



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**Stanovení kofeinu a sensoricky aktivních
sloučenin ve výběrové kávě**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Vojtěch Formánek
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2020

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Vojtěch Formánek
Název práce	Stanovení kofeinu a sensoricky aktivních sloučenin ve výběrové kávě
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020
Abstrakt	Tato bakalářská práce se zabývá stanovením kofeinu a sensoricky aktivních sloučenin ve výběrové kávě z Kávovníku arabského (<i>Coffea arabica</i> L.) pomocí LC-MS. Množství kofeinu bylo stanoveno v závislosti na době extrakce v časech 10, 20, 30, 40, 50 a 60 s. Sensoricky aktivní sloučeniny byly vyhledávány pomocí necílené metabolické LC-MS analýzy v extraktech při teplotách 60, 80, 85, 90, 94, 95 a 100 °C, u kterých byla odborníky hodnocena sladkost, kyselost a hořkost. U 9145 signálů byla provedena korelace s hodnocením, na základě čehož bylo vybráno 13 metabolitů, které byly dále zkoumány. Kyselina citronová, chlorogenové kyseliny, feruoylchinové kyseliny a látka předběžně určená jako C ₃₆ H ₆₆ N ₆ O ₆ . mají pravděpodobně vliv na vnímání kyselé, sladké a hořké chuti
Klíčová slova	Výběrová káva, kofein, sensorika, metabolomika, LC-MS
Počet stran	50
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Vojtěch Formánek
Title of thesis	Analysis of caffeine and sensory-active compounds in specialty coffee
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.
The year of presentation	2020
Abstract	This bachelor thesis deals with measuring the content of caffeine and identification of sensory-active compounds in specialty arabic coffee (<i>Coffea arabica</i> L.) using LC-MS. Caffeine content was measured in fractions prepared by 10, 20, 30, 40, 50 and 60 s extraction time. Sensory-active compounds were investigated by untargeted metabolomic LC-MS analysis in extracts with 60, 80, 85, 90, 94, 95 and 100 °C brewing temperature. In these extracts were evaluated sourness, sweetness and bitterness by certificated specialists. 9145 signals were correlated with sensory evaluation and 13 metabolites were further analyzed. Citric acid, chlorogenic acids, feruloylquinic acids and compound annotated as C ₃₆ H ₆₆ N ₆ O ₆ probably have impact on sour, sweet and bitter taste.
Keywords	Specialty coffee, caffeine sensorics, metabolomics, LC-MS
Number of pages	50
Number of appendices	0
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně
za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

podpis

Děkuji mému vedoucímu Mgr. Jiřímu Grúzovi, Ph.D. za odborné vedení a rady při zpracování práce. Mgr. Lucii Slobodianové za pomoc v laboratoři, Mgr. Martinu Vavrušovi za pomoc při vyhodnocení a interpretaci výsledků, panu Adamu Obrátilovi za pomoc při senzorickém hodnocení a také rodině za podporu, při psaní této práce.

Obsah

Seznam zkratk	7
1 Úvod a cíle práce	8
2 Současný stav řešené problematiky	9
2.1 Kávovník	9
2.2 Biochemické složení	9
2.3 Druhy zpracování kávy	12
2.3.1 Mokré	12
2.3.2 Suché	12
2.3.5 Bezkofeinová káva	13
2.4 Pražení kávy	14
2.5 Výběrová káva	16
2.6 Příprava	16
2.7 Metabolomika	17
2.7.1 Cílená a necílená metabolomická analýza	19
2.7.2 Metabolomika v potravinářství	19
2.8 LC-MS	20
2.8.1 Kapalinová chromatografie (LC)	20
2.8.2 Hmotnostní spektrometrie (MS)	22
2.9 Kofein	24
3 Materiál a metody	27
3.1 Materiál	27
3.2 Chemikálie	27
3.3 Extrakce vzorků pro stanovení kofeinu	27
3.4 Extrakce vzorků pro sensorickou analýzu	27
3.5 Příprava vzorků po LC-MS analýzu	28
3.6 LC-MS analýza	28
3.7 Analýza a zpracování dat	29
4. Výsledky	30
4.1 Stanovení kofeinu ve frakcích	30
4.2 Stanovení sensoricky aktivních sloučenin	33
5 Diskuze	39
5.1 Obsah kofeinu	39
5.2 Sensorické charakteristiky	40
6 Závěr	42
7 Použitá literatura	43

Seznam zkratek

- 5-QCA – kyselina 5-kafeoyelchinová
- Mucilage - exo a mezokarp plodu kávovníku
- GB – neupražená zelená zrna kávovníku
- RC – pražená zrna kávovníku
- SCA – Asociace výběrové kávy
- EC – espresso
- MS – hmotnostní spektrometrie
- NMR – nukleární magnetická rezonance
- GC-MS – plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
- LC-MS – kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
- CE-MS – kapilární elektroforéza spojená s hmotnostní spektrometrií
- CYP450 – cytochrom P450
- LC – kapalinová chromatografie
- MF – mobilní fáze
- SF – stacionární fáze
- HPLC – high performance liquid chromatography
- UHPLC – ultra high performance liquid chromatography
- EI – ionizace proudem elektronů
- CI – chemická ionizace
- ESI – elektrosprej
- ES⁺ - ionizace elektrosprejem v pozitivním módu
- ES⁻ - ionizace elektrosprejem v negativním módu
- MALDI – matricí asistovaná laserová desorpce
- Q – kvadrupolový analyzátor
- SIM – single monitoring
- TOF – analyzátor měřící dobu letu
- QIT – kvadrupólová iontová past

1 Úvod a cíle práce

Káva je po vodě druhým nejkonzumovanějším nealkoholickým nápojem na světě. Je také jednou z nejvíce zkoumaných hospodářských plodin jejíž roční produkce činí přibližně 171 mil. 60 kg pytlů. Z mnoha druhů kávovníků je však využíván jen zlomek. Většina vypěstované kávy se označuje jako komoditní a pouze 3 % jako výběrová káva. V současnosti je kladen velký důraz na kvalitu a zpracování kávy, a to hlavně v souvislosti s tzv. Třetí kávovou vlnou. Látky obsažené v zelené kávě, stejně tak jako proces zpracování a přípravy, mají značný vliv na sensorické charakteristiky výsledného šálku.

Tato práce se zabývá v teoretické části shrnutím dostupné literatury o problematice kávy, jejího zpracování, přípravy a následného hodnocení sensorických vlastností. Cílem této práce je stanovit množství kofeinu v závislosti na čase extrakce a pomocí necílené LC-MS metabolomiky určit látky, které jsou korelovány s chutí kávy. Znalost těchto problematik může přispět k optimalizaci podmínek přípravy nápoje a kvalitativnímu posuzování vlastností bez nutnosti jej ochutnávat.

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Kávovník

Kávovník (*Coffea*) je stálezelený keř nebo strom z čeledi mořenovitých (*Rubiaceae*). Do rodu kávovník spadá několik desítek druhů, z nichž ekonomicky nejvýznamnější druhy jsou kávovník arabský (*Coffea arabica*, L.), kávovník statný (*Coffea canephora*, Pierre ex A. Froehner), známý také jako Robusta a kávovník liberijský (*Coffea liberica*, W. Bull ex Hiern). Všechny druhy rodu *Coffea* jsou diploidní ($2n = 22$), kromě *C. arabica*, která je tetraploidní ($2n = 4x = 44$) (Charrier A. a Berthaud J., 1985). Co do objemu produkce je nejvýznamnější Arabika (60 %) následovaná Robustou (40 %). Kávovník liberijský je využíván zejména při roubování Arabiky a Robusty (Davis A. P. a kol., 2007) a v malé míře se přidává do směsí, ale objem jeho pěstování není příliš významný.

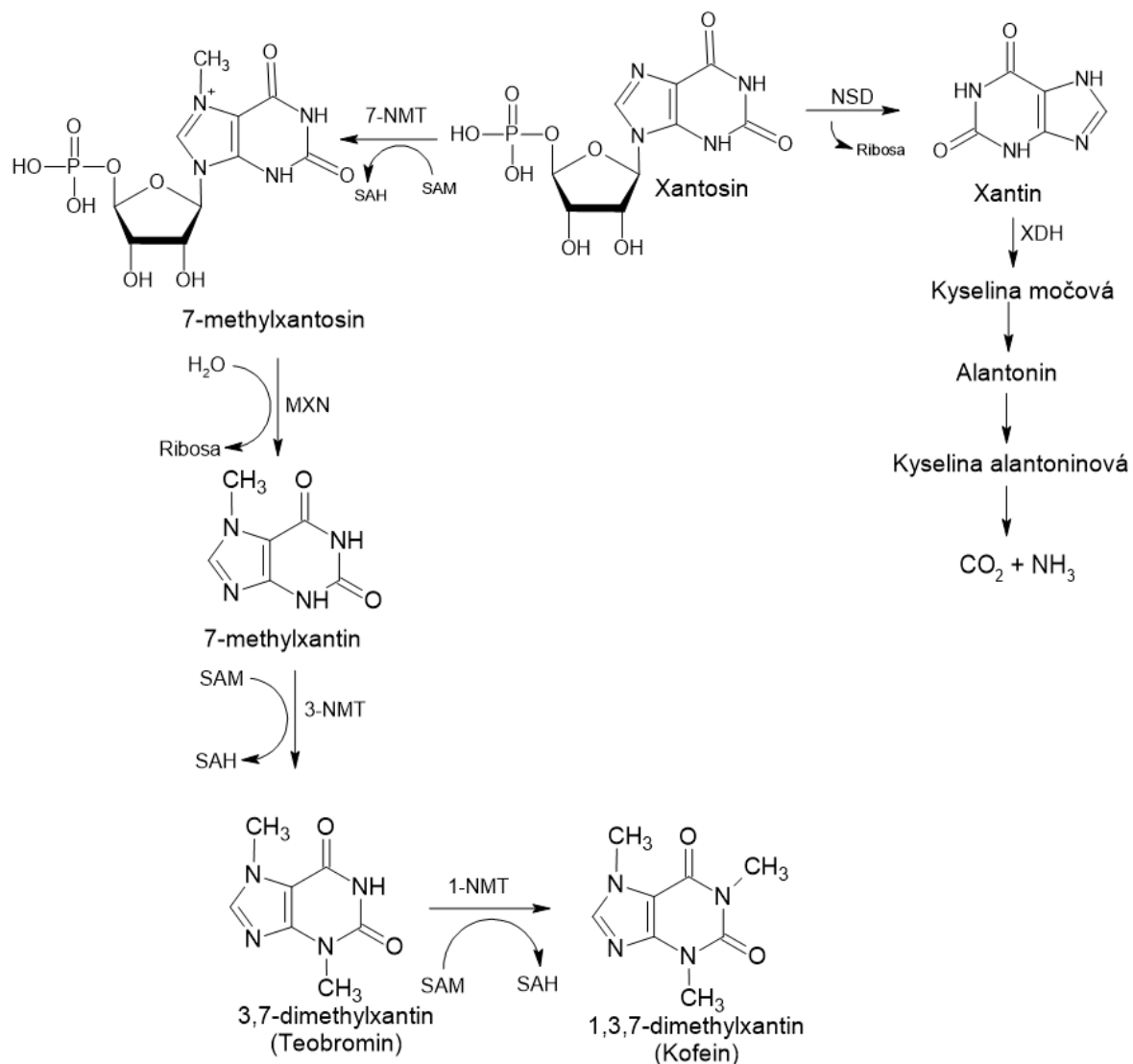
Rod *Coffea* se vyskytuje v celém tropickém i subtropickém pásu v oblastech s vysokou vlhkostí a stabilní teplotou do 22 °C, v nadmořské výšce 200-2000 m.n.m. Robusta roste v nízkých nadmořských výškách, zatímco Arabika preferuje vyšší nadmořskou výšku. Nejvýše položená farma na světě Finca Takesi v Bolívii, leží v nadmořské výšce 2600 m.n.m.

2.2 Biochemické složení

Rostliny obsahují více než 8000 fenolických sloučenin. Díky nim mohou reagovat na různé formy biotického i abiotického stresu. Mezi nejčastější patří výkyvy teplot, nevyvážený obsah minerálů, nebo napadení patogeny a herbivory (Monteiro M. C. a Farah A., 2012). Většina druhů z rodu *Coffea* obsahuje deriváty kyseliny skořicové, a to především kyselinu kávovou, p-kumarovou a vanilovou, a jiné aromatické kyseliny, které vznikají jako sekundární metabolity (Stalikas C. D., 2007). Kyselina 5-kafeoylchinová (5-CQA) je ester, který je ve velké míře zastoupen ve většině druhů z rodu *Coffea*. Její obsah se v listech snižuje v závislosti na stáří (Mondolot L. a kol., 2006). Mladé listy *C. canephora* obsahují až 10krát více 5-CQA, než staré listy. *C. canephora* obsahuje feruloylchinové kyseliny, izomery mono a diesterů CQA. Hydroxycinnamoylchinové kyseliny se během procesu pražení degradují na jednodušší fenoly, což přispívá k hořké chuti nápoje (Mondolot L. a kol., 2006).

Pro celou čeleď *Rubiaceae* je charakteristický obsah alkaloidů. Při jejich syntéze je zapojeno několik podstatných enzymů, kterými jsou kofeinsyntasa, xanthosin-7-N-methyltransferasa, kofeinxanthinmethyltransferasa 1 a 2 (CaMXMT1 a CaMXMT2), a dimethylxanthinmethyltransferasa (CaDXMT1) (Aniszewski T., 2007). Kofein je nejdůležitějším z alkaloidů, syntetizovaných v rostlinách rodu *Coffea*. Syntetizuje se pouze v mladých listech a nezralých plodech a následně se zde ukládá. Syntéza probíhá pouze na prvních listech a horní části stonku. Na dalších listech, stejně tak jako dolní části stonku, kotyledonu a kořene syntéza neprobíhá (Ashihara H. a kol., 2008). Kofein je metabolizován v několika krocích, které zahrnují postupnou přeměnu na theofylin, 3-methylxanthin, xanthin, kyselinu močovou, alantonin, kyselinu alantoninovou a močovinu, která je následně rozložena na oxid uhličitý a amoniak. Tento proces je znázorněn na obr. 1 (Ashihara H. a Crozier A., 1999). Dalším z alkaloidů je trigonelin jehož obsah se pohybuje mezi 0,39 % a 1,77 %. Vyšší koncentrace trigonelinu byly změřeny v *C. arabica*, než v *C. canephora*. Ta naproti tomu obsahuje více kofeinu a kyseliny chlorogenové (Ky C. L. a kol., 2001).

