

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA FYZIKÁLNÍ CHEMIE

**KRYSTALIZACE V PODCHLAZENÉM VODNÉM
ROZTOKU SACHARÓZY**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Bc. Ina Ragasová

VEDOUCÍ PRÁCE: Ing. Jana Shánělová, PhD.

2012

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF PHYSICAL CHEMISTRY

**CRYSTALLIZATION IN UNDERCOOLED
AQUEOUS SOLUTION OF SUCROSE**

THESIS

AUTHOR: Bc. Ina Ragasová

SUPERVISOR: Ing. Jana Shánělová, PhD.

2012

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Ina Ragasová**
Osobní číslo: **C10826**
Studijní program: **N1407 Chemie**
Studijní obor: **Technická fyzikální chemie**
Název tématu: **Krystalizace v podchlazeném vodném roztoku sacharózy**
Zadávající katedra: **Katedra fyzikální chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Zpracujte literární rešerši na proces krystalizace v podchlazených kapalinách se zaměřením na vodné roztoky.
2. Na základě rešerše zvolte vhodný vodný roztok sacharózy a metody využitelné při zkoumání růstu krystalů v tomto roztoku.
3. Proveďte systematickou studii růstu krystalů ledu v roztoku sacharózy při teplotách pod 0 °C, tedy v podchlazeném režimu.
4. Analyzujte získané výsledky se zaměřením na procesy nukleace a růstu krystalů, podrobně je diskutujte a předložte ve formě diplomové práce.

Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: *Dr. Jana Šhánělová*
Číslo práce: *018828*
Studijní program: *21107 Chemie*
Studijní obor: *Technická (aplikovaná) chemie*
Název tématu: *Krystalizace a pochlazením způsobený rozklad sacharózy*
Zodpovědní katedra: *Katedra fyzikální chemie*

Vedoucí diplomové práce: *J. Šhánělová*
Ing. Jana Šhánělová, Ph.D.
Katedra fyzikální chemie

Datum zadání diplomové práce: **24. února 2012**
Termín odevzdání diplomové práce: **22. června 2012**

Zadání práce

1. Všeobecné literární údaje se provedou krystalizací a pochlazením způsobeným rozkladem sacharózy.
2. Za účelem získání vzorků sacharózy v rozkladném stavu budou provedeny krystalizace při různých teplotách a rychlostech ochlazení.
3. Provede se charakteristická měření vzorků sacharózy v rozkladném stavu a jejich rozklad bude sledován v průběhu pochlazení.
4. Analyticky získané výsledky se srovnávají se známými daty o rozkladu sacharózy a provede se diskuse o provedení a průběhu diplomové práce.

P. Lošťák
prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.

R. Bulánek
doc. Ing. Roman Bulánek, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 24. února 2012

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 26. 4. 2012

Bc. Ina Ragasová

Poděkování:

Na tomto mieste by som predovšetkým rada poďakovala svojej vedúcej práce Ing. Janě Shánělovej, PhD. za jej odborné vedenie, pomoc a za všetko, čomu som sa pod jej vedením naučila. Vďaka za podporu a motiváciu patrí aj celej kalorimetrickej skupine pod vedením prof. Ing. Jiřího Málka, DrSc., ktorému ďakujem za poskytnuté materiály a nedoceníteľné rady k vypracovaniu tejto práce.

Na záver by som rada poďakovala svojej rodine, ktorá mi umožnila študovať na tejto škole a podporovala ma po všetkých stránkach behom celého štúdia.

SOUHRN

Předmětem této diplomové práce bylo studium krystalizace vody v podchlazeném vodném roztoku sacharózy o vhodně zvolené koncentraci 50 hm%. Krystalizace vody v systému voda - sacharóza byla sledována za neizotermních podmínek metodou diferenční skenovací kalorimetrie. Z experimentálních dat byla určena teplota krystalizace vody, teplota skelného přechodu matrice a teplota následného tání ledu ve vzorku. Za podmínek izotermních i neizotermních byla sledována nukleace, růst krystalů vody, jejich morfologie a tání v roztoku sacharózy (50 hm%) metodou optické mikroskopie. Z naměřených dat byl určen charakter nukleace a byly stanoveny nukleační teplotní oblasti. Byla vyhodnocena rychlost růstu krystalů vody pro oblasti homogenní a heterogenní nukleace. Dále byly určeny morfologické typy krystalů vody. Ze získaných dat byly určeny rychlosti růstu jednotlivých tvarů krystalů. Byl stanoven průběh teplotní závislosti rychlosti růstu krystalů vody v roztoku a bylo stanoveno maximum této závislosti. Dále byla zjištěna závislost růstové rychlosti na stáří vzorku. Mikroskopicky bylo pozorováno tání vzniklých krystalů ledu a byla stanovena jejich teplota tání.

KLÍČOVÁ SLOVA

Vodný roztok sacharózy, diferenční skenovací kalorimetrie, mikroskopie, nukleace, krystalizace, rychlost růstu krystalů.

SUMMARY

The aim of this thesis is the study of water crystallization in undercooled aqueous solution of sucrose with 50 wt% concentration. The ice crystallization in the water - sucrose system was observed by differential scanning calorimetry under non-isothermal conditions. Temperature of ice crystallization, glass transition temperature of the matrix and ice melting temperature were obtained from experimental data. Nucleation, crystal morphology and growth and melting of ice crystallites in sucrose solution (50 wt%) was studied by means of optical microscopy under isothermal and non-isothermal conditions. The characters of homogenous and heterogenous nucleation were specified and the nucleation temperatures were obtained. The growth rate of ice crystals in sucrose solution (50 wt%) was defined for both, homogenous and heterogeneous nucleation. The crystal morphology was characterized and divided into three groups. For every group, the growth rate of ice crystals was evaluated. The temperature dependence of growth rate for ice crystals in sucrose solution (50 wt%) was determined and maximum of this dependence was obtained. The dependence of the ice crystal growth rate on solution aging was found. In addition, the melting of ice crystals in sucrose solution was studied and the temperature of melting was determined.

KEY WORDS

Aqueous solution of sucrose, differential scanning calorimetry, optical microscopy, nucleation, crystallization, crystal growth rate.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ.....	10
1 ÚVOD	12
2 TEORETICKÁ ČÁST	13
2.1 Proces krystalizace	13
2.1.1 Termodynamická formulace krystalizace	14
2.1.2 Nukleace	16
2.1.2.1 Homogenní nukleace	16
2.1.2.2 Heterogenní nukleace	18
2.1.2.3 Omezení klasické nukleační teorie	20
2.1.3 Růst krystalů	21
2.1.3.1 Termodynamika růstu krystalů	21
2.1.3.2 Kinetika růstu krystalů	23
2.2 Krystalizace podchlazené vody	26
2.2.1 Krystalizace vody v biologických systémech	27
2.2.2 Tvar krystalů vody	27
2.2.3 Metody ovlivnění krystalizace vody	29
2.2.3.1 Vitřifikace	30
2.2.3.2 Kryoprotektanty	30
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
3.1 Příprava vzorku	33
3.2 Diferenciální skenovací kalorimetrie	33
3.3 Mikroskopická metoda	34
3.4 Postup měření	37

4	VÝSLEDKY	40
4.1	Studium krystalizace a tání roztoku sacharózy metodou DSC	40
4.2	Mikroskopické studium rychlosti růstu krystalů vody	43
4.2.1	Neizotermní růst	43
4.2.1.1	Režim chlazení.....	44
4.2.1.2	Režim ohřevu.....	48
4.2.1.3	Vyhodnocení rychlosti neizotermního růstu.....	50
4.2.2	Izotermní růst.....	54
4.2.2.1	Vyhodnocení rychlosti izotermního růstu.....	60
4.2.3	Mikroskopické sledování tání krystalů vody	63
5	DISKUZE	64
6	ZÁVĚR	73
7	BIBLIOGRAFIE	74
	OBSAH OBRÁZKŮ.....	78

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ:

A	frekvenční faktor
DSC	diferenční skenovací kalorimetrie
$G_{L,S}$	Gibbsova energie kapaliny a pevné látky
G^*	kritická Gibbsova energie
k	Boltzmannova konstanta
n	rychlost nukleace
R	poloměr nuklea
R^*	kritický poloměr nuklea
$R_{(L \rightarrow S)}$	průnik křivek závislostí G na T pro kapalinu a tuhou látku
T	teplota
T_g	teplota skelného přechodu
T_m	teplota tání
T_p	teplota maxima píku
ΔG	změna Gibbsovy energie
ΔG_{hetero}	změna Gibbsovy energie heterogenní nukleace
ΔG_{homo}	změna Gibbsovy energie homogenní nukleace
ΔT	podchlazení
γ	povrchová energie
θ	úhel smáčení

1 ÚVOD

Využití sacharidů má v dnešní době široké uplatnění nejen v potravinářství, ale zejména také při kryoprezervačních metodách využívaných pro zachování širokého spektra biologických materiálů. Kryoprezervace získala v posledních letech na významu a je rychle se vyvíjejícím oborem, přesto se stále objevuje mnoho komplikací při zachovávání všech biologických funkcí a životaschopnosti vzorků. Za účelem předcházení těchto komplikací je mnoho chemických látek zkoumáno pro svůj kryoprotektivní potenciál. Mezi tyto látky patří právě sacharidy, z nichž je ve velké míře využívána sacharóza a její vodn roztoky. Sacharóza je disacharidem přirozeně se vyskytujícím ve všech zelených rostlinách a její vodné roztoky jsou typické pro svou vysokou toleranci vůči mrazu. Má kryoprotekční vlastnosti jako jsou schopnost potlačovat nukleaci a růst krystalů ledu či schopnost vázat se na proteiny buněčné membrány. Pro správnou aplikaci a maximální využití sacharózy v kryoprezervačních metodách je nutné pochopit proces krystalizace vody v jejím roztoku.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Proces krystalizace

Krystalizace je složitý fyzikálně-chemický proces probíhající na rozhraní dvou fází. Při tomto procesu dochází k uspořádání jednotlivých elementů látky do pravidelné struktury. Tato změna organizace částic je pro soustavu výhodná, protože při ní dochází ke snižování energie systému. Z tohoto důvodu je krystalizace v přírodě samovolně probíhajícím dějem, jež je možné pozorovat všude kolem nás. K vylučování pevné látky s pravidelnou strukturou může docházet z plynné, kapalně nebo případně i tuhé fáze. Typickým příkladem vylučování krystalů z plynné fáze je vznik sněhových vloček v atmosféře. Krystalizace z tuhé fáze probíhá zejména v metastabilních amorfních systémech. Vznik krystalů z kapalně fáze může probíhat z vodných roztoků nebo tavenin, které v přírodě představují tekuté magma, jehož krystalizací vznikají minerály. Tato práce se však dále zaměřuje pouze na krystalizaci z vodných roztoků.

Proces krystalizace jako takový je využíván ve většině technologických odvětví. V chemickém průmyslu se tento proces využívá jako čistící a separační metoda. Krystalizací se vyrábějí monokrystaly, jejichž částice jsou uspořádány do periodicky se opakujících struktur, a polykrystaly, ve kterých se nachází většina látek. Ty jsou složeny z malých krystalů pravidelné struktury pospojovaných do komplexnějšího systému, který však již pravidelnou strukturu nemá [1]. Nezanedbatelné uplatnění krystalizace najdeme i v potravinářství, kde se běžně setkáváme s krystalizací medu či cukru. Ve velké míře studované a využívané jsou i kapalně krystaly uplatňující se při výrobě displejů pro jejich výjimečné optické vlastnosti v elektrickém poli [2].

Krystalizace však v některých případech může být i nežádoucím jevem, jako je tomu v případě krystalizace medu či u kryoprezervace biologického materiálu. Kryoprezervace je uchovávání živých buněk a tkání v chladícím médiu při velmi nízkých teplotách. Tím je ve většině případů kapalně dusík, jehož teplota varu je -196°C .

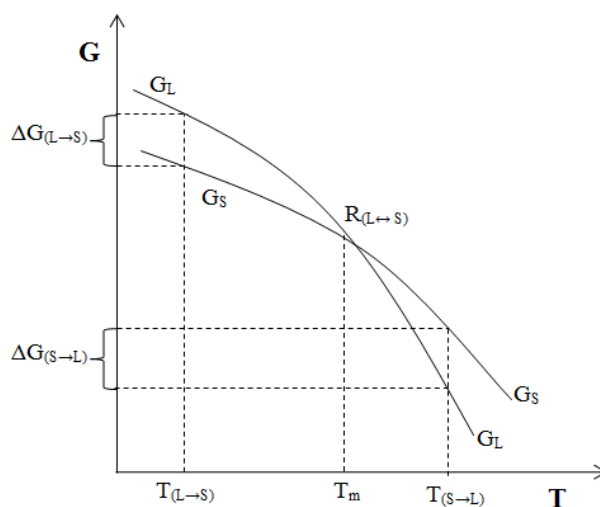
Tato práce je zaměřena na problematiku krystalizace právě v těchto biologických systémech, kdy může krystalizace způsobit strukturní i funkční poškození mrazem uchovávaného buněčného materiálu. Tomu lze zabránit přidáním tzv. kryoprotektivních činidel, které krystalizaci zabraňují, nebo jí alespoň do velké míry negativně ovlivňují. Stejně jako v mnoha jiných případech, i zde se člověk pro svůj výzkum inspiroval

v přírodě. V oblastech s velmi studeným klimatem jsou organismy schopny přežít jen díky specifickým obranným mechanismům proti velkému mrazu. Některé druhy arktických rostlin a živočichů, jako jsou ryby nebo hmyz, produkují tzv. anti-freeze proteiny [3], [4], [5], [6], [7]. Tyto protimrzoucí proteiny způsobují termální hysterezi (tzn. snížení bodu tuhnutí kapaliny) a mají schopnost přilnout na povrch malých krystalků vody a zabránit tak jejich dalšímu růstu. Rostliny mohou přežívat v hlubokých mrazech v důsledku zvýšené koncentrace sacharidů v jednotlivých rostlinných orgánech, čímž snižují vodní potenciál a zabraňují krystalizaci vody [8]. Další organismy žijící v chladných oblastech jsou schopny dokonce kryobiózy, kdy dochází k úplnému zastavení jejich metabolismu hromaděním kryoprotektantů. A právě v těchto biologických systémech člověk nachází inspiraci pro vývoj nových kryoprotekčních látek, jež by bylo možné aplikovat na širokou škálu biologických materiálů určených k uchování. Mezi tyto kryoprotektanty patří například glycerol [9], ethylenglykol, propylenglykol, polyvinylalkohol, butandiol či dimethylsulfoxid [10], který však není příliš vhodný pro svou chemickou nestálost a toxicitu [11]. V největší míře jsou však využívány sacharidy, na něž se tato práce zaměřuje. Pro požadované mrazové uchování a následné obnovení životaschopnosti biologického systému je proto nutno pochopit celkový vliv a působení těchto kryoprotektantů (sacharidů) na buněčný materiál. Toho lze dosáhnout výzkumem jejich vlivu na krystalizaci vody, jež je v těchto systémech stěžejním problémem, protože narostlé krystalky vody buněčný materiál poškozují. Proces krystalizace je složitým fázovým přechodem, kdy dochází ke změně původní struktury látky. První fáze tohoto procesu je nukleace (vznik krystalizačních zárodků), ve druhé fázi pak dochází k růstu krystalů. Podrobněji je tato problematika rozebrána v následujících kapitolách.

2.1.1 Termodynamická formulace krystalizace

Krystalizace je fázový přechod mezi kapalným a pevným stavem sledované látky. Jako každý uskutečnitelný chemický děj, musí být i proces krystalizace spojen s poklesem Gibbsovy energie. Závislost Gibbsovy energie na teplotě pro pevné a kapalně skupenství za izobarických podmínek znázorňuje obrázek 1. Jak je z obrázku patrné, za vyšších teplot má Gibbsova energie kapaliny G_L nižší hodnotu než Gibbsova energie pevné látky G_S , látka se tedy nachází ve stabilnějším kapalném skupenství a je v rovnováze, čemuž odpovídá minimum Gibbsovy energie. V takovémto systému dochází k volnějším

pohybu molekul než v pevné fázi a systém má vysokou entropii. Právě z tohoto důvodu se snižováním teploty průběh závislosti G_L na T mění strměji než je tomu u G_S [12].



Obrázek 1: Závislost Gibbsovy energie na teplotě za konstantního tlaku [12]

Vlivem poklesu teploty dochází k omezení volného pohybu molekul soustavy, které se uspořádávají do krystalické mřížky. Dochází tedy ke snižování entalpie i entropie systému. Rozdíl chemických potenciálů udává celkovou ΔG , která je záporná a je hnací silou celého procesu krystalizace. Jak lze vidět z obrázku 1, je za takovýchto nízkých teplot G_S vzniklé pevné fáze (krystalu) nižší než G_L . Systém se tedy v rovnováze nachází ve stabilnějším krystalickém stavu.

Na stejném obrázku je pro průnik křivek závislostí G na T pro tuhou látku i kapalinu použito označení $R_{(L \rightarrow S)}$. Tomuto bodu odpovídá teplota tání T_m , při níž se v systému nacházejí obě fáze v rovnováze a jejich hodnoty Gibbsovy energie jsou stejné. Fázovou přeměnou dochází ke skokové změně entropie a entalpie. Jde tedy o Ehrenfestův fázový přechod prvního druhu. Uvolněné krystalizační teplo je rovno rozdílu entalpií kapalné a tuhé fáze a musí být ze systému odvedeno [1], [12].

V této části byla shrnuta termodynamika krystalizace, tedy proč k ní dochází a co je její hlavní hnací silou. Krystalizace je však ovlivněna i kineticky, tzn. rychlostí nukleace a rychlostí růstu krystalů, čemuž jsou věnovány následující části této práce.

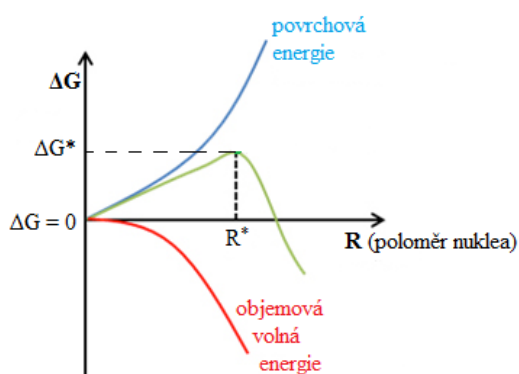
2.1.2 Nukleace

Nukleace je první fází a hlavní podmínkou celého procesu krystalizace. Jde o vznik krystalizačních zárodků, tzn. zárodků tuhé fáze v kapalně směsi. Je to komplikovaná etapa vzniku krystalu, jež probíhá spontánně v roztoku (primární nukleace) nebo je uměle vyvolána tzv. očkovaním (sekundární nukleace). Tato práce se zaměřuje především na primární nukleaci, která se dělí na homogenní a heterogenní. Principy obou těchto typů nukleací i jejich rozdíly jsou popsány dále tzv. klasickou nukleační teorií.

2.1.2.1 Homogenní nukleace

Samovolná nukleace v celém objemu bez přítomnosti cizích fází a částic se nazývá homogenní. Hybnou silou vzniku zárodků krystalů je porušení stability soustavy jejím vychýlením z rovnováhy určitým stupněm podchlazení. Náhodným setkáním částic původní kapalně fáze dochází ke vzniku zárodku pevné fáze, u nějž se předpokládá sférický tvar [13]. Proti soudružnosti vznikajících embryonálních shluků působí snaha systému o vyrovnání vznikajícího koncentračního gradientu. Vznik zárodků tedy vede ke zvyšování volné energie systému. Zárodky jsou proto velmi nestabilní a snadno se rozpadají [14].

Se samovolným procesem nukleace je spojena především změna Gibbsovy energie, jež je znázorněna na obrázku 2 zelenou křivkou. Skládá se ze dvou příspěvků, objemového a povrchového. Objemový příspěvek je znázorněn na tomto obrázku červenou křivkou a je dán poklesem Gibbsovy energie, tedy rozdílem chemických potenciálů kapalně a vznikající pevné fáze ΔG . Tento rozdíl je hnací silou procesu, jež je vyvolána stupněm podchlazení. Zároveň je tato energie úměrná počtu částic v zárodku [15].



Obrázek 2: Závislost ΔG na velikosti zárodka za izoterních izobarických podmínek

Povrchový příspěvek je znázorněn modrou křivkou a je dán nárůstem povrchové energie vznikem fázového rozhraní solidus - liquidus. Suma obou příspěvků udává celkovou ΔG nukleace:

$$\Delta G_{nukleace} = (4/3)\pi R^3 \Delta G + 4\pi R^2 \gamma \quad (1)$$

V rovnici (1) R značí poloměr nuklea, γ je jeho povrchová energie a ΔG je hnací síla nukleace, tedy krystalizační energie, jak byla vysvětlena v kapitole 2.1.1. První člen uvedené rovnice odpovídá objemovému a druhý povrchovému příspěvku. Jejich sumu vyznačuje zelená křivka a má maximum v bodě, jemuž odpovídá poloměr nuklea R^* [15]. Ten se nazývá kritickým a je určen hraničním počtem částic nuklea, který se pohybuje mezi 4 až 60 v závislosti na druhu sloučeniny. Od tohoto počtu již převládají mezimolekulární síly v nukleu nad působením okolních sil původní fáze. Nad hodnotou R^* se tedy zárodek stává stabilním a další připojování částic k jeho povrchu snižuje volnou energii systému [16]. Hodnota R^* klesá s rostoucím podchlazením [17]. Kritické velikosti nuklea odpovídá určitá hodnota Gibbsovy energie G^* , jejíž hodnota udává velikost energetické bariéry, kterou musí embryonální shluk překonat, aby se stal stabilním [13]. Jak lze tedy názorně vidět z obrázku 2, celková Gibbsova energie roste až do dosažení ΔG^* a zárodek je za těchto podmínek nestabilní, může tedy docházet k jeho rozpadu. Za kritickou hodnotou však energie klesá. To znamená, že zárodek je již stabilní, nedochází k jeho rozpadu, ale naopak roste navazováním dalších částic na svůj povrch.

Výše popsaný popis nukleace se nazývá třídímenzionální, protože dochází ke vzniku trojrozměrného sférického nuklea náhodně v objemu roztoku [18].

Hlavním problémem procesu nukleace je určení její rychlosti. Ta udává počet vzniklých zárodků tuhé fáze nadkritické velikosti za jednotku času v jednotce objemu. Rychlost je vyjádřena základním zjednodušeným vztahem [15]:

$$n = A \cdot \exp(-\Delta G^*/kT) \quad (2)$$

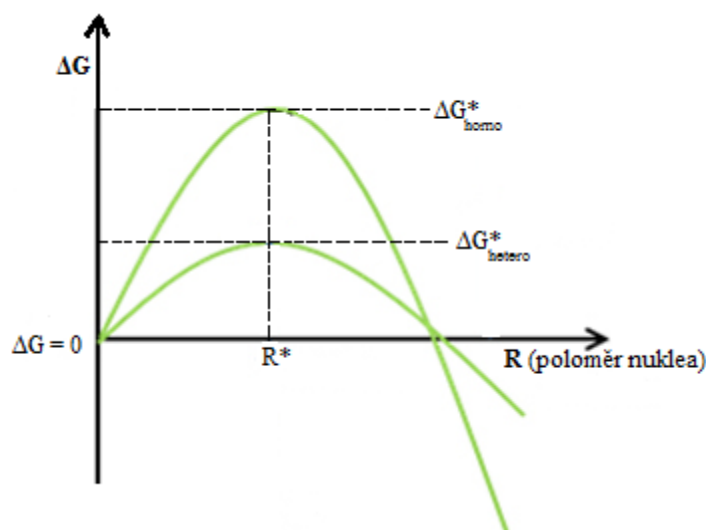
kde ΔG^* je hodnota kritické energetické bariéry, k je Boltzmannova konstanta a A je předexponenciální faktor závisující například na teplotě nebo na koncentraci molekul v původní fázi. Pro nukleaci z par a roztoků má nukleační rychlost složitější vyjádření a závisí na více faktorech, jakými jsou povrchové napětí nově vznikajícího fázového rozhraní či stupeň nasycení systému. Nejdůležitější a nejvýraznější je však

závislost rychlosti na teplotě systému. Jejím snižováním dochází k omezení pohybu molekul a ke snížení jejich difúze k povrchu nuklea. Rychlost homogenní nukleace roste s časem lineárně až do určitého stupně podchlazení, kde setrvává na konstantní hodnotě, a poté opět klesá dalším snižováním teploty.

S homogenní nukleací se v přírodě a praxi příliš často nesetkáváme (vyjma laboratorního prostředí), protože látky se v absolutně čistém stavu přirozeně téměř nevyskytují. V biologických systémech je homogenní nukleace z důvodu jejich komplikovanosti velmi nepravděpodobná. Proto se v těchto systémech předpokládá výskyt složitější heterogenní nukleace, jež je popsána dále.

2.1.2.2 Heterogenní nukleace

Vznik zárodků na cizích tělesech (nečistoty, bublinky, atd...) nebo na stěnách nádoby se nazývá heterogenní nukleace. Tento proces je v přírodě i technologické praxi mnohem častější než nukleace homogenní. Důvodem je snadnější zachycení a shlukování molekul na cizím povrchu. Tím se i zmenšuje počet částic potřebných ke vzniku nuklea. Nukleace tak probíhá snadněji i za menšího podchlazení a její energetická bariéra je nižší než u homogenní nukleace, jak znázorňuje obrázek 3. Kritická velikost nuklea však zůstává stejná, zatímco objem nuklea je rozdílný [13]. Je potřeba si však uvědomit, že zárodek začíná vznikat až po přichycení určitého množství částic či molekul, které se shlukují do jednoho místa. Zachycení jedné molekuly na povrchu cizí látky či více molekul od sebe různě vzdálených se nedá považovat za vznikající nukleum, protože jde pouze o proces adsorpce [19].

