

УДК 57.043:57.086.132

А.И. ОСЕЦКИЙ^{1*}, В.И. ГРИШЕНКО¹, А.С. СНУРНИКОВ¹, И.Е. ШАБАНОВ², Г.А. БАБИЙЧУК¹**Криосублимационное фракционирование биологических материалов**

UDC 57.043:57.086.132

A.I. OSETSKIY^{1*}, V.I. GRISCHENKO¹, A.S. SNURNIKOV¹, I.YE. SHABANOV², G.A. BABIYCHUK¹**Cryosublimation Fractionating of Biological Material**

Проведен анализ термодинамических аспектов криосублимационной сушки биологических объектов. Экспериментально изучен состав водных фракций, извлекаемых из биообъектов в процессе лиофилизации, определены принципы их вариации. Рассмотрены особенности реализации технологий молекулярного криосублимационного фракционирования биологических систем и перспективы их применения при производстве фармацевтических и косметических препаратов.

Ключевые слова: криогенные технологии, криосублимационное фракционирование, сублимационная сушка

Проведено аналіз термодинамічних аспектів криосублимаційного сушіння біологічних об'єктів. Експериментально вивчено склад водяних фракцій, які добували із біооб'єктів у процесі ліофілізації, визначено принципи їх варіації. Розглянуто особливості реалізації технологій молекулярного криосублимаційного фракціонування біологічних систем, перспективи їх застосування у виробництві фармацевтичних та косметичних препаратів.

Ключові слова: криогенні технології, криосублимаційне фракціонування, сублимаційне сушіння.

The article presents the analysis of thermodynamic aspects of cryosublimation drying of biological objects. Composition of water fractions, obtained from biological objects during freeze-drying, is studied experimentally and their variation principles are determined. Peculiarities in technology realisation for molecular cryosublimation fractionating of biological objects as well as their perspective use in pharmacology and cosmetics production are discussed.

Key-words: cryogenic technologies, cryosublimation fractionating, sublimation drying.

Основу наиболее эффективных современных технологий переработки биологического сырья с целью производства высококачественных продуктов питания и полуфабрикатов для парфюмерии, косметологии и фармакологии составляют такие методы заготовки, хранения и переработки исходного сырья, которые максимально сохраняют его молекулярную структуру, витаминный состав, аромат, цвет и вкусовые качества. Наиболее полно этим требованиям удовлетворяют криогенные технологии, обеспечивающие отрицательную температуру при переработке сырья [1]. В результате ингибируются окислительные процессы в перерабатываемом сырье, предотвращаются денатурация и диссоциация наиболее важных молекулярных комплексов, пигментация и деароматизация исходного сырья. Криогенная переработка растительного сырья позволяет полностью сохранить натуральную структуру не только находящихся в нем витаминов, но и молекулярных комплексов, содержащих широкий спектр необходимых человеку минеральных веществ, что важно для их полноценного усвоения. Криогенные технологии применяются при переработке биологических тканей (плаценты человека и животных), они позволяют сохранить натуральную структуру

The basic of the most effective up-to-date technologies of biological raw material processing for obtaining food products of a high quality and semi-product for perfumery, cosmetology and pharmacology is made by the methods of collecting, storage and processing of initial raw material, maximally preserving its molecular structure, vitamin composition, colour and gustatory properties. These requirements are quite completely met by cryogenic technologies, providing the below zero temperature during raw material processing [1]. These technologies provide an inhibition of oxidation in processed raw material, prevents denaturation and dissociation of the most important molecular complexes, pigmentation and loss of flavour. Cryogenic processing of plant raw material enables to preserve completely the natural structure of vitamins, as well as molecular complexes, containing wide spectrum of mineral substances essential for human, that is important for a complete uptake of vitamins and mineral substances. Cryogenic technologies are used in processing of biological tissues (human and animal placenta), allowing to preserve the natural structure of almost all the important hormones, aminoacids, lipid fractions, mineral complexes and vitamins. Hence the products of placenta tissue cryogenic processing are unexpen-

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Воронежская государственная технологическая академия

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Перейславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-30-07, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

²Voronezh State Technology Academy, Russia

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3007, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

практически всех наиболее важных гормонов, аминокислот, липидных фракций, минеральных комплексов и витаминов. Поэтому продукты криогенной переработки плацентарных тканей незаменимы при производстве лекарственных и косметических препаратов. Следует отметить, что в высококачественной переработке биологического сырья в настоящее время криогенные технологии не имеют альтернативы.

Особое место в используемых криогенных технологиях занимает метод криосублимационного высушивания биологических материалов, который получил широкое распространение за последние 30-40 лет, несмотря на высокую себестоимость получаемых продуктов. Важными с точки зрения качества продукции являются следующие технологические факторы.

Предварительное замораживание высушиваемого образца фиксирует его молекулярную структуру, а последующее сублимирование воды исключает механическое искажение-усадку, которое неизбежно при обычном высушивании на воздухе и особенно проявляется в процессе сушки биологических тканей животного происхождения, ягод, грибов и фруктов с большим содержанием воды. Усадка или уменьшение объема этих продуктов при обычном высушивании происходит вследствие коллапса его структуры в результате удаления воды из жидкой фазы из-за высокого значения коэффициента поверхностного натяжения воды ($\sigma=0,073$ н/м). Остающиеся в образце жидкие фракции сжимаются так, чтобы суммарная площадь их поверхности стала минимальной. При этом внутри фракций развивается достаточно высокое давление

$$P = \frac{2\sigma}{r},$$

где r – характерный размер фракций, а молекулярная структура образца испытывает действие различных по направлению деформирующих напряжений. В результате теряется устойчивость молекулярных комплексов, составляющих основу высушиваемого образца, нарушается равновесное электростатическое взаимодействие составляющих их атомарных групп, что не только необратимо изменяет конформацию биомолекул, но и приводит к определенным химическим взаимодействиям. Это приводит к тому, что в высушиваемом обычным образом биологическом сырье всегда содержится целый ряд несвойственных исходному продукту химических элементов. При сублимационной сушке этот эффект исключен, так как вода удаляется из объекта из закристаллизованных или сильно связанных состояний, для которых явление минимизации поверхности несущественно.

dable in production of medicine and cosmetic preparations. Cryogenic technologies should be noted as having no current alternative in high quality processing of biological raw materials.

Special position in utilised cryogenic technologies is taken by method of cryosublimation drying of biological materials, gained a wide distribution during last 30-40 years in spite of a high net price of products obtained. The following technology factors are of great importance for quality of products.

