

## СВЯЗЬ ПРОЦЕССА КРИСТАЛЛИЗАЦИИ ВОДНЫХ КЛАСТЕРОВ, ДИСПЕРГИРОВАННЫХ ВО ВЛАЖНЫХ СЕФАДЕКСАХ, СО СТЕКЛОВАНИЕМ ПОЛИМЕРНОЙ МАТРИЦЫ

© 2019 г. Г.И. Церетели, Т.В. Белопольская, Н.А. Грунина\*, О.И. Смирнова

Санкт-Петербургский государственный университет, 198504, Санкт-Петербург, Петергоф, ул. Ульяновская, 1

\*Государственный университет гражданской авиации, 196210 Санкт-Петербург, ул. Пилотов, 38

E-mail: nagrunina@mail.ru

Поступила в редакцию 27.03.18 г.

После доработки 15.05.18 г.

Принята к публикации 10.10.18 г.

Методом дифференциальной сканирующей калориметрии исследована зависимость основных параметров процессов кристаллизации и плавления формирующихся в сефадексах низкоразмерных водных кластеров от влажности полимера в интервале концентраций воды 30–55%. Показано, что значения температур и теплот исследуемых процессов зависят от концентрации вымораживаемой воды в сефадексе, что можно рассматривать как проявление размерного эффекта, характерного для малых систем. При этом в определенном интервале влажностей сефадекса отчетливо наблюдается гистерезис между процессами плавления и кристаллизации вымораживаемой воды:  $T_{пл}$  выше  $T_{кр}$ , а  $Q_{пл}$  больше  $Q_{кр}$ . Сравнение двух полисахаридных систем с различной структурной организацией – сефадекса и исследованного нами ранее аморфного крахмала – показало, что наблюдается существенное различие в процессах кристаллизации вымораживаемой воды в этих системах. Установлено, что в условиях проведенного эксперимента в сефадексе с низкой влажностью процессы зародышеобразования и их роста, определяющие кристаллизацию воды, разделены по времени. Зародышеобразование происходит при охлаждении, а рост в основном проявляется при нагревании. Лишь при высокой влажности, вдали от  $T_g$  сефадекса, оба процесса происходят при охлаждении, частично накладываясь друг на друга. Напротив, в аморфном крахмале при всех значениях влажности оба процесса происходят при охлаждении. Обнаруженные отличия в кристаллизации вымораживаемой воды могут быть связаны с разной подвижностью воды в этих системах, обусловленной различием в молекулярной подвижности собственно полимерных матриц вблизи области стеклования.

*Ключевые слова:* калориметрия, сефадекс, водные кластеры, кристаллизация, плавление, размерный эффект, гистерезис.

DOI: 10.1134/S0006302919010034

Как известно, основными компонентами большинства продуктов питания, лекарственных и косметических препаратов, а также биотканей и биоорганизмов являются биополимеры (или их различные модификации) и вода. При хранении таких систем при температурах ниже и выше 0°C возможны изменения в первоначальной структуре как природных, так и сформированных в результате деятельности человека влажных биосистем [1–3]. Особое значение при этом имеет трансформация водных кластеров, образующихся в этих системах, размеры которых при изменении условий окружающей среды могут варьироваться от нано-

до микро- и макроуровней. На примере пищевых продуктов методами оптической микроскопии и различного рода визуальными наблюдениями давно установлено, что циклические процессы оттаивания и повторного замораживания приводят к значительному увеличению размеров водных кластеров на микроуровне [4]. Такая трансформация существенно ухудшает потребительские свойства пищевых продуктов, а аналогичный процесс в биотканях может привести к их разрушению за счет образования больших кристаллов льда.

Выполненные нами ранее с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) исследования таких процессов на примере влажных крахмалов (двухкомпонентная система без криопротекторов) с непосредственной регистрацией чередующихся процессов

Сокращение: ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия, ВВ – вымораживаемая вода.

плавления/кристаллизации водных кластеров позволили проследить ряд особенностей их трансформации на наноуровне [5–7]. Полученные результаты, на наш взгляд, интересны и важны не только для понимания процессов трансформации водных кластеров биополимеров, но и для получения уникальной информации о проявлении размерных эффектов в тепловых свойствах различных наносистем.

Отметим, что существование размерных эффектов в поведении температур и теплот плавления водных нанокластеров в различных влажных (гидратированных) биополимерах к настоящему времени надежно установлено [2,8–16]. В то же время соотношение между тепловыми параметрами процессов кристаллизации и плавления водных кластеров в биополимерах, характерное для металлических наносистем [17, 18], было впервые продемонстрировано нами на примере влажных крахмалов [5–7].

Продолжая калориметрические исследования в этом направлении и выбирая в качестве нового объекта изучения сефадексы, относящиеся, так же как и крахмалы, к полисахаридам, мы надеялись проследить связь между тепловыми свойствами водных кластеров, диспергированных в разных полисахаридных системах, и собственно полимерных матриц, а также выяснить, насколько общими являются закономерности, установленные нами ранее для крахмалов. Интересно было также сопоставить особенности проявления размерных эффектов в тепловых свойствах водных кластеров, включенных в различные макромолекулярные структуры.

Как известно, сефадексы состоят из строго линейных полисахаридных цепей, в то время как основную часть крахмалов составляют молекулы амилопектина, имеющие многочисленные боковые привески [19,20].

Напомним об основных свойствах сефадексов, представляющих интерес для настоящей работы. В водной среде сефадексы образуют декстрановые гели, которые используются в гель-хроматографии уже много десятилетий и, как следствие, хорошо охарактеризованы.

Декстраны – это полисахариды, состоящие из тех же мономерных звеньев, что и крахмал. Однако в сефадексах линейные глюкозные молекулярные цепи искусственно соединены короткими поперечными глицериновыми мостиками. В результате одна гранула геля, имеющая размер 10–100 мкм, что сопоставимо с размерами природных гранул крахмала, является одной гидрофильной мегамолекулой. Марки сефадексов различаются по степени их сшивания, что контролирует их способность к набуханию. Внутренний объем набухшей гранулы – это

совокупность множества переходящих друг в друга ячеек или пор, средние размеры которых надежно определены для каждой марки сефадекса в опытах по разделению белков при гелефильтрации в условиях их полного набухания [19,20].