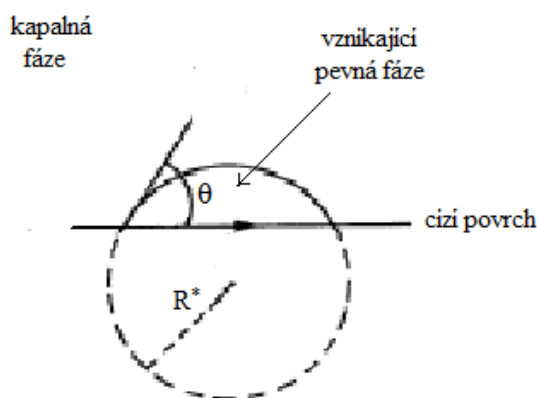


Obrázek 3: Závislost ΔG na průměru nuklea pro homogenní a heterogenní nukleaci

Celková ΔG heterogenní nukleace je přímo úměrná ΔG homogenní nukleace:

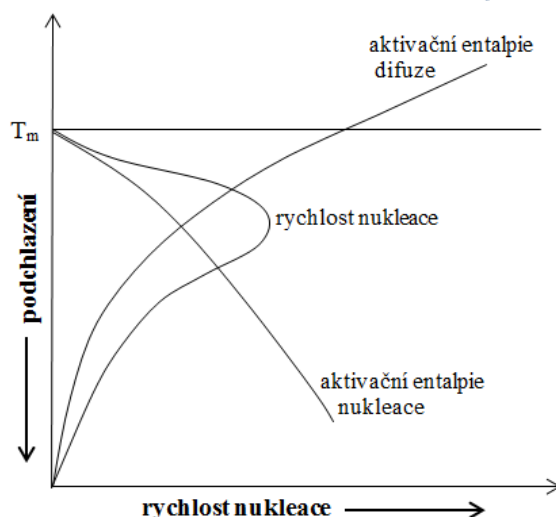
$$\Delta G_{hetero} = \Delta G_{homo} \cdot f(\theta) \quad (3)$$

kde $f(\theta)$ je funkce úhlu smáčení a musí být menší než jedna [13], [18]. Hlavní podmínkou heterogenní nukleace je tedy smáčivost cizího povrchu novou krystalickou fází. Jinak řečeno, musí docházet k interakci částic vznikajícího zárodku pevné fáze s cizím povrchem. Pokud by k tomuto nedocházelo, jednalo by se o homogenní nukleaci z objemu. Na obrázku 4 je náčrtek, jak taková nukleace vypadá. Aby byla splněna předcházející podmínka, musí být smáčivý úhel θ větší než 0° a menší než 180° . Shlukováním částic dochází ke vzniku zárodku podobnému polovině koule zachycené na povrchu. Energie tohoto útvaru je v porovnání s energií koule (jejíž tvar předpokládáme u zárodku vzniklého homogenní nukleací) menší, protože styčný povrch mezi kapalnou a pevnou fází je menší [19].



Obrázek 4: Vznik zárodku nové fáze na cizím povrchu [13]

Rychlost heterogenní nukleace je různá pro různé stupně podchlazení, jak je naznačeno na obrázku 5, a dosahuje určitého maxima. K nukleaci začíná docházet pod teplotou tání T_m . Stejně jako v předcházejícím případě, i zde má rychlost nukleace dva příspěvky. První příspěvek difúze se s podchlazením zmenšuje. Za dosažením maxima rychlosti dochází k omezení transportu částic k povrchu vznikajícího zárodku a systém se nachází v amorfním stavu podchlazené kapaliny. Druhý příspěvek nukleace s podchlazením naopak roste a souvisí s hnací silou tvorby krystalizačních zárodků [15].



Obrázek 5: Vztah mezi rychlostí nukleace a stupněm podchlazení

Problémem u heterogenní nukleace a určení její rychlosti je stanovení vlastností povrchu, na němž nukleace probíhá, a tím určení druhu interakcí mezi tímto povrchem a vznikající tuhou fází. Nukleace může probíhat dokonce velmi mnoha způsoby podle charakteru tohoto povrchu, jež může být rovinný, zakřivený či pórovitý [15].

Nukleaci lze ovlivnit velkým množstvím parametrů. Nejvýznamnějším je teplota, na níž závisí rychlost nukleace a která ovlivňuje difúzi částic k povrchu nuklea. Dalšími faktory, které nukleaci ovlivňují, jsou molární hmotnost sloučeniny, typ její krystalické mřížky, hydratace iontů, tepelná historie vzorku, přítomnost tuhé fáze nebo rozpuštěných příměsí, jež ovlivňují viskozitu roztoku a komplikují tak proces nukleace [16].

S heterogenní nukleací je možné se setkat prakticky všude kolem nás v přírodě i v praxi. Heterogenní nukleací vznikají sněhové vločky v atmosféře nebo minerály a horniny v přírodě. Některé biologické organismy obsahují nukleátory (prachová zrnka, bakterie, makromolekuly), na nichž je heterogenní nukleace vyvolána a které jim umožňují přežít za nízkých teplot řízeným procesem krystalizace.

2.1.2.3 Omezení klasické nukleační teorie

Klasická nukleační teorie bohužel zcela neodpovídá experimentům z praxe. Nelze ji aplikovat na složitější systémy a to hned z několika důvodů. Jedním z nich je skutečnost, že teplotní závislost povrchového napětí v podchlazených systémech není

zcela známa. Dalším důvodem je fakt, že klasická nukleační teorie uvažuje stejné termodynamické vlastnosti zárodku a nové fáze v objemu, což však neplatí pro nuklea složená z malých molekul. Proto existují kromě popsané klasické nukleační teorie i další moderní teorie a modely jejího popisu [20], [21], [22].

2.1.3 Růst krystalů

Růst krystalů je druhým krokem procesu krystalizace. Jde o složitý děj, založený na připojování částic k vzniklému zárodku podle určitých zákonitostí, čímž dochází ke vzniku pravidelné krystalické mřížky. Výsledkem celého procesu je krystal, jehož základem je trojrozměrná elementární buňka složená z několika pravidelně uspořádaných atomů.

Tento proces je umožněn třemi základními ději: transportem atomů k povrchu krystalu, navázání těchto atomů na povrch krystalu a transport uvolněného krystalizačního tepla z povrchu krystalu (tepelná konvekce) [12]. Dle těchto parciálních dějů lze na růst krystalů pohlížet ze dvou hledisek – termodynamického a kinetického, jež jsou dále podrobněji rozebrány.

2.1.3.1 Termodynamika růstu krystalů

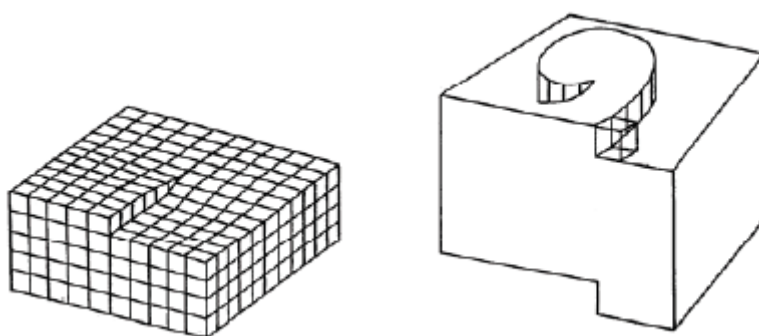
Základem termodynamického pohledu na růst krystalů jsou energetické změny spojené s připojováním nových částic na již vzniklou krystalovou plochu.

Jako první ji popisují tzv. teorie povrchové energie zárodku [18], [23]. Na jejich počátku stál Curie (1885) a Wulff (1901), jež vycházeli z Gibbsovy představy, že stejně jako kapka tak i vznikající krystal musí mít minimální povrchovou energii, aby se staly stabilními. Došli k závěru, že růst krystalu bude řízen rychlostí růstu jeho krystalových ploch, jež rostou buď invariantně, nebo se překrývají. Jejich růstové rychlosti se budou lišit v závislosti na velikosti povrchových energií jednotlivých ploch a budou nepřímo úměrné jejich hustotě. Teorie růstu krystalů vycházející z povrchové energie však selhávají při vysvětlení supersaturace a chování roztoku u povrchu krystalu [23].

Mezi další teorie zabývající se růstem krystalů z termodynamického hlediska patří Kosselova teorie [24]. Vychází z předpokladu, že krystalická plocha je ideálně vyvinuta a neobsahuje žádné nepravidelnosti a poruchy. Kromě připojování nových elementů však uvažuje i odtrhávání částic již dříve připojených vlivem tepelných pohybů [17].

Zabudovávání nových stavebních částic probíhá do souvislých vrstev na taková dostupná místa krystalových ploch, v nichž dojde k uvolnění co největšího množství energie [23], [24]. Těmito místy jsou zejména hrany a zlomy. Pokud jich je nedostatek nebo je narůstající horní vrstva úplná a tvoří novou komplexní rovinu, připojují se částice i na tyto nově vzniklé rovné plochy. Inkorporace částic na komplexní roviny je tzv. povrchová neboli dvoudimenzionální nukleace, která je pro růst krystalů nezbytná [18]. Takto inkorporované částice však mají velkou tendenci se znovu uvolnit a vrátit do roztoku. Začleňováním částic do mřížky dochází k tvorbě řad, jež následně vytvářejí monomolekulární vrstvu krystalu. Pokud je tato jedna vrstva komplexní, dochází na ní ke vzniku nových řad a tím i další vrstvy. Z tohoto důvodu probíhá růst krystalů v nekonečně se opakujících krocích a jeho celková rychlost je určena rychlostí vzniku nových vrstev [16], [23], [25].

Teorie spirálového růstu krystalů se oproti předcházející teorii liší zejména v tom, že předpokládá přítomnost šroubových nebo hranových dislokací (poruch) na již vzniklých krystalových plochách. Nepředpokládá tedy ideálně vyvinutý krystal, což umožňuje přesnější popis dané problematiky v praxi, kde se s ideálně vyvinutým krystalem nesetkáváme. Připojování částic podle této teorie probíhá právě do míst dislokace, čímž dochází k tzv. spirálovému růstu krystalové plochy, jež je znázorněn na obrázku 6 [13]. Pro tento mechanismus není nezbytná povrchová nukleace, jak tomu bylo u předchozí teorie [16], a vysvětluje i výskyt krystalizace při minimálním přesycení roztoku [17].



Obrázek 6: Schéma růstu krystalu mechanismem hranové a šroubové dislokace [13]

Důsledkem výše zmíněných mechanismů připojování nových částic ke vznikajícím krystalovým plochám v přibližně stejném čase je tzv. zonální růst krystalů, kdy jeho

prostřední část je uvažována za nejstarší, zatímco část povrchová naopak za nejmladší. Tak dochází ke vzniku zón lišících se chemickým složením, případně strukturou i barvou. Narůstáním jednotlivých zón na sebe dochází k sektorovému růstu krystalů, kdy se jednotlivé sektory liší svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi [17].

2.1.3.2 Kinetika růstu krystalů

Kinetický pohled na proces růstu krystalů se zabývá zejména určením jeho rychlosti a definováním parametrů, jež tuto rychlost ovlivňují. Za limitující krok, tedy rychlost určující děj, je ve většině případů považována difúze částic k povrchu nebo odvedení uvolněného krystalizačního tepla od povrchu krystalu. Touto difúzí je pak určena celková rychlost procesu růstu krystalu. Kinetika růstu krystalů je popsána mnoha modely a teoriemi, mezi něž patří například teorie mezní vrstvy nebo difúzní teorie, model Černovovův či model podle Burtona, Franka a Cabrera [22], [23], [24], [25].

Většina modelů je založena na složitém matematickém popisu a platí pro komplikované systémy. Z tohoto důvodu se jimi tato práce nebude zabývat, ale dále se zaměří pouze na nejvýznamnější difúzní teorii, jež je pro pochopení problematiky růstu krystalů z roztoku stěžejní.

Difúzní teorie

Na počátku všech difúzních teorií stáli Noyes a Whitney (1897), kteří považovali krystalizaci za opak rozpouštění a chápali tak rychlosti obou procesů za stejné, determinovány rozdílem koncentrací na povrchu pevné fáze a v objemu roztoku [23]. Jejich teorie byla postupně upravována a zpřesňována v dalších letech, kdy bylo zjištěno, že rychlost krystalizace vykazuje určité odchylky od rychlosti rozpouštění například vlivem míchání, rozdílné molekularity obou procesů či průběhu nukleace [18].

Všechny difúzní teorie růstu krystalů vycházejí z představy čtyř základních procesů růstu krystalu, kterými jsou: transport částic z objemu roztoku k povrchu vzniklého zárodku, difúze částic difúzní vrstvou neboli tenkým filmem obklopující povrch krystalu, zabudovávání částic do krystalické mřížky a transport uvolněného krystalizačního tepla do objemu roztoku [13], [24]. Každý z nich probíhá určitou rychlostí, přičemž ten nejpomalejší z nich řídí celkovou rychlost růstu krystalu.

Difúze částic je jejich transport v objemu způsobený koncentračním gradientem, který vzniká nahromaděním částic v jednom místě roztoku. Tím je místo vzniku

krystalizačního zárodku. Difúze probíhá podle kinetiky reakce prvního řádu. U podchlazených roztoků se difúze komplikuje zvyšováním jejich hustoty a viskozity. Pohyb molekul v roztoku je tak velmi omezen vlivem zkrácení mezimolekulárních vzdáleností působením nízkých teplot. Problém difúze částic z objemu lze alespoň částečně odstranit mícháním roztoků [13]. Tento děj bude rychlost určujícím krokem například v případě růstu iontových krystalů, kde je inkorporace nových částic do krystalické mřížky dostatečně rychlá vzhledem k vysokým vazebným energiím [18].

Druhým dílčím dějem je povrchová difúze a je základem adsorpčních teorií [18], [23]. Její základní předpoklad je takový, že částice, které se z objemu dostanou až k povrchu krystalu, se nezačleňují do krystalické mřížky okamžitě. Nejdříve u nich dojde ke ztrátě jednoho stupně volnosti a poté slabými interakcemi mezi sebou vytvářejí hraniční adsorpční vrstvu u povrchu krystalu za ustavení dynamické rovnováhy mezi touto vrstvou a objemem roztoku. Částice v této vrstvě se buď začlení do mřížky, vrátí se do roztoku, anebo srážkami s dalšími částicemi ve vrstvě vytváří nové zárodky (nedokonalý růst krystalu) [18]. Této teorii se taktéž říká teorie rozhraní neboli filmová teorie. Tloušťka tenkého filmu vznikajícího u povrchu krystalu se mění v závislosti na intenzitě míchání roztoku [16], [23].

Další zmíněný děj je začleňování částic do krystalické mřížky. Jde o povrchovou chemickou reakci, jejíž rychlost závisí na jejím reakčním řádu. Literatura uvádí, že může jít o reakci prvního, druhého ale i vyššího řádu [13], [18], [23], [25]. Rychlost tohoto děje tedy může být limitující v případě roztoků, kde je objemová i povrchová difúze umožněna mícháním a je tedy dostatečně rychlá.

Odvod krystalizačního tepla od povrchu krystalu bývá ve většině případů dějem nejrychlejším. Jde o konvekci neboli proudění tepla uvolněného na růstovém rozhraní začleněním částice do krystalické mřížky. Konvekce tepla se může stát určujícím dějem pro rychlost krystalizace z tavenin [24].

Určení, který ze zmíněných procesů je nejpomalejší, závisí na podmínkách krystalizace a lze ho provést několika metodami: porovnáním aktivačních energií krystalizace a difúze, sledováním vlivu příměsí, nebo sledováním vlivu míchání [16].

Difúzní teorie však není dostačující k úplnému popisu procesu krystalizace. Kromě difúze je nutné brát v úvahu i další faktory, jakými jsou například rozpustnost a velikost vznikajících krystalů či částečné odpařování z povrchu roztoku. Teprve jejich kombinací a vzájemným prolínáním oblastí výše zmíněných dějů lze dosáhnout pochopení reálného děje růstu krystalů [23], [26].

Rychlost růstu krystalů

Jak bylo zmíněno v předchozí kapitole, v reálném systému je rychlost růstu dána dílčími rychlostmi jednotlivých dějů. Pro zjednodušení však lze rychlost difúze částic i tepla zanedbat. Za tohoto předpokladu, platného jen u systému s nízkým podchlazením, je krystalizační rychlost definována tzv. lineární rychlostí růstu krystalů. Je dána velikostí a nepravidelnostmi styčné plochy mezi kapalinou a vznikajícím krystalem a závisí na více faktorech. Je funkcí nejen teploty, ale i relativní rychlosti mezi kapalnou a pevnou fází a závisí i na podchlazení. Pokud je podchlazení menší, rychlost s ním roste téměř rovnoměrně až do dosažení určité hodnoty, kde zůstává konstantní. Zvyšováním podchlazení rychlost krystalizace klesá v důsledku zvýšení viskozity roztoku a zpomaleného transportu látky i tepla. Hodnoty lineární rychlosti růstu krystalů bývají obvykle v cm/s pro taveniny a zlomky mm/hod pro roztoky [12], [16].

Pro určení celkové rychlosti procesu krystalizace se v praxi nejčastěji využívá určení rychlosti růstu krystalových ploch. Ty se v jednotlivých směrech však mohou lišit. Principem je určení hmotnostního přírůstku nebo tloušťka přírůstku nově vzniklé vrstvy kolmé na jednotku povrchu krystalu za jednotku času [23]. Využívají se k tomu především metody optické, jako jsou elektronová mikroskopie či interferometrie. Hmotnostní přírůstek lze určit kontinuálním pozorováním změny hmotnosti krystalu [16]. Dále lze využít i metody pro určení změny vlastností krystalizačního roztoku, kam patří například metody dilatometrie, turbidimetrie, konduktometrie, refraktometrie či metody určování změny koncentrace a hustoty roztoku [18].

Krystalizační rychlost je však nutné stanovovat za co nejpřesněji definovaných podmínek. Ty však nelze nikdy určit úplně přesně, protože na krystalizační rychlost má vliv mnoho faktorů, z nichž nejvýznamnější je teplota. Její vztah s rychlosti růstu krystalů je arrheniovský. Za vyšších teplot je rychlost řídicím dějem difúze, za teplot nižších je to začleňování částic do krystalické mřížky [23].

Další významný vliv má míchání, jež zvyšuje relativní rychlost mezi krystalem a roztokem. Urychluje tak transport částic z objemu k povrchu krystalu a tím zvyšuje krystalizační rychlost.

Rozpustné příměsi a nečistoty ovlivňují krystalizační rychlost adsorpcí na povrch krystalu nebo modifikací vlastností krystalizačního roztoku i charakter rozhraní solidus - liquidus. Jejich vliv však může být i pozitivní vytvářením energeticky výhodnějších nových center na plochách v místních deformacích krystalické mřížky.

Dalšími působícími vlivy je rozpouštění vznikající pevné fáze, dokonalost resp. nedokonalost krystalické mřížky či velikost a tvar rostoucího krystalu [16], [18], [23]. Morfologie krystalů je v závislosti na mnoha faktorech různá a velmi rozmanitá. Tato práce se proto dále bude zaměřovat pouze na růst a tvar krystalů vody.

2.2 Krystalizace podchlazené vody

Voda je nejrozšířenější sloučeninou nezbytnou pro veškerý život na Zemi. Za standardních podmínek je bezbarvou kapalinou bez zápachu s teplotou tuhnutí 0°C. Z fyzikálně chemického hlediska je to sloučenina velmi významná a zajímavá svými specifickými vlastnostmi, mezi které patří například vysoká měrná tepelná kapacita, velké povrchové napětí nebo změna její hustoty a objemu s teplotou. Její specifické vlastnosti jsou dány vodíkovými vazbami mezi jednotlivými molekulami.

Pod teplotou tuhnutí má voda tendenci přirozeně krystalizovat. Za určitých podmínek však může zůstat v kapalném stavu i pod touto teplotou a stává se metastabilní, podchlazenou kapalinou. Dostatečně velkou rychlostí chlazení je totiž zabráněno nukleaci, případně je růst krystalů potlačen nárůstem viskozity. Vlivem toho se molekuly pomaleji pohybují, čímž se snižuje jejich tepelná energie až pod hodnotu potenciální energie, která by musela být pro pohyb molekul překonána, a vodíkové můstky se stávají stabilnější [27]. Molekuly jsou v podchlazené kapalině nepravidelně uspořádány. Vzhledem k tomu, že jde o metastabilní systém, nesetrvává v tomto stavu do nekonečna, ale nakonec zakrystalizuje. Za určitých podmínek však nemusí dojít ke vzniku krystalicky pravidelné struktury, nýbrž vzniká amorfni ztuhlá kapalina s fyzikálními vlastnostmi blízkými vlastnostem pevné látky. Tento proces se nazývá vitifikace [28]. Podrobněji se jím tato práce zabývá v kapitole 2.2.3.

Podchlazená voda až na -40°C se vyskytuje v atmosféře, ale i v živých systémech a organismech přežívajících v arktických oblastech. Zabránění krystalizace vody podchlazením a vitifikace se ve velké míře uplatňuje při metodách kryogenního uchovávání různých biologických materiálů.

2.2.1 Krystalizace vody v biologických systémech

Všechny živé organismy obsahují až devadesát procent vody. Její krystalizace však může poškodit buňky, čímž nedojde k opětovnému obnovení životaschopnosti uchovávaného materiálu po jeho rozmrazení.

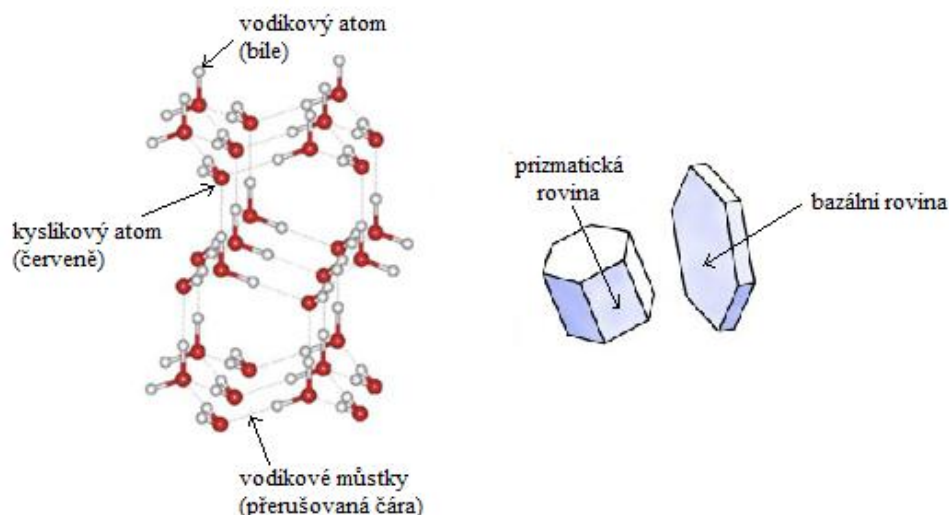
Při zmrazování živých tkání dochází v první řadě ke krystalizaci extracelulární tekutiny. V důsledku vzniku krystalů vody se koncentrace cytosolu zvyšuje, čímž vzniká osmotický gradient mezi intracelulárním a extracelulárním prostorem. Tento gradient se buňka snaží vyrovnat vypuzováním vody do okolí. Důsledkem extracelulární krystalizace je tedy buněčná dehydratace, která způsobuje strukturní změny buněčné membrány. Membrána tak ztrácí základní biologické funkce a buňka umírá.

Intracelulární krystalizace vede bezprostředně k poškození buňky. Cytoplasma, nacházející se uvnitř buněk, obsahuje nejen vodu, ale i velké množství vysokomolekulárních látek, které se hůře uspořádávají do krystalické mřížky, ale snadněji vitrifikují. Pokud je rychlost chlazení příliš vysoká, nestihne se zvýšit koncentrace intracelulárního roztoku prostupem vody do extracelulárního matrixu. Důsledkem je vznik krystalů uvnitř buňky. Ty vyvíjejí nadměrné napětí na buněčnou membránu a mění tak její strukturu. To má za následek opět ztrátu biologických funkcí membrány.

Krystalizace v buněčném materiálu je tedy pro obnovení jeho životaschopnosti nežádoucí a představuje základní problém v kryoprezervačních metodách. Detailnější pohled na krystaly vody a zabránění jejich vzniku je obsahem následujících kapitol.

2.2.2 Tvar krystalů vody

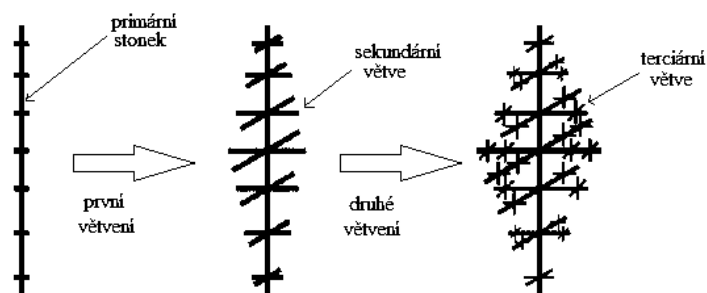
Voda krystaluje nejčastěji v hexagonální soustavě, která je stabilní pro širokou škálu teplot. Důvodem je lomený tvar molekuly vody s úhlem $104,95^\circ$, díky kterému se za nízkých teplot molekuly uspořádávají do šestiúhelníkového tvaru tak, že na jednu molekulu vody se vážou celkem čtyři další, jak je znázorněno na obrázku 7. Vznikají tak volné prostory ve struktuře krystalu a jeho uspořádání je rozvolněnější než v kapalném stavu. To je důvodem menší objemové hustoty ledu oproti kapalné vodě [27].



Obrázek 7: Hexagonální struktura ledu a výsledný šestiúhelníkový hranol

Jak znázorňuje obrázek 7, výsledný tvar vznikajícího krystalu je hexagonální hranol s bazální a prizmatickou rovinou, která na rozdíl od bazální roviny hexagonální symetrii nevykazuje. Rychlosti růstu těchto rovin jsou v závislosti na teplotě různé [29]. Rychlejší růst vrstev v bazálních rovinách se nazývá též růst ve směru c -osy a jeho důsledkem je vznik sloupcového hranolu. Velikosti ploch horní a spodní bazální roviny nemusejí být stejné [30]. U polárních sloučenin, mezi něž voda patří, je růst tohoto typu hranolu neobvyklý. Důvodem je větší koncentrace molekul na rozích šestiúhelníku než jejich koncentrace nad bazální rovinou. Nedochozí teda k nově vznikající vrstvě bazální roviny, ale ta se naopak rozpíná do stran nárůstem vrstev v prizmatických rovinách [18]. Druhým typem je hranol talířový. Ten vzniká za menších podchlazení, kdy je rychlejší růst vrstev v prizmatických rovinách neboli růst ve směru a -osy. Tento tvar bývá také většinou tvarem iniciálním a těžko zachytitelným, jež se hlubším podchlazením stává nestabilní a dalším růstem se začíná větvit [30], [31], [32].

Větvením vzniká stromečkovitý tvar krystalu zvaný dendrit. Jeho růst koresponduje s Kosselovou teorií růstu krystalů, podle které je nejvíce preferovaný růst krystalů na jeho rozích a hranách. Dendrit vzniká většinou v počáteční fázi růstu krystalů a rozumí se jím jediný krystal složený z primárního stonku, z něhož vyrůstají sekundární větve, které se mohou dále větvit na terciární [18], [25], [33]. Jeho schéma je znázorněno na obrázku 8.



Obrázek 8: Větvení při dendritickém růstu krystalu

Důvody vzniku dendritu se podle různých teorií liší. Dendritický růst může být důsledkem nedostatečné difúze částic k povrchu krystalu, nedostatečného odvodu krystalizačního tepla, přítomnosti nečistot nebo rozdílných vlastností okolního prostředí [18], [33].

