

PACS numbers: 76.60.-k, 81.07.Nb, 82.39.Rt, 82.56.-b, 87.80.Lg, 92.20.jb, 92.20.jp

## Состояние воды в зооглее тибетского молочного гриба и влияние на него жидкого полидиметилсилоксана

Т. В. Крупская

*Институт химии поверхности им. А. А. Чуйко НАН Украины,  
ул. Генерала Наумова, 17,  
03164 Киев, Украина*

Методом низкотемпературной  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопии изучено состояние воды в зооглее тибетского молочного гриба с разной степенью его гидратированности ( $h$ , г/г) в воздушной среде и при контакте с полидиметилсилоксаном ПДМС-1000, молекулы которого могут проникать в межклеточные зазоры зооглеи, уменьшая межклеточные взаимодействия. Показано, что максимальная гидратированность симбионта составляет  $h = 32$  г/г (сухого вещества), а вода находится в виде полиассоциатов (кластеров или доменов) сильно- и слабоассоциированной воды.

Методом низкотемпературної  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопії вивчено стан води в симбіонті тибетського молочного гриба з різним ступенем гідратації ( $h$ , г/г) у повітряному середовищі та при контакті з полідиметилсилоксаном ПДМС-1000, молекули якого можуть проникати в міжклітинні щілини зооглеї, зменшуючи міжклітинні взаємодії. Показано, що максимальна гідратованість симбіонта складає  $h = 32$  г/г (сухої речовини), а вода знаходиться у вигляді поліасоціатів (кластерів або домен) сильно- та слабоасоційованої води.

The structure of the hydration layers of water bonded in the symbiont Tibetan kefir grains with a different degree of its hydration ( $h$ , g/g) in the air medium and in a contact with polydimethylsiloxane PDMS-1000, whose molecules can penetrate into the intercellular gaps of zoogloea, reducing cell-cell interactions, is studied by the low-temperature  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. As shown, the maximum hydration symbiont is  $h = 32$  g/g (dry matter), and the water is in the form of polyasociates (clusters or domains) formed by the weakly and strongly associated water.

**Ключевые слова:** тибетский молочный гриб, низкотемпературная  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопия, сильно- и слабосвязанная вода, полидиметилсилоксан.

**Ключові слова:** тибетський молочний гриб, низькотемпературна  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопія, сильно- та слабозв'язана вода, полідиметилсилоксан.

**Key words:** Tibetan kefir grains, low-temperature  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy, strongly and weakly bound water, silicon oil.

*(Получено 17 ноября 2019 г.; после доработки — 27 ноября 2019 г.)*

## 1. ВВЕДЕНИЕ

Зооглея представляет собой симбиоз дрожжевого грибка с уксуснокислыми бактериями, которые характеризуются функциональной специализацией слагающих их клеток. Соединяясь, клетки бактерий образуют студенистые гелеобразные массы или плёнки. Клетки, формирующие зооглею, имеют ряд преимуществ совместного способа сосуществования, таких как повышенная устойчивость к антибактериальным агентам, более эффективного использования питательных субстратов, особенно в условиях пространственно ограниченных экологических ниш, включая организм многоклеточного животного (растения) как хозяина [1–4]. Как и в любом геле, его стабильность и энергия взаимодействия отдельных элементов (биополимеров и клеток) определяется строением воды, которая практически вся находится в связанном состоянии, т.е. входит в состав полиассоциатов, локализованных как внутри клеток, так и в межклеточной среде. В перспективе создание эффективных методов воздействия на структуру воды в гелеобразных веществах, содержащих клеточные колонии, может открыть новые механизмы управления процессами жизнедеятельности клеток и надклеточных образований, что найдёт применение во многих биотехнологических процессах.

Вода является естественной средой функционирования зооглеи. Поэтому целью настоящей работы было изучение связывания воды зооглеей тибетского молочного гриба и определение строения водных полиассоциатов в исходном состоянии и в присутствии биологически инертного вещества — полидиметилсилоксана, который моделировал участие жиров и жирных кислот, присутствующих в молочных и кисломолочных продуктах в виде жировой эмульсии.

