

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality zemědělských produktů



**Porovnání profilu fenolických látek v komerčně
dostupných vzorcích kakaa**

Diplomová práce

Dávid Krajňák

Výživa a potraviny

Mgr. Petr Maršík, Ph. D.

© 2018 ČZU v Praze

Čestné prehlásenie

Prehlasujem, že svoju diplomovú prácu "Porovnanie profilu fenolových látok v komerčne dostupných vzorkách kakaá" som vypracoval samostatne pod vedením vedúceho diplomovej práce a s použitím odbornej literatúry a ďalších informačných zdrojov, ktoré sú citované v práci a uvedené v zoznamu použitých zdrojov na konci práce. Ako autor uvedenej diplomovej práce ďalej prehlasujem, že som v súvislosti s jej vytvorením neporušil autorské práva tretích osôb. Prehlasujem, že mi bol udelený súhlas pre vypracovanie uvedenej práce v slovenčine.

V Prahe dňa 13. 4. 2018

Pod'akovanie

Rád by som sa poďakoval Mgr. Petrovi Maršíkovi, Ph. D. a Doc. Ing. Jánovi Tauchenovi, Ph. D. za ich hodnotné odborné vedenie, rady a pripomienky pri vypracovaní mojej diplomovej práce. Veľká vďaka patrí mojej rodine a partnerke, ktorí stoja vždy pri mne a podporujú ma v mojom rozvoji.

Porovnání profilu fenolických látek v komerčně dostupných vzorcích kakaa

Souhrn

Úvod: *Theobroma cacao* je významná plodina pro své plody, ze kterých se vyrábí kakao a čokoláda. Už starověké civilizace poznali využití kakaových bobů a pěstovali *Theobroma cacao* pro přípravu jejich posvátného kakaového nápoje "xocolatl". Kakao bylo žádané nejen kvůli své chuti a povzbuzujícím účinkem, ale také díky jejich příznivým zdravotním účinkem. Trvalo ještě několik století, dokud se kakao stalo celosvětově významnou plodinou, jak je tomu v současnosti. Kakao se využívá nejen v potravinářství, ale má uplatnění i v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. V minulosti se věřilo, že kakao má léčitelské schopnosti, dodává sílu a moudrost.

S rozvojem metod analytické chemie se podařilo odhalit a popsat fenolické látky v kakaových bobech. Právě pozitivní vliv kakaa na zdraví je spojován s jejich obsahem fenolických látek. U fenolických látek byly prokázány mnohé fyziologické účinky jako anti-alergenní, anti-aterogenně, antioxidační, anti-trombotické, anti-mikrobiální, protizánětlivé, kardio-protektivní, vazodilatační, anti-karcinogenní, anti-mutagenní a anti-tumorové účinky. Polyfenoly v kakau mají příznivý účinek na nervy, chrání je před zánětem a poškozením, chrání pokožku před oxidací vyvolanou UV zářením. Fenolické látky a některé metylxantiny jsou podstatou antioxidačních vlastností kakaa. Podle více autorů přítomnost fenolických látek v kakau je závislá na jeho technologickém zpracování.

Známe více než 8000 polyfenolů, které vytvářejí jednoduché nebo komplexní sloučeniny s vysokou molekulovou hmotností. Z chemického hlediska jsou polyfenoly složeny z benzenové kruhu s jednou nebo více hydroxylovými skupinami. V rostlinách jsou fenolické látky součástí sekundárních metabolitů, které zajišťují jejich růst, reprodukci, ochranu a podmiňují zbarvení a sensorické vlastnosti plodů.

Syrové kakaové boby obsahují vysoký obsah fenolických látek, který je mnohem vyšší než obsah fenolů v červeném víně, zeleném a černém čaji. Obsah fenolických látek v kakaových bobech činí přibližně 12 – 18 % celkové hmotnosti sušiny. Zastoupení a poměr fenolických sloučenin je závislý na oblasti pěstování kakaovníku, klimatických podmínkách během růstu a sklizně kakaových bobů, zralost kakaových zrn a doba

skladování úrody. Nejvíce zastoupenými fenolickými látkami jsou katechin, (-)epikatechin a jejich oligomery prokyanidiny a antokyanidiny. Z purinových alkaloidů je v kakau nejvíce zastoupen theobromin a v malém množství také kofein a theofylin. Theobromin, kofein a theofylin tvoří deriváty xantinů, které se podílejí na katabolismu nukleotidů a nukleových kyselin.

Vysoký obsah fenolických látek dodává hořkou a trpkou příchut' syrovým kakaovým bobům, což zabraňuje jejich přímé konzumaci. Technologické zpracování kakaových bobů zahrnuje fermentaci, sušení a pražení kakaových bobů. Fermentací kakaových bobů se mění jejich chemické složení vlivem fermentační činnosti kvasinek a bakterií. Vytvářejí se tak žádané sensoricky aktivní látky. Podle studií se vlivem fermentace mění celkový fenolový obsah a snižuje se antioxidační kapacita kakaa. Předpokládá se také, že fermentací kakaových bobů se snižuje obsah methylxantinů.

Sušením kakaových bobů se odstraňuje nadbytečná voda a zastavuje se proces spontánního kvašení. Sušení kakaových bobů je nezbytné pro lepší stabilitu kakaových bobů pro další zpracování a snižuje se také mikrobiální riziko. Předpokládá se, že sušení na slunci působí negativně na fenolový profil a antioxidační aktivitu kakaových bobů.

Pražení kakaa je další proces, který má vliv na sensorické vlastnosti kakaa. Pražením se docílí vznik aromatických látek a konečná barva kakaa. Pražení kakaových bobů probíhá při teplotách 120 – 150 °C. Vysoké teploty podle některých autorů způsobují degradaci fenolických sloučenin spolu s dlouhými dobami pražení. Kakao podléhá někdy dalším technologickým úpravám jako je alkalizace, kdy se zvyšuje pH kakaového prášku. Alkalizace kakaa má za následek zjemnění chuti kakaa a zlepšuje se jeho rozpustnost v kapalinách. Alkalizaci je možné dosáhnout různými barevnými odstíny kakaa.

Postupy nebo opatření, které by zachovaly více fenolických látek a tím i zvýšili antioxidační vlastnosti kakaa by mohly mít velký přínos pro zdraví konzumenta této populární pochutiny. Polemizuje se o jiných postupech sušení, jako jsou například metody adsorpčního sušení, vakuového sušení a lyofilizace, které přinesly uspokojivé výsledky pro zachování celkového obsahu fenolických sloučenin.

Kakao je produkováno v oblastech tropického pásma, v rozmezí 20 ° jižní a severní šířky v tak zvaném "kakaová pásu", kde je dostatek srážek a horké podnebí po celý rok. Kakaovník vyžaduje velké množství stínu, proto se pěstuje "Agro-Forest" systémem, tedy ve spojení s jinými vysokými plodinami, ideálně s částečně zachovaným lesem s vyššími stromy. Většina kakaových bobů je produkována maloobchodními farmáři.

Známe několik odrůd kaka, které se vyznačují různou kvalitou. Za nejkvalitnější odrůda kaka se považuje odrůda Criollo, která se pěstuje převážně v Jižní Americe. Kakaové boby odrůdy Criollo jsou určeny do kvalitních a hořkých čokolád. Odrůda Criollo vyžaduje velké množství srážek a vyšší horské polohy při pěstování.

Najprodukovanejší odrůdou kaka je odrůda Forastero, která je pěstována v Africe a jihovýchodní Asii. Odrůda Forastero představuje až 95 % světové produkce kakaových bobů. Kakaové boby odrůdy Forastero se vyznačují nižší kvalitou a cenou, proto jsou určeny pro produkci mléčných čokolád a běžného kakaového prášku.

Cíle: Hlavním cílem práce bylo srovnání profilu fenolových látek v komerčně dostupných vzorcích kakaových bobů a kakaových výrobků, které byly zpracovány různými technologiemi a pocházely ze Samoy a Ekvádoru. Vedlejším cílem práce bylo porovnání obsahu významných alkaloidů v těch samých komerčně dostupných vzorcích.

Hypotéza: Jednotlivé vzorky kakaových bobů a dalších produktů se liší obsahem fenolových látek a alkaloidů v závislosti na způsobu zpracování a oblasti původu.

Metody: Komerční samojské a ekvádorské vzorky odrůdy Forastero a Criollo byly srovnávány na základě fenolového profilu a obsahu alkaloidů. Fenolové látky a nutričně významné alkaloidy byly kvantitativně stanoveny kapalinovou chromatografií (LC/MS). Extrakce a čištění vzorků pro stanovení fenolických látek byly převedeny extrakcí na pevnou fázi (SPE). Pro stanovení alkaloidů byla použita extrakce do teplé vody. Zpracování výsledků bylo provedeno statistickým srovnáním profilů sledovaných látek ve vzorcích kaka (PCA, analýza klastrů).

Výsledky: Obsahy 4-hydroxybenzoové, 3-hydroxybenzoové, ferulové, syringové, protonatechové kyseliny, (+)katechínu, kvercetínu, myricetínu dokazují, že technologické zpracování má vliv na fenolový profil v kakau. Vzorka (6) pražené a čerstvé kakao vykazovala velmi nízké obsahy protokatechuové kyseliny, kvercetínu, luteolinu, taxifolinu a myricetínu oproti ostatním nepraženým samojským vzorkům. Výsledek (-)epikatechína vykazoval protichodné výsledky s (+)katechínem. Obsah (-)epikatechínu vzrástol v pražených vzorcích, zatímco v nepražených vzorků byl jeho obsah nízký. Může to značit na nesprávnou záměnu s (+)katechínem, pro který by byly tyto výsledky přijatelnější.

Rozdíly v země původu kakaových vzorků byly potvrzeny. Avšak rozdíly nejsou tak významné, jako v případě alkaloidů. Samojské kakao vykazovalo lepší výsledky fenolového profilu, zejména co se týče složení 4-hydroxybenzoové, 3-hydroxybenzoové, syringové, kávové, ferulové kyseliny, taxifolinu, myricetínu a katechínu než ekvádorské

kakao. Z alkaloidů se v kakaových bobech a produktech podarilo stanovit theobromin a kofein. Nejvyšší obsah kofeinu a theobrominu se vyskytoval v samojském nefermentovaném a nepraženém kakau (2). Obsah theofylinu jsme zjistili v stopových množstvích. Byl prokázán vliv fermentace a pražení na obsah obou alkaloidů. Samojské čerstvé a nepražené kakao mělo vyšší obsah theobromínu než ekvádorské čerstvé a nepražené kakao (9). Samojské pražené fermentované kakao mělo vyšší obsah kofeinu než odpovídající ekvádorské kakao (7).

Závěr: Výsledky této práce ukazují podobnost z jinými autory, že technologické zpracování má vliv na fenolový profil kakaa a kakaových produktů. Na základě našich výsledků jsme uvedenou hypotézu potvrdily. Jednotlivé vzorky kakaových bobů a kakaových produktů se liší obsahem fenolických látek a alkaloidů v závislosti na způsobu zpracování a oblasti původu kakaa. V případě nutričně významných alkaloidů se nám podařilo prokázat souvislost vlivu fermentace a pražení na obsah kofeinu a theobrominu v kakaových bobech.

Klíčová slova: Kakao. Fenolické látky. LC-MS. Metabolické profilování.

Comparison of phenolic compound profile in commercially available samples of cocoa

Abstract

Introduction: Cocoa beans are an important raw material for production of cocoa and chocolate, which have been known for centuries. Cocoa has been sought not only for its taste but also because of its beneficial health effects. The very positive effect of cocoa on health is associated with their high content of phenolic compounds. It is assumed that the technological processing of cocoa has a negative effect on phenolic content. Procedures or measures that would keep more phenolic substances and thus increase the antioxidant properties of cocoa could be greatly beneficial the health of the consumer of this popular snack.

Objectives: The main objective of this study was to compare the phenol profile between commercially available cocoa bean, cocoa products from Ecuador, that has been processed by different technologies and non-commercial samples of cocoa obtained from Samoa with identical technological processing.

Methods: Commercial Samoa and Ecuador samples of the Forastero and Criollo varieties were compared based on the phenolic profile and alkaloid content. Phenolic compounds and nutritionally significant alkaloids were quantified by liquid chromatography (LC/MS). Extraction and purification of samples for the determination of phenolic compounds was performed by L/L extraction (liquid/liquid). An extraction into warm water was used to determine alkaloids. The results were processed by statistically comparing the profiles of the monitored substances in cocoa samples (PCA, cluster analysis).

Results: The results of 4-OH, 3-OH, ferulic, syringic, protocatechic acid, (+)catechin, quercetin, myricetin contents show that technological processing affects the phenolic profile in cocoa. The result of (-)epicatechin showed opposite results with (+)catechin. Differences between the geographic origin of cocoa samples have been confirmed, but they are not as significant as in the case of alkaloids.

Conclusions: Individual samples of cocoa beans and cocoa products differ in the content of phenolic substances and alkaloids depending on the processing method and the cocoa origin.

Keywords: Cocoa. Phenolic compounds. LC-MS. Cocoa beans. Metabolic profile.

Obsah

1	Úvod.....	15
2	Hypotéza a cieľ práce.....	17
3	Teoretické východiska.....	18
3.1	História kakaa.....	19
3.2	Pestovanie a odrody kakaa	20
3.2.1	Senzorické vlastnosti kakaa	24
3.3	Spracovanie kakaových bôbov	25
3.3.1	Fermentácia kakaových bôbov.....	26
3.3.2	Sušenie kakaových bôbov	27
3.3.3	Skladovanie a praženie kakaových bôbov	28
3.3.4	Drvenie a lisovanie kakaa	29
3.4	Zdravotný prínos T. Cacao.....	31
3.5	Zloženie kakaa	33
3.6	Fenolové látky	33
3.6.1	Polyfenolové látky v kakau.....	35
3.7	Analýza polyfenolov	38
3.7.1	Extrakcia polyfenolových látok	38
3.7.2	Stanovenie polyfenolových látok.....	40
3.8	Analýza polyfenolov v kakau	41
3.8.1	Extrakcia polyfenolov z kakaa	41
3.8.2	Analýza polyfenolov z kakaa	41
3.9	Antioxidačné vlastnosti	42
3.9.1	Fenolové látky a ich antioxidačné vlastnosti	43
3.9.2	Metódy stanovenia antioxidačnej aktivity	43
3.9.3	Antioxidačné vlastnosti kakaa a kakaových produktov	45
3.10	Alkaloidy	45
3.10.1	Xantíny a ich metabolizmus.....	45
3.10.2	Metylxantíny a ich obsah v kakau.....	46
4	Materiály a metódy práce.....	48
4.1	Materiály práce.....	48
4.1.1	Rastlinný materiál	48
4.1.2	Chemikálie a štandardy	49
4.1.3	Prístroje a zariadenia	50
4.1.4	Software	50
4.2	Metódy práce	50
4.2.1	Príprava vzoriek	50

4.2.2	Optimalizácia metódy pre stanovenie fenolových látok.....	51
4.2.3	Extrakcia vzoriek pre stanovenie fenolových látok.....	52
4.2.4	Analýza pre stanovenie fenolových látok.....	52
4.2.5	Analýza pre stanovenie alkaloidov	53
4.2.6	Štatistické vyhodnotenie	53
5	Výsledky	55
5.1	Výsledok analýzy fenolových látok.....	55
5.1.1	Výsledok analýzy pre alkaloidy.....	63
6	Diskusia	66
7	Záver.....	70
8	Zoznam použitých zdrojov	71

Zoznam obrázkov

Obr. č. 1	Dozrievajúce kakaové struky	22
Obr. č. 2	Vnútro kakaového struku.....	22
Obr. č. 3	Agro-forest systém, používaný pre pestovanie kakaovníka	23
Obr. č. 4	Fermentácia kakaových bôbov	25
Obr. č. 5	Sušenie kakaových bôbov na slnku	28
Obr. č. 6	Metabolizmus xantínov	46
Obr. č. 7	ANOVA	57
Obr. č. 8	Diagram komponentných vybraných premenných.....	59
Obr. č. 9	Diagram komponentného skóre so započítaním alkaloidov	60
Obr. č. 10	Graf komponentných váh vybraných premenných.....	61
Obr. č. 11	Sutinový graf.....	61
Obr. č. 12	Dendrogram hierarchickej klastrovej analýzy	62
Obr. č. 13	Dendrogram hierarchickej klastrovej analýzy	63
Obr. č. 14	Výstup z programu Compass Data Analysis pre vzorku kaka (7)	65

Zoznam tabuliek

Tab. č. 1 Taxonómia druhu T. Cacao	21
Tab. č. 2 Rozdelenie odrôd a ich vlastnosti	24
Tab. č. 3 Priemerný obsah celkového flavanolu podľa miery alkalizácie kakaa	31
Tab. č. 4 Priemerné hodnoty zloženia kakaa a čokolády	33
Tab. č. 5 Rozdelenie fenolových zlúčenín	34
Tab. č. 6 Hlavné skupiny polyfenolov v kakau.....	36
Tab. č. 7 Popis kakaových vzoriek pre analýzu fenolových látok	48
Tab. č. 8 Popis kakaových vzoriek pre analýzu alkaloidov	48
Tab. č. 9 Priebeh gradientovej elúcie	53
Tab. č. 10 Priemerný obsah fenolov a fenolových kyselín v kakau.....	55

Zoznam grafov

Graf. č. 1 Obsah theobromínu v kakau.....	64
Graf. č. 2 Obsah kofeínu v kakau.....	65

1 Úvod

Fenolové látky sú častým predmetom záujmu z dôvodu ich významných fyziologických účinkov, nielen čo sa týka ich antioxidačných vlastností. Fenolové látky môžu mať významný prínos vo výžive človeka. Je známe, že kakaové bôby sú bohatým zdrojom fenolových látok a preto je dôležité zistiť, aké faktory podmieňujú ich obsah a akým spôsobom je možné zachovať čo najvyšší obsah fenolových látok.

Kakao a jeho pestovanie, spracovanie, výživové hľadisko bolo pre mňa veľmi zaujímavou témou, keďže ide o plodinu, ktorá sa pestuje v tropických krajinách a má zaujímavé vlastnosti. Objavením polyfenolov s nízkou molekulovou hmotnosťou ako katechín, epikatechín a diméry epikatechínu (prokyanidín B1, B2, C1) sa začalo kakao významnejšie skúmať s použitím kvapalinovej chromatografie s reverznou fázou (RP LC-MS). S vývojom analytických metód sa pre stanovenie fenolových látok v kakau čoraz viac uplatňuje vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) (Jalil et Ismail, 2008). Ukázalo sa, že kakao obsahuje vysoký obsah polyfenolov od 12 až 18 % celkovej hmotnosti sušiny, z čoho je v značnom množstve zastúpený katechín, (-)epikatechín a ich oligoméry prokyanidíny a antokyanidíny. V nefermentovaných kakaových bôboch boli zistené monoméry až tetradekaméry epikatechínu (Jalil et Ismail, 2008). Viaceré štúdie odhalili zdravotné prínosy kakaových flavonoidov, hlavne čo sa týka ich kardioprotektívnych účinkov u ľudí. (Cooper et al., 2017). Posledné výskumy prichádzajú stále s novými fyziologickými účinkami od protinádorových, vazodilatačných, protizápalových účinkov až po pozitívny vplyv na náladu a kognitívne funkcie (Maskarinec, 2009), (Balasundram et al., 2006), (Roy et al., 2001), (Verna, 2013) a (Katz et al., 2011).

Predmetom práce bolo stanovenie fenolových látok v rôznych vzorkách kakaa za použitia LC-MS (hmotnostnej spektrometrie v spojení s kvapalinovou chromatografiou). Hlavným cieľom práce bolo porovnanie celkového fenolového množstva vo vzorkách kakaových bôbov a kakaových produktov. Predpokladáme, že jednotlivé vzorky kakaových bôbov a ďalších produktov sa budú líšiť obsahom fenolových látok a alkaloidov v závislosti na spôsobe ich spracovania a oblasti pôvodu.

Pre získanie kakaa je nevyhnutné dôsledné technologické spracovanie, ktoré môže mať vplyv na výsledný fenolový profil. Každá vzorka v rámci jednej oblasti bola spracovaná inou technologickou úpravou, čo sa týka fermentácie a praženia. Podľa viacerých výskumov sa predpokladá, že tieto procesy majú nepriaznivý vplyv na obsah fenolových látok (Di Mattia et al., 2013), (Kim et Keeney 1984), (Miller et al., 2006), (Miller et al., 2008), (Oracz et al., 2015), (Belščak et al., 2009), (Lacueva et al., 2008). Kakaové vzorky, analyzované v tejto práci pochádzali zo Samoy a Ekvádoru. Všetky vzorky kakaa predstavovali bežne dostupné komerčné produkty.

Úvodné časti tejto práce sú zamerané na *T. cacao*, na jeho históriu, pestovanie a technologické spracovanie. V ďalších kapitolách sú zhrnuté zdravie prospešné vlastnosti fenolových látok v kakau. Ďalšie kapitoly sa venujú popisu a chemickým vlastnostiam fenolových látok. V poslednej časti tejto práce sú popísané metódy extrakcie, analýzy a stanovenia antioxidačnej aktivity fenolových látok v kakau.

2 Hypotéza a cieľ práce

Cieľom práce je porovnanie profilu fenolových látok v komerčne dostupných vzorkách kakaových bôbov a produktov kakaa spracovaných rôznymi technológiami zo Samoy a Južnej Ameriky. Vedľajším cieľom práce bolo porovnanie obsahu významných alkaloidov v tých istých komerčne dostupných vzorkách.

Hypotéza: Jednotlivé vzorky kakaových bôbov a ďalších produktov sa budú líšiť obsahom fenolových látok a alkaloidov v závislosti na spôsobe spracovania a oblasti pôvodu.

3 Teoretické východiska

Rod *Theobroma* pochádza z Južnej Ameriky, z územia východných Ánd. Poznáme 22 druhov rodu *Theobroma* a najznámejší z nich je práve *T. Cacao* (The International Cocoa Organization, 2013). *T. Cacao* je veľmi cenná kultúrna plodina, ktorá sa pestuje na ploche 8,2 miliónov hektárov v 58 krajinách v tzv. kakaovom páse (krajiný v pásme medzi 20 južnou a 20 severnou rovnobežkou. Svetový obchod s kakaom predstavuje ročne hodnotu 4 miliárd amerických dolárov (Pohlan et Perez, 2006). *T. Cacao* má široké využitie v potravinárstve, farmaceutickom a kozmetickom priemysle (Menon et al., 2017). Kakaový prášok má najširšie uplatnenie v potravinách, od čokolád, čokoládových nápojov, zmrzlín, krémov a poliev, sušienok, koláčov, ochucovadiel do potravín, cukrovíniek a cereálií. Z kakaovej kôry sa vyrábajú krmivá pre zvieratá, z buničiny zase nealkoholické nápoje a alkohol, pektíny do marmelád. V kozmetickom priemysle má najväčší význam kakaové maslo, ktoré sa používa na výrobu hydratačných krémov a mydiel (The International Cocoa Organization, 2003). Zbytky z kôry spracovaných kakaových bôbov sú cenným zdrojom alkaloidov pre farmaceutický priemysel (Schumacher et al., 1998).

Produkcia kakaa vo svete podstatne vzrástla oproti minulosti. Ešte v 20. rokoch minulého storočia sa pestovalo najviac kakaa v Strednej a Južnej Amerike, neskôr v 70. rokoch minulého storočia ich v produkcii predbehla Afrika. Nové plantáže v Juhovýchodnej Ázii v súčasnosti dobiehajú aj tých najväčších producentov v Afrike (Schumacher et al., 1998). V sezóne 2014/15 bolo vyprodukovaných 4,236 miliónov ton kakaových bôbov podľa svetovej organizácie kakaa. Viac ako 70 % svetovej produkcie kakaových bôbov pochádzala z Kamerunu, Pobrežia Slonoviny, Ghany, Nigérie a Toga (The International Cocoa Organization, 2017). Napriek tomu sú však výnosy z hektára v Západnej Afrike nízke, čo je spôsobené vysokým výskytom škodcov a chorôb, starými kakaovými plantážami a nedostatkom pôdných živín. Majitelia malých fariem nemajú dostatočné prostriedky pre zefektívnenie svojej produkcie, preto vlády Pobrežia Slonoviny a Ghany podporujú rozsiahle programy pre obnovu a presádzanie kakaovníkov, využívanie hnojív a prípravkov na ochranu pred chorobami. (Wessel et Wessel, 2015). Jemné alebo inak nazývané pravé kakao má najlepšie kvalitatívne vlastnosti a je produkované hlavne v krajinách Južnej Ameriky. V roku 2011 boli najväčšími producentmi jemného kakaa Ekvádor, Dominikánska republika, Kolumbia, Venezuela, Madagaskar, Nikaragua a Bolívia (Trognitz et al., 2013). Jemné kakao pochádza z bôbov odrody Criollo alebo

Trinitario. Existujú však výnimky, kedy odroda Forastero z Ekvádoru sa považuje za jemné kakao a odroda Trinitario z Kamerunu so svojim typickým červeným sfarbením je považovaná za menej kvalitné, hrubé kakao (The International Cocoa Organization, 2013).

