

КЛАСТЕРИЗАЦИЯ ВОДЫ В ДЕГИДРАТИРОВАННОЙ ЗООГЛЕИ «TIBETAN MILK MUSHROOM»

Т.В. Крупская¹, Я. Скубышевска-Знеба³, Б. Хармас³, М.Д. Цапко², В.В. Туров¹

¹Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко, Национальной академии наук Украины, ул. Генерала Наумова, 17, Киев, 03164, Украина, e-mail: krupska@ukr.net

²Киевский Национальный университет им. Тараса Шевченко, ул. Владимирская, 60, Киев, 01033, Украина

³Maria Curie-Sklodowska University, Maria Curie-Sklodowska Sq. 3, Lublin 20-031, Poland

Методами ДСК, ЯМР-спектроскопии и термического анализа изучено состояние воды в частично дегидратированных клеточных культурах тибетского молочного гриба. Установлено, что при содержании воды в образцах до 0.8 г/г, вся вода является связанной с клеточными структурами. Вода преимущественно находится в сильноассоциированном состоянии, когда на каждую молекулу приходится 2-3 водородных связи. В воздушной среде при $C_{H_2O} = 0.3$ г/г, большая часть воды входит в состав кластеров с радиусом $R = 10$ нм. С ростом концентрации воды до 0.8 г/г на кривых распределения присутствуют три максимума при $R = 1, 2$ и 12 нм. Эти же максимумы присутствуют и при замене воздуха средой хлороформа. Дифференцировать строение различных кластеров воды в клеточных системах тибетского молочного гриба удастся использованием среды хлороформа с добавкой трифторуксусной кислоты. В этом случае в спектрах ¹H ЯМР присутствуют четыре сигнала воды, относящейся к кластерам, обладающих разной растворяющей способностью по отношению к кислоте. Примерно половина связанной воды входит в состав кластеров, не растворяющих кислоту. На термограммах оттаивания чистого декана регистрируется два эндотермических пика. Один при $T = -28$ °С, что совпадает с паспортной температурой плавления декана, а второй при $T = -8$ °С. Вероятно, часть декана способна сохранять кристалличность при температуре значительно превышающей температуру плавления основной массы вещества. На ДСК-кривых размораживания образца биоматериала молочного гриба, содержащего равные количества адсорбированной воды и декана наблюдаются несколько эндотермических максимумов. Учитывая, что при выбранной концентрации пик размораживания воды не наблюдается, наиболее интенсивные пики ($T = -28$ и $T = -25$ °С) следует относить к процессу таяния декана. Пики меньшей интенсивности также могут быть связаны с таянием разных форм кристаллического декана, стабилизированных поверхностью биоматериала

Ключевые слова: молочный гриб, полиассоциаты воды, ¹H ЯМР – спектроскопия, ДСК – термограммы

Введение

Зооглея (*Zoogloea*) – представляет собой биоценоз колоний микроорганизмов, которые являются сообществом разных типов бактерий, объединенных для совместной защиты, питания и воспроизводства [1–3]. Обычно зооглея создает вокруг себя коллоидную, гелеподобную капсулу, состоящую из полисахаридов, иногда с добавкой азотистых веществ. Возникновение зооглеи носит приспособительный характер. При этом благодаря слизистой консистенции в ней легко осуществляется абсорбция питательных веществ, необходимых для существования бактерий. Аналогичные структуры могут

формироваться и в организмах животных, в частности в пищеварительном тракте людей и животных. Кроме того, известно, что мозг человека и других млекопитающих представляет собой систему связанных синоптическими связями нейронов и аксонов, погруженных в клеточную среду нейроглии, обеспечивающей процессы их жизнедеятельности [4, 5]. Можно считать, что зооглеи являются первичными сообществами самоорганизованных одноклеточных живых существ, которые являются моделью сосуществования разнородных клеток в живых организмах. В последние годы широкое распространение получила зооглея молочного (кефирного) гриба. Ее образует сразу несколько типов молочнокислых бактерий, которые полезны для работы желудочно-кишечного тракта, поскольку являются источником пробиотиков, повышающих иммунный статус организма [6, 7].

Микроорганизмы, как и большинство клеточных объектов, имеют микронные размеры. Поэтому можно полагать, что внутриклеточная жидкость, как и жидкость, сосредоточенная в межклеточных зазорах, представляет собой наноструктурированную систему. Из-за размерных эффектов ее физико-химические свойства могут отличаться от объемных и зависеть от содержания воды в клетках и контактных межклеточных взаимодействий. В связи с этим значительный интерес представляет изучение строения воды связанной клеточными колониями, и протекания в этой воде простейших химических реакций, таких как реакция диссоциации кислот, протонного обмена, растворения органических веществ и др. В этой связи наиболее перспективным представляется изучение частично дегидратированных клеток, когда доля слабосвязанной или «объемной» воды в них невелика.

Целью настоящей работы было изучение строения водных полиассоциатов в зооглеи Тибетского молочного гриба (*Tibetan milk mushroom*) и влияние на них органических растворителей и сильной органической кислоты (CF_3COOD).

Экспериментальная часть

Материалы: Использовалась культура молочного гриба, выращенная при ферментации цельного молока. Для приготовления образцов клеточная масса промывалась большим количеством дистиллированной воды, помещалась на фильтровальную бумагу и подсушивалась при нормальных условиях в течение 1 ч. Затем, для ЯМР-измерений, при $T = 330 \text{ K}$ на воздухе из биомассы удалялась основная часть воды. Ее остаточное содержание составляло 0.3 г/г (в пересчете на сухое вещество). Частичная регидратация образца проводилась путем добавления дистиллированной воды к навеске образца, содержащей 0.3 г/г H_2O . Для проведения экспериментов при помощи метода дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) образец молочного гриба сушили при 280 K в течение 20 мин. Затем к навескам биоматериала порциями добавляли требуемое количество воды от 0.3 до 1 г/г.

Микрофотографирование осуществлялось на электронном микроскопе Quanta 3D FEG. Перед проведением измерений на образец клеточной массы напыляли тонкую пленку палладия.

ЯМР-спектроскопия: Спектры ЯМР снимали на ЯМР-спектрометре высокого разрешения (Varian “Mercury”) с рабочей частотой 400 МГц. Использовали восемь 60° зондирующих импульсов, длительностью 1 мкс при ширине полосы 20 кГц. Температура в датчике регулировалась термоприставкой Bruker VT-1000 с точностью ± 1 град. Интенсивности сигналов определялись измерением площади под пиками с использованием процедуры разложения сигнала на его составляющие в предположении гауссовской формы сигнала и оптимизации нулевой линии и фазы с точностью, которая для хорошо разрешенных сигналов, была не ниже 5 %, а для перекрывающихся сигналов ± 10 %. Для предотвращения переохлаждения воды в исследуемых объектах, измерения

концентрации незамерзающей воды проводили при нагревании образцов, предварительно охлажденных до температуры 210 К. Температурные зависимости интенсивности сигналов ЯМР проводили в автоматизированном цикле, когда время выдерживания образца при постоянной температуре составляло 9 мин, а время измерения 1 мин. ЯМР-измерения проводились в стандартных 5 мм ампулах.