Исследование зависимостей основных параметров кристаллизации и плавления вымораживаемой воды (ВВ) в сефадексе от его степени гидратации позволяет проследить за началом процесса набухания, за постепенным увеличением размера плавящихся водных кластеров, используя формулу Гиббса–Томсона для определения размеров водных кластеров, как это было сделано ранее нами [5–7] и другими авторами [16]. Отметим, что в такой системе размеры водных кластеров не могут быть определены традиционными методами порометрии, которые обычно используют для твердых материалов [21].

Безусловно, важным обстоятельством, побудившим нас выбрать для продолжения ДСК-исследований тепловые свойства водных кластеров в биополимерах именно влажные сефадексы, является также тот факт, что гели сефадексов представляют собой идеальную аморфную гомогенную систему, в которой никогда не содержится никаких упорядоченных кристаллических структур. Этим сефадексы существенно отличаются от аморфных крахмалов. В аморфном крахмале после разрушения нативных структур (после аморфизации) с течением времени в широком интервале температур и влажностей могут формироваться упорядоченные структуры, подобные нативным [22,23]. Способностью группироваться в упорядоченные структуры в крахмалах обладают боковые привески в молекулах амилопектина, содержащие от единиц до нескольких десятков глюкозных звеньев [24]. Можно было предполагать, что различная структурная организация молекулярных цепей двух типов аморфных полисахаридных систем окажет влияние на тепловые свойства содержащихся в них водных кластеров. Наши ожидания оправдались.

## МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ

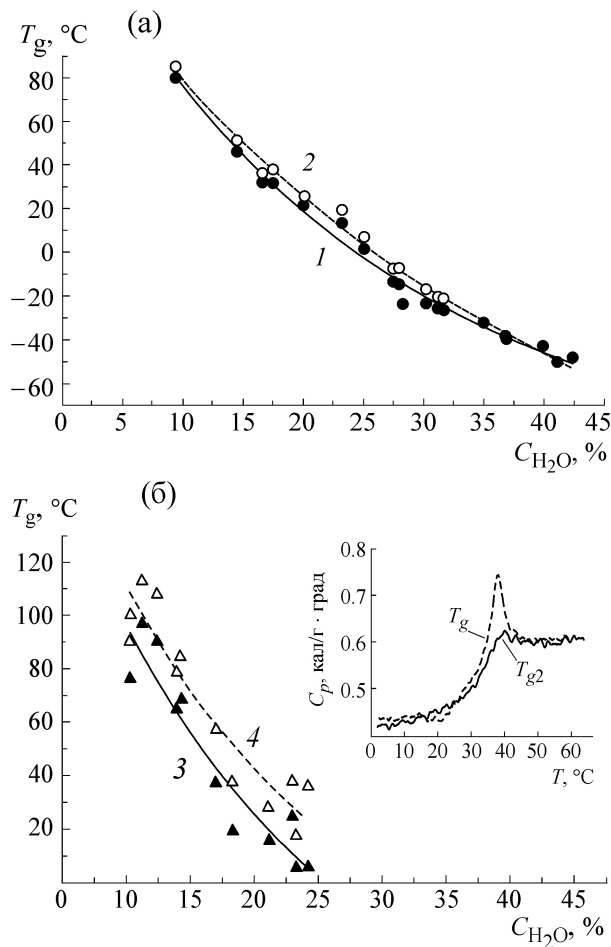
Исследования были выполнены на дифференциальном сканирующем калориметре ДСК-111 (SETARAM Instrumentation, Франция), чувствительность которого составляет  $3 \cdot 10^{-5}$  Дж/с. Для исследования процессов кристаллизации и плавления водных кластеров в выбранном полисахариде проводили последовательно измерения в режиме охлаждения в области температур от 25 до  $-60^\circ\text{C}$  и нагревания в интервале температур, охватывающем, в зависимости от

задачи, диапазон от  $-60$  до  $80^{\circ}\text{C}$ . Скорость нагревания и охлаждения образцов была одинаковой и составляла в основном  $5$  град/мин. Методика коррекции экспериментально получаемых в режимах сканирования по температуре значений температур максимумов исследуемых переходов подробно описана в предыдущих работах [5,6]. Ошибка в определении температуры составляла  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$  во всем диапазоне измерения от  $-60$  до  $80^{\circ}\text{C}$ , в то время как ошибка в определении температур исследуемых переходов равнялась  $\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Ошибка в определении теплоты плавления для скорости  $5$  град/мин составляла  $\pm 5\%$ , теплоты кристаллизации  $\pm 10\%$ . Ошибка при определении  $C_{\text{пл}}$  различается для режимов нагревания и охлаждения и зависит от области температур. В режиме нагревания при температурах выше  $0^{\circ}\text{C}$  она была  $\pm 5\%$ , в области ниже  $0^{\circ}\text{C}$   $\pm 7,5\%$ . В режиме охлаждения ошибка в значении  $C_{\text{пл}}$  составила  $\pm 10\%$ .

В качестве исследуемого аморфного полисахарида был выбран сефадекс марки G-100 (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция), который характеризуется высокой способностью к набуханию. Концентрация воды в исследуемой системе варьировалась от  $10$  до  $55\%$ . Необходимая концентрация воды в образцах в различных экспериментах задавалась путем увлажнения образцов при  $T_{\text{комн}}$ . При этом сначала с помощью вакуумной откачки контрольных образцов при  $T = 105^{\circ}\text{C}$  до постоянной массы была определена исходная влажность препарата, которая составляла  $9\text{--}11\%$  в зависимости от окружающих условий. При изменении степени гидратации сефадекса масса исходных сухих образцов была практически одинаковой и составляла  $\sim 30$  мг. Для установления равномерной влажности образцы, помещенные в стальные герметичные ампулы, выдерживали в течение суток при комнатной температуре.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В работе были получены термограммы влажных образцов сефадекса с содержанием воды от  $10$  до  $55\%$  в режимах нагревания и охлаждения со скоростью, как правило,  $V = 5$  град/мин в интервале температур от  $-60$  до  $25^{\circ}\text{C}$ . Было показано, что в относительно узком интервале изменения влажностей ( $32\text{--}45\%$ ) как в виде самих кривых исследуемых переходов, так и в соотношении температур и теплот плавления (при нагревании) и кристаллизации (при охлаждении) происходят существенные изменения. Результаты последовательного анализа наблюдаемых изменений основных параметров плавления и кристаллизации водных кластеров



**Рис. 1.** Зависимости температур стеклования сефадекса (а) и аморфного картофельного крахмала (б) от их влажности [34]. Кривые 1, 3 – температура перегиба кривой теплоемкости в области перехода,  $T_g$ ; кривые 2, 4 – температура выхода полимера из стеклообразного состояния,  $T_{g2}$ . На врезке приведена температурная зависимость теплоемкости влажного сефадекса: пунктирная линия – для отожженного образца при  $T_{\text{комн}}$  в течение суток, сплошная линия – для закаленного образца.  $C_{\text{H}_2\text{O}} = 16,6\%$ .  $V_{\text{нагр}} = 5$  град/мин.

