

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023

Sára Matysová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Využití moderních analytických technik pro analýzu
biologicky aktivních látek v čokoládě

Sára Matysová

Bakalářská práce

2023

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Sára Matysová**
Osobní číslo: **C20084**
Studijní program: **B0531A130024 Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Využití moderních analytických technik pro analýzu biologicky aktivních látek v čokoládě**
Téma práce anglicky: **Modern analytical techniques in analysis of biological active compounds in chocolate**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na využití moderních analytických technik v analýze významných biologicky aktivních látek obsažených v čokoládě. Zaměřte se rovněž na přípravu čokolády a na vliv alkalizace na obsah biologicky aktivních látek. Pozornost věnujte jak úpravě vzorku před analýzou, tak samotné analýze extraktů pomocí kapalinové chromatografie či pomocí spektrofotometrických technik.
2. Poznatky z literatury využijte pro analýzu antioxidační kapacity připravených extraktů a celkového množství fenolických látek v extraktech pomocí spektrofotometrických metod.
3. Výsledky prezentované v literatuře a experimentálně zjištěné porovnejte a kriticky zhodnoťte.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **7. února 2023**
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2023**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. Ing. Petr Česla, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Využití moderních analytických technik pro analýzu biologicky aktivních látek v čokoládě jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 6.6.2023

Sára Matysová

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat doc. Ing. Lence Česlové, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce, za užitečné rady, ochotu při konzultacích a za čas strávený s vypracováním bakalářské práce.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	antioxidační aktivita
ABTS	2,2'-azinobis (3-ethyl-2, 3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)
C	Katechin
CE	ethanolvý extrakt
DPPH	1,1'-difenyl-2-pikrylhydrazyl
EC	Epikatechin
FRAP	měření antioxidační kapacity pomocí železitých iontů
GAE	ekvivalent kyseliny gallové
GC	Gallokatechin
HDL	lipoproteiny s vysokou hustotou
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
LDL	lipoprotein s nízkou hustotou
Q	Kvercetin
TEAC	celková antioxidační aktivita vztažená ke standardní látce – Troloxu
TPC	celkový obsah fenolických látek
TPTZ	2,4,6-tripyridyl-S-triazin
TROLOX	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina
UHPLC	ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie
UV	ultrafialová oblast
VIS	viditelná oblast

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 -Množství hlavních sloučenin identifikovaných v CE	30
Tabulka 2 -Změny antioxidačních vlastností kakaových bobů v důsledku způsobů pražení ..	33
Tabulka 3 -antioxidační aktivita vzorků čokolády	33
Tabulka 4 -Vzorčky čokolády	35

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Kakaový bob.....	8
Obrázek 3 -Odrůda Forastero	14
Obrázek 4 -Odrůda Trinitario	14
Obrázek 2 -Odrůda Criollo	14
Obrázek 5 - Kalibrační závislost úbytku absorbance na koncentraci standardu Troloxu u metody ABTS	37
Obrázek 6 -Kalibrační závislost úbytku absorbance na koncentraci standardu Troloxu u metody DPPH	37
Obrázek 7 -Antioxidační kapacita extraktů ze vzorků čokolády měřená metodami ABTS a DPPH; vzorek č.1 -Chocolate Amatler (70 % kakaové sušiny), vzorek č.2 – Choco Bonte (0 % kakaové sušiny), vzorek č.3 – J.D. Gross (56 % kakaové sušiny), vzorek č.4 – Sellot (68 % kakaové sušiny), vzorek č.5 – Orion (38 % kakaové sušiny), vzorek č.6 – Merci (32 % kakaové sušiny), vzorek č.7 – Milka (30 % kakaové sušiny), vzorek č.8 – Lindt (65 % kakaové sušiny).....	39
Obrázek 8 - Kalibrační závislost změny absorbance na koncentraci kyseliny gallové (metoda TPC).....	39
Obrázek 9 -Stanovení celkového obsahu fenolických látek v extraktech ze vzorků čokolády metodou TPC; vzorek č.1 -Chocolate Amatler (70 % kakaové sušiny), vzorek č.2 – Choco Bonte (0 % kakaové sušiny), vzorek č.3 – J.D. Gross (56 % kakaové sušiny), vzorek č.4 – Sellot (68 % kakaové sušiny), vzorek č.5 – Orion (38 % kakaové sušiny), vzorek č.6 – Merci (32 % kakaové sušiny), vzorek č.7 – Milka (30 % kakaové sušiny), vzorek č.8 – Lindt (65 % kakaové sušiny).....	40

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá využitím moderních analytických technik pro analýzu biologicky aktivních látek obsažených v čokoládě. Teoretická část shrnuje informace o způsobu výroby čokolády a jejím chemickém složení. Dále se věnuje procesu alkalizace a jeho vlivu na obsah biologicky aktivních látek. Praktická část bakalářské práce je věnována stanovení celkového obsahu fenolických látek a antioxidační kapacity extraktů připravených z čokolády pomocí různých spektrofotometrických metod.

KLÍČOVÁ SLOVA

Čokoláda, kakaovník, alkalizace, biologicky aktivní látky, DPPH, ABTS, TPC, antioxidační aktivita

TITLE

Modern analytical techniques in analysis of biological active compounds in chocolate

ANNOTATION

This thesis focuses on analysis of biologically active compounds present in chocolate using modern analytical techniques. The theoretical part summarizes information about chocolate production and its chemical composition, further, the process of alkalisation and their impact on the content of biologically active substances are described. The experimental part of the thesis deals with the determination of total phenolic contents and antioxidant capacity of chocolate extracts by using spectrophotometric techniques.

KEYWORDS

Chocolate, cocoa, alkalisation, biological active compounds, DPPH, ABTS, TPC, antioxidant activity

OBSAH

1	TEORETICKÁ ČÁST	13
1.1	Kakaovník pravý.....	13
1.1.1	Popis.....	13
1.1.2	Druhy kakaovníku.....	13
1.1.3	Producenti kakaových bobů.....	15
1.2	Chemické složení čokolády	15
1.2.1	Tuky	15
1.2.2	Sacharidy	15
1.2.3	Bílkoviny a aminokyseliny	16
1.2.4	Vitamíny a minerální látky	16
1.2.5	Alkaloidy	18
1.2.6	Ostatní látky	18
1.3	Postup výroby čokolády.....	19
1.3.1	Čištění kakaových bobů.....	19
1.3.2	Fermentace kakaových bobů	19
1.3.3	Sušení.....	20
1.3.4	Pražení	20
1.3.5	Mletí.....	21
1.3.6	Míchání	21
1.3.7	Konšování	21
1.3.8	Temperace.....	22
1.3.9	Skladování	23
1.3.10	Balení a přeprava	23
1.4	Druhy čokolády.....	23
1.5	Alkalizace kakaové hmoty	24
1.5.1	Typ a koncentrace zásady	24
1.5.2	Obsah vody	24
1.5.3	Teplota	25
1.5.4	Tlak	25
1.5.5	Doba trvání	25
1.5.6	Provzdušnění.....	25
1.6	Biologicky aktivní látky.....	26
1.7	Vliv alkalizace na obsah biologicky aktivních látek	26
1.7.1	Vliv alkalizačních podmínek na fenolické látky a methylxanthiny.....	26

1.7.2	Vliv alkalizačních podmínek na těkavé chuťové sloučeniny	27
1.7.3	Vliv alkalizačních podmínek na volné aminokyseliny a redukující cukry v kakaovém prášku	27
1.8	Využití moderních analytických technik v analýze významných biologicky aktivních látek obsažených v čokoládě.....	28
1.8.1	Příprava extraktu.....	28
1.8.2	Stanovení biologicky aktivních látek pomocí kapalinové chromatografie.....	28
1.8.3	Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody ABTS	30
1.8.4	Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody DPPH	31
1.8.5	Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody FRAP	31
1.8.6	Stanovení celkového obsahu fenolických látek (TPC).....	31
1.8.7	Spektrofotometrické stanovení a jejich hodnoty	32
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
2.1	Přístroje a zařízení	34
2.2	Použité chemikálie	34
2.3	Vzorky	35
2.4	Pracovní postupy.....	35
2.4.1	Příprava vzorků.....	35
2.4.2	Spektrofotometrické metody.....	35
2.4.2.1	Metoda ABTS.....	36
2.4.2.2	Metoda DPPH.....	36
2.4.2.3	Metoda TPC-Stanovení celkového množství fenolických látek	36
3	VÝSLEDKY A DISKUZE	37
3.1	Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS a DPPH	37
3.2	Stanovení celkového obsahu fenolických látek	39
4	ZÁVĚR	41
5	POUŽITÁ LITERATURA	42
6	PŘÍLOHY	48

ÚVOD

Čokoláda je běžnou součástí nejrůznějších druhů sladkostí a patří k nejoblíbenějším cukrovinkám na světě. Vyrábí se z kakaových bobů, což jsou semena tropického stromu kakaovníku pravého (*Theobroma cacao*), který se rozděluje do tří skupin, nejrozšířenější Forastero, který představuje přes 90% produkce, dále Criollo a Trinitario. Kakaovník pochází z tropické oblasti Jižní Ameriky, ale v dnešní době se pěstuje v tropech celého světa. Největší producenti kakaava se nachází v oblastech jihovýchodní Asie, Latinské Ameriky a západní Afriky.

Kakaové boby obsahují řadu důležitých biologicky aktivních látek, jako jsou například vitamíny, minerály a antioxidanty, které jsou prospěšné pro náš organismus, takže čokoláda zajišťuje pozvolné uvolňování energie do těla, podporuje imunitní systém, uvolňuje od stresu a pomáhá tělo detoxikovat. Díky obsahu látky zvané theobromin mají kakaové boby povzbudivé účinky podobně jako kofein.

Před analýzou biologicky aktivních látek se vzorky čokolády upravují a extrahují za použití různých rozpouštědel, aby se získal maximální výtěžek. Samotná analýza extraktů může být provedena pomocí kapalinové chromatografie či pomocí spektrofotometrických technik. Pro analýzu antioxidační kapacity připravených extraktů se využívá spektrofotometrických metod ABTS a DPPH. K analýze celkového množství fenolických látek v extraktech se využívá metoda TPC.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Kakaovník pravý

1.1.1 Popis

Kakaovník pravý (*Theobroma cacao*) je strom, který se pěstuje v oblasti od Střední a Jižní Ameriky po Afriku a Indonésii až do výšky 600 metrů nad mořem. Klima musí být teplé, s teplotou 25-27 °C. Kakaovníku nevyhovuje velmi suché a vlhké období. V ideálním případě by se měly srážky pohybovat mezi 1250-2500 mm a měly by být pravidelné. Strom nejlépe roste pod stínem a ochranou vysoko rostoucích rostlin a stromů, jelikož je citlivý na přímé sluneční záření a na silný vítr. Ve volné přírodě dorůstá až do výšky 12-15 metrů, ale kvůli jednodušší sklizni si pěstitelé nenechávají vyrůst strom výše než 4-8 m. Kakaovník kvete a nese plody po celý rok. Během dvou šestiměsíčních cyklů se nachází na stonku a hlavních větvích tisíce jemných květů. Přibližně 40 z nich se nakonec vyvine v ovoce. Každá květina kvete pouze jeden den. Květy, které jsou oplodněny, se po dobu asi pěti měsíců vyvinou v kakaové lusky, které se výrazně liší tvarem, strukturou i velikostí. Lusky mohou mít délku cca 15 až 35 cm. Zralé ovoce (lusky) obvykle obsahuje 20 až 75 kakaových bobů o délce 1 až 3 cm. Kakaové boby (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**) jsou uloženy v bílé dužině [1].



Obrázek 1- Kakaový bob [2]

1.1.2 Druhy kakaovníku

Kakaovník pravý je rozdělován do tří hlavních skupin: Forastero, Criollo a Trinitario, což je kříženec mezi prvními dvěma skupinami. Odrůda Forastero představuje díky své vysoké produktivitě a odolnosti vůči chorobám a škůdcům zhruba 95 % celkové celosvětové produkce.

Odrůdy Criollo a Trinitario podle své kvality obecně produkují „jemné nebo aromatické kakao“, zatímco odrůdy Forastero obvykle produkují až na některé výjimky sypké, základní nebo obyčejné kakao [3].

Odrůda Criollo (obrázek 1) se považuje za ušlechtilý kakaovník, který pochází ze Střední a Jižní Ameriky a také z karibských ostrovů a Srí Lanky. Tvoří pouhých 5 % světové produkce. Pěstuje se velice obtížně, protože je mimořádně zranitelný vůči různým ekologickým hrozbám. Lusky mají bílou až světle růžovou barvu a jejich chuť je jemná, s nízkým obsahem klasické čokoládové chuti, ale bohatá na sekundární tóny dlouhého trvání. Odrůda Criollo, známá jako „princ kakaa“, se používá do těch nejjemnějších čokolád [1].

Nejčastěji pěstovaná odrůda Forastero (obrázek 2), která s největší pravděpodobností pochází z povodí Amazonky, se dnes pěstuje hlavně v Ekvádoru, Africe a Brazílii. Forastero je odolnější, méně náchylná k nemocem a má mnohem vyšší výnos než odrůda Criollo. Lusky se používají hlavně k tomu, aby čokoládě dodaly plnou chuť. Jeho hořká chuť má krátké trvání a není podpořena sekundárními tóny, proto se mnohdy mísí s jinou odrůdou kakaovníku [1].

Trinitario (obrázek 3) je hybrid vzniklý křížovým opylením. Legenda vypráví, že vznikla na ostrově Trinidad poté, co hurikán v roce 1727 téměř zničil místní úrodu Criollo. Za předpokladu, že všechny stromy byly mrtvé, byly na plantážích znovu vysázeny odrůdy Forastero, ale objevili se spontánní hybridy. Trinitario tedy kombinuje to nejlepší ze dvou dalších hlavních odrůd: vytríbenou chuť Criolla a odolnost a vysoký výnos Forastera. Dnes je možné tuto odrůdu nalézt ve všech zemích, kde se kakao Criollo kdysi pěstovalo: karibské ostrovy, Mexiko, Venezuela, Kolumbie a v částech jihovýchodní Asie [1].



