похож на картофельный крахмал, различие в меньшей влажности, порядка 6-7%, благодаря которой количество крахмала в товарной массе больше, а также меньшей зольности, благодаря которой тапиоковый крахмал считается самым чистым крахмалом. Помимо этого, крахмал тапиоки способен образовывать более вязкие и прозрачные клейстеры, чем крахмалы зерновых культур (кукуруза, пшеница). Благодаря способности проявлять свои свойства даже при низких температурах, клейстер, полученный из тапиокового крахмала способствует предотвращению потери влаги при замораживании/оттаивании [47].

Крахмал тапиоки обладает довольно обширной сферой применения в пищевой и непищевой отраслях промышленности в качестве сгустителя/связывающего агента, текстуризатора или в качестве препятствующего образованию комков агента.

За счет длинной текстуры, высокой связывающей способности и низкой температуры желатинизации, тапиоковый крахмал используют при производстве продуктов быстрого приготовления - супов, лапши, а также в качестве загустителя для майонезов, кетчупов, в молочных и мясных

продуктах, в фруктовых наполнителях, в сухих смесях и экструдированных продуктах.

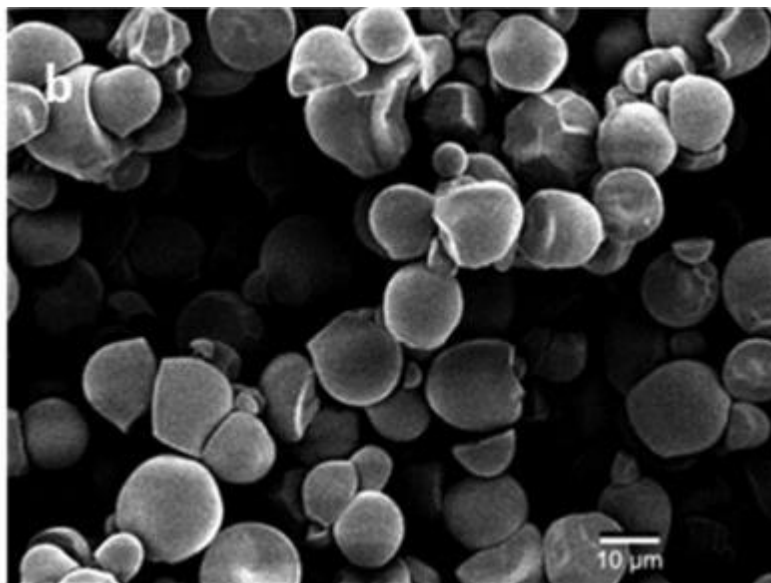


Рис. 1.3 Снимок с растрового электронного микроскопа крахмала маниоки [47]

Маниока, в свою очередь, представляет собой клубнеплодное тропическое растение, принадлежащее типовому виду рода Маниок семейства Молочайные (*Euphorbiaceae*) и пригодное для пищи. Оно было выделено как культура, которая может стимулировать промышленное развитие сельских районов и повысить доход для производителей, переработчиков и торговцев [48]. Маниока является основным источником пищевой энергии для большинства людей, живущих в низменных тропиках и большей части субгумидных тропиков Западной и Центральной Африки [49]. На сегодняшний день это растение активно культивируется в тропических районах. Съедобной частью является похожий на картофелину корнеплод, размеры которого могут достигать до 8 см в диаметре и до 1 м в длину, масса же варьируется от 3 до 10 кг. Как и большинство растений, произрастающих в тропиках, маниока является богатой на урожай и легко возделываемой культурой. Порядка 37% потребляемого жителями Африки продовольствия (из расчета по калорийности) обеспечивается данной культурой. Биологические характеристики маниоки (неприхотливость и высокая урожайность), ее способность выживать после

выращивания и жизнеспособность ее черенков в значительной степени способствовали ее распространению [50].

Маниока рассматривается в качестве средства обеспечения продовольственной безопасности домохозяйств и повышения доступности продовольствия [50]. В связи с тем, что корнеплоды содержат в себе цианогенные гликозиды, сорта маниока разделяются на горькие (высокая концентрация цианидов) и сладкие (низкая концентрация цианидов). Было отмечено, что сорт с низким содержанием цианидов отвечает этим критериям, и поэтому предполагается, что он является хорошим заменителем пшеничной муки в импортируемых продуктах.

При повреждении тканей маниока в ходе некоторых химических реакций гликозид распадается на ацетон и синильную кислоту, которая в свою очередь в определенных дозах может стать для человека причиной летального исхода. Именно поэтому сложился традиционный способ подготовки корней маниока к употреблению их в пищу: чистка, измельчение, замачивание в воде, и только после этого варка. Альтернативным способом является метод, предложенный Ховардом Брэдбери, который заключается в том, чтобы размолотый маниок, смешанный с водой, уложить тонким слоем (приблизительно 1 см) в тени, где он будет сушиться на протяжении 5-6 часов. Это способствует полному испарению цианида.

Таким образом получается выпрессованная масса, являющаяся источником крупы или питательной муки. Отличие такой муки от обычной состоит в большом содержании крахмала. Это связано тем, что 58,90% от всего сухого состава маниоки составляет крахмал [51].

Однако определенные свойства муки маниоки и крахмала, такие как физические, химические, физико-химические, пастообразные и термические параметры, важны для их применения в пищевой промышленности. Более того, некоторые функциональные характеристики, как сообщается, коррелировали с определенными ключевыми качествами продуктов, производимых из такой муки [52, 53]. Характеристики грануляции измельченной муки влияют на

скорость гидратации и набухаемость во время обработки [54]; цвет определяет внешний вид и привлекательность готового продукта; в то время как способность к связыванию и поглощению воды, способность к набуханию и растворимость оказывают влияние на качество углеводов и влияют на вязкость и желирующую способность муки / крахмала [55, 56].

Кроме того, стимулирующий эффект крахмала по модулю хранения композиционных гелей положительно коррелирует со свойствами желатинизации различных типичных крахмалов. Сканирующая электронная микроскопия в условиях окружающей среды показала, что эффект наполнения крахмала на композиционном геле был связан с температурой пастирования и размером частиц типичного крахмала, при котором частицы практически не образуются при 80 ° С. Кроме того, добавление крахмала изменило площадь пика релаксации и увеличило время релаксации в экспериментах ЯМР, что позволило предположить, что крахмал может улучшить способность удерживать воду композитных гелей [46].

На протяжении многих лет ЯМР демонстрирует отличные возможности в изучении сложных молекулярных систем, в том числе пищевых продуктов [57]. В частности, на данный момент времени существует достаточно большое количество работ, посвященных применению методики ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля в исследованиях структурированных высокодисперсных систем: гелей желатина, агрегированных надмолекулярных структур глобулярных белков и т.д.. Следует отметить, что в этих работах, данные, полученные при использовании градиентного метода ЯМР, позволили авторам не только определить факт наличия гелевой структуры в исследуемых образцах, но и дать достаточно подробные характеристики: времена жизни молекул в структуре геля, их количество и т.д.

В нашей работе предполагается исследовать сложные молекулярные системы, приготовленные фирмой на основе растительного белка арахина. При этом важно получить информацию как о наличии или отсутствии надмолекулярных образований на подобии трехмерной сетки геля, так и

установить влияние добавления высокомолекулярного полисахарида – маниоки на подвижность молекул арахина в водном растворе. Следует отметить, что концентрации исходных веществ, по данным предоставленным фирмой «Nutriset group», водных растворах арахина как с добавлением маниоки, так и без – достаточно велики, порядка 20% (вес.). Именно использование метода ЯМР с ИГМП позволит решить такой пул задач, обозначенных выше. Ради справедливости необходимо отметить, что использование методов оптической спектроскопии (светорассеяния и т.д.) для исследования подобных сложных молекулярных систем весьма ограничено из-за характерных особенностей данных методик работать с достаточно разбавленными растворами веществ.

Таким образом, целью данной работы является изучение особенностей трансляционной подвижности и надмолекулярной организации макромолекул арахина в водном растворе, а также смеси арахина с мукой маниоки, с использованием комплекса методик ЯМР с ИГМП.

Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Метод ядерного магнитного резонанса

Ядерный магнитный резонанс – явление поглощения (или испускания) электромагнитной энергии системой ядер, обладающих полуцелым спином, помещенных во внешнее магнитное поле [58], наблюдающееся благодаря переориентации магнитных моментов ядер только в случаях, когда вещество содержит ядра с магнитными моментами. Опишем некоторые свойства в рамках классической векторной модели.

Если образец, магнитные моменты ядер которого отличны от нуля, поместить в радиочастотную (приёмно-передающую) катушку, расположенную в магнитном поле \vec{H}_0 , причем ось ее будет ориентирована перпендикулярно вектору \vec{H}_0 . В результате взаимодействия ядерных моментов с внешним полем \vec{H}_0 , которое ориентировано вдоль оси Z лабораторной системы координат, в образце возникает макроскопическая намагниченность, являющаяся коллинеарной \vec{H}_0 , и представляет собой векторную сумму магнитных моментов отдельных ядер, прецессирующих вокруг \vec{H}_0 с частотой

$$\omega_0 = \gamma H_0 \quad (2.1)$$

где γ — гиромагнитное отношение ядра.

Вектор намагниченности будет отклоняться от направления \vec{H}_0 в случае, если на образец воздействовать переменным электромагнитным полем с частотой $\nu_0 = \frac{\omega}{2\pi}$ (резонансная), направленным перпендикулярно \vec{H}_0 . Таким образом, можно добиться отклонения вектора намагниченности \vec{M} на любой угол, подобрав длительность воздействия электромагнитного поля. В случае, если радиочастотный (р.ч.) импульс поворачивает \vec{M} на 90° или 180° , их называют 90° – м или 180° – м импульсом соответственно.

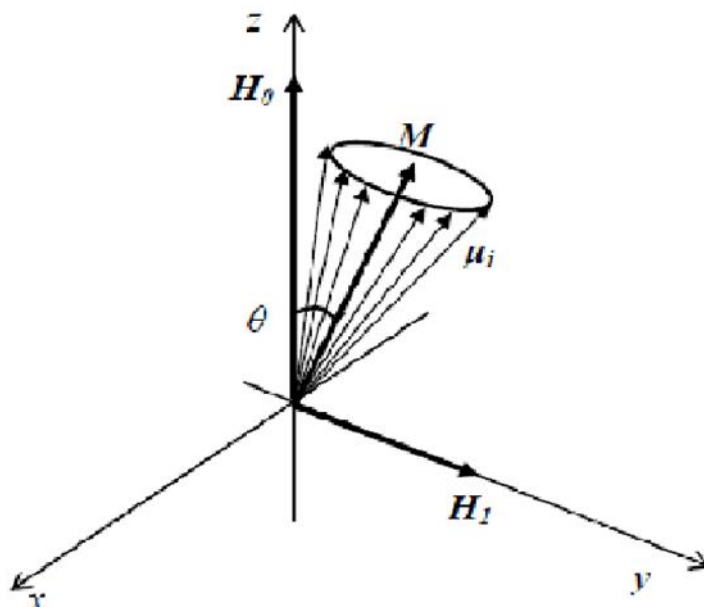


Рис. 2.1. Схематическое представление прецессии вектора макроскопической намагниченности \bar{M} в постоянном внешнем магнитном поле \bar{H}_0 и его отклонение на угол θ после воздействия переменного поля

Так, после воздействия на образец 90° -го радиочастотного импульса, вектор намагниченности \bar{M} окажется перпендикулярным по отношению к \bar{H}_0 . В это время в приемо-передающей катушке возникает напряжение с амплитудой $A(0)$, пропорциональной \bar{M} , который называется сигнал свободной индукции. Амплитуда этого сигнала является убывающей функцией времени в связи с тем, что \bar{M} релаксирует к своему первоначальному состоянию. В случае, когда поперечная к \bar{H}_0 составляющая $\bar{M}(M_\perp)$ изменяется во времени, процесс носит название спин-спиновой релаксации T_2 . Данный процесс возникает благодаря необратимой потере фазовой когерентности в прецессии ядерных спинов вследствие взаимодействия друг с другом. В случае, когда релаксирует к первоначальному состоянию продольная к \bar{H}_0 компонента $\bar{M}(M_\parallel)$, процесс носит название спин-решеточной релаксации T_1 и обуславливается взаимодействием возбужденных ядерных спинов с их окружением (решеткой).

Помимо процессов спин-спиновой и спин-решеточной релаксации на скорость уменьшения сигнала свободной индукции влияет также однородность

магнитного поля \bar{H}_0 . В случае, когда поле \bar{H}_0 является неоднородным, распределенные по всему объему образца ядерные моменты находятся в разных полях и прецессируют с различной частотой. Благодаря быстрой потере фазовой когерентности между отдельными магнитными моментами, дополнительно уменьшается поперечная составляющая M_{\perp} намагниченности.

В последние годы все большее значение придают молекулярной (вращательной и поступательной) подвижности в различных процессах. Одной из характеристик поступательной подвижности молекул является коэффициент самодиффузии, который надежно и достаточно быстро измеряется импульсной методикой ЯМР с применением импульсного градиента магнитного поля. Именно этот метод дает возможность изучить процесс самодиффузии в различных растворах. Упомянув самодиффузию молекул, имеют в виду пространственные перемещения в термодинамически равновесных материальных средах за счет хаотического теплового движения. Траектория таких перемещений имеет случайный характер и обусловлена взаимодействием с огромным количеством частиц [59].

На математическом языке подобные движения описываются плотностью условной вероятности $P(\bar{r} - \bar{r}_0, t)$ обнаружить центр тяжести рассматриваемой молекулы с условием, что в начальный момент времени он находится в точке \bar{r}_0 , в точке пространства с радиус-вектором \bar{r} в момент времени t . Рассчитать ее невозможно, т.к. он эквивалентен решению многочастичных динамических уравнений движения. Но при малых значениях плотность вероятности определяется макроскопически большим числом параметров, задающих начальное состояние системы. С увеличением времени t , ее вид $P(\bar{r} - \bar{r}_0, t)$ упрощается в связи с тем, что количество параметров, определяющих его, уменьшается.

При временах $t \gg \tau_{\max}$, где τ_{\max} - наибольшее из существующих времен корреляции, связанных с пространственными степенями свободы рассматриваемой молекулы, $P(\bar{r} - \bar{r}_0, t)$ принимает простейший, определяющийся единственным параметром D_s , вид:

$$P(\bar{r} - \bar{r}_0, t) = [4\pi D_s t]^{-\frac{3}{2}} \times \exp\left\{-\frac{|\bar{r} - \bar{r}_0|^2}{4D_s t}\right\} \quad (2.2)$$

При выполнении условия $t \geq \tau_{max}$ режим движения молекул называется диффузионным, связанные с ним перемещения молекул — самодиффузией, параметр D_s — коэффициентом самодиффузии (КСД). Такой вид пропагатора характерен для изотропных гомогенных сред, то есть для режима свободной диффузии.

Функция $P(\bar{r} - \bar{r}_0, t)$ при определенных условиях может отличаться от гауссовой. Это может происходить вследствие малости числа частиц в системе, а также на коротких временных интервалах, меньших, чем максимальное время корреляции в системе. К этому могут приводить также различные виды ограниченной и анизотропной диффузии, диффузия в специфической негомогенной среде или при наличии определенных градиентов некоторых физических параметров.

При выполнении условия изотропности и гомогенности системы с помощью пропагатора легко рассчитать среднеквадратичное смещение молекулы за время t :

$$\langle [\vec{r}(t) - \vec{r}_0]^2 \rangle = 6D_s t \quad (2.3)$$

где усреднение производится по каноническому ансамблю. Это соотношение носит название уравнения Эйнштейна [59].

Важным выводом теории самодиффузии является соотношение Эйнштейна-Стокса, являющееся следствием классической теории броуновского движения и связывающая значения КСД D и геометрический размер диффундирующей молекулы R_H через коэффициент трения f в растворителе:

$$D = \frac{kT}{f} = \frac{kT}{6\pi\eta_0 R_H} \quad (2.4)$$

где k — постоянная Больцмана;

T — абсолютная температура раствора;

η_0 — вязкость чистого растворителя при температуре T .

Формула (2.4) является справедливой только для тех молекул, чьи линейные размеры существенно больше, чем размер молекул растворителя и в случае, когда взаимодействиями исследуемой молекулы с такими же соседними частицами можно пренебречь.

2.2 Метод ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля в исследовании самодиффузии

Одним из эффективных и интересных методов, позволяющих исследовать процесс самодиффузии малых молекул и макромолекул, является метод ЯМР, основанный на явлении спинового эха в присутствии градиентов магнитного поля. Используя метод ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля (ИГМП) первичную информацию получают исходя из анализа диффузионных затуханий — зависимость амплитуды сигнала спинового эха от параметров градиента магнитного поля и времени наблюдения [60].

Данная последовательность 90-grad- τ -90- τ_1 -90-grad- τ -эхо, включает в себя три радиочастотных импульса, поворачивающих вектор намагниченности M_0 на 90°, и два прямоугольных импульсных градиента магнитного поля (ИГМП). Первый импульс градиента магнитного поля является кодирующим. Он кодирует текущее положение магнитных моментов ядер исследуемых молекул в пространстве. Вторым ИГМП декодирует новые положения молекул, в которые они перемещаются за время диффузии. Исходя из отклонений амплитуды эха от его максимального значения можно судить о смещении молекул из первоначального положения. В отсутствие градиентов температуры и концентрации причиной таких смещений является только броуновское движение. Поэтому, анализируя величину амплитуды эха, можно получить характерный для исследуемых молекул коэффициент самодиффузии. На практике значения коэффициентов самодиффузии D_{Si} и относительных долей диффундирующих частиц p_i определяют из анализа диффузионного затухания.

$$\frac{A}{A_0} = \sum_i^N p_i * \exp(-\gamma^2 \delta^2 g^2 t_d D_{si}) \quad (2.5)$$

Где A , A_0 – амплитуды сигналов спинового эха при включенном и выключенном градиенте соответственно;

g –амплитуда импульсов градиента магнитного поля;

δ – длительность импульсов градиента магнитного поля;

γ – гиромагнитное отношение резонирующих ядер;

$t_d = \Delta - \frac{1}{3} \delta$ – время диффузии;

Δ – интервал между импульсами градиента магнитного поля;

N – число фаз, если система неоднородна.

Выражение для зависимости амплитуды сигнала стимулированного эха $A(2\tau, \tau_1, g)$ от параметров импульсного градиента при выполнении $g_0 \ll g$ выглядит следующим образом:

$$A(2\tau, g) = A(2\tau, \tau_1, 0) \cdot \exp(-\gamma^2 g^2 \delta^2 t_d D_s) \quad (2.6)$$

В простом случае экспоненциальной релаксации

$$A(2\tau, \tau_1, 0) = \frac{A(0)}{2} * \exp(-\frac{2\tau}{T_2} - \frac{\tau_1}{T_1}) \quad (2.7)$$

где T_1 – время спин-решеточной релаксации, а T_2 – время спин-спиновой релаксации.

Методика стимулированного эха (Рисунок 2.2) обладает существенным преимуществом – возможность значительного увеличения времени диффузии t_d . Помимо этого, особенностью данной последовательности является то, что за время τ спад сигнала происходит согласно механизму спин-спиновой релаксации, а в интервале между вторым и третьим 90° -градусным импульсом намагниченность спадает согласно механизму спин-решеточной релаксации.

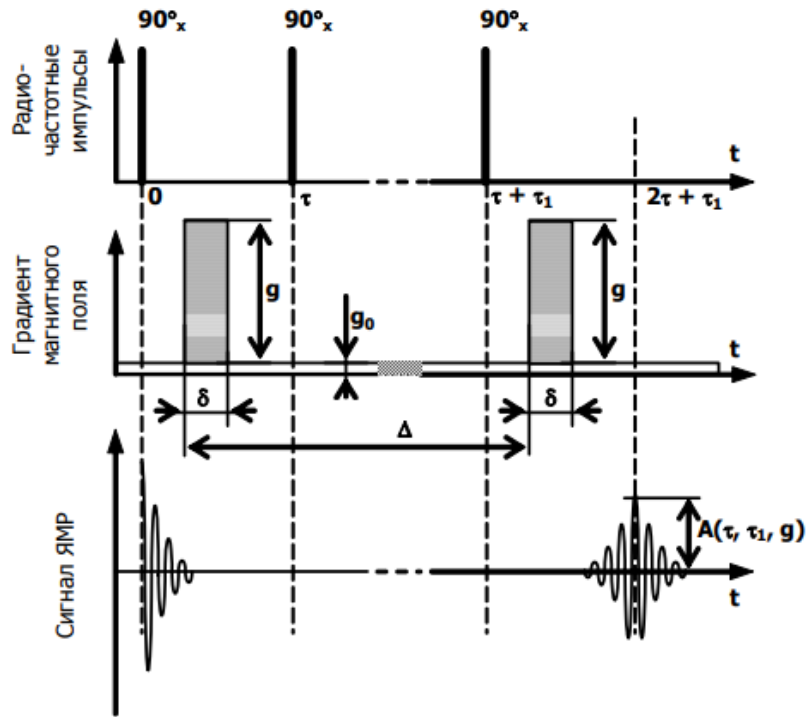


Рис. 2.2. Трех импульсная последовательность стимулированного спинового эха с импульсным градиентом магнитного поля. δ – длительность импульса градиента магнитного поля, g и g_0 – величины импульсного и постоянного (стабилизирующего) градиентов магнитного поля, Δ – временной интервал между импульсами градиента

Для того, чтобы определить коэффициент самодиффузии в эксперименте, необходимо произвести вычисление тангенса угла наклона огибающей отношения амплитуд эхо при включенном и при выключенном градиенте $\frac{A(2\tau, \tau_1, g)}{A(2\tau, \tau_1, 0)}$ при варьировании одного из трех параметров: g , δ , t_d .

