

АСОЦІАТИ ВОДИ У ЧАСТКОВО ЗНЕВОДНЕНИХ ДРІЖДЖАХ І НА ПОВЕРХНІ ГІДРОФОБНОГО КРЕМНЕЗЕМУ

С.П. Туранська, В.В. Туров, В.М. Гунько, В.М. Богатирьов

*Інститут хімії поверхні Національної академії наук України
вул. Генерала Наумова 17, 03680 Київ-164*

Методом ^1H ЯМР спектроскопії з використанням методики виморожування рідкої фази визначено параметри взаємодії води зі структурними елементами дріжджесей і досліджено стан води в частково дегідратованих клітинах. У відносно вузькому діапазоні гідратації (270-400 мг/г) вода переходить із слабоасоційованого водневими зв'язками стану в сильноасоційований стан. На основі результатів, одержаних для клітин і для частково гідрофобізованих кремнеземів, запропоновано модель доменної структури кластерів води.

Parameters of water interaction with structure elements of yeast cell have been found and the state of water in partially dehydrated cells has been studied by means of ^1H NMR spectroscopy combined with the liquid phase freezing technique. Within relatively narrow range of yeast cells hydration (270-400 mg/g) water transforms from weakly associated state by hydrogen bonds into strongly associated one. Basing on the data obtained for cells and partially hydrophobic silicas, a model of domain structure of water clusters has been proposed.

Вступ

Оскільки молекули води легко утворюють водневозв'язані комплекси як між собою, так і при взаємодії з хімічними групами, що мають протондонорні або електрондонорні властивості, вода, яка перебуває в контакті з молекулами біополімерів, у тому числі й локалізована всередині транспортних каналів, є сильно асоційованою [1]. Формування водневозв'язаних комплексів у вузьких порах транспортних каналів значно знижує швидкість дифузії, оскільки молекулярні взаємодії в порожнинах, близьких за розміром до розміру молекули води, сильно відрізняються від взаємодій у рідкому середовищі або на поверхні твердих тіл.

В роботі досліджено структуру води в клітинних мембранах і визначено параметри взаємодії води зі структурними елементами клітин. Стан води всередині клітин можна оцінювати за величиною хімічного зсуву протонів у молекулах зв'язаної води [2]. Зокрема, неасоційовані водневими зв'язками молекули води мають хімічний зсув $\delta=1,7$ м.ч., а хімічний зсув рідкої води і води, зв'язаної з білковими молекулами, становить 5 м.ч. Таким чином, за величиною хімічного зсуву можна визначити середнє число водневих зв'язків, в утворенні яких беруть участь молекули води.

Експериментальна частина

Як модельні клітини використовували суспензії дріжджових клітин *Saccharomyces cerevisiae*. Дослідження проводили методом ^1H ЯМР спектроскопії з використанням методики виморожування рідкої фази [3, 4]. Для вивчення стану зв'язаної води в

клітинних мембранах, її частка повинна бути по можливості збільшена. Тому для експериментів використовувалися зневоднені клітини, з яких спеціальними методами сушки було видалено значну частину внутрішньоклітинної води.

Вимірювання хімічного зсуву води в клітинах проводили на повітрі з використанням зовнішнього стандарту (CHCl_3 , $\delta=7,26$ м.ч.) або в середовищі дейтерованого хлороформу. Оскільки хлороформ може розчиняти лише відносно невелику кількість води (до 0,5 %), припускалося, що в умовах заморожування частково гідратованих клітин середовище хлороформу не вплине на фазовий стан води в клітинних структурах. Використання інертного розчинника дозволяє точно визначати величину хімічного зсуву зв'язаної води.

Результати та їхнє обговорення

Спектри зв'язаної води в клітинах являють собою широкий одиночний сигнал, максимум якого має хімічний зсув 1-2 м.ч. при низькому вмісті води і 3-5 м.ч. при її високому вмісті. При зниженні температури ширина сигналу збільшується і хімічний зсув може бути визначений лише з великою похибкою.