V přírodě jsou typickým příkladem dendritického růstu krystaly sněhových vloček. Vznikají krystalizací z plynné fáze a předpokládá se u nich růst dendritu jen v jedné rovině, tzn. růst jen ve směru a -osy. Běžně však dochází k třídímnímu růstu krystalů. Jde o růst také ve směru c -osy, který určuje tloušťku krystalu. Ta klesá s rostoucí délkou dendritu a je závislá na koncentraci roztoku [31], [32]. Dalším podchlazením a pokračujícím růstem dendritu dochází k jeho větvení do všech směrů a k vyplnění prostoru mezi jednotlivými sousedními větvemi. Výsledkem může být zcela odlišný tvar narostlého krystalu, který se od původního dendritu velmi liší [18], [33], [34].

Rychlost růstu dendritického krystalu se určuje vyhodnocením vzdálenosti jeho nejvýznačnější větve od středu krystalu pomocí mikroskopických metod. Stejnými metodami se určuje i symetrie dendritu. Rychlost růstu sledované větve dendritu nezávisí na koncentraci roztoku, ale pouze na jeho podchlazení [31], [32], [35], [36].

2.2.3 Metody ovlivnění krystalizace vody

Jak již bylo zmíněno dříve, je krystalizace vody v biosystémech stěžejním problémem. Vzhledem k tomu, že se tato práce zaměřuje právě na tento typ krystalizace, nežádoucí při kryoprezervačních technikách, je nutné pochopit, jakými způsoby jí lze předejít případně jak jí lze ovlivnit.

2.2.3.1 Vitřifikace

Vhodně zvolenou rychlostí chlazení podchlazené kapaliny může dojít k jejímu přechodu na amorfní tuhou fázi. Tento proces se nazývá vitřifikace neboli zeskelnění.

V podchlazené kapalině jsou molekuly uspořádané částečně nepravidelně. Dosažením teploty skelného přechodu “zamrzou” na svých místech, čímž nedojde ke vzniku krystalicky pravidelné struktury, ale vzniká amorfní ztuhlá kapalina – sklo. Tento druh strukturní změny se nazývá skelná transformace a jde o fázový přechod druhého řádu se střední hodnotou teploty skelného přechodu T_g . Na molekulární úrovni je tento proces spojen se ztrátou rotačních a translačních stupňů volnosti, za zachování pouze vazebných vibrací uvnitř pevné molekulární struktury. Tepelná roztažnost, tepelná kapacita a stlačitelnost klesají na podobné hodnoty, jaké odpovídají krystalu. Ve vitřifikovaném vzorku dochází pouze k velmi pomalým lokálním pohybům molekul, které vedou k utlumení biologických funkcí buňky, čehož je využíváno v kryobiologii při dlouhodobém uchovávání tkáně za ultranízkých teplot [37].

Procesem vitřifikace uchovávaného materiálu je zabráněno intracelulární krystalizaci vody, jež vede k poškození buněčné tkáně. Zeskelnění vzorku je dosaženo vhodnou dehydratací vzorku formou desikace, ultra-rychlého mrazení, nebo pomocí kryoprotektantů [28]. Těchto látek je však velké množství se širokým uplatněním a tato práce se o některých pouze zmíní, zatímco podrobněji se zaměřuje na sacharidy a jejich vliv, jmenovitě na sacharózu, která je také hlavním předmětem experimentální části.

2.2.3.2 Kryoprotektanty

Kryoprotektanty jsou vysoce koncentrované roztoky chemických látek. Ponoření biologických tkání do těchto roztoků za působení nízkých teplot má za následek vitřifikaci vzorku a zabránění tvorby krystalků ledu. Princip jejich působení je ve snížení (i) obsahu volné vody, (ii) zakoncentrování iontů v cytosolu a (iii) osmotického odsávání vody z buňky. Také regulují minimální buněčný objem a zabraňují tak jejímu mechanickému kolapsu [8].

Velký význam má zvolená koncentrace kryoprotektantu. Ta se volí co nejnižší možná tak, aby při ní ještě nedocházelo ke krystalizaci vzorku. Koncentrace, kritická rychlost ochlazování a hodnota T_g , jež se pohybuje kolem $-120 \pm 10^\circ\text{C}$, jsou charakteristickými vlastnostmi každé kryoprotekční látky. Další významnou vlastností je její toxicita.

Projevuje se denaturačním účinkem na proteiny nebo dehydratačním poškozením vzorku a lze jí předcházet vzájemnou kombinací těchto látek [38].

Podle místa působení dělíme kryoprotektanty na dvě skupiny. První skupina jsou penetrující nízkomolekulární látky, které prostupem přes buněčné membrány pronikají do buňky a brání extracelulární i intracelulární krystalizaci. Typickým zástupcem této skupiny je syntetický dimethylsulfoxid. Ten je však nevhodný pro svou vysokou toxicitu, proto se používá v kombinaci s další penetrující látkou glycerolem, který jeho toxicitu potlačuje [39].

Druhou skupinou jsou nepenetrující kryoprotektanty, které nemají schopnost prostupovat přes buněčné membrány a působí jen v extracelulárním prostoru. Jsou to často polymery, které vytvářejí četné vodíkové vazby, jako je například polyvinylalkohol. Ten je nejrozšířenějším syntetickým kryoprotektantem této skupiny, který výborně adhezuje na povrch nukleí krystalů. Vytvořením vodíkových vazeb mezi svými hydroxylovými skupinami a molekulami vody limituje jejich transport do krystalické struktury a zabraňuje tak růstu krystalů [40]. Do této skupiny kryoprotektantů patří i nepolymerní sacharidy, jimiž se podrobněji zabývá další kapitola této práce.

Sacharidy a jejich kryoprotekční účinky

Sacharidy jsou organické sloučeniny ze skupiny polyhydroxyderivátů aldehydů a ketonů. Jsou přirozenou součástí extracelulárního i intracelulárního prostoru živých buněk, pro které je nezbytná jejich zvýšená koncentrace pro přežití v chladných podmínkách. V kryoprezervačních technikách se tyto látky využívají pro svou nízkou toxicitu a pro své vhodné kryoprotekční vlastnosti.

Jednou z významných vlastností sacharidů je jejich schopnost potlačovat nukleaci a růst krystalů ovlivněním strukturního uspořádání okolních molekul vody. To je způsobeno větší velikostí molekul sacharidů, které vytvářejí skelet velkých hydratovaných klastrů, které zabraňují shlukování a difúzi molekul vody k povrchu nuklea [41], [42].

Druhou významnou kryoprotekční vlastností je jejich vazba na proteiny buněčné membrány. Touto interakcí nahrazují molekuly vody, které jsou za vysoké hydratace na těchto proteinech normálně navázány. Ty by totiž v případě vystavení nízkým teplotám mohli způsobit poškození membrány vznikem krystalů nebo by způsobili fatální dehydrataci buňky [8], [30], [43].

Monosacharidy, jako je například glukóza nebo fruktóza, mají menší kryoprotekční význam pro svou malou molekulu [43]. Mnohem více jsou využívány disacharidy, zejména sacharóza a trehalóza.

Sacharóza vs. trehalóza

Sacharóza je nejčastěji se vyskytující disacharid v rostlinách a její vodné roztoky se vyznačují vysokou tolerancí vůči mrazu. Vodný roztok sacharózy nacházející se pod 0°C je v metastabilním stavu. Teplota heterogenní nukleace se pohybuje v rozmezí -15°C až -25°C v závislosti na rychlosti chlazení [44]. K homogenní nukleaci dochází mezi -40°C až -60°C, přičemž v tomto rozmezí teplota nukleace klesá se zvyšující se koncentrací roztoku. Rychlost růstu krystalů vody z vodného roztoku sacharózy je vyšší, a s rostoucím podchlazením se zvyšuje mnohem výrazněji, než je tomu u roztoků trehalózy. Zároveň však rychlost růstu krystalů vody klesá s rostoucí koncentrací roztoků obou zmíněných disacharidů. Teplota skelného přechodu vodného roztoku sacharózy se pohybuje v širokém rozmezí teplot a je silně závislá na jeho koncentraci, zatímco její závislost na rychlosti chlazení je malá [41]. Sacharóza má uplatnění zejména ve směsi s rafinózou, která potlačuje krystalizaci a velmi ochotně vitrifikuje.

Druhým nejrozšířenějším kryoprotekčním disacharidem je trehalóza. Její významnou vlastností je vysoká teplota skelného přechodu, vysoká stabilita a nízká reaktivita i redukční schopnost [45]. Trehalóza má oproti sacharóze rozdílnou strukturu a vyšší hydratační číslo. Schopnost vázat větší počet molekul vody má za následek větší poloměr vrcholů dendritu. Rychlost růstu krystalů vody v roztoku trehalózy začíná klesat po dosažení určité velikosti krystalu [30]. Krystalizační růst je za nižších koncentrací stabilnější než v roztoku sacharózy, za vyšších koncentrací však převládá nestabilní růst. Morfologie narůstajících krystalů závisí jak na druhu sacharidu, tak na jeho koncentraci [30], [41]. Ze všech výše zmíněných důvodů se trehalóza považuje obecně za lepší kryoprotektant.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Tato práce je zaměřena na studium rychlosti růstu krystalů vody v roztoku sacharózy za nízkých teplot. Skládá se z přípravy sledovaného roztoku požadované koncentrace a jeho studia za vysokých podchlazení metodou diferenční skenovací kalorimetrie a optickým mikroskopem.

3.1 Příprava vzorku

Pro sledování růstové rychlosti krystalů vody při podchlazení byl vybrán vodný roztok sacharózy o hmotnostním zlomku 0,5. Tento roztok byl připraven navážením 1 g sacharózy na analytických vahách do 5 ml odměrné baňky a byl k němu přidán 1 ml redestilované vody. Roztok byl míchán až do úplného rozpuštění sacharózy a poté byl skladován v temnu za laboratorní teploty maximálně po dobu pěti dnů, poté byl připraven roztok nový.

Seznam použitých chemikálií:

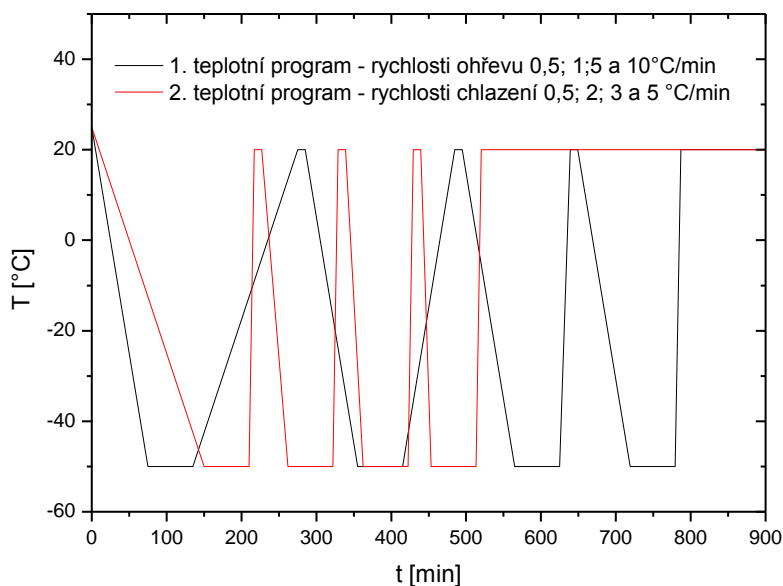
- sacharóza, čistota 99,5%, Sigma – Aldrich,
- redestilovaná voda,
- kapalný dusík, Technoplyn Linde.

3.2 Diferenciální skenovací kalorimetrie

Krystalizace a tání ledu ve vodném roztoku sacharózy byly sledovány pomocí metody DSC za použití konvenčního kalorimetru DSC 822° (Mettler, Toledo), který byl opatřen přídavným chladicím zařízením. Přístroj byl kalibrován standardním postupem na tání čistých kovů In, Zn a Ga. Dva vzorky sacharózy ve formě roztoku o koncentraci 50 hm% byly napipetovány (10 μ l) do standardních hliníkových kelímků. Jako reference byl použit prázdný kelímek. Nulová linie byla měřena před samotným měřením vzorku.

Vzorky byly proměřeny při cyklických teplotních programech. V případě prvního teplotního programu bylo chlazení v každém cyklu provedeno rychlostí 1°C/min až na teplotu -50°C. Poté byl vzorek po dobu 1 hodiny ponechán při teplotě -50°C. Následně byl vzorek ohříván rychlostí 0,5; 1; 5 a 10°C/min až na teplotu 20°C. Toto měření bylo provedeno pouze pro první vzorek. Během druhého teplotního programu byly oba vzorky chlazeny rychlostmi 0,5; 2; 3 a 5°C/min opět na teplotu -50°C a poté opět

následovala izoterma při -50°C po dobu jedné hodiny. Následující ohřev byl pokaždé stejnou rychlostí $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ na teplotu 20°C . Tímto způsobem byl zpracován vzorek č. 1 po předchozím měření prvním teplotním programem a vzorek č. 2 po 24 hodinovém stání v laboratoři v zapouzdřeném stavu při 27°C . Průběh cyklických teplotních programů je znázorněn na obrázku 9.

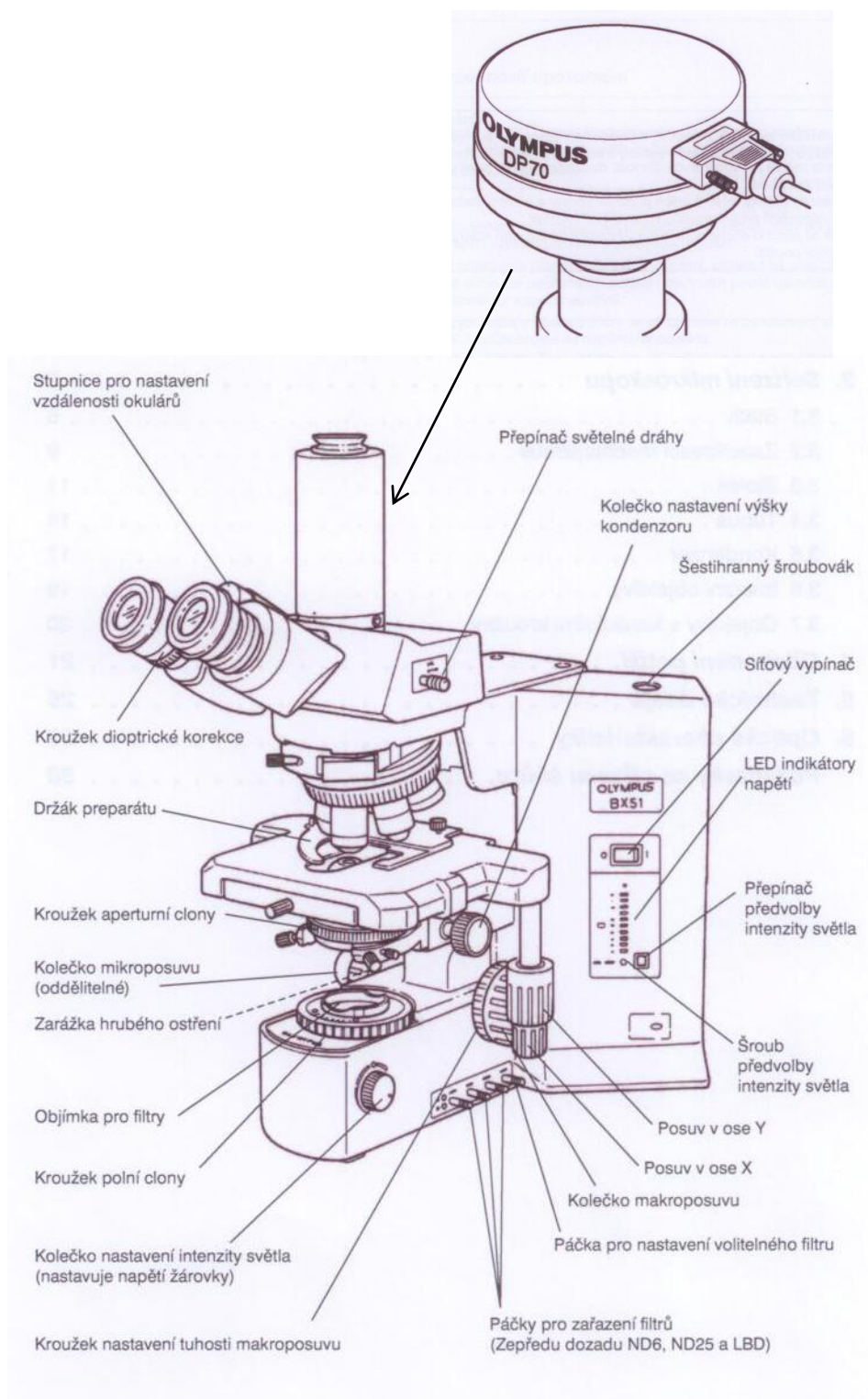


Obrázek 9: DSC cyklický teplotní program

3.3 Mikroskopická metoda

Pro sledování rychlosti růstu krystalů vody v 50 hm% roztoku sacharózy byl použit optický světelný mikroskop OLYMPUS BX51/BX52 opatřen digitální kamerou OLYMPUS DP70 s rozlišením 1280 x 1024 pixelů. Schéma mikroskopu s kamerou je i s popisem jednotlivých částí zobrazeno na obrázku 10.

Kalibrace mezi mikroskopem a snímacím zařízením byla provedena na každé zvětšení objektivu zvlášť a to pomocí objektivního mikrometru, tzv. kalibrační destičky. Ke kalibraci, snímání i vyhodnocení byl použit program QuickPHOTO Industrial 2.3, pomocí kterého byly vyhodnoceny i časosběrné snímky zaznamenané kamerou. Měření bylo prováděno při celkovém zvětšení 50x, 100x, 200x a 500x.



Obrázek 10: Schéma optického mikroskopu OLYMPUS BX51/BX52 s digitální kamerou OLYMPUS DP70

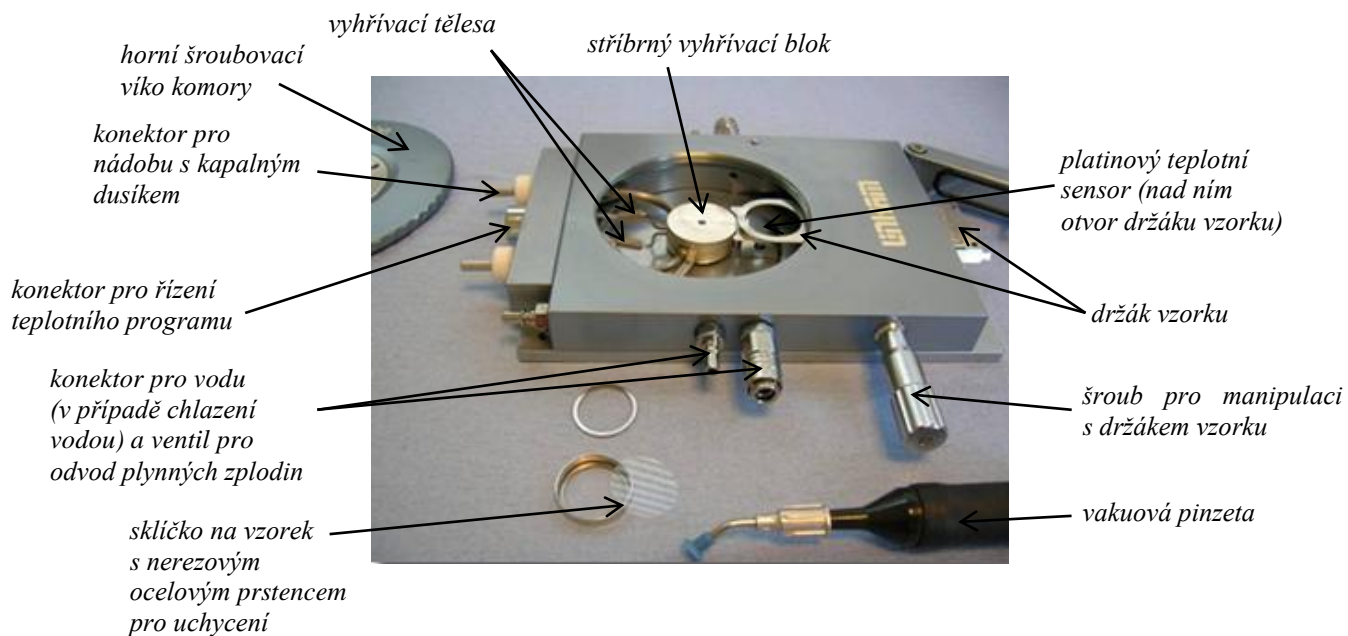
Místo posuvného stolku pro držení vzorku byl použit teplotně programovaný stolek Linkam THMS600/720, jehož součástí je i chladicí pumpa pro kapalný dusík LNP95 a systémový regulátor T95-LinkPad. Všechny tyto části jsou znázorněny na obrázku 11.



Obrázek 11: Vyhřívací a chladicí systém THMS600/720

Linkam THMS600/720 vyhřívací a chladicí systém má maximální rychlost ohřevu $150^{\circ}\text{C}/\text{min}$ s nejvyšší možnou dosažitelnou teplotou 600°C . Minimální rychlost ohřevu je $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Minimální teplota, které je umožněno systémem Linkam dosáhnout, je dána teplotou použitého chladicího média. Tím je v tomto případě kapalný dusík s teplotou varu -196°C .

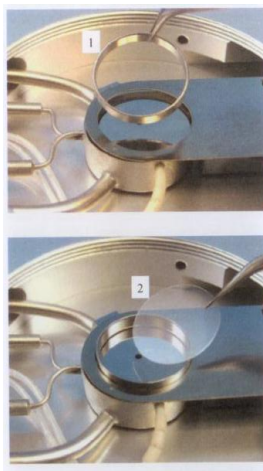
Vzorek na sklíčku je do temperační komory Linkam umístěn na stříbrný vyhřívací a chladicí blok s průměrem 22 mm. Jeho teplota je snímána platinovým teplotním senzorem. Komora Linkam s popisem částí je znázorněna na obrázku 12.



Obrázek 12: Temperační komora Linkam

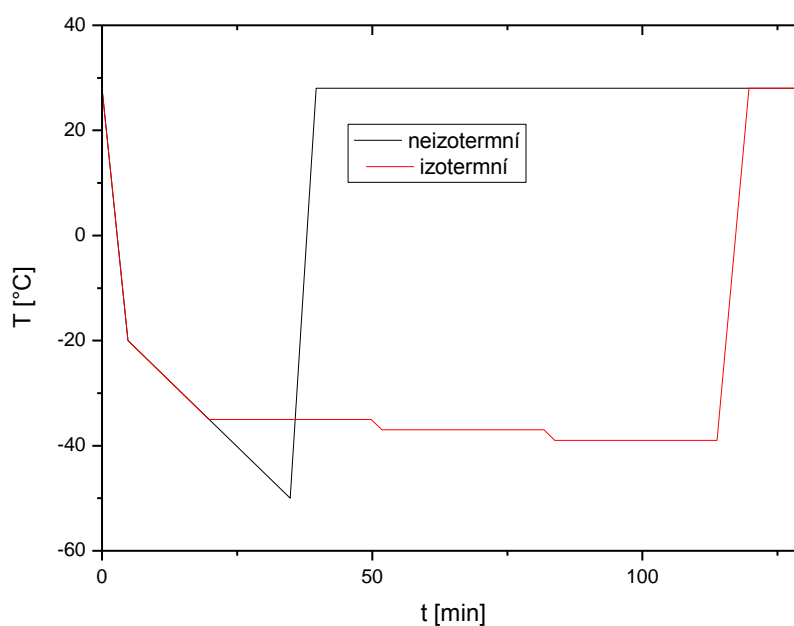
3.4 Postup měření

Umístění vzorku do temperační komory znázorňuje obrázek 13. Držák vzorku byl zasunut do komory a do jeho kruhového otvoru byl vložen nerezový ocelový prsteneček. Poté bylo vloženo sklíčko pro vzorek do prstence tak, že leželo na stříbrném vyhřívacím bloku. Na sklíčko bylo mikropipetou odpipetováno 5 μl z připraveného roztoku sacharózy. Vzniklá kapka vzorku byla od okolních vlivů odizolována přidáním vrchního krycího sklíčka na prsteneček a zašroubováním horního víka komory.



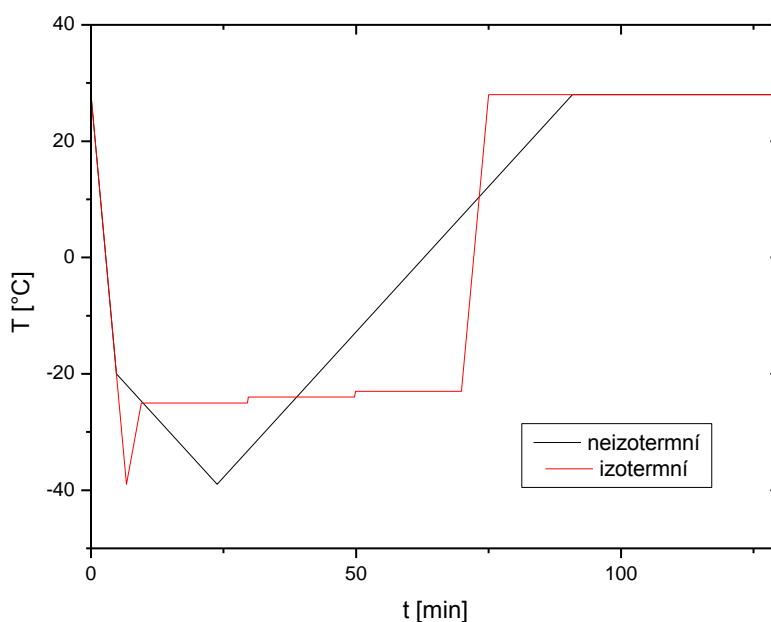
Obrázek 13: Umístění sklíčka pro vzorek do temperační komory

Takto připravený vzorek v temperační komoře byl poté vystaven zvolenému teplotnímu programu. Grafický průběh teplotního programu pro růst krystalů vody při chlazení je znázorněn na obrázku 14. Rychlost chlazení byla na začátku experimentu $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ až do dosažení teploty -20°C , kdy ještě ke krystalizaci nedocházelo. Poté byla rychlost chlazení zpomalena na $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. U neizotermního experimentu byl vzorek chlazen až na teplotu -50°C . Během chlazení byla kapka vzorku pozorována mikroskopicky s celkovým zvětšením 200x. Při zachycení prvního krystalku vody bylo zapnuto časosběrné snímání kamery a byla zaznamenána aktuální teplota. Snímky vznikajícího krystalu vody zachytávala kamera po 7 vteřinách až do zakrystalizování celé kapky. U izotermního experimentu bylo chlazení rychlostí $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ zastaveno na teplotě, kde byla očekávána nukleace a růst krystalů. Této teplotě byl vzorek vystaven po určitou dobu. Při zachycení prvního krystalu bylo opět spuštěno časosběrné snímání kamery. V případě, že během izotermie ke krystalizaci nedošlo, byla teplota systému snížena a izoterma opakována až do teploty krystalizace. Po úplném zakrystalizování vzorku byl proveden ohřev na počáteční teplotu 20°C .



