MASARYKOVA UNIVERZITA
Přírodovědecká fakulta
Ústav chemie

Bakalářská práce

Brno 2021 Jan Duda

MASARYKOVA
UNIVERZITA
Přírodovědecká fakulta
Ústav chemie

Mrazení vodných roztoků – kvantifikace zvýšení lokální koncentrace

Bakalářská práce

Jan Duda

Vedoucí práce: doc. Mgr. Dominik Heger, Ph.D. **Brno 2021**

Bibliografický záznam

Autor:	Jan Duda Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Ústav chemie
Název práce:	Mrazení vodných roztoků – kvantifikace zvýšení lokální koncentrace
Studijní program:	Chemie
Studijní obor:	Chemie
Vedoucí práce:	doc. Mgr. Dominik Heger, Ph.D.
Akademický rok:	2020/2021
Počet stran:	44
Klíčová slova:	Led; Mrazení; Koncentrovaná vrstva; Methylenová modř; RGB; HSV

Bibliographic Entry

Author:	Jan Duda Faculty of Science, Masaryk University Department of chemistry
Title of Thesis:	Freezing of aqueous solutions – quantification of freezing induced increase in concentration
Degree Programme:	Chemistry
Field of Study:	Chemistry
Supervisor:	doc. Mgr. Dominik Heger, Ph.D.
Academic Year:	2020/2021
Number of Pages:	44
Keywords:	Ice; Freezing; Concentrated layer; Methylene blue; RGB; HSV

Abstrakt

Tato práce se zabývá zkoumáním změn lokální koncentrace, ke které dochází v průběhu mrazení vodných roztoků methylenové modře. Teoretická část se zabývá základními pojmy, které souvisí s touto tématikou a zároveň zkoumá možnosti, kde by se znalosti o lokálních změnách koncentrace během mrazení mohli uplatit jak v průmyslu, tak ve vědě. Praktická část pak pojednává o metodě zisku hodnot koncentrace z vodného roztoku pomocí extrahování RGB a HSV spekter z fotografií. Tato metoda umožňuje sledovat mrznoucí roztok a saturovanou vrstvu, která při mrznutí vzniká, při různých rychlostech mrazení. Poznatky z této práce pomohou poodhalit chování rozpuštěných látek ve vodných roztocích při jejich mrznutí. Práce je taktéž prvním krokem při aplikaci této metody na zamrznuté roztoky.

Abstract

This work deals with the investigation of changes in local concentration that occur during the freezing of aqueous solutions of methylene blue. The theoretical part deals with the basic concepts related to this topic and also examines the possibilities where knowledge about local changes in concentration during freezing could be applied in both industry and science. The practical part then deals with the method of obtaining concentration values from aqueous solution by extracting RGB and HSV spectra from photographs. This method makes it possible to monitor the freezing solution and the saturated layer formed during freezing at different freezing rates. The findings from this work will help to reveal the behavior of dissolved substances in aqueous solutions when they freeze. The work is also the first step in applying this method to frozen solutions.

MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KOTLÁŘSKÁ 2, 611 37 BRNO
IČ: 00216224
DIČ: CZ00216224

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Akademický rok: 2020/2021

Ústav:	Ústav chemie
Student:	Jan Duda
Program:	Chemie
Obor:	Chemie

Ředitel *ústavu* PřF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje bakalářskou práci s názvem:

Název práce:	Mrazení vodných roztoků – kvantifikace zvýšení lokální koncentrace
Název práce anglicky:	Freezing of aqueous solutions – quantification of freezing induced increase in concentration
Jazyk závěrečné práce:	čeština

Oficiální zadání:
Úkolem práce je studovat vodné roztoky v průběhu mrzutí, zejména zvýšení koncentrace, které zamrznutí doprovází. Toto bude umožněno pomocí methylenové modře, jejíž absorpční spektrum se mění s koncentrací. Práce bude zaměřena na kvantifikaci koncentrace methylenové modře z fotografií – získané hodnoty RGB budou srovnány s UV-Vis absorpčními spektry identických vzorků. Student se pokusí využít analýzu barev z fotografií k určení lokálních koncentrací ve zmrzlých vzorcích.

Vedoucí práce:	doc. Mgr. Dominik Heger, Ph.D.
Datum zadání práce:	12. 5. 2021
V Brně dne:	30. 7. 2021

Zadání bylo schváleno prostřednictvím IS MU.

Jan Duda, 12. 5. 2021
doc. Mgr. Dominik Heger, Ph.D., 12. 5. 2021
doc. Mgr. Marek Nečas, Ph.D., 12. 5. 2021

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat doc. Mgr. Dominikovi Hegerovi, Ph. D. za ochotu, pomoc a za odborné rady, které mi umožnili vypracovat tuto práci. Déle bych rád poděkovat naší vědecké skupině, zejména pak Radimovi Štůskovi, za poskytnutí svého skriptu na zpracování fotografií, přátelům a rodině. V neposlední řadě bych rád poděkoval své ženě Alexandře.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením vedoucího práce s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

Brno 16. srpna 2021 . . . . . .

Jan Duda

Obsah

Přehled použitého značení . . . . . **x**

Úvod **1**

1. Teoretická část **2**

1.1 Led 2

1.1.1 Základní a obecné info 2

1.2 Mrznutí vody 4

1.2.1 Počátek mrznutí 4

1.2.2 Rychlost mrazení 4

1.2.3 Vznikající led 5

1.2.4 Koncentrovaná vrstva 5

1.2.5 Definice 5

1.3 Význam studie koncentrované vrstvy 7

1.3.1 Lyofilizace 7

1.3.2 Freeze-casting 8

1.3.3 Uchovávání potravin pomocí mrazení 8

1.4 Methylenová modř jako indikátor koncentrace 9

1.5 RGB a HSV model 9

1.5.1 RGB model 9

1.5.2 HSV model 10

2. Experimentální část **11**

2.1 Příprava roztoků 11

2.2 Aparatura 11

2.3 UV-VIS spektra 12

2.4 Rychlost mrazení 14

2.4.1 Rychlost mrazení - experimentální 14

2.4.2 Rychlost mrazení - výpočet a srovnání s experimentem 17

2.5 RGB a HSV 18

2.5.1 Zisk RGB 18

2.5.2 Výpočet HSV 22

2.5.3 Kalibrační závislost 24

2.6 Koncentrovaná vrstva 25

2.6.1 Změny koncentrované vrstvy v průběhu mrznutí 26

2.7 Další poznatky a pozorování 30

2.7.1 Led bez methylenové modře 30
2.7.2 Změny koncentrace v blízkosti koncentrované vrstvy 30
2.7.3 Různá koncentrace methylenové modře v ledu 31
2.7.4 Bubliny methylenové modře 32
2.7.5 Mrznoucí čelo zblízka 33
2.7.6 "Primární a sekundární"mrznoucí čelo 34

Závěr **35**

Příloha **36**

Seznam použité literatury **41**

Přehled použitého značení

Pro snažší orientaci v textu zde čtenáři předkládáme přehled základního značení, které se v celé práci vyskytuje.

c	koncentrace
c_{kv}	koncentrace koncentrované vrstvy
c_{pr}	koncentrace původního roztoku
d	vzdálenost čela od dna kyvety
f	korekční faktor
H	odstín
Ih	led s hexagonální krystalickou strukturou
Ic	led s kubickou strukturou
K_{tci}	tepelná vodivost ledu
L	latentní teplo přeměny vody na led
v	rychlost mrazení
ρ_i	hustota ledu
S	saturace
T_0	teplota chladícího média
V	jas
x	tloušťka ledu

Úvod

Mrazení není pro nikoho nový pojem. S mrznutím se můžeme setkat jak v přírodě v podobě mrznutí vodních ploch, vznik krup, tak i v průmyslech jako je potravinářský a farmaceutický, nebo například ve výzkumu porézních materiálů. Přes fakt, že jsme tímto běžným procesem doslova obklopeni, nedá se tvrdit, že by všechny jeho náležitosti byly plně pochopeny. Úplná odpověď na to, co se děje s nečistotami a látkami obsaženými ve vodném roztoku při procesu mrazení, není zcela známa, přestože na toto téma bylo provedeno již mnoho studií. Při mrazení vodných roztoků vzniká led s kanálky a žílami, které jsou plné zakoncentrovaného roztoku, ve kterém se může začít měnit pH, iontová síla roztoku, viskozita a lokální koncentrace nečistot a rozpuštěných látek. Všechny tyto faktory pak mohou mít vliv na chemii vodných roztoků během mrazení. Koncentrace se však výrazně mění i během mrazení a to díky možnosti vzniku koncentrované vrstvy. Cílem této práce je opticky, pomocí kamery, a RGB analýzy roztoků methylénové modře charakterizovat koncentrovanou vrstvu, která se tvoří před postupující mrznoucím čelem ledu, a stanovit, jak se koncentrace této vrstvy mění s měnící se rychlostí mrazení.

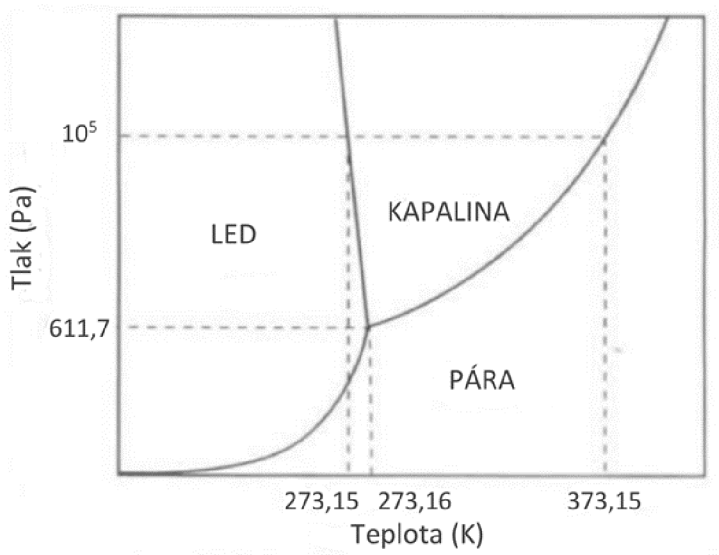
Teoretická část

1.1 Led

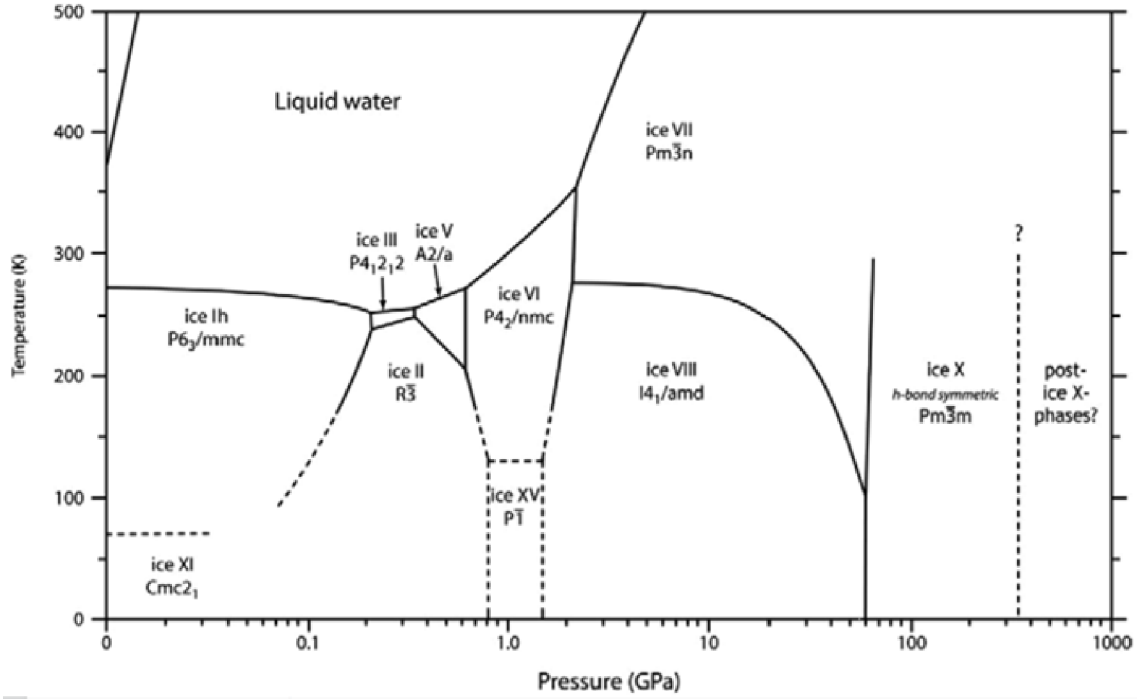
1.1.1 Základní a obecné info

Žijeme na planetě, která je pokryta ze 70 % vodou. Voda je tekutina, která stála u vzniku života a je nedílnou součásti všech živých organismů na Zemi. I přes jednoduchost molekuly vody a fakt, že v minulosti byla a stále je předmětem nesčetného množství studií, vykazuje voda množství anomálií, které nejsou vůbec, nebo jsou pouze částečně vysvětleny. Voda se vyskytuje na zemi ve třech skupenstvích: pevné, kapalné a plynné. Za atmosférického tlaku 611,7 Pa při 0,01 °C koexistuje ve všech těchto třech skupenstvích. [1]

Fázový diagram pro rovnovážný stav mezi ledem, vodou a párou je ilustrován na Obrázcích 1.1, 1.2. Pevné skupenství vody projevuje takzvaný polymorfismus, to je vlastnost látky krystalizovat v mnoha krystalických fázích. V současnosti je známých 20 krystalických fází ledu. [2] Krom polymorfismu vykazuje voda i polyamofismus, tvoří totiž tři amorfní fáze, které jsou ale nestabilní. [3]

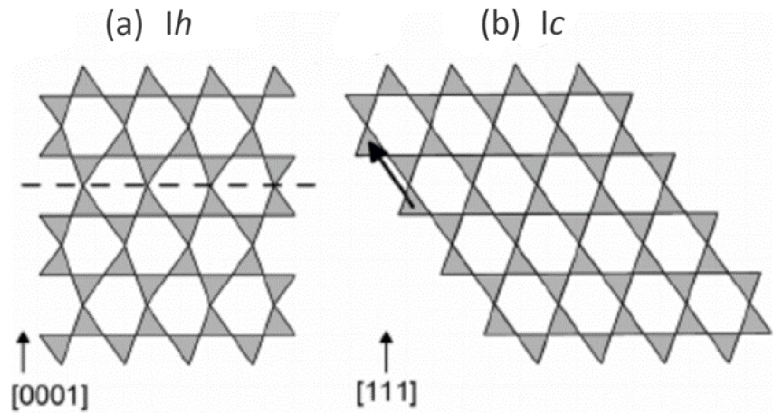


Obrázek 1.1: Fázový diagram vody. [1]



Obrázek 1.2: Fázový diagram stabilních fází ledu. Metastabilní a amorfní fáze nejsou součástí tohoto diagramu. [3]

Na Zemi se však ze všech možných krystalických ledů nachází pouze hexagonální led (I*h*) a led kubický (I*c*) (Obrázek 1.3). [4] Led hexagonální je stabilní a pokud mrzne voda za normálních podmínek vzniká právě on a tvoří tedy naprostou většinu ledové masy na Zemi. Led kubický je metastabilní a existuje jen za speciálních podmínek. I*c* najdeme například v mracích nebo v malém množství v ledu hexagonálním. Metastabilní vlastnosti kubického ledu jsou experimentálně vysvětleny faktem, že led hexagonální je více energeticky stabilní. Je ale také potvrzeno, že led kubický přednostně krystalizuje z metastabilních ledů vytvořených vysokým tlakem, pokud je za nízké teploty tlak, který na ně působí, snížen. [3]



Obrázek 1.3: Struktura hexagonálního (I*h*) a kubického (I*c*) ledu. [5]

1.2 Mrznutí vody

Voda mrzna za normálního atmosférického tlaku při teplotě 0 °C. Za těchto podmínek nastává rovnováha a změny Gibbsovy energie je rovna nule. Změna entropie je pak při přechodu z kapalné vody má zápornou hodnotu 22,0 J/K mol, indikující změnu z méně uspořádaného systému na více uspořádaný. V tomto okamžiku se mohou molekuly vody k sobě přiblížit, vhodně natočit a může začít vznik krystalické struktury ledu. Přimět vodu, aby krystalizovala při 0 °C však nemusí být úplně tak jednoduché, přestože molekuly mají vhodné podmínky a kapalná fáze je v rovnováze s pevnou. To, jestli se molekuly vhodně natočí a vytvoří prvotní krystalizační centrum, ze kterého začne růst krystal ledu, je náhodný neboli stochastický proces. Pravděpodobnost vzniku krystalizačního centra můžeme ovlivnit hned několika způsoby.

1.2.1 Počátek mrznutí

Podchlazení

První způsob je vodu ochladit pod bod mrazu. Voda se stane metastabilní a bude takzvaně podchlazená. Pravděpodobnost náhodné krystalizace se zvýší. Rekordní teplota, při které byla voda stále pozorována v kapalném stavu je -48,3 °C, kdy nastane homogenní krystalizace. [6, 7]

Objem vody

Další možností je navýšení objemu kapaliny. Čím větší je počet molekul, tím je statisticky vyšší šance, že se některé z nich spojí v krystal. [7] Objem kapaliny je problematický hlavně v laboratořích, kde se často využívá malých objemů. Kyvety mohou při teplotě blízké k nule mrznout i několik hodin. Pokud je třeba, aby voda vykrystalizovala při určitém podchlazení, nebo není žádoucí čekat na spontánní krystalizace, používá se třetí způsob, takzvané očkování.

Očkování

Očkování z (angl. seeding) je proces, kdy se do podchlazené vody vpraví kousek ledu, který způsobí, že se molekuly vody v jeho bezprostřední blízkosti stanou jeho součástí a voda začne krystalizovat. Krystalizaci mohou způsobit i nečistoty nebo škrábance na vnitřní straně nádoby, ve které má voda zmrznout.

1.2.2 Rychlost mrazení

Společně s utvořením prvotního krystalizačního centra vzniká i mrznoucí čelo. Na jedné straně tohoto čela nalezneme přibývající led a na straně druhé pak ubývající vodu. Rychlost, jakou toto čelo postupuje vodou se nazývá rychlost mrazení a je definována jako vzdálenost, kterou mrznoucí čelo urazí za jednotku času. Tato definice ale není uniformní napříč literaturou. Například v některých studiích je rychlost mrazení definována jako čas, za který spontánně zmrzne definované množství makroskopicky totožných vzorků, [8] jinde je rychlost mrazení zaměňována s rychlostí chlazení, která je nejčastěji definována jako záporná změna teploty za jednotku času. Fakt, že neexistuje globální definice pro rychlost mrazení pak značně komplikuje bádání.

Teplota chladícího média se dá vypočítat podle rovnice:

$$T_0 = -\frac{\rho_i}{K_{tci}} L v x, \tag{1.1}$$

ze které můžeme vyjádřit rychlost mrazení:

$$v = -\frac{T_0 K_{tci}}{Lx\rho_i}, \tag{1.2}$$

kde T_0 je teplota chladícího média, které je v kontaktu s vodou, ρ_i je hustota ledu, K_{tci} je tepelná vodivost ledu, L je latentní teplo přeměny vody na led, v je rychlost mrazení a x je tloušťka ledu nebo také vzdálenost mezi místem styku chladícího média s vodou a mrznoucím čelem.