В качестве основного параметра, определяющего структуру сетки водородных связей воды использовалась величина химического сдвига протонов (δ_H). Предполагалось, что вода, в которой каждая молекула участвует в формировании четырех водородных связей (двух за счет протонов и двух за счет неподеленных электронных пар атомов кислорода) имеет химический сдвиг $\delta_H = 7$ м.д. (реализуется для гексагонального льда), а слабоассоциированная вода (не участвующая в формировании водородных связей в качестве протонодонора) – $\delta_H = 1 - 1.5$ м.д. [8 – 11]. Для определения геометрических размеров кластеров адсорбированной воды использовалось уравнение Гиббса – Томсона, связывающее радиус сферического или цилиндрического водного кластера или домена (R) с величиной депрессии температуры замерзания [12, 13]:

$$\Delta T_m = T_m(R) - T_{m,\infty} = \frac{2\sigma_{sl}T_{m,\infty}}{\Delta H_f \rho R}, \quad (1)$$

где $T_m(R)$ – температура плавления льда, локализованного в порах радиуса R , $T_{m,\infty}$ – температура плавления объемного льда, ρ – плотность твердой фазы, σ_{sl} – энергия взаимодействия твердого тела с жидкостью и ΔH_f – объемная энтальпия плавления. Для практического использования уравнение (1) можно применять в виде $\Delta T_m = (k/R)$, в котором константа k для многих гетерогенных систем, содержащих воду, близка к 50 град·нм [11]. Методика проведения ЯМР-измерений и способов определения радиусов кластеров межфазной воды подробно описана в [6 – 9]. При этом кластерами можно считать полиассоциаты, радиус которых $R < 2$ нм, а полиассоциаты большего размера – доменами или нанокляпями, поскольку они содержат несколько тысяч молекул воды [8].

Процессу замерзания (размерзания) связанной воды соответствуют изменения свободной энергии Гиббса, обусловленные эффектами ограниченного пространства и природной поверхности раздела фаз. Отличия от процесса в объеме тем меньше, чем дальше от поверхности находится слой воды. При $T = 273$ К замерзает вода, свойства которой соответствуют объемной воде, а по мере понижения температуры (без учета эффекта переохлаждения) замерзают слои воды, ближе расположенные к поверхности. Для изменения свободной энергии связанной воды (льда) справедливо соотношение:

$$\Delta G_{ice} = -0,036(273,15 - T), \quad (2)$$

где численный коэффициент представляет собой параметр, связанный с температурным коэффициентом изменения свободной энергии Гиббса для льда [14]. Определяя по величине интенсивности сигнала температурную зависимость концентрации незамерзающей воды $C_{uw}(T)$ в соответствии с методикой, подробно описанной в [8 – 11], могут быть рассчитаны количество сильно- и слабосвязанной воды и термодинамические характеристики этих слоев.

Межфазную энергию воды на границе с твердыми частицами или в ее водных растворах определяли, как модуль суммарного понижения свободной энергии воды, обусловленного наличием границы раздела фаз [8 – 11] по формуле:

$$\gamma_s = -K \int_0^{C_{uw}^{\max}} \Delta G(C_{uw}) dC_{uw}, \quad (3)$$

где C_{uw}^{\max} – общее количество незамерзающей воды при $T = 273$ К.

ДСК-измерения

ДСК- измерения выполнялись с использованием дифференциального сканирующего микрокалориметра PYRIS Diamond (Perkin Elmer Instruments, USA). Скорость изменения температуры во всех экспериментах составляла 10 град/мин. Калибровка проводилась по температуре плавления воды ($T_m = 0$ °С) и стандартному образцу индия ($T_m = 156$ °С).

Результаты и обсуждение

Снятые при разном увеличении электронные микрофотографии клеточной массы зооглеи молочного гриба приведены на рис. 1.

При малом увеличении клеточная масса представляет собой однородный материал. С ростом разрешающей способности на ее поверхности можно наблюдать отдельные клетки или их агрегаты, которые имеют неправильную форму, вероятно, ввиду удаления из клеток значительной части внутриклеточной воды.

На рис. 2 показаны термограммы клеточной массы зооглеи молочного гриба, предварительно прогретой в течении 20 мин до температуры 380 К, снятые в воздушной среде (рис. 2 а) и в среде газообразного азота (рис. 2 б).

На термограммах (ТГ кривые) можно наблюдать несколько участков изменения массы. Участок 1 (рис. 2 а, б, воздушная среда) отвечает области температур $T < 120$ °С. Он обусловлен дегидратацией клеточной массы, а возможно, и выделением других низкомолекулярных соединений, связанных с биополимерами, например, углекислого газа, являющегося продуктом метаболизма молочнокислых бактерий. Участок 2 может быть связан с удалением структурной воды и частичным распадом низкомолекулярных биополимеров. Затем следует участок быстрого изменения массы за счет деструкции биополимеров, которая сопровождается выделением низкомолекулярных органических веществ и продуктов окисления (участок 3, $230 < T < 260$ °С). Участки 4 и 5 могут быть отнесены к процессам карбонизации и окисления углерода. Каждому участку может быть поставлен в соответствие максимум на кривой ДТГ (рис. 2 в).

При термолитезе без доступа кислорода (рис. 2 в, г) на кривых потери массы в температурной области $T < 180$ °С наблюдаются два отдельных участка (два максимума на кривой ДТГ), которые могут быть связаны с выделением воды и CO_2 . Участки 3 и 4 несколько смещаются в область меньших температур. Окисление биополимерных продуктов происходит за счет взаимодействия с кислородом, выделяющимся при термодеструкции. Процесс потери массы завершается на уровне 70 % от первоначальной, формированием углерода, не способного к дальнейшему окислению без доступа воздуха.

На рис. 3 приведены снятые при разных температурах спектры 1H ЯМР дегидратированной клеточной массы молочного гриба, содержащей 0.3 (рис. 3 а, г) и 0.8 г/г H_2O . В воздушной среде (рис. 3 а, б) в спектрах наблюдаются два сигнала, с химическими сдвигами $\delta_H = 5$ и 1.5 м.д. Первый из этих сигналов следует относить к сильноассоциированной воде, в которой среднее число водородных связей, с соседними молекулами такое же, как и в жидкой воде [8 – 11]. Второй сигнал ($\delta_H = 1.5$ м.д.) может быть обусловлен метильными и метиленовыми группами фосфолипидов или жирных кислот, а также слабоассоциированной водой, не участвующей в образовании водородных связей [8 – 11]. С понижением температуры интенсивность обоих сигналов уменьшается за счет замерзания как воды, так и гидрофобных веществ. С ростом концентрации воды (рис. 3 б) наблюдается относительный рост интенсивности сигнала с химическим сдвигом $\delta_H = 5$ м.д.