Obrázek 4-Odrůda Criollo [1]



Obrázek 2-Odrůda Forastero [1]



Obrázek 3-Odrůda Trinitario [1]

1.1.3 Producenti kakaových bobů

Theobroma cacao se z velké části pěstuje ve třech tropických oblastech, tj. jihovýchodní Asie, Latinská Amerika a západní Afrika. Mezi deset předních světových výrobců patří Pobřeží slonoviny, Nigérie, Indonésie, Ghana, Kamerun, Brazílie, Ekvádor, Peru, Mexiko a Dominikánská republika, přičemž až 70 % celosvětové produkce pochází ze čtyř západoafrických zemí (Pobřeží slonoviny, Kamerun, Ghana a Nigérie) [4].

1.2 Chemické složení čokolády

1.2.1 Tuky

Tuk je nejbohatší energetickou složkou čokolády, umožňuje získat 9 kcal na gram ve srovnání s 5 kcal na gram u sacharidů a bílkovin. Až 50 % kakaava mohou tvořit tuky, které se skládají ze dvou nasycených mastných kyselin (kyselina palmitová a kyselina stearová) a jedné mononenasyčené kyseliny (kyseliny olejové). Tento tuk, který je obsažen v kakaových bobech nezvyšuje hladinu cholesterolu v krvi, avšak jiné přísady v některých čokoládových výrobcích mohou jeho hladinu zvýšit (mléko, jiné formy přísad tuku). Přidané tuky mohou ovlivnit hladinu cholesterolu v krvi způsobem, který může zvýšit riziko srdečních onemocnění, a proto je třeba brát v úvahu dva druhy cholesterolu. Zvýšená úroveň cholesterolu u lipoproteinů o nízké hustotě (LDL) (také známý jako "špatný" cholesterol) a snížená hladina lipoproteinů o vysoké hustotě (HDL) cholesterolu (také známý jako "dobrý" cholesterol) zvyšují riziko vzniku srdečních onemocnění, infarktu a cévní mozkové příhody. Tyto podmínky vznikají v důsledku nahromadění cholesterolu v cévách, což vede k ateroskleróze, což omezuje průtok krve v tepnách vedoucích do srdce a snižuje jeho zásobu kyslíku, což někdy vede k bolestem na hrudi [5,6].

1.2.2 Sacharidy

Kakaové boby mají značné množství sacharidů, ale většina z nich není v cukerném stavu. Sacharidy jsou nejčastěji ve formě škrobu a rozpustné a nerozpustné vlákniny. U čokolády je však cukr její základní složkou [6].

Sacharóza je řepný nebo třtinový cukr, který se skládá z jedné molekuly glukózy a jedné molekuly fruktózy. Zatímco cukrová řepa obsahuje asi 14-17 % sacharózy, cukrová třtina má obsah sacharózy 11–17 %. Rozklad na glukózu a fruktózu lze provést pomocí kyseliny nebo použitím enzymu zvaného invertáza a výslednou směs pak nazýváme invertní cukr [5].

1.2.3 Bílkoviny a aminokyseliny

Bílkoviny jsou přítomny jak v netukovém kakau, tak v mléčných částicích. Mléčná bílkovina má vyšší výživovou hodnotu než kakaové bílkoviny, protože obsahují větší podíl esenciálních mastných kyselin [5]. Bílkoviny jsou tvořeny řadou aminokyselin spojených střídavě aminokyselinou a aminem [5]. Charakteristická vůně čokolády může být způsobena reakcí aminokyselin jako jsou leucin, threonin a glutamin s glukózou, po zahřátí na cca 100 °C. Při vyšších teplotách se vůně stává mnohem intenzivnější [5].

1.2.4 Vitamíny a minerální látky

Kakaové boby jsou velice bohaté na vitamíny a minerální látky. Z vitamínů obsahují: B1, B2, B3, B5, B6, C a E. Z minerálních látek obsahují: měď, vápník, fosfor, železo, hořčík, zinek a mangan [7].

Thiamin (vitamín B1) potřebuje každá buňka těla, aby se vytvořila pohonná hmota, čímž je adenosintrifosfát. Nervové buňky vyžadují vitamín B1 za účelem normálního fungování. Výzkumy ukazují, že vitamín B1 může zvrátit anémii a případně může pomoci při prevenci Alzheimerovy choroby, cukrovky a vředů [7].

Riboflavin (vitamín B2) je ve vodě rozpustný vitamín potřebný ke zpracování aminokyselin a tuků, k aktivaci vitamínu B6 a kyseliny listové. Tento vitamín rovněž napomáhá přeměně sacharidů na adenosintrifosfát. Za určitých podmínek vitamín B2 působí jako antioxidant. Bylo prokázáno, že pomáhá při migrénách, anémii, vředech a šedém zákalu [7].

Niacin (vitamín B3) je nezbytný pro proces uvolňování energie ze sacharidů. Niacinová forma vitamínu B3 také reguluje cholesterol. Věda poukázala, že niacin lze použít při léčbě osteoartrózy, akné a vysokého cholesterolu [7].

Kyselina pantotenová (vitamín B5) se podílí na Krebsově cyklu produkce energie a je nezbytná pro produkci neurotransmiteru acetylcholinu. Dále je nezbytná při výrobě, transportu a uvolňování energie z tuků, aktivuje nadledvinky a závisí na ní syntéza cholesterolu (potřebného pro tvorbu vitamínu D a steroidních hormonů). Mnoho odborníků se domnívá, že vitamín B5 může pomoci zvládat vysoké hladiny cholesterolu a může mít pozitivní účinky při léčbě revmatoidní artritidy [7].

Pyridoxin (vitamín B6) je zásadní pro zpracování aminokyselin a je nezbytný pro produkci hormonů, serotoninu, melatoninu a dopaminu. Díky tomu je vitamín B6 užitečný pro prevenci a/nebo zvrácení různých duševních stavů, jako je deprese. V kombinaci s kyselinou listovou a vitamínem B12 snižuje vitamín B6 hladiny homocysteinu (aminokyselina spojená

se srdečními chorobami a mrtvicí). Může také pomoci v boji proti ranní nevolnosti a symptomům spojeným s premenstruačním syndromem [7].

Kyselina askorbová (vitamín C) je nezbytná pro mnoho biologických funkcí. Vitamín C je známý antioxidant, o kterém je známo, že chrání tělo před různými chorobami souvisejícími s volnými radikály, včetně onemocnění srdce a plic (způsobené kouřením) a tedy pomáhá zvyšovat imunitu. Dále pomáhá při tvorbě kolagenu, snižuje riziko šedého zákalu, mrtvice a problémů souvisejících s toxicitou těžkých kovů [7].

Vitamín E je silný antioxidant, o kterém je známo, že pomáhá předcházet oxidaci LDL, čímž snižuje riziko srdečních onemocnění. Vitamín E také pomáhá kontrolovat zánět a studie také ukázaly, že vitamín E může pomoci zvládnout revmatoidní artritidu a zlepšit imunitní funkce u starších osob [7].

Měď je stopový minerál, který je nezbytný pro mnoho tělesných procesů. Pro absorpci a využití mědi je potřeba železo. Měď je také potřebná k výrobě adenosintrifosfátu, pro syntézu některých hormonů a kolagenu, takzvaného „lepidla“, které drží pojivovou tkáň pohromadě. Je také spojován s prevencí a zvrácením anémie [7].

Vápník je minerál známý pro svou roli v prevenci osteoporózy. Hraje roli při udržování správného krevního tlaku a bylo prokázáno, že snižuje riziko srdečního onemocnění a některých typů rakoviny [7].

Fosfor se v přírodě obvykle vyskytuje v kombinaci s kyslíkem (tzv. fosfát). Většina fosforu v lidském těle existuje v kostech, ale molekuly obsahující fosfát (fosfolipidy) jsou také důležitými složkami buněčných membrán a lipoproteinů, jako jsou lipoproteiny s vysokou hustotou a lipoproteiny s nízkou hustotou [7].

Železo je esenciální minerál, který je součástí hemoglobinu, složky krve přenášející kyslík. Bez dostatečného množství železa nemůže být adenosintrifosfát (pohonná hmota, kterou tělo potřebuje k přežití) správně syntetizován [7].

Hořčík je nezbytný pro různé tělesné funkce a procesy. Je potřebný pro tvorbu kostí, bílkovin a mastných kyselin, tvorbu nových buněk, uvolnění svalů, aktivaci vitamínů B, srážení krve, přenos nervových vzruchů a tvorbu adenosintrifosfátu [7].

Zinek je součástí více než 300 enzymů potřebných k hojení ran, udržení plodnosti dospělých a růstu dětí, syntetizuje bílkoviny, pomáhá reprodukci buněk, posiluje imunitu a chrání před

volnými radikály. Výzkum ukazuje, že zinek může zkrátit trvání a/nebo závažnost běžného nachlazení u dospělých [7].

Mangan je esenciální stopový minerál potřebný pro zdravou tvorbu kůže, kostí a chrupavek a glukózovou toleranci. Pomáhá také aktivovat superoxid dismutázu, důležitý antioxidační enzym [7].

1.2.5 Alkaloidy

Zralá semena obsahují celkově zhruba 1-2,3 % alkaloidů. V kakaových jádrech se nacházejí alkaloidy theobromin a kofein, avšak během procesu fermentace dochází ke snížení jejich obsahu. Po 7 dnech fermentace se jejich obsah sníží zhruba o 40 %, neboť jsou alkaloidy vylučovány do fermentační šťávy a procházejí slupkou, kde jsou částečně zadrženy. Naopak obsah alkaloidů ve slupkách se během fermentace zvyšuje. [8]. Theobromin je velmi mírný stimulant, který může být toxický pro zvířata, jako jsou kočky, psi a papoušci. [6]. V různém množství se vyskytuje také v čaji, kávě a ořechu kola, i když nejbohatším známým zdrojem je čokoláda. Je pozoruhodné, že samotný theobromin neobsahuje žádný brom, spíše byl pojmenován po kakaovníku Theobroma. Přípona „ine“ je standardní konvencí pro alkaloidy, jako caffeine (kofein), nicotine (nikotin) a morphine (morfin) z anglického jazyka [9]. Kofein je běžnou složkou kakaového bobu, která umožňuje čokoládovým výrobkům udržet nás vzhůru. Množství kofeinu je mnohem menší než v jiných produktech, jako jsou káva, kolové nápoje a čaj [6]

1.2.6 Ostatní látky

Dále čokoláda obsahuje fenylethylamin, serotonin a lecitin. Fenylethylamin stimuluje naše tělo zvýšením hladiny dopaminu a adrenalinu v krvi [6], serotonin vytváří pocit potěšení a může způsobovat mírné abstinenční příznaky a mírnou depresi [6] a lecitin je běžná čokoládová přísada složená z fosfolipidů vázaných na molekuly cholinu [10]. Sójový lecitin, který je emulgátorem při výrobě čokolády, se obvykle přidává v koncentraci 3–6 g/kg čokoládové hmoty. Přidání 1-3 g/kg sójového lecitinu má stejný účinek na snížení viskozity jako přidání asi desetinásobku tohoto množství kakaového másla, čímž se snižují výrobní náklady úsporou kakaového másla [11].

1.3 Postup výroby čokolády

Významnou roli ve vývoji chutí hraje technika sběru kakaových bobů a jejich posklizňová úprava, kde prvním krokem je fermentace [12].

1.3.1 Čištění kakaových bobů

Vzhledem k tomu, že k sušení kakaových bobů dochází na zemi, často obsahují písek, kameny či rostlinný materiál. Tyto nečistoty jsou mnohdy velmi tvrdé, a proto musí být nejprve odstraněny, aby nedošlo k poškození zařízení, které se používá k mletí kakaových bobů. Dále je jejich odstranění nutné z důvodu obsahu organických kontaminujících látek, které se během pražení spálí a dochází k uvolnění plynů, které mohou zkazit chuť kakaa. Čištění se proto provádí na začátku procesu výroby čokolády. K odstranění různých typů odpadu se obvykle kombinuje několik různých procesů. Nečistoty v podobě prachu lze odsát. Kameny mohou mít podobnou velikost jako kakaové boby, ale mají odlišnou hustotu. Lze je oddělit vzájemným vibrováním na mřížce, která je nastavena pod úhlem k vodorovné rovině. Vzduch prochází mřížkou a fouká kakaové boby výše než kameny. Jak jsou blíže vibrační mřížce, kameny se posouvají směrem nahoru, kde odpadávají do sběrného pytle. Vzduch dopraví boby do spodní části roštu, kde vstupují do další fáze zpracování [5].

1.3.2 Fermentace kakaových bobů

Fermentace je prvním krokem posklizňového zpracování. Jedná se o klíčovou fázi zpracování kakaových bobů, která rozhoduje o tvorbě chuťových prekurzorů, snižuje jejich hořkost a trpkost a určuje jejich barvu. Výsledek fermentace je ovlivněn složením dužiny, protože ji kvasinky a bakterie využívají k tvorbě chuťových prekurzorů [12]. Fermentace musí začít do 24-48 hodin po otevření lusků a obvykle trvá 5-7 dní [9]. Samotný fermentační proces je rozdělen do 2 fází. První fází je anaerobní fáze, kdy kvasinky, bakterie a vláknité houby začnou fermentovat zrno a dužinu. V této fázi převažují v procesu kvašení kvasinky, jako jsou například: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* a *Candida castellii*. Kvasinky jsou schopny katalyzovat sacharózu, glukózu a fruktózu a produkovat ethanol jako fermentační produkt. Dále pomáhají rozkládat pektin, který podporuje provzdušnění. Druhá fáze je aerobní, začíná po 48 až 96 h a dominují v ní bakterie mléčného kvašení. Zatímco aktivita kvasinek je inhibována provzdušňováním, zvýšením pH dochází k růstu bakterií mléčného kvašení. Před ukončením této fáze jsou bakterie mléčného kvašení nahrazeny bakteriemi kyseliny octové. Kyselina octová nakonec kakaový bob usmrtí, což způsobí prasknutí buněčných stěn a smíchání několika dříve oddělených látek. Bakterie kyseliny octové hrají významnou roli při tvorbě chuťových prekurzorů, které jsou počátkem výrazné čokoládové chuti a vůně. V první fázi

došlo k přeměně některých chemických sloučenin, např. sacharóza se částečně hydrolyzovala na redukující cukry, přeměnila se bílkovina na peptidy a aminokyseliny a některé polyfenoly byly hydrolyzovány a oxidovány. Druhá fáze se pak týká spíše sensorických vlastností, které souvisí se snížením stupně trpkosti, který je ovlivněn oxidací komplexů bílkovin a polyfenolů. Délka fermentace má vliv na pH kakaových bobů a jejich teplotu. Pokud fermentace trvá příliš dlouho a pH je příliš kyselé, dojde ke snížení obsahu chuťových prekurzorů [12].

