

**Термопластический анализ в оптимизации криобиотехнологий**

UDC 57.043:57.083-678.073

E.V. STRUCHKOVA<sup>1</sup>, A.L. KIRILYUK<sup>2</sup>, I.A. OSETSKY<sup>2\*</sup>**Thermoplastic Analysis in Cryobiotechnology Optimization**

Сырье растительного и животного происхождения широко применяется при производстве медицинских и ветеринарных препаратов, косметических средств, пищевых добавок, поскольку оно является уникальным источником биологически активных комплексов: витаминов, микроэлементов, аминокислот, гормонов, липидных фракций и т. д. Однако сохранение их структуры и свойств для дальнейшего использования в производстве – сложнейшая технологическая задача, решение которой возможно на основе современных криобиотехнологий: криогенного диспергирования [3], криосублимационного фракционирования [1], экстракции сжиженными газами [4]. При их реализации необходимо контролировать параметры, определяющие структуру и фазовое состояние перерабатываемого материала. В данном случае к числу наиболее сложных параметров для определения и контроля относится температура  $T_g$ , при которой в охлаждаемом образце исчезают жидкие микрофазы, т. е. происходит его полный переход в твердое состояние. Сложность определения этого параметра связана с тем, что процесс кристаллизации воды в биоматериале протекает в широком интервале температур: от  $-2 \dots -5^\circ\text{C}$  и до температур стеклования связывающих воду биомолекулярных комплексов, которые могут достигать  $-100^\circ\text{C}$  и ниже. При криогенном измельчении и криосублимационном фракционировании наличие или отсутствие жидких микрофаз в перерабатываемом сырье определяет не только особенности переработки и себестоимость конечного продукта, но и его качество.

Цель работы – разработка метода определения значений температуры  $T_g$  при криогенной переработке различных биоматериалов.

**Материалы и методы**

Для определения значений температуры  $T_g$  перерабатываемых биоматериалов применяли метод термопластической деформации [2]. В качестве

Raw materials of plant and animal origins are widely used during the production of medical and veterinary preparations, cosmetics, food additives, since they are unique source of biologically active complexes: vitamins, microelements, amino acids, hormones, lipid fractions etc. However preservation of this structure and properties for further use in production is the complicated task the solving of which is possible basing on contemporary cryobiotechnologies: cryogenic dispersion [3], cryosublimation fractionation [1], extraction with liquefied gases [4]. During their realization it is necessary to control the parameters determining the structure and phase state of the material to be processed. In this case to the most complicated parameters for determining and control the temperature  $T_g$  is referred, under which in a cooled sample liquid microphases disappear, i.e. there is its complete transformation into a solid state. The difficulty of this parameter determining is related to the fact that the process of water crystallization in biological material proceeds within a wide temperature range: from  $-2 \dots -5^\circ\text{C}$  and down to vitrification ones, binding water of biomolecular complexes, which may reach  $-100^\circ\text{C}$  and lower. At cryogenic fragmentation and cryosublimation fractionation the presence or absence of liquid microphases in the raw material under processing determines not only the peculiarities of the processing and final product prime cost, but also its quality.

The research aim was to develop the method of determining the temperature values  $T_g$  at cryogenic processing of various biomaterials.

**Materials and methods**

To determine  $T_g$  values for the biological materials under processing there was applied the method of thermoplastic deformation [2]. As the objects under study the fragments of washed-out in distilled water porcine placenta tissues as well as “Semirenko” apples with the storage term under 3 months were used. Prior to the experiment the studied fragments were frozen in deformation device [2] with the rates of 10–20 grad/min,

<sup>1</sup>Национальный технический университет “ХПИ”, г. Харьков<sup>2</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-41-11, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

<sup>1</sup>National Technical University “Kharkiv Polytechnical Institute”, Kharkov, Ukraine<sup>2</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

\* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 4111, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