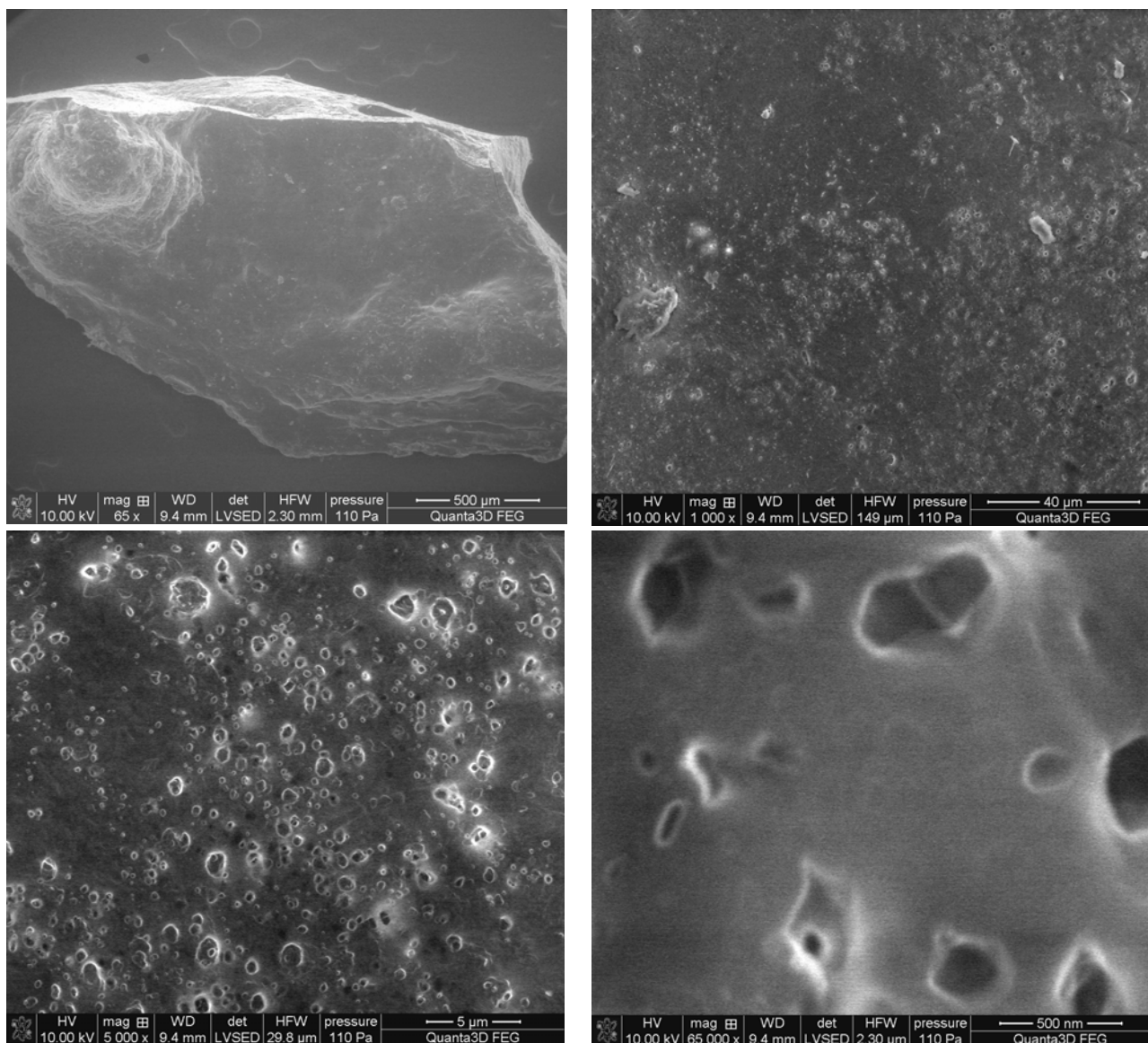


Рис. 1. СЭМ-микрофотографии клеточной массы молочного гриба при разном увеличении электронного микроскопа.

При замене воздушной среды, средой слабополярного органического растворителя – дейтерохлороформа (рис. 3 в) для сигнала, с химическим сдвигом $\delta_{\text{H}} = 1.5$ м.д. начинает проявляться тонкая структура. В спектрах наблюдается несколько сигналов, химические сдвиги которых находятся в диапазоне $\delta_{\text{H}} = 0.8 - 3$ м.д. Следовательно, этот сигнал обусловлен несколькими протонсодержащими веществами.

Поскольку «кислые» протоны в минеральных и органических кислотах имеют большую величину химического сдвига, обусловленную присутствием в кислотах сильных электронодонорных центров [16], а в водных растворах кислот имеет место быстрый протонный обмен между молекулами воды и кислоты [17], их добавление к слабополярной органической среде должно приводить к смещению сигнала протонов воды в слабые магнитные поля (большие величины химического сдвига). На рис. 3 з и 3 д показаны снятые при разных температурах спектры клеточной массы, содержащей 0.3 (рис. 3 з) и 0.8 (рис. 3 д) г/г воды.