1.3.3 Sušení

Po procesu fermentace následuje proces sušení. Sušením kakaových bobů se snižuje obsah vlhkosti z cca 60 % na 7 %, čímž dochází k zabránění nadměrné fermentaci, poškození bobů a napadení plísněmi během skladování. V průběhu sušení dojde ke změně sensorických vlastností, jako je snížení kyselosti, hořkosti, trpkosti, a rovněž dojde k rozvoji hnědé barvy kakaových bobů. Pomalý proces sušení ovlivňuje barvu kakaových bobů a dochází ke snížení obsahu některých těkavých kyselin, což zároveň vede k nízké kyselosti produktu. Při rychlém sušení kakaových bobů dochází ke ztvrdnutí slupky a k zabránění úbytku kyseliny octové, čímž se naopak zvyšuje kyselost bobů [12].

Obecně dochází během procesu sušení ke čtyřem změnám. První je neenzymatická reakce hnědnutí za vzniku těkavých látek, která má vliv na snížení obsahu redukujících cukrů. Za druhé, během sušení dochází k poklesu neredukujících cukrů. Za třetí, proces hydrolyzy kakaového proteinu vede ke snížení koncentrace proteinu a za čtvrté, přítomnost lipázy v kakaových bobech také zvyšuje obsah volných mastných kyselin [12].

Způsoby sušení vytvářejí různé čokoládové chutě. Způsob sušení na slunci mu dodává jedinečnou čokoládovou chuť. Naopak umělé sušení produkuje nearomatické pachy, jako je kouř, šunka, guma nebo benzín. Vysoce kvalitní kakaové boby jsou vyrobeny z dobře vysušených bobů, které jsou hnědého vzhledu, mají nízkou svíravost a hořkost a nemají nevýraznou chuť [12].

1.3.4 Pražení

Pražení je prvním krokem v průmyslovém zpracování čokolády. Jedná se o důležitý krok v dalším rozvoji čokoládových chutí z aromatických prekurzorů vzniklých během fermentace a sušení. Kombinace doby pražení a teploty určuje chuť čokolády. Čas a teplota se pohybují od 5 do 120 min a 120-150 °C. Během pražení se sníží obsah vlhkosti na 1 % až 2 %. Při použití vyšších teplot se snižuje obsah některých těkavých kyselin, jako je nežádoucí kyselina octová,

zatímco méně těkavé kyseliny (šťavelová, citrónová, vinná, jantarová a mléčná) zůstávají nezměněny[12].

1.3.5 Mletí

Kakaové zrna musí být rozemleta od maximální velikosti přibližně 0,5 cm do méně než 30 mikrometrů. Při mletí kakaových zrn se sledují dva cíle. Prvním cílem je vytvořit dostatečně malé částičky kakaá, aby se z nich dala vyrobit čokoláda. Druhým důležitějším důvodem je odstranění co největšího množství tuku z buněk uvnitř listů. Tuk je potřebný k tomu, aby čokoláda lépe tekla, a to jak při výrobě cukrovinek, tak i při jejím rozpouštění v ústech. Tuk je také nejdražší hlavní složkou čokolády, takže z ekonomického hlediska je nutné co nejlépe využít veškerý přítomný tuk v kakaových zrnech [5].

K mletí se používají mlecí stroje, které pracují efektivně pouze s 10násobným zpomalením, takže jsou zapotřebí alespoň dva stupně mletí. Kakaový prášek se nejprve mele nárazovým mlýnem, který rozpustí tuk a vytvoří kapalinu obsahující velké částice o průměru stovek mikrometrů. Druhým mlýnem je obvykle kulový mlýn, nebo kotoučový mlýn, které dokážou zpracovávat kapalně nebo pevně materiály. Mletá kakaová částice obsahuje kakaový škrob, který tvoří asi 7 % hmotnosti kakaové hmoty [5].

1.3.6 Míchání

Míchání ingrediencí při výrobě čokolády je základní operace, která probíhá v kontinuálních nebo dávkových mixérech k dosažení stálé konzistence směsi. Při dávkovém míchání se čokoláda s kakaovou hmotou, cukrem, kakaovým máslem a mléčnými výrobky důkladně promíchá, obvykle při 40-50 °C po dobu 12-15 minut. Velcí výrobci čokolády, jako je Nestlé a Cadbury, obvykle používají kontinuální míchání pomocí známých automatických hnětačů k vytvoření mírně pevnější textury a plastické konzistence [13].

1.3.7 Konšování

Konšování je proces, při kterém se rozvíjí konečná chuť a zlepšuje struktura čokolády. Tento proces snižuje koncentraci volných kyselin a dalších těkavých vedlejších produktů v kakaových bobech. Konšování je posledním výrobním procesem souvisejícím s vývojem chuti. Stává se tedy poslední možností, jak získat požadovanou chuť kakaových výrobků. Začíná zpracováním čokoládových vloček a drobků do tekuté fáze. Použitá teplota se volí v závislosti na složení čokolády a požadované chuti. Podle doby trvání konšování a podle teploty konšování získáme určitou chuť čokolády. Každý čokoládový výrobek má tedy jiná doporučení pro konšovací teploty. Například u mléčné čokolády se doporučuje teplota nižší než 50 °C,

aby se zabránilo Maillardově reakci, zatímco u hořké čokolády 70 °C až 82 °C [12]. Obvykle se doba konšování pohybuje v rozmezí 6-24 hodin u výkonnějších konšírek. Tradiční dlouhá rafinace obvykle trvá asi 72 hodin. Většina výrobců čokolády používá pouze 4-6 hodin konšování, ale to může negativně ovlivnit kvalitu konečného produktu [14].

1.3.8 Temperace

Nekontrolovaná krystalizace kakaového másla typicky produkuje krystaly různých velikostí, z nichž některé nebo všechny jsou dostatečně velké, aby byly jasně vidět pouhým okem. To má za následek skvrnitý a matný povrch čokolády a způsobuje, že se čokoláda při lámání spíše drolí, než láme. Jednotný lesk a křupavá textura správně zpracované čokolády je výsledkem konzistentního vytváření malých krystalků kakaového másla během procesu temperování. Čokoláda v pevném skupenství má tukové částice kakaového másla v krystalické pevné struktuře. Krystaly kakaového másla se při zahřátí dokážou oddělit od pevné struktury a umožňují čokoládě získat se zvyšující se teplotou tekutější konzistenci – proces tání. Čokoláda s vyšším obsahem tuku taje při nižší teplotě. Po odstranění tepla krystalky kakaového másla opět ztuhnou a přiblíží se k sobě, takže čokoláda ztuhne. Teplota je během krystalizace pečlivě kontrolována, aby byl zajištěn nejlepší vzhled a textura, a aby byly vytvořeny co nejstabilnější krystaly, a aby se struktura a vzhled časem nezměnily. Obecně se čokoláda nejprve zahřeje na 50 °C, aby se roztavily krystaly. Čokoláda se poté ochladí na několik minut na přibližně 27 °C, při této teplotě se čokoláda rozruší a vytvoří mnoho malých krystalických "semínek", která fungují jako jádra pro vytvoření malých krystalů v čokoládě. Čokoláda se poté zahřeje na přibližně 31 °C. Po tomto okamžiku jakékoli přehřátí čokolády rozruší temperaci a proces se musí opakovat. [15].

Dva klasické způsoby ručního temperování čokolády jsou:

- 1) Práce s roztavenou čokoládou na povrchu pohlcujícím teplo, jako je kamenná deska, dokud zahuštění neukáže přítomnost dostatečného množství krystalových "semínek", čokoláda se poté jemně zahřeje na pracovní teplotu.
- 2) Tuhou čokoládu vmícháme do rozpuštěné čokolády tak, aby tekutá čokoláda "naočkovala" krystaly.

Pro výrobu konzistentně temperované čokolády lze použít stroje na temperování čokolády s počítačovým ovládním, zejména pro velkoobjemové aplikace [15].

1.3.9 Skladování

Protože je čokoláda obzvláště citlivá na teplotu a vlhkost, vyžaduje vhodné podmínky skladování. V ideálním případě je preferována skladovací teplota 15 až 17 °C s relativní vlhkostí nižší než 50 %, což zvyšuje trvanlivost čokolády a zabraňuje vykvétání tuku. Trvanlivost se pohybuje od 2-3 měsíců u mléčné čokolády po přibližně 2 roky u tmavé čokolády [16].

1.3.10 Balení a přeprava

Pro balení kakaových bobů se obvykle používají jutové sáčky o hmotnosti 60-65 kg, které jsou pak přepravovány lodí, železnicí nebo nákladními vozidly. Ideální podmínky pro udržení během manipulace nebo přepravy jsou teplota mezi 15 až 30°C, relativní vlhkost 70 až 75 % a obsah vlhkosti mezi 6 až 9 % [16]

Tradiční obal pro lisované čokoládové kostky a tabulky je fólie a papír. Hliníková fólie poskytuje určitou ochranu před znečištěním, napadením hmyzem a zkažením. Papír může být jakkoliv zbarvený. Pro jejich přepravu se používají kartonové krabice[5].

1.4 Druhy čokolády

Existují tři hlavní druhy čokolády: hořká, mléčná a bílá, mezi nimiž jsou značné rozdíly. Složení hořké čokolády se skládá především z kakaové hmoty, cukru a kakaového másla. Mléčná čokoláda se skládá z cukru, kakaového másla, mléčné sušiny a kakaového likéru, a bílá čokoláda se skládá z cukru, mléčné sušiny a kakaového másla. Čokoláda může obsahovat také emulgátory, jako je lecitin, a také sůl, aromata nebo koření. Směrnice týkající se kakaa a čokoládových výrobků určených k lidské spotřebě definují hořkou čokoládu jako výrobek získaný z kakaových výrobků a cukrů, s obsahem minimálně 35 % celkové kakaové sušiny, z toho nejméně 18 % kakaového másla a alespoň 14 % odtučněné kakaové sušiny. Mléčná čokoláda je definována jako výrobek získaný z kakaových výrobků, cukru a mléka nebo mléčných výrobků, obsahující alespoň 25 % celkové kakaové sušiny, nejméně 14 % mléčné sušiny, přinejmenším 2,5 % odtučněné kakaové sušiny, nejméně 3,5 % mléčného tuku a alespoň 25 % celkového tuku (kakaové máslo a mléčný tuk). Podle téže směrnice je bílá čokoláda definována jako výrobek získaný z kakaového másla, mléka nebo mléčných výrobků a cukru, obsahující přinejmenším 20 % kakaového másla a nejméně 14 % mléčné sušiny, z toho nejméně 3,5 % mléčného tuku [17].

1.5 Alkalizace kakaové hmoty

Techniku alkalizace poprvé představil Holanďan van Houten v roce 1928, a proto ji pojmenoval jako holandský proces [13]. Alkalizace je volitelný, ale velmi užitečný krok při výrobě kakaa za účelem ztmavnutí jeho barvy, úpravy jeho chuti, snížení kyselé a svíravé chutě, a zvýšení rozpustnosti přírodního kakaa. Kakao je ve své přirozené formě mírně kyselé, s nominálním pH v rozmezí 5,0 až 5,6. Alkalizace neboli holandský proces neutralizuje normální kyselost kakaa a zvyšuje pH na 7 až 8. Z technologického hlediska zahrnuje alkalizace působení hydroxidu na kakaovou surovinu při určitém tlaku a teplotě [18-19].

Proces alkalizace se obvykle provádí v uzavřeném tlakovodním reaktoru za použití kontinuálního hnětacího systému. Patenty vztahující se k procesu alkalizace byly zkoumány s cílem popsat všechny proměnné, které lze během procesu alkalizace kombinovat, aby se vyvinuly kakaové produkty se specifickými vlastnostmi (barva, chuť atd.). Bylo identifikováno sedm proměnných jako nejdůležitějších pro dosažení požadovaných změn: typ a koncentrace hydroxidu, teplota, provzdušňování, obsah vody, tlak a doba trvání [19].

Důležité parametry ovlivňující alkalizaci jsou popsány v následujících kapitolách.

1.5.1 Typ a koncentrace zásady

Typ a koncentrace zásady jsou jedny z nejdůležitějších parametrů ovlivňující proces alkalizace. Během alkalizace se používá několika druhů zásad, a to hydroxidy, uhličitan, či hydrogenuhličitan sodný, draselný či vápenatý. Všechny tyto soli jsou zahrnuty v Codex Alimentarius (potravinářský zákoník) jako povolená aditiva pro regulaci kyselosti, přičemž maximální dávkování je omezeno správnou výrobní praxí. Zásady lze použít samostatně nebo v kombinaci pro tvorbu dané barvy. Díky svým účinkům je K_2CO_3 považován za nejlepší alkalizující sůl pro tvorbu světlých a červených barev, aniž by narušil chuť výrobku, zatímco NaOH se doporučuje pro získání tmavých barev. Wiant a kol. [20] ukázal, že když se zkombinují sloučeniny draslíku a amoniaku zajistí se tím nejintenzivnější černé barvy a zároveň se zachovají vynikající chutě. Nejčastější rozsah koncentrací zásad se pohybuje od 1 do 6 % a liší se v závislosti na povaze použité alkalické látky, kombinaci alkalických činidel a chuťových vad kakaové hmoty [19,20].

