



**MATEMATICKO-FYZIKÁLNÍ
FAKULTA**
Univerzita Karlova

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Tomáš Tayari

Studium fotodegradace piva optickými metodami

Kabinet výuky obecné fyziky

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Petr Gabriel, Ph.D.

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: Fyzika se zaměřením na vzdělávání

Praha rok 2019

Děkuji Výzkumnému ústavu pivovarskému a sladařskému za poskytnutí prostor a optických přístrojů. Dále bych rád poděkoval vedoucímu práce RNDr. Petrovi Gabrielovi, Ph.D. a konzultantovi RNDr. Miroslavu Dienstbierovi za odborné konzultace a trpělivost. V neposlední řadě děkuji Mgr. Pavle Boškové a Tereze Hofrichterové za korekturu textu.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů.

Beru na vědomí, že se na moji práci se vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona v platném znění, zejména skutečnost, že Univerzita Karlova má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

V dne.....

podpis

Název práce: Studium fotodegradace piva optickými metodami

Autor: Tomáš Tayari

Katedra / Ústav: Kabinet výuky obecné fyziky

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Petr Gabriel, Ph.D.

Abstrakt: Pokud je pivo vystaveno působení světelného záření, velmi rychle v něm vzniká nežádoucí velmi nepříjemná tzv. letinková (světelná) příchut'. Podle současných představ je za světelnou příchut' v pivu zodpovědná zejména látka 3-methyl-2-buten-1-thiol (MBT). Vznik MBT je spojen s neenzymatickými reakcemi, v nichž vystupují isohumulony a sirié složky aminokyselin a jejich derivátů. Jako fotokatalyzátor zde působí riboflavin (vitamín B2), který absorbuje světelné záření a v excitovaném stavu reaguje s isohumulony. Působením světla se riboflavin rozpadá na fotoprodukty a mění se optické vlastnosti vzorku.

Cílem práce bylo ověřit možnosti optické detekce fotodegradace piva. Byla sestavena aparatura pro detekci spektrálně rozlišené intensity fluorescence s výměnným excitačním LED zdrojem. Aparatura umožňuje měření excitačně emisní matice fluorescence (EEM) s vybranými vlnovými délkami excitace. Fluorescenční signál je snímán spektrofotometrem pod úhlem 90° vzhledem k excitačnímu paprsku a korigován jeho intenzitou detekovanou v přímém směru. Světelný zdroj i detektory jsou připojeny k měřicí komoře přes optická vlákna.

Na aparatuře byla naměřena fluorescenční spektra riboflavinu, jeho fotoproduktu lumichromu a spektra vzorků čerstvého a definovaně světelně poškozeného piva. Výsledky potvrdily, že sestavená aparatura umožňuje detekovat optické změny piva spojené s jeho světelným poškozením.

Klíčová slova: 3-methyl-2-buten-1-thiol, fotodegradace, letinková příchut', riboflavin

Title: Study of beer photodegradation by optical methods

Author: Tomáš Tayari

Department: Laboratory of General Physics Education

Supervisor: RNDr. Petr Gabriel, Ph.D

Abstract: If beer is exposed to light radiation, it very quickly creates an undesirable unpleasant so-called lightstruck flavor. According to current ideas, 3-methyl-2-butene-1-thiol (MBT) is responsible for the lightstruck flavour in beer. The formation of MBT is associated with non-enzymatic reactions in which isohumulones and sulfuric components of amino acids and their derivatives emerge. Riboflavin (vitamin B2), which absorbs light and reacts with isohumulones in the excited state, acts as a photocatalyst. Light degrades riboflavin into its photoproducts.

The aim of this work was to verify the possibilities of optical detection of beer photodegradation. An apparatus for detecting spectrally differentiated fluorescence intensity with a replaceable excitation LED source was constructed. The apparatus allows the excitation emission matrix of fluorescence (EEM) to be measured with selected excitation wavelengths. The fluorescence signal is scanned by a spectrophotometer with 90 ° offset to the excitation beam and corrected by its intensity which was detected in a straight line. The light source and detectors are connected to the measuring chamber via optical fibers.

The fluorescence spectra of riboflavin, its photoproduct lumichrome and samples of fresh and defined light-damaged beer were measured on the apparatus. The results confirmed that the assembled apparatus makes it possible to detect optical changes of beer associated with its light damage.

Keywords: 3-methyl-2-buten-1-thiol, light-struck character, photodegradation, riboflavin

Obsah

| | |
|--|-----------|
| Úvod | 1 |
| 1. Světelná degradace piva..... | 2 |
| 1.1. Historie výzkumu světelné degradace piva..... | 2 |
| 1.2. Chemický popis průběhu světelného poškození | 3 |
| 1.3. Riboflavin | 4 |
| 1.4. MBT a jeho vlastnosti..... | 6 |
| 1.5. Optická detekce světelného poškození | 6 |
| 1.6. Absorbance a Lambert-Beerův zákon..... | 8 |
| 1.7. Fluorescence | 9 |
| 2. Popis aparatury | 9 |
| 2.1. Fluorescenční aparatura | 9 |
| 2.2. Spektrofotometry | 14 |
| 2.3. COLORTURB | 14 |
| 2.4. Osvětlovací adaptér..... | 15 |
| 3. Výsledky měření | 16 |
| 3.1. Ověření parametrů přístrojů | 16 |
| 3.2. Vlastní měření | 20 |
| Závěr | 34 |
| Seznam použité literatury | 37 |
| Seznam obrázků | 39 |
| Seznam grafů | 40 |
| Seznam tabulek | 41 |
| Seznam použitých zkratk | 42 |

Úvod

Pivo je jedním z nejstarších a nejrozšířenějších nápojů na světě. Dokonce je to nejpoblárnější nápoj hned po vodě a čaji. Je tedy nasnadě zabývat se jeho kvalitou. Z historických nálezů víme, že kvalitou piva se zabývali již staří Egypťané, protože o kvalitě piva pojednávají i některé první dochované řešené matematické úlohy.

Na kvalitu piva může působit mnoho vlivů: od kvality použitých surovin přes to, jak je skladováno, až po způsob, jak je výčepní čepuje do sklenic. Na první pohled nenápadným faktorem může být i to, jestli pivo bylo vystaveno delší dobu světlu. To se může stát (v případě průhledné láhve) v obchodě pod zářivkami nebo i hůř venku na slunci. Závažnost tohoto faktoru si uvědomíme v momentě, kdy světelně poškozené pivo začneme pít; takové pivo bude mít jinou vůni i chuť, zbarvenou takzvanou letinkovou (někdy nazývanou skunkovou) příchutí, která je nepřijemná.

V současné době je znám proces, kterým se pivo světelně poškozuje. Zodpovědná je zejména látka 3-methyl-2-buten-1-thiol (MBT). Vznik MBT je spojen s neenzymatickými reakcemi, v nichž vystupují isohumulony a sirné složky aminokyselin a jejich derivátů. Jako fotokatalyzátor zde působí riboflavin (vitamín B2), který absorbuje světelné záření a v excitovaném stavu reaguje s isohumulony. Působením světla se riboflavin (RF) rozpadá na fotoprodukty, čímž se mění optické vlastnosti vzorku

Tato práce si dává za cíl studovat detekci světelného poškození piva optickými metodami. Výhodou optické detekce je to, že je neinvazivní, tedy pivo nemusíme otevírat, abychom mohli zjistit, jestli je poškozené.

Práce by měla přispět k vytvoření aparatury a k ní se vážící metody, která umožňuje měření optických změn piva přímo v komerčních láhvích. Tato aparatura by mohla mít budoucí možné užití v pivovarnickém průmyslu.

1. Světelná degradace piva

1.1. Historie výzkumu světelné degradace piva

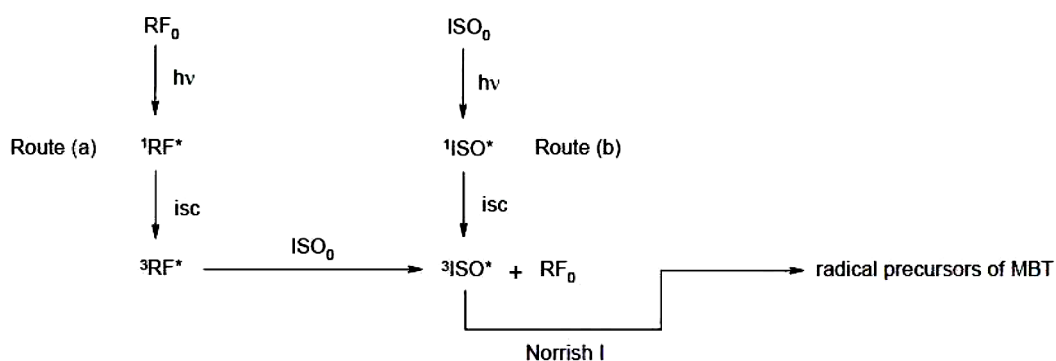
První studie o vlivu světla na kvalitu piva vyšla v roce 1875 na území dnešního Německa [1]. V této studii také byla poprvé nazvána příchut' osvětleného piva jako letinková. Zmíněná studie vzbudila mnoho pozornosti a leckdo se snažil na tento výzkum navázat. Později v roce 1908 se zjistilo, že světlo působí na pivo negativně až po fermentaci. Roku 1934 se přišlo na to, jaké složky jsou nově přítomné ve světelně poškozeném pivě. Jsou to převážně sirovodíky a thioly. V roce 1947 Jacobssen a Högberg ověřili, že světlo, které poškozuje pivo, má vlnovou délku v rozmezí 420 až 540 nm, tzn. od modrého až po zelené světlo. Další významný objev byl uskutečněn v roce 1958, kdy bylo zjištěno, že prekursor podmiňující letinkovou příchut' jsou humulony a lupulony, tzv. iso- α -hořké látky, které do piva přicházejí z chmele. V roce 1962 byl konečně identifikován hlavní původce letinkové příchuti, totiž 3-methylbut-2-en-1-thiol, zkráceně MBT. Začátkem šedesátých let Joširo Kurojwa ověřil předchozí studie. Bezchmelé pivo se světelně nepoškozovalo, ale po přidání chmelového extraktu bylo znovu na světlo citlivé. Rozšířil interval světelného spektra, který má na pivo vliv, na 350 až 500 nm a prokázal, že původcem letinkové příchuti je skutečně MBT. Zároveň provedl mnoho pokusů a zjistil, že kyslík, peroxid vodíku, manganistan draselný a jiné látky tvorbu příchuti potlačují [2, 3].

Kacuhiko Asano následně přišel na to, že stejné druhy piva produkují stejné množství MBT. Ale v rámci různých piv se přítomnost MBT po osvětlení liší. Pomocí modelových roztoků následně ověřil, že tvorba MBT silně závisí na koncentraci riboflavinu v pivu. Riboflavin fungující jako fotochemický senzitivizér je nezbytný pro tvorbu MBT z isohumulonů a sirmého proteinu. [2]

Tuto studii rozšířil Šuso Sakuma, který přímo popsal tvorbu MBT v pivu při světelném poškození. Isohumulony se po interakci se světlem excitovaným riboflavinem (RF) rozkládají na radikály, z kterých vzniká MBT a tedy i nepříjemná pachut'. [2]

1.2. Chemický popis průběhu světelného poškození

Podle dosavadních znalostí probíhá světelné poškození piva takto: Poté, co riboflavin (vitamín B2) absorbuje energii záření, dochází k jeho excitaci. Pokud je riboflavin ozářen světlem o délce mezi 350 až 500 nm, excituje se do singletního stavu. Později přechází i do tripletního stavu. Následně tripletní stav riboflavinu degraduje a předá svou excitační energii isohumulonům, které se excitují, a to taktéž do tripletního stavu. Tento tripletní excitovaný stav isohumulonů může též vzniknout přímým osvitem ultrafialovým zářením. Následně dojde ke štěpení těchto tripletů a dojde ke vzniku 4-methylpent-3-enoylovému radikálu, který se posléze dekarboxyluje a vzniká prekursor MBT, konkrétně 3-methylbut-2-enoylový radikál. Po návázání tohoto radikálu na vhodný zdroj síry vzniká konečně MBT. [2, 4]



Obr. 1: Přenos excitace z riboflavinu na isohumulony a vznik MBT, převzato z [2]

1.3. Riboflavin

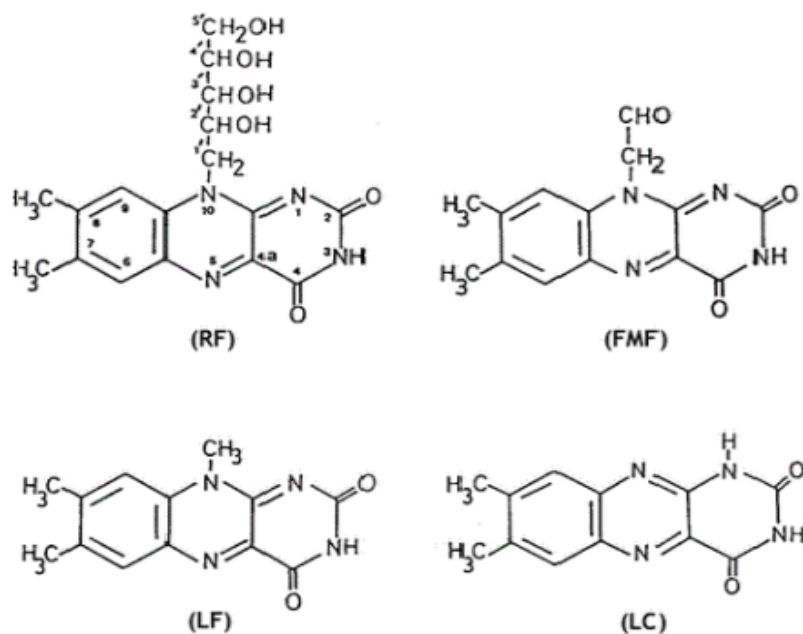
Riboflavin funguje při světelném stárnutí piva jako fotochemický senzitizer, který absorbuje světelné záření ve viditelné části spektra a předává jeho energii dalším látkám. Další komponenty účastníci se světelného poškození (sirné látky a hořké kyseliny) z kterých vzniká MBT, neabsorbují viditelné světlo.