Pomocí této rovnice může také vypočítat, jak se musí měnit s rostoucím ledem teplota chladícího média, aby byla rychlost mrazení v průběhu mrznutí vody konstantní. [9]

1.2.3 Vznikající led

Led, který vzniká desublinací vodní páry, většinou tvoří jednotlivé krystaly ve formě vloček, jehliček nebo destiček v závislosti na podmínkách. [10] Ve vodě nebo ve vodném roztoku však voda krystalizuje téměř výhradně jako polykrystalická struktura.

Při mrznutí vody nebo vodných roztoků se molekuly vody uspořádávají do krystalů ledu. Krystaly ledu obsahují z většiny molekuly vody a veškeré nečistoty, ionty nebo rozpuštěné látky jsou z nich při vzniku vytlačeny. Můžeme se na tento proces dívat tak, že z roztoku odebíráme rozpouštědlo – vodu. Odebráním rozpouštědla se pak zvyšuje koncentrace nečistot, iontů a rozpuštěných látek v blízkosti mrznoucího čela a vzniká tekutá koncentrovaná vrstva těsně před postupujícím mrznoucím čelem. V rostoucí polykrystalické struktuře ledu, je pak každý krystal ze všech stran „omýván“ touto koncentrovanou kapalinou, která tvoří komplikovanou síť kanálků a žil. [11] Roztok v žilách a kanálcích má díky vysokým koncentracím látek jiné jak chemické, tak fyzikální vlastnosti a nezamrzá až do dosažení takzvané eutektické teploty, která je nižší než teplota tuhnutí původního roztoku.

Povrch mrznoucího čela a míra podchlazení roztoku

Povrch mrznoucího čela je úzce spojen s rychlostí mrazení. Při nízkých rychlostech mrazení okolo 0,06 μm/s vzniká planární led a mrznoucí čelo se jeví být hladké. [12] Při navýšení rychlosti mrznutí se začnou tvořit podlouhlé ledové krystaly kolmo na směr mrznutí. Vzniká tak laminární led, jehož mrznoucí čelo již není hladké a nachází se na něm dendritické útvary. Dalším navýšením rychlosti mrazení se mrznoucí čelo stává nestabilním a je pokryto nehomogenními dendrity. Krystalická struktura vznikajícího ledu již není pravidelná a vzniká větší množství malých ledových krystalů v porovnání s planárním nebo laminárním růstem. [9] Pokud znovu zvýšíme rychlost mrazení mrznoucí čelo se stane silně nestabilním a na jeho povrchu se objeví viditelné jehličky, fraktální útvary z jehel nebo komplexní větvené jehličky. Mrznoucí čelo musí v těchto případech dosahovat vysokých rychlostí v řádech cm/s. Těchto rychlostí se dá dosáhnout podchlazením roztoku. Čím více je kapalina podchlazená, tím rychleji se při jejím mrznutí pohybuje mrznoucí čelo. [13, 14, 15]

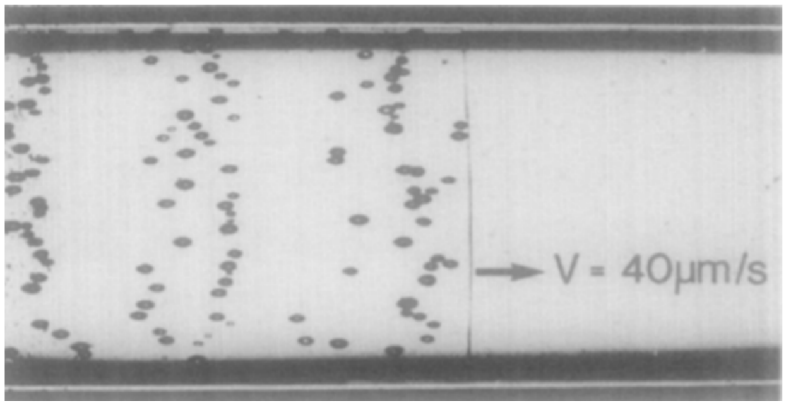
1.2.4 Koncentrovaná vrstva

1.2.5 Definice

Podstatou jejího vzniku je velká neochota látek se zabudovat do krystalů ledu. Koncentrace nečistot, iontů a rozpuštěných látek před mrznoucí vrstvou je vyšší než ve zbytku roztoku.

Vznik bublinek

Bublinky v ledu jsou velmi dobrým příkladem existence koncentrované vrstvy. Vznik bublin při mrznutí vody je možný díky tomu, že se ve vodě nachází rozpuštěný vzduch. Pokud se mrznoucí čelo pohybuje kapalinou dostatečně velikou rychlostí, koncentrace rozpuštěného vzduchu před ní se bude s časem zvyšovat. Konvekce a difuze nestačí na to, aby bylo koncentrace rozpuštěného vzduchu v koncentrované vrstvě držela pod kritickou hodnotou. Jakmile koncentrace rozpuštěného vzduchu v koncentrované vrstvě dosáhne této kritické hodnoty, vytvoří se bublinky. Větší část těchto bublin je následně obklopena rostoucím ledem a stávají se jeho součástí. Tvar bublinek v ledu je závislý na rychlosti mrazení. Při nízkých rychlostech mrazení je větší tendence tvořit protáhlé válcovité bubliny, při vyšších rychlostech pak vznikají menší bubliny kapkovitého tvaru. [9] Bublinky také mohou od mrznoucího čela uniknout. Při vzniku bublin se koncentrace vzduchu v koncentrované vrstvě sníží a další vlna bublin se nevytvoří, dokud koncentrace vzduchu ve vrstvě znovu nedosáhne kritické hodnoty viz Obrázek 1.4. Celý proces se periodicky opakuje. Ve struktuře vzniklého ledu jsou pak patrná místa s velkou koncentrací bublinek a místa takřka bez nich. Může také nastat případ, kdy se mrznoucí čelo pohybuje velmi pomalu. Difuze s konvekcí stačí snižovat lokální koncentraci rozpuštěného vzduchu a drží jí pod kritickou hodnotou po celou dobu mrznutí. Vzniklý led je pak čirý a zcela bez bublinek. [16, 17]



Obrázek 1.4: Vznik bublinek v ledu v souvislosti se změnou koncentrace rozpuštěného vzduchu v koncentrované vrstvě. [17]

Složení plynů uvnitř bublin závisí na tom, které plyny jsou rozpuštěny v původním vodném roztoku před zmrazením. V některých případech je ale také nutné brát v potaz chemické reakce, které mohou nastat při mrznutí roztoků. Příkladem takového jevu je vysrážení $CaCO_3$ z roztoku Ca^{2+} a HCO^{3-}, které je spojeno s tvorbou CO_2. Lokální koncentrace oxidu uhličitého v koncentrované vrstvě rapidně stoupne a vytvoří se bublinky, ve kterých je veliký podíl oxidu uhličitého oproti dalším plynům. [9]

Sledování koncentrované vrstvy elektromagnetickou metodou

Z ledových krystalků se při jejich vniku vytlačují kromě ostatních látek i ionty obsažené v původním vodném roztoku. Mezi vznikajícím ledem a tekutým roztokem obsahující ionty se vytvoří elektrický potenciál (také mrznoucí potenciál), který může dosahovat až stovek voltů. Tento jev se nazývá Workman – Reynoldsův efekt. [18, 19] Efekt je převážně dán rozpustností iontů v krystalické mřížky ledu, a schopností jejich difuze. [20] Měřením mrznoucího potenciálu umožňuje jak nepřímo pozorovat pozorovat koncentrovanou vrstvu, tak zkoumat povrch mrznoucího čela a útvary na něm vzniklé v průběhu mrazení. [13]

1.3 Význam studie koncentrované vrstvy

Jak bylo již zmíněno, při mrznutí vodných roztoků vzniká těsně před postupující mrznoucím čelem koncentrovaná vrstva. Koncentrace rozpuštěných látek a nečistot je v této vrstvě vyšší než v ještě nezmrznutém roztoku a tato zvýšené koncentrace úzce souvisí s rychlostí mrazení. Studium této vrstvy je důležité jak pro pochopení toho, zda látky v této vrstvě mohou podstoupit během mrznutí chemické změny nebo změnu skupenství, [9] tak pro pochopení podmínek panujících v žilách ledu, které jsou tvořené ještě více koncentrovaným roztokem, než se nachází v koncentrované vrstvě. Mrazení a s ním i neodmyslitelný vznik koncentrované vrstvy se běžně používá při lyofilizaci, uchovávání potravin, nebo například při výzkumu porézních materiálů.

1.3.1 Lyofilizace

Lyofilizace je proces, který využívá fyzikálního jevu sublimace k uchovávání farmaceutik, proteinů a jiných biomolekul. Sublimace je děj, při kterém se voda přímo přechází z pevné fáze na plynnou bez toho, aby roztála a stala se kapalnou. [21] Přesto, že se jedná o relativně nákladný a zdlouhavý proces, více něž 50 % farmaceutik je zpracováno právě tímto způsobem. [21] Celý proces je možné rozdělit na tři kroky:

Mrazení

Koncept zmrazení vzorku k následnému sušení se zdá jednoduchý, ve skutečnosti se ale jedná o nejkomplexnější krok. Podle toho, jak rychle materiál mrzne, buď tvoří malé nebo velké krystalky ledu obklopené hustou nebo řídkou sítí žil. Malé krystaly s hustou sítí zpomalují následné sušící kroky, velké krystaly a řídká síť mohou mít za následek nestabilitu vysušeného produktu tzv. „koláče“. Případný kolaps koláče má za následek jeho znehodnocení. [21, 22] Pro každou látku je tedy nutné najít optimální rovnováhu mezi rychlostí lyofilizačního procesu a stabilitou suchého produktu.

Při mrazení je také třeba si dávat pozor na případné změny pH. Zakoncentrovaný roztok nacházející se v žilách a v koncentrované vrstvě může v závislosti na rozpuštěných látkách projevovat značně odlišné pH od původního roztoku. [19, 23]

Tato změna pak může mít za následek nevratnou deaktivaci vysušované látky. Aby se pH v žilách a při mrznutí zůstalo v optimálním rozmezí, přidávají se do roztoků s lyofilizovanou látkou navíc pH tlumiče, tedy látky, které při zmrazení podstupují známou pH změnu. [24, 25] Kromě pH tlumičů se do směsí mohou přidávat i další látky zlepšující stabilitu výsledného produktu. [22]

Primární sušení

Primární sušení je krok, při kterém probíhá samotná sublimace. Je nutné, aby po celou dobu tohoto kroku byla teplota vzorků nižší než teplota eutektická. Tlak v lyofilizační komoře se sníží, aby sublimace mohla probíhat. Odstraňování vody ze sušených vzorků je zprostředkováno pomocí koncentračního gradientu vody mezi vysychajícími vzorky a kondenzátorem. Sublimace je endotermní proces, proto jsou v tomto kroku vzorky lehce zahřívány tak, aby se drželi pod eutektickou teplotou po celou dobu primárního sušení. [21]

Sekundární sušení

V tomto kroku jsou vzorky vysoušeny desorpcí vody až do finální vlhkosti mezi 0,5 % až 5 % vody z celkové hmotnosti. [21]

Podrobnější chápání chemie v koncentrované vrstvě a žilách ledu by mohlo umožnit lyofilizaci většího množství biologických látek, rychlejší proces lyofilizace, snížení šance na denaturaci látek a s tím vším spojené snížení nákladů.

1.3.2 Freeze-casting

Metoda freeze-casting slouží ke tvorbě porézních materiálů takzvanou mokrou cestou. Základem této metody je stabilní suspenze pevných částic, které podstupuje proces mrznutí, při kterém ledové krystaly tlačí částice před sebou. Ze vzniklé zamrzlé struktury je poté sublimací pod vakuem odstraněna voda. [26, 27] V principu má metoda freeze-casting mnohé společného s lyofilizací, avšak u freeze-castingu není kladen důraz na uchovávání biologických materiálů, ale na produkci stálé a přesně definované porézní struktury. Počátkem freeze-casting metody je suspenze pevných částic. Ta musí být stabilní, aby nedocházelo k sedimentaci částic během mrazení a k narušování jinak pravidelné struktury. Proto se do suspenze přidávají surfaktanty a stabilizátory, které zlepšují její vlastnosti. Suspenze se poté mrazí dvěma způsoby, každý z nich má za následek vznik odlišné porézní struktury. Pokud je suspenze chlazena ze všech stran stejně, zárodečné krystaly mohou vznikat v celém objemu a tvoří se homogenní buněčná struktura. Suspenzí chlazenou jen z jedné strany postupuje mrznoucí čelo a tvoří se lamelární struktury. [26, 27] Podmínky mrazení je pouze jeden z mnoha faktorů, které ovlivňují strukturu objektů vzniklých touto metodou. Mezi další patří například aditiva upravující strukturu, kolik procent z objemu suspenze zabírají pevné částice, rychlost mrazení a velikost částic v suspenzi. [12, 26, 27]

1.3.3 Uchovávání potravin pomocí mrazení

Jedním z nejběžnějších způsobů jak uchovávat potraviny je pomocí jejich zmrznutí. Degradační procesy, jako jsou například proteolýza, oxidace, denaturace tuků a bílkovin, jsou za nízkých teplot zpomaleny, ale nikdy nejsou zcela zastaveny. Bakterie a mikroby se přestávají množit kolem teploty -18 °C, je ale nutné dodat, že k usmrcení je často třeba mnohem nižší teplota, nebo použití jiných procesů před samotným mrazením například pasterizace. [28, 29] Existují 3 možnosti, jak zamrazit potraviny a to pomocí zchlazených kovových plátů, které jsou v přímém kontaktu s potravinou, nebo pomocí lázní, které obsahují aditiva pro snížení bodu krystalizace, a nakonec pomocí zchlazeného plynu. Mrazení spolu nese i velkou řadu negativních aspektů, které nepříznivě ovlivňují kvalitu uchovávaného výrobu. Hlavními faktory jsou tvorba krystalů a vznik zakoncentrovaného roztoku. K potlačení těchto i jiných negativních vlivů je možné používat aditiva, ty ovšem nesmí nijak měnit chuť, vůni a vzhled rozmrazeného produktu, nebo nějakým jiným způsobem maskovat degradační procesy, které v něm mohou probíhat.

Vliv rychlosti mrazení

Rychlost jakým se tvoří ledové krystaly a s tím spojená i jejich velikost významně mění to, jaké vlastnosti bude mít produkt po roztání. Pro příklad budeme uvažovat mrznutí buněčného materiálu. Pokud ho budeme chtít zamrazit pomalu, krystaly ledu se bude nejprve tvořit tam, kde je nejmenší koncentrace solí, tedy vně buněk. Mezi těmito krystaly budou vznikat kanálky s silně koncentrovaným roztokem. Osmotický tlak mezi vně a uvnitř buňky se stane natolik silným, že voda z buňky bude vnikat do okolí. Buňka tedy ztrácí vodu a smršťuje se. Tento proces je částečně reverzibilní při opatrném rozmrazení. Krystaly mohou v tomto případě také poškodit membrány buňky, která nevratně ztratí vodu. Po poškození buňky může dojít k dalším jevům, například ke vzniku nežádoucích reakcí z důvodu vylití enzymů z buňky. [28, 29]

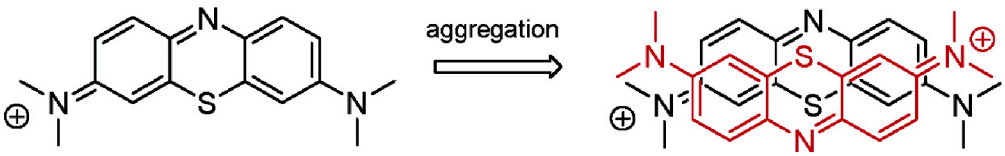
Při rychlém mrazení vznikají četné malé krystaly a to vně i uvnitř buněk najednou. To zamezuje osmotickému proudění vody z buňky a malé krystaly jsou mnohem šetrnější k blanám a biologickým stěnám v buňce. Pro drtivou většinu mrazením zpracovaných produktů je tedy vhodnější rychlé mrazení. [28, 29]

Bližší studium by mohlo pomoci při vývoji nových aditiv, která by mohla snížit náklady na vývoj metod mrazení jednotlivých druhů potravin, snížit procento produktů, které neprojdou kontrolou kvality, lépe kompenzovat ztrátu vody a struktury zmrazeného jídla, prodloužit jeho životnost jak v přepravě, tak v obchodech a tím i omezit vyhazování nespotřebovaného jídla.

1.4 Methylenová modř jako indikátor koncentrace

Methylenová modř je modrá krystalická látka, která je relativně dobře rozpustná ve vodě. Je hojně využívána v lékařství nejčastěji jako marker tkání a orgánů, [30] ale také jako pomocná látka při léčbě dermatologických onemocnění, [31] k detekci lymfatických uzlů napadnutelných rakovinou, [30] nebo jako potenciální antimalarikum [32]. Methylenová modř má ve vodné roztoku při vyšších koncetracích tendenci tvořit dimery a trimery. Tento fakt značně komplikuje určení její přesné koncentrace v roztoku pomocí UV-VIS spektrometrie [33, 34], protože píky monomeru, dimeru a oligomerů methylenové modré nejsou dostatečně rozlišeny. Mechanismus agregace methylenové modře viz Obrázek 1.5.

V této studii byla použita methylenová modř jako indikátor koncentrace vodných roztoků a to hlavně díky její dobré rozpustnosti a možnosti připravení široké koncentrační škály. Roztoky methylenové modré jsou v našem případě zkoumány pomocí fotografií, ze kterých jsou následně extrahována RGB a HSV spektra. To umožňuje jednodušší určení koncentrace a zároveň nepřetržité studium těchto roztoků během mrznutí.



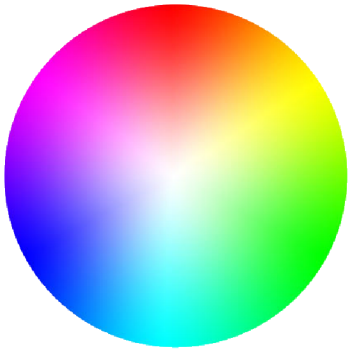
Obrázek 1.5: Schéma agreagace monomeru methlenové modře na její dimer. [33]

1.5 RGB a HSV model

1.5.1 RGB model

RGB je jedním z mnoha modelů, které popisují barvy okolo nás. Každá barvu popsaná pomocí RGB modelu je ve skutečnosti dána třemi barevnými kanály: červený, zelený a modrý (z angl. red, green, blue). Každý kanál je reprezentovaný číselnou hodnotou od 0 do 255. Kombinací hodnot v jednotlivých kanálech vznikají barvy a odstíny. Barvy v RGB modelu jsou míchány takzvaně aditivně. To znamená, že smícháním všech tří barev vznikne bílá barva nebo její odstín. Aditivní charakter RGB je znázorněn v Obrázku 1.6. Čím větší je hodnota kanálu jedné z barev, tím více je barva zastoupená ve finální barvě a tím sytější se stává. Pro příklad: RGB kód 0, 255, 0 náleží zelené barvě; 255, 255, 255 bílé; 0, 0, 0 pak barvě černé. [35]

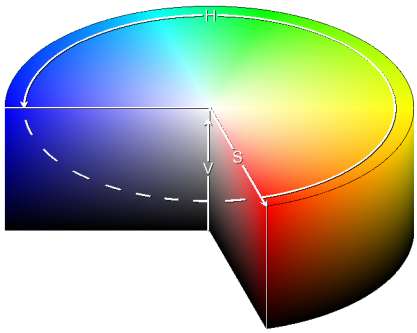
RGB model se hojně používá v moderních zobrazovacích technologiích, kde hodnoty z jednotlivých kanálů řídí intenzitu záření subpixelů v pixelech, nebo v nahrávacích zařízeních, jako jsou digitální kamery.