У середовищі хлороформу ширина сигналу ^1H ЯМР води в клітинах сильно зменшується (рис. 1), що дозволяє прослідкувати за зміною хімічного зсуву і форми сигналу зв'язаної води. Якщо концентрація води в клітинах не перевищує 270 мг/г, вода реєструється у вигляді вузького сигналу з хімічним зсувом $\delta=1,1$ м.ч., інтенсивність якого зростає зі збільшенням вмісту води в клітинах. Одержана величина хімічного зсуву води в частково дегідратованих клітинах близька до хімічного зсуву молекул води, що не беруть участі в утворенні водневозв'язаних комплексів або формують водневозв'язані асоціати як електронодонори. При збільшенні вмісту води в клітинах до 320 мг/г інтенсивність сигналу води в сильному магнітному полі помітно знижується (сигнал 1), проте одночасно з'являється значно ширший сигнал води з хімічним зсувом $\delta=5$ м.ч. (сигнал 2). Зі зниженням температури інтенсивність цього сигналу швидко зменшується, і сигнал зникає в спектрах при $T < 210$ К (рис. 1, в, г). Таким чином, у відносно вузькому діапазоні гідратації дріжджових клітин (270-400 мг/г) відбуваються значні зміни у стані зв'язаної води в клітинах, у результаті яких вода переходить із слабоасоційованого водневими зв'язками стану в сильноасоційований стан. Оскільки певна частина води може розчинятися у хлороформі, а хімічний зсув такої води співпадає з хімічним зсувом сигналу 1, на рис. 1, в (нижній спектр) окремо наведений спектр ^1H ЯМР дисперсійного середовища. З рисунка видно, що інтенсивність сигналу води, розчиненої у хлороформі, значно менша інтенсивності сигналу 1 внутрішньоклітинної води. Враховуючи, що в клітинній суспензії об'єм дисперсної фази більший за об'єм дисперсійного середовища, можна вважати, що розчинена у хлороформі вода не робить істотного внеску до інтенсивності сигналу 1.

За методикою [3, 4] були визначені характеристики шарів зв'язаної води і величини міжфазної енергії клітини/вода (γ_s) в регідратованих дріжджових клітинах з різним вмістом води (C_1) (рис. 2). Перші дві залежності на рис. 2, а і перші дві точки на рис. 2, б належать до води, що перебуває у слабоасоційованому стані ($\delta=1,1$ м.ч.), спектри якої наведені на рис. 1, а, б. На залежності $\gamma_s(C_1)$ різке зменшення міжфазної енергії реєструється при $C_1 = 320$ мг/г, коли в спектрах ^1H ЯМР води, зв'язаної з дріжджовими клітинами, з'являється сигнал сильноасоційованої води ($\delta=5$ м.ч.).

Описані зміни спектральних характеристик води в процесі регідратації дріжджових клітин можна пояснити так. Якщо вміст води у клітинах не перевищує певну критичну величину, то вода в дегідратованих клітинах зосереджується переважно в клітинних мембранах, а також у гідратних оболонках органел і молекул біополімерів. Така вода має аномально малу величину хімічного зсуву, що є характерною для молекул води, які не беруть участі в формуванні водневозв'язаних комплексів як протондонори. Імовірно,

утворенню водневозв'язаних асоціатів води перешкоджають просторові обмеження і присутність значної кількості гідрофобних груп. Зі збільшенням вмісту води в клітинах з'являються внутрішні порожнини, в яких вода може перебувати у вигляді поліасоціатів, структурованих сіткою водневих зв'язків. Перехід води з одного стану в інший має характер фазового переходу, що відбувається у вузькому діапазоні зміни концентрації внутрішньоклітинної води.