Эффективным методом изучения состояния воды в биологических объектах является метод низкотемпературной  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопии, который позволяет определять концентрацию незамерзающей (связанной) воды, находящейся как внутри микроорганизмов, так и взаимодействующей с поверхностью надклеточного матрикса, в температурном интервале 200–273 К [8–10]. Предполагая, что замерзание (таяние) полиассоциатов внутриклеточной воды определяется их линейными размерами, в соответствии с урав-

нением Гиббса–Томсона [11–13], на основании зависимостей изменения концентрации незамерзающей воды от температуры, её замерзания могут быть рассчитаны распределения по радиусам кластеров (нанокпель) связанной воды. При этом кластерами воды можно считать полиассоциаты, радиус которых не превышает 2 нм. В противном случае водные полиассоциаты содержат тысячи молекул воды и их можно характеризовать как домены незамерзающей воды.

## 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Материалы.** Использовалась культура тибетского молочного гриба, полученная при сквашивании цельного молока в течение суток при температуре 298 К, которая имеет вид тканеподобного образования, где отдельные микроорганизмы связаны межклеточными взаимодействиями. Для приготовления образца гриб промывался большим количеством дистиллированной воды, помещался на фильтровальную бумагу и подсушивался при нормальных условиях в течение 1 часа. Количество воды в образце, определённое весовым методом путём выдерживания при 380 К в течение часа, показало, что сухой остаток клеточной массы составлял 3 масс. %.

ЯМР-измерения проводились в стандартных 5 мм ампулах. Использовался ПДМС-1000 (Oxane 1000) производства, Bausch&Lomb (США). Для приготовления образцов, содержащих ПДМС-1000 и навеску, зооглеи смешивали с определённым количеством силикона. Всё это тщательно перемешивали до образования максимально однородной массы.

**Микрофотографирование** порошков и эмульсий проводили с помощью микроскопа Primo Star (Carl Zeiss, Германия) при увеличении  $\times 400$  и  $\times 1000$  с использованием иммерсии.

**ЯМР-спектроскопия.** Спектры ЯМР снимали на ЯМР-спектрометре высокого разрешения (Varian ‘Mercury’) с рабочей частотой 400 МГц. Использовали восемь  $60^\circ$  зондирующих импульсов, длительностью 1 мкс при ширине полосы 20 кГц. Температура в датчике регулировалась термоприставкой Bruker VT-1000 с точностью  $\pm 1$  град. Интенсивности сигналов определялись путём измерения площади пиков с использованием процедуры разложения сигнала на его составляющие в предположении гауссовской формы сигнала и оптимизации нулевой линии и фазы с точностью, которая для хорошо разрешённых сигналов была не ниже 5%, а для перекрывающихся сигналов  $\pm 10\%$ . Для предотвращения переохлаждения воды в исследуемых объектах, измерения концентрации незамерзающей воды проводили при нагревании образцов, предварительно охлаждённых до температуры 210 К. Температурные зависимости интенсивности сигналов ЯМР проводили в автоматизиро-

ванном цикле, когда время выдерживания образца при постоянной температуре составляло 9 мин, а время измерения — 1 мин.

В качестве основного параметра, определяющего структуру сетки водородных связей воды, использовалась величина химического сдвига протонов ( $\delta_H$ ). Предполагалось, что вода, в которой каждая молекула участвует в формировании четырёх водородных связей (двух за счёт протонов и двух за счёт неподелённых 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) — химический сдвиг  $\delta_H = 1-1,5$  м.д. [8–10].

