

## Моделирование процесса замораживания биобъектов с низкими скоростями охлаждения

UDC 57.08:633  
A.G. MISCHENKO

### Modeling of Freezing Process for Biological Objects Using Low Cooling Rates

Проведен анализ существующих математических моделей теплообмена. Выбрана модель, которая наиболее адекватно описывает процесс теплообмена термоблока в горловине сосуда Дьюара. При помощи модели определены параметры устройства, позволяющего реализовывать скорости теплообмена от 0,01 до 4°C/мин до различных конечных температур от 0 до -70°C при пассивном остывании термоблока в горловине сосуда Дьюара.

**Ключевые слова:** математическая модель теплообмена, низкие скорости теплообмена, меристемальные клетки.

Проведено аналіз існуючих математичних моделей теплообміну. Обрано модель, що найбільш адекватно описує процес теплообміну термоблока у горловині судини Дьюара. За допомогою моделі визначено параметри пристрою, що дозволяє реалізувати швидкості теплообміну від 0,01 до 4°C/хв до різних кінцевих температур від 0 до -70°C при пасивному остиганні термоблока у горловині судини Дьюара.

**Ключові слова:** математична модель теплообміну, низькі швидкості теплообміну, меристемальні клітини.

Existing mathematical models of heat exchange were analyzed. There was chosen the model which more adequately describes the process of heat exchange for thermal block in the neck of Dewar vessel. Using the model the parameters of device enabling to apply the rates of heat exchange from 0.01 to 4°C/min down to various final temperatures from 0 to -70°C at passive cool-down of thermal block in Dewar vessel neck.

**Key-words:** mathematical model of heat exchange, low rates of heat exchange, meristematic cells.

При замораживании некоторых видов растительных клеток оптимальные скорости их охлаждения составляют 0,01±0,5°C/мин [7-9]. Для реализации таких скоростей наиболее приемлемым может быть метод пассивного остывания термоблока в горловине сосуда Дьюара, так как он не требует дорогостоящих программных замораживателей [6]. Однако такие малые скорости невозможно реализовать, применяя существующие методы пассивного остывания, вследствие чего возникает проблема создания устройства, обеспечивающего реализацию сверхнизких скоростей охлаждения.

С помощью математического моделирования процесса охлаждения можно значительно повысить эффективность поиска рабочих параметров указанного устройства. При этом минимизируются потери времени и материальные затраты на достижение поставленной цели [1]. Существует несколько видов математических моделей теплообмена [3-5], при помощи которых можно описать процесс остывания термоблока в горловине сосуда Дьюара и, как следствие, возникает проблема выбора наиболее адекватной из них.

During freezing of some species of plant cells optimal rates of their cooling make 0.01±0.5°C/min [7-9]. To apply these rates the most proper method is the one of passive cool-down of thermal block in Dewar vessel neck since it does not require expensive programmable freezers [6]. However these low rates are impossible to be realized by using existing methods of passive cool-down resulting in the appearance of the problem of creation of the device providing ultralow cooling rates.

By means of mathematical modeling of cooling process one can increase significantly the efficiency of the search of operating parameters of the device mentioned. Herewith the losses of time and material expenses are minimized for achieving the task set [1]. There are several types of mathematical models of heat exchange [3-5] due to which it is possible to describe the process of thermal block cool-down in Dewar vessel neck and as a result the problem of choosing the most adequate among them appears.

The research aim is to determine optimal parameters of the device for freezing meristematic cells under field conditions using mathematical modeling of heat exchange process.

Институт животноводства УААН, Харьковская область

Institute of animal breeding of Ukrainian Academy of Agricultural Sciences, Kulinichi, Kharkov region, Ukraine

\* Адрес для корреспонденции: пгт Кулинич, Харьковский р-н, Харьковская обл., Украина 62404; тел.:+38 (057) 740-31-79, факс: +38 (057) 740-31-66, электронная почта: lab\_cryo@ukr.net

\* Address for correspondence: Kulinichi, Kharkov region, Ukraine 62404; tel.:+380 57 740 3179, fax: +380 57 740 3166, e-mail: lab\_cryo@ukr.net

Цель работы – определить оптимальные параметры устройства для замораживания меристемальных клеток в полевых условиях с применением математического моделирования процесса теплообмена.