Obrázek 1.6: Schéma RGB modelu. [36]

1.5.2 HSV model

HSV pro člověka uchopitelnější než RGB, protože se dá snadno zobrazit v prostoru v podobě válce. Stejně jako RGB obsahuje tři složky: H - odstín (z angl. hue) reprezentuje barvu a to jak základní modrou, zelenou a červenou, tak i přechodové barvy, které vznikají na hranicích mezi dvěma základními barvami. Hodnota H je vyjádřena ve stupních od 0 do 360. S saturace (z angl. saturation) ukazuje, jak moc je barva saturovaná a vyjadřuje od 0 % do 100 %. V - jas (z angl. value) říká, jak světlá má barva být s stejně jako *S* je vyjádřena procenty. HSV válec a to, jak jeho jednotlivé komponenty ovlivňují výslednou barvu, je vyobrazen na Obrázku 1.7. [37]



Obrázek 1.7: Schéma HSV modelu. [37]

Pro lepší pochopení HSV spektra uvádím příklady barev: Sytá zelená barva má hodnotu HSV 120, 100, 100, bílá barva má kód 0, 0, 100 a barva černá pak 0, 0, 0.

Experimentální část

2.1 Příprava roztoků

Celkem bylo připraveno 40 roztoků methylenové modře. Nejkoncentrovanější roztok byl označen jako **MB 1** ($5,0 \times 10^{-3}$ mol/l), nejméně koncentrovaný jako **MB 40** ($2,0 \times 10^{-7}$ mol/l) viz Tabulka 2.2. Škála této koncentrace byla zvolena tak, aby odpovídala některým předchozím studiím. [33]

Tabulka 2.2: Seznam připravených roztoků s jejich označením a koncentrací.

Roztok	Koncentrace (mol/l)	Roztok	Koncentrace (mol/l)	Roztok	Koncentrace (mol/l)	Roztok	Koncentrace (mol/l)
MB 1	$5{,}0 \cdot 10^{-3}$	MB 11	$0{,}4 \cdot 10^{-3}$	MB 21	$0{,}3 \cdot 10^{-4}$	MB 31	$0{,}2 \cdot 10^{-5}$
MB 2	$4{,}0 \cdot 10^{-3}$	MB 12	$0{,}3 \cdot 10^{-3}$	MB 22	$0{,}2 \cdot 10^{-4}$	MB 32	$0{,}1 \cdot 10^{-5}$
MB 3	$3{,}0 \cdot 10^{-3}$	MB 13	$0{,}2 \cdot 10^{-3}$	MB 23	$0{,}1 \cdot 10^{-4}$	MB 33	$0{,}9 \cdot 10^{-6}$
MB 4	$2{,}0 \cdot 10^{-3}$	MB 14	$0{,}1 \cdot 10^{-3}$	MB 24	$0{,}9 \cdot 10^{-5}$	MB 34	$0{,}8 \cdot 10^{-6}$
MB 5	$1{,}0 \cdot 10^{-3}$	MB 15	$0{,}9 \cdot 10^{-4}$	MB 25	$0{,}8 \cdot 10^{-5}$	MB 35	$0{,}5 \cdot 10^{-6}$
MB 6	$0{,}9 \cdot 10^{-3}$	MB 16	$0{,}8 \cdot 10^{-4}$	MB 26	$0{,}7 \cdot 10^{-5}$	MB 36	$0{,}6 \cdot 10^{-6}$
MB 7	$0{,}8 \cdot 10^{-3}$	MB 17	$0{,}7 \cdot 10^{-4}$	MB 27	$0{,}6 \cdot 10^{-5}$	MB 37	$0{,}5 \cdot 10^{-6}$
MB 8	$0{,}7 \cdot 10^{-3}$	MB 18	$0{,}6 \cdot 10^{-4}$	MB 28	$0{,}5 \cdot 10^{-5}$	MB 38	$0{,}4 \cdot 10^{-6}$
MB 9	$0{,}6 \cdot 10^{-3}$	MB 19	$0{,}5 \cdot 10^{-4}$	MB 29	$0{,}4 \cdot 10^{-5}$	MB 39	$0{,}3 \cdot 10^{-6}$
MB 10	$0{,}5 \cdot 10^{-3}$	MB 20	$0{,}4 \cdot 10^{-4}$	MB 30	$0{,}3 \cdot 10^{-5}$	MB 40	$0{,}2 \cdot 10^{-6}$

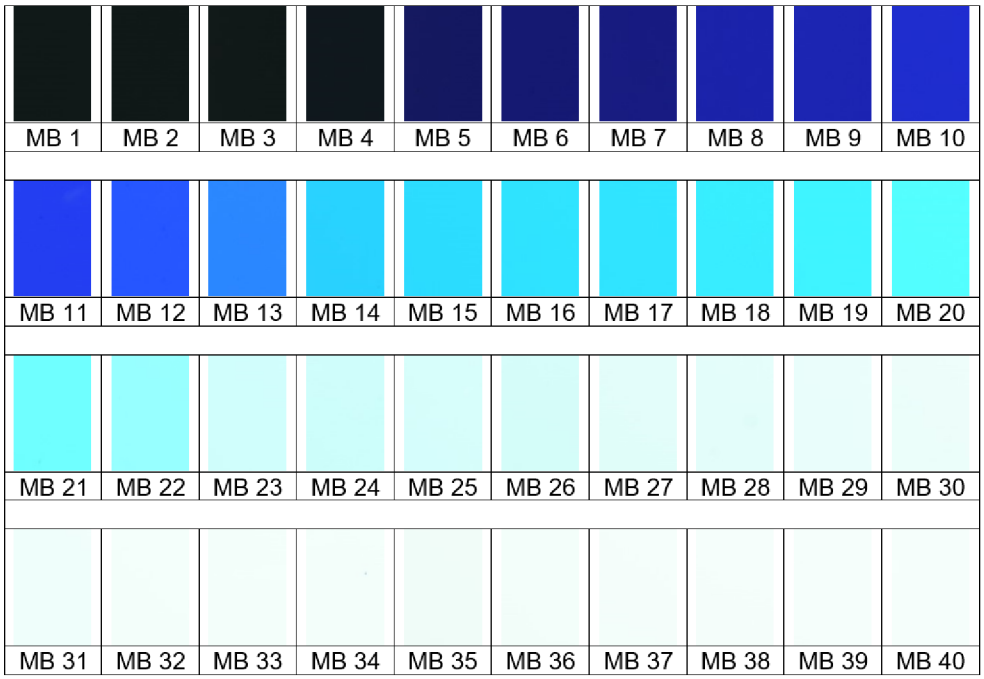
Při výběru koncentrace roztoků byla zároveň vzata v potaz jejich průsvitnost v 1 cm kyvetě. Pokud světlo z osvětlení nedokáže projít kyvetou a dostatečně nasvítit roztok uvnitř, fotka roztoku se pak jeví jako černá a nedají se z ní získat užitečná data. Více koncentrované roztoky by bylo možné sledovat pomocí užší kyvety, zředěné roztoky by se ale pak staly nedetekovatelnými. U širší kyvety by tomu bylo naopak. Řada fotografií roztoků je zobrazena v Tabulce 2.3.

Veškeré roztoky methylenové modré, včetně zásobního roztoku, byly před každým experimentem čerstvě připraveny, aby jejich stáří nebylo více než pár hodin. Methylenová modrá má totiž tendenci ulpívat na skle a to i za laboratorní teploty. [38] Z toho důvodu by staré a dlouho stojící roztoky mohli mít nepříznivý vliv na koncentraci roztoků, na přesnost kalibrační závislosti a následující měření. Methylenová modř používaná v této práci byla dodána firmou Alfa Aesar LOT:03/0611.

2.2 Aparatura

K zachycení fotografií a videozáznamů roztoků byl použit fotoaparát *NIKON D5100 DSLI* s objektivem *Tamron 90mm f/2.8 SP AF Di Macro Lens* připevněná na stativ. Obrázky byly pořízeny ve formátu JPEG s 4k rozlišením, citlivost ISO byla nastavena na konstantních 160, clonové číslo na 8 a vyvážení bílé bylo vypnuto. Videa pro určení rychlosti mrazení byla natáčena v rozlišení

Tabulka 2.3: Fotografie jednotlivých roztoků.



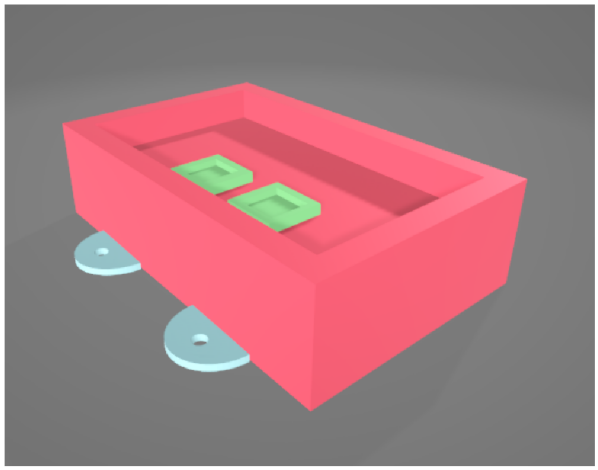
1080p frekvencí 30 FPS. Fotoaparát *NIKON D5100 DSLI* nenabízí další nastavení v režimu videozáznamu, to znamená že citlivost ISO a další nastavení se během natáčení videa automaticky mění.

Pro vhodné a konstantní nasvícení vzorků byla použita světelná komora *Foldio2 Plus* s bílím pozadím. Komora je vybavena třemi LED pásky o celkovém výkonu 32,4 W. Barva emitovaná LED pásky je bílá s teplotou 5700 K. Během focení a natáčení, byl zabudovaný regulátor intenzity světla nastaven na maximální výkon.

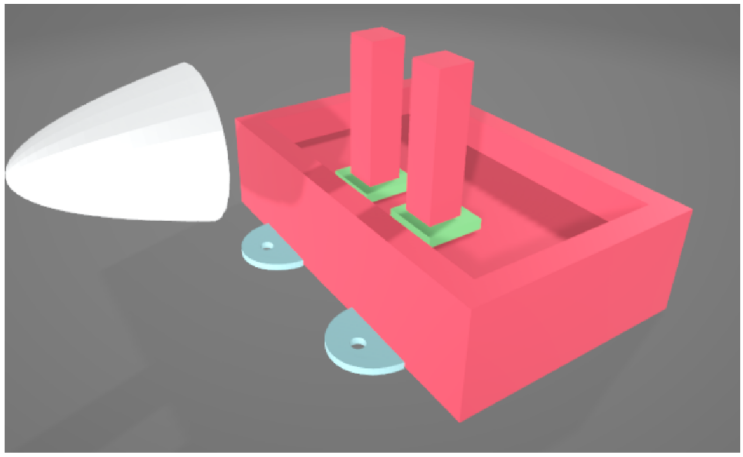
Roztoky byly snímány v kyvetách s vnitřními rozměry 1 x 1 x 4,5 cm vyrobených z opticky čistého polystyrenu. Pro uchycení kyvet byl navržen a na 3D tiskárně vytisknut držák viz Obrázek 2.1. V držáku se nachází dvě čtvercoví štěrbiny pro kyvety. Jedna z kyvet je kyveta s roztokem a ta druhá obsahuje milimetrové měřítko, které umožňuje určit rychlost mrznoucího čela z videozáznamu. Kamera je situována kolmo na přední strany kyvet viz Obrázek 2.2. Dno horní části držáku je zapuštěno přesně 1 cm do základny, to tvoří rezervoár, do kterého se dá nalít tekutý dusík, ethanol se suchým ledem popřípadě i jiné chladící médium. V průběhu mrazení jsou kyvety s roztoky ponořeny vždy maximálně 1 cm do chladícího média, nadbytečné množství chladícího média jednoduše přeteče přes okraj držáku do polystyrenové nádoby. Hladina chladícího média byla během experimentu kontrolována a pokud je třeba tak i v pravidelných intervalech doplňována, aby byla zajištěna konstantní výška hladiny.

2.3 UV-VIS spektra

US-VIS spektra roztoků **MB 1** až **MB 27** byla pořízena v kyvetách s optickou dráhou 0,01 cm (**MB 1** - **10**), 0,1 cm (**MB 11** - **20**) a 1 cm (**MB 21** - **27**) spektrometrem *Cary 5000 UV-Vis-NIR*. Spektra zbylých roztoků byli získány v kyvetě s optickou dráhou 5 cm spektrometrem *Cintra 2020*. Spektrometr Cintra byl použit z důvodu snadného uchycení zmíněné 5 cm kyvety. Každý roztok, včetně slepých vzorků, byl měřen třikrát. Od spekter jednotlivých roztoků bylo odečteno spektrum

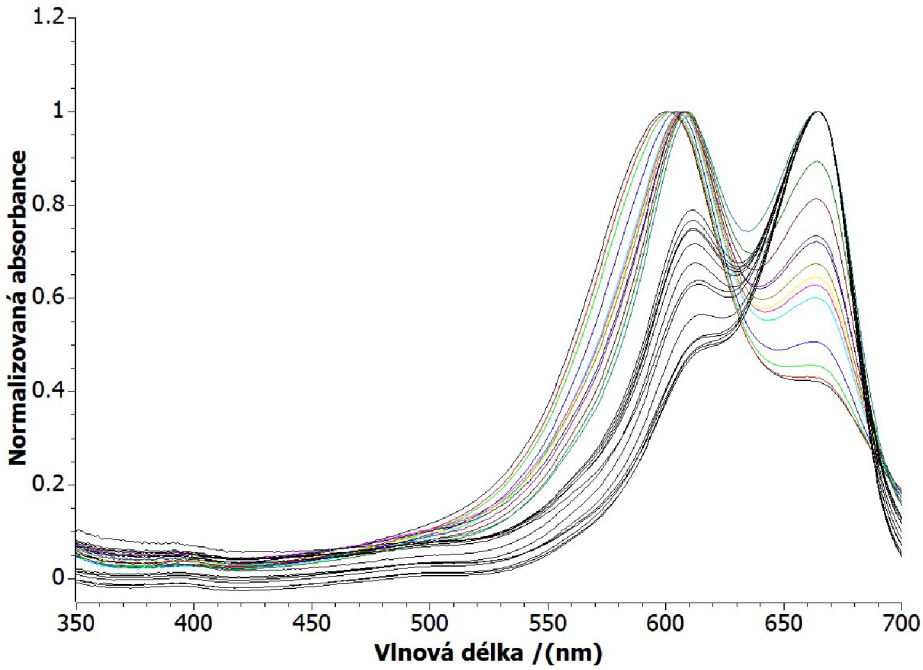


Obrázek 2.1: 3D schéma držáku na kyvety s rezervoárem na chladící médium.



Obrázek 2.2: 3D schéma držáku s kyvetami. Bílí paraboloid naznačuje polohu objektivu kamery.

slepého roztoku. Měření v rámci jednoho roztoku byla zprůměrována. Konečným krokem byla jejich normalizace od 0 do 1. Spektra jsou vyobrazena na Obrázku 2.3. Na spektru je patrné, jak se zvyšující se koncentrací methylenové modré ubývá množství monomeru, který má své absorpční maximum v 664 nm a zároveň přibývá množství dimerů a trimerů maximem v 606 nm. Pík dimeru s trimerem se posouvá se zvyšující se koncentrací směrem ke kratším vlnovým délkám. To je dobře patrné v zamrzlých roztocích, kde je methylenová modř silně koncentrovaná a nemá již modrou, ale fialovou. Je dobré podotknout, že z důvodu aglomerace methylenové modré neplatí Lambert-Beerův zákon. Spektrometr navíc měří kyvetu pouze v jednom místě a nehodí se na sledování tenké a zároveň pohyblivé zakoncentrované vrstvy methylenové modře. Spektra zamrzlých roztoků methylenové modře jsou vidět v práci Dominika Hegera. [33]



Obrázek 2.3: Spektra vodných roztoků methylenové modře **MB 1** až **MB 40**.

2.4 Rychlost mrazení

2.4.1 Rychlost mrazení - experimentální

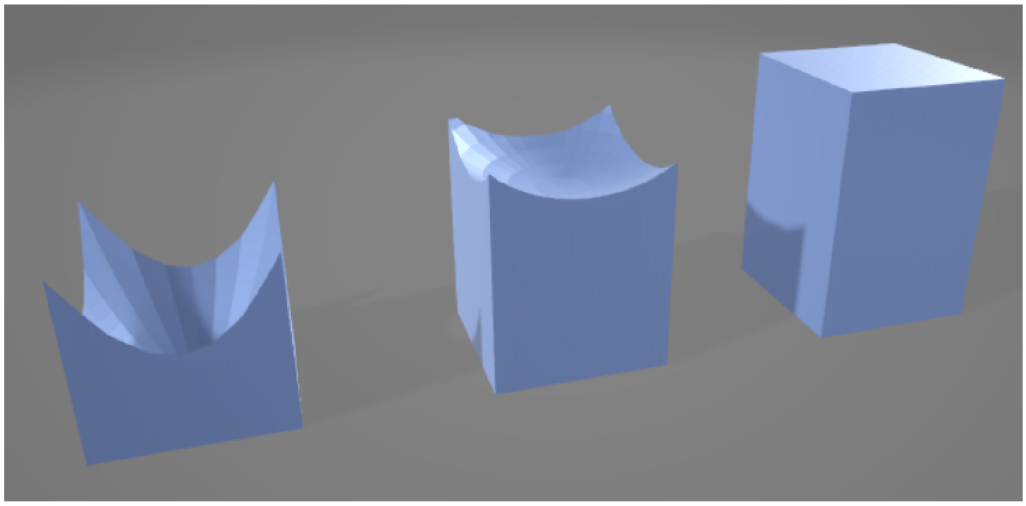
Tekutý dusík

Rezervoár držáku byl opakovaně plněn tekutým dusíkem a to tak dlouho, dokud se dusík nepřestal odpařovat a držák nedosáhl teploty 77 K. Do takto zchlazeného držáku naplněného dusíkem byla vložena kyveta obsahující milimetrové měřítko společně s kyvetou naplněnou vodou.