3.1 História kakaa

Pôvod využívania kakaa siaha 3000 rokov do histórie, kedy ho Mayská a Aztécka civilizácia využívala vo výžive a medicíne (Dillinger et al., 2000) (Chin et al., 2013). Najskôr bolo kakao kultivované Mayskou civilizáciou približne v roku 250 – 900 p. n. l. v Strednej Amerike. Neskôr v 12. až 16. storočí aztécka civilizácia vyrábala tekutý nápoj Xocolatl „horká voda“ z kakaových bôbov, ktorý pripomínal dnešnú čokoládu. Nápoj bol obľúbený aztéckou elitou a podávaný aztéckym bohom. Kakaové bôby sa tiež využívali ako platidlo a v medicíne na potlačenie fyzickej únavy (Dasgupta et Klein, 2014) (Verna, 2013). V historickej správe Bernarda Diaz de Castillo pili Indiáni kakao niekoľkokrát denne a uchovávali mleté kakao vo svojich zásobách. Xocolatl sa pripravoval z jednoduchšej nerafinovanej kakaovej múčky, obsahujúcej ešte kakaový tuk, ktorú Indiáni rozpustili v studenej vode a nápoj dochucovali, vanilkou, divým medom, šťavou z agávy a čili (Schumacher et al., 1998) (Afoakwa, 2014). Neskôr, španielski kolonizátori počas dobývania Mexika v roku 1528 rozšírili kakao po celom Španielsku. Hernán Cortes a jeho skupina si podrobne zaznamenávali recept na prípravu xocolatl (Dasgupta et Klein, 2014) (Afoakwa, 2014). Zo začiatku Španieli pripravovali Xocolatl podľa receptu Aztékov, až neskôr začali osladzovať kakaový nápoj trstinovým cukrom, anízom, škoricu, mandle a lieskové oriešky a potom nápoj pretrepávali až do spenenia. Španieli postupne nahradili studenú vodu v čokoláde a nápoj zalievali vriacou vodou (Schumacher et al., 1998). Od roku 1580 sa v Španielsku začali piť čokoláda a kakao bolo pravidelne dovážané do Španielska (Afoakwa, 2014). Trend pitia čokolády sa začal rozširovať v 17. storočí naprieč Európou, v Taliansku, vo Francúzsku, v Nemecku a vo Veľkej Británii (Afoakwa, 2014). V roku 1657 bol otvorený prvý čokoládový dom v Londýne (Dasgupta et Klein, 2014). V Benátkach a Londýne sa postupne rozšírilo niekoľko čokoládovni. V druhej polovici 17. storočia sa čokoláda stala centrom vyššej dámskej spoločnosti. Dámy sa schádzali neskoro popoludní na šálku čokolády. Miešali čokoládu s ľadom, vajíčkami, horúcou vodou alebo mliekom (Schumacher et al., 1998). V roku 1662 kardinál Brancaccio prehlásil, že pitie horúcej čokolády neporušuje pôst, čo podnietilo rozšírenia nápoja v kláštoroch a na európskych súdoch (Verna, 2013). Rozšírenie čokolády do európskej gastronómie sa však

začalo vo Francúzku. Anna Rakúska priviezla trend pitia čokolády zo Španielska na dvor Ľudovíta XIII. Kakao sa rozšírilo do všetkých kútov, potom čo sa rozvinul medzinárodný obchod s kakaom. Konkurencia výroby, systematické pestovanie kakaovníkov a ich kultivácia spôsobila pokles cien španielskeho kakaa. Do kakaa sa už pridávalo jemné mlieko. Za vlády Ľudovíta XIV. sa začala podporovať priemyslová výroba. Prvý raz sa začal odstraňovať tuk - kakaové maslo od základnej hmoty. Podľa tradície sa kakaová hmota stláčala do tvrdých okrúhlych koláčov, ktoré slúžili ako východiskový materiál pre výrobu čokolády, ako je tomu dodnes. Spočiatku sa táto hmota využívala na výrobu čokoládového nápoja pre šľachtickú vrstvu. (Schumacher et al., 1998). Až začiatkom 20. storočia, vplyvom inovácií vo výrobe čokolády a lacnej dodávky surového kakaa sa stala čokoláda dostupná pre široké vrstvy obyvateľstva (Afoakwa, 2014).

3.2 Pestovanie a odrody kakaa

Kakao a čokoláda sú v súčasnosti veľmi populárnymi produktmi pre svoju chuť, arómu a široké využitie v potravinárstve. Tieto produkty sú vyrábané zo surového, fermentovaného a sušeného kakaa. Surové pražené kakao dodáva produktom jedinečnú kakaovú arómu, ktorá sa prejavuje v typickej chuti a vôni kakaových výrobkov (Elwers et al., 2009). Kakaovník alebo *T. Cacao* je vždyzelený tropický strom patriaci do čeľade Sterculiaceae (Slezovité) radu Malvales (Slezotvaré). Okrem *T. Cacao* existuje ešte 21 druhov rodu *Theobroma*. (Afoakwa, 2014).

Z kultivovaných druhov sú to *Theobroma Angustifolia* (kakaovník úzkolistý), *Theobroma Bicolor* (Kakaovník dvojfarebný) alebo *Theobroma Pentagona* (Kakaovník päťhranný), ktoré nie sú významné pre komerčné získavanie kakaa (Schumacher et al., 1998).

Tab. č. 1 Taxonómia druhu *T. Cacao*

Taxonómia		
Ríša	Plantae	Rastliny
Podríša	Tracheobionta	Cievnaté rastliny
Nadoddelenie	Spermatophyta	Semenné rastliny
Oddelenie	Magnoliaphyta	Krytosemenné
Trieda	Magnoliopsida	Dvojkličnolistové
Podtrieda	Dilleniidae	Diléniové
Rad	Malvales	Slezotvaré
Čeľad'	Sterculiaceae	Slezovité
Rod	Theobroma	Kakaovník
Druh	<i>Theobroma Cacao</i>	Kakaovník pravý

Zdroj: <https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=THCA>

T. Cacao dosahuje výšku od 4 – 8 metrov, no pri ideálnych tieniacich podmienkach. môže dorásť až do výšky 10 metrov. Kmeň kakaovníka je priamy, s tenkou a jemnou kôrou s hnedým zafarbením (Afoakwa, 2014). Typickým znakom kakaovníka je hlboko siahajúci kolovitý koreň a kmeňorodosť, čo znamená, že kvety a plody vyrastajú priamo z kmeňa kakaovníka. Táto vlastnosť sa objavuje aj u iných rastlinných druhov (Schumacher et al., 1998). Z rovného kmeňa kakaovníka vyrastá najčastejšie 5 hlavných konárov, z ktorých vyrastajú početné bočné konáre, šplhajúce šikmo dohora. Bočné konáre sa stupňovite rozrastajú do strán a vytvárajú širokú korunu. Listy kakaovníka sú lesklé, neopadavé, 30 cm dlhé a majú elipsovité tvar. Ružové kvety kakaovníka sa vyskytujú v trsoch a vyrastajú zo starého dreva a nánosu v mieste kmeňa (kauliflória), prípadne v mieste silných bočných konárov (ramiflória). Pre kakaovník je typická päťdielna stavba kvetu. Každý kvet obsahuje 5 kališných lístkov, 5 bielych až ružových okvetných lístkov, 5 piestikov, 5 tyčínok, korunka s piatimi zárezmi na blizne a semenník s piatimi oddielmi. V piatom roku života sa začína obdobie kvitnutia a v desiatom roku života sa na kakaovníke objavujú prvé plody (Schumacher et al., 1998).

Plody kakaovníka dorastajú do dĺžky 15 – 25 cm (Afoakwa, 2014). U kakaovníka chýbajú presne ohraničené obdobia kvitnutia a tvorby plodov. Často je možné pozorovať kvety a súčasne aj zrelé plody na jednom strome. Opelenie kvetov musí prebehnúť už

niekoľko hodín po rozkvitnutí. Kultivované formy musia byť preto opelňované ručne (Schumacher et al., 1998).

Obr. č. 1 Rastúce kakaové struky



Obr. č. 2 Vnútro kakaového struku

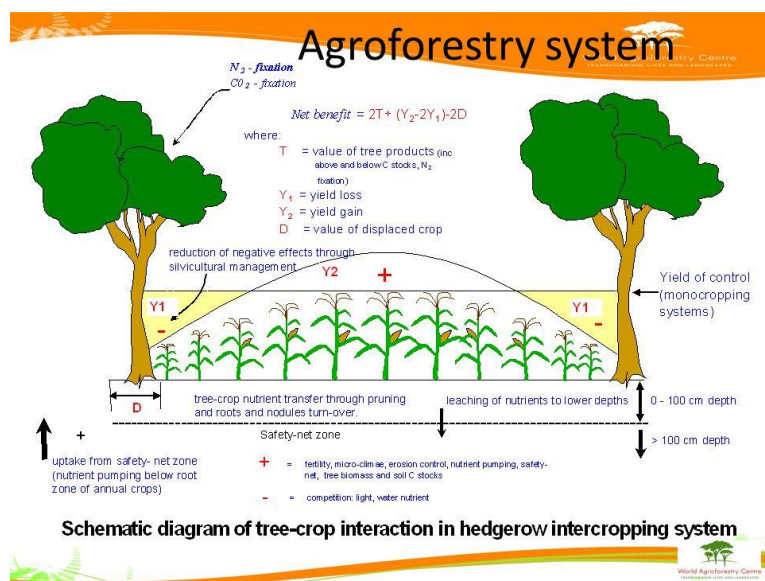


Zdroj: <https://bodygeek.ro/wp-content/uploads/2012/09/Arborele-de-cacao-201x300.jpg>
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/2b/Chocolate_in_its_Rawest_Form_%2827583224425%29.jpg

T. Cacao je rýchlo rastúca plodina, ktorá vyžaduje dostatočné množstvo tieňa, preto sa pestuje v spojení s inými stromami alebo vysokými plodinami tzv. agro-forest systémom (obr. 2). V súčasnosti sa používajú dve spôsoby: niektorá časť prírodného lesa ostáva, alebo celá pôda sa vyčistí a pestujú sa aj iné plodiny. Druhý spôsob je však ekologicky menej uspokojivý (Pohlan et Perez, 2006).

Pre pestovanie kakaovníka je vhodné horúce a daždivé podnebie s dostatočnými zrážkami (Pohlan et Perez, 2006). Ideálnymi oblasťami pre rast kakaovníka sú horské oblasti na pobreží a ostrovoch, kde je vysoká vlhkosť vzduchu a stabilná priemerná teplota 25 °C (Schumacher et al., 1998). Napriek tomu, že kakaovník je plodný po celý rok, zber úrody sa začína na konci vlhkého obdobia a môže trvať maximálne do 3 mesiacov (Pohlan et Perez, 2006).

Obr. č. 3 Agro-forest systém, využívaní pri pestovaní kakaovníka



Zdroj: http://images.slideplayer.com/9/2509691/slides/slide_37.jpg

Väčšina svetovej úrody sa zozbiera v období od októbra do marca. Druhý, menší zber sa môže vykonávať na začiatku vlhkého obdobia, ale proces sušenia je tak sťažnený (Schumacher et al., 1998). Až 80 % kakaových bôbov je vyprodukovaných maloobchodnými farmármi (Conservation Alliance, 2013). Výnosy malých pestovateľov predstavujú 200 až 700 kg za hektár v závislosti od daného regiónu. U veľkoprodukcie na rozsiahlych plantážach môžu výnosy kakaových bôbov dosahovať 3 tony z hektára (Schumacher et al., 1998).

Zber a spracovanie kakaových strukov sa vykonáva ručne. Na zber sa používajú špeciálne tvarované nože. Nože musia mať ostrú čepeľ, aby sa dosiahol hladký rez a nepoškodil sa nános na dreve, z ktorého kvitnú ďalšie kvety (The International Cocoa Organization, 2012). Pri vysoko položených plodoch sa nože nasadzujú na dlhé tyče. Miesto rezu sa obvykle ošetrí (Schumacher et al., 1998). Kakaové struky dosahujú zrelosť o 5. až 6. mesiacov po oplodnení. Zrelé plody sa spoznajú podľa zmeny sfarbenia, zelené mienia farbu na žlté, červené na oranžové. Fialové kakaové struky farbu nemenia vôbec. Zrelosť je potom možné určiť pomocou zvuku pri potrasení kakaového struku. Bôby zrelého struku sa uvoľňujú z placenty počas traseňa a uvoľnené bôby v struku hrkocú. (Schumacher et al., 1998).

Tab. č. 2 Rozdelenie odrôd a ich vlastnosti

Názov odrody	Charakteristika	Svetová spotreba
Criollo	Cenná a vzácna Menej horká a aromatická chuť Nižší obsah polyfenolov Náchylnosť k chorobám	5 – 10 %
Forastero	Komerčne významná Lacnejšie kakaové bôby	80 %
Trinitario	Hybrid Criolla a Forastera	10 – 15 %
Nacional	Pestuje sa len v Ekvádore	
Arriba	Považovaná za najlepšiu	

Zdroj: Vlastné spracovanie (Schumacher et al., 1998), (Di Mattia et al., 2017)

Odroda Criollo pochádza z Ekvádoru a Venezuely. Pestuje sa ešte v strednej Ameriky za účelom šľachtenia nových druhov vo východnej Ázii. Criollo sa vyznačuje slabou plodnosťou, avšak má najkvalitnejšie a najdrahšie bôby. Kakao z odrody Criollo sa používa na výrobu horkej čokolády. Optimálne klimatické podmienky pre odrodu Criollo sú veľké množstvo zrážok a rast vo vyšších horských polohách. Odroda Criollo tvorí podlhovasté plody s bielymi až krémovými klíčovými listami (Schumacher et al., 1998).

Odroda Forastero je najrozšírenejšou odrodou kakaa. Až 95 % svetovej produkcie kakaa pochádza z odrody Forastero. Vyznačuje sa plochými, fialovými a adstringentnými semenami. Forastero sa pestuje prevažne v Západnej Afrike, najmä v Pobreží Slonoviny, Ghane, Nigérii a Kamerune (Saltini et al., 2013). Forastero sa používa na výrobu mliečnej čokolády a kakaového prášku (Schumacher et al., 1998).

Odroda Trinitario bola vyšľachtená na Trinidade z odrody Criolla a Forastera. Jeho podiel na svetovej produkcii je veľmi nízky, len 5 %. Spolu s Criollom sa používa na výrobu kvalitných horkých čokolád. Nevýhodou Trinitaria je jeho náchylnosť k chorobám obidvoch pôvodných druhov (Saltini et al., 2013).

3.2.1 Senzorické vlastnosti kakaa

Chuť kakaa je variabilná a závisí od genetickej konštitúcie odrody kakaa. Napriek tomu chuť dokáže ovplyvniť nesprávny fermentačný proces a poľnohospodársky postup.

Pri menej kvalitných odrodách chuť nie je možné zlepšiť kvalitnejším výrobným postupom (Di Mattia et al., 2017). Prirodzenou súčasťou kakaa je jeho horkosť a trpká aróma, ktorá je spôsobená prevažne fenolickými látkami, z malej časti purínmi. Z polyfenolových látok sú to práve proantokyanidínové a flavanolové frakcie, ktoré ovplyvňujú horkosť a astrigenciu čokoládovej chuti (Di Mattia et al., 2017). Podľa niektorých zdrojov reakčné produkty polyfenolových zlúčenín tvoria hlavné látky, podmieňujúce sensorické vlastnosti kakaa. Počas fermentácie a sušenia kakaa dochádza k jeho tmavnutiu vplyvom kondenzácie produktov polyfenolových zlúčenín (Elwers et al., 2009). Úplná kakaová aróma sa naplno rozvinie až po pražení kakaových bôbov (Schumacher et al., 1998).

3.3 Spracovanie kakaových bôbov

Kakaové bôby sú uložené vo veľkých žltých, oranžových až niekedy fialových kakaových strukoch, ktoré rastú priamo na stromoch (Lefeber et al., 2011). Každý kakaový struk obsahuje približne 30 – 40 bôbov, ktoré sú obalené slizovitou buničinou (Di Mattia et al., 2017). Technologickým spracovaním dosahujú kakaové bôby správne fyzikálno-chemické, sensorické a organoleptické vlastnosti (Oracz et al., 2015). Dôležitým krokom spracovanie kakaa je jeho fermentácia. Správny fermentačný postup prispieva k vývoji chuti kakaa, zabezpečuje vysokú kvalitu kakaa a zabraňuje tvorbe mykotoxínov (Nielsen et al., 2012).

Obr. č. 4 Fermentácia kakaových bôbov



Zdroj:

https://cdn.shopify.com/s/files/1/1588/2719/files/Cocoa_farmer_David_Kebu_Jnr_holding_fermenting_cocoa_beans.__10687048615_large.jpg?v=1495302353

3.3.1 Fermentácia kakaových bôbov

Klíma v tropických podmienkach veľmi napomáha fermentačným procesom. Mikroorganizmy majú ideálne podmienky rozkladať dužinu obsahujúcu cukor a tým uvoľňovať kakaové semená (Schumacher et al., 1998). Medzi tieto fermentujúce mikroorganizmy patria kvasinky čeľade Enterobacteriaceae a v menšej miere baktérie mliečneho (LAB) a octového kvasenia (AAB) (Lefeber et al., 2011). Najčastejšie sú to druhy *Saccharomyces Cerevisiae*, *Hanseniasspora Opuntiae*, *Hanguana Thailandica*, *Pichia Kudriavzevii* a z kvasiniek *Lactobacillus Fermentum* a *Acetobacter Pasteurianus*. Prítomnosť ďalších bakteriálnych druhov ako sú *Lactobacillus Plantarum*, *Lactobacillus Pentosus* a *Gluconobacter Frateurii* môže prispievať k určitej variabilite chuti kakaa (Buczek, 2017). Po otvorení kakaového struku, celá vnútorná buničina spontánne fermentuje (Lefeber et al., 2011). Kakaové struky sa otvárajú najneskôr do 10 dní naraz, po ich zhromaždení. Na rozpolenie kakaového struku sa tradične používa drevená, na konci zhrubnutá palica. Pri údere touto palicou do stredu sa struk ľahko oddelí a nepoškodí sa tak kakaové bôby. Používanie mačety je taktiež bežné, ale kakaové bôby sa môžu ľahko poškodiť (The International Cocoa Organization, 2012). Dužina sa so semenami ručne vyberie a v košoch sa odnesie na miesto fermentácie. U drobných pestovateľov semená fermentujú uložené voľne na slnku a na banánových listoch. Na veľkých plantážach sa kakaové semená ukladajú do drevených debien stupňovito hore na seba (Schumacher et al., 1998). Fermentačné debny musia byť skonštruované z miestneho tvrdého dreva a upravené tak, aby udržiavali teplo a umožnili odtok vody z kakaovej masy (Cocoa Research Center). Voda z čerstvých semien, umiestnených na vrchných debnách tak môže stekať nadol k starším a suchším semenám. Týmto spôsobom je zabezpečená potrebná vlhkosť pre fermentačný proces. Sparené fermentujúce bôby sa potom každý deň presypávajú do nižších debien, sú tiež premiešavané, aby mali dostatok kyslíka pre oxidačné procesy. Doba fermentácie závisí od odrody kakaa. Odroda Criollo sa fermentuje 2 dni, odroda Forastero až 8 dní (Schumacher et al., 1998). Pri fermentačnej teplote 50 °C mikroorganizmy produkujú etanol, kyselina mliečnu, kyselinu octovú a iné aromatické prekurzory. Fermentácia nesmie trvať príliš dlho, aby nedošlo k nadmernému rastu mikroorganizmov, čo by sa prejavilo nevýraznou chuťou kakaa (Schwan et Wheals, 2004). Fermentácia kakaa zvyšuje priepustnosť bunkových stien, tie postupom času oslabia a bunková tekutina sa dostáva do celého semena (Schumacher et al., 1998). Fermentáciou

sa postupne mení sfarbenie fermentovaných bôbov z bledožltej až po typickú tmavohnedú farbu (Kim et Keeney, 1984).

3.3.2 Sušenie kakaových bôbov

Po fermentácii je potrebné kakao vysušiť na 5 – 7 % obsah vody v sušine. Docieli sa tým vyššia stabilita kakaa pre ďalšie spracovanie. Sušenie najčastejšie prebieha priamo na slnku v statických podmienkach, prípadne vo vyhrievacích sušičkách (Di Mattia et al., 2017). Sušenie na plantážach väčšinou prebieha uložením sfermentovaných kakaových bôbov na sieťovinu alebo obrovské ploché drevené debny vo vrstvách 5 – 10 centimetrov, umiestnené voľne na slnku. Kakaové bôby sú počas sušenia priebežne obracané a presýpané, aby sa vzduch dostal ku každému semenu a zabránilo sa tak plesniveniu (Schumacher et al., 1998). Kakaové bôby sa sušia spravidla 5 – 10 dní. Vo veľmi vlhkých oblastiach schnú kakaové bôby pomaly a preto je ich nutné zastrešovať počas noci a za vlhkého počasia (Food and Agriculture Organization, 1997). Umývanie kakaových bôbov po fermentácii môže skrátiť sušenie a zabrániť zlepovaniu semien pri sušení. Nevýhodou umývania je vyššie riziko poškodenia semien. Po usušení kakaových bôbov dostávame surové kakao (Schumacher et al., 1998). Sušenie na slnku pôsobí negatívne na obsah polyfenolických zlúčenín a na antioxidačnú aktivitu kakaových bôbov (Di Mattia et al., 2017). Di Mattia et al. (2013) zaznamenali až 30 % úbytok polyfenolov a 70 % úbytok celkového fenolového obsahu vplyvom sušenia kakaových bôbov na slnku. Podľa Alean et al. (2016) má hlavne teplota a nedostatočná vlhkosť prostredia vplyv na mieru degradácie polyfenolov v kakau. Jeho skupina dosiahla najnižšiu degradáciu polyfenolov pri teplote 40 °C. Ako môžeme vidieť, konvenčné spôsoby sušenia kakaa na slnku alebo s horúcim vzduchom nie sú šetrné pre bioaktívne látky v kakau, vzhľadom na ich energetickú neúčinnosť (Menon et al., 2017). Menon et al., (2017) sa snažili preskúmať pokročilejšie metódy sušenia. Porovnávali 4 metódy – adsorpčné sušenie, vákuové sušenie, lyofilizáciu a sušenie v sušiarňi pri 50 % vlhkosti. Najvyššiu regeneráciu celkového obsahu polyfenolov namerali pri metóde lyofilizácie. Lyofilizácia je však relatívne drahá a menej užitočná metóda. Namiesto lyofilizácie by sa mohlo viac uplatniť adsorpčné a vákuové sušenie, ktoré vykazovali vysokú regeneráciu celkového množstva polyfenolov.

Obr. č. 5 Sušenie kakaových bôbov na slnku



Zdroj:

http://www.rawcacaonibs.com/wpcontent/uploads/2015/08/15576823883_424ed28d47_z.jpg

3.3.3 Skladovanie a praženie kakaových bôbov

Surové kakao sa skladuje často vo veľkých zásobách, aby sa veľkí výrobcovia ochránili pred kolísaním cien kakaa na svetových trhoch a udržali si stabilnú kvalitu svojich čokoládových výrobkov miešaním surového kakaa. V klimatizovaných skladoch musí byť udržiavaná vhodná teplota (Schumacher et al., 1998). Sklady musia byť dostatočne vetrané, aby kakaové bôby neresorbovali vlhkosť. Vrecia by mali byť robustné, priedušné a z biologicky odbúrateľného materiálu. Keďže kakao ľahko dokáže absorbovať cudzie pachy z korenín a iných zápachajúcich látok, musí byť skladované a prepravované oddelene a v čistom prostredí bez akýchkoľvek zvyškov iných surovín (Gutierrez, 2017).