### Материалы и методы

Теоретические значения скоростей охлаждения термоблока заданных параметров получены при помощи математических моделей теплообмена [3-5]. Расчет параметров термоблока, необходимого для замораживания объектов с низкими скоростями, производили с помощью компьютерной программы в среде C++.

Проверка выводов, вытекающих из математических моделей, на первом этапе проводилась на существующем термоблоке (стальной цилиндрический стакан со сплошными стенками, помещенный в горловину сосуда Дьюара Х34Б) [2], а затем на изготовленном в ходе проведения исследований. Экспериментальные значения скоростей охлаждения термоблоков получены при помощи измерения зависимости температуры от времени хромель-копелевой термопарой (диаметр измерительной головки равен 0,2 мм), откалиброванной с точностью до 0,1°C. Зависимости изменения температуры регистрировали графопостроителем Н-307.

### Результаты и обсуждение

Скорости охлаждения термоблока [2], рассчитанные с использованием математических моделей [3-5], в несколько раз превышают экспериментальные (рис. 1). Несовпадение экспериментальных и расчетных зависимостей можно объяснить разными начальными условиями. Математическая модель теплообмена описывает процесс охлаждения однородного цилиндрического тела, а в экспериментах применяется термоблок, который содержит неоднородности различного типа: стаканообразная форма, воздушная прослойка, штатив и крепежные приспособления, создающие дополнительный теплообмен, не учитываемый в теоретических моделях. Удовлетворительного приближения теоретически рассчитанных зависимостей и экспериментальных данных можно достичь подбором поправочного коэффициента ( $k=0,125$ ) для формулы теплопроводности ( $\alpha$ ) исследуемого объекта:

$$\alpha = k \sqrt{\frac{\gamma}{c \cdot \rho}},$$

где  $\gamma$  – коэффициент теплопроводности материала;  $c$  – теплоёмкость;  $\rho$  – плотность.

При использовании такого коэффициента наблюдается определенное несовпадение

### Materials and methods

Theoretical values of thermal block of given parameters were obtained using the mathematical models of heat exchange [3-5]. Calculation of thermal block parameters required for freezing of objects with low rates was performed with computer program in C++ environment.

The conclusions proceeding from mathematical models were checked in elaborated cylinder thermal block (steel cylinder-shaped cup with solid wall, placed into the neck of Kh34B Dewar vessel), and then on the newly-elaborated one (details in the text further). Experimental values of the thermal block cooling rates were obtained by measuring with chromel-copper thermocouple (diameter of measuring head is 0.2 mm) calibrated with the accuracy of 0.1°C. Temperature changes were recorded with H-307 graph plotter.

### Results and discussion

Theoretically calculated cooling rates of thermal block exceeded experimental ones in several times (Fig. 1). Non-coincidence of experimental and calculated indices may be explained with their various initial conditions. Mathematical model of heat exchange depicts the cooling process of cool-down of cylinder body and in experiments thermal block comprising inhomogeneities of different types: glass-like form, air gap, the containers with biological objects, stand and mounting hardware creating an additional heat