С практической точки зрения наиболее удобным является вариант регистрации диффузионного затухания $A(g^2)$ варьируя величину градиента g при фиксированных параметрах δ и t_d . Во многом, это диктуется тем, что при этой последовательности интервалы между радиочастотными импульсами могут оставаться фиксированными. В таком случае, на протяжении всего эксперимента вклад релаксационного затухания эхо $A(2\tau, \tau_1, 0)$ будет постоянным.

Известно [59], что в многофазных системах форма диффузионного затухания $A(g^2)$ может зависеть от временных параметров эксперимента. Это может происходить в связи с тем, что процесс ядерной релаксации имеет

немоноэкспоненциальный вид, или из-за наличия обменных процессов между фазами. Оба этих процесса имеют различные в общем случае характеры зависимости.

В случае немоноэкспоненциального вида ядерной релаксации в сигнале эхо от временных интервалов (τ, τ_1) между радиочастотными импульсами наблюдается зависимость соотношения населенностей для различных коэффициентов самодиффузии: чем больше различаются времена ядерной магнитной релаксации для фаз с разными коэффициентами D_{si} , тем сильнее зависимость. Характер зависимости $A(g^2)$ от τ или τ_1 является сложным и определяется тем, в каком соответствии находятся величины D_{si} и T_{2i}, T_{1i} . Очевидно, что должна наблюдаться зависимость от τ или τ_1 среднего коэффициента самодиффузии \bar{D}_s . \bar{D}_s может как уменьшаться, так и увеличиваться с ростом значений τ или τ_1 .

В случае, когда форма диффузионного затухания $A(g^2)$ зависит от временных параметров эксперимента из-за обменных процессов, форма диффузионного затухания $A(g^2)$ зависит от временного параметра t_d . Наблюдающаяся при малых временах диффузии неэкспоненциальность $A(g^2)$ стремится с ростом t_d к экспоненте. В этом случае, $A(g^2)$ можно охарактеризовать спектром коэффициентов самодиффузии, которые меняются следующим образом: с ростом t_d уменьшаются населенности $p_i(t_d)$, соответствующие наибольшим и наименьшим коэффициентам самодиффузии D_{si} . Важным является тот факт, что средний коэффициент самодиффузии ($\bar{D}_s = \sum_i p_i D_{si}$) от времени диффузии не зависит.

Таким образом, оба этих процесса имеют различные внешние признаки поведения $A(g^2)$, но не всегда могут быть достаточными для уверенной интерпретации результатов. Т.к. времена диффузии t_d и величина τ_1 в методике стимулированного эхо не могут быть выбраны независимо друг от друга в широком интервале их значений, бывает трудно разделить вклады неэкспоненциальной релаксации и процессов обмена в форму $A(g^2)$. В [61] были предложены достаточно простые модификации стандартных импульсных

последовательностей специально для идентификации причин зависимости формы $A(g^2)$ от временных параметров эксперимента. Одной из таких последовательностей является представленная на рисунке 2.3 модифицированная методика стимулированного эхо, которая состоит из 5-ти 90° радиочастотных импульсов: $90^\circ - \tau - 90^\circ - \tau_1 - 90^\circ - \tau - (1 - \text{ое эхо}) - \tau_2 - 90^\circ - \tau_3 - 90^\circ - \tau_2 - (2 - \text{ое эхо})$.

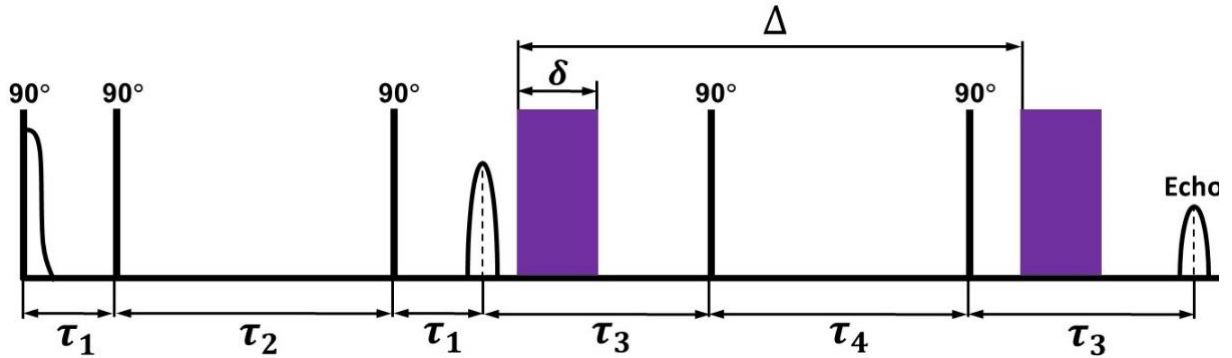


Рис. 2.3. Модифицированная 5-импульсная последовательность, предназначенная для идентификации причин зависимости диффузионных затуханий $A(g^2)$ от временных параметров эксперимента. Фиолетовым цветом обозначен импульсный градиент магнитного поля

В данной последовательности после первого и третьего радиочастотного импульса следуют импульсы градиента. Первые три радиочастотных импульса составляют стандартную импульсную последовательность стимулированное эхо. Дополнительные два 90° импульса служат того, чтобы сформировать второе стимулированное эхо на расстоянии $2\tau + \tau_1 + 2\tau_2 + \tau_3$, амплитуда которого определяется процессами спин-спиновой релаксации в интервале времени 2τ и $2\tau_2$, а спин-решеточной $-\tau_1$ и τ_3 . Как и прежде, время диффузии t_d определяется как расстояние между импульсами градиента магнитного поля и близко к значению τ_1 . Таким образом, временное положение второго сигнала спинового эхо может быть значительно больше времени диффузии. При этом, если мы будем менять только τ_3 , мы будем менять временное положение второго эхо в масштабе спин-решеточной релаксации не изменяя t_d , а изменяя

τ_1 и τ_3 так, чтобы $\tau_1 + \tau_3 = const$, будем менять только t_d , сохраняя постоянным временное положение эхо.

Итак, для того, чтобы идентифицировать причины зависимости формы диффузионного затухания, проводят две серии измерений $A(g^2)$:

-1-ая серия — при различных значениях τ_3 . В таком случае форма $A(g^2)$ будет меняться только в случае неэкспоненциальной (спин-решеточной) релаксации.

-2-ая серия — при разных τ_1 , но с условием $\tau_1 + \tau_3 = const$, т.е. при различных t_d . В этом случае форма $A(g^2)$ будет меняться только за счет особенностей (например, обмена) диффузионных процессов.

Когда форма $A(g^2)$ зависит как от τ_3 , так и от t_d , корректное исследование процесса самодиффузии в образце может быть проведено только с помощью модифицированной последовательности.

2.3 Объект исследования

Для исследования трансляционной подвижности арахина в водных растворах при помощи метода ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля были использованы два коммерческих образца, предоставленных «Nutriset group»:

1. Пищевой продукт на основе арахина;
2. Пищевой продукт на основе смеси муки маниоки и арахина.

По данным производителя, образцы были приготовлены путем механического смешивания компонент продукта и последующего термического воздействия (был осуществлен нагрев смеси с концентрацией 19.5% (вес.) первичной белковой фракции белка арахиса с водой до температуры 368 К в течении 15 минут, после чего доведен до температуры 278 К). Аналогичным способом был приготовлен пищевой продукт на основе смеси муки маниоки и арахина. Данных о возможном наличии в пищевых продуктах других молекулярных компонент фирмой «Nutriset group» не представлено.

В связи с этим нами были дополнительно приготовлены образцы водных растворов основных компонент пищевых продуктов: арахина и муки маниоки. При этом образцы готовились аналогичным, указанному фирмой, способом.

Отдельно приведем данные (см. таблицу 2.1) по характеристикам муки маниоки, которая была использована для изготовления одного из коммерческих образцов.

Таблица 2.1 Подробная характеристика муки маниоки, взятой для приготовления коммерческого образца, предоставленного фирмой «Nutriset group»

Влага (мас.%)	11-13 %
Крахмал (мас.% сухого вещества)	>98 %
Сырая клетчатка (мас.%)	1 %
Зольность (мас.%)	0,3 %
Белки	0,2 %
pH	4-7
Общее содержание цианида	2 м.д.
Частицы размером менее 0,2 мм	95 %

Таким образом, исходя из данных, представленных в таблице 2.1 можно заключить, что мука из маниоки характеризуется высоким содержанием ($> 98\%$ от сухого вещества) тапиоки (крахмала, добываемого из корней маниока), малой зольностью ($<0,3\%$) и малым содержанием цианидов (<2 миллионных долей). В образце мука на 95% состояла из частиц, размер которых не превышал $0,20$ мм.

При самостоятельном приготовлении образцов мы использовали концентрат арахисового протеина, обладающий пищевой ценностью на 100 г: белки- 50% , жиры – 8% , углеводы – 15% , влага – 5% , и энергетической ценностью на 100 г- 395 Ккал.; а также тапиоковый крахмал с пищевой ценностью на 100 г продукта: белки – $0,2\%$, углеводы – 88% , и энергетической ценностью – 360 Ккал.

Глава 3. САМОДИФФУЗИЯ МОЛЕКУЛ АРАХИНА В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ И В СМЕСИ С МУКОЙ МАНИОКИ

Исследования трансляционной диффузии молекул арахина в водных растворах проводились методом ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля (ИГМП) на приборе AVANCE III фирмы Bruker, снабженном блоком импульсного градиента магнитного поля с максимальной величиной градиента 28 Тл/м. Все измерения проводились на частоте резонанса протонов 400 МГц при температуре 298 К с использованием импульсной последовательности стимулированного эхо. Значение временного интервала τ_1 между первым и третьим радиочастотным импульсами, а, следовательно, и интервал Δ между импульсами градиента, варьировалось в пределах от 100 до 1000 мс, что позволяло исследовать зависимость формы диффузионных затуханий от времени диффузии $t_d = \Delta - \delta \cdot \frac{1}{3}$. Длительность δ импульса градиента магнитного поля была равна 2 мс. Максимальное значение градиента магнитного поля в экспериментах было 2800 Гаусс/см.

3.1 Вид ^1H ЯМР спектров для водных растворов арахина

На рисунке 3.1 представлены протонные спектры ЯМР сигнала спинового эхо для образцов водных растворов арахина и смеси арахина с мукой маниоки, предоставленных компанией «Nutrisset group».

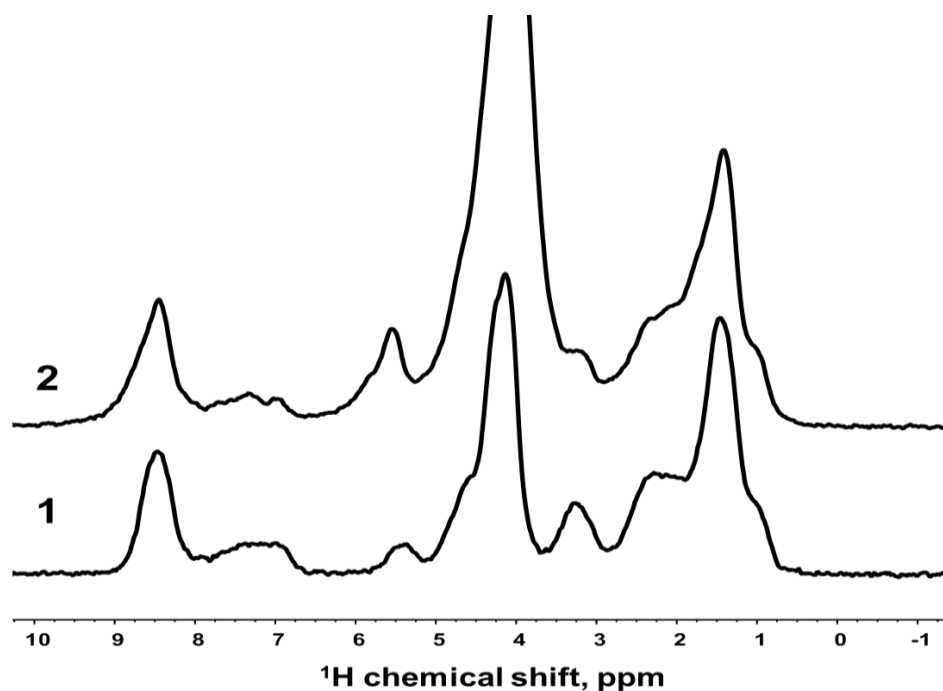


Рис. 3.1 Протонные спектры ЯМР сигнала спинового эхо при значении градиента магнитного поля $g=143$ Гс/см и времени диффузии 100 мс для коммерческих образцов водных растворов с концентрацией арахина 19.5%: цифрой 1 обозначен спектр водного раствора арахина, цифрой 2 – спектр для белкового раствора с мукой маниоки .

Как видно из рисунка 3.1, в целом представленные ЯМР спектры обладают схожестью в части наличия сигналов с определенными химическими сдвигами, единственное отличие спектров состоит в различии интенсивностей ЯМР сигналов: с добавлением муки маниоки в водный раствор арахина с концентрацией 19.5% в спектре ^1H наблюдается увеличение амплитуды линий в области химических сдвигов от 3 до 6 м.д., что свидетельствует о увеличении числа молекул в растворе, содержащих протоны различных групп, свойственных компонентам муки маниоки. Известно [65, 66], что для полисахаридов, входящих в состав маниоки, характерны аномерные сигналы протонов в позициях α -1,4 и α -1,6 в области хим. сдвигов от 4.94 до 5.2 м.д.. Характерные химические сигналы в области от 3.07 до 3.6 м.д. обычно относят к протонам, находящимся во внутренней части молекулы полисахарида маниоки [67]. Наличие сигнала в области спектра от 7 до 9 м.д является интересным в связи с тем, что сигнал в этой области не характерен для белковых структур. Возвращаясь к сравнительному анализу представленных на

рисунке 3.1 ЯМР спектров исследуемых образцов необходимо отметить достаточно большое уширение линий в спектрах по сравнению, например, со стандартными значениями ширины линий для водных растворов белков, в которых ширина линий имеет значение порядка 0.01 м.д.. Согласно литературным данным [66] подобное уширение ЯМР спектров наблюдается в случае достаточно больших скоростей спин-спиновой релаксации ($1/T_2$).

Известно, что макромолекулы и молекулярные кластеры (надмолекулярные структуры типа трехмерной сетки геля с высокой вязкостью и т.д.) характеризуются медленной вращательной подвижностью и достаточно короткими временами T_2 . Поэтому на спектрах, представленных на рисунке 3.1 линии от отдельных химических групп не разрешаются.

3.2 Форма диффузионных затуханий для арахина в водных растворах

Известно, что первичной информацией, получаемой из эксперимента ЯМР с ИГМП, является диффузионное затухание.

На рисунке 3.2 представлена серия спектров ЯМР с ИГМП для образцов водных растворов арахина и смеси арахина с мукой маниоки предоставленных компанией «Nutriset group» в зависимости от величины градиента магнитного поля.

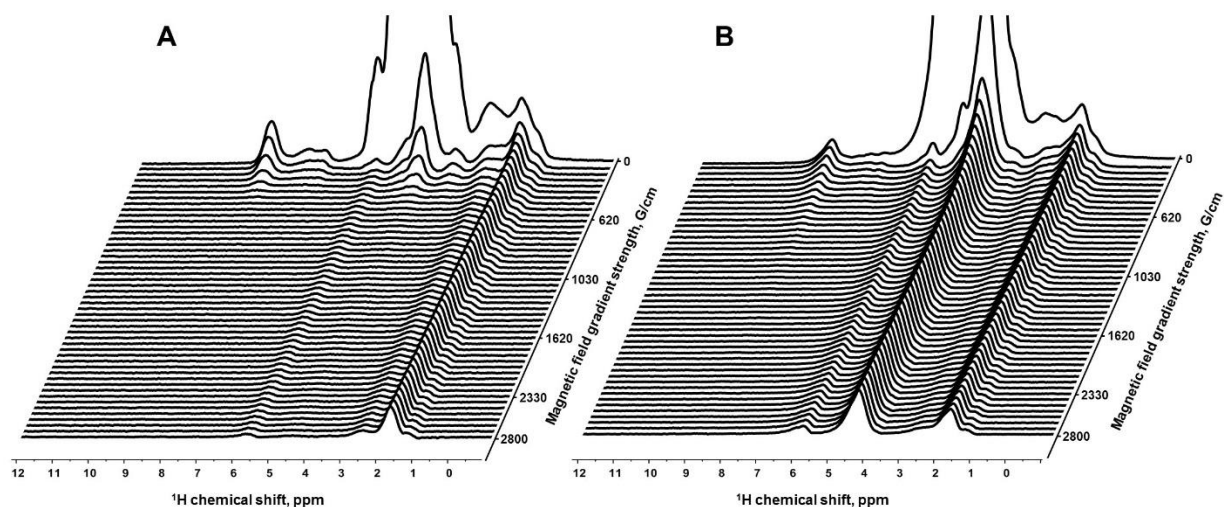


Рис. 3.2 Протонные спектры ЯМР с ИГМП при времени диффузии 100 мс для

коммерческих образцов водных растворов с концентрацией арахина 19.5%: А спектр водного раствора арахина, В – спектр для водного раствора арахина с мукой маниоки. Вся спектральная область сигналов ЯМР представлена в зависимости от величины градиента от 25 Гс/см до 2800 Гс/см (с одинаковым вертикальным масштабированием)

Прежде всего необходимо отметить, что ЯМР спектры для образцов водных растворов арахина и смеси арахина с мукой маниоки при малых градиентах магнитного поля (порядка 70 Гс/см) не демонстрируют достаточного разрешения для того, чтобы получить диффузионные затухания для каждой наблюдаемой линии в спектре. Очевидно, что первопричиной этого факта является интенсивный ЯМР сигнал с химическим сдвигом 4.7 м.д., характерный –ОН группам, соответствующий молекулам растворителя – воде H_2O . Наблюдаемое в рассматриваемых спектрах при значениях градиента 25 Гс/см соотношение интенсивностей сигналов (~80:20) относящихся к ОН группам (4.7 м.д.) и молекулам белка (в области хим. сдвигов от 0.5 до 4 м.д.) свидетельствует о том, что образцы были приготовлены с использованием H_2O в качестве растворителя (а не D_2O , принятого для ЯМР исследований). В то же время при градиентах магнитного поля больше 150 Гс/см на спектрах вид регистрируемых спектров уже не содержит явных признаков линий растворителя. Достаточно неожиданным является, как видно из рисунка 3.2, то, что скорости затухания сигнала ЯМР с ростом амплитуды градиента магнитного поля представляются разными для разных областей хим. сдвигов. Это настораживающий факт, который может свидетельствовать о неоднородности исследуемой молекулярной системы как по трансляционной подвижности молекул, так и по их химической структуре. В связи с этим для более детального анализа мы разделили весь наблюдаемый спектр ЯМР ВР на семь поддиапазонов (областей) химических сдвигов, так как показано на рисунке 3.3.

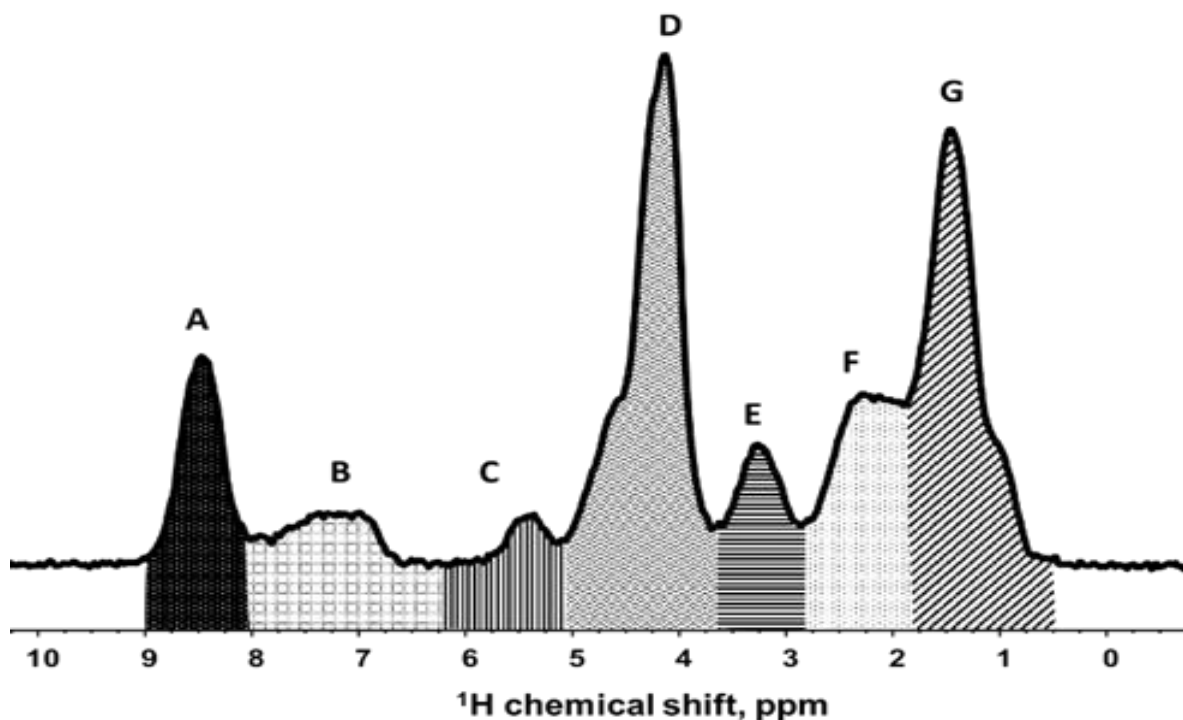


Рисунок 3.3 – Диапазоны хим сдвигов, по которым будут определены соответствующие диффузионные затухания, на примере спектра спигового эхо ^1H для образца водного раствора арахина с концентрацией 19.5% при значении градиента магнитного поля $g=143$ Гс/см:

A – от 8.1 до 9 м.д.; B – от 6.2 до 8.1 м.д.; C – от 5.2 до 6.2 м.д.;

D – от 3.6 до 5.2 м.д.; E – от 2.8 до 3.6 м.д.; F – от 1.75 до 2.8 м.д.;

G – от 0.5 до 1.75 м.д.

