

Влияние дисперсного кремнезема на связанную воду в замороженных клеточных суспензиях

В.В. ТУРОВ, С.П. ГОРБИК, А.А. ЧУЙКО

Институт химии поверхности НАН Украины, г. Киев

Effect of Disperse Silica on Bound Water in Frozen Cellular Suspensions

TUROV V.V., GORBİK S.P., CHUIKO A.A.

Institute of the Surface Chemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

Методом ^1H ЯМР спектроскопии в условиях вымораживания жидкой фазы изучалось влияние дисперсного кремнезема на гидратированность модельных клеточных суспензий при варьировании концентрации клеточной массы в диапазоне 0-25 % масс, а концентрации SiO_2 – в диапазоне 0-5 % масс. Обнаружено, что дисперсный кремнезем вызывает сильное уменьшение концентрации связанной воды в системе. Максимальное уменьшение межфазной энергии клетка-вода (γ_s) составляет 130 Дж/г. В концентрированных клеточных суспензиях клетки и частицы кремнезема могут образовывать комплексные коллоидные системы, в которых величина γ_s в 2 раза меньше, чем в бинарной.

Методом ^1H ЯМР спектроскопії в умовах виморожування рідкої фази досліджувався вплив дисперсного кремнезему на гідратованість модельних клітинних суспензій при варіюванні концентрації клітинної маси в діапазоні 0-25 % мас, а концентрації SiO_2 - в діапазоні 0-5 % мас. Виявлено, що дисперсний кремнезем викликає значне зменшення концентрації зв'язаної води в системі. Максимальне зменшення міжфазної енергії клітина-вода (γ_s) складає 130 Дж/г. У концентрованих клітинних суспензіях клітини і частки кремнезему можуть утворювати комплексні колоїдні системи, в яких величина γ_s у 2 рази менша, ніж у бінарній.

Using the ^1H NMR method under conditions of liquid phase freezing-out the effect of disperse silica on hydration rate of model cell suspensions in varying the concentration of cell mass within the range of 0-25% mass and that of SiO_2 within the range of 0-5% (w/w) have been studied. Disperse silica was found to cause a strong decrease in bound water concentration in the system. The maximum reduction in inter-phase energy of cell/water (γ_s) was equal to 130 J/g. In concentrated cell suspension the cells and particles of silica can form complex colloid systems with the value of γ_s in two times lower than that in the binary system.

Уже много лет дисперсный кремнезем находит применение в фармацевтике и медицине при создании лекарственных средств, обладающих антимикробной активностью, препаратов пролонгированного действия, а также различных паст и мазей, используемых для лечения гнойных инфекций [1-3]. Попав в организм, частицы кремнезема контактируют с тканями и отдельными клетками. Поэтому значительный интерес представляет исследование процесса взаимодействия живых клеток с частицами SiO_2 . В качестве модельной системы могут быть использованы клеточные суспензии, содержащие коллоидные частицы кремнезема. Поведение таких систем часто подчиняется тем же законам, что и простые коллоиды [6,8].

В водных суспензиях поверхность клеток и частиц дисперсного кремнезема сильно гидратированы, т.е. на поверхности существует слой связанной воды, толщина которого может составлять несколько молекулярных диаметров. Для осуществления контакта клетки с поверхностью гидратные оболочки как клеток, так и твердых частиц должны деформироваться таким образом, что часть связанной воды удаляется из зазора клетка-частица. Параметры взаимодействия могут быть рассчитаны на основе регистрации изменений в характеристиках слоев связанной воды при варьировании концентрации клеток или твердых

During many years disperse silica has found an application in pharmaceuticals and medicine when creating medicines possessing antimicrobial activity, preparations of prolonged effect, as well as various pastes and ointments used for treating purulent infections [1-3].

Being entered into an organism, the particles of silica contact the tissues and separate cells. Therefore the investigation of the process of interaction of alive cells with the particles of SiO_2 is of a significant interest. Cellular suspensions, containing colloid silica particles can be studied as a model system. The behaviour of such systems is frequently subjected to the same regulations as simple colloids [6,8].

In aqueous suspensions the surface of cells and particles of disperse silica are strongly hydrated, that is on the surface there is a layer of bound water, the width of which can make several molecular diameters. To accomplish the contact of a cell with the surface hydrate membrane both of cells and solid particles must be deformed in such a way to remove a part of bound water out of cell-particle clearance.

Parameters of interaction can be calculated on the base of recording the changes in characteristics of the layers of bound water when varying the concentration of cells or solid particles. In the papers [4,9,10] there was a detailed description of the method of determining the characteristics of the

частиц. В [4, 9, 10] подробно описан метод определения характеристик слоев связанной воды, межфазных энергий и сил адгезии в водных суспензиях дисперсных частиц, основанный на измерении температурных зависимостей сигнала ^1H ЯМР незамерзающей воды в замороженных суспензиях.

Цель настоящей работы - изучение процессов гидратации и регидратации, которые происходят в замороженных водных суспензиях живых клеток, содержащих добавки дисперсного кремнезема, и изменений в величине межфазной энергии при взаимодействии клеток с высокодисперсным кремнеземом.

Так как многие клетки в процессе замораживания-оттаивания погибают [5], для экспериментов использовали культуру дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, клетки которых обладают высокой криоустойчивостью. Визуализацию клеток осуществляли с помощью оптического микроскопа "Микмед-1" с объективом 40x и окуляром 15x. Размер клеток определяли окулярным микрометром с точностью 0,85 мкм.