Preliminary freezing of sample to be dried fixes its molecular structure, and following water sublimation excludes a mechanical distortion and shrinkage, which is inevitable during usual drying on air, especially during drying of biological tissues of animal origin, berries, mushrooms and fruits with great extent of water. Shrinkage or decrease of volume of these products during usual drying is caused by structure collapse resulted from water removing from liquid phase due to a high value of surface tension coefficient of water in drying object ($\sigma=0.073$ N/m). Sample's residual liquid fractions are pressured in such a way, that their total surface value is minimal. In this case the fractions got a high internal pressure

$$P = \frac{2\sigma}{r},$$

where r is a characteristic fraction size, and molecular structure of sample meet the action of differently directed deforming stresses. As a result the molecular complexes, being the basis of object to be dried, loss their stability, as well as the balance of electrostatic interaction between atomic groups as their parts, that cause both irreversible biological molecule conformation and certain chemical interactions. The reason of these processes lies in presence of series of chemical substances in biological raw material dried in a usual way, which are non-inherent to a final product. Sublimation drying excludes this effect, water is removed out of the object from crystallised or strongly fixed states, where the effect of surface minimisation is insignificant.

The fact that there is non-bound water in an ice state in an object during cryosublimation excludes the prolonged effect on biological molecules coming from fluid fraction with steadily changed chemical composition. On another hand at positive temperatures the water molecule evaporation increases the concentration of salts and other solutes in residual water fractions, that leads to irreversible changes in conformation of biological molecules in the sample. The remarkable evidence of the phenomenon is observed during drying with vacuum supercondensation, where molecular skeleton of the biological object is intensively flown around by liquid fractions of overcritical concentrations (during 2-6 hrs at 40-60°C).

Тот факт, что свободная вода в процессе криосублимирования находится в объекте в виде льда, исключает длительное воздействие на биомолекулы жидкой фракции с непрерывно меняющимся химическим составом. Напротив, при положительных температурах испарение молекул воды повышает концентрацию солей и других химических элементов в остающихся жидких фракциях, что приводит при достижении критических концентраций к необратимым изменениям конформации биомолекул, находящихся в образце. Наиболее явно это проявляется при сушке в режиме вакуумной перекомденсации, когда молекулярный остов биообъекта интенсивно омывается (2-6 ч) при 40-60°C жидкими фракциями закритических концентраций. В данном случае доля необратимых биохимических повреждений достаточно велика.

При сушке в режиме криосублимации практически подавлены окислительные процессы, так как диффузия молекулярного кислорода в замороженном образце крайне затруднена, а высушиваемый образец постоянно находится в вакууме, т.е. не контактирует с кислородом (рис. 1). При сушке в воздушной среде молекулярный кислород всегда взаимодействует с биологическими молекулами, образуя такие высокотоксичные продукты, как супероксидный ион O_2^- и перекись водорода H_2O_2 . В результате происходит активная химическая деградация исходного сырья. Это наиболее характерно для сушки методом распыления, когда в зависимости от диаметра капель эффективная поверхность высушиваемого образца увеличивается в десятки тысяч раз и становится активным сорбентом молекулярного кислорода. Поскольку в процессе криосублимационной сушки образец находится при достаточно низких температурах (рис. 2, 3), в нем обеспечивается высокая сохранность термолабильных молекул и биологически активных молекулярных комплексов, составляющих, как правило, основную ценность перерабатываемого растительного сырья.

При криосублимационной сушке в предварительно замороженном исходном сырье лучше сохраняются низкомолекулярные сложные эфиры, ответственные за ароматические свойства продукта, эфирные масла и другие высоколетучие компоненты, что обеспечивает высокие ароматические и вкусовые качества конечного продукта, а также его особые лечебные свойства.

Перечисленные факторы доказывают, что при криосублимационной сушке растительного сырья, в отличие от других известных способов удаления влаги из биологических объектов, можно получать продукты более высокого качества.

Однако применение криосублимационного высушивания до настоящего времени ограничива-

The portion of irreversible biochemical damages in this case is quite big.

During cryosublimation drying the oxidative processes are almost suppressed, as the molecular oxygen diffusion in a frozen object is extremely embarrassed, and treated sample is constantly under vacuum, i.e. has no contact with oxygen (Fig. 1). During air drying the molecular oxygen always interacts with biological molecules and produces a high-reactive products, such as superoxide ion O_2^- and hydrogen peroxide H_2O_2 . This results in an active chemical degradation of a initial raw material. This is mostly characteristic for spray-up drying, when depending on a drop diameter the effective surface is increased by ten thousand times and become the active sorbent of molecular oxygen. Hence the sample is under quite low temperatures during cryosublimation drying (Fig. 2, 3), the thermolabile molecules and biologically active molecular complexes, being the most valuable part of processed plant raw material, are well preserved.

During cryosublimation drying the preliminarily frozen initial raw material preserves low molecular complex ethers, responsible for flavour properties of the product, ether oils and other highly-fugitive components much better, and this results in high quality flavour and taste properties of final product, as well as in its special medical properties.

The stated factors testify to the fact, that cryosublimation drying of plant raw material allows to obtain the products of higher quality comparing to other known ways for water removing from biological objects.

However utilisation of cryosublimation drying lately has been limited to the obtaining of dry product

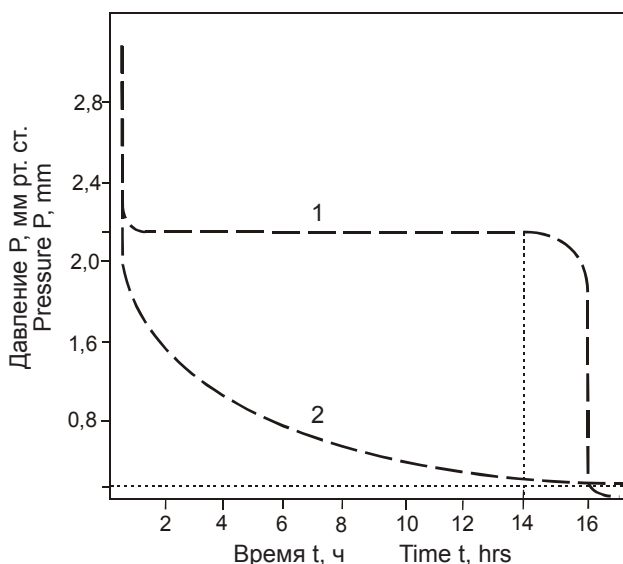


Рис. 1. Типичные временные зависимости давления в сублимационной камере P_c при возгонке льда (кривая 1) и лиофилизации биологических материалов (кривая 2).