Další ze skupiny organických látek obsažených v kávovníku jsou karotenoidy. Ty jsou široce zastoupeny ve všech nadzemních částech rostliny, kde se podílejí na udržování fosfolipidových membrán (Havaux M., 1998). Podílejí se také na ochraně rostlin proti silnému světelnému záření a s tím spojeným fotooxidativním stresem (Ledford H. K. a Niyogi K. K., 2005). Většina rostlin v listech ukládá β -karoten (Frank H. A. a Cogdell R. J., 1996). Oba druhy kávovníku obsahují v listech α -karoten, který se běžně v listech většiny rostlin neukládá (Simkin A. J. a kol., 2008). *C. canephora* obsahuje celkově více karotenoidů, než *C. arabica*. Bylo dokázáno, že je-li rostlina vystavena stresu z dehydratace, dojde ke zvýšení transkripce enzymů, zodpovědných za syntézu karotenoidů (Simkin A. J. a kol., 2008).



Obrázek 1 Biosyntéza kofeinu z xantosinu a jeho následná degradace v rostlinách rodu *Coffea*. Převzato a upraveno z (Ashihara H. a Crozier A., 1999)

xantosin N-7-methyltransferasa (7-NMT); methylxantosin nucleosidasa (MXN); 7-methylxantin-N-3 methyl transferasa (3-NMT); teobromin-N-1-methyltransferasa (1-NMT); S-adenosyl-L-methionine (SAM); S-adenosyl-L-homocysteine (SAH) xantinedehydrogenasa (XDH).

2.3 Druhy zpracování kávy

Zpracování kávy po sklizni do značné míry utváří výsledné senzorycké charakteristiky kávy. Káva prochází procesem fermentace a díky přítomnosti různých druhů mikroorganismů je vytvářen charakteristický chuťový profil (Ribeiro L. S. a kol., 2017).

2.3.1 Mokrý

Nazývané též promyté zpracování spočívá ve zbavení zrna exokarpu a mezokarpu (mucilage) před vlastním procesem sušení. Zrno je spolu s odstraněnými částmi umístěno do otevřených nádrží s vodou a ponecháno 6–72 hodin fermentovat. Během této doby dochází k rozpadu a následnému rozpouštění zbývajících částí exokarpu přichycených k zrnu. Ta jsou následně z nádrže odstraněna a sušena na slunci do dosažení zbytkové vlhkosti 11–12 % (Ribeiro L. S. a kol., 2018).

2.3.2 Suché

Tato metoda zpracování, nazývaná též jako naturální, je nejstarší metodou zpracování kávových zrn. Po sklizni jsou kávová zrna rozprostřena v tenké vrstvě a sušena na slunci. Během této doby jsou zrna obracena, aby došlo k rovnoměrnému sušení a zabránilo se tak vzniku nežádoucí plísně. Tento proces sušení trvá v závislosti na podmínkách 30–40 dní. Následně jsou zrna zbavena usušeného exokarpu a mezokarpu (Hoffmann J., 2014, do Carmo K. B. a kol., 2020).

2.3.3 Honey

Nazývané též polopromyté, semi-dry, pulped natural. Tento způsob zpracování jsou hybridem mezi suchým a mokrým zpracováním. Po sklizni je zrno zbaveno slupek, avšak ulpělá mucilage je ponechána a zrna jsou sušena spolu s ní. Dle zbytkového množství mucilage pak dále můžeme rozlišovat na white, yellow, orange, red, purple a black honey. Toto označení však není nikterak regulováno a závisí na uvážení farmáře (Scholz M. B. D. a kol., 2019).

2.3.4 Anaerobní

Moderní trendy zpracování kávy ve snaze dosáhnout v šálku co nejlepší chuti využívají různých technologických postupů. Pěstitelé a zpracovatelé kávy začali používat při zpracování metody, typické při výrobě jiných potravin, a to zejména zpracování za anaerobních podmínek, charakteristický pro mlékárenský, případně vinařský průmysl. Plody kávovníku jsou umístěny do nádrží s tlakovými ventily, ze kterých je odstraněn kyslík. Díky těmto extrémním podmínkám probíhá fermentace pouze za působení určitých mikroorganismů (zejména *Lactobacillus* a *Lactococcus*) (Zhang S. J. a kol., 2019). Tento způsob zpracování zle použit u všech výše zmíněných metod. Jeho využití je především u kávy nižší kvality nicméně v současnosti je velmi populární i u výběrové kávy (Cafeimports, 2020).

2.3.5 Bezkofeinová káva

Byly nalezeny některé druhy kávovníku, které neobsahují kofeinsyntasu (*C. charrieriana*) (Stoffelen P. a kol., 2008), nebo je u nich produkce kofeinu výrazně snížena (*C. arabica* var. *Laurina*) (Silvarolla M. B. a kol., 2004). Jejich pěstování je nicméně náročné a s malým výtěžkem. Proto byly vyvinuty technologické procesy, zajišťující odstranění kofeinu až po zpracování některou z výše uvedených metod.

Přímá metoda extrakce je založena na převedení kofeinu do organického rozpouštědla (ethylacetát, methylen chlorid). Zelená zrna (GB) jsou nejdříve napařena a poté jsou ponořena do rozpouštědla. Zrna jsou poté vyjmuta a zahřáta, aby došlo k odstranění zbylého rozpouštědla. Při nepřímé metodě jsou nejprve GB ponořena do vody, do níž jsou extrahovány rozpustné látky včetně kofeinu. Voda je poté smíchána s organickým rozpouštědlem. Po jeho odstranění s extrahovaným kofeinem jsou GB opět ponořena do vody, již bez obsahu kofeinu. Tento krok navrácí rozpustné aromatické látky zpět do GB. Superkritická fluidní extrakce pomocí CO₂ je využívána převážně u méně kvalitní kávy a pouze pro velká kvanta. Může být využita jak pro GB, tak praženou kávu (RC) (Ramalakshmi K. a Raghavan B., 1999). Švýcarská vodní metoda, používaná převážně u výběrové kávy, nevyužívá žádná organická rozpouštědla. Při tomto procesu jsou GB ponořena do horké vody.

Tato voda obsahuje extrakt z GB s odstraněným kofeinem. Díky nasycení roztoku aromatickými látkami, dojde k extrakci pouze kofeinu. Voda s rozpuštěnými látkami je následně filtrována přes uhlíkový filtr, čímž dojde k odstranění kofeinu. Extrakt je pak znovu mísen s GB a cyklus se opakuje po dobu přibližně 10 h (SwissWater, 2020).



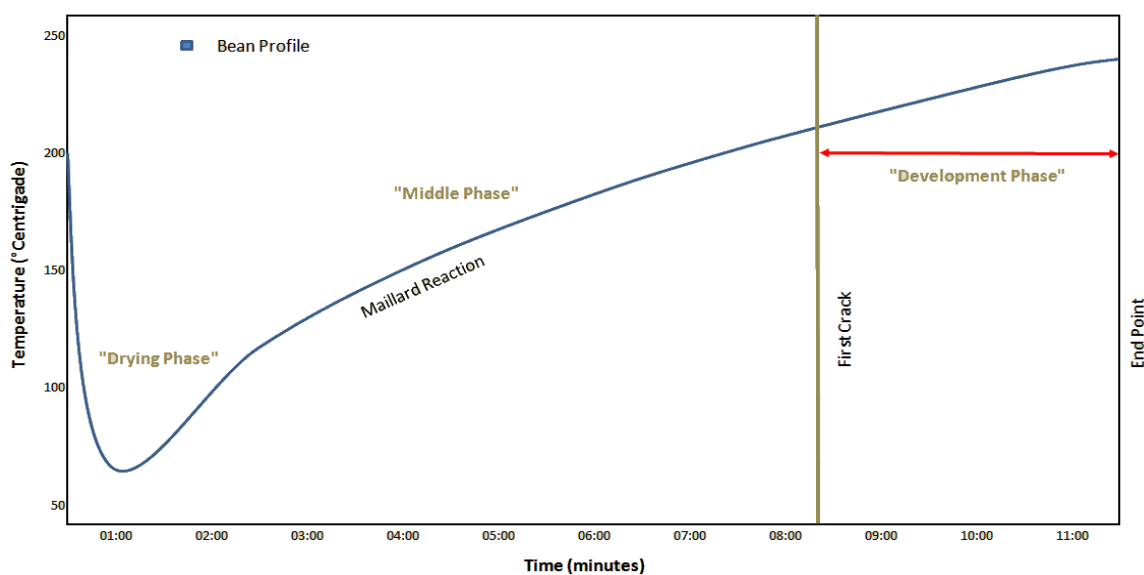
Obrázek 2 Řez plodem kávovníku a jeho jednotlivé vrstvy (Romcafe, 2020)

2.4 Pražení kávy

Během tohoto procesu dochází k důležitému vývoji chuťových charakteristik. Ovlivňuje výsledné chemické složení zrna a tím i nápoje (Livramento K. G. a kol., 2017). GB obsahující 11-12 % vlhkosti. Po vložení GB do pražicího přístroje, dochází k odpařování vody (Drying phase). Nedochozí téměř k žádné změně barvy. Následuje střední fáze (Middle phase). Zde dochází k významným chemickým reakcím, které se podílejí na následných sensorických charakteristikách kávy. Jsou to zejména Maillardova reakce, karamelizace a Streckerova degradace. Tlak vodní páry a plynů (CO_2), kumulované v intercelulárních prostorech, přesáhne kritickou mez a dojde k narušení struktury tzv. first crack. To se projeví zvětšením objemu. Elektronovým mikroskopem je možné pozorovat praskliny (Hu G. a kol., 2020). Při fázi vývoje (Development phase) se vytváří nejvíce sensoricky aktivních sloučenin. Zde se ukončuje proces pražení výběrové kávy. Může následovat second crack. Při něm se na povrch zrn

dostávají oleje, které negativně ovlivní sensorické charakteristiky kávy (Hoffmann J., 2020). Následuje fáze rychleného zchlazení, aby došlo k zastavení exotermních reakcí. Jednotlivé fáze jsou znázorněny na obr. 3.

Dle barvy a délky pražení rozlišujeme pražení světlé (light), střední (medium) a tmavé (dark) (Soares C. M. D. a kol., 2015). U výběrové kávy jsou využívána především první dvě zmiňovaná.



Obrázek 3 Pražicí křivka v závislosti teploty na času s jednotlivými fázemi. (Převzato z 38espresso, 2020)

Maillardova reakce je neenzymatická reakce hnědnutí mezi aminosloučeninami a redukujícími cukry za vysoké teploty (140–170 °C). V první fázi kondenzují AMK s cukry v glykosamin (1-amino-1deoxy-2 ketosa). Ve druhé fázi dochází k izomeraci na Amadoriho produkt. Ve třetí fázi dochází fragmentaci za tvorby meziproductů (hydroxymethylfurfural, pyruvátaldehyd, diacetyl), které dále reagují za vzniku heterocyklických sloučenin (melanoidinů). Ty jsou již tmavě zbarveny (Tamanna N. a Mahmood N., 2015). Při pražení kávy je významný vznik akrylamidu. Tato karcinogenní látka vzniká v kávě převážně z asparaginu a redukujících cukrů. Jeho výsledná koncentrace závisí na délce pražení. Akrylamid se po 10 minutách začíná rozpadat. Jeho koncentrace jsou nižší u Arabiky, než u Robusty (Bertuzzi T. a kol., 2020, Soares C. M. D. a kol., 2015).

2.5 Výběrová káva

Jako výběrová je označována káva vysoké kvality z konkrétního místa původu, se kterou je v celém procesu zpracování a přípravy zacházeno dle určitých pravidel dle Asociace výběrové kávy (Specialty coffee asociation, SCA) (Carvalho F. M. a kol., 2020). Hodnocení kvality provádí speciálně vyškolení odborníci (Q grader). Při hodnocení zelené kávy je zohledňováno mnoho faktorů. Ve 350 g vzorku zelené kávy nesmí být přítomny žádné primární a maximálně 5 sekundárních defektů. Po následném upražení a ohodnocení sensorických kvalit (kyselost, tělo, aroma, chuť) jsou kávy bodovány na škále (0–100). Body jsou získávány v několika kategoriích. Výběrová káva musí dosáhnout v součtu alespoň 80 bodů (SCA 1, 2020). Vůně suché kávy/aroma zalité kávy, vlastní chutě, jejich rozvinutost a komplexnost. Dále se hodnotí dochuť, kterou káva zanechává. Dalšími aspekty hodnocení jsou kyselost, sladkost a tělo šálku. Vyváženost jednotlivých chutí, jejich konzistentnost a čistota. Na závěr se hodnotí, zda káva splňuje předpoklady pro svoji oblast původu a množství defektů v šálku (SCA 2, 2020).

2.6 Příprava

Upražená kávová zrna jsou připravována dvěma základními způsoby. Nápoj připravený za normálního tlaku, nebo za zvýšeného tlaku. V prvním případě dochází k extrakci hruběji namletých kávových zrn, která jsou následně od nápoje oddělena. Dle způsobu oddělení jsou pak rozlišovány jednotlivé metody. Filtry mohou být papírové, kovové nebo látkové s různou velikostí pórů i tvarů. Příprava může probíhat manuálně, nebo pomocí automatického překapávače. Nejznámější manuální metody přípravy jsou zobrazeny na obr 4. Při přípravě je doporučován poměr 60–70 g mleté kávy na 1 litr vody v závislosti na použité metodě (SCA 2, 2020, Hoffmann, 2014).



Obrázek 4 Metody přípravy filtrované kávy. Zleva Hario V60, Chemex, Aeropress, Frenchpress (převzato a upraveno z Piccoloneexistuje!, 2020)

Extrakce za zvýšeného tlaku je využíváno u přípravy nápojů na bázi espressa (EC). Při této metodě je káva jemně namleta a upěchována v tzv portafiltru. Následně je káva extrahována malým množstvím vody při tlaku 9 bar (Gloess A. N. a kol., 2013). Na přípravu tradičního italského EC je použito 7 g kávy a přibližně 40 mL vody. Doba extrakce je přibližně 25 s (Maeztu L. a kol., 2001).