Absorpční spektrum riboflavinu má čtyři významná absorpční maxima. Pro naše potřeby jsou ve viditelném světle důležitá pouze maxima na vlnové délce 375 nm a 445 nm (jak je vidět na grafu 1). [4]

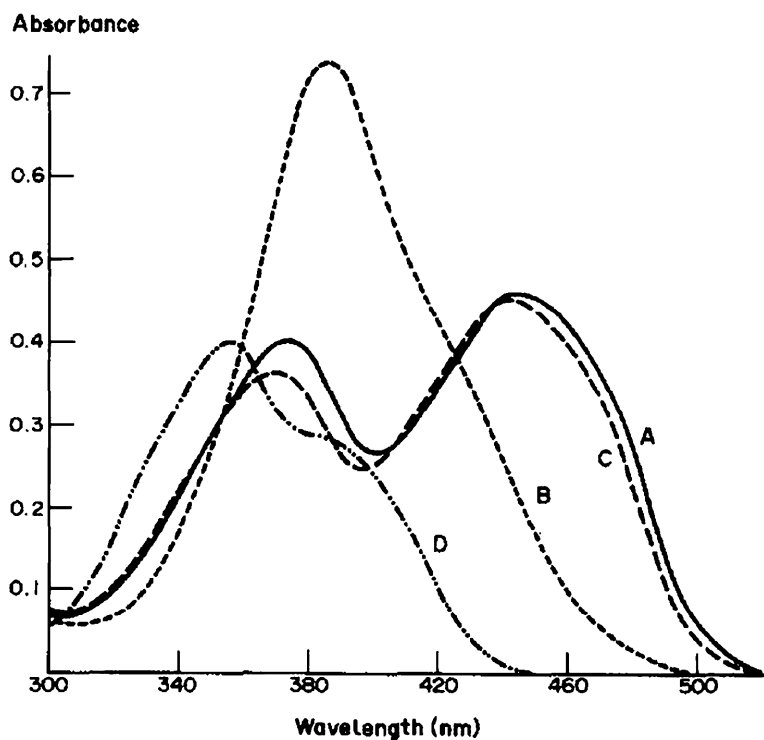
Riboflavin je organická látka patřící do skupiny flavinů. Flaviny jsou látky odvozené od 8-dimethylisoalloxazinu (7,8-dimethylbenzo[g]pteridin-2,4-dion). Flaviny mají význam při různých enzymatických reakcích, dále se uplatňují při transferu elektronu v dýchacích řetězcích v biologických procesech. [5]

Riboflavin je pak ze všech flavinů zastoupen v pivu v největším množství. Do piva se dostává převážně z ječmene, a dokonce se neodbourává při vaření piva, protože dobře odolává teplotě varu. Působením kvasnic se jeho koncentrace následně zvyšuje. [6]

Při osvětlení riboflavinu dochází k jeho degradaci a vzniku fotoproduktů (často kombinací s jinými flaviny). Nejčastěji vznikajícími fotoprodukty jsou lumichrom (LC), formylmethylflavin (FMF) a lumiflavin (LF) (zakresleno v obr 2). [6]



Obr. 2: Strukturní vzorce riboflavínu a jeho fotoproduktů, převzato z [7]



Graf 1: Absorpční spektra riboflavínu a jeho fotoproduktů (A – riboflavin, B – formylmethylflavin, C – lumiflavin, D – lumichrom), převzato z [8]

Riboflavin je pro tuto práci důležitý z toho důvodu, že při světelném poškození dochází k jeho degradaci, koncentrace riboflavinu v pivu klesá. Z poklesu obsahu riboflavinu lze zpětně určit, zda pivo je nebo není světelně poškozené. Koncentraci riboflavinu lze poměrně dobře opticky detekovat díky jeho absorpčním a fluorescenčním vlastnostem.

1.4. MBT a jeho vlastnosti

MBT neboli 3-methylbut-2-en-1-thiol (reg. č. CAS 5287-45-6) je látka podle dosavadních znalostí zodpovědná za letinkovou pachův světelně poškozeného piva. Je to slabá kyselina obsahující jednu dvojnou vazbu a thiolovou funkční skupinu. MBT má bod varu mezi 123 až 126 °C a molární hmotnost 102,2. Látka má sama o sobě pronikavý zápach, připomínající výměšky skunka, odtud se často zápach MBT někdy nazývá „skunkovým“. MBT má vysokou chuťovou aktivitu, práh detekovatelnosti lidským čichem se v pivu pohybuje v rozmezí 4 až 20 ng/l (ve vodě dokonce 0,2 až 0,4 ng/l) [6].

Měření koncentrace MBT v roztoku je poměrně náročné. Vzhledem k vysoké chuťové aktivitě je potřeba velmi citlivých zařízení. Vhodnými metodami mohou být zejména: plynová chromatografie, chromatografie na silikagel, měření změn redoxního potenciálu piva, kolorimetrické stanovení obsahu sirovodíku nebo titrace měřící obsah thiolů [3].

1.5. Optická detekce světelného poškození

Optická detekce je stále rozšířenější metoda studia různých látek. Rychlost, sensitivita a obzvláště neinvazivnost ji činí ideální pro studium různých nápojů v průhledných obalech. Hlavním problémem optických metod je zastoupení nepřeborného množství látek v nápoji. Spektra těchto látek se mohou překrývat, čímž komplikují měřící metodu.

Problém optické detekce světelné degradace piva byl v minulosti již zkoumán. Jednak je to práce Richarda Pozdrika z roku 2006, který se svým týmem sledoval

změny absorbance pomocí absorpční spektroskopie u osvětleného piva s přidavkem riboflavinu a zkoumal vztah mezi úbytkem riboflavinu a tvorbou skunkové příchuti. [9] Z tuzemských prací je to pak diplomová práce Jakuba Škody z roku 2014, který zkoumal změny absorbance spojené se světelným poškozením u piva a modelových roztoků [6].

Pozdrik se svým týmem ukázal, že modelový vzorek piva, tvořený roztokem riboflavinu, isohumulonů a cysteinu ve vhodném pufru, vykazuje maxima ve svém absorpčním spektru na 373 a 445 nm odpovídající absorpčním maximům riboflavinu. Po několikaminutovém osvětlení již roztok tato maxima nevykazoval, s přibývajícím časem osvětlení absorpce roztoku klesala, došlo k degradaci riboflavinu na fotoprodukty. Pozdrik též potvrdil tvorbu letinkové příchuti spojenou s úbytkem riboflavinu v průběhu osvětlení. Pokud modelové pivo bylo probubláno kyslíkem, schopnost absorbovat světlo o vlnové délce 445 nm neztratilo a k úbytku riboflavinu nedošlo. [9]

Škoda ve své diplomové práci ověřil, že po osvětlení modelových roztoků a piv světlem o vlnové délce 450 nm dochází k úbytku absorbance na 450 nm. Úbytek absorbance koreluje s úbytkem obsahu riboflavinu - určeno HPLC (High-performance liquid chromatography) analýzou a s tvorbou letinkové světelné příchuti - ověřeno degustačním panelem. Pomocí aparatury COLORTURB bylo možné změny absorbance spojené se světelným poškozením detekovat i u nativních vzorků v komerčních láhvích. Dále bylo zjištěno, že osvětlené roztoky byly schopné za určitý čas regenerovat (beze změny obsahu riboflavinu, určeno HPLC analýzou) a znovu absorbovat světlo o délce 450 nm. Regeneraci přisoudil vzniku dosud neznámých fotoproduktů riboflavinu. [6]

Výsledky potvrdily, že světelné poškození je svázáno s úbytkem riboflavinu a tvorbou letinkové pachutě v pivu. K detekci RF v pivu jsou využívány chromatografické, elektroforézní a fluorescenční metody. Nevýhodou většiny používaných metod je, že vyžadují předpřípravu vzorků vedoucí k separaci nebo zvýšení obsahu RF [10]. Martina Duyvis [11] vyvinula citlivou fluorimetrickou

metodu detekce RF v pivu. Nevýhodou této metody je nutnost ředění vzorku a jeho titrace a zdlouhavost celého měření.

Ewa Sikorska [12] demonstrovala, že fluorescenční spektroskopii je možné využít pro bezkontaktní detekci obsahu riboflavinu v pivu. Měření prováděla na nativních, neředěných a jinak neupravovaných vzorcích piv. Při svých měřeních využívali front-face uspořádání aparatury (fluorescenční signál je sbírán pod úhlem blízkým 180° k excitačnímu paprsku). Pro určení obsahu RF využili měření kompletní fluorescenční excitačně emisní matice (EEM) ve spojení s vícerozměrnou regresní analýzou dat.

Výhodou jimi navržené metody je bezkontaktnost měření bez nutnosti zásahů do vzorku. Nevýhodou metody je časová a finanční náročnost měření (použití drahé komerční aparatury) a složité a časově náročné vyhodnocení naměřených dat. Naším cílem je sestavit jednoduchou aparaturu pro měření fluorescence a ověřit její použitelnost po detekci světelného poškození piva.

1.6. Absorbance a Lambert-Beerův zákon

Pakliže necháme světlo procházet nějakým materiálem, dojde nutně k jeho útlumu. Signál se ztrácí, když se v materiálu rozptyluje jeho energie. Jak moc se signál neztrácí, popisuje veličina transmitance

$$\vartheta = \frac{I_t}{I_0}, \quad (1)$$

kde I_t je intenzita prošlého záření a I_0 je původní intenzita záření. [13]

O transmitanci také hovoří Lambert-Beerův zákon, jenž má tvar

$$\vartheta = 10^{-\varepsilon cl}, \quad (2)$$

kde ε je molární [látkový] absorpční koeficient, c je látková koncentrace [počet molů látky na litr roztoku] a l je délka, kterou světlo v látce urazilo. Jako záporně vzatý

dekadický logaritmus z transmitance je definovaná veličina absorbance [13]

$$A = -\log(\vartheta) = \varepsilon cl. \quad (3)$$

1.7. Fluorescence

Pro zkoumání riboflavinu je výhodná jeho fluorescenční vlastnost. Tento fakt značně usnadňuje jeho detekci. Fluorescence je fyzikální jev, při kterém látka pohltí elektromagnetické záření (světlo) a následně jej zase vyzaří. Na rozdíl od jiných typů luminiscence, těleso přestává vyzařovat světlo v okamžiku, kdy odstraníme zdroj elektromagnetického záření. Vyzářené světlo bývá delší vlnové délky než původní záření, které látku vybudilo. Proces fluorescence funguje následovně:

Elektromagnetické záření dopadá na fluorescenční látku. Elektronů této látky se excitují, je to způsobeno absorpcí světla fluorescenční látkou, toto světlo se následně přeměňuje na energii excitující elektrony. Vyšší energetické stavy elektronů jsou nestabilní a elektrony následně padají zpět na nižší hladiny. Při přechodu na nižší energetickou hladinu uvolní přebytečnou energii ve formě fotonu. [14]

