

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra kvality a bezpečnosti potravin**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Chemické složení tzv. sloní kávy ve srovnání s konvenčně  
zpracovanými kávovými zrny (*Coffea* sp.; Rubiaceae)**

**Diplomová práce**

**Bc. Jan Hájíček**

**Kvalita potravin a zpracování zemědělských produktů**

**doc. Ing. Jan Tauchen, Ph.D.**

**© 2024 ČZU v Praze**

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Chemické složení tzv. sloní kávy ve srovnání s konvenčně zpracovanými kávovými zrnky (*Coffea* sp.; Rubiaceae)" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 19.4.2024

---

## **Poděkování**

Rád bych touto cestou poděkoval vedoucímu mé práce doc. Ing. Janu Tauchenovi, Ph.D., za zpětnou vazbu, odborné a profesionální vedení, věnovaný čas a cenné rady, které mi pomohly k finální podobě této diplomové práce. Dále bych rád vyjádřil vděk Hoca Gokce, která mi byla po celou dobu laboratorních měření nápomocná. Děkuji také doc. Ing. Adéle Fraňkové, Ph.D., za její podporu při chromatografickém měření, a Mgr. Petrovi Maršíkovi, Ph.D., za jeho pomoc se statistickým zpracováním dat. V neposlední řadě patří dík i mé rodině, která mě během celého studia podporovala.

# Chemické složení tzv. sloní kávy ve srovnání s konvenčně zpracovanými kávovými zrny (*Coffea* sp.; Rubiaceae)

## Souhrn

Káva se řadí mezi jednu z nejpobulárnějších světových komodit, kterou denně konzumují miliony lidí. Nejvýznamnější jsou odrůdy Arabiky a Robusta, avšak v posledních letech došlo k nárůstu zájmu o exotičtější varianty, které nabízejí nevšední zážitek. Může se jednat o kávy, u kterých není využíván klasický způsob suchého či mokrého zpracování. Jedná se například o takzvanou „honey“ metodu, či metody zahrnující využití zvířat. Mezi nejznámější z těchto netradičních metod patří využití cibetek, káva známá jako Kopi Luwak. Do dnešního dne však byly na trh uvedeny i další typy káv, včetně ptačí kávy, a i námi zkoumané sloní kávy, která se svou cenou 2500 USD za kilogram označuje za nejdražší kávu světa. Dodnes není známo, jaký má tento způsob zpracování kávových zrn vliv na kvalitativní změny přítomných látek.

Cílem této práce bylo zjistit antioxidační vlastnosti a chemické složení sloní kávy a následně ho porovnat s konvenční a cibetkovou kávou. Celkem byly analyzovány tři vzorky, kdy se jednalo o sloní kávu původem z Thajska, konvenční Arabiku z Thajska a cibetkovou kávu z Indonésie. Tyto vzorky byly následně testovány na obsah látek pomocí GC-SPME-MS a HPLC/UV a na *in vitro* antioxidační aktivity. Tato práce jako první na světě použila a zdokumentovala využití HPLC/UV na zjištění složení sloní kávy a ORAC stanovení pro antioxidační aktivitu. Všechny získaná data byla podrobena analýze hlavních komponent (PCA) a testování ANOVA ( $p < 0,05$ ). Po provedení PCA analýzy byla však metoda ORAC vyloučena, kvůli odchylce dat, která zkreslovala výsledek.

Sloní káva vykazovala nižší hodnoty DPPH (19,67  $\mu\text{g TE/mg}$ ), ORAC (250  $\mu\text{g TE/mg}$ ), ABTS (81,84  $\mu\text{g TE/mg}$ ), TPC (26,35  $\mu\text{g GAE/mg}$ ), TFC (1,38  $\mu\text{g QE/mg}$ ), kofeinu (0,93 %) a dalších chemických sloučeninách, oproti konvenční kávě, což bylo předpokládáno vlivem trávení v těle zvířete. Ve sloní kávě nebyl nalezen 2-ethyl-3-methylpyrazine, 2-ethyl-5-methylpyrazine a 3-ethyl-2-hydroxy-2-cyklopenten-1-on. Tyto látky nejenom, že mohou ovlivňovat aroma dané kávy, ale rovněž by mohly posloužit jako markety při stanovení autentičnosti sloní kávy.

**Klíčová slova:** Slon, sloní káva, chemické složení, antioxidační aktivita, cibetková káva

# Chemical composition of so-called elephant coffee compared to conventionally processed coffee beans (*Coffea* sp.; Rubiaceae)

## Summary

Coffee ranks among the most popular global commodities, consumed by millions of people every day. The most significant varieties are Arabica and Robusta, but in recent years, there has been a surge in interest in more exotic variants that offer unique experiences. These may involve methods of processing other than the classic dry or wet techniques, such as the so-called "honey" method or methods involving animal intervention. Among the most famous of these non-traditional methods is the utilization of civets, known as Kopi Luwak. However, additional types of coffee have been introduced to the market, including bird coffee and the elephant coffee under our investigation, which, with its price of 2500 USD per kilogram, is considered the world's most expensive coffee. To this day, the impact of this processing method on qualitative changes in present compounds remains unknown.

The aim of this study was to determine the antioxidant properties and chemical composition of elephant coffee and subsequently compare it with conventional and civet coffee. A total of three samples were analyzed, consisting of elephant coffee originating from Thailand, conventional Arabica from Thailand, and civet coffee from Indonesia. These samples were then tested for compound content using GC-SPME-MS and HPLC/UV, as well as for *in vitro* antioxidant activities. This study, as the first in the world, utilized and documented the use of HPLC/UV to identify the composition of elephant coffee and ORAC determination for antioxidant activity. All acquired data underwent principal component analysis (PCA) and ANOVA testing ( $p < 0.05$ ). However, following PCA analysis, the ORAC method was excluded due to data deviation, which distorted the results.

Elephant coffee showed lower values in DPPH (19.67  $\mu\text{g TE/mg}$ ), ORAC (250  $\mu\text{g TE/mg}$ ), ABTS (81.84  $\mu\text{g TE/mg}$ ), TPC (26.35  $\mu\text{g GAE/mg}$ ), TFC (1.38  $\mu\text{g QE/mg}$ ), caffeine (0.93 %), and other chemical compounds compared to conventional coffee, as was expected due to the process of digestion within the animal's body. Additionally, certain compounds such as 2-ethyl-3-methylpyrazine, 2-ethyl-5-methylpyrazine, and 3-ethyl-2-hydroxy-2-cyclopenten-1-one were not found in elephant coffee. These compounds not only could influence the aroma of the coffee in question but could also serve as markers in determining the authenticity of elephant coffee.

**Keywords:** Elephant, elephant coffee, chemical composition, antioxidant activity, civet coffee

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Vědecká hypotéza a cíle práce</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše</b>	<b>11</b>
<b>3.1</b>	<b>Káva</b>	<b>11</b>
3.1.1	Kávovník arabský- <i>Coffea arabica</i> L.	11
3.1.2	Kávovník statný- <i>Coffea canephora</i>	11
3.1.3	Kávovník liberijský- <i>Coffea liberica</i>	11
<b>3.2</b>	<b>Hlavní obsahové látky</b>	<b>12</b>
3.2.1	Purinové alkaloidy a další dusíkaté látky	12
3.2.2	Polyfenolické látky	12
3.2.3	Volatilní a vonné látky	13
3.2.4	Sacharidy	14
<b>3.3</b>	<b>Zpracování kávy</b>	<b>15</b>
3.3.1	Suchá metoda (dry method)	15
3.3.2	Mokrý metoda (wet method)	15
3.3.3	Semi-suchá/semi-mokrý (tzv. honey method)	16
3.3.4	Nové metody zpracování kávy	16
3.3.5	Metody zahrnující zvířata	17
<b>3.4</b>	<b>Vliv fermentace na kávová zrna</b>	<b>18</b>
<b>3.5</b>	<b>Cibetkovití</b>	<b>19</b>
3.5.1	Oviječ skvrnitý	19
3.5.2	Cibetka africká	20
<b>3.6</b>	<b>Slon indický</b>	<b>20</b>
3.6.1	Trávicí trakt slona	21
<b>3.7</b>	<b>Změny v cibetkové kávě</b>	<b>23</b>
<b>3.8</b>	<b>Předěšlé studie hodnotící sloní kávu</b>	<b>25</b>
<b>4</b>	<b>Metodika</b>	<b>27</b>
<b>4.1</b>	<b>Vzorky kávy</b>	<b>27</b>
<b>4.2</b>	<b>Příprava vzorků</b>	<b>28</b>
<b>4.3</b>	<b>Chemikálie, činidla a standardy</b>	<b>28</b>
<b>4.4</b>	<b>Antioxidační aktivita <i>in vitro</i></b>	<b>28</b>
4.4.1	Inhibice DPPH radikálů	28
4.4.2	Test ekvivalentní antioxidační kapacity Trolox (TEAC)	28
4.4.3	Test absorbance kyslíkových radikálů (ORAC)	29
4.4.4	Celkový obsah fenolů (TPC)	29
4.4.5	Celkový obsah flavonoidů (TFC)	29

<b>4.5</b>	<b>Chemické složení .....</b>	<b>30</b>
4.5.1	HPLC/UV analýza kofeinu a polyfenolů .....	30
4.5.2	GC-SPME-MS analýza těkavých látek v kávě .....	30
<b>4.6</b>	<b>Statistická analýza .....</b>	<b>31</b>
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>32</b>
5.1	Antioxidační aktivita.....	32
5.2	Chemické složení .....	32
5.3	Statistická analýza .....	34
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>37</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>39</b>
<b>8</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>40</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů .....</b>	<b>49</b>
<b>10</b>	<b>Samostatné přílohy .....</b>	<b>I</b>

# 1 Úvod

Káva se těší celosvětové oblibě, díky svému aroma, chuti, zdravotnímu přínosu a tradici spojenou s její konzumací. Dle posledních dostupných dat International Coffee Organization roční konzumace kávy pro rok 2021/2022 dosahovala 170,3 milionů 60-kilových balení, což představuje nárůst oproti předchozímu roku ze 164,9 milionů 60-kilových balení o 3,3 %. Největší množství kávy se zkonsumuje v Evropě s roční konzumací 54,2 milionů 60-kilových balení, následuje Asie s Oceánií s 40,8 milionů 60-kilových balení. Na třetím místě je USA s Kanadou, poté Jižní Amerika, Afrika a nejmenší konzumace dosahuje Mexiko se Střední Amerikou. Na rozdíl od konzumace, došlo u produkce k poklesu o 2,1 % ze 170,83 milionů 60-kilových balení na 167,2 milionů 60-kilových balení. Jediná oblast s nárůstem produkce o 7,1 % byla Asie s Oceánií. Největším vývozcem kávy byla Brazílie, která tvořila 29,6 % celkového množství exportovaného kávy, následovaná Vietnamem s 21,9 % (International Coffee Organization, 2022; Seninde, 2020).

Hlavním faktorem pro výběr kávy konzumentem je její chuť a aroma. Dvěma nejčastějšími odrůdami, které se objevují na trhu je Arabika a Robusta, kdy každá z káv má své typické chuťové rysy, aroma a chemické složení. Tyto parametry lze ovlivnit genetickým základem rostlin, stanovištěm, podmínkami pěstování a v neposlední řadě i posklizňovými úpravami. V praxi se běžně používá posklizňové zpracování suchou či mokrou metodou, které dodává kávě žádoucí charakteristiky a zbavuje jí oplodí okolo zrn. Kromě těchto zmíněných metod lze kávové plody zpracovávat i zkrmováním zvířatům. Po strávení plodů jsou kávová zrna vybírána z exkrementů, očištěna a dále zpracována. Jedná se například o zrna cibetek (káva Kopi Luwak) a sloní kávu, u které začala výroba v roce 2012 firmou Black Ivory Coffee. Díky průchodu trávicím traktem těchto zvířat dostávají zrna zcela jinou chuť a aroma. Ta je kompenzována mnohonásobně vyšší cenou, která je dána limitovanou produkcí a vysokou poptávkou (Muzaiifa, 2020; Black Ivory Coffee Company, 2024; Ghosh, 2014; Toci, 2015).

Z dostupných studií, jež se věnovaly srovnání konvenční a cibetkové kávy vyplývá, že cibetková káva může být na některé hlavní látky výrazně chudší. Tyto látky mohou zahrnovat kofein a jemu příbuzný teobromin a teofylin a látky antioxidační povahy, včetně nejzastoupenějších derivátů chlorogenové kyseliny a dalších (Muzaiifa, 2020; Ongo, 2020; Febrina, 2023). Toto je vysvětleno tím, že zmíněné látky mohou v trávicím traktu zvířete degradovat (Marccone, 2004). Na druhou stranu, tím, že kávová zrna procházejí trávicím traktem, může být cibetková káva bohatší na některé aromatické sloučeniny, např. guajakol, pyraziny a furany (Frag, 2023). V případě využití slonů, vzhledem k tomu, že se jedná o poměrně novou metodu zpracování kávy, jsou však tyto kvantitativní a kvalitativní změny obsahových chemických látek stále neznámé.

Na základě této skutečnosti, se tato studie věnovala determinaci chemického složení sloní kávy ve srovnání s kávou konvenční a cibetkovou. Pro tyto účely byly využity metody analytické chemie – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí pro účely detekce kofeinu a hlavních fenolických sloučenin (chlorogenová, kávová, a skořicová kyselina) a plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií a vybavena SPME vláknem pro detekci aromatických látek. V rámci této studie byla rovněž zkoumána antioxidační aktivita



vzorků pomocí *in vitro* metod (TPC, TFC, metody DPPH, ORAC, a TEAC). Získané výsledky byly podrobeny statistické analýze hlavních komponent PCA a ANOVA ( $p < 0,05$ ).

## 2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Káva (*Coffea* sp.; Rubiaceae) je jedním z nejvíce konzumovaných nápojů a stimulantů na světě. Odhaduje se, že celosvětově se ročně spotřebuje přibližně 160 milionů 60-kilogramových sáčků kávy. Valná většina konzumované kávy je zpracována konvenčním způsobem. Vzhledem k popularitě tohoto nápoje se však stále objevují nové zpracovatelské metody. Jedním z méně tradičních postupů je zkrmování kávových zrn různým chovným zvířatům. Kávová zrna jsou v trávicím traktu zvířat částečně natrávena a vyloučena z těla v exkrementech, ze kterých jsou zrna následně sbírána a dále zpracovávána. Nejčastěji jsou kávová zrna zkrmována cibetkám (tzv. cibetková káva). V současnosti se však využívají i jiná zvířata, např. sloni. Dodnes není známo, jaký má tento způsob zpracování kávových zrn vliv na kvalitativní změny přítomných látek. Tato diplomová práce si klade za cíl porovnat chemické složení tzv. sloní kávy ve srovnání s cibetkovou kávou a tradičně zpracovanými kávovými zrny.

Hypotéza: Sloní káva, podobně jako cibetková, bude s velkou pravděpodobností chudší na vybrané chemické látky ve srovnání s konvenční kávou. Zřejmě z důvodu toho, že dochází k částečné absorpci obsahových látek v trávicím traktu zvířete.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Káva

#### 3.1.1 Kávovník arabský-*Coffea arabica* L.

“Kávovník arabský (*Coffea arabica* L.) je tropická rostlina pocházející z vyšších poloh jihozápadní Etiopie. Patří do čeledi mořenovitě (Rubiaceae). Z Etiopie se postupem času rozšířil do Jemenu a v 16.století se objevil v Turecku. Následně ho v 17.století objevili Holanďané, kteří ho vysadili v Indonésii. Mezi největší producenty dnes patří Brazílie, Kolumbie, Mexiko, Indie, Pobřeží slonoviny, Indonésie a Etiopie. Sklizeň kávovníku arabského představuje asi 65 % světové produkce kávy. Rostlině se nejvíce daří v tropických horských oblastech (1100-1500 metrů a výše) s většími výkyvy teplot mezi dnem a nocí. To je dáno přítomností ranní mlhy, nebo rosy. Existují však i odrůdy nížinné. [...] Káva Arabika je charakteristická jemným aroma, nižším obsahem kofeinu a vyšší cenou zrn. Mezi nejznámější kultivary patří Typica, Bourbon, Blue Mountain a Cattura. “ (Hájíček, 2022; Hoskovec, 2011; Valíček, 1989; Gibson, 2018)

#### 3.1.2 Kávovník statný-*Coffea canephora*

Druhým nejznámějším druhem je káva Robusta z kávovníku statného (*Coffea canephora*), který pochází z tropických deštných lesů řeky Kongo. “Peckovice i semena jsou menší oproti kávovníku arabskému. Rovněž poskytuje kávu nižší jakosti, avšak oblíbenou. Někteří uživatelé si jí cení v espresech díky své hluboké chuti a krémovosti. Káva Robusta obsahuje oproti Arabice více kofeinu a má výraznější hořkou chuť. Na světové produkci kávy se podílí okolo 30 %. Oproti kávovníku arabskému má lepší přizpůsobivost stanovištním podmínkám a větší odolnost vůči chorobám. Ve směsi s kávovníkem arabským slouží k výrobě instantní kávy.“(Hájíček, 2022; Gibson, 2018; Valíček, 1989)

#### 3.1.3 Kávovník liberijský-*Coffea liberica*

Nejméně využívanou rostlinou pro produkci kávy je kávovník liberijský (*Coffea liberica*), který se pěstuje se v západní Africe, Malajsii a dalších zemích jihovýchodní Asie. Oproti výše zmíněným druhům k jeho hlavní výhodám patří vysoká odolnost vůči chorobám, avšak má velmi trpkou chuť, díky čemuž se na světové produkci podílí pouhými dvěma procenty. Mezi nejvyužívanější kultivary se řadí *Kape Baroko* a *Excelsa*. *Kape baroko* má největší zrna ze všech známých odrůd a druhů kávy. *Excelsa* je vyhledávána pro svou komplexnost a hloubku s ovocnými rysy a výraznou kyselou chutí. *Excelsa* se v jistých literaturách uvádí jako samostatný druh kávy, i když se jedná o kultivar Liberiky (Hájíček, 2022; Valíček, 1989; Gibson, 2018; Anon., 2021).