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 [8, 13]:

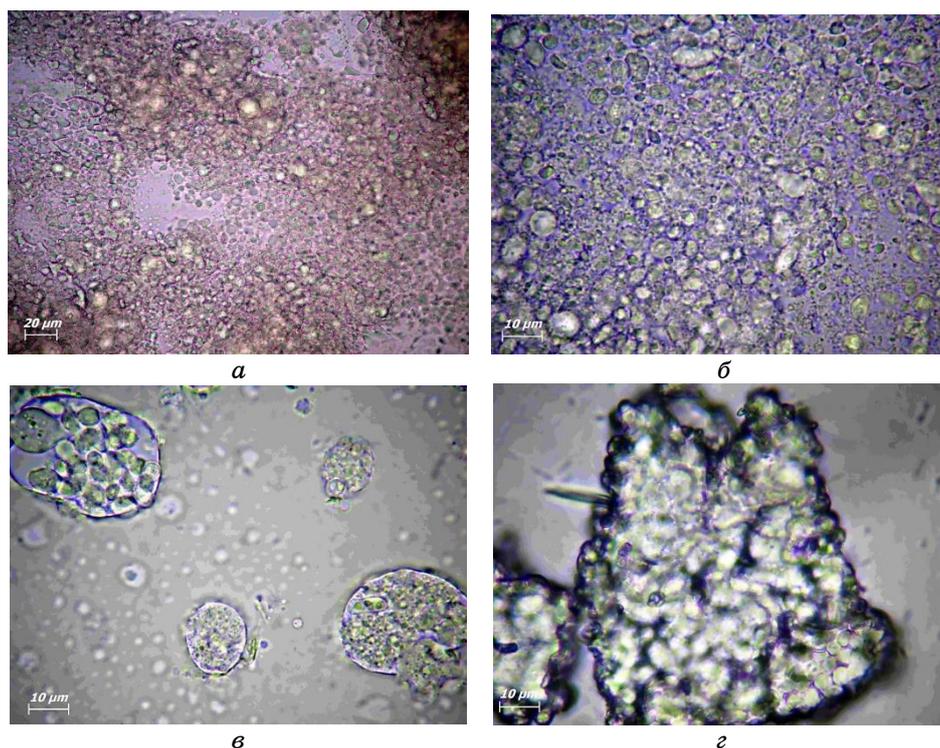
$$\Delta T_m = T_m(R) - T_{m,\infty} = \frac{2\sigma_{sl}T_{m,\infty}}{\Delta H_f \rho R}, \quad (1)$$

где  $T_m(R)$  — температура плавления льда, локализованного в порах радиуса  $R$ ,  $T_{m,\infty}$  — температура плавления объёмного льда,  $\rho$  — плотность твёрдой фазы,  $\sigma_{sl}$  — энергия взаимодействия твёрдого тела с жидкостью и  $\Delta H_f$  — объёмная энтальпия плавления. Для практического использования уравнение (1) можно применять в виде  $\Delta T_m = k/R$ , где константа  $k$  для многих гетерогенных систем, содержащих воду, близка к 50 град·нм [9]. Методика проведения ЯМР-измерений и способов определения радиусов кластеров межфазной воды подробно описана в [8–10].