Выделенные на рисунке 3.3 области сигналов A и B с химическим сдвигом от 6.2 м.д. до 9 м.д. могут быть отнесены к протонам ароматической области, а области C, D и E с химическим сдвигом от 2.8 м.д. до 6.2 м.д. принадлежат к молекулам –ОН группы, в том числе и наблюдаемый наиболее интенсивный, по сравнению с остальными, сигнал с химическим сдвигом 4.7 миллионных долей. Химические сдвиги, отмеченные областями E, F и G, распространяющиеся от 0.5 м.д. до 2.8 м.д., характерны для молекул алифатической области (метильная группа).

Ниже, на рисунке 3.4 представлены диффузионные затухания для различных областей химических сдвигов, полученные для указанных диапазонов хим. сдвигов для обоих исследуемых образцов. Буквенные

обозначения символов, соответствуют принятым на рисунке 3.3 обозначениям областей хим. сдвигов, по которым производилось интегрирование сигнала ЯМР для выделения спектрально разрешенных диффузионных затуханий.

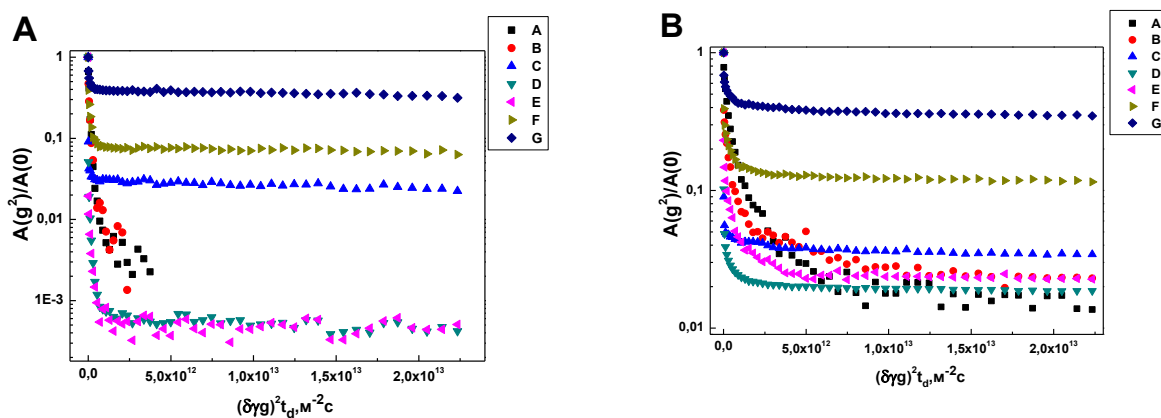


Рис. 3.4 Диффузионные затухания для водных растворов арахиса с концентрацией 19.5 % для различных областей хим.сдвигов (А – от 8.1 до 9 м.д.; В – от 6.2 до 8.1 м.д.; С – от 5.2 до 6.2 м.д.; D – от 3.6 до 5.2 м.д.; E – от 2.8 до 3.6 м.д.; F – от 1.75 до 2.8 м.д.; G – от 0.5 до 1.75 м.д.), полученные в результате применения импульсной последовательности стимулированное эхо при времени диффузии $t_d=100$ мс:

А) для арахиса в водном растворе при весовой концентрации 19.5%;

В) для смеси арахиса и муки маниоки в водном растворе при весовой концентрации арахиса 19.5%.

Результаты, представленные на рисунке 3.4, позволяют сделать, как минимум, два вывода: а) для всех диффузионных затуханий характерна сильная неэкспоненциальность; б) все диффузионные затухания, за редким исключением, индивидуальны и не совпадают друг с другом.

Конечно, эти выводы и, особенно, второй из них, носят еще предварительный характер. Дело в том, что начальные участки диффузионных затуханий могут быть искажены вкладом молекул растворителя. Поскольку для нас приоритетной задачей является получение информации о трансляционной подвижности молекул белковой (не водной) части систем вода-арахин-мука, то мы должны найти способ этот вклад из диффузионных затуханий исключить. На рисунке 3.5 в качестве примера показано характерное

для области малых градиентов магнитного поля диффузионное затухание сигнала ЯМР, полученное для диапазона химических сдвигов от 3.6 до 5.2 м.д. (диапазон D , согласно рис. 3.3).

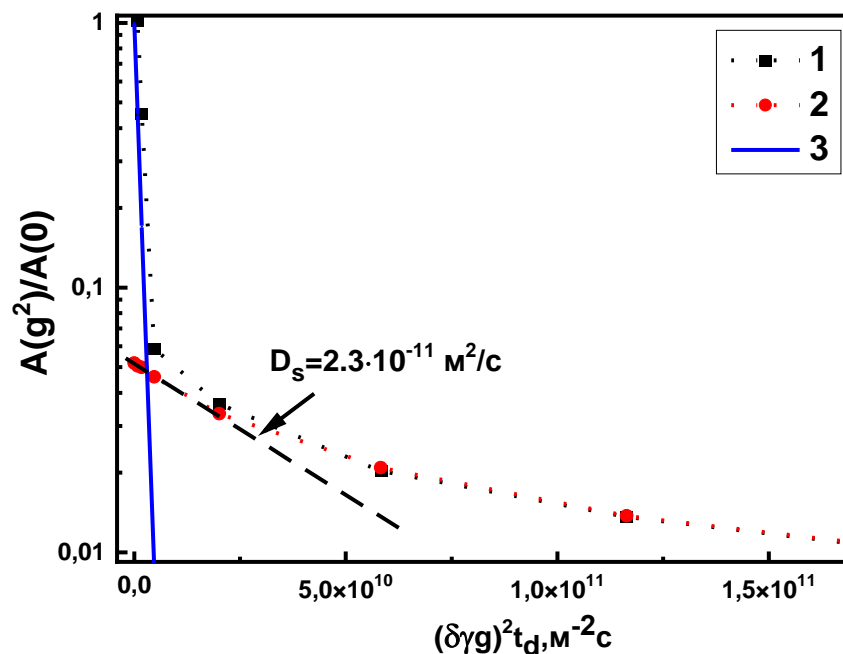


Рис. 3.5 – Спектрально разрешенное диффузионное затухание для водного раствора арахина, полученное для спектральных линий области спектра с хим. сдвигами от 0.5 до 1.75 м.д. при малых значениях градиента магнитного поля: 1 – исходное диффузионное затухание; 2 – диффузионное затухание после вычета вклада от молекул воды; 3 – диффузионное затухание молекул воды, рассчитанное при значении КСД воды равным $1 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$. Пунктирной прямой показана касательная к начальному участку диффузионного затухания 2.

На этом же рисунке синей линией показано диффузионное затухание, рассчитанное для значения КСД равное $1 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$. Как видно, она хорошо аппроксимирует самый начальный участок диффузионного затухания. При этом дальнейшее поведение диффузионного затухания явно указывает на существенно меньшую зависимость амплитуды сигнала от значения градиента магнитного поля, что будет соответствовать существенно меньшим значениям КСД, относящимся к неводным компонентам системы. Так, кривой 2 на рисунке 3.5 показано диффузионное затухание, получаемое после вычитания

вклада от молекул воды. Пунктирной прямой показана касательная к начальному участку полученного таким образом диффузионного затухания, которая по сути соответствует нижеприведенному выражению (3.2) и определяется значением среднего КСД для неводных компонент. Для рассматриваемого примера значение среднего КСД равно $2.3 \cdot 10^{-11}$ м²/с, что существенно меньше значения КСД ($1 \cdot 10^{-9}$ м²/с) для молекул растворителя (воды). Заметим, что используемое значение для молекул воды отличается от такового для чистой воды почти в три раза, но оно вполне разумно, если принять, что речь идет о КСД молекул воды в достаточно концентрированном водном растворе арахина. Итак, в любом случае, за счет сильного различия значений КСД молекул воды и КСД для молекул белка эти вклады легко разделяются, что дает возможность получить для дальнейшего анализа диффузионные затухания, полностью относящиеся только к неводным компонентам исследуемых систем.

На рисунке 3.6 приведены нормированные на единицу диффузионные затухания, аналогичные представленным выше на рисунке 3.4, но с исключенным для каждого из них вкладом воды.

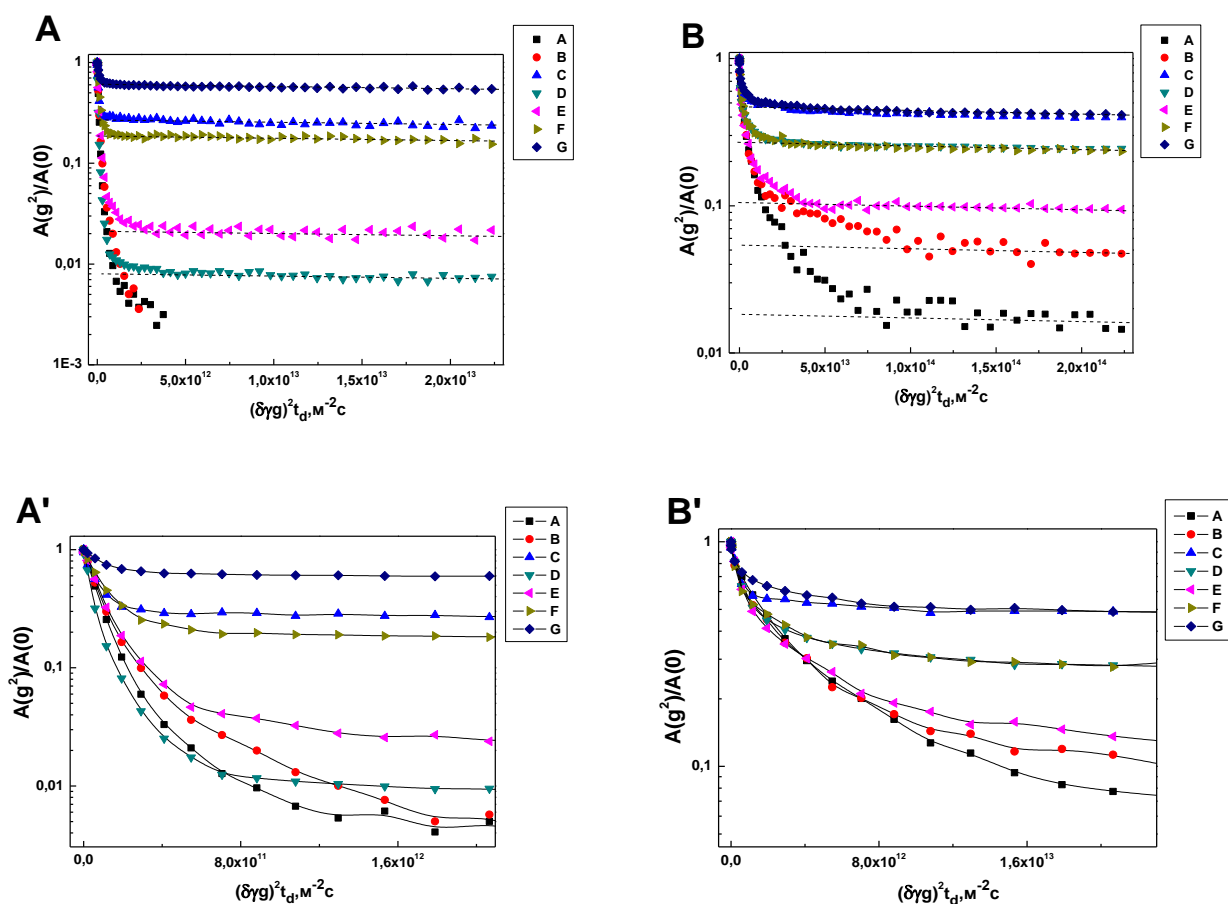


Рис. 3.6 Диффузионные затухания для водных растворов арахина с концентрацией 19.5 % для различных областей хим. сдвигов (А – от 8.1 до 9 м.д.; В – от 6.2 до 8.1 м.д.; С – от 5.2 до 6.2 м.д.; D – от 3.6 до 5.2 м.д.; E – от 2.8 до 3.6 м.д.; F – от 1.75 до 2.8 м.д.; G – от 0.5 до 1.75 м.д.), полученные в результате применения импульсной последовательности стимулированное эхо при времени диффузии $t_d=100$ мс и вычтенным вкладом диффузии воды:

А и А' – для арахина в водном растворе при различных масштабах по оси абсцисс;

В и В' – для смеси арахина и муки маниоки в водном растворе при различных масштабах по оси абсцисс.

Все пунктирные линии, представленные на рисунках 3.6 А и 3.6 В были рассчитаны при значении КСД $D_{s\ min} = 5 \cdot 10^{-15} \frac{m^2}{c}$, а уровни амплитуд расчетных линий подобраны так, чтобы обеспечить совпадение с конечными участками экспериментальных ДЗ.

Если сравнивать семейства диффузионных затуханий, представленные на рисунках 3.4 и 3.6, друг с другом, то можно говорить о том, что исключение водной компоненты привело к несколько разным изменениям формы каждого

из ДЗ, что связано, очевидно, с различным вкладом водной компоненты для разных диапазонов хим. сдвигов. При этом видно, что произошли достаточно сильные метаморфозы на начальных участках диффузионных затуханий, в то время как, естественно, в области больших градиентов их форма изменилась мало.

При анализе формы диффузионного затухания в многокомпонентных молекулярных системах принято исходить из того, что она может представляться в виде суммы экспоненциальных составляющих, число которых соответствует числу молекулярных компонент с различающимися коэффициентами самодиффузии.

$$\frac{A(g^2)}{A(0)} = \sum_i p_i \cdot \exp(-\gamma^2 g^2 \delta^2 D_{si} t_d), \quad (3.1)$$

где D_{si} и p_i – коэффициент самодиффузии и населенность i -ой компоненты исследуемой системы, регистрируемая в сигнале стимулированного эхо при определенных значениях временных интервалов τ_1 и τ_2 .

Часто полезным оказывается использование понятия среднего коэффициента самодиффузии, определяемого как

$$\langle D_s \rangle = \sum_i p_i \cdot D_{si} \quad (3.2)$$

Заметим, что средний КСД также легко определяется и по касательной к начальному наклону ДЗ.

В нашем случае, для водного раствора арахина, содержащего по информации производителя всего две компоненты – растворитель (H_2O) и арахин, можно было бы ожидать всего одну компоненту в диффузионном затухании, поскольку вклад воды уже исключен. Но, как видим, это не соответствует действительности.

Итак, в целом, представленные на рисунке 3.6 диффузионные затухания, характеризующие теперь только неводные компоненты систем арахин-вода и

арахин-вода-мука, полностью подтверждают уже сделанные ранее выводы. А именно:

а) все диффузионные затухания индивидуальны по форме и не совпадают друг с другом;

б) для всех диффузионных затуханий характерна сильная неэкспоненциальность, свидетельствующая о широком спектре значений КСД.

Второе означает, что в каждую из семи выделенных областей хим. сдвигов дают вклад спектральные линии молекул с сильно различающимися характеристиками трансляционной подвижности. Такой результат в принципе возможен и легко реализуется, например, для случая макромолекул одной химической природы, но разных молекулярных масс. Но тот факт, что для всех семи выделенных областей хим. сдвигов регистрируемые формы диффузионных затуханий индивидуальны и не совпадают друг с другом не позволяет остановиться на такой простой версии.

На примере более простой системы арахин-вода можно сформулировать два крайних предположения. Согласно первому из них можно считать, что кроме собственно молекул белка арахина имеется еще, как минимум, одна молекулярная компонента с другими характеристиками трансляционной подвижности. При этом, линии спектра ЯМР ВР для этой гипотетической молекулярной компоненты перекрываются со всеми линиями, характерными для белка арахина, но имеют другое распределение по интенсивностям. В рамках такого предположения каждое из регистрируемых ДЗ содержало бы две компоненты, относящихся к собственно молекулам белка арахина и предполагаемой молекулярной компоненте, а все различия между регистрируемыми формами ДЗ сводились бы к разным соотношениям между вкладами этих компонент. Однако, в этом случае, как несложно показать, диффузионные затухания не должны были бы перекрываться между собой так, как это видно из Рис. 3.6 А' и Рис. 3.6 В'.

Согласно другой крайней точке зрения, можно допустить возможность наличия в системе арахин-вода формально семи (по количеству выделенных

областей хим. сдвигов) разных неводных молекулярных компонент с разными характеристиками трансляционной подвижности и разной химической структурой, каждая из которых дает сигнал ЯМР только в одном из выделенных диапазонов химических сдвигов. Такое предположение тоже представляется маловероятным хотя бы потому, такой белок как арахин, сам по себе имеет сложный спектр ЯМР ВР, основные линии которого ожидаются, как минимум, в трех из семи определенных выше диапазонов хим. сдвигов..

Как мы уже отметили, сформулированные выше два предположения являются крайними. Разумно считать, что истина где-то между ними и неясно, в какой мере она может быть установлена в рамках настоящего исследования.

Обратим теперь внимание на то, что в представленных на рисунке 3.6 диффузионных затуханиях можно выделить один общий признак. Речь идет о том, что конечные участки большинства диффузионных затуханий имеют одинаковые или близкие наклоны и могут быть аппроксимированы выражением типа

$$\frac{A(g^2)}{A(0)} = p_{min} \exp(-\gamma^2 g^2 \delta^2 D_{s\ min} t_d), \quad (3.3)$$

где $D_{s\ min} = 5 \pm 2 \cdot 10^{-15} \text{ м}^2 \text{ с}^{-1}$, а параметр p_{min} подобран для каждого ДЗ так, чтобы обеспечить наилучшее совпадение с его конечным участком соответствующего экспериментального диффузионного затухания, полученного при времени диффузии $t_d=100$ мс.

Итак, для образца вода-арахин во всех диффузионных затуханиях, кроме затуханий, соответствующих областям хим. сдвигов А и В, присутствует компонента, удовлетворяющая выражению (3.3). При этом, для образца вода-арахин-мука такая компонента присутствует во всех семи диффузионных затуханиях. Другими словами – регистрируется во всех обнаруженных линиях спектра ЯМР в диапазоне хим. сдвигов от 0,5 до 9 м.д.

Как отмечалось в обзорной части настоящей работы, в водных растворах арахина может образовываться гелевая структура. Согласно результатам работ [68-73] одним из главнейших признаков образования геля является постоянство

(независимость от времени) регистрируемых в методе ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля среднеквадратичных смещений для молекул или фрагментов молекул, входящих в структуру геля. Если же рассуждать в терминах коэффициентов самодиффузии, то в этом случае вычисляемые коэффициенты самодиффузии становятся функцией времени диффузии. Причем, в этом, так называемом режиме «аномальной» или полностью ограниченной самодиффузии, значения КСД обратно пропорциональны времени диффузии:

$$D_{si}(t_d) \propto t_d^{-1} \quad (3.4)$$

Итак, попытаемся выяснить, имеются ли в полученных экспериментальных диффузионных затуханиях признаки присутствия компонент, удовлетворяющих условию (3.4). Очевидно, что для этого необходимо проанализировать и сравнить диффузионные затухания, полученные при разных временах диффузии.

3.3 Зависимость формы диффузионных затуханий для водных растворов арахина от времени диффузии

На рисунке 3.7 представлены диффузионные затухания для системы арахин-вода, полученные при двух разных временах диффузии t_d (0.1 и 0.5 с). Диффузионные затухания показаны в координатах $\lg(A(g^2)/A(0))$ vs $(\delta\gamma g)^2$, удобных для тестирования ограниченной диффузии. В таких координатах выполнение условия (3.4) легко обнаруживается по признаку либо совпадения диффузионных затуханий, измеренных при разных временах диффузии, либо, как минимум, сохранения наклона зависимости.