## 3.2 Hlavní obsahové látky

### 3.2.1 Purinové alkaloidy a další dusíkaté látky

Kávovníky obsahují dva různé druhy alkaloidů. Může se jednat o deriváty xantinu, purinové alkaloidy, které zahrnují kofein, theobromin a theofylin anebo o pyridinový alkaloid, trigonelin. Hlavními alkaloidy v kávě je kofein a trigonelin. V kávových zrnech se theobromin a theofylin nacházejí pouze ve stopovém množství. Množství alkaloidů závisí na odrůdě, genetických vlastnostech kultivaru, zralosti zrn při sklizni, způsobu sklizně, podmínkách posklizňového zpracování, zemědělských postupech, prostředí a klimatickými parametry. Kofein v kávových zrnech vzniká syntetizováním xanthosinu z purinových nukleotidů. Celá cesta zahrnuje xanthosin, který se mění na 7-methylxanthosin, ten dále na 7-methylxanthin, následuje theobromin a finálním produktem je kofein. Kofein se v kávových zrnech Arabiky nachází v rozmezí 0,8 až 1,4 % (w/w) suché hmotnosti. U kávy Robusta se jedná o 1,7 až 4,0 % kofeinu a u Liberiky se obsah pohybuje okolo 1,2 %. Obsah kofeinu v kávě se během pražení téměř nemění, jelikož je při teplotách pražení stále stabilní. K rozkladu dochází při zahřátí nad 285 °C. Druhým nejzastoupenějším alkaloidem je trigonelin je v kávě syntetizován z kyseliny nikotinové odvozené z nikotinamidu adeninových nukleotidů. Zelená kávová zrna Arabiky obsahují 0,74-1,54 % trigonelinu ve své suché hmotnosti, avšak je tepelně nestabilní a během pražení se přeměňuje na kyselinu nikotinovou (niacin; vitamín B<sub>3</sub>), methylpyridin a další dusíkaté látky, které zahrnují aromatické sloučeniny. Robusta obsahuje přibližně dvě třetiny množství trigonelinu v Arabice. V pražených zrnech kávy zůstává 20-50 % původního množství trigonelinu v závislosti na stupni pražení. Trigonelin je prekurzor různých tříd aromatických sloučenin, včetně furanů, pyrazinů, pyrrolů a pyridinů, které vznikají během pražení kávy a přispívají k finální chuti nápoje. Methylxanthiny a trigonelinem jsou spojovány s hořkou chutí kávy. Theobromin je nejspíše takéž relativně tepelně stabilní, vzhledem k podobnosti struktury molekuly ku kofeinu (Samanidou, 2015; Ashihara, 2006; Mehari, 2016; Wang, 2019).

### 3.2.2 Polyfenolické látky

Nejzastoupenější polyfenoly v kávě jsou hydroxyskořicové kyseliny (fenolové kyseliny), které tvoří 98 % celkového obsahu polyfenolů, zbývající 2 % připadají na alkylmethoxyfenoly, alkylfenoly, methoxyfenoly a další polyfenoly, jako je katechol, fenol a pyrogallol. V zelených kávových zrnech se fenolové kyseliny vyskytují v chlorogenových formách a po upražení následně ve formě kávových kyselin. Označení „chlorogenová kyselina“ u kávy zahrnuje skupinu esterů, které vznikly vytvořením vazby mezi kyselinou chinovou a trans-skořicovými kyselinami, u kávy nejčastěji s kyselinou kávovou a ferulovou a *p*-kumarovou. Nejčastěji vznikají estery, které tvoří vazbu s hydroxylem na 5,3 a 4 uhlíku. Méně často se vznikají estery s hydroxylem na 1 uhlíku. Nejhojněji zastoupeným polyfenolem kávy je kyselina 5-kafeoylchinová. Podtřídy chlorogenových kyselin zahrnují kyselinu kaffeoylchinovou, dikaffeoylchinovou, feruloylchinovou, *p*-kumaroylchinovou a kaffeoyl-feruloylchinovou. Z těchto podtříd tvoří deriváty kyseliny kaffeoylchinové přibližně 80 % celkového obsahu

chlorogenové kyseliny kávy. Téměř 60 % tvoří kyselina 5-kafeoylchinová, která se označuje jako kyselina chlorogenová. V Arabice a Robustě bylo identifikováno mnoho minoritních chlorogenových kyselin, avšak na finální jakost kávy mají nejspíše minimální vliv, jelikož se podílí na méně jak 1 % celkového množství chlorogenových kyselin v kávě. Chlorogenové kyseliny jsou prekurzory fenolů a katecholu, které způsobují trpkou, hořkou a kyselou chuť kávy. Robusta obsahuje až dvakrát více kyseliny chlorogenové, než Arabika. Data získaná z literatury naznačují, že množství a profil polyfenolických látek v kávě závisí na podmínkách pražení, způsobu pěstování a odrůdě. Nejvyšších obsahů polyfenolických látek dosahuje káva pražená při lehkém až středním pražení, u tmavě pražené kávy dochází až ke dvojnásobnému snížení oproti zeleným zrnům. Polyfenolické sloučeniny jsou vysoce termolabilní, které velmi snadno degradují při záhřevu nad 80 °C. Z hlediska pěstování měla konvenční káva nižší obsahy polyfenolů oproti organické formě pěstování. To je dáno tím, že při organickém způsobu si rostlina syntetizuje více fenolických látek jako druh přírodního pesticidu pro svou ochranu. Během skladování dochází k poklesu polyfenolických sloučenin degradací chlorogenových kyselin. Snížení hladiny polyfenolů je pro spotřebitele nežádoucí, díky jejich domnělým antioxidačním vlastnostem a ochranou před mnoha neinfekčními nemocemi (Liczbiński, 2022; Chu, Farah, 2012; Król, 2020; Tresserra-Rimbau, 2015).

### 3.2.3 Volatilní a vonné látky

Těkavé sloučeniny, které tvoří typické aroma kávy, vznikají v kávových zrnech při pražení v důsledku pyrolýzy, karamelizace, Streckerovy degradace a Maillardových reakcí. Zelená kávová zrna neobsahují kávové aromatické sloučeniny, i když se jedná o podobné skupiny sloučenin. Samotný profil těkavých látek závisí na podmínkách pražení a na složení netěkavých sloučenin v zelených zrnech. Díky tomu má na konečné složení vliv i genetika, půda, zemědělské postupy, klima a stupeň zrání. V upražených kávových zrnech bylo identifikováno více jak 950 těkavých sloučenin. Nejčastějšími skupinami jsou furany, pyrany, pyraziny, pyrroly, ketony, fenoly, uhlovodíky, alkoholy, aldehydy, kyseliny a anhydridy, estery, laktony, thiofeny, oxazoly, thiazoly, pyridiny, aminy a různé sloučeniny síry a dusíku. Ze sacharidů vznikají furany, aldehydy, ketony a fenoly. Proteiny, peptidy a aminokyseliny dávají vzniknout ketonům, pyrrolům a pyrazinům. Z lipidů vzniká malé množství aldehydů a ketonů a jak již bylo zmíněno dříve, z kyseliny chlorogenové vznikají těkavé fenolické sloučeniny a z trigonellinu vznikají pyrroly, pyridiny a pyraziny. Pyraziny, pyrroly a pyridiny jsou zodpovědné za ořechové, pražené a pečené tóny kávy. Hladiny pyridinu, 2-methylpyrazinu, furfuralu, furfurylformiátu, 2-furanomethanolacetátu, 5-methylfurankarbaldehydu, 1-(2-furanylmethyl)-1H-pyrrolu, 1-(1H-pyrrol-2-yl)-ethanonu, 2-methoxyfenolu a 4-ethyl-2-methoxyfenolu lze ovlivnit podmínkami pražení. Kvalita zrn ovlivňuje 2-methylpyrazin, 2,3,5-trimethylpyrazin, 1-H-pyrrol a 2-furfurylmethanol. Pokud porovnáme profil těkavých sloučenin Arabiky a Robusty, u Arabiky převládá 3-merkpto-3-methylbutylformiát; sotolón; abhexon; 2-methyl-3-furantiol, fenylacetaldehyd; 3,4-dimethyl-2-cyklopentenol-l-on; kyselina 2-/3-methylbutanová; linalool; kyselina octová; furfural; 2-acetylfuran; 5-methylfurfural; furfurylalkohol; 3-methylcyklopentan-1,2-dion; maltol a 2-formylpyrrol, zatímco Robusta

vykazuje vyšší hladiny 2,3-diethyl-5-methylpyrazinu; 4-ethylguajakolu; guajakolu; fenolu; a 3-methyl-2-buten-1-thiolu. Díky těmto rozdílům, je i jiné aroma kávy, kdy se Arabika vyznačuje karamelovým až sladkým aroma, zatímco Robusta má více oříškové až zemité tóny. Poslední zmíněná látka je dávana v souvislosti s nepříjemným až zkaženým zápachem kávy, na druhou stranu pyraziny, které měly vyšší hladiny v Robustě, souvisejí s oříškovou až kakaovou vůní. Furfural a 2-acetylfuran, které vykazovaly vyšší hladiny v Arabice dávají kávě sladké až mandlové aroma. Z hlediska obsahu zaujímají furany více než 40 %, celkového obsahu těkavých látek. Druhou převládající skupinu z hlediska obsahu tvoří ketony s 20-27 %, dále alkoholy s 5 %, pyraziny a aldehydy se 4 % a pyroly v rozmezí 0,2-4 % (Chu, Farah, 2012; Ongo, 2020; Seninde, 2020; Dippong, 2022).

### 3.2.4 Sacharidy

Sacharidy tvoří 50-60 % hmotnosti suchých kávových zrn a během pražení hrají důležitou roli při Maillardově reakci. Podílí se na vázání aroma, stabilizaci pěny, tvorbě sedimentu, zvýšené viskozitě nápoje a tvorbě volatilních látek. Na začátku vývoje plodu se hladiny glukózy a fruktózy pohybují mezi 16,5 a 1,6 % sušiny, ale během vývoje plodu jejich koncentrace rapidně klesá na 0,03 až 0,04 % sušiny plodů. To je dáno zejména tím, že glukóza vstupuje do syntéz sacharózy, během vývoje rostliny, u které se obsah zvyšuje o 5-12 %. Zrna kávy Arabika obsahují 8,2 až 8,3 % sacharózy a zrna Robusty pouze 3,3 až 4 %. U Arabiky sacharóza představuje 90 % obsažených disacharidů. Během pražení se sacharóza degraduje zpátky na glukózu, fruktózu, 1,6-anhydroglukózu, arabinózu a erythritol. Po upražení zrna v obsahují 0,4 až 2,8 % sacharózy. Vzniklá glukóza a fruktóza se během pražení rozkládá rychleji než samotná sacharóza a jejich obsah je v zrnech také minimální. Z hlediska monosacharidů se v zelených zrnech dále nachází xylóza a ramnóza s obsahem 0,2-0,3 % a galaktóza s obsahem mezi 10-12 %. Polysacharidy do chuti kávy nezasahují, na rozdíl od přítomných monosacharidů a disacharidů. Hlavními polysacharidy zelených zrn jsou manany, galaktomannany, arabinogalaktany a celulóza. Celulóza tvoří okolo 8 % sušiny zrna a je částečně odolná vůči tepelné degradaci, díky propojení vláken celulózy s galaktomannany a arabinogalaktany, které společně tvoří hustou matici, která chrání před teplem. Robusty obsahují 19-22 % galaktomannů a 6-8 % arabinogalaktanů, zatímco Arabiky 25-30 % galaktomannů a 9-13 % arabinogalaktanů. Z přítomných polysacharidů nejvíce degradují arabinogalaktany. Během pražení sacharidy s nízkou molekulovou hmotností téměř zcela degradují a v zrnech jich následně zbývá minimální množství. Bylo zjištěno, že arabinóza, galaktóza, manóza a glukóza mají sklony k tepelné degradaci ve zmíněném pořadí. Kromě výše zmíněných sloučenin bylo v kávových zrnech pozorováno i malé množství pektinů a xyloglukanů (Portillo, 2022; Redgwell, 2006; Arya, 2007).

### 3.3 Zpracování kávy

#### 3.3.1 Suchá metoda (dry method)

Při suchém zpracování jsou plody ihned po sklizni sušeny na venkovních prostranstvích, nejčastěji na otevřených terasách, až do snížení obsahu vlhkosti na 12 hmotnostních %. Tento proces trvá 10-25 dní v závislosti na teplotě a vlhkosti prostředí. Nejdůležitější je rovnoměrné rozprostření plodů po celé ploše podlahy nebo rohoží. Rohože by neměly být hlubší jak 40 mm, jelikož může docházet k fermentaci a změně barvy zrn. I při suchém způsobu zpracování dochází během sušení k jisté míře fermentace. Po vysušení na požadovanou vlhkost se oplodí loupe buď ručně nebo pomocí mechanického čističe zrn. Zrna se následně prosejí přes síta, kde dochází k odstranění nečistot a vadných zrn, u kterých došlo nějakým způsobem k poškození. Následné třídění zrn je prováděno buď mechanicky pomocí ručního sbírání, nebo použitím optických metod. Nevýhodou této metody zpracování je kromě možné zmíněné fermentace a změny barvy, nafoukaný prach a další nečistoty z venkovního prostředí na povrch zrn. V oblastech, kde dochází k pěstování kávy se během sklizně často objevují bouřky, které mohou taktéž produkt znehodnotit. Suchý proces zpracování je jednodušší a levnější, zatímco mokrá proces je náročnější, jak z hlediska časového, tak finančního, ale vzniká káva vyšší kvality (Ghosh, 2014; Janne Carvalho Ferreira, 2023).

#### 3.3.2 Mokrý metoda (wet method)

Při mokrému zpracování dochází k působení mechanických sil na plod, díky čemuž dochází k odstranění vnějších vrstev zrna, jako je mezokarp a exokarp, přičemž na zrnu zůstává povlak slizu (mucilage). Ten je tvořen hemicelulózami, pektiny a cukry nerozpustnými ve vodě. Tento sliz je následně fermentován a odstraněn pomocí promytí zrn a sušení. Nezralé plody bývají tvrdé a odstranění vnějších vrstev bývá obtížné, proto je důležitý sběr jen zralých plodů. Po odstranění vnějších obalů se zrna dávají do velkých kádí s vodou, kde dochází k odstranění plovoucích vadných zrn, které nebyly zachycena při sběru. Fermentace slizu probíhá ve fermentačních nádržích po dobu 24 až 40 hodin. Přirozeně se vyskytující kvasinky, bakterie a enzymy slizu se společně podílí na jeho rozkladu. Pro urychlení a kontrolu fermentace mohou být ke kávě přidávány předem určené kmeny, či proteolytické enzymy. Během fermentace by káva měla být občas promíchána. Zda došlo k dostatečnému rozkladu se ověří pomocí zkoušky omytím, kdy se na část zrn pustí mírný proud vody, který by měl veškerý zbylý sliz z povrchu omýt. Ihned po tomto zjištění musí být zrna omyta, v opačném případě se začnou v kávě tvořit látky způsobující pachutí kávy. Po omytí musí být ihned káva vysušena na vlhkost 10-12 hmotnostních %, jinak opět hrozí vznik chuťově nepříznivých látek a rozvoj mykotoxinů. Vysušená káva se nechá minimálně 8 hodin odpočinout na dobře větraném místě a následně se mechanicky odstraní zbylá pergamenová vrstva. Ta je od kávy následně vyfoukána vzduchem, nebo pomocí sít. Nevýhodou této metody je velká spotřeba vody, která se pohybuje okolo 30 litrů na 1 kilogram kávy (Ghosh, 2014; Velásquez, 2022).

### 3.3.3 Semi-suchá/semi-mikrá (tzv. honey method)

U medové metody zpracování kávy dochází k odstranění slupky a dužniny bez mycího procesu a část slizu zůstává na zrnech, s kterou se i zrna suší. Dužnina a slupka je ze zrn odstraňována mechanicky, pomocí rozvlákňovacího stroje. Zrna se suší po dobu 10-12 dní na vlhkost 10-11 % a následně se z nich odstraňuje pergamenová vrstva. Medová metoda je méně náchylná na fermentaci a dochází při ní ke snižování hladiny chuti kávy, ale i kyselosti. Vzhledem k tomu, že je káva sušena ve venkovním prostředí, dochází zde ke stejným problémům s nečistotami, jako u suché metody a po usušení je kávu nutné prosít (Velásquez, 2022; Sunarharum, 2020; Várady, 2022).

### 3.3.4 Nové metody zpracování kávy

Kromě známých, komerčně využívaných postupů zpracování kávy se zkoumá možnost využití karbonické macerace a indukované anaerobní fermentace. Karbonická macerace byla jako první používána při výrobě vína, kdy se využívá adaptabilita neporušených plodů na bezkyslíkaté médium obohacené o oxid uhličitý v uzavřeném prostředí. Díky přidání oxidu uhličitého, tento proces adaptace způsobuje přechod z anaerobního metabolismu na fermentační metabolismus ve všech druzích ovoce. Celý proces je významně ovlivňován dobou a teplotou fermentace. U kávy, která tento proces podstoupila, byl pozorován příznivý účinek na zlepšení chemického a sensorického profilu. Nejlepších výsledků dosahuje káva, která je podrobena při fermentaci teplotě 38 °C po dobu 72-96 hodin. Dalším významným faktorem je diverzita použitých bakterií. Z přirozeně vyskytujících se bakterií dominují během fermentace rody *Leuconostoc* a *Laktobacillus*. Při počáteční fázi fermentace dosahuje teplota 18-28 °C, při čemž je pozorovatelná vyšší četnost rodu *Leuconostoc*. Po zvýšení na 38 °C dochází ke zvýhodnění rodu *Laktobacillus*, který je nejspíše odpovědný za vznik látek pozitivně ovlivňující sensorickou jakost. Výhodu této metody je prostředí s vyšší asepti, na druhou stranu zavedení této metody vyžaduje bioreaktory s tlakovou a CO<sub>2</sub> regulací, což znamená větší počáteční investici. U metody anaerobní fermentace se využívá startovacích kultur, které samovolně indukují anaerobní fermentaci. Převládají rody *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Pantoea* a rody hub *Cladosporium* a *Candida*. Metoda je založena na fermentaci kávy v uzavřeném prostředí, bez přídavku vody, tedy v pevném skupenství. K tomu dochází v uzavřených bioreaktorech, kdy dochází k postupnému spotřebování kyslíku mikroorganismy a produkci oxidu uhličitého mikrobiálním metabolismem, čím se zlepšuje činnost bakterií mléčného kvašení a kvasinek, které produkují metabolity, které zintenzivňují požadované aroma a chuť kávy. Oproti předešlé metodě jsou zde vstupní investice nižší, avšak chybí nástroje pro řízení procesu v bioreaktorech. Obvykle nejsou k dispozici senzory na měření pH, teploty nebo na zařízení automatického míchání, a proto je nutné reaktory otevírat pro homogenizaci, kontrolu pH a teploty, díky čemuž se umožní vstup kyslíku do prostředí (Gomes, 2022; Brioschi Junior, 2021; Jimenez, 2023; Braga, 2023; Da Silva, 2023; Janne Carvalho Ferreira, 2023).