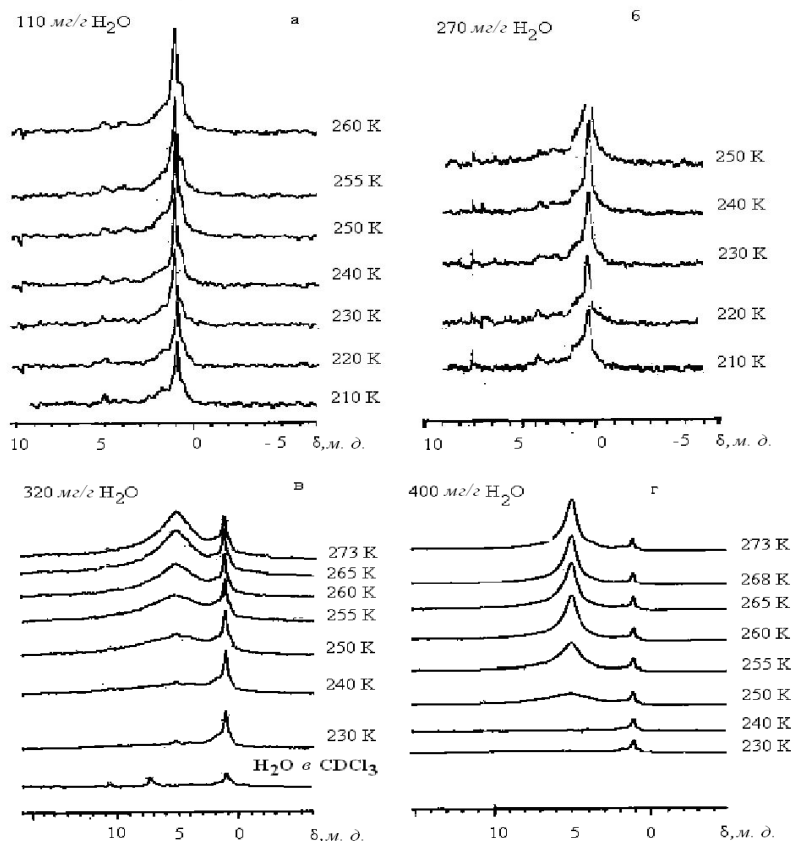


Рис. 1. Зміна форми спектрів ^1H ЯМР води в дріжджових клітинах з різним вмістом води у середовищі дейтерохлороформу.

Для перевірки припущення про сильний вплив гідрофобних ділянок внутрішньої межі розділу фаз клітина-вода на будову аквакомплексів у частково зневоднених клітинах нами були порівняно результати, одержані для клітин і для кремнеземів з хімічно прищепленими до поверхні триметилсилільними групами. На поверхні вибраної серії триметилсилільованих кремнеземів (MS1, MS2, MS3) заміщено від 30 до 50% поверхневих гідроксильних груп, тому вона містить значну кількість ОН-груп, які можуть слугувати первинними центрами адсорбції води, розділеними гідрофобними ділянками.

На рис. 3 наведені температурні залежності зміни спектрів ^1H ЯМР води, адсорбованої на поверхні MS1, MS2, MS3. При одночасній адсорбції на поверхні триметилсилільованих кремнеземів води і CDCl_3 , окрім основного сигналу води (сигнал 2), у спектрах реєструється сигнал меншої інтенсивності з хімічним зсувом $\delta=1,7$ м.ч. (сигнал 1). Хімічний зсув цього сигналу співпадає з величиною δ для сигналу 2 на рис. 2. Зі зниженням температури інтенсивність сигналу 1 зростає, а сигналу 2 - спадає. При $T < 210$ К, окрім основного сигналу води (сигнал 2), у спектрах триметилсилільованих кремнеземів з адсорбованими H_2O і CDCl_3 реєструється сигнал меншої інтенсивності з хімічним зсувом $\delta=1,7$ м.ч. (сигнал 1). Хімічний зсув цього сигналу співпадає з величиною δ для води, що не бере участі в утворенні водневозв'язаних комплексів. При

$T < 210$ К у спектрах реєструється лише сигнал 1. Найбільш чітко зміна інтенсивності сигналів 1 і 2 при зниженні температури спостерігається для значного надлишку хлороформу (рис. 3, в). З того факту, що вода, відповідальна за сигнал 1, не замерзає при зниженні температури до 190 К, впливає, що ця фракція води сильно зв'язана з поверхнею або ж перебуває в особливому стані, більш стабільному, ніж тетракоординувана вода у льодоподібних структурах.

