

ВЛАСТИВОСТІ КОМПОЗИТНИХ СИСТЕМ НА ОСНОВІ СУСПЕНЗІЙ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ ТА КРЕМНЕЗЕМУ

Т.В.¹ Крупська, В.В.¹ Туров, М.Д.² Цапко, Я.³ Скубишевська-Зіємба, Б.³ Хармас

¹Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка, НАН України,
Київ 03164, вул. Генерала Наумова, 17, Київ, Україна,
E-mail: krupska@ukr.net

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
Київ 01033, вул. Володимирська, 60, Київ, Україна

³Університет Марії Кюрі-Склодовської
пл. Марії Кюрі-Склодовської, 3, Люблін, 20-031, Польща

Методами низькотемпературної ¹H ЯМР-спектроскопії та ДСК вивчено процес гідратації лактобактерій, вплив на нього слабополярного органічного середовища, інкапсулювання клітин нанокремнеземом, і можливості проникнення в них такої активної речовини як трифтороцтова кислота (ТФОК).

Показано, що спектральні параметри води в концентрованих клітинних суспензіях молочнокислих бактерій значно залежать від концентрації суспензій, що, ймовірно, пов'язано з можливістю формування стабільного клітинного гелю, який без його руйнування може бути інкапсульований частинками кремнезему як у повітряному середовищі, так і в середовищі хлороформу з добавкою трифтороцтової кислоти. На кривих розподілу за радіусами кластерів незамерзаючої води присутні два максимуми, що відповідають $R = 2$ і $20 - 100$ нм. Вклад у розподіл другого максимуму зростає з ростом концентрації води. На ДСК-термограмах лактобактерій величина теплового ефекту, віднесена до кількості зв'язаної води, є значно меншою теплового ефекту плавлення льоду, що пов'язано з наявністю значної кількості незамерзаючої води.

Ключові слова: лактобактерії, інкапсулювання, діоксид кремнію, зв'язана вода, ¹H ЯМР-спектроскопія, ДСК

Вступ

На даний час для тривалого зберігання клітинних суспензій широко використовується спосіб їх заморожування з кріопротектором (гліцерин або ДМСО) при температурі -196 °C (рідкий азот) [1, 2]. Його головним недоліком є низький відсоток збереження життєздатних клітин (55 – 60 %). При цьому препарат ДМСО є токсичним, що вимагає його повного видалення із суспензії клітин після розморожування. Крім того, в процесі деконсервації може пошкоджуватися до 30 % клітин. Незважаючи на те, що гліцерин значно менш токсичний, його використання також призводить до руйнування клітин після їх розморожування.

На практиці кріоконсервування клітинних суспензій зазвичай застосовують багатоступеневі режими заморожування з різними значеннями температури переходів від етапу до етапу, в залежності від типу клітин [3, 4]. В результаті з клітин видаляється велика частина внутрішньоклітинної води. Це обумовлено тим, що при температурі до -30 °C може здійснюватися таке трансмембранне перенесення внутрішньоклітинної води, яке практично не супроводжується формуванням внутрішньоклітинного льоду. На даному

етапі охолодження обмежена можливість трансмембранної дифузії (різна для різних типів клітин). Потім йде етап глибокого заморожування. Він менш вимогливий до швидкості охолодження, однак, при високих швидкостях можливе утворення в кристалах, які ростуть, позаклітинного льоду великої кількості дефектів, здатних викликати механічні напруги, а, внаслідок цього, призвести до пошкодження заморожених клітин [5].

Перспективним напрямком тривалого зберігання клітин при відносно високих температурах може бути їх інкапсуляція нанорозмірними біологічними інертними матеріалами, здатними створювати навколо мікрокрапель клітинної суспензії гідрофільну оболонку, яка з одного боку забезпечує можливість газового обміну між суспензією та зовнішнім середовищем, а з іншої – гальмує процеси життєдіяльності клітин, переводячи їх в стан близький до анабіозу. На даний час розроблено технологічні схеми інкапсулювання багатьох типів клітин, зокрема клітин кісткового мозку, ракових та ін. клітин [6, 7], які дозволяють не тільки зберегти клітини в життєздатному стані, але і вирощувати клітинні культури.

Метою даної роботи було вивчення гідратації клітинних суспензій та життєздатності клітин молочнокислих бактерій, інкапсульованих кремнеземом і можливості проникнення через гідрофільний бар'єр в клітини такої активної речовини, як трифтороцтова кислота (ТФОК).

В якості основних методів дослідження була обрана низькотемпературна ^1H ЯМР-спектроскопія та диференціальна скануюча калориметрія (ДСК). За допомогою ЯМР-спектроскопії, за зміною інтенсивності сигналу води в процесах заморожування-танення зразка можна визначити температурну залежність концентрації незамерзаючої води, а за величиною хімічного зсуву – середнє число водневих зв'язків, в яких приймає участь будь-яка молекула води [8–11]. ДСК визначає величину теплових ефектів фазових переходів. Для багатокомпонентних систем це дозволяє слідкувати за особливостями формування композитних систем з участю мінеральних частинок і клітин.

Експериментальна частина

Матеріали: Використовувалася ліофілізована суміш культур молочнокислих бактерій, що застосовуються для закваски сметани (*Lactococcus lactis* subsp. *Actis Lactococcus lactis* subsp. *Diacetylactis* *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus*). У процесі приготування зразків наважка сухої клітинної маси суспендувалася в рівній за масою кількості води. Інкапсулювання проводилося шляхом додавання до суспензії клітин кремнезему в кількості, рівному 40 % від маси сухих клітин. Отримана маса перемішувалася до утворення гомогенного матеріалу, який потім поміщали у вимірювальну ЯМР-ампулу. Використовувався аморфний кремнезем, з питомою поверхнею 300 м²/г, TS-100 (Cabot Corporation, США). В якості органічних добавок і слабополярного середовища використовували дейтерохлороформ, дейтеродиметилсульфоксид і дейтеротрифтороцтову кислоту. Це заважало появи в спектрах додаткового інтенсивного сигналу розчинників, а в разі ТФОК дозволяло зберігати незмінну інтенсивність сигналу протонів, що відносяться до легко обмінних протонів речовин – H₂O і ТФОК. Відсутність у препараті клітин значної кількості сторонніх речовин дозволяло співвідносити сигнали протонів, що зареєстровані в спектрах ^1H ЯМР, виключно до води, оскільки спектри біополімерних продуктів, які складають основу клітинного матеріалу, не реєструються в спектрах «рідинного» ЯМР за рахунок малих часів релаксації, порівняно із часом релаксації протонів в твердих тілах [9].

Мікрофотографування порошків і емульсій проводилося за допомогою мікроскопа Primo Star (Zeiss, Німеччина) при збільшенні x400 і x1000 з використанням імерсії.

ЯМР-спектроскопія: Спектри ЯМР знімали на ЯМР-спектрометрі з високим розрішенням (Varian “Mercury”) з робочою частотою 400 МГц. Використовували вісім 60° зондуючих імпульсів, довжиною 1 мкс при ширині смуги 20 кГц. Максимум датчика регулювання термоприставки Bruker VT-1000 з точністю ±1 град. Інтенсивність сигналів визначали шляхом вимірювання площі піків з процедурою розкладу сигналу на його складові в припущенні гаусової форми сигналу і оптимізації нульової лінії та фази з точністю, яка для дозволених сигналів була не менше 5 %, а для сигналів, що перекриваються ±10 %. Для запобігання переохолодженню води в досліджуваних об’єктах, вимірювання концентрації незамерзаючої води проводили при нагріванні зразків, попередньо охолоджених до температури 210 К. Температурні залежності інтенсивності сигналів ЯМР проводилися в автоматизованому циклі, час витримування зразка при постійній температурі становив 9 хв, а час вимірювання 1 хв.