### 3.3.5 Metody zahrnující zvířata

Mimo výše zmíněné metody, se do popředí dostávají i metody zahrnující zpracování kávových bobů zvířecím trávicím traktem. Dochází zde k využití přirozených enzymů a mikroorganismů jejich trávicího traktu a stejně jako u ostatních typů fermentace je primárním úkolem odstranit slizovou vrstvu zrn. Do kategorie káv zpracovaných pomocí činnosti zvířat se řadí cibetková káva (Kopi Luwak), sloní káva, kávová zrna zpracovaná ptáky jacu a opičí káva. U všech zmíněných druhů dochází ke zlepšení sensorických vlastností kávy, avšak za mnohonásobně vyšší cenu oproti konvenční kávě. Ta je dána nutností dodržovat welfare zvířat, pracností s úpravou těchto zrn a v neposlední řadě množstvím, které lze těmito metodami vyprodukovat. Mezi jednotlivými várkami zrn může docházet k rozdílům v sensorických vlastnostech, jelikož jsou značně ovlivňovány stravou zvířat. Volně žijící zvířata si vybírají jen ty nejlepší plody s optimální zralostí, což zaručuje nejvyšší kvalitu těchto zrn. Produkci Kopi Luwak dominuje Indonésie, Honduras, Etiopie, Indie, Uganda, Peru a Mexiko. Z jedné volně žijící cibetky lze získat mezi 250 až 500 kg kávy za rok. Zpracováním v trávicím traktu dochází taktéž ke snížení obsahu kofeinu v zrnech. U cibetek byly nalezeny mikroorganismy se schopností degradace kofeinu, jedná se o *Methylobacterium populi*, *Klebsiella quasi pneumoniae*, *Raoultella ornithinolytica* a *Stenotrophomonas schelatiphaga*. Pták jacu (Guan skvrnitý – *Penelope supercilialis*) je přirozeným a taktéž ohroženým živočichem deštných pralesů Brazílie, který se živí ovocem, klíčky, listy, zrny a hmyzem. Dle dostupných studií, došlo u zpracování kávy ptákem jacu o snížení obsahu kofeinu o 69 % a obsahu kyseliny chlorogenové o 28 %, dále se změnil profil triacylglycerolů v zrnech. Kromě toho, došlo ke zvýšení obsahu kampesterolu, což bylo nejspíše způsobeno vyšší absorpcí stigmasterolu a  $\beta$ -sitosterolu. Ptáci štěpí lipidy hydrolýzou pomocí lipolytických enzymů, konkrétně kolipázou a pankreatickou lipázou a následně dochází k absorpci v tenkém střevě. Výroba této kávy začala přibližně před deseti lety, kdy se majitel kávových farem nemohl zbavit těchto chráněných ptáků a nechal se inspirovat cibetkovou kávou. Opičí káva je původem z Indie a Tchaj-wanu, kde opice konzumují zralé kávové plody na farmách. Opice zkonsumují dužinu zrn, z které nasávají i její šťávu, následně zrna ponechají nějakou dobu v ústech, kde je povalují a poté vyplivnou. Je udáváno, že chuťový profil těchto zrn je lepší než u běžných zrn kávy. Z hlediska podmínek pH v trávicím traktu se pták jacu pohybuje v rozmezí 2,7 až 6,4 a zmíněný savci v rozmezí 2,5 až 7,6. U všech zvířat, kromě opičí kávy, zrna prochází gastrointestinálním traktem a po vyloučení z těla se zrna vybírají z exkrementů zvířat, následně se čistí, suší a praží (Febrianto, 2023; Ripper, 2022; Raveendran, 2022).

Momentálně jediná společnost zabývající se sloní kávou, vystupuje pod názvem Black Ivory Coffee, se sídlem firmy v Anantara Golden Triangle v severním Thajsku. Káva má charakteristickou chuť s tóny čokolády, sladu, koření, s nádechem trávy a bez spálené nebo hořké chuti běžné kávy. Každý slon sní denně 150 kg potravy. Slonům jsou předkládány celé kávové bobule ve směsi s preferovaným ovocem daného slona, solí, tamarindem a rýží. Doba strávení bobulí trvá 15 až 70 hodin. Během tohoto procesu na bobule působí enzymy a kyseliny žaludku, které rozbíjejí bílkoviny, které jsou odpovědné za hořkost kávy. Kávová zrna Arabiky (*Coffea arabica*), která jsou slonům předkládána, pochází od horských kmenů žijící v oblasti

Chiang Mai v Thajsku. Bobule jsou sbírány ručně, 1500 metrů nad mořem. Po digesci a opětovném sběru zrn jsou zrna promývána a sušena na slunci. Následuje pražení po 3 kg várkách. K výrobě 1 kg kávy je potřeba 33 kilogramů bobulí, to přibližně odpovídá 10000 zrn na 1 kg pražené kávy, jelikož u většiny zrn dojde k rozžvýkání, rozbití nebo ztrátě ve vysoké trávě nebo vodě během koupání slonů. Kávová zrna jsou skladována v dubových sudech po koňaku nebo rumu, díky čemuž část pachu pohltí i samotná zrna. Majitel společnosti Blake Dinkin strávil vývojem a vhodnými podmínkami pro zkrmování slony 10 let. Dinkin ve spolupráci s Torontskou zoo například zjistil, že kofein není vstřebáván do sloního krevního oběhu, jelikož dužnina okolo zrna kofein dostatečně zadrží. S aktuální cenou za kilogram 2500 USD se řadí mezi jedny z nejdražších káv světa. První produkce v roce 2012 čítala 50 kg. Pro rok 2023 se předpokládala produkce 225 kg této kávy, přičemž se využívá okolo 20 slonů (Black Ivory Coffee Company, 2024; Dombrowski, 2013; Matthews, 2019; Lee, 2014; Sullivan, 2014).

### 3.4 Vliv fermentace na kávová zrna

Při zpracování kávy je používáno slovo fermentace pro každý proces chemické přeměny, která je řízena mikroorganismy a při kterém dochází k využití mezokarpu jako zdroje energie. Hlavním cílem fermentace je odstranění kávového slizu (mucilage). Ten obsahuje hlavně polysacharidy (včetně pektinu), celulózu a škrob. Skládá se z 84,2 % vody, 8,9 % bílkovin, 4,1 % redukujících cukrů, 0,91 % pektátů a 0,7 % popela. Povrchový sliz může prodloužit dobu potřebnou k vysušení kávových zrn a v některých případech také vést k tvorbě plísní, které snižují výslednou kvalitu kávy. Mikroorganismy (kvasinky, bakterie a houby) hrají hlavní roli při degradaci slizu tím, že během fermentačního procesu produkují různé enzymy, alkoholy a kyseliny. Všechny druhy kávy, ať už procházejí jakýmkoliv zpracováním, podstupují určitý druh fermentace působením epifytických mikroorganismů během zpracování. Díky vysoké dostupnosti substrátu, může fermentace probíhat současně se sušením, případně v odděleném kroku výroby. Pro proces fermentace lze využít enzymy, které se přirozeně vyskytují v plodech kávy a mikroflóre z prostředí, ale i komerčně dostupné směsi enzymů. Jedná se o směsi pektinázy, hemicelulózy a celulózy. Nejdůležitější enzymy produkované mikroorganismy pro degradaci pektinových látek jsou pektinyláza, polygalakturonáza a pektinmetylesteráza. Pektinyláza katalyzuje degradaci pektinu trans-eliminací a uvolňuje nenasycené galakturonové kyseliny. Polygalakturonáza je hlavním enzymem podílejícím se na fermentaci kávy. Katalyzuje hydrolýzu  $\alpha$ -1,4 glykosidických vazeb na kyselinu pektovou (kyselinu polygalakturonovou). Methylesteráza pektinu je zodpovědná za deesterifikaci methoxylové skupiny pektinu za vzniku kyseliny pektinové a methanolu. Výběr startovacích kultur je klíčový, tyto kultury urychlují degradaci slizu, ale musí mít i toleranci vůči stresu během fermentace, schopnost potlačit růst patogenních hub a pozitivní vliv na senzorickou kvalitu kávy. V případě, kdy fermentace probíhá nad doporučenou dobu, mohou mikroorganismy vytvářet nežádoucí látky způsobující pachutě a nepříjemné aroma. Jedná se hlavně o kyselinu propionovou a máselnou, které by se zde měly vyskytovat v koncentracích menších jak  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Kromě nich vzniká i ethanol, kyselina octová a další vyšší karboxylové

kyseliny. Nedostatečně fermentovaná zrna mohou obsahovat zbytky slizu a velké množství cukrů, které zabraňují vysychání a vytvářejí prostředí pro rozvoj nežádoucích mikroorganismů. Samotný proces fermentace mění složení přítomných aromatických a chuťových sloučenin a množství vody v zrnech. Mikrobiální aktivita a rozsah fermentace určují koncentrace volných cukrů a volných aminokyselin, které následně během pražení přispívají k tvorbě Maillardových sloučenin (Haile, 2019; Janne Carvalho Ferreira, 2023).

Studie Kwak et al. (2018) se zabývala fermentací zelených kávových zrn po dobu 24 hodin třemi druhy kvasinek. Získané hodnoty byly porovnávány se vzorky, jež byly pouze namočené v obyčejné pitné vodě. Při kvasinkové fermentaci došlo k výraznému zvýšení antioxidační aktivity, stejně jako ke zvýšení celkového množství polyfenolů a flavonoidů. U sensorických testů byla akceptovatelnost fermentovaných kávových zrn nižší než kontrola pro své ovlivnění aroma a chuti kávy, na druhou stranu 39 % hodnotitelů upřednostňovalo fermentovanou kávu. Přijatelnost může souviset s přítomností různých těžkých sloučenin po kvašení. Tito hodnotitelé nepociťovali negativní aroma a chuť. Přijetí této kávy spotřebiteli by se mohlo zvýšit s vědomím vysoké antioxidační aktivity a obsahu fenolických sloučenin, které se z kávy uvolňovali po pražení. Během fermentace dojde k oslabení silně vázaných fenolických sloučenin v buněčné stěně, což usnadňuje jejich extrakci po pražení. I když u kávové fermentace je nejžádanější odstranění slizu, lze využít i zvýšení funkčnosti kávových zrn. To lze i posílit máčením v ovocných extraktech, ve kterých lze také provádět fermentaci. Díky tomu se mohou kávová zrna stát obohacenými funkčními potravinami. Po 24hodinové fermentaci došlo u všech vzorků ke snížení pH. U kontrolních vzorků byl pokles způsoben uvolňovanými organickými kyselinami a fermentaci přirozeně se vyskytujícími bakteriemi mléčného kvašení v kávových zrnech. Zvýšené množství flavonoidů je způsobeno přeměnou nerozpustných fenolických sloučenin na rozpustné flavonoidy během fermentace. I když je nutno podotknout, že vznikalo více rozpustných fenolických látek než flavonoidů.

### 3.5 Cibetkovití

Čeď cibetkovití (*Viverridae*) se řadí do třídy savců, čeledi šelem. Kromě cibetek se do této čeledi řadí dále ženetky, oviječi, fosy, nandinie a pucholy. Cibetkovití se vyznačují štíhlým protáhlým tělem s dlouhým ocasem, krátkými nohama, delším krkem a zašpičatělým čenichem. Příbuzností jsou blízko hyenám a kočkám, oproti kterým mají delší čenich a více zubů. Většina cibetek má na těle podélné řady skvrn. Jedná se o všežravce, kteří se živí malými savci, ptáky, ještěrkami, bezobratlými živočichy a také plody stromů a ovocem. Existují druhy pozemní, stromové i částečně vodní, přičemž se vyskytují v lesích, poušti i v savaně. Doba trávení cibetek trvá 12-36 hodin (Burnie, 2002a).

#### 3.5.1 Oviječ skvrnitý

Oviječ skvrnitý (*Paradoxurus hermaphroditus*) je noční šelma z čeledi cibetkovitých žijící v jižní, východní a jihovýchodní Asii. Přirozeně se vyskytuje v mírných a tropických lesích, ale

Lze ho zahlédnout i v parcích, příměstských zahradách, plantážích a ovocných sadech. Dorůstá do délky 43-71 cm s váhou 1,5 až 4,5 kg a dožívá se od 15 do 20 let. Mezi charakteristické znaky patří huňatý ocas, hnědošedá barva kožichu s černými pásy na hřbetě a tmavými skvrnami na bocích a obličejová maska. Na rozdíl od ostatních cibetek má oviječ více specializované zuby pro všežravou stravu, ostatní druhy konzumují převážně maso. Jeho zuby jsou slabší, špičaté a trháky pro trhání masa jsou méně vyvinuté. Pobývá převážně na stromech, kde se živí plody, hlavně fíky. Dále do jeho jídelníčku spadají pupeny trav, hmyz, krysy, rejsci, myši, drůbež a ptáci, semena, vejce, plazi, šneci, štíři a další. Stravou se přizpůsobují prostředí, avšak preferují bobule a dužnaté ovoce. Vybírá si jen ty nejlepší a nejzralejší plody, zatímco ostatní nechává na později. To platí i o kávových bobulích, kdy sbírá jen ty nejzralejší třešně. Často ho lze také spatřit, jak si pochutnává na zkvašené palmové šťávě (Burnie, 2002a; Nelson, 2013).

### 3.5.2 Cibetka africká

Cibetka africká (*Civettictis civetta*) je noční šelma žijící v savanách a lesích jižní a střední Afriky. Nejčastěji ji lze nalézt podél říčních toků, do suchých oblastí se vydává jen zřídka. V dospělosti váží 12-15 kg a měří 60-90 cm. Průměrná délka života je 15 až 20 let. Stejně jako oviječ skvrnitý je cibetka africká všežravec, který se živí především ovocem, mršinami, hlodavci, hmyzem, vejci, plazy a ptáky. Mají velké široké stoličky, které jsou vhodné k drcení a trhání, čehož využívá i k lovu, kdy kořist loví pouze čelistí. Oproti ostatním živočichům je schopná jíst i jedovaté či chuťově nevábné jídlo, jako jsou mnohonožky, zkažené mršiny nebo kulčiby (*Stychnos*). Charakteristickými znaky jsou velké zadní končetiny, nízko položená hlava s obličejovou maskou, krátká hřívna na zádech a tělo stříbrné až krémové barvy s hnědočernými skvrnami (Shalu, 2000).

## 3.6 Slon indický

Slon indický (*Elephas maximus*) se řadí do třídy savců, řádu chobotnatců a čeledi slonovití, do kterého se řadí pouze tři známe druhy slonů. Mimo slona indického se jedná o slona afrického a slona pralesního. Jedná se o skupinového živočicha vyskytujícího se v jižní a jihovýchodní Asii. Dosahuje délky až 3,5 metru a hmotnosti 2-5 tun, přičemž u slonů se projevuje výrazný pohlavní dimorfismus. Kly se u samic vůbec nevyskytují. Dožívá se až 60 let, přičemž roste po celý svůj životní cyklus. Délka života slona je značně ovlivněna opotřebením zubů, které se postupně opotřebovávají díky rostlinné stravě, kterou jedí. Pokud jsou všechny sady zubů opotřebené, slon nemůže přijímat potravu a zemře. Žijí v savaně, v tropických stálezelených lesích, listnatých lesích, křovinných lesích a na pastvinách. V tlamě mají velké hřebenité stoličky pro stoličky pro zpracování hrubé potravy, jako je, kůra, listí, větve, tráva a ovoce. Většina jeho potravy se skládá z luštěnin (*Fabaceae*), trav (*Poaceae*), ostřic (*Cyperaceae*), palm (*Palmae*), pryšce (*Euphorbiaceae*), řešetláku (*Rhamnaceae*) a slézotvarých (*Malvales*). Sloni během příjmu potravy vytrhávají velké trsy trávy, odlamují

větve, strhávají kůru, vyvracejí stromy z kořenů, čímž značně se značně mění charakter prostředí dle velikosti populace slonů. V minulosti plocha obývá slonem indickým dosahovala 9 milionů čtverečních kilometrů, dnes tato plocha činí pouhých 500 000 kilometrů čtverečních vzhledem k soutěžení s lidmi o půdu a taktéž je zařazen do Červeného seznamu IUCN jako ohrožený druh (Burnie, 2002b; Karkala, 2016).

### 3.6.1 Trávicí trakt slona

Trávicí trakt slona se skládá z úst s chobotem, hltanu, jícnu, jednoduchého žaludku, tenkého a tlustého střeva, slepého střeva, konečníku a řitního otvoru. Do gastrointestinálního systému se dále zapojují stoličky, jazyk, slinné žlázy, játra a slinivka břišní. Sloni mají aktivní slinnou amylázu a lysozym, zatímco aktivita slinné peroxidázy je velmi malá až nulová. Sliny dále obsahují zvýšený obsah močoviny, což naznačuje recyklační mechanismus bakterií a prvoků v trávicím traktu pro své metabolické procesy. Jícen je krátký, s úzkou dutinou, která je potažena hlenovými žlázami. Žaludek je jednoduchý vak válcového tvaru, který je schopen pojmout až 76,6 litrů zpracované potravy u dospělé samice slona asijského. V žaludku nejsou žádné glukagonové buňky, ale obsahuje endokrinní buňky, které jsou imunoreaktivní vůči peptidu YY (PYY). Ve srovnání s jinými býložravými druhy mají sloni krátký střevní trakt. Slepé střevo je hlavní místo fermentace a obsahuje velké množství kvasícího rostlinného materiálu s objemem  $90 \pm 10$  litrů. Slinivka břišní přiléhá ke dvanáctníku a má endokrinní i exokrinní funkci. Ačkoli sloni postrádají žlučník, žluč je nepřetržitě vylučována a prochází do tenkého střeva více vývody. Žluč funguje k zlepšit trávení a vstřebávání lipidů v celém střevě. Sloni neprodukují žlučové kyseliny, ale žlučové alkoholy. Trávicí trakt je uzpůsoben na průchod velkého množství méně kvalitní potravy jejich střevem v relativně krátkém časovém období. To funguje jako kompenzace vůči jejich velikosti, nižšímu poměru povrchu střev ku objemu střev, větší velikosti požitých částic a většími ztrátami fekálního bakteriálního materiálu v důsledku zvýšené fermentace. Asijské sloni stráví přibližně 40-50 % potravy, k čemuž nejvíce dochází v horní části tlustého střeva. U suchého materiálu dochází ke strávení 36-53 %, u hemicelulózy k 53 % a u celulózy k 47 %. Přičemž asijské sloni mají vyšší koeficient strávené stravy oproti jejich africkým protějškům, to je dáno i delší dobou denní pastvy oproti africkým slonům, což mělo při vývoji nejspíše vliv i na delší střevní trakt slona asijského (Greene, 2019; Clauss, 2007).