1.5.2 Obsah vody

Voda má schopnost transportovat alkalické činidlo k barevným prekurzorům, které budou oxidovány během alkalizace. Aby se alkalické činidlo dobře rozložilo, je třeba přidat potřebné množství vody k navlhčení kakaového materiálu. Přidání většího množství vody, než je nutné,

znamená delší dobu sušení. Zpravidla se přidává voda v rozmezí koncentrací 10 až 50 %, avšak je obtížné poskytnout doporučení ohledně procentního podílu vody, které musí být přidáno, aby se dosáhlo specifické barevné charakteristiky [19].

1.5.3 Teplota

Teplota je další důležitou proměnnou, která určuje barvu kakaa. Obecně platí, že zvýšení teploty má za následek tmavší barvu kakaa a rychlejší reakci. Nejčastěji používané rozmezí teplot je od 60 do 130 °C. K výrobě červeného kakaa jsou obecně vyžadovány nižší teploty, zatímco k získání tmavšího kakaa je třeba použít vyšších teplot. Pro tmavé kakao je maximální doporučená teplota 135 °C, protože vysoké teploty sice vytvářejí velmi tmavé kakao, ale mohou mít nepříznivý vliv na chuť [19].

1.5.4 Tlak

Proces výroby černého kakaa vyžaduje tradiční systém, a to tlak mezi 1 až 12 atmosfér a reakční dobu mezi 30 až 120 minutami. Během vytlačování, při kterém se aplikuje tlak mezi 47 až 75 atmosfér, je však doba trvání pod 5 minut. Kromě urychlení procesu je zvýšení tlaku spojeno s intenzitou zbarvení kakaově červené barvy [19].

1.5.5 Doba trvání

Celková doba expozice by měla trvat od 5 do 180 minut. Je nutné zdůraznit význam doby trvání alkalizace ve vztahu k vývoji barvy a vzniku pachu. Při překročení doporučené doby trvání procesu může dojít k výskytu nežádoucích příchutí [19].

1.5.6 Provzdušnění

Alkalizace je založena na oxidativních reakcích, které se odehrávají v základních médiích a přispívají k tvorbě barev. Při těchto chemických reakcích je nutné injekčně podávat kyslík, a proto je pro změnu barvy kakaa klíčové provzdušňování. Konkrétně se uvádí, že k výrobě červeného kakaa je zapotřebí více provzdušňování než k získání kakaa černého. Optimální rychlost provzdušňování je od 0 do 5 bar/min [19].

1.6 Biologicky aktivní látky

Biologicky aktivní látky kromě základní výživové hodnoty poskytují další zdravotní výhody. Bioaktivní sloučeniny jsou molekuly, které mohou představovat terapeutický potenciál tím, že ovlivňují příjem energie a zároveň snižují prozánětlivý stav, oxidační stres a metabolické poruchy. Epidemiologické studie poukázaly, že vysoká konzumace potravin bohatých na bioaktivní sloučeniny s antioxidační aktivitou, včetně vitamínů, minerálních látek, a hlavně fenolických sloučenin, jako jsou flavonoidy a karotenoidy, má pozitivní vliv na lidské zdraví a mohla by snížit riziko řady onemocnění, jako jsou rakovina, srdeční choroby, mrtvice, Alzheimerova choroba, cukrovka, šedý zákal a funkční úpadek související s věkem [21]. Obsah bioaktivních látek je mimo jiné podmíněno zpracováním kakaových bobů po sklizni, jehož významným krokem je v tomto ohledu fermentace. Kakao je bohaté na bioaktivní sloučeniny, převážně methylxantiny sloučeniny, jako je theobromin a kofein, a také fenolické sloučeniny, jako je kyselina gallová a flavan-3-olové monomery, katechin (C) a epikatechin (EC) [22].

1.7 Vliv alkalizace na obsah biologicky aktivních látek

1.7.1 Vliv alkalizačních podmínek na fenolické látky a methylxanthiny

Polyfenolové a methylxantinové sloučeniny jsou zodpovědné za svíravou a hořkou chuť kakaa a ovlivňují jeho stabilitu a stravitelnost [23–26]. Problémem při používání alkalizovaných kakaových výrobků je, že během alkalizace vlivem silně zásaditého pH může dojít k jejich degradaci [18]. Zvláště se zvyšujícím se stupněm alkalizace může dojít ke snížení obsahu hlavních zástupců methylxanthinů, theobrominu a kofeinu, přičemž theobrominu se v kakau vyskytuje daleko více než kofeinu [24,25]. V případě fenolických látek byl v průběhu alkalizace zaznamenán 77% pokles obsahu EC a 67% pokles C [18], zatímco Andres-Lacueva a kol. [29] uvedli průměrný pokles epikatechinu o 67 % a katechinu o 38 % v kakaovém prášku po alkalizaci. Obsah epigallokatechinu je významně nižší než obsah ostatních flavan-3-olů [30], zatímco obsah EC a C v kakaovém prášku je v rámci studií srovnatelný [29-30]. Hlavním zástupcem flavanolů v kakau je EC [29], jeho obsah v kakaových bobech z Ghany a Indonésie byl 2,65–0,3 mg/g, a 0,79–0,05 mg/g a obsah C v kakaových bobech se pohyboval v rozmezí 0,17 až 1,15 mg/g [31], což se shoduje s uváděnou hodnotou přibližně 4,52 mg/g v odtučněném vzorku podle Kim a Keeney [32].

1.7.2 Vliv alkalizačních podmínek na těkavé chuťové sloučeniny

Kakaové těkavé látky pocházejí z aromatických prekurzorů vznikajících během fermentace a sušení bobů [18,33]. Zatímco některé aromatické sloučeniny během alkalizace degradují, jiné vznikají, jako např. nonanal, ethanol, 2-propanol, což je pravděpodobně způsobené degradací aminokyselin a závisí na stupni alkalizace [18]. V kakau bylo identifikováno přibližně 600 těkavých látek, zahrnující několik chemických tříd, jako jsou aldehydy, ketony, estery, alkoholy, pyraziny, chinoxaliny, furany, pyrony, laktony, pyroly a diketopiperaziny a další [34]. Různé druhy kakaava mohou vykazovat různé a specifické příchutě, protože koncentrace a sensorický charakter těchto sloučenin se výrazně liší [34]. Bylo zjištěno, že alkoholy, kyseliny a D-limonen tvoří hlavní sloučeniny (přibližně 60-75 %) těkavých aromatických látek [18]. Kyselina octová, která je převládající kyselinou v kakaovém prášku před alkalizací, se po silném stupni alkalizace sníží až o 67 % [18], zatímco podle jiné studie [35] se při vysoké alkalizaci snížila o 94 %. Přimícháním glukózy jako redukujícího cukru při alkalizačním procesu se dosáhne lepší chuti kakaava [18]. Dále v případě alkalizace za přídavku glukózy nedochází k tak velkému poklesu kyselin a dokonce v případě alkoholů dochází ke zvýšení jejich obsahu [18]. D-Limonen, představuje pouze 1,92 % kakaové hmoty před alkalizací, ale po lehkém stupni alkalizace se zvýší na 6,92 %, a těžkém na 31,4 %. To naznačuje, že začleněním redukujícího cukru (glukózy) do procesu alkalizace vzniká více aromatických sloučenin. Aldehydy, ketony, estery, alkany, furany a sloučeniny obsahující benzen po lehkém stupni alkalizace svůj obsah zvyšují, ale některé z nich se po těžké alkalizaci sníží [18,35].

1.7.3 Vliv alkalizačních podmínek na volné aminokyseliny a redukující cukry v kakaovém prášku

Alkalizace během pražení může vést k rozvoji Maillardovy reakce, zejména k tvorbě neenzymatických hnědých sloučenin. Maillardova neboli neenzymatická reakce hnědnutí zahrnuje především reakci volných aminoskupin aminokyselin a redukujících cukrů, při níž vznikají aromatické a chuťové látky. Neenzymatické hnědnutí je zodpovědné za některé z nejpríjemnějších chutí, které si lidé vychutnávají [18,36–38]. Bylo zjištěno, že hlavním redukujícím cukrem v kakaovém prášku je fruktóza [18,38,39], ale po alkalizaci nebyla zjištěna žádná glukóza [18]. Degradace aminokyselin při pražení může být právě důsledkem Maillardovy reakce a oxidativní deaminace, stejně jako snížení obsahu aminokyselin při alkalizaci [18,40]. Bylo pozorováno, že míra degradace hydrofobních aminokyselin byla 44 % u lehkého stupně alkalizace, 83 % u těžkého stupně a 75 % u alkalizace s přídavkem

glukózy [40]. Dále bylo zjištěno [18], že v případě alkalizace kakaového prášku s přídavkem glukózy dochází k větším ztrátám aminokyselin než bez jejího přídavku.

1.8 Využití moderních analytických technik v analýze významných biologicky aktivních látek obsažených v čokoládě

1.8.1 Příprava extraktu

Pro stanovení biologicky aktivních látek v kakau a čokoládě je nutné nejprve vzorek homogenizovat a případně nadrtit na menší kousky. Kakaový prášek lze analyzovat okamžitě, nebo po zmrazení ho rozmělnit na jemnější prášek. Čokoláda se nastrouhá nebo rozpustí působením tepla [18,41–43]. Takto připravený vzorek se nejčastěji nejprve zbaví tuků pomocí extrakce s *n*-hexanem [41,42]. Odtučněné vzorky jsou vysušeny na vzduchu [44], ve vakuové sušárně při teplotě 30 °C [18] či pod proudem dusíku [44], aby se odpařily zbytky organického rozpouštědla. Poté se provádí extrakce biologicky aktivních látek pomocí různých organických rozpouštědel, jako je methanol [41–43], aceton [34–35], ethanol [45] či jejich vodné roztoky [41]. Pro potlačení disociace přítomných fenolických látek se často k extrakčnímu činidlu přidává kyselina octová [34–35] či mravenčí [41]. Pro podpoření extrakce je možné využít ultrazvukovou lázeň, nebo se suspenze se intenzivně míchá třepačkou. Po extrakci dochází k odstředění suspenze a oddělení rozpouštědla od pevného podílu. Extrakt je dále přefiltrován a analyzován zpravidla pomocí spektrofotometrických a chromatografických technik. [43,45,46].

1.8.2 Stanovení biologicky aktivních látek pomocí kapalinové chromatografie

Kvantitativní a kvalitativní stanovení biologicky aktivních látek v extraktech z čokolády či kakaa pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie se zpravidla provádí s využitím spektrofotometrického detektoru [18,27,43,45,47–48] nebo ve spojení s hmotnostním spektrometrem [18,27,29,47,49,50]. Separace se provádí v systémech s obrácenými fázemi, kde jako mobilní fáze se používá vodný roztok s přídavkem kyseliny mravenčí [18,43,45,47,49] nebo octové [18,29,43] a jako organické rozpouštědlo se využívá acetonitril [18,29,43,45,48] či metanol [27,43,47,50]. Pro záznam fenolických látek se většinou využívají vlnové délky 270, 325 či 360 nm, podle absorpčních maxim hlavních složek kakaa a čokolády, což jsou katechiny, methylxantiny, fenolické kyseliny a deriváty flavonolu [45]. Protože se jedná o látky polárnějšího charakteru, pro ionizaci u hmotnostní spektrometrie se volí elektrosprej. Identifikace jednotlivých fenolických sloučenin se provádí na základě porovnání retenčních časů s retenčními časy standardů nebo na základě hmotnostních spekter a dostupných údajů

z literatury [18,27,29,43,45,47–50]. Pro kvantitativní analýzu se volí zpravidla metoda externích kalibračních křivek [18]. Pokud není dostupný standard, využívá se ke kvantitativní analýze strukturně blízký analog [45].

V kakau, a tedy i v čokoládě jsou obsažené dva hlavní typy biologicky aktivních látek. Do první skupiny patří antioxidanty, zejména flavan-3-oly ve formě katechinových monomerů a oligomerů. Nejhojněji zastoupené monomery v kakaovém prášku jsou katechin a epikatechin, jejichž koncentrace obvykle dosahují 0,2 a 0,7 % (w/w) [50]. Druhý typ kakaových bioaktivních látek zahrnuje tzv. psychoaktivní složky, jako je theobromin a kofein. Kofein může tvořit až 0,28 % hmotnosti kakaového prášku a theobromin až 2,21 % hmotnosti [50]. Většina prací se právě zabývá společným stanovením flavan-3-olových monomerů a methylxanthinů [18,27,29,43,45,47–50]. V závislosti na druhu kakaa a parametrech zpracování se může složení bioaktivních látek v kakaovém prášku značně lišit. Obsah theobrominu se většinou pohybuje od 0,5-12 mg/g čokolády [48] a závisí na odrůdě kakaa, podmínkách fermentace a také na přípravě čokolády. V mléčných čokoládách je zpravidla menší obsah theobrominu (2,1-3,2 mg/g) než v hořkých čokoládách (3,8-4,8 mg/g) [47]. Ve studii Belščak a kol. [51] bylo stanovené podobné množství theobrominu v mléčné čokoládě (3,4 mg/g), ale téměř dvojnásobné množství v hořké čokoládě (8,5 mg/g). Podobně vysoké množství bylo stanoveno i v práci Bordiga a kol. [52]. Obsah kofeinu se pohybuje u mléčných čokolád 0,2-0,3 mg/g a u hořkých čokolád mezi 0,6-0,9 mg/g [47]. Tyto hodnoty jsou nižší než hodnoty uváděné Belščakem a kol. [51] (0,5 mg/g pro mléčnou a 0,9 mg/g pro hořkou čokoládu), ale vyšší než hodnoty uváděné pro hořké čokolády Bordigou a kol. [52] (0,2-0,3 mg/g).

Profil bioaktivních látek přítomných v ethanolovém extraktu připraveného z kakaa byl stanoven v práci Baranowska a kol. [45]. Obsah hlavních sloučenin identifikovaných v extraktu z kakaa je uveden v tabulce 1. Většinu identifikovaných bioaktivních složek ve vzorku představují psychoaktivní složky (kofein a theobromin). Dalšími hojně zastoupenými bioaktivními složkami jsou flavan-3-oly, konkrétně katechin, epikatechin a gallokatechin. V mnohem nižších koncentracích byla stanovena kyselina protokatechová, patřící mezi hydroxybenzoové kyseliny, a také kvercetin ze skupiny flavonolů. Analyzovaný vzorek obsahoval také menší množství dalších sloučenin charakteristických pro kakao, jako je arabinosid a kvercetin [45].