Obrázek 14: Neizotermní a izotermní teplotní program při chlazení

Teplotní program pro růst krystalů vody při ohřevu je graficky znázorněn na obrázku 15. U neizotermního experimentu byl vzorek nejdříve ochlazen rychlostí $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ na -20°C , poté byla rychlost chlazení snížena na $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ na nejnižší možnou teplotu bez zakrystalizování, tj. na -40°C . Následně byl vzorek ohříván stejnou rychlostí. Jakmile byl spatřen první krystal vody, bylo spuštěno časoběrné snímání kamery a byla zaznamenána aktuální teplota. Snímky kamera zaznamenávala opět po 7 vteřinách až do zakrystalizování celého vzorku. U izotermního experimentu byl vzorek ochlazen rychlostí $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ opět na -40°C . Poté byl vzorek ohříván rychlostmi $0,5$ až $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ na teploty v rozmezí od -35°C do -20°C , při kterých byla očekávána krystalizace. Působení této teploty byl vzorek vystaven po určitou dobu. Při zachycení krystalu bylo opět spuštěno časoběrné snímání. Pokud k nukleaci a krystalizaci při dané izotermě nedošlo, byla teplota zvýšena o 1°C a postup opakován až do teploty krystalizace.



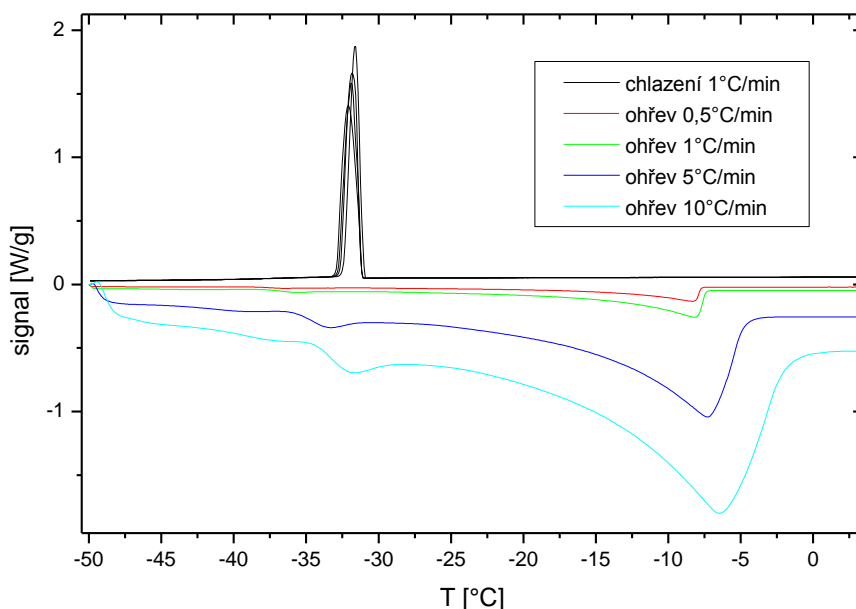
Obrázek 15: Neizotermní a izotermní teplotní program při ohřevu

Z neizotermního pozorování růstu krystalů při ohřevu i chlazení byla získána závislost velikosti krystalu na čase a tedy i rychlosti růstu na teplotě. Výsledkem izotermního experimentu byla časová závislost velikosti a rychlosti růstu krystalu při dané teplotě.

4 VÝSLEDKY

4.1 Studium krystalizace a tání roztoku sacharózy metodou DSC

Odpipetováním 10 μl z připraveného vodného roztoku sacharózy (50 hm%) do hliníkových DSC kelímků byly připraveny dva vzorky. U prvního vzorku byl sledován proces tání za působení různých rychlostí ohřevu. Odpovídající teplotní program byl popsán v kapitole 3.2. Záznam získaného DSC signálu, který odpovídá tepelnému toku celého procesu, je na obrázku 16. Získaná data jsou po odečtení nulové linie. Vyhodnocená maxima a minima píků jednotlivých měření spolu s hodnotou krystalizačního tepla jsou shrnuta v tabulce I.



Obrázek 16: DSC záznam krystalizace a tání vodného roztoku sacharózy (50 hm%)

Vzorek během chlazení rychlostí 1°C/min opakovaně zakrystalizoval v teplotním rozsahu -30°C až -34°C. Výrazné černě značené exotermní píky v této teplotní oblasti odpovídají uvolněnému krystalizačnímu teplu $\Delta H_{\text{krystalizace}}$, které bylo stanoveno vyhodnocením ploch píků na průměrnou hodnotu $-88,38 \pm 0,18$ kJ/mol. Úzké rozmezí teplot a úzký, pravidelný tvar píků poukazuje na rychlý exotermní děj.

Z tabulky I je patrné, že se teploty krystalizace pro všechny čtyři procesy chlazení shodují a dosahují průměrné hodnoty maxim při teplotě $-31,3^{\circ}\text{C}$. O zakrystalizování vzorku v celém objemu vypovídá pokles signálu na původní hodnotu.

Tabulka I

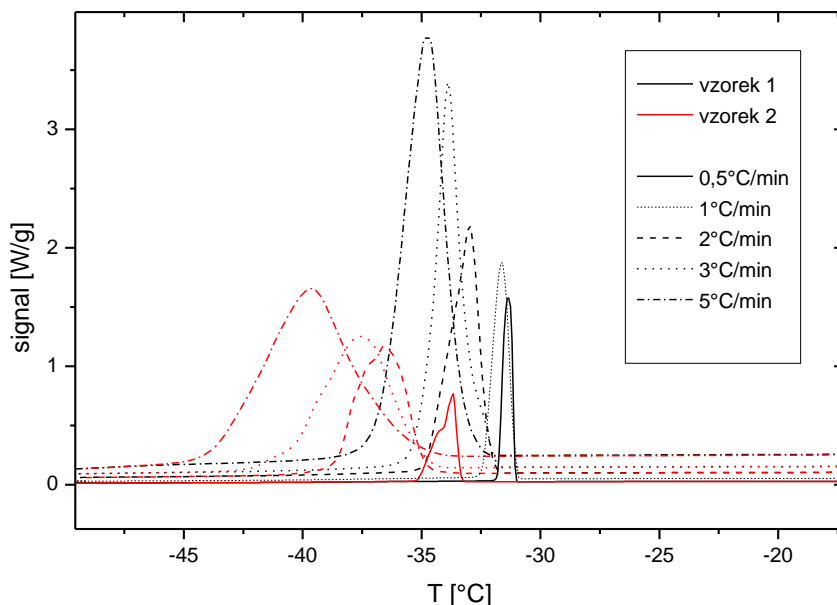
Tabulka teplot maxim a minim píků krystalizace a tání roztoku sacharózy (50 hm%)

<i>Krystalizace</i>		<i>Tání</i>			
<i>Rychlost chlazení</i>	$T_p \text{ max } [^{\circ}\text{C}]$	<i>Rychlost ohřevu</i> [$^{\circ}\text{C}/\text{min}$]	1. endo efekt	2. endo efekt	
1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$	-31,51		$T_p \text{ min } [^{\circ}\text{C}]$		
	-31,44		0,5	-36,43	-8,38
	-31,17		1	-35,56	-8,25
	-31,77		5	-33,41	-7,54
$\Delta H_{\text{krystalizace}}$ [kJ/mol]	$-88,38 \pm 0,18$	10	-31,83	-7,00	

Vzorek byl poté ohříván rychlostí $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ na laboratorní teplotu a následně byl cyklus zopakován s teplotou ohřevu 1, 5 a $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Během ohřevu byly pozorovány dva endotermní děje. První děj byl zaznamenán v oblasti od -28°C do -39°C . Hodnoty minim píků odpovídajícím této oblasti jsou shrnuty v tabulce I. Z tabulky i DSC signálu je patrný posun teploty endotermního efektu s rostoucí rychlostí ohřevu k vyšším hodnotám. Z DSC záznamu je také zřejmé, že signál se na původní hodnotu nevrátil, a tedy tento endotermní proces plynule přechází v děj druhý, kterému odpovídají endotermní píky v teplotní oblasti $-0,5^{\circ}\text{C}$ až -18°C . Jejich minima jsou taktéž shrnuta v tabulce I. Tento druhý děj byl proti prvnímu mnohem výraznější a docházelo k němu v širším teplotním rozmezí, probíhal tedy delší dobu. Stejně jako v předchozím případě, také u tohoto endotermního efektu docházelo ke zvýšení jeho teploty s rostoucí rychlostí ohřevu, jak je patrné z tabulky i DSC záznamu. V tomto případě však posun není tak výrazný, jako u prvního děje. Návrat signálu na původní hodnotu poukazuje na tání v celém objemu vzorku.

Druhým teplotním programem, který byl popsán v kapitole 3.2, byl u obou vzorků sledován proces krystalizace za působení různých rychlostí chlazení. Záznam získaných DSC signálů je na obrázku 17. Vyhodnocená maxima píků spolu s $\Delta H_{\text{krystalizace}}$ obou vzorků jsou shrnuta v tabulce II. Krystalizace prvního vzorku byla sledována v tentýž den,

kdy byl roztok sacharózy připraven. Exotermní, černě značené píky v rozsahu teplot od -30°C do -40°C odpovídají uvolněnému krystalizačnímu teplu $\Delta H_{\text{krystalizace}}$, které bylo stanoveno vyhodnocením plochy píků na hodnotu $-88,95 \pm 0,85 \text{ kJ/mol}$. Z tabulky i z DSC záznamu je zřetelný posun teplotních maxim píků s rostoucí rychlostí chlazení k nižším hodnotám. Proces krystalizace probíhal v celém objemu vzorku, o čemž vypovídá pokles signálu na původní hodnotu.



Obrázek 17: DSC záznam krystalizace vzorku 1 a vzorku 2 připravených z vodného roztoku sacharózy (50 hm%)

Tabulka II

Tabulka teplot maxim píků krystalizace roztoku sacharózy (50 hm%)

Krystalizace		
Rychlost chlazení [°C/min]	vzorek 1	vzorek 2
	$T_p \text{ max}$ [°C]	
0,5	-31,33	-33,67
1	-31,58	-
2	-33,00	-36,53
3	-33,90	-37,60
5	-34,75	-39,67
$\Delta H_{\text{krystalizace}}$ [kJ/mol]	$-88,95 \pm 0,85$	$-79,75 \pm 0,75$

Vzorek 2 byl metodou DSC proměřován až následující den od přípravy roztoku sacharózy. Krystalizace probíhala v teplotní oblasti -32°C až -47°C a odpovídají jí červeně značené exotermní píky, z jejichž plochy bylo určeno krystalizační teplo $\Delta H_{\text{krystalizace}}$ na hodnotu $-79,75 \pm 0,75 \text{ kJ/mol}$. Tvar i poloha červených píků se značně liší od krystalizačních píků vzorku 1. Jsou posunuty do nižších teplot, kde krystalizace probíhá pomaleji, a jejich tvar svědčí o minimálně dvou souběžně probíhajících dějích. Tato změna chování je přisuzována 24 hodinové prodlevě mezi přípravou vzorku a jeho měřením. Teplotní maxima píků druhého vzorku také vykazují s rostoucí rychlostí chlazení větší posun k nižším hodnotám, než byl zaznamenán u krystalizačního procesu prvního vzorku.

4.2 Mikroskopické studium rychlosti růstu krystalů vody

Přímé sledování krystalizačního procesu v podchlazeném roztoku sacharózy (50 hm%) bylo provedeno metodou optické mikroskopie. Snímky rostoucích krystalů vody byly zaznamenávány mikroskopickou kamerou v určité časové frekvenci při aktuální teplotě. Získané fotografie byly vyhodnoceny určením tvaru, počtu, teploty a velikosti pozorovaných krystalů v daném čase. Podle tvaru krystalu byla měřena buď jeho délka, nebo jeho průměr. Výsledkem bylo určení růstové rychlosti krystalu vody, případně závislost této rychlosti na teplotě.

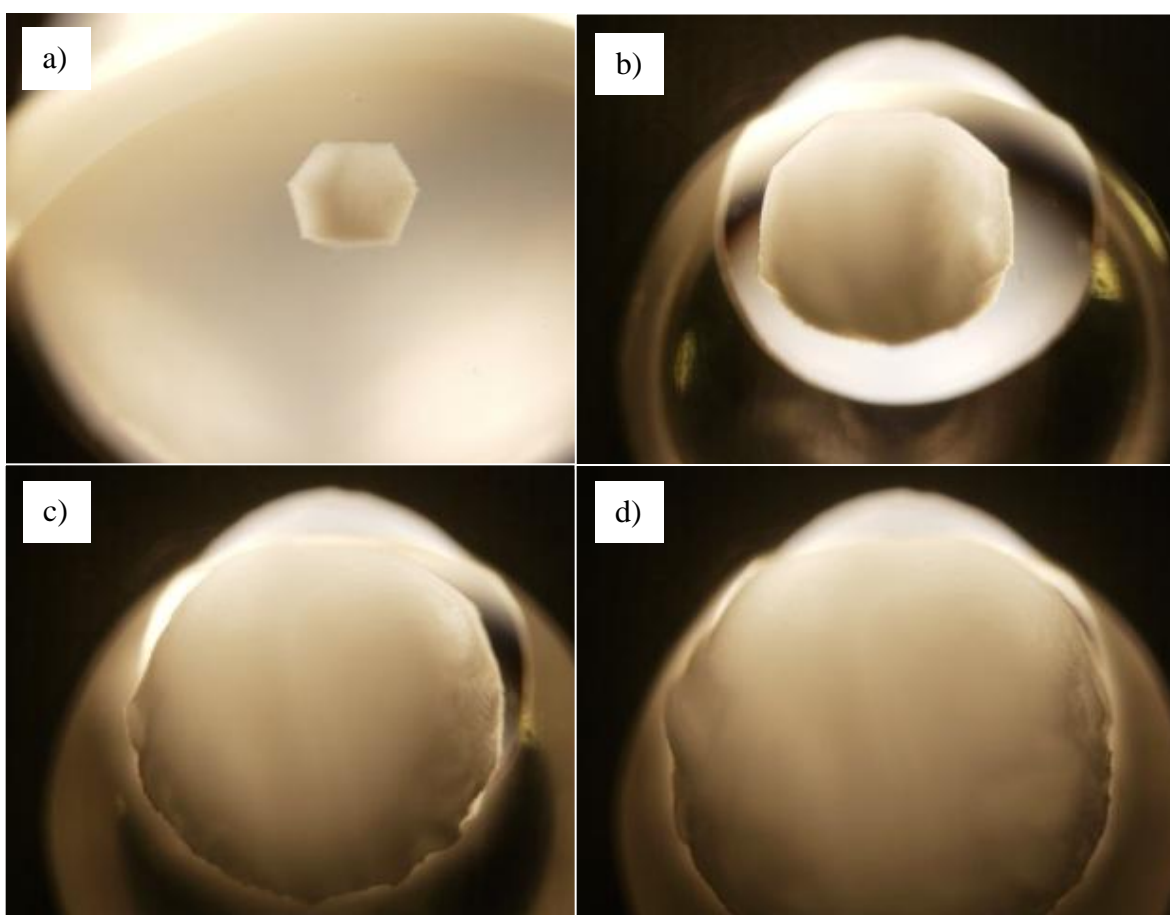
Fotografie krystalů uvedené v této práci neobsahují měřítko, protože snímky byly pořízené při různém zvětšení mikroskopu a následně byly upraveny digitálním zvětšením pro lepší zobrazení krystalů v této práci. Měřítka pro takto změněné fotografie by tedy nebylo jednotné a dobře patrné

4.2.1 Neizotermní růst

Rychlost růstu krystalů vody byla studována za neizotermních podmínek při chlazení i při ohřevu podchlazeného roztoku sacharózy. Teplotní programy pro chlazení i ohřev systému byly popsány v kapitole 3.4.

4.2.1.1 Režim chlazení

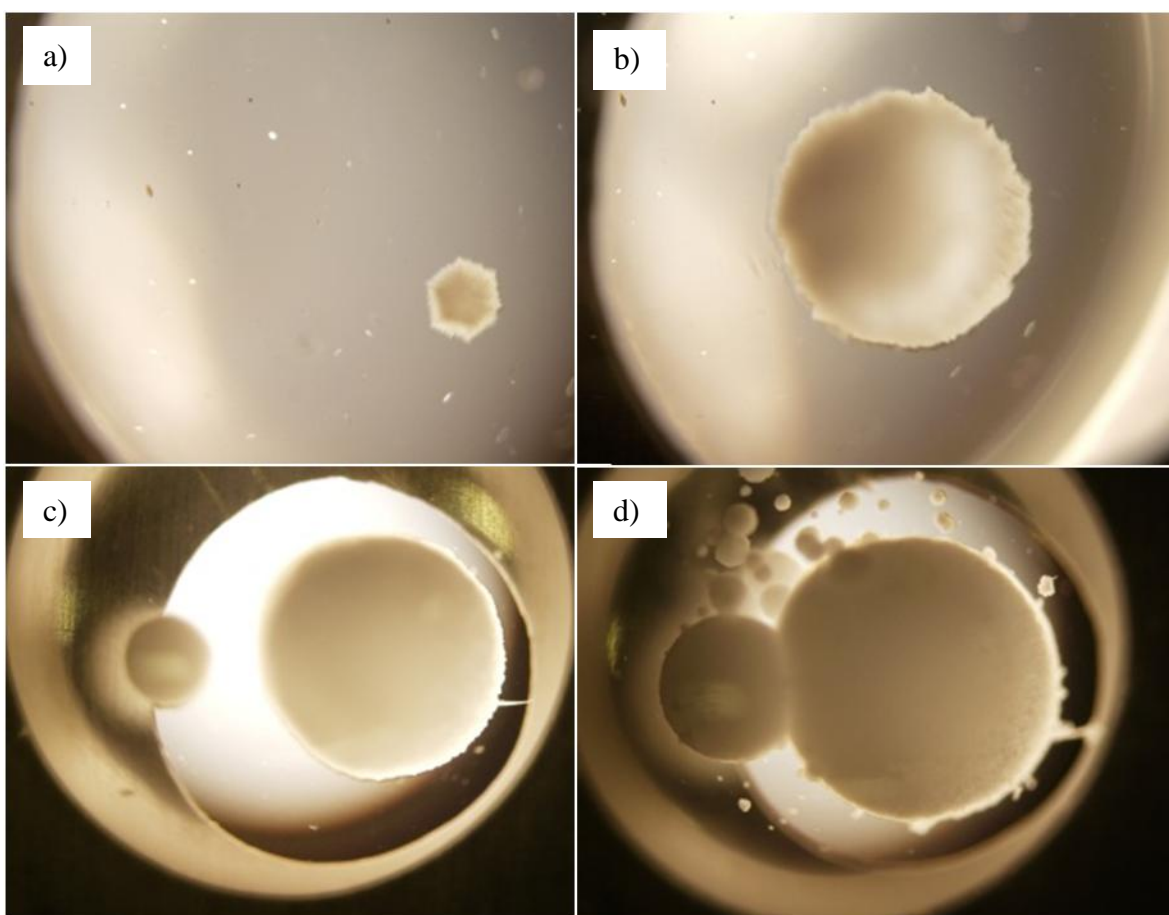
Při režimu chlazení rostly krystaly v teplotním rozmezí od -24°C do -45°C . Hexagonální růst krystalů vody byl pozorován ve dvou případech. V prvním případě byl růst krystalu zachycen při teplotě $-24,1^{\circ}\text{C}$, při níž byl pořízen první snímek na obrázku 18. Jak je vidět z druhého snímku, hexagonální tvar je zde ještě trochu zachován, nicméně postupným poklesem teploty a dalším růstem přechází krystal na sférický tvar. Jeho kompaktní, ačkoli nepravidelné okraje poukazují na jeho hustou strukturu. Tento jediný krystal v konečné fázi proroste celou kapkou vzorku, jak lze vidět ze čtvrtého snímku stejného obrázku. Růst jiných krystalů zde nebyl vůbec zaznamenán.



Obrázek 18: Neizotermní hexagonální růst krystalu vody ve vodném roztoku sacharózy (50 hm%) s počáteční teplotou růstu $-24,1^{\circ}\text{C}$ v režimu chlazení

Velikosti krystalu: a) $399\ \mu\text{m}$ (0 s), b) $1603\ \mu\text{m}$ (72 s), c) $2269\ \mu\text{m}$ (128 s), d) $2723\ \mu\text{m}$ (184 s).

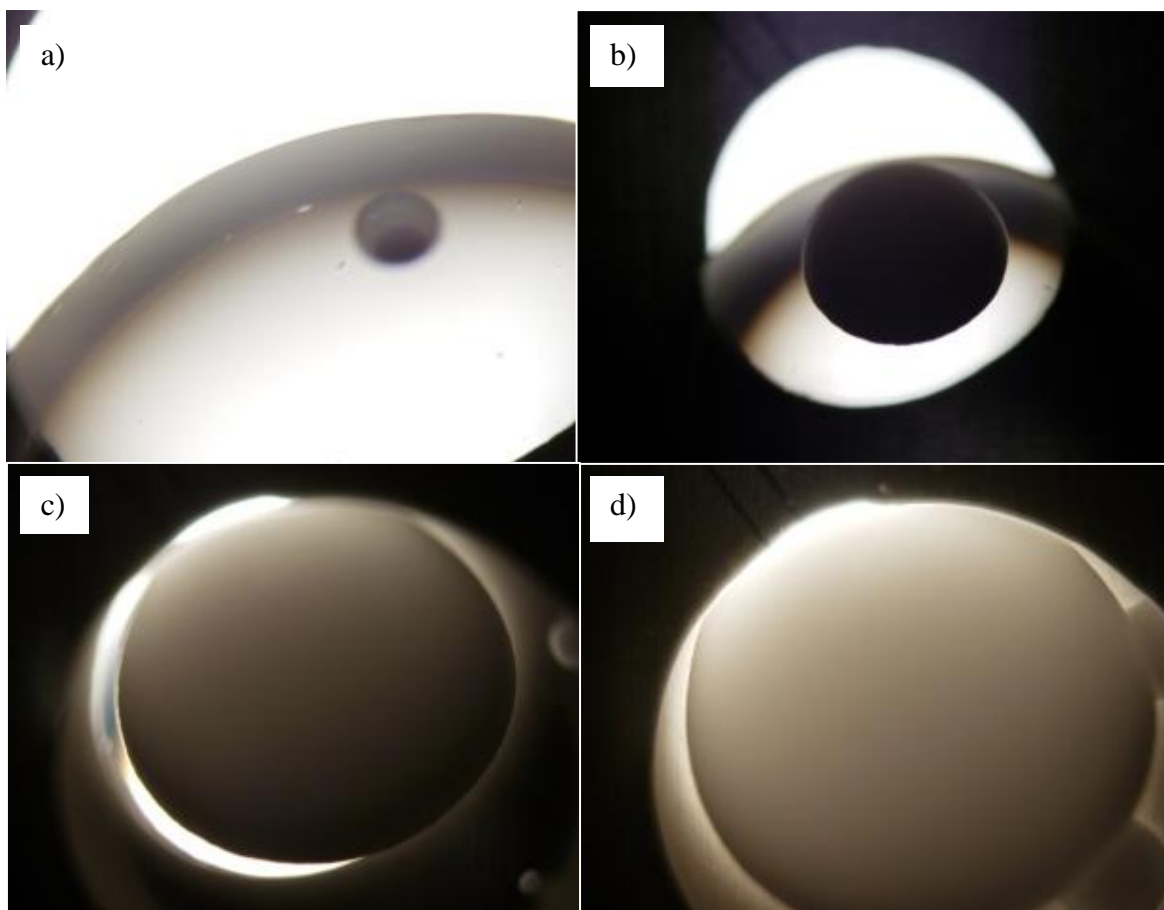
Ve druhém případě hexagonálního růstu byla první teplota zachycení krystalu $-30,8^{\circ}\text{C}$. Při této teplotě byl pořízen první snímek na obrázku 19. Další pokles teploty měl opět za následek přerůstání krystalu do sférického tvaru s nepravidelnými, roztřepenými okraji vypovídajícími o jeho rozvolněnější strukturu. Zároveň byl při teplotě $-35,8^{\circ}\text{C}$ zpozorován další krystal, který je zachycen na třetí fotografii až po 328 sekundách od svého vzniku. Na stejném snímku je vidět pravidelný okraj obou krystalů. Při teplotě $-42,5^{\circ}\text{C}$ byla zaznamenána mnohočetná nukleace a následný růst těchto nově vzniklých krystalů v sousedství původních, jak je názorné z posledního snímku tohoto obrázku.



Obrázek 19: Neizotermní hexagonální růst krystalů vody ve vodném roztoku sacharózy (50 hm%) s počáteční teplotou růstu $-30,8^{\circ}\text{C}$ v režimu chlazení

Velikosti krystalu: a) $254\ \mu\text{m}$ (0 s), b) $344\ \mu\text{m}$ (184 s), c) $1517\ \mu\text{m}$ (632 s), d) $1788\ \mu\text{m}$ (1064 s).