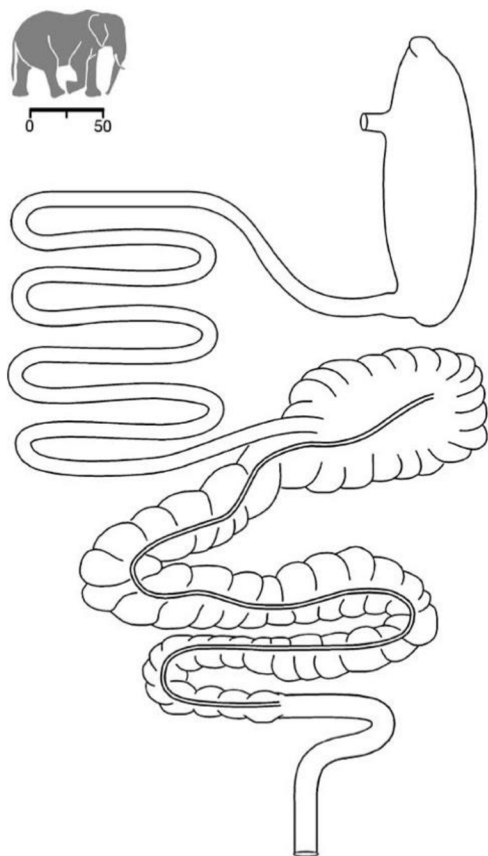


Fig. 1 Gastrointestinal tract of an African elephant (*Loxodonta africana*) (necropsy described in Clauss et al. 2005b). The scale bar represents 50 cm

Obrázek 1: Trávicí trakt *Elephas maximus*, postupně jde za sebou jícen, žaludek, tenké střevo, slepé střevo, tlusté střevo až ke konečníku (Clauss, 2007)

Další důležitou částí, která významně ovlivňuje výslednou kvalitu sloní kávy je střevní mikrobiota zvířat. Největší rozmanitost mikrobioty, u slonů indických v severním Thajsku, byla zjištěna v dospělém věku, zatímco nejnižší byla u stále kojených mláďat. Po dosažení geriatrického věku, dochází znovu ke snížení rozmanitosti mikrobioty. Střevní mikrobiotě mláďat slonů dominují bakterie rodu *Bifidobacterium* z čeledi *Bifidobacteriaceae* a bakterie rodu *Akkermansia*. U kojených slonů jsou taktéž zvýšeny taxony fermentující vlákninu, jako je skupina *Lachnospiraceae* NK3A20. U kojených mláďat byla taktéž vyšší četnost kmene *Euryarchaeota*, *Actinobacteriota*, *Verrucomicrobiota*, *Proteobacteria* a *Desulfobacterota*, oproti dospělým a dospívajícím slonům, avšak kmen *Cyanobacteria*, *Spirochotau* *Armatimonadota* a *Elusimicrobiota* byl u mláďat slonů nižší. Na úrovni čeledí a rodů byly taxony z čeledí *Bifidobacteriaceae*, *Akkermansiaceae*, *Villonellaceae*, *Bacteroidaceae* a *Butyricioccaceae* spolu s rody *Bifidobacterium*, *UCG-008*, *Olsenella*, *Akkermansia* a *Bacteroides* u kojených slonů vyšší, než u dospělých a dospívajících. Oproti tomu Čeledi *Spirochaetaceae*, *Paludibacteraceae*, *Planococcaceae* a *Gastranaerophilales* a rod *Solibacillus*, *Agathobacter*, *Lachnospiraceae* *XPB1014*, *Treponema* byly u kojených slonů nižší. Dominantními bakteriemi, které se vyskytovaly mezi všemi věkovými skupinami jsou kmene *Firmicutes* následované *Bacteroidetes* a *Actinobacteria*. Mláďata vykazovala vysokou četnost *Actinobacteria* a *Euryarchaeota* a nízkou četnost kmene *Bacteroidetes* a *Spirochete*, spolu

s čeleděmi *Oscillospiraceae* a *Clostridiaceae*. I přes postupný vývoj z kojeneho mláděte na odstavené a následně dospívajícího slona na dospělého, byla relativní četnost kmenů střevní mikroflóry velmi podobná. Mikrobiota zdravých dospělých slonů by měla být prakticky stabilní. Nejdominantnějšími čeleděmi u dospělých a dospívajících slonů byly bakterie *Lachnospiraceae*, následované *Oscillospiraceae*, *Clostridiaceae*, *Christensenellaceae*, *Anaerovoraceae* a *Rikenellaceae*. Stejně tak jsou přítomny prospěšné bakterie trávicí vlákninu jako jsou kmeny *Firmicutes*, *Bacteroides*, *Spirochaetota* a *Actobacteriota* a *Lachnospiraceae*. U starších slonů byly hodnoty kmenů *Chlorofexi* a *Euryarchaeota* zvýšeny, zatímco *Cyanobacteria*, *Desulfobacteria*, *Fibrobacterota* a *Bacteroidota* byly sníženy oproti ostatním skupinám. Na úrovni čeledi byly *Lactobacillaceae*, *Xanthobacteraceae*, *Pseudomonadaceae*, *Caloramatoraceae* a *Micrococcaceae* hojnější než u dospívajících a dospělých slonů. Na úrovni rodu byly *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Garicola*, *Succinivibrio* vyšší u starších slonů, zatímco *Schwartzia*, *Acinetobacter*, *Lysinibacillus* a *Solibacillus* byly nižší. *Lachnospiraceae* jsou hlavními producenty SCFA, zejména butyrátu, který slouží jako zdroj živin a růstových faktorů pro zdravý střevní epitel a přispívá také k prevenci zánětů. Čeleď *Oscillospiraceae* spolu s rody *NK4A214* byly pravděpodobně schopny využívat střevní hostitelské glykany a produkovat důležité SCFA, jako je butyrát a jejich metabolity. Taktéž dominantní byl i rod *Sarcina* z čeledi *Clostridiaceae*. Jedná se o produkující celulózu s fermentačním metabolismem sacharidů. K prvním změnám složení mikrobioty dochází po začátku konzumace rostlinné stravy a odstavení od mléka. Se zvýšením konzumace vlákniny dochází i ke zvýšení fibrolytických bakterií. Pokles četnosti střevní mikrobioty u starších slonů je nejspíše spojen se ztrátou stoliček, kdy dochází k horšímu mechanickému zpracování potravy v ústech a dále i trávení (Klinhom, 2023).

### 3.7 Změny v cibetkové kávě

Studie Ongo et al. (2020) zjistila, že při průchodu zrn trávicím traktem cibetky, dochází k částečnému rozkladu bílkovin, díky čemuž káva dostává svojí typickou chuť a aroma. Pokud se jedná o zrna kávy *Robusta*, bylo zjištěno, že dochází ke zvýšení obsahu těkavých látek, oproti kontrolnímu vzorku o 40 %. Nejvyšší nárůst vykazují pyraziny, deriváty furanu, fenolické sloučeniny, maltol a další méně významné těkavé látky. U strávených zrn kávy *Arabika*, nedošlo u jedné sady vzorků ke zvýšení obsahu těkavých látek vůbec a u druhé došlo dokonce oproti kontrolní sadě došlo ke snížení obsahu těkavých látek na 70 % množství. Jediná těkavá látka vykazující nárůst ve všech vzorcích cibetkové kávy byl furfural, který vzniká hlavně při degradaci pentózových cukrů během pražení. To potvrzuje hypotézu o hydrolytickém účinku v trávicím traktu cibetek, kdy dochází ke štěpení polysacharidů bohaté na pentózové cukry, jako je arabinogalaktan.

Muzaiifa et al. (2020) se zabývali složením šesti vzorků indonéské cibetkové kávy. Průměrné obsahy lipidů, proteinů, kofeinu a chlorogenových kyselin ve vzorcích *Arabiky* *Kopi Luwak* v zelených zrnech byly stanoveny na 12,30 %, 13,36 %, 1,20 % a 3,73 %, zatímco v pražených zrnech dosahovaly tyto hodnoty 14,79 %, 13,66 %, 1,10 % a 0,88 %. Celkové

množství lipidů bylo stanoveno Soxhletovou metodou pomocí extrakce s hexanem, množství hrubého proteinu Kjeldahlovou metodou a obsah kofeinu a chlorogenových kyselin pomocí HPLC. Zmíněný obsah proteinů tedy zahrnuje proteiny, peptidy i aminokyseliny. U průměrných pražených zrn kávy Arabika by se obsah lipidů měl pohybovat v rozmezí 12-18 % a obsah proteinů v rozmezí 11-13 % pro zelené zrna a 13-15 % pro pražená. Obsah kofeinu byl v zelených a pražených vzorcích na podobné úrovni, to je dáno jeho teplotní stabilitou, avšak během pražení může docházet k malým ztrátám kofeinu v důsledku sublimace. Hodnoty chlorogenových kyselin byly nižší oproti průměrné kávě Arabika, kdy by zrna měla obsahovat 5,5-8,0 % v zelených zrnech a 1,2-2,3 % v pražených zrnech. Chlorogenové kyseliny jsou na rozdíl od kofeinu tepelně nestabilní a během pražení silně degradují. Samotná rychlost degradace je dána podmínkami pražení, kdy při mírném pražení degraduje okolo 60 % a při silném téměř 100 % množství chlorogenových kyselin. Jedná se o sekundární metabolity kyseliny chinové a ferulové, které se podílejí na hořkosti a tmavší barvě kávy. Lipidy, proteiny a kofein v zelených a pražených zrnech byl v rozsahu běžné kávy Arabika.

Massimo F. Marcone (2004) se zabýval vlastnostmi kávových zrn Robusta pocházejících od ovíječe skvrnitého a cibetky africké. Vzorky zrn od obou druhů vykazovaly vyšší úroveň červeného barevného odstínu a celkovou větší tmavost oproti kontrolním nestráveným vzorkům. Při zvětšení povrchu zrn pomocí elektronového mikroskopu s rozlišením 10000x byly pozorovány mikro důlky na povrchu zrn, které byly vytvořené působením žaludečních šťáv a trávicích enzymů. To naznačuje, že kyselé látky a proteolytické enzymy žaludečních šťáv pronikají endokarpem zrn, kde reagují s povrchem. Při zvětšení zrn 1000x a 5000x byly kontrolní vzorky mnohem drsnější, relativní hladkost cibetkové kávy by mohla být způsobena odlupování vnějšího povrchu zrna během průchodu trávicím traktem a působením peristaltickým pohybem v systému cibetky. Cibetkové zrna byla také tvrdší a křehčí, což naznačuje možné změny mikrostrukturálních vlastností, díky vstupu trávicí šťáv do zrn. Během proteolýzy došlo ke vzniku jiných typů produktů v kávových zrnech u ovíječe skvrnitého a jiných u cibetky africké. To mělo za následek vznik rozdílných produktů Maillardovy reakce, a tedy i jiné chuti a aroma, což bylo dokázáno pomocí elektronického nosu. Zrna prošlá ovíječem skvrnitým vykazovala vyšší stupeň červených a žlutých odstínů, oproti zrnům cibetky africké, které navíc měli zelenější barvu. Rozdíl v barvě strávených zrn byl pozorován i mezi dvěma podskupinami afrických cibetek. Dále bylo potvrzeno působení proteolytických enzymů cibetky na zrno, kdy došlo ke ztrátám zásobních proteinů zrn, což může vést k aromatickým a chuťovým změnám. Stupeň proteolýzy se zároveň lišil mezi cibetkou africkou a ovíječem skvrnitým. V cibetkové nepražené kávě bylo dále pozorováno méně typů kolonií bakterií a zároveň až o dva řády méně enterických organismů, oproti kontrolním nepraženým vzorkům. U cibetkové kávy bylo i méně koliformních bakterií, tyto hodnoty mohou být způsobeny důkladným mytím zrn vodou po extrakci z trusu. Kávové třešně zpracovávané trávicím traktem cibetky procházejí určitým typem mokrého zpracování v důsledku okyselení v žaludku a následné fermentaci působením přirozené střevní mikroflóry. Degradace slizu plodů kávy v žaludku cibetky může mít spojitost překyselením jejich žaludku. Při mokré

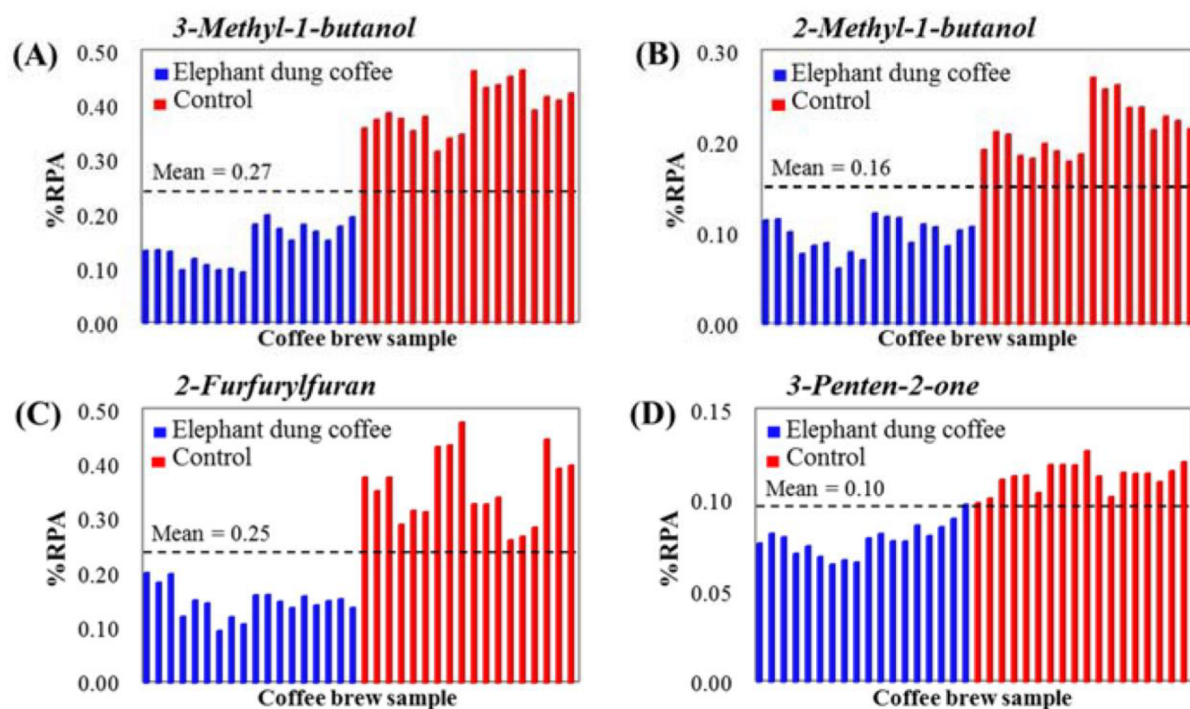


zpracování zrn jsou pro fermentaci preferovány bakterie mléčného kvašení, které jsou i hlavní kolonizační bakterie v trávicím traktu cibetek, což by mohlo mít spojitost s jejich charakteristickou chutí.

### 3.8 Předěšlé studie hodnotící sloní kávu

Studie Thammarat et al. (2018) se zabývala identifikací těkavých sloučenin a určením specifických markerů ve sloní kávě s použitím Static headspace plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií a chemometrickým vyhodnocením. Pomocí této metody bylo ve sloní kávě identifikováno 78 těkavých sloučenin patřících do 13 chemických tříd, včetně šesti alkoholů, pěti aldehydů, jedné karboxylové kyseliny, tří esterů, 17 furanů, jednoho furanonu, 13 ketonů, dvou oxazolů, čtyř fenolických sloučenin, 14 pyrazinů, jednoho pyridinu, osmi pyrrolů a tří sloučenin obsahujících síru. Kromě toho byly stanoveny čtyři potenciální diskriminační markery kávy ze sloního trusu, včetně 3-methyl-1-butanolu, 2-methyl-1-butanolu, 2-furfurylfuranu a 3-penten-2-onu. Studie zkoumala sloní kávu se vzorkem nedigestované kávy ze stejné plantáže. Navrhovaná metoda může být užitečná pro ověřování pravosti kávy ze sloního trusu a kontrolu kvality. Pro analýzu SHS byla zvolena teplota extrakce 80 °C s dobou měření GC-MS po dobu 60 minut. U každého vzorku bylo měření prováděno v hexaplikátu. Relativní standartní odchylky pro stanovení 78 těkavých sloučenin ve vzorcích se pohybovaly v rozmezích 1,8-15 %. Všechny vzorky vykazovaly podobné profily těkavých látek, což podporuje tvrzení výrobce, kdy měly být všechny vzorky ze stejné plantáže. Píky detekované na GC-MS chromatogramech byly identifikovány na základě srovnání jejich hmotnostních spekter s databází NIST 14. Hlavními sloučeninami nalezenými v obou sadách vzorků kávy byl aceton, methylpyrazin, furfural, 5-methylfurfural a 2-furanmethanol. Káva ze sloního trusu a kontroly mají podobný profil, vykazují stejných 78 těkavých sloučenin, což ukazuje, že žádné jedinečné sloučeniny sloní káva, analyzovanou pomocí současného přístupu SHS GC-MS, nevykazovala. Srovnáním relativních ploch píků obou sad vzorků bylo zjištěno, že pět sloučenin s nejvyšším průměrem této hodnoty v kávě ze sloního trusu je 2-furanmethanol (15,9 %), aceton (12,6 %), furfural (6,22 %), methylpyrazin (5,28 %) a 5-methylfurfural (5,21 %). Tyto hodnoty se blížily hodnotám kontrole. Analýza ostatních sloučenin ukázala relativně nižší množství 49 těkavých sloučenin v kávě ze sloního trusu, zatímco 29 sloučenin vykazovalo vyšší množství v kávě ze sloního trusu než v kontrolách. Dle kritéria p-hodnoty <0,01 45 těkavých sloučenin v kávě ze sloního trusu a kontrole se výrazně liší. První tři chemické třídy s nejvyšším % RPA v kávě ze sloního trusu jsou furany (34,8 %), pyraziny (22,9 %) a ketony (18,8 %). Přesto poskytují p-hodnotu  $\geq 0,01$ , která se nevýznamně liší od kontrolních dat. Pokud jde o všechny identifikované sloučeniny, sedm chemických tříd se významně liší (p-hodnota <0,01), včetně aldehydů, esterů, pyrrolů, pyridinů, alkoholů, fenolických sloučenin a oxazolů. Výběr markerů pro sloní kávu byl proveden pomocí jednosměrné ANOVA analýzy a T-statistiky. Na základě oneway ANOVA se 45 těkavých sloučenin významně lišilo mezi kávou ze sloního trusu a kontrolami a lze je použít jako markerové sloučeniny. Dále byla použita T-statistika, metoda pro testování významnosti dvou populací, k hodnocení těkavých sloučenin

ve sloním trusu a v kontrolních skupinách. Tento přístup vedl ke stejnému počtu (45) sloučenin, jako byl získán z jednoho způsobem ANOVA. Podle t-hodnot patří mezi 8 nejvýše hodnocených (10 % proměnných) sloučenin 3-methyl-1-butanol (-18,5), 2-methyl-1-butanol (-14,6), 3-penten-2-jeden (-13,0), 2-furfurylfuran (-12,5), furfurylmethylether (-9,91), 2-methyl-2-cyklopenten-1-on (-9,18), 2-methylbutanal (8,96) a 3-methylbutanal (8,30), které byly vybrány jako potenciálně dobré markerové sloučeniny pro kávu ze sloního trusu. Relativní plocha všech těkavých látek v kontrolní sadě byla větší než plocha těchto látek ve sloní kávě. To bylo nejspíše dáno trávením a fermentací zrn v gastrointestinálním traktu slonů.