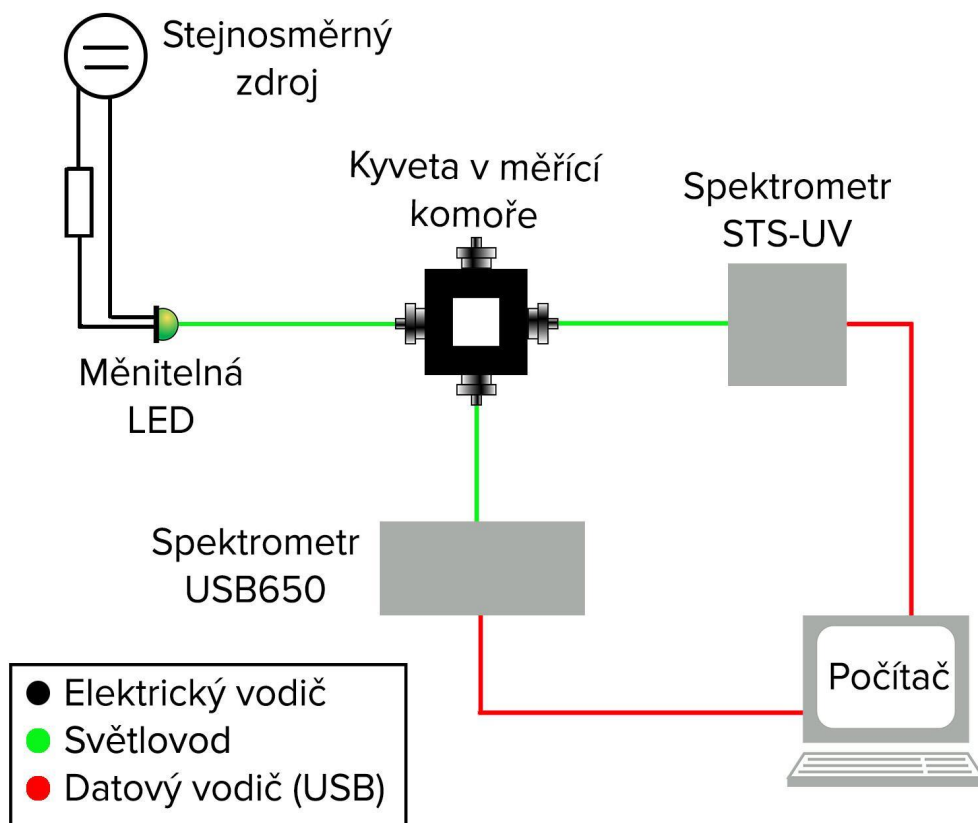
2. Popis aparatury

2.1. Fluorescenční aparatura

Pro měření fluorescence byla navržena a realizována aparatura, jež je vyobrazena na obr. 3. Jako zdroj světla byly použity světelné diody napájené stejnosměrným zdrojem TIPA QJ3005EIII. Světlo z LED (Light-Emitting Diode) bylo vedeno světlovodem Avantes FC-UVIR600-1 do měřicí komory, ve které byla umístěna čtverhranná optická kyveta s optickou dráhou 1 cm. Optická kyveta měla 4 leštěné strany a umožnila měření pod čtyřmi úhly 0 °, 90 °, 180 ° a 270 °. Měřicí komora obsahovala čtyři vstupy pod těmito úhly s instalovanými adaptéry pro připojení světlovodů. Adaptéry byly osazeny optickými prvky pro fokusaci paprsku. Paprsek byl fokusován do středu kyvety, aby všechny adaptéry od místa sběru světla byly stejně vzdálené. Ke dvěma adaptérům byly připojeny 2 miniaturní

spektrofotometry. Oba spektrofotometry byly připojeny pomocí světlovodů k měřicí komoře. Každý spektrofotometr byl k měřicí komoře připojen jiným způsobem. Spektrofotometr Ocean Optics Red Tide USB-650 byl připojen kolmo k přivedenému paprsku světla a měřil fluorescenci látky v kyvetě. Druhý spektrofotometr (Ocean Optics STS-UV miniature spectrometer) byl připojen přímo ve směru šíření světla, měřil útlum signálu v materiálu neboli absorbanci. Data ze spektrofotometrů byla vedena datovými kabely (USB) do počítače. V počítači byla data zaznamenávána pomocí programu OceanView 1.6.7 dodávaného firmou Ocean Optics, která vyrábí oba spektrofotometry použité k měření.

Diody bylo možné měnit a bylo možné zkoumat působení světla o různých vlnových délkách. Adaptéry pro připojení LED ke světlovodům, pro fokusaci světla do měřicí komory a sběr světla ze vzorku byly vyrobeny firmou Optovit, s.r.o. Jihlava. Všechny světlovody a adaptéry byly osazeny standardní koncovkou SMA 905.

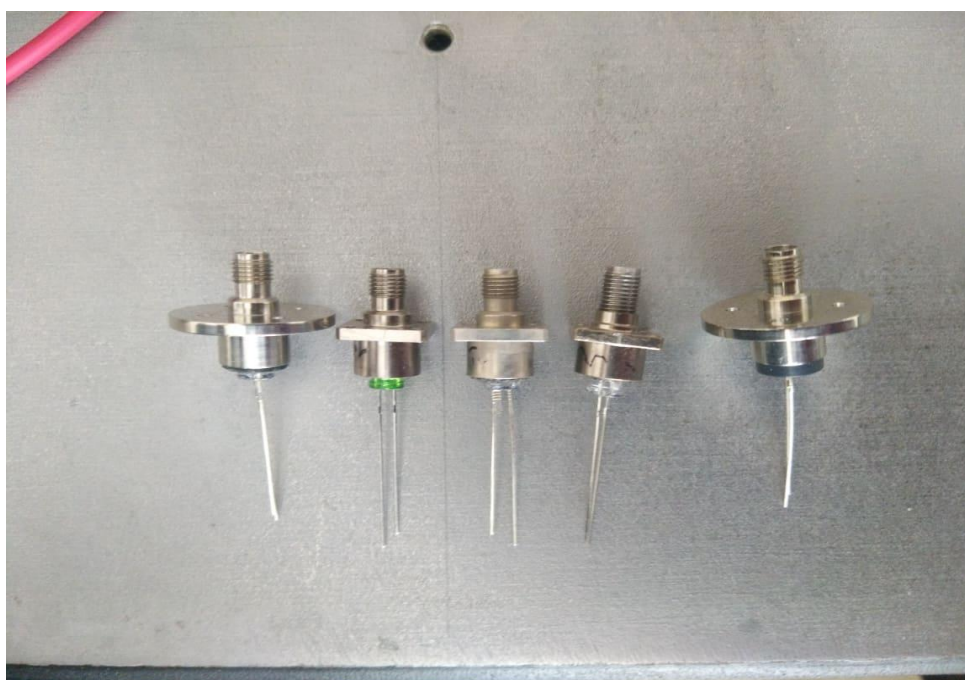


Obr. 3: Schéma použité aparatury

Při měření byly použity dva druhy svítivých diod, oválné standardní LED T-1 $\frac{3}{4}$ o průměru 5 mm (od firmy Roithner-Laser) s výkonem v řádu jednotek mW, které pokrývaly maxima absorpčního spektra riboflavinu o vlnové délce 310 až 560 nm (obr. 4). Později byly instalovány supersvítivé diody od firem Roithner-Laser a Luxeon (obr. 5) s výkonem řádově jednotek W. Tyto nové diody pokrývaly spektrum od 385 nm do 480 nm (viz tabulka 1). Supersvítivé diody byly umístěny na hliníkový chladič, ke kterému byl fixován adaptér na světlovod. (viz obr 4 a 5).

| Výrobce | Typ | Uváděná vlnová délka [nm] | Naměřená vlnová délka [nm] |
|----------|-----------|---------------------------|----------------------------|
| Luxeon | SZ-01-V4 | 385 | 385 |
| Luxeon | SZ-01-S8 | 405 | 405 |
| Roithner | H2A1-H420 | 420 | 424 |
| Roithner | H2A1-H435 | 435 | 442 |
| Luxeon | SP-01-V4 | 448 | 456 |
| Roithner | H2A1-H470 | 470 | 470 |
| Luxeon | SP-01-B6 | 470 | 480 |

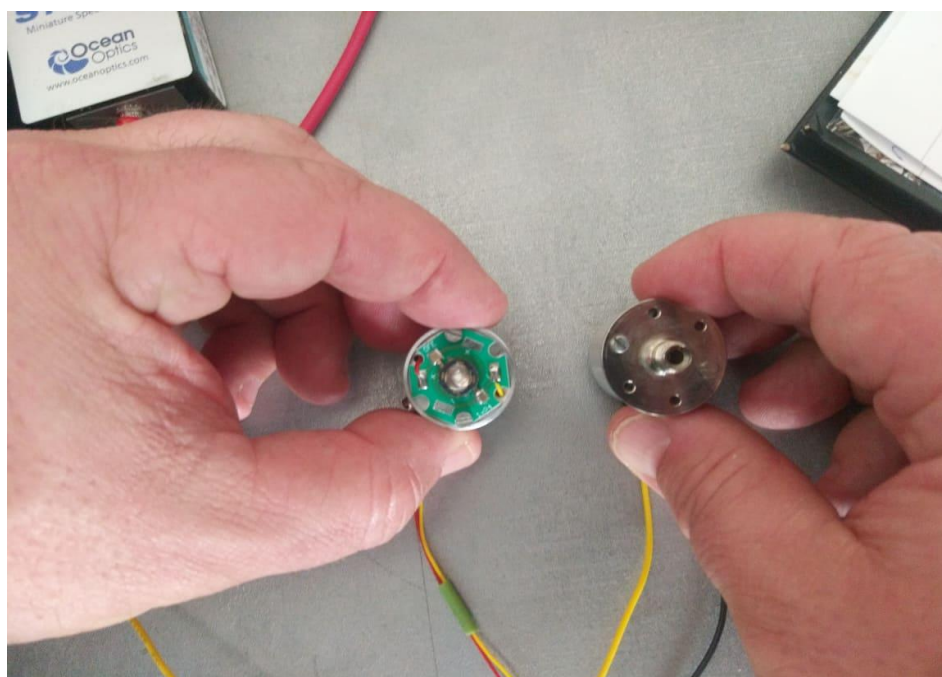
Tabulka 1: Parametry použitých supersvitivých diod



Obr. 4: Původní svítivé diody namontované do koncovek kompatibilních s optickou kabeláží



Obr. 5: Supersvítivé diody namontované do koncovek kompatibilních s optickou kabeláží s chladiči



Obr. 6: Supersvítivá dioda na chladiči [vlevo] a s adaptérem na světlovod [vpravo]

2.2. Spektrofotometry

Při měření byly použity dva spektrofotometry, konkrétně Ocean Optics STS-UV miniature spectrometer a Ocean Optics Red Tide USB-650.

Ocean Optics STS-UV miniature spectrometer je malý spektrofotometr s rozměry 40 mm × 42 mm × 24 mm, vážící přibližně 60 g. Obsahuje detektor ELIS1024 se 1024 aktivními pixely a 14bit A/D převodníkem. Je schopný detekovat signály v rozmezí vlnových délek 190 až 650 nm. Maximální integrační čas spektrofotometru je 10 s a minimální 10 μs. Spektrofotometr má poměr signálu ku šumu garantovaný výrobcem výrazně menší než 1500:1 [15].

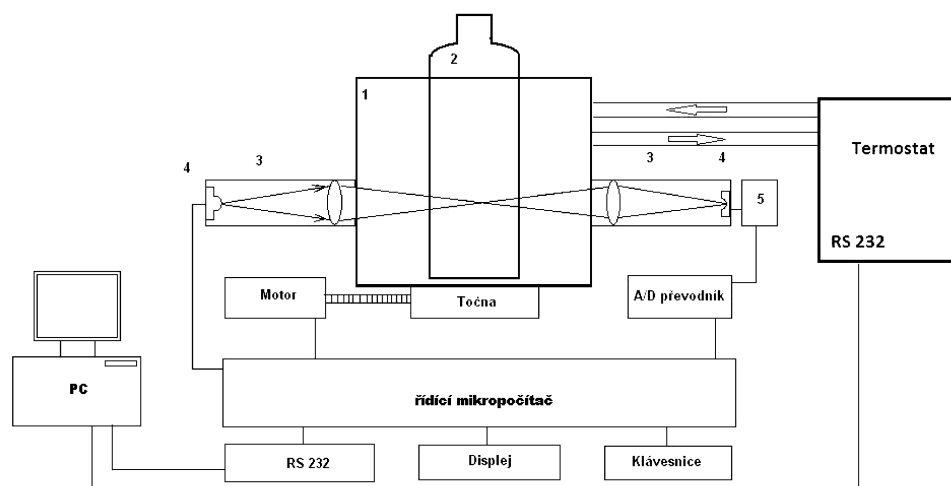
Ocean Optics Red Tide USB-650 je spektrofotometr s rozměry 89,1 mm × 63,3 mm × 34,4 mm o hmotnosti 190 g. V tomto spektrofotometru je zabudován detektor Linear silicon CCD array se 650 aktivními pixely a 12bit A/D převodníkem. Red Tide USB-650 detekuje signály s vlnovou délkou v rozmezí 350 až 1000 nm, tzn. se spektrálním rozlišením 1 nm. Maximální integrační čas spektrofotometru je 65 s a minimální 3 ms. Spektrofotometr má poměr signálu ku šumu garantovaný výrobcem za maximálního signálu 250:1 [16].

2.3. COLORTURB

K měření transmise vzorků v láhvích bylo použito prototypu přístroje COLORTURB sestaveného na Katedře chemické fyziky a optiky, MFF UK Praha. Hlavní výhodou přístroje COLORTURB je schopnost měřit mimo kyvety, a to i vzorky v komerčních láhvích a PET láhvích do průměru 100 mm. To umožňuje měření bez nutnosti otevírání láhví.

Přístroj měří absorpci jako útlum světelného signálu při průchodu vzorkem. Využitím tří svítivých diod vyzařujících světlo na třech vlnových délkách (RGB, střední hodnota 450 nm, 525 nm a 630 nm, pološířka 20 nm) je vzorek prosvícen uprostřed komory. Diody je možné zapínat a vypínat nezávisle, čímž lze zjistit hodnoty transmise pro každou ze třech vlnových délek. Pro minimalizaci vlivu láhve

na výsledky je vzorek v komoře ponořen do imersní kapaliny a během měření se plynule otáčí. Jako referenční vzorek je použita kyveta s destilovanou vodou [6].