Vznikající mrznoucí čelo není z počátku ploché, to je způsobeno faktem, že dusík omývá kyvetu ve všech stran. Mrznoucí čelo tedy ze začátku neroste ze dna kyvety kolmo vzhůru, ale ze dna a z každé ze stěn zároveň. Jakmile se čelo dostane nad hladinu dusíku, začne se postupně zplošťovat a 11 mm nad hladinou dusíku se stává plochým a postupuje zbytkem kyvety vzhůru kolmo na stěny. Tento jev je zobrazen pomocí 3D modelu viz Obrázek 2.4. Rychlost mrazení je získána snímáním čela od počátku jeho zploštění. Do té doby se čelo nechová předvídatelným způsobem a jeho rychlost nelze spolehlivě určit pomocí kamery.

Ethanol se suchým ledem

Postup pro přípravu a ochlazení rezervoáru byl stejný jako u tekutého dusíku. Mrznoucí čelo, stejně jako v případě použití tekutého dusíku, projevuje nepravidelnost ve spodní části kyvety. Jev je ale méně výrazný a mrznoucí čelo se zplošťuje už pár milimetrů nad hladivou chladícího média. Mrznoucí čelo vystoupalo během experimentů až do výšky 29 mm od dna kyvety, kde se zastavilo a ani po dalších 30 minutách neprojevovalo další postup. V této výšce ochlazený ethanol již nestačí dostatečně rychle odebírat teplo od mrznoucího čela a postup čela roztokem se zcela zastaví.



Obrázek 2.4: 3D schéma tvaru mrznoucího čela a jeho změny v různé výšce kyvety.

Vyhodnocení rychlosti mrazení

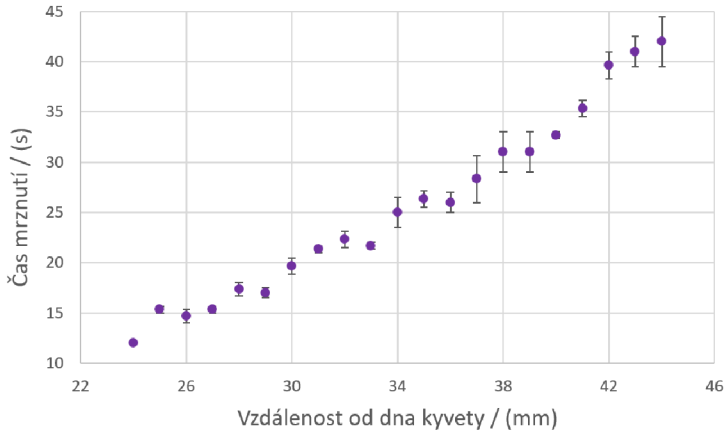
Pro zjištění, jakých rychlostí mrazení nabývají roztoky v této aparatuře a jak se tato rychlost s časem mění, byl zkoumán vzorek destilované vody. Vzorek byl při mrazení natáčen kamerou, mrazení bylo opakováno celkem 3 krát, pro každé chladící médium. Videa byla poté individuálně analyzována. Bylo zaznamenáno, za kolik sekund postoupí mrznoucí čelo o jeden mm. Čas byl odečten z času videa (s přesností na 1 s) a vzdálenost byla kontrolována pomocí milimetrového měřítka ve srovnávací kyvetě. Takto byl určen čas pro každý milimetr kyvety. Časy z jednotlivých měření byly zprůměrovány a doplněny o směrodatnou odchylku průměru viz Obrázky 2.5, 2.6, data viz Tabulka 3.8. Podělením vzdálenosti 1 mm časem mrznutí byla získána rychlost mrazení v mm/s viz Obrázek 2.7. Posledním krokem pak byl přepočet rychlosti mrazení na její záporný logaritmus. Záporný logaritmus je zobrazen v Obrázku 2.8. Závislosti záporných logaritmů rychlosti mrazení na čase byly následně proloženy přímkami, jejiž rovnice (2.3), (2.4) byly později použity pro určení rychlosti mrazení pouhým odečtením vzdálenosti na milimetrovém papíře.

$$-\,log\ v = 0,0254d + 0,5144. \tag{2.3}$$

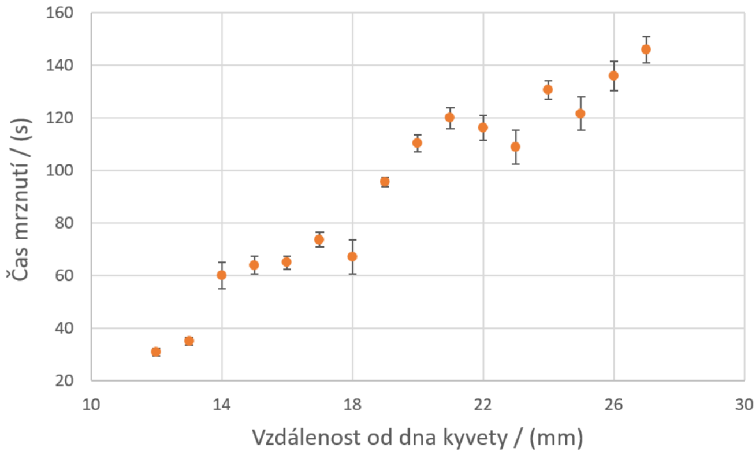
$$-\,log\ v = 0,049d + 0,9896. \tag{2.4}$$

Rovnice (2.3) slouží k výpočtu rychlosti mrazení, pokud mrazíme tekutým dusíkem, rovnice (2.4) pokud mrazíme pomocí směsi ethanol se suchým ledem.

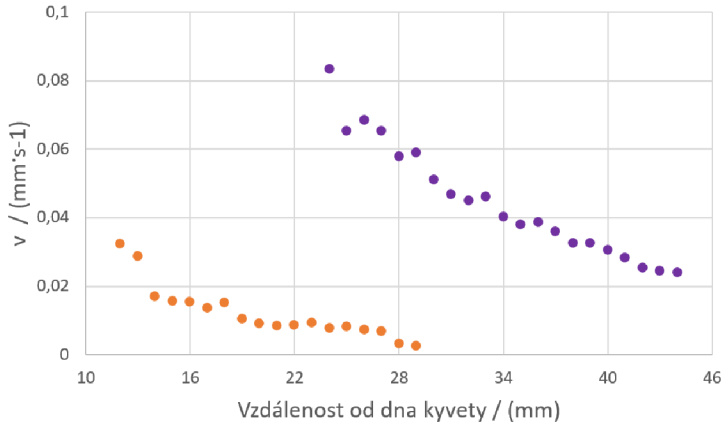
Rychlost mrazení se pohybuje v rozmezí od $8,33 \times 10^{-2}$ mm/s do $2,46 \times 10^{-3}$ mm/s. Přestože nemůžeme naší aparaturou zjistit jakým způsobem roste náš led, můžeme námi získané rychlosti mrazení srovnat s daty v experimentu [14]. Z tohoto srovnání se dá usoudit, že náš led vzniká laminárním způsobem.



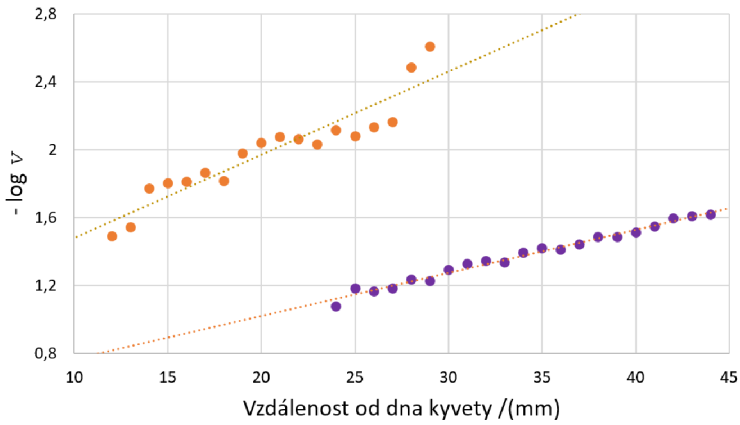
Obrázek 2.5: Čas mrznutí jednoho milimetru ledu s použitím tekutého dusíku jako chladícího média.



Obrázek 2.6: Čas mrznutí jednoho milimetru ledu s použitím směsi ethanolu a suchého ledu jako chladícího média.



Obrázek 2.7: Experimentální rychlost mrazení. Oranžově je zobrazena rychlost v lázni ethanol a suchý led, modře je pak rychlost rychlost získaná s použitím tekutého dusíku.

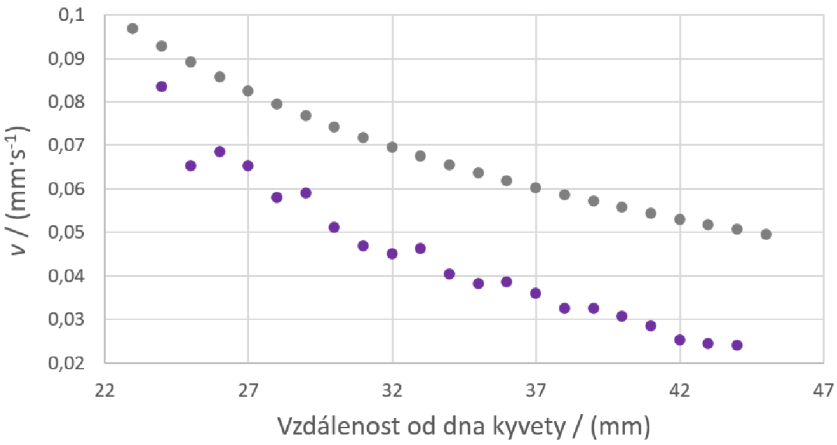


Obrázek 2.8: Záporný logaritmus experimentální rychlosti mrazení v směsi ethanol a suchý led.

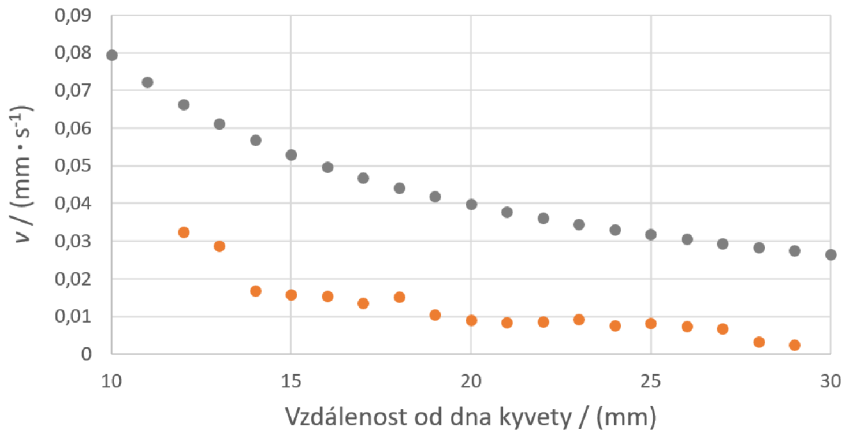
2.4.2 Rychlost mrazení - výpočet a srovnání s experimentem

K výpočtu teoretické rychlosti mrazení byl použita rovnice (1.2) popsaná v teoretické části této práce.

Do této rovnice za T_0 bylo dosazeno pro tekutý dusík -196,15 °C a -78,15 °C pro ethanol se suchý ledem. Za ρ_i 925,7 kg/m3, za L $3,33 \times 10^5$ J/kg. Tepelná vodivost ledu K_{tci} je v našem případě značně problematická, jedná se totiž o veličinu, která nepřímo závisí na teplotě, přesněji její hodnota roste s klesající teplotou. Led v tomto experimentu však dosahuje široké škály teplot od teploty našich chladících médií, až po 278,15 K. Nejnižší teplota, pro kterou se podařilo nalézt hodnotu tepelné vodivosti ledu je 178 K. Za této teploty je její hodnota 3,49 W/mK. [39] Tato hodnota byla použita pro srovnání vypočtené hodnoty s mrazením pomocí tekutého dusíku. Pro mrazení pomocí směsi ethanol a suchý led byla použita hodnota 3,05 W/mK, ze stejného zdroje. Porovnání teoretické a experimentální rychlosti mrazení je vyobrazeno na Obrázcích 2.9, 2.10.



Obrázek 2.9: Srovnání experimentální rychlosti mrazení za použití tekutého dusíku a vypočítané rychlost mrazení s K_{tci} = 3,49 W/mK.



Obrázek 2.10: Srovnání experimentální rychlosti mrazení za použití ethanolu se suchým ledem a vypočítané rychlost mrazení s K_{tci} = 3,05 W/mK.

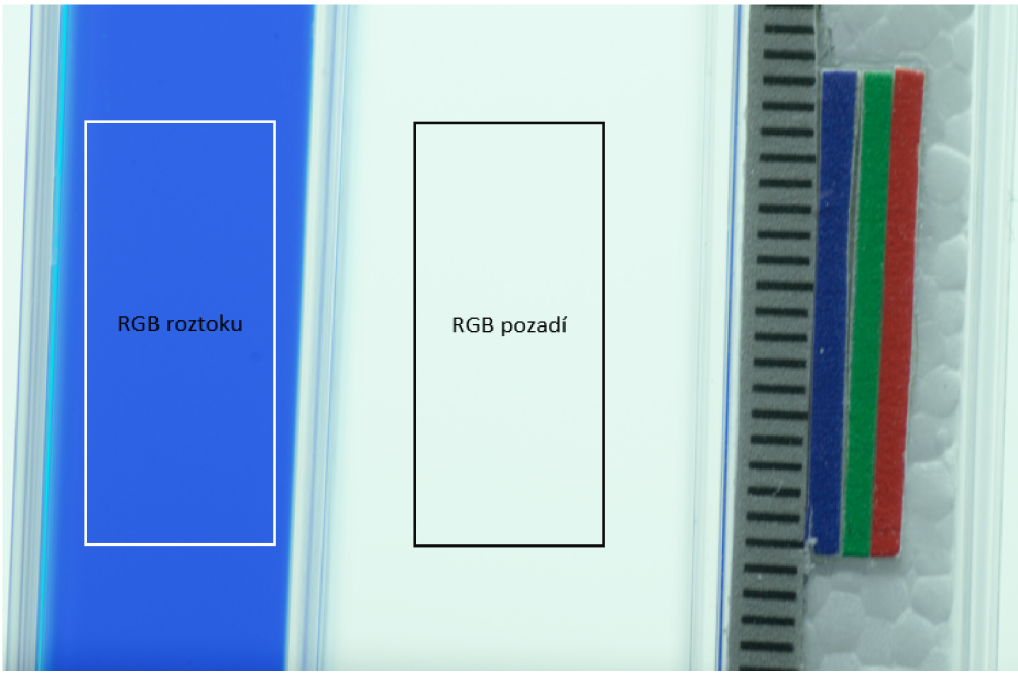
Z Obrázků 2.9, 2.10 je patrné, že experimentální rychlost je prakticky během celého měření nižší a zároveň klesá vzhledem k rostoucímu ledu rychleji než teoretická. Vyšší teoretická rychlost se dá alespoň částečně vysvětlit tím, že tepelná vodivost ledu je v průběhu našeho experimentu proměnlivá, na rozdíl od té, která byla použita při výpočtu, kde figurovala jako konstanta. Jednou z možností jak řešit tento problém by bylo uvést diferenciální rovnici, kde bychom tepelnou vodivost ledu uvažovali jako funkci závislosti tepelné vodivosti ledu na teplotě. V takovém případě by však bylo nutné navíc přesně sledovat teplotu ledu v průběhu experimentu a to momentální verze naší aparatury nedokáže.

Rychlejší klesání křivky, které je patrné hlavně v Obrázku 2.9, a zároveň i nižší experimentální hodnoty rychlosti mrazení, by se pak dalo vysvětlit vnějšími faktory. Rovnice (1.2) totiž počítá s izolovaným systémem, kde teplo z okolí nemůže ovlivnit rychlost mrazení. V praxi tomu tak však není. Mezi rostoucím ledem a okolím existuje teplotní gradient. Teplo z okolí může volně proudit do mrznoucího vzorku, oteplovat ho a tím i snižovat rychlost mrazení. Tento efekt pokračuje až do té doby, kdy se množství tepla odebírané chladícím médiem v místě mrznoucího čela vyrovná s teplem, které mrznoucí čelo přijímá z okolí, a jeho růst se zastaví. To se děje v experimentu s ethanolem ochlazeným suchým ledem, jak bylo zmíněno dříve. Výpočet rychlosti mrazení v našem případě není vhodný a v práci se bude nadále počítat s pouze experimentálními daty.

2.5 RGB a HSV

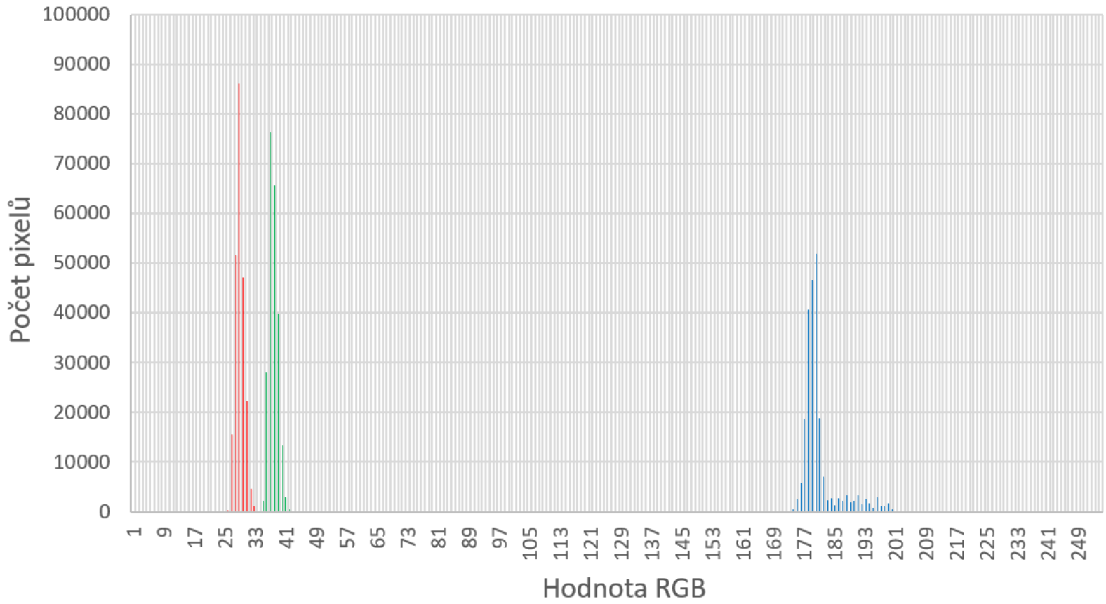
2.5.1 Zisk RGB

Každý kalibrační roztok byl vyfocen celkem třikrát. Fotografie roztoků byly zpracovány následujícím způsobem. Z každé fotografie bylo vyříznuto pole dobře reprezentující roztok methylenové modře a pole dobře reprezentující pozadí světelné komory (příklad viz Obrázek 2.11)



Obrázek 2.11: Ukázka původní fotografie s naznačenými výřezy pozadí a roztoku.