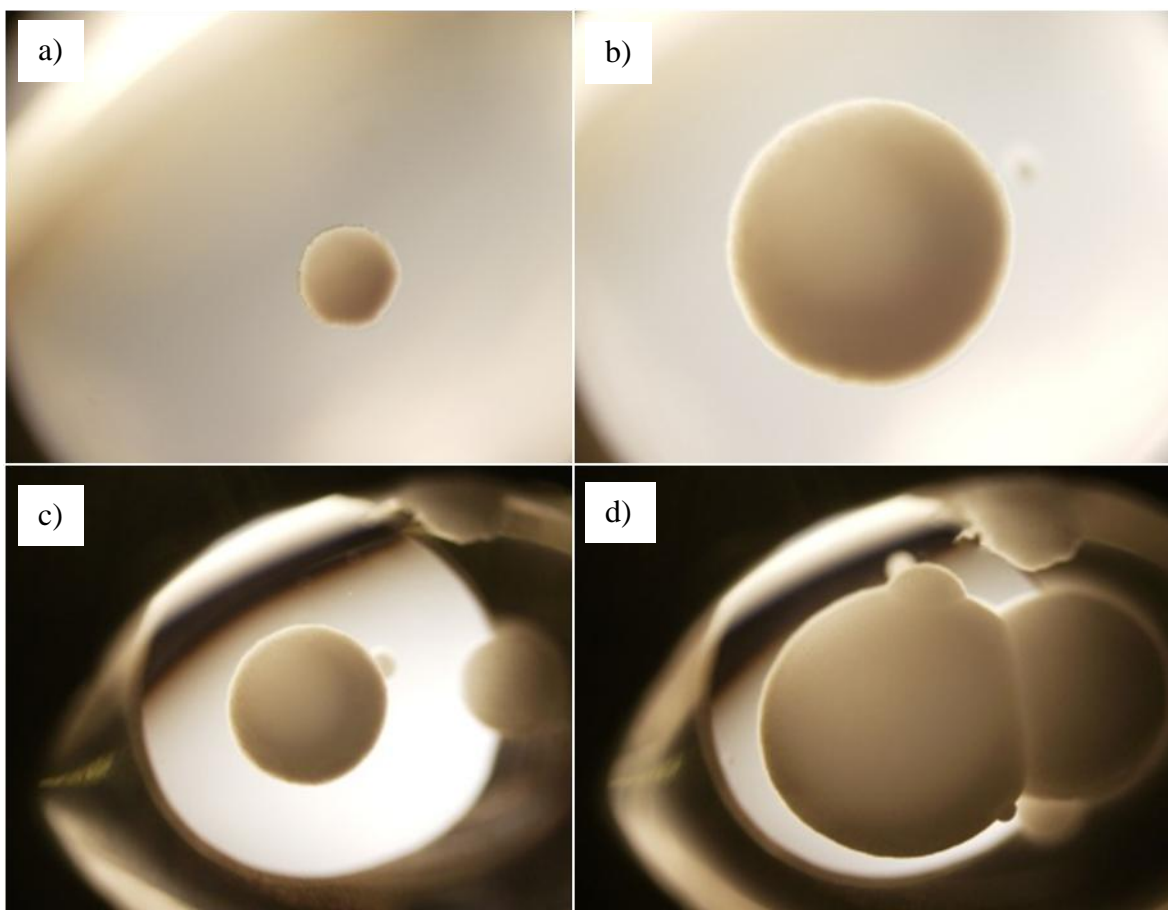
Druhým typem počátečního tvaru krystalů vody je sférický tvar. Tato morfologie je typická a v konečné fázi byla pozorována u všech typů experimentů. Obrázek 20 zachycuje růst krystalů od kraje kapky při teplotě -33°C . Krystal má pravidelné kompaktní okraje a až když je poměrně velký, při teplotě $-36,8^{\circ}\text{C}$, dochází k růstu dalších dvou krystalků. V konečné fázi se všechny tři spojují a prorůstají celým vzorkem.



Obrázek 20: Neizotermní růst sférických krystalů vody ve vodném roztoku sacharózy (50 hm%) s počáteční teplotou růstu -33°C v režimu chlazení

Velikosti krystalu: a) $257\ \mu\text{m}$ (0 s), b) $1139\ \mu\text{m}$ (90 s), c) $2358\ \mu\text{m}$ (240 s), d) $2786\ \mu\text{m}$ (340 s).

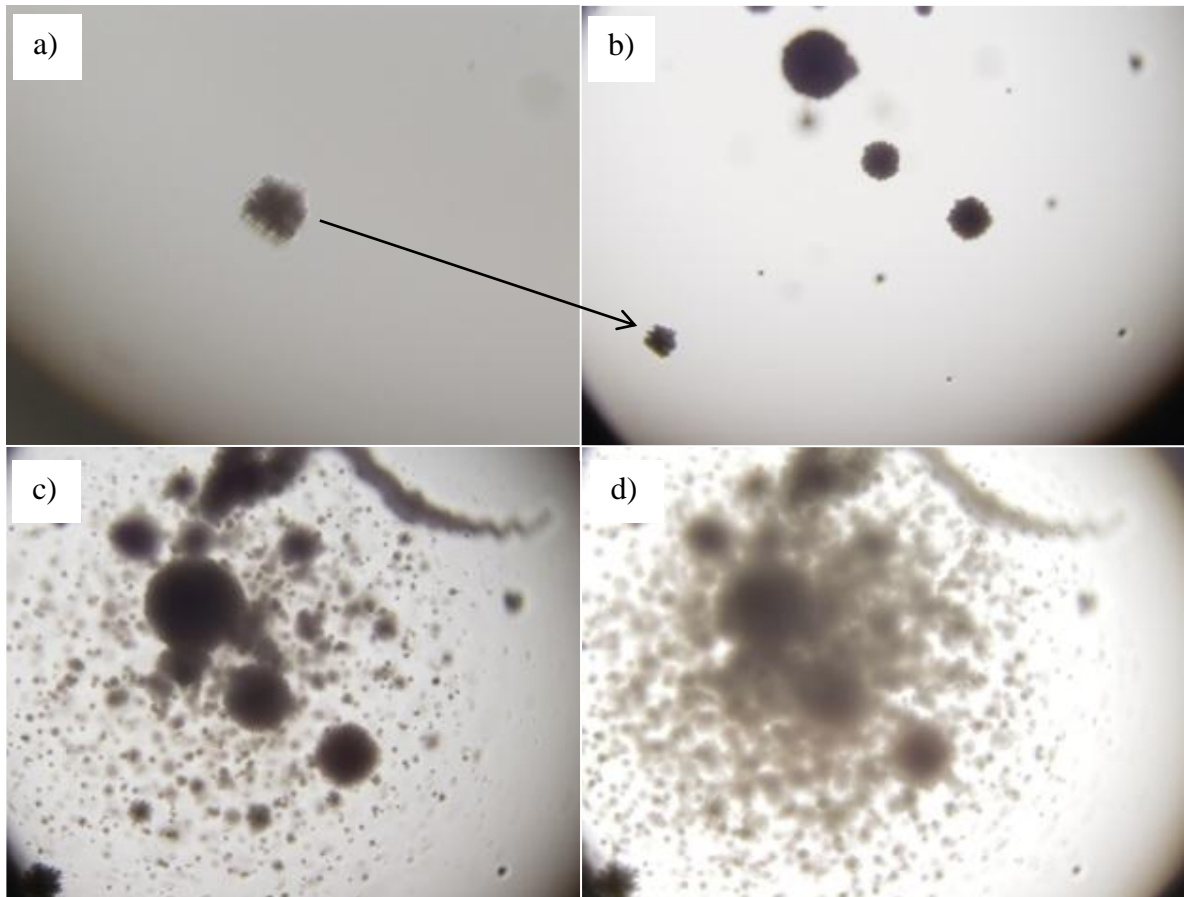
Na obrázku 21 jsou snímky zaznamenávající krystalický růst při počáteční teplotě růstu $-34,4^{\circ}\text{C}$. Tento krystal s pravidelnými okraji a kompaktní strukturou roste daleko od kraje kapky v objemu vzorku. Při teplotě -36°C je pozorován růst dalšího krystalu a od $-36,8^{\circ}\text{C}$ dochází k mnohačetnému růstu v celém objemu.



Obrázek 21: Neizotermní růst sférických krystalů vody ve vodném roztoku sacharózy (50 hm%) s počáteční teplotou růstu $-34,4^{\circ}\text{C}$ v režimu chlazení

Velikosti krystalu: a) $229\ \mu\text{m}$ (0 s), b) $868\ \mu\text{m}$ (92 s), c) $1002\ \mu\text{m}$ (114 s), d) $1803\ \mu\text{m}$ (301 s).

Snímky na obrázku 22 se od předcházejících typů mírně liší. První fotografie pořízená při $-44,6^{\circ}\text{C}$ zachycuje nepravidelný sférický krystal připomínající vločku s nekompaktními okraji. Ty odpovídají zřetelně viditelné rozvolněné krystalické struktuře. Při dalším poklesu teploty dochází k nukleaci a růstu mnoha malých krystalků v celém objemu vzorku, jak je zachyceno na dalších snímcích. Na nich je zaznamenáno také prorůstání krystalů jedním směrem do objemu kapky za vzniku struktur podobných šlahounům.

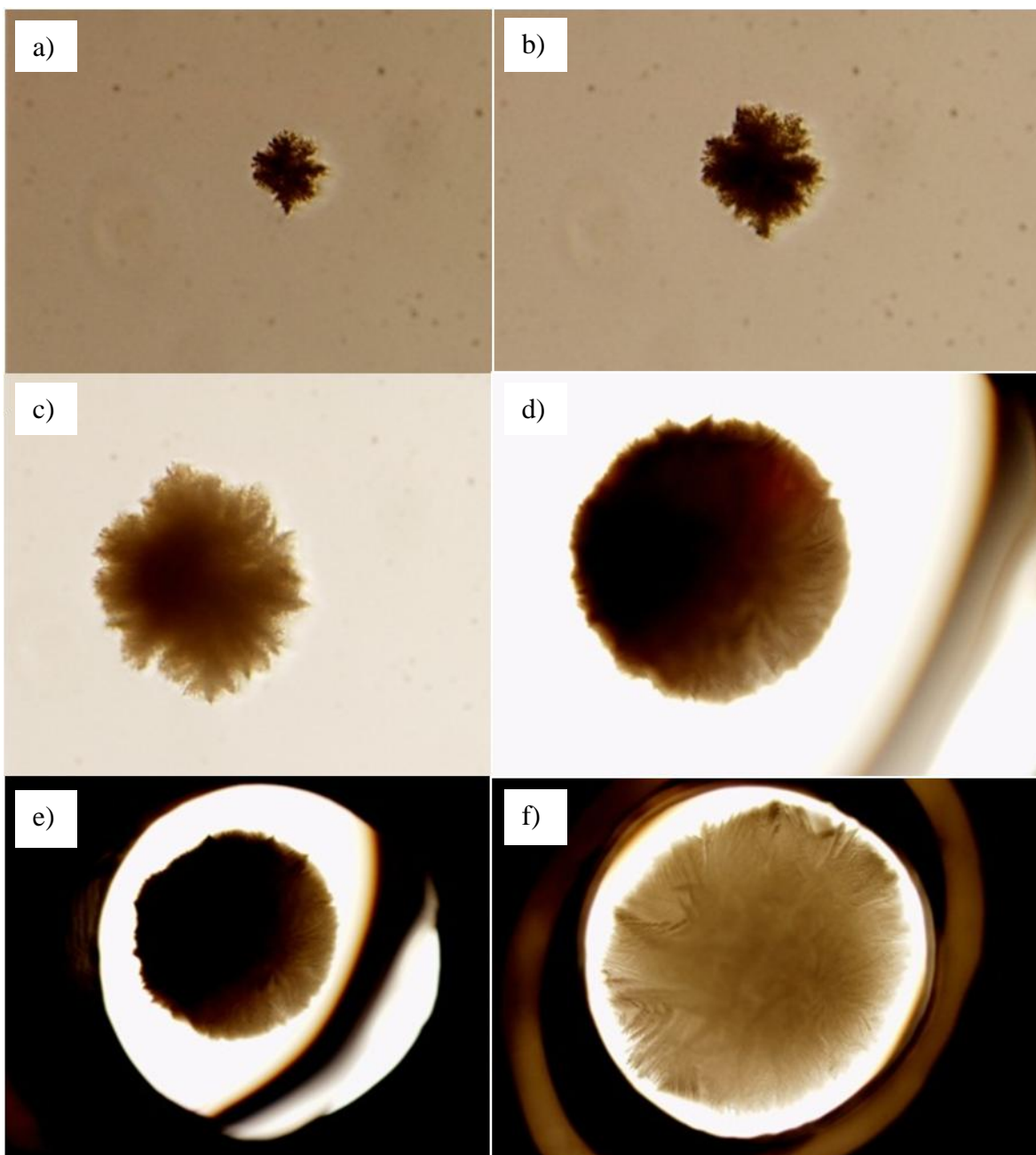


Obrázek 22: Neizotermní růst sférických krystalů vody ve vodném roztoku sacharózy (50 hm%) s počáteční teplotou růstu $-44,6^{\circ}\text{C}$ v režimu chlazení

Velikosti krystalu: a) $214\ \mu\text{m}$ (0 s), b) $226\ \mu\text{m}$ (68 s), c), d) nevyhodnoceno (938 s a 1548 s).

4.2.1.2 Režim ohřevu

Při neizotermních experimentech v režimu ohřevu byl počátek krystalizace pozorován v teplotním rozmezí od -33°C do -42°C . Ve všech případech byl zaznamenán růst jen jediného krystalu, který prorostl celým vzorkem a který měl morfologii podobnou sférickému krystalu na obrázku 21 s více či méně pravidelnými okraji. Pouze v jednom případě, který je zachycen na obrázku 23, byl počáteční krystalický tvar mírně odlišný. Na prvním snímku je zachycen růst krystalu při teplotě $-41,3^{\circ}\text{C}$. Jedná se o velmi malý krystal, který byl zpočátku pozorován pod velkým zvětšením. Jeho tvar neodpovídá sférickému ani hexagonálnímu tvaru, o kterých byla zmínka v předchozí kapitole. Tento krystal svojí morfologií připomíná spíše sněhovou vločku, od které se však liší třídídimenzionálním růstem.



Obrázek 23: Neizotermní růst krystalu vody ve vodném roztoku sacharózy (50 hm%) s počáteční teplotou růstu $-42,1^{\circ}\text{C}$ v režimu ohřevu

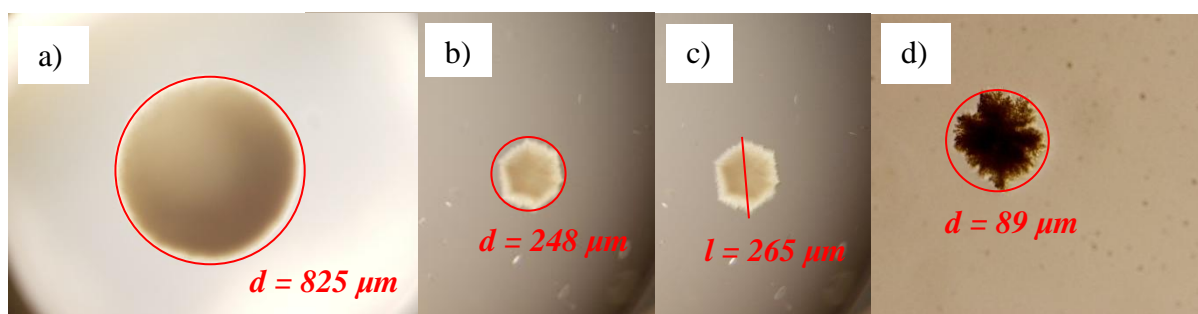
Velikosti krystalu: a) $55\ \mu\text{m}$ (48 s), b) $89\ \mu\text{m}$ (112 s), c) $161\ \mu\text{m}$ (216 s), d) $945\ \mu\text{m}$ (712 s), e) $1398\ \mu\text{m}$ (872 s), f) $2203\ \mu\text{m}$ (1240 s).

Sněhová vločka roste planárně, tzn. v jedné rovině, zatímco zachycený krystal roste ve třech rozměrech, o čemž svědčí jeho tmavá místa patrná na první a druhé fotografii obrázku 23. Postupným zvyšováním teploty a následným růstem se mění tvar krystalu na

sférický s nepravidelnými okraji a menší hustotou. O méně husté krystalické struktuře vypovídá i poslední snímek na tomto obrázku. Na něm je detailněji pozorovatelná rozdílná dendritická struktura krystalu, která se v předcházejících případech vůbec nevyskytovala. Tento jev byl pozorován u izotermních i neizotermních experimentů v režimu ohřevu.

4.2.1.3 Vyhodnocení rychlosti neizotermního růstu

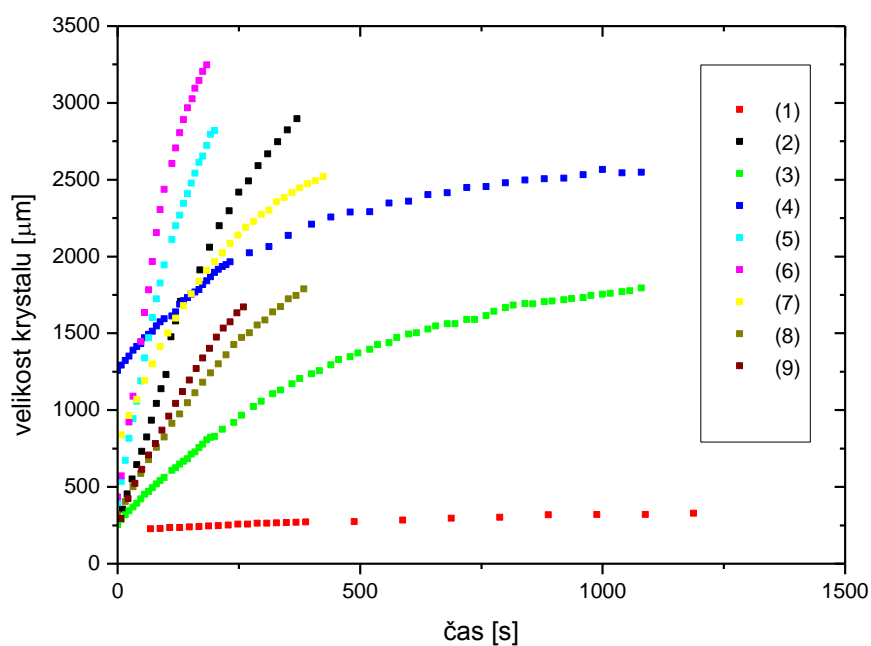
Časosběrné snímky rostoucích krystalů z jednotlivých experimentů byly vyhodnoceny v programu QuickPHOTO Industrial 2.3, který umožňuje měření v obraze a vkládání kalibrovaného měřítka. Pomocí tohoto programu byl měřen průměr krystalu určením jeho obvodové kružnice nebo délka krystalu ve směru jeho nejvýraznějšího růstu, jak je znázorněno na obrázku 24.



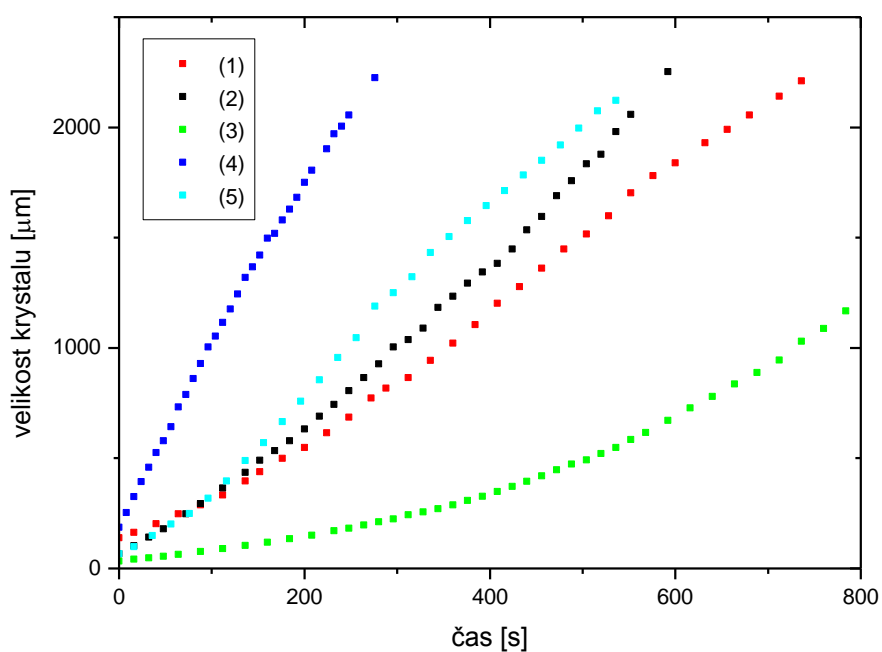
Obrázek 24: Vyhodnocení průměru a délky krystalů

- a) vyhodnocení průměru sférického krystalu
- b) vyhodnocení průměru obvodové kružnice krystalu hexagonálního tvaru
- c) vyhodnocení délky hexagonálního krystalu ve směru jeho největšího růstu
- d) vyhodnocení průměru obvodové kružnice krystalu vločkového tvaru

Na druhém a třetím snímku je tentýž krystal vyhodnocený metodou obvodové kružnice a metodou určení délky jeho vrcholů. V tomto případě je považován za konečnou velikost krystalu průměr těchto dvou měření. Důvodem je další růst krystalu a změna jeho hexagonálního tvaru na sférický tvar, u něhož je poté vyhodnocován pouze průměr, nikoli délka. Výsledkem vyhodnocení je závislost velikosti krystalu na čase a její grafický průběh pro jednotlivá měření v režimu chlazení i ohřevu je znázorněn na obrázcích 25 a 26. Čísla v legendě grafů odpovídají jednotlivým experimentům.



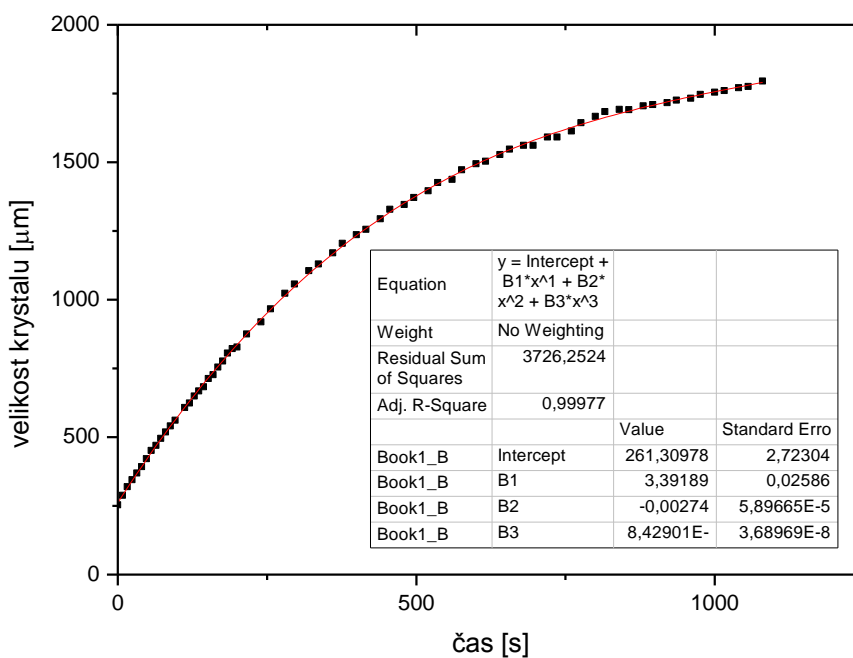
Obrázek 25: Grafická závislost velikosti krystalu ve vodném roztoku sacharózy (50 hm %) na čase pro neizotermní měření v režimu chlazení



Obrázek 26: Grafická závislost velikosti krystalu ve vodném roztoku sacharózy (50 hm %) na čase pro neizotermní měření v režimu ohřevu

Data z obou typů měření vykazují počáteční lineární závislost, později však dochází k odchylkám od linearity. V grafu na obrázku 25 je patrný konkávní průběh funkcí, což je v souladu s předpokládaným poklesem rychlosti růstu v důsledku klesající teploty. Data získána v režimu ohřevu na obrázku 26 vykazují jisté rozdíly ve svém průběhu. V případě měření 2 a 3 má závislost konvexní průběh v souladu s očekáváním zvýšení rychlosti růstu s teplotou. U měření 4 a 5 je průběh funkcí konkávní a růstová rychlost, na rozdíl od očekávání, klesá v důsledku velkého rozměru krystalu a nedostatku stavebního materiálu pro krystalizaci. Data z experimentu 1 vykazují lineární průběh.

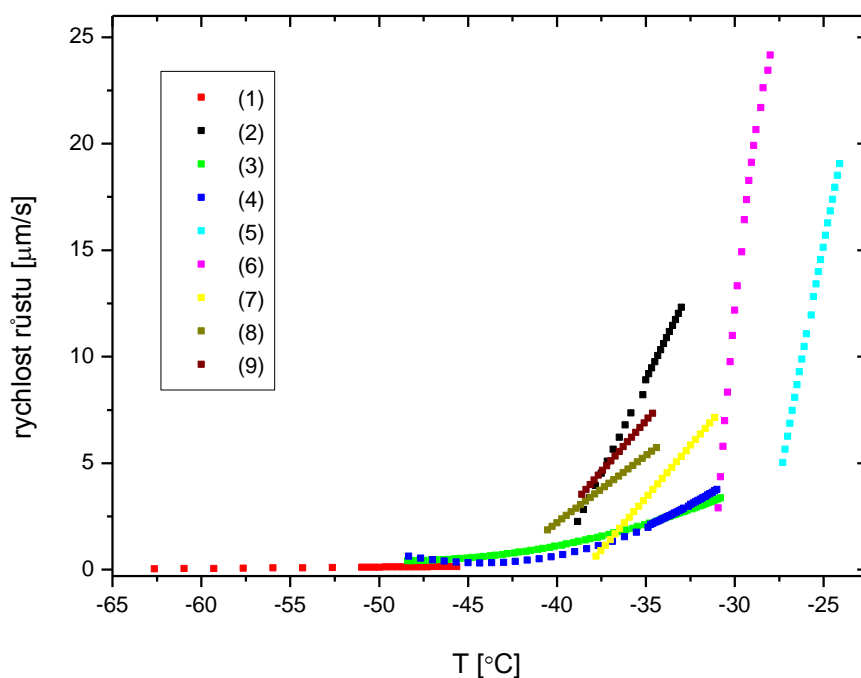
Pro určení rychlosti růstu bylo potřeba vzhledem k nelineárnímu růstu zvolit typ nelineární regrese. Nejvhodnější se zdála regrese polynomická 2. nebo 3. stupně (obr. 27), jejíž derivací byla získána růstová rychlost krystalu v jednotlivých časech. Numerická derivace z experimentálních dat nebyla pro vyhodnocení vhodná z důvodu velké chyby dat.