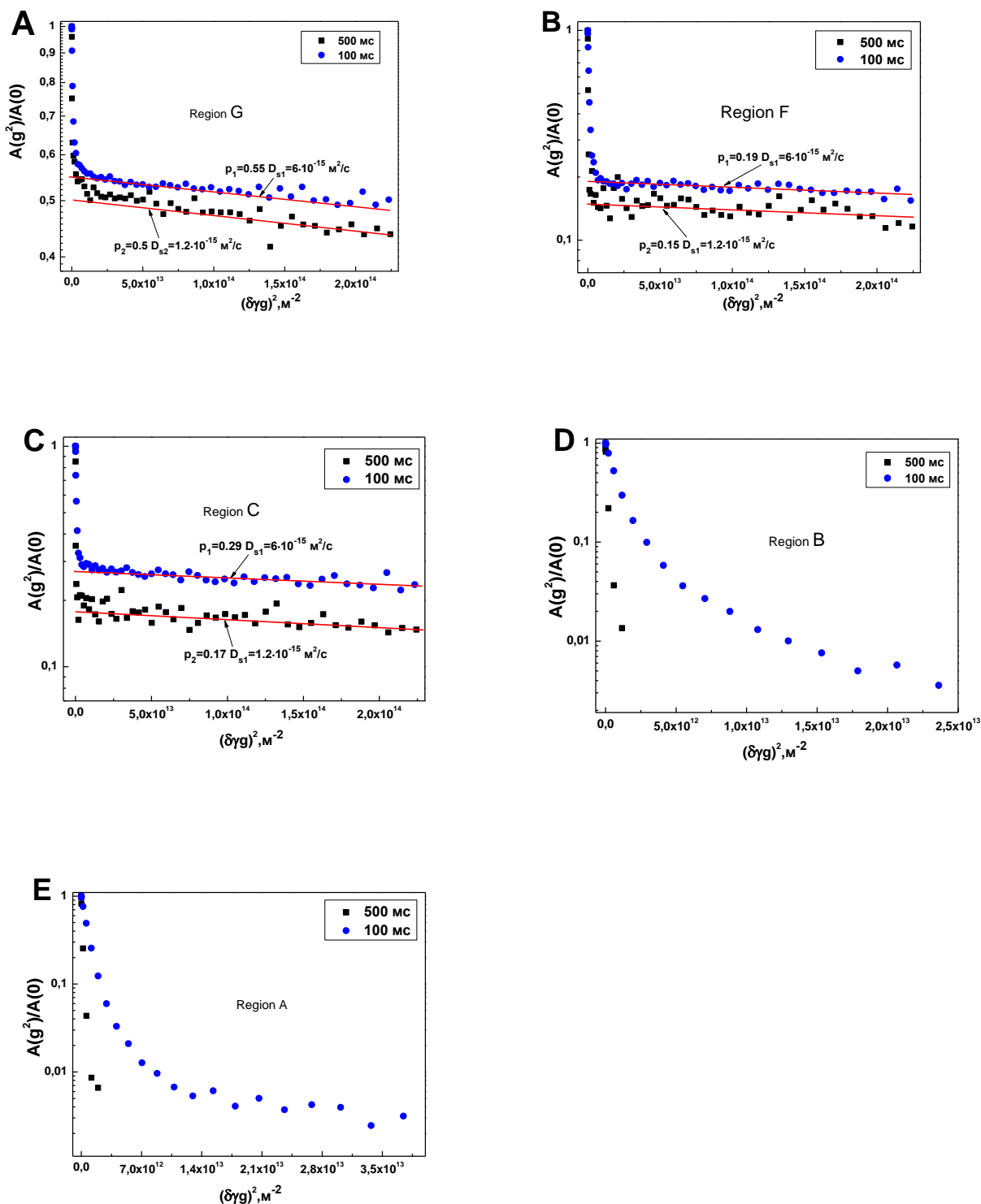


Рис. 3.7 Спектрально разрешенные диффузионные затухания для водных растворов арахина, полученные при временах диффузии t_d 100 и 500 мс для различных спектральных областей спектра в соответствии с обозначениями, принятыми на рисунке 3.3.

Как видно из рисунка 3.7, конечные участки диффузионных затуханий, измеренных при разных временах диффузии для областей хим. сдвигов G, F и C, сохраняют свой наклон. Поскольку ранее конечные участки диффузионных

затуханий мы аппроксимировали, согласно (3.3), коэффициентом $D_{s\ min}$, то это означает, что именно эта компонента удовлетворяет условию (3.4), а именно:

$$D_{s\ min}(t_d) \propto t_d^{-1}. \quad (3.4a)$$

)

Для областей хим. сдвигов А и В, как видно из рисунка 3.7 никаких признаков совпадения для ДЗ при разных временах диффузии в представленных координатах не наблюдается. Сравнение ДЗ для областей хим. сдвигов Е и D оказалось невозможным из-за плохого отношения сигнал/шум при измерениях в условиях времени диффузии 500 мс.

Таким образом, в рамках имеющейся погрешности эксперимента для образца арахин-вода мы имеем право утверждать о существовании в диффузионных затуханиях для линий спектра, находящихся в областях С, F и G, компоненты, удовлетворяющей условию (3.4a). Области F и G (от 2.8 до 0.5 м.д.) относятся к алифатическим группам, которые могут содержаться в структуре молекулы арахина. Это дает основания считать, что в образце вода-арахин до половины молекул белка арахина участвуют в формировании гелевой структуры. При этом размер ограничений, который можно грубо связать с размером сетки геля легко рассчитывается по соотношению

$$\langle r^2 \rangle = D_{s\ min}(t_d) * 6t_d \quad (3.5)$$

Согласно полученным данным, для системы вода арахин $\sqrt{\langle r^2 \rangle} \approx 60 \pm 2$ нм, если принять, что значение $D_{s\ min} = 6 \pm 1 * 10^{-15} \text{ м}^2 \text{ с}^{-1}$ и $1,2 \pm 1 * 10^{-15} \text{ м}^2 \text{ с}^{-1}$ при временах диффузии 100 и 500 мс соответственно.

Область С (от 5.2 до 6.2 м.д.) ближе к ароматике и, на наш взгляд, сопоставить её соответствующей структуре белка арахина не так просто. Возможно, наличие сигналов в этой области хим. сдвигов связано с какой-то нам неизвестной молекулярной компонентой, содержащей достаточно большое количество амидных групп (R-CO-NH_2). Предположительно это связано с добавлением ферментов, для наилучшего переваривания продуктов. Заметим, что вычисленный по данным для этой области хим. сдвигов размер ограничений полностью совпадает со значением $\sqrt{\langle r^2 \rangle} \approx 60 \pm 2$ нм,

полученным по данным для областей F и G. Кроме того, также как и для областей F и G, в диффузионном затухании для области С оказывается достаточно весомой (порядка 30%) доля компоненты, относимой по своим характеристикам к гелевой структуре арахина.

Что касается областей хим. сдвигов А и В, то они охватывают диапазон от 6.2 до 9 м.д.. Это область ароматики, которую в нашем случае наиболее вероятно связывать с молекулами масел, обладающих невысокой молекулярной массой и характеризующихся поэтому достаточно большими значениями коэффициентов самодиффузии. Причем процесс самодиффузии для молекул масел не связан ни с какими ограничениями, и, следовательно, значения КСД не зависят от времени диффузии, что подтверждается экспериментально.

3.4 Зависимость формы диффузионных затуханий для водных растворов арахина с добавлением муки маниоки от времени диффузии

На следующем рисунке в таких же координатах, как и в предыдущем случае, представлены данные диффузионных измерений при двух разных временах диффузии (100 и 500 мс) для образца вода-арахин-мука.

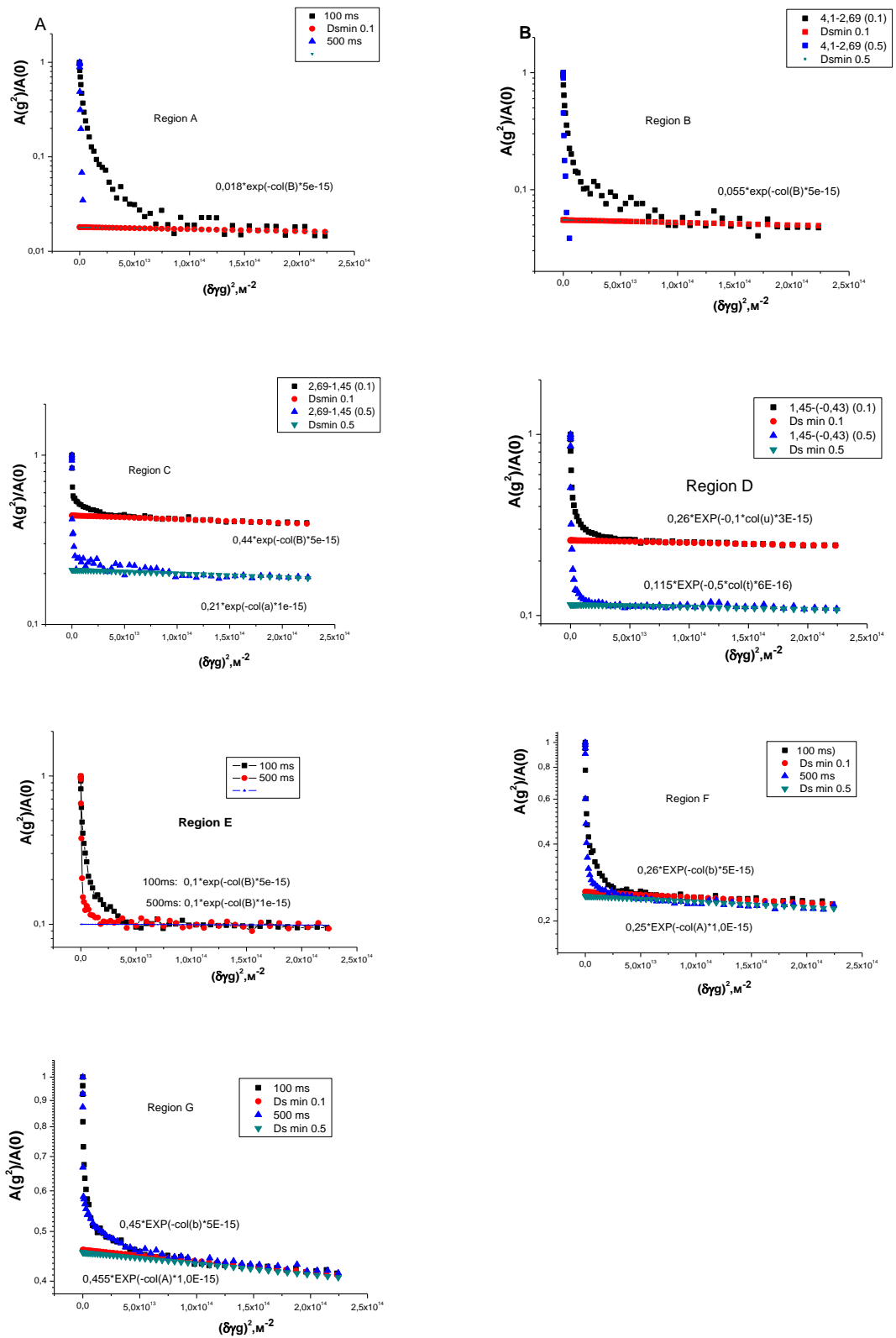


Рис. 3.8 Спектрально разрешенные диффузионные затухания для водных растворов смеси арахиса с мукой маниоки Tweed cheese при временах диффузии t_d 100 и 500 мс, полученные для различных спектральных областей спектра в соответствии с обозначениями, принятыми на рисунке 3.3.

Как видно из рисунка 3.8, диффузионные затухания, полученные для спектральных областей A и B , как и в предыдущем случае не показывают признаков, удовлетворяющих режиму ограниченной самодиффузии. В то же время все остальные пять спектральных областей (C , D , E , F и G) в представленных координатах характеризуются диффузионными затуханиями, демонстрирующими факт сохранения наклона конечных участков, аппроксимируемых выражением типа (3.3).

Итак, в системе вода-арахин-мука для достаточно широкой области химических сдвигов (от 0.5 до 6.2 м.д.) уверенно фиксируется наличие компоненты с коэффициентом самодиффузии, подчиняющемуся условию (3.4а), то есть – условию полностью ограниченной самодиффузии.

Сравнивая значения коэффициентов самодиффузии $D_{s\ min}$ для обоих исследованных образцов можно заметить, что они почти одинаковы. Так, для системы вода-арахин-мука в спектральных диапазонах F и G при времени диффузии 100 мс $D_{s\ min} = 5 \cdot 10^{-15} \text{ м}^2 \text{ с}^{-1}$ (при времени диффузии 100 мс). Это не намного меньше ранее полученного значения $D_{s\ min} = 6 \cdot 10^{-15} \text{ м}^2 \text{ с}^{-1}$ для этих же условий в образце вода-арахин.

В то же время для спектральной области D нельзя не заметить существенного уменьшения значений $D_{s\ min}(t_d)$. Так при временах диффузии 100 и 500 мс мы наблюдаем $D_{s\ min} = 3 \cdot 10^{-15} \text{ м}^2 \text{ с}^{-1}$ и $D_{s\ min} = 6 \cdot 10^{-16} \text{ м}^2 \text{ с}^{-1}$ соответственно. Надо сказать, что для образца вода-арахин недостаточность сигнала в этой спектральной области вообще не позволила нам проанализировать его должным образом на предмет зависимости от времени диффузии.

Итак, на основании указанных фактов можно предположить, что добавление в систему вода-арахин муки мало что изменило с точки зрения размеров ограничений предполагаемой сетки геля в спектральных диапазонах E , F и G . По данным для этих областей в образце вода-арахин-мука размер ограничений равен $\sqrt{\langle r^2 \rangle} \approx 57 \pm 2$ нм. Другими словами, размер сетки геля,

образованного молекулами арахина, при добавлении муки практически не изменился.

Что касается спектральной области D , то увеличение сигнала в этой области естественно связывать именно с добавлением муки. Следовательно, и такая измеряемая характеристика, как $D_{s\ min}$, вероятнее всего, относится к поведению молекул, входящих в состав муки и участвующих в формировании геля. В этом случае возможность регистрации меньшего значения $D_{s\ min}$ легко объяснить, если допустить, что молекулы, входящие в состав муки и образующие единую гелевую структуру (или участвующие в ней) с молекулами арахина, имеют меньшую конформационную подвижность по сравнению с молекулами арахина.

Другой аспект, который также имеет смысл обсудить, касается наблюдаемых на рисунках 3.7 и 3.8 зависимостей значений p_{min} от времени диффузии t_d . Из данных для образца вода-арахин, представленных на рисунке 3.7, мы видим, что в спектральных областях G и F , также как и в спектральной области C , наблюдается отчетливая тенденция к уменьшению значения p_{min} с ростом времени диффузии. Если допустить отсутствие эффектов, связанных с распределением времен спин-решёточной релаксации, то этот факт трактуется как признак лабильности сетки геля и наличия динамического равновесия между свободными молекулами арахина и молекулами в сетке геля. Более того, проанализировав зависимость $p_{min}(t_d)$ можно оценить время жизни молекул в состоянии геля. В любом случае можно ожидать, что для образца вода-арахин искомое время жизни будет порядка секунды.

Теперь посмотрим на данные для образца вода-арахин-мука, показанные на рисунке 3.8. Как видим, для спектральных областей G , F и E конечные участки диффузионных затуханий, полученных при разных временах диффузии, совпадают. Другим словами это значит, что регистрируемые для них значения p_{min} от времени диффузии не зависят, как минимум, в диапазоне от 100 до 500 мс. Согласно результатам работ [69, 73] это значит, что в указанном диапазоне времен диффузии признаки молекулярного обмена не

регистрируются. Следовательно, если и говорить о времени жизни молекул в состоянии геля, то его значение будет много больше максимального времени $t_d = 500$ мс.

Таким образом, в качестве ещё одного эффекта, связанного с добавлением муки, можно считать снижение характеристик лабильности гелевой структуры.

Третий эффект, связанный с присутствием муки, усматривается в том, что в среднем значения p_{min} , при прочих равных условиях, оказываются больше для системы вода-арахин-мука. То есть, грубо можно говорить о том, что добавление муки увеличивает долю молекул, находящихся в состоянии геля в целом по всему образцу.

Итак, представленные на рисунках 3.7 и 3.8 диффузионные затухания сигнала спинового эхо в координатах соответствующих тестированию режима полностью ограниченной диффузии [68, 69]. демонстрируют, что наклон компоненты диффузионного затухания с наименьшим коэффициентом самодиффузии остается постоянным, несмотря на пятикратное изменение времени диффузии t_d . Этот признак однозначно свидетельствует о том, что коэффициент самодиффузии D_{min} обратно пропорционален времени диффузии. а среднеквадратичное смещение молекул арахина остается постоянным $\langle r^2 \rangle \sim t_d^0$ так, как это следует из основного уравнения:

$$D_{min} = \frac{\langle r^2 \rangle}{6t_d} \propto t_d^{-1} \quad (3.6)$$

Подобные эффекты наблюдались в работах [59, 69-72], в особенности в гелях желатина [69], а также и в концентрированных растворах α -казеина [73]. Наличие такой зависимости позволяет нам утверждать, что в водных растворах арахина, в том числе и при добавлении муки маниоки, наблюдаются процессы гелеобразования.

На рисунке 3.9 показана зависимость вычисленных значений коэффициентов самодиффузии D_{min} от времени диффузии t_d для двух

исследованных образцов, определенная по диффузионным затуханиям в спектральном диапазоне, объединяющем области G и F .

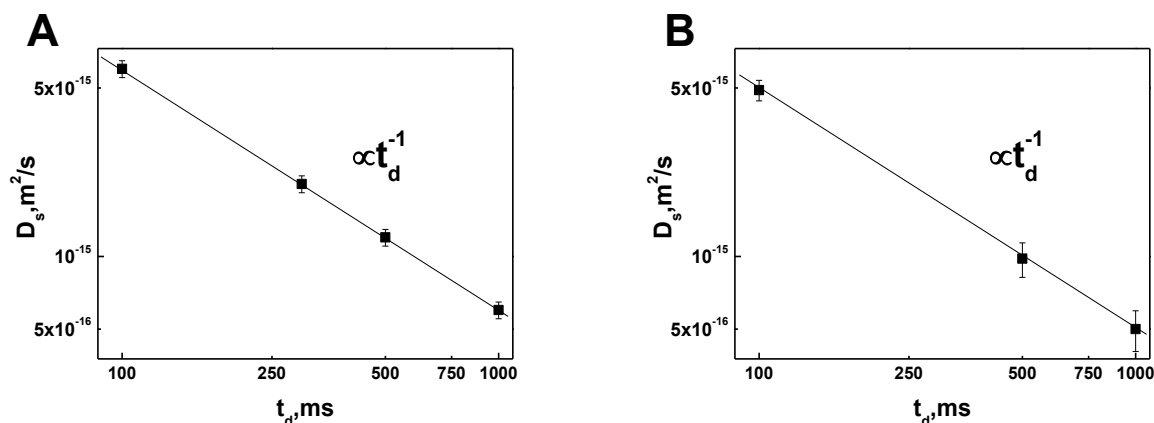


Рис. 3.9 Зависимости значений минимального коэффициента самодиффузии D_{min} от времени диффузии t_d по диффузионным затуханиям, полученным в объединенной ($G+F$) спектральной области:

А) для молекул арахина в водном растворе с концентрацией арахина 19.5% Tweed cheese 1;

В) для молекул арахина в водном растворе в присутствии муки маниоки с концентрацией арахина 19.5% Tweed cheese 2;

Как видно из рисунка 3.9, полученные экспериментальные зависимости в достаточно большом диапазоне времен вполне удовлетворительно описываются выражением типа $D_{min} \propto t_d^{-1}$ (показано на рисунке прямыми). Таким образом, зависимости минимального значения коэффициента самодиффузии от времени диффузии демонстрируют, что при концентрации арахина 19.5% в водных растворах, по крайней мере, часть молекул арахина находится в полностью ограниченном состоянии. При этом, размер ограничений, вычисленный по выражению (3.5), для молекул арахина в водном растворе при концентрации белка 19,5% равен $\sqrt{\langle r^2 \rangle} \approx 60 \pm 7$ нм, а аналогичный размер ограничений в смеси арахина и муки маниоки в водном растворе равен $\sqrt{\langle r^2 \rangle} \approx 58 \pm 8$ нм. Эти значения совпадают с оценками, сделанными ранее.

Таким образом, в случае водного раствора, содержащего исключительно арахин, с концентрацией 19,5% эффект ограниченной диффузии может быть

связан с только с тем, что несколько молекул арахина взаимодействуя друг с другом формируют надмолекулярную структуру, подобную трехмерной сетке геля. При этом, в качестве межмолекулярных связей могут выступать нековалентные взаимодействия (водородные, ионные и другие нековалентные связи) [74].

Кроме того, известно [75], что надмолекулярная структура, формируемая молекулами арахина представляет собой термообратимый гель, подобный гелям желатины, при формировании которого существует промежуточная стадия –термическую денатурацию белка.

Дополнительные эксперименты, проведенные с использованием модифицированной пяти-импульсной последовательности стимулированного эхо, так же подтвердили этот вывод.

3.5 Эффект добавления муки маниоки к водному раствору арахина в трансляционной подвижности на разных участках спектра

Попытаемся еще раз более детально понять, каким же образом повлияла мука на систему арахин+вода? Для удобства сравнения представим отдельно для каждой выделенной спектральной области диффузионные для образцов водных растворов арахина и смеси арахина с мукой маниоки. Эти данные приведены ниже, на рисунке 3.10.