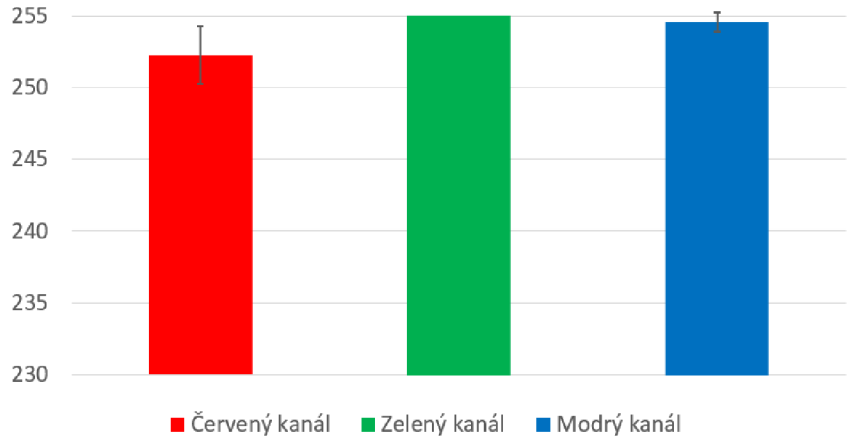
Takto oříznuté obrázky byly zpracovány skriptem v programu MAtLab. [40] Skript nejprve extrahuje RGB hodnoty pro každý pixel z vybraného pole, pak tyto hodnoty seřadí podle četnosti a nakonec vrátí uživateli medián z takto seřazených hodnot. Příklad histogramu vytvořeného skriptem je vyobrazen na Obrázku 2.12.



Obrázek 2.12: Histogram roztoku **MB 9**. Červená oblast odpovídá rozložení hodnot červeného kanálu napříč všemi pixely analyzované fotografie, zelená pak koresponduje s zeleným kanálem a modrá s modrým.

Faktorizace RGB

Aby byly omezeny externí vlivy na hodnoty RGB roztoků (například nechtěné externí osvětlení kyvet) a byla zajištěna reprodukovatelnost experimentů. RGB hodnoty každého snímku roztoku byly standardizovány a to pomocí RGB hodnot bílého pozadí extrahovaného ze stejného snímku jako roztok. Celý krok standardizace vychází z myšlenky, že pozadí bílé barvy by mělo mít na každé fotce stejné hodnoty RGB a to 255, 255, 255. V praxi se ale RGB extrahované z fotografií mírně liší od hodnoty ideální bílé. Na Obrázku 2.13 jsou vidět průměrné RGB hodnoty pozadí napříč všemi roztoky, chybové úsečky pak zobrazují rozpětí hodnot jednotlivých kanálů.



Obrázek 2.13: RGB hodnoty pozadí napříč fotografiemi všech čtyřiceti roztoků.

Z Obrázku 2.14 je také zřejmé, že se hodnota zeleného kanálu pozadí nemění a zůstává na hodnotě 255 napříč všemi fotografiemi, nejvíce se mezi jednotlivými fotografiemi mění hodnota červeného kanálu. Ten má v některých případech hodnotu jen 247, proti očekávané hodnotě 255.

Abychom vzali v potaz nesrovnalost skutečného RGB pozadí a RGB dokonale bílé, zavádíme takzvaný korekční faktor f pro každý z RGB kanálů. Korekční faktor je pak podílem RGB hodnoty příslušného kanálu dokonale bílé barvy a jeho skutečné hodnoty extrahované ze skriptu:

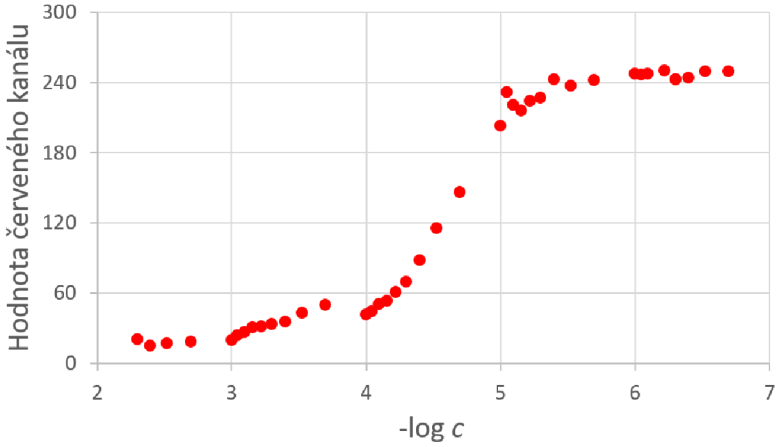
$$ {}_{f}Y = \frac{255}{Y_{skript}}. \tag{2.5} $$

kde ${}_{f}Y$ je korekční jednoho ze zkoumaných kanálů (Y může být R, G nebo B), 255 je hodnota ideální bílé barvy (stejná u všech kanálů) a Y_{skript} je skutečná hodnota kanálu získaná našim skriptem (Y může být R, G nebo B).

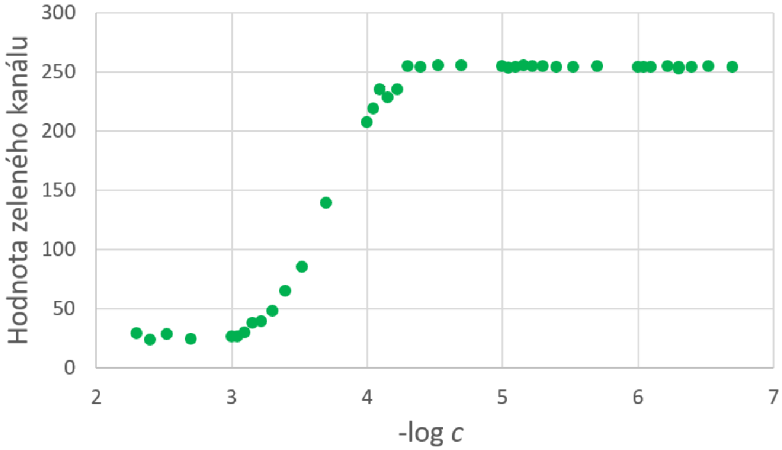
Korekční faktor tedy říká, kolikrát je hednota kanálu pozadí menší, než hodnota skutečné bílé barvy. Tímto způsobem byly získány korekční faktory pro pozadí všech roztoků.

Pokud se liší skutečné RGB pozadí od teoretického a to faktorem f, RGB jakéhokoli bodu na fotografii dostaneme, vynásobíme-li RGB hodnoty získané pomocí skriptu faktorem f. Z toho plyne, že vynásobením RGB hodnot extrahovaných z roztoků s jejich příslušnými korekčními faktory, dostaneme korigované RGB pro daný roztok.

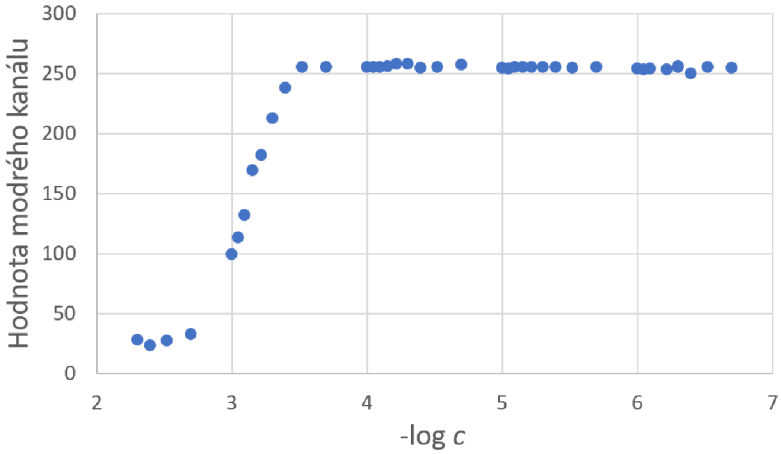
Korigovaná RGB data ze tří fotografií pro každý roztok byla zprůměrována. Tyto průměry jsou k nalezení příloze v Tabulce 3.1 společně se směrodatnými odchylkami průměru. Jednotlivé korigované kanály v závislosti na záporném logaritmu koncentrace s směrodatnou odchylkou průměru viz Obrázky 2.14 - 2.16 (směrodatné odchylky průměru jsou menší než body v grafech, proto nejsou vyobrazeny). 3D grafické zobrazení korigovaných RGB hodnot roztoků viz Obrázek 2.17



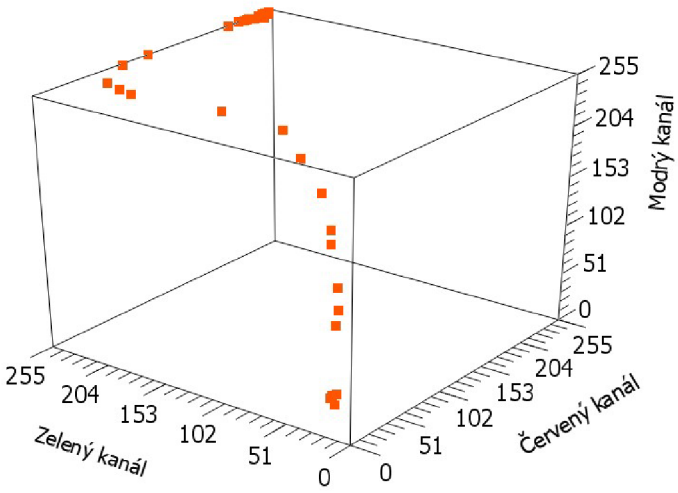
Obrázek 2.14: Závislost záporného logaritmu koncentrace na červeném kanálu.



Obrázek 2.15: Závislost záporného logaritmu koncentrace na zeleném kanálu.



Obrázek 2.16: Závislost záporného logaritmu koncentrace na modrém kanálu.



Obrázek 2.17: Korigované RGB hodnoty všech roztoků zobrazené ve 3D prostoru.

2.5.2 Výpočet HSV

Hodnoty HSV byly získány pomocí online kalkulačky pro převod RGB do HSV. [41] Algoritmus, který kalkulačka používá je uveden níže:

$$R' = \frac{R}{255}. \tag{2.6}$$

$$G' = \frac{G}{255}. \tag{2.7}$$

$$B' = \frac{B}{255}. \tag{2.8}$$

$$C_{max} = max(R', G', B'). \tag{2.9}$$

$$C_{min} = min(R', G', B'). \tag{2.10}$$

$$\Delta = C_{max} - C_{min}. \tag{2.11}$$

Výpočet odstínu:

$$H = \begin{Bmatrix} 0^\circ & \Delta = 0 \\ 60^\circ \times (\frac{G'-B'}{\Delta} mod 6), & C_{max} = R' \\ 60^\circ \times (\frac{B'-R'}{\Delta} + 2), & C_{max} = G' \\ 60^\circ \times (\frac{R'-G'}{\Delta} + 4), & C_{max} = B' \end{Bmatrix} \tag{2.12}$$

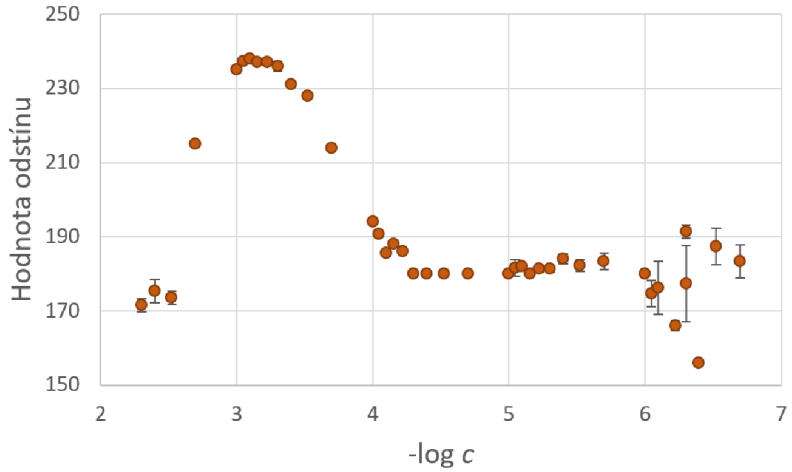
Výpočet saturace:

$$S = \begin{Bmatrix} 0, & C_{max} = 0 \\ \frac{\Delta}{C_{max}}, & C_{max} \neq 0 \end{Bmatrix} \tag{2.13}$$

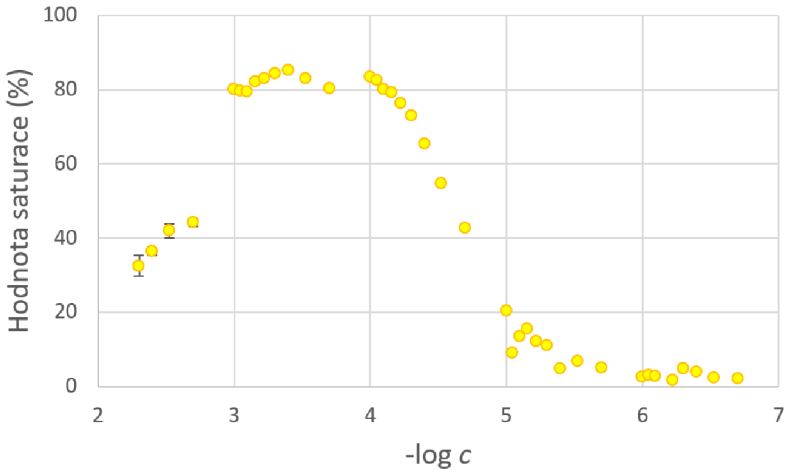
Výpočet jasu:

$$V = C_{max}. \tag{2.14}$$

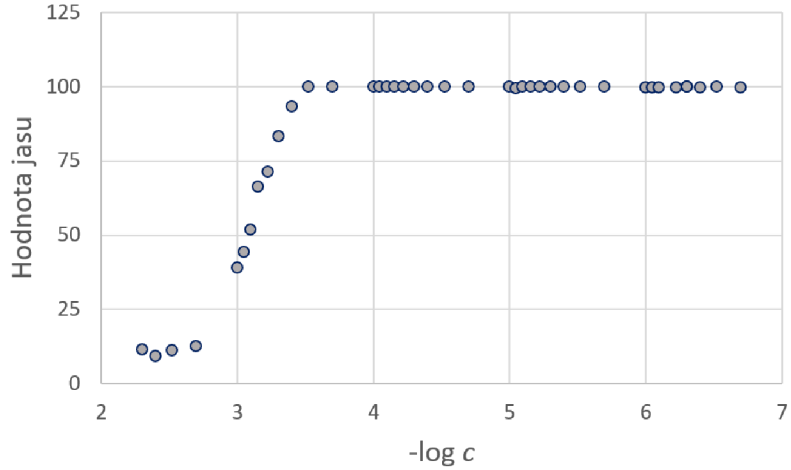
RGB data použitá na výpočet již byla korigovaná na bílou barvu v předchozím kroku, korekce HSV tedy není třeba. Zprůměrované HSV hodnoty s příslušnými směrodatnými odchylkami průměru viz Tabulka 3.2. Obrázky 2.18 - 2.20 vyobrazují záporný logaritmus koncentrace roztoku methylenové modré na hodnotách HSV. Na Obrázku 2.21 jsou HSV hodnoty vyobrazeny v 3D prostoru.



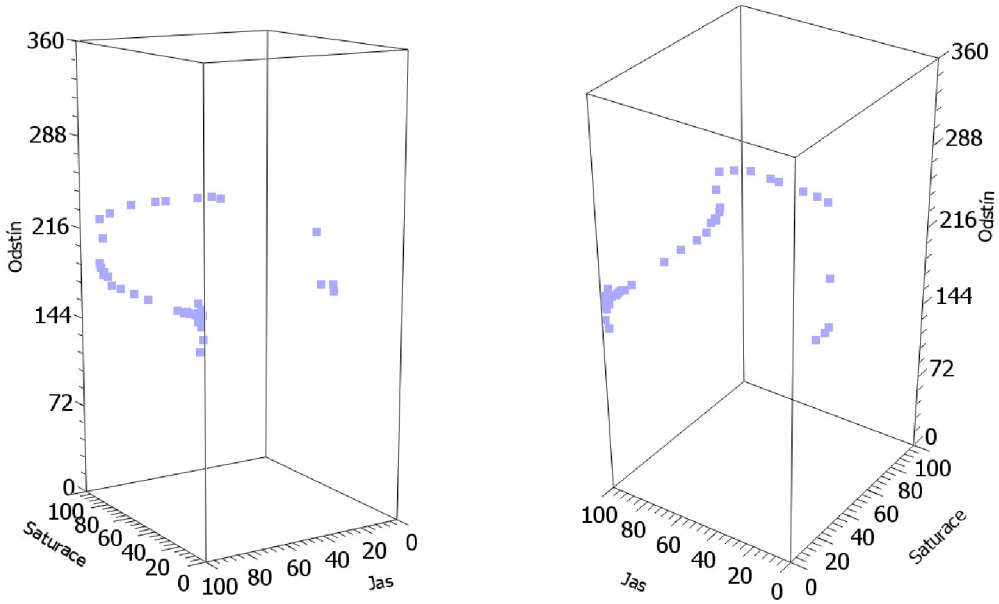
Obrázek 2.18: Závislost záporného logaritmu koncentrace na odstínu H.



Obrázek 2.19: Závislost záporného logaritmu koncentrace na saturaci S.



Obrázek 2.20: Závislost záporného logaritmu koncentrace na hodnotě jasu.



(a) Korigované HSV hodnoty všech roztoků zobrazené ve 3D prostoru.

(b) Korigované HSV hodnoty všech roztoků zobrazené ve 3D prostoru.

Obrázek 2.21: Různé úhly pohledu na HSV ve 3D prostoru.