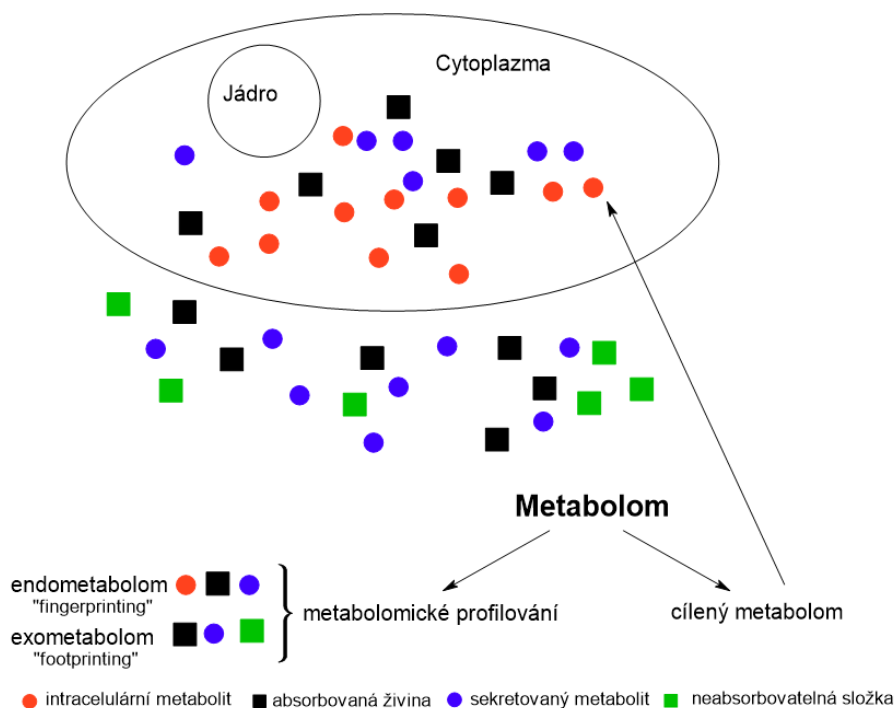
Moderní postupy při přípravě EC se zaměřují na poměr hmotnosti mleté kávy a hmotnosti výsledného nápoje, a to přibližně v poměru 1:2. 18-20 g kávy je extrahováno při teplotě 94 °C, tlaku 9 bar, po dobu 30 ± 5 s. Hmotnost výsledného nápoje je 36-45 g (Hoffmann J., 2014). Sensorické hodnocení EC je založeno jak na vlastnostech nápoje (textura, crema), tak na chuťových a čichových charakteristikách (hořkost, sladkost, kyselost) (WCE, 2020, Andueza S. a kol., 2007).

2.7 Metabolomika

Metabolomika patří do omických přístupů ke studiu organismů. Zkoumá všechny metabolity, podílející se na metabolismech v tkáních, buňkách i celého organismu (Roberts L. D. a kol., 2012). Metabolity jsou typické svou malou molekulovou hmotností do 1000 Da. Velkými molekulami jako jsou proteiny, DNA, nebo RNA se zabývají další omické metody např. proteomika, nebo genomika. Velikost metabolomu se odvíjí od velikosti zájmového organismu a také se mění v čase. Jeho složení dává informaci o aktuálním stavu buňky a vypovídá o expresi genů,

ale i reakci na okolní prostředí (Musilová J. a Glatz Z., 2011). Určit celkový metabolom se doposud nepodařilo u žádného zkoumaného organismu. U dalších omických oborů je tomu jinak (Viant M. R. a kol., 2017). V genomice jsou určeny celé genomy mnoha organismů např. *Saccharomyces cerevisiae* (Goffeau A. a kol., 1996) nebo *Arabidopsis thaliana*. Celkový metabolom je velmi proměnlivý a odráží funkci jednotlivých molekul. Látky, jako jsou sacharidy, mohou být zastoupeny v relativně vysokých koncentracích (mmol). Specifické signální molekuly mohou být zastoupeny pouze v řádu jednotek molekul.

Metabolomický „fingerprinting“ je analýza velkého množství metabolitů uvnitř buňky tzv. endometabolomu. Oproti tomu, metabolomický „footprinting“ je analýza metabolitů vně buňky tzv. exometabolomu. Obě analýzy se dají pozorovat speciálními metodami, které jsou rychlé, ale nemusejí být kvantitativní. Metabolický „profiling“ identifikuje a kvantifikuje zájmové sloučeniny z určité specifické skupiny chemických látek, nebo jako součásti metabolických drah. Metabolomická „target“ analýza se potom zaměřuje pouze na konkrétní zájmové metabolity (Villas-Bôas S. G. a kol., 2005).



Obrázek 5 Základní metabolomické přístupy. Převzato a upraveno z (Musilová J. a Glatz Z., 2011)

2.7.1 Cílená a necílená metabolomická analýza

Při metabolomických analýzách se využívá dvou základních postupů, a to cílené a necílené analýzy. Při cílené analýze se vyhodnocuje předdefinovaná skupina metabolitů, které jsou již chemicky charakterizované, je známa jejich struktura a funkce a měřené výsledky jsou porovnány s databázemi. Díky tomu nedochází ke vzniku artefaktů a je studována pouze určitá skupina látek, což značně zmenšuje množství dat, získaných z měření (Lu W. a kol., 2008)

Necílená metabolomická analýza si klade za cíl, určit co nejvíce metabolitů, které se mohou nacházet ve zkoumaném biologickém vzorku (De Vos R. C. H. a kol., 2007), a to jak metabolitů již známých, tak molekul, které nebyly doposud charakterizovány. Takto provedená analýza přináší velmi rozsáhlá, komplexní data, jejichž vyhodnocení vyžaduje bioinformatické přístupy. Při tomto procesu je nutné s daty pracovat tak, aby nedošlo ke ztrátě, nebo znehodnocení získaných informací (Gorrochategui E. a kol., 2016) Látky, které nebyly doposud identifikovány je potřeba charakterizovat. Data z MS se mohou zpracovat programy na porovnání spekter a odlišení od pozadí (MetAlign, XCMS) (Commisso M. a kol., 2013) a ty poté porovnat s databázemi např. DrugBank, MassBank, MetaboLights database (Metabolomic Society, 2020)

2.7.2 Metabolomika v potravinářství

Analýza potravin se zaměřuje především na stanovování množství přítomných skupin (sacharidy, proteiny, lipidy, vitamíny). Díky metabolomickým přístupům je však možné určit jednotlivé konkrétní složky, obsažené v potravině (Wishart D. S., 2008). Toho se využívá u stanovování kvality potravin a potvrzování jejich autentičnosti. V současnosti je využíváno metod, analyzujících rozpustné látky, spíše než nerozpustných částic. Využívá se zejména NMR, GC-MS, LC-MS a CE-MS. V rajčatech (*Solanum lycopersicum*) bylo doposud identifikováno více než 60 nepolárních sekundárních metabolitů (polyfenoly, flavonoidy, glykosidy) pomocí LC-MS (Moco S. a kol., 2006).

Využitím LC byly identifikovány některé nové flavonoly v červených hroznech vinné révy (*Vitis vinifera*) (Mattivi F. a kol., 2006). Díky těmto poznatkům a postupům je také možné odlišovat různé metody přípravy, skladování nebo stáří potravin. S tím se pojí také lepší možnost kontroly šlechtění rostlin a krmiva pro hospodářská zvířata (Wishart D. S., 2008)

V současnosti je třeba stanovovat nejen látky, které se nacházejí v potravině z důvodu kvantifikace, ale také k určení autenticity a kontroly kvality produktu. Ve snaze snížit výrobní náklady jsou potraviny smíchávány s různými aditivy umělého nebo přírodního původu. Tato aditiva obvykle nemají vliv na senzorické vlastnosti (chuť, vůně, barva), mohou však být potenciálním rizikem pro konzumenta ze zdravotního hlediska. Přidáváním levnějšího grepového do pomerančového džusu, může mít na konzumenta negativní vliv, jelikož grep obsahuje furokumarinové inhibitory CYP450 (Girenavar B. a kol., 2006). Velmi často také dochází k falsifikaci nápojů, nesprávným uvedením místa původu, odrůdy a stáří (Gougeon L. a kol., 2019). Metabolomická analýza nachází využití také při kontrole kvality produktů. Pro společnosti, mající výrobní linky v různých částech světa je nezbytné zajistit, aby vyráběný produkt měl všude konstantní kvalitu. Např. výrobní linky pivovaru mohou kontrolovat kvalitu jednotlivých várek, stanovováním obsahu specifických látek (laktátu, dextranů, 2-fenylethanolu) (Almeida C. a kol., 2006)

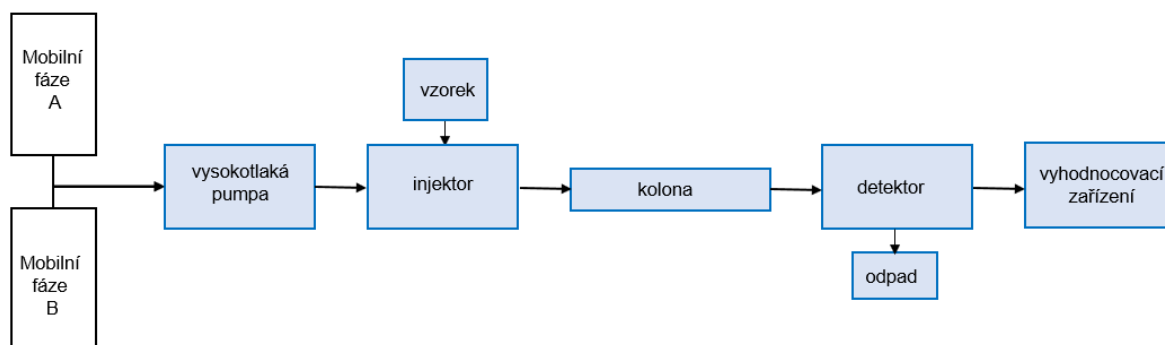
2.8 LC-MS

2.8.1 Kapalinová chromatografie (LC)

Tato metoda je využívána pro rozdělování směsi látek na její jednotlivé komponenty. Ty se následně dále analyzují, čím dochází k identifikaci sloučenin obsažených ve vzorku. Toho se využívá například v klinické biochemii, analýze léčiv, nebo metabolomice. Jako mobilní fáze (MF) je využívána kapalina, ve které je rozpuštěn vzorek. Ta protéká skrz kolonu se stacionární fází (SF). Jednotlivé látky se v koloně zpomalují a dělí podle své afinity k SF. Z kolony potom vycházejí v retenčním čase, charakteristickým pro danou látku. Výstupem z tohoto rozdělení je chromatogram, kde jsou zaznamenány retenční časy jednotlivých látek (Crouch S. R. a kol., 2019).

Podle typu SF a MF rozdělujeme LC na dva typy, a to na normální a reverzní fázi. Analýza na normální fázi využívá jako MF nepolární látku (hexan, tetrachlormethan) a jako SF nejčastěji silikagel. Střední průměr pórů je asi 8-15 nm. Nejčastější velikost částecek náplně jsou 3, 5 a 10 μm . Při analýze na reverzní fázi slouží jako MF polární látka (methanol, acetonitril, voda, nebo jejich směs) a jako SF je na kolonu navázaná silikátová skupina s různými substituenty nepolárních látek (názvy kolony pak vycházejí z délky postranního řetězce C8, C18, fenyl) (Crouch S. R. a kol., 2019).

Ke zvýšení účinnosti separace je využíván vysoký tlak, kterým je kapalina skrz kolonu protlačena. Při tlaku do 30 Mpa se jedná o HPLC (high performance liquid chromatography) a při tlaku do 100 Mpa o UHPLC (ultra high performance liquid chromatography). Kapalinový chromatograf se sestává ze zásobníků mobilních fází, vysokotlakého čerpadla, nástřikového zařízení (injektoru) s šesticestným ventilem, předkolony mající ochranou funkci proti látkám se silnou retencí, vlastní analytické kolony a detektoru (obr. 6). Ten může být na principu spektrofotometru, refraktometru, amperometru nebo MS (Klouda P., 2003).



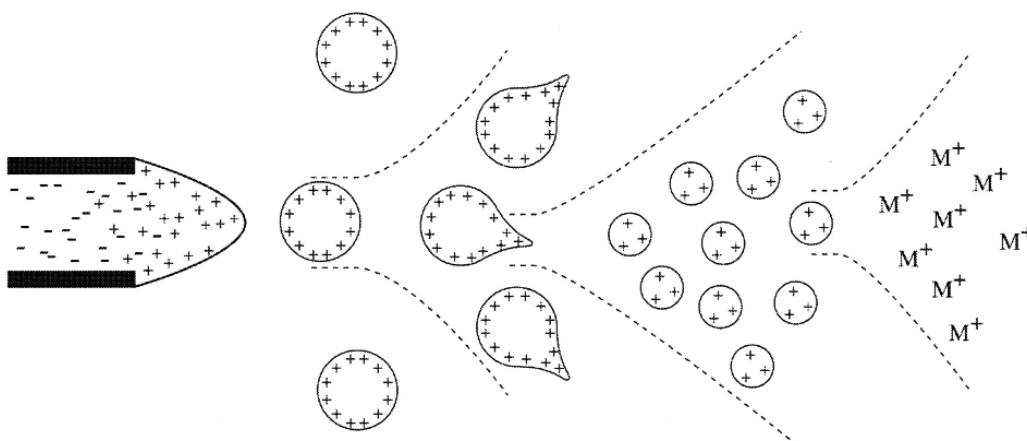
Obrázek 6 Schéma HPLC

V kolonách se analyzované látky dělí různým způsobem. V praxi jsou používány kromě kolon na reverzní a normální fázi také kolony fungující na principu výměny iontů (SCX, Strong Cation Exchange), kolony využívající hydrofilních interakcí (HILIC, Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) (Crouch S. R. a kol., 2019).

2.8.2 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Tato analytická separační technika využívá převedení vzorku na ionizovanou plynnou formu, která se následně dělí podle poměru hmoty a náboje (m/z) působením elektrického a magnetického pole. Hmotnostní spektrometry se sestávají z kapiláry pro vstup vzorku, iontového zdroje, který produkuje ionizovanou formu analytu, vlastního hmotnostního analyzátoru, detektoru a zařízení, na kterém je vyhodnocováno hmotnostní spektrum (Klouda P., 2003).