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

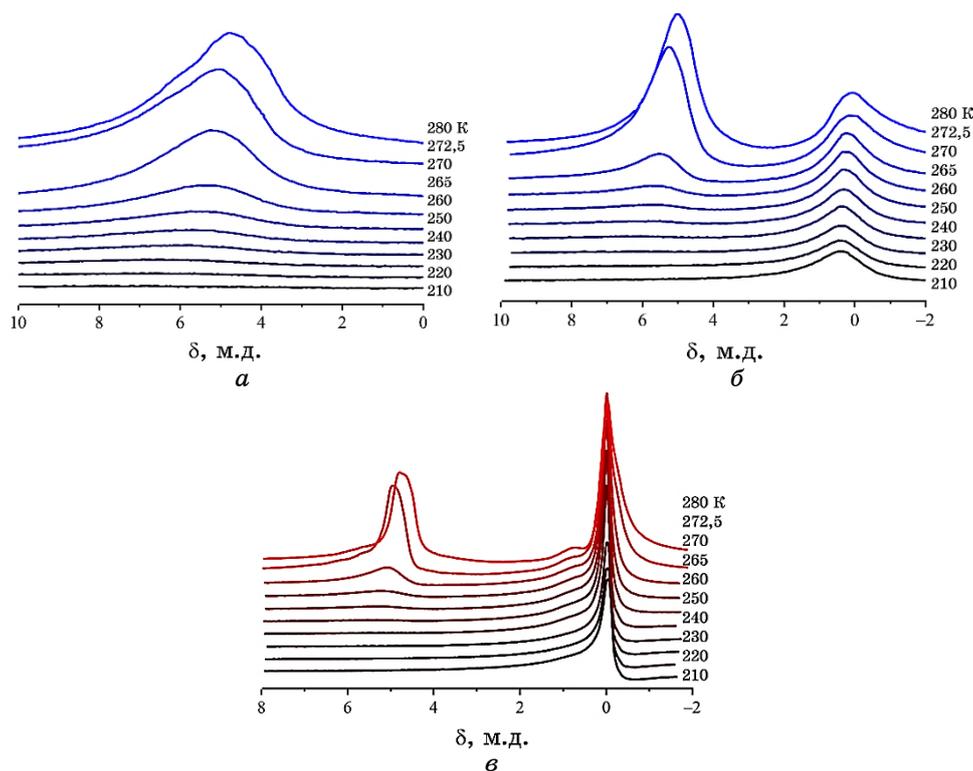
Микрофотографии тибетского молочного гриба исходного и при добавлении ПДМС-1000, приведены на рис. 1. В процессе смачивания силиконом происходит некоторое набухание всей массы зооглеи без распада на отдельные клеточные образования (рис. 1, а). При избытке ПДМС-1000 часть клеток переходит в силикон в виде одиночных клеток или их совокупность (рис. 1, б), что может свидетельствовать о возможной связи силикона со слизью, образованной сообществом микроорганизмов и выходом её вместе с клетками с пустот матрикса зооглеи.

Снятые при разных температурах спектры  $^1\text{H}$  ЯМР образцов клеточной массы молочного гриба, содержащего 97 масс.% воды на воздухе (а) и с добавлением 30% полидиметилсилоксана ПДМС-1000 (б) приведены на рис. 2.



**Рис. 1.** Микрофотографии симбионта тибетского молочного гриба, полученные при увеличении  $\times 400$  (*a*) и  $\times 1000$  (*б*, *в*, *г*) для образца, содержащего 32 г/г воды на воздухе (*a*, *б*) и с добавлением силикона (*в*, *г*).<sup>1</sup>

Появление фазы силикона приводит к определённым изменениям в надклеточной структуре зооглеи и переходу в фазу силикона некоторого количества клеток или их агрегатов. Вода наблюдается в виде широкого сигнала, интенсивность которого уменьшается с понижением температуры ввиду частичного замерзания связанной воды, а химический сдвиг протонов ( $\delta_H$ ) увеличивается от  $\delta_H = 5$  м.д. при  $T = 280$  К до  $\delta_H = 6$  м.д. при  $T = 220$  К.  $\delta_H$  воды определяется средним числом водородных связей, в которых участвует каждая молекула воды. В частности, установлено [9], что для мономеров воды (газовая фаза или раствор в среде слабополярных органических растворителей) характерен химический сдвиг  $\delta_H = 1-1,5$  м.д. С другой стороны для тетракоординированной воды во льду найдено, что  $\delta_H = 7$  м.д. Тогда в соответствии с принципами, изложенными в [9], можно считать воду, имеющую химический сдвиг  $\delta_H < 2$  м.д. слабоассоциированной. Жидкая вода относится к сильноассоциированным жидкостям, где среднее число водородных связей, в которых участвует каждая молекула, составляет 2–5–3. Величина  $\delta_H$



**Рис. 2.** Снятые при разных температурах спектры  $^1\text{H}$  ЯМР клеточной массы молочного гриба, содержащего 97 мас.% воды, исходного (а) и с добавлением ПДМС-1000 при соотношениях концентраций 2:1 (б) и 1:3 (в).<sup>2</sup>

воды, присутствующей в зооглеи тибетского молочного гриба ( $\delta_{\text{H}} = 4,5\text{--}5$  м.д.), свидетельствует о том, что вода находится в сильноассоциированном состоянии, аналогичном состоянию жидкой воды. Несколько большие, чем для жидкой воды, значения химического сдвига позволяют полагать высокую упорядоченность связанной воды.