Большинство клеток имели форму, близкую к сферической. Их средний диаметр составлял ~ 5 мкм. Незначительное количество клеток имели четко выраженную эллипсоидальную форму с соотношением диаметров ~ 7:9. Цитохимическое определение жизнеспособности дрожжей проводили по методике [7]. Показатель жизнеспособности товарных дрожжей при комнатной температуре приближался к 100%. После замораживания с помощью жидкого азота, выдержки в течение 10 мин при температуре 77 К и последующего оттаивания дрожжи сохраняли высокий показатель жизнеспособности, составляющий ~ 90%. При замораживании-оттаивании водных суспензий дрожжей показатель их жизнеспособности снижался до ~ 70%.

Концентрацию клеток в суспензии определяли с помощью камеры Горяева. Удельная поверхность товарных пекарских дрожжей составляла ~ 1 м²/г.

Спектры ЯМР снимались на ЯМР спектрометре высокого разрешения Bruker WP-100 SY с рабочей частотой 100 МГц и полосой пропускания 50 кГц. Температура в датчике регулировалась термopриставкой Bruker VT-1000 с точностью ± 1 град. Интенсивности сигналов определяли электронным интегратором с точностью ± 10 %. Для предотвращения переохлаждения суспензий концентрацию незамерзающей воды измеряли при нагревании суспензий, предварительно охлажденных до температуры 210 К.

Условием замерзания воды на межфазной границе адсорбент(клетка)/вода является равенство свободных энергий молекул адсорбированной воды

layers of bound water, inter-phase energies and the adhesion in aqueous suspensions of disperse particles, based on the measurement of temperature dependencies of ^1H NMR signal of non-freezing water in frozen suspensions.

The aim of present work was to study the processes of hydration and re-hydration, occurring in frozen aqueous suspensions of alive cells, containing the additives of disperse silica, and changes in the value of inter-phase energy under cellular interaction with highly disperse silica.

Because of the fact that many cells in the process of freeze-thawing die [5] for the experiments we used the yeast culture *Saccharomyces cerevisiae*, the cells of which possess a high cryoresistance. Cell visualisation was performed with optic microscope "Micmed-1" with 40x object-glass and 15x eyepiece. Cell size was determined with ocular micrometer with an accuracy of 0,85 mcm.

The majority of cells had the shape, close to spherical. Their average diameter made ~5 mcm. Insignificant number of cells had distinctly manifested ellipsoid shape with the ratio of diameters ~7:9. Cytochemical determination of yeast viability was conducted according to the methods [7].

The viability index of marketable yeast at room temperature approached 100%. After freezing using liquid nitrogen, maintenance during 10 min at the temperature of 77 K and following thawing the yeast kept a high index of viability, making ~90%. During freeze-thawing of yeast aqueous suspensions their viability index reduced down to ~70%.

Cell concentration in suspension was found with Goryaev's chamber. Specific surface of marketable baker's yeast made ~ 1 м²/g.

NMR spectra were recorded with NMR spectrometer of high resolution (Bruker WP-100 S) with operating frequency of 100 MHz and bandwidth of 50 kHz. Temperature in the gauge was regulated with thermodevice (Bruker VT-1000) with the accuracy of ± 1 grad. The intensity of signals was determined with electron integrator with the accuracy of ± 10 %. To prevent the suspensions against overcooling the concentration of non-freezing water was measured when heating the suspensions, preliminarily cooled down to the temperature of 210 K.

The condition of water freezing at adsorbent (cell)/water interphase boundary is the equality of free energies of molecules of adsorbed water and ice. In this case the reduction of freezing temperature for adsorbed water (273-T) is determined by the decrease in a free energy of water, caused by adsorptional interactions ($\Delta G = G_0 - G$, where G_0 - free energy of ice at $T = 273$ K) [10]. Since an ice free energy with a

и льда. При этом понижение температуры замерзания адсорбированной воды (273 - T) определяется уменьшением свободной энергии воды, вызванным адсорбционными взаимодействиями ($\Delta G = G_0 - G$, где G_0 - свободная энергия льда при $T = 273$ K) [10]. Поскольку свободная энергия льда с понижением температуры изменяется по линейному закону, то

$$\Delta G = 0,036(273 - T) . \quad (1)$$

Площадь под кривой $\Delta G(C_{H_2O})$ определяет величину межфазной энергии коллоидных частиц (γ_s):

$$\gamma_s = K \int_0^{C_{H_2O}^{max}} \Delta G dC_{H_2O} , \quad (2)$$

где $C_{H_2O}^{max}$ - концентрация незамерзающей воды при $T \rightarrow 273$ K.

Межфазная энергия определяет суммарное понижение свободной энергии коллоидной системы, обусловленное присутствием границы раздела фаз. По зависимостям $\Delta G(C_{H_2O})$ могут быть рассчитаны также параметры слоев сильно- и слабосвязанной воды. При этом под слабосвязанной водой понимают ту часть незамерзающей воды, свободная энергия которой лишь немного понижена адсорбционными взаимодействиями с поверхностью адсорбентов или биополимеров. Она замерзает при температуре около 273 K. Сильносвязанная вода может не замерзать даже при сильном охлаждении суспензии [10]. Количественные значения толщины слоев каждого типа воды ($C_{H_2O}^s$ и $C_{H_2O}^w$ для сильно- и слабосвязанной воды соответственно) и максимальные величины понижения свободной энергии воды, вызванного адсорбцией (ΔG^s и ΔG^w), могут быть получены экстраполяцией соответствующих участков зависимостей к осям абсцисс и ординат.

Следует отметить, что в замороженных клеточных суспензиях, в отличие от суспензий дисперсных адсорбентов и биополимеров, часть внутриклеточной воды является незамерзающей из-за концентрирования раствора низкомолекулярных веществ, которые присутствуют во внутриклеточной жидкости. Экспериментально разделить оба вида незамерзающей воды тяжело, поэтому рассчитанная по формуле (2) величина межфазной энергии будет содержать некоторый вклад от изменения свободной энергии воды, обусловленный присутствием во внутриклеточной жидкости низкомолекулярных веществ. Можно ожидать, что на зависимости $\Delta G(C_{H_2O})$ такая "объемная" незамерзающая вода будет проявляться преимущественно на участке, отвечающем слабосвязанной воде.