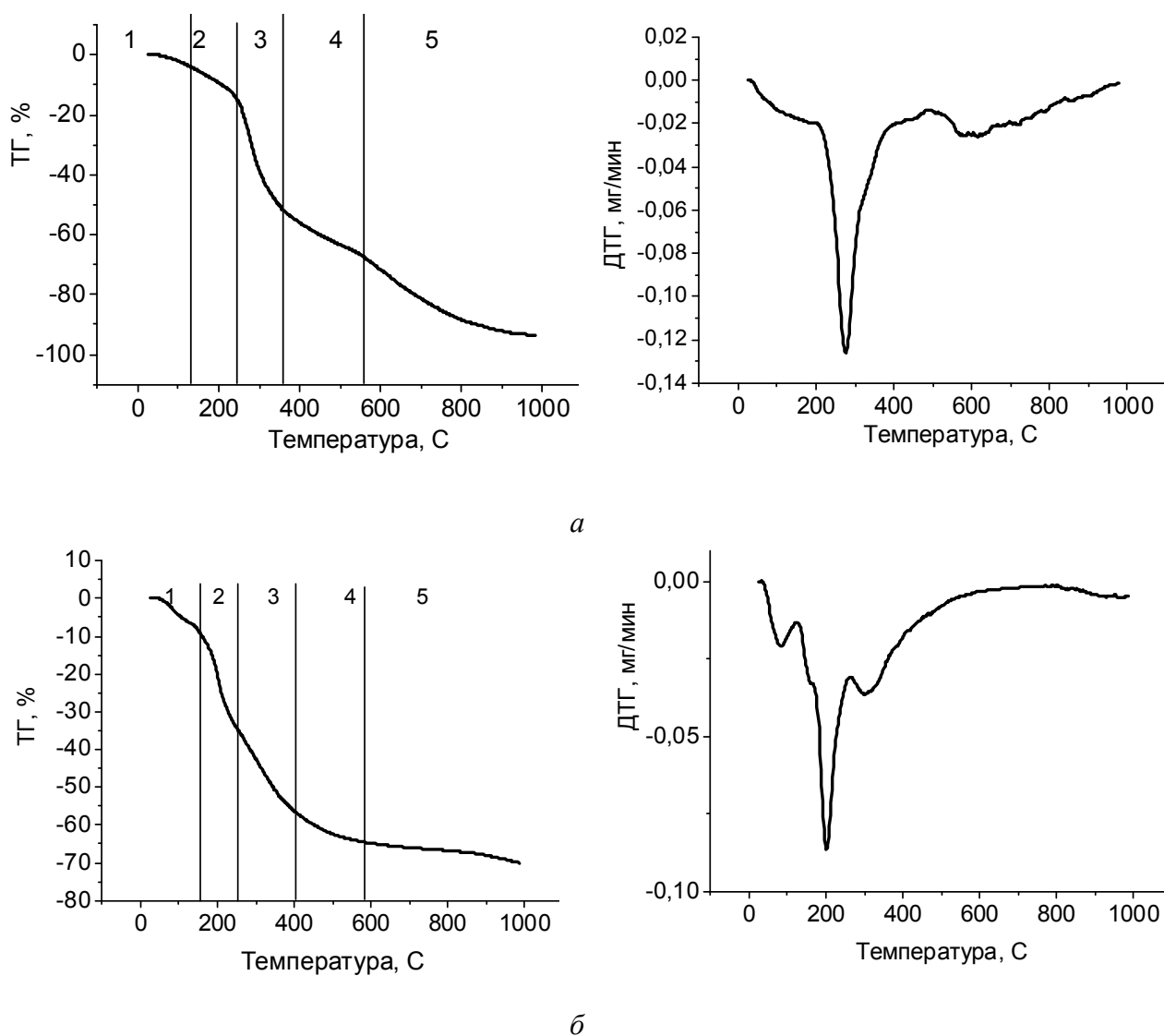


Рис. 2. Термограммы клеточной массы молочного гриба, полученные на воздухе (*а*) и в среде газообразного азота (*б*).

Для образца с меньшей гидратированностью в спектрах вместо одного сигнала сильноассоциированной воды становятся различимы три сигнала (сигналы 1 – 3). Если учесть, что для протонов чистой трифторуксусной кислоты (ТФУК) характерно значение химического сдвига $\delta_{\text{H}} = 11.5$ м.д., полученные результаты можно интерпретировать с точки зрения формирования внутри клеточной массы водных полиассоциатов, способных растворять разное количество ТФУК – максимальное для сигнала 1 и минимальное для сигнала 3. Поскольку химический сдвиг сигнала 3 практически совпадает с химическим сдвигом жидкой воды, можно полагать, что значительная часть внутриклеточной воды находится в состоянии кластеров, не способных растворять ТФУК. С уменьшением температуры и замерзанием основной части воды, возрастает доля воды, входящей в состав концентрированного раствора H_2O – ТФУК. В спектрах также регистрируется сигнал 4, с химическим сдвигом $\delta_{\text{H}} = 2$ м.д., интенсивность которого заметно возрастает с понижением температуры. Наиболее вероятно, что этот сигнал относится к слабоассоциированной воде, входящей в состав поверхностных кластеров с участием молекул CDCl_3 . С ростом гидратированности образца (рис. 3 *д*) в спектрах становятся различимыми только сигналы 2 и 3.

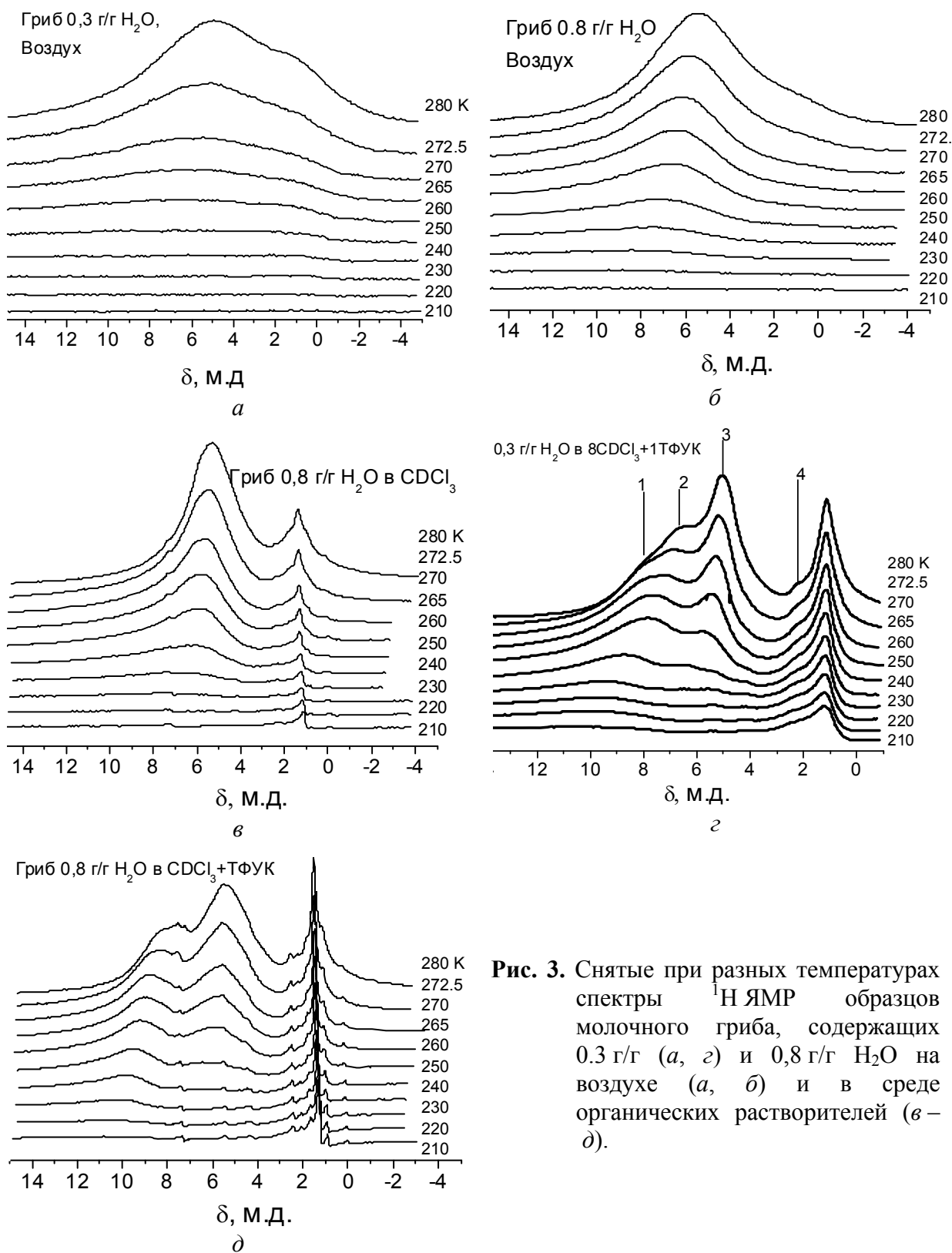


Рис. 3. Снятые при разных температурах спектры ^1H ЯМР образцов молочного гриба, содержащих 0,3 г/г (а, с) и 0,8 г/г H_2O на воздухе (а, б) и в среде органических растворителей (в – д).

Температурные зависимости концентрации незамерзающей воды, изменения свободной энергии Гиббса и распределения по радиусам водных полиассоциатов приведены на рис. 4 а – в. Характеристики слоев незамерзающей воды, рассчитанные в соответствии с уравнениями 2 и 3 суммированы в таблице 1.