Fig. 1. Typical pressure P_c vs time t dependencies in freeze-drying chamber during ice sublimation (curve 1) and freeze-drying of biological materials (curve 2).

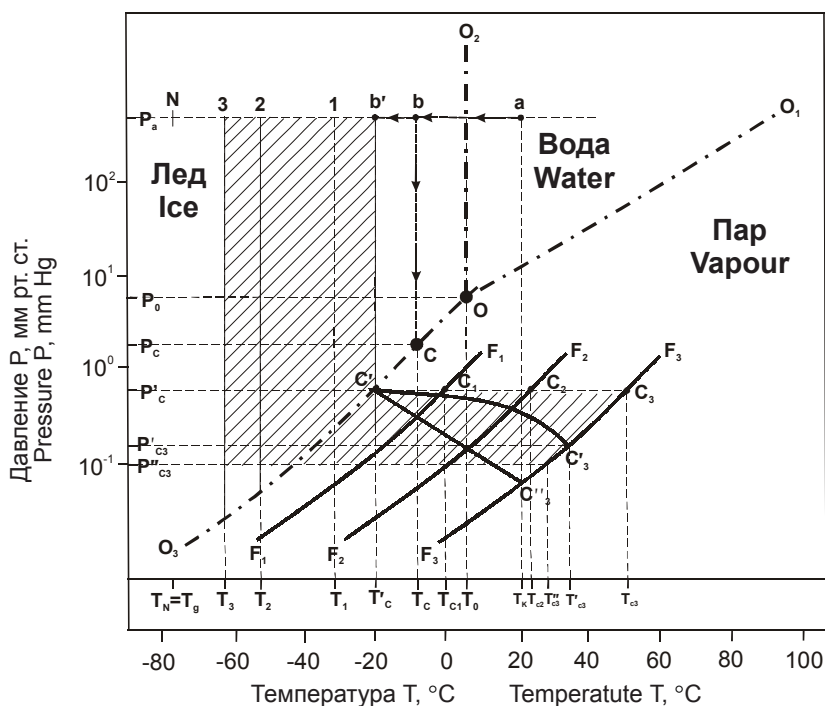


Рис. 2. Термодинамическая схема процессов криосублимационного фракционирования сложных биологических систем.

Fig. 2. Thermodynamic scheme of sublimation fractionating in complex biological systems.

лось получением сухого продукта в сублимационной камере [2, 3], поэтому основные конструкторские разработки были направлены на улучшение качества исключительно сухой фракции.

В работе нами впервые исследован химический состав водных фракций, осаждаемых на криогенной поверхности десублиматора при лиофилизации растительного сырья и биологических тканей. Полученные результаты показывают, что в ряде случаев эти фракции не менее ценны и уникальны, чем остающийся в сублимационной камере сухой остаток. Поэтому в работе подробно исследован процесс выделения из замороженных биологических материалов, сложных по биохимическому составу водных фракций, который назван криосублимационным фракционированием.

Термодинамические аспекты криосублимационного фракционирования биологических материалов. Термодинамические параметры криосублимационной сушки биологических материалов обычно связывают с диаграммой состояния чистой воды (штрих-пунктирные кривые $O-O_1$, $O-O_2$, $O-O_3$) и параметрами ее тройной точки: $P_0 \approx 4,6$ мм рт. ст. (610,6 Па) и $T_0 \approx 0,008^\circ\text{C}$ (см. рис. 2).

Согласно представленной диаграмме процесс перевода объектов в режим лиофилизации заключается в их предварительном охлаждении до температуры $T_c < T_0$ с последующим помещением в вакуумную камеру, где с помощью вакуумных

in sublimation chamber [2, 3], hence the major part of engineering research was directed to improving the quality of just dry fraction.

In this paper we have firstly studied the chemical composition of water fractions sedimented on cryogenic surface of desublimator during freeze-drying of plant raw material and biological tissues. The obtained results show, that in some cases these fractions are not less valuable and unique, comparing to the dry rests left in sublimation chamber. Hence this paper deals with a detailed study of the extraction of water fractions with complex biochemical composition from frozen biological materials. We defined this process the *cryosublimation fractionating*.

Thermodynamic aspects of cryosublimation fractionating of biological materials. Thermodynamic parameters of cryosublimation drying of biological materials are usually

associated with a phase diagram of pure water (dashed lines $O-O_1$, $O-O_2$, $O-O_3$) and position of its triple point $P_0 \approx 4.6$ mm hg (610.6 Pa) and $T_0 \approx 0.008^\circ\text{C}$ (see Fig. 2).

According to the presented diagram the transferring of objects into freeze-drying regimen consists in their pre-cooling down to temperature of $T_c < T_0$ with following introducing into vacuum chamber, where

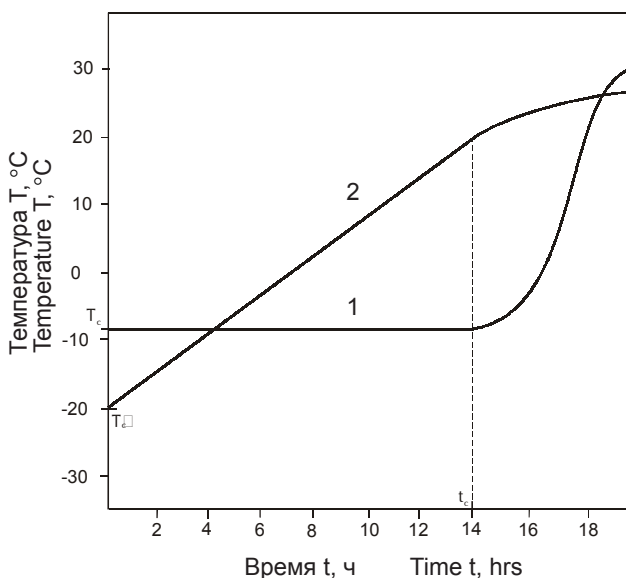


Рис. 3. Типичные зависимости температуры объекта T_c от времени t в процессе возгонки чистого льда (кривая 1) и лиофилизации биологических материалов (кривая 2).

Fig. 3. Typical pressure T_c vs time t dependencies in sublimation chamber P_c during ice sublimation (curve 1) and freeze-drying of biological materials (curve 2).

насосов парциальное давление молекул воды уменьшается до значений $P_C < P_0$ (см. рис. 2). Если после этого обеспечить равномерный подвод к объекту энергии для компенсации удельной теплоты сублимации, то за время t_c при неизменных значениях T_C и P_C содержащийся в объекте лед перейдет в газообразное состояние.