На рис. 1 представлены зависимости концентрации незамерзающей воды от температуры и рассчитанные на их основе в соответствии с

decrease in temperature changes according to linear law, then

$$\Delta G = 0.036 (273-T) \quad (1)$$

The area under the curve $\Delta G(C_{H_2O})$ determines the value of interphase energy of colloid particles (γ_s):

$$\gamma_s = K \int_0^{C_{H_2O}^{max}} \Delta G dC_{H_2O} , \quad (2)$$

where $C_{H_2O}^{max}$ - concentration of non-freezing water at $T \rightarrow 273$ K.

Interphase energy determines a total reduction in free energy of colloid system, stipulated with the presence of the boundary of phases. Using the $\Delta(C_{H_2O})$ dependencies one can calculate also the parameters of the layers of strongly and weakly bound water. In this case weakly bound water means that the part of non-freezing water, free energy of which is only slightly reduced by adsorptional interactions with the surface of adsorbents or biopolymers. It freezes at the temperature about 273 K. Strongly bound water can not be frozen even at sharp cooling of suspension [10]. Quantitative values of the width of the layers of each type of water $C_{H_2O}^s$ and $C_{H_2O}^w$ for strongly and weakly bound water energy, caused by adsorption (ΔG^s and ΔG^w), can be obtained by extrapolation of corresponding sites of dependencies to the axes of abscises and ordinates.

It should be noted that in frozen cellular suspensions in contrast to the suspensions of disperse adsorbents and biopolymers, the part of intracellular water is non-freezing due to the concentrating of the solution of low molecular substances, presenting in intracellular liquid. Experimentally it is very difficult to divide both types of non-freezing water, so the calculated on the formula (2) value of interphase energy will contain some contribution due to the change in water free energy, stipulated by the presence in intracellular liquid of low molecular substances. It could be expected that on the dependence $\Delta G(C_{H_2O})$ such a "volumetric" non-freezing water will manifest predominantly on the site, related to weakly bound water.

In Fig. 1 we presented the dependence of the concentration of non-freezing water on the temperature and the calculated on their base according to the formula (1) dependence of the change in free energy on the concentration of yeast (C_{yeast}) within the range of $0 < C_{yeast} < 25\%$ (w/w) and constant concentration of silica in the suspension ($C_{SiO_2} = 5\%$ (w/w)). Characteristics of the layers of bound water are presented in Table 1.

Since the accuracy of temperature measurement and consequently the ΔG value are high, the error in determining the value of interphase energy depends mainly on the accuracy of measurement of the concentration of non-freezing water, i.e. actually it

формулой (1) зависимости изменения свободной энергии от концентрации незамерзающей воды при варьировании концентрации дрожжей ($C_{др}$) в диапазоне $0 < C_{др} < 25$ % масс и постоянной концентрации кремнезема в суспензии ($C_{SiO_2} = 5\%$ масс). Характеристики слоев связанной воды приведены в табл. 1.

Поскольку точность измерения температуры, а следовательно, и величины ΔG высока, погрешность определения величины межфазной энергии зависит в основном от точности измерения концентрации незамерзающей воды, т.е. фактически определяется точностью интегрирования спектров. Если интенсивность сигнала, выбранного в качестве стандартного, принять за единицу, то обычно удается обеспечить измерение сигнала интенсивностью 0,1 с точностью $\pm 10\%$. В работе как стандартная выбиралась интенсивность сигнала воды от клеточной суспензии до ее замораживания ($I_{T=275}$). Тогда ошибка в определении величины по формуле

$$\delta(C_{H_2O}) = I_{T=275} / I\%, \quad (3)$$

а ошибка измерения межфазной энергии

$$\delta\gamma_s = \sum_i \Delta G_i \delta(C_{H_2O})_i, \quad (4)$$

где суммирование проводится по всем экспериментальным точкам. Оценка, выполненная по формуле (4), показывает, что погрешность в определении межфазной энергии не превышала 15%.

Таблица 1. Характеристики слоев связанной воды в водных суспензиях пекарских дрожжей, содержащих 5 % масс кремнезема (аэросил А-480)

Table 1. Characteristics of the layers of bound water in aqueous solutions of baker's yeast, containing 5% (w/w) of silica (aerosil A-480)

$\bar{N}_{\text{д.о.}}, \% \text{ i äññ}$ $C_{\text{yeast}}, \% \text{ m ass}$	$\frac{\Delta G_{\text{w}}'}{\bar{A} \bar{a} / \bar{i} \bar{i} \bar{e} \bar{u}}$ $\frac{\Delta G_{\text{w}}'}{\bar{A} \bar{a} / \bar{i} \bar{i} \bar{e} \bar{u}}$ кДж/М	$\frac{\Delta G_{\text{w}}'}{\bar{A} \bar{a} / \bar{i} \bar{i} \bar{e} \bar{u}}$ $\frac{\Delta G_{\text{w}}'}{\bar{A} \bar{a} / \bar{i} \bar{i} \bar{e} \bar{u}}$ кДж/М	$C_{H_2O}^s, \text{ i ä / ä}$ $C_{H_2O}^s, \text{ mg/g}$	$C_{H_2O}^w, \text{ i ä / ä}$ $C_{H_2O}^w, \text{ mg/g}$	$\gamma_s, \bar{A} \bar{a} / \bar{a}$ $\gamma_s, \text{ J/g}$
0	3,75	0,4	420	980	78
1	4,2	0,6	400	1100	83
2	2,7	0,6	250	850	61
3	3,25	0,55	400	900	72
6	2,6	0,75	400	900	72
12,5	3,5	1,2	440	560	55
25	2,8	0,6	550	550	61