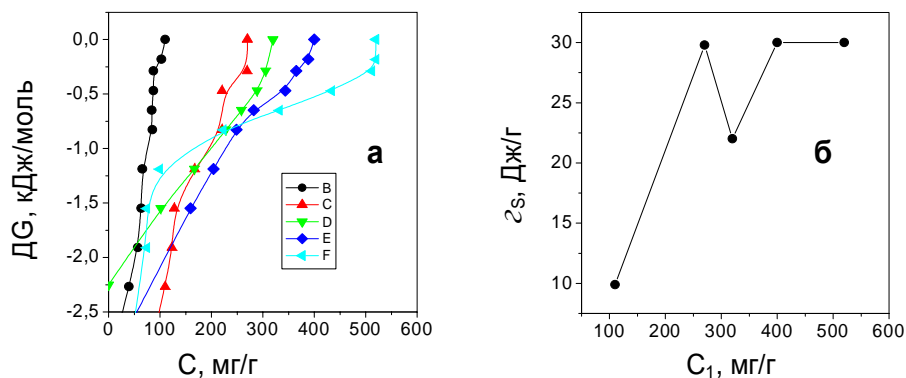


Рис. 2. Залежність зміни вільної енергії Гіббса ΔG води в дріжджових клітинах від концентрації незамерзаючої води C (а) і міжфазної енергії клітини-вода γ_s від концентрації внутрішньоклітинної води C_1 (б) у середовищі дейтерохлороформу. Вміст води в клітинах, мг/г: 70(B), 110(C), 270(D), 400(E), 520(F).

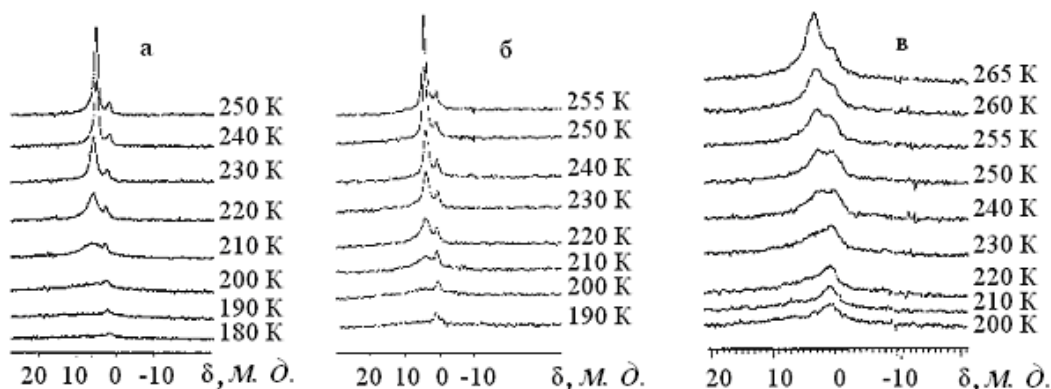


Рис. 3. Температурні залежності спектрів ^1H ЯМР води, адсорбованої на поверхні триметилсилільованих кремнеземів у присутності дейтерохлороформу: (а) MS1, $C_{\text{H}_2\text{O}} = 240$ мг/г, $C_{\text{CDCl}_3} = 0,6$ г/г; (б) MS2, $C_{\text{H}_2\text{O}} = 220$ мг/г, $C_{\text{CDCl}_3} = 0,6$ г/г; (в) MS3, $C_{\text{H}_2\text{O}} = 200$ мг/г, $C_{\text{CDCl}_3} = 2,7$ г/г.

Порівняння даних рис. 1 і 3 дозволяє зробити висновок про те, що між спектральними характеристиками сигналів води у частково дегідратованих клітинах і на поверхні частково гідрофобізованих кремнеземів є багато спільного. Зокрема, для обох систем у спектрах реєструється сигнал води з аномально малою величиною хімічного зсуву. При певному співвідношенні концентрацій компонентів системи цей сигнал стає домінуючим.