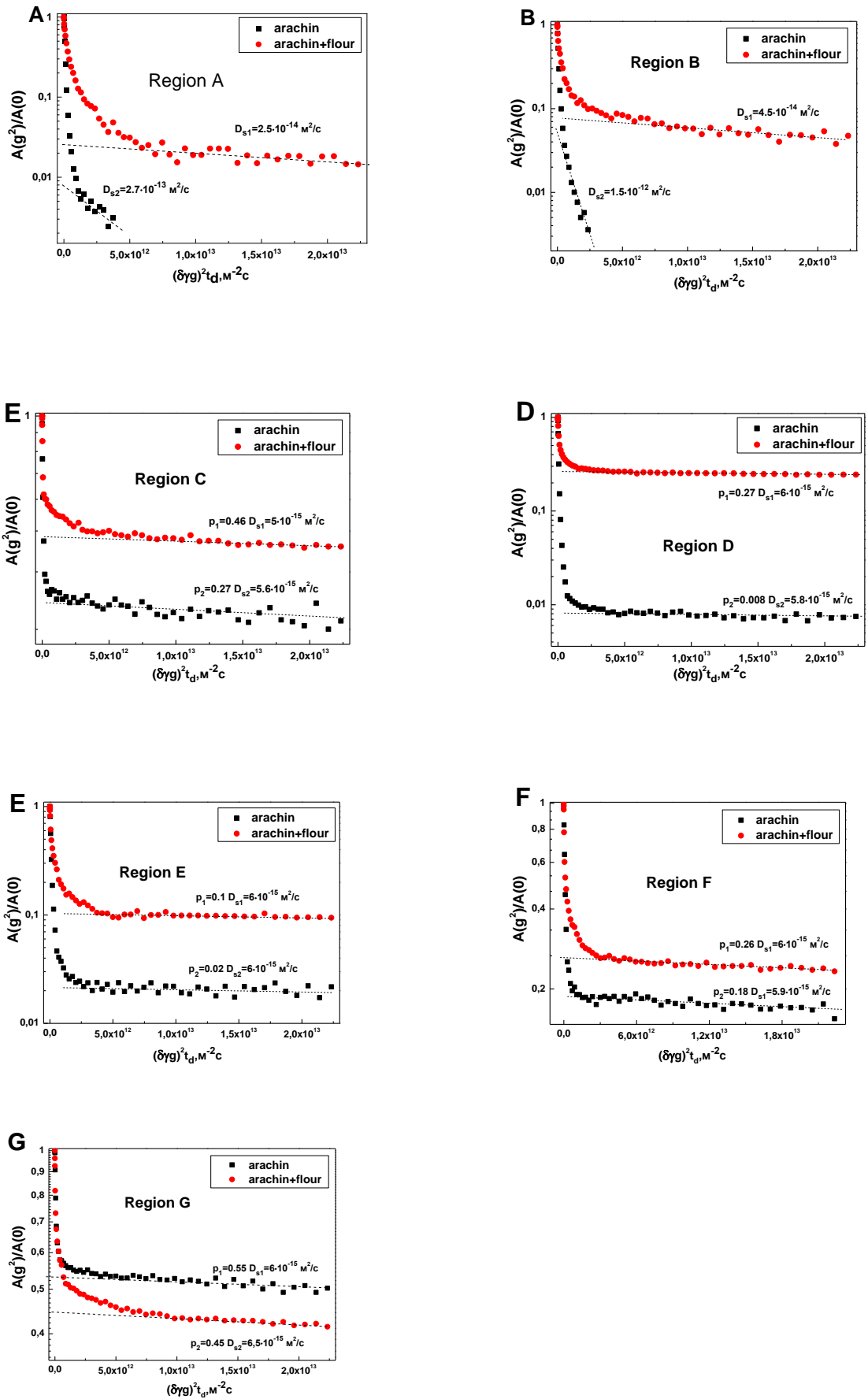


Рис. 3.10 Диффузионные затухания для водных растворов арахина (черный цвет) и арахина

с мукой (красный цвет) с концентрацией 19.5 % полученные при времени диффузии 100 мс для различных областей хим. сдвигов в соответствии с обозначениями, принятыми на рисунке 3.3.

Прежде всего необходимо отметить, что для ДЗ, полученных для сигнала в спектральной области *G*, добавление муки привело к уменьшению доли молекул с минимальным КСД, участвующих в формировании геля. Отметим, что в целом добавление муки приводит к увеличению доли гелевой компоненты по всему спектру химических сдвигов. При этом максимальное увеличение произошло в областях *D* и *E*. При этом для областей *A* и *B*, где ранее для образца арахин+вода гелевой компоненты не обнаруживалось, такая компонента появилась в результате добавления муки. На фоне вышесказанного несколько странным представляется результат диффузионных затуханий для спектральной области *G*. Эффект добавления муки для этой спектральной области оказался обратным, а именно: доля компоненты с минимальным КСД уменьшилась. Это не тривиальный результат, который следует рассматривать как еще один признак сложности исследуемой молекулярной системы, как в части механизмов, происходящих внутри неё, так и, прежде всего, сложности исходного молекулярного состава.

3.6 Исследование особенностей трансляционной подвижности молекул маниоки

В связи с тем, что полученные образцы от коллег из компании «Nutriset group» демонстрируют не только сложный молекулярный состав, но и различное вовлечение молекул в образование гелевой структуры, нами было принято решение об исследовании компонент исходных коммерческих образцов по отдельности. Итак, для начала рассмотрим результаты исследования особенностей трансляционной подвижности молекул маниоки в водном растворе при концентрации 20% (вес.).

На рисунке 3.11 представлена серия протонных спектров ЯМР для образца водного раствора маниоки в зависимости от величины градиента магнитного поля, полученные в результате воздействия на образец последовательности стимулированного эхо.

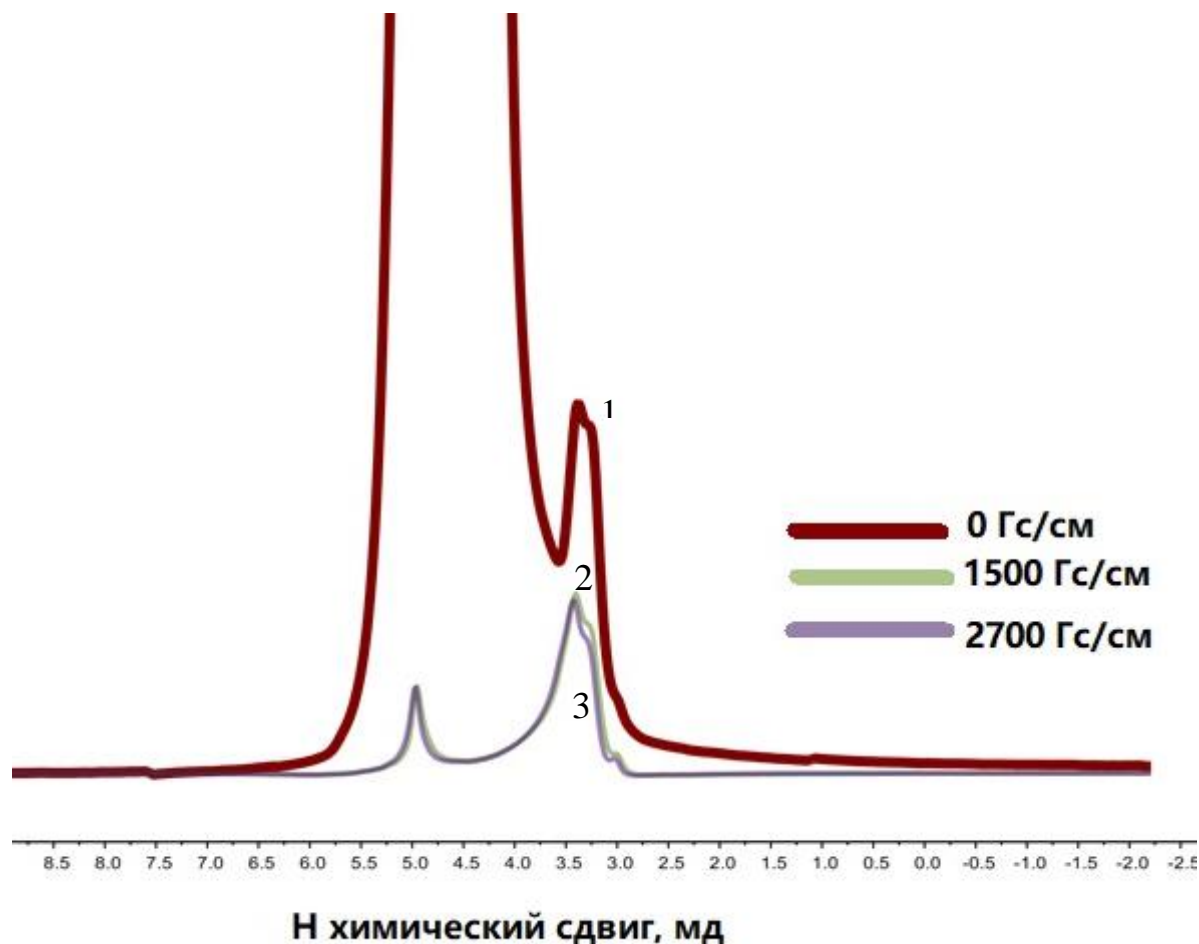


Рис. 3.11 Протонные спектры ЯМР с ИГМП при времени диффузии 100 мс для водного раствора муки маниоки с концентрацией маниоки 20% при различных значениях амплитуды градиента:

1. 0 Гс/см;
2. 1500 Гс/см;
3. 2700 Гс/см;

(с одинаковым вертикальным масштабированием)

Видно, что скорости затухания сигнала ЯМР с ростом амплитуды градиента магнитного поля для всех областей, в отличие от таких же спектров для образцов компании «Nutriset group» представляются одинаковыми. Интенсивный ЯМР сигнал с химическим сдвигом 4.7 м.д., характерный –ОН

группам соответствует молекулам растворителя. Данный факт связан с дейтеро-протонным обменом между молекулами дейтерированной воды и ОН-группами полисахарида, имеющимися в достаточно большом количестве на поверхности молекулы маниоки [47]. Сигналы, находящиеся в области химических сдвигов от 3.07 до 3.6 м.д. обычно относят к протонам, находящимся во внутренней части молекулы полисахарида маниоки [47]. В то же время, при градиентах магнитного поля 1500 Гс/см и больше в спектрах водного раствора маниоки (см. рисунок 3.11) не содержится сигналов от –ОН групп молекул растворителя.

Итак, для более детального анализа трансляционной подвижности молекул водного раствора чистой маниоки мы условно разделили протонный спектр ЯМР на два поддиапазона (области) химических сдвигов, так, как показано на рисунке 3.12.

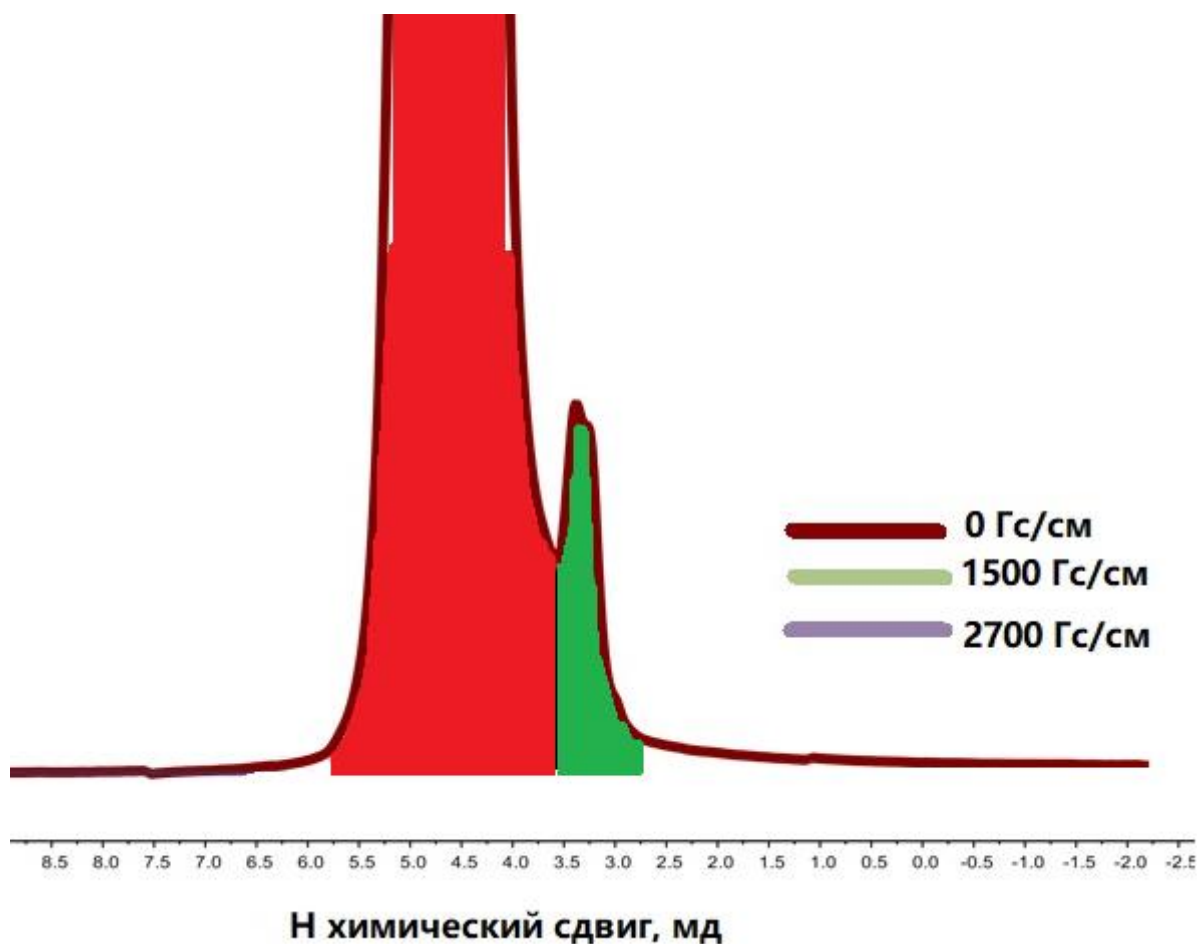


Рис. 3.12 Диапазоны хим. сдвигов, по которым будут определены соответствующие диффузионные затухания на примере спектра спинового эхо 1H для образца водного

раствора муки маниоки с концентрацией муки 20% при нулевом значении градиента.

1. От 2,7 м.д. до 3.5 м.д.
2. От 3,5 м.д. до 5.8 м.д.

На рисунке 3.13 представлены диффузионные затухания, полученные для указанных областей химических сдвигов для водного раствора муки маниоки с концентрацией муки 20%.

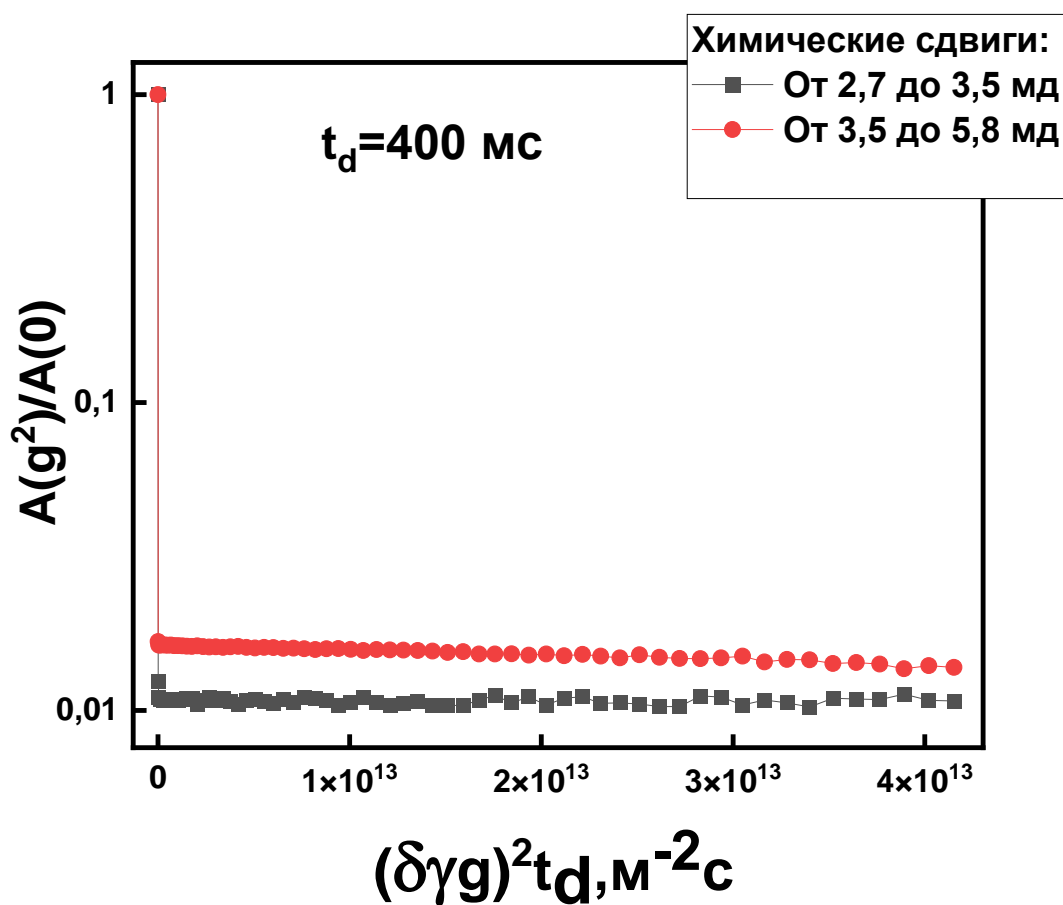


Рис. 3.13 Диффузионные затухания для водного раствора муки маниоки с концентрацией муки 20 % для различных областей хим.сдвигов (Черные – от 2,7 мд до 3.5 мд, красные – от 3,5 мд до 5.8 мд.), полученные в результате применения импульсной последовательности стимулированное эхо при времени диффузии $t_d=400$ мс

Поскольку приоритетной задачей нашего исследования является установление особенностей трансляционной подвижности именно молекул белковой (не водной) части системы вода-арахин-мука, то мы исключили вклад от молекул воды (компонента с КСД $\sim 10^{-9}$ м²/с) из диффузионных затуханий

способом, аналогичным системам арахин-вода и арахин в образцах, предоставленных компанией «Nutriset group». Ниже на рисунке 3.14 представлены диффузионные затухания для указанных областей химических сдвигов для водного раствора муки маниоки с концентрацией муки 20% с исключенным вкладом от молекул воды.

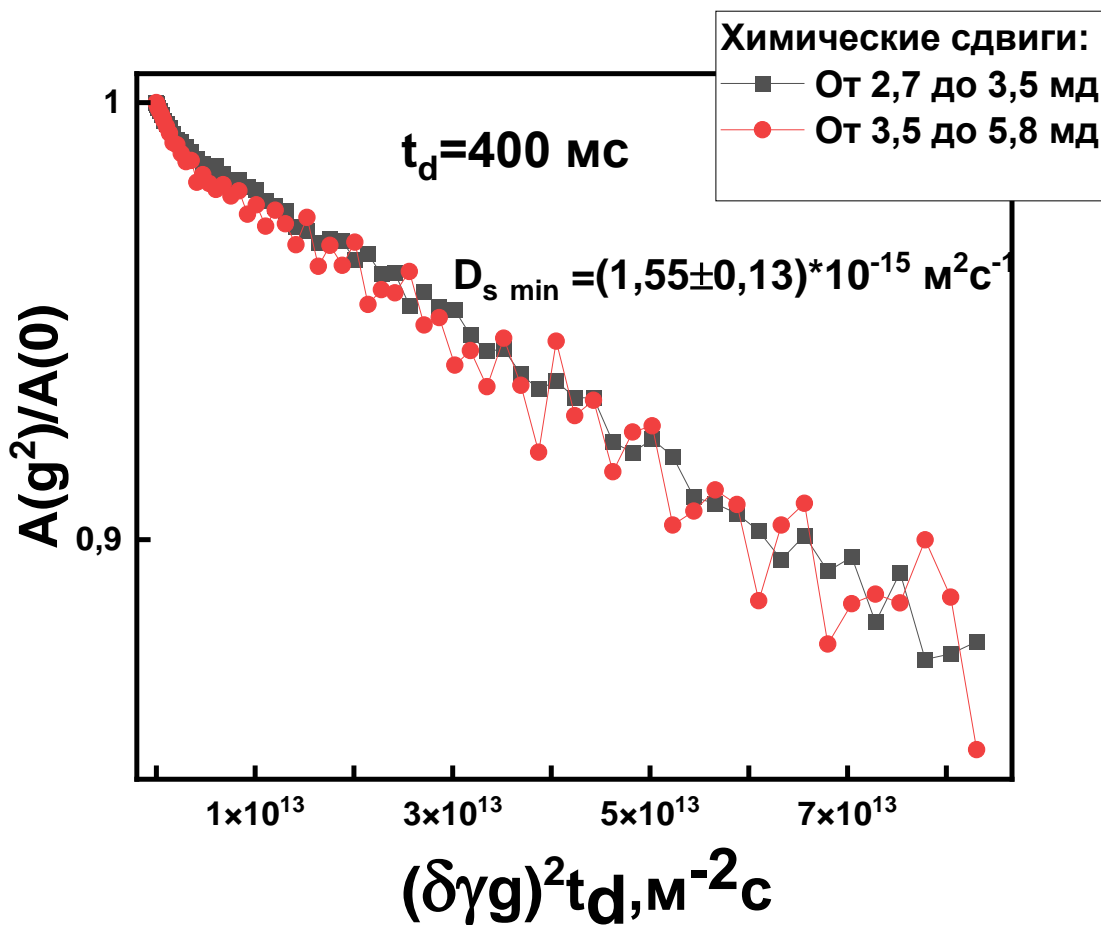


Рис. 3.14 Диффузионные затухания для водного раствора муки маниоки с концентрацией муки 20 % для различных областей хим. сдвигов (Черные – от 2,7 мд до 3.5 мд, красные – от 3,5 мд до 5.8 мд.), полученные в результате применения импульсной последовательности стимулированное эхо при времени диффузии $t_d=400$ мс с вычтенным вкладом воды.

Исходя из приведенных на рисунке 3.14 данных, можно сказать, что диффузионные затухания носят сложный характер и описываются соотношением вида:

$$\langle D_s \rangle = \sum_i p_i D_{si} \quad (3.2)$$

В соответствии с выражением 3.2 диффузионные затухания сигнала спинового эхо для выделенных областей химических сдвигов совпадают и аппроксимируются суммой двух экспонент (3.1):

$$\frac{A(g^2)}{A(0)} = \sum_i p_i \cdot \exp(-\gamma^2 g^2 \delta^2 D_{si} t_d), \quad (3.1)$$

При следующих параметрах: $p_1 = 0.99$, $D_{s1} = (1,55 \pm 0,13) \cdot 10^{-15} \text{ м}^2 \text{с}^{-1}$, $p_2 = 0.01$, $D_{s2} = (5.5 \pm 0,13) \cdot 10^{-13} \text{ м}^2 \text{с}^{-1}$. Таким образом, все молекулы, содержащие различные химические группы в своей структуре (что демонстрирует протонный спектр, представленный на рисунке 3.11) исследуемого водного раствора маниоки характеризуются одинаковой трансляционной подвижностью. Этот экспериментальный факт дает нам возможность предположить, что различное поведение диффузионных затуханий каждой области спектра в системе арахин-мука маниоки-вода в коммерческих образцах обусловлено не наличием в системе молекул маниоки.