is determined by the accuracy of spectra integration. If the intensity of signal chosen as a standard, to assume as "1", then usually one can manage to provide the signal measurement of the intensity of 0.1 with the accuracy $\pm 10\%$. In the work as a standard one we have chosen the signal intensity of water from cellular suspension before its freezing ($I_{T=275}$). Then the error in determining the C_{H_2O} value can be estimated on the formula:

$$\delta(C_{H_2O}) = I_{T=275} / I\%, \quad (3)$$

and the error of measurement of interphase energy

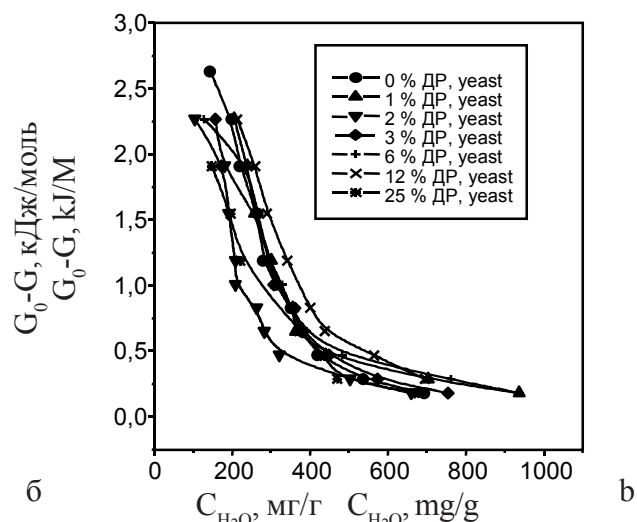
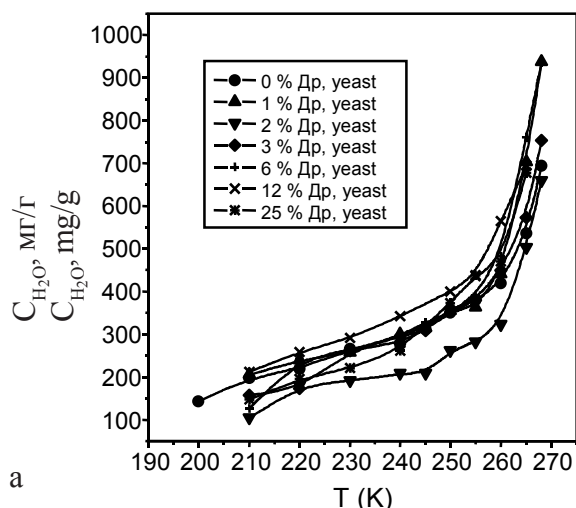


Рис. 1. Зависимость концентрации незамерзающей воды от температуры для водных суспензий дрожжей, содержащих 5 % масс дисперсного кремнезема (а), и построенные на их основе зависимости изменения свободной энергии от концентрации незамерзающей воды (б).

Fig. 1. Dependency of concentration of non-freezing water on the temperature for aqueous suspensions of yeast, containing 5% (w/w) of disperse silica (a), and built on their basis the dependencies of the change in free energy on the concentration of non-freezing water (b).

Если при некоторой фиксированной температуре ($T < 273 \text{ K}$) концентрация незамерзающей воды в водной суспензии кремнезема составляла $C_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{SiO}_2}$, а концентрация незамерзающей воды, обусловленная клетками дрожжей $C_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{др}} = 100\% \cdot C_{\text{др}}/100$, то изменение концентрации незамерзающей воды, связанное с присутствием кремнезема, определяется соотношением:

$$\Delta C_{\text{H}_2\text{O}} = C_{\text{H}_2\text{O}} - C_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{SiO}_2} - C_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{др}} = 100\% \cdot C_{\text{др}}/100 \quad (5)$$

Зависимости $\Delta C_{\text{H}_2\text{O}}(T)$ и $\Delta C_{\text{H}_2\text{O}}(C_{\text{др}})$ приведены на рис. 2, а и б соответственно. Из рис. 2 следует, что эти зависимости не являются монотонными, хотя в целом присутствие в клеточной суспензии кремнезема привело к уменьшению концентрации незамерзающей воды в системе. В области низких температур с ростом концентрации клеток и повышением температуры существует тенденция уменьшения величины $\Delta C_{\text{H}_2\text{O}}$. Наибольшая дегидратация образцов наблюдается при $C_{\text{др}} = 2\% \text{ масс}$ и $C_{\text{др}} = 25\% \text{ масс}$. При $T \rightarrow 273 \text{ K}$ для всех изученных образцов имеется тенденция роста величины $\Delta C_{\text{H}_2\text{O}}$, причем для образцов, содержащих 1 и 6% масс клеточной массы, $\Delta C_{\text{H}_2\text{O}}$ становится положительной.

Как следует из данных табл. 1, с ростом $C_{\text{др}}$ величина $C_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{s}}$ вначале уменьшается, а затем возрастает примерно в 1,5 раза относительно первоначальной величины, которой служит суспензия кремнезема при отсутствии дрожжей. Концентрация слабосвязанной воды с ростом $C_{\text{др}}$ от 0 до 25% масс уменьшается вдвое. Концентрация обоих типов связанной воды совпадает при $C_{\text{др}} = 25\% \text{ масс}$. Если не принимать во внимание скачкообразного понижения величины γ_{s} при $C_{\text{др}} = 2\% \text{ масс}$, на основании

$$\delta\gamma_{\text{s}} = \sum_i \Delta G_i \delta(C_{\text{H}_2\text{O}})_i, \quad (4)$$

where the summing is accomplished for all experimental points. The evaluation, made on the formula (4), shows that the error in determining interphase energy did not exceed 15%.