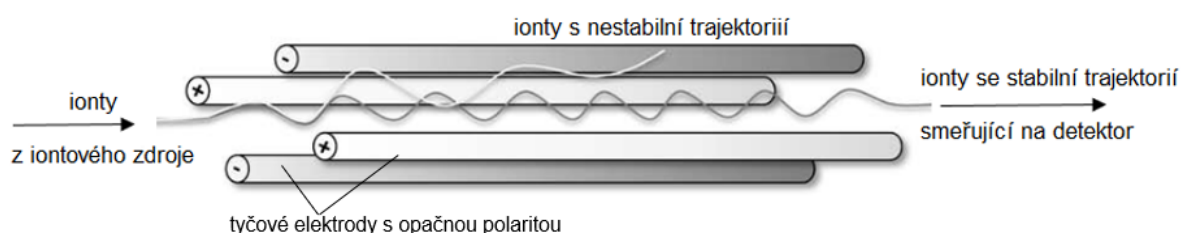
K ionizaci vzorku se dají využít tvrdé a měkké metody. Ionizace proudem elektronů (EI) patří mezi tvrdé ionizační techniky. Tento proud elektronů, předává svoji energii analytu a dává tak vzniknout radikálům, které vedou ke vzniku fragmentačního spektra. Toto spektrum následně slouží k identifikaci molekuly. Dalším typem ionizace je chemická ionizace (CI), ta patří mezi měkké techniky. Napřed je ionizován plyn (methan, amoniak) a ten následně předává svou energii analytu a tím dochází k omezení fragmentace. Ionizace pomocí elektrospreje (ESI) je spolu s matricí asistovanou laserovou desorpcí (MALDI) v současnosti nepoužívanější technikou pro analýzu biologických vzorků (Friedecký D., Lemr K. 2012). ESI využívá silného napětí (2-5 kV) za atmosférického tlaku. Na hrotu kapiláry se tvoří kapička a je unášena inertním plynem (dusík), vlivem odpařování rozpouštědla dochází ke zvětšování povrchového náboje kapičky a zároveň k jejímu zmenšování až dojde ke coulumbické explozi a uvolnění nabitých částic. Tento proces je zobrazen na obr. 7 (Ho a kol. 2003).



Obrázek 7 Mechanismus ionizace pomocí elektrospreje, (Převzato z Ho a kol. 2003)

MALDI se využívá pro detekci proteinů a makromolekul. Analyt je nanesen na desku spolu s matricí (organická kyselina). Na desku je vypálen laserový paprsek o vysoké intenzitě, tím dojde k ionizaci matice, ze které náboj přechází na analyt. Celý proces probíhá ve vakuu (Zenobi a Knochenmuss, 1998).

Analyzátoři jsou součástí MS, kde ve vakuu dochází k separaci iontů analytu podle m/z (Friedecký D., Lemr K. 2012). Kvadrupolový analyzátoř (Q, quadrupole) je soustava 4 elektrodoých tyčů, na které se přivádí stejnosměrné a střídavé napětí v řádech stovek V. Sousední tyče mají vždy opačnou polaritu. Schéma Q je popsáno na obr. 8.



Obrázek 8 Schéma Kvadrupolového analyzátoř. Převzato a upraveno z (Friedecký D., Lemr K. 2012).

Po nastavení parametrů (intenzita stejnosměrného a amplituda střídavého proudu) lze selektovat pouze ionty o určitém m/z , které projdou až na detektor, ostatní ionty vlivem vychýlení na detektor nedopadnou (Klouda P., 2003). Analyzátoř pracuje ve skenovací módu, kde dochází k průběžnému proměření elektrického pole a detekci většiny iontů v krátkém čase. Při single in monitoringu (SIM) dochází k detekci pouze iontů, odpovídajícím daným parametrům nastavení (Friedecký a Lemr K. 2012). V průletovém analyzátoř, měřícím dobu letu (TOF, time of flight) dochází ve vakuované (1-2 m) dlouhé letové trubici k akceleraci iontů pomocí elektrického pole. Ion nižší hmotností, mající stejnou kinetickou energii, jako ion s vyšší hmotností se bude ve vakuu pohybovat rychleji. Na detektor umístěný na konci letové trubice dopadají nejprve iont s nižší hmotností a poté s vyšší. U průletových analyzátořů se využívá reflektoru, jež otáčí rovinu letu o 180° , díky tomu dochází k prodloužení doby letu a lepšímu rozlišení. Kvadrupolová iontová past (QIT, quadrupole ion-trap analyser) má pouze dvě tyčové elektrody a jednu kruhovou, které zpomalují ionty, díky přítomnosti helia a po změně parametrů dochází k uvolnění (Klouda P., 2003).

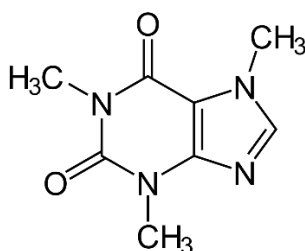
Analyzátory mohou být zapojeny i tandemově. Analýza je pak založena na principu vícenásobné fragmentace v sériově zapojených analyzátorech. Ionty z iontového zdroje putují do prvního analyzátoru, který propouští jen některé ionty. Následuje kolizní cela, kde se prekurzorové ionty fragmentují. Tyto ionty následně pokračují do dalšího analyzátoru (Crouch S. R. a kol., 2019).

Detektory zaznamenávají buď, všechny ionty, bez ohledu na m/z , nebo ty které m/z dokážou zohlednit. V prvním případě měří detektory elektrický proud, vznikající při nárazu iontu na dynodu. Zesílením elektrického proudu (až 10^8 krát) pomocí několika dynod za sebou, nebo pomocí channeltronu. (trychtýřovitě se zužující dynoda) (Friedecký a Lemr K. 2012).

2.9 Kofein

Synonyma: Thein, Guaranin. Je bílá, krystalická látka. Jedná se o purinový alkaloid, derivát xanthinu (1,3,7-trimethylxanthin). Bod tání v bezvodé formě je $238\text{ }^{\circ}\text{C}$. Jeho rozpustnost je závislá na teplotě. Za normálních podmínek je hůře rozpustný (2 g/100 mL), při zvyšování teploty jeho rozpustnost značně vzrůstá (66 g/100 mL při $100\text{ }^{\circ}\text{C}$). Je slabě bazický a neobsahuje žádná stereogenní centra (PubChem).

Kofein je metabolitem celé řady rostlin. Nejznámější je jeho výskyt v kávovníku (*Coffea*), podle čehož dostal své pojmenování. Dále se ve větší míře vyskytuje v čajovníku čínském (*Cameilla sinensis*, L.), kakaovníku (*Theobroma cacao*, L.), cesmíně paraguayské (*Ilex paraguariensis*, A. St.-Hil.) a kolovníku zašpičatělém (*Cola acuminata*, Schott & Endl.). V uvedených rostlinách se syntéza kofeinu vyvinula pomocí konvergentní evoluce (Huang R. a kol., 2016). Rostliny využívají kofein jako ochranu mladých pletiv před patogeny a herbivory. *Crinipellis pernicioso* je houbovitý parazit, napadající mladá pletiva kakaovníku. V těchto pletivech je koncentrace kofeinu zvýšena 7-8 krát (Aneja M. a Gianfagna T., 2001). Rostliny ošetřené postřikem s obsahem kofeinu nejsou napadány parazity, nebo na parazity působí postřik neurotoxicky (Hollingsworth R. G. a kol., 2002). Další možnou funkcí kofeinu je „autotoxická“ inhibice. Obsah kofeinu v opadaných listech a semenných obalech uvolněný do půdy, brání semenům v růstu v okolí mateřské rostliny (Anaya A. L. a kol., 2006).



Obrázek 9 Kofein (1,3,7-trimethylxanthin)

2.9.1 Zdravotní účinky kofeinu

Působí jako stimulant centrálního nervového systému (CNS) a je nejužívanější psychoaktivní látkou. Jako takový snižuje únavu a ospalost (Nehlig A. a kol., 1992). V první hodině po podání dochází k zostření kognitivních funkcí, schopnosti reagovat na změny a zvýšení ostražitosti (Camfield D. A. a kol., 2014). Funguje jako antagonist adenosinových receptorů. Adenosin se kumuluje v neuronech a po jeho navázání na receptor vzrůstá odpověď v podobě únavy (DrugBank, 2020). Způsobuje vazokonstrikci, čímž zrychluje krevní oběh. V plicích působí jako relaxant hladkého svalstva a má bronchodilatační účinek. V ledvinách působí zvýšenou diurézu a sekreci reninu (UDelaware, 2020). Je také využíván jako látka zvyšující výkon ve sportu jak při silových, tak vytrvalostních sportech oddalováním nástupu únavy (Pesta D. H. a kol., 2013).

Vliv kofeinu na průběh těhotenství je neprůkazný a sporný, nicméně se nedoporučuje překračovat dávku 200 mg/den. Při překračování může docházet k úbytku porodní váhy nebo potratu (Kuczkowski K. M., 2009, Lassi Z. S. a kol., 2014). U některých lidí, kteří přijímali pravidelně kofein ve vyšších dávkách může při omezení konzumace docházet k abstinčním příznakům jako je bolest hlavy, nervozita, zvýšená únava a neschopnost soustředit se. Při jednorázovém předávkování (<1500 mg) dochází k intoxikaci organismu (LD₅₀ orálně 10–14 g) (DrugBank, 2020). Po překročení této dávky dochází k zesílení stimulace, spánkovým poruchám, bolestem hlavy a bušení srdce vlivem hypertenze a celkovému neklidu organismu.

V medicíně je využívám jako léčivo při bronchopulmonární dysplasii a apnoe u předčasně narozených dětí, což však může negativně ovlivňovat spánek, při léčbě ortostatické hypotenze (IUPHAR, 2020, Schmidt B. a kol., 2007). Byly studovány jeho vlivy na Parkinsonovu a Alzheimerovu nemoc (Chen J. F. a kol., 2001). Je využíván jako vedlejší přídatná látka s anestetiky proti bolestem svalů a hlavy (paracetamol, ibuprofen) a zvyšuje jejich účinnost o 5-10% (Baratloo A. a kol., 2016)

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

Pražená kávová zrna (*Coffea arabica* var. *Heilroom*) „Sweetshop“ (Squaremile, Londýn, Velká Británie), zpracovaná promytou metodou byla použita na stanovení kofeinu. Pražená kávová zrna (*Coffea arabica* var. *Caturra*) (Kikafe, Olomouc, Česká republika), zpracovaná naturální metodou byla použita pro senzorickou analýzu.

3.2 Chemikálie

Kofein (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), dpHBA (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Tewksbury, USA), methanol $\geq 99,9\%$ (LiChrosolv, Merck, Darmstadt, Německo), mobilní fáze byly připraveny z kyseliny mravenčí (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), $\geq 99,9\%$ acetonitril (čistota LC-MS) (LiChrosolv, Merck, Darmstadt, Německo). Lockspray pro MS leucin-enkefalin o 5 ng/ μ L (Waters, Milford, USA).

3.3 Extrakce vzorků pro stanovení kofeinu

Bylo namleto 18 g RC na mlýnku Mythos One (Nuova Simonelli group, Belforte del Chienti, Itálie) a utlačeno v portafilteru silou 14 kg, pomocí automatického tamperu Puqress Q2 (Barista Technology BV, Amsterdam, Nizozemsko). Vzorky byly připraveny na kávovaru Aurelia II (Nuova Simonelli group, Belforte del Chienti, Itálie). Byly použity standardní podmínky dle SCA ($T = 94\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 9\text{ bar}$). Frakce byly odebírány v intervalu 10 s do celkové doby extrakce 60 s. Vzorky jednotlivých frakcí byly přefiltrovány přes filtr Millipore Nylon 0,45 μm (Millex, Merck, Darmstadt, Německo) a uchován v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4 Extrakce vzorů pro senzorickou analýzu

RC byla namleta na mlýnku Mythos One (Nuova Simonelli group, Belforte del Chienti, Itálie) a utlačena v portafilteru silou 14 kg, pomocí automatického tamperu Puqress Q2 (Barista Technology BV, Amsterdam, Nizozemsko). Vzorky byly připraveny na kávovaru Aurelia II (Nuova Simonelli group, Belforte del Chienti, Itálie) při tlaku $p = 9\text{ bar}$ a době extrakce 30 s. Extrakční teplota byla 60, 80, 85, 90, 94, 95 a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. U jednotlivých extraktů byly certifikovanými odborníky ohodnoceny na škále 1–5 kyselost, sladkost a hořkost. Vzorky byly přefiltrovány přes filtr Millipore Nylon 0,45 μm (Millex, Merck, Darmstadt, Německo) a uchovány v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.5 Příprava vzorků po LC-MS analýze

200 µL vzorku bylo přefiltrováno přes centrifugační filtr RC-02 Micro Spin Filter (Ciro Manufacturing Corp., Deerfield Beach, USA) na centrifuze Micro Star 17 (VWR, Avantor, Randor, USA) při 990 G po dobu 3 min. Filtrát byl 100x zředěn do 20% methanolu. Byl přidán IS dpHBA (výsledná koncentrace 10^{-5} M). 150 µL bylo přeneseno do vialek pro LC-MS analýzu.

3.6 LC-MS analýza

Rozdělení extraktů bylo provedeno na koloně Acquity UPLC BEH C18 1,7 µm, rozměry kolony 150 x 2,1 mm. UHPLC se skládal z PDA detektoru (Acquity Ultra Performance), Sample manageru (FTN Acquity UPLC) a pumpy (Quaternary Solvent manager Acquity UPLC Class H) (Waters, Milford, USA). Kolona byla udržována při teplotě 30 °C a vzorky při 4 °C. Nástřik vzorků byl 3 µL. Byl použit gradient mobilní fáze s obsahem $\geq 99,9\%$ acetonitril a 5 mM kyselina mravenčí v deionizované vodě. Voda byla získána z přístroje Simplicity 185 (Millipore Corp., Billerica, USA). Složení gradientu je uvedeno v Tabulce 1

Jednotlivé oddělené látky byly detekovány na hmotnostním spektrometru Synapt G2-Si (Waters, Milford, USA). Iontovým zdrojem byl ESI. Analyzátor byl v sérii zapojený Q a TOF. Vzorky pro stanovení kofeinu byly měřeny v pozitivním módu a pro senzorickou analýzu v pozitivním i negativním módu. Nastavení MS je uvedeno v Tabulce 2. Data byla zaznamenána v režimu DDA (Data Dependent Acquisition).