Po príchode surového kakaa do spotrebiteľskej krajiny alebo továrne sa vykonáva kontrola kvality. Pomocou oceľovej rúrky s hrotom sa odoberie malá vzorka surového kakaa pre analýzu. Kvalitné surové kakao musí byť dokonale fermentované a vysušené (Schumacher et al., 1998). Kakaové bôby musí spĺňať maximálne povolené limity pre poškodené, rozlomené, plesnivé, klíčiace bôby a bôby napadnuté hmyzom (Gutierrez, 2017). Pred spracovaním sa surové kakao ukladá z vriec do veľkého sila. Počas skladovania kakaa sa

kontroluje a zaznamenáva teplota, vlhkosť a priechod vzduchu v miestnosti. Prvým krokom spracovania je čistenie surového kakaa od fyzikálnych nečistôt (kamienky, triesky, vlákna vriec, klince) pomocou silného prúdu vzduchu, sít, kief a magnetickou silou. Súbežne sa vykonáva laboratórna kontrola kakaa, zisťuje sa množstvo tuku a obsah vody (Schumacher et al., 1998).

Nasledujúcim krokom je proces praženia, ktorý je dôležitý pre rozvinutie čokoládovej arómy kakaa. Kakao sa zvyčajne praží pri teplotách od 120 – 150 °C v časových intervaloch od 5 – 120 minút (Di Mattia et al., 2017) (Natsume et al., 2000).

Proces praženia prebieha vo veľkých elektrických zariadeniach. Teplota praženia je špecifická pre každú odrodu kakaa. U kvalitnejších odrôd sa používajú nižšie teploty pod 120 °C. Pred pražením sa musí ešte znížiť vlhkosť kakaových bôbov na 3 %, aby sa mohol uvoľniť a odstrániť tvrdý obal okolo jadra. Praženie môže prebiehať s celými kakaovými bôbmi, po ktorom sa uvoľní tvrdý obal alebo sa pražia ošúpané a rozdrvené kakaové bôby. Zmena farby kakaa je po pražení už definitívna (Schumacher et al., 1998). Praženie kakaa spôsobuje ďalší úbytok celkového fenolového obsahu vplyvom tepelnej lability fenolových zlúčenín. Obzvlášť vysoké teploty s dlhým časovým pôsobením urýchľujú degradáciu polyfenolov, čo má za následok zníženie celkových antioxidačných účinkov (Di Mattia et al., 2017) (Kofink et al., 2007). Arlorio et al. (2007) pri pražení rôznych odrôd kakaa pri teplote 130 °C nameral 37 – 48 % úbytok antioxidačnej aktivity kakaa.

3.3.4 Drvenie a lisovanie kakaa

V poslednom kroku sa spracované kakaové bôby mechanicky rozdrví až do tekutej kakaovej pasty (Di Mattia et al., 2017). Prúdom vzduchu sa odstraňujú komponenty so špecifickou hmotnosťou a týmto sú odstránené úlomky tvrdého obalu z kakaovej drviny. Výsledným produktom je drvina, ktorá sa nazýva „nibs“. Kakaová drvina podlieha prísnej skúške kvality, aby sa zabezpečilo dokonalé odstránenie nečistôt. Požiadavky na kontrolu drviny sú 50 % tuku, 3 % vody a 2 % rastlinných nečistôt. Potom sa kakaová drvina pomelie na špeciálnych mlynoch na kakao, kde dochádza vplyvom tepla k rozpusteniu tuku a výstupom z mlyna je tekutá kakaová pasta. Kakaová pasta sa do ďalšie spracovania musí skladovať za stáleho miešania a vyššej teploty, aby sa hmota nezrazila (Schumacher et al., 1998). Tekutá kakaová hmota predstavuje východiskový materiál pre všetky kakaové produkty, vrátane kakaového masla a kakaového prášku. (Miller et al., 2008), (Kofink et al., 2007).

Kakaová pasta sa lisuje pod vysokým tlakom a pri teplote 80 až 90 °C cez sitá z ušľachtilej oceli. Počas lisovania sa vylúči väčšina tuku vplyvom zvyšovania tlaku na otvory sita. Tuk odteká v podobe kakaového masla. Doba lisovania kakaovej hmoty závisí od žiadúceho množstva tuku v kakaových výliskoch. Kakaové maslo je pred formovaním filtrované, aby sa odstránili posledné stopy kakaa a nečistôt. Kakaové maslo sa formuje do finálnych 2 alebo 5 kg kvádrov. Kakaové maslo si zachováva vysokú trvanlivosť pri zachovávaní správnych podmienok skladovania. Kakaové maslo je kvalitný, hodnotný a cenný tuk (Schumacher et al., 1998). Kakaové maslo sa vyznačuje žltým sfarbením a obsahuje kyselinu olejovú, palmitovú, steárovú a malé množstvá kyseliny linolénovej a arachidónovej. Teplota topenia masla je medzi 30 – 32 °C. Pre svoje výživové a hydratačné vlastnosti na pokožku sa kakaové maslo využíva v kozmetike. Pri teplote 20 °C si kakaové maslo zachováva súdržnosť, tvrdosť a krehkosť (Verna, 2013).

Zbytok kakaovej hmoty sa lisuje do tvrdého okrúhleho výlisku s priemerom 45 cm a hrúbkou 5 cm, ktorý pripomína koláč. Kakaový výlisk obsahuje nízke množstvo tuku. Z výlisku sa neskôr vyrába kakaový prášok po jeho rozdrvení a alkalizačnom procese. Alkalizačným procesom sa zvyšuje hodnota pH pomocou uhličitanu draselného, aby sa zjemnila chuť kakaa a zlepšila jeho rozpustnosť v kvapalinách. Alkalizáciou sa zlepšujú vlastnosti kakaa a je možné dosiahnuť rôzny farebný odtieň kakaa (Miller et al., 2008) (Schumacher et al., 1998). Miller et al. (2008) uvádza, že pri alkalizácii kakaa dochádza k výraznému zníženiu flavanolov. Jeho skupina merala a porovnávala vzorky kakaa s rôznou mierou alkalizácie. Výsledky štúdie sú uvedené v tab. č. 3. Nealkalizované prírodné kakao malo zo všetkých vzoriek najvyššie ORAC, celkový obsah polyfenolov a flavanolov vrátane proantokyanidínov. Podľa množstva tuku vo výslednom kakaovom prášku rozoznávame nízkotučné kakao s 10 % množstvom tuku a polotučný s 20 % množstvom tuku (Schumacher et al., 1998).

Tab. č. 3 Priemerný obsah celkového flavanolu podľa miery alkalizácie kakaa

Typ alkalizácie	pH	Priemerný obsah celkového flavanolu
Nealkalizované kakao	5,3 – 5,8	34,6 ± 6,8 mg/g
Ľahko-alkalizované kakao	6,5 – 7,2	7,8 ± 4,0 mg/g
Stredne-alkalizované kakao	7,21 – 7,60	3,9 ± 1,8 mg/g
Silne-alkalizované kakao	7,61	3,9 ± 1,8 mg/g

Zdroj: Vlastné vypracovanie podľa Miller et al. (2009)

3.4 Zdravotný prínos T. Cacao

Kakao bolo považované za liečivú rastlinu, ktorú dlhé roky využívali Olmekovia, Mayovia a Aztéci vo svojej medicíne. Kakaové struky symbolizovali život a Aztékovia verili, že im kakaový nápoj dáva silu, múdrosť a plodnosť. Kakao malo výživné, posilňujúce a afrodisiakálne vlastnosti (Dillinger et al., 2000) (Lippi, 2009). Lekárske použitie kakaa sa neskôr prenieslo do Starého sveta a boli zdokumentované jeho liečivé vlastnosti (Dillinger et al., 2000). Kakaový nápoj bol veľmi ťažko prijatý kresťanskou Európou, pre ktorú všetky čierne a tmavo sfarbené potraviny, pochádzajúce z „barbarskej“ kultúry predstavovali hriechne potraviny. Čokoláda sa smela piť len pre liečebné účely. Kvôli tomu sa lekári snažili prichádzať s novými prospešnými účinkami kakaového nápoja (Lippi, 2009). V Badianovom kódexe z roku 1552 je popísaný spôsob liečby únavy pozitím kvetov kakaovníka. Ďalej Florentínsky kódex z roku 1590 popisuje použitie zmesi kakaových bôbov, kukurice a byliny *Calliandra Anomala* na utlmenie horúčky, ťažkého dýchania alebo pri liečbe srdcových ochorení. Neskôr v 16. storočí v Španielsku a v celej Európe sa objavovali rôzne lekárske odporúčania (Dillinger et al., 2000). Kakao sa najčastejšie využívalo pri liečbe nedostatočnej telesnej hmotnosti u podvyživených a slabých pacientov, na stimuláciu nervového systému u apatických a vyčerpaných pacientov, na zlepšenie stimulácie obličiek, trávenia a činnosti čriev (Dillinger et al., 2000) (Lippi, 2009). V menšej miere sa objavovali zmienky o liečbe anémie, nechutenstve, tuberkulózy, horúčky, zníženej produkcii materského mlieka, dny a obličkových kameňov (Dillinger et al., 2000). Kakao bolo tiež známe ako sexuálne afrodisiakum, ktoré zvyšovalo sexuálne libido. Nielen kakaové bôby, ale aj rôzne masti z kakaového masla, kôry, kvetov a listov sa používali pri podráždenej pokožke a popáleninách (Dillinger et al., 2000).

Vďaka vysokému obsahu proantokyanidínov, flavonoidov a iných fenolových látok má kakao prospešné účinky na ľudské zdravie (Zainal et al., 2016). Polyfenoly sa vyznačujú viacerými fyziologickým vlastnosťami ako sú anti-alergénne, anti-aterogénne, antioxidantné, anti-trombotické, anti-mikrobiálne, protizápalové, kardio-protéktívne a vazodilatačné vlastnosti (Balasundram et al., 2006) (Roy et al., 2001) (Verna, 2013). Tieto vlastnosti spolu s anti-karcinogénnymi, anti-mutagénnymi, či protizápalovými účinkami sa spoľahlivo uplatňujú v liečbe a prevencii rakoviny (Huang et al., 2010). V štúdií Othman et al. (2007) bola zistená antioxidantná aktivita kakaa, ďalej štúdia Corti et al. (2009) a Galleano et al. (2010) preukázali pozitívny vplyv kakaa na ochranu pred kardiovaskulárnymi ochoreniami a v štúdií Maskarinec (2009) boli preukázané protinádorové účinky. Taktiež proantokyanidíny v kakau u mnohých in vitro štúdií na experimentálnych modeloch potvrdili anti-tumorové účinky v podobe inhibície nádorových kináz a transkripčných faktorov (Kang et al., 2008). Podľa Katz et al. (2011) a Verna (2013) má kakao priaznivé účinky na sýtosť, kognitívne funkcie a náladu. Kakao obsahuje veľké množstvo epikatechínu, ktorý dokáže regulovať oxid dusnatý a tým pozitívne vplyva na cievny endotel. Polyfenoly v kakau majú ochranný účinok na nervy, chránia ich pred zápalom a poškodením, bol potvrdený aj ochranný efekt na pokožku pred oxidáciou vyvolanou UV žiarením. Kakaový extrakt je prirodzeným zdrojom kyseliny γ -aminomaslovej (GABA), ktorá pomáha znižovať krvný tlak a má upokojujúce účinky. Aj vďaka tomu má kakao dobré uplatnenie v kozmetickom priemysle a nutraceutike (Oryza Oil co.).

Zdravotný vplyv kakaa je významnou mierou determinovaný obsahom polyfenolov s antioxidantným účinkom, ktoré sa strácajú pri spracovaní kakaa a kakaových výrobkov. Počas praženia kakaových bôbov navyše dochádza k vzniku produktov Maillardových reakcií, ktoré môžu mať negatívny dopad na zdravie pri konzumácii finálnych produktov kakaa. (Di Mattia et al., 2017) (Kofink et al., 2007). Kakao je zdrojom vazoaktívnych amínov, ktoré sú niekedy spájané s migrénou a bolesťou hlavy. Marcus et al. (1997) vypracoval dvojnásobnú slepú provokačnú štúdiu na čokoládu a jej vplyv na migrénu u žien. V štúdií nebol preukázaný významný vplyv čokolády na migrénu u chronických pacientov. K podobnému názoru dospel aj Lippi et al. (2014), ktorý analyzoval výsledky epidemiologických a provokačných štúdií. Štúdie, ktoré mali pozitívnejšie korelácie, prišli so závermi, že čokoláda mala 2 – 3 krát nižší vplyv na migrénu než jej obvyklé spúšťače.

3.5 Zloženie kakaa

V kakau bolo zistených 380 chemických látok a z toho 11 má psychoaktívne účinky (Rimbach et al., 2009). Kakaová hmota obsahuje 55 % tuku a z nej vzniká kakaové maslo alebo kakaový prášok s rozličným podielom tuku podľa typu kakaového prášku. Spotrebiteľský, plnotučný kakaový prášok obsahuje okolo 24 % tuku a priemyslový kakaový prášok obsahuje 10 až 12 % tuku. Odtučnený kakaový prášok sa získava extrakciou tuku vhodnými rozpúšťadlami (Čížková a Voldřich, 2018). V kakaovom tuku prevládajú triglyceridy a neutrálne lipidy. Obsah bielkovín tvoria 10 – 15 % sušiny kakaových bôbov, z toho 52 % sú albumíny a 43 % sú globulíny. V nižších koncentráciách sú prítomné tiež glutelíny a prolamíny. Z psychoaktívnych látok v kakau sú najvýznamnejšie metylxantíny - teobromín, kofeín a teofylín. Niektoré bioaktívne látky v kakaových výťažkoch majú vazodilatačné účinky (Bertazzo et al., 2012). Polyfenolové látky sú v kakaových bôboch obsiahnuté v značnom množstve – tvoria až 10 % sušiny celého kakaového bôbu (Rusconi et Conti, 2010).

Tab. č. 4 Priemerné hodnoty zloženia kakaa a čokolády

Výrobok	Kakaový prášok	Čokoláda (horká)	Mliečna čokoláda
Voda	3	0,9	1,5
Energie (kJ/100 g)	958	2222	2239
Bielkoviny	19,6	5,5	7,7
Tuky	13,7	32,4	29,7
Sacharidy	54,3	47,6	51,5
Nasýtené MK	8,1	8,0	14,23
Mononenasýtené MK	4,6	5,1	13,2
Polynenasýtené MK	0,4	0,4	0,8
Cholesterol (mg/100 g)	0	4	23

Zdroj: (podľa Čížkovej a Voldřicha, 2018)

3.6 Fenolové látky

Fenolové zlúčeniny predstavujú rôzne deriváty pentóz, fosfátov, šikimátov a fenylypropanoidov. Fenoly sú aromatické látky, zložené z benzénového kruhu s jednou

alebo viacerými hydroxylovými skupinami pripojenými priamo na benzénový kruh (Baiano et Nobile, 2015) (Balasundram et al., 2006).

Fenolové látky môžu existovať ako jednoduché alebo komplexné zlúčeniny s vysokou molekulovou hmotnosťou (Balasundram et al., 2006). Doteraz bolo klasifikovaných viac ako 8000 polyfenolových zlúčenín (Guo et Jiang, 2009). Polyfenoly, ako sa súhrne označujú polyfenolové látky, sa bežne vyskytujú ako konjugáty mono- a polysacharidov, prípadne ako funkčné deriváty vo forme esterov a metylesterov. Fenolové zlúčeniny sa rozdeľujú do niekoľkých tried.

Tab. č. 5 Rozdelenie fenolových zlúčenín

Trieda	Štruktúra
Benzochinóny	C_6
Hydroxybenzoové kyseliny	C_6-C_1
Acetofenóny, kyseliny fenylactové	C_6-C_2
Hydroxyškoricové kyseliny, Fenylpropanoidy	C_6-C_3
Naftochinóny	C_6-C_4
Xantóny	$C_6-C_1-C_6$
Stilbeny, Anthrachinóny	$C_6-C_2-C_6$
Flavonoidy, Izoflavonoidy	$C_6-C_3-C_6$
Lignány, Neolignány	$(C_6-C_3)_2$
Biflavonoidy	$(C_6-C_3-C_6)_2$
Ligníny	$(C_6-C_3)_n$
Taníny (proantokyanáty, flavolany)	$(C_6-C_3-C_6)_n$

Zdroj: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814605006242#bib94>

Najširšiu skupinu polyfenolových látok tvoria flavonoidy, ktoré zahrňujú viac ako polovicu všetkých fenolových zlúčenín. Počet, poloha hydroxylových skupín a povaha substitúcií na aromatických kruhoch determinuje antioxidačnú aktivitu fenolových látok (Balasundram et al., 2006). Antioxidačný potenciál je prevažne založený na o-difenolovej štruktúre fenolových látok (Elwers et al., 2009). Fenolové látky tvoria sekundárne metabolity u rastlín, ktoré zabezpečujú ich rast a reprodukciu, poskytujú im ochranu pred

rôznymi predátormi a patogénmi. U plodov rastlín podmieňujú ich sfarbenie a senzorické vlastnosti, hlavne vďaka vysokej antioxidačnej aktivite (Balasundram et al., 2006).

3.6.1 Polyfenolové látky v kakau

Vysoký výskyt polyfenolov v kakau je výskumníkom dlhodobo známy. Už v roku 1909 Ultée a Van Dorsen identifikovali v kakau neznámu kryštalickú látku, ktorá sa pomenovala ako l-epikatechín. chlorogénová (Jalil et Ismail, 2008). Neskôr ďalšie 3 typy katechínov boli nájdené v kakaových bôboch. Hnedé a fialové sfarbenie sa začalo pripisovať komplexným zmenám produktov katechínov a tanínu. Postupne sa identifikovali mnohé iné polyfenoly ako proantokyanidíny, kyanidové glykozidy, kyanidín-arabinozid, kyanidín-galaktozid a ostatné diméry proantokyanidínov. Okrem hlavných zložiek v kakaových výťažkov, listov a stonkách boli objavené antokyanáty, p-kumaryl a kyselina chlorogénová (Jalil et Ismail, 2008). Celkový podiel polyfenolov v kakau je vyšší, ako je celkový podiel polyfenolov v červenom víne, zelenom a čiernom čaji (Andújar et al., 2012). Polyfenoly sa v kakaových bôboch nachádzajú v pigmentových bunkách kotyledónov. Obsah antokyanínov určuje sfarbenie v týchto pigmentových bunkách od bielej až po fialovú farbu (Rusconi et Conti, 2010). Zastúpenie a pomer fenolových zlúčenín v kakau nie je rovnaký ani v rámci tej istej odrody. Vplýva na to viacero faktorov, ako oblasť pestovania kakaovníka, klimatické podmienky počas rastu a zberu kakaových bôbov, zrelosť kakaových zŕn, prípadne doba skladovania úrody. Počas technologického spracovania, hlavne za použitia vysokých teplôt pri tepelnom spracovaní kakaových bôbov dochádza k znižovaniu koncentrácie polyfenolov v kakau (Oracz et al., 2015). Vo finálnych kakaových výrobkoch môže celkový obsah polyfenolových zlúčenín klesnúť až 10-násobne. Kakaové bôby obsahujú hlavne látky patriace do 3 skupín polyfenolových zlúčenín - katechíny, antokyaníny a proantokyanidíny (tab. č. 6) (Rimbach et al., 2009).

Tab. č. 6 Hlavné skupiny polyfenolov v kakau

Skupina	Obsah (%)	Zlúčeniny
Katechíny	37 %	epikatechín katechín gallokatechín epigallokatechín
Antokyány	4 %	kyanidín-3 L-arabinozid kyanidín-3-D-galaktozid
Proantokyanidíny	58 %	flavan-3,4-diol B1 flavan-3,4-diol B2 flavan-3,4-diol B3 flavan-3,4-diol B4 flavan-3,4-diol B5 flavan-3,4-diol C1 flavan-3,4-diol D
Flavanoly		kvercetín kvercetín-3-O-glukozid (izokvercetín) kvercetín-3-O-galaktozid (hyperosid)
Flavóny		apigenín, apigenín-8-C-glukozid (vitexín) apigenín-6-C-glukozid (izovitexín) luteolín a luteolín-7-O-glukozid dihydrokercetín dihydroxykamferol kamferolrutinozid naringenín naringenín-glukozid myricetín-glukozid

Skupina	Obsah (%)	Zlúčeniny
Ostatné		kyselina kávová kyselina chlorogenová kyselina kumarová kyselina ferulová kyselina fenylactová kyselina floreová kyselina protokatechová kyselina syringová kyselina vanilová klovamid a dideoxyklovamid

Zdroj: Vlastné vypracovanie (podľa Rimbach et al., 2009 a Rusconi et Conti, 2010)

Z katechínov je najviac zastúpený epikatechín, ktorý tvorí až 35 % celkového obsahu katechínov. Hlavnými antokyanidínmi v kakau sú kyanidín-3, L-arabinozid a kyanidín-3-D-galaktozid. Proantokyanidíny sú zastúpené hlavne ako diméry, triméry alebo oligoméry flavan-3,4-diolu v rôznych derivátoch. Podiel derivátov flavan-3,4-diolu je závislý na výrobnom procese. V sušenom odtučnenom prášku z čerstvých kakaových bôbov sa obsah rozpustných polyfenolových zlúčenín pohybuje okolo 15 až 20 % (Rimbach et al., 2009). Koncentrácia epikatechínu v suchom odtučnenom kakaovom prášku kolíše od 21,89 po 43,27 mg/g (Rusconi et Conti, 2010). Počas fermentácie dochádza k reakciám polyfenolových zlúčenín, epikatechín oxiduje a polymerizuje do komplexnejších trieslovín (Kim et Keeney, 1984). V dôsledku týchto reakcií obsah epikatechínu a celkový obsah polyfenolov vo fermentovanom odtučnenom kakaovom prášku klesá o 10 až 20 %, obsah proantokyanidínov je 3 až 5 – násobne nižší a antokyány sa strácajú. Konečný obsah epikatechínu tak môže byť od 2,66 až 16,5 mg/g v závislosti od miesta pôvodu kakaa. (Rimbach et al., 2009).

3.7 Analýza polyfenolov

3.7.1 Extrakcia polyfenolových látok

Neexistuje žiadna štandardná metóda pre extrakciu polyfenolov. Najzaužívanejšie metódy izolácie polyfenolov sú extrakcia rozpúšťadlom alebo extrakcia superkritickou kvapalinou (Bucic-Kojic et al., 2007) (Baydar et al., 2004) (Bleve et al., 2008). Na extrakciu fenolových látok má vplyv viacero faktorov - typ rozpúšťadla, polarita rozpúšťadla, čas a teplota extrakcie, chemické zloženie a fyzikálna charakteristika matrice a vzorky a ich vzájomná interakcia (Rajbhar et al., 2015) (Khoddami et al., 2013). Rozpustnosť polyfenolov závisí od chemickej povahy v rastlinách, ktorá sa značne líši. Polyfenoly sa môžu vyskytovať voľne, vytvárať vysoko polymerizované látky v interakcii s bielkovinami a sacharidmi. Rastlinné vzorky môžu obsahovať rôzne pomery fenolových kyselín, fenylnopropanoidov, antokyanátov, tanínov (Naczk et Shahidi, 2006). Polyfenoly sú niekedy vo forme nerozpustných komplexov a tie znemožňujú dokonalú extrakciu.

Rozpustnosť polyfenolov závisí hlavne od polarít rozpúšťadla. Polyfenoly sa nachádzajú v rôznych kombináciách, často vytvárajú silné vodíkové mostíky, preto sa musí voliť viac rozpúšťadiel s určitým percentom vody, aby bola extrakcia čo najúčinnnejšia (Naczk et Shahidi, 2006) (Rajbhar et al., 2015). Polyfenoly sa extrahujú v metanole, etanole, propanole, acetóne, etyl acetáte, dimetylformalíne a v ich kombináciách s vodou (Naczk et Shahidi, 2006). Pri extrakcii polyfenolov sa tiež koextrahujú nefenolické látky ako sú cukry, organické kyseliny a proteíny, ktoré sa musia vyčistiť purifikačnými metódami. Najčastejšie to sú extrakcia na pevnej fáze (SPE), extrakcia kvapalina/kvapalina (L/L) alebo tuhá látka/kvapalina (S/L) (Ignat et Popa, 2011). Na rozpustenie hydrofílnych polyfenolov vrátane aglykónov, glykozidov a oligomérov sa používa voda, metanol, etanol, acetonitril, acetón alebo ich zmes s vodou. Kvapalné extrakty sú niekedy purifikované dietyléterom v závislosti od ich rozpustnosti. (Roy et al., 2001). Pri nízkom pH sú polyfenoly stabilnejšie. Kyseliny pomáhajú zneutralizovať polyfenoly, ktoré tak ľahšie prechádzajú do organického rozpúšťadla (Khoddami et al., 2013). Klasický spôsob extrakcie polyfenolov je metóda nepriameho ohrevu vo vodnom kúpeli v rozmedzí teplôt od 20 – 50 °C (Rajbhar et al., 2015). Pre lepšiu výťažnosť sa volí dlhšia doba extrakcie v kombinácii s dostatočne vysokou teplotou. Vyššie teploty umožňujú dokonalejšie uvoľnenie vnútorného obsahu z rastlinného materiálu. Vyššia teplota tiež znižuje viskozitu rozpúšťadla, ktoré lepšie prechádza pevnou fázou a zvyšuje difúzne koeficienty

extrahovaných zlúčenín (Rajbhar et al., 2015). Príliš vysoké teploty nad 70 °C a príliš dlhá doba extrakcie sú pre polyfenoly nevhodné, keďže dochádza k ich degradácii. (Pasrija et Anandharamakrishnan, 2015).