Для объектов, представляющих собой чистую воду, эта схема подтверждается экспериментально (см. рис. 1, 3, кривые 1). Поэтому представленная на рис. 2 диаграмма часто используется для расчетов параметров T_C и P_C в промышленных сублимационных комплексах. При этом учитывается лишь тот факт, что кристаллизация воды в реальных биологических системах завершается при более низких температурах $T'_C < T_C < T_0$. В результате проводится только корректировка траектории обхода тройной точки, т. е. замена траектории $a \rightarrow b \rightarrow c$ на $a \rightarrow b' \rightarrow c'$ при соответствующей замене параметров T_C и P_C на T'_C и P'_C (рис. 2).

Основная ошибка такого подхода состоит в совмещении понятий парциального давления молекул воды над замороженным биообъектом при температуре T'_C и давления насыщенного пара чистого льда (см. рис. 2, кривая $O-O_3$). При этом не учитывается тот факт, что парциальное давление зависит от состава замороженного биообъекта и соответствующей ему диаграммы фазовых состояний.

Поэтому кинетика сублимационной сушки реальных биообъектов значительно отличается от процесса возгонки чистого льда. Суть этого отличия можно изобразить схематически, условно разделив содержащуюся в биообъекте жидкость на фракции: 1, 2, 3...N. Каждой из этих фракций соответствует температура завершения процесса кристаллизации: $T_1, T_2, T_3 \dots T_N$ (см. рис. 2), определяемая не только характером и силой связей молекул воды с биомолекулами в объекте, но и растворимыми в ней веществами. Следует отметить, что температура завершения процесса кристаллизации воды в конкретной фракции может не совпадать с температурой перехода этой фракции в твердое состояние. Это характерно для частично стеклующихся криобиологических растворов типа “вода – криопротектор”: при лиофилизации биообъектов определенная часть воды переходит в пар не из кристаллов льда, а из связанных состояний. Естественно, что каждой из выделенных таким образом фракций будет соответствовать своя зависимость парциального давления составляющих его молекул от температуры. Условно эти зависимости представлены на рис. 2 кривыми $F_1-F_1, F_2-F_2, F_3-F_3$, которые подтверждают тот факт, что при заданной температуре сильно связанным состояниям соответствуют

partial pressure of water molecules is diminished by vacuum pump down to $P_C < P_0$ (see Fig. 2). When providing the following uniform energy supply to object to compensate the specific sublimation heat, the ice from the object will transform into to gas state within time t_c at constant values of T_C and P_C .

For the case of pure water this scheme is supported experimentally (see Fig. 1, 3, curve 1). Hence the diagram shown in Fig. 2 is often used for calculation of T_C and P_C parameters in commercial sublimation devices. One takes into account just the fact that water crystallisation in live biological systems terminates at lower temperatures $T'_C < T_C < T_0$. As the result the correction of triple point by-path is carried-out only, i.e. substitution of pathway $a \rightarrow b \rightarrow c$ for $a \rightarrow b' \rightarrow c'$ at corresponding substitution of T_C and P_C parameters for T'_C and P'_C (Fig. 2).

The main inaccuracy of such an approach is in overlapping of definitions for partial pressure of water molecules above frozen object at temperature of T'_C and pressure of saturated vapour of pure ice (see Fig. 2, curve $O-O_3$). Herewith it is not taken into consideration that, the partial pressure depends on frozen object composition and corresponding phase diagram.

Therefore kinetics of sublimation drying of live biological objects considerably differs from the process of a sublimation of pure ice. The essence of this difference can be shown schematically, when the biological object's fluid is tentatively divided into fractions 1, 2, 3 ... N. Each of these fractions has a definite crystallisation termination temperature: $T_1, T_2, T_3 \dots T_N$ (see Fig. 2), which is determined not merely by nature and strength of water and biological molecule bonds, but also depends on origin of dissolved substances. It is worth to note that termination temperature of water crystallisation in particular fraction could generally not coincide with the temperature of transition of this fraction into solid state. It is characteristic for partially vitrified solutions of “water-cryoprotectant” type: during freeze-thawing of biological objects the definite part of water transits into a vapour state not from ice crystals, but from bound states. Each of these isolated fractions would naturally have their own dependences of partial pressure vs temperature for the constituent molecules. These dependencies are shown tentatively in Fig. 2 by the curves $F_1-F_1, F_2-F_2, F_3-F_3$, confirming the fact, that at given temperature the lower values of partial pressure correspond to the stronger bound states. Therefore the intensive removal of these fractions from biological object during cryosublimation at given external pressure $P_C = P'_C$ is possible under increase of object temperature by the pathway ($C' \rightarrow C_1 \rightarrow C_2 \rightarrow C_3$). We can assume due to the data of Fig. 2 that it is possible to perform the cryosublimation drying of biological objects with combining the variations of

меньшие значения парциальных давлений. Соответственно интенсивное удаление этих фракций из биообъекта в режиме сублимации при заданном внешнем давлении $P_c=P'_c$ возможно при повышении температуры объекта по траектории ($C' \rightarrow C_1 \rightarrow C_2 \rightarrow C_3$). Из рис. 2 следует, что криосублимационную сушку объектов можно проводить, комбинируя изменения температуры и давления, т. е. вести лиофилизацию по траекториям $C' \rightarrow C'_3$, $C' \rightarrow C''_3$ и т. д. Предпочтение следует отдавать траекториям с одновременным уменьшением давления и повышением температуры, так как они позволяют ускорить сушку и завершить ее при более низких температурах ($T''_{C_3} < T'_{C_3} < T_{C_3}$). Оптимальность такого подхода подтверждается

экспериментально при лиофилизации как растительного сырья, так и биологических тканей. Экспериментальные зависимости $T'_c=f(t)$ и $P'_c=\varphi(t)$, где t – время сушки, для целого ряда объектов представлены кривыми 2 на рис. 2 и 3. Определяемые этими зависимостями интервалы температур и давлений, отражающие реальную картину процесса сублимационной сушки биологических систем, могут являться основой для расчета технических параметров соответствующих установок.

Используя рис. 2, можно сформулировать принципы криосублимационного фракционирования биологических систем. Согласно экспериментальным данным в режиме криосублимации можно последовательно выделять из образца различные по количественному составу водные фракции (рис. 4). Суть этого процесса состоит в периодическом изменении основных технологических параметров криосублимационной сушки T_c и P_c вдоль заранее выбранной траектории типа $C' \rightarrow C'_3$ (см. рис. 2).