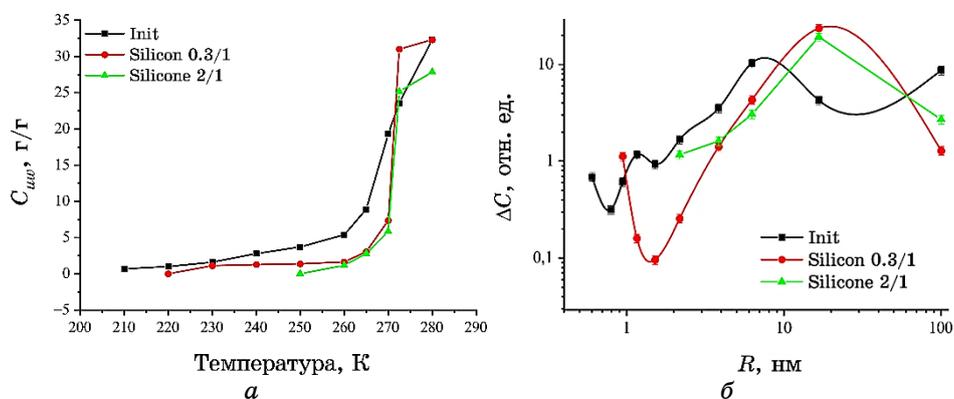
В присутствии 30% силикона (рис. 2, б), в спектрах появляется сигнал метильных групп ПДМС при  $\delta_{\text{H}} = 0$  м.д., а температурная область, в которой регистрируется сигнал воды, заметно сужается. Этот эффект усиливается с ростом доли силикона в образце (рис. 2, в). Дополнительно в спектрах появляется сигнал воды в области  $\delta_{\text{H}} \approx 1$  м.д., который может быть обусловлен слабоассоциированной водой, образующейся на межфазной границе биоматериала с гидрофобной средой [8–10]. Следует отметить, что в этой же спектральной области можно ожидать сигнал протонов от метильных и метиленовых групп алифатических фрагментов, которые состав-

ляют основу фосфолипидных клеточных мембран. Однако, ввиду малого количества сухого материала в клеточной массе и относительно большой интенсивности сигнала, которая соответствует 6 г протонсодержащего вещества на 1 г клеточной массы, можно отнести наблюдаемый сигнал к слабоассоциированной воде.

Поскольку интенсивность сигнала воды в спектрах  $^1\text{H}$  ЯМР до замораживания образца (или после его оттаивания) определяется всей присутствующей в образце водой (которая может быть измерена весовым методом), по изменению интенсивности сигнала с температурой легко могут быть рассчитаны значения концентрации незамерзающей воды для каждой температуры в процессе нагревания образца от 210 до 280 К.

Зависимости концентрации незамерзающей воды от температуры представлены на рис. 3, а, а на рис. 3, б — рассчитанные в соответствии с уравнением Гиббса–Томсона (1) распределения по радиусам кластеров (доменов) связанной воды.

В соответствии с данными рис. 3, а, зооглея связывает очень большое количество воды, которое достигает 32 г на один г сухого вещества. На зависимости  $C_{uw}(T)$  при  $T = 260$  К наблюдается перегиб, делящий её на два участка, которые отвечают сильносвязанной (SBW) и слабосвязанной воде (WBW) [8]. Уменьшение эффективности межклеточных взаимодействий жидким силиконом влечёт за собой снижение количества слабосвязанной воды от 5 до 2 г/г (рис. 3, а). Существенные различия наблюдаются также на распределениях по радиусам кластеров внутриклеточной воды (рис. 3, б). В исходной клеточной массе повышен вклад от кластеров и доменов воды с  $R < 10$  и  $R = 100$  нм. В образце, содержащем 30% силикона,



**Рис. 3.** Зависимость концентрации незамерзающей воды от температуры для образцов молочнокислого гриба, исходного и содержащего ПДМС-1000 (а), рассчитанные на их основе распределения по радиусам кластеров внутриклеточной воды (б).<sup>3</sup>

минимальный радиус регистрируемых кластеров воды составляет 1 нм, а при избытке силикона — 2 нм.