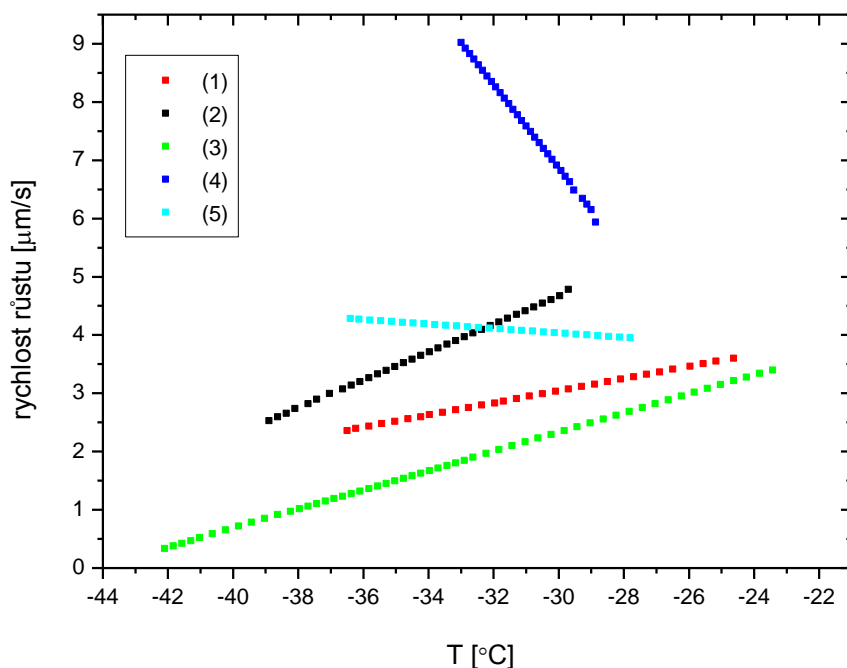
Obrázek 27: Polynomická regrese časové závislosti velikosti krystalu (experiment 3)

Výsledkem všech neizotermních měření je tedy závislost rychlosti růstu na čase a tím i na teplotě. V grafu na obrázku 28 je znázorněna teplotní závislost růstové rychlosti pro experimenty v režimu chlazení. V případě všech experimentů dochází podle očekávání k poklesu rychlosti růstu s poklesem teploty. Nejsme však schopni exaktně říct, zda má na klesající rychlost vliv kromě teploty také velikost krystalu či další faktory. Pod teplotou -40°C je rychlost růstu krystalů malá, mění se velice pomalu a všechny experimenty vedou k podobným výsledkům. V teplotní oblasti kolem -30°C je rozdíl mezi experimenty mnohem výraznější. Růstová rychlost je při těchto teplotách vysoká, mění se velmi prudce a klesá až k té nejnižší hodnotě.

Graf na obrázku 29 znázorňuje průběh růstové rychlosti v závislosti na teplotě pro jednotlivá měření v režimu ohřevu. U experimentů 1, 2 a 3 s nízkou počáteční rychlostí růstu dochází podle očekávání s nárůstem teploty k jejímu zvýšení. Experimenty 4 a 5 vykazují opačný trend teplotní závislosti růstové rychlosti. To může být ovlivněno vysokou počáteční rychlostí růstu, nebo dalšími faktory, jakými jsou velikost krystalů či nedostatek stavebního materiálu k dalšímu růstu.



Obrázek 28: Závislost rychlosti růstu na teplotě pro vodný roztok sacharózy (50 hm%) v režimu chlazení

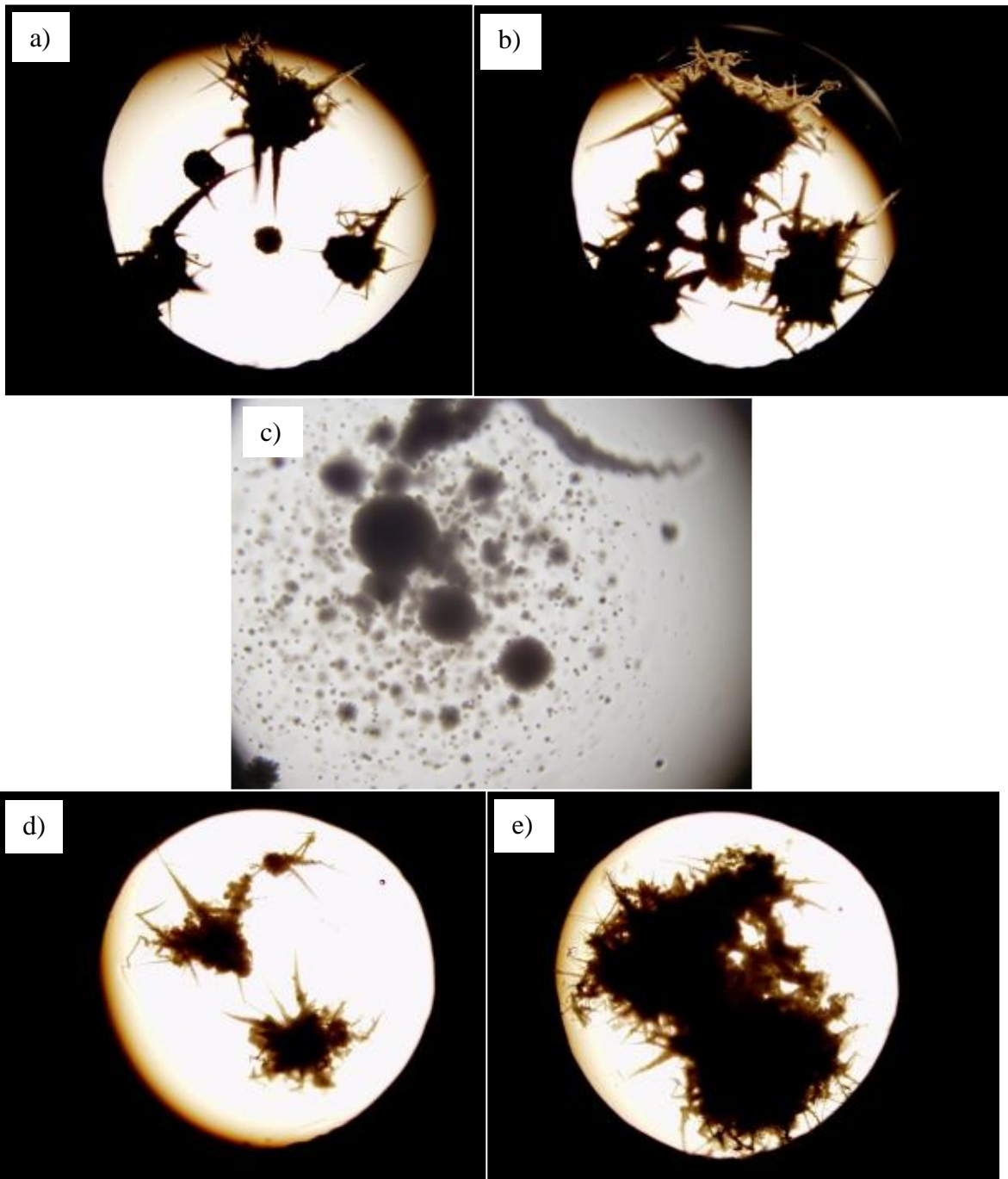


Obrázek 29: Závislost rychlosti růstu na teplotě pro vodný roztok sacharózy (50 hm%) v režimu ohřevu

4.2.2 Izotermní růst

Izotermní rychlost růstu krystalů vody byla studována při chlazení i při ohřevu podchlazeného roztoku sacharózy. Odpovídající teplotní program byl popsán v kapitole 3.4.

Při izotermních experimentech v režimu chlazení byl počátek krystalizace vody zaznamenán v rozmezí teplot od -30°C do -45°C . Hexagonální tvar krystalu nebyl u tohoto typu měření pozorován. Pro všechny případy byl růst sférických krystalů i jejich počet odpovídající těm, které jsou popsány v kapitole 4.2.1.1. (obr. 20 a 21). Pouze u krystalizace při teplotách nižších než -44°C byl pozorován rozdíl proti neizotermním experimentům v počtu krystalů i jejich konečném tvaru. Tento rozdíl je patrný ze snímků na obrázku 30.



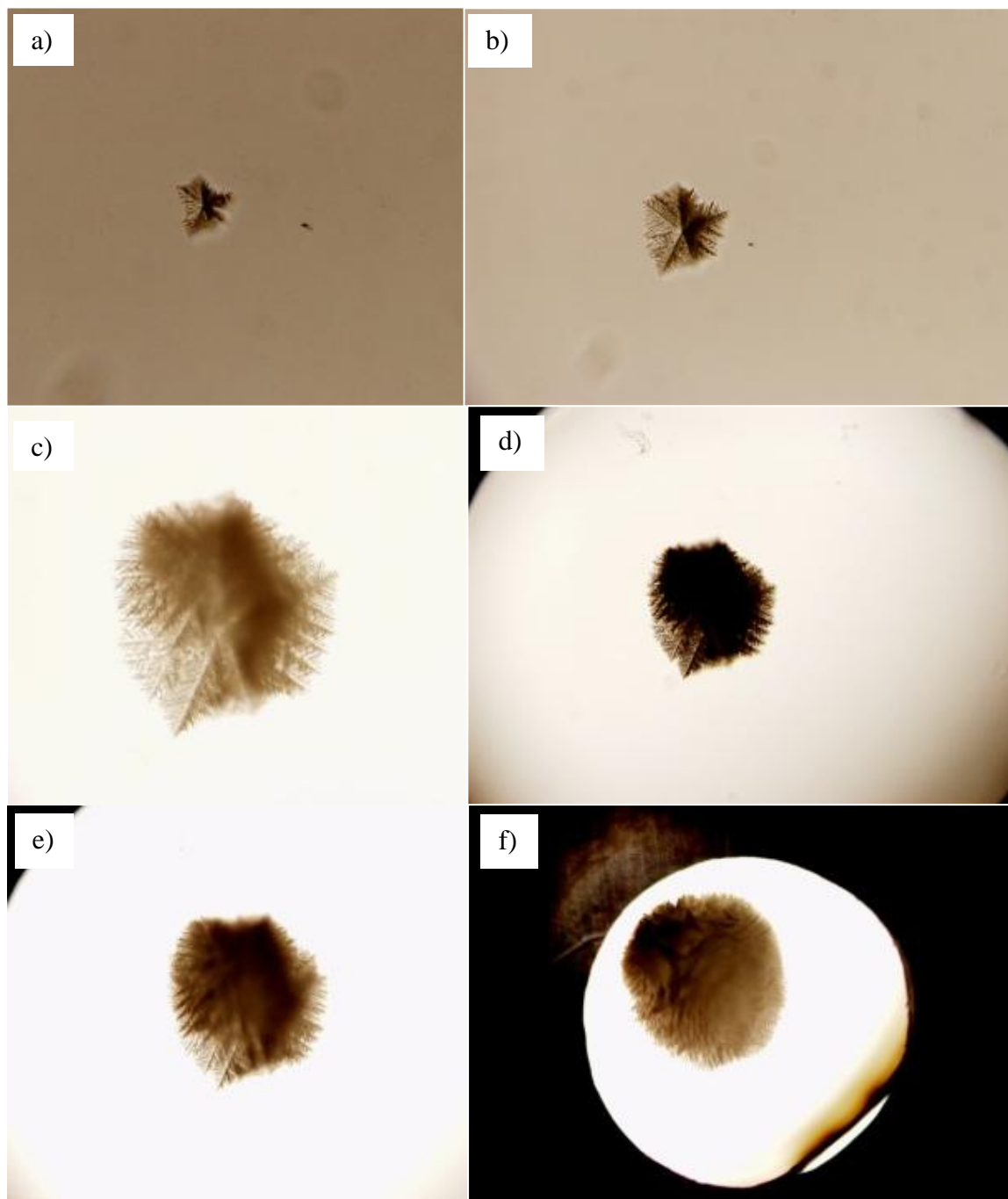
Obrázek 30: Růst krystalů vody ve vodném roztoku sacharózy (50 hm%) za nízkých teplot v režimu chlazení

*a), b) izotermně při -44°C
 c) neizotermně při počáteční teplotě $-44,6^{\circ}\text{C}$ (snímek pro srovnání)
 d), e) izotermně při -45°C*

Počáteční tvar krystalů na uvedených snímcích byl sférický vločkovitý tvar, podobný krystalu na obrázku 22a), s velmi nepravidelnými roztřepenými okraji a menší hustotou krystalické struktury. S délkou setrvání vzorku v izotermě při těchto velmi nízkých teplotách docházelo k mnohačetnému růstu dalších krystalků vody, jak je vidět z obrázku 30. Krystaly se zahušťovaly a přerůstaly do sférického tvaru s výrůstky připomínajícími šlahouny. Postupným růstem docházelo ke spojování šlahounů, jak je zachyceno na obrázku 30b) a 30e). To vedlo k velmi pozvolnému prorůstání celého vzorku krystalickou fází. Tento charakteristický výskyt výrůstků a jejich prorůstání do sebe nebylo u předchozích měření pozorované. Pro srovnání těchto rozdílů v růstu krystalů při neizotermních a izotermních experimentů za vysokých podchlazení byla přidána fotografie 30c).

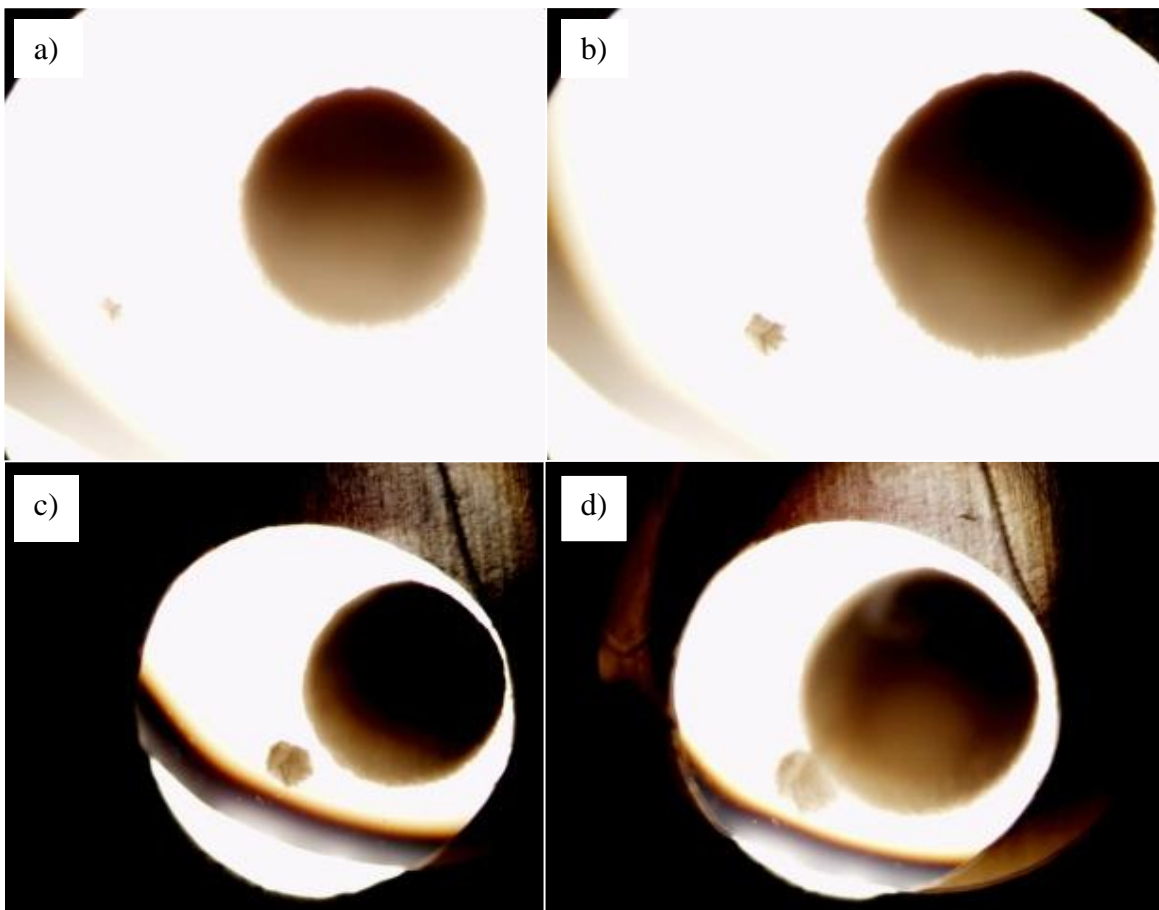
Dalším krystalickým tvarem, který byl u izotermních měření v režimu chlazení pozorován, byl tvar vločky. Snímky na obrázku 31 a 32 tento typ dendritického růstu krystalů zachycují. Vločkovitý krystal byl v předcházejícím případě neizotermních měření zaznamenán pouze v jednom případě krystalizace během ohřevu. Na snímcích obrázku 31 je detailně zachycena struktura vločkovitého krystalu vody, jehož růst byl pozorován při teplotě -33°C . Zatímco vločce podobný krystal, který byl popsán v kapitole 4.2.1.2, rostl ve všech směrech, krystal na obrázku 31 roste zpočátku pouze ve dvou rovinách kolmých na sebe, o čemž svědčí tmavé, nezaostřené části na těchto fotografiích. Na dalších snímcích již přerůstá krystal do všech směrů, nabývá nepravidelného sférického tvaru a zachovává si menší hustotu krystalické struktury.

Fotografie na obrázku 32 zachycují současný růst dvou krystalů při teplotě -34°C . První sférický krystal je na snímku 32a) zachycen s velikostí $723\ \mu\text{m}$ v čase 55 s od momentu zachycení jeho vzniku. V tomtéž čase začíná růst druhý krystal, který má dendritický tvar připomínající vločku. Na rozdíl od krystalu na obrázku 31 roste tento krystal zpočátku planárně a poté se rozrůstá do všech směrů. Jeho tvar na posledním snímku odpovídá velmi nepravidelnému sférickému tvaru podobné oblaku. Tento tvar vypovídá o nerovnoměrné krystalové struktuře s velmi nízkou hustotou.



Obrázek 31: Izotermní růst dendritických krystalů vody ve vodném roztoku sacharózy (50 hm%) při teplotě -33°C při chlazení

Velikost krystalu: a) 75 μm (28 s), b) 158 μm (161 s), c) 417 μm (546 s), d) 489,3 μm (637 s), e) 616 μm (833 s), f) 1848 μm (1199 s).

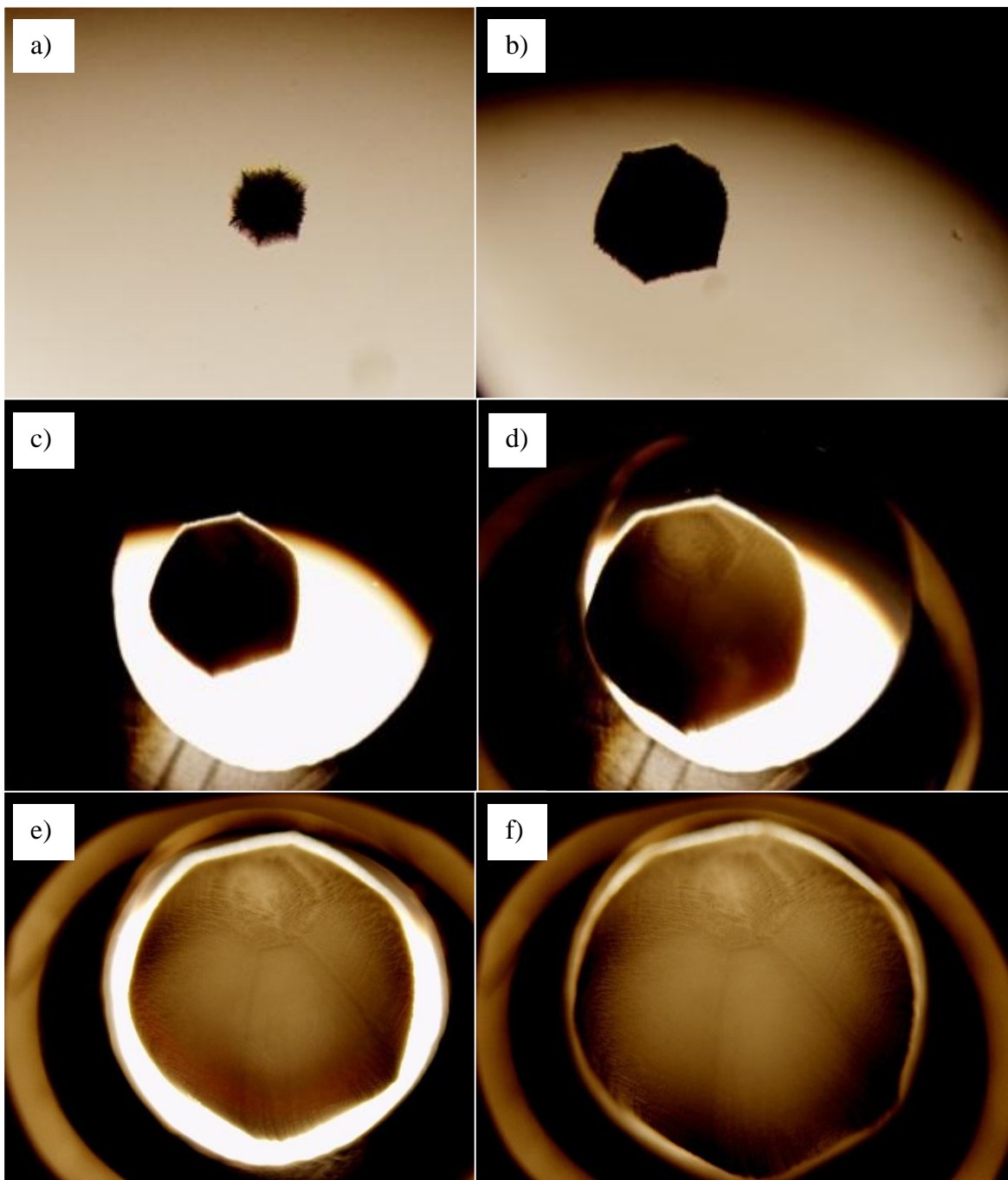


Obrázek 32: Izotermní růst dendritického krystalu vody ve vodném roztoku sacharózy (50 hm%) při teplotě -34°C při chlazení

Velikost krystalu: a) $723\ \mu\text{m}$ (55 s), b) $846\ \mu\text{m}$ (83 s), c) $1203\ \mu\text{m}$ (160 s), d) $1428\ \mu\text{m}$ (216 s).

Izotermní experiment *v režimu ohřevu* byl proveden pouze jeden z důvodu velmi neochotné krystalizace systému za těchto podmínek. Zachycený krystal vody rostl při teplotě -23°C v hexagonálním tvaru a je zobrazen na fotografiích obrázku 33.

Postupným růstem docházelo ke změně krystalické morfologie až na sférický tvar se zachovanou původní hexagonální strukturou. Konečný tvar krystalu je podobný nafukovacímu míči a je znázorněn na posledních dvou zvětšených fotografiích. Tato skutečnost nebyla u žádného jiného experimentu pozorována.

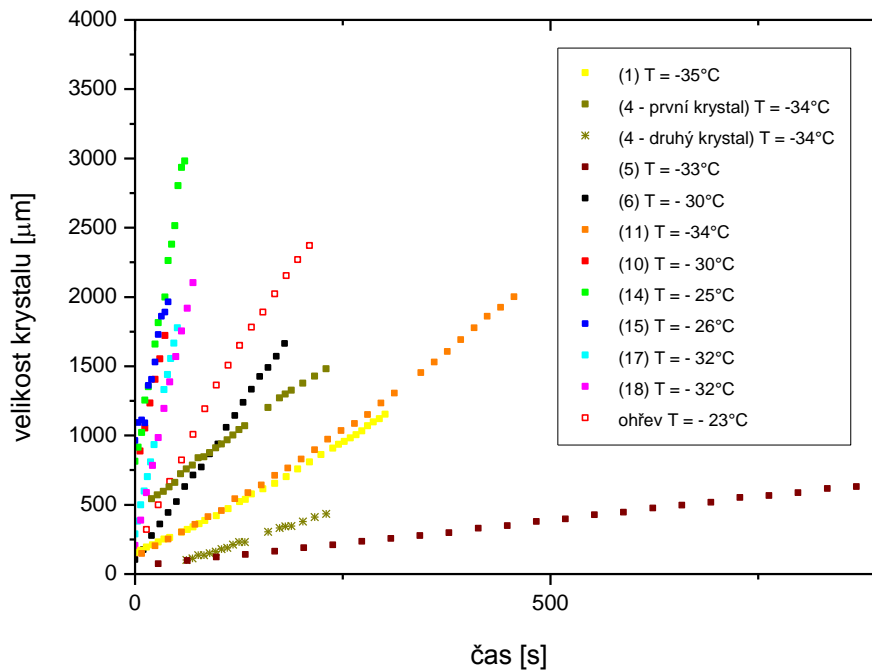


Obrázek 33: Izotermní růst hexagonálního krystalu vody ve vodném roztoku sacharózy (50 hm%) při teplotě -23°C při ohřevu

*Velikost krystalu: a) $153\ \mu\text{m}$ (0 s), b) $500\ \mu\text{m}$ (28 s), c) $1100\ \mu\text{m}$ (77 s), d) $1579\ \mu\text{m}$ (119 s),
e) $2022\ \mu\text{m}$ (168 s), f) $2371\ \mu\text{m}$ (210 s).*

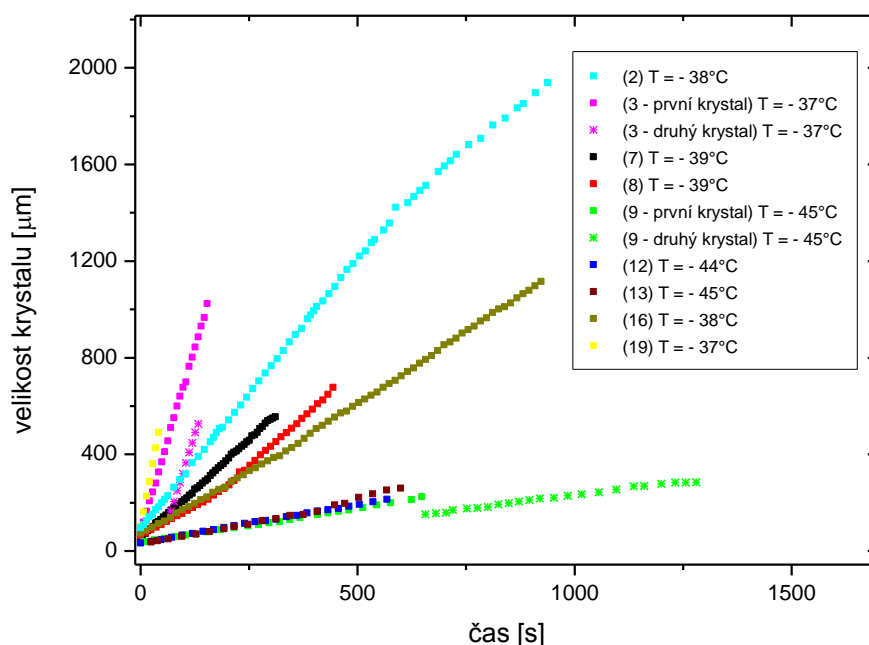
4.2.2.1 Vyhodnocení rychlosti izotermního růstu

Vyhodnocení fotografií pořízených při izotermních experimentech bylo provedeno stejným způsobem, jaký byl popsán v kapitole 4.2.1.3. Stejně jako u neizotermních měření je výsledkem časová závislost velikosti krystalu. Z důvodu velkého množství experimentálních dat byla vyhodnocená grafická závislost velikosti krystalu na čase rozdělena podle teplot měření do dvou grafů, které jsou na obrázcích 34 a 35. Čísla v legendě grafů odpovídají jednotlivým experimentům.