в зависимости от влажности полимера с привлечением ранее полученных аналогичных данных для крахмала предлагаются ниже.

**Стеклование сефадекса.** Прежде чем приступить к обсуждению результатов исследования плавления и кристаллизации водных кластеров в сефадексе, остановимся на данных, характерных для образцов, содержащих только невымораживаемую и, соответственно, неплавящуюся воду (рис. 1). Как было установлено нами, граница между количеством вымораживаемой и невымораживаемой воды в выбранном сефадексе соответствует содержанию воды  $\sim 30\%$ . При меньших влажностях в отсутствие плавления воды наблюдается скачок теплоемкости,

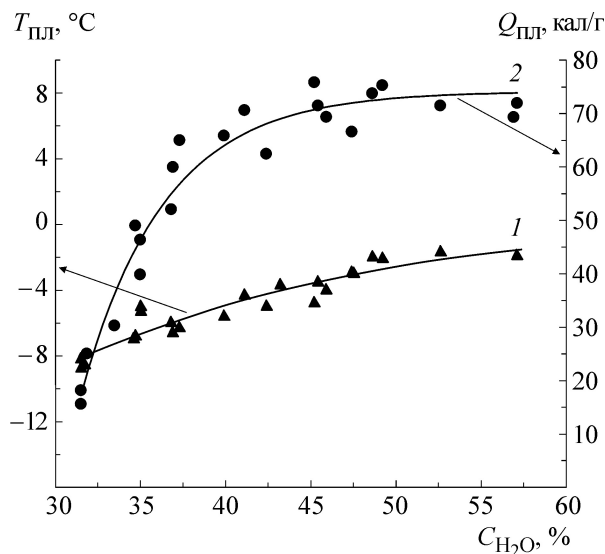


Рис. 2. Зависимости температуры  $T_{пл}$  (треугольники) и теплоты  $Q_{пл}$  (кружки) плавления ВВ в сефадексе от влажности. Значения  $Q_{пл}$  нормированы на массу ВВ.

который естественно отнести к процессу стеклования.

Стеклование – это релаксационный переход аморфной системы из жидкого (или высокоэластического для полимеров) термодинамически равновесного состояния в замороженное неравновесное стеклообразное состояние [25–27]. Несмотря на то, что молекулярные структуры разных стеклующихся систем могут сильно различаться, изменения их главных макроскопических характеристик, к числу которых относится теплоемкость, в интервале стеклования носят общий характер.

Как было установлено [2,28–33], как аморфные, так и нативные биополимеры при определенных значениях температур и влажности могут находиться в стеклообразном состоянии. При этом поведение их теплоемкости в аморфном состоянии в интервале стеклования является типичным для всех стеклующихся систем и характеризуется проявлением скачка теплоемкости. В то же время в нативном состоянии подобный скачок в нативном крахмале, как и в других нативных биополимерах, не наблюдается. В аморфных биополимерах также наблюдается зависимость температуры стеклования от содержания воды, которая в этом случае является пластификатором, от условий нагревания и охлаждения, от тепловой предыстории тестируемых образцов. В настоящей работе нагревание и охлаждение, как правило, проводили с одинаковой скоростью 5 град/мин, поэтому значения температур стеклования при нагрева-

нии и охлаждении образца с одной и той же влажностью практически одинаковы.

Как следует из рис. 1а (кривая 1), температура стеклования  $T_g$  сефадекса (температура середины скачка теплоемкости) понижается с ростом влажности. Полученная для сефадекса зависимость  $T_g$  близка к аналогичным зависимостям для исследованных нами ранее крахмалов (рис. 1б, кривая 3) [34].

Отметим, что получение экспериментальных значений  $T_g$  становится весьма затруднительным при влажностях  $> 30\%$ , при которых на термограммах начинает проявляться плавление водных кластеров. Однако полученные нами экспериментальные данные позволили оценить температуру стеклования даже при таких влажностях, когда теплота плавления весьма значительна,  $\geq 35\%$ . В этом случае за  $T_g$  мы принимали температуру начала процесса дополнительной кристаллизации при нагревании (например, рис. 4б).

На врезке на рис. 1 также приведены температурные зависимости теплоемкости отожженного в течение суток при  $T_{комн}$  и затем закаленного образца влажного сефадекса ( $C_{H_2O} = 16,6\%$ ), которые являются классическими для стеклующихся систем. Эти данные наглядно иллюстрируют утверждение, что сефадекс – идеальная аморфная система. Повторим, что одна глобула сефадекса – это одна мегамолекула геля, размеры которой порядка 10–100 мкм, что сопоставимо с размерами глобул нативного крахмала. На этом же рисунке приведены данные, характеризующие ширину интервала стеклования для сефадекса и аморфного крахмала при разных влажностях (рис. 1, кривые 2 и 4). Ниже мы остановимся на этом подробнее.

**Температура и теплота плавления водных кластеров, диспергированных во влажных сефадексах.** На рис. 2 приведены зависимости температур и теплот (нормированы на массу ВВ) плавления водных кластеров от влажности сефадекса. Видно, что оба параметра плавления ВВ уменьшаются с понижением влажности, что является типичным проявлением размерного эффекта для наносистем. Отметим, что основное внимание экспериментаторов, занимающихся в последние десятилетия изучением тепловых свойств наносистем, сосредоточено на исследованиях металлов и газов [17,18]. При этом аномалии в тепловых свойствах диспергированной в биосистемах воды наблюдались очень давно (работа [8] и ссылки в ней). Однако их трактовка долгое время не рассматривалась с точки зрения проявления размерных эффектов. Исключения составляют работы [5–7,16]. Выпол-

ненные нами в последние годы исследования тепловых свойств крахмалов с низкой влажностью наглядно продемонстрировали роль размера формирующихся в них водных кластеров [5–7].