В якості основного параметра, що визначає структуру сітки водневих зв’язків води, використовувалася величина хімічного зсуву протонів (δ_H). Припускали, що вода, де кожна молекула бере участь в утворенні чотирьох водневих зв’язків (двох за рахунок протонів і двох за рахунок неподілених електронних пар атомів кисню) має хімічний зсув $\delta_H = 7$ м.ч. (для гексагонального льоду), слабоасоційована вода (та, що не приймає участі в утворенні водневих зв’язків в якості протонодонора) хімічний зсув $\delta_H = 1 - 1,5$ м.ч. [8 – 11]. Для визначення геометричних розмірів кластерів адсорбованої води використовували формулу Гібса – Томсона, яка зв’язує радіус сферичного або циліндричного водного кластера або домена (R) з величиною депресії температури замерзання [12, 13]:

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

де $T_m(R)$ – температура плавлення льоду, локалізованого в порах радіуса R , $T_{m,\infty}$ – температура плавлення об’ємного льоду, ρ – густина твердої фази, σ_{sl} – енергія взаємодії твердого тіла з рідиною та ΔH_f – об’ємна ентальпія плавлення. Для практичного використання формулу (1) можна застосовувати у вигляді $\Delta T_m = (k/R)$, де константа k для багатьох гетерогених систем, що містять воду, близька до 50 град·нм [11]. Методика проведення ЯМР-вимірювань та способів визначення радіусів кластерів міжфазної води детально описана в [8-11]. При цьому кластерами можна вважати поліасоціати, радіус яких $R < 2$ нм, а поліасоціати більшого розміру – доменами або нанокраплями, оскільки вони містять кілька тисяч молекул води [10].

Процесу замерзання (танення) зв’язаної води відповідають зміни вільної енергії Гіббса, зумовлені ефектами обмеженого простору та природної поверхні розділу фаз. Відмінності від процесу в об’ємі тим менші, чим далі від поверхні знаходиться шар води. При $T = 273$ К замерзає вода, властивості якої відповідають об’ємній воді, а по мірі зниження температури (без урахування ефекту переохолодження) замерзають шари води, які ближче розташовані до поверхні. Для вимірювання вільної енергії зв’язаної води (льоду) справедливе співвідношення:

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

де чисельний коефіцієнт являє собою параметр, зв’язаний з температурним коефіцієнтом зміни вільної енергії Гіббса для льоду [14]. Визначаючи за величиною інтенсивності сигналу температурну залежність концентрації незамерзаючої води $C_{unw}(T)$ відповідно до методики, детально описаної в [8 – 11], можуть бути розраховані кількості сильно- і слабозв’язаної води та термодинамічні характеристики цих шарів.

Міжфазна енергія води на границі з твердими частинками або в її водних розчинах визначалася як модуль сумарного зниження вільної енергії води, зумовлений наявністю границі розділу фаз [8 – 11] за формулою:

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

де C_{uw}^{\max} – загальна кількість незамерзаючої води при $T = 273$ К.

Результати та їх обговорення.

На рис. 1 наведено мікрофотографії клітинних суспензій (а), сухої бактеріальної культури (б) і суспензії клітин, інкапсульованих нанокремнеземом (в), зняті при збільшенні $\times 1000$. У суспензіях добре відрізняються молочнокислі бактерії (рис. 1, а), що можуть утворювати агрегати, розмір яких досягає 10 мкм. У полі зору мікроскопа спостерігається хаотичний рух клітин, що свідчить про їх високу життєздатність. У сухому стані (рис. 1, б) клітини формують кристалоподібні структури різних розмірів. Окремі клітини в них візуально не ідентифікуються. Ймовірно, клітини або їх агрегати знаходяться в капсулах нанокремнезему мікронного розміру, де завдяки високій в'язкості системи клітин знаходяться у нерухомому стані. Проте, якщо частинку композиту помістити у водне середовище, то мікроорганізми легко переміщуються в рідку фазу і проявляють високу рухливість, яка зберігається і в тому випадку, коли зразок попередньо охолоджується до 210 К протягом 1,5 год.

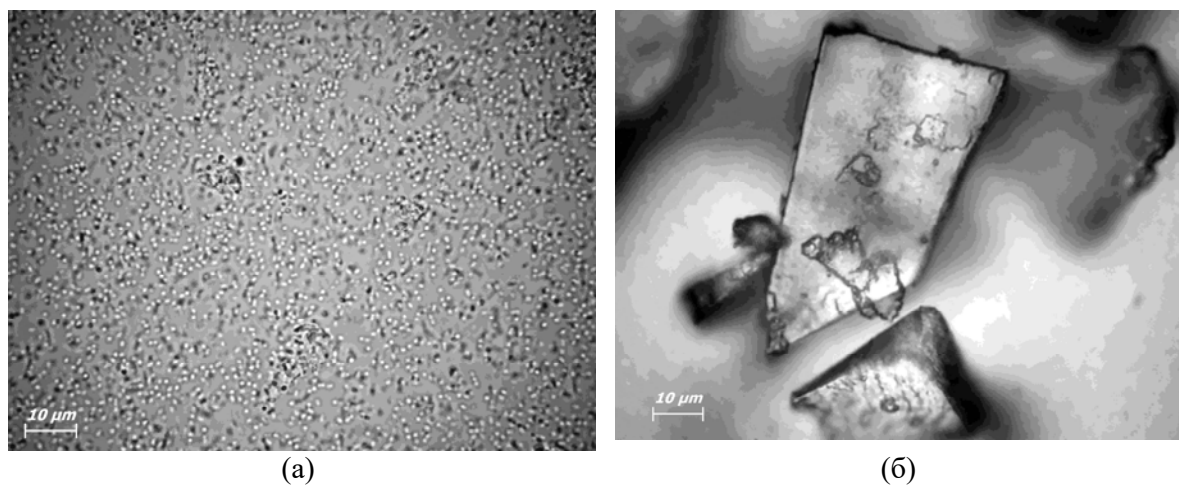
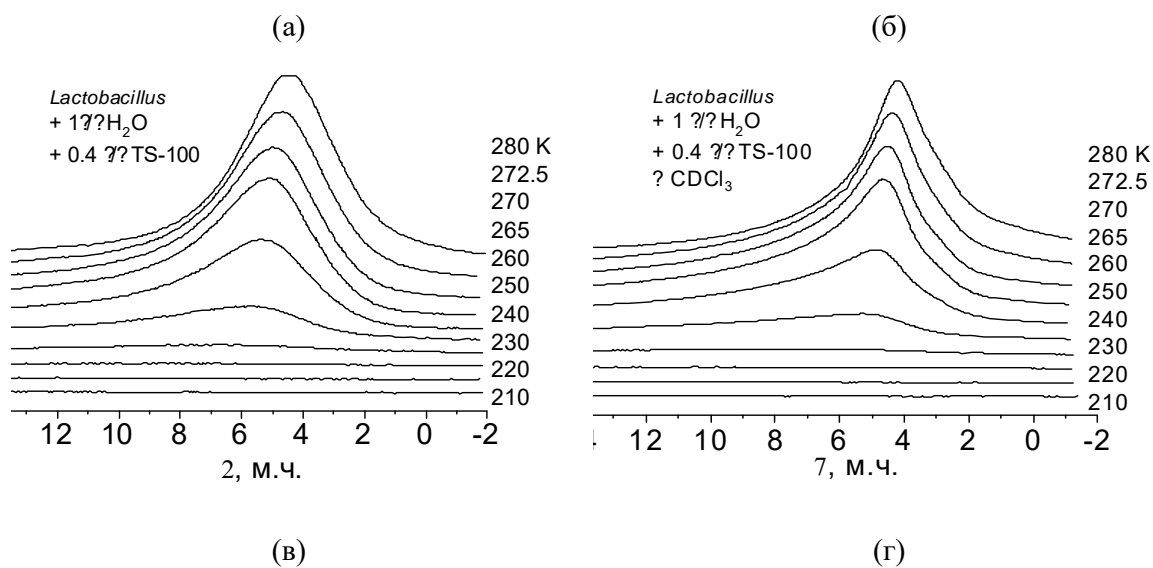
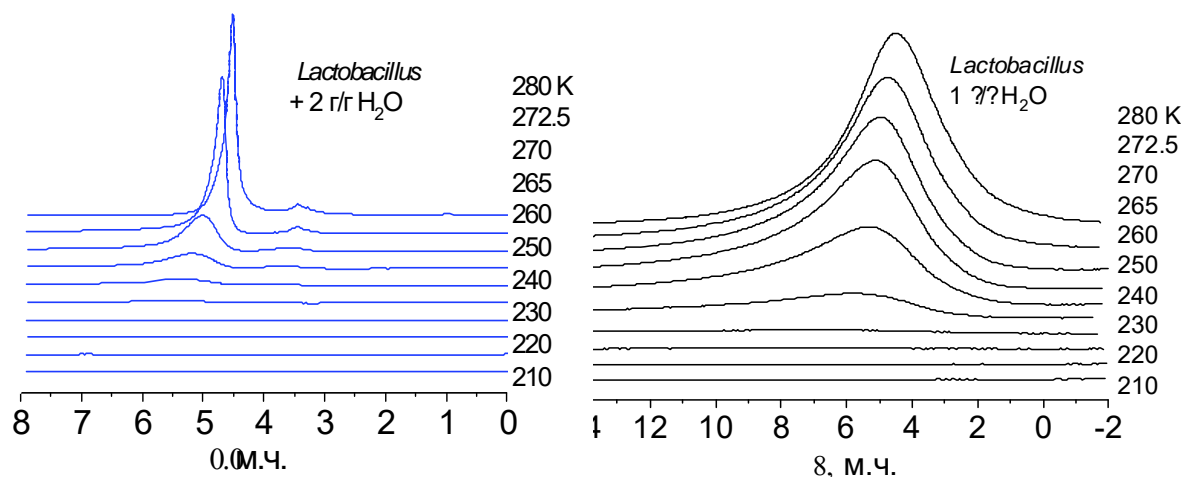