Obr. 7: Schéma aparatury COLORTURB ; 1 - měřicí komora, 2 - vzorek, 3 - optické tubusy, 4 - optické vysílače a přijímače, 5 - optoelektronické převodníky a předzesilovače (převzato z [6])

2.4. Osvětlovací adaptér

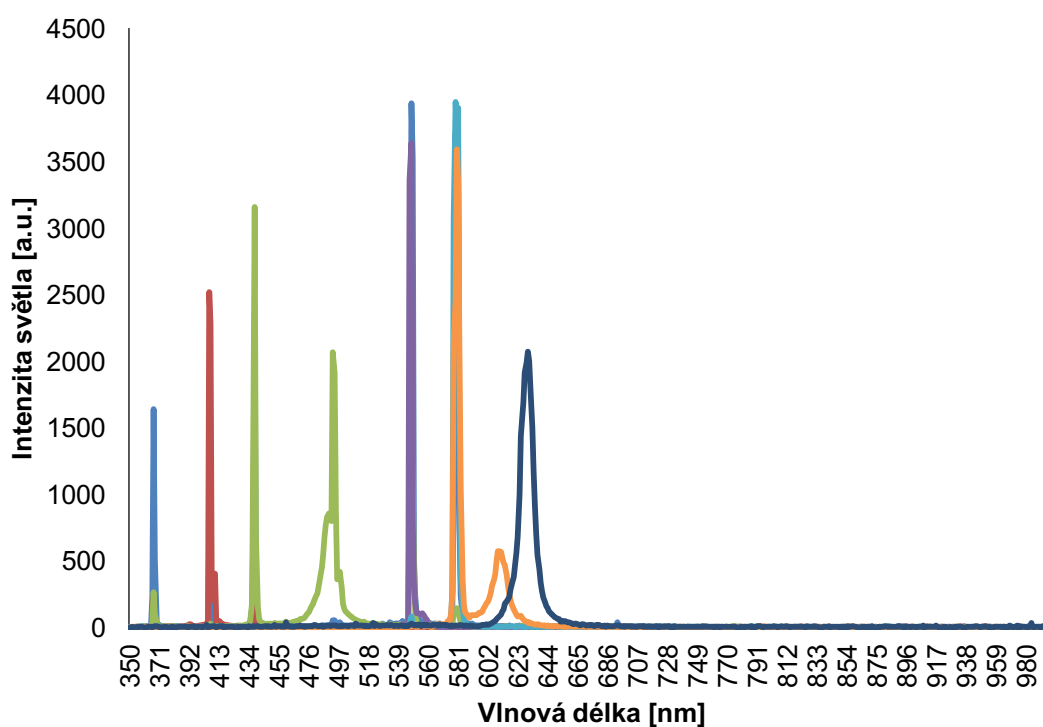
K definovanému osvětlování vzorků byl použit osvětlovací adaptér. Osvětlovací adaptér byl vyroben z LED pásku s třemi typy diod (RGB). Tento pásek byl stočen a nalepen na vnitřní stěnu plastové trubky po celé její délce. Celý tento konstrukt je postaven na mřížce, pod kterou je větrák. Větrák je spuštěn současně se světlem a je zde instalován proto, aby se vzorek při osvětlování od světelného zdroje nezahříval. „Svítivost osvětlovacích diod byla změřena luxmetrem Voltcraft a při napětí zdroje 12,3 V a proudu 800 mA dosahovala hodnot od 7000 lx na okraji až po maximální hodnotu 8200 lx uprostřed válce.“ [6]

3. Výsledky měření

3.1. Ověření parametrů přístrojů

3.1.1. Ověření kalibrace spektrofotometrů

K ověření, zda jsou spektrofotometry správně nakalibrovány, respektive jestli stupnice spektrofotometrů nejsou posunuté vůči tabelovaným hodnotám, bylo použito rtuťové výbojky. Rtuťová výbojka má emisní spektrum s maximy o známých vlnových délkách, takže pokud toto emisní spektrum změříme spektrofotometrem, je možné zjistit jeho odchylku.

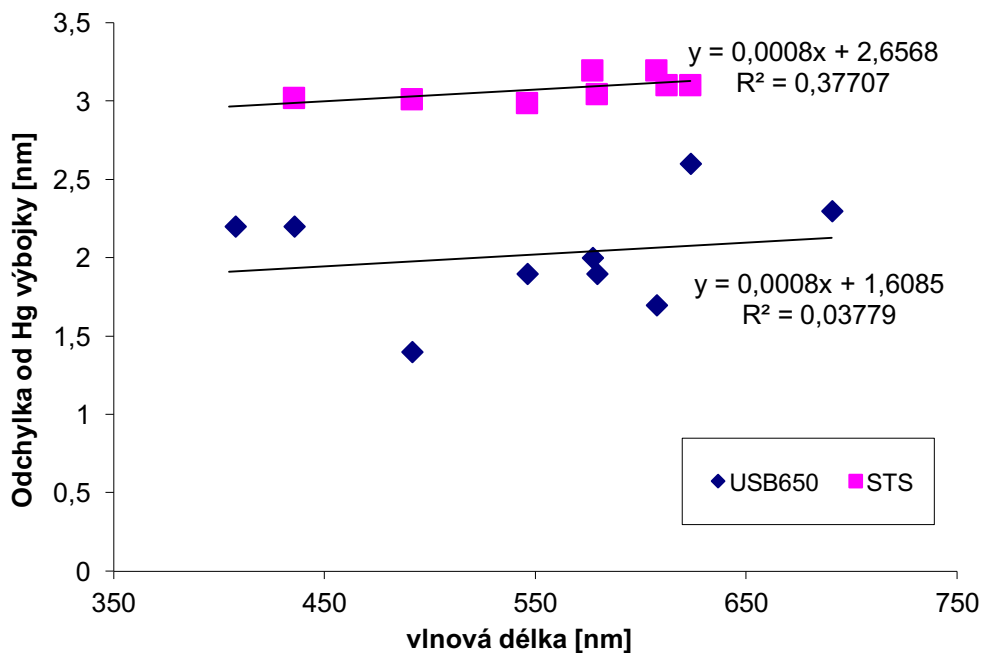


Graf 2: Naměřené hodnoty spektra Hg výbojky spektrofotometrem USB-650

Byly naměřeny hodnoty emisního spektra Hg výbojky oběma spektrofotometry (spektrum naměřené USB-650 viz graf 2). Z dat byly odečteny polohy maxim spektrálních čar. Tyto hodnoty byly následně porovnávány s tabelovanými hodnotami emisního spektra Hg výbojky (jak je uvedeno v tabulce 2).

| Tabelované vlnové délky čar spektra Hg výbojky [nm] | Měřené vlnové délky spektrofotometrem STS [nm] | Měřené vlnové délky spektrofotometrem USB-650 [nm] |
|---|--|--|
| 407,8 | | 410 |
| 435,8 | 438,8 | 438 |
| 491,6 | 494,6 | 493 |
| 546,1 | 549,0 | 548 |
| 577,0 | 580,2 | 579 |
| 579,1 | 582,1 | 581 |
| 607,3 | 610,5 | 609 |
| 612,3 | 615,4 | |
| 623,4 | 626,5 | 626 |
| 671,6 | | |
| 690,7 | | 693 |

Tabulka 2: Naměřené a tabelované vlnové délky čar spektra Hg výbojky



Graf 3: Posun obou spektrofotometrů

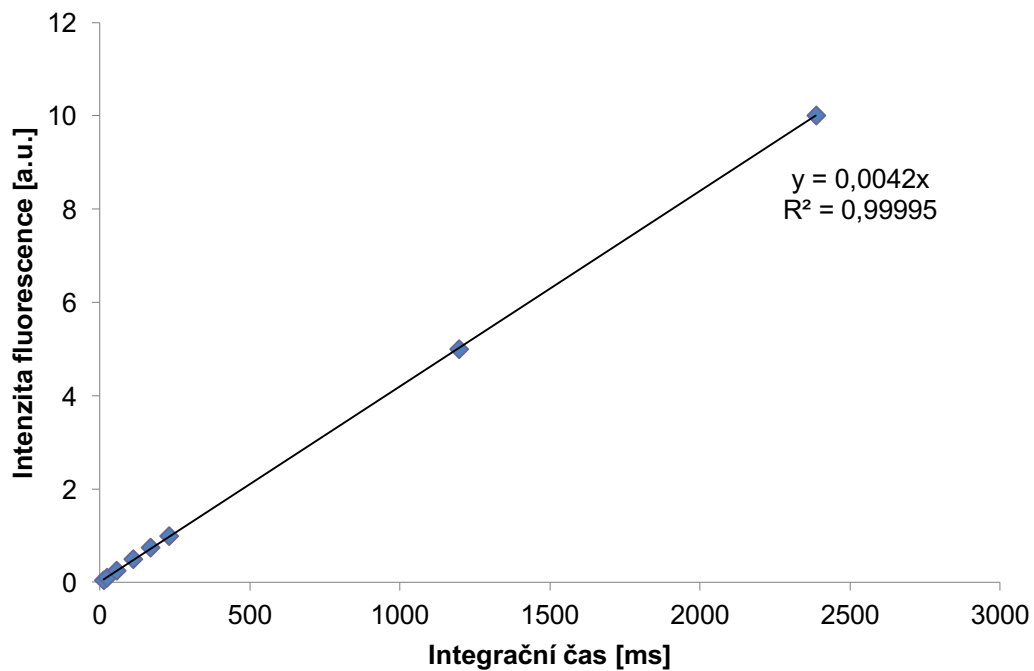
Odečtem tabelovaných hodnot od naměřených hodnot byly zjištěny posuny spektrální kalibrace spektrofotometrů. Tyto posuny byly vyneseny do grafu 3.

Z naměřených hodnot bylo zjištěno, že spektrofotometr STS je posunut od standardizované stupnice přibližně o 2 nm a spektrofotometr USB-650 je posunut od standardizované stupnice přibližně o 3 nm v celém měřeném rozsahu spektra.

3.1.2. Srovnání integračních časů

Integrační čas je doba, po kterou je detektor spektrofotometru vystaven světlu, jenž na tento detektor dopadá. Elektromagnetické záření na snímač dopadá po určitém definované době, po kterou se na detektoru integruje signál. Proto název integrační čas. Čím delší integrační čas je pro měření zvolen, tím více signálu na detektor dopadne. Díky tomu lze měřit i velmi slabé signály, které by za krátkých integračních časů byly nepatrné.

Aby bylo možné porovnávat naměřená data měřená s různými integračními časy, bylo nutné zjistit, jakým způsobem závisí naměřená hodnota na zvyšování integračního času spektrofotometru. Různé integrační časy musely být použity například proto, že rozdíly mezi fluorescencí měřených látek byly takové, že rozsah v kombinaci s rozlišovací schopností spektrofotometru je neumožňovaly měřit při jednom integračním čase. Proto byl připraven roztok 30 mg/l riboflavinu ve vodě a následně proměřena jeho intenzita fluorescence pro několik integračních časů. Výsledky tohoto měření jsou zakresleny v grafu 4.



Graf 4: Závislost integračního času na absorbanci látky

Ve zmíněném grafu můžeme vidět naměřené hodnoty fluorescence riboflavinu (na vlnové délce 535 nm) snímané s různými integračními časy. Jak je z grafu vidět, závislost je lineární. Tedy převod dat naměřených s různými integračními časy je možný.

3.1.3. Srovnání citlivosti spektrofotometrů

Pro srovnání citlivosti spektrofotometrů bylo zaznamenáno spektrum světla diody po průchodu aparaturou bez vzorku, a to postupně na obou spektrofotometrech. Integrační čas spektrofotometrů byl nastaven tak, aby bylo dosaženo stejné intenzity v maximu. Pomocí tohoto měření bylo zjištěno že spektrofotometr USB650 je oproti spektrofotometru STS 15krát citlivější. Na základě tohoto zjištění byl spektrofotometr USB650 vybrán k měření fluorescence vzorku a spektrofotometr STS k měření transmise, protože fluorescenční signály jsou výrazně nižší než transmisní signály.

3.2. Vlastní měření

3.2.1. Zpracování dat

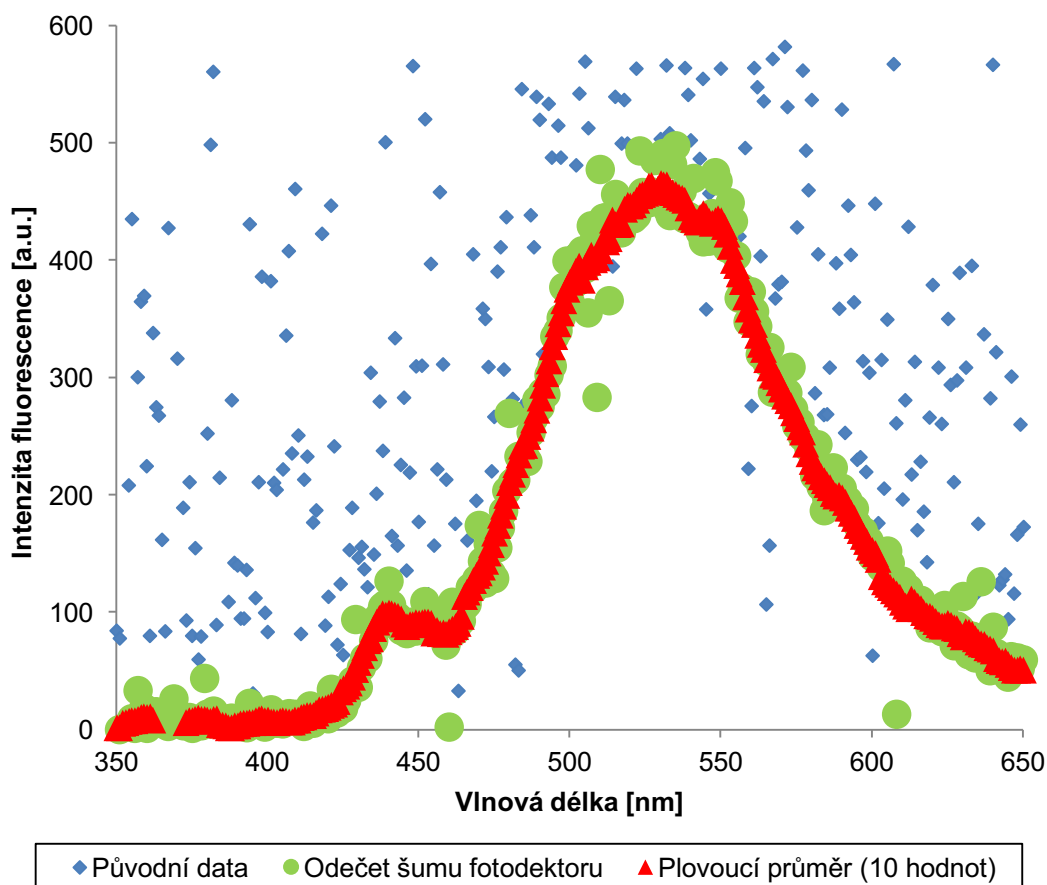
Svitivost každé diody je jiná. Aby bylo možné data mezi sebou porovnávat, bylo nutné naměřené hodnoty fluorescence normovat. Proto byly současně s fluorescencí měřeny i hodnoty transmise. Adaptéry měřicí komory umožňovaly fokusovat místo, ze kterého byl sbírán signál obou spektrofotometrů do středu kyvety. Protože signál musel urazit stejnou vzdálenost skrz roztok do spektrofotometru, docházelo jak u sběru transmise, tak u sběru fluorescence ke stejnému útlumu světla a data lze tedy porovnávat.