Extrakcia za použitia ultrazvuku (UAE) je často využívaná na extrakciu zlúčenín s antioxidačnou aktivitou z rastlinných materiálov (Sang et al., 2017) (Rosseló-Soto et al., 2015). UAE spočíva vo využití deštruktívnych účinkov ultrazvukových vln. Pri UAE dochádza k narušeniu buniek, prenos hmoty je intenzívnejší a zvyšuje sa penetrácia a kapilárne účinky. Pre silnejší účinok sa používa vyššia teplota UAE, ktorá zvyšuje difúziu a tlak v extrakte (Rajbhar et al., 2015). Použitie UAE znižuje nároky na množstvo rozpúšťadla a výrazne šetrí čas (Bendicho et al., 2012) (Corbin et al. 2015). Negatívom UAE je, že znižuje opakovateľnosť analýzy. Najčastejšie sa pri analýze používajú ultrazvukové sondy a ultrazvukové kúpele (Rajbhar et al., 2015).

Extrakcia za použitia mikrovln (MAE) má mnoho výhod pri extrakcii polyfenolov. Použitím mikrovlnnej energie sa iniciuje pohyb molekulárnych iónov a rotácia dipólov, čo vedie k treniu molekúl a tým k produkcii tepla vo vzorke. Teplo poškodzuje bunkové steny a tak sa môžu efektívne uvoľniť fenolové látky (Rahaju et al., 2014) (Camel, 2001). MAE je populárna a nákladovo efektívna metóda s možnosťou pokročilých úprav ako je mikrovlnná asistovaná extrakcia pod tlakom (PMAE) a mikrovlnná asistovaná extrakcie bez rozpúšťadla (SFMAE) (Rajbhar et al., 2015). Výhodou MAE je možnosť použitia nižšieho množstva rozpúšťadla, kratšia doba extrakcie (menej ako 30 minút), vysoká výťažnosť zo vzorky (Huie, 2002). MAE tiež vykazuje dobrú reprodukovateľnosť a uchovanie vyššej hodnoty celkovej antioxidačnej aktivity v extrakte (Rajbhar et al., 2015). Pri MAE extrakcii sa najčastejšie ako rozpúšťadlá volia vodné roztoky acetónu alebo etanolu, prípadne ich kombinácia. (Mandal et al., 2007).

Pre zlepšenie účinnosti extrakcie polyfenolov z rastlinných vzoriek bolo popísaných viacero metód - napr. extrakcia 30 % etanolom pri 60 °C po dobu 2 hodín, využívanie sekvenčnej alkalickéj hydrolýzy a vyššieho počtu enzymatických postupov, použitie alfa-amylázy alebo kombinácia alfa-amylázy s celulózou (Hinneburg et Neubert, 2005) (Zupfer et al., 1998) (Yu et al., 2001). Keďže polyfenoly sú citlivé na oxidáciu, extrakcia by mala trvať menej ako 24 hodín (Naczek et Shahidi, 2006).

Antokyány sa najlepšie extrahujú v okyslenom organickom rozpúšťadle, ktorým je najčastejšie metanol. (Naczek et Shahidi, 2006) (Khoddami et al., 2013). Okyslené rozpúšťadlá mali za následok vyššiu výťažnosť o 10 – 45 % viac stanovených antokyánov

ako neokyslené rozpúšťadlá (Bridgers et al., 2010). Okyslené organické rozpúšťadlo narúša bunkové steny a stabilizuje uvoľnené antokyány. Kyselina v rozpúšťadle môže spôsobovať rozbitie komplexov antokyánov s kovmi alebo pigmentmi. Po zahutnení kyslých výťažkov antokyánov vo vákuu prebieha ich extrakcia v petrolétere, etylacetáte a dietyléteri, aby sa odstránili lipidy a nepotrebné polyfenoly (Naczek et Shahidi, 2006). Na extrakciu antokyánov sa používa extrakcia na pevnej fáze (SPE) alebo mikroextrakcia na pevnej fáze (SPME). Elúcia prebieha roztokom alkalického bóru cez extrakt na pevnej fáze (Naczek et Shahidi, 2006).

3.7.2 Stanovenie polyfenolových látok

Polyfenolové látky je možné kvantitatívne a kvalitatívne stanoviť viacerými analytickými metódami, ako je napr. nukleárna magnetická rezonancia (NMR), spektroskopia v blízkej infračervenej oblasti (NIR), vysokoúčinná chromatografia na tenkej vrstve (HPTLC), kvapalinová chromatografia s hmotnostnou spektroskopiou (LC-GS), vysokoúčinná kapilárna elektroforéza (HPCE) alebo vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC). (Rajbhar et al., 2015) (Roy et al., 2001) (Khoddami et al., 2013). Kolorimetrické metódy ako Folin-Ciocalteu, Folin-Denis a Prussian Blue sa najčastejšie používajú na hrubé kvantitatívne stanovenie celkových polyfenolov, metóda vanilín-HCl pre kvantitatívne stanovenie katechínov a metóda butanol-HCl pre kvalitatívne stanovenie proantokyanidínov. Tieto kolorimetrické metódy sú jednoduché pre použitie a vykazujú vysokú citlivosť (Makkar, 1989) (Ignat et al., 2011). Najviac používané metódy pre presnú kvantifikáciu fenolových zlúčenín sú kombinácie MS s HPLC, LC alebo GC (Khoddami et al., 2013). Niekedy môžeme vidieť použitie iných netradičných metód ako sú tenkovrstvová chromatografia (TC), plynová chromatografia (GC) a najnovšie sa tiež začína používať kapilárna elektroforéza (CE) a stĺpcová chromatografia (CC) (Rajbhar et al., 2015) (Wollgast et Anklam, 2000). Mobilnú fázu v HPLC tvoria vodné roztoky acetonitrilu alebo metanolu, v špecifických prípadoch sa využíva tiež etanol, tetrahydrofurán a 2-propanol. (Zarena et Sankar, 2011) (Takenaka et al., 2011). Pre zabránenie ionizácie fenolových látok je nevyhnutné udržiavať pH mobilnej fázy v rozmedzí 2 – 4, na čo sa používa kyselina octová, mravčia, fosforečná alebo octan, citrát a fosforečnan amónny (Lee et al., 2008). Štandardne sa pri analýze polyfenolov volí gradientová elúcia. (Khoddami et al., 2013). Na detekciu polyfenolov sa najbežnejšie používajú tandemové techniky HPLC-UV (UV-Vis spektroskopia) a GC-MS. Čoraz viac

sa používa LC-MS technika. Niekedy sa používajú aj iné detektory ako plameňovo-ionizačný (FID), elektrochemický a fluorometrický detektor (Robbins, 2003).

3.8 Analýza polyfenolov v kakau

3.8.1 Extrakcia polyfenolov z kakaa

Dostatočné extrahovanie polyfenolových zlúčenín zo vzoriek kakaa je závislé od chemickej povahy zlúčenín, veľkostí vzorky, metódy extrakcie, času a podmienok skladovania vzorky a prítomnosti interferujúcich látok, napr. sacharidy a bielkoviny. (Márquez et al., 2012). Čo sa týka vhodných rozpúšťadiel pre extrakciu polyfenolov, najlepšie sa osvedčili vodné roztoky metanolu, etanolu, prípadne acetónu. Vodné roztoky organických rozpúšťadiel výrazne zlepšujú extrakciu polyfenolov oproti jednozložkovým rozpúšťadlám. (Yilmaz et Toledo, 2006). Na začiatku sa čerstvá alebo suchá vzorka rozomelie na prášok a extrahuje vo vodnom roztoku organického rozpúšťadla alebo v CO₂. Po extrakcii je nutné odstrániť menej polárne alebo príliš polárne zlúčeniny z extraktu pomocou L/L metódy alebo využitím SPE extrakcie (Baharum et al., 2016). Okrem klasických spôsobov extrakcie polyfenolov z kakaa, ako je extrakcia kvapalnými rozpúšťadlami je možné použiť superkritickú fluidnú extrakciu s CO₂ (SC-CO₂). Samostatná SC-CO₂ je však menej účinná, preto sa táto metóda optimalizuje pomocou etanolu ako korozpúšťadla (Sarmiento et al., 2008). Napriek tomu, že ide o nákladnú metódu extrakcie, kvôli nárokom na kompresné zariadenie a chladenie, má táto metóda svoje výhody. Nie je nutné používať vyššie teploty ako pri štandardných metódach (Sarmiento et al., 2008). SC-CO₂ v kombinácii s korozpúšťadlom zlepšuje extrakciu polárnejších zlúčenín (Grigonis et al., 2005). SC-CO₂ s použitím membrán ponúka nižšiu spotrebu energie pri analýze, vysokú selektivitu, ľahkú separáciu termolabilných zlúčenín a ekologickejší spôsob analýzy (Sarmiento et al., 2008). V súčasnosti sa výskumníci snažia prichádzať s novšími metódami extrakcie, ktoré by boli časovo nenáročnejšie a spotrebovali by nižšie množstvo rozpúšťadla. Použitie ultrazvuku alebo kombinácie mikrovln a ultrazvuku sa zdá byť veľmi rýchle a účinné pre izoláciu polyfenolových zlúčenín (Chemat et al., 2011).

3.8.2 Analýza polyfenolov z kakaa

Pre kvantitatívne stanovenie fenolových látok sa veľmi často používa HPLC s reverznými stacionárnymi fázami. Mobilnú fázu tvorí systém dvoch rozpúšťadiel

s gradientovou elúciou – voda/metanol s prídavkom kyseliny octovej/trifluoroctovej a acetonitril s prídavkom kyseliny octovej/trifluoroctovej. Prietok mobilné fázy sa pohybuje od 0,4 – 1 ml/m a doba analýzy trvá od 20 – 25 min pri teplote 22 - 26 °C (Ali et al., 2015) (Natsume et al., 2014) (Cruz et al., 2015) (Alemanno et al., 2003) (Kobori et al., 2013) (Patras et al., 2014). V našej práci bol použitý systém LC-MS, ktorý sa používa aj pre stanovenie polyfenolov v kakau. Pri LC-MS je možná optimalizácia použitím tandemového módu MS-MS. Parametre analýzy ako elúcia a mobilná fáza sú podobné ako pri HPLC, len prietoky sú oveľa nižšie od 250 – 400 μm , objem analytu predstavuje 20 μm a používajú sa vyššie teploty okolo 35 °C (Karim et al., 2014) (Rabaneda et al., 2003) (Baharum et al., 2016). Pre analýzu fenolov sú tiež populárne tandemové techniky – napr. hmotnostná spektrometria s elektrónovým ionizačným sprejom (HPLC-ESI-MS-MS) a hmotnostná spektrometria v kombinácii s analyzátorom doby letu (HPLC-TOF MS) (Ali et al., 2015) (Patras et al., 2014). Na detekovanie zlúčenín sa používa PDA, Fluorescenčný, UV-VIS detektor a spektrá eluovaných zlúčenín sa zaznamenávajú pri vlnovej dĺžke v rozsahu 280 až 360 nm (UV-VIS) a excitačnej vlnovej dĺžke 230 nm (fluorescenčný detektor) (Ali et al., 2015) (Cruz et al., 2015) (Kobori et al., 2013) (Belščak et al., 2009).

3.9 Antioxidačné vlastnosti

Voľné radikály sú molekuly, ktoré sú v dočasnom stave nestále a vysoko-reaktívne. V biologických systémoch vznikajú prooxidačnými enzýmovými systémami a tiež sa tvoria pri oxidácii lipidov, zápalových procesoch, ožiarení a podobne (Dlugošová a Pšenáková, 2004). Podstatou účinku voľných radikálov na biologické systémy je, že majú jeden alebo viac nespárených elektrónov v molekulovom alebo atómovom orbitály a tým pádom odoberajú elektróny iným molekulám. Voľné radikály môžu poškodzovať časti biologických systémov alebo môžu vytvárať reaktívnejšie metabolity po reakcii s oxidovanými látkami (Dlugošová a Pšenáková, 2004). Napriek týmto negatívnym účinkom majú voľné radikály dôležitú funkciu v biologických systémoch, napr. pomáhajú regulovať proliferáciu buniek, apoptózu a génovú expresiu (Pisoschi et al., 2016). Prevalencia voľných radikálov a prooxidantov nad antioxidačnými účinkami, alebo inak povedané oxidačný stres v ľudskom tele je spájaný s rozvojom degeneratívnych porúch vrátane mutagenézy, karcinogenézy, kardiovaskulárnych ochorení a starnutia (Singh et Singh, 2008).

3.9.1 Fenolové látky a ich antioxidantné vlastnosti

Prírodné antioxidanty sa vyskytujú v mnohých potravinách ako ovocie, zelenina, huby, koreniny, obilniny, nápoje a v liečivých rastlinách (Xu et al., 2017). Z chemického hľadiska sú to prevažne látky ako fenolové kyseliny, flavonoidy, antokyány, lignany, stilbény, karotenoidy a vitamíny (Baiano et Nobile, 2015). Fenolové látky sú účinnými antioxidantmi, ktoré sú schopné inhibovať tvorbu voľných radikálov, narušujú prenos autooxidácie (Brewer, 2011). Často majú synergické účinky s inými antioxidantmi (Fernandez et al., 2002). Antioxidanty s aromatickým alebo fenolovým kruhom efektívne predávajú vodíkový atóm voľným radikálom a dočasne sa stávajú sami radikálom. Tvorbou chinónových štruktúr a vplyvom delokalizácie elektrónov v ich aromatickom kruhu stabilizujú svoju radikálovú povahu (Baiano et Nobile, 2015).

Antioxidačná aktivita flavonoidov spočíva v regulácii účinku reaktívnych kyslíkových radikálov. Flavonoidy fungujú ako lapače voľných radikálov, inhibujú lipidovú oxidáciu a enzýmy kaskády kyseliny arachidónovej, zvyšujú účinok antioxidačných vitamínov (A, E, β -karotén) a znižujú ich degradáciu (Dlugošová a Pšenáková, 2004). Antokyány a antokyanidíny často vytvárajú chelátové komplexy s kovmi a tým takisto predávajú vodíkový atóm voľným radikálom (Brewer, 2011). Takisto flavonóny a niektoré flavanóny dokážu viazať kovy na 5-hydroxylových a 4-oxo skupinách (Fernandez et al., 2002). Schopnosť redukcie voľných radikálov závisí od počtu a polohy -OH skupín v molekule polyfenolov. Vyšší počet -OH skupín v molekule a prítomnosť orto-3,4-dihydroxy štruktúry v B kruhu v kombinácii s 4-karbonyl štruktúrou na polohe C₂ a C₃ rozhoduje o účinnosti fenolových antioxidantov (Lupea et Cacic, 2008). Zdrojom antioxidačnej aktivity sú najčastejšie (1) fermentované, nepražené fenolové kyseliny – kyselina gálová, kávová a rozmarýnová, (2) fenolové diterpény – karnosol, karnosová kyselina, rosmanol a rosmadial, (3) čerstvé, nepražené čerstvé, nepražené flavonoidy – kvercetín, katechín, naringenín a kamferol (Brewer, 2011).

3.9.2 Metódy stanovenia antioxidačnej aktivity

S narastajúcim záujmom o účinnosť a funkciu antioxidantov sa vyvinulo viacero metód stanovenia antioxidačnej aktivity. Antioxidačnú aktivitu je možné stanoviť metódami DPPH, FRAP, ORAC, VCEAC, TRAP, chemiluminiscencia, CUPRAC a TEAC (Vertuani et al., 2014) (Miller et al., 2006) (Frankel et Meyerová, 2000) (Pisoschi et al., 2016) (Pred et al., 2005). Niektoré metódy spočívajú buď v prenose vodíkových atómov

(ORAC, TRAP, chemiluminiscencia), iné metódy zase využívajú prenos jednotlivých elektrónov (FRAP, CUPRAC) (Pred et al., 2005). Metódy DPPH a TEAC sú založené aj na prenose vodíka a jednotlivých elektrónov (Pisoschi et al., 2016). Najjednoduchšou metódou stanovenia antioxidantnej aktivity látok je metóda DPPH, ktorá je rýchla a má široké uplatnenie pri stanovení antioxidantnej aktivity v potravinách (Sagar et Singh, 2011). DPPH funguje na princípe redukcie radikálového kationu DPPH⁺ (1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl). DPPH sa stanovuje v metanole, etanole alebo sa používajú pufrované alkoholické roztoky. Úpravou pH roztoku sa udržiava rozpustnosť hydrofóbneho hydrazylového radikálu a analyzovaných fenolových zlúčenín. V priebehu vývoja optimalizácie DPPH testu sa do roztoku začali pridávať neiónové detergenty a citrátovo-fosfátový pufr. Po redukcii DPPH sa mení sfarbenie roztoku z fialovej na svetložltú farbu. Antioxidantný účinok sa hodnotí poklesom absorpcie vzorky pri absorpčnom maxime 515 nm. Ako štandard sa používa Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2- karboxylová kyselina). (Nicklisch et Waite, 2014) (Neugebauerová a Vábková, 2011) (Hu et al., 2016) (Frankel et Meyerová, 2000).

ORAC (Oxygen radical absorbance capacity assay) je rozšírená fluorescenčná metóda, ktorá je založená na inhibícii oxidácie peroxidovými radikálmi, iniciovanej tepelným rozkladom 2, 2'-azobis-2-metylpropánimidamidu. ORAC sa považuje za biologicky najrelevantnejšiu metódu stanovenia antioxidantnej kapacity. Pri ORAC je reakčná zmes tvorená sodnou soľou fluoresceínu (fluorescenčná sonda) a fosforečnanom sodným, do ktorej sa pridáva analyzovaná vzorka. pH reakčnej zmesi sa upravuje na 7,0. Kontrolná vzorka sa pripravuje v M – Na fosfátovom pufrí s použitím Troloxu ako štandardu. Vyhodnotenie prebieha na spektrofotometri pomocou fluorescencie pri excitácii 485 nm a emisii 520 nm (Ninfali et al., 2005), (Chin et al., 2013), (Jolić et al., 2011).

FRAP (ferric reducing antioxidant power) spočíva v stanovení schopnosti vzorky redukovať železité komplexy. Ako analyzujúce činidlo sa obvykle používa zmes roztokov: acetátový alebo octanový pufr + 2,4,6 -tripiryridyl-s-triazín (TPTZ) v kyseline chlorovodíkovej + chlorid železitý. Roztok sa vplyvom redukcie a interakcii s činidlom intenzívne farbí do modra. Antioxidantný účinok sa vyhodnocuje odčítaním absorpcie na UV-VIS spektrofotometri pri absorpčnom maxime 593 nm. Výsledok sa porovnáva so štandardom (kyselina gálová) (Vertuani et al., 2014), (Neugebauerová a Vábková, 2011).

3.9.3 Antioxidačné vlastnosti kakaa a kakaových produktov

Fenolové látky v kakau preukázali, že sú schopné v *in vitro* štúdiách inhibovať peroxidáciu lipidov a vychytávať superoxidové, hydroxylové a lipidové peroxylové radikály (Othman et al., 2007). Viacero faktorov ako pôvod, odroda, spracovanie a skladovanie kakaa má vplyv na celkovú antioxidačnú kapacitu (Hu et al., 2016). Najvyššiu stratu antioxidačnej aktivity spôsobuje proces alkalizácie kakaa (až 64%) a praženie kakaa (14%), čo je priamo úmerné strate celkového množstva polyfenolov. Na technologické spracovanie je najviac náchylný epigallokatechín, prokyanidín B1 a B2, zatiaľ čo kyselina kávova vykazuje vysokú chemickú stabilitu (Jolić et al., 2011), (Andres-Lacueva et al., 2008). Niektoré fenolové zlúčeniny môžu na testy DPPH a ORAC reagovať odlišne. Taktiež prítomnosť iných nefenolových látok môžu ovplyvňovať výsledok analýzy antioxidačnej aktivity (Hu et al., 2016). Z kakaových produktov vykazuje najvyššiu antioxidačnú aktivitu tmavá čokoláda, keďže má vyšší podiel sušiny a tým aj viac fenolových látok (Beľšák et al., 2009).

3.10 Alkaloidy

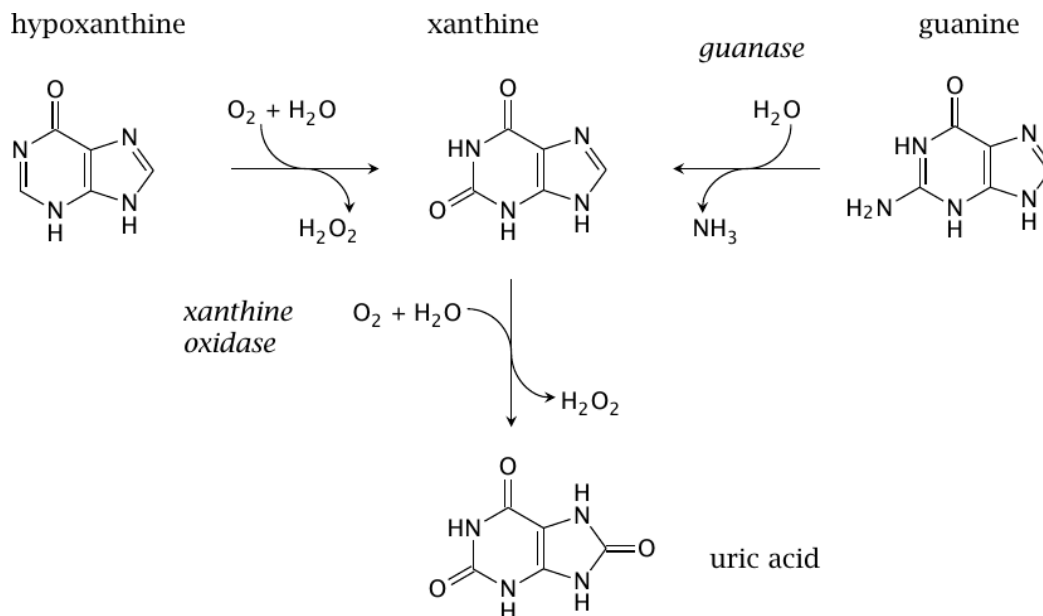
Alkaloidy sú dusíkaté zlúčeniny, ktoré tvoria zásadité soli karboxylových kyselín. Z chemického hľadiska alkaloidy predstavujú biele kryštalické látky, ktoré sú rozpustné v polárnych rozpúšťadlách. Alkaloidy spravidla obsahujú viazanú heterocyklickú zlúčeninu, podľa ktorej sa rozdeľujú do špecifických skupín. Väčšina alkaloidov obsahuje dusík viazaný do ich heterocyklickej zlúčeniny (Aniszewski, 2007). V súčasnosti poznáme okolo 10 000 alkaloidov. Alkaloidy tvoria sekundárne metabolity plnia v telách rastlín ochrannú funkciu odpudzujú, bylinožravcov a lákajú opel'ovačov. Alkaloidy sú najviac zastúpené v semenách, listoch, koreňoch a kôre rastlín (Informační centrum bezpečnosti potravín). Viacero alkaloidov je vysoko toxických, s omamnými účinkami a horkou chuťou (Aniszewski, 2007).

3.10.1 Xantíny a ich metabolizmus

Xantíny patria do skupiny purínov, ktoré sa účastnia na metabolických pochodoch u človeka. Xantíny a jeho deriváty sú súčasťou metabolizmu GMP, GDP a GTP a nukleových kyselín. Xantíny sa tiež podieľajú na katabolizme nukleotidov a nukleových

kyselín, keďže tvoria prekursor kyseliny močovej (Franco et al., 2013). Z derivátov xantínu sú odvodené alkaloidy ako kofeín alebo theobromín (Spiller, 1998).