If at certain fixed temperature ($T < 273 \text{ K}$) the concentration of non-freezing water in aqueous suspension of silica $C_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{SiO}_2}$ and the concentration of non-freezing water, stipulated by yeast cells $C_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{др}} = 100\% \cdot C_{\text{др}}/100$ then the change in concentration of non-freezing water, connected to silica presence is determined by the ratio:

$$\Delta C_{\text{H}_2\text{O}} = C_{\text{H}_2\text{O}} - C_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{SiO}_2} - C_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{др}} = 100\% \cdot C_{\text{др}}/100 \quad (5)$$

$\Delta C_{\text{H}_2\text{O}}(T)$ and $\Delta C_{\text{H}_2\text{O}}(C_{\text{др}})$ dependencies are presented in Fig. 2 a and b, correspondingly. The Figure 2 shows that these dependencies are not monotonous, although in a whole the silica presence in cellular suspension resulted in a reduction of concentration of non-freezing water in the system. In the range of low temperatures with the rise in concentration of cells and temperature increase there is a tendency to the decrease in the $\Delta C_{\text{H}_2\text{O}}$ value. The highest dehydration of samples is observed at $C_{\text{др}} = 2\% \text{ (w/w)}$ and $C_{\text{др}} = 25\% \text{ (w/w)}$. At $T \rightarrow 273 \text{ K}$ for all studied samples there is a tendency of the growth of the Δ value, in addition for the samples, containing 1 and 6% of cellular mass, $\Delta C_{\text{H}_2\text{O}}$ gets positive.

As the Table 1 data show, with the growth of $C_{\text{др}}$ the value $C_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{s}}$ firstly reduces and then increases approximately in 1.5 times in respect of initial value, which is the suspension of silica at the absence of yeast. The concentration of weakly bound water with the growth of $C_{\text{др}}$ from 0 to 25% (w/w) decreases twice. The concentration of both types of bound water

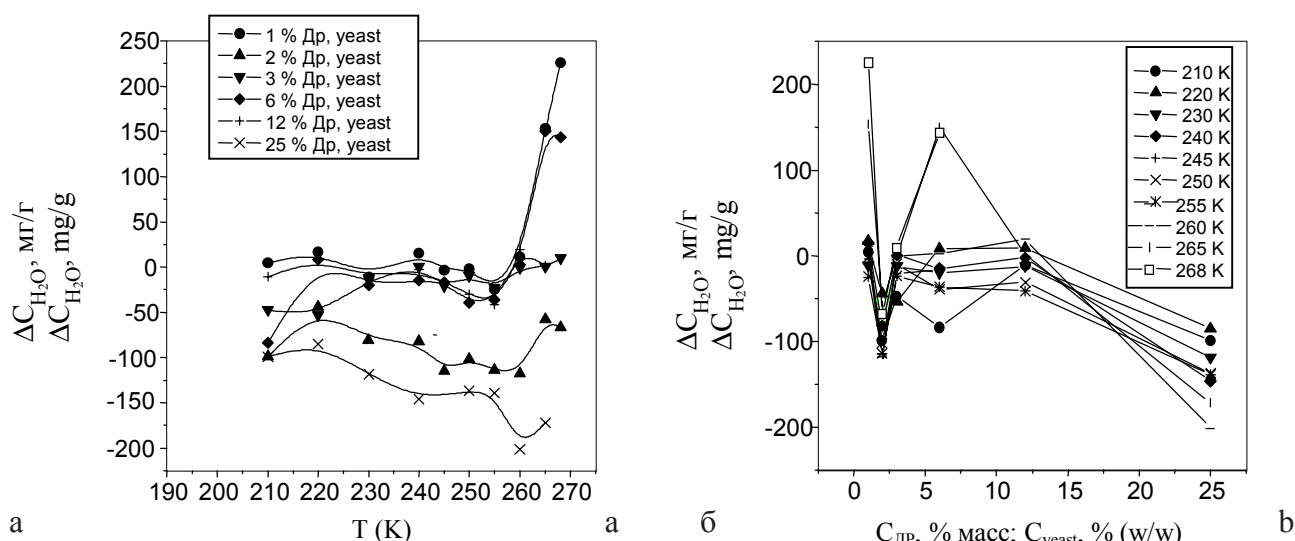


Рис. 2. Влияние температуры (а) и концентрации клеточной массы (б) на гидратацию водных суспензий дрожжей, содержащих 5% масс SiO_2 .

Fig. 2. Effect of temperature (a) and concentration (b) on hydration of aqueous suspensions of yeast, containing 5% (w/w) of SiO_2 .

зависимости $\gamma_s(C_{др})$ можно заключить, что величина межфазной энергии с ростом $C_{др}$ уменьшается в том случае, если $C_{др} \leq 10\%$ масс, а дальнейший рост концентрации клеток не приводит к существенному изменению величины γ_s , полученной нами.

Чтобы определить, как поверхность кремнезема влияет на величину межфазной энергии клетка-водная среда, можно сравнить данные, приведенные в табл. 1, с соответствующей зависимостью для бинарной клеточной суспензии (рис. 3, а). Различия в величинах γ_s при фиксированной концентрации клеточной массы в суспензии определяют изменение свободной энергии в результате взаимодействия клетка-поверхность (рис 3, б). Как следует из приведенных данных, присутствие кремнезема резко уменьшает межфазную энергию на границе раздела фаз клетка-вода. Это свидетельствует об интенсивном связывании клеток с поверхностью кремнезема. Особенно большое различие в величинах γ_s бинарных и тройных суспензий наблюдается при малых концентрациях клеточной массы. Участок зависимости $\gamma_s(C_{др})$ слева от излома (рис. 3, а) отвечает слабому межклеточному взаимодействию (гелеобразной фазы не образуется). Присутствие в суспензии частиц дисперсного кремнезема приводит к уменьшению величины γ_s на 130 Дж/г. Тогда эта величина определяет максимальную энергию взаимодействия клеток с поверхностью кремнезема.