Tabulka 1-Množství hlavních sloučenin identifikovaných v CE [45]

Sloučenina	Obsah v CE [µg/ml]
theobromin	1548 ± 23
Kofein	125,3 ± 4,2
epikatechin (EC)	268 ± 17
katechin (C)	98,6 ± 6,8
gallokatechin (GC)	30,33 ± 0,57
kyselina protokatechová	6,67 ± 0,29
kvercetin (Q)	0,667 ± 0,08

1.8.3 Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody ABTS

Metoda ABTS je jedna ze základních a nejčastěji používaných metod pro stanovení celkové antioxidační aktivity. Touto metodou se testuje schopnost vzorku nebo látky zhášet volné radikály ABTS^{•+} (2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)). Reakce antioxidantu s tímto radikál kationtem se sleduje spektrofotometricky při vlnové délce 734 nm odpovídající absorpčnímu maximu generovaného radikál kationtu, který se z ABTS generuje pomocí peroxidisíranu draselného nebo systémem H₂O₂/peroxidasa. Stanovení celkové antioxidační aktivity lze také provést komerčně vyráběným zařízením. Používají se také mikrotitrace na mikrotitračních destičkách [53]. Úbytek absorbance původně zeleného roztoku je poté přepočítán pomocí standardu Troloxu na jeho ekvivalentní množství (TEAC), které se udává jako mikromol Troloxu na 1 g nebo 1 ml vzorku [53]. Metoda ABTS se dá také on-line spojit s HPLC pro zjištění antioxidační aktivity jednotlivých eluovaných látek [53].

Ve studii Martínez a kol. [54] se antioxidační aktivita testovaných methanol-acetonových extraktů z kakaových lusků pohybovala od 23-38 µM ekvivalentu Troloxu/g; zatímco v ethanolových extraktech byla antioxidační kapacita nižší s hodnotami okolo 23-24 µM ekvivalentu Troloxu/g. Lecumberri a kol. [55] analyzovali antioxidační kapacitu ethanolového extraktu kakaového produktu bohatého na vlákninu pomocí metody ABTS a zjistili hodnoty 7,73 µM ekvivalentu Troloxu/g vzorku.

1.8.4 Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody DPPH

DPPH·(2,2-difenyyl-1-pikrylhydrazyl) je stabilní volný radikál, který je způsoben delokalizací volného elektronu na celé molekule. Radikál je rozpustný v různých organických rozpouštědlech, ale ne ve vodě. Obvykle se rozpouští v methanolu, ethanolu nebo jejich vodných směsích [56]. Výhodou tohoto testu je, že DPPH vytváří stabilní radikál přímo v roztoku a není nutné ho generovat. Principem je měření úbytku absorbance původně fialového roztoku, který se odbarvuje vlivem reakce s antioxidy. Tento úbytek se měří spektrofotometricky při vlnové délce 515-520 nm a přepočítává se opět na ekvivalentní množství standardu Troloxu [45,57–59].

1.8.5 Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody FRAP

FRAP je metoda pro stanovení antioxidační aktivity založená na redukci železitých komplexů. Při této metodě antioxidy ve vzorku redukují komplex Fe^{3+} -2,4,6-tris(2-pyridyl-1,3,5-riazin) (Fe^{3+} -TPTZ) na železnatý komplex. Zvýšení absorbance odpovídající vzniku komplexu Fe^{2+} -TPTZ se měří spektrofotometricky při vlnové délce 593 nm. Tato metoda má svá omezení, protože měření se provádějí při nefyziologicky nízkém pH (3,6), nejsou zachycovány komplexy pomalu reagujících polyfenolických látek a thiolů a navíc vznikající železnaté ionty jsou Fentonovou reakcí in vivo jedním z reaktantů. Proto metoda FRAP odráží pouze schopnost látky redukovat ionty železa a nemusí pozitivně korelovat s celkovou antioxidační aktivitou vzorku [53].

1.8.6 Stanovení celkového obsahu fenolických látek (TPC)

Stanovení celkových fenolických látek je založeno na reakci fenolických látek s činidlem Folin-iocalteu. Modrá barva výsledného polymerního komplexu je výsledkem redukce Folin-iocalteuova činidla (snížením oxidačního čísla molybdenu). Intenzita barvy se měří spektrofotometricky při 750 nm. Kvantifikace je založena na porovnání vzorku se standardem kyseliny gallové, proto jsou výsledky uvedeny jako ekvivalentní množství kyseliny gallové (GAE) [60-61].

Celkový obsah fenolických látek může být ovlivněn přidáním kakaových slupek do čokolády [47]. Kakaové slupky jsou považovány za cennou surovinu při výrobě potravin jako zdroj polyfenolických látek [62], vlákniny [63] nebo jako antimikrobiální látka [64]. Vzhledem k tomu, že je součástí kakaových bobů, které jsou jednou z hlavních složek čokolády, má smysl ji při výrobě čokolády používat. Přídavek kakaových slupek zvýší TPC, přičemž tento účinek je výraznější s nárůstem obsahu kakaových slupek z 5 % na 15 % v hořké čokoládě [47]. Celkový obsah fenolických látek v mléčných čokoládách se pohybuje v rozmezí 0,7 -1,5 mg

GAE/g odtučněného vzorku, zatímco u hořkých čokolád 2,4-3,6 mg GAE/g odtučněného vzorku [47]. Více než dvojnásobné množství však uvádí Belščak-Cvitanović a kol. [51], kdy u mléčné čokolády byly hodnoty GAE v rozmezí 3,5-5,5 mg/g odtučněného vzorku a u hořké čokolády 7,5-12 mg/g odtučněného vzorku. TPC ve všech analyzovaných vzorcích byla však větší než uvádějí Roda a Lambri [65] pro hořkou (2,12 mg GAE/g odtučněného vzorku) a mléčnou (0,64 mg GAE/g odtučněného vzorku) čokoládu. Nejvyšších hodnot TPC pro hořké čokolády bylo pozorováno v práci Godočikova a kol. [66], kde hodnoty GAE byly v rozmezí 4,83-23,58 g GAE/kg odtučněného vzorku.

1.8.7 Spektrofotometrické stanovení a jejich hodnoty

Při porovnání několika spektrofotometrických metod bylo zjištěno, že TPC i antioxidační kapacita měřená metodami DPPH a FRAP se pro různé druhy surových slupek kakaových bobů a kakaové boby významně liší [67]. V rámci této studie [67] byl hodnocen i vliv původu a pražení vzorků. Zatímco TPC i FRAP bylo hodnoceno jako ekvivalent kyseliny gallové, GAE, u DPPH metody byla jako standard použita kyselina askorbová [67]. Rozdílné hodnoty u vzorků různého původu mohou být způsobeny zeměpisnou polohou, stupněm zralosti (obdobím sklizně), odrůdou kakaových bobů a stavem po sklizni. Surové kakaové boby zjevně obsahují vyšší množství antioxidantů ve srovnání se surovou slupkou kakaových bobů. TPC se pohybuje v rozmezí od 810 do 2260 mg GAE/100 g vzorku kakaových bobů. DPPH se pohybuje v rozmezí od 504 do 5995 mg AA/100 g vzorku. FRAP se pohybuje v rozmezí od 313-1366 mg GAE/100 g vzorku. [67].

Jiný výzkum [68] se zabýval hodnocením antioxidační kapacity kakaových bobů pražených při teplotě 184 °C po dobu 16 minut v přehřáté parní peci za použití dvou oddělených režimů ohřevu: konvekčního režimu a režimu přehřáté páry. Pro měření antioxidačních vlastností kakaa byla použita metoda FRAP a DPPH a dále byl stanoven celkový obsah fenolických látek. V tabulce 2 jsou uvedeny změny antioxidačních vlastností kakaových bobů v závislosti na způsobu pražení jako střední hodnoty \pm směrodatná odchylka ze tří opakování [68].

Tabulka 2-Změny antioxidačních vlastností kakaových bobů v důsledku způsobů pražení [68]

Stanovení	Surový kakaový bob	Pražení přehřátou parou	Konvekční pražení
TPC (mg/100 g)	47,95 ± 7	42,86 ± 21	31,42 ± 43
DPPH (% inhibice)	68,65 ± 3	58,37 ± 11	29,65 ± 17
FRAP (μM/g)	32,52 ± 6	25,83 ± 13	15,76 ± 15

Jak je z výsledků patrné [68], celkový obsah fenolických látek se snížil jak při pražení přehřátou parou, tak při konvekčním pražení, přičemž míra degradace byla vyšší při konvekčním pražení než při přehřátém pražení v páře [68]. Při určování texturních a kvalitativních parametrů kakaových bobů jsou klíčové mikrostrukturní vlastnosti. Při mikrostrukturní analýze bylo zjištěno, že kakaové boby pražené přehřátou parou měly hladší a jasnější krystaly než konvenčně pražený vzorek [69].

Martinez a kol. [54] analyzovali antioxidační vlastnosti pomocí tří různých metodik u kakaových bobů pěstovaných ve dvou různých lokalitách v Ekvádoru. Hodnoty uvedené v této studii se pohybovaly v rozmezí 4,45 až 4,56 μM ekvivalentu Troloxu/g pro ABTS test, 3,81 až 4,05 μM ekvivalentu Troloxu/g pro DPPH test a 1,51 až 1,78 μM ekvivalentu Troloxu/g pro FRAP test.

Antioxidační aktivita testovaných vzorků čokolády s různým obsahem kakaové sušiny hodnocené metodami DPPH, ABTS a FRAP [70] je uvedena v tabulce 3. Jak je z tabulky patrné antioxidační aktivita roste s obsahem kakaové sušiny pouze při použití DPPH metody. U ABTS a FRAP metody nebyl pozorován stejný trend a antioxidační aktivita měřená ABTS a FRAP testem byla největší u vzorku s 90% obsahem kakaové sušiny a nejmenší ve směsi čokolády se 100% obsahem kakaové sušiny. Hodnoty jsou vyjádřeny jako g ekvivalentů Troloxu/kg ve směsi čokolády.

Tabulka 3-antioxidační aktivita vzorků čokolády [70]

vzorek	DPPH [g/kg]	ABTS [g/kg]	FRAP [g/kg]
80% čokoláda	6.09 ± 0.01	47.19 ± 5.61	31.20 ± 0.77
90% čokoláda	6.11 ± 0.01	64.43 ± 2.43	37.96 ± 1.25
100% čokoláda	6.19 ± 0.00	36.98 ± 0.41	19.24 ± 0.84

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Přístroje a zařízení

V rámci práce bylo pro měření antioxidační kapacity a stanovení celkového množství fenolů použito následující zařízení:

- UV/VIS spektrofotometr Shimadzu UV-2450 (Kyoto, Japonsko),
- předvážky Kern 440-35A (Kern, Německo),
- analytické váhy Sartorius (Ústí nad Labem),
- centrifuga Sorvall ST Plus Centrifuge Series (Thermo Fischer Scientific, USA)
- mikropipety Biohit-Proline s nastavitelným objemem 10–100 μl , 100–1000 μl , 1–5 ml (Biohit, Finsko),
- skleněná kyveta, 1 cm,
- skládané filtrační papíry,
- vialky,
- odměrné a běžné laboratorní sklo.

2.2 Použité chemikálie

- ABTS diamonná sůl (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina) (Sigma Aldrich, USA),
- 2M Folin-Ciocalteuovo činidlo (Sigma Aldrich, USA),
- DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl) hydrazyl) (Sigma Aldrich, USA),
- *n*-hexan (Sigma Aldrich, USA),
- methanol (Sigma Aldrich, USA),
- peroxidisíran draselný (Penta, ČR),
- uhličitan sodný (Penta, ČR),
- destilovaná voda, Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina) (Sigma Aldrich, USA),
- kyselina gallová (Sigma Aldrich, USA).

2.3 Vzorky

Pro experimentální část bakalářské práce bylo použito 8 vzorků čokolády, které jsou uvedeny v tabulce 4, kde vzorek 1, 3, 4, 5 a 8 je hořká čokoláda, vzorek 2 bílá čokoláda a vzorek 6 a 7 mléčná čokoláda.

Tabulka 4-Vzorky čokolády

Číslo vzorku	Název vzorku čokolády a země původu	Navážka vzorku (g)	Obsah kakaové sušiny nejméně (%)
1.	Chocolate Amatler (Španělsko)	2,85	70
2.	Choco Bonte (Česká republika)	2,17	-
3.	J. D. Gross (Německo)	2,66	56
4.	Sellot (Státy evropské unie)	2,70	68
5.	Orion (Česká republika)	2,74	38
6.	Merci (Německo)	2,77	32
7.	Milka (Státy evropské unie)	2,69	30
8.	Lindt (Švýcarsko)	2,34	65

2.4 Pracovní postupy

2.4.1 Příprava vzorků

Přibližně 2-3 g čokoládových vzorků bylo rozehráno ve vialkách, po rozehrání bylo přidáno 10 ml *n*-hexanu, kterým se extrahovalo 5 minut. Po extrakci byly vzorky centrifugovány po dobu 5 minut při 8000 otáček/minutu, aby došlo k rozdělení vrstev. Vrstva *n*-hexanu obsahující tuk byla oddělena, poté byl znovu přidán *n*-hexan a proces byl opakován ještě 2krát. Po posledním oddělení vrstev se zbytek *n*-hexanu nechal vysušit. Do vialek byl přidán 70% methanol, obsah byl promíchán a třepán na třepačce po dobu 15 minut. Poté byl vzorek odstředěn v centrifuze a přefiltrován přes skládaný filtr.

2.4.2 Spektrofotometrické metody

Postupy na stanovení antioxidační aktivity a celkového množství fenolických látek byly převzaty z diplomové práce Terezy Šalomounové [71].