Obr. č. 6 Metabolizmus xantínov



Zdroj: <http://watcut.uwaterloo.ca/webnotes/Metabolism/Nucleotides.html>

3.10.2 Metylxantíny a ich obsah v kakau

Metylxantíny a kyseliny metylurónové patria medzi purínové alkaloidy. Najznámejší zástupcovia metyloxantínov sú kofeín (1,3,7-trimetylxantín), theobromín (3,7-dimetylxantín) a theofylín (1,3-dimetylxantín), ktoré sa prirodzene nachádzajú v čajových listoch, yerba mate, kávových zrnách, kakaových bôboch, bobuliach guarany (Ashihara et al., 2011), (Sanchez, 2017). Metylxantíny pôsobia v ľudskom tele ako regulátory intracelulárnej hladiny vápnika, majú vplyv na inhibíciu fosfodiesterázy, na moduláciu účinkov GABA A receptoru a majú antagonistický účinok na receptory adenosínu (Franco et al., 2013). Metylxantíny sú charakteristické svojimi psychostimulačnými účinkami. Príjem nízkeho množstva metyloxantínov nepredstavuje zdravotné riziko, ale môže mať pozitívny zdravotný vplyv pre ľudí (Sanchez, 2017).

Kofeín má stimulačný účinok na nervový, kardiovaskulárny, respiračný účinok a stimuluje žalúdočnú exkréciu. Odporúčaná dávka pre bežnú populáciu tvorí 200 mg / deň. Za smrteľnú dávku kofeínu sa považuje 10 gramov, čo je približne 100 šálok kávy (Lo Coco et al., 2007).

Theobromín a theofylín má medicínske uplatnenie ako vazodilatátory a brochnodilatátory, uvoľňujú hladké svalstvo a zlepšujú dýchanie u astmatikov alebo pri iných respiračných ochorení (Lo Coco et al., 2007). Theobromín má mierny stimulačný účinok na centrálny nervový systém (Katz et al., 2011).

Kakao obsahuje metylxantínové látky, prevažne theobromín, ktorého obsah v kakau činí približne 2 až 3 % a v menšej miere kofeín (0,2 % hmotnosti kakaa) (Katz et al., 2011). Theofylín sa v kakau nachádza len v stopových množstvách (Shively et Tarka, 1984).

Na stanovenie alkaloidov v kakau sa používa HPLC s reverznou fázou a s gradientovou / izokratickou elúciou (Risner, 2008), (Sanchez, 2017), (Lo Coco et al., 2007), (Thomas et al., 2004). Mobilnú fázu tvorí najčastejšie MeOH s 0,3 % kyselinou octovou a voda, prípadne MeOH a voda s 0,1 % kyselinou octovou Risner (2008), (Sanchez, 2017), (Lo Coco et al., 2007). V odtučnenom kakaovom prášku Shively et Tarka (1984) zistili obsah theobromínu 1,9 % celkovej hmotnosti kakaa a obsah kofeínu 0,21 % celkovej hmotnosti kakaa. Risner (2008) vo svojej analýze kakaa stanovil obsah theobromínu v koncentrácii 26 000 mg / kg sušiny a obsah kofeínu v koncentrácii 2 400 mg / kg. Podľa Franco et al. (2013) je koncentrácia theobromínu vo fermentovaných vzorkách vždy vyššia ako koncentrácia kofeínu. Tento pomer theobromínu a kofeínu je však veľmi variabilný a pohybuje sa od 1,9 až 10,6 % relatívnej smerodajnej odchýlky. Na obsah metylxantínov v kakau má vplyv fermentačný proces, typ odrody kakaových bôbov a genotyp kakaovníka (Shively et Tarka, 1984), (Scapagnini et al., 2014).

4 Materiály a metódy práce

4.1 Materiály práce

4.1.1 Rastlinný materiál

Vzorky samojského kakaa (*Theobroma cacao* L.) (tab. č. 7) pochádzali od firmy Faleolo, Samoa Trust Estates. Odroda samojských vzoriek predstavovala odrodu Forastero. Všetky samojské vzorky boli zozbierané v priebehu júna až augusta 2016 a pochádzali z jedného stromu. Kakaové bôby boli na mieste spracované rôznymi spôsobmi. Zoznam a popis kakaových vzoriek pre stanovenie fenolových látok je uvedený v tab. č. 7, pre stanovenie alkaloidov v tab. č. 8. Pre porovnávanie Samojského kakaa boli použité dva vzorky kakaových bôbov - vzorky (7), (8) a jedna vzorka kakaovej hmoty (9). Všetky tri vzorky kakaa (*Theobroma cacao* L.) predstavujú odrodu Forastero, boli komerčne spracované a pochádzali z Ekvádoru (tab. č. 7). Ekvádorské vzorky boli zakúpené v čokoládovni Troubelice (Troubelice, Česká republika). Vzorka (9) predstavuje kakaovú hmotu, ktorá vznikla mletím nepražených surových kakaových bôbov a pri jej spracovaní nedošlo k zvýšeniu teploty nad 42 °C.

Tab. č. 7 Popis kakaových vzoriek pre analýzu fenolových látok

Číslo	Typ spracovania	Odroda	Pôvod	Navážky [mg]		
				A	B	C
(1)	fermentované, nepražené 4 dni fermentované, premývané 1 deň sušené	Forastero	Samoa	440,8	115,9	501,2
(2)	nefermentované, nepražené 5 dní sušené	Forastero	Samoa	501,1	103,3	501,1
(3)	čerstvé, nepražené	Forastero	Samoa	501,4	168,6	502,2
(4)	fermentované, pražené 4 dni fermentované, premývané 1 deň sušené 20 min pražené	Forastero	Samoa	500	247,9	501,5
(5)	nefermentované, pražené 5 dní sušené 20 min pražené	Forastero	Samoa	501,1	452,4	501,4
(6)	čerstvé, pražené	Forastero	Samoa	500,9	350,8	500,6
(7)	fermentované, pražené	Forastero	Ekvádor	501,5	135,7	276,5

(8)	fermentované, pražené	Forastero	Ekvádor	500,4	331	501,4
(9)	čerstvé, nepražené kakaová hmota mletie do 42 °C	Forastero	Ekvádor	465,2	186	465,9

Zdroj: Vlastné spracovanie
A, B, C – technické opakovania

Tab. č. 8 Popis kakaových vzoriek pre analýzu alkaloidov

Číslo	Typ spracovania	Odroda	Pôvod	Navážky [mg]		
				A	B	C
(1)	fermentované, nepražené	Forastero	Samoa	50,01	48,19	52
(2)	nefermentované, nepražené	Forastero	Samoa	47,21	45,2	52,48
(3)	čerstvé, nepražené	Forastero	Samoa	53,48	45,93	54,64
(4)	fermentované, pražené	Forastero	Samoa	44,11	41,54	54,48
(5)	nefermentované, pražené	Forastero	Samoa	48,48	54,25	55,82
(6)	čerstvé, pražené	Forastero	Samoa	56,3	44,41	48,75
(7)	fermentované, pražené	Forastero	Ekvádor	56,09	49,54	54,1
(8)	fermentované, pražené	Forastero	Ekvádor	56,72	44,3	40,22
(9)	čerstvé, nepražené	Forastero	Ekvádor	44,13	42,28	46,48

Zdroj: Vlastné spracovanie
A, B, C – technické opakovania

4.1.2 Chemikálie a štandardy

Z analytických štandardov boli použité fenolové kyseliny: [protokatechuová, kávová, chlorogénová, gálová, ferulová, kumarová, syringová, vanilová, trans-škoricová, anízová, horčicová, salicylová, 3-hydroxybenzoová a 4-hydroxybenzoová (99 %), 3,4,5-trimetoxybenzoová] a flavonoidy [(-)epikatechín, (+)katechín, luteolín, kaempferol, epikatechín-galát, myricetín, kvercetín, rutín, naringenín, taxifolín a apigenín (95 %)]. Z vnútorných štandardov boli použité [kofeín ¹³C₃, kyselina 5-fluórsalicylová a kyseliny trans-škoricovej-p, 2,3,4,5,6-d₆]. Všetky štandardy boli zakúpené od Sigma Aldrich (Česká republika). Z rozpúšťadiel boli použité vysoko čisté rozpúšťadlá Chromasolv™ [acetonitril (ACN), n-hexán, metanol (MeOH), dietyléter], kyselina mravčia (FA, analytická čistota).

4.1.3 Prístroje a zariadenia

Pre prípravu, extrakciu a uchovávanie vzoriek boli použité nasledujúce zariadenia:

- SPE Vacuum Manifold (Millipore Sigma, USA)
- Zdroj vakua pro SPE (KNF, Neuberger, USA)
- Kolonky, Waters OASIS® (HLB, Cartridge, USA)
- Laboratorne váhy, e=0,1; d=0,01, ViBRA (Shinko Denshi CO., Japonsko)
- Kónické centrifugační zkušavky, 15 ml (ThermoFisher Scientific, USA)
- pH metr s automatickou teplotní kompenzací PH114 (Snail Instruments, ČR)
- Ultrazvukový kúpeľ, RA1680 (Tesla, ČR)
- Automatická pipeta, 100 – 1000 µl (Eppendorf, Nemecko)
- Automatická pipeta, 10 – 100 µl (Eppendorf, Nemecko)
- Dusíkový koncentrátor vzorků, typ NDK 200-2 (Labicom, s.r.o, ČR)
- Mikroskúmvky, 1,5 ml (Eppendorf, Nemecko)
- Centrifuga, Rotanta 460 R, Hettich, Nemecko
- Vyhrievaný koncentrátor MiVac (Genevac, Ipswich, UK)
- Vialky, 2 ml, Agilent Technologies

Pre analýzu fenolových látok a alkalodov boli použité nasledujúce zariadenia:

- Hmotnostný spektrometer UHR-Qq-TOF; Impact II (Daltonik GmbH, Nemecko)
- UHPLC, UltiMate 3000 (Thermo Scientific, Waltham, USA)
- Chromatografická kolona Kinetex P5, 100A, 1.7 µm, 100 × 2.1mm (Phenomenex, USA)

4.1.4 Software

4.2 Metódy práce

4.2.1 Príprava vzoriek

Všetkých 9 kakaových vzoriek bolo vysušených a zbavených celkového obsahu tuku pomocou n-hexánu. Do vysušených kakaových vzoriek (1 g) bolo pridaných 3 ml n-hexánu. Vzorky boli extrahované počas 1 minúty na vortexe a počas 5 minút v ultrazvukovom kúpeľi. Následne boli vzorky centrifugované pri 15 000 otáčkach/min počas 10 minút pre lepšie oddelenie n-hexánovej vrstvy. Celý postup extrakcie bol

zopakovaný štyrikrát, čím sa získalo približne 12 ml extraktu s n-hexánom. Následne bol n-hexán odparený v prúde dusíka použitím vyhrievaného bloku pri teplote 40 °C, pričom bol získaný výťažok z kakaového masla. Zostatok n-hexánu z odtučneného kakaového prášku bol odstránený umiestnením vzoriek do vyhrievaného koncentratora počas 30 minút a pri teplote 40 °C.

4.2.2 Optimalizácia metódy pre stanovenie fenolových látok

Pre optimalizáciu metódy sme otestovali dve metódy extrakcie – L/L extrakcie a SPE extrakciu. Množstvo 600 mg vzorky č. 7. (pražené a fermentované kakao, Ekvádor) bolo odvážených na analytickej váhe. Vzorka (navážka 600,13 mg) bola následne extrahovaná v 6 ml 80 % MeOH. Vzorka bola extrahovaná 2 minúty v ultrazvukovom vodnom kúpeli a 1 minútu na vortexe. Vzorky boli ďalej centrifugované po dobu 10 minút, pri 15 000 otáčkach/min a teplote 37 °C. Alikvót bol oddelený od pevného sedimentu a prevedený do falkonky. Celý postup bol zopakovaný trikrát. Konečný extrakt bol odparený na vákuovej rotačnej odparke pri teplote 40 °C, počas 5 hodín a pri 170 otáčkach/min. Banka s vysušením extraktom bola hydratovaná v deionizovanej vody (laboratórna teplota) o množstve 7 ml a extrakt bol dôkladne rozpustený pomocou ultrazvuku. Extrakt bol upravený približne na pH 2,5 prídavkom malého množstva kyseliny mravčej. Žiadúca hodnota pH sa vyhodnocovala pomocou farebnej zmeny na lakmusovom pH papieri. Okyslení extrakt sme rozdelili do 6 skúmaviek po 1 ml. 3 skúmavky po 1 ml boli purifikované metódou L/L a 3 skúmavky po 1 ml metódou SPE.

Pre metódu L/L bola použitá ako kvapalná fáza dietyléter. Do každej skúmavky sme napipetovali 2 ml dietyléteri. Vzorky boli potom extrahované podobným spôsobom, ako pri extrakcii v MeOH (2 min ultrazvuk, 1 min vortex). Vzorky boli centrifugované po dobu 5 minút pri 15 000 otáčkach/min a pri teplote 20 °C. Do prázdnych označených falkoniek sme odpipetovali supernatant zo vzoriek pomocou pascalovej pipety. Extrakčný postup bol opakovaný trikrát za rovnakých podmienok. Pre rýchlejšie sušenie sme do extraktu pridali 1 g sušidla (síran sodný). Vzorky so supernatantom sme nechali odpariť v prúde dusíka použitím vyhrievaného bloku pri teplote 40 °C počas 1 hodiny.

Pre metódu SPE boli použité kolónky SPE s vymývaním cez manifold. SPE kolónky sa aktivovali s 5 ml MeOH a následne boli premyté 10 ml deionizovanej vody (laboratórna teplota). Do SPE kolóniek boli napipetované vzorky po 1 ml a tie boli sušené

počas 20 minút. Elúcia potom prebehla s použitím 3 ml MeOH. Extrakty s MeOH boli odparené v prúde dusíka použitím vyhrievaného bloku pri teplote 40 °C počas 1 hodiny.

4.2.3 Extrakcia vzoriek pre stanovenie fenolových látok

Všetky vzorky odtučneného kakaa (9 vzoriek po 3 technické opakovania A, B, C; tab. č. 7) boli odvážené na analytickej váhe v množstve 500 mg (navážky sú uvedené v tab. č. 9.). Každá vzorka bola ošetrená pridaním 10 µl vnútorného štandardu (10 µg/ml kyseliny 5-fluórsalicylovej a kyseliny trans-škoricevej-p, 2,3,4,5,6-d₆). Vzorky boli následne extrahované 20 ml 80 % MeOH. Pre lepšiu stabilitu fenolových zlúčenín voči oxidácií v kakaovom prášku bolo pridaných 40 ng/ml BHT. Vzorky boli premiešané na orbitálnej trepačke počas 24 hodín a centrifugované 10 minút pri 15 000 otáčkach/min. Supernatant bol odparený na vákuovej rotačnej odparke pri 170 otáčkach/min a pri teplote vodného kúpeľa 40 °C. Vysušený zbytok bol rozpustený v 5 ml deionizovanej vody (laboratórna teplota). Extrakt bol upravený približne na pH 2,5 prídavkom 10 µl HCl. Výsledná hodnota pH sa vyhodnocovala pomocou farebnej zmeny na lakmusovom pH papieri. Pre extrakciu fenolových látok bola použitá metóda extrakcie L/L s dietyléterom. Do každého extraktu bolo pridaných 5 ml dietyléteru a extrakty boli miešané počas 1 minúty na orbitálnej trepačke. Pre lepšiu výťažnosť fenolových látok boli vzorky s dietyléterom centrifugované 5 minút pri 15 000 otáčkach/min. Extrakčný postup bol opakovaný trikrát za rovnakých podmienok. Získané extrakty (15 ml) boli odparené do sucha v prúde dusíka použitím vyhrievaného bloku pri teplote 40 °C.

4.2.4 Analýza pre stanovenie fenolových látok

Supernatant v množstve 5 µl bol zriedený v 1 ml roztokom MeOH:voda v pomere 1:1. Vzorky boli neskôr prevedené do sklenenej nádoby a podrobili sa analýze na prístroji LC-MS. LC-MS pozostávala z ultra vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (UHPLC) (UltiMate 3000, Thermo Scientific, Waltham, USA) s ultra vysokým rozlíšením qq-analyzátora doby letu s hmotnostných spektrometrom (UHR-Qq-TOF; Impact II, Bruker, Billerica, USA). Teplota v chromatografickej kolóne bola nastavená na 35 °C. Gradientová elúcia s prietokom mobilnej fázy 0,200 ml/min prebiehala s použitím mobilnej fázy A (vody s prídavkom 0,1 % kyseliny mravčej) a mobilnej fázy B (MeOH s prídavkom 0,1 % kyseliny mravčej) spôsobom, uvedeným v tab. č. 9.

Tab. č. 9 Priebeh gradientovej elúcie

Čas analýzy	Pomer fáz A : B
0 minút	95 : 5
3,6 minút	95 : 5
10 minút	0 : 100
15 minút	95 : 5
17 minút	95 : 5
20 minút	95 : 5

Zdroj: Vlastné spracovanie

4.2.5 Analýza pre stanovenie alkaloidov

Odtučené kakaové vzorky v množstve 50 mg boli ošetrené 10 μ l vnútorného štandardu (1 mg/ml; kofeín kofeín $^{13}\text{C}_3$) a 990 μ L horúcej vody o teplote 90 °C. Vzorky boli následne miešané na orbitálnej trepačke 1 minútu a odstredené na centrifúge pri 15 000 otáčkach/min počas 5 minút. Supernatant v množstve 4 μ l bol zriedený v 1 ml roztokom MeOH:voda v pomere 1:1. Vzorky boli neskôr prevedené do sklenenej nádoby a podrobili sa analýze na prístroji LC-MS. LC-MS pozostávala z ultra vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (UHPLC) (UltiMate 3000, Thermo Fisher, Waltham, USA) s ultra vysokým rozlíšením qq-analyzátora doby letu s hmotnostných spektrometrom (UHR-Qq-TOF; Impact II, Bruker Daltonik, Bremen, Nemecko). Na identifikáciu purínových alkaloidov bola použitá kolóna Acclaim™ s hrúbkou 20 C18. Gradientová elúcia sa uskutočnila použitím mobilnej fázy A (voda) a mobilnej fázy B (Acetonitril s prídavkom 0,1 % kyseliny mravčej) nasledujúcim spôsobom: 0 minút 90 : 10 (A:B).

4.2.6 Štatistické vyhodnotenie

Vzorky boli pripravené troma nezávislými extrakciami. Pre analýzu vzoriek sme použili softvér:

- Chromeleon Xpress, Chromeleon 6.80. SR15, ThermoFisher Scientific, USA
- Compass DataAnalysis 4.3 (Bruker Daltonik GmbH, Nemecko)
- OtofControl 4.0 (Bruker Daltonik GmbH, Nemecko)
- HyStar 3.2 (Bruker Daltonik GmbH, Německo)

- Metabolite Detect 2.0 SR4 (Bruker Daltonik GmbH, Nemecko)

Pre štatistické vyhodnotenie výsledkov sme použili klastrovú analýzu, ktorá bola vypracovaná v programe Statistica 12.1 (StatSoft, USA). Použili sme Wardovu metódu s euklidovskými vzdialenosťami ako zhukovací algoritmus. Testom ANOVA sme testovali štatistickú významnosť vzoriek pomocou programu Statistica 12.1 (StatSoft, USA). Pre určenie odlišností medzi vzorkami sme vybrali Tukey-ho HSD test. Rozdelenie normality sme testovali pomocou Kolmogorov-Smirnovovho a Lilieforsovho testu. Test rozdelenia normality nepriniesol najlepšie výsledky, avšak môžeme konštatovať, že normalita dát sa dá pre tento súbor predpokladať. Pre vyhodnotenie výsledkov bola použitá tiež metóda viacerozmernej analýzy, konkrétne išlo o analýzu hlavných komponent (PCA) v programe programu Statistica 12.1 (StatSoft, USA).

5 Výsledky

5.1 Výsledok analýzy fenolových látok

Výstupy analýzy fenolových látok, ktoré boli analyzované LC-MS Q-TOF s vysokým rozlíšením sme vyhodnocovali v programe Compass Data Analysis 4.3. Štatistické výsledky sme vypracovali v programe Statistica. Výsledné priemerné množstvá fenolových látok s priemernou smerodajnou odchýlkou sú uvedené v tab. č. 10 v jednotkách [g/kg] odučnenej kakaovej sušiny. Chyba merania činila 3,60 %.

Tab. č. 10 Priemerný obsah fenolov a fenolových kyselín v kakau

[g/kg]	(1) ferm. nepr.	(2) nefer. nepr.	(3) čers. nepr	(4) ferm. praž.	(5) neferm praž.	(6) čers. praž.	(7) praž. ferm.	(8) nepr. ferm.	(9) nepr. čer.
Epikatechín	57,18^a ± 22,07	48,23^a ± 37,35	45,43 abcd ± 19,37	422,73 d ± 99,02	767,02 ab ± 244,08	59,32 cd ± 27,81	573,59 ± 276,78	488,64 bcd ± 195,93	214,89 abc ± 137,25
(+)Katechín	85,34^a ± 27,32	63,29^a ± 37,58	66,26^a ± 23,17	36,54^a ± 11,46	49,59^a ± 20,03	1,83^a ± 1,02	32,13^a ± 11,91	34,22^a ± 16,39	44,52^a ± 34,14
Kys. Protokatech uová	51,31 ab ± 5,99	51,28 ab ± 5,60	34,87 ab ± 11,05	27,05 ab ± 4,52	23,11 ab ± 5,15	12,54^a ± 0,25	40,88 ab ± 5,20	28,41 ab ± 2,93	72,49^b ± 50,26
Kvercetín	28,52 ab ± 2,85	12,57 ab ± 3,58	16,39 ab ± 2,91	4,05^{ab} ± 1,09	16,81 ab ± 5,64	0,08^a ± 0,03	15,43 ab ± 4,31	11,71 ab ± 2,74	43,35^b ± 44,53
Luteolín	3,39^a ± 3,14	3,78^a ± 2,14	1,52^a ± 0,41	0,75^a ± 0,10	0,37^a ± 0,04	tr.	3,56^{ab} ± 0,31	7,38^b ± 0,73	4,61^{ab} ± 2,54
Taxifolín	tr.	1,75^a ± 2,14	29,88^b ± 17,42	1,06^a ± 0,70	3,65^a ± 1,35	tr.	4,19^a ± 2,73	1,86^a ± 0,29	4,38^a ± 5,77

[g/kg]	(1) ferm. nepr.	(2) nefer. nepr.	(3) čers. nepr	(4) ferm. praž.	(5) neferm praž.	(6) čers. praž.	(7) praž. ferm.	(8) nepr. ferm.	(9) nepr. čer.
Naringenin	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	1,97^a ± 1,56	0,62^a ± 0,22	2,02^a ± 1,80
Myricetin	0,88^{ab} ± 0,08	0,76^{ab} ± 0,01	1,02^b ± 0,16	0,77^{ab} ± 0,09	0,76^{ab} ± 0,05	n.d.	0,72^{ab} ± 0,12	0,71^a ± 0,02	0,83^{ab} ± 0,05
Keamferol	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.
Apigenin	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.
Epikatechin -galát	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Rutín	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3- hydroxyben zoová kys.	8,21^a ± 2,91	8,90^a ± 0,72	11,40^a ± 1,36	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.
4- hydroxyben oová kys.	132,35^a ± 32,69	156,40^{ab} ± 40,40	216,50^b ± 49,72	14,64^a ± 3,17	7,61^a ± 1,69	11,04^a ± 0,93	14,67^a ± 1,35	17,59^a ± 5,95	22,36^a ± 10,44
3,4,5- trimetoxibe nzoová kys.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.
Kys. kávová	0,11^a ± 0,02	1,03^a ± 1,36	2,86^a ± 0,81	tr.	0,65 ± 0,29	tr.	0,46^a ± 0,76	tr.	tr.
Kys. syringová	13,62^a ± 0,66	9,49^a ± 0,47	8,26^a ± 1,52	1,76^a ± 0,69	2,11^a ± 0,62	1,91^a ± 0,81	1,05^a ± 0,48	1,52^a ± 0,34	5,10^a ± 6,00
Kys. vanilová	2,64^{ab} ± 0,64	7,12^{ab} ± 5,25	4,10^{ab} ± 1,23	tr.	0,93^a ± 0,61	6,83^b ± 1,46	0,46^a ± 0,20	4,71^{ab} ± 0,79	tr.
Kys. ferulová	7,95^{ab} ± 1,15	10,90^{ab} ± 1,31	11,70^b ± 4,01	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	1,62^a ± 0,45

[g/kg]	(1) ferm. nepr.	(2) nefer. nepr.	(3) čers. nepr	(4) ferm. praž.	(5) neferm praž.	(6) čers. praž.	(7) praž. ferm.	(8) nepr. ferm.	(9) nepr. čer.
Kys. trans- škoricová	tr.	tr.	n.d.	n.d.	tr.	n.d.	n.d.	1,81 ± 1,13	n.d.
Kys. salicylová	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.
Kys. sinapová	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.
Kys. kumarová	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.
Kys. anízová	tr.	tr.	tr.	tr.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kys. chlorgénová	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kys. gálová	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Zdroj: Vlastné spracovanie

V spodnom čísle je vyjadrená smerodajná odchýlka.