Tabulka 1 Složení mobilní fáze s obsahem acetonitrilu a 5 mM kyseliny mravenčí

Čas [min]	průtok µL /min	Acetonitril [%]	Kys. mravenčí [%]
0	250	5	95
0,1	250	5	95
1	250	10	90
12	250	35	65
17	250	70	30
17,5	250	100	0
19	250	100	0
19,5	250	5	95
22	250	5	95

Tabulka 2 Nastavení MS pro analýzu vzorků

Parametr	Nastavení
Rozsah měření (<i>m/z</i>)	70-1500
Zmlžující plyn	N ₂
Lockspray	leucin-enkefalin (5ng/μl)
Kolizní energie	± 20 eV
Doba měření	22 min
Kapilární napětí	2000 V
Teplota iontového zdroje	120 °C
Cone voltage	0,015 kV
Desolvatační teplota	500 °C
Průtok cone gas	0,5 L/min
Průtok desolvatačního plynu	10 L/min

3.7 Analýza a zpracování dat

Pro stanovení kofeinu byla sestavena kalibrační řada v rozsahu 0,01 – 100 pmol. Kofein byl stanoven v jednotlivých frakcích a v referenčním nápoji metodou interního standardu.

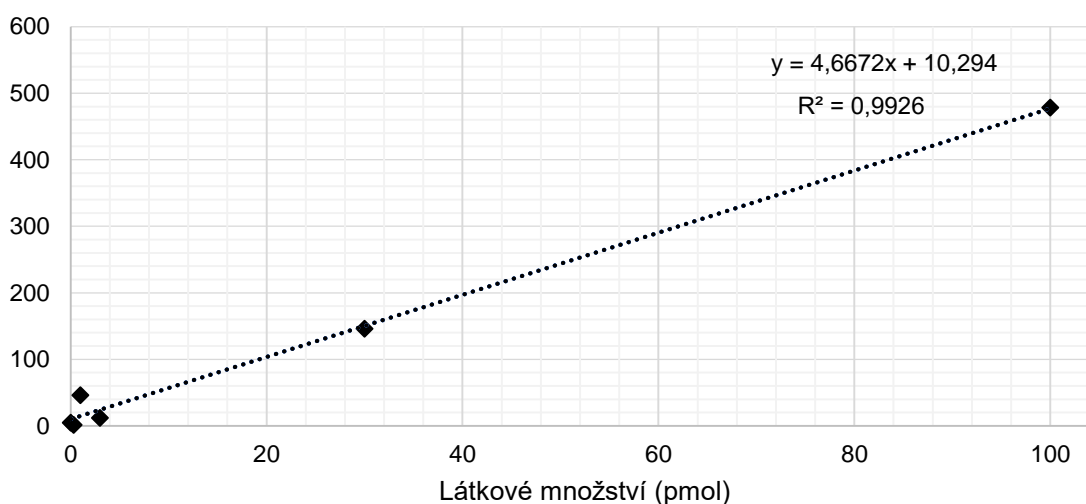
Pro analýzu sensoricky aktivních sloučenin byly z celkových 9145 signálů vybrány ty, jejichž plocha byla >2000. U 833 vybraných látek byla provedena Spearmanova korelace mezi sensorickým hodnocením a plochou píků. Pro následnou analýzu byly vybrány ty látky, jejichž součet absolutních hodnot Spearmanova korelačního koeficientu byl větší než 1,7 a zároveň jejich plocha byla větší než 25000. Výsledné features byly podrobeny manuálnímu zkoumání a byly určeny molekulární ionty. U takto vybraných 13 látek byl v programu MassLynx (Micromass, Manchester, Velká Británie) určen sumární vzorec a spektra byla porovnána s databází Metlin.

4. Výsledky

Cílem bakalářské práce bylo stanovení množství kofeinu v různých fázích extrakce EC a tím potvrdit nebo vyvrátit tvrzení, že kofein se extrahuje do nápoje pouze ve specifických intervalech. Další částí práce byla identifikace sloučenin, odpovědných za chuťové vlastnosti EC a zda se tyto vlastnosti mění v souvislosti s extrakční teplotou.

4.1 Stanovení kofeinu ve frakcích

Pro stanovení byla použita kalibrační řada kofeinu v rozsahu 0,01 – 100 pmol. Vzorke byly měřeny metodou interního standardu.



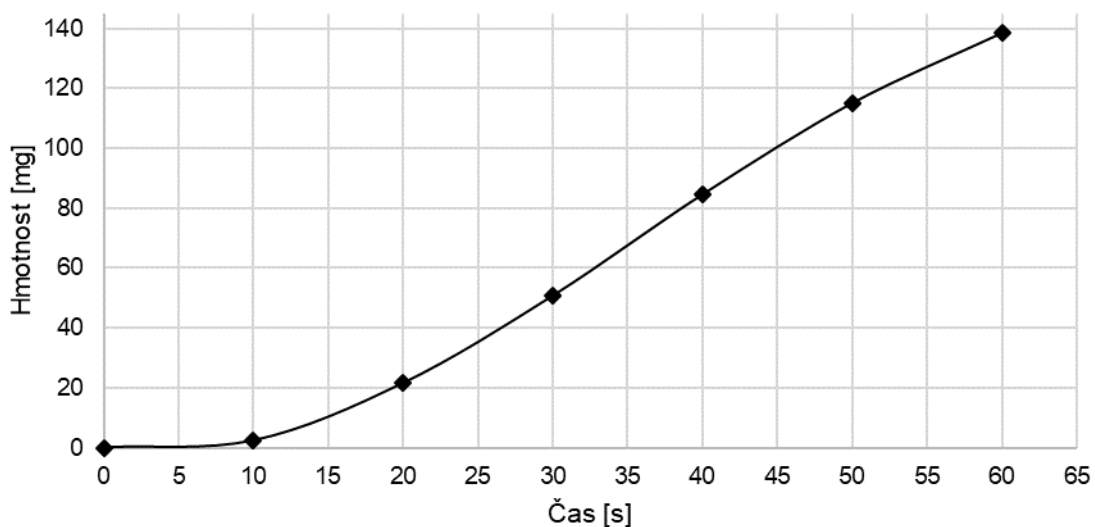
Graf 1 Kalibrační řada kofeinu metodou interního standardu dpHBA

Kofein byl stanovován v 6 frakcích kávy v 10 s intervalech. Množství kofeinu ve frakcích se pohybovalo v rozmezí 2,38 mg ve frakci do 33,83 mg a koncentrací od 1,08 mg/mL do 1,83 mg/mL. Celkové množství kofeinu ve všech frakcích bylo 138,48 mg. Jednotlivé hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 3. V referenčním, neděleném vzorku EC připraveného dle standardu SCA byl obsah kofeinu 52,43 mg což odpovídá koncentraci 1,31 mg/mL.

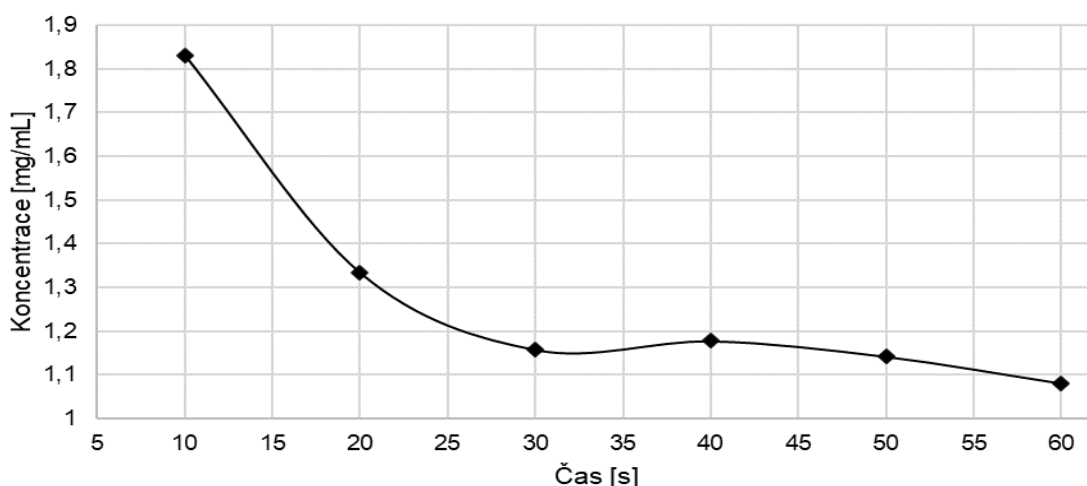
Tabulka 3 Koncentrace a množství kofeinu ve frakcích kávy odebraných v 10 s intervalech

Čas [s]	n [mol]	m [g]	mg ve frakci	mg/mL ve frakci	Objem nápoje [mL]
10	$2,82686 \times 10^{-8}$	$5,48947 \times 10^{-6}$	2,3788	1,8298	1,3
20	$1,83343 \times 10^{-8}$	$3,56034 \times 10^{-6}$	19,226	1,3336	16,2
30	$1,02795 \times 10^{-8}$	$1,99618 \times 10^{-6}$	29,211	1,1575	43,9
40	$7,26799 \times 10^{-9}$	$1,41137 \times 10^{-6}$	33,826	1,1772	71,9
50	$4,66943 \times 10^{-9}$	$9,06756 \times 10^{-7}$	30,467	1,1419	100,8
60	$2,81854 \times 10^{-9}$	$5,47333 \times 10^{-7}$	23,371	1,081	128,1

Z Grafu 2 je patrné, že množství extrahovaného kofeinu se během extrakce zvyšuje. Ve 40. s dosáhne rychlost extrakce maxima a extrakce se zpomaluje. Koncentrace kofeinu je z počátku vysoká, vzhledem k malému objemu frakce. S narůstající dobou extrakce se zrychluje průtok vody a tím klesá koncentrace ve frakcích, jak je patrné z Grafu 3.

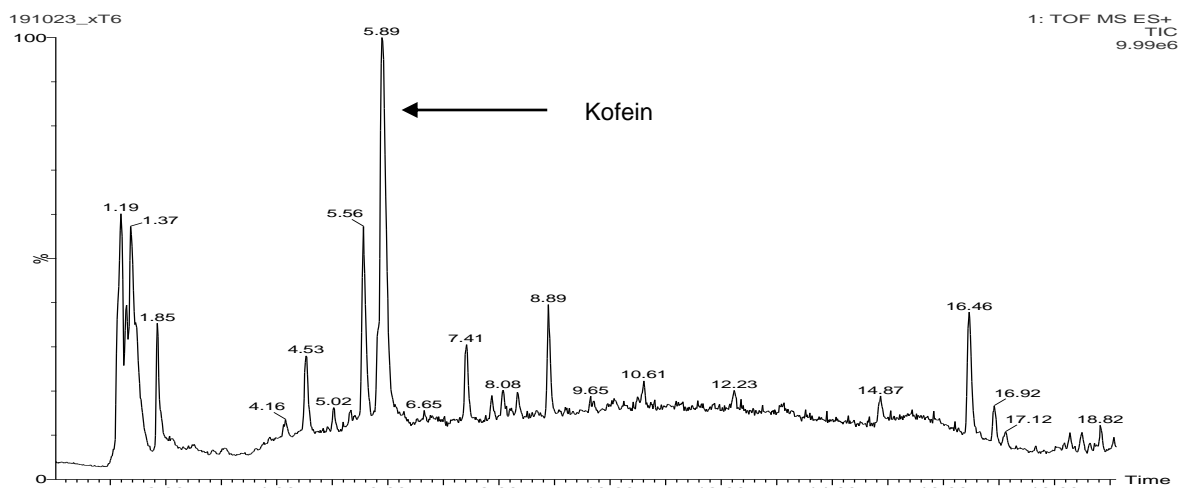


Graf 2 Závislost množství kofeinu v nápoji na době extrakce. Nápoj byl připraven z 18 g RC *Coffea arabica* var. *Heirloom* při standardních podmínkách ($T = 94 \text{ } ^\circ\text{C}$, $p = 9 \text{ bar}$) a celkové době extrakce 60 s.

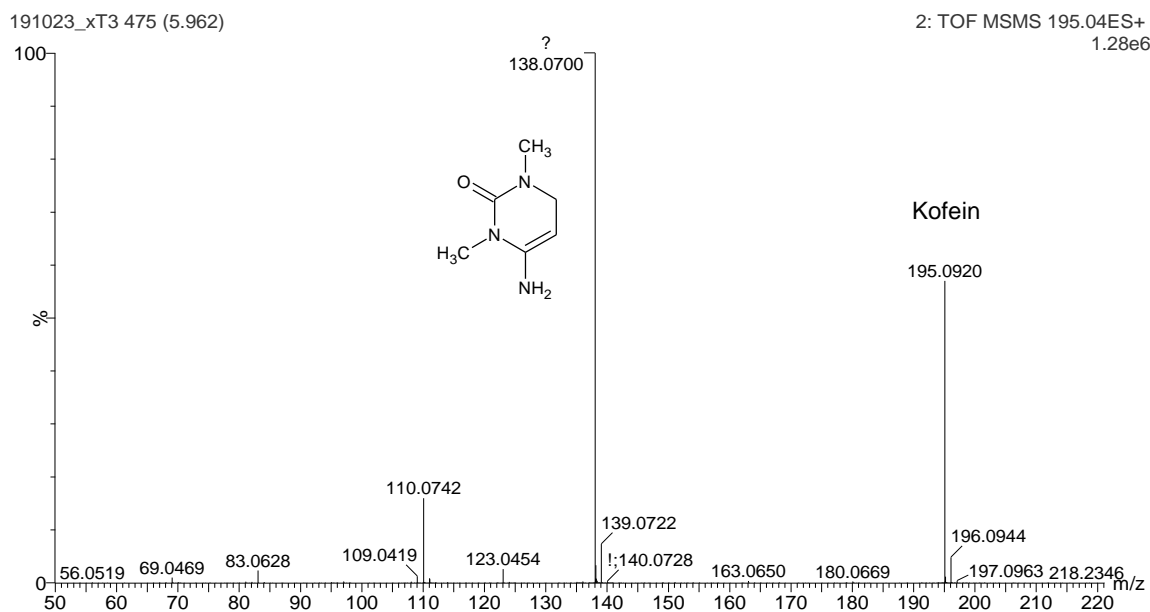


Graf 3 Závislost koncentrace kofeinu v nápoji na době extrakce. Nápoj byl připraven z 18 g RC *Coffea arabica* var *Heirloom* při standardních podmínkách ($T = 94\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 9\text{ bar}$) a celkové době extrakce 60 s.

LC-MS stanovení kofeinu bylo provedeno metodou interního standardu dpHBA. RT kofeinu v MF 99,9 % acetonitril : 5 mM kyselina mravenčí byl 5,89 min. RT dpHBA byl 5,72 min.