2.4.2.1 Metoda ABTS

Radikálový kation byl připraven reakcí 10 mg ABTS rozpuštěného v 5 ml destilované vody ($c = 3,6 \text{ mmol/l}$) se 100 μl $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ($c = 0,064 \text{ mol/l}$). Roztok byl ponechán za nepřístupu světla v chladničce po dobu 12 hodin. Ze zásobního roztoku bylo pipetováno 2,5 ml do 100 ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku. Ke 3 ml této reakční směsi bylo přidáno 50 μl vzorku a důkladně promícháno. Roztok byl ponechán v klidu na stinném místě po dobu 60 minut, a poté byl měřen úbytek absorbance A při vlnové délce $\lambda = 734 \text{ nm}$. Úbytek absorbance byl vyjádřen v % a pomocí kalibrační křivky přepočten na ekvivalentní množství standardu Troloxu.

2.4.2.2 Metoda DPPH

DPPH činidlo bylo připraveno navážením 0,004 g DPPH do 25ml odměrné baňky, která byla následně doplněna methanolem, absorbance byla upravena methanolem na $A=0,8$. Ke 3 ml pracovního roztoku bylo přidáno 50 μl vzorku a směs byla důkladně promíchána. Pro zjištění celkové antioxidační kapacity byl měřen úbytek po 30 minutách, kdy byl roztok ponechán na stinném místě. Úbytek absorbance byl měřen při vlnové délce $\lambda = 515 \text{ nm}$. Tento úbytek byl pomocí kalibrační křivky přepočítán na ekvivalentní množství Troloxu.

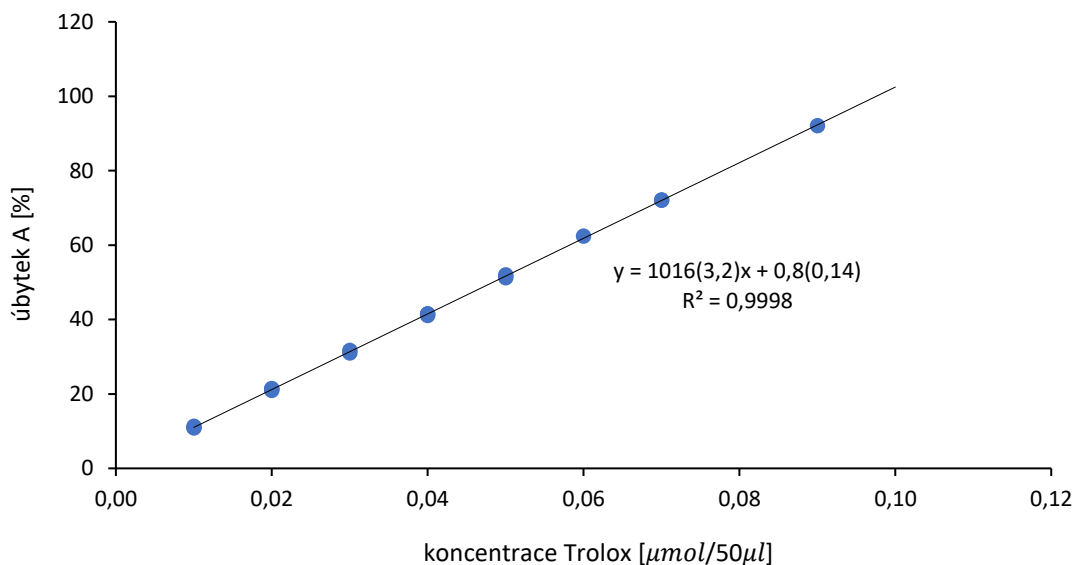
2.4.2.3 Metoda TPC-Stanovení celkového množství fenolických látek

Pracovní roztok pro stanovení celkového množství fenolických látek byl připraven naředěním 2 M Folin-Ciocalteuova činidla destilovanou vodou v poměru 1:20. Ke 2 ml tohoto činidla bylo přidáno 50 μl vzorku. Směs byla promíchána a po 5 minutách byl přidán 1 ml 7,5% Na_2CO_3 . Nárůst absorbance byl po 30 minutách změřen při 750 nm a přepočítán na ekvivalentní množství kyseliny gallové pomocí kalibrační křivky.

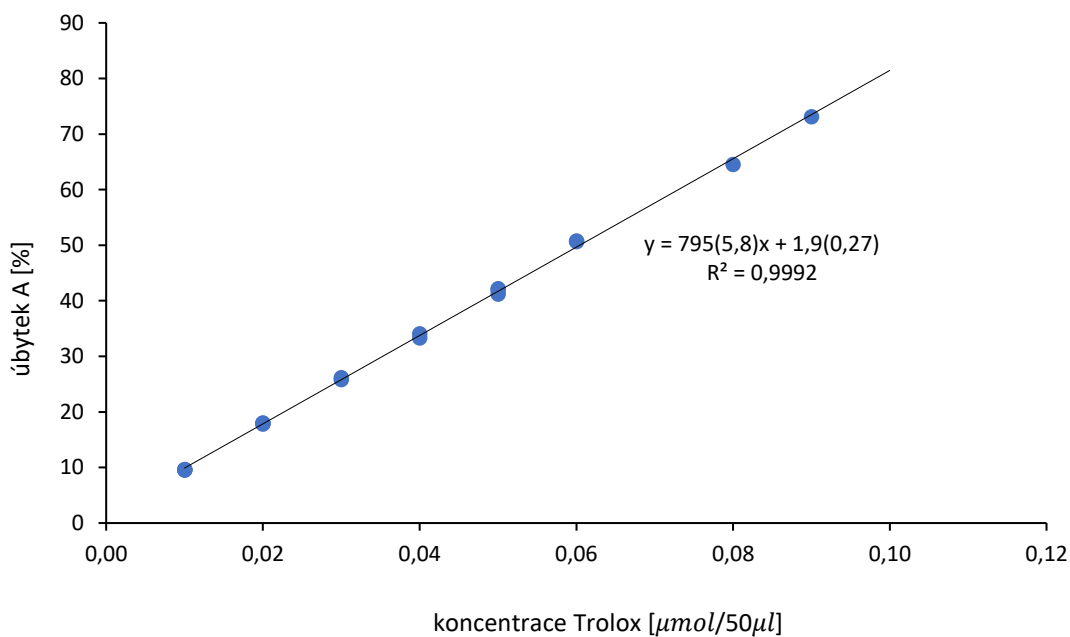
3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS a DPPH

Pro metodu ABTS a DPPH byly v první řadě proměřeny kalibrační roztoky standardu Troloxu a sestrojena kalibrační závislost úbytku absorbance A na ekvivalentním množství Troloxu (obrázek 5 a obrázek 6).



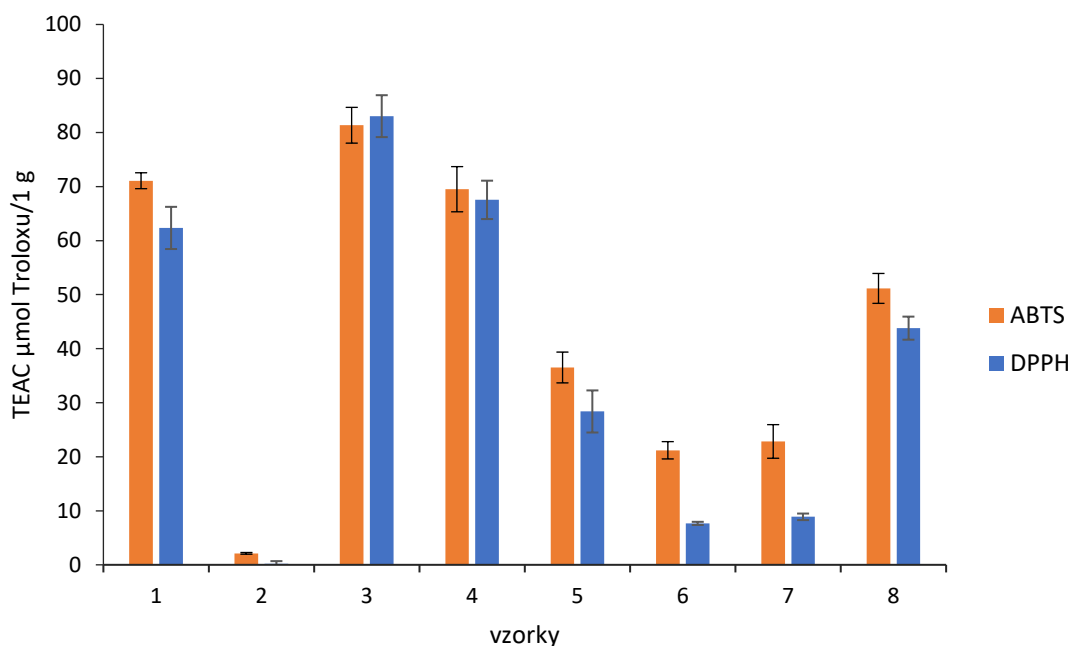
Obrázek 5- Kalibrační závislost úbytku absorbance na koncentraci standardu Troloxu u metody ABTS



Obrázek 6- Kalibrační závislost úbytku absorbance na koncentraci standardu Troloxu u metody DPPH

Regresní diagnostika byla provedena v programu QC Expert (TriloByte, ČR), kde byly s pomocí grafických diagnostických testů odstraněny vlivné body. Významnost regresních parametrů byla testována pomocí Studentova t-testu. Parametry lineární regrese – úsek a směrnice, jsou spolu s jejich směrodatnými odchylkami a koeficientem uvedeny na obrázku 5 a obrázku 6.

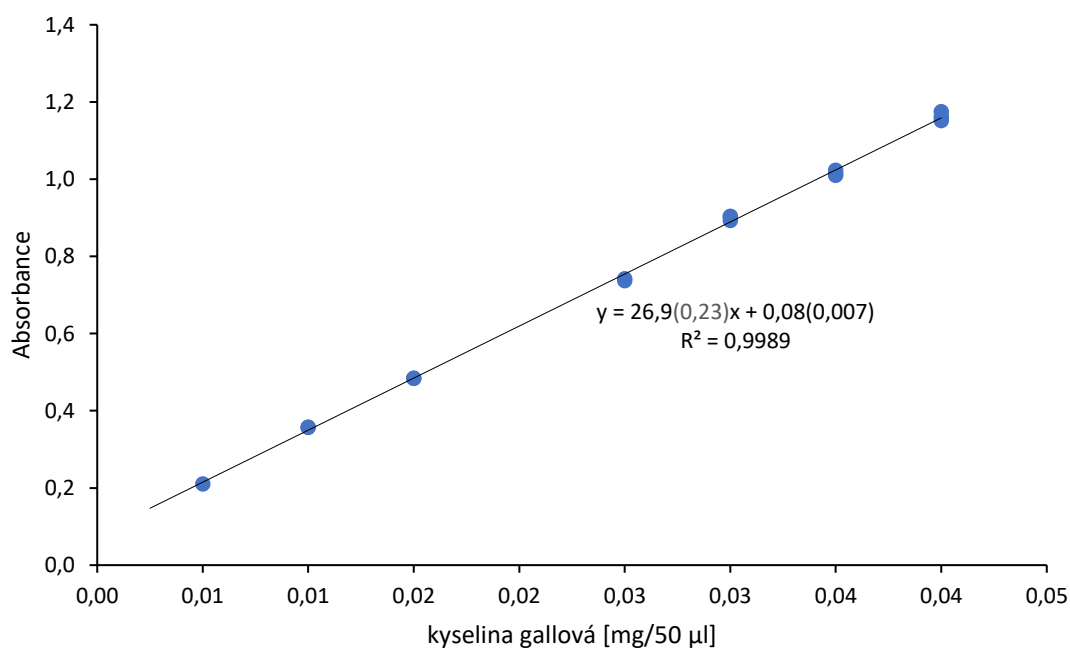
Úbytek absorbance studovaných čokolád byl pomocí rovnice regrese kalibrační křivky závislosti úbytku absorbance A na koncentraci Troloxu přepočten na jeho ekvivalentní množství, tzn. TEAC. U každého vzorku byly provedeny celkem 4 měření a byla vypočtena průměrná hodnota TEAC, která byla vztažena na 1 g čokolády. Výsledné průměrné hodnoty jsou uvedené v příloze v tabulce P1 a graficky znázorněny na obrázku 7. Z průměrných hodnot je patrné, že nejvyšší antioxidační aktivitu má hořká čokoláda značky J. D. Gross, jak u stanovení metodou ABTS, tak metodou DPPH. Naopak nejmenší antioxidační aktivitu má bílá čokoláda značky Choco Bonte. Rozdílnou míru antioxidační aktivity lze vysvětlit odlišným obsahem kakaové sušiny v čokoládách, můžeme tedy říci, že čokolády s vyšším obsahem kakaové sušiny mají vyšší antioxidační vlastnosti, jak je vidět na obrázku 7. Jak je z obrázku patrné, vyšších hodnot antioxidační kapacity bylo většinou dosaženo metodou ABTS, to může být vysvětleno jiným mechanismem reakce antioxidantu s různými radikály (ABTS reaguje s jinými látkami než DPPH).