2.5.3 Kalibrační závislost

Cílem získání kalibrační závislosti, je její následné použití pro zpětné určení neznámé koncentrace methylenové modře pomocí hodnot naměřených RGB nebo HSV hodnot. Pro každou z výše vyobrazených křivek bylo vybráno takové koncentrační rozpětí, při kterém se signál (RGB nebo HSV) nejvíce mění se změnou koncentrace. Ve všech případech byla tímto úsekem proložena přímka. Neznámé koncentrace byly určeny z rovnic těchto přímek:

$$-\,log\ c = \frac{R + 672,31}{174,28}. \tag{2.15}$$

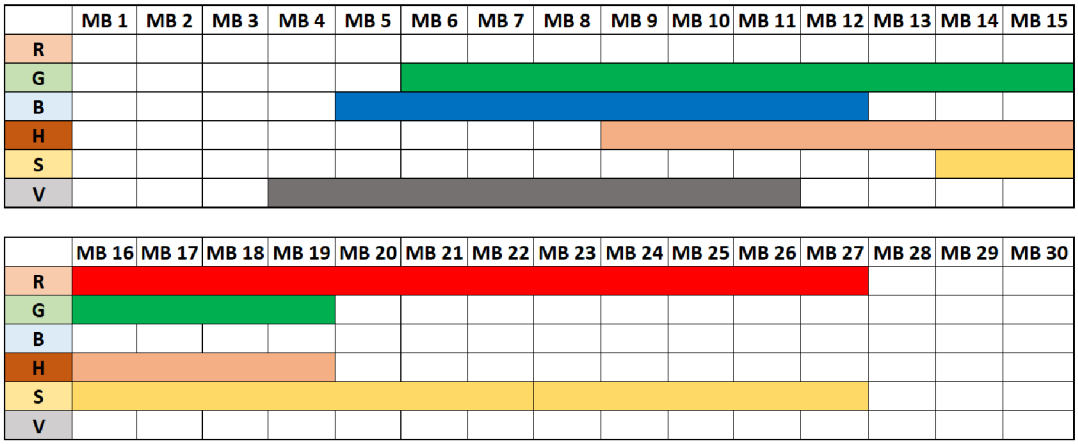
$$-\log c = \frac{G + 594,31}{198,38}. \tag{2.16}$$

$$-\log c = \frac{B + 770,32}{294,44}. \tag{2.17}$$

$$-\log c = -\frac{S - 352,52}{66,134}. \tag{2.18}$$

Rovnice (2.15) odpovídá červenému kanálu RGB spektra, rovnice (2.16) zelenému kanálu, (2.17) pak červenému a (2.18) saturaci z HSV spektra

Jednotlivé komponenty RGB a HSV spekter nemají moc široký rozsah, kde se mění s koncentrací lineárně. Dohromady ovšem dávají možnost zkoumat koncentraci roztoků v rozmezí od 2×10^{-3} mol/l do 6×10^{-6} mol/l, škála se tedy nachází mezi roztoky **MB 4** až **MB 27**. Na Obrázku 2.22 je znázorněno, u kterých roztoků se složky RGB a HSV chovají lineárně. Pro červený kanál je lineární rozpětí od **MB 16** do **MB 27**, pro zelený od **MB 6** do **MB 19**, pro modrý kanál od **MB 5** do **MB 12**, pro odstín H od **MB 9** do **MB 19**, pro saturaci S od **MB 14** do **MB 27** a pro jas V od **MB 4** do **MB 11**.



Obrázek 2.22: Schéma lineární odezvy signálu záporného logaritmu koncentrace.

2.6 Koncentrovaná vrstva

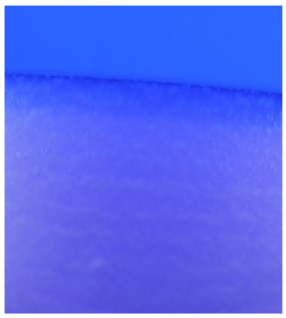
Ze všech 40 roztoků bylo vybráno několik, které spadají do této lineární závislosti. Jedná se o roztoky **MB 12**, **MB 18** a **MB 26**. Tyto roztoky byly mrazeny nejprve s použitím tekutého dusíku jako chladícího média a poté za použití ethanolu se suchým ledem, aby bylo dosaženo dostatečně různých rychlostí mrazení. Roztoky byly v průběhu mrznutí foceny každých 5 až 10 s. Jednotlivé fotky byly poté ručně analyzovány a byli z nich vybrány takové, které ostře a jasně vyobrazují koncentrovanou vrstvu. Stejně jako u určování RGB roztoků bylo z fotek extrahováno RGB spektrum, tentokrát ovšem pouze malá úzká sekce, která dobře reprezentovala koncentrovanou vrstvu. Z fotek bylo také extrahováno RGB pozadí pomocí kterého bylo RGB vrstvy korigováno. RGB hodnoty byly extrahovány celkem 3krát pro každou fotografii a to z různých míst vrstvy. Data použitá v Obrázcích 2.24 - 2.26 a 2.29 byla zprůměrována a doplněna o směrodatnou odchylku průměru. Pro studium koncentrované vrstvy u roztoku **MB 26** bylo navíc krom RGB spektra použito i HSV spektrum.

Při focení roztoků se stala velkým problémem kondenzace vodní páry na stěně kyvety, kterou snímá kamera. I když vrstva nebyla vidět pouhým okem, makro objektiv kamery ji zachytil velmi snadno a koncentrovaná vrstva se na fotkách jevila rozpitá a ne dobře definovaná. Z toho důvodu byla přední strana kyvety v průběhu experimentu jemně otírána papírovým čtverečkem namočeným v ethanolu a fotografie byly vždy pořízeny bezprostředně po jejím utření.

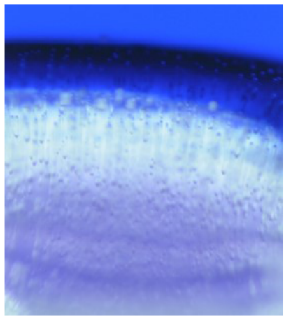
Je také třeba podotknout, že v případě mrznutí za pomocí tekutého dusíku se koncentrovaná vrstva takřka ztratila zhruba 5 mm před dosažením hrdla kyvety. Příčinou tohoto jevu se zdá být změna tvaru mrznoucího čela, které mění svůj tvar z ploché na konkávní. To je způsobeno tím, že led a voda v bezprostřední blízkosti stěn kyvety přijímají teplo z okolí, zatímco led uprostřed kyvety si snáze udržuje nižší teplotu. Mrznoucí čelo prostupuje vnitřní částí kyvety rychleji, než u okrajů a koncentrovaná vrstva se ztrácí. Stejné konkávní prohnutí se ukázalo v menší míře i u vzorků mrazených pomocí lázně ethanolu se suchým ledem. V tomto případě však vrstva neztratila na celé ploše mrznoucí vrstvy, pouze na okrajích v blízkosti stěn. V prostřední části kyvety koncentrovaná vrstva zůstala stabilní a viditelná.

2.6.1 Změny koncentrované vrstvy v průběhu mrznutí

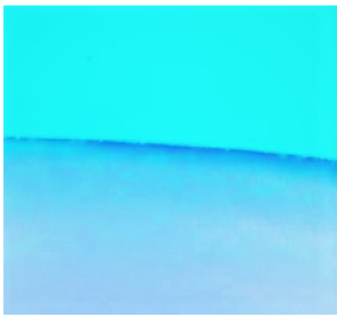
koncentrovaná vrstva se v průběhu mrznutí na naší aparatuře značně mění a to jak její šířka, tak i koncentrace. Co se týče její tloušťky, tak ta se zvětšuje s klesající rychlostí mrazení. Při vyšších rychlostech mrazení je dokonce tak tenká, že ji má kamera někdy i problém zachytit. V takovém případě se mrznoucí čelo pohybuje takovou rychlostí, že vznikající zakoncentrovaná vrstva je vrstvou takřka zcela pohlcena mrznoucím čelem a methylenová modrá je rychle zakomponována do kanálků obklopujících krystaly vznikajícího ledu. V tomto případě má koncentrovaná vrstva na fotografiích tloušťku do desítek pixelů. Jakmile se čelo zpomalí, koncentrovaná vrstva začne nabývat na tloušťce, v našem případě do tloušťky kolem 0,5 mm. To stejné se dá říci i o koncentraci methylenové modře v koncentrované vrstvě, která se stejně jako její tloušťka, zvyšuje se snižující se rychlostí mrazení. Na Obrázcích 2.23 jsou vidět koncentrované vrstvy u všech třech zkoumaných roztoků **MB 12**, **MB 18** a **MB 26** nejprve ve vzorcích mrazených pomocí tekutého dusíku a následně ve vzorcích mrazených pomocí směsi ethanol a suchý led. Porovnáním těchto obrázků je vizuálně velmi dobře vidět rozdíl mezi koncentrovanou vrstvou rychle a pomalu mrznoucího ledu.



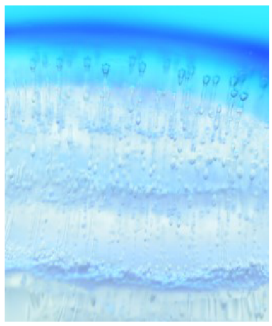
(a) Detail na koncentrovanou vrstvu roztoku **MB 12** mrazeného pomocí tekutého dusíku



(b) Detail na koncentrovanou vrstvu roztoku **MB 12** mrazeného pomocí směsi ethanolu a suchého ledu

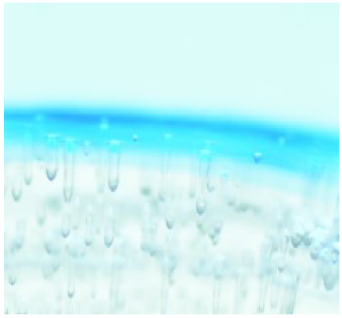


(c) Detail na koncentrovanou vrstvu roztoku **MB 18** mrazeného pomocí tekutého dusíku



(d) Detail na koncentrovanou vrstvu roztoku **MB 18** mrazeného pomocí směsi ethanolu a suchého ledu

(e) Detail na koncentrovanou vrstvu roztoku **MB 26** mrazeného pomocí tekutého dusíku



(f) Detail na koncentrovanou vrstvu roztoku **MB 26** mrazeného pomocí směsi ethanolu a suchého ledu

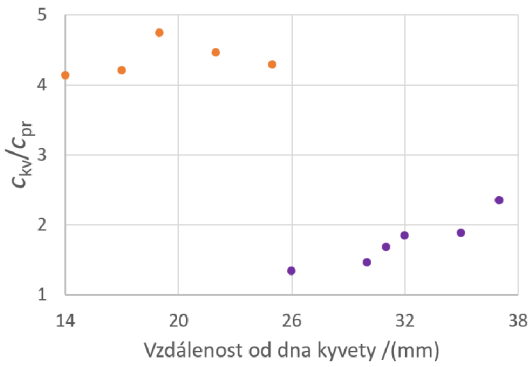
Obrázek 2.23: Znázornění koncentrované vrstvy roztoků **MB 12**, **MB 18** a **MB 26** při rychlém a pomalém mrazení

Koncentrační změny

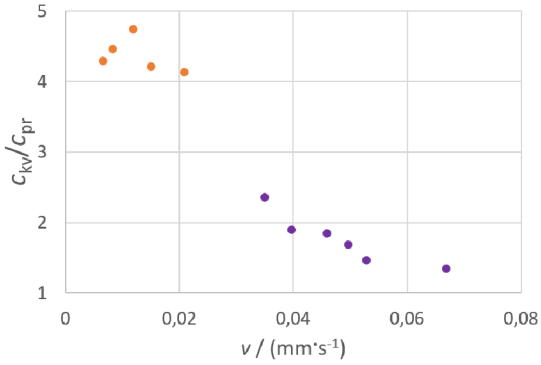
Jak bylo výše zmíněno, koncentrace methylenové modře v koncentrované vrstvě se zvyšuje v průběhu experimentu s klesající rychlostí mrazení. Změna koncentrace koncentrované vrstvy u roztoku **MB 12** byla určena pomocí rovnice závislosti modrého kanálu RGB spektra na záporném logaritmu koncentrace methylenové modře (2.17) a je vyobrazena na Obrázku 2.24. Změna kon-

centrace koncentrované vrstvy u roztoku **MB 18** byla určena rovnicí pro zelený kanál (2.16) a je vyobrazena na Obrázku 2.25. Roztok **MB 26** byl zkoumán za pomoci rovnice červeného kanálu (2.15) a zároveň pomocí rovnice saturace z HSV spektra 2.18. Závislost jeho koncentrované vrstvy na rychlosti mrazení je pak vyobrazena na Obrázku 2.26. Oranžová barva v Obrázcích 2.24 - 2.27 reprezentuje data získaná mrazením směsy ethanol a suchý led, fialová barva pak data získaná mrazením tekutým dusíkem. Data pro Obrázky 2.24 - 2.27 jsou k nahlédnutí v Tabulkách 3.3 - 3.6.

Při nejpomalejších rychlostech mrazení vzorku **MB 12** a **MB 18** je vidět pokles v koncentraci vrstvy. To je způsobeno tím, že mrznoucí čelo již nepostupuje dostatečně rychle a difuze koncentrované vrstvy do roztoku začne být hlavním faktorem ovlivňující její koncentraci.

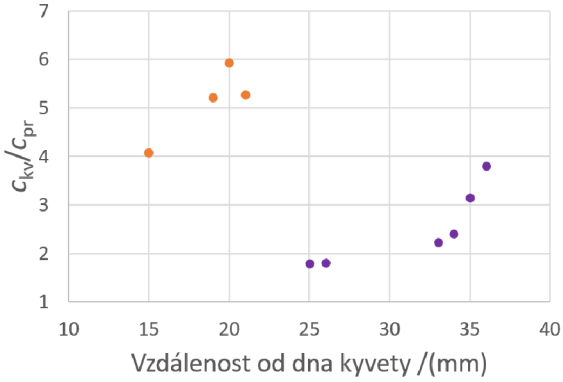


(a) Závislost poměru koncentrace koncentrované vrstvy a původního roztoku na vzdálenosti od dna kyvety.

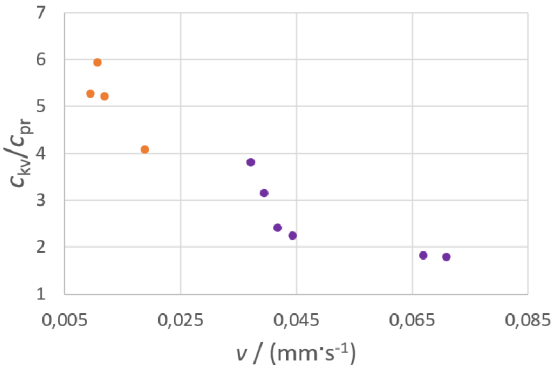


(b) Závislost poměru koncentrace koncentrované vrstvy a původního roztoku na rychlosti mrazení.

Obrázek 2.24: Změna koncentrace koncentrované vrstvy roztoku **MB 12**.

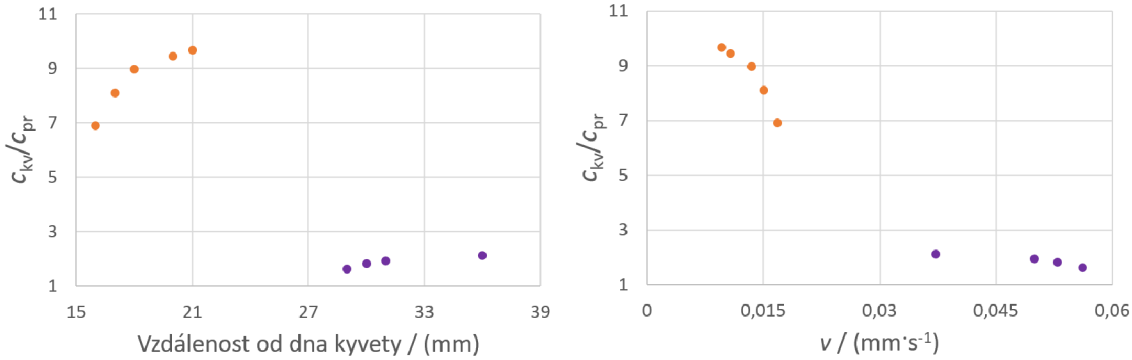


(a) Závislost poměru koncentrace koncentrované vrstvy a původního roztoku na vzdálenosti od dna kyvety.



(b) Závislost poměru koncentrace koncentrované vrstvy a původního roztoku na rychlosti mrazení.

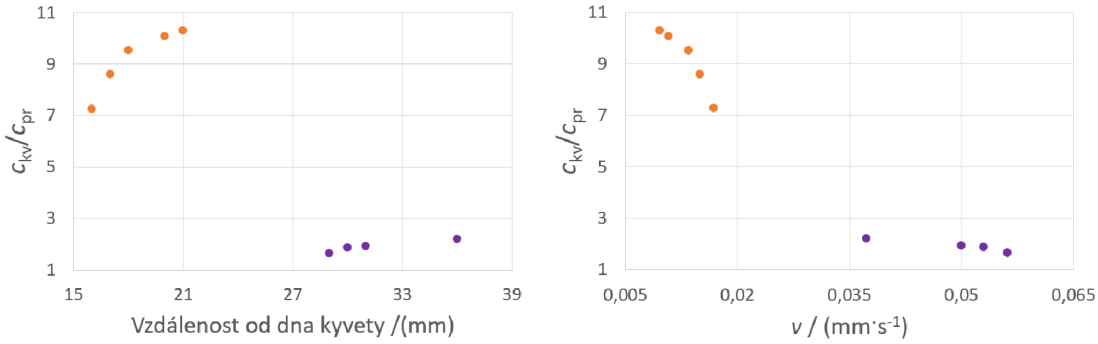
Obrázek 2.25: Změna koncentrace koncentrované vrstvy roztoku **MB 18**.



(a) Závislost poměru koncentrace koncentrované vrstvy a původního roztoku na vzdálenosti od dna kyvety.

(b) Závislost poměru koncentrace koncentrované vrstvy a původního roztoku na rychlosti mrazení.

Obrázek 2.26: Změna koncentrace koncentrované vrstvy roztoku **MB 26**. Koncentrace byla získána pomocí červeného kanálu.



(a) Závislost poměru koncentrace koncentrované vrstvy a původního roztoku na vzdálenosti od dna kyvety.

(b) Závislost poměru koncentrace koncentrované vrstvy a původního roztoku na rychlosti mrazení.

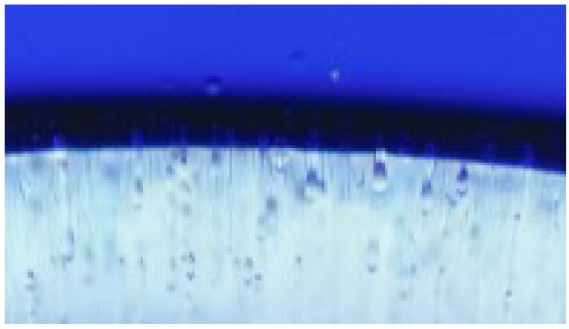
Obrázek 2.27: Změna koncentrace koncentrované vrstvy roztoku **MB 26**. Koncentrace byla získána pomocí saturace.

Koncentrace roztoků byli po jejich přípravě změřeny pomocí jejich RGB hodnot a kalibrační křivky. Koncentrace **MB 12** = $3,2 \times 10^{-4}$ mol/l, **MB 18** = $6,2 \times 10^{-5}$ mol/l a **MB 26** = $7,52 \times 10^{-6}$ mol/l. Srovnáním koncentrace původních roztoků a jejich koncentrované vrstvy bylo zjištěno, že koncentrovaná vrstva roztoku **MB 12** se zakoncentrovala 1,3krát až 4,7krát, vrstva u **MB 18** pak 1,8krát až 5,7krát a u **MB 26** byla koncentrace v koncentrované vrstvě 1,6krát až 9,8 krát v závislosti na rychlosti mrazení.