Поскольку клеточная масса молочнокислой зооглеи содержит большое количество связанной воды, следует ожидать, что гидрофобные полимерные молекулы ПДМС не проникают в клетки, а располагаются на гидрофобных участках их поверхности в структурных полостях или межклеточных зазорах. Гидрофобные молекулы могут взаимодействовать с поверхностью клеток или надклеточного матрикса только по ван-дер-ваальсовому механизму. Поэтому для объяснения уменьшения связывания воды под влиянием ПДМС следует предположить, что молекулы ПДМС проникают в зазоры между адсорбированной водой и структурными элементами зооглеи. То есть гидрофобные взаимодействия оказываются сильнее, чем взаимодействия с поверхностью кластеров (доменов) адсорбированной воды, осуществляемые преимущественно посредством водородных связей.

Ранее подобный эффект был обнаружен при изучении совместной адсорбции воды и неполярных органических веществ на поверхности минеральных адсорбентов (нанокремнезёмы, силикагели, структурно упорядоченные оксиды) [9]. Тогда исчезновение на распределениях  $\Delta C(R)$  кластеров воды с  $R < 2$  нм можно объяснить тем, что такие кластеры преимущественно локализованы в межклеточных зазорах (или структурных пустотах надклеточного матрикса) зооглеи. В результате, силикон, проникая в межклеточное пространство, вытесняет воду из гидрофобных наноразмерных полостей, а межклеточная вода, растворяясь в силиконе, трансформируется из сильноассоциированного в слабоассоциированное состояние, характеризующееся химическим сдвигом  $\delta_H \approx 1$  м.д. (рис. 2, в). Из соотношения интенсивностей сигналов сильно- и слабоассоциированной воды можно сделать вывод, что в межклеточном пространстве находится около 15% от всей воды, содержащейся в молочнокислой зооглее.

#### 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием метода низкотемпературной  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопии показано, что гидратированность молочнокислой зооглеи составляет 32 г воды на грамм вещества сухой клеточной массы. Внутриклеточная вода находится преимущественно в виде кластеров и доменов с радиусом 2–100 нм. Молекулы силикона могут проникать в межклеточные зазоры зооглеи, уменьшая межклеточные взаимодействия. При этом часть клеток переходит в силикон в виде одиночных клеток или их агрегатов. Межклеточная вода, находящаяся в виде кластеров с  $R \leq 2$  нм, замещается силиконом и переходит в слабоассоциированное состояние с химическим

сдвигом  $\delta_H \approx 1$  м.д.

Автор выражает благодарность члену-корреспонденту НАН Украины В. В. Турову за ценные советы и замечания при написании работы.

## ЦИТИРУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. A. V. Oleskin, *J. Basic Microbiol.*, **34**, No. 6: 425 (1994).
2. В. И. Дуда, М. Г. Выпов, В. В. Сорокин, Л. Л. Митюшина, А. В. Лебединский, *Микробиология*, **64**, № 1: 69 (1995).
3. И. Ю. Сафронова, И. В. Ботвинко, *Микробиология*, **67**, № 1: 55 (1998).
4. С. А. Волошин, А. С. Капрельянц, *Биохимия*, **69**, № 11: 1555 (2004).
5. J. W. Costerton, *Beijerinck Centennial. Microbial Physiology and Gene Regulation: Emerging Principles and Applications: Book of Abstracts* (Ed. W. A. Scheffers and J. P. van Dijken) (Delft: Delft. Univ. Press: 1995), p. 20.
6. B. Kasemo, *Surface Science*, **500**: 656 (2002).
7. И. А. Смирнова, И. А. Еремина, А. Д. Гулбани, Л. А. Остроумов, *Техника и технология пищевых производств*, **2**: 93 (2014).
8. В. М. Гунько, В. В. Туров, П. П. Горбик, *Вода на межфазной границе* (Киев: Наукова думка: 2009).
9. V. M. Gun'ko and V. V. Turov, *Nuclear Magnetic Resonance Studies of Interfacial Phenomena* (New York: Taylor & Francis: 2013).
10. В. В. Туров, В. М. Гунько, *Кластеризованная вода и пути ее использования* (Киев: Наукова думка: 2011).
11. V. M. Gun'ko, V. V. Turov, V. M. Bogatyrev, V. I. Zarko, R. Leboda, E. V. Goncharuk, A. A. Novza, A. V. Turov, and A. A. Chuiko, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **118**: 125 (2005).
12. D. W. Aksnes and L. Kimtys, *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, **25**: 146 (2004).
13. O. V. Petrov and I. Furo, *Progr. in NMR*, **54**, No. 2: 97 (2009).