Obrázek 34: Grafická závislost velikosti krystalu na čase pro izotermní měření vodného roztoku sacharózy (50 hm%) v rozmezí teplot od -23°C do -35°C

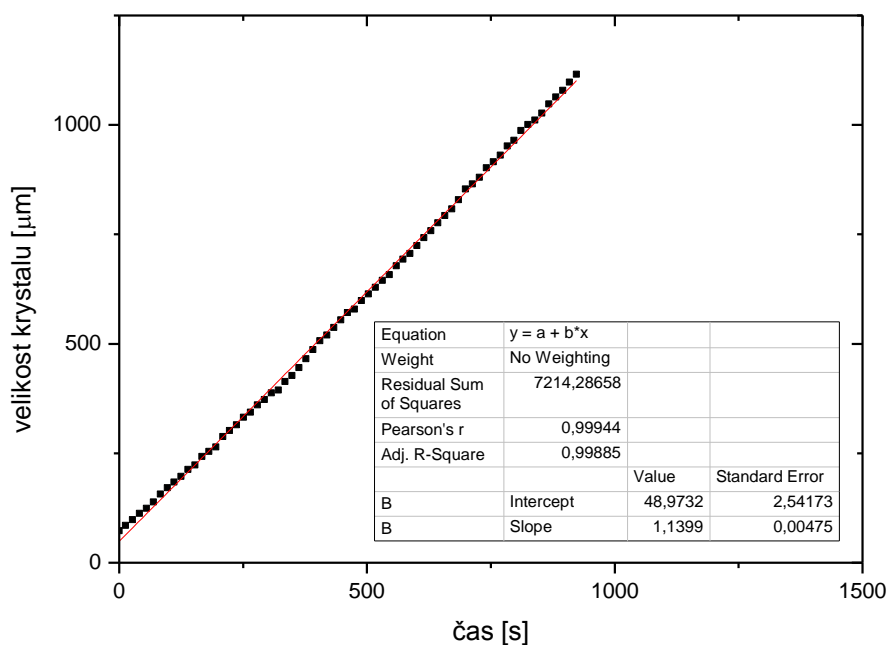
Jak je z uvedených grafů patrné, je ve většině případů průběh časové závislosti velikosti krystalu při různých teplotách lineární. Jednotlivá měření a jím odpovídající získané závislosti se liší pouze strmostí svého průběhu, tedy velikostí směrnice. Protože jde o izotermní měření, udává zároveň směrnice rychlost růstu krystalu při dané teplotě.



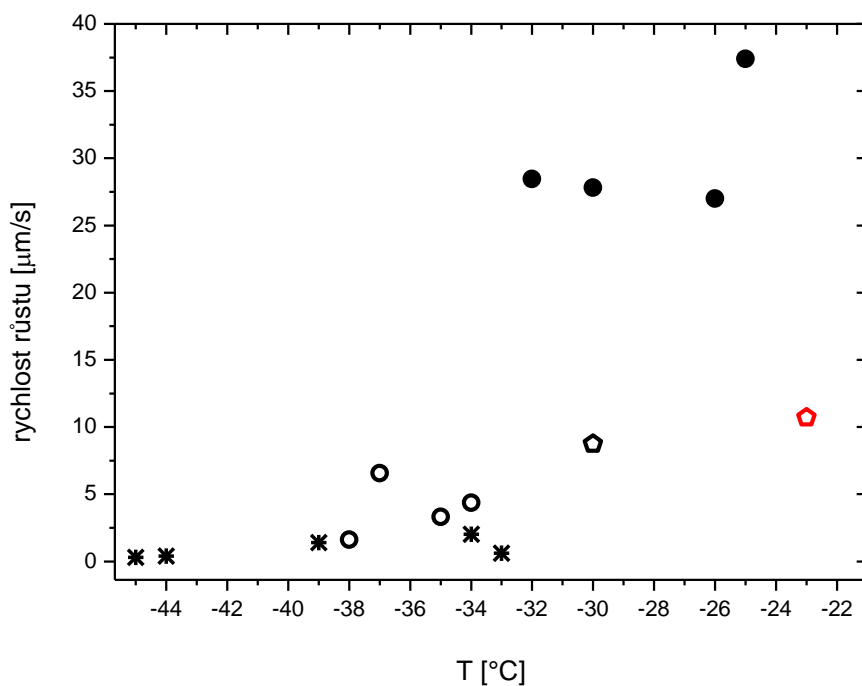
Obrázek 35: Grafická závislost velikosti krystalu na čase pro izotermní měření vodného roztoku sacharózy (50 hm%) v rozmezí teplot od -37°C do -45°C

Odchýlení průběhu závislosti od linearit ve směru zmenšení směrnice je zřetelné u měření 2 a 4. Stejný jev je pozorován u izotermního experimentu v režimu ohřevu. U měření 3, 4 a 9 byl vyhodnocován současný růst dvou krystalů, z nichž každý měl jinou růstovou rychlost. V grafech jsou data z těchto měření značena stejnou barvou ale rozdílným symbolem.

Všechny vyhodnocené časové závislosti velikosti krystalu byly proloženy lineární regresí, jak je graficky znázorněno na obrázku 36. Růstová rychlost byla určena ze směrnice regresní rovnice. Tímto postupem vyhodnocení všech dat byla získána závislost rychlosti růstu krystalů vody na teplotě pro izotermní měření. Její grafické znázornění je na obrázku 37. Na tomto grafu je zřetelně vidět, že pro různé izotermní experimenty probíhající při stejné teplotě byla vyhodnocena rozdílná rychlost růstu. Taktéž jsou odlišné rychlosti růstu různých krystalů pozorovaných při stejném měření.



Obrázek 36: Lineární regrese časové závislosti velikosti krystalu (experiment 16)

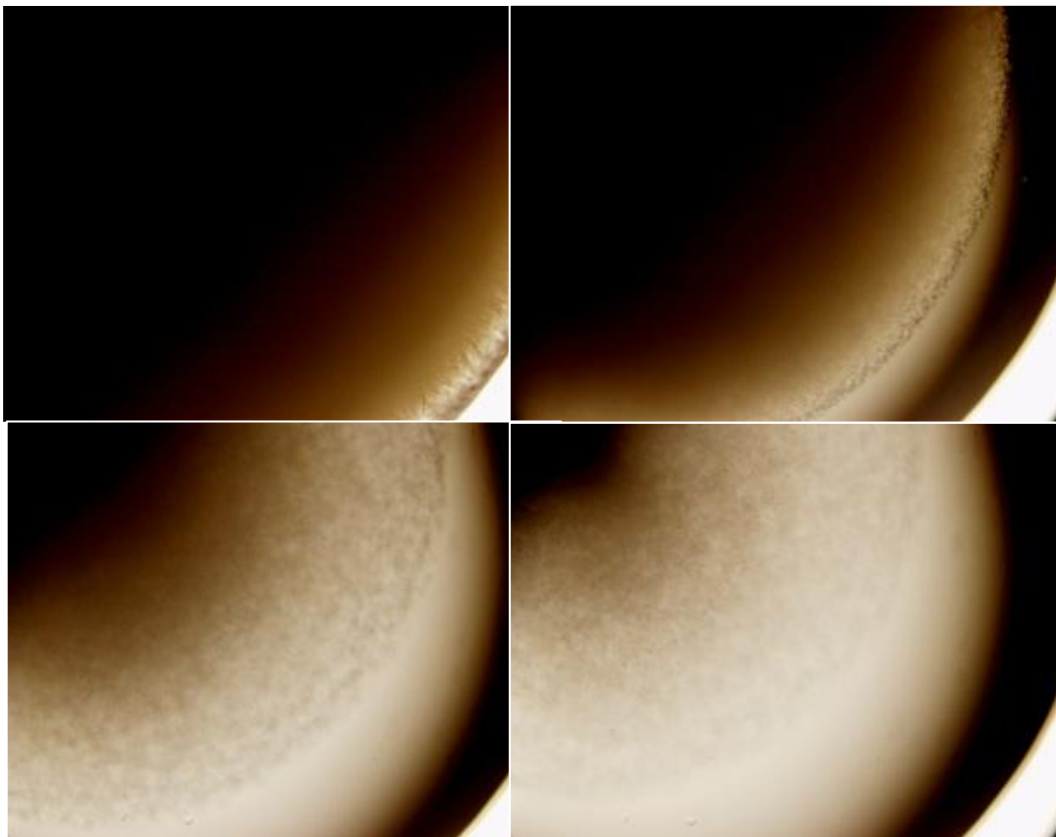


Obrázek 37: Závislost růstu krystalů vody ve vodném roztoku sacharózy (50 hm%) na teplotě pro izotermní měření

Černé body – experiment v režimu chlazení; červený bod – experiment v režimu ohřevu; hvězdou značené body - růst dendritických krystalů (vločky); pětiúhelníkem značené body - růst hexagonálních krystalů; kruhem značené body – růst sférických krystalů.

4.2.3 Mikroskopické sledování tání krystalů vody

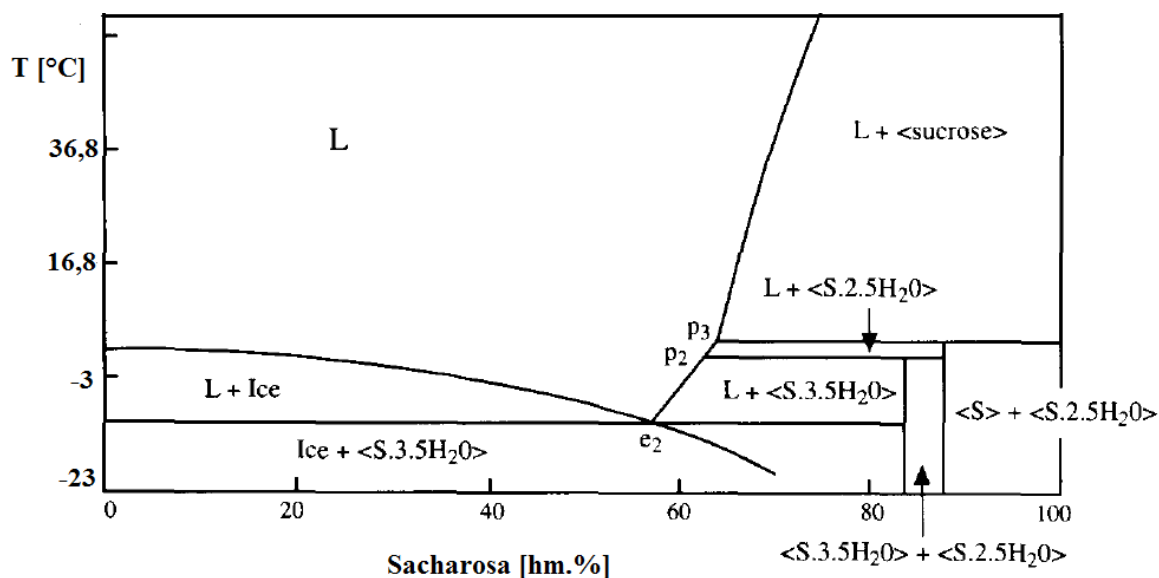
Teplota tání byla stanovena metodou DSC a poté i mikroskopicky. Vzorek byl stejně jako v předchozích případech podchlazen až do jeho zakrystalizování. Poté byla mikroskopicky sledována teplota tání kvaziizotermní metodou. Vzorek byl vystaven teplotnímu programu s rychlostí ohřevu $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, kterou bylo dosaženo předpokládané teploty tání. Této teplotě byl vzorek po určitou dobu vystaven. Mikroskopem bylo pozorováno postupné odtávání vzorku. Při jeho zastavení byla teplota zvýšena o jeden stupeň a opět byla nastavena izoterma. Celý proces byl opakován až do úplného roztátí celého objemu vzorku. Kamerou byly pořizovány časoběrné snímky pro názornost postupného tání. Rychlost procesu však určována nebyla z důvodu použitého nejmenšího zvětšení mikroskopu, které neumožňovalo zachytit celý vzorek. Vzorek začal tát od kraje při teplotě -13°C , jak je zachyceno na první fotografii obrázku 38. Druhý snímek zaznamenává postupné tání při zvýšení teploty o jeden stupeň, třetí snímek zachycuje tání při nárůstu teploty o 2 stupně. K úplnému roztátí vzorku došlo až při teplotě -10°C .



Obrázek 38: Odtávání zakrystalizovaného vzorku vodného roztoku sacharózy (50 hm%) od kraje v teplotním rozmezí -13°C až -10°C

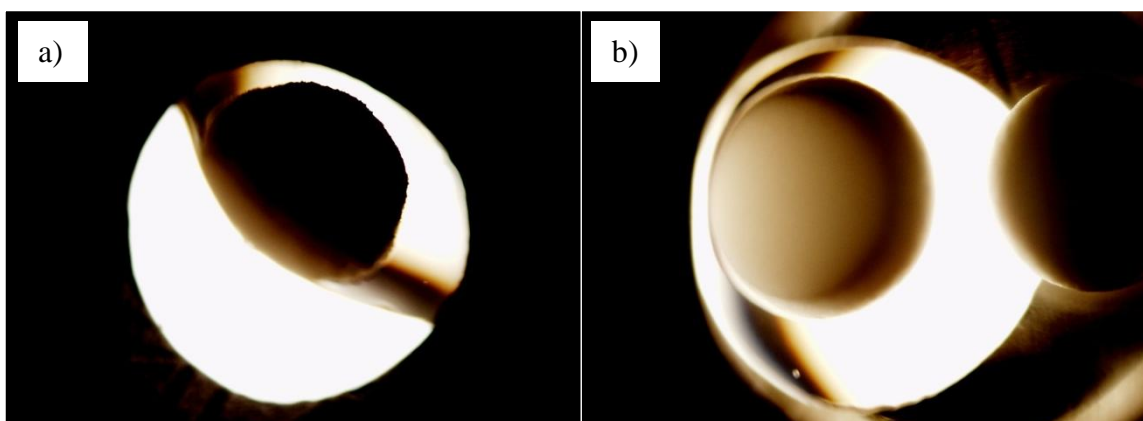
5 DISKUZE

Tato práce se zabýváva studiem procesu krystalizace ve vodném roztoku sacharózy o koncentraci 50 hm% za vysokého podchlazení. Z měření pomocí DSC vyplynulo, že v podchlazeném roztoku dochází ke krystalizaci při teplotách -30°C až -45°C , což odpovídá sledovanému růstu krystalů vody mikroskopickou metodou. Při následném ohřevu takto zakrystalizovaného vzorku byly pozorovány dva výrazné endotermní efekty. První efekt při teplotách kolem -35°C naznačuje svým charakterem skelný přechod a plynule přechází v druhý mnohem větší endotermní efekt, který odpovídá tání ledu. Sledované efekty souhlasí se zjištěním předchozích autorů [44], [46], [47], [48] i s fázovým diagramem systému voda – sacharóza [47], který ukazuje pro 50 hm% roztok sacharózy tání krystalů ledu při teplotách $-9,5^{\circ}\text{C}$ až -7°C . Systém vykazuje hypotetické eutektikum [49] s teplotou tání $-9,5$ [46], [50], [51]. V našem případě předpokládáme při chlazení krystalizaci pouze ledu a zbytek matrice, který je bohatší na sacharózu, zůstává pravděpodobně ve vitrifikovaném stavu. Tomu odpovídá i nález jednoho skelného přechodu při ohřevu a následného jednoho efektu tání. Přesná teplota tání krystalů ledu byla stanovena mikroskopicky na $-10 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, což odpovídá fázovému diagramu pro dané složení.



Obrázek 39: Fázový diagram systému voda – sacharóza [47]

Hlavní část práce se zabývala stanovením rychlosti růstu krystalů vody v roztoku sacharózy (50 hm%) pomocí optického mikroskopu. Během těchto experimentů bylo možno sledovat jak průběh nukleace, tak samotný růst krystalů. Vznik krystalů byl sledován pouze při teplotách nižších než -20°C . Výrazný trend k heterogenní nukleaci byl pozorován při teplotách -25°C až -33°C . V těchto případech byl sledován nízký počet sférických krystalů (jeden až dva). Všechny krystaly začínaly růst v blízkosti okraje kapky vzorku, jak je zachyceno na obrázku 40.



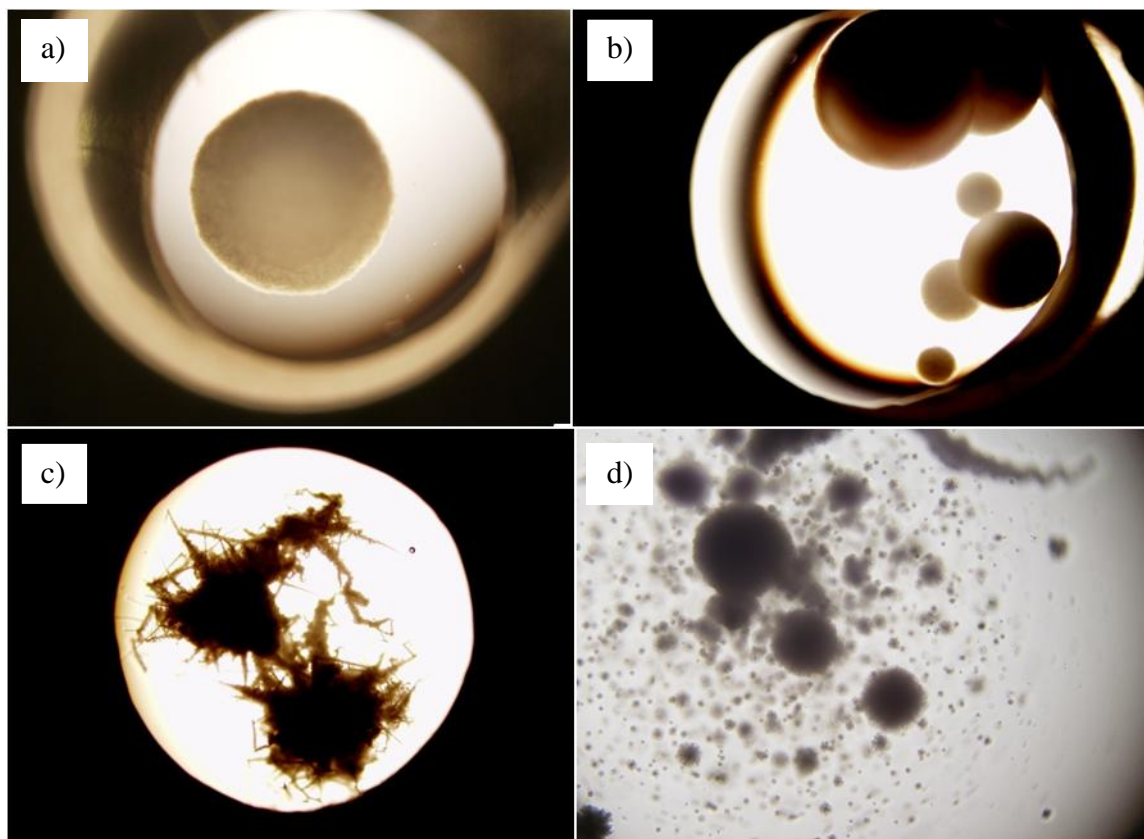
Obrázek 40: Heterogenní nukleace vody ve vodném roztoku sacharózy (50 hm%)

Velikost krystalů: a) $1404\ \mu\text{m}$ při teplotě -26°C , b) $1556\ \mu\text{m}$ při teplotě -32°C .

Rychlosti růstu dosahovaly v případě heterogenní nukleace velmi vysokých hodnot (tabulka III), které mohou být vysvětleny rozdílným povrchovým napětím a rozdílným působením sil v důsledku zakřivení kapky v místě růstu krystalu. Zjištěné teploty odpovídají teplotnímu rozsahu heterogenní nukleace vody, jež se uvádí v literatuře [44], [52], [53].

Homogenní nukleace byla pozorována v širokém teplotním rozmezí od -23°C do -50°C , přičemž výrazně se projevovala při teplotách nižších než -40°C , kdy docházelo ke vzniku velkého množství drobných krystalků v celém objemu kapky vzorku. Při delších časech temperace při nízkých teplotách docházelo k nepravidelnému růstu krystalů, který se projevoval vznikem charakteristických šlahounů v důsledku přednostního růstu krystalu do určitého směru. Takovýto růst je způsoben vysokou viskozitou systému

a jeho hlubokým podchlazením, které má za následek velmi nestabilní a rozdílné chování systému v různých místech objemu vzorku. v literatuře se uvádí teploty pro homogenní nukleaci pod -40°C , což odpovídá i našim měřením. [41], [44], [53].



Obrázek 41: Homogenní nukleace vody ve vodném roztoku sacharózy (50 hm%)

Velikost krystalů: a) $1212\ \mu\text{m}$ při teplotě -31°C ,
b), c), d) nevyhodnoceno, při teplotě -37°C , -44°C a -60°C

Z výsledků měření rychlosti růstu krystalů vody v roztoku sacharózy (50 hm%) vyplývá, že při dané teplotě je rychlost růstu krystalů konstantní v čase a nezávisí tedy na velikosti krystalů (obr. 33 – 35). Výjimkou jsou extrémně velké krystaly nad $2500\ \mu\text{m}$.

Jak je však patrné z následující tabulky a grafu, údaje z několika experimentů jsou rozdílné o $\pm 30\%$. Když se pokusíme vysvětlit tyto rozdíly, dojdeme k závěru,

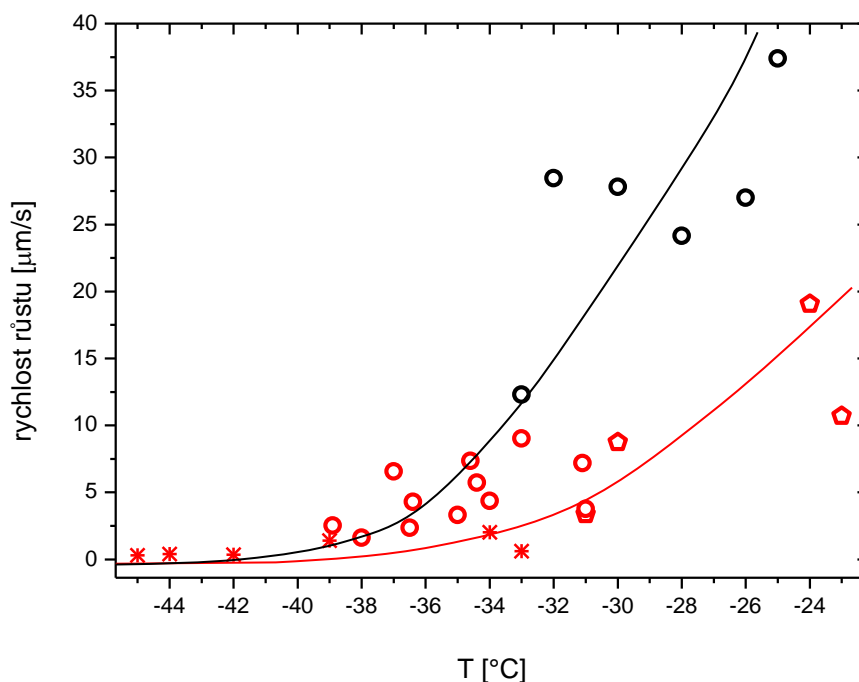
že naměřená rychlost růstu krystalů je ovlivněna řadou faktorů, jako jsou způsob nukleace, tvar krystalu a tepelná historie vzorku. V tabulce i v grafu jsou rozděleny získané rychlosti růstu dle typu nukleace. Je patrné, že růst v oblasti heterogenní nukleace v blízkosti okraje kapky vykazuje vyšší rychlosti. Tato oblast je v grafu vyznačena černými kruhovými body a přechází do oblasti homogenní nukleace, jak je naznačeno černou růstovou křivkou. Tato růstová křivka vykazuje prudký pokles s rostoucím podchlazením. Oblast homogenní nukleace vyznačují červené body různého geometrického tvaru podle počáteční morfologie vznikajících krystalů. Červeně je znázorněna druhá růstová křivka vykazující méně strmý průběh teplotní závislosti rychlosti růstu. Obě křivky limitují za vysokého podchlazení k nule a bude o jejich průběhu diskutováno dále.

Tabulka III

Tabulka rychlostí růstu při jednotlivých teplotách pro homogenní a heterogenní nukleaci

<i>Homogenní nukleace</i>			
<i>T</i> [°C]	<i>Rychlost růstu</i> [μm/s]	<i>T</i> [°C]	<i>Rychlost růstu</i> [μm/s]
-23	10,7	-34,6	7,34
-24	19,06	-35	3,32
-30	8,73	-36,4	4,28
-31	3,36	-36,5	2,36
-31	3,77	-37	6,56
-31,1	7,18	-38	1,61
-33	0,61	-38,9	2,53
-33	9,02	-39	1,39
-34	2,03	-42	0,34
-34	4,36	-44	0,4
-34,4	5,72	-45	0,3

<i>Heterogenní nukleace</i>	
<i>T</i> [°C]	<i>Rychlost růstu</i> [μm/s]
-25	37,4
-26	27
-28	24,16
-30	27,8
-32	28,45
-33	12,3



Obrázek 42: Závislost rychlosti růstu na teplotě pro dva typy nukleace

Černé body - oblast homogenní nukleace; červené body - oblast heterogenní nukleace; hvězdou značené body - růst dendritických krystalů (vločky); pětiúhelníkem značené body - růst hexagonálních krystalů; kruhem značené body - růst sférických krystalů, černá a červená linie naznačuje pravděpodobný průběh dvou růstových křivek.

Abychom mohli porovnat údaje pro různé typy krystalů, byly do grafu pro neizotermní měření vyneseny jen počáteční hodnoty rychlosti růstu při první sledované teplotě.

Počáteční morfologie rostoucích krystalů byla trojího typu, jak bylo zmíněno v předchozích kapitolách. Na obrázku 42 už bylo patrné, že jsou zde vyneseny rychlosti růstu krystalů s různou morfologií. Tato skutečnost je zdůrazněna v tabulce IV.