Вычисленные на основании полученных для сефадекса параметров плавления ВВ размеры кластеров по уравнению Гиббса–Томсона при значениях влажности, близких к 50% (с  $T_{пл}$  равной  $\sim -1,5^\circ\text{C}$ ), составляют величину порядка  $\sim 35$  нм. Максимальное понижение  $T_{пл}$  ВВ в сефадексе относительно  $T_{пл}$  объемной воды, полученное в работе для влажности 32%, составляет  $\sim 9^\circ\text{C}$ , что, согласно уравнению Гиббса–Томсона, соответствует размеру водного кластера  $\sim 5$  нм.

Напомним, что при коррекции значений температур плавления ВВ на термограммах, полученных при  $V = 5$  град/мин, за  $T_{пл} = 0^\circ\text{C}$  принимались данные по плавлению объемной воды на той же скорости нагревания при условии равенства массы образцов объемной воды и массы ВВ во влажных сефадексах [5,6].

Сопоставление полученных зависимостей  $T_{пл}$  и  $Q_{пл}$  водных кластеров в сефадексе от его влажности с аналогичными зависимостями для нативного крахмала демонстрирует их общий характер. Отметим, что при этом для денатурированного крахмала подобный вид зависимостей наблюдается лишь после длительного хранения аморфизованных образцов [6,7].

**Температура и теплота кристаллизации водных кластеров, диспергированных во влажных сефадексах.** В отличие от процесса плавления ВВ выбор количественных характеристик процесса кристаллизации не является таким простым. Сначала рассмотрим вопрос о температуре кристаллизации ВВ в сефадексе. При этом речь пойдет об экзотермических кривых, связанных с кристаллизацией ВВ, в режиме охлаждения. Остановимся на следующих двух температурных характеристиках этого процесса. Первая –  $T_{кр}$ , значение температуры максимального в этих условиях развития процесса кристаллизации (рис. 3а). С уменьшением влажности от 57 до 35%  $T_{кр}$  ВВ в сефадексе изменяется от  $-15$  до  $-35^\circ\text{C}$  (кривая 1). Такой характер изменения  $T_{кр}$  резко отличается от закономерности, ранее установленной для аморфного картофельного крахмала (кривая 2). В последнем случае  $T_{кр}$  от влажности практически не зависит [6,7].

Второй параметр, используемый нами для температурной характеристики процесса кристаллизации при охлаждении, – полуширина наблюдаемой экзотермической кривой (рис. 3б). Как видно из рисунка, полуширина кривой кристаллизации ВВ в сефадексе (кривая 4) с

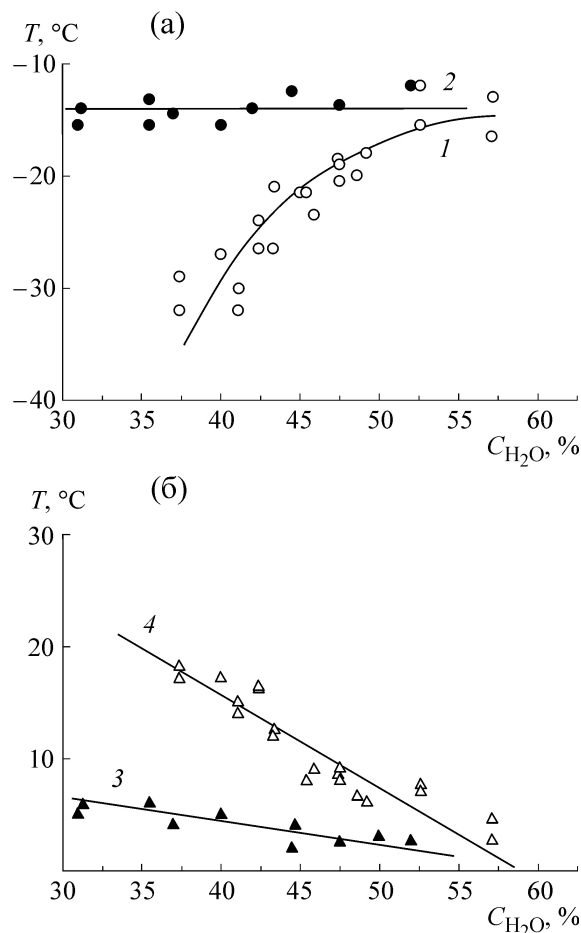
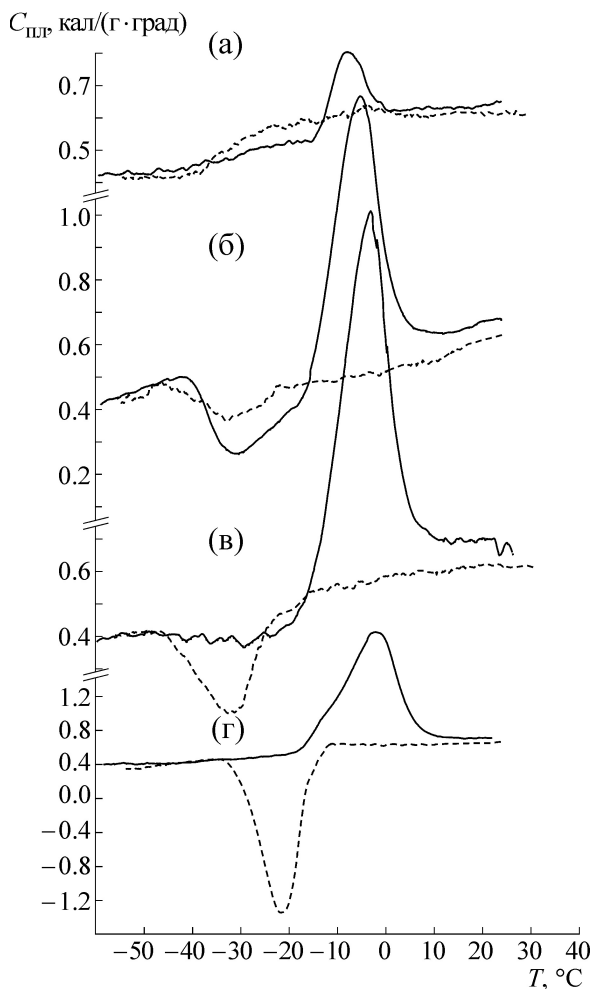


Рис. 3. Зависимости температуры кристаллизации  $T_{кр}$  (а) и полуширины кривых кристаллизации  $\Delta T_{1/2}$  (б) ВВ от влажности полимера. Кривые 1, 4 – для сефадекса; кривые 2, 3 – для аморфного крахмала [6,7].