При заданных и выдерживаемых в течение промежутка времени Δt_{C_1} параметрах $T_c=T_{C_1}$ и $P_c=P_{C_1}$ сублимируется фракция F_1 , при параметрах T_{C_2} и P_{C_2} за время Δt_{C_2} – фракция F_2 и т.д. Значения параметров T_c и P_c , значения временных интервалов Δt_c для каждого вида биообъекта и химического состава выделяемых фракций F определяют экспериментально.

Для практического разделения сублимированных водных фракций F необходима установка с несколькими десублиматорами, принципиальная схема которой показана на рис. 5. В процессе

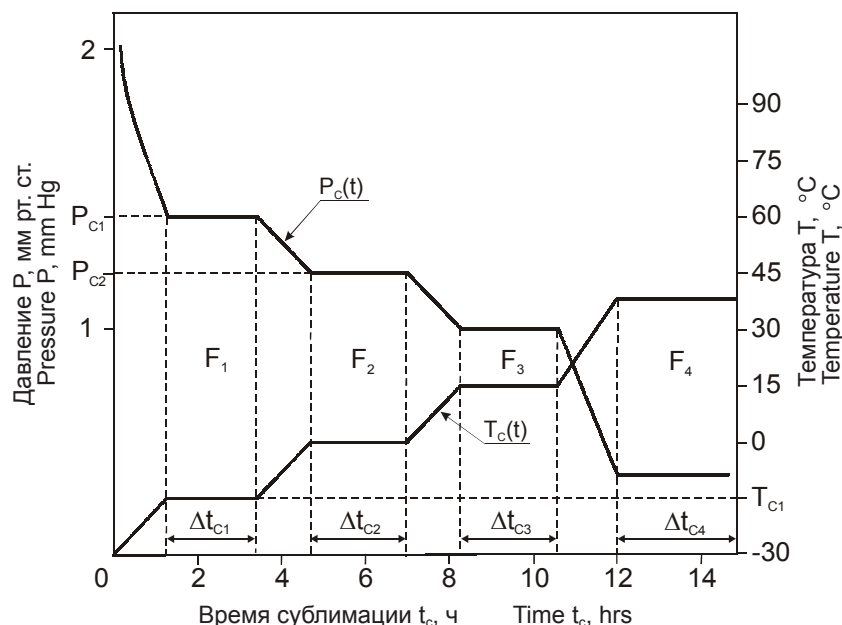


Рис. 4. Технологические параметры процесса криосублимационного фракционирования биологических материалов.

Fig. 4. Technological parameters of sublimation fractionating of biological materials.

temperature and pressure, i. e. to perform freeze-drying by $C' \rightarrow C'_3$, $C' \rightarrow C''_3$ pathways, etc. The preference should be given to the pathways with a simultaneous decrease of pressure and rise of temperature, as these allow to accelerate the drying and to complete it at lower temperatures ($T''_{C_3} < T'_{C_3} < T_{C_3}$). This approach is experimentally confirmed as optimal during freeze-drying of both plant raw material, and animal tissues. Experimental dependencies $T'_c=f(t)$ and $P'_c=\varphi(t)$, where t is drying duration are shown with curves 2 in Fig. 2 and 3. The ranges of temperatures and pressures, determined by these dependencies, reflect the present pattern of sublimation drying process of biological systems, and can be a basis for calculating technical parameters for appropriate device.

Fig. 2 is helpful in formulating the principles of cryosublimation fractionating of biological systems. According to experimental data it is possible to select stepwise the aqueous fractions having different quantitative composition from the sample during cryosublimation (Fig. 4). The essence of this process consists in periodic changes of basic technological parameters of cryosublimation drying, T_c and P_c , along pre-selected pathway of $C' \rightarrow C'_3$ type (see Fig. 2).

Within given and fixed time limit, Δt_{C_1} , parameters $T_c=T_{C_1}$ and $P_c=P_{C_1}$ the fraction F_1 is sublimated, at T_{C_2} and P_{C_2} during Δt_{C_2} – the fraction F_2 , etc. Values of parameters T_c and P_c as well as time limits Δt_c for each type of biological objects and chemical composition of obtained fractions F are found experimentally.

For practical separation of the sublimated aqueous fractions F the device with several desublimators is needed, its schematic diagram is shown in Fig. 5.

работы установки за время Δt_{c1} молекулярные потоки из сублимационной камеры СК осаждаются на криопанелях десублиматора ДС₁, в то время, как остальные десублиматоры перекрыты вентилями В. Десублиматор ДС₂ за время Δt_{c2} принимает на себя молекулярные потоки фракции F₂ и т.д. После сушки и отогрева десублиматоров водные фракции из каждого десублиматора сливаются в отдельные приемные емкости.

Продукты криосублимационного фракционирования материалов животного и растительного происхождения. В основе технологии криосублимационного фракционирования биоматериалов лежит предположение о том, что газовая фаза над замороженным биообъектом является сложной композицией из молекул разной природы: воды, аминокислот, эфиров, витаминов, минеральных веществ, фрагментов сложных молекулярных комплексов и т.д. Молекулы воды в сложной по составу газовой среде составляют ~98%, однако их преобладание связано и с тем фактом, что кинетика изменения как температуры объекта, так и давления в сублимационной камере зависит от спектра состояний, из которых происходит возгонка молекул воды (см. рис. 2). В свою очередь эта кинетика при заданном виде биологического объекта определяет состав и количество остальных фракций в газовой фазе, состоящих, как правило, из частиц с молекулярной массой 10-300 а. е. м. Следует учитывать, что особенности разделения образующейся над замороженным биообъектом газовой фазы на фракции тесно связаны с состоянием содержащейся в нем воды, т. е. как с природой ее связей с биомолекулами, так и составом растворенных в ней веществ.