Obrázek 2: Grafy možných markerů pro sloní kávu (Thammarat, 2018)

Jediná studie, která se zaměřila na měření podobných charakteristik, jako tato diplomová práce pochází od Haile et al. (2020), kdy porovnávaly antioxidační aktivitu a těkavé sloučeniny vzorků kávy, které byly připravené mokřím (WP) a suchým způsobem (DP) zpracování a následně byla porovnávána se sloní kávou (EP) v praženém i nepraženém stavu. Spolu s antioxidační aktivitou byl měřen celkový obsah fenolů (TPC), celkový obsah flavonoidů (TFC) a celkový obsah taninů (TTC). Antioxidační aktivita byla měřena pomocí metody pohlcování radikálů 2-difenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH) a metodou FRAP, kdy se měří redukující síla působící na železitý iont. Vzorky EP obsahovaly 2-hydroxymethylpyrrol, 3-methylfuran, 2-methylfuran, 2-ethyl-3-methylpyrazin a 2-hexanolové sloučeniny. Tyto látky byly nalezeny pouze u vzorků EP kávy, čímž by se mohlo jednat o potencionální markery původu. Hodnoty TPC byly nalezeny ve výrazně větším množství ve EP kávě oproti WP a DP kávě, přičemž jeho hodnota se snižovala s rostoucí teplotou pražení. Při světlém pražení tato káva dosahovala 14,08 GAEmg/ml kávového extraktu. Vyšší hodnoty TPC ve EP kávě může být daná průchodem trávicím traktem slona, kdy na něj působí různé látky, které mohou degradovat molekuly a zvýšit obsah fenolů. Nejnižších hodnot TPC dosahovaly zrna podrobená DP, to je nejspíše dáno tím, že při mokřím způsobu dochází činností bakterií a kvasinek k fermentačním

procesům a produkci kyseliny, alkoholů a enzymů, které zvyšují obsah antioxidantů a fenolů v kávě. Nejvyšší hodnoty TTC vykazovala oproti ostatním vzorkům EP káva při světlém a tmavém stupni pražení, zatímco DP vykazovalo nejvyšší hodnotu TTC mezi vzorky při středním pražení se EP kávou na druhém místě. Mírně vyšší hodnoty vykazovala EP káva oproti DP a WP i v TFC. Vzorky DP i WP dosahovaly při všech úrovních pražení podobných hodnot. Hladina TFC ve vzorcích se stupněm pražení klesala. Při světlém pražení WP, DP a EP káva dosahovaly hodnot 7,05, 6,99 a 8,27 QE mg/ml kávového extraktu. U DPPH aktivity došlo k poklesu hodnot ze zvyšujícím se stupněm pražení. Při světlém pražení bylo procento inhibice DPPH 39,74 % u EP kávy, což bylo nejvíce oproti vzorkům DP a WP kávy. Při středním pražení nejvyšších hodnot dosahovaly vzorky DP, následované WP a EP kávou, přičemž rozdíly byly minimální. Při tmavém pražení EP káva vykazovala znovu nejvyšší hodnoty aktivity vychytávání radikálů DPPH, ale rozdíly byly opět minimální. Těkavé sloučeniny byly určeny pomocí statické plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Bylo identifikováno okolo 37 těkavých sloučenin kyselin, alkoholů, aldehydů, amidů, esterů, etherů, furanů, furanonů, ketonů, fenolů, pyrazinů, pyridinů, heterocyklických N a funkčních tříd pyrrolů. Jednou z nejhojněji vyskytujících se látek byl 2-furanmethanol, kdy větší množství bylo nalezeno v WP, než DP a EP kávě. Konkrétně 7,54; 4,11 a 4,76 mg/l kávového extraktu ze zrn. Druhou nejvíce zastoupenou látkou byla kyselina octová s koncentrací 2,38, 4,17 a 3,10 mg/l kávového extraktu v EP kávě, WP a DP. Koncentrace 2-methylpyrazinu byla nižší ve vzorcích EP kávy a DP než ve vzorcích WP, konkrétně 1,20, 2,74 a 3,86 mg/l uvařené kávy. Množství pyridinu bylo 1,33, 1,75 a 1,74 mg/l uvařené kávy ze zrn EP kávy, WP a DP. Průměrné koncentrace 2,6-dimethylpyrazinu ve EP kávě, WP a DP byly 1,20, 0,92 a 1,48 mg/l. WP káva (2,01 mg/l) měla vyšší obsah furfuralu, dvakrát vyšší než u vařené EP kávy (0,87 mg/l) a DP (1,08 mg/l). Koncentrace 2-methylbutanalů byla ve EP kávě a DP 0,52 mg/l a 0,43 mg/l uvařené kávy, přičemž u WP detekován nebyl. Káva EP, WP a DP měla 1,21, 1,37 a 1,46 mg/l 2-ethylpyrazinu ve vařené kávě, v daném pořadí. WP káva měla 2,93 mg/l 2-methyltetrahydrofuran-3-onu. V kávě EP a DP však 2-methyltetrahydrofuran-3-on detekován nebyl. EP káva obsahovala jako jediné tyto sloučeniny: 2-hydroxymethylpyrrol (0,11 mg/l), 3-methylfuran (0,10 mg/l), 2-methylfuran (0,08 mg/l), 2-ethyl-3-methylpyrazin (0,06 mg/l) a 2-hexanol (0,03 mg/l). Celková koncentrace furanů byla 10,94, 6,25 a 5,34 mg/l kávového extraktu při ošetření WP, EP kávy a DP. Celková koncentrace pyrazinů byla u EP kávy 3,59 mg/l, WP 4,78 mg/l a DP 4,22 mg/l. Získané hodnoty byly zpracovány analýzou hlavních složek (PCA) a hladina významnosti byla získána pomocí ANOVY.

## 4 Metodika

### 4.1 Vzorky kávy

Vzorky konvenční kávy Arabika (pěstované v Pang Khon, Thajsko), cibetkové kávy Arabika Kopi Luwak (Bali, Indonésie) a kávy Black Ivory pocházející ze slonů (Thajsko) byly zakoupeny od komerčních distributorů (Čajový dýchánek, Dobruška, Česká republika; Johnny's coffee, Omice, Česká republika a společnost Black Ivory Coffee). Vzorky byly vybírány na

základě co největší vzájemné podobnosti s ohledem na genetický (káva Arabika), ale i geografický původ (jihovýchodní Asie – tedy Thajsko a Indonésie). Pokud víme, Black Ivory Coffee Company v Thajsku je jediným celosvětovým distributorem sloní kávy, zatímco distribuce cibetkové kávy je téměř výhradně omezena na Indonésii.

## 4.2 Příprava vzorků

Pokud není uvedeno jinak, všechny testy využívaly extrakty připravené postupem popsaným v této části. Vzorky kávy byly namlety kávovým mlýnkem Silvercrest SKMS 150 A1. Množství 100 mg jemně mleté kávy bylo smícháno s 10 ml horké vody (100 °C), ponecháno stát po dobu 5 minut, vortexováno po dobu 1 minuty a odstředěno. Vzorky byly skladovány při -20 °C.

## 4.3 Chemikálie, činidla a standardy

2,2'-Azobis(2-amidinopropan) dihydrochlorid (AAPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina (ABTS), 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina (Trolox), sodná sůl fluoresceinu (FL), činidlo Folin-Ciocalteu (F-C), peroxidisíran amonný (APS) a standardy analytické čistoty kofeinu, kyseliny chlorogenové, kyseliny gallové, kyseliny skořicové a kyseliny kávové byly získány ve společnosti Sigma–Aldrich (Praha, Česká republika). Rozpouštědla a kyseliny analytické kvality, včetně methanolu (MeOH), acetonitrilu (ACN), kyseliny octové (AA) byly zakoupeny od společnosti VWR (Praha, Česká republika). Činidlo Folin-Ciocalteu byl získán od Penty (Praha, Česká republika).

## 4.4 Antioxidační aktivita *in vitro*

### 4.4.1 Inhibice DPPH radikálů

Schopnost vzorků kávy inhibovat radikál DPPH byla stanovena mírnou modifikací dříve popsané metody (Sharma, 2009). Každý vzorek byl připraven v 96-jamkových mikrotitračních destičkách pomocí dvojnásobné ředící řady (100 µl v MeOH). Následně bylo do každé jamky přidáno 100 µl čerstvě připraveného 0,25 mM DPPH v roztoku MeOH, čímž se vytvořil rozsah koncentrací od 4,9 do 5000 µg/ml každého vzorku (konečný objem 200 µl). Takto připravené vzorky byly udržovány ve tmě při laboratorní teplotě a absorbance byla měřena po 30 minutách při 517 nm pomocí Synergy H1 reader (BioTek, Winooski, USA). Trolox byl použit jako pozitivní kontrola v koncentracích 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 254 a 512 µg/mL. Výsledky byly vyjádřeny jako poloviční maximální inhibiční koncentrace (µg/ml IC50) a poté přepočteny na ekvivalenty Troloxu (µg TE/mg kávy).

### 4.4.2 Test ekvivalentní antioxidační kapacity Trolox (TEAC)

Antioxidační test TEAC byl stanoven mírnou modifikací vylepšené metody odbarvování radikálových kationtů ABTS, kterou dříve popsal Re (Re, 1999). Radikál ABTS byl vytvořen

smícháním 5  $\mu\text{l}$  ABTS (7 mM) s 500  $\mu\text{l}$  APS (245 mM) a inkubací roztoku přes noc ve tmě při pokojové teplotě. Před vlastním experimentem byl radikál ABTS naředěn (na přibližně 1 % v/v) v PBS pufru, dokud nedosáhl hodnot absorbance  $\approx 0,700$  při 734 nm. Množství 10  $\mu\text{l}$  od každého vzorku bylo přeneseno do 96-jamkové mikrotitrační destičky. Poté bylo do každé jamky přidáno 190  $\mu\text{l}$  ABTS radikálu. Destičky byly inkubovány ve tmě při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Absorbance byla měřena při 734 nm. Vzorky kávy byly testovány v koncentraci 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Kalibrační křivka Troloxu byla získána pomocí sedmi koncentrací (0,156, 0,313, 0,625, 1,25, 2,5, 5 a 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; konečná koncentrace). Výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalenty Troloxu ( $\mu\text{g TE}/\text{mg kávy}$ ).

#### **4.4.3 Test absorbance kyslíkových radikálů (ORAC)**

Schopnost vzorků kávy zpomalit rozklad FL indukovaný radikálem AAPH byla stanovena mírnou modifikací dříve vyvinuté metody ORAC (Ou, 2001). Vzhledem k tomu, že jamky co nejbližší okraji mikrotitrační destičky neudrží konstantní teplotu jako ty blíže centru destičky, bylo do těchto napipetováno pouze 200  $\mu\text{l}$  destilované vody a sloužily pouze jako buffer zóna pro zbylé jamky (Held, 2005). Všechny reagenty a vzorky byly připraveny v 75 mM fosfátovém pufru (pH 7,0). Každý vzorek (25  $\mu\text{l}$ ) byl smíchán se 150  $\mu\text{l}$  FL (54 Nm) a inkubován při 37 °C po dobu 10 minut. Pro zahájení oxidační reakce bylo do každé jamky přidáno 25  $\mu\text{l}$  čerstvě připraveného AAPH (153 mM). Postupný pokles fluorescence byl měřen po 1-minutových intervalech po dobu 2 hodin s vlnovou délkou absorbance a emise nastavených na 490 a 519 nm (čtečka Synergy H1; BioTek, Winooski, USA). Standardní kalibrační křivky pozitivní kontroly Troloxu byly vytvořeny v pěti koncentračních úrovních (0,5, 1, 2, 4 a 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalenty Troloxu ( $\mu\text{g TE}/\text{mg kávy}$ ).

#### **4.4.4 Celkový obsah fenolů (TPC)**

Celkový obsah fenolů ve vzorcích kávy byl stanovený pomocí mírně modifikované metody (Singleton, 1999). Od každého vzorku bylo odebráno 100  $\mu\text{l}$ , které byly přidány do 96-jamkové mikrotitrační destičky s výslednou koncentrací 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Poté bylo do každé jamky přidáno 25  $\mu\text{l}$  Folin-Ciocalteuova činidla a okamžitě podrobena orbitálnímu třepání při cca. 500 ot./min. po dobu 10 minut. Následně bylo do každé jamky přidáno 75  $\mu\text{l}$  12%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a ponecháno 1 hodinu při 37 °C ve tmě. Výsledky byly stanoveny spektroskopicky při 700 nm (Synergy H1 reader; BioTek, Winooski, USA). Pro standardní referenční materiál byla použita kyselina gallová. Jako referenční látka byla použita kyselina gallová, ze které byla připravena 10-bodová kalibrační křivka (0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 a 128  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Výsledky byly vyjádřeny v ekvivalentech kyseliny gallové ( $\mu\text{g GAE}/\text{mg kávy}$ ).

#### **4.4.5 Celkový obsah flavonoidů (TFC)**

Celkový obsah flavonoidů byl měřen modifikovanou metodou dříve popsanou (Chandra, 2014). Do 96-jamkových mikrotitračních destiček bylo od každého vzorku napipetováno 100

$\mu\text{L}$ , ke kterým bylo přidáno 100  $\mu\text{L}$  10% chloridu hlinitého. Jako referenční látka byl použit kvercetin) o koncentracích 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 a 128 mg/mL. Po přidání roztoků do jamek byl roztok inkubován po dobu 60 minut při pokojové teplotě ve tmě. Absorbance byla následně měřena při vlnové délce 420 nm za použití čtečky mikrodestiček Synergy H1. Výsledky jsou vyjádřeny jako ekvivalenty kvercetinu ( $\mu\text{g}$  QE/mg kávy).

## 4.5 Chemické složení

### 4.5.1 HPLC/UV analýza kofeinu a polyfenolů

Kyselina chlorogenová (kyselina 5-O-kafeoylchinová, 5-O-CQA), kofein (CAF), kyselina gallová (GLA), kyselina skořicová (CNA) a kyselina kávová (CAFA) ve vzorcích kávy byly analyzovány s použitím dříve popsané metody využívající HPLC-UV (Tauchen, 2015). Přístroj sestával ze systému Ultimate 3000 jež byl vybaven V/Vis detektorem (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). Analyty byly separovány na koloně ACE 100A Excel 2  $\mu\text{m}$  C18-Amide (150 x 4,6 mm, Advanced Chromatography Technologies Ltd, Aberdeen, Skotsko). Gradientová eluce byla provedena za použití mobilních fází A (voda s 0,5% kyselinou octovou) a B (acetonitril s 0,5% kyselinou octovou) v následujících poměrech (A:B): 96:4 v 0 min, 85:15 v 10 min, 79 :21 v 14 min, 78:22 v 25 min, 59:41 v 34 minut, 0:100 v 38 min, 0:100 v 48 min, 96:4 v 51 mi a 96:4 v 61 min. Objem nástřiku byl stanoven na 10  $\mu\text{L}$ , průtok na 1 ml/min a teplota termostatu na 33 °C. Detekce analytů byla provedena v rozsahu vlnových délek 194 a 500 nm. Kvantifikace byla provedena při 260 a 300 nm. Data byla vyhodnocena pomocí softwaru Chromeleon 7.2 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Standardní kalibrační křivka každého analytu byla vytvořena v koncentračním rozsahu 100-2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pomocí šesti koncentračních bodů (100, 50, 20, 10, 5 a 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Množství 5-O-CQA, CAF, GLA, CAN a CAFA bylo vyjádřeno v % obsahu v suchém vzorku kávy. Všechny analýzy byly provedeny v triplicátu.

### 4.5.2 GC-SPME-MS analýza těkavých látek v kávě

Těkavý profil látek byl stanoven SPME extrakcí a následnou analýzou pomocí GC-MS, dříve popsané Várady et al. (Várady, 2022) a Fraňková et al. (Frankova, 2021). Všechny vzorky byly měřené v triplicátech, kdy do každé vialky bylo naváženo 500 mg čerstvě namletého vzorku. GC-MS analýza byla provedena pomocí GC pece Agilent 7890A a hmotnostního spektrometru 5975C (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) a autosampleru CombiPal (CTC Analytics AG, Zwingen, Švýcarsko). Těkavé látky byly absorbovány na SPME vlákno potažené kombinovanou DVB/CAR/PDMS fází (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Vzorky byly kondicionovány při teplotě 40 °C po dobu 10 minut a následně sorbovány 15 minut při stejné teplotě. K desorpci těkavých látek došlo na vstupu GC při nastavené teplotě 230 °C po dobu 10 minut v splitless režimu přístroje. K separaci složek došlo na HP-5MS koloně (30 m, vnitřní průměr 0,25 mm, 0,25  $\mu\text{m}$ , Agilent, Santa Clara, CA, USA). Jako nosný plyn bylo použito helium s průtokem 1 ml/min. Teplotní program pece byl nastaven na zvyšování teploty ze 40 °C na teplotu 180 °C s rychlostí 5 °C/min. Po minutě udržování teploty 180 °C, se teplota rychlostí 30 °C/min zvyšovala na 280 °C. Teplota kvadrupólu byla udržována na 150 °C a teplota iontového

zdroje na 230 °C. Sloučeniny byly měřeny ve skenovacím režimu 45-550 m/z. Těkavé látky byly identifikovány porovnáním získaných spekter a retenčních indexů vypočítaných dle Kováts (Kováts, 1958) se standardní referenční databází NIST č. 69 (National Institute of Standards and Technology) (NIST Chemistry WebBook: Standard Reference Database 69, 1996). Po prohlídce spektra byly všechny látky s retenčním časem větším jak 25,5 minuty vyřazeny, jelikož velikost těchto píků byla minimální a nebylo by možné zcela jistě určit tyto látky. Obsah určených látek byl vyjádřen ve formě procentuální zastoupení relativní oblasti píku (RPA %), kde se jednalo o plochu daného píku ku celkové ploše píků vzorku.

#### **4.6 Statistická analýza**

Všechna data byla získána vždy v triplikátech (GC-MS + HPLC/UV analýzy) a/nebo v triplikátech ve třech nezávislých testech (*in vitro* antioxidační aktivita). Statistické zhodnocení dat bylo provedeno pomocí programu Statistica 14.0.1 (TIBCO Software) pro ANOVA analýzu s post-hoc Tukey-ho HSD testem a pro zjištění korelace mezi signifikantními rozdíly. Pro analýzu hlavních komponent (PCA) byl využit internetový software MetaboAnalyst 6.0, přičemž vstupní data byla škálována pomocí Pareto škálování.

## 5 Výsledky

Vzorky sloní kávy vykazovaly výrazně nižší hodnoty DPPH, ORAC, ABTS, TPC a TFC oproti zbylým vzorkům, leč obsahovaly 2-methylbutanal, 2-methylfuran a 3-methylbutanal, které nebyly přítomny v konvenční Arabice. Ve sloní kávě se dále nepodařilo detekovat 2-ethyl-3-methylpyrazin, 2-ethyl-5-methylpyrazin a 2-ethyl-5-methylpyrazin, které byly ve zbylých dvou vzorcích přítomné. Z hlediska chemického složení, dosahovala sloní káva stejné hladiny kofeinu, jako cibetková káva, avšak nižší hodnoty kyseliny chlorogenové oproti zbylým vzorkům. Obsah kyseliny gallové, skořicové a kávové se u všech tří vzorků pohyboval na podobné hladině.