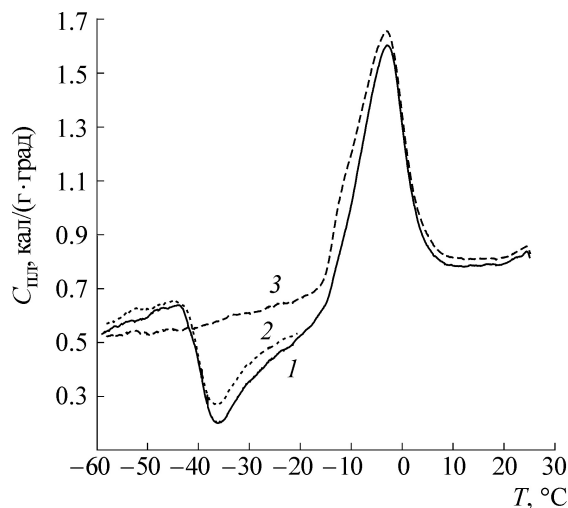
изменением влажности от 37 до 57% изменяется в несколько раз (рис. 3, кривая 4). В то же время в крахмале эта величина в том же интервале влажностей меняется незначительно (рис. 3, кривая 3) и близка к минимальному значению полуширины для сефадекса [6,7].

Теперь перейдем к другому основному параметру процесса кристаллизации – теплоте перехода. Здесь ситуация еще более сложная, поскольку процесс кристаллизации, согласно представлениям классической термодинамики, определяется наложением двух процессов – зародышеобразования и роста кристаллов и зависит от их скоростей [35,36]. Проведем поэтапно описание наблюдаемых явлений на соответствующих термограммах (рис. 4). Было получено, что при влажностях ниже 36–37% соответствующий кристаллизации экзотермический максимум при охлаждении не фиксируется в условиях проводимого эксперимента (ско-



**Рис. 4.** Термограммы охлаждения (пунктирная линия) и нагрева (сплошная линия) влажного сефадекса в области кристаллизации и плавления водных кластеров при разных влажностях полимера: (а) – 34,7%; (б) – 37,3%; (в) – 41,1%; (г) – 45,0%  $H_2O$ .

рость 5 град/мин), хотя граница существования ВВ в сефадексе, определенная по появлению на термограмме ее плавления, составляет ~30%. В этом случае в процессе охлаждения исследуемая система, по-видимому, «попадает» в область стеклования прежде, чем успевает экспериментально проявиться начало зародышеобразования. Иными словами, при этих влажностях сефадекса мы имеем дело в течение всего процесса охлаждения в основном с переохлажденной водой. На рис. 4а приведенная термограмма охлаждения демонстрирует изменение хода теплоемкости в определенной области температур, характерное для процесса стеклования, – скачок теплоемкости. При этом при нагревании образца наблюдается поглощение тепла с  $T_{пл} = -8^\circ C$  и  $Q_{пл} = 2,0$  кал/г. Различие между теплоемкостью при охлаждении и нагревании в области от  $-35$  до  $-13^\circ C$ , предше-



**Рис. 5.** Термограммы нагрева влажного сефадекса из серии последовательных охлаждений–нагреваний: 1 – первое нагревание; 2 – второе нагревание с остановкой при  $T = -20^\circ C$ ; 3 – третье нагревание после прерывания сканирования.  $C_{H_2O} = 39,9\%$ ;  $V_{нагр} = 5$  град/мин.

ствующей плавлению ВВ, можно отнести к происходящему во время нагревания процессу докристаллизации. Теплота этого процесса составляет  $Q_{кр}$  примерно около 2 кал/г, что сопоставимо с  $Q_{пл}$  ВВ. Можно предположить, что в процессе охлаждения в окрестности стеклования полимера образовались зародыши, рост которых мы впоследствии и наблюдаем при нагревании.

Далее, в интервале влажностей 37–43%, при охлаждении уже наблюдается частичная кристаллизация ВВ в виде экзотермического максимума, но завершение процесса происходит все равно при нагревании в виде докристаллизации непосредственно перед плавлением. При этом в начале диапазона (вблизи 37%) вклад кристаллизации при охлаждении невелик, основной процесс происходит при нагревании (рис. 4б). При повышении же влажности кристаллизация в основном проходит во время охлаждения, только небольшая дополнительная кристаллизация наблюдается при нагревании (рис. 4в). Добавим, что убедиться в том, что наблюдаемое понижение значений теплоемкости на термограммах нагревания действительно связано с выделением тепла кристаллизации ВВ, нам позволил следующий опыт, состоящий из нескольких последовательных охлаждений и нагреваний сефадекса с влажностью 39,9% (рис. 5). Сначала были проведены стандартные охлаждение и нагревание образца, включая плавление водных кластеров. После повторного охлаждения в процессе нагревания была сделана остановка при температуре примерно  $-20^\circ C$ , от

которой вновь было проведено охлаждение и затем нагревание, включая плавление водных кластеров. Как видно из рисунка, при нагревании после остановки дополнительная кристаллизация отсутствует. При этом теплоты плавления ВВ в условиях стандартного опыта и опыта с прерыванием нагревания совпадают. Это подтверждает, что в течение первого непрерывного нагрева образца в области температур, предшествующей плавлению ВВ, проходит и завершается именно кристаллизация, связанная с дополнительным ростом кристаллитов, образовавшихся при охлаждении.

Что касается кристаллизации ВВ в сефадексе с влажностью выше 45%, то она полностью происходит и завершается при охлаждении, при этом  $Q_{кр}$  и  $Q_{пл}$  водных кластеров практически совпадают (рис. 4г).