В реальных процессах указанные особенности будут проявляться тем сильнее, чем сложнее состав сублимируемых из биообъекта молекулярных пучков. В противоположном случае, когда сублимируют только молекулы воды, термин “фракционирование” означает лишь процесс разделения исходного замороженного биообъекта на воду и сухой остаток. Следует отметить, что технические проблемы изучения сублимационных фракций связаны не только со сложностью вариаций термодинамических параметров (см. рис. 2), но и с разработкой режимов их охлаждения на криогенных панелях десублиматоров. Оптимальные условия эксперимента заключаются в том, чтобы все сублимируемые из исследуемого биообъекта молекулы сконденсировать и закристаллизовать на панелях десублиматора. На практике эти условия реализовать полностью невозможно, но максимальные результаты можно получить при существенном понижении темпера-

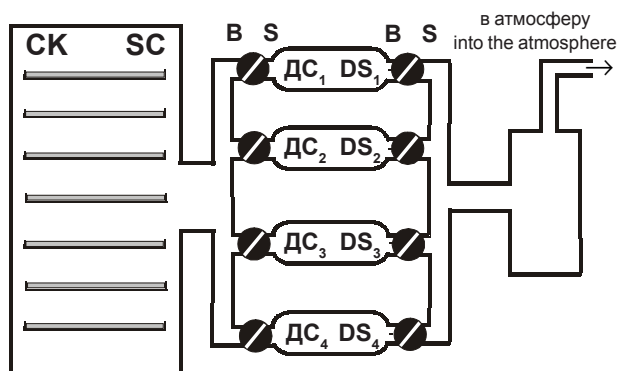


Рис. 5. Принципиальная схема комплекса для криосублимационного фракционирования биообъектов.

Fig. 5. Schematic diagram of device for cryosublimation fractionating of biological objects.

During device operation the molecular flows from sublimation chamber SC are sedimented on cryoplates of desublimator DS₁ during time limit Δt_{c1} while remaining desublimators are closed by faucets F. Desublimator DS₂ takes up the molecular flows of the fraction F₂ during time limit Δt_{c2} , etc. After drying and warming of desublimators the aqueous fractions from each desublimator are drained in separate intake containers.

Products of cryosublimation fractionating of animal and plant tissues. In the basis of biomaterial cryosublimation fractionating technology there is the assuming that the gas phase above the frozen biological object is a complex composition of molecules of a different origin: water, amino acids, ethers, vitamins, mineral substances, fragments of molecular complexes etc. Water molecules comprise ~98% in composite gas medium, however their dominance is associated also with the fact, that the kinetics of variation both temperature of object and pressure in sublimation chamber depends on variety of states, from which the water molecules sublimate (see Fig. 2). In its turn, the kinetics for a certain biological object determines the composition and amount of remaining fractions in a gas phase consisted, as a rule, of fragments with molecular weight of 10-300 AMU. It is necessary to consider, that the features of gas phase separation to the fractions over frozen biological object are closely associated to its water state, i.e. both to origin of aqueous bonds with biomolecules and solutes' composition.

In live processes the indicated features will be stronger manifested, when the composition of molecular beam, sublimated from biological object is more complicated. And in contrast, if only water molecules sublimate, the term “fractionating” means only a process of separation of an initial frozen biological object into water and dry remainder. It is necessary to note, that the technological problems in

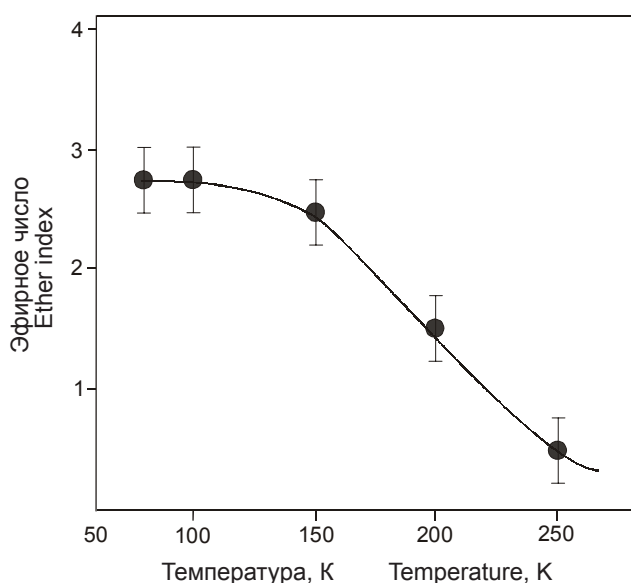


Рис. 6. Зависимость эфирного числа криосублимационной водной фракции ромашки лекарственной от начальной температуры криогенных панелей основного десублиматора.

Fig. 6. Dependence of ether index of *Matricaria chamomilla* flowers cryosublimation aqueous fraction vs. initial temperature of main desublimator cryogenic plates.

туры криогенных панелей десублиматора. Это связано с тем, что удержать осаждаемые на холодной поверхности десублиматора молекулы можно только в том случае, если они достаточно быстро переходят в твердофазное состояние. Если мигрирующие по охлажденной поверхности десублиматора молекулы объединяются в жидкие микрофазы, то вероятность их удержания резко снижается. Если химический состав и фазовая диаграмма подвергающегося сублимационной сушке образца таковы, что он до температур $-50\div-80^{\circ}\text{C}$ содержит жидкие микрофазы, то аналогичные по химическому составу жидкие микрофазы будут возникать и на поверхностях десублиматора. Это означает, что для удержания содержащихся в них молекул на поверхностях десублиматора температуру последних следует понижать до температуры стеклования жидких микрофаз. Исследования химического состава осаждаемых на криогенных панелях десублиматоров водных фракций сублимируемого растительного сырья (цветов розы эфиромасличной, ромашки лекарственной, шалфея мускатного и лаванды) показали, что их химический состав остается стабильным только после понижения температуры панелей десублиматора ниже -100°C (рис. 6). Охлаждение панелей десублиматоров до этих температур с помощью жидкого азота не представляет трудности. Однако используемые в настоящее время сублимационные установки, работающие на масляных форвакуумных насосах, не позволяют получить химически чистую сублимируемую водную фракцию [2, 3].