исследуемых объектов использовали фрагменты отмытых в дистиллированной воде тканей свиной плаценты и яблок сорта «Семиренко» со сроком хранения не более трех месяцев. Перед экспериментом исследуемые фрагменты замораживали в деформационной приставке [2] со скоростями 10–20 град/мин, которые обычно используются при криогенной переработке биологического сырья

### Результаты и обсуждение

На рис. 1 приведены типичные термопластические кривые, полученные при изучении замороженных тканей свиной плаценты по методике [2]. При всех значениях внешних напряжений  $\sigma$ , прикладываемых к исследуемым образцам, характер зависимости  $\varepsilon = \varepsilon(T)$  не изменяется: деформация замороженных образцов  $\Delta \varepsilon_T$  незначительно возрастает с повышением температуры от  $-140^\circ\text{C}$  до некоторой температуры  $T_g$ , а при  $T > T_g$  начинается их интенсивное пластическое течение. При этом температура начала пластического течения  $T_g$  существенно зависит от прикладываемых напряжений  $\sigma$ .

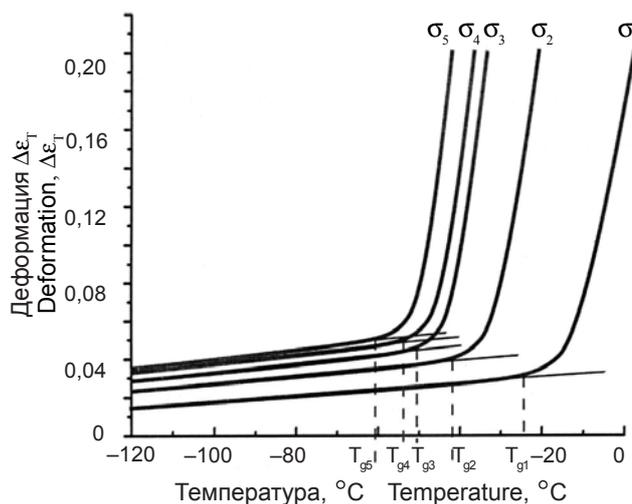
Характер зависимостей температуры  $T_g$  от приложенных напряжений  $\sigma_0$  для тканей свиной плаценты и фрагментов яблок сорта «Семиренко» показан на рис. 2, где  $\sigma_0(T)$  – напряжение начала интенсивного пластического течения образца при определенной температуре  $T$ , т. е. аналог предела текучести материала. Представленные на рис. 2 кривые имеют выраженный трехстадийный характер. Так, напряжение  $\sigma_0$  линейно уменьшается в интервалах температур  $-196^\circ\text{C} \dots T''_g$  и  $T'_g \dots -10^\circ\text{C}$ , однако наблюдается достаточно резкое его снижение в диапазоне температур  $T''_g \dots T'_g$ . С точки зрения физики пластичности данный эффект можно объяснить только плавлением или расстеклованием комплексов «биополимер-вода» в этом интервале температур. При таких процессах в образцах образуются жидкие микрофазы и, как следствие, снижается сопротивляемость образцов внешней нагрузке и повышаются их пластические характеристики. По окончании этих процессов, т. е. в интервале температур  $T'_g \dots -10^\circ\text{C}$ , наблюдается обычная для чистого льда зависимость  $\sigma_0 = \sigma_0(T)$ . Установленные таким образом температурные интервалы плавления или расстеклования биополимерных комплексов позволяют оптимизировать режимы переработки соответствующего биологического сырья. Так, криогенное измельчение целесообразно проводить при температурах  $T < T''_g$ , то есть при исчезновении жидких микрофаз и охрупчивании биоматериала. Напротив, криосублимационное фракционирование начинают при  $T \geq T'_g$ , когда большая часть свободной воды закристаллизована, а биологически активные низкомолекулярные фракции находятся в жидких микрофазах.

usually used for cryogenic processing of biological raw material.