2.7 Další poznatky a pozorování

2.7.1 Led bez methylenové modře

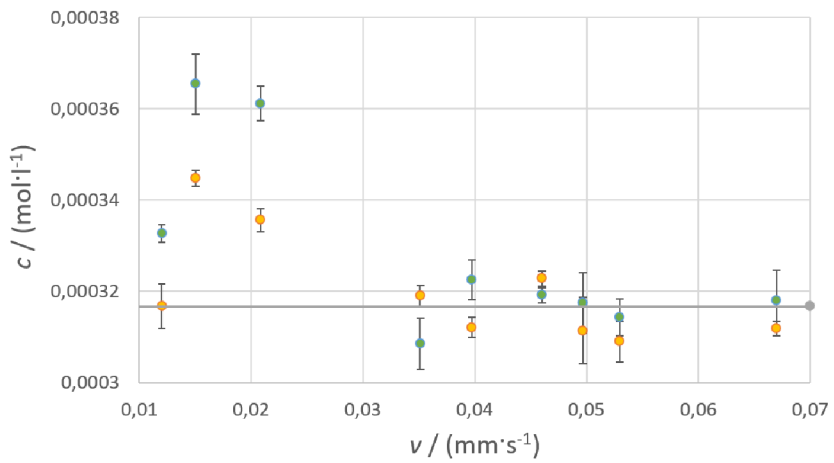
V průběhu experimentů bylo docela běžné, že za nízkých rychlostí mrazení (při mrazení pomocí směsi ethanol a suchý led) vznikal led zcela bez přítomnosti methylenové modře. Stejně tak je možné vytvořit led zcela bez přítomnosti bublin pouze tím, že bude původní roztok mrazen dostatečně pomalu. [17] V obou případech je koncentrace v koncentrované vrstvě držena pod kritickou hodnotou. Pro rozpuštěný vzduch je však rychlost potřebná pro tento jev mnohem nižší než v našem případě, kdy čirý led vnikal při rychlosti mrazení kolem 12×10^{-3} mm/s a méně u všech tří zkoumaných roztoků **MB 12**, **MB 18** a **MB 26**. Bublinky však za této rychlosti stále vznikaly a byli přítomny ve struktuře ledu. Jakákoli vyšší rychlost mrazení měla za následek, že se methylenová modrá alespoň částečně zabudovávala do struktury vznikajícího ledu. Příklad vzniku čirého ledu z roztoku **MB 12**, mrazeného směsí ethanolu a suchého ledu je vidět na Obrázku 2.28.



Obrázek 2.28: Vznik čirého ledu pomalým mrazením roztoku **MB 12**.

2.7.2 Změny koncentrace v blízkosti koncentrované vrstvy

Roztok **MB 12** byl použit pro zkoumání změn koncentrace methylenové modře v okolí koncentrované vrstvy, přesněji ve vzdálenosti 1 a 5 mm od ní. To bylo provedeno pomocí extrahování RGB z požadovaných úseků a následným určením koncentrace pomocí hodnot modrého kanálu a jeho závislosti na záporném logaritmu koncentrace 2.17. Závislost je vynesena na obrázku 2.29, kde zelenou barvou je označena koncentrace 1 mm nad vrstvou, oranžovou barvou pak koncentrace 5 mm nad vrstvou. Šedá čára naznačuje koncentraci původního roztoku. Data pro tuto závislost jsou uvedena v Tabulce 3.7.



Obrázek 2.29: Změny koncentrace roztoku nad koncentrovanou vrstvou **MB 12**.

Z Obrázku 2.29 je patrné, že pokud se mrznoucí čelo pohybuje rychle a methylenová modř se prakticky zcela dostává do žil a kanálků v ledu, koncentrace v okolním roztoku se příliš neliší od koncentrace původního nezmrzlého roztoku. Jakmile se však mrazení zpomalí, koncentrovaná vrstva se začne zvětšovat a nebude se dostávat do ledu, koncentrace okolního roztoku se zvýší.

2.7.3 Různá koncentrace methylenové modře v ledu

Jak bylo zmíněno v teoretické části práce, bubliny v ledu vznikají rázově ve vlnách v závislosti na koncentraci rozpuštěného vzduchu v koncentrované vrstvě. Koncnetrace methylenové v ledu kolísá podobným způsobem. Při vyšších rychlostech mrazení jsou sekce methylenové modře v ledu blízko u sebe a nejsou rozeznatelné. Při nižších rychlostech však vznikají sekce ledu, kolmé na směr mrznutí, které obsahují jinou koncentraci methylenové modře než okolní led. Koncentrace v těchto vrstvách však není touto metodou stanovitelná. Naše metoda zatím nedokáže přesně určit koncentraci methylenové modře v zmrzlých roztocích, protože jevy jako rozptyl světla ledovými krystaly a přítomnost bublin zkreslují výsledky. Příklad tohoto jevu je vidět na Obrázku 2.30.

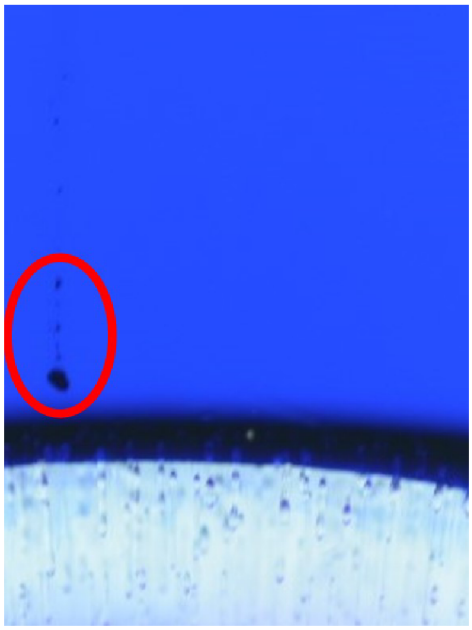
(a) Změny koncentrace methylenové modře v ledu u vzorku **MB 12**.

(b) Změny koncentrace methylenové modře v ledu u vzorku **MB 18**.

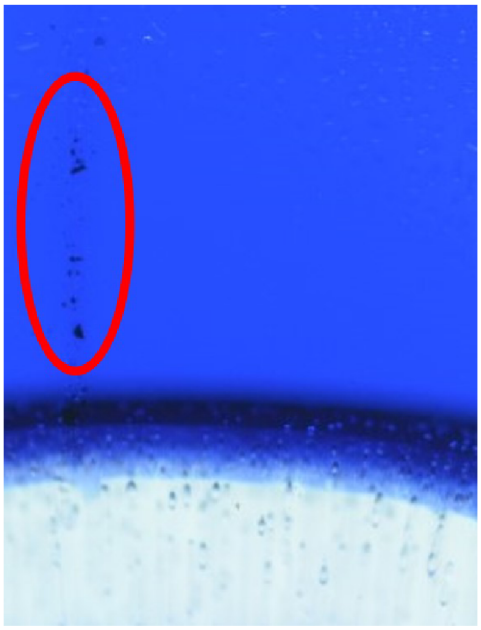
Obrázek 2.30: Změny koncentrace methylenové modře v ledu.

2.7.4 Bubliny methylenové modře

Při experimentech s roztokem **MB 12** došlo k nečekanému jevu. Při nízkých rychlostech mrazení se od koncentrované vrstvy oddělily "bublinky"se stejným odstínem modré, jakou měla v ten okamžik koncentrovaná vrstva. Jev byl relativně vzácný a v pěti měřeních, se ho podařilo zreprodukovat a nafotit pouze 2krát. Proč tyto útvary vzniki není známo. Jedna z hypotéz je taková, že se jedná o bublinky vzduchu, které na svém povrchu nesou zakoncentrovaný roztok methylenové modré. Ovšem žádné bubliny vzduchu o podobné velikosti nebyli pozorovány při mrazení vody ani roztoků methylenové modré. Mohlo by se také jednat o kusy zakoncentrované vrstvy oddělené od samotné vrstvy. Ovšem proč by toto oddělení mělo nastat zůstává záhadou. Útvary se po vystoupání několik milimetrů nad mrznoucím čelem rozplynuly. "Bublinky"methylenové modře jsou vyobrazeny na Obrázcích 2.31.



(a) "Bublinky"methylenové modré vzniklé při mrazení roztoku **MB 12**.

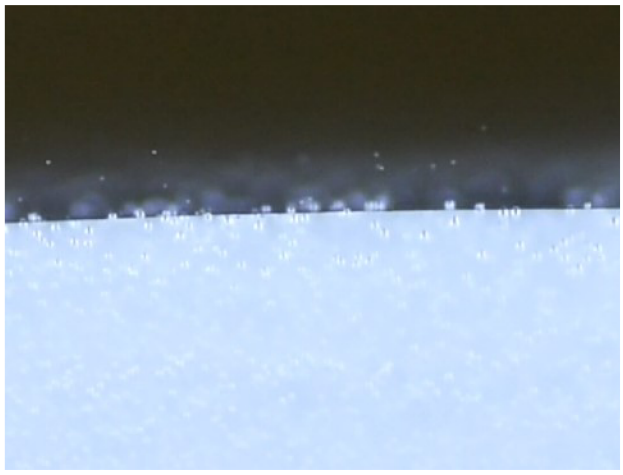


(b) "Bublinky"methylenové modré vzniklé při mrazení roztoku **MB 12**.

Obrázek 2.31: "Bublinky"methylenové modře.

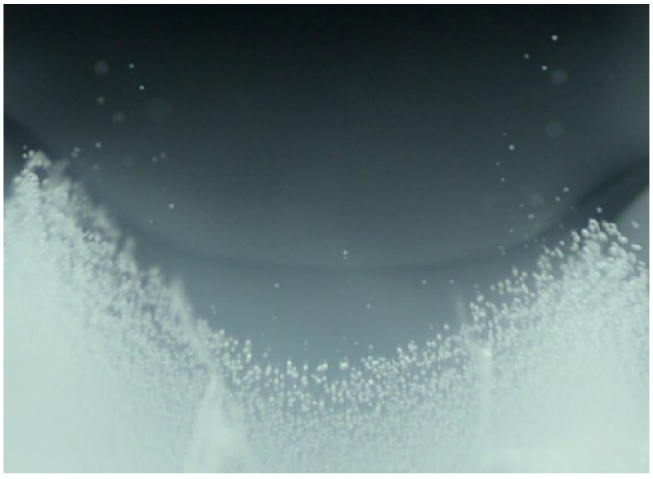
2.7.5 Mrznoucí čelo zblízka

V průběhu experimentů bylo pořízeno i několik makro snímků mrznoucího čela deionizované vody. Na Obrázku 2.32 je vidět ploché mrznoucí čelo se vznikajícími bublinami. Většina z těchto bublin zůstává v roztoku, ovšem některé před čelem stačí uniknout. To se shoduje s experimentem [16], kde autoři taktéž mrazí sloupec vody odspodu vzhůru a vidí unikající bublinky. Žádná z bublin však nedosahuje velikosti "bublin"methylenové modře.



Obrázek 2.32: Makro fotografie mrznoucího čela destilované vody.

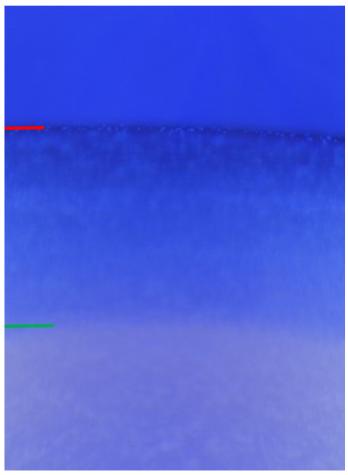
Na Obrázku 2.33 je vidět čelo před tím, než se stalo plochým. Na snímku je zachycen okamžik, kdy ze vznikajícího ledu uniká abnormální množství bublinek vzduch. Pro vysvětlení tohoto jevu je třeba si uvědomit, že rozpustnost vzduchu ve vodě stoupá s klesající teplotou a zároveň s rostoucím tlakem. Kyveta s vedou je v tomto případě ponořena v tekutém dusíku, a mrznoucí čelo vyrůstá z každé stěny a dna kyvety, scháma je vidět na Obrázku 2.4. To tvoří velké pnutí v ledu, které se uvolní slyšitelným prasknutím ledu, které je doprovázeno tvorbou bublinek. V tom okamžiku klesne tlak působící na rozpuštěný vzduch a množství bublinek vyplave z ledu do roztoku.



Obrázek 2.33: Vznik velkého množství bublin po prasknutí v ledu.

2.7.6 "Primární a sekundární"mrznoucí čelo

Při mrazení vzorků pomocí tekutého dusíku došlo během našich experimentů k rozdělení původního mrznoucího čela na dvě, primární a sekundární. To je způsobeno tím, že nejprve má mrznoucí čelo teplotu pod eutektickou teplotou našeho vznikajícího ledu. Teplota čela však roste s uraženou vzdáleností a čelo se rozdělí. Primární čelo před sebou sune koncentrovanou vrstvu a za sebou nechává led, jehož teplota je nad eutektickou teplotou. Pod primárním čelem se pak nachází sekundární čelo, které za sebou nechává led pod eutektickou teplotou. Na spodní části Obrázku 2.34 je vidět led pod eutektickou teplotou, který má lehce fialovou barvu. Jak bylo zmíněno u UV-VIS spekter, vysoké koncentrace methylenové modře se posouvají k fialové barvě. Nad tímto ledem je jasně viditelné sekundární čelo (označené zelenou přímkou) následované ledem nad eutektickou teplotou a primárním čelem (označené červenou přímkou), nad kterým je viditelný tekutý roztok.



Obrázek 2.34: Fotografie primárního a sekundárního mrznoucího čela.

Jev byl za jiných podmínek pozorován v práci [15], kde autoři pozorují podchlazenou kapku pomocí vysokorychlostní kamery. Kapkou nejprve prostoupí primární čelo a následně sekundární čelo, které zanechá led se zmrazeným eutektikem.

Závěr

Cílem této práce bylo odhalit a zkoumat koncentrovanou vrstvu, která vzniká při mrazení vodních roztoků methylenové modře. Dynamický výzkum této vrstvy byl umožněn, pomocí fotografií pořízených v průběhu experimentu, ze kterých bylo následně extrahováno RGB popřípadě HSV koncentrované vrstvy. Jednotlivé hodnoty byly převedeny na koncentraci methylenové modře pomocí kalibrační řady roztoků. Koncentrace koncentrované vrstvy byla sledována při různých rychlostech mrazení, kterých bylo docíleno použitím různých chladících médií. Rychlosti mrazení v této studii se pohybují od $8,33 \times 10^{-2}$ mm/s do $2,46 \times 10^{-3}$ mm/s. Pokud je srovnáme s daty z práce [14], můžeme soudit, že led vznikající v našem experimentu vzniká laminárním růstem. Z výsledků naší studie vyplynulo, že koncentrace koncentrované vrstvy roste se snižující se rychlostí mrazení. Tento výsledek je shodný se studiemi, které zkoumali koncentraci rozpuštěného vzduchu v koncentrované vrstvě a bublinky v ledu. Bylo také zjištěno, že poměr koncentrace methylenové modře v koncentrované vrstvě a v původním roztoku závísí na konentraci v původním roztoku. Koncentrace vrstvy u **MB 12** byla až 4,7krát vyšší než původní roztok, zatímco u **MB 26** [16, 17] byla koncentrace vrstvy až 9,7krát vyšší než v původním roztoku. Krom koncentrace se s rychlostí mrazení mění i tloušťka saturované vrstvy a to tak, že se zvyšuje od desítek pixelů při rychlém mrazení až po 0,5 mm u mrazení pomalého.

Naše metoda zkoumání koncentrace pomocí RGB je momentálně limitovaná pouze na zkoumání vodních roztoků. Do budoucna bychom tuto metodu rádi aplikovali i na zmrzlé roztoky. Informace o tom, kolikrát se roztok zakoncentruje v kanálcích a žilách ledu při různém způsobu mrazení a jaký má tato koncentrace vliv na pH, iontovou sílu a další faktory by byly přínosné v jak vědních, tak průmyslových odvětvích jako potravinářství nebo farmacie. Před dosažením tohoto cíle je však třeba řešit několik překážek, jako je třeba vliv bublinek v ledu na hodnoty RGB nebo odrážení světelných paprsků ledovými krystalky. Oba tyto jevy se zhoršují se zvyšující se rychlostí mrazení a pro další postup bude nutné je obejít, nebo jejich vliv na RGB alespoň omezit.

Příloha

Tabulka 3.1: Zprůměrované korigované RGB roztoků se směrodatnou odchylkou průměru jednotlivých hodnot.

Roztok	Průměr			Směrodatná odchylka průměru		
	R	G	B	R	G	B
MB 1	20,060	29,333	28,000	0,453	0,444	0,000
MB 2	15,179	23,667	23,000	0,000	0,444	0,000
MB 3	16,660	28,333	27,000	0,453	0,444	0,000
MB 4	18,214	24,000	32,333	0,000	0,000	0,444
MB 5	19,901	26,667	99,333	0,899	0,889	0,444
MB 6	23,460	26,667	113,000	0,000	0,444	0,000
MB 7	26,520	30,000	131,667	0,000	0,000	0,444
MB 8	30,357	38,000	169,000	0,000	0,000	0,000
MB 9	31,369	39,000	182,000	0,000	0,000	0,000
MB 10	33,333	48,000	212,165	0,444	0,000	0,446
MB 11	35,417	65,000	238,000	0,000	0,000	0,000
MB 12	43,180	85,000	255,000	0,453	0,000	0,000
MB 13	49,980	139,000	255,000	0,000	0,000	0,000
MB 14	41,820	207,000	255,000	0,000	0,000	0,000
MB 15	44,187	219,000	255,000	0,450	1,333	0,000
MB 16	50,595	234,667	255,000	0,000	3,111	0,000
MB 17	53,040	228,000	256,004	0,000	0,000	0,000
MB 18	60,520	235,000	258,036	0,453	0,000	0,000
MB 19	69,360	254,667	258,036	0,000	0,444	0,000
MB 20	88,036	254,000	254,667	0,000	0,000	0,444
MB 21	115,667	255,000	255,000	0,444	0,000	0,000
MB 22	146,333	255,000	257,016	0,889	0,000	0,000
MB 23	203,000	254,333	254,333	0,000	0,444	0,444
MB 24	231,255	253,000	253,992	0,000	0,000	1,344
MB 25	220,333	254,000	255,000	0,444	0,000	0,000
MB 26	215,743	255,000	255,000	0,455	0,000	0,000
MB 27	224,333	254,333	255,000	0,444	0,444	0,000
MB 28	226,667	254,333	255,000	0,000	0,444	0,000
MB 29	242,711	254,000	255,000	0,000	0,000	0,000
MB 30	237,320	254,000	254,667	0,453	0,000	0,444
MB 31	242,000	254,333	255,000	0,000	0,444	0,000
MB 32	247,520	254,000	253,996	0,453	0,000	0,000
MB 33	246,333	254,000	253,333	0,889	0,000	0,444
MB 34	247,000	254,000	253,667	0,000	0,000	0,889
MB 35	242,667	252,667	255,000	0,889	0,444	0,000
MB 36	249,940	254,333	253,333	0,000	0,444	0,444
MB 37	242,333	254,000	256,008	0,889	0,000	0,000
MB 38	244,000	254,000	250,000	0,000	0,000	0,000
MB 39	249,333	254,333	255,000	0,444	0,444	0,000
MB 40	249,000	254,000	254,333	0,000	0,000	0,444

Tabulka 3.2: Zprůměrované korigované HSV roztoků se směrodatnou odchylkou průměru jednotlivých hodnot.