Obrázek 7- Antioxidační kapacita extraktů ze vzorků čokolády měřená metodami ABTS a DPPH; vzorek č.1 -Chocolate Amatler (70 % kakaové sušiny), vzorek č.2 – Choco Bonte (0 % kakaové sušiny), vzorek č.3 – J.D. Gross (56 % kakaové sušiny), vzorek č.4 – Sellot (68 % kakaové sušiny), vzorek č.5 – Orion (38 % kakaové sušiny), vzorek č.6 – Merci (32 % kakaové sušiny), vzorek č.7 – Milka (30 % kakaové sušiny), vzorek č.8 – Lindt (65 % kakaové sušiny)

3.2 Stanovení celkového obsahu fenolických látek

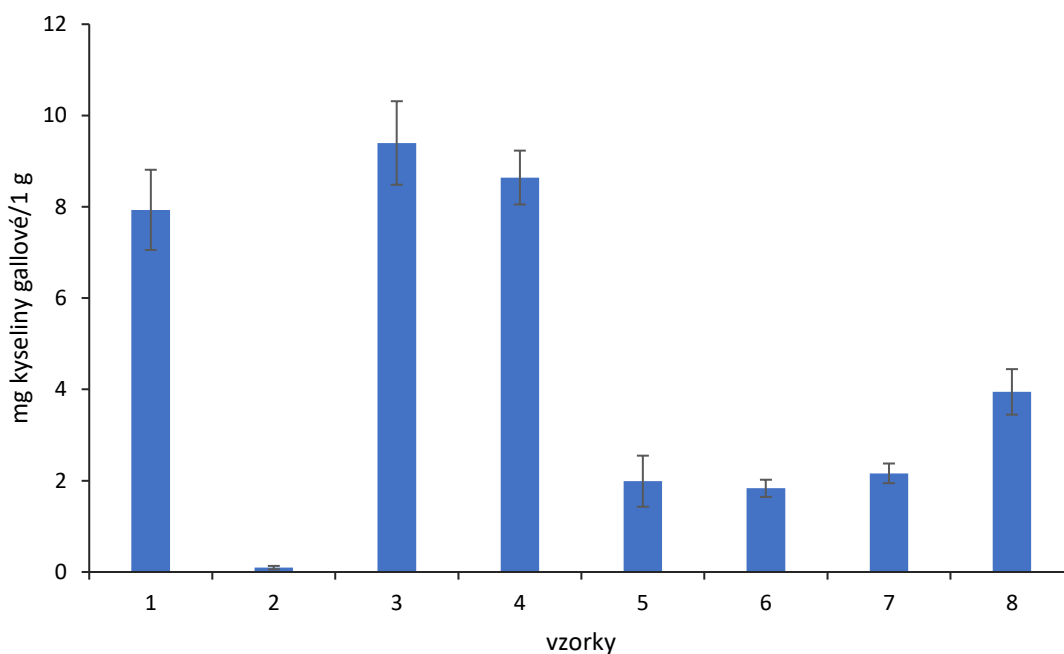
Pro metodu TPC byly v první řadě proměřeny kalibrační roztoky standardu kyseliny gallové a byla sestrojena kalibrační závislost absorbance A na ekvivalentním množství kyseliny gallové (obrázek 8).



Obrázek 8- Kalibrační závislost změny absorbance na koncentraci kyseliny gallové (metoda TPC)

Opět byla provedena regresní diagnostika v programu QC Expert (TriloByte, ČR), kde byly s pomocí grafických diagnostických testů odstraněny vlivné body. Parametry lineární regrese – úsek a směrnice, jsou spolu s jejich směrodatnými odchylkami a koeficientem uvedeny na obrázku 8.

Zvýšení absorbance u extraktů připravených ze studovaných čokolád byla pomocí rovnice regrese kalibrační křivky závislosti absorbance na množství kyseliny gallové přepočtena na její ekvivalentní množství, GAE. U každého vzorku byly provedeny celkem 4 měření a byla vypočtena průměrná hodnota GAE, která byla vztažena na 1 g vzorku. Výsledné průměrné hodnoty jsou uvedeny v příloze v tabulce P2 a znázorněny na obrázku 9. Z průměrných hodnot v tomto grafickém znázornění je též zřejmé, že nejvyšší obsah fenolických látek má hořká čokoláda značky J. D. Gross. Naopak nejmenší obsah fenolických látek má bílá čokoláda značky Choco Bonte. Rozdílný rozsah obsahu fenolických látek lze také vysvětlit odlišným obsahem kakaové sušiny v čokoládách. Dále může mít na obsah fenolických látek vliv i technologické zpracování čokolád.



Obrázek 9- Stanovení celkového obsahu fenolických látek v extraktech ze vzorků čokolády metodou TPC; vzorek č.1 -Chocolate Amatler (70 % kakaové sušiny), vzorek č.2 – Choco Bonte (0 % kakaové sušiny), vzorek č.3 – J.D. Gross (56 % kakaové sušiny), vzorek č.4 – Sellot (68 % kakaové sušiny), vzorek č.5 – Orion (38 % kakaové sušiny), vzorek č.6 – Merci (32 % kakaové sušiny), vzorek č.7 – Milka (30 % kakaové sušiny), vzorek č.8 – Lindt (65 % kakaové sušiny)

4 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývá využitím analytických technik v analýze významných biologicky aktivních látek v čokoládě. V teoretické části je popsána výroba čokolády a její složení a také je zde popsán proces alkalizace, což je volitelný krok při výrobě kaka, jejímž cílem je zvýšení rozpustnosti přírodního kaka, úprava jeho chuti (snížení kyselosti) a úprava barvy (ztmavnutí). Alkalizace ovlivňuje mimo jiné i složení kaka a čokolády, tzn. obsah flavan-3-olů, methylxanthinů, těkavých chuťových sloučenin a volných aminokyselin. V neposlední řadě je zde popsána extrakce biologicky aktivních látek z kaka a čokolády a jejich stanovení pomocí kapalinové chromatografie či spektrofotometrických technik jako jsou DPPH, ABTS, FRAP a TPC.

Experimentální část bakalářské práce je zaměřena na stanovení antioxidační aktivity extraktů z čokolád spektrofotometrickými metodami ABTS a DPPH, a na spektrofotometrickém stanovení celkového množství fenolických látek pomocí Folin-Ciocalteua činidla.

Vyšší hodnoty antioxidační aktivity byly pozorovány u metody ABTS, protože tento radikál reaguje s širokým okruhem látek vykazujících antioxidační aktivitu. Dále bylo zjištěno, že antioxidační aktivita závisí na obsahu kakaové sušiny, a tedy čokolády s vyšším obsahem kakaové sušiny vykazují vyšší antioxidační vlastnosti a vyšší obsah fenolických látek. Dále má na rozdílnou míru antioxidační aktivity vliv i technologické zpracování čokolád.

5 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Theobroma cacao, the food of the gods, Barry Callebaut [online]. Švýcarsko, 2023. Dostupné z: <https://www.barry-callebaut.com/en/group/media/press-kit/theobroma-cacao-food-gods>
- [2] Illustration of a Theobroma cacao, Cocoa bean [online]. iStock. 2018. Dostupné z: <https://www.istockphoto.com/cs/vektor/theobroma-cacao-kakaov%C3%A9-boby-gm1080690180-289710583>
- [3] BORJA FAJARDO, J.G., HORTA TELLEZ, H.B., PEÑALOZA AUTESTA, G.C., SANDOVAL ALDANA, A.P., MENDEZ ARTEAGA, J.J., Antioxidant activity, total polyphenol content and methylxantine ratio in four materials of Theobroma cacao L. from Tolima, Colombia. Heliyon. 2022, 8(5). ISSN 24058440. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844022006909>
- [4] DAHUNSI, S.O., OSUEKE, C.O., OLAYANJU, T.M.A., LAWAL, A.I. Co-digestion of Theobroma cacao (Cocoa) pod husk and poultry manure for energy generation: Effects of pretreatment methods. Bioresource Technology. 2019, 283, 229–241. ISSN 0960854. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960854219304523>
- [5] BECKETT S.T., The science of chocolate. 2nd ed. Cambridge, UK: RSC Publishing, 2008. 240. ISBN 978-0-85404-970-7.
- [6] Chocolate History - Origin of Chocolate and Cacao [Online]. History of Chocolate. 2023. Dostupné z: <http://www.historyofchocolate.net/chocolate-history/>
- [7] Nutrients in Chocolate, Lisa Getas, DC [online]. Nevada, 2023. Dostupné z: <https://www.doctorlisadc.com/nutrients-in-chocolate/>
- [8] ČOPIKOVÁ J., SINICA A., KOZA V., BLEHA R., Technologie čokolády a cukrovinek. Praha, 2020. 130. ISBN 978-80-7592-077-5
- [9] Chocolate: the sweet taste of ... chemistry?. Austrtralian Academy of Science [online]. Austrálie, 2023. Dostupné z: <https://www.science.org.au/curious/everything-else/chocolate>.
- [10] Complete Guide to The Ingredients In Chocolate. Dame Cacao [online]. 2023. Dostupné z: <https://damecacao.com/ingredients-in-chocolate/>
- [11] SHANTZ, B. a ROHM, H., Influence of lecithin–PGPR blends on the rheological properties of chocolate. LWT - Food Science and Technology. 2005, 38(1), 41–45. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2004.03.014
- [12] WAHYUNI, N. L., SUNARHARUM, W. B., MUHAMMAD, D. R. A. a SAPUTRO, A. D., Formation and development of flavour of cocoa (Theobroma cacao L.) cultivar Criollo and Forastero: a review. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2021, 733(1). ISSN 1755-1307. Dostupné z: doi:10.1088/1755-1315/733/1/012078
- [13] SHAFI, F., RESHI, M. a BASHIR, I., CHOCOLATE PROCESSING. INTERNATIONAL JOURNAL OF ADVANCED BIOLOGICAL RESEARCH. 2018, 8(3). ISSN 2250 –3579
- [14] Chocolate quality and conching . Bean To Bar World [online]. Kanada, 2023. Dostupné z: <https://beantobarworld.com/chocolate-research/chocolate-quality-and-conching>
- [15] Why is Chocolate Tempered? Science of cooking [online]. Dostupné z: <https://www.scienceofcooking.com/chocolate/why-is-chocolate-tempered.htm>
- [16] Cocoa Processing & Chocolate Manufacturing. PMG Engineering [online]. 2020. Dostupné z: <https://www.pmg.engineering/handling-cocoa-and-its-derived-product/>
- [17] GLICERINA, V., BALESTRA, F., DALLA ROSSA, M. a ROMANI, S., Microstructural and rheological characteristics of dark, milk and white chocolate: A comparative study. Journal of Food Engineering. 2016, 169, 165–171. ISSN 02608774. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfoodeng.2015.08.011

- [18] LI, Y., FENG, Y., ZHU, S., LUO, C., MA, J. a ZHONG, F., The effect of alkalization on the bioactive and flavor related components in commercial cocoa powder. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2012, 25(1), 17-23. ISSN 08891575. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfca.2011.04.010
- [19] VALVERDE GARCÍA, D., PERÉZ ESTEVE, É. a BARAT BAVIERA, J.M., Changes in cocoa properties induced by the alkalization process: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2020, 19(4), 2200-2221. ISSN 1541-4337. Dostupné z: doi:10.1111/1541-4337.12581
- [20] WIAN, M. J., LYNCH, W. R. a LEFRENIERE, R. C., Method for producing deep red and black cocoa [online]. US5009917A, 1989. Dostupné z: <https://patents.google.com/patent/US5009917A/en>
- [21] SANTOS, D. I., SARAIVA, J. M. A., VICENTE, A. A. a MOLDAO-MARTINS, M., 2 - Methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds and nutrients. *Innovative Thermal and Non-Thermal Processing, Bioaccessibility and Bioavailability of Nutrients and Bioactive Compounds*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. 2019, 23–54 s. Dostupné z doi:10.1016/B978-0-12-814174-8.00002-0
- [22] CORTEZ, D., QUISPE-SANCHEZ, L., MESTANZA, M., OLIVA-CRUZ, M., YOPLAC, I., TORRES, C. a CHAVEZ, S. G., Changes in bioactive compounds during fermentation of cocoa (*Theobroma cacao*) harvested in Amazonas-Peru. *Current Research in Food Science*. 2023, 6. ISSN 26659271. Dostupné z: doi:10.1016/j.crf.2023.100494
- [23] BELŠČAK, A., KOMES, D., HORŽIĆ, D., GANIĆ, K. K. a KARLOVIĆ, D.. Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Research International*. 2009, 42(5-6), 707-716. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2009.02.018
- [24] PETTIPHER, G. M. L., An improved method for the extraction and quantitation of anthocyanins in cocoa beans and its use as an index of the degree of fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1986, 37(3), 289-296. ISSN 00225142. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.2740370314
- [25] SERRA BONVEHI, J. a VENTURA COLL, F., Evaluation of bitterness and astringency of polyphenolic compounds in cocoa powder. *Food Chemistry*. 1997, 60(3), 365-370. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/S0308-8146(96)00353-6
- [26] THORNGATE, J. H. a NOBLE, A. C., Sensory evaluation of bitterness and astringency of 3R(-)-epicatechin and 3S(-)-catechin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1995, 67(4), 531-535. ISSN 00225142. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.2740670416
- [27] BRUNETTO, M. R., GUTIÉRREZ, L., DELGADO, Y., GALLIGNANI, M., ZAMBRANO, A., GÓMEZ, Á., RAMOS, G. a ROMERO, C., Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. *Food Chemistry*. 2007, 100(2), 459-467. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2005.10.007
- [28] PURA NAIK, J., Improved High-Performance Liquid Chromatography Method to Determine Theobromine and Caffeine in Cocoa and Cocoa Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001, 49(8), 3579-3583. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf000728z
- [29] ANDRES-LACUEVA, C., MONAGAS M., KHAN N., IZQUIERDO-PULIDO M., URPI-SARDA M., PERMANYER, J. a LAMUELA-RAVENTÓS, R. M., Flavanol and flavonol contents of cocoa powder products: influence of the manufacturing process, Flavanol and Flavonol Contents of Cocoa Powder Products: Influence of the