analysis of sublimation fractions are associated not only with difficult variations of thermodynamic parameters (see Fig. 2), but also with elaborating the regimens of their cooling on desublimator cryogenic plates. The optimal experimental conditions consist in the condensation and crystallisation on desublimator plates of entire molecules, sublimated from the studied biological object. These conditions are practically impossible to realise, but the maximal outcome could be achieved after a significant temperature drop on desublimator cryogenic plates. That is molecules' holding is possible on a cold surface only in the case of their rapid transition into solid state. If migrating along desublimator cooled surface molecules are aggregated in liquid microphases, the possibility of their holding sharply diminishes. If chemical composition, i.e. phase diagram of the object under sublimation drying exposure result into appearance of liquid microphases in the object at temperatures down to $-50\div-80^{\circ}\text{C}$, the ones with similar chemical composition will arise on desublimator surfaces. It means, that desublimator surfaces temperature should be decreased down to glass transition temperature of liquid microphases to hold the molecules. Studying chemical composition of aqueous fractions from plant raw material (flowers of *Rosa gallica*, *Matricaria chamomilla*, *Salvia sclarea* and *Lavandula gen.*) been sedimented on cryogenic plates showed their stability only after decrease of desublimator plate's temperature down to -100°C (Fig. 6). The cooling of desublimation plates down to these temperatures using liquid nitrogen does not create any difficulties. However the sublimation devices, being applied nowadays, are based on oil forevacuum pumps and do not allow to obtain a "chemically pure" sublimated aqueous fraction [2, 3]. It is caused by intensive sorption of forevacuum pump oil molecules from vacuum contour by desublimator cryopanel at temperatures below $-60\div-80^{\circ}\text{C}$. To prevent this process the installation for cryosublimation fractionating of biological materials with additional desublimator (Fig. 7) was designed. Operation principle of the installation is the following. The frozen raw material 1 on special trays is placed in sublimation chamber 2, where the process of fractionating is started at the temperature of -20°C and pressure of 100 Pa (0.8 mm hg), made with forevacuum pumps 3. Energy is supplied to trays with raw material by infrared heaters 4 to compensate the specific heat of sublimation. Molecules of water and highly fugitive molecular fragments, evaporating from frozen raw material, are sedimented on exterior surfaces of cryogenic plates 5, arranged in main desublimator 6. Cryoplates are cooled down to -196°C by filling up liquid nitrogen from the reservoir 7. To prevent the pollution of aqueous fractions sedimented on panels 5 by oil molecules of forevacuum pumps 3,

Это связано с тем, что при понижении температуры криопанелей десублиматора ниже $-60\div-80^{\circ}\text{C}$ они начинают интенсивно сорбировать находящиеся в вакуумном контуре сублимационной установки молекулы масла из форвакуумных насосов. С целью предотвращения этого процесса был создан комплекс для криосублимационного фракционирования биологических материалов с дополнительным десублиматором (рис. 7). Принцип работы комплекса следующий: замороженное сырье 1 в специальных поддонах помещают в сублимационную камеру 2, где при температуре -20°C и давлении 100 Па (0,8 мм рт. ст.), которое создается с помощью форвакуумных насосов 3, начинается процесс его фракционирования. Энергия для компенсации удельной теплоты сублимации подводится к поддонам с сырьем при помощи инфракрасных нагревателей 4. Испаряющиеся из замороженного сырья молекулы воды и высоколетучие молекулярные фрагменты осаждаются на внешних поверхностях криогенных панелей 5, расположенных в основном десублиматоре 6. Криопанели охлаждаются до температуры -196°C за их счет заполнения жидким азотом из резервуара 7. Для защиты осаждающейся на панелях 5 водной фракции от молекул масла, используемого в вакуумных насосах 3, применен защитный десублиматор 8. Пары жидкого азота, испаряющегося в процессе криосублимационного фракционирования в основном десублиматоре 6, проходят змеевик 9 защитного десублиматора 8, охлаждая его до температуры $-30\div-40^{\circ}\text{C}$. Этого охлаждения достаточно для того, чтобы молекулы масла, попадающие в вакуумный контур десублиматоров из насоса 3, конденсировались в защитном десублиматоре 8. После окончания криосублимационного фракционирования и отогрева панелей десублиматоров в емкость 10 сливается чистая криосублимационная водная фракция из основного десублиматора 6 (до 95% от общего объема), а в емкость 11 из защитного десублиматора 8 – незначительное количество криосублимационной водной фракции (до 5% от общего объема), загрязненной молекулами вакуумного масла и непригодной для дальнейшего использования. При этом в сублимационной камере остается сухой порошок (влажность не более 3-5%) перерабатываемого сырья.

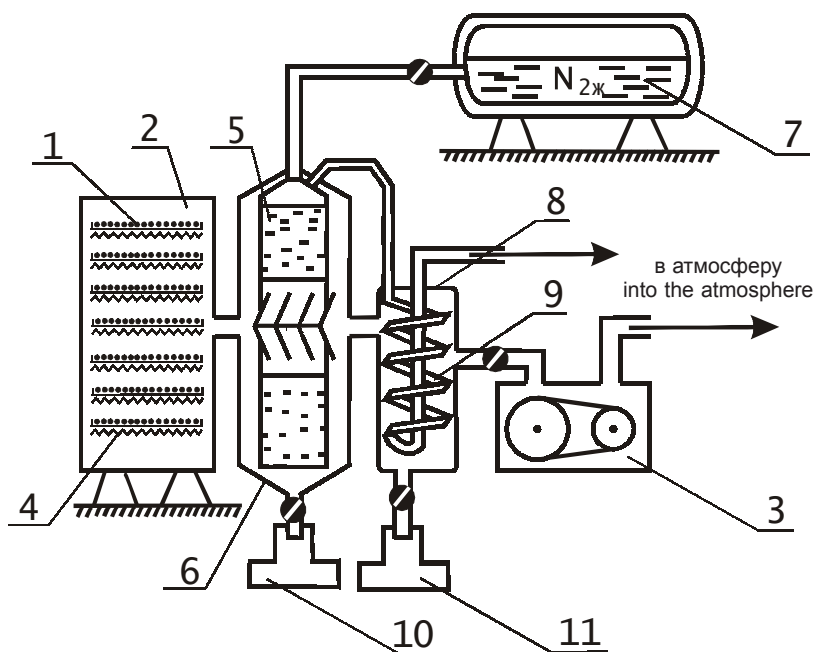


Рис. 7. Схема криосублимационной установки с двухкаскадным десублиматором (пояснения в тексте).

Fig. 7. Scheme of cryosublimation device with two step desublimator (explained in text).

the protective desublimator 8 is applied. The vapours of liquid nitrogen, evaporating in process of cryosublimation fractionating in main desublimator 6, went through a serpentine 9 of protective desublimator 8, cooling it down to temperature of $-30\div-40^{\circ}\text{C}$. The resulted temperature is quite low to condense in protective desublimator 8 the oil molecules coming into vacuum circuit from the pump 3. After termination of cryosublimation fractionating and warming of desublimator panels the pure aqueous fraction from main desublimator 6 drain in container 10 (up to 95% of total amount), and container 11 of protective desublimator gets the minor amount of cryosublimation aqueous fraction (up to 5% of total amount), polluted with oil molecules and being unsuitable for further usage. Simultaneously the dry powder (damp no more than 3-5%) of processed raw material rests in sublimation chamber.