**Проявление гистерезиса в соотношении процессов плавления и кристаллизации диспергированной в сефадексе воды.** Полученные результаты наглядно демонстрируют существование гистерезиса между процессами плавления и кристаллизации ВВ в сефадексах. Наблюдения проявления гистерезиса, естественно, стали возможны лишь с использованием ДСК путем сопоставления результатов прямого и обратного сканирования. Из приведенных выше данных следует, что между температурами плавления ВВ в сефадексе при нагревании (рис. 2, кривая 1) и температурами ее кристаллизации при охлаждении (рис. 3, кривая 1) имеет место гистерезис,  $T_{пл}$  выше  $T_{кр}$ , как и в нативном и денатурированном крахмале [6,7]. Количественно наблюдаемый гистерезис может быть охарактеризован как разница между  $T_{пл}$  и  $T_{кр}$ .

Между значениями теплот плавления и кристаллизации ВВ в сефадексе при охлаждении в некотором интервале влажностей также существует различие –  $Q_{пл}$  больше  $Q_{кр}$  (рис. 6). Однако количественная характеристика наблюдаемого различия путем простого сравнения этих теплот является неполной. Видно, что разница в теплотах этих процессов на низких влажностях существенна и уменьшается, как и в крахмалах, с ростом влажности. При этом величина данной разности в сефадексе гораздо больше, чем в крахмале. Кроме того, в отличие от крахмала, как было показано выше, в области влажностей, при которых наблюдается максимальное различие между значениями теплот плавления при нагревании и теплот кристаллизации ВВ при охлаждении (при одинаковой скорости 5 град/мин), в процессе нагревания непосредственно перед началом плавления ВВ в исследуемом сефадексе происходит дополнительное выделение тепла, т.е. наблюдается вторая стадия кристаллизации ВВ. При

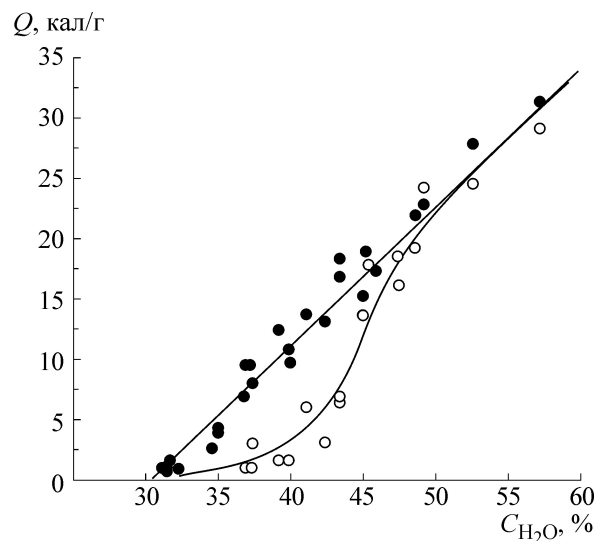


Рис. 6. Зависимости теплот плавления (темные кружки) и кристаллизации (светлые кружки) водных кластеров, диспергированных в сефадексе, от его влажности. Приведенные значения теплот нормированы на массу образца.

этом даже с учетом теплоты докристаллизации суммарная величина  $Q_{кр}$  ВВ по-прежнему остается меньше  $Q_{пл}$ . Таким образом в целом, используя понятие (термин) «гистерезис» в самом широком его толковании как «отставание следствия от производящей его причины», полученное в условиях данного эксперимента соотношение между теплотами плавления и кристаллизации ВВ в сефадексе с влажностью 32–43% можно считать двустадийным проявлением гистерезиса.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Итак, проведенное ДСК-исследование позволило установить ряд особенностей процессов плавления и кристаллизации водных кластеров, диспергированных в сефадексе. К их числу, во-первых, следует отнести проявление характерного для малых систем размерного эффекта в зависимостях температур и теплот исследуемых процессов от влажности сефадекса. Показано, что полученные значения температур и теплот зависят от концентрации ВВ в сефадексе и изменяются нелинейно при ее увеличении. Во-вторых, отчетливо проявляется гистерезис между процессами плавления и кристаллизации ВВ. В некотором интервале влажностей полимера  $T_{пл}$  выше  $T_{кр}$ , а  $Q_{пл}$  больше  $Q_{кр}$ .

Сравнение данных о тепловых свойствах водных кластеров в сефадексе, полученных в данной работе, с соответствующими результатами для других биополимеров, в первую оче-

редь, для подробно изученных нами ранее крахмалов [5–7], показывает, что между ними много общего. Однако существуют и определенные различия, главным образом, в процессах кристаллизации ВВ в этих системах.

По-видимому, причина имеющихся различий кроется в связи процессов кристаллизации водных кластеров в этих системах с молекулярной подвижностью полимерных матриц. Еще раз напомним об общепринятых подходах к объяснению сути процесса кристаллизации. Как известно, кристаллизация определяется перекрыванием по шкале температур двух процессов – зародышеобразования и роста кристаллов, а именно их скоростями. Если устойчивость образующегося зародыша определяется зависимостью свободной энергии образования сферического зародыша от радиуса [35], то вероятность образования зародыша и последующий рост кристаллитов зависит от подвижности кристаллизующегося вещества [35,36], в нашем случае воды в двухкомпонентной системе вода–биополимер. При этом вероятность образования зародыша увеличивается с понижением температуры, а его рост увеличивается с ее повышением.

Выполненные нами исследования процесса кристаллизации водных кластеров в сефадексе и крахмале показывают, что подвижность молекул воды связана с молекулярной подвижностью полимерной матрицы. Установленное ранее различие в зависимости  $T_{кр}$  ВВ от влажности в нативном и аморфном крахмалах продемонстрировало отчетливую связь параметров кристаллизации диспергированной воды с молекулярной подвижностью биополимерной матрицы [6]. Было показано, что в то время как в относительно жестком частично-кристаллическом нативном крахмале основную роль в процессе кристаллизации играет размер водного кластера, в аморфном крахмале процесс кристаллизации определяется высокой молекулярной подвижностью цепей биополимера, находящегося в высокоэластическом состоянии. При этом размер кластера практически не влияет на величину  $T_{кр}$ .