Uvedená skratka **tr.** znamená stopové množstvo látky, ktorá je prítomná a detekovaná, ale nekvantifikovateľná. Skratka **n.d.** predstavuje látku, ktorá nebola detekovaná (pod hranicou detekcie tj. odozva nižšia než 3x výšky šumu)

Indexom sú vyjadrené signifikantné rozdiely medzi vzorkami v rámci každej sledovanej látky na hladine významnosti $\alpha = 5 \%$ (ANOVA).

Z fenolových látok sa nám podarilo stanoviť (-)epikatechín, (+)katechín, kvercetín, luteolín, taxifolín, naringenín, myricetín. Najvyšší obsah (-)epikatechínu sme namerali vo vzorke (5) nefermentované, pražené kakao. Ďalej vysoké množstvá (-)epikatechínu obsahovali vzorky (7) a (8), ktoré prešli fermentáciou. Obsah (-)epikatechínu v pražených samojských vzorkách bol vyšší, než v nepražených vzorkách.

(+)Katechín bol najviac zastúpený vo vzorke (1) fermentované, nepražené. Vysoké obsahy (+)katechínu boli typické pre všetky nepražené Samojské vzorky (1) fermentované, nepražené, (2) nefermentované, nepražené, (3) čerstvé, nepražené. Výnimku tvorilo ekvádorské kakao, kde najnižší obsah (+)katechínu bol práve vo fermentovanom a praženom kakau (7). (4) fermentované, pražené kakao fermentované, pražené a (8)

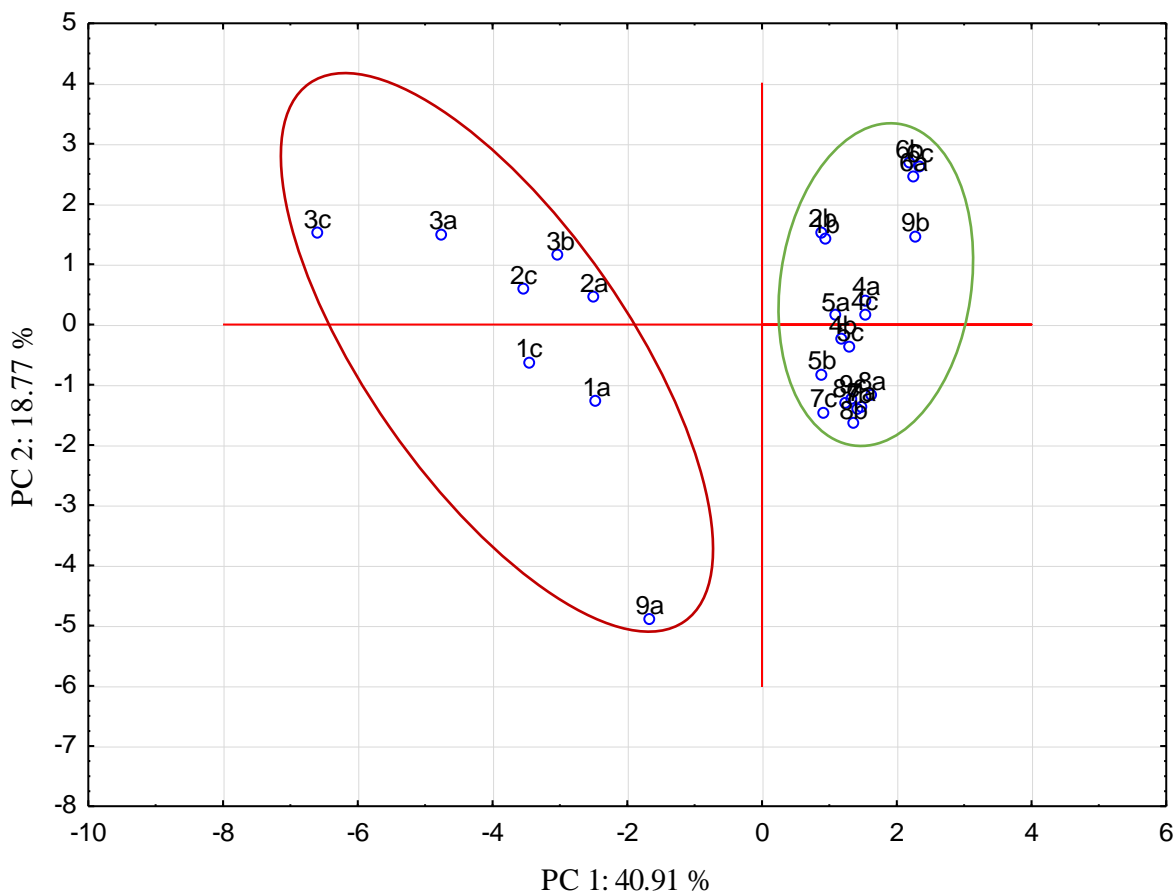
obsahovalo nižšie množstvo (+)katechínu a vyššie množstvo protokatechuovej kyseliny než ich nefermentovaná pražená varianta (5).

Najvyššie hodnoty kvercetínu sme zaznamenali u vzorky (9) nepražené a čerstvé, za ním nasledovala vzorka (1) fermentované, nepražené kakao. Výrazné vyšší obsah luteolínu sme zaznamenali vo vzorke (8) nepražené, fermentované kakao. Pražené Samojské vzorky (4) fermentované, pražené, (5) nefermentované, pražené, (6) čerstvé, pražené naopak obsahovali nižšie množstvá luteolínu než nepražené Samojské vzorky (1) fermentované, nepražené; (2) nefermentované, nepražené; (3) čerstvé, nepražené. Slabý výsledok priniesla vzorka (6) čerstvé, pražené kakao, kde boli množstvá luteolínu a taxifolínu pod hranicou kvantifikácie. Podobne, výrazné rozdiely vykazoval obsah taxifolínu vo vzorke (3) čerstvé, nepražené kakao, ktorá obsahovala 8 násobne vyššie množstvo taxifolínu než pražená verzia (5) nefermentované, pražené. Z fenolových kyselín sa nám podarilo namerať v malých množstvách kyselinu 3-hydroxybenzoovú, 4-hydroxybenzoovú, 3,4,5-trimetoxybenzoovú, kávovú, syringovú, vanilovú, ferulovú, transškoricovú. Kyselina kávová sme dokázali namerať vo všetkých nepražených vzorkách kaka. Kyselina ferulová a 3-hydroxybenzoová kyselina bola zistená len u nepražených Samojských vzorkách. Kyselina syringová bola nameraná vo všetkých vzorkách, ale vyššie obsahy vykazovali nepražené samojské vzorky a kakaová hmota z čerstvých Ekvádorských bôbov (9). To isté bolo v prípade 4-hydroxybenzoovej kyseliny, ktorá bola extrémne zvýšená (28 násobne) v prípade vzorky (3) čerstvé, nepražené než vo vzorke (5) nefermentované, pražené kakao.

V diagrame komponentného skóre v sústave PC 1 a PC 2 môžeme vidieť protichodnú separáciu vzoriek do dvoch veľkých skupín. Samojské vzorky (4b), (4c) fermentované, pražené kakao (5c), (5a) a nefermentované, pražené kakao boli významné v rámci komponenty PC 2. Výsledok z diagramu komponentného skóre takmer kopíruje dendogram klastrovej analýzy, ktorá rozdelila kakaové vzorky do dvoch zhlukov. V najpočetnejšom zhluku sú najviac zastúpené ekvádorské a samojské pražené vzorky. V rámci tohto zhluku sa vytvoril ešte menší zhluk, zložený len z technických opakovaní čerstvé, praženej vzorky (6). Druhý, vzdialenejší zhluk, ktorý je vyznačený červenou farbou zahrňuje vzorky s väčším rozptylom, t. j. viac odlišné. Ide prevažne o nepražené varianty, ktoré korelujú s distribúciou fenolových kyselín (obr. č. 10). Ekvádorská vzorka (9a) vykazuje najväčšou odlišnosť v rámci červeného zhluku. Práve táto ekvádorská

čerstvá vzorka mala výrazne nízky obsah (-)epikatechínu oproti ekvádorským praženým a fermentovaným vzorkám.

Obr. č. 8 Diagram komponentného skóre vybraných premenných PC 1 a PC 2

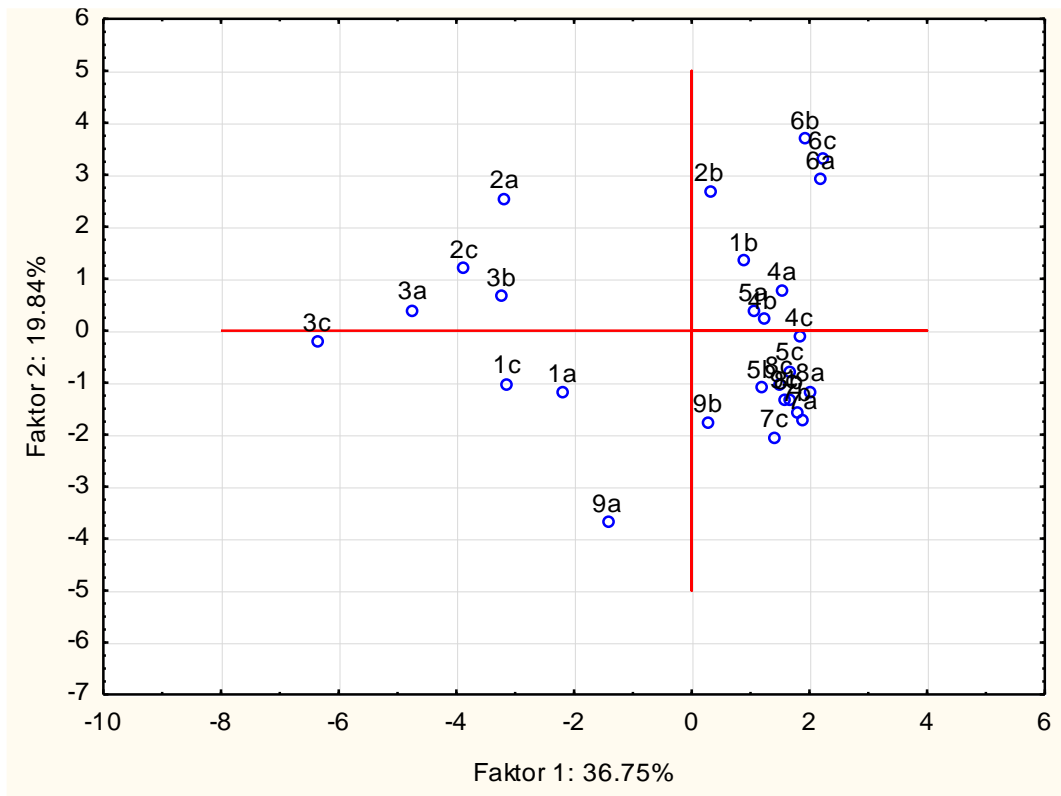


Zdroj: Vlastné spracovanie

Započítaním alkaloidov do PCA analýzy sme dosiahli vyváženejší výsledok, obzvlášť pre vzorky vo vzdialenom zhluku (obr. č. 9). V tomto prípade Samojskej vzorky (3a), (3b), (3c) čerstvé a nepražené kakao a Ekvádorská vzorka (9b) nepražené, čerstvé kakao sa preukázali byť významné.

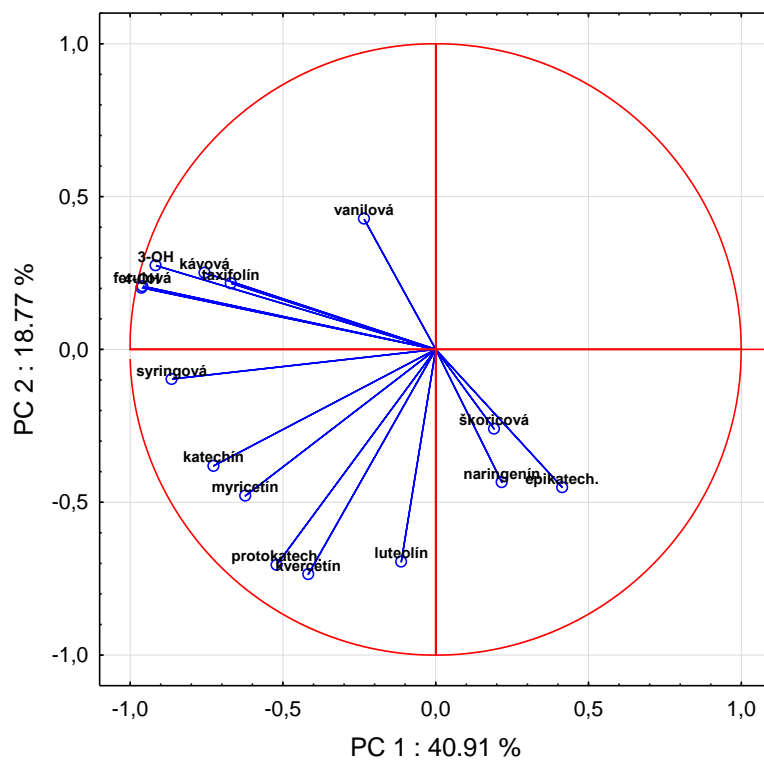
Z grafu komponentného skóre vybraných premenných PC 1 a PC 2 (obr. č. 10) môžeme vidieť významný vplyv luteolínu na rozmiestnenie vzoriek medzi jednotlivými fenolovými látkami. Podobne významný vplyv vykazuje aj kyselina syringová v rámci komponenty PC 2. Fenolové kyseliny 4-OH, 3-OH, ferulová a kávová vytvorili osobitnú skupinu na grafe komponentného skóre.

Obr. č. 9 Diagram komponentného skóre vybranných premenných PC 1 a PC 2 so započítaním alkaloidov



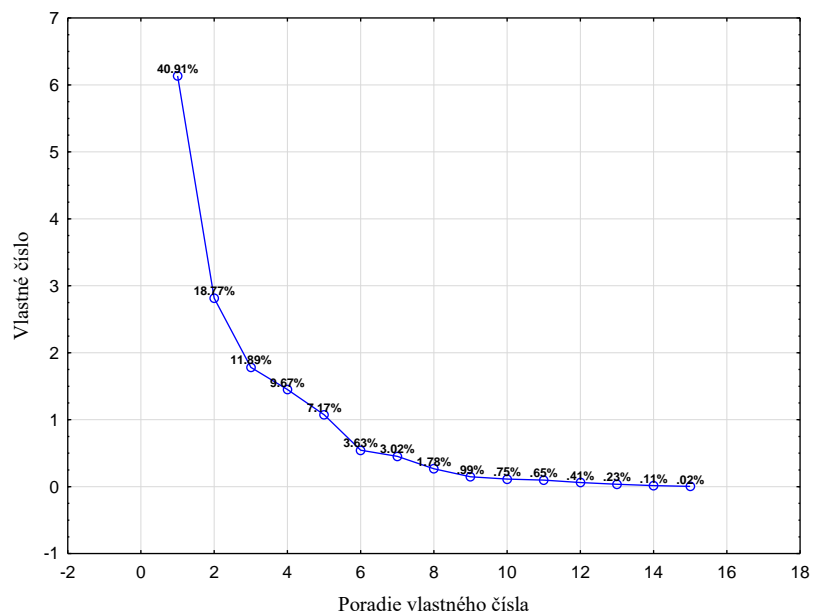
Zdroj: Vlastné spracovanie

Obr. č. 10 Graf komponentného skóre premenných PC 1 a PC 2



Zdroj: Vlastné spracovanie

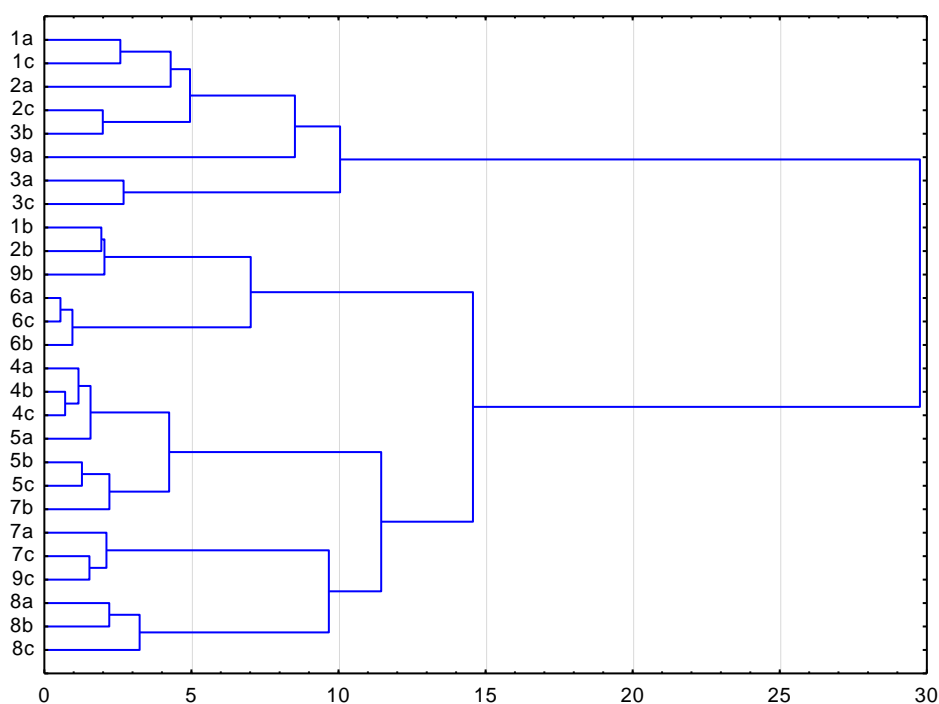
Obr. č. 11 Sutinový graf



Zdroj: Vlastné spracovanie

V sutinovom grafe (obr. č. 11) môžeme vidieť percentuálne vyjadrenie rozptylov všetkých faktorov, ktoré existujú medzi vzorkami. Najvýraznejším faktorom bol faktor PC 1, ktorý v sebe zahrňoval 40,91 % celkovej variability súboru. Menej významný bol faktor PC 2, keďže vyjadroval len 18,77 % celkovej variability. Priebeh sutinového grafu by mal byť čo najviac vertikálny pre dosiahnutie vyššej štatistickej významnosti.

Obr. č. 12 Dendogram hierarchickej klastrovej analýzy pre fenolové látky

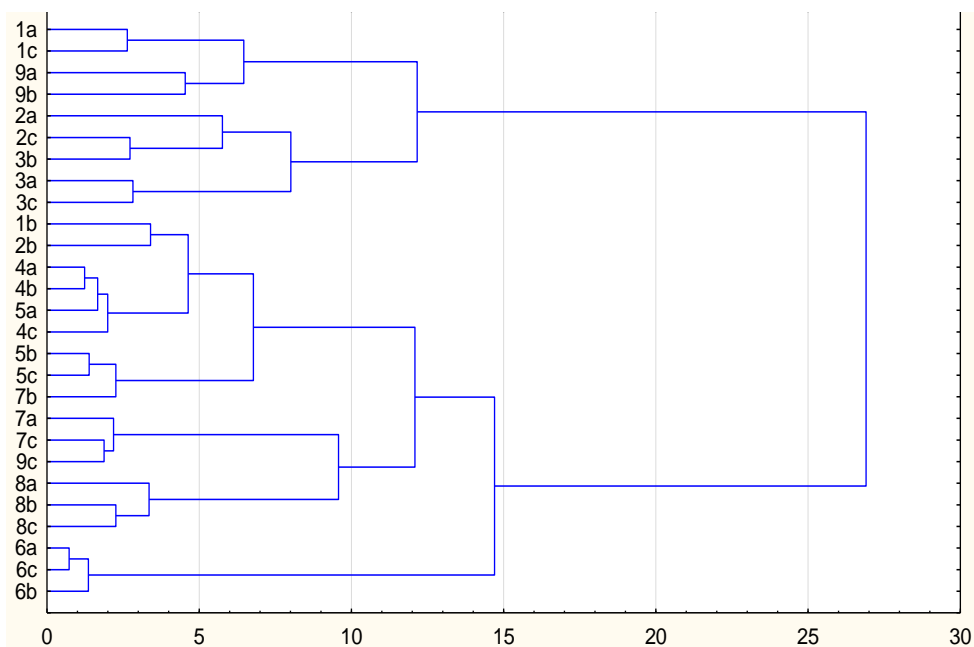


Zdroj: Vlastné spracovanie

Pre vyhodnotenie klastrovej analýzy po štandardizácii sme ako zhukovací mechanizmus zvolili Wardovú metódu s euklidovskými vzdialenosťami. Skúšali sme aj iné metódy, avšak táto metóda priniesla najlepší výsledok. V dendograme hierarchickej klastrovej analýzy (obr. č. 12) sa nám vytvorili dve zhluky, podobne ako to bolo na diagrame komponentného skóre (obr. č. 8). Hlavný zhluk na dendograme zahrňuje najväčší počet vzoriek. Vzdialenosť horizontálnej čiary nám vyjadruje, aká výrazná je odlišnosť medzi vzorkami. Najväčší rozptyl vykazujú vzorky (6a), (6c), (6b) čerstvé a pražené kakao a potom (4a), (4b), (4c) pražené a fermentované kakao spolu so vzorkou (5a) pražené, nefermentované kakao. Ďalej sú dosť odlišné Ekvádorské vzorky (7a), (7c) pražené, fermentované a (9c). Na obr. č. 13 je pre porovnanie dendogram hierarchickej klastrovej

analýzy so započítanými alkaloidmi. Započítané alkaloidy nám mierne pozmenili rozloženie vzoriek na dendrograme.

Obr. č. 13 Dendrogram hierarchickej klastrovej analýzy so započítaním alkaloidov

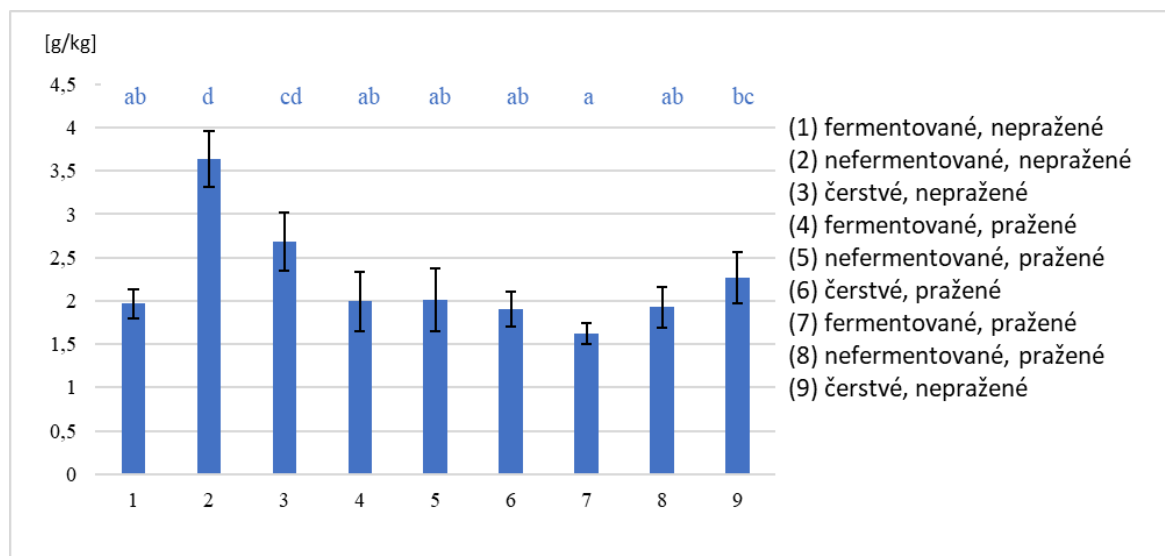


Zdroj: Vlastné spracovanie

5.1.1 Výsledok analýzy pre alkaloidy

Alkaloidy sme analyzovali pomocou LC-MS Q-TOF s vysokým rozlíšením a výsledky sme vyhodnotili v programe Compass Data Analysis 4.3. Štatistické výsledky sme testovali v programe Statistica. Priemerné obsahy alkaloidov s priemernou smerodajnou odchýlkou sú uvedené v grafe. č. 1 a grafe č. 2. Z alkaloidov bol theobromín nameraný v najvyšších koncentráciách (graf č. 1). Za ním nasledoval kofeín, ktorý bol druhým najviac zastúpeným metylxantínom (graf č. 2). Obsah theofylínu vo vzorkách bol zistený len v stopových množstvách. Ako vnútorný štandard bol použitý kofeín¹³C³ (1 mg/ml). Lineárna kalibračná krivka bola vyjadrená $y = 57698x + 2540021$ ($R^2: 0.9933$) pre kofeín a $y = 18437x + 494579$ ($R^2: 0.9966$) pre theobromín. Testom ANOVA v programe Statistica 12.1 sme testovali štatistickú významnosť vzoriek pomocou. Pre určenie závislosti medzi vzorkami sme vybrali Tukey-ho HSD. Rozdelenie normality sme testovali pomocou Kolmogorov-Smirnovovho a Lilieforsovho testu. Test rozdelenia normality nepriniesol najlepšie výsledky, avšak môžeme konštatovať, že normalita dát sa dá pre tento súbor predpokladať.