Возвращаясь к анализу сложной формы диффузионных затуханий, представленных на рисунке 3.14 стоит отметить, что мы имеем право нашу систему разделить на две компоненты: : $p_1 = 0.99$, $D_{s1} = (1,55 \pm 0,13) \cdot 10^{-15} \text{ м}^2 \text{с}^{-1}$, $p_2 = 0.01$, $D_{s2} = (5.5 \pm 0,13) \cdot 10^{-13} \text{ м}^2 \text{с}^{-1}$, и для порядка 99% молекул наблюдаются признаки гелеобразования. Далее для установления признаков возможно формирующейся надмолекулярной структуры типа трехмерной сетки геля в водном растворе маниоки нами были зарегистрированы диффузионные затухания для образца с мукой маниоки. На рисунке 3.15 представлены диффузионные затухания для образца водного раствора муки маниоки, полученные при разных временах диффузии t_d (50, 200, 400 и 600 мс).

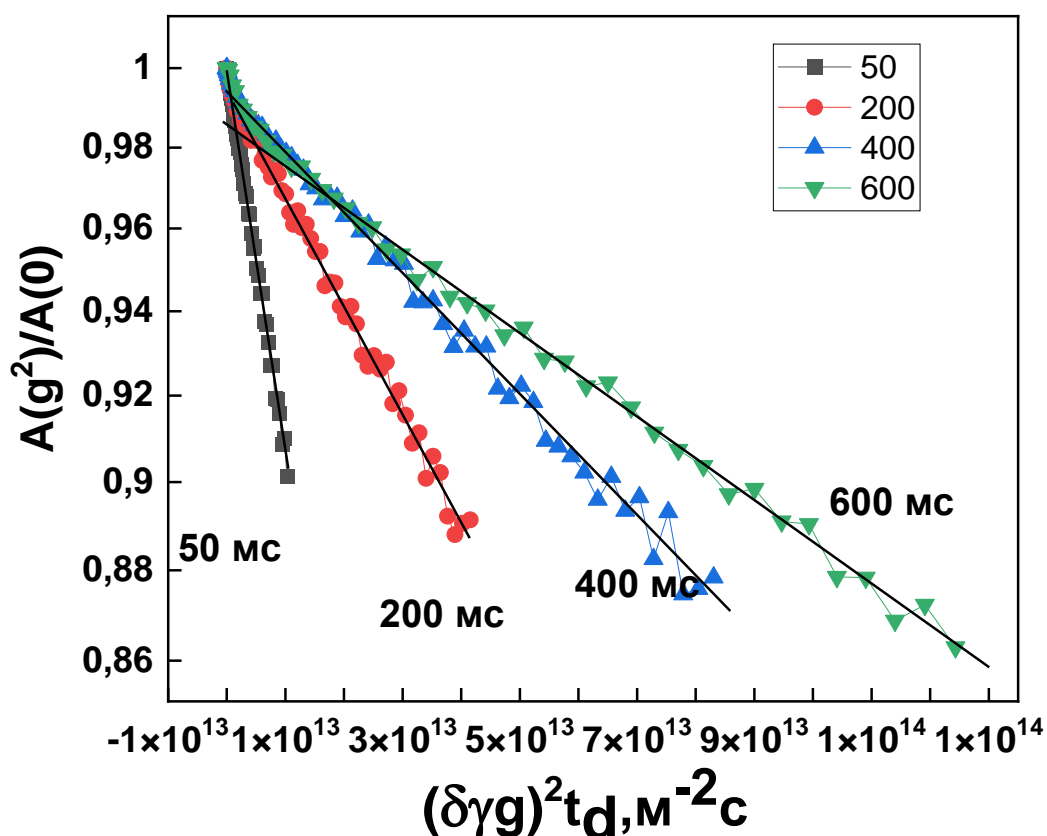


Рис. 3.15 Диффузионные затухания для водных растворов маниоки при концентрации 20 % (вес.) для всей области хим. сдвигов, полученные в результате применения импульсной последовательности стимулированное эхо при разных временах диффузии – 50, 200, 400 и 600 мс.

Исходя из экспериментально полученных диффузионных затуханий, приведенных на рисунке 3.15 видно, что для части молекул при увеличении времени диффузии уменьшается КСД, что в свою очередь является признаком ограниченной диффузии. Этот режим диффузии хорошо отображают диффузионные затухания, представленные в координатах $\lg(A(g^2)/A(0))$ vs $(\delta\gamma g)^2$, удобных для тестирования ограниченной диффузии. В таких координатах выполнение условия (3.4) легко обнаруживается, как было уже сказано в параграфе 3.3, по признаку либо совпадения диффузионных затуханий, измеренных при разных временах диффузии, либо, как минимум, сохранения наклона зависимости.

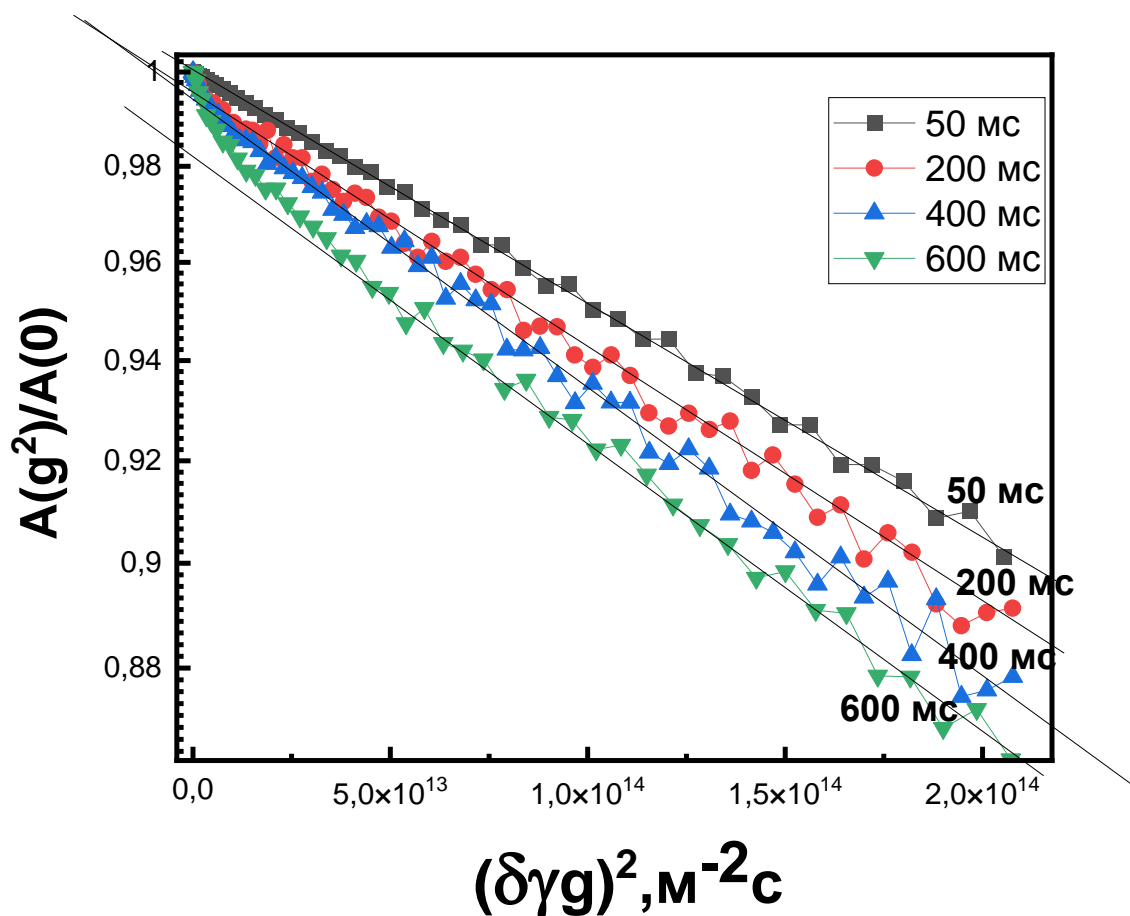


Рис. 3.16 Спектрально разрешенные диффузионные затухания для водных растворов муки маниоки, полученные при временах диффузии t_d 50, 200, 400 и 600 мс.

Как видно из рисунка 3.16, конечные участки диффузионных затуханий, измеренные при разных временах диффузии, сохраняют свой наклон. В связи с тем, что ранее конечные участки диффузионных затуханий мы аппроксимировали согласно выражению 3.3, коэффициентом $D_{s\ min}$, то это означает, что минимальная компонента удовлетворяет условию 3.4а.

Таким образом, в рамках имеющейся погрешности эксперимента для водного раствора муки маниоки мы имеем право утверждать о существовании в диффузионных затуханиях компоненты, удовлетворяющей условию 3.4а. Причем, около 99% молекул маниоки участвует в формировании гелевой структуры. При этом размер ограничений, вычисленный из соотношения 3.5 для системы мука маниоки + вода составляет $\sqrt{\langle r^2 \rangle} \approx 60 \pm 2$ нм.

Итак, представленные на рисунке 3.16 диффузионные затухания сигнала спинового эхо в координатах соответствующих тестированию режима полностью ограниченной диффузии [68, 69]. демонстрируют, что наклон компоненты диффузионного затухания с наименьшим коэффициентом самодиффузии остается постоянным, несмотря на двенадцатикратное изменение времени диффузии t_d . Этот признак однозначно свидетельствует о том, что коэффициент самодиффузии D_{min} обратно пропорционален времени диффузии. а среднеквадратичное смещение молекул арахина остается постоянным $\langle r^2 \rangle \sim t_d^0$ так, как это следует из основного уравнения:

$$D_{min} = \frac{\langle r^2 \rangle}{6t_d} \propto t_d^{-1} \quad (3.6)$$

Подобные эффекты также наблюдались в обоих образцах , предоставленных коллегами из компании «Nutraset group». Наличие такой зависимости позволяет нам утверждать, что в водных растворах муки маниоки наблюдаются процессы гелеобразования.

На рисунке 3.17 показана зависимость вычисленных значений коэффициентов самодиффузии D_{min} от времени диффузии t_d для образца водного раствора муки маниоки, определенная по диффузионным затуханиям.

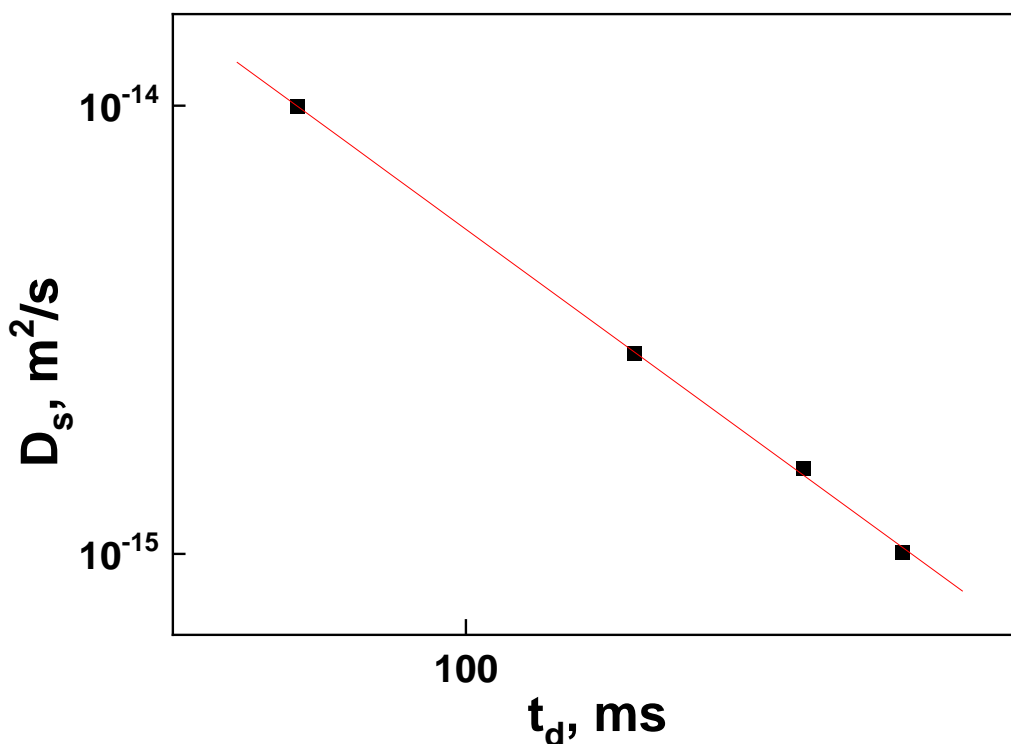


Рис. 3.17 Зависимость значений минимального коэффициента самодиффузии D_{min} от времени диффузии t_d для водного раствора маниоки.

Как видно из рисунка 3.17, полученная экспериментальная зависимость в достаточно большом диапазоне времен вполне удовлетворительно описывается выражением типа $D_{min} \propto t_d^{-1}$ (показано на рисунке прямой). Таким образом, зависимости минимального значения коэффициента самодиффузии от времени диффузии демонстрируют, что молекулы муки маниоки находятся в полностью ограниченном состоянии.

Таким образом, наблюдаемый эффект ограниченной диффузии может быть связан с только с тем, что несколько молекул муки маниоки взаимодействуя друг с другом образуют надмолекулярную структуру, подобную трехмерной сетке геля. При этом, в качестве межмолекулярных связей могут выступать нековалентные взаимодействия (водородные, ионные и другие нековалентные связи) [74].

3.7 Исследование особенностей трансляционной подвижности молекул арахина

Мы выяснили, что неоднозначные результаты исследований коммерческих образцов не связаны со вкладом молекул муки маниоки. В таком случае, остается еще один вариант – причиной различного поведения диффузионных затуханий для каждой из обозначенных в параграфе 3.2 областей химических сдвигов являются молекулы арахина.

Попытаемся разобраться, действительно ли это вклад от молекул арахина. Исследование мы начали с изучения свойств арахина в водном растворе при концентрации 20% (вес.).

На рисунке 3.18 представлена серия спектров ЯМР с ИГМП для образца водного раствора арахина в зависимости от величины градиента магнитного поля.

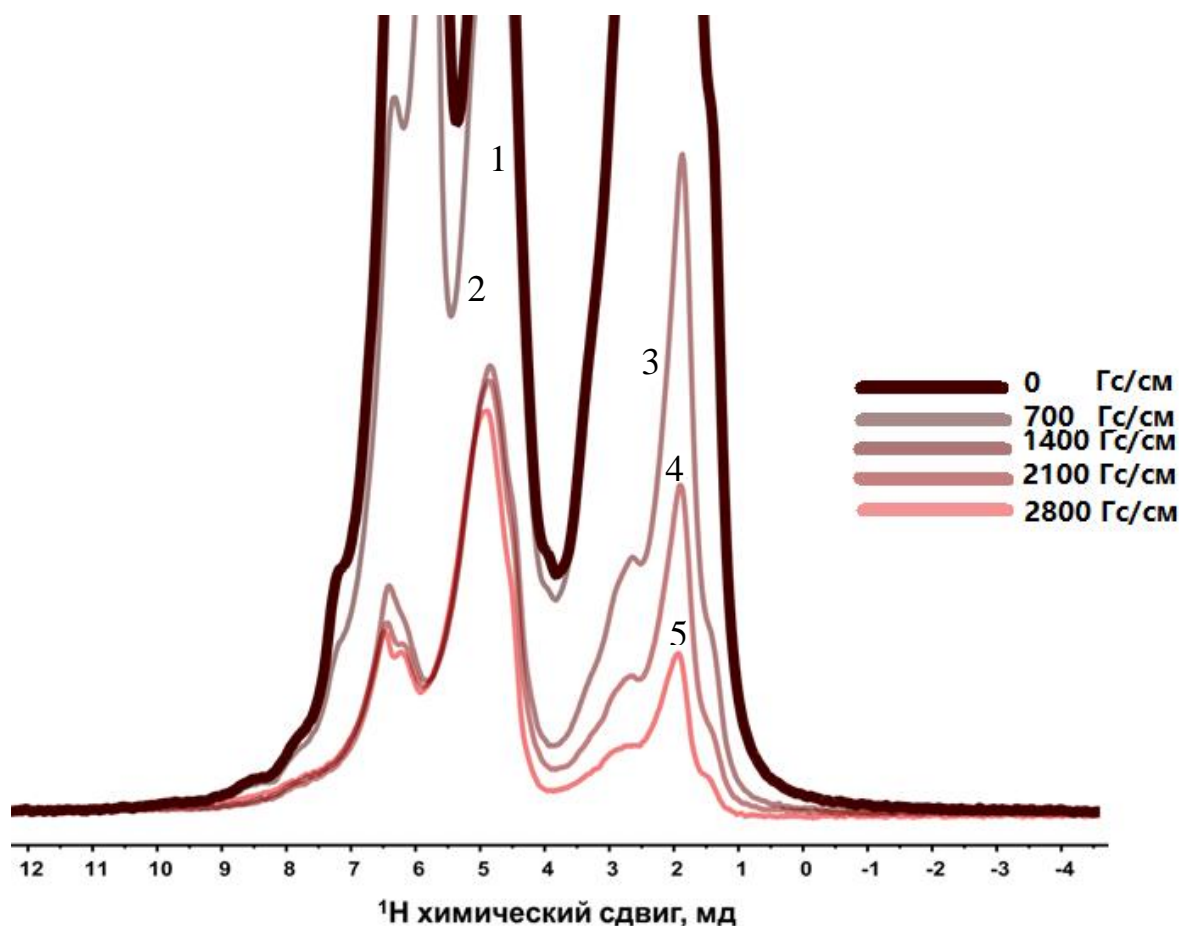


Рис. 3.18 Протонные спектры ЯМР с ИГМП при времени диффузии 100 мс для образца водного раствора арахина при концентрации 20 % (вес.), приготовленного самостоятельно при различных значениях амплитуды градиента:

1. 0 Гс/см;
 2. 700 Гс/см;
 3. 1400 Гс/см;
 4. 2100 Гс/см;
 5. 2800 Гс/см;
- (с одинаковым вертикальным масштабированием)

Видно, что скорости затухания сигнала ЯМР с ростом амплитуды градиента магнитного поля для обеих областей представляются различными, так же, как и для спектров образцов системы арахин-вода, приготовленных в исследовательском центре Tweed. Этот факт свидетельствует о неоднородности исследуемой молекулярной системы как по трансляционной подвижности молекул, так и по их химической структуре.

Важным отличием при сравнении спектров (при нулевом градиенте) водного раствора арахина и водного раствора арахина, приготовленного в исследовательском центре, является отсутствие в спектрах арахина, приготовленного самостоятельно, сигналов А и В (исходя из обозначений, принятых в параграфе 3.2) в области от 7,5 до 9 м.д. Этот факт подтверждает сделанные нами ранее выводы о наличии в образцах, предоставленных нам исследовательским центром Tweed, еще как минимум одной молекулярной компоненты, ответственной за различный вид зависимостей диффузионных затуханий сигнала спинового эхо от разных областей хим. сдвигов.

Тем не менее, для более детального анализа мы разделили весь наблюдаемый спектр ЯМР на два поддиапазона (области) химических сдвигов, так, как показано на рисунке 3.19

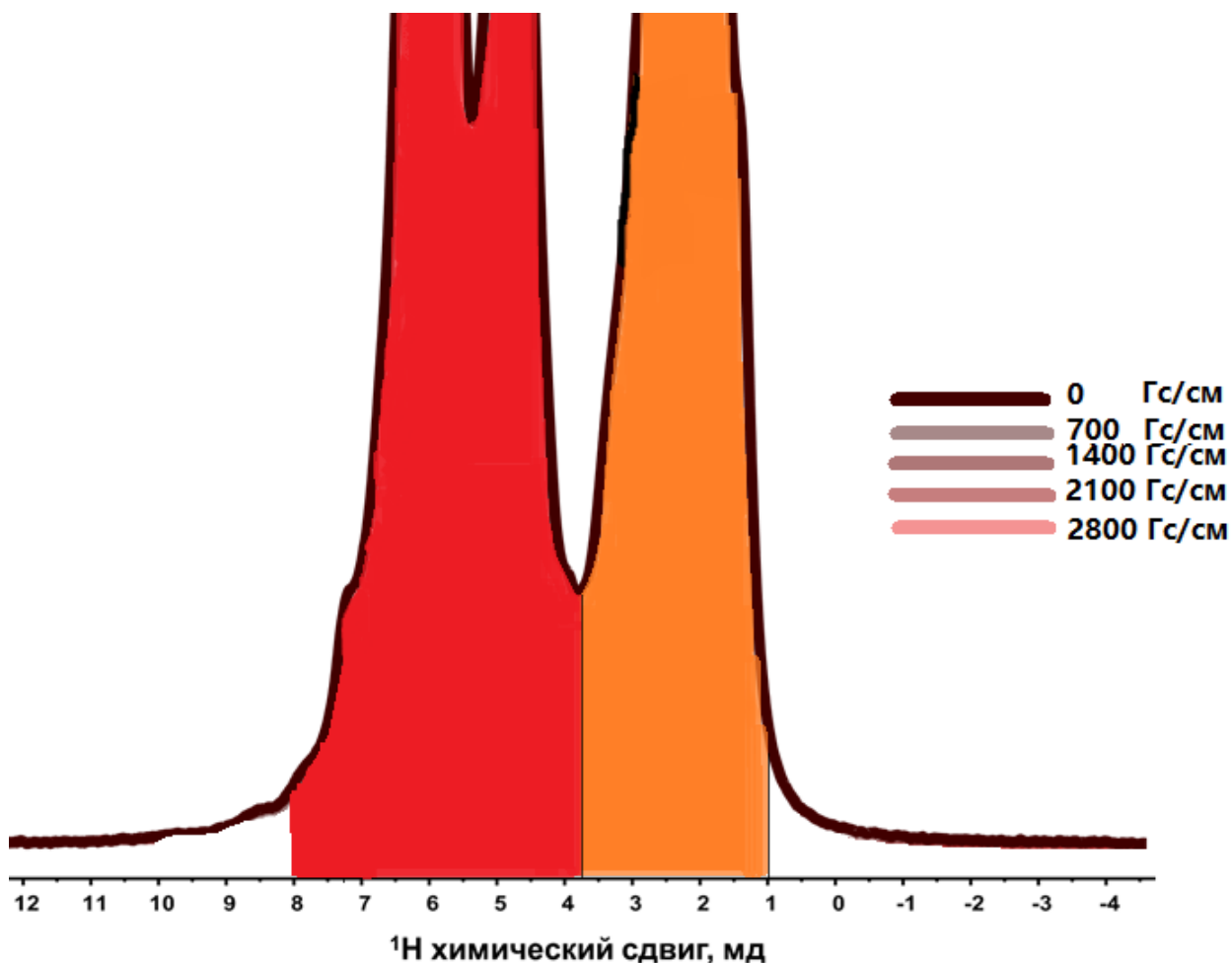


Рис. 3.19 Диапазоны хим. сдвигов, по которым будут определены соответствующие диффузионные затухания на примере спектра спинового эхо ^1H для образца водного раствора арахина с концентрацией 20% при нулевом значении градиента.