З наведених результатів випливає, що вода на поверхні триметилсилільованих кремнеземів переходить у стан з аномально малим хімічним зсувом при $T < 210$ К. При цій температурі у зразках MS1, MS2, MS3 залишається 5-10% мас. незамерзаючої води. Враховуючи, що на поверхні немодифікованого кремнезему міститься в середньому 2,5 ОН-групи на nm^2 , можна підрахувати, що концентрація незамерзаючої води на три порядки перевищує концентрацію залишкових гідроксильних груп. Таким чином, внесок

до усередненої величини хімічного зсуву від молекул води, які взаємодіють безпосередньо з первинними адсорбційними центрами поверхні, малий. Він не може пояснити аномально малу величину хімічного зсуву води при низькій температурі.

Поблизу гідрофобних ділянок поверхні можуть формуватися великі кластери води, що не беруть участі в утворенні водневих зв'язків. Із порівняння експериментальних результатів з даними квантовохімічних розрахунків величини хімічного зсуву протонів у кластерах молекул води в газовій фазі і з урахуванням ефекту сольватації інертним розчинником як основну умову появи сигналу води з хімічним зсувом $\delta=1,1$ м.ч. можна виділити формування малих кластерів води з обмеженою кількістю водневих зв'язків. Можливо, у таких кластерах (наприклад 2D-цикли, що містять 4-6 молекул води) частина протонів не утворює водневих зв'язків при контакті з молекулами CDCl_3 або слабкополярними ділянками в клітинних структурах. Варто виділити дві основні тенденції, які можуть мати місце при взаємодії води з клітинними структурами. Із зростанням гідратації всередині клітин відбувається формування все більших крапель води. Цей процес супроводжується зменшенням сигналу води з хімічним зсувом $\delta=1,1$ м.ч. і зростанням сигналу води з $\delta=5$ м.ч. При низькому вмісті води в клітинах відбувається зміна розподілу внутрішньоклітинної води за розмірами кластерів (вода в дегідратованих клітинах присутня у вигляді одиничних молекул і невеликих кластерів з малим числом водневих зв'язків). Цей процес стимулюється слабкополярними молекулами хлороформу або гідрофобними ділянками на межі поділу фаз клітина-вода. У результаті в спектрах ^1H ЯМР може спостерігатися лише сигнал води з хімічним зсувом $\delta=1,1$ м.ч., що відповідає особливому стану води, слабо асоційованої водневими зв'язками.

Висновки

Метод ^1H ЯМР спектроскопії в поєднанні з методикою виморожування рідкої фази дозволяє визначати параметри взаємодії води зі структурними елементами клітин і оцінювати структуру води в клітинах. Якщо вміст води в клітинах не перевищує певну критичну величину, вода має аномально малу величину хімічного зсуву, що є характерною для молекул води, які не беруть участі в формуванні водневозв'язаних комплексів як протонодонори. У вузькому діапазоні концентрації внутрішньоклітинної води відбувається перехід води із слабкоасоційованого водневими зв'язками стану в сильноасоційований стан. Запропоновано модель структури води, розташованої поблизу гідрофобних ділянок поверхні клітин і модифікованих кремнеземів.

Робота виконана у відповідності до проекту 04.07/00035 Фонду фундаментальних досліджень Міністерства освіти та науки України.

Література

1. Fujiyoshi Y., Mitsuoka K., Groot B.L., Philippsen A., Grubmuller H., Agre P., Engel A. Structure and function of water channels // *Curr. Opin. in Struct. Biol.* – 2002. – V. 12. – P.509-515.
2. Туров В.В., Гунько В.М., Горбик С.П., Чуйко А.А. Влияние высокодисперсного кремнезема на фазовое равновесие в водных суспензиях, содержащих клетки и белки // *Доп. НАН України.* – 2003. - № 9. – С.150-156.
3. Turov V.V., Leboda R. Application of H-1 NMR spectroscopy method for determination of characteristics of thin layers of water adsorbed on the surface of dispersed and porous adsorbents // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 1999. – V. 79, N 2-3. – P.173-211.
4. Туров В.В., Горбик С.П., Чуйко А.А. Влияние дисперсного кремнезема на связанную воду в замороженных клеточных суспензиях // *Проблемы криобиологии.* – 2002. - № 3. – С.16-23.