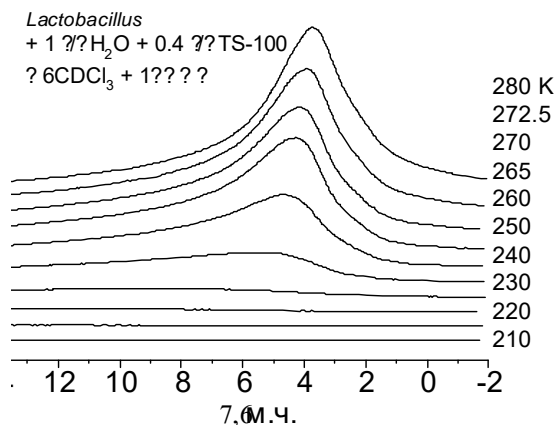
Рис. 1. Мікрофотографії клітинної суспензії (а) та дегідратованого клітинного матеріалу (б) молочнокислих бактерій

Зняті при різних температурах спектри води у водній суспензії 1:2 і 1:1 клітин наведено на рис. 2, а, б, відповідно. При концентрації води $h = 2$ г/г, в спектрах спостерігається кілька сигналів. Сигнал води, який зміщується від $\delta_H = 4$ м.ч. при 280 К до $\delta_H = 5,5$ м.ч. при $T = 240$ К. Крім того, в спектрах фіксується відносно більш слабкий сигнал при $\delta_H = 3,5$ м.ч. Він складається з кількох піків, які можуть бути віднесені до сигналів гідроксильних груп цукрів, присутніх у ліофілізаті клітин як поживне середовище. Спостерігається також слабкий сигнал з $\delta_H = 1$ м.ч., хімічний зсув якого може відповідати метильним або метиленовим групам фосфоліпідів або протонам слабоасоційованої води [8]. Зі зниженням температури інтенсивність сигналів зменшується за рахунок часткового замерзання як води так і цукрів. У концентрованій суспензії клітин (рис. 2, б) ширина сигналу значно більша, що обумовлено більш високою

в'язкістю системи. При цьому на фоні значно інтенсивнішого сигналу води, сигнали цукрів у спектрах не відрізняються.

Якщо до водно-клітинної суспензії додати нанокремнезем (TS-100), то у результаті слабоінтенсивного механічного перемішування суміш легко утворювала компакту дуже в'язку масу. Дані мікроскопічних досліджень (рис.1) показують, що частинки нанокремнезему розташовуються по периферії мікрокапель (10-20 мкм) клітинної суспензії. Спектри води в такій системі (рис. 2, в) представлені одним сигналом, спектральні характеристики якого близькі до спектрів вихідної клітинної суспензії при $h = 2$ г/г (рис. 2, б).



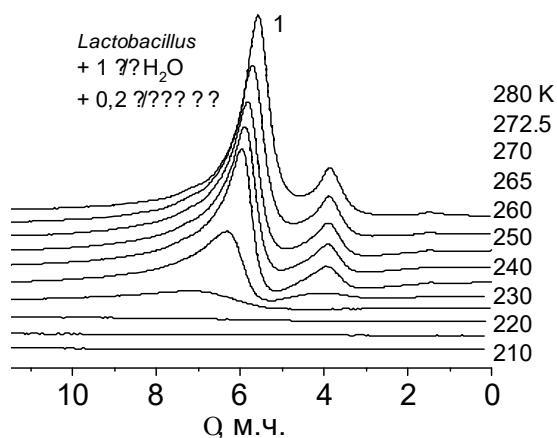


(д)

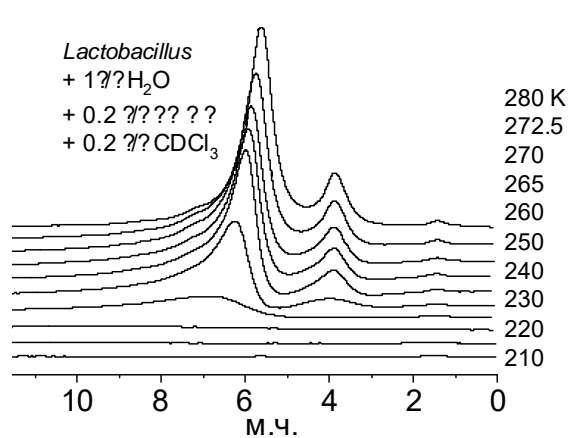
Можливість проникнення через бар'єр нанокремнезему слабополярних (CDCl_3) і полярних (ТФОК) речовин була вивчена шляхом додавання до композитної системи, що містить клітинну суспензію і нанокремнезем, хлороформу в кількості достатній для заповнення всіх внутрішніх порожнин, куди додавали ТФУКД1. Зняті при різних температурах спектри ^1H ЯМР для даних систем, мали подібний вигляд. Вони наведені на рис. 2, г, д. Хімічний зсув сигналу води становить 4-5,5 м.ч., що дозволяє зробити висновок про відсутність ТФОКД1 в клітинній суспензії. Ймовірно, повного змочування частинок нанокремнезему хлороформом не відбувається, а на границі з водною суспензією клітин зберігається повітряний прошарок, що заважає проникненню ТФОКД1.