1. От 1 м.д. до 3,8 м.д.
2. От 3.8 м.д. до 8 м.д.

На рисунке 3.20 представлены диффузионные затухания, полученные для указанных областей химических сдвигов для не коммерческого образца водного раствора арахина с концентрацией арахина 20%.

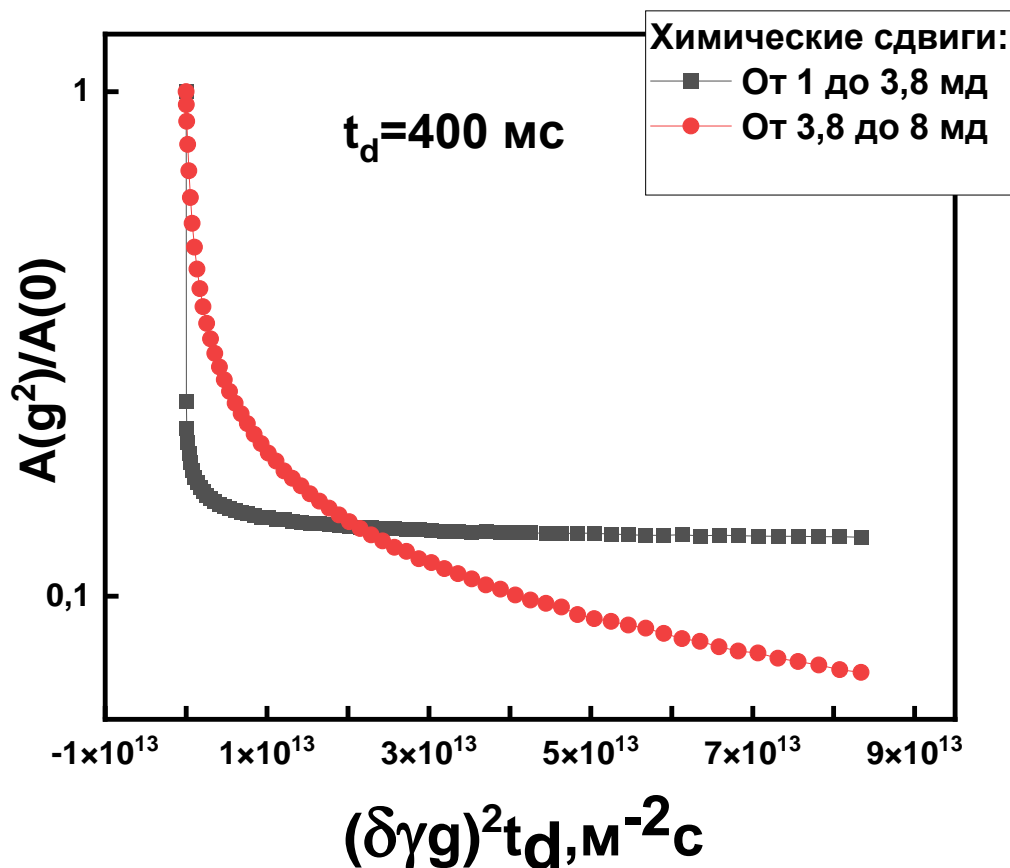


Рис. 3.20 Диффузионные затухания для водного раствора арахина с концентрацией арахина равной 20 % для различных областей хим.сдвигов (Черные – от 1 мд до 3,8 мд, красные – от 3.8, мд до 8 мд.), полученные в результате применения импульсной последовательности стимулированное эхо при времени диффузии $t_d=400$ мс

В связи с тем, что для нас приоритетной задачей является получение информации о трансляционной подвижности молекул белковой (не водной) части системы вода-арахин, то мы исключили вклад диффузионных затуханий таким же способ, как делали это ранее с системами арахин-вода и арахин в образцах наших коллег, а также в самостоятельно приготовленном образце

маниоки. Ниже на рисунке 3.21 представлены нормированные на единицу диффузионные затухания для указанных областей химических сдвигов для некоммерческого водного раствора арахина с концентрацией арахина равной 20% с вычтенным вкладом воды.

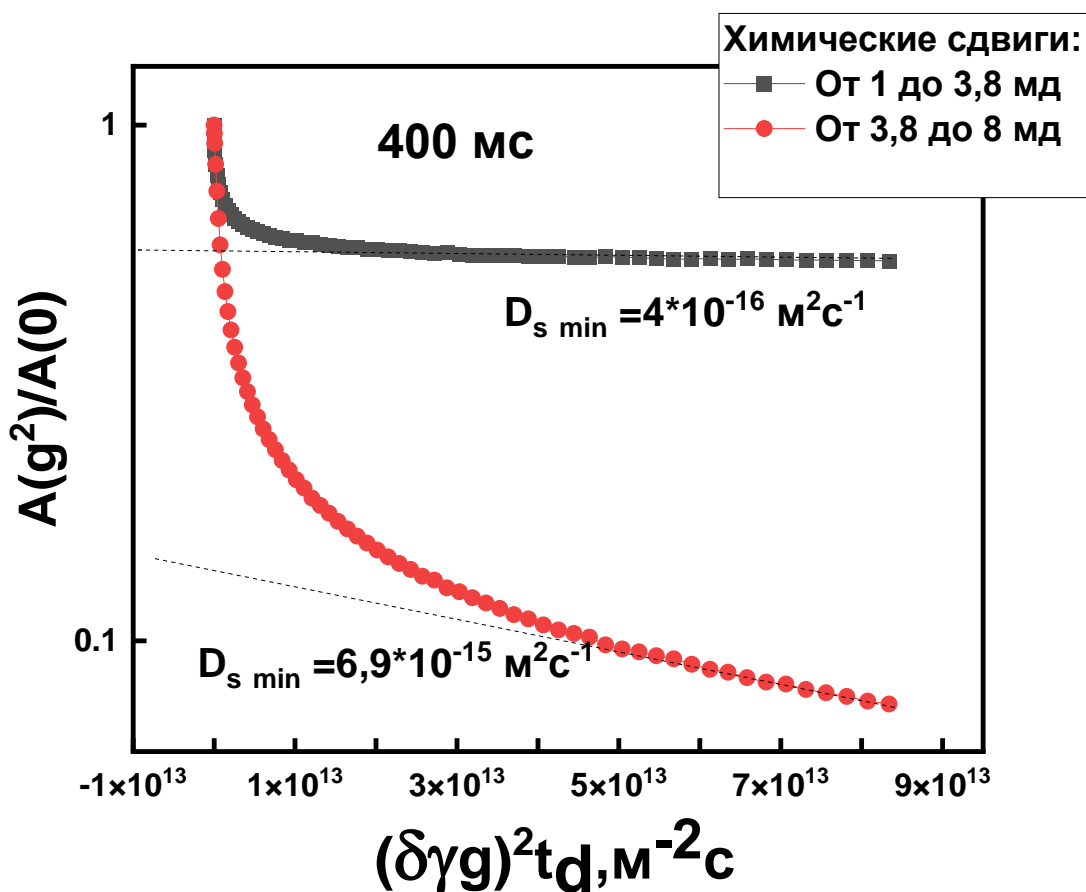


Рис. 3.21 Диффузионные затухания для водного раствора арахина с концентрацией арахина равной 20 % для различных областей хим.сдвигов (Черные – от 1 мд до 3,8 мд, красные – от 3,8 мд до 8 мд.), полученные в результате применения импульсной последовательности стимулированное эхо при времени диффузии $t_d=400$ мс с вычтенным вкладом воды.

Исходя из приведенных данных, можно сказать, что: во-первых, для всех диффузионных затуханий характерно сильная неэкспоненциальность, во-вторых, диффузионные затухания индивидуальны и не совпадают друг с другом. Ранние предположения (параграф 3.2.) касательно различий между регистрируемыми формами диффузионных затуханий для систем водного

раствора арахина и водного раствора арахина с добавлением муки маниоки, предоставленных компанией «Nutriset group», сводились к различным соотношениям между предполагаемой неизвестной компонентой и компонентами белка арахиса - арахина. Для приготовленных нами образцов водного раствора арахина с концентрацией арахина равной 20%, мы выявили отсутствие сигналов А и В (исходя из обозначений, принятых в параграфе 3.2) в области от 7,5 до 9 м.д., сделав вывод о наличии в коммерческих образцах наших коллег какой-то неизвестной нам компоненты. Но в образце арахина, подготовленного нами, данной компоненты нет, тем не менее, диффузионные затухания, полученные от различных областей хим. сдвигов, имеют различный вид.

Если сравнивать семейства диффузионных затуханий, представленные на рисунках 3.20 и 3.21, друг с другом, то можно говорить о том, что исключение водной компоненты привело к несколько разным изменениям формы каждого из диффузионных затуханий, что связано, очевидно, с различным вкладом водной компоненты для разных диапазонов хим. сдвигов.

Мы уже упоминали, что при анализе формы диффузионного затухания многокомпонентных молекулярных системах принято исходить из того, что она может представляться в виде суммы экспоненциальных составляющих, число которых соответствует числу молекулярных компонент с различающимися коэффициентами самодиффузии. Стоит отметить, что диффузионные затухания для обоих выделенных областей аппроксимируются различными минимальных коэффициентом самодиффузии, равным $D_s=(6,9\pm 0,13)\cdot 10^{-15} \text{ м}^2\text{с}^{-1}$ для области спектра от 4 до 7 м.д., и $D_s=(4\pm 0,13)\cdot 10^{-16} \text{ м}^2\text{с}^{-1}$ для области спектра от 1 до 3,5 м.д.

На рисунке 3.22 показаны диффузионные затухания для водного раствора арахина по всему спектру при разных временах диффузии.

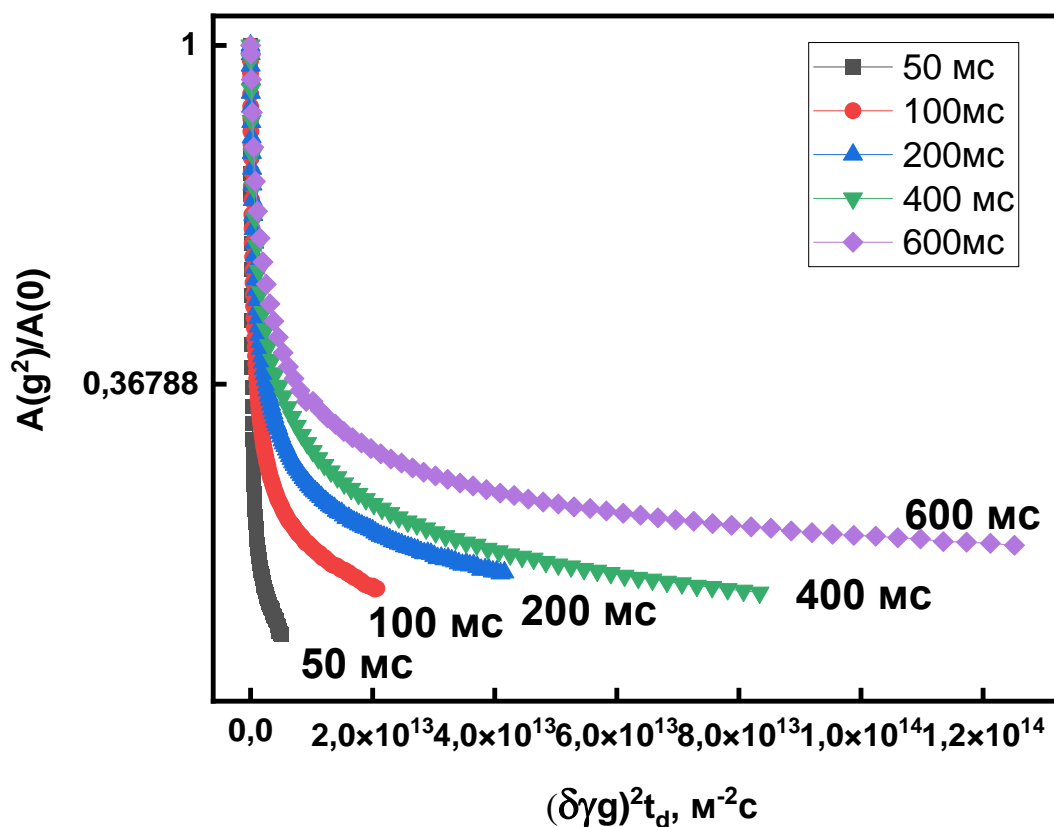


Рис. 3.22 Диффузионные затухания для водного раствора арахина при концентрации 20 % (вес.), полученные в результате применения импульсной последовательности стимулированное эхо при разных временах диффузии (50, 100, 200, 400, 600 мс)

Для установления признаков наличия надмолекулярного образования типа трехмерной сетки геля при помощи метода ЯМР с ИГМП необходимо провести исследование зависимости формы диффузионного затухания от времени диффузии. На рисунке 3.23 представлены диффузионные затухания для некоммерческого образца водного раствора арахина, полученные при разных временах диффузии t_d (50, 200, 400 и 600 мс), но в координатах $\lg(A(g^2)/A(0))$ vs $(\delta\gamma g)^2$, удобных для тестирования ограниченной диффузии. В таких координатах выполнение условия (3.4) легко обнаруживается, как было уже сказано в параграфе 3.3, по признаку либо совпадения диффузионных затуханий, измеренных при разных временах диффузии, либо, как минимум, сохранения наклона зависимости.

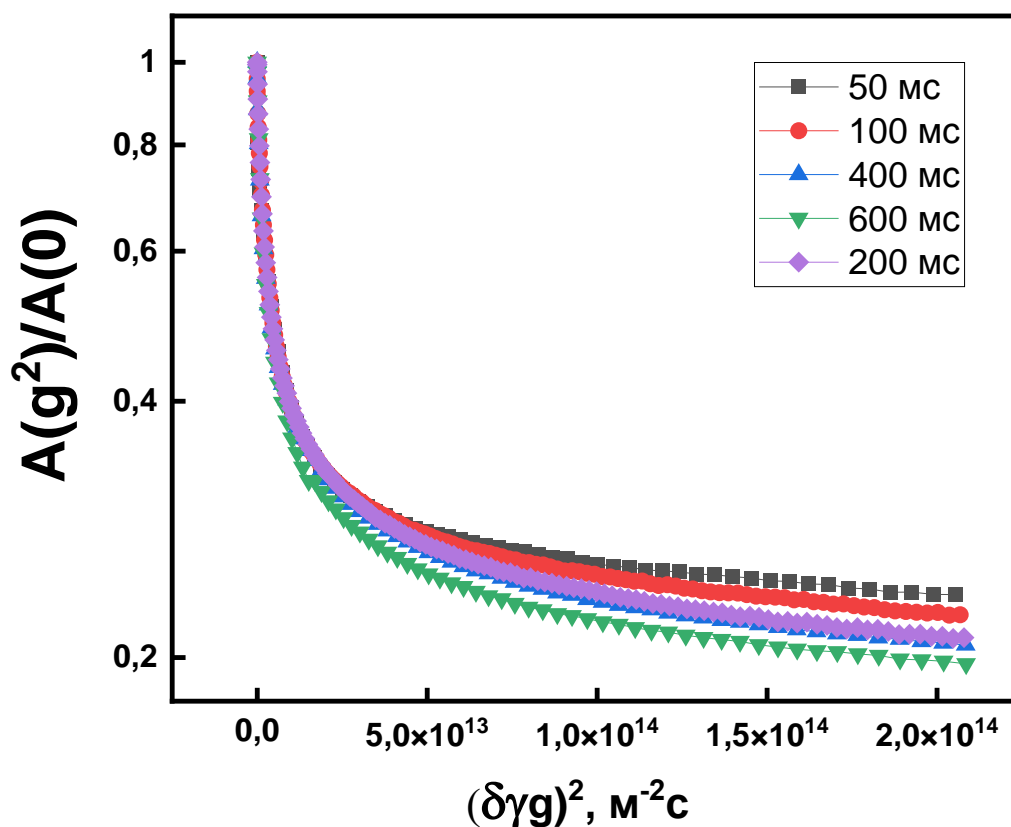


Рис. 3.23 Спектрально разрешенные диффузионные затухания для водного раствора арахина, полученные при временах диффузии t_d 50, 200, 400 и 600 мс, в координатах, удобных для тестирования режима ограниченной самодиффузии.

Как видно из рисунка 3.23, конечные участки диффузионных затуханий, измеренных при разных временах диффузии, сохраняют свой наклон. В связи с тем, что ранее конечные участки диффузионных затуханий мы аппроксимировали согласно выражению 3.3, коэффициентом $D_{s\ min}$, то это означает, что компонента с минимальным КСД удовлетворяет условию 3.4а.

Таким образом, в рамках имеющейся погрешности эксперимента для водного раствора арахина, приготовленного самостоятельно, мы имеем право утверждать о существовании в диффузионных затуханиях компоненты, удовлетворяющей условию 3.4а. По крайней мере часть молекул арахина участвуют в формировании гелевой структуры. При этом размер ограничений,

вычисленный из соотношения 3.5. для системы арахин + вода составляет $\sqrt{\langle r^2 \rangle} \approx 55 \pm 2$ нм.

Итак, представленные на рисунке 3.23 диффузионные затухания сигнала спинового эхо в координатах соответствующих тестированию режима полностью ограниченной диффузии [68, 69] демонстрируют, что наклон компоненты диффузионного затухания с наименьшим коэффициентом самодиффузии остается постоянным, несмотря на двенадцатикратное изменение времени диффузии t_d . Этот признак однозначно свидетельствует о том, что коэффициент самодиффузии D_{min} обратно пропорционален времени диффузии. а среднеквадратичное смещение молекул арахина остается постоянным $\langle r^2 \rangle \sim t_d^0$ так, как это следует из основного уравнения(3.6). Подобные эффекты также наблюдались в образцах наших коллег из компании «Nutriset group», а также в некоммерческом образце водного раствора муки маниоки. Наличие такой зависимости позволяет нам утверждать, что в водных растворах арахина наблюдаются процессы гелеобразования.

На рисунке 3.24 показана зависимость вычисленных значений коэффициентов самодиффузии D_{min} от времени диффузии t_d для образца водного раствора арахина, определенная по диффузионным затуханиям.

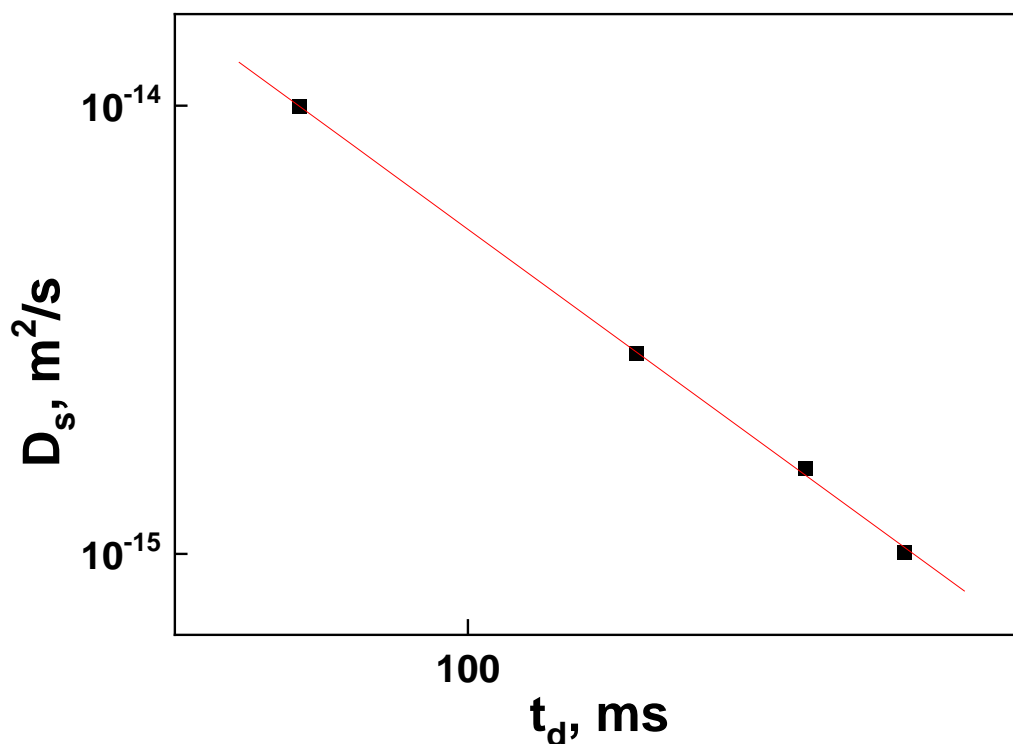


Рис. 3.24 Зависимость значений минимального коэффициента самодиффузии D_{min} от времени диффузии t_d по диффузионным затуханиям, полученным по всему спектру для водного раствора арахина с концентрацией арахина равной 20%.