K celkovému zpracování dat docházelo tak, že naměřená data intenzity fluorescence byla podělena maximem transmise příslušného měření, následně byla vydělena integračním časem, po který byla data o fluorescenci sbírána a vynásobena integračním časem, po který byla sbírána data o transmisi. Výsledek byl vynásoben tisícem, aby byla zajištěna lepší přehlednost grafů. Takto získaná data intenzity fluorescence jsou nezávislá na integračních časech spektrofotometrů a intenzitě dopadajícího světla a umožní nám srovnávat výsledky jednotlivých měření.

Při měření vzorků se slabým fluorescenčním signálem bylo nutné prodloužit integrační čas spektrofotometru téměř na maximum. I když byla měřicí komora s kyvetou stíněna před okolním světlem, měřená data byla neprůkazná (jak je vidět v grafu 5 – původní data). Bylo to hlavně tím, že fluorescenční signál byl tak slabý, že v měřených datech převládal samotný šum fotodetektoru. Vliv šumu fotodetektoru byl minimalizován měřením vzorku bez osvětlení LED diodou při jednom integračním čase. Tímto způsobem se změní šum fotodetektoru, který lze následně odečíst od naměřených dat tak, aby data obsahovala pouze informace, které odpovídají fluorescenci vzorku (jak je vidět v grafu 5 – odečet šumu fotodetektoru). Tento postup lze použít díky tomu, že je šum v určitém časovém úseku konstantní.

Následně byla křivka intenzity fluorescence vyhlazena metodou plovoucího průměru přes deset po sobě jdoucích pixelů, což je spektrální oblast asi 4 nm. Zvolené průměrování umožňovalo získat minimálně zašuměné a spojitě křivky

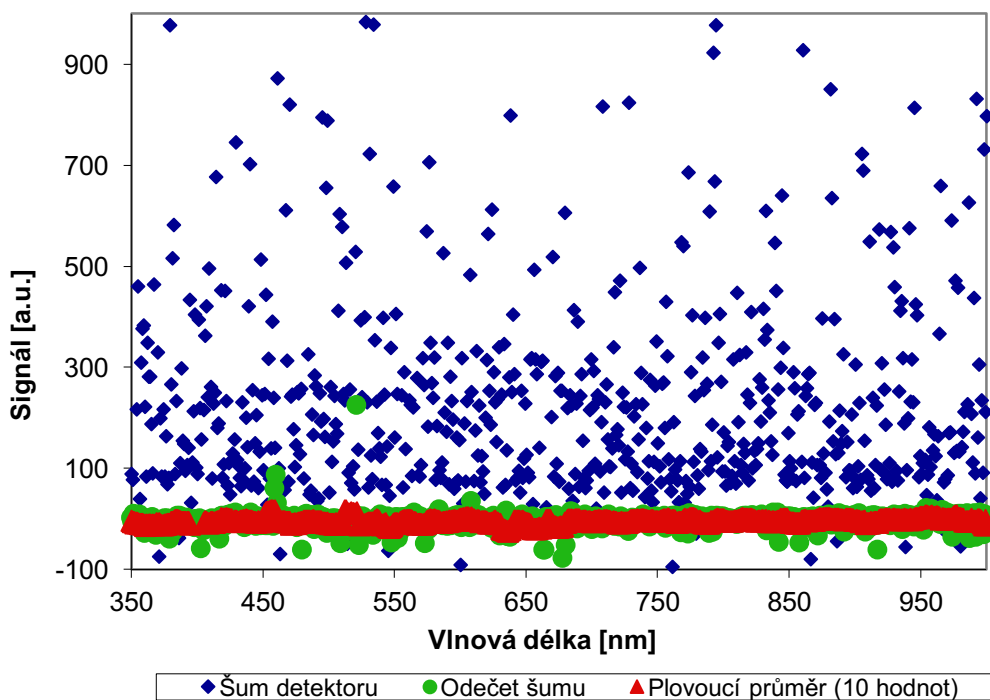
spekter (graf 5 – plovoucí průměr). Toto průměrování bylo možno zvolit, protože charakteristický průběh fluorescenčních maxim látek při pokojové teplotě má spektrální šířku v řádu desítek nanometrů, tedy výrazně větší než 4 nm, a proto není možné, aby se při tomto typu průměrování nějaká informace ztratila.



Graf 5: Fluorescenční spektrum piva, ukázka zpracování

3.2.2. Temný proud fotodetektoru

Aby bylo potvrzeno, že šum fotodetektoru je v čase konstantní a lze jej odečíst od naměřených dat, byl vypracován graf z několika měření šumů fotodetektoru naměřených v jednom dni. Data byla měřena při nejvyšším integračním čase 30 s, aby byl šum fotodetektoru co nejmarkantnější. Šum byl zpracován obdobně jako data v kapitole 3.2.1. Z grafu č. 6 je zřejmé, že takovéto zpracování dat je vhodné.



Graf 6: Šum fotodetektoru

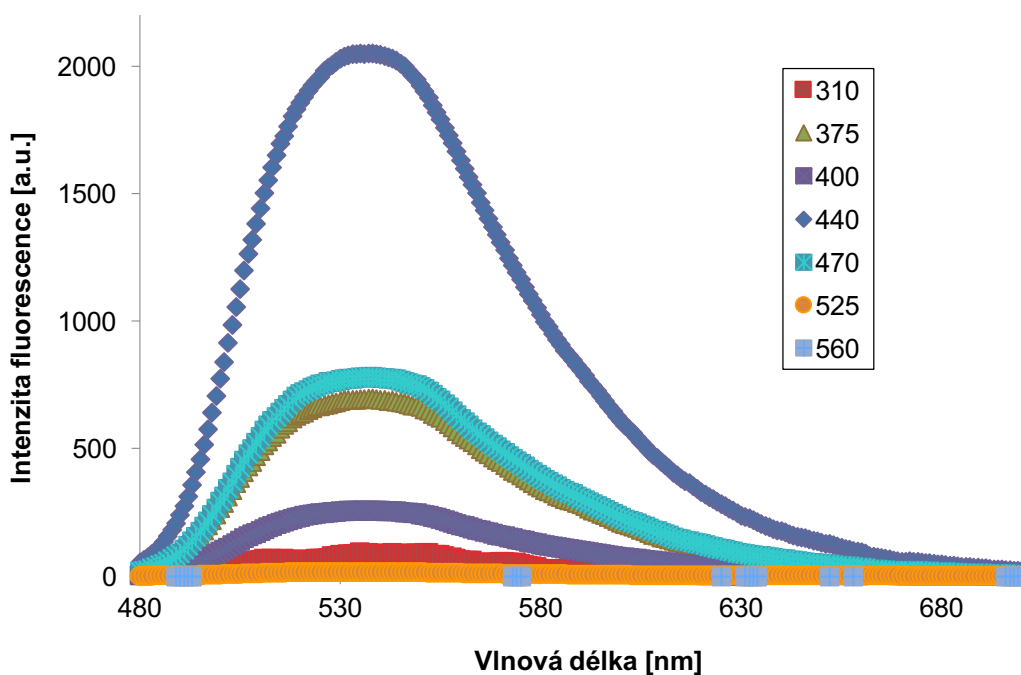
V grafu 6 jsou tři závislosti obdobně jako v grafu 5. Data v grafu 6 byla zpracována stejně jako data v grafu 5. Jak je vidět, naměřená data šumu fotodetektoru jsou náhodně rozeseta po celé ploše grafu. Směrodatná odchylka přes všechny hodnoty naměřených dat je přibližně 450 a.u. Od naměřených dat byla odečtena naměřená data šumu fotodetektoru ve stejném dni, to bylo do grafu 6 vyneseno jako závislost označená „odečet šumu“. Směrodatná odchylka těchto dat je výrazně nižší, respektive přibližně 70 a.u. Z tohoto lze vyvodit, že při měření v rámci hodin je šum fotodetektoru relativně konstantní. Odečet šumu byl následně vyhlazen plovoucím průměrem přes 10 hodnot podobně jako byla vyhlazována naměřená data. Takto je dosaženo prakticky konstantní nulové funkce. Směrodatná odchylka takto vyhlazeného šumu fotodetektoru je cca 20 a.u.

Podobně byla zpracována data měření šumu fotodetektoru měřená v rámci několika dní. Směrodatné odchylky odečtu i průměru přes 10 hodnot zde dosahovaly cca o 30 % vyšších hodnot. Nelze tedy označit šum fotodetektoru za zcela konstantní. Toto však neovlivnilo měření, protože měření šumu fotodetektoru

probíhalo bezprostředně po každém měření. Šum obou použitých spektrofotometrů byl při stejných integračních časech srovnatelný.

3.2.3. Měření fluorescenčního spektra se standardními diodami

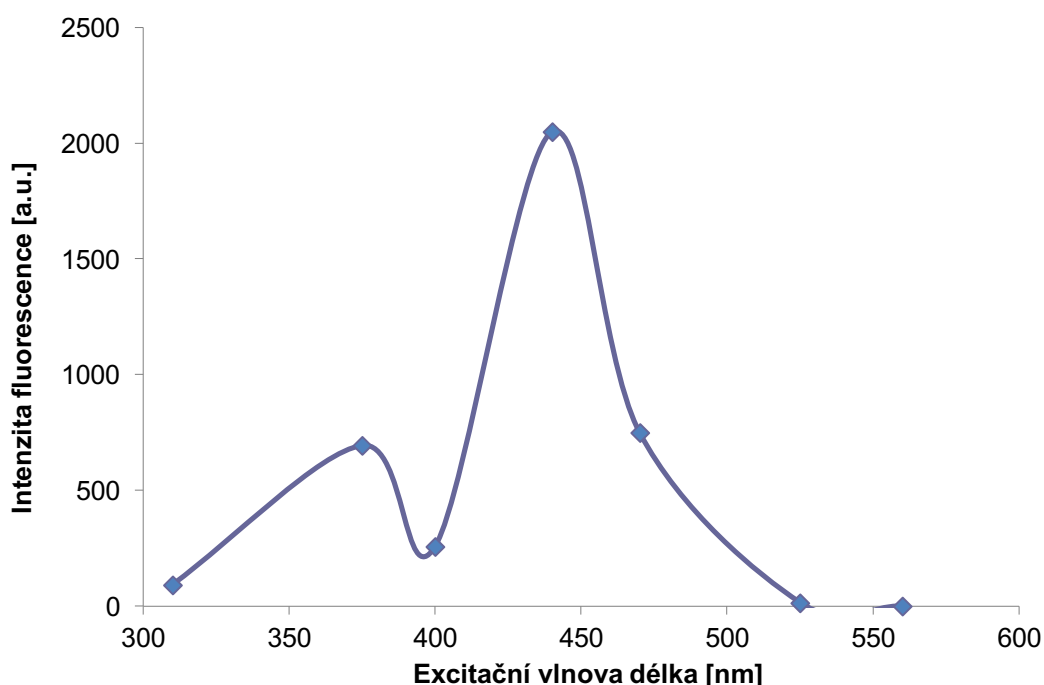
Jako první bylo proměřeno fluorescenční spektrum roztoku riboflavinu ve vodě v koncentraci 30 mg/l. K excitaci bylo použito komerčně dostupných diod T-1 ³/₄. Byly použity diody o vlnových délkách 310 nm, 375 nm, 400 nm a 440 nm. Na těchto vlnových délkách má riboflavin absorbanční extrém. Konkrétně na 310 nm má absorbanční minimum, na 375 nm má maximum, na 400 nm opět minimum a na 440 maximum. Tyto diody byly doplněny o diody s vlnovou délkou 470 nm, 525 nm a 560 nm. Při tomto měření byl integrační čas spektrofotometru, který sbíral data o fluorescenci, nastaven na 10 s.