Полученные в данной работе результаты позволили сравнить тепловые свойства двух полностью аморфных систем – сефадекса и аморфного крахмала – и понять, как на них влияет различная структурная организация молекулярных цепей этих полисахаридов. Разница в архитектуре сефадекса и крахмала состоит прежде всего в наличии в последнем относительно коротких боковых привесков к линейным цепям полисахаридов. Как известно, в сефадексах линейные полисахаридные молекулярные цепи искусственно сшиты короткими по-

перечными глицериновыми мостиками, что, безусловно, влияет на их подвижность. Чем больше сшивок, тем более жесткой является пространственная структура каждой гранулы. Зависимость  $T_g$  и ширины интервала стеклования от количества сшивок в различных сефадексах – предмет нашего дальнейшего исследования.

Основные принципы построения сложной иерархической структуры гранул крахмала к настоящему моменту надежно установлены, однако многие конкретные детали архитектуры и связанных с ней тепловых свойств аморфного крахмала до сих пор остаются дискуссионными. Один из вопросов, представляющий значительный интерес для настоящей работы, заключается в том, как к главной цепи амилопектина присоединены боковые цепи, величина которых варьирует от единиц до десятков глюкозных остатков [37]. При этом наиболее вероятной является длина в 10–12 полисахаридных звеньев. Многочисленные хроматографические исследования остатков расщепленных молекул дают лишь информацию о распределении боковых цепей по длине, но не о способах их присоединения к основной цепи [38]. Авторы работы [39], основываясь на своих исследованиях полимерных жидких кристаллов, высказали предположение, что места ветвления цепей должны быть достаточно гибкими. При описании своей модели они использовали термин «flexible spacer». В противном случае процесс организации боковых цепей в упорядоченные кристаллические структуры был бы невозможен ни в нативном, ни в аморфном состоянии в процессе длительного хранения [37]. Следует отметить, что этот термин до сих пор используется при описании процессов структурирования в жидких кристаллических полимерах [40].

Именно «flexible spacer» обеспечивает достаточную подвижность боковых цепей, необходимую для формирования кристаллических структур как в нативном состоянии при росте гранул крахмала в природе, так и в аморфном крахмале в процессе ретроградации. В то же время в денатурированном состоянии крахмала «flexible spacer» обеспечивает в целом более высокую молекулярную подвижность цепей полимерной матрицы в значительной мере за счет практической независимости подвижности привесков относительно основной цепи. Такой вывод позволяет сделать наблюдаемое различие в ширине интервала стеклования двух систем. Как известно, точка перегиба скачка стеклования делит интервал стеклования на две неравные по температуре части. При этом низкотемпературная часть интервала, как правило, шире, и его нижняя граница определяется с большой



ошибкой [26,27]. Именно поэтому в качестве характеристики интервала стеклования мы использовали продемонстрированную на рис. 1 разницу температур.

Естественно предположить, что процесс стеклования аморфного крахмала можно рассматривать как наложение соответствующих процессов собственно основной цепи и различных боковых привесков, имеющих гибкую связь с основной цепью. Как следствие, интервал стеклования такой сложной системы в крахмале должен быть гораздо шире, чем в гомогенной структуре сефадекса, что и подтверждается в наших экспериментах. На рис. 1 приведены значения двух различных температур, характеризующих скачок стеклования: одна  $T_g$  – классическая, соответствующая перегибу перехода теплоемкости в области скачка стеклования, другая  $T_{g2}$  – граница интервала стеклования при переходе в высокоэластическое состояние. Как следует из приведенных данных, классические значения температур стеклования в крахмале и сефадексе близки друг к другу (рис. 1, кривые 1, 3). В то же время разность между значениями  $T_g$  и  $T_{g2}$  для каждой из систем отличается в несколько раз. Таким образом, можно считать, что переход полимерной матрицы из высокоэластического состояния в стеклообразное и связанное с этим процессом уменьшение молекулярной подвижности воды в рассматриваемых системах происходят по-разному, и поэтому ширина температурного интервала такого уменьшения в них отличается в несколько раз.

Добавим, что, как показано экспериментально [41], подвижность воды изменяется симбатно изменению вязкости биополимеров. Исследования коэффициента диффузии воды в таких системах, как аморфный крахмал, амилопектин, желатина, показали, что при переходе биополимера от практически дегидратированного состояния к системам с промежуточной влажностью (50%) этот коэффициент увеличивается на шесть порядков. Это сопоставимо с изменением вязкости биополимеров в интервале стеклования как при нагревании, так и при гидратировании. Можно считать, что вблизи интервала стеклования подвижность (диффузия) воды в биополимере также изменяется многократно.

## ВЫВОДЫ

Из всего вышесказанного непосредственно вытекает, что процесс кристаллизации водных кластеров в сефадексе и аморфном крахмале при низких влажностях может развиваться по-разному из-за различий в подвижности воды в

этих системах, являющейся следствием разной молекулярной подвижности полимерных матриц вблизи области стеклования. Действительно, в сефадексе при низких влажностях процессы зародышеобразования и роста в условиях проведенного эксперимента разделены по времени. Зародышеобразование происходит при охлаждении, а рост в основном проявляется при нагревании. Напротив, в крахмале зародышеобразование и рост кристаллитов воды происходят при всех влажностях одновременно в процессе охлаждения. В сефадексе подобным образом кристаллизация водных кластеров происходит лишь при больших значениях влажности вдали от  $T_g$ .

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Y. H. Roos, *Phase transitions in foods*, (Academic Press, N.-Y., 1995).
2. *Water Relationships in Foods*, Ed. by H. Levine and L. Slade (Plenum Press, N.-Y., 1991).
3. *Carbohydrates in food*, Ed. by A.-C. Eliasson (Marcel Dekker. Inc, N.-Y., 1996).
4. H. D. Goff in *Starch in food: Structure, function and applications*, Ed. by A.-C. Eliasson (Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 2004), pp. 425–427.
5. N. A. Grunina, G. I. Tsereteli, T. V. Belopolskaya, O. I. Smirnova, *Carbohydrate Polymers* **132**, 499 (2015).
6. Г. И. Церетели, Т. В. Белопольская, Н. А. Грунина и др., *Биофизика* **62** (1), 53 (2017).
7. Т. В. Белопольская, Г. И. Церетели, Н. А. Грунина и др., *Биофизика* **62** (5), 852 (2017).
8. Г. М. Мревлишвили, *Низкотемпературная калориметрия биологических макромолекул* (Мецниереба, Тбилиси, 1984).
9. G. I. Tseretely and O. I. Smirnova, *J. Therm. Analysis* **38**, 1189 (1992).
10. Г. И. Церетели, Т. В. Белопольская и Т. Н. Мельник, *Биофизика* **42** (1), 68 (1997).
11. T. V. Belopolskaya, G. I. Tsereteli, N. A. Grunina, et al., in *Starch Science Progress*, Ed. by L. A. Wasserman, G. E. Zaikov, P. Tomasik, et al. (Nova Science Publ. New-York, 2011), pp. 1–15.
12. K. Tananuwong and D. S. Reid, *Carbohydrate Polymers* **58**, 345 (2004).
13. K. Tananuwong and D. S. Reid, *J. Agricult. & Food Chem.* **52**, 4308 (2004).
14. S. Suzuki and S. Kitamura, *Food Hydrocolloids* **22**, 862 (2008).
15. T. Tran, K. Thitipraphunkul, K. Piyachomkwan, et al., *Starch/Stärk* **60**, 61 (2008).
16. S. Park, R. A. Venditti, H. Jameel, et al., *Carbohydrate Polymers* **66**, 97 (2006).
17. Г. Н. Макаров, *Успехи физ. наук* **180**, 185 (2010).
18. Р. С. Берри и Б. М. Смирнов, *Успехи физ. наук* **179**, 147 (2009).
19. Г. Детерман, *Гель-хроматография* (Мир, М., 1970).