Tabulka IV

Tabulka rychlostí růstu při jednotlivých teplotách pro různou morfologii krystalů

<i>Sférické krystaly</i>			
<i>T</i> [°C]	<i>Rychlost růstu</i> [μm/s]	<i>T</i> [°C]	<i>Rychlost růstu</i> [μm/s]
-25	37,4	-34	4,36
-26	27	-34,4	5,72
-28	24,16	-34,6	7,34
-30	27,8	-35	3,32
-31	3,77	-36,4	4,28
-31,1	7,18	-36,5	2,36
-32	28,45	-37	6,56
-33	9,02	-38	1,61
-33	12,3	-38,9	2,53

<i>Hexagonální krystaly</i>	
<i>T</i> [°C]	<i>Rychlost růstu</i> [μm/s]
-23	10,7
-24	19,06
-30	8,73
-31	3,36

<i>Dendritické krystaly (vločky)</i>	
<i>T</i> [°C]	<i>Rychlost růstu</i> [μm/s]
-33	0,61
-34	2,03
-39	1,39
-42	0,34
-44	0,4
-45	0,3

Dendritický růst krystalů tvaru vločky byl nejčastěji pozorován při teplotách nižších než -39°C. Výjimkou bylo zaznamenání růstu tohoto typu krystalického tvaru i při menším podchlazení, a to při teplotách -33°C a -34°C. Jak uvádí Kirkpatrick [54], dendritický růst krystalů je za vysokých podchlazení běžný a je způsobený tepelnou nestabilitou podchlazené kapaliny kolem krystalu. Tato nestabilita vzniká v důsledku nerovnoměrného odvádění krystalizačního tepla z povrchu krystalu. Ve všech případech krystaly této morfologie vykazovaly na počátku homogenní nukleaci a zároveň i nejnižší rychlosti růstu v důsledku dvoudimenzionálního růstu krystalů. Růstové rychlosti limitovaly za vysokých podchlazení k nulové hodnotě (obr. 42).

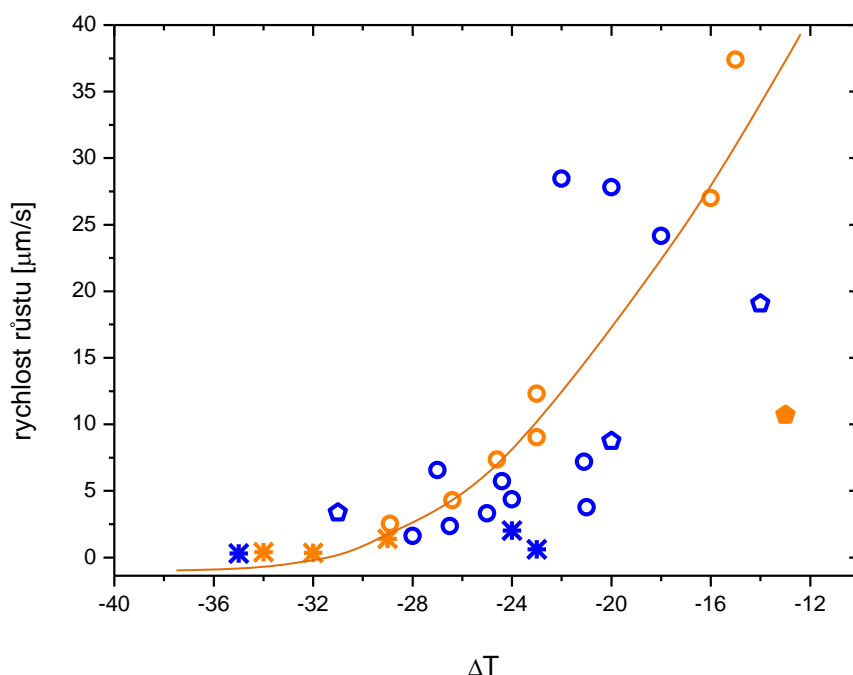
Krystaly tvaru vloček v roztoku sacharózy byly pozorovány v experimentech podle Gonda a Sei [30], [41] nebo podle Teraoka a spol. [31] a Ohsaka [36]. Z důvodů

použití jiného podchlazení a koncentrace roztoků nelze porovnávat krystalizační rychlosti získané z jejich experimentů s rychlostmi určenými v této práci.

Za vyšších teplot -23°C až -33°C přecházel vločkovitý tvar krystalů na tvar hexagonální. Tento morfologický přechod je patrný z výše uvedeného grafu naznačenou červenou růstovou křivkou. Hexagonální krystaly rostly opět procesem homogenní nukleace, ale v důsledku menšího podchlazení dosahovaly již vyšších růstových rychlostí (obr. 42). Nízké podchlazení mělo za následek větší stabilitu podchlazené kapaliny v okolí krystalu a menší viskozitu systému. Důsledkem těchto vlivů byla difúze částic k povrchu krystalu rychlejší. Hexagonální symetrie je pro krystalizaci vody charakteristická a její výskyt byl popsán i v literatuře [30], [31], [32].

Sférické krystaly rostly procesem homogenní i heterogenní nukleace ve velmi širokém rozmezí teplot, jak lze vyčíst z grafu na obrázku 42. Krystaly sférického tvaru v oblasti homogenní nukleace v teplotním rozsahu od -31°C do -39°C vykazovaly vysoký rozptyl v růstových rychlostech daný tepelnou historií a stářím vzorku, jak bude vysvětleno dále. V oblasti heterogenní nukleace v rozmezí teplot od -25°C do -33°C nebyl pozorován růst krystalů jiného tvaru než sférického. Růstová rychlost krystalů s touto morfologií se zvyšovala s teplotou rychleji, než tomu bylo u vločkovitých a následně hexagonálních krystalů. Tento rozdíl je patrný porovnáním obou růstových křivek v grafu. Sférický tvar krystalů vody v roztoku sacharózy za použití jiného podchlazení a koncentrace byl zaznamenán i podle Hindmarshe a spol. [55].

Rychlost růstu krystalů vody byla odlišná pro roztoky sacharózy čerstvě připravené, tj. měřené v den jejich přípravy, a pro roztoky odstáté, tj. měřené až po jedno nebo vícedenní prodlevě. Graf na obrázku 43 znázorňuje rozdíly v průběhu závislosti rychlosti růstu krystalů pro tyto dva typy vzorků na podchlazení ΔT . Podchlazení je vyjádřeno jako rozdíl měřené teploty a teploty tání systému voda - sacharóza. Tání bylo pozorováno mikroskopicky od teploty -13°C , přičemž k úplnému roztátí vzorku došlo až při teplotě -10°C , která byla určena za teplotu tání. Oranžové body v tomto grafu vyznačují rychlosti růstu pro experimenty, v nichž byl použit roztok odstátý. Data získaná měřením vzorků, které byly připraveny z čerstvých roztoků sacharózy, jsou vyznačena modrými body.



Obrázek 43: Závislost rychlosti růstu na podchlazení pro různé stáří vzorků

Oranžové body – vzorky roztoků odstátých po dobu jednoho až čtyř dnů; modré body – vzorky roztoků čerstvě připravených; hvězdou značené body - růst dendritických krystalů (vločky); pětiúhelníkem značené body - růst hexagonálních krystalů; kruhem značené body – růst sférických krystalů; oranžová linie naznačuje pravděpodobný průběh růstové křivky.

Po srovnání dat obou typů experimentů v uvedeném grafu je zřetelně patrný velký rozptyl jednotlivých měření čerstvých vzorků, zatímco data z experimentů s odstátým vzorkem vykazují odchylky malé. Důvodem tohoto rozdílu je složité chování čerstvých roztoků, které není závislé jen na řídicích silách, jakými jsou difúze či viskozita roztoku, ale závisí také na místním uspořádání částic v objemu vzorku. Toto uspořádání pravděpodobně není stabilizované a vzorek vykazuje nerovnovážné chování v jednotlivých místech svého objemu. V důsledku těchto skutečností dochází ke vzniku krystalů různých tvarů s rozdílnými rychlostmi růstu při stejné teplotě krystalizace. Dalším faktorem, který má vliv na takto nereprodukovatelné chování systému, je pravděpodobná nehomogenita čerstvě připraveného roztoku. Roztoky sacharózy nebyly podrobeny homogenizaci speciálními technikami. Z důvodu přítomnosti nehomogenit ve vzorku je možný velmi rozdílný průběh krystalizací u jednotlivých měření. Tato data sledují růstovou křivku, která je v grafu naznačena oranžovou barvou, a vykazují malý rozptyl.

To je pravděpodobně způsobeno ustálením podmínek v roztoku a jeho dostatečnou homogenizací, ke které došlo během prodlevy mezi přípravou a měřením vzorku.

DSC záznam krystalizace obou typů vzorků na obrázku 17 (str. 41) potvrzuje také rozdílné chování čerstvých a odstátých vzorků. Krystalizační píky značené černě, které byly získané proměřením čerstvého vzorku, vypovídají svým tvarem o rychlém procesu krystalizace, pravděpodobně založeném na heterogenní nukleaci. Zatímco krystalizační píky odstátých vzorků (červené křivky) jsou posunuty do oblasti nižších teplot, kde dochází převážně k homogenní nukleaci, která je následována pomalejším růstem krystalů. Tvar těchto píků naznačuje, že proces krystalizace je celkově pomalejší a komplikovanější.

Tato práce ukázala, že proces krystalizace vody z 50 hm% roztoku sacharózy je složitý a ovlivněný řadou faktorů. Díky tomu získané údaje vykazují značnou chybu. Přesto můžeme odhadnout průběh závislosti rychlosti růstu krystalů vody na teplotě z reprodukovatelných dat získaných proměřením odstátých vzorků, kdy nezávisí na aplikovaném teplotním programu. Zcela reprodukovatelné jsou údaje v oblasti teplot kolem -40°C , kde převládá homogenní nukleace a rychlost růstu limituje k nule (obr. 43). Při menším podchlazení rychlost růstu stoupá až k maximu při teplotě -25°C (podchlazení -15°C). Při dalším vzrůstu teploty bude průběh křivky klesat v důsledku pomalého přibližování k bodu tání. Tomu odpovídá také izotermní experiment v režimu ohřevu, který je v grafu vyznačený plným oranžovým pětiúhelníkem. Vlivem rostoucí teploty bude růst krystalů zastaven při teplotách těsně nad -13°C , kdy už krystaly začínají roztávat.

6 ZÁVĚR

Na základě zadání byla provedena rešerše na proces krystalizace v podchlazených kapalinách se zaměřením na vodné roztoky. Jako vzorek byl vybrán vodný roztok sacharózy o koncentraci 50 hm%. Pro zkoumání růstu krystalů byly zvoleny metody DSC a optické mikroskopie. Vyhodnocení experimentálních měření vedlo k těmto závěrům:

- Metodou DSC byla zjištěna teplota krystalizace vody při chlazení ve vodném roztoku sacharózy (50 hm%) v teplotní oblasti od -30°C do -45°C . Během následného ohřevu byly zjištěny dva endotermní efekty. První efekt při teplotách kolem -35°C odpovídá skelnému přechodu hydratované sacharózy, která ve vzorku zbyla po zakrystalizování vody. Druhý endotermní efekt v teplotní oblasti kolem -8°C odpovídá tání ledu ve vzorku.
- Optickým mikroskopem byla sledována morfologie, nukleace a rychlost růstu krystalů vody ve vodném roztoku sacharózy (50 hm%) při teplotách pod -20°C .
- Heterogenní nukleace s nízkým počtem vznikajících nukleí byla pozorována při teplotách od -25°C do -33°C . Homogenní nukleace byla zaznamenána v širokém teplotním rozsahu, velmi výrazná a s vysokým počtem nukleí byla při teplotách menších než je -40°C , kde také docházelo ke vzniku výrůstků vycházejících z původních krystalů.
- Krystaly vykazovaly morfologii trojího typu. Z heterogenních nukleí vznikaly výhradně sférické krystaly s vysokou rychlostí růstu ($12 - 37 \mu\text{m/s}$). V případě homogenních nukleí vznikaly zejména při velmi vysokých podchlazeních dendritické krystaly, jejichž rychlost růstu byla nejnižší ($0,3 - 2 \mu\text{m/s}$). Dále vznikaly hexagonální krystaly v oblasti vyšších teplot a jejich růst byl opět pomalejší ($3,4 - 19 \mu\text{m/s}$) než u sférických krystalů při stejné teplotě. Ve středu sledovaného teplotního rozsahu se tvořily krystaly sférického tvaru s rychlostí růstu od $1,6$ do $9 \mu\text{m/s}$.
- Sledovaná rychlost růstu krystalů vody byla pro danou teplotu nezávislá na čase a velikosti krystalu. Rychlost růstu měla maximum v oblasti kolem -25°C při hodnotách $37 \mu\text{m/s}$ a postupně klesala se snižující se teplotou k hodnotám kolem $0,5 \mu\text{m/s}$. Na druhé straně byl růst krystalu zastaven při teplotě -13°C , kde docházelo k postupnému tání až do teploty -10°C . Stanovená rychlost růstu byla významně ovlivněna kromě morfologie krystalu také stářím vzorku.

7 BIBLIOGRAFIE

- [1] Prof. Ing. Frumar M., DrSc.: Chemie pevných látek, Pardubice: Vysoká škola chemicko technologická v Pardubicích, Katedra obecné a anorganické chemie, 1992.
- [2] M. Glogarová: „Kapalné krystaly“, Fyzikální ústav Akademie věd ČR, Praha.
- [3] P. L. Davies a B. D. Sykes: „Antifreeze proteins“, *Current Opinion in Structural Biology* 7, pp. 828 - 834, 1997.
- [4] S. Martínez-Páramo, V. Barbosa, S. Pérez-Cerez, V. Robles a M. P. Herráez: „Cryoprotective effects of antifreeze proteins delivered into zebrafish embryos“, *Cryobiology* 58, pp. 128 - 133, 2009.
- [5] H. Ishiguro a B. Rubinsky: „Influence of fish antifreeze proteins on the freezing of cell suspensions with cryoprotectant penetrating cells“, *International Journal of Heat Mass Transfer* 41, pp. 1907 - 1915, 1998.
- [6] H. Chao, C. I. DeLuca a P. L. Davies: „Mixing antifreeze protein types changes ice crystal morphology without affecting antifreeze activity“, *FEBS Letters* 357, pp. 183 - 186, 1995.
- [7] G. Amir, L. Horowitz a B. Rubinsky: „Subzero nonfreezing cryopreservation of rat hearts using antifreeze protein I and antifreeze protein III“, *Cryobiology* 48, p. 273 – 282, 2004.
- [8] J. Zámečník a J. Šesták: „Biological glasses and their forming during overwintering and cryopreservation of plants“, *Some thermodynamic, structural and behavioral aspects of materials accentuating non-crystalline states*, Plzeň, Západočeská univerzita a OPS Plzeň, 2009.
- [9] T. Iljma: „Thermal analysis of cryoprotective solutions for red blood cells“, *Cryobiology*, sv. 36, pp. 165 - 173, 1998.
- [10] L. L. Kuleshova, S. S. Gouka a D. W. Huttmacherb: „Vitrification as a prospect for cryopreservation of tissue-engineered constructs“, *Biomaterials*, sv. 28, pp. 1585 - 1596, 2007.
- [11] M. Faltus a J. Zámečník: Konzervace genetických zdrojů chmele pomocí metody kryoprezervace, Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2008.

- [12] Y. Saito: Statistical physics of crystal growth, Singapore: World Scientific Publishing, 1996.
- [13] Prof. RNDr. Kratochvíl B., DSc.: „Kryštalizace farmaceutických substancí“, *Chemické listy*, pp. 3 - 12, 2007.
- [14] P. Hartman: Crystal Growth: An introduction, Amsterdam: North - Holland Publishing Comp., 1973.
- [15] G. Vali: „Ice nucleation - Theory“, East University Avenue, Laramie, Wyoming, 1999.
- [16] J. Nývlt: Kryštalizácia z roztokov, Bratislava: Slovenské vydavateľstvo technickej literatúry, 1967.
- [17] J. Zimák: Vznik a vývoj krystalů, Olomouc: Univerzita Palackého, 1995.
- [18] A. Van Hook: Crystallization - Theory and practice, New York: Reinhold Publishing Corporation, 1961.
- [19] D. Kashchiev: „Nucleation - Basic theory with applications“, Butterworth Heinemann, Sofia, 2000.
- [20] L. Gránásy: „Cahn–Hilliard-type density functional calculations for homogeneous ice nucleation in undercooled water“, *Journal of Molecular Structure*, pp. 523 - 536, 1999.
- [21] I. Napari: „Density functional theory of nucleation and phase behavior in binary fluid systems“, *Report Series in Aerosol Science*, 2000.
- [22] M. Ohara a R. C. Reid: Modeling crystal growth rates from solution, New Jersey, USA: Prentice-Hall, Inc., 1973.
- [23] J. W. Mullin: Crystallization (4th edition), Oxford: Elsevier Butterworth-Heinemann, 2001.
- [24] Z. Ing. Bubník: *Kryštalizace sacharózy*, Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1983.
- [25] R. F. Strickland - Constable: Kinetics and mechanism of crystallization, New York: Academic Press, 1968.
- [26] A. Shibkov, M. A. Zheltov, A. A. Korolev, A. A. Kazakov a A. A. Leonov: „Crossover from diffusion-limited to kinetics-limited growth of ice crystals“, *Journal of Crystal Growth*, sv. 285, 2005.

- [27] P. G. Debenedetti a H. E. Stanley: „Supercooled and glassy water“, *Physics Today*, 2003.
- [28] I. Ragasová: *Bakalářská práce: Problematika kryogenního uchování biologických materiálů*, Pardubice: Univerzita Pardubice, Katedra fyzikální chemie, 2010.
- [29] L. Vardiman: „The Mechanism of Ice Crystal Growth and the Theory of Evolution“, *The Second International Conference on Creationism*, Pittsburgh, USA, 1990.
- [30] T. Sei, T. Gonda a Y. Arima: „Growth rate and morphology of ice crystals growing in a solution of trehalose and water“, *Journal of Crystal Growth* 240, pp. 218 - 229, 2002.
- [31] Y. Teraoka, A. Saito a S. Okawa: „Ice crystal growth in supercooled solution“, *International Journal of Refrigeration* 25, pp. 218 - 225, 2002.
- [32] Y. Teraoka, A. Saito a S. Okawa: „Study on anisotropy of growth rate of ice crystal in supercooled water“, *International Journal of Refrigeration* 27, pp. 242 - 247, 2004.
- [33] I. Tarján a M. Mátrai: *Laboratory manual on crystal growth*, Budapest: Akadémiai Kiadó, 1972.
- [34] I. Braslavsky a S. G. Lipson: „The double-pyramid structure of dendritic ice growing from supercooled water“, *Journal of Crystal Growth* 198/199, pp. 56 - 61, 1999.
- [35] Y. Furukawa a W. Shimada: „Three-dimensional pattern formation during growth of ice dendrites - its relation to universal law of dendritic growth“, *Journal of Crystal Growth* 128, pp. 234 - 239, 1993.
- [36] K. Ohsaka a E. H. Trinh: „Apparatus for measuring the growth velocity of dendritic ice in undercooled water“, *Journal of Crystal Growth* 194, pp. 138 - 142, 1998.
- [37] B. Wowk: „Thermodynamic aspects of vitrification“, *Cryobiology*, 2009.
- [38] A. Lawson, H. Ahmad a A. Samba: „Cytotoxicity effects of cryoprotectants as single-component and cocktail vitrification solutions“, *Cryobiology* 62, pp. 115 - 122, 2011.

- [39] K. Tselutin, F. Seigneurin a E. Blesbois: „Comparison of Cryoprotectants and Methods of Cryopreservation of Fowl Spermatozoa“, *Poultry Science* 78, pp. 586 - 590, 1999.
- [40] H. Wang, S. Lu a Z. Lun: „Glass transition behavior of the vitrification solutions containing propanediol, dimethyl sulfoxide and polyvinyl alcohol“, *Cryobiology*, sv. 58, pp. 115 -117, 2009.
- [41] T. Gonda a T. Sei: „The inhibitory growth mechanism of saccharides on the growth of ice crystals from aqueous solutions“, *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials* 51, pp. 70 - 80, 2005.
- [42] A. M. Omran a C. J. King: „Kinetics of ice crystallization in sugar solution and fruit juices“, *AIChE Journal* 20, pp. 795 - 803, 1974.
- [43] G. Bryant, K. L. Koster a J. Wolfe: „Membrane behaviour in seeds and other systems at low water content: the various effects of solutes“, *Seed Science Research*, sv. 11, pp. 17 - 25, 2001.
- [44] A. Sikora, V. O. Dupanov, J. Kratochvíl a J. Zámečník: „Transition in aqueous solutions of sucrose at subzero temperatures“, *Journal of Macromolecular Science* 46, pp. 71 - 85, 2007.
- [45] J. Wolfe a G. Bryant: „Freezing, drying and/or vitrification of membrane-solute-water systems“, *Cryobiology*, sv. 39, pp. 103 - 129, 1999.
- [46] G. Blond, D. Simatos, M. Cat, C. G. Dussap a J. B. Gros: „Modeling of the water-sucrose state diagram below 0 °C“, *Carbohydrate Research* 298 , pp. 139 - 145, 1997.
- [47] E. Shalaev a F. Franks: „Equilibrium phase diagram of the water-sucrose-NaCl system“, *Thermochimica Acta* 255, pp. 49 - 61, 1995.
- [48] J. E. K. Schawe: „A quantitative DSC analysis of the metastable phase behavior of the sucrose–water system“, *Thermochimica Acta* 451 , p. 115 – 125, 2006.
- [49] M. Mathlouthi a P. Reiser: *Sucrose: Properties and Applications*, Glasgow: Blackie Academic and Professional, an imprint of Chapman and Hall, 1995.
- [50] H. D. Goff, E. Verespej a D. Jermann: „Glass transitions in frozen sucrose solutions are influenced by solute inclusions within ice crystals“, *Thermochimica Acta* 399 , p. 43 – 55, 2003.

- [51] A. P. MacKenzie: „Non-equilibrium freezing behaviour of aqueous systems“ ,*Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 278, pp. 167 - 189, 1977.
- [52] P. W. Wilson, A. F. Heneghan a A. D. J. Haymet: „Ice nucleation in nature: supercooling point (SCP) measurements and the role of heterogeneous nucleation“, *Cryobiology* 46, pp. 88 - 98, 2003.
- [53] K. F. Kelton a A. L. Greer: Nucleation in Condensed Matter: Applications in Materials and Biology, Elsevier, 2010.
- [54] R. J. Kirkpatrick: „Crystal Growth from the Melt: A Review“, *American Mineralogist* 60, pp. 798 - 814.
- [55] J. P. Hindmarsh, A. B. Russell a X. D. Chen: „Measuring dendritic growth in undercooled sucrose solution droplets“, *Journal of Crystal Growth* 285, pp. 236 - 248, 2005.
- [56] F. W. Kleinhans a P. Mazur: „Comparison of actual vs. synthesized ternary phase diagrams for solutes of cryobiological interest“, *Cryobiology* 54, p. 212 – 222, 2007.

OBSAH OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1: Závislost Gibbsovy energie na teplotě za konstantního tlaku</i>	15
<i>Obrázek 2: Závislost ΔG na velikosti zárodku za izotermních podmínek.....</i>	16
<i>Obrázek 3: Závislost ΔG na průměru nuklea pro homogenní a heterogenní nukleaci ..</i>	18
<i>Obrázek 4: Vznik zárodku nové fáze na cizím povrchu</i>	19
<i>Obrázek 5: Vztah mezi rychlostí nukleace a stupněm podchlazení</i>	20
<i>Obrázek 6: Schéma růstu krystalu mechanismem hranové a šroubové dislokace</i>	22
<i>Obrázek 7: Hexagonální struktura ledu a výsledný šestiúhelníkový hranol</i>	28
<i>Obrázek 8: Větvení při dendritickém růstu krystalu</i>	29
<i>Obrázek 9: DSC cyklický teplotní program</i>	34
<i>Obrázek 10: Schéma optického mikroskopu OLYMPUS BX51/BX52</i>	35
<i>Obrázek 11: Vyhřívací a chladičí systém THMS600/720</i>	36
<i>Obrázek 12: Temperační komora Linkam</i>	37
<i>Obrázek 13: Umístění sklíčka pro vzorek do temperační komory</i>	37
<i>Obrázek 14: Neizotermní a izotermní teplotní program při chlazení.....</i>	38
<i>Obrázek 15: Neizotermní a izotermní teplotní program při ohřevu</i>	39
<i>Obrázek 16: DSC záznam krystalizace a tání vodného roztoku sacharózy</i>	40
<i>Obrázek 17: DSC záznam krystalizace vzorku 1 a vzorku 2.....</i>	42
<i>Obrázek 18: Neizotermní hexagonální růst krystalu vody při $-24,1^{\circ}\text{C}$</i>	44
<i>Obrázek 19: Neizotermní hexagonální růst krystalů vody při $-30,8^{\circ}\text{C}$</i>	45
<i>Obrázek 20: Neizotermní růst sférických krystalů vody při -33°C.....</i>	46
<i>Obrázek 21: Neizotermní růst sférických krystalů vody při $-34,4^{\circ}\text{C}$</i>	47
<i>Obrázek 22: Neizotermní růst sférických krystalů vody při $-44,6^{\circ}\text{C}$</i>	48
<i>Obrázek 23: Neizotermní růst krystalu vody při $-42,1^{\circ}\text{C}$</i>	49
<i>Obrázek 24: Vyhodnocení průměru a délky krystalů.....</i>	50
<i>Obrázek 25: Grafická závislost velikosti krystalu na čase v režimu chlazení</i>	51
<i>Obrázek 26: Grafická závislost velikosti krystalu v režimu ohřevu.....</i>	51
<i>Obrázek 27: Polynomická regrese časové závislosti velikosti krystalu.....</i>	52
<i>Obrázek 28: Závislost rychlosti růstu na teplotě v režimu chlazení.....</i>	53
<i>Obrázek 29: Závislost rychlosti růstu na teplotě v režimu ohřevu</i>	54
<i>Obrázek 30: Růst krystalů vody za nízkých teplot v režimu chlazení</i>	55
<i>Obrázek 31: Izotermní růst dendritických krystalů vody při -33°C.....</i>	57

<i>Obrázek 32: Izotermní růst dendritického krystalu vody při -34°C</i>	58
<i>Obrázek 33: Izotermní růst hexagonálního krystalu vody při -23°C.....</i>	59
<i>Obrázek 34: Grafická závislost velikosti krystalu na čase (-23°C do -35°C)</i>	60
<i>Obrázek 35: Grafická závislost velikosti krystalu na čase (-37°C do -45°C)</i>	61
<i>Obrázek 36: Lineární regrese časové závislosti velikosti krystalu.....</i>	62
<i>Obrázek 37: Závislost růstu krystalů vody na teplotě pro izotermní měření.....</i>	62
<i>Obrázek 38: Odtávání zakrystalizovaného vzorku (-13°C až -10°C).....</i>	63
<i>Obrázek 39: Fázový diagram systému voda – sacharóza.....</i>	64
<i>Obrázek 40: Heterogenní nukleace vody ve vodném roztoku sacharózy.....</i>	65
<i>Obrázek 41: Homogenní nukleace vody ve vodném roztoku sacharózy.....</i>	66
<i>Obrázek 42: Závislost rychlosti růstu na teplotě pro dva typy nukleace</i>	68
<i>Obrázek 43: Závislost rychlosti růstu na podchlazení pro různé stáří vzorků</i>	71