Graf 7: Fluorescenční spektrum riboflavinu

Riboflavin byl postupně excitován světlem o různých vlnových délkách (jak ukazuje graf 7). Obecně uváděná hodnota vlnové délky světla, které riboflavin vyzáří

při fluorescenci, je 535 nm. Jak je v grafu vidět, maximum fluorescence je položeno přibližně v 535 nm pro všechny excitační vlnové délky, což se shoduje s obecně uváděnými daty. Největší intenzita fluorescence byla naměřena při excitaci světlem s vlnovou délkou 440 nm. Připomeneme-li si absorpční spektrum riboflavinu (graf 1), riboflavin má absorpční maximum právě na 445 nm. Absorpční minimum oproti tomu má v 300 nm, od 500 nm výše riboflavin neabsorbuje. Obojí je patrné v naměřeném fluorescenčním spektru. Do grafu č. 9 byla vynesena závislost intenzity fluorescence RF v maximu fluorescenčního píku na 535 nm pro všechny excitační vlnové délky.

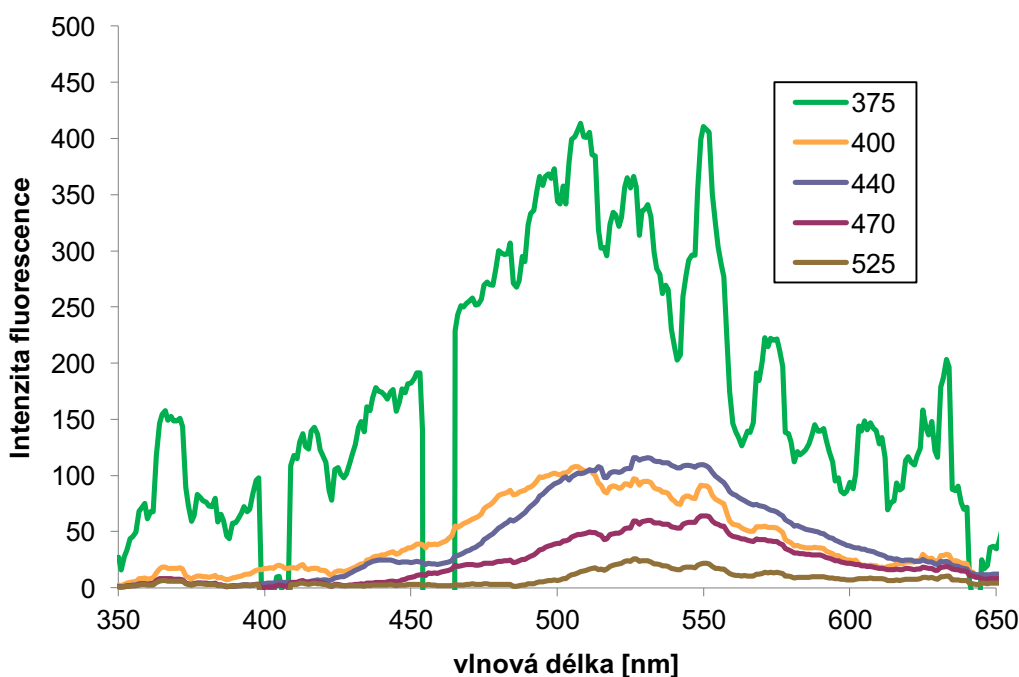


Graf 8: Fluorescenční spektrum riboflavinu 2

Z grafu je zřejmé, že průběh intenzity fluorescence kopíruje absorpční spektrum riboflavinu. Velikost intenzity fluorescence závisí nejen na absorpčním spektru, ale i na kvantovém výtěžku fluorescence a spektrální citlivosti spektrofotometru, která není v měřeném rozsahu konstantní.

V dalším kroku bylo provedeno měření fluorescenčního spektra piva, konkrétně bylo použito pivo značky Pilsner Urquell. K excitaci byly znovu použity standardní

oválné diody, stejné jako byly použity k měření fluorescence riboflavinu. Integrační čas měření fluorescenčního signálu byl zvýšen na maximální hodnotu 30 s.



Graf 9: Fluorescenční spektrum piva

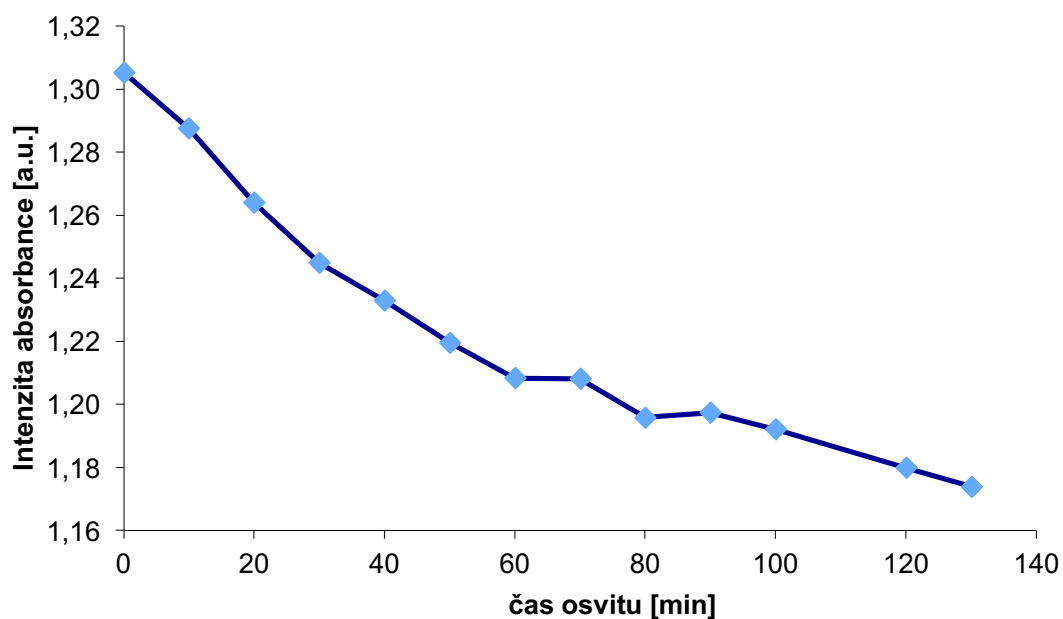
Jak je z grafu 9 vidět, výsledky měření neodpovídají očekávání. Na rozdíl od měření fluorescenčního spektra RF (graf 7) nejsou v grafu 9 uvedena data pro excitační vlnovou délku 310 nm a 560 nm, protože se v podstatě rovnala nule. Pivo na vlnové délce 310 nm absorbuje tak silně, že nedošlo vůbec k průchodu světelného signálu do interakčního objemu vzorku. Při excitaci na vlnové délce 560 nm je intenzita fluorescence téměř nulová. Ostatní data jsou neprůkazná. Hlavním důvodem je, že pivo fluoreskuje daleko méně než riboflavin a u provedeného měření se snižuje poměr signálu ku šumu; stačí porovnat maximum intenzity fluorescence riboflavinu v grafu 7 (které se pohybuje okolo 2500 a.u.) a maximum intenzity fluorescence piva v grafu 9 (které se pohybuje v řádech pod 500 a.u.). Ačkoliv byl integrační čas při měření piva zvýšen na 30 s, byl signál tak nízký, že tato data nešla použít. Aparatura tedy nebyla vhodná k měření a bylo potřeba ji změnit.

Přestože jsou tato data nevyhovující, lze si všimnout zajímavého trendu, a to že maximum všech závislostí excitovaných světlem o vlnové délce větší než 440 nm je okolo 535 nm, což je vlnová délka, na které fluoreskuje riboflavin.

3.2.4. Měření fluorescenčního spektra piva se supersvitivými diodami

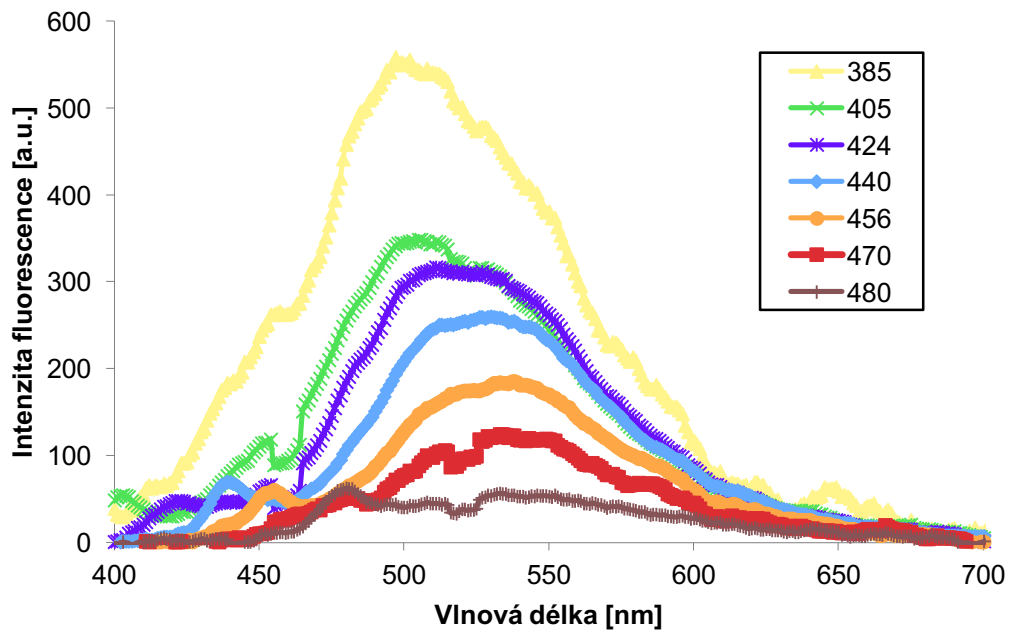
Z výše uvedeného vyplývá, že data nebylo možné použít kvůli příliš slabému signálu. Zvoleným řešením bylo tedy použít jiné diody, které by více svítily, tj. generovaly silnější světelný signál. Byly nakoupeny supersvitivé diody od dvou firem: Luxeon a Roithner-Laser. LED byly vybrány tak, aby pokrývaly spektrální oblast, ve které má riboflavin maxima/minima.

Po instalaci nových diod byla měřena dvě piva značky Pilsner Urquell. Jedno z nich bylo přemístěno bez přístupu kyslíku do bílé 0,3l láhve a následně definovaně osvětlováno v osvětlovacím adaptéru. Během osvitů vzorku byla na aparatuře COLURTURB měřena změna absorbance na vlnové délce 450 nm. Výsledek měření je zobrazen v grafu 10. U osvětleného a neosvětleného vzorku byl metodou HPLC na VÚPS určen obsah riboflavínu. U neosvětleného vzorku byl obsah riboflavínu 400 µg/l, po 130 minutách osvitů klesl obsah riboflavínu na 170 µg/l. Absorbance piva klesá úměrně době, po které bylo pivo osvětlováno.

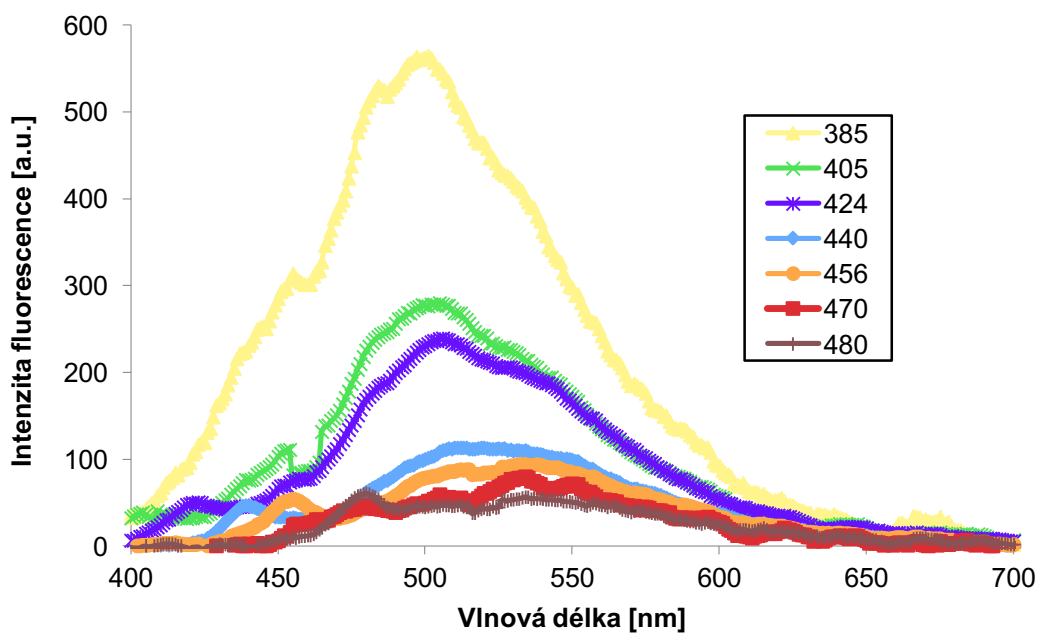


Graf 10: Odbarvení piva Pilsner Urquell v bílé láhvi v závislosti na čase osvitu

Následně bylo pomocí sestavené aparatury a nových diod měřeno fluorescenční spektrum jak osvětleného, tak neosvětleného piva. Fluorescenční signál byl při použití vysoce svítivých diod natolik velký, že při tomto měření byl nastaven integrační čas spektrofotometru, který sbíral data o fluorescenci v rozmezí od 1 s do 5 s. Naměřená data jsou zobrazena v grafech 11 a 12.