Таблица 1. Характеристики слоев незамерзающей воды в частично дегидратированных образцах молочного гриба

C_{H_2O} , г/г	Среда	ΔG_s , кДж/моль	C_{uw}^s , мг/г	C_{uw}^w , мг/г	γ_s , Дж/г
0.3	Воздух	-2.8	48	252	5.5
0.8	Воздух	-2.8	230	570	19.6
0.8	$CDCl_3$	-1.8	320	480	23

В соответствии с принципами, изложенными в [8 – 11] слабосвязанной водой (WBW) можно считать ту часть воды, которая замерзает при $T \geq 265$ К. Остальная вода является сильносвязанной (SBW). Из таблицы 1 следует, что для образца, содержащего 0.3 г/г связанной воды, к сильносвязанной может быть отнесено только 48 мг/г H_2O . Рост количества воды в образце молочного гриба сопровождается увеличением концентрации как сильно- так и слабосвязанной воды (C_{uw}^s и C_{uw}^w соответственно). При этом доля сильносвязанной воды увеличивается, вероятно, за счет изменения морфологической структуры биоматериала.

На распределениях по радиусам полиассоциатов (кластеров и доменов) образца, содержащего 0.3 г/г связанной воды, присутствуют максимумы при $R = 7$ и 100 нм. Кроме них наблюдаются слабоинтенсивные максимумы при $R \approx 1$ и 2 нм. С ростом гидратированности образца до $C_{H_2O} = 0.8$ г/г интенсивность этих максимумов существенно возрастает, вместо максимума при $R = 7$ нм появляется другой, при $R = 30$ нм. Одновременно возрастает количество доменов с $R = 100$ нм. Гидрофобная среда прежде всего уменьшает вклад от больших доменов, что сопровождается ростом вклада от доменов с $R = 20$ нм.

Метод дифференциальной сканирующей калориметрии может эффективно использоваться для определения величин тепловых эффектов фазовых переходов в изобарических условиях [19]. При изучении этим методом дегидратированных лактобактерий было обнаружено несколько экзотермических пиков. Связанных с процессами денатурации биополимеров в органеллах, в частности в рибосомах [20, 21].

На рис. 5 приведены зависимости изменения теплового потока от температуры в процессах замораживания (рис. 5 а) и оттаивания (рис. 5 б) клеточной массы молочного гриба, содержащей разное количество остаточной воды. При минимальной концентрации воды (0.3 г/г) на кривых замораживания фиксируется несколько экзотермических пиков при температурах $0 < T < -10$ °С, которые могут быть отнесены к замерзанию воды, раствора сахаров, фосфолипидов и жирных кислот. С ростом концентрации воды диапазон замерзания и количество экзотермических пиков возрастает. Анализ тепловых эффектов процесса замораживания усложняется возможными эффектами переохлаждения [18] как воды, так и других компонентов клеточного материала.

На кривых оттаивания (рис. 5 б) наблюдается два-три максимума, расположенные в диапазоне температур $-10 < T < 18$ °С. Низкотемпературный максимум может быть отнесен к процессу таяния воды. Минимальная температура, при которой фиксируется эндотермический пик, составляет -18 °С. Отсюда следует, что полученные значения тепловых эффектов следует относить к слабосвязанной воде, т.е. воде, входящей в состав доменов с радиусом $R = 10 - 100$ нм (рис. 4 в). Вода, которой отвечают более мелкие домены и кластеры не наблюдается на термограммах, вероятно, ввиду ее малого количества и широкого диапазона температур, в котором происходит ее замерзание (рис. 4 а, б). Пики, расположенные в области положительных температур, могут быть отнесены к процессу таяния молекулярных кристаллов липидных структур, входящих в состав клеточных мембран и наблюдающихся в спектрах ЯМР в виде сигналов с химическими сдвигами $\delta_H = 1 - 2$ м.д. (рис. 3).

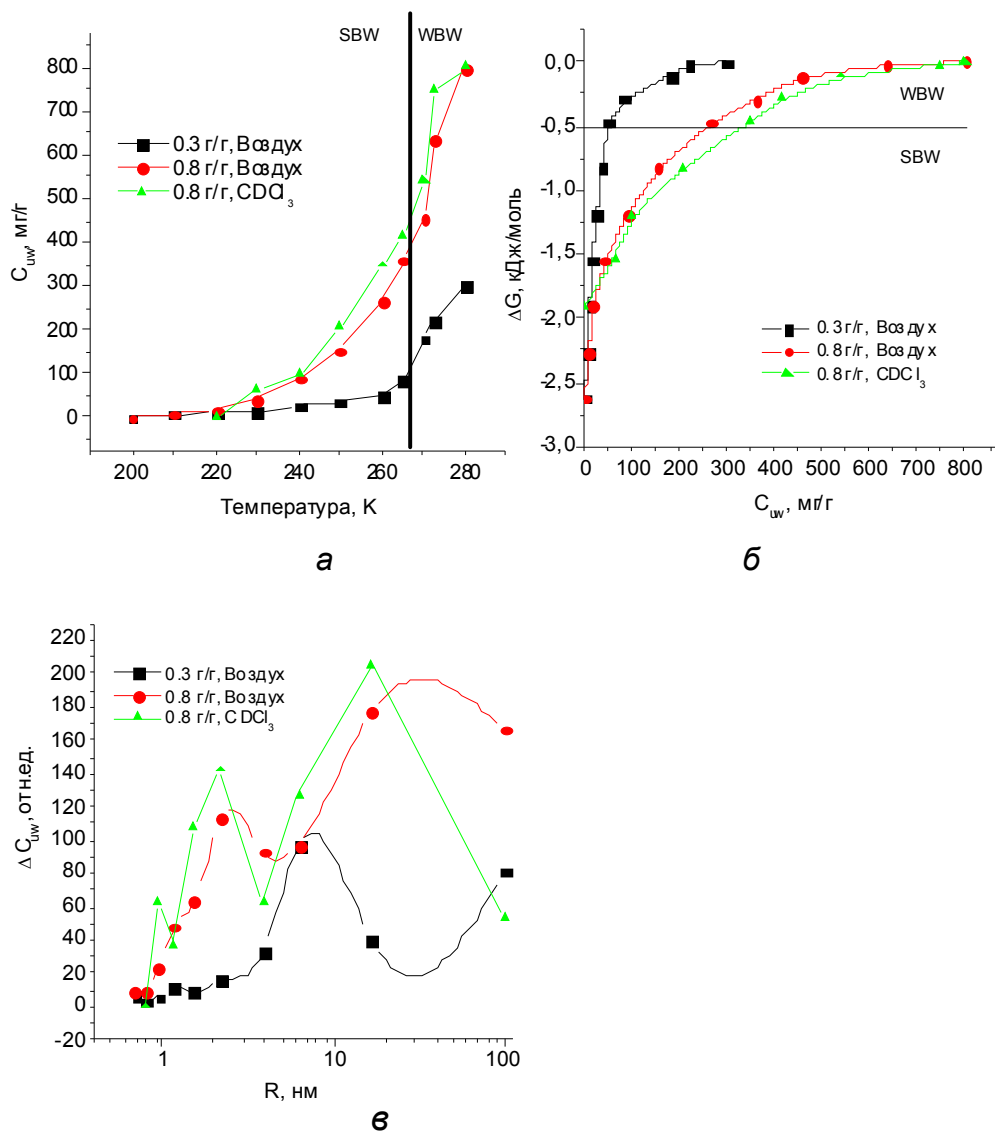


Рис. 4. Зависимости изменения концентрации незамерзающей воды от температуры (а), изменения свободной энергии Гиббса от концентрации незамерзающей воды (б) и распределения по радиусам полиассоциатов (в) для частично дегидратированных образцов молочного гриба в воздушной и органической средах.