Це підтверджується також і відсутністю сигналу протонів ТФОКД1 в дисперсійному середовищі. Завдяки швидкому протонному обміну, що відбувається при формуванні водневозв'язаних комплексів ТФОКД1- H_2O у випадку прямого контакту суміші $\text{CDCl}_3/\text{ТФОКД1}$ з водою, слід очікувати заміни значної частини дейтронів на протони та появу сигналу ТФОКД1 в області $\delta_{\text{H}} = 11,5$ м.ч. [15]

Рис. 2. Зняті при різних температурах спектри ^1H ЯМР водної суспензії 2:1 (а) і 1:1 (б) молочнокислих бактерій, суспензії 1:1, інкапсульованої кремнеземом TS-100, на повітрі (в) в середовищі CDCl_3 (г) і суміші $6\text{CDCl}_3/1\text{ТФОКД1}$ (д)



(а)



(б)

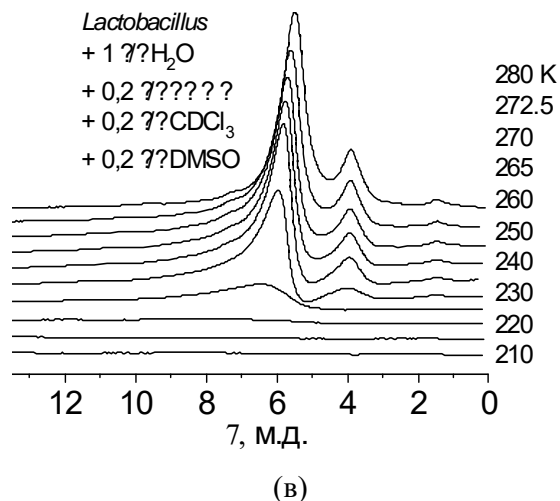


Рис. 3. Зняті при різних температурах спектри ^1H ЯМР водної суспензії 1:1 молочнокислих бактерій, при додаванні до водного середовища ТФОК (а, б, в), CDCl_3 (б) і $\text{CDCl}_3 + \text{DMCO}$ (в)

При додаванні до суспензії 0,2 г/г ТФОКD1 (рис. 3, а) відбувається розділення сигналу на два (сигнали 1 і 2), що відрізняються за величиною хімічного зсуву. При цьому завдяки надлишку води та швидкому обміну протонами між ТФОКD1 і водою більша частина дейтронів у молекулах кислоти замінюється протонами. Хімічний зсув менш інтенсивного сигналу слабо залежить від температури і становить $\delta_H \approx 4$ м.ч. Він може бути віднесений до сигналу гідроксильних груп цукрів, які присутні в клітинному матеріалі у вигляді поживного середовища. Другий сигнал має істотно більшу величину хімічного зсуву, який збільшується при зниженні температури (вимержання води) від 6 до 8 м.ч. Враховуючи, що хімічний зсув чистої трифтороцтової кислоти $\delta_H = 11,5$ м.ч., можна зазначити, що сигнал 1 відноситься до тієї частини води, яка легко обмінюється протонами з молекулами ТФОК, що призводить до зростання величини δ_H . Ймовірно, ТФОК легко проникає в клітини через клітинні мембрани і її концентрація всередині і поза клітинами є близькою, що пояснює присутність тільки одного сигналу для внутрішньоклітинної та позаклітинної води.

Результати вивчення можливостей проникнення органічних речовин у клітини для їх концентрованої водної суспензії представлені на рис. 3, б, в. Хоча хлороформ у водних середовищах утворює окрему (більш важку) фазу, локалізовану в нижній частині посудини (вимірювальної ампули ЯМР), завдяки міжфазному переносу можна очікувати зв'язування деякої кількості хлороформу з гідрофобними центрами клітинної поверхні, а, можливо, і його розчинення в біліпідному шарі клітинних мембран. Ще значніше збільшення проникнення клітинних мембран можна очікувати при введенні в дисперсійне середовище ДМСО, який однаково добре розчиняється як у воді так і в хлороформі. При цьому можливе підвищення проникнення клітинних оболонок для молекул ТФОК і формування всередині клітин аддуктів, що містять різну її кількість.

Відповідно до даних, наведених на рис. 3, б, в, в спектрах з'являється кілька слабо інтенсивних сигналів з великими значеннями хімічного зсуву, ніж у суміші ТФОК- H_2O . Так на рис. 4 наведено спектри зразка, представленого на рис. 3, в при високій чутливості спектрометра при 240 К (рис. 4, а) і 280 К (рис. 4, б).

При 240 К більша частина присутньої в зразку води і цукру замерзає (рис.3, в). У спектрах крім загального сигналу ТФОК- H_2O фіксується сигнал при $\delta_H = 11,5$ м.ч., що відповідає сигналу практично не розбавленої водою ТФОК. З підвищенням температури даний сигнал зникає за рахунок прискорення протонного обміну з молекулами води. При $T = 280$ К спостерігається декілька сигналів з хімічними зсувами в діапазоні $\delta_H = 7-10$ м.ч. Вони також можуть бути віднесені до сигналів асоціатів ТФОК- H_2O , з різними

співвідношеннями концентрацій інгредієнтів. Найбільш вірогідним місцем локалізації цих асоціатів необхідно вважати нанорозмірні смуги всередині мікроорганізмів або зазори між контактуючими одна з одною клітинами.

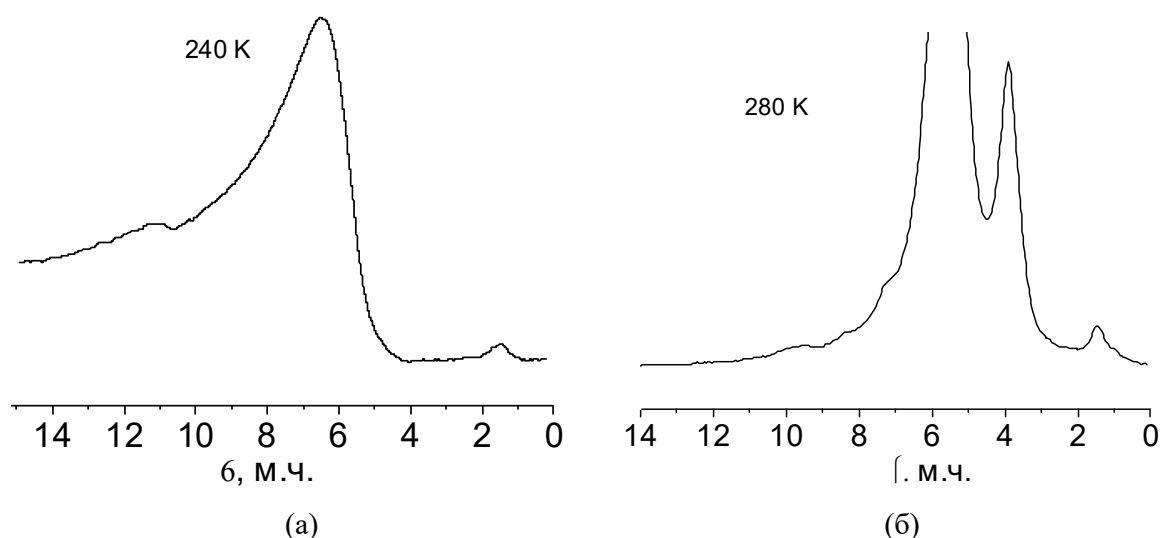


Рис. 4. Зняті при великому підсиленні спектри ^1H ЯМР водної суспензії молочнокислих бактерій з добавками CDCl_3 та ДМСО при температурі 240 К (а) і 280 К (б)

Графіки залежності зміни концентрації незамерзаючої води від температури та зміни вільної енергії Гіббса від концентрації незамерзаючої води в координатах $T(\Delta G)(C_{iw})$ наведено на рис. 5, а на рис. 6 – розподіл за радіусами кластерів незамерзаючої води і цукрів, розраховані відповідно до формули Гіббса – Томсона для вихідної клітинної суспензії та її композитів з нанокремнеземом (рис. 5, а та рис. 6, а), а також клітинних суспензій, що містять добавку ТФОК (рис. 5, б та рис 6, б, в). У відповідності з принципами, детально викладеними в [6 – 9], частина води, яка замерзає при $T > 260 \text{ K}$ ($\Delta G > -0,5 \text{ кДж/моль}$), може бути віднесена до слабозв’язаної (WBW) води, а інша частина – до сильнозв’язаної води (SBW). Характеристики шарів різних типів води наведені в табл. 1.

Можливість використання для водних розчинів ТФОК тих же способів розрахунку параметрів зв’язаної води, що і для вихідної водної суспензії, обумовлена тим, що замерзання компонентів розчину, як правило, відбувається шляхом спільної кристалізації компонентів у вигляді індивідуальних кристалів льоду і ТФОК. Тоді, в процесі нагрівання зразка, танення льоду відбувається при температурі, що відповідає радіусу кристаліту відповідно до формули Гіббса – Томсона. Лише після цього вода змішується з ТФУК, що розтанула і утворює розчин.