При больших концентрациях, благодаря сильным межклеточным взаимодействиям, клеточная суспензия образует гелеобразную фазу.

coincides at $C_{yeast} = 25\%$ (w/w). If do not take in account an abrupt decrease in the γ_s value at $C_{yeast} = 2\%$ (w/w), on the base of the $\gamma_s(C_{yeast})$ dependence we can conclude that the value of interphase energy with the growth in C_{yeast} reduces, if $C_{yeast} \leq 10\%$ (w/w), and further growth of cell concentration does not result in a significant change in the γ_s value.

In order to determine how the surface of silica affects the value of the cell-aqueous medium interphase energy, one can compare the data, presented in the Table 1 with the corresponding dependence for binary cellular suspension, mentioned in the paper [9] (Fig. 3, a). The differences in γ_s values under fixed concentration of cellular mass in the suspension determine the change in free energy in the result of the cell-surface interaction (Fig. 3, b). As the mentioned data demonstrate the presence of silica sharply decreases interphase energy at the boundary of cell-water phase. This testifies to an intensive binding of cells with silica surface. Especially big difference is observed in the γ_s values of binary and triple suspensions under low concentrations of cellular mass. The site of $\gamma_s(C_{yeast})$ to the left from the break (Fig. 3 a) corresponds to a weak intercellular interaction (gel-like phase does not form). The presence of the particles of disperse silica in suspension results in the decrease in γ_s value by 130 J/g. Then this value determines a maximum energy of cell interaction with silica surface.

Under high concentration due to strong intercellular interactions, cellular suspension forms gel-like phase. The introduction into such a suspension of 5% mass disperse silica results only in a slight change in interphase energy. Probably within this concentration

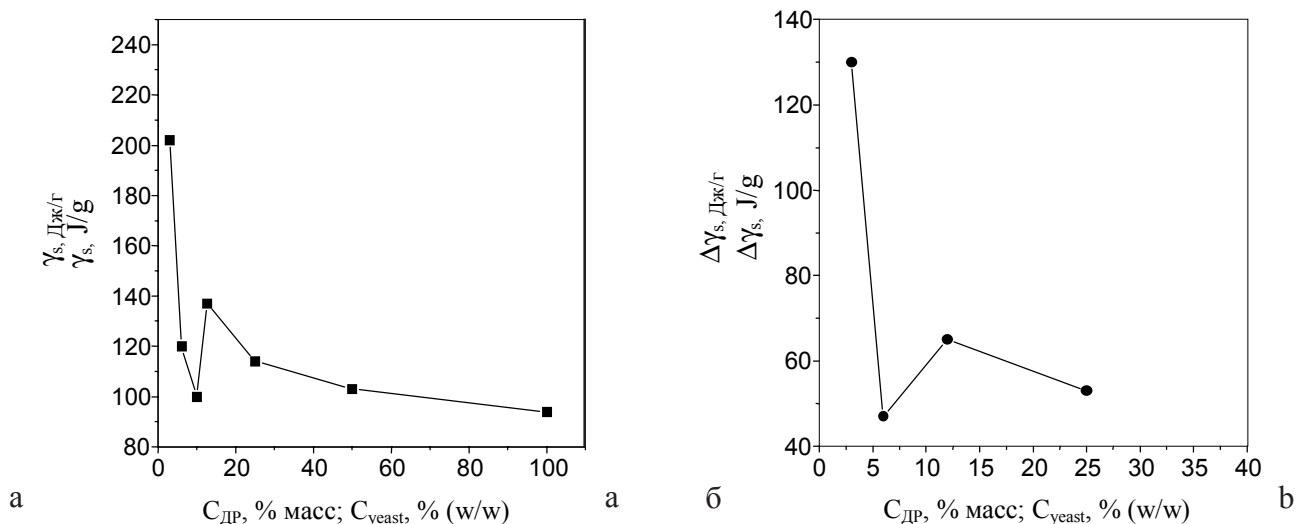


Рис. 3. Влияние концентрации клеточной массы в суспензии на межфазную энергию в системе, содержащей воду и клеточную массу (а), а также на изменение свободной энергии, обусловленное присутствием высокодисперсного SiO_2 (б) для суспензий, содержащих 5% масс кремнезема.

Fig. 3. Effect of concentration of cellular mass in suspension on inter-phase energy in the system, containing water and cellular mass (a) as well as on the change of free energy, stipulated by the presence of highly disperse SiO_2 (b) for the suspensions, containing 5% (w/w) of SiO_2 .

Введение в такую суспензию 5 % масс дисперсного кремнезема приводит лишь к незначительному изменению межфазной энергии. По-видимому, в этом концентрационном интервале большая часть клеток принимает участие в образовании связей клетка-клетка и не участвует в формировании комплексов клетка-поверхность. Наиболее вероятно, что излом на зависимости $\gamma_s(C_{др})$ при $C_{др}=2\%$ масс в тройных суспензиях (табл. 1), как и в бинарных суспензиях (рис. 3, а), обусловлен фазовым переходом, который происходит в клеточной суспензии с ростом концентрации.