Graf č. 1 Priemerný obsah theobromínu v kakau

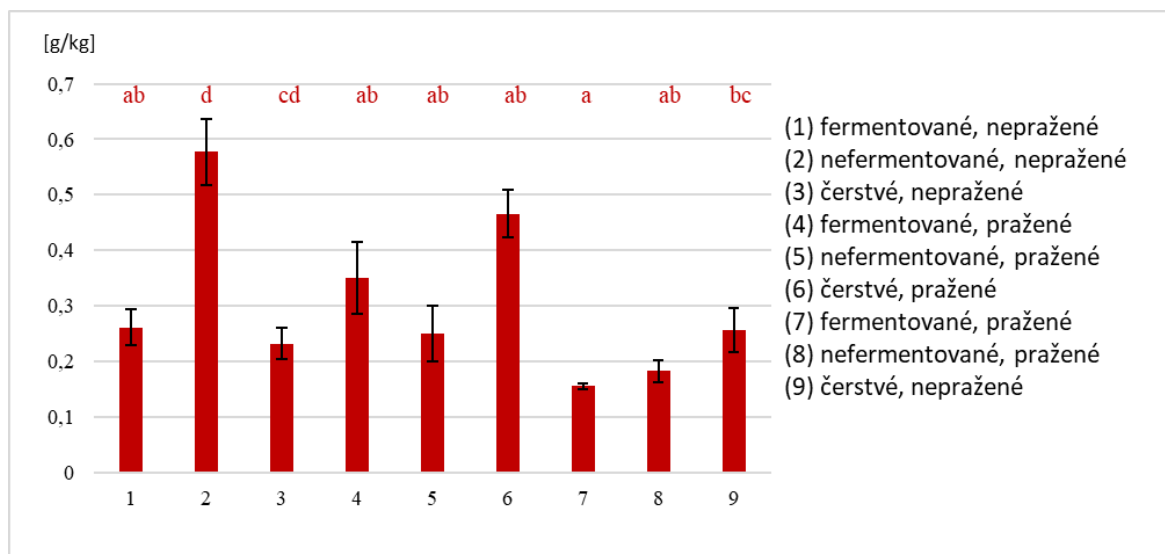


Zdroj: Vlastné spracovanie

Najvyšší obsah theobromínu bol vo vzorke (2) nefermentované, nepražené kakao, za ním nasledovalo čerstvé, nepražené kakao (3) (graf č. 1). Najvyšší obsah theobromínu z Ekvádorským vzoriek (7), (8), (9) bol v nepraženom a čerstvom kakau (9). Ekvádorské čerstvé a nepražené kakao (9) malo nižší obsah theobromínu než Samojské čerstvé a nepražené kakao (3). Vplyv fermentácie na vzorky (1) fermentované, nepražené bol markantný pri porovnaní so vzorkou (2) nefermentované a nepražené kakao. Podľa Tukey-ho HSD testu na hladine významnosti $\alpha = 0,01$ sme zistili, že vzorka (2) nefermentované, nepražené kakao zo Samoy bola štatisticky signifikantne odlišná (graf č. 1).

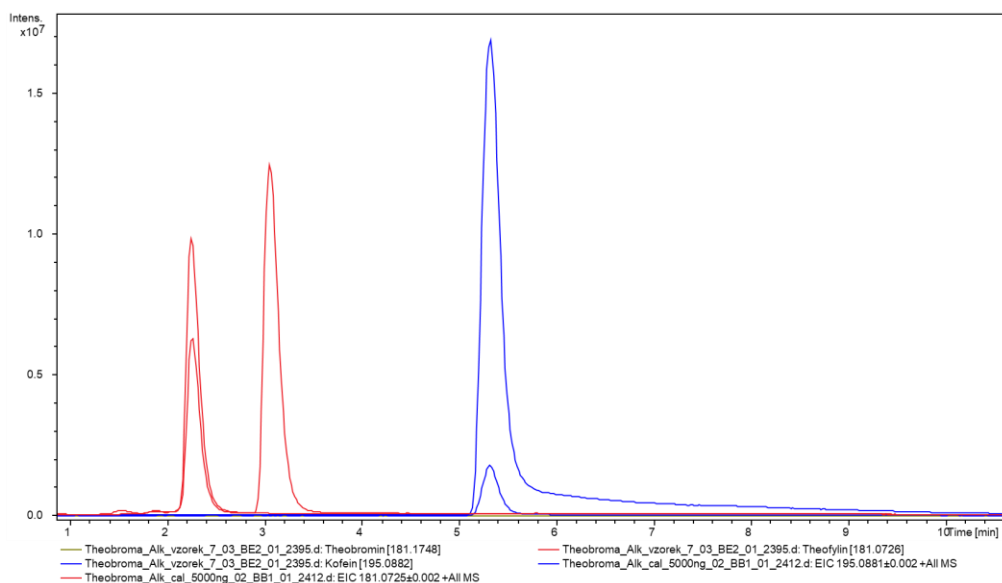
Najvyšší obsah kofeínu bol v nefermentovanom, nepraženom kakau (2) a za ním nasledovalo čerstvé, pražené kakao (6) (graf č. 2). Vplyv praženia môžeme vidieť z rozdielov obsahu kofeínu medzi vzorkami (2) a (5). Vplyv fermentácie bol tiež výrazný z rozdielov obsahu kofeínu medzi vzorkami (1) a (2). Z rozdielov medzi vzorkami (4) a (7) je viditeľný vplyv geografického pôvodu medzi Samojským a Ekvádorským kakaom. Podľa Tukey-ho HSD testu pre kofeín na hladine významnosti $\alpha = 0,01$ sme zistili, že vzorka (2) nefermentované, nepražené kakao a pražené, fermentované kakao (7) zo Samoy boli štatisticky signifikantne odlišné (graf č. 2).

Graf č. 2 Priemerný obsah kofeínu v kakau



Zdroj: Vlastné spracovanie

Obr. č. 14 Výstup z programu Compass Data Analysis pre vzorku kakaa (7) v rámci analýzy theobromínu, kofeínu a theofylínu.



Zdroj: Vlastné spracovanie

Z alkaloidov najviac prevláda theobromín. Možeme vidieť, že peak theobromínu (červená farba) ktorý sa prekrýva so štandardom ($M + H^+$ ión o koncentrácii 5000 ng/μl). Ďalej obsah kofeínu je nižší a jeho prítomnosť je potvrdená prekrývaním sa so štandardom ($M + H^+$ ión), (modrá farba). Theofylín nebol detekovaný, keďže sa neprekrýva so štandardom (červená farba).

6 Diskusia

Z alkaloidov sa nám v kakaových bôboch a produktoch podarilo stanoviť theobromín a kofeín. Obsah theobromínu prevyšoval obsahy kofeínu, podobne ako to uvádza mnoho autorov (Ashihara et al., 2011), (Sanchez, 2017), (Katz et al., 2011), (Shively et Tarka, 1984), (Franco et al., 2013). Theofylín sme zistili len v stopových množstvách, podobne ako u Shively et Tarka, (1984); Ashihara et al. (2011); Sanchez (2017); (Katz et al. (2011); (Shively et Tarka, 1984); (Franco et al. (2013). Obsah theobromínu bol 8 násobne vyšší než obsah kofeínu, čo sa nezhoduje úplne s Langer et al. (2011), ktorý uvádza, že obsah theobromínu v kakových bôboch je približne 20 násobne vyšší než kofeín. Ničmenej, príčinou neshody s uvádzaným údajom môže byť skutočnosť, že pomer theobromínu a kofeínu v kakau je veľmi variabilný (Franco et al., 2013). Vplyv fermentácie a praženia na obsah kofeín bol výrazný. Usudzujeme to na základe rozdielov medzi vzorkami (1) a (2). Fermentované a nepražené kakao (1) stratilo takmer polovicu obsahu kofeínu oproti jej nefermentovanej variante. V prípade praženia to dokazujú rozdiely v obsahu kofeínu medzi vzorkami (2) a (5). Nefermentované kakao malo po pražení výrazne nižší obsah kofeínu než nepražené nefermentované kakao. U theobromínu sme takisto zistili negatívny vplyv fermentácie a praženia na jeho obsah z rozdielov tých istých vzoriek, ako to bolo v prípade kofeínu. Negatívny vplyv fermentácie na obsah kofeínu a theobromínu sa zhoduje so štúdiami Shively et Tarka (1984) a Camu et al. (2008). Camu et al. (2008) zaznamenal nižší obsah theobromínu o 20 % po fermentácii kakaa. Ho et al. (2014) zase pozoroval 38% až 40% stratu theobromínu a 50% až 54% stratu kofeínu po vplyvom fermentácie kakaa. Straty kofeínu a theobromínu vplyvom technologického spracovania sú spôsobené oxidáciou týchto alkaloidov, podobne ako to býva u fenolových látok. Podľa Camu et al. (2008) a Aprotosoiaie et al. (2016) pokles theobromínu a kofeínu po fermentácii kakaa môže byť ovplyvnení ich únikom do fermentačných štiav alebo ich migráciou do kotyledónov. Samojské kakao obsahovalo vyšší obsah kofeínu než ekvádorské, čo môžeme najlepšie vyčítať z rozdielov v rámci fermentovaných pražených vzoriek kakaa (4) a (7). Môže existovať určitý vplyv genotypu kakaa na obsah alkaloidov, ako to uvádza (Scapagnini et al., 2014).

Najviac zastúpenými látkami boli flavan-3-oly (-)epikatechín a (+)katechín, čo sa zhoduje s Oracz et al. (2015) a Shahidi et. Naczk (2003). Ďalej sa nám podarilo namerať kvantifikovateľné množstvá kyseliny protokatechuovej, kvercetínu, luteolínu, taxifolínu,

myricetínu, naringenínu, kyseliny 4-hydroxybenzoovej, 3- hydroxybenzoovej, syringovej, ferulovej, kávovej, trans-škoricovej a vanilovej. Malé množstvá, naringenínu, kyseliny ferulovej a kávovej sa podarilo stanoviť aj Borchers et al. (2000). Výsledky obsahov 4-OH, 3-OH, ferulovej, syringovej dokazujú, že technologické spracovanie má vplyv na fenolový profil v kakau. Vzorky (1), (2), (3) majú na tieto výsledky najväčší vplyv, no aj v prípade ekvádorských vzoriek môžeme pozorovať pokles týchto fenolových kyselín. Ďalším dôkazom pre potvrdenie našej hypotézy sú nízke množstvá protokatechuovej kyseliny, kvercetínu a stopové množstvá luteolínu, taxifolínu, myricetínu, kyseliny syringovej, kávovej a ferulovej v čerstvom praženom kakau oproti (6) čerstvému nepraženému kakau. Vo všetkých prípadoch je vplyv praženia na množstvá uvedených fenolov výrazný. Množstvá kyseliny protokatechuovej v nepražených Samojských vzorkách (1), (2), (3) sú pomerne vysoké oproti praženým samojským vzorkám (4), (5), (6). Podobne aj v prípade luteolínu je obsah v (8) nepraženom a fermentovanom kakau vyšší takmer o polovicu než v (7) praženom fermentovanom kakau. Veľmi vysoký obsah kvercetínu majú vzorky (1) fermentované kakao a (9) kakaová hmota z čerstvých a nefermentovaných bôbov. Obsah kvercetínu v týchto čerstvých vzorkách je výrazne vyšší v porovnaní so vzorkami (4) fermentované, pražené a (7) fermentované, pražené kakao. Výsledok sa zhoduje s Ioannone et al. (2015), ktorí zistili vplyv praženia na zníženie flavanolov, kedy rýchlosť ich straty bola úmerná s vyššími teplotami praženia.

V prípade (-)epikatechínu sme dosiahli protichodné výsledky. Najvyšší obsah epikatechínu malo fermentované a pražené kakao (7), oproti vzorkám (8) (približne 14,8 %) a (9) (približne 56 %), ktoré boli technologicky menej spracované. Toto zistenie nekorešponduje s bežnou literatúrou, kde by bol uvedený vyšší obsah nekatechínových fenolových látok v praženom fermentovanom, než v nepraženom fermentovanom kakau. (Di Mattia et al., 2017) (Kofink et al., 2007). Nazaruddin et al. (2006) uvádza pokles (-)epikatechínu od 10 až 70 % vplyvom fermentácie. Vzorky vykazujú výrazné smerodajné odchýlky v obsahu epikatechínu. Obsah (-)epikatechínu bol približne 2 násobne nižší v čerstvom nefermentovanom kakau (9) než vo fermentovanom nepraženom a praženom kakau (7), (8). Tento výsledok sa nestotožňuje s celou radou štúdií (Wollgast & Anklam, 2000), (Tomás-Barberán et al., 2007), (Rimbach et al., 2009), (Kim et Keeney, 1984), (Nazaruddin et al., 2006), (Di Mattia et al., 2017), (Kofink et al., 2007). Vzorka (9a) čerstvé, nefermentované kakao však nevykazovala významnú podobnosť s inými vzorkami v rámci PCA a klastrovej analýzy. Dôvodom pre tento výsledok (-)epikatechínu bola

pravdepodobne veľmi malá navážka a charakter vzorky. Vzorka (9) predstavovala pevnú kakaovú hmotu, kde bolo veľké množstvo nehomogénnych častíc, čo sa mohlo podpísať pod nízky obsah (-)epikatechínu.

Iným dôvodom zvláštnych výsledkov epikatechínu môže byť fakt, že došlo k zámene výstupných údajov (+)katechínu za (-)epikatechín. Potvrdzoval by to 6 násobný nárast (-)epikatechínu (katechínu) v pražených vzorkách (4), (5) oproti nepraženým variantám (1), (2), ktorý je typický pre katechín v dôsledku epimerizačných reakcií (Kofink et al., 2007). Vplyv praženia na vyššie hodnoty (+)katechínu uvádza mnoho autorov (Kofink et al., 2007), (Caligiani et al., 2007), (Payne et al., 2010), (De Taeye et al. (2017)). Negatívny vplyv technologického spracovania na fenolový profil je spôsobený vylúhovaním fenolových látok do fermentačnej štavu pri fermentácii, oxidačnými a polymerizačnými reakciami pri pražení, ako to uvádza Kim et Keeney (1984). Suazo et al. (2014) tvrdí, že vplyvom zvýšenej teploty sa jednoduchšie formy fenolových zlúčenín uvoľnia zo svojich komplexných štruktúr.

Vplyv technologického spracovania je viditeľný aj na ekvádorských vzorkách, kde obsah kyseliny syringovej je viac ako 3 násobný v čerstvej vzorke (9) oproti fermentovanej nepraženej (7) a praženej vzorke (8). V prípade 4-hydroxybenzoovej kyseliny môžeme vidieť výrazný vplyv čerstvosti kakaových vzoriek na obsah 4-hydroxybenzoovú, kde obidve čerstvé vzorky (3) a (9), ktoré neboli pražené majú výraznejší obsah 4-hydroxybenzoovej kyseliny než technologicky viac spracované vzorky. Tento rozdiel nám tiež poukazuje na vplyv geografického pôvodu na fenolový profil. Samojské kakao má oproti ekvádorskému vyšší obsah 4- hydroxybenzoovej, 3- hydroxybenzoovej, ferulovej a syringovej kyseliny. 4-hydroxybenzoová, 3-hydroxybenzoová a ferulová kyselina navyše vykazujú určitú podobnosť medzi sebou na grafe komponentného skóre. To môže byť dôvodom, prečo sú vzorky (1), (2), (3) znázornené vo vzdialenom zhľuku od ostatných látok, ako to môžeme vidieť aj na diagrame komponentných premenných a dendograme klastrovej analýzy. Výsledky sú v určitej korelácii s výsledkami pre alkaloidy, kde je vplyv geografického pôvodu výraznejší. Môžeme teda skonštatovať, že samojské kakao má lepší fenolový profil, hlavne čo sa týka fenolových kyselín. Jonfia-Essien et al. (2008) na základe svojej štúdie usudzuje, že existuje malý až žiadny rozdiel v obsahu fenolových látok medzi klasickou odrodou kaka a hybridu Forastera. Ničmenej, tento výsledok môže byť spôsobený inými faktormi, ako sú klimatickými podmienky a nadmorská výška (Carrillo et al. 2014).

Hlavným obmedzením pri práci vnímam nedostatočné množstvo vzoriek, ktoré sme získali pre výskum a tiež nedostatočný počet vzoriek pre analýzu. Odpovedajúce varianty z každej geografickej oblasti by boli vhodnejšie pre tento experiment. Vzorky neboli pripravované v dôslednom časovom slede, čo sa zrejme podpísalo na výrazných rozdieloch medzi jednotlivými technickými opakovaniami. Pre extrakciu fenolových látok sme skúšali metódy SPE extrakcie a L/L extrakcie. Z hľadiska lepších predbežných výsledkov sme zvolili L/L, keďže preukázala reprodukovateľnejšie výsledky z výťažnosti než SPE metóda.

Na záver môžeme skonštatovať, že fenolový profil kakaa je ovplyvnení veľkým množstvom faktorov. Nielen technologické spracovanie a geografický pôvod kakaa, ale aj iné faktory môžu mať vplyv na fenolový profil v kakau (nadmorská výška regiónu, priemerná teplota regiónu, UV žiarenie, kvalita pôdy počas rastu kakaovníka, odroda kakaa, metabolické obranné reakcie, v prípade výskytu škodcov a byľinožravcov). V súčasnosti máme dôležité poznatky ohľadom vplyvu technologického spracovania kakaa na celkový fenolový profil. Je však nutné pokračovať v ďalších štúdiách, čo sa týka fenolového profilovania v kakau, aby sme získali konzistentný prehľad a lepšie zistili, akým spôsobom je možné predísť čo najvyšším fenolovým stratám v kakau. Niektoré štúdie naznačujú, že strate fenolových látok je možné účinnejšie zabrániť, ak sa použijú dokonalejšie postupy pri spracovaní kakaa (Menon at al., 2017). Snahou o drahšie a šetrnejšie postupy fermentácie, sušenia, praženia a alkalizácie kakaa by sme mohli získať kakaové produkty, potraviny alebo pochutiny s vyšším obsahom fenolových látok, ktoré by mali priaznivejšie účinky na zdravie ľudí. Zásadnou otázkou je, do akej miery majú fenolové látky priaznivý účinok na ľudské zdravie za reálnych podmienok a do akej miery prispievajú k ochrane pred rôznymi ochoreniami. Existujú aj iné poživatiny a potraviny, ktoré sú bohaté na fenolové látky ako je napríklad čajovník čínsky, červené víno, niektoré druhy ovocia a zeleniny, ktoré môžu prispieť k dostatočnému príjmu fenolových látok a antioxidantov u ľudí.

7 Záver

Výsledky tejto práce ukazujú podobnosť z inými autormi, že technologické spracovanie má vplyv na fenolový profil kakaa a kakaových produktov. Na základe výsledkov sme našu hypotézu potvrdili. Jednotlivé vzorky kakaových bôbov a ďalších produktov sa líšia obsahom fenolových látok a alkaloidov v závislosti na spôsobe spracovania a oblasti pôvodu. Samojské kakao vykazovalo lepšie výsledky, hlavne čo sa týka zloženia fenolových kyselín: 4-hydroxybenzoovej, 3-hydroxybenzoovej, syringovej a ferulovej kyseliny, myricetínu, taxifolínu a katechínu oproti ekvádorskému kakau. V prípade nutrične významných alkaloidov sa nám podarilo preukázať súvislosť vplyvu fermentácie a praženia na obsah kofeínu a theobromínu v kakaových bôboch. Vyšší obsah kofeínu a theobromínu vykazovali samojské vzorky.

Významným prínosom práce bolo príspevanie k súčasným poznatkom o prítomnosti a obsahu fenolových látok v kakaových bôboch a kakaových produktoch. Použitie SPE metódy s následným porovnaním výsledkov by mohlo predstavovať zaujímavé rozšírenie tejto práce. Z hľadiska chemického zloženia samojské kakao ešte nebolo tak komplexne skúmané.

Vyšší počet odpovedajúcich variánt z každej geografickej oblasti by bol určite vhodnejší, či už v prípadnom pokračovaní práce alebo v podobných experimentoch. Je dôležité porovnávanie vzoriek, ktoré by boli vyprodukované za rovnakých podmienok, aby sme vylúčili všetky intereferujúce faktory, ktoré majú vplyv na fenolový profil v kakaových bôboch.

8 Zoznam použitých zdrojov

- Afoakwa, E. O. 2014. Cocoa production and processing technology. CRC Press. Boca Raton. p. 374. ISBN: 1-138-03382-0.
- Alean, J., Chejne, F., Rojano, B. (2016). Degradation of polyphenols during the cocoa drying process. *Journal of Food Engineering*. 189. 99 – 105.
- Alemanno, L., Ramos, T., Gargadenec, A., Andary, C., Ferriere, N. (2003). Localization and Identification of phenolic compounds in *Theobroma Cacao* L. somatic embryogenesis. *Annals of Botany*. 92 (4). 613 – 623.
- Ali, F., Ranneh, Y., Ismail, A., Esa, N. M. (2015). Identification of phenolic compounds in polyphenols-rich extract of Malaysian cocoa powder using the HPLC-UV-ESI—MS/MS and probing their antioxidant properties. *Journal of Food Science and Technology*. 52 (4). 2103 – 2111.
- Alija, C. M., Brar, K., Verma, M., Valero, J. R. (2010). Extraction and analysis of polyphenols: recent trends. *Reviews in Biotechnology*. 31 (3). 227 – 249.
- Alkaloidy. Informační centrum bezpečnosti potravin [online]. [cit. 2018-4-5]. Dostupné z <<http://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/92002.aspx>>.
- Andres-Lacueva, C., Monagas, M., Khan, N., Izquierdo-Pulido, M., Urpi-Sarda, M., Permanyer, J., Lamuela-Raventós, R. M. (2008). Flavanol and flavonol contents of cocoa powder products: influence of the manufacturing process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56 (9). 3111 – 3117.
- Andújar, I., Recio, M. C., Giner, R. M., Ríos, J. L. (2012). Cocoa polyphenols and their potential benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2012. 906252.
- Aniszewski, T. 2017. Alkaloids - secrets of life.. Elsevier. p. 316. ISBN: 978-0-444-52736-3
- Aprotosoiaie, A. C., Luca, S. V., Miron, A. (2016). Flavor chemistry of cocoa and cocoa
- Arlorio, M., Locatelli, M., Travaglia, F., Coisson, J. D., Del Grosso, E., Minassi, A., Appendino, G., Martelli, A. (2007). Roasting impact on the contents of clovamide

(N-caffeoyl-L-DOPA) and the antioxidant activity of cocoa beans (*Theobroma Cacao* L.). *Food Chemistry*. 106 (3). 967-975.

Ashihara, H., Kato, M., Crozier, A. (2011). Distribution, biosynthesis and catabolism of methylxanthines in plants. *Handbook of Experimental Pharmacology*. (200). 11 – 31.

Baharum, Z., Akim, A. M., Hin, T. Y. Y., Hamid, R. A., Kasran, R. (2016). *Theobroma cacao*: review of the extraction, isolation, and bioassay of its potential anti-cancer compounds. *Tropical Life Sciences Research*. 27 (1). 21 – 42.

Baiano, A., Nobile, M. A. D. (2016). Antioxidant compounds from vegetable matrices: biosynthesis, occurrence, and extraction systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 56 (12). 2053 – 2068.

Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2016) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 99. 191 – 203.

Baydar, N. G., Özkan, G., Sağdıç, O. (2004). Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis Vinifera* L.) extracts. *Food Control*. 15 (5). 335 – 339.

Beckett, S. T. 2009. *Industrial chocolate manufacture and use: Fourth edition*. Blackwell Publishing Ltd. p. 685. ISBN: 978-1-405-13949-6.

Belščak, A., Komes, D., Horžić, D., Ganić, K. K., Karlović, D. (2009). Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Research International*. 42 (5 -6). 707 – 716.

Bendicho, C., Calle, I. D. L., Pena, F., Costas, M., Cabaleiro, N., Lavilla, I. (2012). Ultrasound-assisted pretreatment of solid samples in the context of green analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*. 31. 50 – 60.