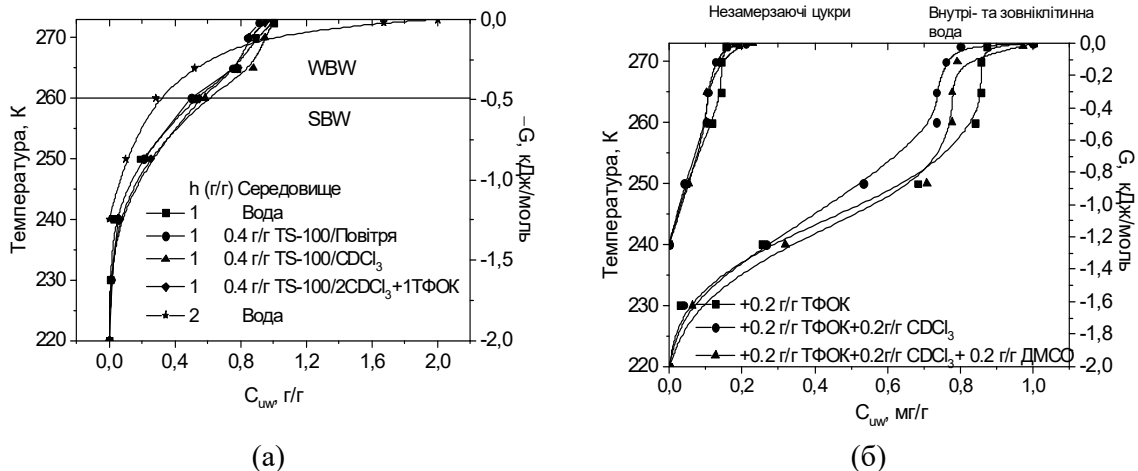


Рис.5. Температурні залежності концентрації незамерзаючої води та зміна вільної енергії Гіббса від концентрації незамерзаючої води в координатах $T(\Delta G)(C_{ufw})$ для водних суспензій клітин та їх композитів з кремнеземом TS-100 (а) і суспензій з додатками ТФОК (б)

Таблиця 3. Характеристики шарів незамерзаючої води в композитних системах на основі суспензій молочнокислих бактерій та нанокремнезему TS-100 і ТФОК

Середовище	h , г/г	C_{ufw}^s , г/г	C_{ufw}^w , г/г	ΔG_{max} , кДж/моль	γ_s , Дж/г
-	2	0,70	1,30	1,25	24,0
-	1	0,50	0,50	-2,0	31,2
TS-100	1	0,50	0,50	-2,0	30,2
TS-100/ $CDCl_3$	1	0,60	0,45	-2,0	33,9
TS-100/ $CDCl_3$ /ТФОК	1	0,53	0,47	-2,0	32,2
ТФОК	1	0,85	0,15	-2,0	41,9
ТФОК/ $CDCl_3$	1	0,72	0,28	-1,8	35,5
ТФОК/ $CDCl_3$ /ДМСО	1	0,75	0,25	-1,8	40,5

Формально описані в [6 – 9] методи визначення розподілу за радіусами кластерів можуть бути віднесені і до розчинених у воді речовин (в нашому випадку, цукрів). Так, в [13] було показано, що константи у формулі Гіббса – Томсона для речовин, що утворюють однотипні молекулярні комплекси досить близькі. Враховуючи, що як вода, так і цукри формують при заморожуванні кристалічну решітку, в якій гідроксильні групи беруть участь в утворенні водневих зв'язків із сусідніми молекулами, а їх кристалізація відбувається в одному температурному інтервалі (рис. 5, б), можна вважати, що для них константи в формулі 1 близькі.

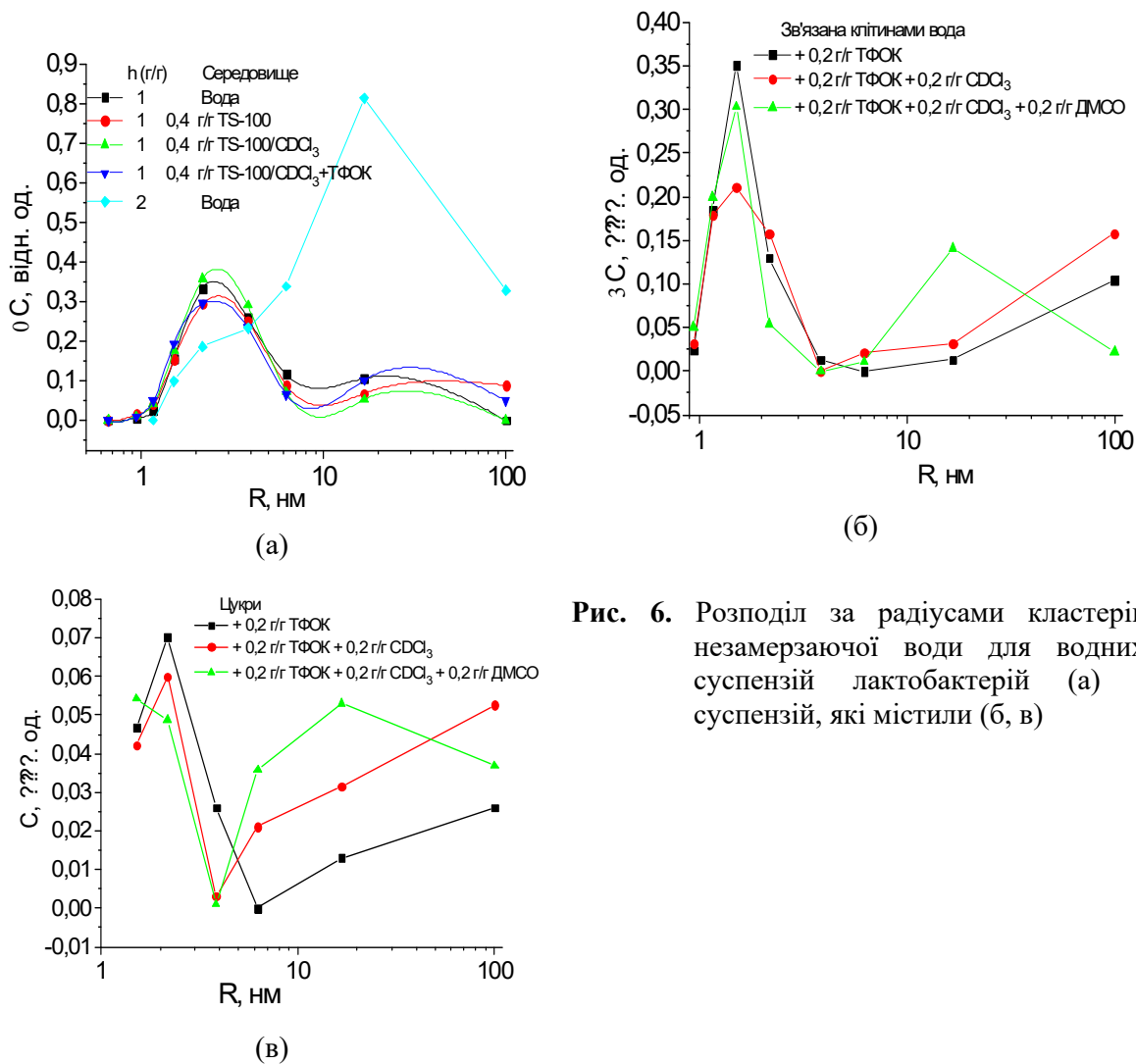


Рис. 6. Розподіл за радіусами кластерів незамерзаючої води для водних суспензій лактобактерій (а) і суспензій, які містили (б, в)

Як випливає з даних табл. 1, зведення суспензії приводить до значного збільшення вмісту слабозв'язаної води. Незважаючи на більшу кількість води в системі, міжфазна енергія (яка визначає сумарне зниження вільної енергії Гіббса води, обумовлене наявністю границь розділу фази з поверхнею клітин і внутрішньоклітинними структурами) при розбавленні зменшується. Це може бути пов'язано з утворенням в концентрованих суспензіях коллігативної клітинної структури, в якій клітини і оточуюча їх вода утворює в'язкий гель, чутливий до загальної кількості води.