20. Т. Дэвени и Я. Гергей, *Аминокислоты, пептиды и белки* (Мир, М., 1976).
21. Т. Г. Плаченев и С. Д. Колосенцев, *Порометрия* (Химия, Л., 1988).
22. *Starch in food: Structure, function and applications*, Ed. by A.-C. Eliasson (Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 2004).
23. Г. И. Церетели, Т. В. Белопольская, Н. А. Грунина и др., *Вестн. СПбГУ*, сер. 4, вып. 2, 10 (2012).
24. Е. Bertoft, in *Starch in food: Structure, function and applications*, Ed. by A.-C. Eliasson (Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 2004), pp. 57–96.
25. *Энциклопедия полимеров* (Сов. энциклопедия, М., 1977), т. 3, сс. 489–497.
26. Ю. К. Годовский, *Теплофизические методы исследования полимеров* (Химия, М., 1976).
27. В. А. Берштейн и В. М. Егоров, *Дифференциальная сканирующая калориметрия в физико-химии полимеров* (Химия, Л., 1990).
28. Г. И. Церетели и О. И. Смирнова, *Биофизика* **34**, 2243 (1989).
29. Г. И. Церетели и О. И. Смирнова, *Биофизика* **33**, 905 (1991).
30. G. I. Tseretely and O. I. Smirnova, *J. Therm. Analysis*, **38**, 89 (1992).
31. G. I. Tsereteli, T. V. Belopolskaya, N. A. Grunina, et al., *J. Therm. Anal. Calorim.* **62**, 1189 (2000).
32. G. I. Tsereteli, T. V. Belopolskaya, and N.A. Grunina, *J. Therm. Anal. Calorim.* **92**, 711 (2008).
33. T. V. Belopolskaya, G. I. Tsereteli, N. A. Grunina, et al., *J. Therm. Anal. Calorim.* **92**, 677 (2008).
34. T. V. Belopolskaya, N. A. Grunina, G. I. Tsereteli, and O. I. Smirnova, in *Starch Progress in Structural studies, modifications and applications*, Ed. by P. Tomasik et al. (Polish Society of Food Technologists, Krakow, 2004), pp. 165–176.
35. Л. Манделькерн, *Кристаллизация полимеров* (Химия, Л., 1966).
36. D. Turnbull, *Solid State Physics* **3**, 226 (1956).
37. M. A. Donald, in *Starch in food: Structure, function and applications*, Ed. by A.-C. Eliasson (Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 2004), pp. 156–184.
38. S. Hizukuri, in *Carbohydrates in food*, Ed. by A.-C. Eliasson (Marcel Dekker. Inc., N.-Y., 1996), pp. 347–429.
39. M. A. Donald and A. J. Windle, *Liquid crystalline polymers* (C.U.P., Cambridge, 1992).
40. V. P. Shibaev and A. Yu. Bobrovsky, *Russ. Chem. Rev.* **86** (11), 1024 (2017).
41. M. Karel and J. Sajuy, in *Water Relationships in Foods*, Ed. by H. Levine and L. Slade (Plenum Press, N.-Y., 1991), pp. 157–173.

## Interrelation of the Process of Crystallization of Water Clusters Filtrated through Sephadex Resins in their Wet Form to Polymeric Matrix Glass-Transition Temperature

G.I. Tseretely\*, T.V. Belopolskaya\*, N.A. Grunina\*\*, and O.I. Smirnova\*

\*Saint Petersburg State University, ul. Ulyanovskaya 1, Petergof, St. Petersburg, 198504 Russia

\*\*State University of Civil Aviation, ul. Pilotov 38, St. Petersburg, 196210 Russia

Differential scanning calorimetry analysis was used to explore whether the main parameters of the crystallization and melting processes of small-sized water clusters infiltrated through Sephadex resins depend on the amount of water (30–55%) sorbed onto the polymer surface. It is shown that the values of temperatures and heats of the processes under study are dependent on the concentration of frozen water in Sephadex, which can be considered as a manifestation of the size effect. A hysteresis between the processes of melting and crystallization of frozen water has also been detected: in a certain moisture range of the biopolymer  $T_m$  is higher than  $T_{cr}$ , and  $Q_m$  is greater than  $Q_{cr}$ . Both of these facts reflect the basic properties of low-dimensional systems. A comparison of two polysaccharide systems with different structural organization, Sephadex and the amorphous starch studied earlier, showed that there is a significant difference in the processes of crystallization of frozen water in these systems. It was found that under the conditions of the experiment in Sephadex with low humidity the nucleation and growth processes, determining the crystallization of water, are separated in time. Nucleation occurs upon cooling, and growth is mainly manifested by heating. Only at high humidity, far from  $T_g$  of Sephadex, both processes occur during cooling, partially overlapping each other. In contrast, in amorphous starch, with all the humidity, both processes occur during cooling. The observed differences in the crystallization of frozen water can be related to the different mobility of water in these systems, due to the difference in the molecular mobility of the biopolymer matrices proper near the glass transition region.

*Keywords:* calorimetry, Sephadex resin, water clusters, crystallization, melting, size effect, hysteresis