This approach allows to purify biologically valuable cryosublimation aqueous fraction from oil molecules and to obtain the high-quality products for food, cosmetic, pharmaceutical production without expending an extra energy. The chemical composition of aqueous fractions obtained after sublimation of *Rosa gallica* and *Matricaria chamomilla* flowers, as well as human placenta fragments are shown in the Tables 1-3. The indicated data confirm the complex content of aqueous fractions obtained from biological objects by cryosublimation, and the possibility for separation of molecular flows, sublimated from frozen biological system. As the matter of fact the obtained

Данный подход позволяет без дополнительных энергетических затрат очищать биологически ценную криосублимационную водную фракцию от молекул вакуумного масла и получать высококачественные продукты для пищевых, косметических, фармацевтических производств. Химический состав сливаемых в емкость 10 водных фракций, полученных при сублимировании свежемороженых цветов розы эфиромасличной и ромашки лекарственной, а также фрагментов плаценты человека, приведен в табл. 1-3. Указанные данные подтверждают сложность биохимического состава водных фракций, выделяемых из биообъектов в режиме криосублимирования, и возможность разделения сублимируемых из замороженных биологических систем молекулярных потоков. Фактически полученные результаты являются основой для не имеющих альтернативы технологий выделения фракций с молекулярной массой до 300 а. е. м. из натурального биологического сырья, а также для нового направления по разделению этих фракций на уникальные компоненты.

Выводы

В данной работе был подтвержден сложный и уникальный состав водных фракций, выделяемых из замороженного биологического сырья в режиме криосублимирования. Безусловно, эти фракции требуют дальнейшего экспериментального изучения с точки зрения как фармакологических свойств, так и физики процессов, происходящих на всех этапах криосублимационного фракционирования. Техника криогенного разделения биологических материалов позволит получать продукты с заранее программируемыми свойствами. Поскольку в настоящее время не существует других методов для получения подобных низкомолекулярных водных фракций, описанный метод является уникальным в современной криобиологии, а полученные продукты могут быть основой для производства фармацевтических и косметических препаратов нового поколения.

Литература

1. Подольский А.Г., Осецкий А.И. Современные криобиологические технологии переработки растительного сырья: Справ. пособие.– Харьков: НТУ “ХПИ”, 2001.– 311 с.
2. Подольский М.В. Высушивание препаратов крови и кровезаменителей.– М.: Медицина, 1973.– 176 с.

Таблица 1. Аминокислотный состав криосублимационных водных фракций
Table 1. Aminoacid composition of frozen-dried aqueous fractions

Вещество Substance	Количество, мкмоль/л Content, μmol/l		
	Плацента человека Human placenta	Роза эфиромасличная <i>Rosa gallica</i>	Ромашка лекарственная <i>Matricaria chamomilla</i>
Аланин Alanine	12		
Аргинин Arginine	5	10,5	
Аспарагин Asparagine	7		
Аспарагиновая кислота Asparaginate	2		
Валин Valine	20		
Гистидин Histidine	35	26,7	52,4
Глицин Glycine	15		
Глутаминовая кислота Glutamate	17		
Изолейцин Isoleucine	19	2	3
Лейцин Leucine	15	3	5
Лизин Lysine	35	25,3	191
Пролин Proline	6		
Серин Serine	10,2		
Треонин Threonine	7		
Цистеин Cysteine	8,2		
Фенилаланин Phenylalanine	Следы Traces	3	3

results create the basis for novel technologies aiming the obtaining of fractions with molecular weight of 300 AMU from biological raw material, as well as the separation of these fractions into unique components.

Conclusions

This investigation confirmed the complex and unique composition of aqueous fractions obtained from frozen biological raw material using cryosublimation. These fractions certainly require further experimental analysis of both their pharmacological properties, and physics of processes occurred at all stages of cryosublimation fractionating. The technology of cryogenic separation of biological materials will allow the obtaining of products with pre-programmed

Таблица 2. Содержание минеральных веществ в криосублимационных водных фракциях
Table 2. Mineral substances composition in frozen-dried aqueous fractions

Источник Source	Химический элемент Chemical element											
	Mg	Al	Si	P	Ca	Cr	Mn	Pe	Ni	Cu	Zn	Pb
Плацента человека Human placenta	30	11	42	120	60	0,3	0,2	10	0,2	0,3	4058	0,005
Роза эфиромасличная <i>Rosa gallica</i>	8	–	–	10	5	–	1,5	1,4	–	3,0	12,3	–
Ромашка лекарственная <i>Matricaria chamomilla</i>	4	–	–	12	6	–	0,8	0,6	–	3,5	2,38	–

Таблица 3. Биохимические характеристики криосублимационных водных фракций
Table 3. Biochemical indices of frozen-dried aqueous fractions

Параметр Parameter	Фракция Fraction		
	Плацента человека Human placenta	Роза эфиромасличная <i>Rosa gallica</i>	Ромашка лекарственная <i>Matricaria chamomilla</i>
Содержание общих липидов, г/л Total lipid content, g/l	–	1,8	2,2
Содержание гормонов Hormone content	Пролактин, МЕ/л Prolactine, IU/l	4000	–
	ФСГ, МЕ/л FSH, IU/l	50	–
	Тестостерон, нмоль/л Testosterone, nmol/l	11	–
	Прогестерон, нмоль/л Progesterone, nmol/l	64	–
Антиокислительная активность Antioxidant activity	Не определялась N/A	32,5±0,08	73,5±0,16
Эфирное число Ether index	–	1,28	2,25
Кислотное число, мг/КОН Acid index, mg/KOH	–	2,8	2,3
Перекисное число Peroxidation index	–	0,15	0,11
Йодное число Iodine index	–	5,63	5,08
Число омыления Soap index	–	4,08	4,55

3. Камовников В.П., Малков Л.С., Воскобойников В.А. Вакуум-сублимационная сушка пищевых продуктов.– М.: Агропромиздат, 1985.– 288 с.

Поступила 12.10.2004

properties. As nowadays there are no other methods for obtaining similar aqueous fractions comprising low molecular weight substances the described method is unique in up-to-date cryobiology, and the obtained products can be base for production of pharmaceutical and cosmetic preparations of a new generation.

References

1. Podolskiy A.G., Osetskiy A.I. Up-to-date cryobiological technologies of plant raw material processing. Reference book.– Kharkov, 2001.– 311 p.
2. Podolskiy M.V. Drying of blood and blood substitute samples.– Moscow: Meditsina, 1973.– 176 p.
3. Kamovnikov V.P., Malkov L.S., Voskoboynikov V.A. Vacuum-sublimation drying of food products.– Moscow: Agropromizdat, 1985.– 288 p.

Accepted in 12.10.2004