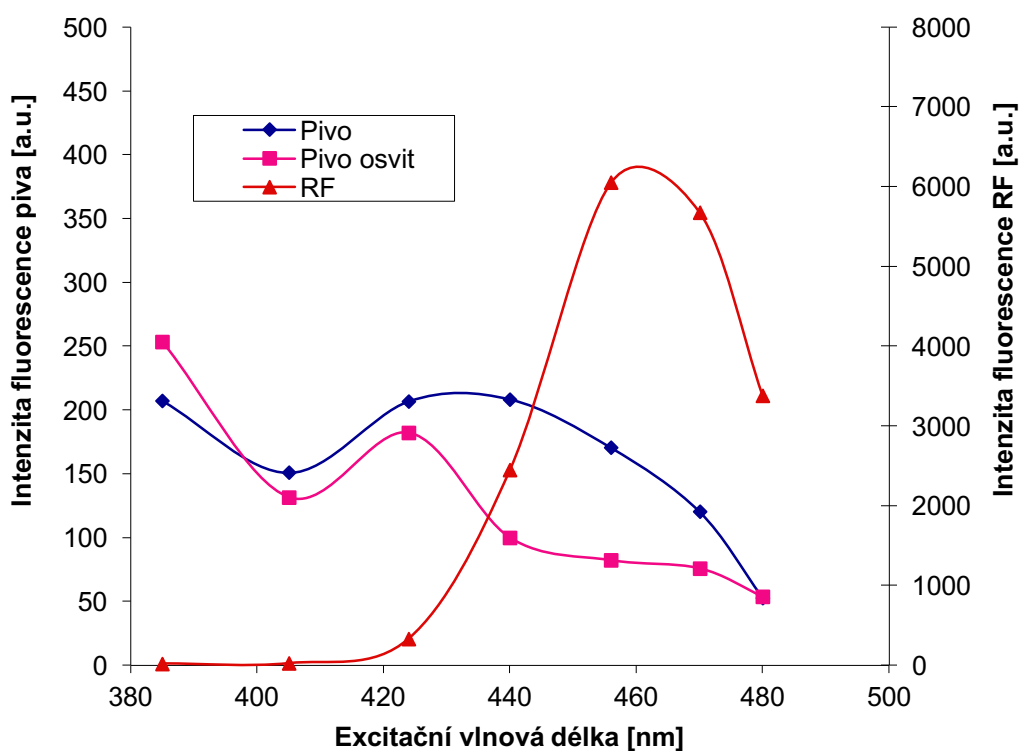
Graf 11: Fluorescenční spektrum neosvětleného piva v závislosti na vlnové délce excitace



Graf 12: Fluorescenční spektrum osvětleného piva v závislosti na vlnové délce excitace

U všech závislostí osvětleného piva došlo k poklesu fluorescence světla o vlnové délce kolem 535 nm. Nejvíce je tento úbytek fluorescence patrný pro závislosti excitované světlem o vlnové délce 440 nm, 456 nm a 470 nm, kde má riboflavin právě jedno ze svých absorbančních maxim. Fluorescenční spektra naměřená při excitaci světlem o vlnové délce 385 nm, 405 nm a 424 nm mají maxima na vlnové délce přibližně 500 nm. Je zřejmé, že při použití světla o této vlnové délce převládá v pivu fluorescence jiných látek, než je riboflavin. Fluorescenční spektra naměřená při excitaci světlem o vlnové délce 440 nm, 456 nm, 470 nm a 480 nm mají maxima na vlnové délce přibližně 535 nm odpovídající maximu fluorescenčního spektra riboflavinu.

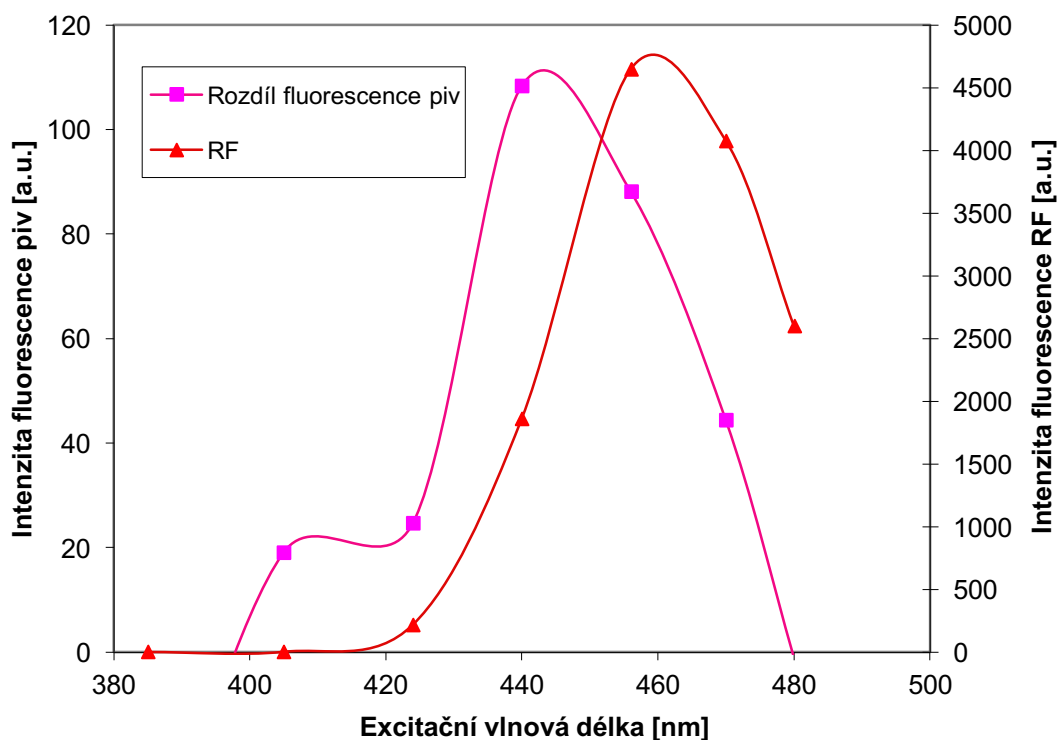
K vyhodnocení naměřených spekter jsme se rozhodli použít metodu SSF (Synchronous scanning fluorescence). Tato metoda přiřazuje excitačním vlnovým délkám intenzitu emitovaného světla o vlnové délce vzdálené od excitační vlnové délky o zvolenou hodnotu $\Delta\lambda$. Metoda SSF zjednodušuje metodu Excitačně emisní matice (EEM) a při vhodně zvoleném intervalu $\Delta\lambda$ dobře separuje fluorescenční spektra jednotlivých komponent.



Graf 13: SSF spektra piva a RF při $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$

V grafu 13 je na hlavní i na vedlejší ose vynesena intenzita fluorescence na excitační vlnové délce. Na hlavní ose se nachází závislosti fluorescence osvětleného a neosvětleného piva, na vedlejší pak závislost fluorescence riboflavinu. Jak již bylo řečeno výše, hodnoty fluorescence riboflavinu jsou daleko vyšší než hodnoty fluorescence piva, bylo tedy nutné v rámci zachování názornosti vynést na vedlejší osu výrazně vyšší hodnoty fluorescence než na hlavní. Zvolená hodnota $\Delta\lambda$ byla v tomto případě 60 nm. Tato hodnota byla zvolena hlavně proto, že minimalizuje šířku fluorescenčního píku při zachování jeho intenzity, jak prezentovala ve své práci Ewa Sikorska [12] při studiu riboflavinu. Roztok riboflavinu měl koncentraci 30 mg/l.

Největší diskrepance mezi osvětleným a neosvětleným pivem je při excitaci 440 nm, 456 nm a 470 nm, v jiných místech na sebe křivky v rámci chyby přiléhají. Toto je patrné i ze srovnání grafů 11 a 12.



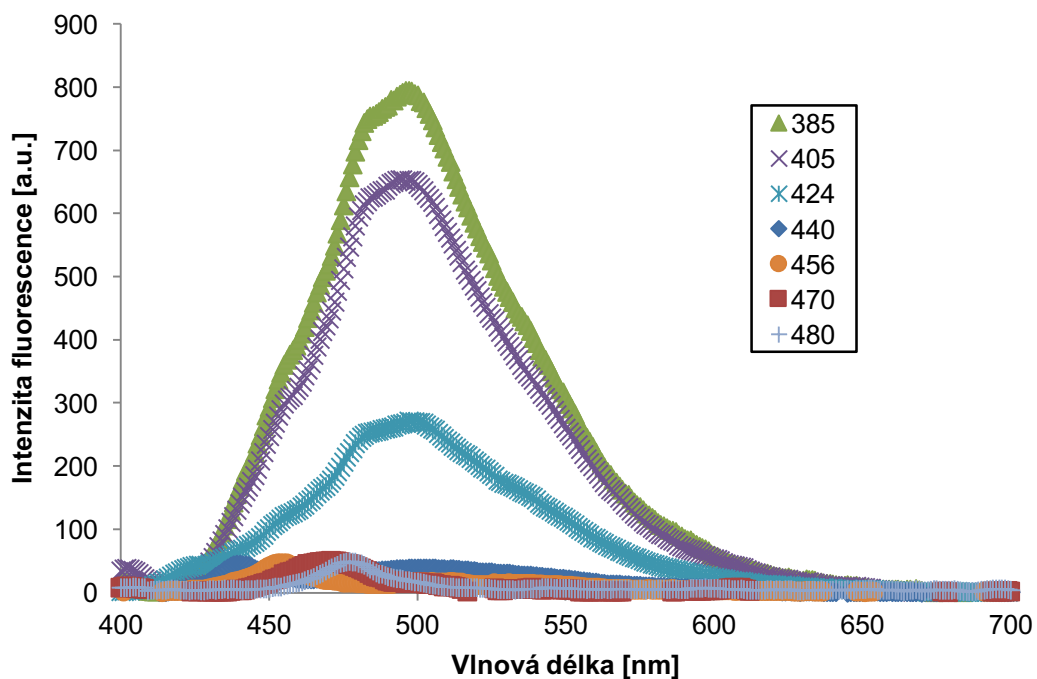
Graf 14: SSF spektra piva a RF při $\Delta\lambda=60$ nm

V grafu č. 14 je srovnání SSF spekter riboflavinu a úbytku fluorescence u osvětleného piva s rozdílem excitační a emisní vlnové délky $\Delta\lambda = 60$ nm. Data byla získána tak, že od naměřených dat pro čerstvé pivo byla odečtena naměřená data osvětleného piva. Tím byla zjištěna závislost chybějící fluorescence v osvětleném pivu. Z grafu je zřejmé, že tvar spektra úbytku fluorescence piva odpovídá tvarem spektru RF, ale maxima jsou vůči sobě posunuta. Rozdíl ve spektrech je nejspíše způsoben fluorescencí některého z fotoproduktů RF.

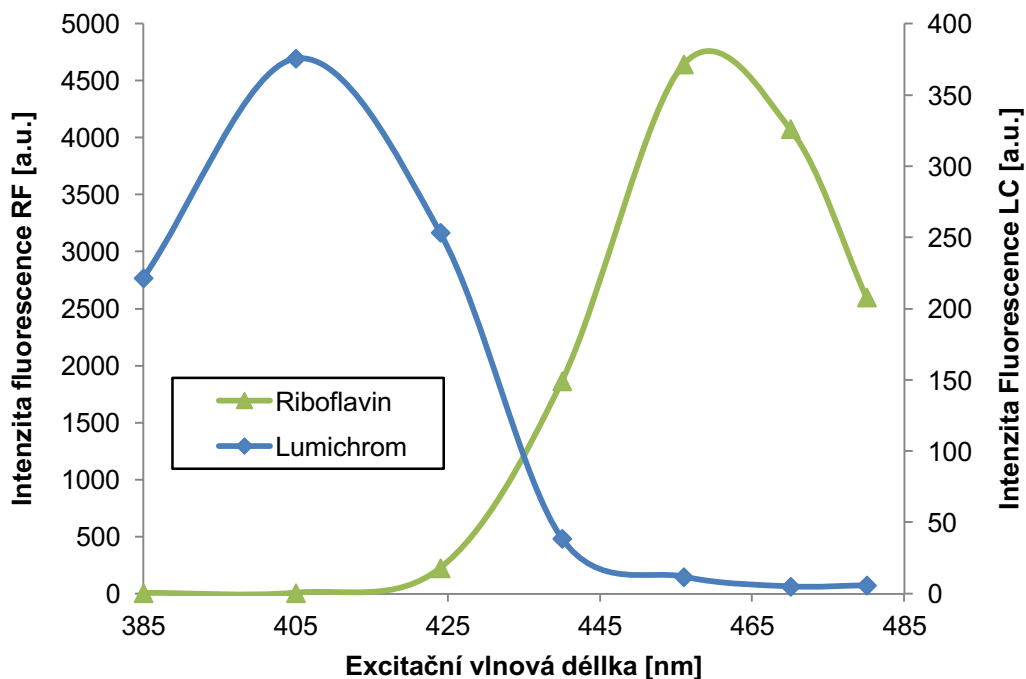
3.2.5. Měření fluorescenčního spektra fotoproduktů riboflavinu se supersvitivými diodami

Abychom ověřili vliv fotoproduktů RF, které vznikají při světelném poškození piva, byl namíchán roztok lumichromu (LC), jediného komerčně dostupného fotoproduktu RF, jehož vznik byl při analýze piva metodou HPLC prokázán [6]. Byl namíchán roztok 20 mg příslušné látky v litru vody. Následně bylo změřeno

fluorescenční spektrum na aparatuře s použitím supersvítivých diod. Fluorescenční spektrum lumichromu je zobrazeno v grafu 9. Lumichrom nejvíc fluoreskuje světlem o vlnové délce kolem 495 nm. Nejvíce fluoreskuje po excitaci světlem o vlnových délkách 385 nm, 405 nm a 424 nm (viz graf 15).