При інкапсулюванні клітинної суспензії нанокремнеземом вплив хлороформу або суміші з ТФОК на параметри незамерзаючої води мінімальні. Зміна міжфазної енергії, змінюється в межах $\pm 3,5$ Дж/г, що близько до похибки її вимірювання. При цьому фіксуються близькі значення кількості сильнозв'язаної і слабозв'язаної води. Величина ΔG_{max} , яка показує зменшення вільної енергії в найближчому до границі розділу шарі адсорбованої води не перевищує - 2 кДж/моль.

У випадку, коли ТФОК присутня у воді, яка є для клітин дисперсійним середовищем, параметри зв'язаної клітинами води також слабо залежать від наявності органічних добавок. Ріст у присутності ТФОК міжфазної енергії, зв'язаної з клітинами води, може бути обумовлений вкладом від енергії сольватації води молекулами ТФОК.

При цьому для кристалізації води з розчину у вигляді чистого льоду повинна бути затрачена енергія, необхідна для виділення компонентів розчину.

Розподіл за радіусами кластерів води і цукрів у досліджуваних системах наведено на рис. 6. Для клітинної суспензії, інкапсульованої нанокремнеземом (рис. 6, а), на розподілах спостерігаються два максимуми при $R = 2$ і 20 нм. Розведення суспензії супроводжується значним ростом більших і зменшенням малих кластерів зв'язаної води. Це також свідчить про можливість руйнування при розведенні клітинного гелю. Органічні добавки слабо впливають на розмір кластерів зв'язаної води, що, ймовірно, пов'язано з утрудненням їх проникнення до клітини.

Для клітинних суспензій, що містять ТФОК (рис. 6, б, в), вигляд розподілу істотно змінюється. Для води, зв'язаної з клітинами, характерна наявність максимуму при $R = 2$ нм. Значна частина води входить також до складу об'ємних кластерів з $R > 10$ нм. Наявність спільних рис у розподілах за радіусами кластерів води і цукрів дозволяє припускати, що умови формування обох кластерних систем подібні. Ймовірно, по мірі замерзання води та формування нанорозмірних кристалів льоду поблизу них відбувається утворення близьких за розміром кристалів цукру

Метод диференціальної скануючої калориметрії може ефективно використовуватися для визначення величини теплових ефектів фазових переходів в ізобаричних умовах [16, 17]. На рис. 7, а, б наведено дані ДСК-вимірювань ліофілізованих зразків лактобактерій, що містять різну кількість води, яка додавалась порціями до сухого порошку біоматеріалу. У вихідному клітинному матеріалі та матеріалі, що містить менше 0,3 г/г H_2O , теплові ефекти її плавлення і кристалізації в циклі заморожування-танення не фіксуються. Це свідчить про те, що вся діюча в клітинах вода знаходиться у вигляді окремих адсорбованих молекул, або невеликих кластерів, не здатних трансформуватися у фазу гексагонального льоду, для якого тепловий ефект фазового переходу становить близько 330 Дж/г. Для зразка, що містить 0,3 г/г води на криві заморожування (рис. 7, а), з'являється екзотермічний пік, максимум якого відповідає $T = 220$ К. З ростом концентрації води цей пік зміщується в область більш високої температури, а його інтенсивність зростає. При $C_{H_2O} = 0,7$ г/г на термограмі з'являється другий пік, зміщений відносно основного в область більш низьких температур.

Криві танення зразків (рис. 7, б) істотно відрізняються від кривих замерзання. Два максимуми на кривих залежності теплового потоку від температури спостерігаються для всіх зразків при $C_{H_2O} \geq 0,3$ г/г, максимуми теплового ефекту зміщуються в область більш високих температур і різниця між положеннями максимумів менш чутлива до вмісту води в зразках. У таблиці 2 наведено значення теплового ефекту, розрахованого за площею екзотермічного (замерзання) та ендотермічного (танення) піків. Теплові ефекти віднесені до загальної кількості води в зразках. При цьому припускали, що для вимірювання використовували сухі порошки клітинного матеріалу. При повторному проведенні процесу заморожування-танення (при $C_{H_2O} = 0,5$ г/г), теплові ефекти фазового переходу змінюються не більше, ніж на 15 %.

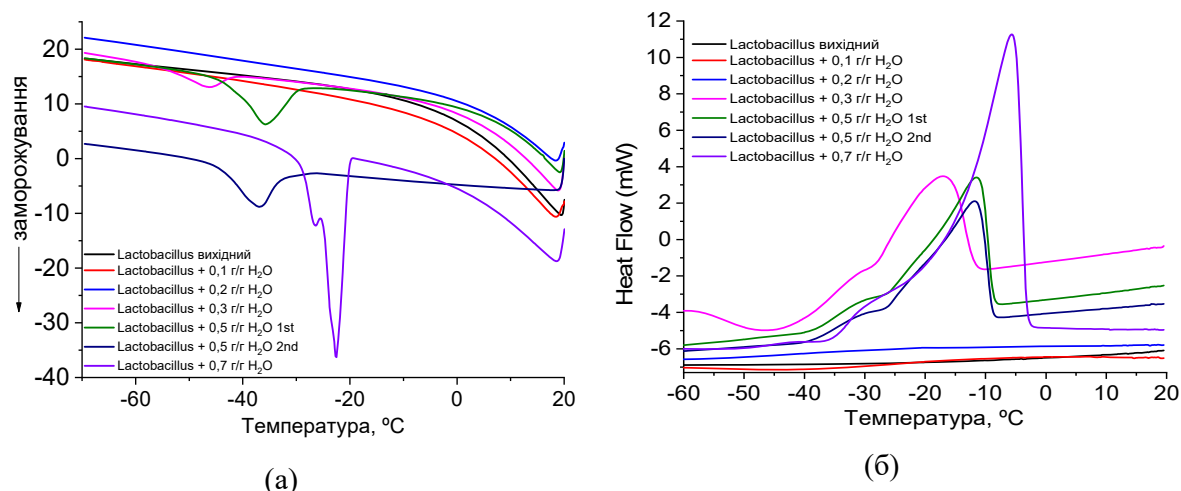


Рис. 7. Термограми замерзання (а) і танення (б) зразків ліофілізованих лактобактерій, які мітять різну кількість внутрішньоклітинної води

Таблиця 1 Теплові ефекти замерзання і танення клітинної маси лактобактерій, які містять різну кількість зв'язаної води

	СН ₂ O г/г	Площа mW grad	ΔН мДж	ΔН/м(Н ₂ O) Дж/г	m _{пр} /м(Н ₂ O) мг
заморожування	0,3	-15,35	-91,4	-16,2	18,807/5,642
	0,5 1	-67,7	-405	-69,3	11,686/5,843
	0,5 2	-57,9	-347	-59,4	11,686/5,843
	0,7	-13,5; -161,8	-80,8; -968	-17,4; -208,44	15,408/4,644
нагрівання	0,3	18,2; 73,8	109; 441,9	19,3; 78,3	18,807/5,642
	0,5 1	13; 76,2	77,8; 456,3	13,31; 78,1	11,686/5,843
	0,5 2	12; 71,6	71,8; 428,7	12,29; 73,4	11,686/5,843
	0,7	21; 168,7	125,7; 1010	27,1; 217,5	15,408/4,644

Різниця у величинах теплових ефектів заморожування і танення може бути обумовлена декількома причинами. Однією з головних є схильність води до переохолодження, що зумовлено відсутністю достатньої кількості центрів кристалізації. Здатність до переохолодження зберігається і для зв'язаної води в обмеженому просторі пористих твердих тіл [18,19]. Крім того, заморожування клітинних об'єктів, що містять воду, може супроводжуватися переміщенням води через клітинні мембрани, параметри якого можуть відрізнятися в процесах заморожування і танення. Для лактобактерій слід також враховувати присутність в ліофілізованому клітинному матеріалі значної кількості цукру (рис. 3 – 5), концентрація розчину яких залежить від наявності переохолодженої води. По мірі зростання кількості внутрішньоклітинної води сумарна величина теплового ефекту наближається до температури плавлення чистого льоду, хоча і не досягає цієї величини. Таким чином, різниця у величині теплового ефекту танення внутрішньоклітинної води від теплоти плавлення льоду дає можливість оцінити частину води, що знаходиться в незамерзаючому стані.