## REFERENCES

1. A. V. Oleskin, *J. Basic Microbiol.*, **34**, No. 6: 425 (1994).
2. V. I. Duda, M. G. Vipov, V. V. Sorokin, L. L. Mityushina, and A. V. Lebedinsky, *Microbiology*, **64**, No. 1: 69 (1995) (in Russian).
3. I. Yu. Safronova and I. V. Botvinko, *Microbiology*, **67**, No. 1: 55 (1998) (in Russian).
4. S. A. Voloshin and A. S. Kaprelyants, *Biochemistry*, **69**, No. 11: 1555 (2004) (in Russian).
5. J. W. Costerton, *Beijerinck Centennial. Microbial Physiology and Gene Regulation: Emerging Principles and Applications: Book of Abstracts* (Ed. W. A. Scheffers and J. P. van Dijken) (Delft: Delft. Univ. Press: 1995), p. 20.
6. B. Kasemo, *Surface Science*, **500**: 656 (2002).
7. I. A. Smirnova, I. A. Eremina, A. D. Gulbani, and L. A. Ostroumov, *Tekhnika i Tekhnologiya Pishchevykh Proizvodstv*, **2**: 93 (2014) (in Russian).
8. V. V. Turov, V. M. Gun'ko, and P. P. Gorbik, *Voda na Mezhfaznoy Granitse [Water at the Interface]* (Kiev: Naukova Dumka: 2009), p. 994 (in Russian).

9. V. M. Gun'ko and V. V. Turov, *Nuclear Magnetic Resonance Studies of Interfacial Phenomena* (New York: Taylor & Francis: 2013).
10. V. V. Turov and V. M. Gun'ko, *Klasterizovannaya Voda i Puti Yeyo Ispol'zovaniya* [Clustered Water and Its Application] (Kiev: Naukova Dumka: 2011) (in Russian), p. 313.
11. V. M. Gun'ko, V. V. Turov, V. M. Bogatyrev, V. I. Zarko, R. Leboda, E. V. Goncharuk, A. A. Novza, A. V. Turov, and A. A. Chuiko, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **118**: 125 (2005).
12. D. W. Aksnes and L. Kimtys, *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, **25**: 146 (2004).
13. O. V. Petrov and I. Furo, *Progr. in NMR*, **54**, No. 2: 97 (2009).

---

*Chuiko Institute of Surface Chemistry, N.A.S. of Ukraine,  
17, General Naumov Str.,  
UA-03164 Kyiv, Ukraine*

<sup>1</sup> Fig. 1. Microphotographs of a symbiote of a Tibetan milk mushroom obtained with an increase of  $\times 400$  (a) and  $\times 1000$  (b, e, z) for a sample containing 32 g/g of water in air (a, b) and with the addition of silicone (e, z).

<sup>2</sup> Fig. 2. The  $^1\text{H}$  NMR spectra of the cell mass of a milk fungus containing 97 wt.% Water, taken (a) and with the addition of PDMS-1000 at concentration ratios of 2: 1 (b) and 1:3 (e), taken at different temperatures.

<sup>3</sup> Fig. 3. Dependence of the concentration of ice-free water on temperature for samples of lactic acid fungus, the initial and containing PDMS-1000 (a), calculated on the basis of their distribution over the radii of the clusters of intracellular water (b).