Graf 15: Fluorescenční spektrum lumichromu



Graf 16: SSF spektra LC a RF při $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$

Obdobně jako pivo byl lumichrom analyzován pomocí metody SSF. V grafu 16 jsou na obou vertikálních osách vyneseny intenzity fluorescence v závislosti na excitační vlnové délce. Na pravé ose jde o závislost fluorescence lumichromu, na levé ose pak závislost fluorescence riboflavinu, která je výrazně vyšší než u lumichromu. Toto uspořádání bylo zvoleno, protože nejdůležitější je srovnání tvaru obou závislostí.

SSF spektrum lumichromu s rozdílem excitační a emisní vlnové délky $\Delta\lambda=60 \text{ nm}$ má pík výrazně posunutý vzhledem k RF. Píky RF a LC se nepřekrývají. Při tomto způsobu vyhodnocení fluorescence je zřejmé, že lumichrom neovlivňuje naměřené hodnoty fluorescence pro excitační vlnové délky 424 nm a delší, protože pro tyto vlnové délky je SSF spektrum prakticky nulové.

Závěr

V rámci bakalářské práce byla sestavena optická aparatura pro měření fluorescence vzorků se dvěma spektrofotometry připojenými pomocí světlovodů k měřicí komoře navržené pro měření vzorku v čtvercové kyvetě o podstavné hraně 1 cm vybavené čtyřmi vstupy pro světlovody. Spektrofotometr měřící fluorescenci látky v kyvetě byl připojen kolmo k přivedenému paprsku světla. Sestavená optická aparatura užívala jako zdroj světla komerčně dostupných oválných standardních LED T-1 $\frac{3}{4}$ o průměru 5 mm. Tato aparatura byla schopna spolehlivě měřit fluorescenční spektrum riboflavinu.

Byla ověřena kalibrace obou použitých spektrofotometrů pomocí měření čárového spektra Hg výbojky a bylo zjištěno, že spektrofotometr STS je posunut od standardizované stupnice přibližně o 2 nm a spektrofotometr USB-650 je posunut od standardizované stupnice přibližně o 3 nm v celém měřeném rozsahu spektra.

U obou použitých spektrofotometrů byla ověřena lineární závislost mezi naměřeným signálem a integračním časem při konstantním světelném signálu. Linearita byla ověřena pomocí měření roztoku riboflavinu ve vodě (30 mg/l). Měřena byla intenzita fluorescence fluorescenčního maxima riboflavinu při různých integračních časech. Data byla naměřena při rozdílných integračních časech, lze tedy mezi sebou porovnávat.

Byla srovnána citlivost obou spektrofotometrů. Spektrofotometr USB650 je oproti spektrofotometru STS 15krát citlivější. Šum obou použitých spektrofotometrů byl při stejných integračních časech srovnatelný. Na základě tohoto zjištění byl spektrofotometr USB650 vybrán k měření fluorescence vzorku a spektrofotometr STS k měření transmise.

Aby bylo měření zpřesněno, bylo třeba zjistit šum fotodetektoru spektrofotometrů. Bylo ověřeno, že šum fotodetektoru je relativně konstantní v datech naměřených v rozmezí několika hodin, a proto se jej lze zbavit užitými metodami zpracování dat.

Data byla zpracována tak, že od měřených hodnot fluorescence i transmise byl odečten šum fotodetektoru (signál detektoru bez přístupu světla měřený se stejným nastavením), následně byla data vyhlazena pomocí plovoucího průměru přes deset po sobě jdoucích pixelů, což je spektrální oblast asi 4 nm. Takto upravená data intenzity fluorescence byla podělena maximem transmise příslušného měření, následně byla vydělena integračním časem, po který byla data o fluorescenci sbírána a vynásobena integračním časem, po který byla sbírána data o transmisi. Výsledek byl vynásoben tisícem, aby byla zajištěna lepší přehlednost grafů. Takto získané hodnoty intenzity fluorescence jsou nezávislé na intenzitě dopadajícího excitačního záření.

Při pokusu měření fluorescenčního spektra piva bylo zjištěno, že signál je příliš slabý, a tudíž není možné naměřená data vhodně interpretovat. Použitá úprava aparatury spočívala ve výměně komerčně dostupných diod s výkonem v řádu mW za supersvítivé diody s výkonem v řádu jednotek W. V důsledku užití těchto supersvítivých diod měřený signál značně vzrostl a již bylo možné jej dobře analyzovat.

Na osvětlovacím adaptéru byly definovaně světelně poškozeny vzorky piva. Pomocí přístroje COLORTURB bylo ověřeno, že osvitem došlo ke změně absorbance osvětleného piva. Pomocí HPLC bylo zjištěno, že osvitem došlo k úbytku riboflavinu z 400 $\mu\text{g/l}$ na 170 $\mu\text{g/l}$. Světelné poškození bylo ověřeno i sensoricky. Na fluorescenční aparatuře byly změřeny světelně poškozené a původní nepoškozené vzorky piva.

Na základě naměřených dat bylo zjištěno, že pomocí analýzy fluorescenčního spektra lze rozeznat osvětlené pivo od neosvětleného. A to hlavně díky úbytku fluorescence o vlnové délce 535 nm. Právě světlo o vlnové délce 535 nm emituje riboflavin ve svém fluorescenčním maximu. Úbytek fluorescence odpovídá faktu, že riboflavin při světelném poškození degraduje.

Pro vyhodnocení spekter byla zvolena metoda metody SSF (Synchronous scanning fluorescence). Tato metoda přiřazuje excitačním vlnovým délkám intenzitu

emitovaného světla o vlnové délce vzdálené od excitační vlnové délky o zvolenou hodnotu $\Delta\lambda$.

SSF spektrum rozdílu osvětleného a neosvětleného piva odpovídá tvarem spektru RF ale maximum je posunuto z 470 nm na 442 nm. Toto nové fluorescenční maximum by mohlo být zapříčiněno některým z fotoproduktů riboflavinu. Jako kandidát byl vybrán lumichrom, jehož vznik byl při analýze piva metodou HPLC prokázán [6], a který jako jediný je komerčně dostupný. SSF spektrum lumichromu je výrazně posunuto vzhledem k SSF spektru RF. Při excitaci světlem o vlnové délce 442 nm je SSF spektrum lumichromu s rozdílem excitační a emisní vlnové délky $\Delta\lambda = 60$ nm prakticky nulové. Přítomnost lumichromu tedy nemůže vysvětlit absenci úbytku fluorescence osvětleného piva při excitaci světlem o vlnové délce 442 nm. Nejjednodušším vysvětlením absence úbytku fluorescence je fluorescence jiného neznámého fotoproduktu RF. Toto vysvětlení podporuje fakt, že při HPLC analýze osvětlených piv byl objeven neznámý fotoprodukt [6]. Tento fotoprodukt by právě mohl být onou hledanou látkou, která fluoreskuje na vlnové délce 442 nm.

Seznam použité literatury

- [1] LINTNER, C. Lehrbuch der Bierbrauerei. Braunschweig Vieweg. 1875.
- [2] HEYERICK, Arne. UNRAVELING THE MECHANISM OF THE LIGHTSTRUCK FLAVOR OF BEER. B.m., 2000. Gent.
- [3] TEMPLAR, J., K. ARRIGAN a W. J. SIMPSON. Formation, Measurement and Significance of Lightstruck Flavor in Beer: A Review. *Brewers Digest*. 1995, roč. 70, čís. 5, s. 18–25.
- [4] DE KEUKELEIRE, Denis, Arne HEYERICK, Kevin HUVAERE, Leif H. SKIBSTED a Mogens L. ANDERSEN. Beer Lightstruck Flavor: The Full Story. *Cerevisia*. 2008, roč. 33, čís. 3, s. 133–144.
- [5] INSIŃSKA-RAK, Małgorzata, Anna GOLCZAK a Marek SIKORSKI. Photochemistry of Riboflavin Derivatives in Methanolic Solutions. *J. Phys. Chem. A*. 2012, roč. 116, s. 1199–1207.
- [6] ŠKODA, Jakub. Studium tepelné a světelné degradace piva a dalších fermentovaných nápojů. Praha 2014. Diplomová práce. Univerzita Karlova. Matematicko-fyzikální fakulta. Vedoucí práce RNDr. Petr Gabriel, Ph.D.
- [7] AHMAD, Iqbal, Q. FASIHULLAH a Faiyaz H. M. VAID. Photolysis of formylmethylflavin in aqueous and organic solvents. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2006, s. 680–685.
- [8] AHMAD, Iqbal a David C. RAPSON. Multicomponent spectrophotometric assay of riboflavine and photoproducts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1990, roč. 8, čís. 3, s. 217–223.
- [9] POZDRIK, Richard, Felicity RODDICK a Peter ROGERS. Spectrophotometric Method for Exploring 3-Methyl-2-butene-1-thiol [MBT] Formation in Lager. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006
- [10] SIKORSKA, Ewa, Anna GLISZCZYŃSKA-ŚWIGŁO. Simultaneous analysis of riboflavin and aromatic amino acids in beer using fluorescence and multivariate calibration methods. *Analytica chimica acta*. 2008

- [11] DUYVIS, Martina G., Riet HILHORST. Role of Riboflavin in Beer Flavor Instability: Determination of Levels of Riboflavin and Its Origin in Beer by Fluorometric Apoprotein Titration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002
- [12] SIKORSKA, Ewa. Analysis of vitamin B2 using front-face intrinsic beer fluorescence. *The journal European Food Research and Technology*. 2007
- [13] Studijní text k úloze 17. Měření absorpce světla. Základní fyzikální praktikum[online]. [cit. 2019-12-03]. Dostupné z: https://physics.mff.cuni.cz/vyuka/zfp/_media/zadani/texty/txt_317.pdf
- [14] SÝKOROVÁ, Kateřina. Anizotropní techniky ve studiu cytoplasmy [online]. [cit. 2019-05-01]. Dostupné z: https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=125515. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.
- [15] Specifikace spektrofotometru STS-UV. Ocean optics [online], [cit. 2019-21-04]. Dostupné z: <https://oceanoptics.com/product/sts-uv-microspectrometer/#tab-specifications>
- [16] Specifikace spektrofotometru Red Tide USB-650. Ocean optics [online], [cit. 2019-21-04]. Dostupné z: <http://stage.oceanoptics.us/product/usb-650-red-tide-spectrometers/#tab-specifications>

Seznam obrázků

Obr. 1: Přenos excitace z riboflavinu na isohumulony a vznik MBT, převzato z [2]

Obr. 2: Strukturální vzorce riboflavinu a jeho fotoproduktů, převzato z [7]

Obr. 3: Schéma použité aparatury

Obr. 4: Původní svítivé diody namontované do koncovek kompatibilních s optickou kabeláží

Obr. 5: Supersvítivé diody namontované do koncovek kompatibilních s optickou kabeláží s chladiči

Obr. 6: Supersvítivá dioda na chladiči [vlevo] a s adaptérem na světlovod [vpravo]

Obr. 7: Schéma aparatury COLORTURB ; 1 - měřicí komora, 2 - vzorek, 3 - optické tubusy, 4 - optické vysílače a přijímače, 5 - optoelektronické převodníky a předzesilovače (převzato z [6])

Seznam grafů

Graf 1: Absorpční spektra riboflavinu a jeho fotoproduktů (A – riboflavin, B – formylmethylflavin, C – lumiflavin, D – lumichrom), převzato z [8]

Graf 2: Naměřené hodnoty spektra Hg výbojky spektrofotometrem USB-650

Graf 3: Posun obou spektrofotometrů

Graf 4: Závislost integračního času na absorbanci látky

Graf 5: Fluorescenční spektrum piva, ukázka zpracování

Graf 6: Šum fotodetektoru

Graf 7: Fluorescenční spektrum riboflavinu

Graf 8: Fluorescenční spektrum riboflavinu 2

Graf 9: Fluorescenční spektrum piva

Graf 10: Odbarvení piva Pilsner Urquell v bílé láhvi v závislosti na čase osvitu

Graf 11: Fluorescenční spektrum neosvětleného piva v závislosti na vlnové délce excitace

Graf 12: Fluorescenční spektrum osvětleného piva v závislosti na vlnové délce excitace

Graf 13: SSF spektra piva a RF při $\Delta\lambda = 60$ nm

Graf 14: SSF spektra piva a RF při $\Delta\lambda=60$ nm

Graf 15: Fluorescenční spektrum lumichromu

Graf 16: SSF spektra LC a RF při $\Delta\lambda = 60$ nm

Seznam tabulek

Tabulka 1: Parametry použitých supersvítivých diod

Tabulka 2: Naměřené a očekávané vlnové délky čar spektra Hg výbojky

Seznam použitých zkratk

MBT - 3-methylbut-2-en-1-thiol

RF – riboflavin

LC – lumichrom

FMF – formylmethylflavin

LF – lumiflavin

HPLC - High-performance liquid chromatography

VÚPS - Výzkumný ústav pivovarský a sladařský

EEM - excitačně emisní matice

LED - Light-Emitting Diode

SSF - Synchronous scanning fluorescence