Для более подробного изучения процессов взаимодействия кремнезема с концентрированной клеточной суспензией нами исследовались изменения характеристик слоев связанной воды в тройных системах, содержащих фиксированную концентрацию клеточной массы ($C_{др} = 12,5\%$ масс), и варьируемой в диапазоне $0 \div 5\%$ масс концентрацией кремнезема. На рис. 4 приведены графики зависимости изменения свободной энергии от концентрации незамерзающей воды и рассчитанная на их основе зависимость изменения межфазной энергии от концентрации SiO_2 в суспензии. Характеристики слоев связанной воды суммированы в табл. 2.

Из приведенных результатов видно, что с ростом C_{SiO_2} межфазная энергия монотонно уменьшается, если $C \leq 1\%$ масс. При дальнейшем концентрировании суспензии величина γ_s остается постоянной в широком диапазоне изменения C_{SiO_2} . В отличие от данных, приведенных на рис 3, а, уменьшение межфазной энергии обусловлено

interval big part of the cells participates in the formation of the cell-cell bonds and do not participate in the formation of the cell-surface complexes. The break on the $\gamma_s(C)$ dependence at $C_{yeast} = 2\%$ (w/w) in triple suspensions (Table 1) and in binary suspensions as well (Fig. 3 a) is rather stipulated with a phase transition, occurring in cellular suspension with the rise in concentration.

For more detailed studying of the processes of silica interaction with concentrated cellular suspension we have investigated the changes in characteristics of the layers of bound water in triple systems, containing fixed concentration of cellular mass ($C_{yeast} = 12,5\%$ (w/w)) and being varied by silica concentration within the range of $0 \div 5\%$ (w/w). Fig. 4 shows the diagrams of dependencies of the change in free energy on the concentration of non-freezing water and calculated on their base the dependence of the change in interphase energy on the concentration of SiO_2 in suspension. The characteristics of layers of bound water were summarised in the Table 2.

The mentioned results demonstrate that with the rise in C_{SiO_2} interphase energy monotonously reduces if $C \leq 1\%$ (w/w). Under following concentrating of the suspension the value γ_s remains constant within a wide range of C_{SiO_2} change. In contrast to the data presented in Fig. 3 a, the decrease in interphase energy is stipulated with the reduction of both weakly and strongly bound water (Table 2).

Obtained results testify to the fact that silica is capable to actively affect the phase state of concentrated cellular suspensions. The dependence in $\gamma_s(C_{SiO_2})$ in Fig. 4, b can be explained from the point of view of the formation in a triple system,

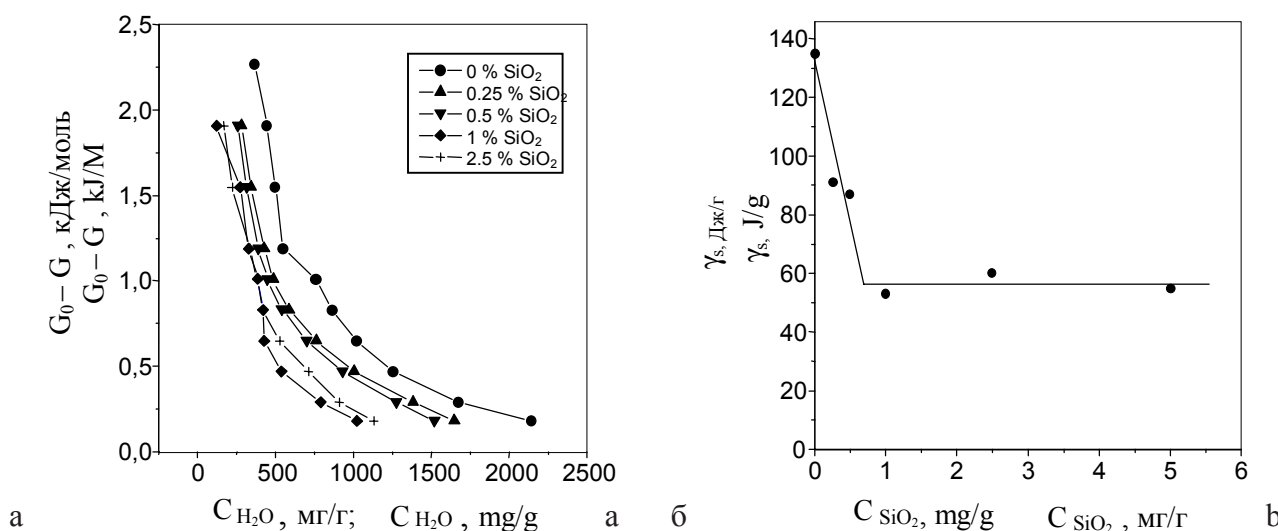


Рис. 4. Зависимость изменения свободной энергии от концентрации незамерзающей воды (а) и построенная на ее основе зависимость изменения межфазной энергии от концентрации кремнезема (б) для водных суспензий, содержащих 12,5 % масс клеточной массы.

Fig. 4. Dependence in the change of free energy on the concentration of non-freezing water (a) and building on its base the dependence of the change in inter-phase energy on the concentration of silica (b) for aqueous suspensions, containing 12,5% (w/w) of cellular mass.

уменьшением концентрации как слабо-связанной, так и сильносвязанной воды (табл. 2).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что кремнезем способен активно влиять на фазовое состояние концентрированных клеточных суспензий. Зависимость $\gamma_s(C_{SiO_2})$ на рис. 4, б можно трактовать с точки зрения формирования в тройной системе, содержащей частицы высокодисперсного SiO_2 и клетки дрожжей нового фазового состояния, в котором частицы кремнезема способствуют межклеточным взаимодействиям. Это состояние характеризуется соотношением концентраций клеток и SiO_2 12:1. Гидратированность клеток для него наблюдается в 2 раза меньшая, чем в бинарной системе. Рост концентрации кремнезема свыше стехиометрического соотношения не влияет на состояние суспензии.