Наявність двох максимумів на термограмах може бути обумовлено тим, що при відносно високих температурах вода входить до складу розчину цукру (а можливо й інших низькомолекулярних речовин). Основна частина цукру вимерзає при $T > 230$ K (рис. 7). Тому можна очікувати, що низькотемпературний пік пов'язаний з переважним замерзанням (плавленням) чистої води, яка входить до складу кластерів або невеликих доменів

У композитних системах, приготовлених шляхом перетирання частково зволжених лактобактерій та нанокремнезему, формуються компактні частинки, в яких клітини або клітинні агрегати взаємодіють з органомінеральними частинками. Можна вважати, що практично вся вода знаходиться всередині клітин і зв'язується з біополімерними структурами. Вигляд термограм танення композитів, що відрізняються вмістом органомінеральної фази (рис. 8) близький до аналогічних термограм вихідних лактобактерій (рис. 7, б). На них фіксуються два максимуми, що відповідають температурам 240-248 К і 251-263 К, які можуть бути віднесені до процесів танення кластерів міжфазної води, і водного розчину цукру, відповідно. Теплові ефекти танення речовин, віднесені до одиниці маси, наявної у зразку води (0,5 г/г), наведені в табл. 2.

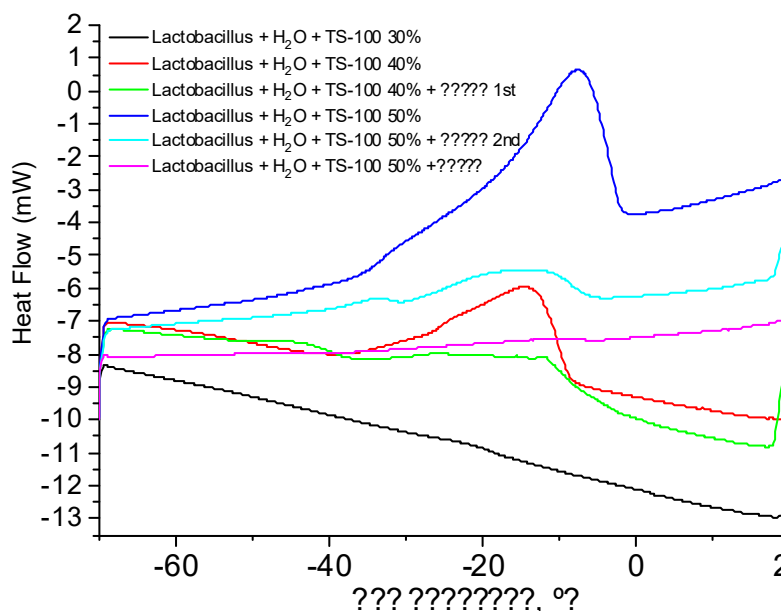


Рис. 8. Термограма танення композиту ліофілізованих лактобактерій та нанокремнезему, що відрізняються вмістом органомінеральної фази

Згідно з даними рис. 8 і табл. 2 присутність нанокремнезему призводить до значного зменшення ендотермічного теплового ефекту танення внутрішньоклітинної води, а саме всередині клітин зростає частка води, що залишається в незамерзаючому стані. Максимальний ефект спостерігається для зразка, що містить 0,3 г/г нанокремнезему і зменшується зі збільшенням кількості органомінеральної фази.

Таблиця 2. Теплові ефекти процесу танення композитних систем на основі лактобактерій та нанокремнезему

C_{Dec} г/г	C_{TS-100} г/г	$\Delta H / T_{max}$ (Дж/г)/К		$m_{pr}/m(H_2O)$ мг
0	0,30		28,1/251	3,30/0,925
0	0,40		21,5/243	10,28/2,83
0,2	0,40	21,6/230	41,4/248	57,7/263
0	0,50		25,9/243	148,9/263
0,2	0,50		20,2/240	48,3/260
0,2 змішані	0,50	1,16 /230	5,21/248	9,14/263

Додавання до композитної системи рідкої неполярної речовини також впливає на стан води в композиті. В експериментах ДСК використовували *n*-декан, який на відміну від хлороформу має низьку летючість і замерзає при відносно більш високій температурі ($T_f = 230$ К). У присутності 0,2 г/г декану при $T = 230$ К на термограмах з'являється ендотермічний пік плавлення декану (рис. 8), інтенсивність якого невелика, що свідчить про відносно невелику його частку, не зв'язаного з клітинною та органомінеральною компонентами композиту.

Теплові ефекти танення води в композитній системі, створеній на основі лактобактерій і нанокремнезему, виявилися чутливими до способу приготування. Так, якщо до клітинної маси, що містить 0,5 г/г адсорбованої води перемішати, а потім додати *n*-декан, то на термограмі практично відсутній пік декану, який розмерзається, а сумарний тепловий ефект танення води становить 68,5 Дж/г (табл. 3). Якщо ж декан додати до порошку нанокремнезему, а потім перемішати з частково зволоженою клітинною масою, то величина піків танення води істотно зменшується, а тепловий ефект становить лише 14,36 Дж/г (останній рядок в табл. 3).

Таким чином, клітини лактобактерій можуть утворювати з частинками нанокремнезему компакту композитну систему, в якій тверді частинки значно впливають на стан внутрішньоклітинної води. Таким чином, частинки кремнезему TS-100 не є інертними по відношенню до клітин і багато в чому визначають процеси, які відбуваються в клітині навіть у тому випадку, коли клітини знаходяться в стані анабіозу, а їх життєдіяльність максимально заторможена. Зменшення в присутності частинок нанокремнезему кількості води, яка здатна кристалізуватися у вигляді гексагонального льоду, може слугувати основою використання нанокремнеземів для запобігання пошкодженню клітин у процесі їх кріоконсервації.

Висновки

Показано, що спектральні параметри води в концентрованих клітинних суспензіях молочнокислих бактерій значно залежать від концентрації суспензій, що, ймовірно, пов'язано з можливістю формування стабільного клітинного гелю, який без його руйнування може бути інкапсульований частинками нанокремнезему TS-100 як у повітряному середовищі, так і в середу хлороформу з добавкою трифтороцтової кислоти. При цьому органічні компоненти погано проникають в клітини. Ймовірно, це пов'язано з формуванням навколо клітин або їх агрегатів капсули, яка містить повітря, що затрудняє проникнення молекул середовища у водну клітинну суспензію.

У відносно розбавлених водних суспензіях і в концентрованих суспензіях, що містять добавку ТФОК та не містить нанокремнезему, зв'язана клітинами вода і присутні в розчині цукру спостерігаються в ^1H ЯМР-спектрах у вигляді двох роздільних сигналів, з хімічними зсувами 4 і 6-7 м.ч., відповідно, що дозволяє визначити термодинамічні параметри води і кластерну структуру води і цукру. Показано, що на кривих розподілу за радіусами кластерів незамерзаючої води присутні два максимуми, що відповідають $R = 2$ і 20-100 нм.

На ДСК-термограмах лактобактерій величина теплового ефекту, віднесена до кількості зв'язаної води, значно менше теплового ефекту плавлення льда, що зв'язано з наявністю значної кількості незамерзаючої води.