Roztok	Průměr			Směrodatná odchylka průměru		
	H	S	V	H	S	V
MB 1	171,667	32,467	11,533	1,778	2,822	0,178
MB 2	175,333	36,333	9,267	3,111	1,022	0,178
MB 3	173,667	41,933	11,133	1,778	1,911	0,178
MB 4	215,000	44,133	12,633	0,667	0,911	0,178
MB 5	235,000	80,133	38,933	0,000	0,889	0,178
MB 6	237,333	79,600	44,300	0,444	0,000	0,000
MB 7	238,000	79,467	51,667	0,000	0,044	0,178
MB 8	237,000	82,200	66,300	0,000	0,000	0,000
MB 9	237,000	83,000	71,400	0,000	0,000	0,000
MB 10	236,000	84,300	83,233	1,333	0,200	0,178
MB 11	231,000	85,300	93,300	0,000	0,000	0,000
MB 12	228,000	82,967	100,000	0,000	0,178	0,000
MB 13	214,000	80,400	100,000	0,000	0,000	0,000
MB 14	194,000	83,500	100,000	0,000	0,000	0,000
MB 15	190,667	82,500	100,000	0,444	0,133	0,000
MB 16	185,667	80,000	100,000	0,889	0,000	0,000
MB 17	188,000	79,200	100,000	0,000	0,000	0,000
MB 18	186,000	76,367	100,000	0,000	0,178	0,000
MB 19	180,000	72,900	100,000	0,000	0,000	0,000
MB 20	180,000	65,467	99,867	0,000	0,044	0,178
MB 21	180,000	54,633	100,000	0,000	0,178	0,000
MB 22	180,000	42,633	100,000	0,000	0,311	0,000
MB 23	180,000	20,300	99,867	0,667	0,133	0,178
MB 24	181,667	8,933	99,467	2,222	0,311	0,356
MB 25	182,000	13,567	100,000	0,000	0,178	0,000
MB 26	180,000	15,433	100,000	0,000	0,178	0,000
MB 27	181,333	12,067	100,000	0,889	0,178	0,000
MB 28	181,333	11,000	100,000	0,889	0,000	0,000
MB 29	184,000	4,833	100,000	1,333	0,178	0,000
MB 30	182,333	6,700	99,867	1,556	0,267	0,178
MB 31	183,333	5,100	100,000	2,222	0,000	0,000
MB 32	180,000	2,533	99,600	0,000	0,178	0,000
MB 33	174,667	3,033	99,600	3,556	0,311	0,000
MB 34	176,333	2,900	99,733	7,111	0,133	0,178
MB 35	191,333	4,833	100,000	1,778	0,356	0,000
MB 36	166,000	1,700	99,733	1,333	0,200	0,178
MB 37	177,333	4,833	99,867	10,222	0,178	0,178
MB 38	156,000	3,900	99,600	0,000	0,000	0,000
MB 39	187,333	2,267	100,000	4,889	0,178	0,000
MB 40	183,333	2,133	99,733	4,444	0,178	0,178

Tabulka 3.3: Průměrné koncentrace saturované vrstvy roztoku **MB 12** se směrodatnou odchylkou průměru (n=3)

Tekutý dusík			Ethanol se suchým ledem		
Vzdálenost od dna kyvety (mm)	Průměr koncentrace vrstvy ($mol \cdot l^{-1}$)	Směrodatná odchylka průměru ($mol \cdot l^{-1}$)	Vzdálenost od dna kyvety (mm)	Průměr koncentrace vrstvy ($mol \cdot l^{-1}$)	Směrodatná odchylka průměru ($mol \cdot l^{-1}$)
26	0,436E-03	1,034E-05	14	0,132E-02	6,943E-06
30	0,472E-03	1,211E-05	17	0,135E-02	4,722E-06
31	0,532E-03	4,692E-06	19	0,152E-02	1,326E-05
32	0,588E-03	5,140E-06	22	0,143E-02	1,507E-05
35	0,601E-03	4,219E-06	25	0,137E-02	1,448E-05
37	0,751E-03	1,057E-05			

Tabulka 3.4: Průměrné koncentrace saturované vrstvy roztoku **MB 18** se směrodatnou odchylkou průměru (n=3)

Tekutý dusík			Ethanol se suchým ledem		
Vzdálenost od dna kyvety (mm)	Průměr koncentrace vrstvy ($mol \cdot l^{-1}$)	Směrodatná odchylka průměru ($mol \cdot l^{-1}$)	Vzdálenost od dna kyvety (mm)	Průměr koncentrace vrstvy ($mol \cdot l^{-1}$)	Směrodatná odchylka průměru ($mol \cdot l^{-1}$)
25	0,112E-03	2,319E-06	15	0,255E-03	3,298E-06
26	0,113E-03	1,463E-06	19	0,325E-03	1,491E-06
33	0,139E-03	3,562E-06	20	0,370E-03	3,498E-05
34	0,150E-03	6,478E-06	21	0,329E-03	1,189E-05
35	0,197E-03	6,019E-06			
36	0,238E-03	8,669E06			

Tabulka 3.5: Průměrné koncentrace saturované vrstvy roztoku **MB 26** získané pomocí červeného kanálu se směrodatnou odchylkou průměru (n=3)

Tekutý dusík			Ethanol se suchým ledem		
Vzdálenost od dna kyvety (mm)	Průměr koncentrace vrstvy ($mol \cdot l^{-1}$)	Směrodatná odchylka průměru ($mol \cdot l^{-1}$)	Vzdálenost od dna kyvety (mm)	Průměr koncentrace vrstvy ($mol \cdot l^{-1}$)	Směrodatná odchylka průměru ($mol \cdot l^{-1}$)
29	1,210E-05	2,126E-07	16	5,194E-05	9,643E-07
30	1,369E-05	1,626E-07	17	6,089E-05	5,594E-07
31	1,451E-05	2,539E-07	18	6,738E-05	1,658E-06
36	1,593E-05	4,746E-07	20	7,097E-05	1,094E-06
			21	7,262E-05	6,699E-07

Tabulka 3.6: Průměrné koncentrace saturované vrstvy roztoku **MB 26** získané pomocí saturace se směrodatnou odchylkou průměru (n=3)

Tekutý dusík			Ethanol se suchým ledem		
Vzdálenost od dna kyvety (mm)	Průměr koncentrace vrstvy ($mol \cdot l^{-1}$)	Směrodatná odchylka průměru ($mol \cdot l^{-1}$)	Vzdálenost od dna kyvety (mm)	Průměr koncentrace vrstvy ($mol \cdot l^{-1}$)	Směrodatná odchylka průměru ($mol \cdot l^{-1}$)
29	1,243E-05	3,389E-07	16	5,458E-05	1,361E-06
30	1,411E-05	1,974E-07	17	6,457E-05	9,940E-07
31	1,444E-05	2,475E-07	18	7,161E-05	1,786E-06
36	1,657E-05	4,569E-07	20	7,569E-05	1,177E-06
			21	7,746E-05	7,209E-07

Tabulka 3.7: Průměrné koncentrace roztoku v blízkosti koncentrované vrstvy se směrodatnou odchylkou průměru (n=3)

1 mm nad koncentrovanou vrstvou			5 mm nad koncentrovanou vrstvou		
Vzdálenost koncentrované vrstvy od dna kyvety (mm)	Průměr koncentrace ($mol \cdot l^{-1}$)	Směrodatná odchylka průměru ($mol \cdot l^{-1}$)	Vzdálenost koncentrované vrstvy od dna kyvety (mm)	Průměr koncentrace ($mol \cdot l^{-1}$)	Směrodatná odchylka průměru ($mol \cdot l^{-1}$)
14	0,361E-03	3,708E-06	14	0,336E-03	2,599E-06
17	0,365E-03	6,548E-06	17	0,345E-03	1,780E-06
19	0,333E-03	1,941E-06	19	0,317E-03	4,915E-06
26	0,318E-03	6,582E-06	26	0,312E-03	1,604E-06
30	0,314E-03	4,087E-06	30	0,309E-03	4,465E-06
31	0,317E-03	6,667E-06	31	0,311E-03	7,313E-06
32	0,319E-03	1,641E-06	32	0,323E-03	1,660E-06
35	0,323E-03	4,444E-06	35	0,312E-03	2,222E-06
37	0,309E-03	5,614E-06	37	0,319E-03	2,262E-06

Tabulka 3.8: Průměrné časy mrznutí v tekutém dusíku a směsi ethanol a suchý led se směrodatnou odchylkou průměru (n=3)

Tekutý dusík			Ethanol se suchým ledem		
Vzdálenost od dna kyvety (mm)	Průměrný čas mrznutí 1 mm (s)	Směrodatná odchylka průměru (s)	Vzdálenost od dna kyvety (mm)	Průměrný čas mrznutí 1 mm (s)	Směrodatná odchylka průměru (s)
24	12,00	0,00	12	31,00	1,50
25	15,33	0,33	13	35,00	1,50
26	14,67	0,67	14	60,00	5,00
27	15,33	0,33	15	64,00	3,50
28	17,33	0,67	16	65,00	2,50
29	17,00	0,50	17	73,67	2,83
30	19,67	0,83	18	67,00	6,50
31	21,33	0,33	19	95,67	1,67
32	22,33	0,83	20	110,33	3,33
33	21,67	0,33	21	120,00	4,00
34	25,00	1,50	22	116,33	4,67
35	26,33	0,83	23	109,00	6,50
36	26,00	1,00	24	130,6	3,67
37	28,33	2,33	25	121,67	6,33
38	31,00	2,00	26	136,00	5,50
39	31,00	2,00	27	146,00	5,00
40	32,67	0,33	28	308,00	11,00
41	35,33	0,83	29	406,67	10,67
42	39,67	1,33			
43	41,00	1,50			
44	42,00	2,50			

Seznam použité literatury

[1] Reid W. T., *Sturmian theory for ordinary differential equations*, Applied Mathematical Sciences, Springer-Verlag, New York, 1980. ISBN: 0-387-90542-1.

[2] Hansen T. C., *The everlasting hunt for new ice phases.* Nature Communications, **12**(1), 2021. DOI: 10.1038/s41467-021-23403-6

[3] Fuentes-Landete V., *Crystalline and amorphous ices.* Proc. of the International School of Physics "Enrico Fermi", Water: Fundamentals as the Basis for Understanding the Environment and Promoting Technology. Amsterdam, Bologna, **187**, 173-208, 2015. DOI: 10.3254/978-1-61499-507-4-173

[4] Salzmann C. G., Radaelli P. G., Slater B., Finney J. L., *The polymorphism of ice: FIVE unresolved questions*. Physical Chemistry Chemical Physics, **13**(41), 18468, 2011. DOI: 10.1039/c1cp21712g

[5] Fox-Powell M., Cousins C., *Production of crystalline and amorphous phases during freezing of Simulated Enceladus ocean fluids.* Journal of Geophysical Research: Planets, **126**(1), 2020. DOI: 10.5194/epsc2020-199

[6] Moore E. B., Molinero V., *Structural transformation in supercooled water controls the crystallization rate of ice.* Nature, **479**(7374), 506-508, 2011. DOI: 10.1038/nature10586

[7] Mossop S. C., *The freezing of supercooled water.* Proceedings of the Physical Society. Section B, **68**(4), 193-208, 1955. DOI: 10.1088/0370-1301/68/4/301

[8] Vali G., *Freezing rate due to heterogeneous nucleation.* Journal of the Atmospheric Sciences, **51**(13), 1843-1856, 1994. DOI: 10.1175/1520-0469(1994)0512.0.co;2

[9] Killawee J., Fairchild I., Tison J., Janssens L., Lorrain R., *Segregation of solutes and gases in experimental freezing of dilute solutions: implications for natural glacial systems.* Geochimica Et Cosmochimica Acta, **62**(23-24), 3637-3655, 1998. DOI: 10.1016/s0016-7037(98)00268-3

[10] Nakaya U. *Snow Crystals: Natural and Artificial.* Science, **120**(3123), 755LP-755, 1954. DOI: 10.4159/harvard.9780674182769

[11] Krausko J., Runštuk J., Neděla V., Klán P., Heger D., *Observation of a brine layer on an ice surface with an environmental scanning electron microscope at higher pressures and temperatures.* Langmuir, **30**(19), 5441–5447, 2014. DOI: 10.1021/la500334e

[12] Waschkies T., Oberacker R., Hoffmann M., *Investigation of structure formation during freeze-casting from very slow to very fast solidification velocities.* Acta Materialia, **59**(13), 5135-5145, 2011. DOI: 10.1016/j.actamat.2011.04.046

[13] Shibkov A., Golovin Y., Zheltov M., Korolev A., Leonov A., *In situ monitoring of growth of ice from supercooled water by a new electromagnetic method.* Journal of Crystal Growth, **236**(1-3), 434-440, 2002. DOI: 10.1016/s0022-0248(01)02108-x

[14] Shibkov A., Golovin Y., Zheltov M., Korolev A., Leonov A., *Morphology diagram of nonequilibrium patterns of ice crystals growing in supercooled water.* Physica A: Statistical Mechanics and Its Applications, **319**, 65-79, 2003. DOI: 10.1016/s0378-4371(02)01517-0

[15] Schremb M., Tropea C., *Solidification of supercooled water in the vicinity of a solid wall.* Physical Review E, **94**(5), 2016. DOI: 10.1103/physreve.94.052804

[16] Carte A. E., *Air bubbles in ice.* Proceedings of the Physical Society, **77**(3), 757-768, 1961. DOI: 10.1088/0370-1328/77/3/327

[17] Lipp G., Körber C., Englich S., Hartmann U., Rau G., *Investigation of the behavior of dissolved gases during freezing.* Cryobiology, **24**(6), 489-503, 1987. DOI: 10.1016/0011-2240(87)90053-8

[18] Workman E. J., Reynolds S. E., *Electrical phenomena occurring during the freezing of dilute aqueous solutions and their possible relationship to thunderstorm electricity.* Physical Review, **78**(3), 254-259, 1950. DOI: 10.1103/physrev.78.254

[19] Bronshteyn V. L., Chernov A. A., *Freezing potentials arising on solidification of dilute aqueous solutions of electrolytes*. Journal of Crystal Growth, **112**(1), 129–145, 1991. DOI: 10.1016/0022-0248(91)90918-u

[20] Haymet A., Wilson P., *The workman–reynolds "freezing potential": a new look at the inherent physical process.* Journal of Molecular Liquids, **228**, 243-246, 2017. DOI: 10.1016/j.molliq.2016.07.081

[21] Khairnar S., Kini R., Harwalkar M., Salunkhe K., Chaudhari S., *A review on freeze drying process of pharmaceuticals*. International Journal of Research in Pharmacy and science, 76-94, 2012. ISSN: 2249–3522

[22] Shivanand A., Mukhopadhayaya S., *A review on lyophilization: a technique to improve stability of hygroscopic, thermolabile substances.* PharmaTutor, **5**(11), 28-39, 2017. e-ISSN: 2347-7881

[23] Heger D., Klánová J., Klán P., *Enhanced protonation of cresol red in acidic aqueous solutions caused by freezing.* The Journal of Physical Chemistry B, **110**(3), 1277–1287, 2006. DOI: 10.1021/jp0553683

[24] Krausková Ľ., Procházková J., Klašková M., Filipová L., Chaloupková R., Malý S., Damborský J., Heger D. *Suppression of protein inactivation during freezing by minimizing pH changes using ionic cryoprotectants*. International Journal of Pharmaceutics, **509**(1-2), 41–49, 2016. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.05.031

[25] Hauptmann A., Podgoršek K., Kuzman D., Srčič S., Hoelzl G., Loerting T., *Impact of buffer, protein concentration and sucrose addition on the aggregation and particle formation during freezing and thawing.* Pharmaceutical Research, **35**(5), 2018. DOI: 10.1007/s11095-018-2378-5

[26] Li W. L., Lu K., Walz J. Y., *Freeze casting of porous materials: review of critical factors in microstructure evolution.* International Materials Reviews, **57**(1), 37–60, 2012. DOI: 10.1179/1743280411y.0000000011

[27] Deville S., *Freeze-casting of porous ceramics: a review of current achievements and issues.* Advanced Engineering Materials, **10**(3), 155–169, 2008. DOI: 10.1002/adem.200700270

[28] Rahman S., *Handbook of food preservation*. CRC Press, 2020.

[29] Amit S. K., Uddin M. M., Rahman R., Islam S. M., Khan M. S., *A review on mechanisms and commercial aspects of food preservation and processing.* Agriculture & Food Security, **6**(1), 2017. DOI: 10.1186/s40066-017-0130-8

[30] Mathelin C., Croce S., Brasse D. , Gairard B., Gharbi M., Riamisandratsoa N., Bekaert V., Francis Z., Guyonnet J.-L., Huss D., Salvador S., Schaeffer R., Grucker D., Marin C., Bellocq J.-P., *Methylene blue dye, an accurate dye for sentinel lymph node identification in early breast cancer*. Anticancer Research, International Institute of Anticancer Research, **29**(10), 4119-4125, 2009.

[31] Chang T.-W., *Eczema Herpeticum.* Archives of Dermatology, **111**(9), 1174, 1975. DOI: 10.1001/archderm.1975.01630210090012

[32] Müller O., Lu G., Jahn A., Mockenhaupt F.-P., *How worthwhile is methylene blue as a treatment of malaria?* Expert Review of Anti-Infective Therapy, **17**(7), 471–473, 2019. DOI: 10.1080/14787210.2019.1634545

[33] Heger D., Jirkovský J., Klán P., *Aggregation of methylene blue in frozen aqueous solutions studied by absorption spectroscopy.* The Journal of Physical Chemistry A, **109**(30), 6702–6709, 2005. DOI: 10.1021/jp050439j

[34] Bergmann K., O'Konski C. T., *A spectroscopic study of methylene blue monomer, dimer, and complexes with montmorillonite.* The Journal of Physical Chemistry, **67**(10), 2169–2177, 1963. DOI: 10.1021/j100804a048

[35] *RGB to HSV color conversion* (online). RGB to HSV conversion | color conversion. (cit. 27. 07. 2021). Dostupné z: https://www.rapidtables.com/convert/color/rgb-to-hsv.html

[36] *Convert RGB values to color wheel coordinates* (online). Stack Overflow (cit. 27. 07. 2021). Dostupné z: https://stackoverflow.com/questions/50819434/convert-rgb-values-to-color-wheel-coordinates

[37] *HSL and HSV* (online). Psychology Wiki (cit. 27. 07. 2021). Dostupné z: https://psychology.wikia.org/wiki/HSL_and_HSV

[38] Chakrabarti S., Dutta B. K., *On the adsorption and diffusion of methylene blue in glass fibers.* Journal of Colloid and Interface Science, **286**(2), 807–811, 2005. DOI: 10.1016/j.jcis.2005.01.035

[39] *Ice - thermal properties* (online). Engineering ToolBox, 2004 (cit. 27. 07. 2021). Dostupné z: https://www.engineeringtoolbox.com/ice-thermal-properties-d_576.html

[40] *Matlab* (online). MathWorks (cit. 27. 07. 2021). Dostupné z: https://www.mathworks.com/products/matlab.html

[41] *HSV to RGB color conversion* (online). HSV to RGB conversion | color conversion (cit. 27. 07. 2021). Dostupné z: https://www.rapidtables.com/convert/color/hsv-to-rgb.html