Работа выполнена при поддержке Фонда фундаментальных исследований Украины (проект 04.07. 00035).

Литература

2. *Алюшин М.Т., Астахов М.Н.* Аэросил и его применение в фармакологической практике // Фармация.– 1971.– № 6.– С. 73-77.
3. *Гунько В.М., Богомаз В.И., Чуйко А.А.* Теоретические аспекты медико-биологического применения высокодисперсных кремнеземов: Кремнеземы в медицине и биологии. – Киев - Ставрополь, 1993.– С. 51-89.
4. *Лысенко Л.В., Чуешов В.И., Лаврушина Т.Г.* Сравнительные характеристики модифицированных образцов аэросила // Фармация.– 1977.– №1.– С. 56-58.
5. *Туров В.В.* Слои связанной воды и поверхностные силы в водных суспензиях высокодисперсных оксидов: Химия поверхности кремнезема: Т.1, ч.1.– Киев, 2001.– С. 510-607.
6. *Цуцаева А.А., Аграненко В.Б., Федорова Л.И. и др.* Криоконсервирование клеточных суспензий.– Киев: Наук. думка, 1983.– 240 с.
7. *Lee S.S., Robinson F.M., Wang H.G.* Rapid determination of yeast viability // Biotechn. Bioeng. Symp.– 1981.– N11.– P. 641-649.
8. *Suzuki T., Mizushima Y.* Characteristics of Silica-Chitosan Complex Membrane and Their Relationships to the Characteristics of Growth and Adhesiveness of L-929 Cell Cultured on the Biomembrane // J. of Fermentation and Bioengineering.– 1997.– V.84, N2.– P. 128-132.
9. *Turov V.V., Barvinchenko V.N.* Structurally ordered surface layers of water at the SiO_2 /ice interface and influence of adsorbed molecules of protein hydrolysate on them // Colloids and Surface.– 1997.– 8, N3.– P. 125-132.
10. *Turov V.V., Leboda R.* 1H NMR chemical shifts of adsorbed molecules on the carbon surface // Adsorption Sci. and Technol.– 1998.– V.1-16, N10.– P. 837-855.

Поступила 23.12.2001

Таблица 2. Характеристики слоев связанной воды в коллоидной системе, содержащей дисперсный кремнезем и 12,5 % масс дрожжевых клеток.

Table 2. Characteristics of the layers of bound water in colloid system, containing disperse silica and 12,5% mass of yeast cell .

C_{SiO_2} , % масс C_{SiO_2} , % (w/w)	DG^s , кДж/моль DG^s , kJ/M	DG^w , кДж/моль DG^w , kJ/M	$C_{H_2O}^s$, мг/г $C_{H_2O}^s$, mg/g	$C_{H_2O}^w$, мг/г $C_{H_2O}^w$, mg/g	g_s , Дж/г g_s , J/g
0	4.25	0.7	500	2300	135
0.25	3.4	0.9	700	1500	91
0.5	3.75	0.9	600	1600	87
1	2.2	0.5	450	1250	53
2.5	2.8	0.85	470	1030	60

containing the particles of highly disperse SiO_2 and cells of yeast of new phase state, in which the particles of silica contribute to intercellular interactions.

This state is characterised with the 12:1 ratio of cell concentrations and SiO_2 . Cell hydration rate for it is observed as twice less when comparing with binary system. The growth silica concentration higher than stoichiometric ratio does not affect the suspension state.

The work is supported with the Foundation of fundamental investigations of Ukraine (project No 04.07.00035).

References

1. *Alyushin M.T., Astakhov M.N.* Aerosil and its application in pharmacological practice // Farmatsiya. – 1971.– N6.– P. 73-77.
2. *Gunko B.M., Bogomaz V.I., Chuiko A.A.* Theoretical aspects of medical and biological application of highly disperse silica. In: Silica in medicine and biology.– Kiev-Stavropol, 1993.– P. 51-89.
3. *Lysenko L.V., Chueshov V.I., Lavrushina T.G.* Comparative characteristics of modified samples of aerosil// Farmatsiya. - 1977. - N1. - P. 56-58.
4. *Turov V.V.* Layers of bound water and surface forces in aqueous suspensions of highly disperse oxides: Chemistry of silica surface. V1.– Kiev, 2001. – 735 p.
5. *Tsutsayeva A.A., Agranenko V.B., Fedorova L.I. et al.* Cryopreservation of cellular suspensions. – Kiev: Naukova Dumka, 1983.– 240 p.
6. *Hermanson M.* The DLVO Theory in Microbial Adhesion // Colloids and Surface. B.– 1999.– V. 14.– P. 105-119.
7. *Lee S.S., Robinson F.M., Wang H.G.* Rapid determination of yeast viability // Biotechn. Bioeng. Symp.– 1981.– N11.– P. 641-649.
8. *Suzuki T., Mizushima Y.* Characteristics of Silica-Chitosan Complex Membrane and Their Relationships to the Characteristics of Growth and Adhesiveness of L-929 Cell Cultured on the Biomembrane // J. of Fermentation and Bioengineering.– 1997.– V.84, N2.– P. 128-132.
9. *Turov V.V., Barvinchenko V.N.* Structurally ordered surface layers of water at the SiO_2 /ice interface and influence of adsorbed molecules of protein hydrolysate on them // Colloids and Surface. B.– 1997.– 8, N3.– P. 125-132.
10. *Turov V.V., Leboda R.* 1H NMR chemical shifts of adsorbed molecules on the carbon surface // Adsorption Sci. and Technol.– 1998.– V.1-16, N10.– P. 837-855.

Accepted in 23.12.2001