Bertazzo, A., Comai, S., Mangiarini, F., Su, Ch. (2012). Composition of cacao beans. *Nutrition and Health*. 7. 105 – 117.

Better farming series: Processing cocoa beans. 1997. *FAO Economic and Social Development Series*. 3 (22). ISBN: 92-5-100623-7.

- Bleve, M., Ciurlia, L., Erroi, E., Lionetto, G., Longo, L., Rescio, L., Schettino, T., Vasapollo, G. (2008). An innovative method for the purification of anthocyanins from grape skin extracts by using liquid and sub-critical carbon dioxide. *Separation and Purification Technology*. 64 (2). 192 – 197.
- Borchers, A. T., Keen, C.L., Hannum, S. M., Gershwin, M. E. (2000). Cocoa and chocolate: Composition, bioavailability, and health implications. *Journal of Medicinal Food*. 3 (2). 77 – 10.
- Brewer, M. S. (2011). Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 10 (4). 221 – 247.
- Bridgers, E. N., Chinn, M. S., Truong, V. D. (2010). Extraction of anthocyanins from industrial purple-fleshed sweet potatoes and enzymatic hydrolysis of residues for fermentable sugars. *Industrial Crops and Products*. 32 (3). 613 – 620.
- Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Bilić, M., Velić, D. (2007). Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*. 81 (1). 236 – 242.
- Buczek, M. Chocolate: The fermentation and flavors of the chocomicrobiome. *Microbial Sciences* [online]. 2017. [cit. 2018-02-15]. Dostupné z <
<https://www.asm.org/index.php/general-science-blog/item/6289-chocolate-the-fermentation-and-flavors-of-the-chocomicrobiome> >
- Caligiani, A., Cirilini, M., Palla, G., Ravaglia, R., Arlorio, M. (2017). GC-MS detection of chiral markers in cocoa beans of different quality and geographic origin. *Chirality*. 19 (4). 329 – 34.
- Camel, V. (2001). Recent extraction techniques for solid matrices—supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *Analyst*. 126 (7). 1182 – 1193.
- Camu, N., Winter, T. D., Addo, S. K., Takrama, J. S., Bernaert, H., Vuyst, L. D. (2008). Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. *Journal of The Science of Food and Agriculture*. 88 (13). 2288 – 2297.

- Carrillo, L. C., Londoño-Londoño, J., Gil, A. (2014). Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in *Theobroma cacao* beans from different cocoa-growing areas in Colombia. *Food Research International*. 60. 273 – 280.
- Chemat, F., Huma, Z., Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*. 18 (4). 813 – 835.
- Chin, E., Miller, K. B., Payne, M. J., Hurst, J. W., Stuart, D. A. (2013). Comparison of antioxidant activity and flavanol content of cacao beans processed by modern and traditional Mesoamerican methods. *Heritage Science*. 1. 9.
- Čížková, H., Voldřich, M. Falšování čokolády a výrobků s podílem kakaa a čokolády [online]. Verlag Dashöfer. 1. januára 2018 [cit. 2018-02-04]. Dostupné z <https://www.potravinynfo.cz/33/falsovani-cokolady-a-vyrobku-s-podilem-kakaa-a-cokolady-uniqueidmRRWSbk196FNf8-jVUh4EuODk_BiBtGx1uIo64olodiw9PBWuC7BmQ/?uid=%23D%C3%A1vid_Kraj%C5%88%C3%A1k&e=krajnak.da%40gmail.com>.
- Cooper, K. A., Donovan, J. L., Waterhouse, A. L., Williamson, G. (2008). Cocoa and health: a decade of research. *British Journal of Nutrition*. 99. 1 – 11.
- Corbin, C., Fidel, T., Leclerc, E. A., Barakzoy, E., Sagot, N., Falguières, A., Renouard, S., Blondeau, J. P., Ferroud, C., Doussot, J., Lainé, E., Hanoa, CH. (2015). Development and validation of an efficient ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*. 26. 176 – 185.
- Corti, R., Flammer, A. J., Hollenberg, N. K., Lüscher, T.F. (2009). Cocoa and cardiovascular health. *Circulation*. 119 (10). 1433 – 1441.
- Cruz, J. F. M., Leite, P. B., Soares, S. E., Bispo, E. S. (2015). Bioactive compounds in different cocoa (*Theobroma Cacao* L.) cultivars during fermentation. *Food Science and Technology*. 35 (2). 279 – 284.
- Dasgupta, A., Klein, K. (2014). *Antioxidants in food, vitamins and supplements*. Elsevier Academic Press. p. 344. ISBN: 978-0-12-405872-9.

- De Taeye, C., Bodart, M., Caullet, G., Collin, S. (2017). Roasting conditions for preserving cocoa flavan-3-ol monomers and oligomers: interesting behaviour of Criollo clones. *Journal of The Science of Food and Agriculture*. 12. 4001 – 4008.
- Di Mattia, C. D., Sacchetti G., Mastrocola, D., Serafini, M. (2017). From Cocoa to Chocolate: The impact of processing on In vitro antioxidant activity and the effects of chocolate on antioxidant markers in vivo. *Front Immunology*. 8. 1207.
- Di Mattia, C., Martuscelli, M., Sacchetti, G., Scheirlinck, L., Beheydt, B., Mastrocola, D., Pittia, P. (2013). Effect of fermentation and drying on procyanidins, antiradical activity and reducing properties of cocoa beans. *Food and Bioprocessing Technology*. 6 (12). 3420 – 3432.
- Dillinger, T. L., Barriga, P., Escárcega, S., Jimenez, M., Salazar, L. D., Grivetti, L. E. (2000). Food of the gods: cure for humanity? A cultural history of the medicinal and ritual use of chocolate. *Journal of Nutrition*. 130 (8S). 2057 – 2072.
- Dlugošová, K., Pšenáková, I. (2004). Antioxidačné účinky vybraných sekundárnych metabolitov. *Nova Biotechnologica*. 185 – 195.
- Elwers, S., Zambrano, A., Rohsius, Ch., Lieberei, R. (2009). Differences between the content of phenolic compounds in Criollo, Forastero and Trinitario cocoa seed (*Theobroma Cacao* L.). *European Food Resources Technology*. 229. 937 – 948.
- Fernandez, M. T., Mira, M. L., Florêncio, M. H., Jennings, K. R. (2002). Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 92 (2). 105 – 111.
- Franco, R., Oñatibia-Astibia, A., Martínez-Pinilla, E. (2013). Health benefits of methylxanthines in cacao and chocolate. *Nutrients*. 5 (10). 4159 – 4173.
- Frankel, E. N., Meyer, A. S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of The Science of Food and Agriculture*. 80 (13). 1925 – 1941.
- Galleano, M., Oteiza, P. I., Fraga, C. G. (2009). Cocoa, chocolate and cardiovascular disease. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 54 (6). 483 – 490.

- Grigonis, D., Venskutonis, P. R., Sivik, B., Sandahl, M., Eskilsson, C. S. (2005). Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (*Hierochloë Odorata*). *The Journal of Supercritical Fluids*. 33 (3). 223 – 233.
- Growing Cocoa [online]. The International Cocoa Organization. 26. Marec 2013. [cit. 2018-02-16]. Dostupné z <<https://www.icco.org/about-cocoa/growing-cocoa.html>>
- Gutiérrez, T. J. (2017). State-of-the-art chocolate manufacture: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 16. 1313 – 1344.
- Harvesting & post-harvest processing. International Cocoa Organization [online]. 2012. [cit. 2018-03-09]. Dostupné z <<https://www.icco.org/about-cocoa/harvesting-and-post-harvest.html>>.
- Hinneburg, I., Neubert, R. H. H. (2005). Influence of extraction parameters on the phytochemical characteristics of extracts from buckwheat (*Fagopyrum Esculentum*) herb. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 (1). 3 – 7.
- Ho, V. T. T., Zhao, J., Fleet, G. (2014). Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 174. 72 – 87.
- Hu, Y., Pan, Z., Liao, W., Li, J., Gruget, P., Kitts, D. D., Lu, X. (2016). Determination of antioxidant capacity and phenolic content of chocolate by attenuated total reflectance-Fourier transformed-infrared spectroscopy. *Food Chemistry*. 202. 254 – 261.
- Huang, W. Y., Cai, Y. Z., Zhang, Y. 2010. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutrition and Cancer*. 62 (1). 1-20.
- Huie, C. W. (2002). A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 373. 23 – 30.
- ICCO Annual report 2014/2015. International Cocoa Organization [online]. 2017. [cit. 2018-03-02]. Dostupné z <<https://www.icco.org/about-us/icco-annual-report.html>>.

- Ignat, I., Volf, I., Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*. 126 (4). 1821 – 1835.
- Jalil, A. M. M., Ismail, A. (2008). Polyphenols in cocoa and cocoa products: is there a link between antioxidant properties and health? *Molecules*. 13 (9). 2190 – 2219.
- Jolić, S. M., Redovniković, I. R., Marković, K., Šipušić, D. I., Delonga, K. (2011). Changes of phenolic compounds and antioxidant capacity in cocoa beans processing. *International Journal of Food Science & Technology*. 46 (9). 1793 – 1800.
- Jonfia-Essien, W. A., West, G., Alderson, P. G., Tucker, G. (2008). Phenolic content and antioxidant capacity of hybrid variety cocoa beans. *Food Chemistry*. 108. 1155 – 1159.
- Kang, N. J., Lee, K. W., Lee D. E., Rogozin, E. A., Bode A. M., Lee H. J., Dong. Z. (2008). Cocoa procyanidins suppress transformation by inhibiting mitogen-activated protein kinase kinase. *Journal of Biological Chemistry*. 283. 20664 – 20673.
- Karim, A. A., Azlan, A., Ismail, A., Hashim, P., Gani, S. S. A., Zainudin, B. H., Abdullah, N. A. (2014). Phenolic composition, antioxidant, anti-wrinkles and tyrosinase inhibitory activities of cocoa pod extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 14. 381.
- Katz, D. L., Doughty, K., Ali, A. (2011). Cocoa and chocolate in human health and disease. *Antioxidants and Redox Signaling*. 15 (10). 2779 – 2811.
- Kedare, S. B., Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*. 48 (4). 412 – 422.
- Khoddami, A., Wilkes, M. A., Roberts, T. A. (2013). Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*. 18 (2). 2328 – 2375.
- Kim, H., Keeney, P. G. (1984). Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. *Journal of Food Science*. 49. 1090 – 1092.

- Kobori, K., Maruta, Y., Mineo, S., Shigematsu, T., Hirayama, M. (2013). Polyphenol-retaining decaffeinated cocoa powder obtained by supercritical carbon dioxide extraction and its antioxidant activity. *Foods*. 2 (4). 462 – 477.
- Kofink, M., Papagiannopoulos, M., Galensa, R. (2007). (-)-Catechin in cocoa and chocolate: occurrence and analysis of an atypical flavan-3-ol enantiomer. *Molecules*. 12 (7). 1274 – 1288.
- Kongor, J. E., Hinneh, M., Walle, D. V., Afoakwa, E. O., Boeckx, P., Dewettinck, K. (2016). Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma Cacao*) bean flavour profile - A review. *Food Research International*. 82. 44 – 52.
- Lacueva, C. A., Monagas, M., Khan, N., Pulido, M. I., Sarda, M. U., Permanyer, J., Raventós, R. M. L. (2008). Flavanol and flavonol contents of cocoa powder products: influence of the manufacturing process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56 (9). 3111 – 3117.
- Langer, S., Marshall, L. J., Day, A. J., Morgan, M. R. A. (2011). Flavanols and Methylxanthines in Commercially Available Dark Chocolate: A Study of the Correlation with Nonfat Cocoa Solids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59 (15). 8435 – 8441.
- Lee, J., Rennaker, CH., Wrolstad, R. E. (2008). Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*. 110 (3). 782 – 786.
- Lefeber, T., Janssens, M., Moens, F., Gobert, W., De Vuyst, L. (2011). Interesting starter culture strains for controlled cocoa bean fermentation revealed by simulated cocoa pulp fermentations of cocoa-specific lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 77 (18). 6694 – 6698.
- Lippi, D. (2009). Chocolate and medicine: Dangerous liaisons? *Nutrition*. 25 (11 - 12). 1100 – 1103.
- Lippi, G., Mattiuzzi, C., Cervellin, G. (2014). Chocolate and migraine: the history of an ambiguous association. *Acta Bio-medica: Atenei Parmensis*. 85 (3). 216 – 21.
- Lo Coco, F., Lanuzza, F., Micali, G., Cappellano, G. (2007). Determination of theobromine, theophylline, and caffeine in by-products of cupuacu and cacao seeds

- by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science*. 45 (5). 273 – 275.
- Makkar, H. P. S. (1989). Protein precipitation methods for quantitation of tannins: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 37 (4). 1197 – 1202.
- Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha, S. (2007). Microwave assisted extraction - an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy Reviews*. 1 (1).
- Marcus, D. A., Scharff, L., Turk, D., Gourley, L. M. (1997). A double-blind provocative study of chocolate as a trigger of headache. *Cephalalgia: An International Journal of Headache*. 17 (8). 855 – 62.
- Marquez, E. G., Guerrero, A. R., Alonso, C. P., Vernon-Carter, E. J. (2012). Effect of solvent-temperature extraction conditions on the initial antioxidant activity and total phenolic content of multiple extracts and their decay upon storage at different pH. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 11 (1). 1 – 10.
- Maskarinec, G. (2009). Cancer protective properties of cocoa: a review of the epidemiologic evidence. *Nutrition and Cancer*. 61. 573 – 579.
- Menon, A. S., Hii, C. L., Law, C. L., Shariff, S., Djaeni, M. (2017). Effects of drying on the production of polyphenol-rich cocoa beans. *Drying Technology: An International Journal*. 35 (15). 1799 – 1806.
- Miller, K. B., Stuart, D. A., Smith, N. L., Lee, C. Y., McHale, N. L., Flanagan, J. A., Ou, B., Hurst, W. J. (2006). Antioxidant activity and polyphenol and procyanidin contents of selected commercially available cocoa-containing and chocolate products in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54 (11). 4062 – 4068.
- Miller, K. B., Hurst, W. J., Payne, M. J., Stuart, D. A., Apgar, J., Sweigart, D. S., Ou, B. (2008). Impact of alkalization on the antioxidant and flavanol content of commercial cocoa powders. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56 (18). 8527 – 8533.

- Naczki, M., Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41 (5). 1523 – 1542.
- Natsume, M., Osakabe, N., Yamagishi, M., Takizawa, T., Nakamura, T., Miyatake, H., Hatano, T., Yoshida, T. (2014). Analyses of polyphenols in cacao liquor, cocoa, and chocolate by normal-phase and reversed-phase HPLC. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 64 (12). 2581 – 2587.
- Nazaruddin, R., Seng, L. K., Hassan, O., Said, M. (2006). Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma Cacao*) during fermentation. *Industrial Crops and Products*. 24 (1). 87 – 94.
- Neugebauerová J., Vábková J. Antioxidačná aktivita a látky fenolické povahy v rodu *Máta* (*Mentha Longifolia*). *Úroda* [online]. Október 2011. 395 – 401. [cit. 2018-03-02]. Dostupné z <<http://www.cbks.cz/Rostliny2011/prispevky/NeugebauerovaVabkova.pdf>>.
- Nicklisch, S. C. T., Waite, J. H. (2014). Optimized DPPH assay in a detergent-based buffer system for measuring antioxidant activity of proteins. *MethodsX*. 1. 233 – 238.
- Nielsen, D. S., Crafac, M., Jespersen, L., Jakobsen, M. (2012). The microbiology of cocoa fermentation. *Chocolate in Health and Nutrition*. 7. 39 – 60.
- Ninfali, P., Mea, G., Giorgini, S., Rocchi, M., Bacchiocca, M. (2005). Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition. *British Journal of Nutrition*. 93. 257 – 266.
- Oracz, J., Zyzelewicz, D., Nebesny, E. (2015). The content of polyphenolic compounds in cocoa beans (*Theobroma cacao* L.), depending on variety, growing region, and processing operations: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 55 (9). 1176 – 1192.
- Othman, A., Ismail, A., Ghani, N. A., Adenan, I. (2007). Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry*. 100 (4). 1523 – 1530.
- Pasrija, D., Anandharamakrishnan, C. (2015). Techniques for extraction of green tea polyphenols: a review. *Food Bioprocessing Technology*. 8. 935 – 950.

- Patras, M. A., Milev, B. P., Vrancken, G., Kuhnert, N. (2014). Identification of novel cocoa flavonoids from raw fermented cocoa beans by HPLC–MSⁿ. *Food Research International*. 63. 353 – 359.
- Payne, M. J., Hurst, W. J., Miller, K. B., Rank, C., Stuart, D. A. (2010). Impact of fermentation, drying, roasting, and Dutch processing on epicatechin and catechin content of cacao beans and cocoa ingredients. *Journal of The Science of Food and Agriculture*. 58 (19). 10518 – 10527.
- Pisoschi, A. M., Pop, A., Cimpeanu, C., Predoi, G. (2016). Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: a review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016. 9130976.
- Pohlan, H. A. J., Pérez, V. D. Growth and production of cacao. Soils, plant growth and crop production. A review on cocoa agro-forestry as a means for biodiversity conservation. World Cocoa Foundation Partnership Conference, Brussels [online]. 2006. 3. 1 - 17. [cit. 2018-12-27]. Dostupné z <<http://www.eolss.net/sample-chapters/c10/E1-05A-43-00.pdf>>.
- Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 (10). 4290 – 4302.
- Products that can be made from cocoa. International Cocoa Organization [online]. 2003. [cit. 2018-03-09]. Dostupné z < <https://www.icco.org/faq/52-by-products/115-products-that-can-be-made-from-cocoa.html>>.
- products: an overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 15. 73 – 90.
- Rahayu, P. P., Radiati, L. E., Manab, A. (2015). Physico chemical properties of whey protein and gelatine biopolymer using tea leaf extract as crosslink materials. *Current Research in Nutrition and Food Science*. 3 (3).
- Rajbhar, K., Dawda, H., Mukundan, H. (2015). Polyphenols: Methods of extraction. *Scientific Reviews and Chemical Communications*. 5 (1). 1 – 6.

- Rimbach, R., Melchin, M., Moehring, J., Wagner, A. E. (2009). Polyphenols from cocoa and vascular health - a critical review. *International Journal of Molecular Sciences*. 10 (10). 4290 – 4309.
- Risner, C. H. (2008). Simultaneous determination of theobromine, (+)-catechin, caffeine, and (-)-epicatechin in standard reference material baking chocolate 2384, cocoa, cocoa beans, and cocoa butter. *Journal of Chromatographic Science*. 46 (10). 892 – 899.
- Roselló-Soto, E., Galanakis, CH. M., Brnčić, M., Orlien, V., Trujillo, F. J., Mawson, R., Knoerzer, K., Tiwari, B. K., Barbaa, F. J. (2015). Clean recovery of antioxidant compounds from plant foods, by-products and algae assisted by ultrasounds processing. Modeling approaches to optimize processing conditions. *Trends in Food Science & Technology*. 42 (2). 134 – 149.
- Roy, M., Siddiqi, M., Bhattacharya, R. K. (2001). Cancer chemoprevention: tea polyphenol induced cellular and molecular responses. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2. 109 – 116.
- Rusconi, M., Conti, A. (2010). *Theobroma Cacao* L., the food of the gods: a scientific approach beyond myths and claims. *Pharmacological Research*. 61. 5 – 13.
- Sanchez, J. M. (2017). Methylxanthine content in commonly consumed foods in Spain and determination of its intake during consumption. *Foods*. 6 (12). 109.
- Sánchez-Rabaneda, F., Jáuregui, O., Casals, I., Andrés-Lacueva, C., Izquierdo-Pulido, M., Lamuela-Raventós, R. M. (2003). Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *Journal of Mass Spectrometry*. 38 (1). 35 – 42.
- Sarmiento, L. A. V., Machado, R. A. F., Petrus, J. C. C., Tamanini, T. R., Bolzan, A. (2008). Extraction of polyphenols from cocoa seeds and concentration through polymeric membranes. *The Journal of Supercritical Fluids*. 45 (1). 64 – 69.
- Scapagnini, G., Davinelli, S., Di Renzo, L., De Lorenzo, A., Olarte, H. H., Micali, G., Cicero, A. F., Gonzalez, S. (2014). Cocoa bioactive compounds: significance and potential for the maintenance of skin health. *Nutrients*. 6 (8). 3202 – 3213.

- Schumacher, K., Forsthofer, L., Rizzi, S., Teubner, Ch., Witzigmann, E., Schönfeldtová, S. 1998. *Čokoláda/Veľká encyclopedia*. Teubner Edition. 238 s. ISBN: 80-967324-9-8.
- Schwan, R.F., Wheals, A. E. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 44 (4). 205 – 221.
- Shively, C. A., Tarka, S. M. (1984). Methylxanthine composition and consumption patterns of cocoa and chocolate products. *Progress in Clinical and Biological Research*. 158. 149 – 78.
- Singh, S., Singh, R. P. (2008). In vitro methods of assay of antioxidants: an overview. *Food Reviews International*. 24 (4). 392 – 415.
- Spiller, G. A. 1998. *Caffeine*. CRC Press. Boca Raton. p. 377. ISBN 0-8493-2647-8.
- Suazo, Y., Davidov-Pardo, G., Arozarena, I. (2015). Effect of fermentation and drying on cocoa polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63 (45). 9948 – 9953.
- Sustainable cocoa production - farmer trainers manual. Conservation Alliance [online]. July 2013. [cit. 2018-12-23]. Dostupné z <<https://www.ifc.org/wps/wcm/connect/a06b1f80432c3b709b68ffd8c62d54d0/Sustainable+Cocoa+Production.pdf?MOD=AJPERES>>.
- Thomas, J. B., Yen, J. H., Schantz, M. M., Porter, B. J., Sharpless, K. E. (2004). Determination of caffeine, theobromine, and theophylline in standard reference material 2384, baking chocolate, using reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52 (11). 3259 – 3263.
- Tomas-Barberán, F. A., Cienfuegos-Jovellanos, E., Marín, A., Muguera, B., Gil-Izquierdo, A., Cerdá, B., Zafrilla, P., Morillas, J., Mulero, J., Ibarra, A., Pasamar, M. A., Ramón, D., Espín, J. C. (2007). A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoid monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55 (10). 3926 – 3935.
- Trognitz, B., Cros, E., Assemat, S., Davrieux, F., Forestier-Chiron, N., Ayestas, E., Kuant, A., Scheldeman, X., Hermann, M. (2013). Diversity of Cacao Trees in Waslala,

- Nicaragua: Associations between genotype spectra, product quality and yield potential. A Peer-Reviewed, Open Access Journal. 8 (1).
- Verna, R. (2013). The history and science of chocolate. *The Malaysian Journal of Pathology*. 35 (2). 111 – 121.
- Vertuani, S., Scalambra, E., Vittorio, T., Bino, A., Malisardi, G., Baldisserotto, A., Manfredini, S. (2014). Evaluation of antiradical activity of different cocoa and chocolate products: relation with lipid and protein composition. *Journal of Medicinal Food*. 17 (4). 512 – 516.
- Wessel, M., Foluke, P. M., Wessel, Q. (2015). Cocoa production in West Africa, a review and analysis of recent developments. *Wageningen Journal of Life Sciences*. 74 – 75. 1 – 7.
- Wollgast, J., Anklam, E. (2000). Review on polyphenols in *Theobroma Cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*. 33 (6). 423 – 447.
- Xu, D. P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., Zhang, J. J., Li, H. B. (2017). Natural antioxidants in foods and medicinal plants: extraction, assessment and resources. *International Journal of Molecular Sciences*. 18 (1). 96.
- Yilmaz, Y., Toledo, R. T. (2006). Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19 (1). 41 – 48.
- Yu, J., Vasanthan, T., Temelli, F. (2011). Analysis of phenolic acids in barley by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49 (9). 4352 – 4358.
- Zainal, B., Abdah, M. A., Taufiq, Y. Y. H., Roslida, A. H., Rosmin K. (2016). *Theobroma Cacao*: Review of the extraction, isolation, and bioassay of its potential anti-cancer compounds. *Tropical Life Sciences Research*. 27 (1). 21 - 42.
- Zarena, A. S., Sankar, K. U. (2011). Phenolic acid, flavonoid profile and antioxidant activity in mangosteen (*Garcinia Mangostana* L.) pericarp. *Journal of Food Biochemistry*. 36 (5). 627 – 633.

Zupfer, J. M., Churchill, K. E., Rasmusson, D. C., Fulcher, R. G. (1998). Variation in Ferulic acid concentration among diverse barley cultivars measured by HPLC and microspectrophotometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46 (4). 1350 – 1354.