### Results and discussion

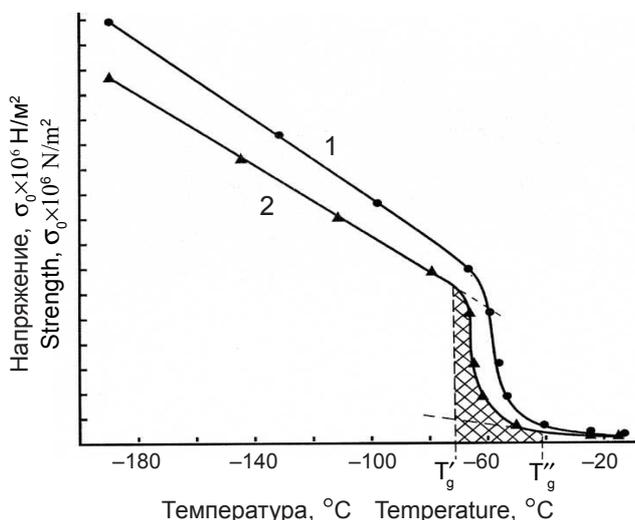
Fig. 1 shows typical thermoplastic curves obtained when studying frozen tissues of porcine placenta according to the methods [2]. At all the values of external strengths  $\sigma$ , applied to the samples under study, the dependence character  $\varepsilon = \varepsilon(T)$  does not change: deformation of frozen samples  $\Delta \varepsilon_T$  slightly increases with a rise of temperature from  $-140^\circ\text{C}$  up to a temperature  $T_g$  and at  $T > T_g$  their intensive plastic yielding starts. Herewith the temperature of the start of plastic yielding  $T_g$  depends on applied strengths  $\sigma$ .

The character of  $T_g$  temperature dependencies on applied strengths  $\sigma_0$  for tissue of porcine placenta and fragments of “Semirenko” apples has been demonstrated in Fig. 2, where  $\sigma_0(T)$  is the strength of the start of intensive plastic yielding of the sample at a certain temperature  $T$ , i.e. the analogue of fluidity limit of the material. The presented in Fig. 2 curves are of the manifested three-stage character. So, the strength  $\sigma_0$  is linearly decreased within temperature intervals  $-196^\circ\text{C} \dots T_g$  and  $T'_g \dots -10^\circ\text{C}$ , however there is observed quite sharp its reduction within the temperature range of  $T''_g$  and  $T'_g$ . From the point of view of physics of plasticity this effect may be explained only by melting or devitrification of the “biopolymer-water” complexes within this temperature interval. Under these processes in the samples the liquid microphases are formed and, as the consequence, the resistance of the samples to external loading reduces and their plastic



**Рис. 1.** Термопластические кривые предварительно замороженных тканей свиной плаценты, полученные при различных значениях внешних напряжений:  $\sigma_1 = 65 \times 10^4 \text{ Н/м}^2$ ,  $\sigma_2 = 130 \times 10^4 \text{ Н/м}^2$ ,  $\sigma_3 = 392 \times 10^4 \text{ Н/м}^2$ ,  $\sigma_4 = 654 \times 10^4 \text{ Н/м}^2$ ,  $\sigma_5 = 1046 \times 10^4 \text{ Н/м}^2$ .

**Fig. 1.** Thermoplastic curves of preliminary frozen tissues of porcine placenta, obtained at different values of external strengths:  $\sigma_1 = 65 \times 10^4 \text{ N/m}^2$ ,  $\sigma_2 = 130 \times 10^4 \text{ N/m}^2$ ,  $\sigma_3 = 392 \times 10^4 \text{ N/m}^2$ ,  $\sigma_4 = 654 \times 10^4 \text{ N/m}^2$ ,  $\sigma_5 = 1046 \times 10^4 \text{ N/m}^2$ .