Из данных табл. 2 следует, что величина теплового эффекта таяния льда, отнесенная к общему количеству воды в образце, увеличивается с ростом гидратированности биоматериала, но остается значительно меньше теплового эффекта вазового перехода гексагональный лед-вода (330 Дж/г). Вероятно, большая часть воды в биоматериале находится в сильносвязанном состоянии и ее таяние проходит в широком диапазоне температур, сопоставимым с диапазоном варьирования температуры в ДСК-экспериментах.

На рис. 5 приведены ДСК-термограммы процессов замораживания (а) и оттаивания (б) чистого н-декана и декана в частично дегидратированной биомассе молочного гриба, содержащего 0.2 г/г остаточной воды. В процессе замораживания (рис. 5в) экзотермический пик кристаллизации декана наблюдается при $T = -34$ °С, что на 5°С ниже справочной температуры фазового перехода. Если декан прибавлен к образцу молочного гриба, содержащего некоторое количество воды, температура его замораживания практически не изменяется, но увеличивается ширина экзотермического пика. Кроме того, на термограмме появляется эндотермический пик кристаллизации воды ($T = -3$ °С).

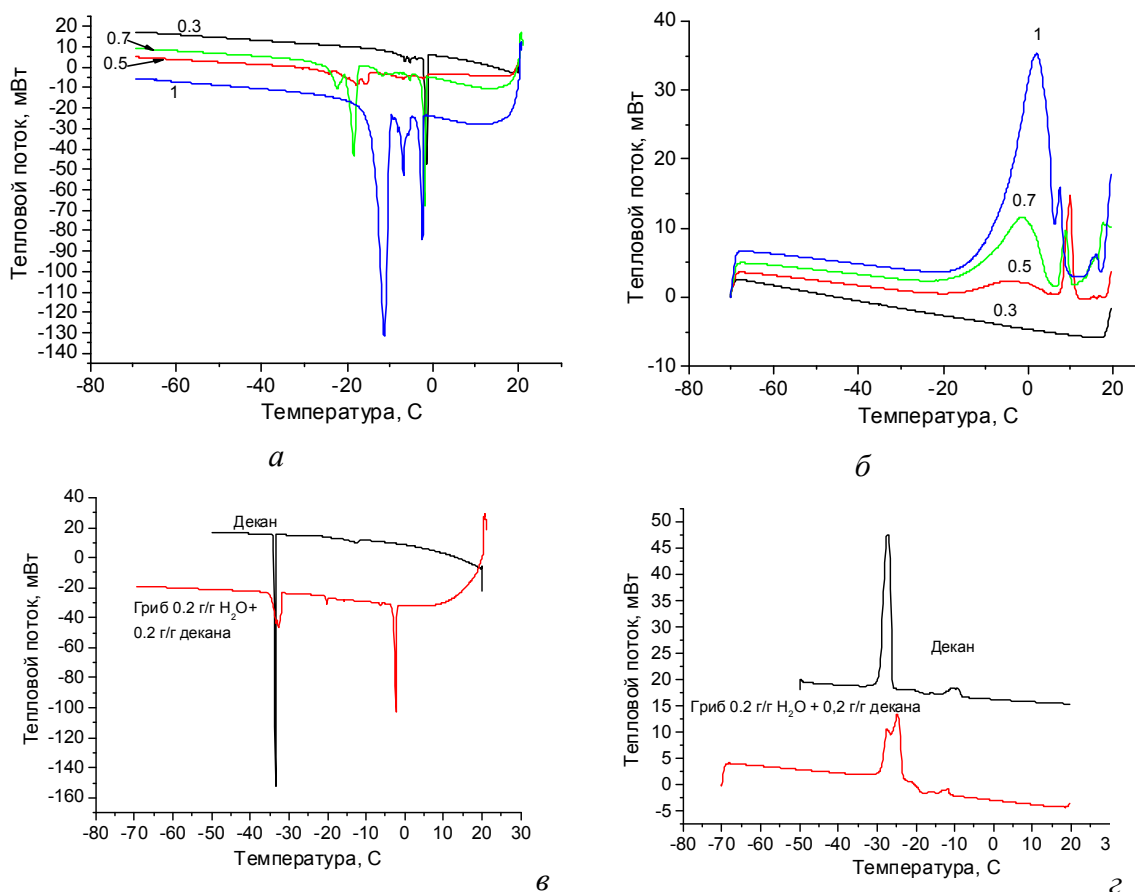


Рис. 5. Зависимости тепловых эффектов замораживания (*а, в*) и оттаивания (*б, г*) воды и органических веществ в частично дегидратированном материале молочного гриба, полученные методом ДСК.

Таблица 2. Тепловые эффекты процесса таяния воды в частично дегидратированном биоматериале молочного гриба, содержащем разную концентрацию остаточной воды.

C_{H_2O} , г/г	$\Delta H/T_{max}$, (Дж/г)/(град. С)	m_{H_2O} , мг
0.3	3.7/(-5)	14.26
0.5	5.4/(-4)	32.64
0.7	28.3/(-4)	29.87
1	38.6/(-2)	50.46

Термограммы оттаивания (рис. 5 *г*) оказались более сложными. Даже для чистого декана на них регистрируется по крайней мере два эндотермических пика. Один при $T = -28\text{ }^\circ\text{C}$, что совпадает с паспортной температурой плавления декана, а второй при $T = -8\text{ }^\circ\text{C}$. Вероятно, часть декана способна сохранять кристалличность при температуре значительно превышающей температуру плавления основной массы вещества. Ранее для *n*-декана и некоторых других неполярных веществ этот эффект наблюдался с помощью метода низкотемпературной ^1H ЯМР-спектроскопии [22, 23]. На ДСК-кривых размораживания образца биоматериала молочного гриба, содержащего равные количества адсорбированной воды и декана, наблюдаются несколько эндотермических максимумов. Учитывая, что при выбранной концентрации пик размораживания воды не наблюдается (рис. 5б), наиболее интенсивные пики ($T = -28$ и $T = -25\text{ }^\circ\text{C}$) следует относить к процессу таяния декана. Пики меньшей интенсивности также могут быть связаны с таянием разных форм кристаллического декана, стабилизированных поверхностью биоматериала.