- Manufacturing Process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, 56(9), 3111-3117. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf0728754
- [30] ELWERS, S., ZAMBRANO, A., ROHSIUS, C. a LIEBEREI, R., Differences between the content of phenolic compounds in Criollo, Forastero and Trinitario cocoa seed (*Theobroma cacao* L.). *European Food Research and Technology*. 2009, 229(6), 937-948. ISSN 1438-2377. Dostupné z: doi:10.1007/s00217-009-1132-y
- [31] SUBAGIO, A., SARI, P. a MORITA, N., Simultaneous determination of (+)-catechin and (-)-epicatechin in cacao and its products by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Phytochemical Analysis*. 2001, 12(4), 271-276. ISSN 0958-0344. Dostupné z: doi:10.1002/pca.583/Simultaneous_determination_of_catechin_and_epicatechin_in_cacao_and_its_products_by_high_performance_liquid_chromatography_with_electrochemical_detection (accessed June 23, 2023).
- [32] KIM, H. a KEENEY, P. G., (-)-Epicatechin Content in Fermented and Unfermented Cocoa Beans. *Journal of Food Science*. 1984, 49(4), 1090-1092. ISSN 0022-1147. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2621.1984.tb10400.x
- [33] APROTOSOAIE, A. C., LUCA S. V. a MIRON, A., Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products-An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2016, 15(1), 73-91. ISSN 15414337. Dostupné z: doi:10.1111/1541-4337.12180
- [34] ZIEGLEDER, G., Flavour Development in Cocoa and Chocolate. *Industrial Chocolate Manufacture and Use*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2008, 169-191. ISBN 9781444301588. Dostupné z: doi:10.1002/9781444301588.ch8
- [35] SIORIKI, E., TUENTER, E., DE WALLE, D. V., LEMARCQ, V., CAZIN, C. S. J., NOLAN, S. P., PIETERS L. a DEWETTINCK, K., The effect of cocoa alkalization on the non-volatile and volatile mood-enhancing compounds. *Food Chemistry*. 2022, 381. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2022.132082
- [36] ZIEGLEDER, G. a BIEHL, B., Analysis of Cocoa Flavour Components and Flavour Precursors. *Analysis of Nonalcoholic Beverages*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1988, 1988, 321-393. *Modern Methods of Plant Analysis*. ISBN 978-3-642-83345-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-83343-4_14
- [37] VOIGT, J., BIEHL, B., HEINRICHS, H., KAMARUDDIN, S., MARSONER G. G. a HUGL, A., In-vitro formation of cocoa-specific aroma precursors: aroma-related peptides generated from cocoa-seed protein by co-operation of an aspartic endoprotease and a carboxypeptidase. *Food Chemistry*. 1994, 49(2), 173-180. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/0308-8146(94)90155-4
- [38] MISNAWI, JINAP, S., JAMILAH, B. a NAZAMID, S., Effect of polyphenol concentration on pyrazine formation during cocoa liquor roasting. *Food Chemistry*. 2004, 85(1), 73-80. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2003.06.005
- [39] REDGWELL, R.J, TROVATO, V. a CURTI, D., Cocoa bean carbohydrates: roasting-induced changes and polymer interactions. *Food Chemistry*. 2003, 80(4), 511-516. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/S0308-8146(02)00320-5
- [40] SERRA BONVEHÍ, J. a VENTURA COLL, F., Factors Affecting the Formation of Alkylpyrazines during Roasting Treatment in Natural and Alkalinized Cocoa Powder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, 50(13), 3743-3750. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf011597k
- [41] GUYOT, S., MARNET, N., LARABA, D., SANONER P. a DRILLEAU, J. F., Reversed-Phase HPLC following Thiolytic for Quantitative Estimation and Characterization of the Four Main Classes of Phenolic Compounds in Different Tissue Zones of a French Cider Apple Variety (*Malus domestica* Var. Kermerrien). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998, 46(5), 1698-1705. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf970832p

- [42] HAMMERSTONE, J. F., LAZARUS, S. A., MITCHELL, A. E., RUCKER, R. a SCHMITZ, H., Identification of Procyanidins in Cocoa (*Theobroma cacao*) and Chocolate Using High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ACS Publications [online]. American Chemical Society, 1999. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jf980760h>
- [43] CHAN, E. W. C., Bioactivities and chemical constituents of leaves of some *Etlingera* species (Zingiberaceae) in Peninsular Malaysia, Monash University, 2017. <https://doi.org/10.4225/03/5878569E454C8>.
- [44] ADAMSON, G. E., LAZARUS S. A., MITCHELL, A. E., PRIOR, R. L., CAO, G., JACOBS, P. H., KREMERS, B. G., CAO, J. F., RUCKER, R. B., RITTER, K. A. A SCHMITZ, H. H., HPLC Method for the Quantification of Procyanidins in Cocoa and Chocolate Samples and Correlation to Total Antioxidant Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999, 47(10), 4184-4188. ISSN 0021-8561. Dostupné z: [doi:10.1021/jf990317m](https://doi.org/10.1021/jf990317m)
- [45] BARANOWSKA, M., SULIBORSKA, K., TODOROVIC, V., KUSZNIEREWICZ, B., ChRZANOWSKI, W., SOBAJIC, S. a BARTOSZEK, A., Interactions between bioactive components determine antioxidant, cytotoxic and nutrigenomic activity of cocoa powder extract. *Free Radical Biology and Medicine*. 2020, 154, 48-61. ISSN 08915849. Dostupné z: [doi:10.1016/j.freeradbiomed.2020.04.022](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.04.022)
- [46] TODOROVIC, V., REDOVNIKOVIC, I. R., Zoran TODOROVIC, JANKOVIC, G., DODEVSKA, M. a SOBAJIC, S., Polyphenols, methylxanthines, and antioxidant capacity of chocolates produced in Serbia. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2015, 41, 137-143. ISSN 08891575. Dostupné z: [doi:10.1016/j.jfca.2015.01.018](https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.01.018)
- [47] BARIŠIĆ, V., STOKANOVIĆ, M. C., FLANJAK, I., DOKO, K., JOZINOVIĆ, A., BABIĆ, J., ŠUBARIĆ, D., MILIČEVIĆ, B., CINDRIĆ I. a AČKAR Đ., Cocoa Shell as a Step Forward to Functional Chocolates—Bioactive Components in Chocolates with Different Composition. *Molecules*. 2020, 25(22). ISSN 1420-3049. Dostupné z: [doi:10.3390/molecules25225470](https://doi.org/10.3390/molecules25225470)
- [48] BATISTA, N. N., DE ANDRADE, D. P., RAMOS, C. L., DIAS, D. R. a SCHWAN, R. F., Antioxidant capacity of cocoa beans and chocolate assessed by FTIR. *Food Research International*. 2016, 90, 313-319. ISSN 09639969. Dostupné z: [doi:10.1016/j.foodres.2016.10.028](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.028)
- [49] KUSZNIEREWICZ, B., PIEKARSKA, A., MRUGALSKA, B., KONIECZKA, P., NAMIEŚNIK, J. a BARTOSZEK, A., Phenolic Composition and Antioxidant Properties of Polish Blue-Berried Honeysuckle Genotypes by HPLC-DAD-MS, HPLC Postcolumn Derivatization with ABTS or FC, and TLC with DPPH Visualization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012, 60(7), 1755-1763. ISSN 0021-8561. Dostupné z: [doi:10.1021/jf2039839](https://doi.org/10.1021/jf2039839)
- [50] OSAKABE, N., BABA, S., YASUDA, A., IWAMOTO, T., KAMIYAMA M., TOKUNAGA, T., a KONDO, K., Dose-Response Study of Daily Cocoa Intake on the Oxidative Susceptibility of Low-Density Lipoprotein in Healthy Human Volunteers. *Journal of Health Science*. 2004, 50(6), 679-684. ISSN 1344-9702. Dostupné z: [doi:10.1248/jhs.50.679](https://doi.org/10.1248/jhs.50.679)
- [51] BELŠČAK, A., KOMES, D., HORŽIĆ, D., GANIĆ, K. K. a KARLOVIĆ, D., Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Research International*. 2009, 42(5-6), 707-716. ISSN 09639969. Dostupné z: [doi:10.1016/j.foodres.2009.02.018](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.02.018)
- [52] BORDIGA, M., LOCATELLI, M., TRAVAGLIA, F., COÏSSON, J.D., MAZZA G. a ARLORIO, M., Evaluation of the effect of processing on cocoa polyphenols: antiradical

- activity, anthocyanins and procyanidins profiling from raw beans to chocolate. 2015, 50(3), 840-848. ISSN 09505423. Dostupné z: doi:10.1111/ijfs.12760
- [53] Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. Chemické listy. [online] 2004. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/2004_04_03.pdf
- [54] MARTÍNEZ, R., TORRES, P., MENESES, M. A., FIGUEROA, J. G., PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A. a VIUDA-MARTOS, M., Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. Food Research International. 2012, 49(1), 39-45. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2012.08.005
- [55] LECUMBERRI, E., MATEOS, R., IZQUIERDO-PULIDO, M., RUPÉREZ, P., GOYA L. a BRAVO, L., Dietary fibre composition, antioxidant capacity and physico-chemical properties of a fibre-rich product from cocoa (*Theobroma cacao* L.). Food Chemistry. 2007, 104(3), 948-954. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2006.12.054
- [56] STAŠKO, A., BREZOVÁ, V., BISKUPIČ S. a MIŠÍK, V., The potential pitfalls of using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl to characterize antioxidants in mixed water solvents. Free Radical Research. 2009, 41(4), 379-390. ISSN 1071-5762. Dostupné z: doi:10.1080/10715760600930014
- [57] BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER M. E. a BERSET, C., Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT - Food Science and Technology. 1995, 28(1), 25-30. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5
- [58] THAIPONG, K., BOONPRAKOB, U., CROSBY, K., CISNEROS-ZEVALLOS, L. a David HAWKINS BYRNE, D., Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. Journal of Food Composition and Analysis. 2006, 19(6-7), 669-675. ISSN 08891575. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfca.2006.01.003
- [59] PISOSCHI, A. M., CHEREGI, M. C. a DANET, A.F., Total Antioxidant Capacity of Some Commercial Fruit Juices: Electrochemical and Spectrophotometrical Approaches. Molecules. 2009, 14(1), 480-493. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules14010480
- [60] BLAINSKI, A., LOPES, G. a MELLO, J. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. Molecules. 2013, 18(6), 6852-6865. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules18066852
- [61] FZRSB_Fyziologie_stresu.pdf, (n.d.). http://www.rustreg.upol.cz/_materials/fyziologie_rostlin/FZRSB_Fyziologie_stresu.pdf
- [62] DE BARROS, H. E. A., NATARELLI, C. V. L., DE CARVALHO TAVARES, I. M., DE OLIVEIRA, A. L. M., ARAÚJO, A. B. S., PEREIRA, J., CARVALHO, E. E. N., DE BARROS VILAS BOAS, E. V. a Marcelo FRANCO, M., Nutritional Clustering of Cookies Developed with Cocoa Shell, Soy, and Green Banana Flours Using Exploratory Methods. Food and Bioprocess Technology. 2020, 13(9), 1566-1578. ISSN 1935-5130. Dostupné z: doi:10.1007/s11947-020-02495-w
- [63] COLLAR, C., ROSELL, C.M., MUGUERZA B.a MOULAY. L., Breadmaking Performance and Keeping Behavior of Cocoa-soluble Fiber-enriched Wheat Breads. Food Science and Technology International. 2009, 15(1), 79-87. ISSN 1082-0132. Dostupné z: doi:10.1177/1082013208102643 Zkopírovat citaci
- [64] KAYAPUTRI, I. L., DJALI, M., SUKRI N. a FAZARYASTI, R. H., The antimicrobial effectiveness of cacao shell and cacao husk combination on inhibition of pathogenic bacteria in food products. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2020, 443(1). ISSN 1755-1307. Dostupné z: doi:10.1088/1755-1315/443/1/012077

- [65] RODA, A. a LAMBRI, M., Changes in Antioxidants and Sensory Properties of Italian Chocolates and Related Ingredients Under Controlled Conditions During an Eighteen-Month Storage Period. *Nutrients*. 2019, 11(11). ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu11112719
- [66] GODOČIKOVÁ, L., IVANIŠOVÁ, E., ZAGUŁA, G., NOGUERA-ARTIAGA, L., Ángel A. CARBONELL-BARRACHINA, A. A., KOWALCZEWSKI, P. L. a KAČÁNIOVÁ, M., Antioxidant Activities and Volatile Flavor Components of Selected Single-Origin and Blend Chocolates. *Molecules*. 2020, 25(16). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25163648
- [67] SIOW, C. S., CHAN, E. W. C., WONG, C. W. a NG, C. W., Antioxidant and sensory evaluation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) tea formulated with cocoa bean hull of different origins. *Future Foods*. 2022, 5. ISSN 26668335. Dostupné z: doi:10.1016/j.fufo.2021.100108
- [68] ZAMAN, W. a AL-DIN SIFAT, S., Impact of superheated steam roasting on changes in antioxidant and microstructure properties of raw and processed cocoa cotyledon. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2023, 30(2). ISSN 1319562X. Dostupné z: doi:10.1016/j.sjbs.2023.103562
- [69] ZAMAN, W., BHAT, R. a YANG, T. A., Impact of Convectonal and Superheated-Steam Roasting on the Physicochemical and Microstructural Properties of Cocoa Butter Extracted from Cocoa Beans. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2017, 41(4). ISSN 01458892. Dostupné z: doi:10.1111/jfpp.13005
- [70] GODOČIKOVÁ, L., IVANIŠOVÁ, E., ZAGUŁA, G., NOGUERA-ARTIAGA, L., CARBONELL-BARRACHINA, Á. A., KOWALCZEWSKI, P. L. a KAČÁNIOVÁ, M., Antioxidant Activities and Volatile Flavor Components of Selected Single-Origin and Blend Chocolates. *Molecules*. 2020, 25(16). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25163648
- [71] ŠALAMOUNOVÁ, T., Analýza významných biologicky aktivních látek v různých částech lichořeřišnice větší s využitím HPLC/MS/MS. Pardubice, 2019. Diplomová práce. Univerzita Pardubice. Chemicko-technologická fakulta. Katedra analytické chemie.

6 PŘÍLOHY

Tabulka P1 – Průměrné hodnoty TEAC vzorků čokolády, metoda ABTS a DPPH

Číslo vzorku	Název vzorku čokolády	Obsah kakaové sušiny nejméně (%)	TEAC $\mu\text{mol Troloxu}/1 \text{ g}$	
			ABTS	DPPH
1.	Chocolate Amatler	70	71,083	62,346
2.	Choco Bonte	-	2,122	0,191
3.	J. D. Gross	56	81,353	83,033
4.	Selllot	68	69,513	67,540
5.	Orion	38	36,521	28,381
6.	Merci	32	21,194	7,665
7.	Milka	30	22,831	8,883
8.	Lindt	65	51,154	43,798

Tabulka P2 – Průměrné hodnoty kyseliny gallové vzorků čokolády, metoda TPC

Číslo vzorku	Název vzorku čokolády	Obsah kakaové sušiny nejméně (%)	TPC – mg kyseliny gallové/1 g
1.	Chocolate Amatler	70	7,933
2.	Choco Bonte	-	0,096
3.	J. D. Gross	56	9,398
4.	Selllot	68	8,641
5.	Orion	38	1,989
6.	Merci	32	1,833
7.	Milka	30	2,162
8.	Lindt	65	3,946