### 5.1 Antioxidační aktivita

Při antioxidační analýze se práce zaměřila na sledování hodnot DPPH, ORAC, ABTS, TPC a TFC, kdy získané výsledky jsou patrné v tabulce 1. Sloní káva dosahovala ve všech těchto hodnotách nejnižších výsledků, konkrétně 19,67  $\mu\text{g TE/mg}$  pro DPPH, 250,85  $\mu\text{g TE/mg}$  pro ORAC, 81,84  $\mu\text{g TE/mg}$  pro ABTS, 26,35  $\mu\text{g GAE/mg}$  pro TPC a 1,38  $\mu\text{g QE/mg}$  pro TFC. Naopak vůči tomu, konvenční vzorek kávy Arabika dosahoval v těchto parametrech nejvyšších hodnot, mimo hodnoty ORAC, kdy konvenční káva měla hodnotu DPPH 44,14  $\mu\text{g TE/mg}$ , ORAC 289,990  $\mu\text{g TE/mg}$ , ABTS 125,97  $\mu\text{g TE/mg}$ , TPC 34,91  $\mu\text{g GAE/mg}$  a TFC 2,15  $\mu\text{g QE/mg}$ . Vzorek cibetkové kávy dosahoval středních hodnot, u většiny měření, v porovnání s dvěma předchozími vzorky. Respektive 32,23  $\mu\text{g TE/mg}$  pro DPPH, 314,19  $\mu\text{g TE/mg}$  pro ORAC, 104,78  $\mu\text{g TE/mg}$  pro ABTS, 32,69  $\mu\text{g GAE/mg}$  pro TPC a 1,73  $\mu\text{g QE/mg}$  pro TFC.

Tabulka 1: Antioxidační aktivita a celkový obsah fenolů a flavonoidů (průměr  $\pm$  SD) testovaných vzorků kávy

Druh vzorku	DPPH	ORAC	ABTS	TPC	TFC
		$\mu\text{g TE/mg}$		$\mu\text{g GAE/mg}$	$\mu\text{g QE/mg}$
Konvenční káva	44.14 $\pm$ 13.28	289.99 $\pm$ 75.93	125.97 $\pm$ 14.22	34.91 $\pm$ 4.88	2.15 $\pm$ 0.46
Cibetková káva	32.26 $\pm$ 7.97	314.19 $\pm$ 79.60	104.78 $\pm$ 15.76	32.69 $\pm$ 10.64	1.73 $\pm$ 0.40
Sloní káva	19.67 $\pm$ 2.86	250.85 $\pm$ 60.35	81.84 $\pm$ 7.78	26.35 $\pm$ 3.08	1.38 $\pm$ 0.28

### 5.2 Chemické složení

V tabulce 2 jsou patrné sloučeniny změřené pomocí HPLC/UV. Všechny tři druhy kávy dosahovaly podobných hodnot kyseliny gallové, skořicové a kávové. Odlišovaly se pouze obsahem kofeinu a kyselinou chlorogenovou. Sloní káva vykazovala 0,93 % kofeinu, 0,33 % kyseliny chlorogenové, 0,018 % kyseliny gallové, 0,009 % kyseliny skořicové a 0,017 % kyseliny kávové. Tato káva měla nejnižší obsah kyseliny chlorogenové a stejné množství kofeinu, jako cibetková káva, ale méně než konvenční káva. Konvenční káva obsahovala 1,33 % kofeinu a 0,36 % kyseliny chlorogenové. Cibetková káva obsahovala 0,93 % kofeinu a 0,44 % kyseliny chlorogenové, což bylo nejvíce, ze všech vzorků.



Tabulka 2: Chemické složení (průměr ± SD) testovaných vzorků kávy pomocí HPLC/UV

Druh vzorku	Kofein	Kyselina chlorogenová	Kyselina gallová		
			Kyselina gallová	Kyselina skořicová	Kyselina kávová
%					
Konvenční káva	1.33 ± 0.13	0.36 ± 0.04	0.017 ± 0.0006	0.011 ± 0.0015	0.020 ± 0.002
Cibetková káva	0.93 ± 0.07	0.44 ± 0.03	0.016 ± 0.0001	0.010 ± 0.0004	0.019 ± 0.001
Sloní káva	0.93 ± 0.03	0.33 ± 0.01	0.018 ± 0.0003	0.009 ± 0.0001	0.017 ± 0.001

Po provedení GC-SPME-MS stanovení se podařilo identifikovat 25 látek. Tyto látky jsou zaznamenány v tabulce 3. Třemi nejzastoupenějšími látkami ve vzorcích byl furfurylalkohol, 5-methylfurfural a furfuryl acetát, které se pohybovaly v rozmezí 14,43 až 32,73 %RPA. Ve vzorcích cibetkové kávy se podařilo stanovit všech 25 identifikovaných látek. U konvenční kávy Arabika nebyl detekován 2-methylbutanal, 2-methylfuran a 3-methylbutanal. U sloní kávy se nepodařilo detekovat 2-ethyl-3-methylpyrazin, 2-ethyl-5-methylpyrazin a cyklopenten-1-on. Při porovnání sloní kávy s konvenční, tak sloní káva vykazovala vyšší hodnotu furfuryl acetátu, furfurylalkoholu, methylpyrazinu, pyridinu, 3-ethyl-2,5-dimethylpyrazinu, 1-(1H-pyrrol-2-yl)ethanonu, octové kyseliny, pentan-2,3-dionu a propanové kyseliny. U ostatních detekovaných látek byla jejich hladina nižší oproti konvenční kávě.

Tabulka 3: Chemické složení (průměr ± SD) testovaných vzorků kávy pomocí GC-SPME-MS

Číslo sloučeniny	Sloučenina	Kovátsův index	NIST	Konvenční káva	RPA%	
					Cibetková káva	Sloní káva
1	Furfuryl acetát	996	998	14.46 ± 0.00	20.96 ± 0.56	18.00 ± 0.03
2	5-methylfurfural	968	969	21.21 ± 2.37	14.43 ± 2.23	15.77 ± 2.25
3	Furfurylalkohol	862	866	30.79 ± 1.95	23.72 ± 4.14	32.73 ± 3.14
4	Furfural	839	829	8.63 ± 0.28	4.65 ± 0.36	7.00 ± 0.62
5	Pyrazin	724	672	0.20 ± 0.05	0.28 ± 0.03	0.43 ± 0.03
6	Methylpyrazin	824	824	6.97 ± 0.21	7.26 ± 0.56	8.84 ± 1.01
7	Pyridin	737	740	2.68 ± 0.44	5.65 ± 0.78	6.28 ± 0.06
8	2-ethyl-3-methylpyrazin	1008	1000			
9	3-ethyl-2,5-dimethylpyrazin	1081	1083	2.69 ± 0.39	7.01 ± 1.06	Nedetekováno
10	N-Acetyl-4H-pyridin	1024	1038	1.94 ± 0.21	2.16 ± 0.38	3.73 ± 0.63
11	1-Acetoxy-propan-2-one	872	876	1.28 ± 0.13	0.86 ± 0.13	1.13 ± 0.25
12	2-methylbutanal	654	656	4.86 ± 0.35	5.12 ± 1.16	3.57 ± 0.38
13	1-furfurylpyrrol	1194	1162	Nedetekováno	0.64 ± 0.28	1.18 ± 0.32
14	Furfuryl formiát	909	902	1.28 ± 0.13	0.86 ± 0.13	1.13 ± 0.25
15	2-ethyl-5-methylpyrazin	1003	1004	1.63 ± 0.39	1.52 ± 0.45	1.09 ± 0.17
16	D-Limonen	1033	1035	2.69 ± 0.39	7.01 ± 1.06	Nedetekováno
17	2-methylfuran	611	603	4.53 ± 0.63	0.41 ± 0.06	0.82 ± 0.21
18	1-(1H-pyrrol-2-yl)ethanon	1067	1063	Nedetekováno	0.64 ± 0.06	0.94 ± 0.03
19	Octová kyselina	618	602	0.37 ± 0.02	0.44 ± 0.08	0.46 ± 0.06
20	2,3-dimethyl-2-cyklopenten-1-on	1044	1052	1.33 ± 0.18	1.14 ± 0.19	1.55 ± 0.23
				0.95 ± 0.16	0.81 ± 0.14	0.67 ± 0.21

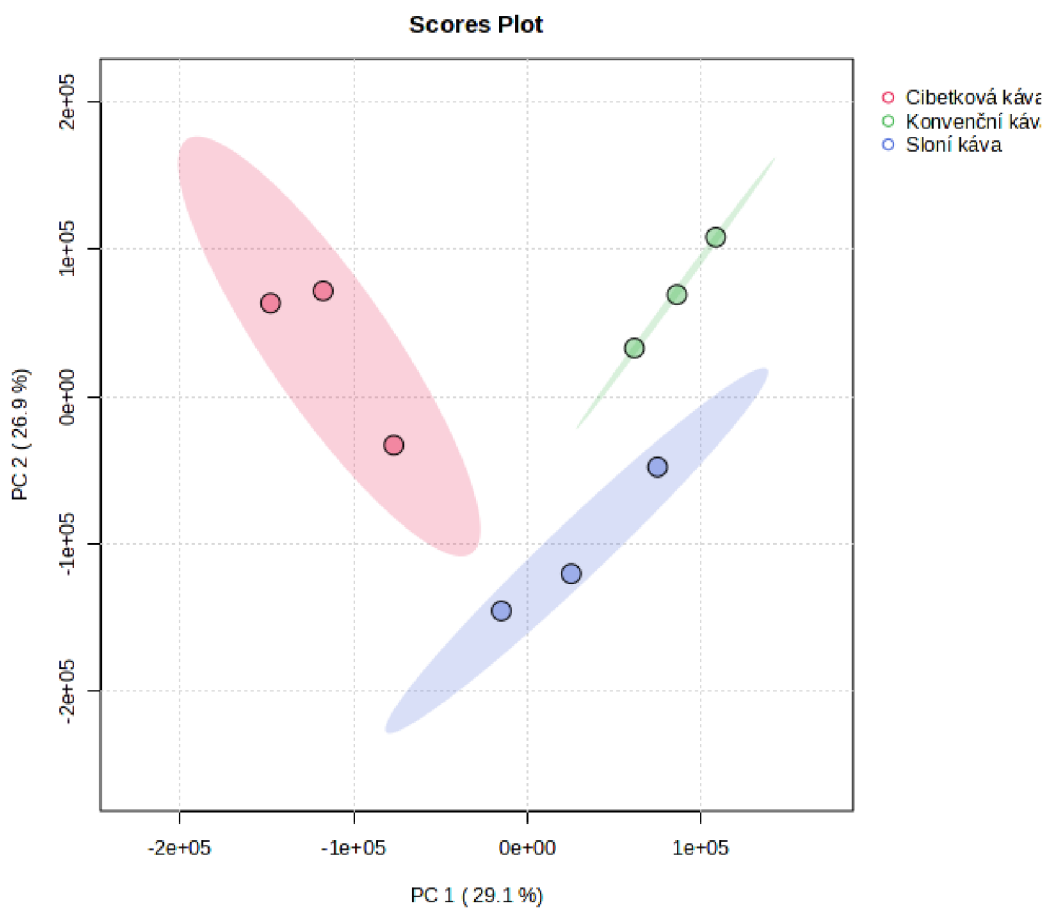
Tabulka 3: (pokračování)

21	Pentan-2,3-dion	684	696	0.13 ± 0.02	0.28 ± 0.12	0.30 ± 0.11
22	2-methylbutanová kyselina	878	886,2	0.32 ± 0.05	0.36 ± 0.12	0.20 ± 0.03
23	3-ethyl-2-hydroxy-2-cyklopenten-1-on	1098	1082	0.48 ± 0.03	0.73 ± 0.02	Nedetekováno
24	Propanová kyselina	701	702	0.34 ± 0.15	0.21 ± 0.06	0.36 ± 0.09
25	3-methylbutanal	647	649	Nedetekováno	0.11 ± 0.01	0.185 ± 0.004

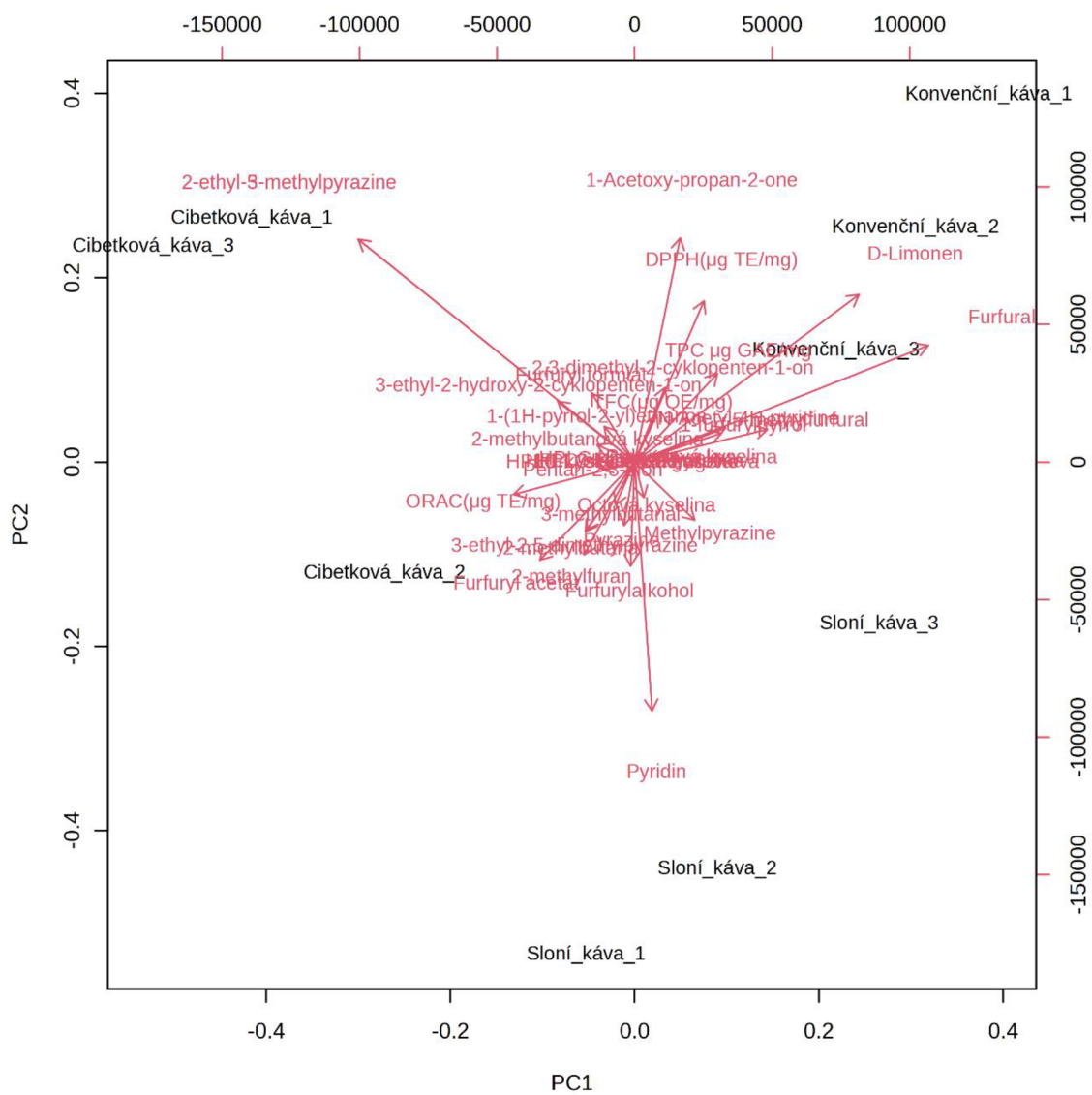
Poznámka; RPA%: procentuální zastoupení relativní oblasti píku

### 5.3 Statistická analýza

V rámci studie byla provedena PCA analýza hlavních komponent na hladině pravděpodobnosti 95 % ( $p < 0,05$ ), ze které jsou výstupy zpracované ve formě grafů viz obrázek 3 a obrázek 4. V prvním grafu je patrné rozdělení vzorků dle naměřených hodnot do tří samostatných oblastí a ve druhém grafu jsou znázorněny jednotlivé ukazatele a míra jejich závislosti na určení daných oblastí pro skupiny vzorků. Po provedení této PCA analýzy, byla následně vyloučena ORAC metoda, kvůli odchylce dat, která zkreslovala výsledek. To je patrné i ve směrodatné odchylce ORAC (viz tabulka 1) kdy se pohybovala od 60,35 do 75,93  $\mu\text{g TE/mg}$ . Ze zbylých ukazatelů byla následně vypracována ANOVA s  $p < 0,05$  a post-hoc Tukey-ho HSD testem. Celkem se podařilo určit 5 faktorů se signifikantním rozdílem. Jednalo se o DPPH testování, D-limonen, pyrazin, 2-ethyl-3-methylpyrazin a 2-ethyl-5-methylpyrazin. U DPPH, 2-ethyl-3-methylpyrazinu a 2-ethyl-5-methylpyrazinu byl signifikantní rozdíl mezi všemi třemi druhy vzorků. U D-limonenu cibetková káva, se sloní kávou spadaly do stejné skupiny, zatímco konvenční káva, se signifikantně odlišovala a u pyrazinu spadala konvenční káva s cibetkovou do stejné skupiny, zatímco sloní se odlišovala. Hodnoty DPPH pozitivně korelovaly s antioxidačními stanoveními ABTS, TFC, TPC ( $p < 0,05$ ). D-limonen koreloval nejvíce s pyridinem, furfurelem, 5-methylfurfurelem, kofeinem a kyselinou kávovou. Pyrazin v rámci chemického složení silně koreloval s pyridinem, 2-methylbutanalem a skořicovou kyselinou. 2-ethyl-3-methylpyrazin a 2-ethyl-5-methylpyrazin společně silně korelovaly v rámci chemického složení s kyselinou gallovou, kyselinou chlorogenovou a 3-ethyl-2-hydroxy-2-cyklopenten-1-onem.



Obrázek 3: Graf komponentních vah PC1 a PC2 dle měřených ukazatelů



Obrázek 4: Graf komponentních vah PC1 a PC2 s jednotlivými měřenými ukazateli

## 6 Diskuze

Cílem této diplomové práce bylo zjistit změny v chemickém složení sloní kávy ve srovnání s kávou konvenční a cibetkovou. Chemické složení sloní kávy bylo již dříve zkoumáno dvěma studii. Tyto však zůstávají velice omezené a využívají zejména vzorky získané experimentální formou (Thammarat, 2018; Haile, 2020). Podle našeho nejlepšího vědomí je tato studie první, která determinuje chemické složení komerčně dostupných vzorků sloní kávy (Black Ivory Coffee). Je obecně známo, že samotné zpracování kávy, zejména pak pražení, může mít výrazný vliv na změny chemického složení (Wei, 2015; Liao, 2022). Z tohoto důvodu je žádoucí zajistit zelená zrna od všech vzorků a následně je upražit za stejných podmínek. Po předchozí vzájemné komunikaci, nám společnost Black Ivory Coffee odmítla poskytnout nestrávená zelená zrna, a proto nebylo možné porovnat rozdíl mezi zrny před a po strávení. Je rovněž poměrně hojně popsáno i to, že země původu může výrazně hrát roli v typickém chemickém složení daného vzorku kávy (Risticvic, 2008; Akiyama, 2008; Costa Freitas, 1999). Z tohoto důvodu tato studie zajistila vzorky z podobných oblastí (jihovýchodní Asie – Thajsko a Indonésie).