Obrázek 10 LC-MS analýza kávy v pozitivním módu zobrazená jako Total Ion Current (TIC) chromatogram. Separace probíhala na koloně Acquity UPLC BEH C18 1,7 μm (Waters, Milford, USA). Káva byla připravena při standardních podmínkách ($T = 94\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 9\text{ bar}$, $t = 30\text{ s}$). Na přípravu bylo použito 18 g mleté kávy a hmotnost výsledného nápoje byla 37 g.



Obrázek 11 MS/MS spektrum kofeinu v ES⁺. Molekulární iont m/z 195,092 [M+H]⁺, RT byl 5,96 min. Jeho fragment m/z 138,0700. Kolizní energie 20 eV

4.2 Stanovení sensoricky aktivních sloučenin

Z celkových 9145 signálů ve vzorcích bylo pro analýzu vybráno 13 látek na základě Spearmanova korelačního koeficientu. Z těchto látek bylo 6 korelováno s kyselostí, 6 se sladkostí a 9 s hořkostí. Látky jsou uvedeny v Tabulkách 5-7 Chutě spolu byly výrazně korelovány a nejde tedy jednoznačně určit, kterou ze sensorických charakteristik daná látka přímo ovlivnila.

Tabulka 4 Extrakční teplota a sensorické hodnocení extraktů

Teplota [°C]	Kyselost	Sladkost	Hořkost
60	4	3	1,5
80	4	2,5	2
85	3	3	2,5
90	2,5	3	2
94	3	3	2,5
95	3	3	2
100	2	1,5	4

Tabulka 5 Detekované látky korelované s kyselou chutí kávy, řazené dle Spearmanova korelačního koeficientu. Extrakce RC *Coffea arabica* var *Caturra* probíhala při teplotách 60, 80, 85, 90, 94, 95 a 100 °C, a tlaku 9 bar. Necílená metabolická LC-MS analýza byla provedena na hmotnostním spektrometru s vysokým rozlišením (Synapt G2-Si, Waters).

<i>m/z</i>	RT [min]	ion	Elementární složení molekuly	Anotace	r
727,3537	13,03	[M-H] ⁻	C ₄₉ H ₄₈ N ₂ O ₄	-	0,879
367,1035	7,41	[M-H] ⁻	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	Feruloylchinová kys. (izomer) ^a	0,805
353,0876	4,52	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Neochlorogenová kys. ^b	0,805
191,0187	1,52	[M-H] ⁻	C ₆ H ₈ O ₇	Citronová kys. ^b	0,805
481,2446	8,90	[[M-H] ⁻	C ₂₅ H ₃₈ O ₉	-	0,805
679,5126	10,60	[M+H] ⁺	C ₃₆ H ₆₆ N ₆ O ₆	-	-0,879

^a Předběžná identifikace na základě MS/MS spekter

^b Identifikace na základě porovnání s autentickým standardem

Tabulka 6 Detekované látky korelované se sladkou chutí kávy, řazené dle Spearmanova korelačního koeficientu. Extrakce RC *Coffea arabica* var *Caturra* probíhala při teplotách 60, 80, 85, 90, 94, 95 a 100 °C, a tlaku 9 bar. Necílená metabolická LC-MS analýza byla provedena na hmotnostním spektrometru s vysokým rozlišením (Synapt G2-Si, Waters).

<i>m/z</i>	RT [min]	ion	Elementární složení molekuly	Anotace	r
138,056	1,38	[M+H] ⁺	C ₇ H ₇ NO ₂	-	0,668
559,1117	5,56	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₁₈ N ₄ O ₁₀	-	0,668
353,0876	5,54	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Chlorogenová kys. ^b	0,535
335,0776	8,08	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₆ O ₈	Pravděpodobný derivát kavové kys. (izomer) ^a	0,535
335,0772	8,35	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₆ O ₈	Pravděpodobný derivát kavové kys. (izomer) ^a	0,535
335,0772	7,89	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₆ O ₈	Pravděpodobný derivát kavové kys. (izomer) ^a	0,535

^a Předběžná identifikace na základě MS/MS spekter

^b Identifikace na základě porovnání s autentickým standardem

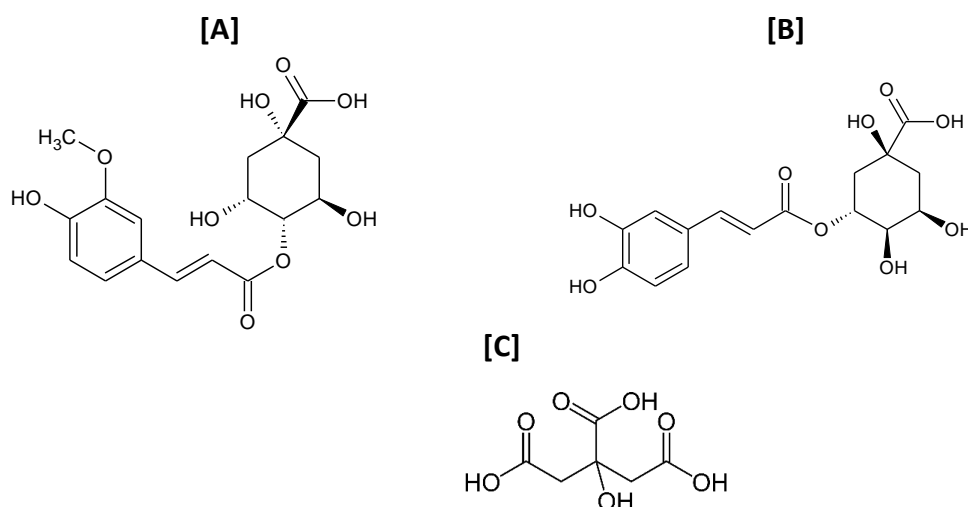
Tabulka 7 Detekované látky korelované s hořkou chutí kávy, řazené dle Spearmanova korelačního koeficientu. Extrakce RC *Coffea arabica* var *Caturra* probíhala při teplotách 60, 80, 85, 90, 94, 95 a 100 °C, a tlaku 9 bar. Necílená metabolická LC-MS analýza byla provedena na hmotnostním spektrometru s vysokým rozlišením (Synapt G2-Si, Waters).

<i>m/z</i>	RT [min]	ion	Elementární složení molekuly	Anotace	r
679,5126	10,60	[M+H] ⁺	C ₃₆ H ₆₆ N ₆ O ₆	-	0,767
353,0876	5,54	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Chlorogenová kys. ^a	-0,711
138,056	1,38	[M+H] ⁺	C ₇ H ₇ NO ₂	-	-0,767
335,0776	8,08	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₆ O ₈	Pravděpodobný derivát kávové kys. (izomer) ^b	-0,767
367,1035	7,41	[M-H] ⁻	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	Feruloylchinová kys. (izomer) ^b	-0,767
353,0876	4,52	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Neochlorogenová kys. ^a	-0,767
191,0187	1,52	[M-H] ⁻	C ₆ H ₈ O ₇	Citronová kys. ^a	-0,767
481,2446	8,90	[[M-H] ⁻	C ₂₅ H ₃₈ O ₉	-	-0,767
367,1036	5,93	[M-H] ⁻	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	Feruloylchinová kys. ^b	-0,861

^a Předběžná identifikace na základě MS/MS spekter

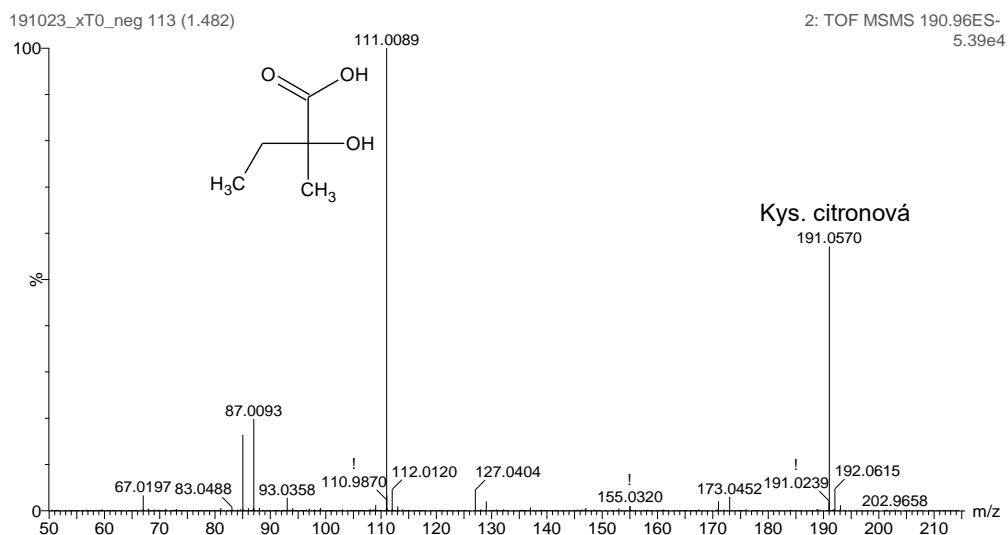
^b Identifikace na základě porovnání s autentickým standardem

Na základě porovnání spekter byly jako senzory významné látky určeny kys. citronová, chlorogenová a neochlorogenová. Dále pak kys. feruoylchinová a její izomer.

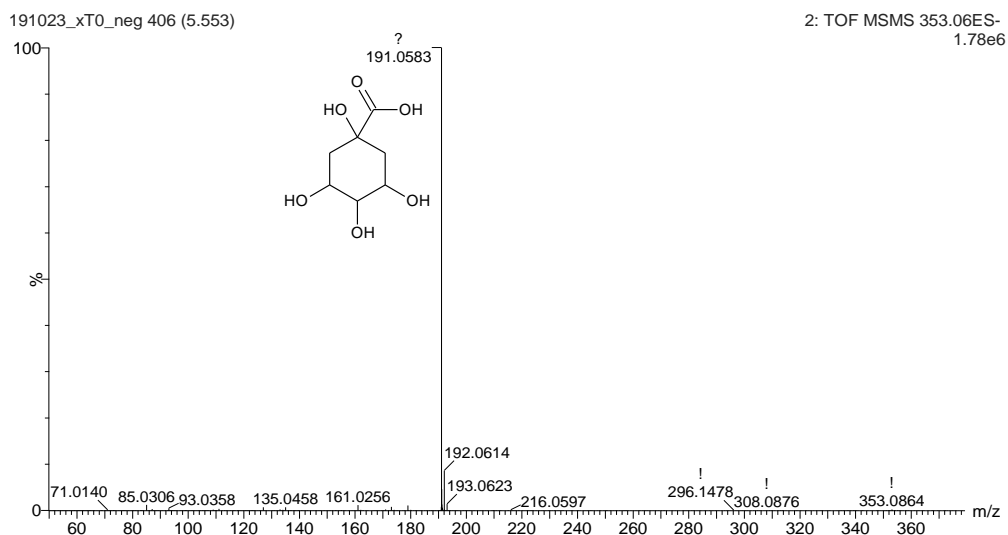


Obrázek 12 Kyselina feruoylchinová [A], chlorogenová [B] a [C] citronová

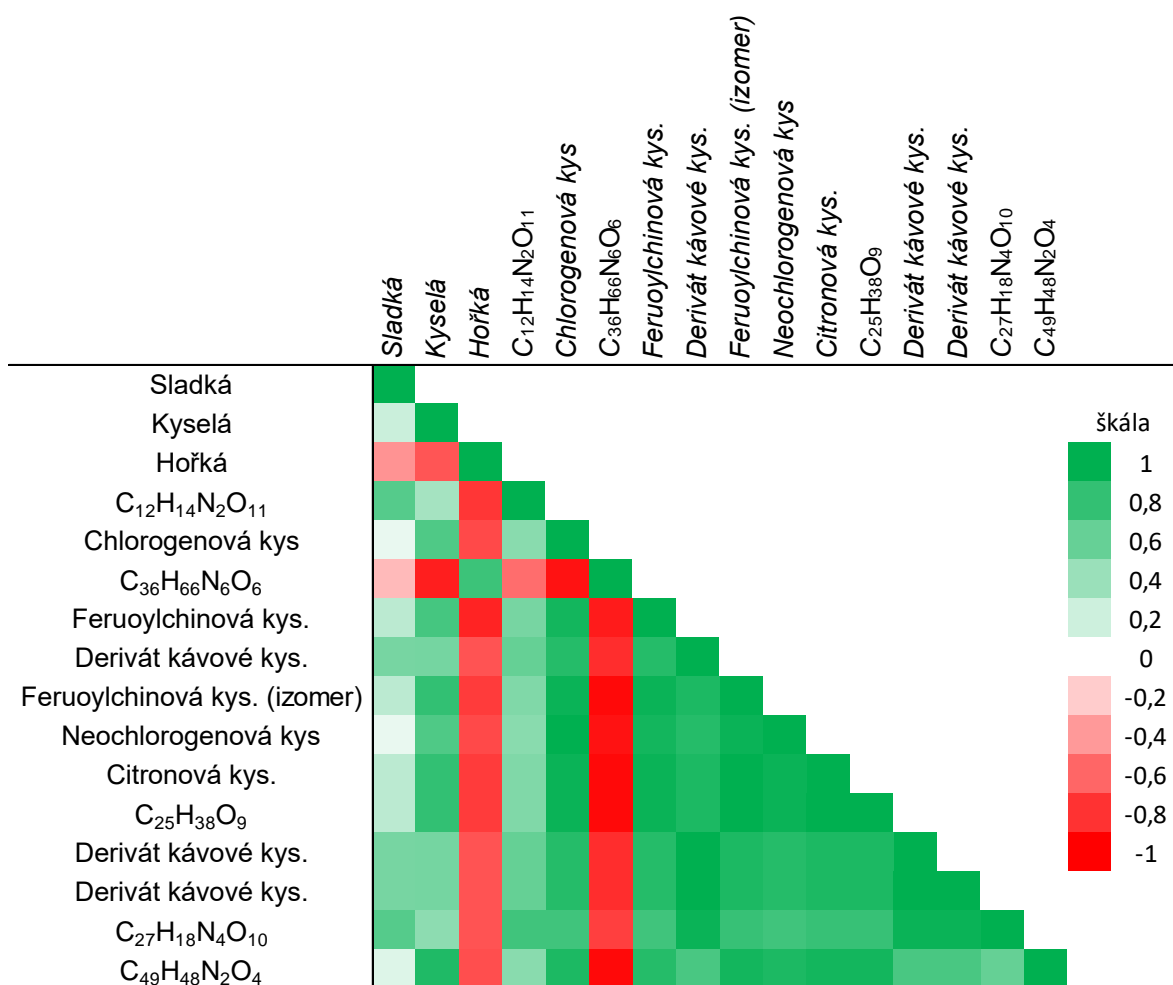
Nejvyšší hladiny látek korelovaných se senzoryckými charakteristikami byly nejčastěji v extraktu připraveném při nejnižší teplotě (60 °C). Pouze v jednom případě (C₃₆H₆₆N₆O₆) byl trend opačný a koncentrace této látky stoupala se vzrůstající teplotou extrakce.