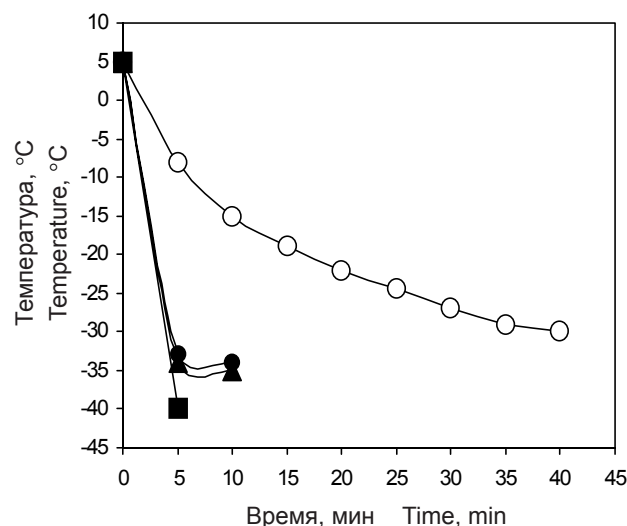


Рис. 1. Теоретические и экспериментальные зависимости температуры термоблока, в основании которого находится слой воздуха, от времени его охлаждения: ○ – экспериментальные данные; ● – рассчитанные по [3]; ▲ – рассчитанные по [4]; ■ – рассчитанные по [5].

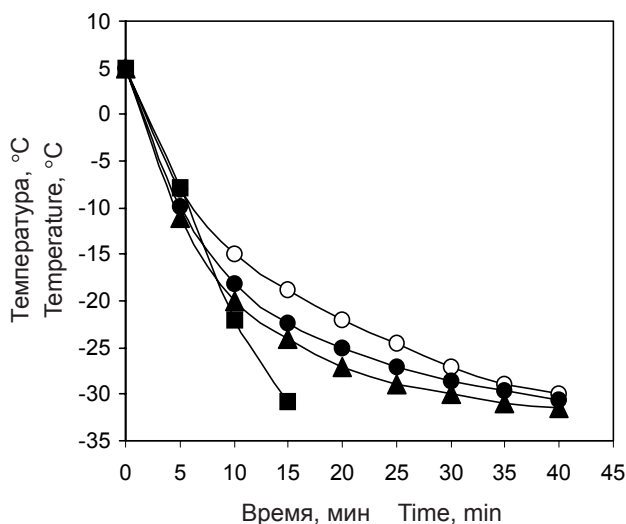
Fig. 1. Theoretical and experimental dependences of temperature vs. cooling time for thermal block with air filled double walls: ○ – experimental data; ● – data calculated according to [3]; ▲ – data calculated according to [4]; ■ – data calculated according to [5].

экспериментальных данных с результатами расчетов согласно приведенным моделям (рис. 2). Наиболее адекватное совпадение с полученными экспериментальными данными демонстрируют модели, полученные в [3] и [5]. Из этих двух моделей более удобной для практического применения из-за меньшей сложности является модель [3]:

$$T = T_1 \left[ \frac{x}{L} + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\sin(n\pi x/L)}{n} \cdot \text{EXP} \left( - \frac{n^2 \pi^2 \alpha^2 t}{L^2} \right) \right]$$

где  $T$  – текущая температура;  $T_1$  – температура в начальный момент времени;  $x$  – расстояние до местоположения объекта;  $L$  – длина цилиндра;  $\alpha$  – коэффициент теплопроводности;  $t$  – время остывания цилиндра.

Скорость остывания термоблока в значительной степени определяется коэффициентом теплопроводности. Поэтому для создания макета устройства, позволяющего задавать различные скорости охлаждения в полевых условиях, целесообразно варьировать характерное время остывания изменением параметров термоблока. Расчеты согласно модели [3] показали, что для достижения поставленной цели следует вокруг термоблока создать воздушную прослойку, теплопроводность которой можно регулировать, изменяя давление воздуха в ней. Для этой цели можно использовать цилиндри-



**Рис. 2.** Теоретические и экспериментальные зависимости температуры термоблока с двойными стенками, заполненными воздухом, от времени его охлаждения с учетом поправочного коэффициента  $k$ :  $\circ$  – экспериментальные данные;  $\bullet$  – рассчитанные по [3];  $\blacktriangle$  – рассчитанные по [4];  $\blacksquare$  – рассчитанные по [5].