Jedná se o první studii, která uplatnila HPLC/UV pro zjištění chemického složení sloních kávových zrn. Sloní káva, spolu s cibetkovou byla výrazně chudší na kofein. Toto zjištění odpovídá předpokladu, že část kofeinu zrn, spolu s ostatními látkami, je absorbována či degradována fermentací v těle zvířat (Thammarat, 2018; Haile, 2020; Ifmalinda, 2019). Hodnoty kyseliny chlorogenové, gallové, skořicové a kávové dosahovaly téměř stejných hodnot a rozdíly v jejich obsahu byly minimální. Nutno podotknout, že jejich množství v zrnech se pohybovalo pod 1 %. Studie Pokhrel et al. (2016), která zkoumala množství kofeinu v konvenční kávě a čaji z Nepálu, pomocí HPLC, se v množství kofeinu shodovala s daty této práce, kdy jejich káva dosahovala hodnot 1,19-1,33 % kofeinu. Dále studie Rubiyanti (2019) použila HPLC pro stanovení množství kofeinu v indonéské Kopi Luwak, kde cibetková káva dosahovala 1,13 % kofeinu, tedy mírně větší hodnoty než v případě našich vzorků.

DPPH dosahovala nejnižších hodnot u sloní kávy. Vzorky neměli informace k pražení, ale lze předpokládat, že byl použit střední stupeň pražení. V tomto případě dochází ke shodě se studií Haile et al. (2020), kdy nejvyšší stupeň DPPH vykazovala konvenční káva zpracovaná suchou či mokrou metodou a až následně sloní káva. Stejný trend byl v minulosti pozorován i u cibetkové kávy, která vykazovala nižší hodnotu oproti konvenční kávě (Cheong, 2013). Hodnota DPPH cibetkové kávy byla vyšší, než sloní, lze předpokládat, že je to ovlivněno rozdílnou dobou trávení zvířat.

Studie Haile et al. (2020) se taktéž zaměřila na obsah TPC a TFC. Při středním pražení vykazovala sloní káva zkoumaná Haile et al. o 1-2 mg GAE/mL kávy vyšší hodnoty TPC oproti konvenční kávě. Podobný trend následoval i u TFC. To je očekávané, díky tomu, že flavonoidy se řadí do fenolů a jsou tedy vzájemně korelované (Mutha, 2021). Obě metody však mají značné limity. U TPC dochází k interferenci s ostatními látkami (např. aminokyselinami; (MacDonald-Wicks, 2006). Metoda TFC je zase striktně zaměřená na měření alkoholových forem flavonoidů, tzv. flavanolů (kvercetin, rutin atd.; Peřkal, 2014). Výsledky z těchto metod se tedy musí brát se značnou rezervou. V této diplomové práci byl zjištěn trend, kdy vzorky

konvenční Arabiky dosahovaly nejvyšších hodnot a sloní káva byla na tyto sloučeniny chudší. Z hlediska ABTS nebyla dostupná ke sloní a cibetkové kávě žádná data, ale změřené hodnoty následovaly trend ostatních antioxidačních stanovení, kdy nejvyšší hodnoty dosahovala konvenční káva, následovaná cibetkovou a nejmenší obsah vykazovala sloní káva. Studie Kaisangsri et al. (2020) vyhodnocovala ABTS na množství Troloxu v mg/ml kávy pro konvenční Arabiky a Robusty. Zde jim kávy Arabika dosahovaly hodnot 0,361 až 1,019 mg TE/ml kávy. Pokud převedeme námi získaná data, tak hodnoty pro ABTS se pohybují v mnohem nižší hodnotách, než udává studie. Na druhou stranu hodnoty zelených zrn zkoumané Di Stefano et al. (2023) a pražených zrn Acidri et al. (2020) se velmi blížily námi získaným hodnotám.

Předchozí studie Haile et al. (2020) porovnávala těkavé látky konvenční kávy zpracované suchou a mokrou metodou se sloní kávou. Podařilo se určit 4 látky, které nebyly přítomny v konvenční kávě a mohlo by se jednat o potencionální markery původu. Jednalo se o 2-hydroxymethylpyrrol, 3-methylfuran, 2-methylfuran, 2-ethyl-3-methylpyrazin a 2-hexanol. 2-hexanol, 2-hydroxymethylpyrrol a 3-methylfuran se nepodařilo stanovit ani u jednoho ze vzorků a 2-ethyl-3-methylpyrazin byl v našem případě detekován v konvenční i cibetkové kávě, ale naopak se nenacházel ve sloní. Této práci se podařilo taktéž stanovit 2-methylfuran ve sloní kávě, avšak byl přítomný i v cibetkové kávě. Tedy jeho přítomnost může být spojena s procesem trávení. Literatura dále uvádí, že se nachází ve většině konzervovaných a zavařovaných potravin, včetně dětské výživy, konzervovaných mořských a masných produktů a rajčatových protlaků (Scholz, 2019). Vznik 2-methylfuranu je dáván ve spojitost s oxidací polynenasycených mastných kyselin, kyseliny askorbové, karotenoidů, nebo tepelnou degradací redukcujících cukrů a aminokyselin (Stadler, 2017).

Studie Thammarat et al. (2018) stanovila jako potencionální markery sloní kávy 3-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-butanol, 2-furfurylfuran a 3-penten-2-on, kdy všechny zmíněné sloučeniny vykazovaly vyšší hodnoty ve sloní kávě oproti konvenční (viz obrázek 2). Z těchto zmíněných byl v této práci identifikován pouze 2-furfurylfuran, neboli furfurylalkohol, který vykazoval vyšší hodnoty oproti komerční kávě, avšak díky hodnotám směrodatné odchylky, lze říci, že dosahoval spíše velmi podobných hodnot.

U našich vzorků sloní kávy se dále nepodařilo detekovat 2-ethyl-5-methylpyrazin a cyklopenten-1-on. Díky tomu, by se mohlo jednat o potencionální markery autentičnosti sloní kávy. 2-Ethyl-5-methylpyrazin byl kromě kávy pozorován ve sladovém ječmenu (Beal, 1994), mase (Elmore, 2000) a mělo by se jednat o hlavní látku chuti sezamového oleje (Lu, 2005). Cyklopenten-1-on dle studie Moon et al. (2010) vzniká v kávě z kyseliny chlorogenové. Kromě kávy byl dále pozorován například ve fritovacích olejích (Takeoka, 1996) a byl pozorován při pečení fenylalaninu s furaneolem v autoklávu při 180 °C (Baltes, 1988).

## 7 Závěr

Práci se podařilo potvrdit hypotézu, ohledně předpokládaného nižšího množství chemických látek ve sloní kávě oproti konvenční. Dle předpokladu měla sloní káva nižší hodnoty DPPH, ORAC, ABTS, TPC a TFC v rámci antioxidační analýzy a nižší hodnoty kofeinu a dalších chemických látek. Toto je s největší pravděpodobností způsobeno procesem trávení zvířete. Porovnáním dat práce s předchozí literaturou, ohledně možných diskriminačních markerů, došlo ke zjištění, že z původních 5 navrhovaných látek byly ve vzorku naší sloní kávy nalezeny pouze dvě z těchto látek, přičemž 2-ethyl-3-methylpyrazin se nacházel ve všech vzorcích a 2-methylfuran byl stanoven ve sloní i cibetkové kávě, a tedy jeho vznik může opět souviset s procesem trávení. Ve vzorcích sloní kávy nebyl nalezen 2-ethyl-3-methylpyrazin, 2-ethyl-5-methylpyrazin a 3-ethyl-2-hydroxy-2-cyklopenten-1-on. Při ověřování autentičnosti sloní kávy by mohla hrát jejich absence zásadní roli při stanovení potencionálního falšování. Do budoucna by bylo vhodné provést další studie, které se budou problematikou sloní kávy dále zabývat. Bude nutné provést studii s větším množstvím vzorků a rozsáhlejším analytickým přístupem. Ideální by taktéž bylo získat zelená kávová zrna, která jsou podávána slonům a srovnat jejich chemické složení před a po trávení. Zvláštní pozornost by měla být kladena na nalezení a potvrzení diskriminačních markerů, které by umožnily spolehlivě rozlišit sloní kávu od ostatních, jelikož vzhledem k vysoké ceně sloní kávy, lze rovněž ve zvýšené míře předpokládat možnost falšování této kávy.

## 8 Literatura

ACIDRI, Robert, Yumiko SAWAI, Yuko SUGIMOTO, Takuo HANDA, Daisuke SASAGAWA, Tsugiyaki MASUNAGA, Sadahiro YAMAMOTO a Eiji NISHIHARA, 2020. Phytochemical Profile and Antioxidant Capacity of Coffee Plant Organs Compared to Green and Roasted Coffee Beans. *Antioxidants* [online]. **9**(2), 1-18 [cit. 2024-04-14]. ISSN 2076-3921. Dostupné z: doi:10.3390/antiox9020093

AKIYAMA, M., K. MURAKAMI, Y. HIRANO, et al., 2008. Characterization of Headspace Aroma Compounds of Freshly Brewed Arabica Coffees and Studies on a Characteristic Aroma Compound of Ethiopian Coffee. *Journal of Food Science* [online]. **73**(5), C335-C346 [cit. 2022-03-13]. ISSN 0022-1147. Dostupné z: doi:10.1111/j.1750-3841.2008.00752.x

ANON., 2021. *Coffea liberica*. *National Parks: Flora and Fauna Web* [online]. [cit. 2022-03-12]. Dostupné z: <https://www.nparks.gov.sg/florafaunaweb/flora/2/8/2820>

ARYA, Meenakshi a L. Jagan Mohan RAO, 2007. An Impression of Coffee Carbohydrates. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. **47**(1), 51-67 [cit. 2022-03-13]. ISSN 1040-8398. Dostupné z: doi:10.1080/10408390600550315

ASHIHARA, Hiroshi, 2006. Metabolism of alkaloids in coffee plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* [online]. **18**(1), 1-8 [cit. 2024-03-06]. ISSN 1677-0420. Dostupné z: doi:10.1590/S1677-04202006000100001

BALTES, Werner a Lutz MEVISSSEN, 1988. Model reactions on roast aroma formation. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* [online]. **187**(3), 209-214 [cit. 2024-04-14]. ISSN 0044-3026. Dostupné z: doi:10.1007/BF01043341

BEAL, Andrew D. a Donald S. MOTTRAM, 1994. Compounds contributing to the characteristic aroma of malted barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. **42**(12), 2880-2884 [cit. 2024-04-14]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf00048a043

*Black Ivory Coffee Company* [online], 2024. [cit. 2024-01-31]. Dostupné z: <https://blackivorycoffee.com/>

BRAGA, Ana Valéria Ulhano, Márcio André MIRANDA, Hiroshi AOYAMA a Flavio Luís SCHMIDT, 2023. Study on coffee quality improvement by self-induced anaerobic fermentation: Microbial diversity and enzymatic activity. *Food Research International* [online]. **165** [cit. 2024-03-03]. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2023.112528

BRIOSCHI JUNIOR, Dério, Rogério CARVALHO GUARÇONI, Marliane DE CÁSSIA SOARES DA SILVA, et al., 2021. Microbial fermentation affects sensorial, chemical, and microbial profile of coffee under carbonic maceration. *Food Chemistry* [online]. **342** [cit. 2024-03-03]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2020.128296

BURNIE, David, ed., 2002. Zvíře. In: *Zvíře*. Praha: Knižní klub, s. 204. ISBN 802420862-8.



- BURNIE, David, ed., 2002. Zvíře. In: *Zvíře*. Praha: Knižní klub, s. 220-221. ISBN 802420862-8.
- CLAUSS, Marcus, Hanspeter STEINMETZ, Ulrike EULENBERGER, Pete OSSENT, Robert ZINGG, Jürgen HUMMEL a Jean-Michel HATT, 2007. Observations on the length of the intestinal tract of African *Loxodonta africana* (Blumenbach 1797) and Asian elephants *Elephas maximus* (Linné 1735). *European Journal of Wildlife Research* [online]. 2007-1-26, **53**(1), 68-72 [cit. 2024-01-30]. ISSN 1612-4642. Dostupné z: doi:10.1007/s10344-006-0064-0
- COSTA FREITAS, A.M a A.I MOSCA, 1999. Coffee geographic origin — an aid to coffee differentiation. *Food Research International* [online]. **32**(8), 565-573 [cit. 2022-03-13]. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/S0963-9969(99)00132-5
- DA SILVA, Marliane de Cássia Soares, Tomás Gomes Reis VELOSO, Dério BRIOSCHI JUNIOR, et al., 2023. Bacterial community and sensory quality from coffee are affected along fermentation under carbonic maceration. *Food Chemistry Advances* [online]. **3** [cit. 2024-03-03]. ISSN 2772753X. Dostupné z: doi:10.1016/j.focha.2023.100554
- DI STEFANO, Vita, Carla BUZZANCA, Fortunato RUVUTUSO, Dario SCUDERI, Eristanna PALAZZOLO, Giovanni GUGLIUZZA, Ilenia TINEBRA a Vittorio FARINA, 2023. Chemical composition and anti-radical properties of coffee cherry cultivated in Mediterranean climate. *Food Bioscience* [online]. **56**, 1-11 [cit. 2024-04-14]. ISSN 22124292. Dostupné z: doi:10.1016/j.fbio.2023.103349
- DIPPONG, Thomas, Monica DAN, Melinda Haydee KOVACS, Evoke Dalma KOVACS, Erika Andrea LEVEL a Oana CADAR, 2022. Analysis of Volatile Compounds, Composition, and Thermal Behavior of Coffee Beans According to Variety and Roasting Intensity. *Foods* [online]. **11**(19), 1-15 [cit. 2024-03-09]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods11193146
- DOMBROWSKI, Jennifer, 2013. *Luxe Adventure Traveler* [online]. [cit. 2024-01-31]. Dostupné z: <https://luxeadventuretraveler.com/black-ivory-worlds-most-expensive-coffee/>
- ELMORE, J.S., D.S. MOTTRAM, M. ENSER a J.D. WOOD, 2000. The effects of diet and breed on the volatile compounds of cooked lamb. *Meat Science* [online]. **55**(2), 149-159 [cit. 2024-04-14]. ISSN 03091740. Dostupné z: doi:10.1016/S0309-1740(99)00137-0
- FARAG, Mohamed A., Tarik A. MOHAMED, Enas A. EL-HAWARY a Amr ABDELWARETH, 2023. Metabolite Profiling of Premium Civet Luwak Bio-Transformed Coffee Compared with Conventional Coffee Types, as Analyzed Using Chemometric Tools. *Metabolites* [online]. **13**(2), 1-19 [cit. 2024-04-12]. ISSN 2218-1989. Dostupné z: doi:10.3390/metabo13020173
- FEBRIANTO, Noor Ariefandie a Fan ZHU, 2023. Coffee bean processing: Emerging methods and their effects on chemical, biological and sensory properties. *Food Chemistry* [online]. **412**, 1-20 [cit. 2024-03-12]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2023.135489

FEBRINA, Lizma, Nizar HAPPYANA a Yana Maolana SYAH, 2023. Metabolic Profiling, Antioxidant Activity, and Alpha-Glucosidase Inhibitory Activity of the Roasted Beans of Luwak (Civet) Coffee. *ACS Food Science & Technology* [online]. 2023-11-17, **3**(11), 1864-1876 [cit. 2024-04-12]. ISSN 2692-1944. Dostupné z: doi:10.1021/acsfoodscitech.3c00249

FRANKOVA, Adela, Anna MANOUROVA, Zora KOTIKOVA, et al., 2021. The Chemical Composition of Oils and Cakes of *Ochna serrulata* (Ochnaceae) and Other Underutilized Traditional Oil Trees from Western Zambia. *Molecules* [online]. **26**(17) [cit. 2024-04-07]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules26175210

GHOSH, Payel a Natarajan VENKATACHALAPATHY, 2014. Processing and Drying of Coffee - A review. *International Journal of Engineering Research & Technology* [online]. **3**(12), 784-794 [cit. 2024-03-02]. ISSN 2278-0181. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/269986518\\_Processing\\_and\\_Drying\\_of\\_Coffee\\_-\\_A\\_Review](https://www.researchgate.net/publication/269986518_Processing_and_Drying_of_Coffee_-_A_Review)

GIBSON, Mark a Pat NEWSHAM, 2018. *Food Science and the Culinary Arts*. 1. [s.l.]: Academic Press. ISBN 978-0-12-811816-0.

GOMES, Willian dos Santos, Lucas Louzada PEREIRA, Cristhiane Altoé FILETE, et al., 2022. Changes in the Chemical and Sensory Profile of *Coffea canephora* var. Conilon Promoted by Carbonic Maceration. *Agronomy* [online]. **12**(10) [cit. 2024-03-03]. ISSN 2073-4395. Dostupné z: doi:10.3390/agronomy12102265

GREENE, Whitney, Ellen S. DIERENFELD a Susan MIKOTA, 2019. A Review of Asian and African Elephant Gastrointestinal Anatomy, Physiology, and Pharmacology. *Journal of Zoo and Aquarium Research*. **7**(1), 1-14. ISSN 2214-7594.

HAILE, Mesfin a Won Hee KANG, 2019. The Role of Microbes in Coffee Fermentation and Their Impact on Coffee Quality. *Journal of Food Quality* [online]. 2019-03-07, **2019**, 1-6 [cit. 2024-01-30]. ISSN 0146-9428. Dostupné z: doi:10.1155/2019/4836709

HAILE, Mesfin, Hyung Min BAE a Won Hee KANG, 2020. Comparison of the Antioxidant Activities and Volatile Compounds of Coffee Beans Obtained Using Digestive Bio-Processing (Elephant Dung Coffee) and Commonly Known Processing Methods. *Antioxidants* [online]. **9**(5) [cit. 2024-02-25]. ISSN 2076-3921. Dostupné z: doi:10.3390/antiox9050408

HÁJÍČEK, Jan, 2022. *Historie a současný stav falšování kávy*. Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýčká 129, Suchdol, 165 21 Praha. Bakalářská práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Vedoucí práce Ing. Jan Tauchen, Ph.D.

HELD, P., 2005. *Performing oxygen radical absorbance capacity assays with synergy™/TMHT: ORAC antioxidant tests*. Application Note. Biotek Instruments, Winooski, USA.