Obrázek 13 MS/MS spektrum kys. citronové v ES⁻. Molekulární iont *m/z* 191,0570 [M-H]⁻, RT byl 1,48 min. Její fragment *m/z* 111,0089. Kolizní energie -20 eV

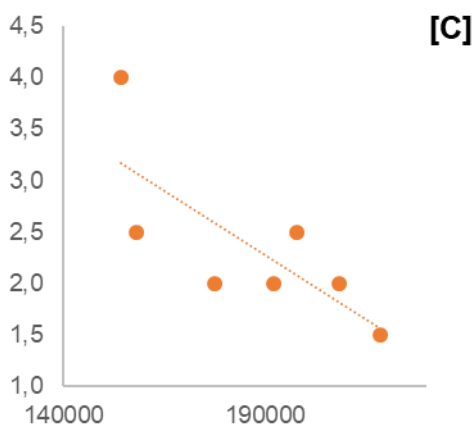
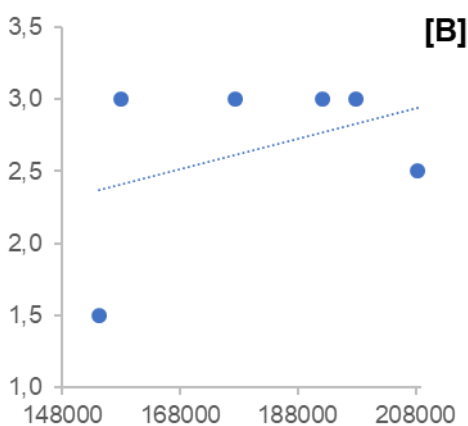
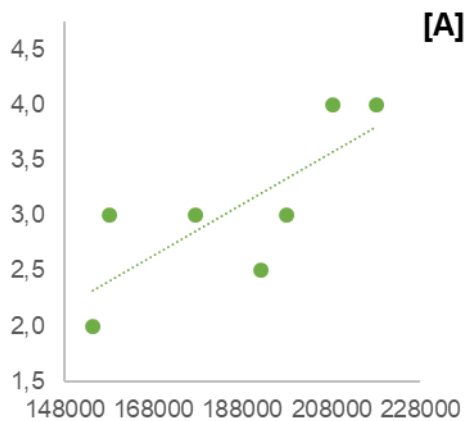


Obrázek 14 MS/MS spektrum kys. chlorogenové v ES⁻. Molekulární iont *m/z* 353,0864 [M-H]⁻, RT byl 5,55 min. Její fragment *m/z* 191,0583. Kolizní energie -20 eV



Obrázek 15 Korelační heatmapa senzoričeských charakteristik (chutí) a detekovaných metabolitů, které byly nejvíce korelované s chutí kávy. Je zobrazena Spearmanův koeficient pořadové korelace. Zelená barva zobrazuje pozitivní korelaci, červená negativní korelaci chutí s obsaženými látkami se senzoričeskou aktivitou

Z Grafu 4 [A] a [B] je patrné, že se zvyšující se koncentrací kys. citronové se zvyšovalo hodnocení pro kyselost. Čím byla v extraktu nižší koncentrace kys. citronové, tím výraznější byla hořkost nápoje. Z Grafu 4 [C] je patrné, že při vysoké koncentraci byla hořkost velmi nízká



Graf 4 Hodnocení sensorických vlastností kyselosti [A], sladkosti [B] a hořkosti [C] u kys. citronové, v závislosti na ploše. Nápoje byly připraveny z 18 g RC *Coffea arabica* var *Caturra*, při teplotách extrakce 60, 80, 85, 90, 94, 95 a 100 °C a tlaku 9 bar. Extrakty byly děleny na reverzní fázi na koloně Acquity UPLC BEH C18 1,7 μm (Waters, Milford, USA).

5 Diskuze

5.1 Obsah kofeinu

Kofein v nápoji byl stanoven v různých extrakčních časech a jeho koncentrace byly porovnány se standardně připraveným EC.

Stanovený obsah v kofeinu v EC byl přibližně 50 mg, což také odpovídá různým zdrojům, které uvádějí obsah kofeinu mezi 50-100 mg v 30-60 mL nápoje (Caffeine info, 2020, USDA, 2020). Toto množství je velmi proměnlivé a závisí na druhu kávy, množství použité RC, hrubosti mletí, době extrakce, množství vyextrahované kávy (Severini C. a kol., 2017).

Navzdory obecně rozšířené informaci, že ristretto, tedy malá káva neobsahuje téměř žádný kofein a také informaci, že kofein se z kávy extrahuje až po určitém čase (Dokonalá káva, 2020), ho tento nápoj obsahuje poměrně velké množství. Stává se, že barista (osoba připravující kávu) nabídne ristretto, jako nápoj s nízkým až žádným obsahem kofeinu. Pro osoby citlivé na kofein, nebo např. pro kojící to může být značným rizikem. Správně by mělo být ristretto extrahováno stejně jako EC (25-30 s) s tím rozdílem, že nápoj má menší objem (CoffeeGeek, 2020). Z výsledků je patrné, že při zachování času extrakce bude obsah kofeinu minimálně podobný. V těhotenství se doporučuje nepřekračovat dávku kofeinu 200 mg/den (Kuczkowski K. M., 2009). Tato dávka sice není obsažena v jednom EC, nicméně může dojít k mylnému předpokladu, že konzumací ristretta kofein nepřijmeme a konzumovat pak další nápoje, které již kofein obsahují. U hypersensitivních lidí může kofein vyvolat alergickou reakci (Sugiyama K. a kol., 2015), hyperaktivitu, bolesti hlavy a nespavost (Yang A. a kol., 2010).

Řešením by mohlo být, zastavit extrakci kávy velice brzy, po 10-15 s, případně nechat odtéct prvních 60 s a použít až následné části extrakce, nebo použít už jednou extrahovanou kávu. Takový nápoj by už ale neměl požadované sensorické vlastnosti a byl by v rozporu se zásadami pro přípravu výběrové kávy (SCA 3, 2020). Dalším řešením může být použití bezkofeinové kávy. Ta by měla být připravována dle standardů SCA. Bylo by tedy nutné mít k tomu uzpůsobené vybavení, a to především separátní mlýnek. Bezkofeinová káva, je-li zbavena

kofeinu chemickou cestou, může obsahovat chuťově nepříjemné látky (Ramalakshmi K. a Raghavan B., 1999).

5.2 Senzorické charakteristiky

Senzoricky aktivní sloučeniny byly vyhledávány v extraktech připravených za různé teploty (60–100 °C). Obsažené látky detekované pomocí necílené LC-MS analýzy byly následně korelovány se sensorickým hodnocením skupiny certifikovaných odborníků.

Při stanovování látek, majících vliv na chuť bylo určeno celkem 13 látek. Většina z nich byla nalezena v extraktu při 60 °C, přestože doporučená teplota pro přípravu EC je 94 °C (Buratti S. a kol., 2017). To může souviset s výraznější polaritou sensoricky aktivních látek a také s jejich teplotní stabilitou. Při vyšších teplotách dochází k extrakci širšího spektra látek, které se navzájem ovlivňují a také k termickému rozpadu. Produkty rozkladu pak mají jiné sensorické vlastnosti než původní. Chuť kávy připravené při nízké teplotě byla velmi plochá. Ve velkém množství byla zastoupena kyselina citronová. Tato kyselina má velký význam na vnímání kyselosti nápoje (Jham G. N. a kol., 2002). Její obsah v nápoji se pohybuje mezi 0,3 až 1,1 mg/mL (Khamitova G. a kol., 2020b, Rodrigues C. I. a kol., 2007). Používá se také jako umělé aditivum do různých nápojů, ke zvýšení kyselosti a jako konzervant.

Další z detekovaných látek byly kyselina chlorogenová a neochlorogenová. Tyto polyfenolické látky jsou ve velké míře zastoupeny v GB. Jejich obsah je 1,1 g – 6,5 g na 100 g (Cheng K. a kol., 2019, Monteiro M. C. a Farah A., 2012) a při pražení se jejich obsah snižuje. (Cheng K. a kol., 2019, Monteiro M. C. a Farah A., 2012). Ve 14 g RC je jejich obsah 33 mg. (Khamitova G. a kol., 2020a). do nápoje se extrahuje přibližně 1,8 - 2,3 mg/mL (Khamitova G. a kol., 2020b, Vilas-Boas A. A. a kol., 2020). Během procesu pražení vznikají z kyseliny chlorogenové melanoidiny a laktony. Tyto látky jsou spojovány s hořkou chutí a jejich množství závisí na stupni pražení. Čím déle je káva pražena, tím více vzniká látek způsobujících hořkou chuť (Cangussu L. B. a kol., 2020).

Kyselina chlorogenová je látkou, která při určitých koncentracích zesiluje vnímání sladkosti a snižuje vnímání hořkosti. Její obsah je tedy v kávě žádoucí, především u světle pražené výběrové kávy, jsou její koncentrace vyšší (Upadhyay R. a Mohan Rao L. J., 2013). Kyselina feruoylchinová patří mezi významné antioxidanty spolu s dalšími deriváty kyseliny chinové, přičemž konzumací kávy je přijímáno množství těchto látek. Extrahované do nápoje jsou pak dostupnější než v potravinách (Cheng K. a kol., 2019, Tomac I. a kol., 2020). Její obsah v kávě se pohybuje kolem 0,05 mg/mL (Jeon J.-S. a kol., 2017)

6 Závěr

V teoretické části této práce jsou shrnuta fakta týkající se kávovníku a jeho fytochemického složení, a to především u významných látek kofeinu a kyseliny chlorogenové. Dále je popsán způsob zpracování kávových zrn jak zelených, tak jejich následné zpracování do podoby pražené kávy. Dále je zde popsáno využití metabolomických postupů při určování kvality potravin a LC-MS analýza. Jsou zde shrnuty poznatky o kofeinu a jeho fyziologických a zdravotních účincích. Experimentální část se zabývala analýzou kofeinu a sensoricky aktivních látek v kávě. Cílem bylo stanovení množství kofeinu v kávě v závislosti na době extrakce. Výsledky vyvrací mýtus o malém obsahu kofeinu v nápoji připraveném během prvních 20 s extrakce. Dalším cílem bylo stanovení sloučenin, které mají významný vliv na výslednou chuť nápoje a zda je jejich obsah závislý na teplotě extrakce. Z výsledků vyplývá, že např. kyselina citronová a chlorogenová mají zřejmě vliv na vnímání kyselosti. Neznámá látka s elementárním složením $C_{36}H_{66}N_6O_6$ potom pravděpodobně ovlivňuje vnímání hořkosti. Oba výše popsané cíle práce byly úspěšně splněny.

7 Použitá literatura

1. Almeida C., Duarte I. F., Barros A., Rodrigues J., Spraul M. a Gil A. M. (2006) Composition of beer by 1h nmr spectroscopy: Effects of brewing site and date of production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54** 700-706
2. Alonso-Salces R. M., Serra F., Reniero F. a Héberger K. (2009) Botanical and geographical characterization of green coffee (*coffea arabica* and *coffea canephora*): Chemometric evaluation of phenolic and methylxanthine contents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57** 4224-4235
3. Anaya A. L., Cruz-Ortega R. a Waller G. (2006) Metabolism and ecology of purine alkaloids. *Frontiers in bioscience*, **11** 2354-70
4. Andueza S., Vila M. A., Paz de Peña M. a Cid C. (2007) Influence of coffee/water ratio on the final quality of espresso coffee. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **87** 586-592
5. Aneja M. a Gianfagna T. (2001) Induction and accumulation of caffeine in young, actively growing leaves of cocoa (*Theobroma cacao* L.) by wounding or infection with *crinipellis perniciososa*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **59** 13-16
6. Aniszewski T. (2007) Alkaloids—secrets of life. Alkaloid chemistry, biological significance, applications, and ecological role. Amsterdam: Elsevier
7. Ashihara H. a Crozier A. (1999) Biosynthesis and catabolism of caffeine in low-caffeine-containing species of coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47** 3425-3431
8. Ashihara H., Sano H. a Crozier A. (2008) Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering *Phytochemistry* **69** 841-856
9. Baratloo A., Rouhipour A., Forouzanfar M. M., Safari S., Amiri M. a Negida A. (2016) The role of caffeine in pain management: *A brief literature review Anesth Pain Med* **6** e33193-e33193
10. Bertuzzi T., Martinelli E., Mulazzi A. a Rastelli S. (2020) Acrylamide determination during an industrial roasting process of coffee and the influence of asparagine and low molecular weight sugars. *Food Chemistry* **303** 125372
11. Buratti S., Benedetti S. a Giovanelli G. (2017) Application of electronic senses to characterize espresso coffees brewed with different thermal profiles. *European Food Research and Technology* **243** 511-520