Література

1. *Franks F.* Biophysics and biochemistry at low temperature. Cambridge: University Press. – 1985. – 210 p

2. Кулешова Л. Г., Коваленко И.Ф. Теоретическое прогнозирование оптимальных скоростей охлаждения клеточных суспензий // Вестник Харьковского национального университета. Биофиз. вестник. – 2008. – Вип. 20(1). – С. 56–64.
3. Осецкий А. И., Кирилюк А. Л., Гурина Т. М. О возможном механизме повреждения криоконсервируемых биологических объектов за счет пластической релаксации давлений в замкнутых жидкофазных включениях // Проблемы криобиологии. – 2007. – Т.17, № 3. – С. 272–281.
4. Кривохарченко А.С., Серобян Г.А., Садовников В.Б. Криоэмбриобанки – перспективная технология консервации генетических ресурсов лабораторных, домашних и диких животных для практического использования. Труды IV Международной конференции и дискуссионный научный клуб. Украина, Крым, Ялта-Гурзуф: "IT+ME'98". – 1998. – Т.1. – С.380–383.
5. Хофманн Н., Бернеманн И., Погожих Д., Гласмахер Б. Разработка системной оптимизации протоколов криоконсервирования клеточных суспензий // Проблемы криобиологии. – 2011. – Т.21, № 4. – С. 353–363.
6. Цыренов В.Ж. Основы биотехнологии: культивирование клеток человека и животных // Издательство ВСГТУ Улан-Удэ. – 2005. – 49 с.
7. Fakhrullin R. F., Minullina R. T. Hybrid Cellular–Inorganic Core–Shell Microparticles: Encapsulation of Individual Living Cells in Calcium Carbonate Microshells // Langmuir. – 2009. – V.25 (12). – P 6617–6621
8. Гунько В.М., Туров В.В., Горбик П.П. Вода на межфазной границе. – Киев: Наукова думка. 2009. – 694 с
9. Gun'ko V.M., Turov V.V. Nuclear Magnetic Resonance Studies of Interfacial Phenomena // Boca Raton: CRC Press, 2013. – 1040 p.
10. Туров В.В., Гунько В.М. Кластеризованная вода и пути ее использования. – Киев, Наукова думка, 2011. – 316 с.
11. Gun'ko V.M., Turov V.V., Bogatyrev V.M., Zarko V.I., Leboda R., Goncharuk E.V., Novza A.A., Turov A.V., Chuiko A.A. 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. – 400 с.
15. Pople J.A., Schneider W.G., Bernstein H.J. High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance. // New York-Toronto-London: McGraw-Hill Book Company, JNC. – 1959. –P. 165–180.
16. Höhne G., Hemminger W., Flammersheim H.-J. Differential Scanning Calorimetry: An Introduction for Practitioners // Springer-Verlag. – 1996. – 222 p.
17. Reading. M. Hourston D.J. Modulated Temperature Differential Scanning Calorimetry: Theoretical and Practical Applications in Polymer Characterisation // Springer Science & Business Media. – 2006 – 328 p.
18. Faraone A., Liu L., Mou C.-Y., Shih P.-C., Copley JRD, Chen S.-H. Translational and rotational dynamics of water in mesoporous silica materials: MCM-41-S and MCM-48-S // J. Chem. Phys. –2003. – V.119. – P. 3963–3971.
19. Liu L., Faraone A., Mou C.-Y., Shih P.-C. and Chen S.-H. Slow dynamics of supercooled water confined in nanoporous silica materials // J. Phys.: Condens. Matter. – 2004. – V. 16. – S5403 – S5436.

References

1. Franks F. *Biophysics and biochemistry at low temperature*. (Cambridge: University Press, 1985).
2. Kuleshova L. G., Kovalenko I. F. Theoretical Prediction of Optimal Cooling Rates of Cell Suspensions Bulletin of Kharkov National University. Biophys. messenger. 2008. **20**(1): 56. [in Russian].
3. Osetsky A. I., Kirilyuk A. L., Gurina T. M. On a possible mechanism of damage to cryopreserved biological objects due to plastic pressure relaxation in closed liquid-phase inclusions. *Problems of cryobiology*. 2007. **17**(3): 272. [in Russian].
4. Krivoharchenko A.S., Serobyanyan G.A., Sadovnikov V.B. Cryoembryobanks are a promising technology for the conservation of genetic resources of laboratory, domestic and wild animals for practical use. Proceedings of the IV International Conference and discussion scientific club. Ukraine, Crimea, Yalta-Gurzuf: "IT+ME'98". 1998. **1**: 380. [in Russian].
5. Hofmann N., Bernemann I., Pogozhikh D., Glasmacher B. Development of systemic optimization of cell suspension cryopreservation protocols. *Problems of cryobiology*. 2011. **21**, (4): 353. [in Russian].
6. Tsyrenov V.Zh. Fundamentals of Biotechnology: Cultivation of Human and Animal Cells. (Publishing house of ESGTU Ulan-Ude. 2005). [in Russian].
7. Fakhru'llin R. F., Minullina R. T. Hybrid Cellular–Inorganic Core–Shell Microparticles: Encapsulation of Individual Living Cells in Calcium Carbonate Microshells. *Langmuir*. 2009. **25** (12): 6617.
8. Gun'ko V.M., Turov V.V., Gorbik P.P. *Water at interface*. (Kiev: Naukova dumka. 2009). [in Russian].
9. Gun'ko V.M., Turov V.V. *Nuclear Magnetic Resonance Studies of Interfacial Phenomena*. (Boca Raton: CRC Press, 2013).
10. Turov V.V., Gun'ko V.M. *Clustered water and ways of its application*. (Kiev: Naukova dumka, 2011). [in Russian].
11. Gun'ko V.M., Turov V.V., Bogatyrev V.M., Zarko V.I., Leboda R., Goncharuk E.V., Novza A.A., Turov A.V., Chuiko A.A. 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. Course of colloid chemistry. Surface phenomena and disperse systems. (Moscow: Chemistry. 1982). [in Russian].
15. Pople J.A., Schneider W.G., Bernstein H.J. High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance. *New York-Toronto-London: McGraw-Hill Book Company, JNC*. 1959: 165.
16. Höhne G., Hemminger W., Flammersheim H.-J. Differential Scanning Calorimetry: An Introduction for Practitioners. (Springer-Verlag. 1996)
17. Reading. M. Hourston D.J. Modulated Temperature Differential Scanning Calorimetry: Theoretical and Practical Applications in Polymer Characterisation. (Springer Science & Business Media. 2006).
18. Faraone A., Liu L., Mou C.-Y., Shih P.-C., Copley JRD, Chen S.-H. Translational and rotational dynamics of water in mesoporous silica materials: MCM-41-S and MCM-48-S. *J. Chem. Phys.* 2003. **119**: 3963.
19. Liu L., Faraone A., Mou C.-Y., Shih P.-C. and Chen S.-H. Slow dynamics of supercooled water confined in nanoporous silica materials. *J. Phys.: Condens. Matter*. 2004. **16**: S5403.

PROPERTIES OF COMPOSITE SYSTEMS BASED ON SUSPENSIONS OF *LACTOBACILLUS* AND SILICA

Krupska T.V.¹, Turov V.V.¹, Tsapko M.D.², Skubyshevskaya-Ziemba J.³, Charmas B.³

¹*Chuiko Institute of Surface Chemistry National Academy of Sciences of Ukraine,,
Kyiv 03164, 17 General Naumov Str., Kyiv, Ukraine*

²*Taras Shevchenko National University of Kyiv,
Kyiv 01033, 60 Volodymyrska Str., Kyiv, Ukraine*

³*Faculty of Chemistry, Maria Curie-Skłodowska University, 20-031 Lublin, Poland*

Low-temperature ¹H NMR spectroscopy and DSC methods were used to study the hydration process of Lactobacillus, the influence of a weakly polar organic environment on it, and the encapsulation of cells with silica and the possibility of penetration of such an active substance as trifluoroacetic acid (TFAA) into them.

It is shown that the spectral parameters of water in concentrated cell suspensions of Lactobacillus significantly depend on the concentration of the suspensions, which is probably related to the possibility of forming a stable cell gel, which can be encapsulated by silica particles both in the air environment and in the environment without its destruction chloroform with the addition of trifluoroacetic acid. There are two maxima corresponding to $R = 2$ and 20-100 nm on the distribution curves of the radii of clusters of unfreezing water. The contribution to the distribution of the second maximum increases with increasing water concentration. On the DSC-thermograms of lactobacilli, the value of the thermal effect related to the amount of bound water is much smaller than the thermal effect of ice melting, which is due to the presence of a significant amount of non-freezing water.

Keywords: *Lactobacillus, encapsulation, silica, bound water, ¹H NMR spectroscopy, DSC*