**Рис. 2.** Температурные зависимости напряжений текучести замороженных тканей свиной плаценты (1) и фрагментов яблок сорта «Семиринко» (2).

**Fig. 2.** Temperature dependences of yield strength of frozen tissues of porcine placenta (1) and fragments of “Semirenko” apples (2).

Данные результаты подтверждаются при криогенной переработке биоматериалов. Например, время криогенного измельчения до заданной дисперсности фрагментов тканей свиной плаценты и яблок сорта «Семиринко» уменьшается в 3–4 раза при переходе через температуру  $T''_g$  в процессе охлаждения с одновременным уменьшением расхода жидкого азота.

### Выводы

Предлагаемый подход позволяет точно определить важный для криобиологических технологий температурный интервал образования жидких микрофаз в биоматериалах и оптимизировать отдельные технологические этапы их криогенной переработки, что улучшает качество получаемой продукции и снижает ее себестоимость.

### Литература

1. Осецкий А. И., Грищенко В. И., Снурников А. С. и др. Криосублимационное фракционирование биологических материалов // Пробл. криобиологии. – 2006, №2. – С. 230–240.
2. Осецкий А. И., Кирилюк А. Л., Гурина Т. М. Изучение кинетики расстеклования водных растворов криопротекторов методом термопластической деформации // Пробл. криобиологии. – 2005, №2. – С. 137–146.
3. Павлюк Р. Ю., Черевко А. И., Гулый И. С. и др. Новые технологии витаминных углеводсодержащих фитодобавок и их использование в продуктах профилактического действия. – Харьков – Киев, 1997. – 290 с.
4. Подольский А. Г., Осецкий А. И. Современные криобиологические технологии переработки растительного сырья: Справ. пособие. – Харьков, 2001. – 311 с.

characteristics increase. After finishing of these processes, i.e. within the interval of  $T'_g \dots -10^\circ\text{C}$  temperatures, there is observed usual for pure ice dependency  $\sigma_0 = \sigma_0(T)$ . Thereby established temperature intervals of melting or devitrification of biopolymer complexes enable the optimization of processing regimens of corresponding biological raw materials. So, cryogenic fragmentation is expedient to be performed at  $T < T''_g$  temperatures, that is during disappearance of liquid microphases and embrittlement of biomaterial. In contrast, cryosublimation fractionation is started at  $T \geq T'_g$ , when the major part of free water has been crystallized and biologically active low molecular fractions are in liquid microphases.

These results are well confirmed during cryogenic processing of biological materials. For instance, time of cryogenic fragmentation up to the determined dispersiveness of the fragments of porcine placenta tissues and the ones of “Semirenko” apples reduces in 3–4 times during transition via  $T''_g$  temperature during cooling with simultaneous expenditure of liquid nitrogen.

### Conclusions

Proposed approach enables the distinct determining of an important for cryobiological technologies temperature interval of the formation of liquid microphases in biological materials and optimization of some technological stages of their cryogenic processing, that improves the quality of the resulted production and reduces its net price.

### References

1. Osetsky A.I., Grischenko V.I., Snurnikov A.S. et al. Cryosublimation fractionating of biological material // Problems of Cryobiology. – 2006. – N2. – P. 230–240.
2. Osetsky A.I., Kirilyuk A.L., Gurina T.M. Study of kinetics of devitrification of aqueous solutions of cryoprotectants by method of thermoplastic deformation // Problems of Cryobiology. – 2005. – N2. – P. 137–146.
3. Pavlyuk R.Yu., Cherevko A.I., Gulyy I.S. et al. New technologies of vitamin carbohydrate-containing phyto-additives and their use in products of preventive action. – Kharkov-Kiev, 1997. – 290p.
4. Podolskiy A.G., Osetsky A.I. Modern cryobiological technologies of processing of plant raw material: Reference book. – Kharkov, 2001. – 311 p.

Accepted in 20.05.2008

Поступила 20.05.2008