12. Cafeimports
<https://www.cafeimports.com/europe/blog/2019/09/10/whats-anaerobic-fermentation-and-why-is-it-so-popular-all-of-a-sudden/> (7. 7. 2020)
13. Caffeine info <https://www.caffeineinformer.com/the-caffeine-database> (24. 7. 2020)
14. Camfield D. A., Stough C., Farrimond J. a Scholey A. B. (2014) Acute effects of tea constituents l-theanine, caffeine, and epigallocatechin gallate on cognitive function and mood: A systematic review and meta-analysis. *Nutrition Reviews* **72** 507-522
15. Cangussu L. B., Rodrigues C. G., Ribeiro M. C., Dutra V. L. M., Amaral E. F. G. A Fante C. A. (2020) Projective mapping: Potential tool for sensory evaluation of coffees for industrial application. *Semin.-Cienc. Agrar.* **41** 1557-1566
16. Charrier, A. a Berthaud, J. (1985) Botanical Classification of Coffee. Botany, Biochemistry, and Production of Beans and Beverage, Croom Herm, Westport, London, 13-47.
17. Crouch S. R., Holler F. J., West D. M. a Skoog D. A. (2019) Analytická chemie VŠCHT Praha, pp 735-750, 833-851
18. Carvalho F. M., Moksunova V. a Spence C. (2020) Cup texture influences taste and tactile judgments in the evaluation of specialty coffee. *Food Quality and Preference* **81** 103841
19. CoffeeGeek <http://coffeegeek.com/guides/ristretto> (28. 7. 2020)
20. Commisso M., Strazzer P., Toffali K., Stocchero M. a Guzzo F. (2013) Untargeted metabolomics: An emerging approach to determine the composition of herbal products. *Comput Struct Biotechnol J* **4** e201301007-e201301007
21. Davis A. P., Chester M., Maurin O. a Fay M. F. (2007) Searching for the relatives of coffeea (*rubiaceae*, *ixoroideae*): The circumscription and phylogeny of coffeeae based on plastid sequence data and morphology. *American Journal of Botany* **94** 313-329
22. De Vos R. C. H., Moco S., Lommen A., Keurentjes J. J. B., Bino R. J. a Hall R. D. (2007) Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spektrometry. *Nature Protocols* **2** 778-791
23. do Carmo K. B., do Carmo J. C. B., Krause M. R., Moreli A. P. a Lo Monaco P. A. V. (2020) Quality of arabic coffee under different processing systems, drying methods and altitudes. *Biosci. J.* **36** 1116-1125

24. Dokonalá káva <https://www.dokonalakava.cz/blog/kavove-omyly--myty-a-polopravdy/> (29. 7. 2020)
25. DrugBank <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00201#pharmacology> (6. 7. 2020)
26. Frank H. A. a Cogdell R. J. (1996) Carotenoids in photosynthesis *Photochemistry and Photobiology* **63** 257-264
27. Friedecký D. a Lemr K. (2012). Úvod do hmotnostní spektrometrie, *Klinická Biochemie a Metabolismus*, **20** (41), No. 3, 152–157.
28. Girenavar B., Poulouse S. M., Jayaprakasha G. K., Bhat N. G. A Patil B. S. (2006) Furocoumarins from grapefruit juice and their effect on human cyp 3a4 and cyp 1b1 isoenzymes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **14** 2606-2612
29. Gloess A. N., Schönbacher B., Klopprogge B., D`Ambrosio L., Chatelain K., Bongartz A., Strittmatter A., Rast M. a Yeretizian C. (2013) Comparison of nine common coffee extraction methods: Instrumental and sensory analysis. *Eur Food Res Technol* **236** 607-627
30. Goffeau A., Barrell B. G., Bussey H., Davis R. W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J. D., Jacq C., Johnston M., Louis E. J., Mewes H. W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H. a Oliver S. G. (1996) Life with 6000 genes. *Science* **274** 546
31. Gorrochategui E., Jaumot J., Lacorte S. a Tauler R. (2016) Data analysis strategies for targeted and untargeted lc-ms metabolomic studies: Overview and workflow. *Trends in Analytical Chemistry* **82** 425-442
32. Gougeon L., da Costa G., Richard T. a Guyon F. (2019) Wine authenticity by quantitative 1h nmr versus multitechnique analysis: A case study. *Food Analytical Methods* **12** 956-965
33. Havaux M. (1998) Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends in Plant Science* **3** 147-151
34. Hoffmann J., (2014) The world atlas of coffee: from beans to brewing: coffees explored, explained and enjoyed, pp. 23-37, 73-87, Octopus publishing group ltd., Londýn, UK
35. Hollingsworth R. G., Armstrong J. W. a Campbell E. (2002) Caffeine as a repellent for slugs and snails. *Nature* **417** 915-916
36. Hu G., Peng X., Gao Y., Huang Y., Li X., Su H. a Qiu M. (2020) Effect of roasting degree of coffee beans on sensory evaluation: Research from the perspective of major chemical ingredients. *Food Chemistry* **331** 127329

37. Huang R., O'Donnell A. J., Barboline J. J. a Barkman T. J. (2016) Convergent evolution of caffeine in plants by co-option of exapted ancestral enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* **113** 10613-10618
38. Chen J. F., Xu K., Petzer J. P., Staal R., Xu Y. H., Beilstein M., Sonsalla P. K., Castagnoli K., Castagnoli N., Jr. A Schwarzschild M. A. (2001) Neuroprotection by caffeine and $\alpha(2a)$ adenosine receptor inactivation in a model of parkinson's disease. *J Neurosci* **21** RC143-RC143
39. Cheng K., Dong W., Long Y., Zhao J., Hu R., Zhang Y. a Zhu K. (2019) Evaluation of the impact of different drying methods on the phenolic compounds, antioxidant activity, and in vitro digestion of green coffee beans. *Food Science & Nutrition* **7** 1084-1095
40. IUPHAR
<https://www.guidetopharmacology.org/GRAC/LigandDisplayForward?tab=clinical&ligandId=407> (6. 7. 2020)
41. Jeon J.-S., Kim H.-T., Jeong I.-H., Hong S.-R., Oh M.-S., Park K.-H., Shim J.-H. a Abd El-Aty A. M. (2017) Determination of chlorogenic acids and caffeine in homemade brewed coffee prepared under various conditions. *Journal of Chromatography B* **1064** 115-123
42. Jham G. N., Fernandes S. A., Garcia C. F. a Silva A. A. d. (2002) Comparison of GC and HPLC for the quantification of organic acids in coffee. *Phytochemical Analysis* **13** 99-104
43. Khamitova G., Angeloni S., Borsetta G., Xiao J., Maggi F., Sagratini G., Vittori S. a Caprioli G. (2020a) Optimization of espresso coffee extraction through variation of particle sizes, perforated disk height and filter basket aimed at lowering the amount of ground coffee used. *Food Chemistry* **314** 126220
44. Khamitova G., Angeloni S., Fioretti L., Ricciutelli M., Sagratini G., Torregiani E., Vittori S. a Caprioli G. (2020b) The impact of different filter baskets, heights of perforated disc and amount of ground coffee on the extraction of organics acids and the main bioactive compounds in espresso coffee. *Food Research International* **133** 109220
45. KLOUDA, P. (2003) *Moderní analytické metody. 2., upr. a dopl. vyd.* Ostrava: Pavel Klouda
46. Kuczkowski K. M. (2009) Caffeine in pregnancy. *Archives of Gynecology and Obstetrics* **280** 695
47. Ky C. L., Louarn J., Dussert S., Guyot B., Hamon S. a Noirot M. (2001) Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. *Accessions Food Chemistry* **75** 223-230

48. Lassi Z. S., Imam A. M., Dean S. V. a Bhutta Z. A. (2014) Preconception care: Caffeine, smoking, alcohol, drugs and other environmental chemical/radiation exposure. *Reprod Health* **11** Suppl 3 S6-S6
49. Ledford H. K. a Niyogi K. K. (2005) Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae. *Plant, Cell & Environment* **28** 1037-1045
50. Livramento K. G. d., Borém F. M., José A. C., Santos A. V., Livramento D. E. d., Alves J. D. a Paiva L. V. (2017) Proteomic analysis of coffee grains exposed to different drying process. *Food Chemistry* **221** 1874-1882
51. Lu W., Bennett B. D. a Rabinowitz J. D. (2008) Analytical strategies for LC-MS-based targeted metabolomics. *Journal of Chromatography B* **871** 236-242
52. Maeztu L., Andueza S., Ibañez C., Paz de Peña M., Bello J. a Cid C. (2001) Multivariate methods for characterization and classification of espresso coffees from different botanical varieties and types of roast by foam, taste, and mouthfeel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49** 4743-4747
53. Mattivi F., Guzzon R., Vrhovsek U., Stefanini M. a Velasco R. (2006) Metabolite profiling of grape: Flavonols and anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54** 7692-7702
54. Metabolomic society -
<http://metabolomicsociety.org/resources/metabolomics-databases> (5. 2. 2020)
55. Moco S., Bino R. J., Vorst O., Verhoeven H. A., de Groot J., van Beek T. A., Vervoort J. a de Vos C. H. R. (2006) A liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolome database for tomato. *Plant Physiology* **141** 1205
56. Mondolot L., La Fisca P., Buatois B., Talansier E., De Kochko A. a Campa C. (2006) Evolution in caffeoylquinic acid content and histolocalization during *Coffea canephora* leaf development. *Annals of Botany* **98** 33-40
57. Monteiro M. C. a Farah A. (2012) Chlorogenic acids in brazilian *Coffea arabica* cultivars from various consecutive crops. *Food Chemistry* **134** 611-614
58. Musilová J. a Glatz Z. (2011). Referát. 745. METABOLOMIKA – ZÁKLADNÍ POJMY, STRATEGIE A METODOLOGIE. *Chem. Listy* **105**, 745-751
59. Nehlig A., Daval J.-L. a Debry G. (1992) Caffeine and the central nervous system: Mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Research Reviews* **17** 139-170

60. Pesta D. H., Angadi S. S., Burtscher M. a Roberts C. K. (2013) The effects of caffeine, nicotine, ethanol, and tetrahydrocannabinol on exercise performance. *Nutr Metab* **10** 71-71
61. Piccoloneexistuje! <https://www.piccoloneexistuje.cz> (15. 7. 2020)
62. PubChem Database <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2519#x27> (5. 7. 2020)
63. Ramalakshmi K. a Raghavan B. (1999) Caffeine in coffee: Its removal. Why and how?. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **39** 441-456
64. Ribeiro L. S., Evangelista S. R., da Cruz Pedrozo Miguel M. G., van Mullem J., Silva C. F. a Schwan R. F. (2018) Microbiological and chemical-sensory characteristics of three coffee varieties processed by wet fermentation. *Annals of Microbiology* **68** 705-716
65. Ribeiro L. S., Ribeiro D. E., Evangelista S. R., Miguel M., Pinheiro A. C. M., Borem F. M. a Schwan R. F. (2017) Controlled fermentation of semi-dry coffee (*Coffea arabica*) using starter cultures: A sensory perspective. *Food Sci. Technol.* **82** 32-38
66. Roberts L. D., Souza A. L., Gerszten R. E. a Clish C. B. (2012) Targeted metabolomics. *Current Protocols in Molecular Biology* **98** 30.2.1-30.2.24
67. Rodrigues C. I., Marta L., Maia R., Miranda M., Ribeirinho M. a Máguas C. (2007) Application of solid-phase extraction to brewed coffee caffeine and organic acid determination by UV/HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis* **20** 440-448
68. Romcafe <httpswww.romcaffe.itentraining-culture> (26. 2. 2020)
69. SCA 1 <https://sca.coffee/research/coffee-standards> (14. 7. 2020)
70. SCA 2 <https://sca.coffee/research/protocols-best-practices> (14. 7. 2020)
71. SCA 3 <https://scanews.coffee/2018/02/01/defining-ever-changing-espresso-25-magazine-issue-3> (24. 7. 2020)
72. Schmidt B., Roberts R. S., Davis P., Doyle L. W., Barrington K. J., Ohlsson A., Solimano A. a Tin W. (2007) Long-term effects of caffeine therapy for apnea of prematurity. *New England Journal of Medicine* **357** 1893-1902
73. Scholz M. B. D., Prudencio S. H., Kitzberger C. S. G. (2019) Physico-chemical characteristics and sensory attributes of coffee beans submitted to two post-harvest processes. *J. Food Meas. Charact.* **13** 831-839
74. Silvarolla M. B., Mazzafera P. a Fazuoli L. C. (2004) A naturally decaffeinated arabica coffee. *Nature* **429** 826-826
75. Simkin A. J., Moreau H., Kuntz M., Pagny G., Lin C., Tanksley S. a McCarthy J. (2008) An investigation of carotenoid biosynthesis in *Coffea canephora* and *Coffea arabica*. *Journal of Plant Physiology* **165** 1087-1106

76. Stalikas C. D. (2007) Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science* **30** 3268-3295
77. Stoffelen P., Noirod M., Couturon E. a Anthony F. (2008) A new caffeine-free coffee from Cameroon. *Botanical Journal of the Linnean Society* **158** 67-72
78. Sugiyama K., Cho T., Tatewaki M., Onishi S., Yokoyama T., Yoshida N., Fujimatsu T., Hirata H., Fukuda T. a Fukushima Y. (2015) Anaphylaxis due to caffeine. *Asia Pac Allergy* **5** 55-56
79. SwissWater <https://www.swisswater.com/our-process/> (8. 7. 2020)
80. Tamanna N. a Mahmood N. (2015) Food processing and maillard reaction products: Effect on human health and nutrition. *Int J Food Sci* **2015** 526762-526762
81. Tomac I., Šeruga M. a Labuda J. (2020) Evaluation of antioxidant activity of chlorogenic acids and coffee extracts by an electrochemical DNA-based biosensor. *Food Chemistry* **325** 126787
82. UDelaware
<https://www1.udel.edu/chem/C465/senior/fall00/Caffeine/Physiological.htm>
(6. 7. 2020)
83. Upadhyay R. a Mohan Rao L. J. (2013) An outlook on chlorogenic acids—occurrence, chemistry, technology, and biological activities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **53** 968-984
84. USDA <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/789340/nutrients>
(24. 7. 2020)
85. Viant M. R., Kurland I. J., Jones M. R. a Dunn W. B. (2017) How close are we to complete annotation of metabolomes?. *Current Opinion in Chemical Biology* **36** 64-69
86. Vilas-Boas A. A., Oliveira A., Jesus D., Rodrigues C., Figueira C., Gomes A. a Pintado M. (2020) Chlorogenic acids composition and the impact of in vitro gastrointestinal digestion on espresso coffee from single-dose capsule. *Food Research International* **134** 109223
87. Villas-Bôas S. G., Mas S., Åkesson M., Smedsgaard J. a Nielsen J. (2005) Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrometry Reviews* **24** 613-646
88. WCE <https://worldcoffeeeevents.org/2019-world-barista-championship-world-brewers-cup-rules-regulations-released/> (16. 7. 2020)
89. Wishart D. S. (2008) Metabolomics: Applications to food science and nutrition research. *Trends in Food Science & Technology* **19** 482-493

90. Yang A., Palmer A. A. a de Wit H. (2010) Genetics of caffeine consumption and responses to caffeine. *Psychopharmacology* **211** 245-257
91. Zhang S. J., De Bruyn F., Pothakos V., Contreras G. F., Cai Z., Moccand C., Weckx S. a De Vuyst L. (2019) Influence of various processing parameters on the microbial community dynamics, metabolomic profiles, and cup quality during wet coffee processing. *Frontiers in Microbiology* **10**
92. 38espresso <http://38espresso.com/about/roasting/> (9. 7. 2020)