**Fig. 2.** Theoretical and experimental dependences of temperature vs. cooling time with introduction of correction coefficient  $k$  for thermal block with air filled double walls:  $\circ$  – experimental data;  $\bullet$  – data calculated according [3];  $\blacktriangle$  – data calculated according [4];  $\blacksquare$  – data calculated according [5].

exchange not taking into account in theoretical models. If introducing corrective coefficient ( $k=0.125$ ) into the equation of heat conductivity of the studied object satisfactory approaching to calculated data to experimental ones may be achieved (Fig. 2):

$$\alpha = k \sqrt{\frac{\gamma}{c \cdot \rho}}$$

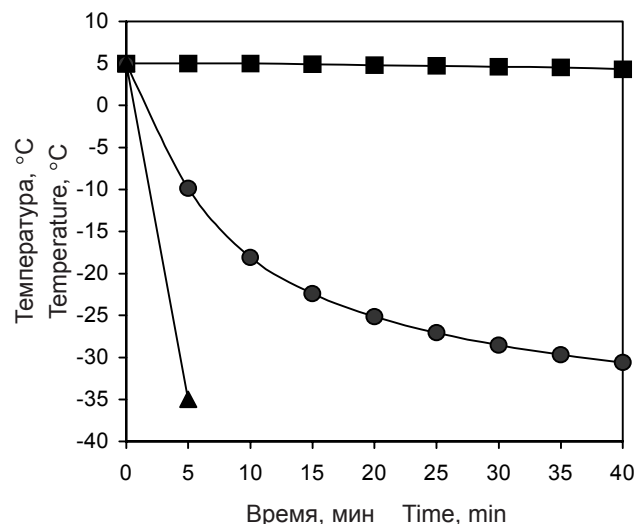
where  $\gamma$  – coefficient of heat conductivity of material,  $c$  – heat capacity,  $\rho$  – density.

When using this coefficient there is certain difference left between experimental data and the results of calculations on the models. The most adequate fitting with experimental data give the models from [3] and [5]. From these two models the one [5] is more convenient for practical use due to less complications:

$$T = T_1 \left[ \frac{x}{L} + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\sin(n\pi x/L)}{n} \cdot \text{EXP} \left( - \frac{n^2 \pi^2 \alpha^2 t}{L^2} \right) \right]$$

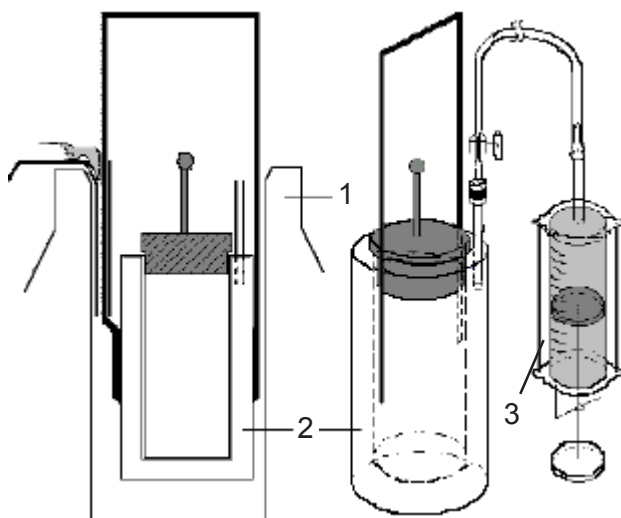
where  $T$  is the current temperature;  $T_1$  is the initial temperature;  $x$  – distance to object;  $L$  – cylinder length;  $\alpha$  – heat conductivity coefficient;  $t$  – time of cylinder cooling-down.

The rate of cool-down of thermal block is mainly determined by the coefficient of heat conductivity. Therefore to create the device model enabling to set different cooling rates in field conditions characteristic



**Рис. 3.** Теоретические зависимости температуры термоблока с двойными стенками, заполненными воздухом, под различным давлением, от времени его охлаждения, рассчитанные согласно модели [3] с учетом поправочного коэффициента  $k$ :  $\blacksquare$  – давление 0,01 атм;  $\bullet$  – 1 атм;  $\blacktriangle$  – 3 атм.