Выводы

1. В частично дегидратированном биоматериале молочного гриба, вода находится в виде полиассоциатов (кластеров и доменов) с радиусом в диапазоне 1-100 нм. При этом даже в случае $C_{H_2O} = 0.3$ г/г, значительная часть воды присутствует в слабосвязанном состоянии.
2. Межфазные водные полиассоциаты не однородны по способности растворять сильные органические кислоты. Так при добавлении к органической среде трифторуксусной кислоты, регистрируются по крайней мере четыре типа водных структур, с разной растворяющей способностью по отношению к ТФУК. Почти половина межфазной воды находится в состоянии кластеров (доменов) не растворяющих ТФУК.
3. Эндотермические пики на ДСК-термограммах размораживания образцов биоматериала молочного гриба наблюдаются только в случае, когда $C_{H_2O} \geq 0.3$ г/г. Это соответствует регистрации преимущественно слабосвязанной воды.

Литература

1. *Oleskin A.V.* Social behaviour of microbial populations // *J. Basic Microbiol.* – 1994. – V.34, N 6. – P.425–439.
2. *Rossello-Mora R. A., Wagner M., Amman R., Schile K.-H.* The Abundance of *Zoogloea ramigera* in Sewage Treatment Plants // *Applied and Environmental Microbiology.* – 1995. – V.61, N 2. – P. 702–707.
3. *Fridman B.A., Dugan P.R., Pfuster R.M., Remsen C.C.* Fine Structure and Composition of the Zoogloal Matrix Surrounding *Zoogloea ramigera* // *Journal of Bacteriology.* – 1968. – V. 96, N 6. – P. 2144–2153.
4. *Хачатрян А.А., Ерофеева Л.М., Кутвицкая С.А.* Роль нейроглии в функционировании нервной системы // *Успехи современного естествознания.* – 2014. – № 6. – С. 66–70;
5. *Costerton J.W.* Microbial interactions in biofilms // *Beijerinck Centennial. Microbial Physiology and Gene Regulation: Emerging Principles and Applications. Book of Abstracts /Ed. W.A. Scheffers, J.P. van Dijken.* Delft. Delft. Univ. Press. – 1995. – P.20–21.
6. *Афанасьева О.В.* Молочный гриб: Тибетская загадка: Новейшие методики лечения; Уникальные косметические рецепты. АСТ: Астрель-СПб, 2006. – с. 127.
7. *Митрофанова Т.А.* Тибетский гриб: Лечение аллергии, восстановление микрофлоры кишечника. ИД: «Весь», 2005. – с. 128.
8. *Гулько В.М., Туров В.В., Горбик П.П.* Вода на межфазной границе. Киев: Наукова думка. 2009. – с. 694.
9. *Gun'ko V.M., Turov V.V.* Nuclear Magnetic Resonance Studies of Interfacial Phenomena. New York: Taylor & Francis, 2013. – p. 1070.
10. *Туров В.В., Гулько В.М.* Кластеризованная вода и пути ее использования. Киев: Наукова думка. 2011. – с. 316.
11. *Gun'ko V.M., Turov V.V., Bogatyrev V.M. et. al* Unusual Properties of Water at Hydrophilic/Hydrophobic Interfaces // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 2005 – V.118. – P. 125–172.
12. *Aksnes D.W., Kimtys L.* Characterization of mesoporous solids by 1H NMR // *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* – 2004. – V. 25. – P.146–163.
13. *Petrov O.V., Furo I.* NMR cryoporometry: Principles, application and potential // *Progr. NMR.* – 2009. – V.54. – P. 97–122.
14. *Фролов Ю.Г.* Курс коллоидной химии. Поверхностные явления и дисперсные системы. Москва, Химия. 1982. – с. 400.

15. *Derome A.E.* Modern NMR Tecnoque for Chrmistry Research. Pergamon Press. Oxford New York Beijing Frankfurte Sao Paulo Sodney Tokyo Toronto. – p. 390
16. *Abragam, A.* The Principles of Nuclear Magnetism; Oxford University Press: Oxford. UK. 1961.
17. *Franks F.* Biophysics and biochemistry at low temperature. Cambridge: University Press. 1985.– p. 210.
18. *Höhne G., Hemminger W., Flammersheim H.-J.* Differential Scanning Calorimetry: An Introduction for Practitioners // Springer-Verlag, 1996. – p. 222.
19. *Lee J., Kaletunç G.* Evaluation of the Heat Inactivation of *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum* by Differential Scanning Calorimetry // Appl Environ Microbiol. – 2002. – V. 68, N 11. – P. 5379–5386.
20. *Mohacsi-Farkas, C., J. Farkas, L. Meszaros, O. Reichart, E. Andrassy.* Thermal denaturation of bacterial cells examined by differential scanning calorimetry. // J. Therm. Anal. Calor. – 1999. – V. 57. – P. 409–414.
21. *Gun'ko V.M., Turov V.V., Krupskaya T.V. et. al* Interfacial behavior of silicone oils interacting with nanosilica and silica gels. // J. Colloid and Interface Science. – 2013. – V.394 – P.467–474.
22. *Turov V.V., Gun'ko V.M., Zarko V.I., et. al* Interfacial Behavior of *n*-Decane Bound to Weakly Hydrated Silica Gel and Nanosilica over a Broad Temperature Range. // Langmuir. – 2013. – V.29. – P. 4303–4314.

References

1. Oleskin A.V. Social behaviour of microbial populations. *J. Basic Microbiol.* 1994. **34**(6): 425.
2. Rossello-Mora R. A., Wagner M., Amman R., Schile K.-H. The Abundance of Zoogloea ramigera in Sewage Treatment Plants. *Applied and Enviromental Microbiology.* 1995. **61**(2): 702.
3. Fridman B.A., Dugan P.R., Pfuster R.M., Remsen C.C. Fine Structure and Composition of the Zoogloal Matrix Surrounding Zoogloea ramigera. *Journal of Bacteriology.* 1968. **96**(6): 2144.
4. Khachatryan A.A., Erofeeva L.M., Kutvitskaya S.A. The role of neuroglia in the functioning of the nervous system. *The successes of modern science.* 2014. 6: 66. [in Ukrainain].
5. Costerton J.W. Microbial interactions in biofilms. Beijerinck Centennial. Microbial Physiology and Gene Regulation: Emerging Principles and Applications. Book of Abstracts /Ed. W.A. Scheffers, J.P. van Dijken. Delft. Delft. Univ. Press: 1995: 20.
6. Afanasyeva O.V. Milk Mushroom: Tibetan riddle: The latest treatment methods; Unique cosmetic recipes. AST: Astrel-SPb. 2006: 127. [in Ukrainain].
7. Mitrofanova T.A. Tibetan mushroom: Treatment of allergies, restoration of intestinal microflora. IH: “Ves”, 2005: 128.
8. Gun'ko V.M., Turov V.V., Gorbik P.P. Water at the interface. Kyiv: Naukova dumka. 2009: 694. [in Ukrainain].
9. Gun'ko V.M., Turov V.V. Nuclear Magnetic Resonance Studies of Interfacial Phenomena. New York: Taylor & Francis, 2013: 1070.
10. Turov V.V., Gun'ko V.M. Clustered water and its application. Kyiv: Naukova dumka. 2011: 316. [in Ukrainain].
11. Gun'ko V.M., Turov V.V., Bogatyrev V.M. et. al Unusual Properties of Water at Hydrophilic/Hydrophobic Interfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2005. **118**: 125.
12. Aksnes D.W., Kimtys L. Characterization of mesoporous solids by ¹H NMR. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance.* 2004. **25**:146.
13. Petrov O.V., Furo I. NMR cryoporometry: Principles, application and potential. *Progr. NMR.* 2009. **54**: 97.
14. *Frolov Yu.G.* The course of colloid chemistry. Surface phenomena and disperse systems. Moscow: Chemistry. 1982: 400. [in Ukrainain].