Как видно из рисунка 3.24, полученная экспериментальная зависимость в достаточно большом диапазоне времен вполне удовлетворительно описывается выражением типа $D_{min} \propto t_d^{-1}$ (показано на рисунке прямой). Таким образом, зависимости минимального значения коэффициента самодиффузии от времени диффузии демонстрируют, что молекулы арахина в нашем образце находятся в полностью ограниченном состоянии.

ВЫВОДЫ

По результатам исследования коммерческих образцов пищевых продуктов приготовленных на основе арахина и смеси арахина с мукой маниоки в водной среде, предоставленных фирмой «Nutrisset group», специализирующейся в области разработки продуктов питания для стран Африки, а также образцов арахина и муки маниоки, приготовленных самостоятельно, установлено следующее:

1. Коммерческие образцы пищевых продуктов обладают сложным молекулярным составом, что проявляется не только в виде спектра ЯМР ВР, но и, как оказалось, в том, что для каждой области хим. сдвигов в этих спектрах регистрируются различающиеся между собой диффузионные затухания сигнала спинового эхо.

2. На основании анализа диффузионных затуханий, в том числе детального анализа зависимости от времени диффузии, показано, что в этих системах формируется не менее сложная надмолекулярная структура, характеризующаяся признаками геля, с характерным расстоянием между узлами сетки геля порядка 60 нм.

3. Для пищевого продукта на основе арахина, так же как и для образца, самостоятельно приготовленного, доля молекул в состоянии геля не превышает 30% и уверенно регистрируются признаки обмена между молекулами, находящимися в структуре геля и в свободном состоянии. В то же время в водных растворах муки маниоки надмолекулярную структуру типа геля образуют практически все молекулы (~99%) .

3. Детальный анализ всего комплекса полученных результатов дает основание утверждать, что наличие муки маниоки увеличивает в пищевом продукте долю гелевой структуры не только за счет своего присутствия, но и за счет дополнительного структурообразующего эффекта в арахиновой компоненте.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Giovannucci, D. Food and Agriculture: the future of sustainability / D. Giovannucci, S. J. Scherr, D. Nierenberg, C. Hebebrand, J. Shapiro, J. Milder, K. Wheeler // The sustainable development in the 21st century (SD21) Report for Rio. – 2012. – V. 20.
2. Henchion, M. Future protein supply and demand: strategies and factors influencing a sustainable equilibrium / M. Henchion, M. Hayes, A.M. Mullen, M. Fenelon, B. Tiwari // Foods. – 2017. – V. 6, № 7. – P. 53.
3. Покровский, А. А. Роль биохимии в развитии науки о питании: Некоторые закономерности ассимиляции пищевых веществ на уровне клетки и целостного организма / А.А. Покровский. – Москва: Наука, 1974. – 127 с.
4. Black, M. Seed Technology and its Biological Basis / M. Black, J. D. Bewley // Sheffield Academic Press, UK and CRC Press, Florida, 2000. – 419 p.
5. Yang, H. Effects of starch properties and thermal-processing conditions on surimi–starch gels / H. Yang, J.W. Park // LWT-Food Science and Technology. – 1998. – V. 31. – №. 4. –P. 344-353.
6. Jimsheena, V. K. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from arachin by simulated gastric digestion / V. K. Jimsheena, L. R. Gowda // Food chemistry. – 2011. – V. 125, № 2. – P. 561-569.
7. Yu, J. Peanut protein concentrate: Production and functional properties as affected by processing / J. Yu, M. Ahmedna, I. Goktepe // Food chemistry. – 2007. – V. 103, № 1. – P. 121-129.
8. Kritchevsky, D. Atherogenicity of animal and vegetable protein: influence of the lysine to arginine ratio / D. Kritchevsky, S.A. Tepper, S.K. Czarnecki, D.M. Klurfeld // Atherosclerosis. – 1982. – V. 41, № 2. – P. 429-431.
9. Jimsheena, V. K. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from arachin by simulated gastric digestion / V. K. Jimsheena, L. R. Gowda // Food chemistry. – 2011. – V. 125, № 2. – P. 561-569.

10. Suknark, K. Physical properties of directly expanded extrudates formulated from partially defatted peanut flour and different types of starch / K. Suknark, R. D. Phillips, M. S. Chinnan //Food Research International. – 1997. – V. 30, № 8. – P. 575-583.
11. Hoffpauir, C. L. Peanut composition, relation to processing and utilization / C. L Hoffpauir, //Journal of agricultural and food chemistry. – 1953. – V. 1, № 10. – P. 668-671.
12. Basha, S.M.M. Changes in free amino acids, carbohydrates, and protein of maturing seeds from various peanut (*arachis hypogaea* L.) cultivars / J.P. Cherry; C.T. Young – 1976. – V.53. – P.586–597.
13. Neucere, N. J. Isolation of α -arachin, the major peanut globulin / N. J. Neucere //Analytical biochemistry. – 1969. – V. 27, № 1. – P. 15-24.
14. Krishna, T. G Variation and inheritance of the arachin polypeptides of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) / T. G. Krishna, S. E. Pawar, R. Mitra //Theoretical and applied genetics. – 1986. – V. 73, № 1. – P. 82-87.
15. Yamada, T. Dissociation-association behavior of arachin between dimeric and monomeric forms / T. Yamada, S. Aibara, Y. Morita //Agricultural and biological chemistry. – 1979. – V. 43, № 12. – P. 2549-2556.
16. Johnson, P. The globulins of the ground nut (*Arachis Hypogaea*): I. Investigation of arachin as a dissociation system / P. Johnson, E. M. Shooter //Biochimica et biophysica acta. – 1950. – V. 5. – P. 361-375.
17. Cater, C. W. The arachin molecule / C.W Cater, W.E.F Naismith, R.H.K Thomson, G.R. Ure //Nature. – 1957. – V. 180. – №. 4593. – P. 971-973.
18. Tombs, M. P. An electrophoretic investigation of groundnut proteins: the structure of Arachins A and B / M. P. Tombs //Biochemical Journal. – 1965. – V. 96, № 1. – P. 119.
19. Dawson, R. Comparison of fractionation of groundnut proteins by two different methods / R. Dawson //Analytical biochemistry. – 1971. – V. 41, № 2. – P. 305-313.

20. Shetty, K. J. Studies on groundnut proteins. III. Physicochemical properties of arachin prepared by different methods / K. J. Shetty, M. S. N. Rao // *Analytical biochemistry*. – 1974. – V. 62, № 1. – P. 108-120.
21. Shetty, K. J. Studies on groundnut proteins V. Physico-chemical properties of arachin prepared by different methods / K. J. Shetty, M. S. N. Rao // *Analytical biochemistry*. – 1976. – V. 73, № 2. – P. 458-470.
22. Ferry, J. D. Protein gels / J. D. Ferry // *Advances in protein chemistry*. – Academic Press, 1948. – V. 4. – P. 1-78.
23. Bello, J. The mechanism of gelation of gelatin the influence of pH, concentration, time and dilute electrolyte on the gelation of gelatin and modified gelatins / J. Bello, H. R. Bello, J. R. Vinograd // *Biochimica et biophysica acta*. – 1962. – V. 57, № 1. – P. 214-221.
24. Harrington, W. F. Formation and stabilization of the collagen-fold / W. F. Harrington, P. H. von Hippel // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 1961. – V. 92, № 1. – P. 100-113.
25. Doolittle, R. F. Structural aspects of the fibrinogen to fibrin conversion / R. F. Doolittle, // *Advances in protein chemistry*. – Academic Press, 1973. – V. 27. – P. 1-109.
26. Catsimpoolas, N. Gelation phenomena of soybean globulins. I. Protein-protein interactions / N. Catsimpoolas, E. W. Meyer // *Unknown*. – 1970. – V. 47. – P. 559-570.
27. Catsimpoolas, N. Gelation phenomena of soybean globulins. II. Protein-water miscible solvent interactions / N. Catsimpoolas, E. W. Meyer // *Cereal chemistry*. – 1971.
28. Kumar, K. D. N. Reversible gelation of arachin / K. D. N. Kumar, P. K. Nandi, M. S. N. RAO // *International journal of peptide and protein research*. – 1980. – V. 15. – № 1. – P. 67-72.
29. Joshi, M. Rheological and microstructural characteristics of lentil starch–lentil protein composite pastes and gels / M. Joshi, P. Aldred, J.F. Panozzo, S. Kasapis, B. Adhikari // *Food Hydrocolloids*. – 2014. – V. 35. – P. 226-237.

30. Couso, I. Morphology of starch in surimi gels / I. Couso, C. Alvarez, M. T. Solas, C. Barba, M. Tejada // *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*. – 1998. – V. 206, № 1. – P. 38-43.
31. Singh, N. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources / N. Singh, J. Singh, L. Kaur, N.S. Sodhi, B.S. Gill // *Food chemistry*. – 2003. – V. 81, № 2. – P. 219-231.
32. Yuan, Y. Physicochemical properties of starch obtained from *Dioscorea nipponica* Makino comparison with other tuber starches / Y. Yuan, L. Zhang, Y. Dai, J. Yu // *Journal of food engineering*. – 2007. – V. 82. – №. 4. – P. 436-442.
33. Alcázar-Alay, S. C. Physicochemical properties, modifications and applications of starches from different botanical sources / S. C. Alcázar-Alay, M. A. A. Meireles // *Food Science and Technology*. – 2015. – V. 35, № 2. – P. 215-236.
34. Rahn, C. R. A study of the quality factors affecting the short-term decomposition of field vegetable residues / C. R. Rahn, R. D. Lillywhite // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. – 2002. – V. 82, № 1. – P. 19-26.
35. Draget, K. I. Food polysaccharides and their applications / R.M. Hassan, K.S. Khairou, A.M. Awad // CRC Press, Boca Raton. – 2006. – P. 289-234.
36. Eliasson A. C. Starch: Physicochemical and Functional Aspects / A. C. Eliasson, M. Gudmundsson. – *Carbohydrates in Food*. – 2006. – V. 159. – 391 p.
37. Magnin, D. Interactions between polysaccharides and polypeptides / D. Magnin, S. Dumitriu // *Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility*. – 2005. – P. 305-306.
38. Imeson, A. Thickening and Gelling Agents for Food. Blackie Academic & Professional / A. Imeson. – London. – 1992. – P.98-123.

39. Phillips, G. O. Use and technology of exudate gums from tropical sources / G.O. Phillips, G. Pass, M. Jeffries //Gelling and thickening agents in foods. – 1980. – P. 135-161.
40. Bemiller, J. N. Structure- property correlations of non- starch food polysaccharides / J. N. Bemiller, //Macromolecular Symposia. – Weinheim, Germany : WILEY- VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 1999. – V. 140. – №. 1. – P. 1-15.
41. Hoppe, C. A. Unique properties of high viscosity gums / C. A. Hoppe, A. Goswami //Macromolecular Symposia. – Weinheim, Germany : WILEY- VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 1999. – V. 140, № 1. – P. 93-96.
42. Rinaudo, M. Relation between the molecular structure of some polysaccharides and original properties in sol and gel states / M. Rinaudo // Food Hydrocolloids. – 2001. – V. 15, № 4-6. – P. 433-440.
43. Cheng, H. N. Rheology of carboxymethylcellulose made from bacterial cellulose / H. N. Cheng, M. Takai, E. A. Ekong //Macromolecular Symposia. – Weinheim, Germany : WILEYVCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 1999. – V. 140, № 1. – P. 145-153.
44. Wu, M. Effect of typical starch on the rheological properties and NMR characterization of myofibrillar protein gel / W. Mangang, W. Jiahao, H. Juan, L. Zhikun, L. Rui, L. Yang, C. Yan, G. Qingfeng, Y. Hai //Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2020. – V. 100, № 1. – P. 258-267.
45. Waterschoot, J. Production, structure, physicochemical and functional properties of maize, cassava, wheat, potato and rice starches / J. Waterschoot, S.V. Gomand, E. Fierens, J. A. Delcour //Starch. – 2015. – V. 67, № 1-2. – P. 14-29.
46. Echebiri, R. N. Production and utilization of cassava in Nigeria: prospects for food security and infant nutrition / R. N. Echebiri, M. E. I. Edaba //PAT. – 2008. – V. 4, № 1. – P. 38-52.

47. Waterschoot J. et al. Production, structure, physicochemical and functional properties of maize, cassava, wheat, potato and rice starches //Starch- Stärke. – 2015. – Vol. 67. – №. 1-2. – C. 14-29.
48. Lebot, V. Tropical Root and Tuber Crops Cassava, Sweet Potato, Yams and Aroids Crop Production Science in Horticulture Vol. 17 / V. Lebot //Wallingford, CT: CABI. – 2009.
49. International Institute of Tropical Agriculture. Cassava in tropical Africa [Text]: a reference manual. – IITA, 1990. – 176 p.
50. Ponzio, N. R., Mixtures of two Argentinean wheat cultivars of different quality: a study on breadmaking performance / N. R. Ponzio, M. C. Puppo, C. Ferrero //Cereal chemistry. – 2008. – V. 85, № 5. – P. 579-585.
51. Linlaud, N. E. Effect of hydrocolloids on water absorption of wheat flour and farinograph and textural characteristics of dough / N. E. Linlaud, M. C. Puppo, C. Ferrero //Cereal chemistry. – 2009. – V. 86, № 4. – P. 376-382.
52. Hatcher, D. W. Flour particle size, starch damage, and alkali reagent: impact on uniaxial stress relaxation parameters of yellow alkaline noodles / D. W. Hatcher, G. G. Bellido, M. J. Anderson //Cereal chemistry. – 2009. – V. 86, № 3. – P. 361-368.
53. Tchoumboue, J. Comparative studies on the influence of supplementation with two legumes (*Arachis glabrata* Benth and *Desmodium intortum*) on the reproductive and growth performance of guinea pigs (*Cavia porcellus* L.) / J. Tchoumboue, A. T. Niba, G. Kenfack //Bull Anim Health Prod Afr. – 2001. – V. 49. – P. 74-83.
54. Oladunmoye, O. O. Evaluation of some physical–chemical properties of wheat, cassava, maize and cowpea flours for bread making / O. O. Oladunmoye, R. Akinoso, A. A. Olapade //Journal of Food Quality. – 2010. – V. 33, №. 6. – P. 693-708.
55. Cheng, H. N. Solution NMR spectroscopy of food polysaccharides / H. N. Cheng, T. G. Neiss // Journal Polymer Reviews. – 2012. – V. 52. – P.81-114.

- 56.Фаррар, Т. Импульсная и Фурье-спектроскопия ЯМР / Фаррар Т. Беккер Э. – Москва: Мир. – 1973. – 167 с.
- 57.Маклаков, А. И. Самодиффузия в растворах и расплавах полимеров / А.И. Маклаков, В.Д. Скирда, Н.Ф. Фаткуллин. – Казань: Изд-во Казанского ун-та, 1987. – 225 с.
- 58.Васина, Е. Н. Самодиффузия в регулярных пористых системах методом ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля : учебное пособие/ Е.Н. Васина, В.Д. Скирда, В.И. Волков. – Казань, 2000. – 50 с.
- 59.Скирда, В.Д. Развитие градиентного ЯМР в исследованиях структуры и динамики сложных молекулярных систем / В.Д. Скирда, А.И. Маклаков, Г.Г. Пименов, Н.Ф. Фаткуллин, В.А. Севрюгин, Н.К. Двояшкин, А.В. Филиппов, Г.И. Васильев // Электронный журнал «Структура и динамика молекулярных систем. – 2008. – №. 2. – С. 1-118.
- 60.Dieckert, J. W. Composition of Some Subcellular Fractions from Seeds of *Arachis hypogaea* a / J. W. Dieckert, J. E. Snowden JR, A. T. Moore, D. C. Heinzelman, A. M. Altschul //Journal of Food Science. – 1962. – V. 27, № 3. – P. 321-325.
- 61.Basha, S. M. M. Identification of cultivar differences in seed polypeptide composition of peanuts (*Arachis hypogaea* L.) by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis / S. M. M. Basha //Plant Physiology. – 1979. – V. 63, № 2. – P. 301-306.
- 62.Wang L. Protein contents in different peanut varieties and their relationship to gel property / L. Wang, H. Liu, L. Liu, Q. Wang, Q. Li, Y. Du, J. Zhang //International journal of food properties. – 2014. – V. 17, № 7. – P. 1560-1576.
- 63.Nilsson G. S. Determination of the Degree of Branching in Normal and Amylopectin Type Potato Starch with ¹H NMR Spectroscopy Improved resolution and two- dimensional spectroscopy / G.S. Nilsson, L. Gorton, K.E. Bergquist, U. Nilsson //Starch- Stärke. – 1996. – V. 48, № 10. – P. 352-357.

64. Shih F. F. Gelatinization and pasting properties of rice starch modified with 2-octenylsuccinic anhydride / F. F. Shih, K. W. Daigle // *Food/Nahrung*. – 2003. – V. 47, № 1. – P. 64-67.
65. Won C. Structural and rheological properties of potato starch affected by degree of substitution by octenyl succinic anhydride / C. Won, Y. Jin, M. Kim, Y. Lee, Y. H. Chang // *International journal of food properties*. – 2017. – V. 20. – №. 12. – P. 3076-3089.
66. Skirda V. D. Translational Mobility of Macromolecules in Networks / V.D. Skirda, I.R. Gafurov, A.I. Maklakov, M.M. Doroginskii // *Vysokomol. Soedin., Kratk. Soobshcheniya*. – 1988. – V. 30, № 4. – P. 313-314.
67. Gafurov I. R. NMR study of the structure of aqueous gelatine gels and the process of their formation / I.R. Gafurov, V.D. Skirda, A.I. Maklakov, S.P. Perevezentseva, Y. A. Zimkin // *Polymer Science USSR*. – 1989. – V. 31, № 2. – P. 292-300.
68. Gafurov I. R. Self-diffusion and gelation in benzyl alcohol solutions of cellulose triacetate / I.R. Gafurov, V.D. Skirda, A.I. Maklakov, I.I. Ryskina // *Polymer Science USSR*. – 1988. – V. 30, № 7. – P. 1639-1644.
69. Skirda V. D. Detection of spatial fluctuations of segments in swollen polybutadiene networks by nuclear magnetic resonance pulsed field gradient technique / V. D. Skirda, M. M. Doroginikij, V. I. Sundukov, A. I. Maklakov, G. Fleischer, K. Georg Häusler, E. Straube // *Die Makromolekulare Chemie, Rapid Communications*. – 1988. – V. 9, № 9. – P. 603-607.
70. Price, W. S. *NMR Studies of Translational Motion* / W. S. Price // Cambridge University Press: Cambridge, U.K. – 2009. – 393 p.
71. Melnikova, D.L. Effect of Intrinsic Disorder and Self-Association on the Translational Diffusion of Proteins: The Case of α -Casein / D.L. Melnikova, V.D. Skirda, I.V. Nesmelova // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2017. – V. 121, № 14. – P. 2980-2988.

72. Kella, N. K. D. Sugars decrease the thermal denaturation and aggregation of arachin / N. K. D. Kella I. Poola //International Journal of Peptide and Protein Research. – 1985. – V. 26, № 4. – P. 390-399.
73. Kella, N. K. D. Heat-induced reversible gelation of arachin: kinetics, thermodynamics and protein species involved in the process / N. K. D. Kella //International journal of biological macromolecules. – 1989. – V. 11, № 2. – P. 105-112.
74. van de Velde, F. Protein-polysaccharide interactions to alter texture / F. van de Velde, E.H.A. de Hoog, A. Oosterveld, R. H. Tromp //Annual review of food science and technology. – 2015. – V. 6. – P. 371-388.
75. Evans, M. Emulsion stabilisation using polysaccharide–protein complexes / M. Evans, I. Ratcliffe, P. A. Williams //Current Opinion in Colloid & Interface Science. – 2013. – V. 18, № 4. – P. 272-282.
76. Schmitt C. Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review / C. Schmitt, C. Sanchez, S. Desobry-Banon, J. Hardy //Critical reviews in food science and nutrition. – 1998. – V. 38, № 8. – P. 689-753.
77. Pan X. Elevated expression of CUEDC2 protein confers endocrine resistance in breast cancer / Xin Pan, Tao Zhou, Yan-Hong Tai, Chenguang Wang, Jie Zhao et al//Nature medicine. – 2011. – V. 17, № 6. – P. 708.
78. Ozbolat, I. T. Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting / I. T. Ozbolat, M. Hospodiuk //Biomaterials. – 2016. – V. 76. – P. 321-343.
79. Caillard, R. Rheological investigation of soy protein hydrogels induced by Maillard-type reaction / R. Caillard, G. E. Remondetto, M. Subirade //Food hydrocolloids. – 2010. – V. 24, № 1. – P. 81-87.
80. Gu, X. Influence of sugars on the characteristics of glucono- δ -lactone-induced soy protein isolate gels / X. Gu, L. J. Campbell, S. R. Euston //Food Hydrocolloids. – 2009. – V. 23, № 2. – P. 314-326.

81. Tombs, M. P. A determination of the sub-units of arachin by osmometry. Arachins A, B and A1 / M. P. Tombs, M. Lowe // *Biochemical Journal*. – 1967. – V. 105, № 1. – P. 181-187.
82. Tombs, M. P. Protein solubility: phase separation in arachin- salt- water systems / M. P. Tombs, B. G. Newsom, P. Wilding // *International journal of peptide and protein research*. – 1974. – V. 6, № 4. – P. 253-277.
83. Johnson, P. The globulins of the ground nut (*Arachis Hypogaea*): I. Investigation of arachin as a dissociation system / P. Johnson, E. M. Shooter // *Biochimica et biophysica acta*. – 1950. – V. 5. – P. 361-375.