**Fig. 3.** Theoretical dependences of temperature vs. cooling time found according the model [3] with introduction of correction coefficient  $k$  for thermal block with air filled double walls under various pressure:  $\blacksquare$  – 0.01 atm;  $\bullet$  – 1 atm;  $\blacktriangle$  – 3 atm.



**Рис. 4.** Схема устройства для замораживания объектов со скоростями от 0,01 до 4°C/мин: 1 – сосуд Дьюара; 2 – цилиндрический стакан с двойными стенками, заполненными воздухом; 3 – насос для изменения давления внутри стенок стакана.

**Fig. 4.** Scheme of device for freezing of objects with rates of 0.01 to 4°C/min: Dewar vessel; 2 – cylindrical cup with air filled double walls; 3 – pump for changing the pressure inside the cup walls.

ческий блок с двойными стенками, заполненными воздухом. Плотность и теплопроводность основания термоблока можно контролировать изменением давления воздуха, при этом происходит изменение режима охлаждения термоблока (рис. 3).

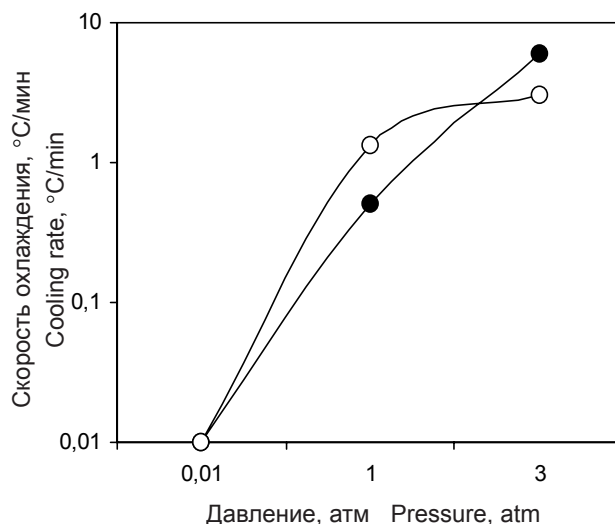
После теоретических расчетов с использованием выбранной модели теплопроводности [3] и поправочного коэффициента  $k$  был изготовлен цилиндрический термоблок с двойными стенками, заполненными воздухом (рис. 4). Изменение давления воздуха между стенками блока от 0,01 до 3 атм приводило к изменению скорости его охлаждения в горловине сосуда Дьюара от 0,01 до 4°C/мин (рис. 5). Низкие скорости замораживания, необходимые для низкотемпературного консервирования меристемальных клеток растений [7-9], можно реализовать при давлении воздуха в прослойке от 0,01 до 0,2 атмосфер.

### Выводы

При помощи математического моделирования разработано устройство, позволяющее реализовывать скорости охлаждения исследуемого объекта в диапазоне от 0,01 до 4°C/мин как в лабораторных, так и полевых условиях.

### Литература

1. Горбунов Л.В., Бучацкий Л.П. Криоконсервация половых клеток и эмбрионов животных. – Киев, 2005. – 325 с.



**Рис. 5.** Теоретическая и экспериментальная зависимости скорости охлаждения термоблока от давления воздуха между стенками основания (теоретическая зависимость рассчитана согласно модели [3] с учетом поправочного коэффициента  $k$ ): ○ – экспериментальные данные; ● – теоретические данные.