15. Derome A.E. Modern NMR Tecnoque for Chrmistry Research. Pergamon Press. Oxford New York Beijing Frankfurte Sao Paulo Sodney Tokyo Toronto. 390
16. Abragam, A. The Principles of Nuclear Magnetism; Oxford University Press: Oxford. UK. 1961.
17. Franks F. Biophysics and biochemistry at low temperature. Cambridge: University Press. 1985: 210.
18. Höhne G., Hemminger W., Flammersheim H.-J. Differential Scanning Calorimetry: An Introduction for Practitioners. *Springer-Verlag*. 1996: 222.
19. Lee J., Kaletunç G. Evaluation of the Heat Inactivation of *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum* by Differential Scanning Calorimetry. *Appl Environ Microbiol*. 2002. **68**(11): 5379.
20. Mohacsi-Farkas, C., J. Farkas, L. Meszaros, O. Reichart, E. Andrassy. Thermal denaturation of bacterial cells examined by differential scanning calorimetry. *J. Therm. Anal. Calor*. 1999. **57**: 409.
21. Gun'ko V.M., Turov V.V., Krupska T.V. et. al Interfacial behavior of silicone oils interacting with nanosilica and silica gels. *J. Colloid and Interface Science*. 2013. **394**: 467.
22. Turov V.V., Gun'ko V.M., Zarko V.I., et. al Interfacial Behavior of *n*-Decane Bound to Weakly Hydrated Silica Gel and Nanosilica over a Broad Temperature Range. *Langmuir*. 2013. **29**: 4303.

КЛАСТЕРИЗАЦІЯ ВОДИ В ДЕГІДРАТОВАНІЙ ЗООГЛЕЇ “TIBETAN MILK MUSHROOM”

Т.В. Крупська¹, Я. Скубішевська-Зієба³, Б. Хармас³, М.Д. Цапко², В.В. Туров¹

¹*Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка, Національної академії наук України, вул. Генерала Наумова, 17, Київ, 03164, Україна, e-mail: krupska@ukr.net*

²*Київський Національний університет ім. Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 60, Київ, 01033, Україна*

³*Maria Curie-Sklodowska University, Maria Curie-Sklodowska Sq. 3, Lublin 20-031, Poland*

Методами ДСК, ЯМР-спектроскопії та термічного аналізу вивчено стан води в частково дегідратованих клітинних культурах тибетського молочного гриба. Встановлено, що при вмісті води в зразках до 0.8 г/г, вся вона є зв'язаною з клітинними структурами. Вода переважно знаходиться в сильноасоційованому стані, коли на кожну молекулу приходить 2-3 водневих зв'язки. У повітряному середовищі при $C_{H_2O} = 0.3$ г/г, велика частина води входить до складу кластерів з радіусом $R = 10$ нм. З ростом концентрації води до 0,8 г/г на кривих розподілу присутні три максимуми при $R = 1, 2$ і 12 нм. Ці ж максимуми присутні і при заміні повітря середовищем хлороформу. Диференціювати будова різних кластерів води в клітинних системах тибетського молочного гриба вдається при використанні середовища хлороформу з добавкою трифтороцтової кислоти. В даному випадку в спектрах 1H ЯМР присутні чотири сигнали води, що відносяться до кластерів, які мають різну розчинюючу здатність по відношенню до кислоти. Приблизно половина зв'язаної води входить до складу кластерів, які не розчиняють кислоту. На термограмах відтавання чистого декану реєструються два ендотермічних піки. Один при $T = -28$ °C, що збігається з паспортною температурою плавлення декану, а другий при $T = -8$ °C. Ймовірно, частина декану здатна зберігати кристалічність при температурі, яка значно перевищує температуру плавлення основної маси речовини. На ДСК-кривих розморожування зразка біоматеріалу молочного гриба, що містить рівні кількості адсорбованих води і декану спостерігаються кілька ендотермічних максимумів. З огляду на те, що при вибраній концентрації пік розморожування води не спостерігається, найбільш інтенсивні піки ($T = -28$ і $T = -25$ °C) слід відносити до процесу танення декану. Піки меншої інтенсивності також можуть

бути пов'язані з таненням різних форм кристалічного декану, стабілізованих поверхнею біоматеріалу.

Ключові слова: молочний гриб, поліасоціати води, ^1H ЯМР – спектроскопія, ДСК – термограми

WATER CLUSTERING IN A DEHYDRATED ZOOGLIE “TIBETAN MILK MUSHROOM”

T.V. Krupskaya¹, Ja. Skubiszewska-Zieba³, B. Charmas³, M.D. Tsapko², V.V. Turov¹

¹Chuiko Institute of Surface Chemistry, 17 General Naumov Street, Kiev 03164, Ukraine,
e-mail: krupska@ukr.net

²Taras Shevchenko Kyiv National University, 60 Volodymyrska Street 60, Kyiv, 01033, Ukraine,

³Maria Curie-Sklodowska University, Maria Curie-Sklodowska Sq. 3, Lublin 20-031, Poland

By the methods of DSC, NMR spectroscopy and thermal analysis, the state of water in partially dehydrated cell cultures of the Tibetan milk fungus was studied. It was found that when the water content in the samples is up to 0.8 g/g, all water is associated with cellular structures. Water is predominantly in a highly associated state, when there are 2-3 hydrogen bonds per molecule. In air at $C_{\text{H}_2\text{O}} = 0.3$ g/g, most of the water is part of clusters with a radius of $R = 10$ nm. With an increase in water concentration to 0.8 g/g, three maxima are present on the distribution curves at $R = 1, 2,$ and 12 nm. The same maxima are also present when air is replaced by a chloroform medium. It is possible to differentiate the structure of various water clusters in the cellular systems of a Tibetan milk fungus using chloroform medium with the addition of trifluoroacetic acid. In this case, in the ^1H NMR spectra there are four water signals related to clusters having different dissolving powers with respect to acid. About half of the bound water is part of acid-insoluble clusters. Two endothermic peaks are recorded on thermograms of thawing of a pure decane. One at $T = -28$ °C, which coincides with the passport melting point of the decane, and the second at $T = -8$ °C. Probably, part of the decane is able to maintain crystallinity at a temperature significantly higher than the melting temperature of the bulk of the substance. On the DSC curves of thawing of a sample of milk fungus biomaterial containing equal amounts of adsorbed water and decane, several endothermic maxima are observed. Considering that at the chosen concentration, the peak of water defrosting is not observed, the most intense peaks ($T = -28$ and $T = -25$ °C) should be attributed to the process of decane melting. Peaks of lower intensity can also be associated with the melting of various forms of crystalline decane stabilized by the surface of the biomaterial

Keywords: milk mushroom, water polyassociates, ^1H NMR spectroscopy, DSC - thermograms