HOSKOVEC, Ladislav, 2011. COFFEA ARABICA L. – kávovník arabský. *Botany.cz* [online]. [cit. 2022-03-12]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/coffea-arabica/>

- CHANDRA, Suman, Shabana KHAN, Bharathi AVULA, Hemant LATA, Min Hye YANG, Mahmoud A. ELSOHLI a Ikhlas A. KHAN, 2014. Assessment of Total Phenolic and Flavonoid Content, Antioxidant Properties, and Yield of Aeroponically and Conventionally Grown Leafy Vegetables and Fruit Crops: A Comparative Study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [online]. **2014**, 1-9 [cit. 2024-02-25]. ISSN 1741-427X. Dostupné z: doi:10.1155/2014/253875
- CHEONG, Mun Wai, Kau Hin TONG, Jeremy Jian Ming ONG, Shao Quan LIU, Phillip CURRAN a Bin YU, 2013. Volatile composition and antioxidant capacity of Arabica coffee. *Food Research International* [online]. **51**(1), 388-396 [cit. 2024-04-14]. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2012.12.058
- CHU, Yi-Fang, FARAH, Adriana, ed., 2012. Coffee Constituents. In: *Coffee* [online]. 1. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, s. 21-58 [cit. 2022-03-17]. ISBN 9780470958780. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781119949893.ch2>
- IFMALINDA, Ifmalinda, Imas Siti SETIASIH, Mimin MUHAEMIN a Sarifah NURJANAH, 2019. Chemical Characteristics Comparison of Palm Civet Coffee (Kopi Luwak) and Arabica Coffee Beans. *Journal of Applied Agricultural Science and Technology* [online]. 2019-08-31, **3**(2), 280-288 [cit. 2024-04-14]. ISSN 2621-2528. Dostupné z: doi:10.32530/jaast.v3i2.110
- INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION, 2022. ICO Annual Review 2021/2022. *International Coffee Organization* [online]. [cit. 2024-04-05]. Dostupné z: <https://www.ico.org/documents/cy2022-23/annual-review-2021-2022-e.pdf>
- JANNE CARVALHO FERREIRA, Ludmilla, Matheus DE SOUZA GOMES, Liliane MACIEL DE OLIVEIRA a Líbia DINIZ SANTOS, 2023. Coffee fermentation process: A review. *Food Research International* [online]. **169** [cit. 2024-03-05]. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2023.112793
- JIMENEZ, Emerson Josue Martinez, Pâmela Mynsen Machado MARTINS, Ana Luiza de Oliveira VILELA, Nádia Nara BATISTA, Sttela Dellyzete Veiga Franco da ROSA, Disney Ribeiro DIAS a Rosane Freitas SCHWAN, 2023. Influence of anaerobic fermentation and yeast inoculation on the viability, chemical composition, and quality of coffee. *Food Bioscience* [online]. **51** [cit. 2024-03-03]. ISSN 22124292. Dostupné z: doi:10.1016/j.fbio.2022.102218
- KAISANGSRI, Nattapon, Orrapun SELAMASSAKUL, Chanikan SONKLIN, Natta LAOHAKUNJIT, Rungruang RITTIPUN a Orapin KERDCHOECHUEN, 2020. PHENOLIC COMPOUNDS AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF COFFEE EXTRACT FOR COSMETIC PRODUCT. *Journal of Science and Engineering*. **1**(1), 71-76.
- KARKALA, Nikitha, 2016. *Animal Diversity Web.: Elephas maximus* [online]. [cit. 2024-02-09]. Dostupné z: [https://animaldiversity.org/accounts/Elephas\\_maximus/](https://animaldiversity.org/accounts/Elephas_maximus/)
- KLINHOM, Sarisa, Sirawit SRIWICHAIIN, Sasiwan KERDPHOO, Jaruwan KHONMEE, Nipon CHATTIPAKORN, Siriporn C. CHATTIPAKORN a Chatchote THITARAM, 2023. Characteristics of gut microbiota in captive Asian elephants (*Elephas maximus*) from infant to elderly. *Scientific*

*Reports* [online]. **13**(1) [cit. 2024-02-27]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-023-50429-1

KOVÁTS, E., 1958. Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. *Helvetica Chimica Acta* [online]. **41**(7), 1915-1932 [cit. 2024-04-07]. ISSN 0018-019X. Dostupné z: doi:10.1002/hlca.19580410703

KRÓL, Katarzyna, Magdalena GANTNER, Aleksandra TATARAK a Ewelina HALLMANN, 2020. The content of polyphenols in coffee beans as roasting, origin and storage effect. *European Food Research and Technology* [online]. **246**(1), 33-39 [cit. 2022-03-13]. ISSN 1438-2377. Dostupné z: doi:10.1007/s00217-019-03388-9

KWAK, Han Sub, Yoonhwa JEONG a Misook KIM, 2018. Effect of Yeast Fermentation of Green Coffee Beans on Antioxidant Activity and Consumer Acceptability. *Journal of Food Quality* [online]. **2018**, 1-8 [cit. 2024-01-30]. ISSN 0146-9428. Dostupné z: doi:10.1155/2018/5967130

LEE, Andrew, 2014. *Canadian Broadcasting Corporation* [online]. [cit. 2024-01-31]. Dostupné z: <https://www.cbc.ca/news/world/black-ivory-coffee-canadian-s-elephant-poop-coffee-makes-a-pricey-cup-of-joe-1.2881812>

LIAO, Yu-Chen, Taejo KIM, Juan L. SILVA, Wu-Yueh HU a Bang-Yuan CHEN, 2022. Effects of roasting degrees on phenolic compounds and antioxidant activity in coffee beans from different geographic origins. *LWT* [online]. **168**, 1-7 [cit. 2024-04-14]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2022.113965

LICZBIŃSKI, Przemysław a Bożena BUKOWSKA, 2022. Tea and coffee polyphenols and their biological properties based on the latest in vitro investigations. *Industrial Crops and Products* [online]. **175**, 1-8 [cit. 2024-03-07]. ISSN 09266690. Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2021.114265

LU, Chih-ying, Zhigang HAO, Richard PAYNE a Chi-Tang HO, 2005. Effects of Water Content on Volatile Generation and Peptide Degradation in the Maillard Reaction of Glycine, Diglycine, and Triglycine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2005-08-01, **53**(16), 6443-6447 [cit. 2024-04-14]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf050534p

MACDONALD-WICKS, Lesley K, Lisa G WOOD a Manohar L GARG, 2006. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. **86**(13), 2046-2056 [cit. 2024-04-17]. ISSN 0022-5142. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.2603

MARCONE, Massimo F, 2004. Composition and properties of Indonesian palm civet coffee (Kopi Luwak) and Ethiopian civet coffee. *Food Research International* [online]. **37**(9), 901-912 [cit. 2024-02-10]. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2004.05.008

MATTHEWS, Hayley, 2019. *DatingNews* [online]. [cit. 2024-01-31]. Dostupné z: <https://www.datingnews.com/daters-pulse/black-ivory-coffee-gives-couples-a-rare-roast/>

MEHARI, Bewketu, Mesfin REDI-ABSHIRO, Bhagwan Singh CHANDRAVANSHI, Minaleshewa ATLABACHEW, Sandra COMBRINCK a Rob MCCRINDLE, 2016. Simultaneous Determination of Alkaloids in Green Coffee Beans from Ethiopia: Chemometric Evaluation of Geographical Origin. *Food Analytical Methods* [online]. **9**(6), 1627-1637 [cit. 2022-03-12]. ISSN 1936-9751. Dostupné z: doi:10.1007/s12161-015-0340-2

MOON, Joon-Kwan a Takayuki SHIBAMOTO, 2010. Formation of Volatile Chemicals from Thermal Degradation of Less Volatile Coffee Components: Quinic Acid, Caffeic Acid, and Chlorogenic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2010-05-12, **58**(9), 5465-5470 [cit. 2024-04-14]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf1005148

MUTHA, Rakesh E., Anilkumar U. TATIYA a Sanjay J. SURANA, 2021. Flavonoids as natural phenolic compounds and their role in therapeutics: an overview. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. **7**(1), 1-13 [cit. 2024-04-14]. ISSN 2314-7253. Dostupné z: doi:10.1186/s43094-020-00161-8

MUZAIFA, M, D HASNI, FEBRIANI, A PATRIA a A ABUBAKAR, 2020. Chemical composition of green and roasted coffee bean of Gayo arabica civet coffee (kopi luwak). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* [online]. 2020-01-01, **425**(1) [cit. 2024-02-10]. ISSN 1755-1307. Dostupné z: doi:10.1088/1755-1315/425/1/012001

NELSON, Jessica, 2013. *Animal Diversity Web.: Paradoxurus hermaphroditus* [online]. [cit. 2024-02-09]. Dostupné z: [https://animaldiversity.org/accounts/Paradoxurus\\_hermaphroditus/](https://animaldiversity.org/accounts/Paradoxurus_hermaphroditus/)

NIST Chemistry WebBook: Standard Reference Database 69, 1996. LINSTROM, P.J. a W.G. MALLARD, ed. *National Institute of Standards and Technology* [online]. [cit. 2024-04-07]. Dostupné z: <https://webbook.nist.gov/chemistry/>

ONGO, Emelda A., Giuseppe MONTEVECCHI, Andrea ANTONELLI, Veronica SBERVEGLIERI a Fortunato SEVILLA III, 2020. Metabolomics fingerprint of Philippine coffee by SPME-GC-MS for geographical and varietal classification. *Food Research International* [online]. **134** [cit. 2024-02-09]. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2020.109227

OU, Boxin, Maureen HAMPSCH-WOODILL a Ronald L. PRIOR, 2001. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2001-10-01, **49**(10), 4619-4626 [cit. 2024-02-25]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf010586o

PEKAL, Anna a Krystyna PYRZYNSKA, 2014. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Analytical Methods* [online]. **7**(9), 1776-1782 [cit. 2024-04-17]. ISSN 1936-9751. Dostupné z: doi:10.1007/s12161-014-9814-x

POKHREL, Prashanta, Suraj SHRESTHA, Som Kanta RIJAL a Krishna Prasad RAI, 2016. A simple HPLC Method for the Determination of Caffeine Content in Tea and Coffee. *Journal of Food Science and Technology Nepal* [online]. 2016-04-16, **9**, 74-78 [cit. 2024-04-06]. ISSN 1816-0727. Dostupné z: doi:10.3126/jfstn.v9i0.16200

PORTILLO, Ostilio R. a Ana C. ARÉVALO, 2022. Coffee's carbohydrates. A critical review of scientific literature. *Bionatura* [online]. 2022-9-15, **7**(3), 1-12 [cit. 2024-04-01]. ISSN 13909347. Dostupné z: doi:10.21931/RB/2022.07.03.11

RAVEENDRAN, Ashika a Pushpa S. MURTHY, 2022. New trends in specialty coffees - "the digested coffees." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2022-06-23, **62**(17), 4622-4628 [cit. 2024-03-12]. ISSN 1040-8398. Dostupné z: doi:10.1080/10408398.2021.1877111

RE, Roberta, Nicoletta PELLEGRINI, Anna PROTEGGENTE, Ananth PANNALA, Min YANG a Catherine RICE-EVANS, 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. **26**(9-10), 1231-1237 [cit. 2024-03-05]. ISSN 08915849. Dostupné z: doi:10.1016/S0891-5849(98)00315-3

REDGWELL, Robert a Monica FISCHER, 2006. Coffee carbohydrates. *Brazilian Journal of Plant Physiology* [online]. **18**(1), 165-174 [cit. 2024-04-01]. ISSN 1677-0420. Dostupné z: doi:10.1590/S1677-04202006000100012

RIPPER, Beatriz, Maysa Silva BARRETO, Fabio Junior Moreira NOVAES, Mateus Gomes DE GODOY, Denise Maria Guimarães FREIRE, Claudia Moraes DE REZENDE, Juliana Cortes NUNES a Daniel PERRONE, 2022. Comprehensive Composition of Flavor Precursors in Kopi Luwak and Jacu Exotic Green Bioprocessed Coffees. *Frontiers in Sustainable Food Systems* [online]. 2022-6-21, **6**, 1-15 [cit. 2024-03-12]. ISSN 2571-581X. Dostupné z: doi:10.3389/fsufs.2022.824929

RISTICEVIC, Sanja, Eduardo CARASEK a Janusz PAWLISZYN, 2008. Headspace solid-phase microextraction–gas chromatographic–time-of-flight mass spectrometric methodology for geographical origin verification of coffee. *Analytica Chimica Acta* [online]. **617**(1-2), 72-84 [cit. 2022-03-13]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2008.04.009

RUBIYANTI, Rani, 2019. Determination of Caffeine Content of Indonesia Luwak Coffee (Mongoose Coffee) Using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Analysis. *International Journal of ChemTech Research* [online]. **12**(04), 43-47 [cit. 2024-04-06]. ISSN 09744290. Dostupné z: doi:10.20902/IJCTR.2019.120407

SAMANIDOU, Victoria F., 2015. Determination of Polyphenols and Major Purine Alkaloids in Coffee. In: *Coffee in Health and Disease Prevention* [online]. Elsevier, s. 971-981 [cit. 2024-03-06]. ISBN 9780124095175. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409517-5.00107-8

SENINDE, Denis Richard a Edgar CHAMBERS, 2020. Coffee Flavor: A Review. *Beverages* [online]. **6**(3), 1-25 [cit. 2024-03-09]. ISSN 2306-5710. Dostupné z: doi:10.3390/beverages6030044

- SHALU, Tuteja, 2000. *Animal Diversity Web.: Civettictis civetta* [online]. [cit. 2024-02-09]. Dostupné z: [https://animaldiversity.org/accounts/Civettictis\\_civetta/](https://animaldiversity.org/accounts/Civettictis_civetta/)
- SHARMA, Om P. a Tej K. BHAT, 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry* [online]. **113**(4), 1202-1205 [cit. 2024-02-25]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2008.08.008
- SCHOLZ, Gabriele a Richard H. STADLER, 2019. Furan and Alkylfurans: Occurrence and Risk Assessment. In: *Encyclopedia of Food Chemistry* [online]. Elsevier, s. 532-542 [cit. 2024-04-14]. ISBN 9780128140451. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100596-5.21828-3
- SINGLETON, Vernon L., Rudolf ORTHOFER a Rosa M. LAMUELA-RAVENTÓS, 1999. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: *Oxidants and Antioxidants Part A* [online]. Elsevier, s. 152-178 [cit. 2024-02-25]. Methods in Enzymology. ISBN 9780121822002. Dostupné z: doi:10.1016/S0076-6879(99)99017-1
- STADLER, Richard H. a Viviane THEURILLAT, 2017. Heat-Generated Toxicants in Foods (Acrylamide, MCPD Esters, Glycidyl Esters, Furan, and Related Compounds). In: *Chemical Contaminants and Residues in Food* [online]. Elsevier, s. 171-195 [cit. 2024-04-14]. ISBN 9780081006740. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100674-0.00008-4
- SULLIVAN, Michael, 2014. *National Public Radio* [online]. [cit. 2024-01-31]. Dostupné z: <https://www.npr.org/sections/thesalt/2014/08/20/340154271/no-1-most-expensive-coffee-comes-from-elephants-no-2>
- SUNARHARUM, W B a M FARHAN, 2020. Effect of manual brewing techniques on the sensory profiles of Arabica coffees (Aceh Gayo wine process and Bali Kintamani honey process). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* [online]. 2020-02-01, **454**(1) [cit. 2024-03-02]. ISSN 1755-1307. Dostupné z: doi:10.1088/1755-1315/454/1/012099
- TAKEOKA, Gary, Charles PERRINO a Ron BUTTERY, 1996. Volatile Constituents of Used Frying Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 1996-01-01, **44**(3), 654-660 [cit. 2024-04-14]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf950430m
- TAUCHEN, Jan, Petr MARSIK, Marie KVASNICOVA, David MAGHRADZE, Ladislav KOKOSKA, Tomas VANEK a Premysl LANDA, 2015. In vitro antioxidant activity and phenolic composition of Georgian, Central and West European wines. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. **41**, 113-121 [cit. 2024-02-25]. ISSN 08891575. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfca.2014.12.029
- THAMMARAT, Poowadol, Chadin KULSING, Kanet WONGRAVEE, Natchanun LEEPIPATPIBOON a Thumnoon NHUJAK, 2018. Identification of Volatile Compounds and Selection of Discriminant Markers for Elephant Dung Coffee Using Static Headspace Gas Chromatography—Mass Spectrometry and Chemometrics. *Molecules* [online]. **23**(8) [cit. 2024-02-03]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules23081910

TOCI, Aline Theodoro, Adriana FARAH, Helena Redigolo PEZZA a Leonardo PEZZA, 2015. Coffee Adulteration: More than Two Decades of Research. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* [online]. 2015-10-13, **46**(2), 83-92 [cit. 2022-03-13]. ISSN 1040-8347. Dostupné z: doi:10.1080/10408347.2014.966185

TRESSERRA-RIMBAU, Anna, Alexander MEDINA-REMÓN, Ramon ESTRUCH a Rosa M. LAMUELA-RAVENTÓS, 2015. Coffee Polyphenols and High Cardiovascular Risk Parameters. In: *Coffee in Health and Disease Prevention* [online]. Elsevier, s. 387-394 [cit. 2022-03-13]. ISBN 9780124095175. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409517-5.00042-5

VALÍČEK, Pavel, 1989. *Užitkové rostliny tropů a subtropů*. Praha: Academia. ISBN 80-200-0000-3.

VÁRADY, Matúš, Jan TAUCHEN, Adéla FRAŇKOVÁ, Pavel KLOUČEK a Peter POPELKA, 2022. Effect of method of processing specialty coffee beans (natural, washed, honey, fermentation, maceration) on bioactive and volatile compounds. *LWT* [online]. **172** [cit. 2024-03-02]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2022.114245

VELÁSQUEZ, Sofía, Carlos BANCHÓN, Willian CHILÁN a José GUERRERO-CASADO, 2022. Effect of Three Post-Harvest Methods at Different Altitudes on the Organoleptic Quality of C. canephora Coffee. *Beverages* [online]. **8**(4) [cit. 2024-03-02]. ISSN 2306-5710. Dostupné z: doi:10.3390/beverages8040083

WANG, Rui, Jingjing XUE, Lei MENG, et al., 2019. Caffeine Improves the Performance and Thermal Stability of Perovskite Solar Cells. *Joule* [online]. **3**(6), 1464-1477 [cit. 2024-03-18]. ISSN 25424351. Dostupné z: doi:10.1016/j.joule.2019.04.005

WEI, Feifei a Masaru TANOKURA, 2015. Chemical Changes in the Components of Coffee Beans during Roasting. In: *Coffee in Health and Disease Prevention* [online]. Elsevier, s. 83-91 [cit. 2024-04-14]. ISBN 9780124095175. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409517-5.00010-3



## 9 Seznam použitých zkratk a symbolů

- 1) SFCA: Mastné kyseliny s krátkým řetězcem
- 2) WP: Mokrý metoda
- 3) DP: Suchá metoda
- 4) EP: Sloní káva
- 5) TPC: Celkové množství fenolických sloučenin
- 6) TFC: Celkové množství flavonoidů
- 7) PCA: Analýza hlavních složek
- 8) TEAC: Test ekvivalentní antioxidační kapacity Trolox
- 9) ORAC: Test absorpance kyslíkových radikálů
- 10) HPLC: Vysokoučinná kapalinová chromatografie
- 11) GC: Plynová chromatografie
- 12) SPME: Mikroextrakce na pevné fázi
- 13) MS: Hmotnostní spektrometrie
- 14) Q-TOF: Kvadrupól spojený s Time of Flight detektorem
- 15) DVB/CAR/PDMS: Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane
- 16) 5-O-CQA: Kyselina 5-O-kafeoylchinová
- 17) CAF: Kofein
- 18) GAL: Kyselina gallová
- 19) CNA: Kyselina skořicová
- 20) CAFA: Kyselina kávová
- 21) RPA%: procentuální zastoupení relativní oblasti píku



## **10 Samostatné přílohy**