**Fig. 5.** Theoretical and experimental dependences of cooling rate vs. air pressure in the double base of thermal block (theoretical dependence was calculated according to the model [3] with introduction of correction coefficient  $k$ ): ○ – experimental data; ● – theoretical data.

time of cool-down should be varied. Calculations according the mathematical model [3] has shown that for achieving the set aim around the thermal block it is necessary to create an air gap the heat conductivity of which may be regulated by altering air pressure. Therefore it is necessary to manufacture a cylinder block with double walls, an inner part of those would be air-filled. Due to variation of air pressure by means of either its pumping-out or compression both density and heat conductivity of thermal block base changed that significantly affected cooling regimen of thermal block (Fig. 3).

After theoretical calculations using the chosen model of heat exchange [3] and correction coefficient  $k$  we produced the cylinder thermal block with air filled double walls (Fig. 4). Air pressure variation between the walls of the block from 0.01 to 3 atm results in the change in the rate of its cooling in the neck of Dewar vessel from 0.01 to 4°C/min (Fig. 5). Low cooling rates essential for low temperature preservation of meristematic cells of plants [7-9] in particular may be applied at air pressure in layer from 0.01 to 0.2 atm.

### Conclusions

Using the mathematical modeling a device allowing the realisation of an object cooling rates in 0.01 to 4°C/min range both in laboratory and field conditions was elaborated.

2. Горбунов Л.В., Салина А.С. Способы криоконсервации половых клеток и эмбрионов животных в широком диапазоне скоростей обмена // Животноводческие науки.– 2005.– №5.– С. 140-143.
3. Джеффрис Г., Свирлс Б. Методы математической физики.– М.: Мир, 1970.– 352 с.
4. Лыков А.В. Теория теплопроводности.– М.: Высш. школа, 1967.– 580 с.
5. Лыков А.В. Теплообмен: Справочник.– М.: Энергия, 1978.– 479 с.
6. Снурников А.С. Криобанки для различных биологических объектов // Пробл. криобиологии.– 2005.– Т. 15, №1.– С. 85-102.
7. Towill L.E., Forsline P.L. Cryopreservation of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) using a dormant vegetative bud method // Cryo-Letters.– 1999.– Vol. 20, N4.– P. 215-222.
8. Wu Y., Zhao Y., Engelmann F. et al. Cryopreservation of apple dormant buds and shoot tips // Cryo-Letters. – 2001.– Vol. 22, N6.– P. 375-380.
9. Zhao Y., Wu Y., Engelmann F., Zhou M. Cryopreservation of axillary buds of grape (*Vitis vinifera*) in vitro plantlets // Cryo-Letters.– 2001.– Vol. 22, N5.– P. 321-328.

Поступила 02.03.2006

## References

1. Gorbunov L.V., Buchatsky L.P. Cryopreservation of sexual cells and embryos of animals.– Kiev, 2005.– 325 p.
2. Gorbunov L.V., Salina A.S. Approach for cryopreservation of animal reproductive cells and embryos using wide range of cooling rates // Zhivotnovidcheskie nauki.– 2005.– N5.– P. 140-143.
3. Jeffreys H., Swirles B. Methods of mathematical physics. Moscow: Mir, 1970.– 270 p.
4. Lykov A.V. Theory of heat conductivity.– Moscow: Vysshaya shkola, 1967.– 580 p.
5. Lykov A.V. Heat exchange: Reference book.– Moscow: Energy, 1978.– 479 p.
6. Snurnikov A.S. Cryobanks for various biological objects // Problems of Cryobiology.– 2005.– N1.– P. 85-102.
7. Towill L.E., Forsline P.L. Cryopreservation of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) using a dormant vegetative bud method // Cryo-Letters.– 1999.– Vol. 20, N4.– P. 215-222.
8. Wu Y., Zhao Y., Engelmann F. et al. Cryopreservation of apple dormant buds and shoot tips // Cryo-Letters. – 2001.– Vol. 22, N6.– P. 375-380.
9. Zhao Y., Wu Y., Engelmann F., Zhou M. Cryopreservation of axillary buds of grape (*Vitis vinifera*) in vitro plantlets // Cryo-Letters.– 2001.– Vol. 22, N5.– P. 321-328.

Accepted in 02.03.2006