



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VÝVOJ NOVÝCH TYPŮ ENERGETICKÝCH NÁPOJŮ NA BÁZI KÁVY S AKTIVNÍMI SLOŽKAMI

DEVELOPMENT OF NEW TYPE OF ENERGY DRINKS BASED ON COFFEE WITH ACTIVE SUBSTANCES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Markéta Dudrová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1431/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Markéta Dudrová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

Název bakalářské práce:

Vývoj nových typů energetických nápojů na bázi kávy s aktivními složkami

Zadání bakalářské práce:

Cílem práce je vývoj nových typů energetických nápojů na bázi různých druhů kávy s přídavkem biologicky aktivních složek.

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) literární rešerše zaměřená na komplexní problematiku energetických nápojů, jejich složek a účinků
- 2) příprava modelových energetických nápojů na bázi kávy s přídavkem dalších aktivních rostlinných složek ve volné a enkapsulované formě
- 3) stanovení fyzikálně–chemických charakteristik a stability liposomů s aktivními složkami v nápojích
- 4) sledování dynamiky uvolňování kofeinu z částic a změny celkového složení nápojů v průběhu času

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Markéta Dudrová
student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá vývojem a přípravou nových energetických nápojů s přídavkem aktivních rostlinných složek ve volné a enkapsulované formě. Teoretická část je zaměřena na charakterizaci energetických nápojů, hlavních složek a jejich vlastností i účinků na lidský organismus. Experimentální část se zabývá přípravou rostlinných extraktů, jejich charakterizací a následnou enkapsulací do liposomových částic. U všech částic byla stanovena velikost, koloidní stabilita, dlouhodobá stabilita, antioxidační aktivita a enkapsulační účinnost. Dále byly vytvořeny energetické nápoje, jejichž základem byly různé druhy kávy, které byly obohaceny o volný nebo enkapsulovaný extrakt z guarany, kustovnice, matchy nebo kakaa. U připravených energetických nápojů byl sledován obsah kofeinu, cukrů, polyfenolů a také antioxidační aktivita. Na závěr byly vybrané energetické nápoje podrobeny sensorické analýze, kde byl hodnocen vzhled, barva, vůně i chuť.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with development and preparation of new energy drinks with active plant component in free and encapsulated form. The theoretical part is focused on characterization of the energy drinks, their components and properties. The experimental part deals with the preparation of plant extracts, their characterization and subsequent encapsulation into liposome particles. All particles were determined for size, colloidal stability, long-term stability, antioxidant activity and encapsulation efficiency. Energy drinks based on various types of coffee were prepared and enriched with free or encapsulated guarana, goji, matcha or cocoa extract. In prepared energy drinks the content of caffeine, sugar, phenolics and antioxidant activity was monitored. Finally, selected energy drinks were subjected to sensory analysis, where appearance, color, smell and taste were evaluated.

KLÍČOVÁ SLOVA

Energetické nápoje, kofein, enkapsulace, liposomy, polyfenoly

KEYWORDS

Energy drinks, caffeine, encapsulation, liposomes, polyphenols

DUDROVÁ, M. *Vývoj nových typů energetických nápojů na bázi kávy s aktivními složkami*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2019. 63 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studentky

PODĚKOVÁNÍ

V této části bych ráda poděkovala vedoucí své práce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za cenné rady, odborné vedení a ochotu při tvorbě bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Renatě Pavelkové a Ing. Natálii Burešové za trpělivost, ochotu a pomoc při zpracování experimentální části. Velké díky patří také rodině a přátelům, kteří mne po celou dobu studia podporovali.

OBSAH

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | Úvod | 8 |
| 2 | Teoretická část..... | 9 |
| 2.1 | Charakteristika energetických nápojů..... | 9 |
| 2.2 | Složení energetických nápojů | 9 |
| 2.2.1 | Kofein | 9 |
| 2.2.1.1 | Metabolismus kofeinu | 10 |
| 2.2.1.2 | Účinky kofeinu na lidský organismus | 11 |
| 2.2.2 | Taurin..... | 12 |
| 2.2.3 | Sladidla v energetických nápojích | 13 |
| 2.2.3.1 | Sacharidická sladidla | 13 |
| 2.2.3.2 | Umělá sladidla..... | 13 |
| 2.2.4 | Glukuronolakton | 13 |
| 2.2.5 | L-karnitin | 14 |
| 2.2.6 | Inozitol | 14 |
| 2.2.7 | Vitaminy | 14 |
| 2.2.8 | Barviva..... | 14 |
| 2.2.9 | Konzervanty..... | 15 |
| 2.3 | Rostlinné materiály s obsahem povzbuzujících látek | 15 |
| 2.3.1 | Káva | 15 |
| 2.3.1.1 | Bezkofeinová káva | 16 |
| 2.3.1.2 | Instantní káva | 16 |
| 2.3.1.3 | Zelená káva..... | 17 |
| 2.3.2 | Guarana..... | 17 |
| 2.3.3 | Kustovnice čínská | 18 |
| 2.3.4 | Matcha | 19 |
| 2.3.5 | Kakao | 19 |
| 2.4 | Přírodní aktivní složky..... | 20 |
| 2.4.1 | Antioxidační aktivita..... | 20 |
| 2.4.2 | Polyfenoly..... | 21 |
| 2.4.3 | Flavonoidy | 21 |
| 2.5 | Enkapsulace aktivních látek | 21 |
| 2.5.1 | Materiály pro enkapsulaci..... | 22 |
| 2.5.2 | Liposomy | 22 |

| | | |
|---------|--|----|
| 2.5.2.1 | Lecithin..... | 22 |
| 2.5.2.2 | Cholesterol..... | 22 |
| 2.5.3 | Příprava liposomů pomocí ultrazvuku..... | 23 |
| 2.6 | Metody charakterizace liposomových částic..... | 23 |
| 2.6.1 | Absorpční spektrometrie..... | 23 |
| 2.6.2 | Stanovení stability částic..... | 23 |
| 2.6.3 | Dynamický rozptyl světla..... | 24 |
| 2.7 | Metody charakterizace aktivních látek..... | 25 |
| 2.7.1 | Vysokoúčinná kapalinová chromatografie..... | 25 |
| 2.7.2 | Hodnota pH..... | 25 |
| 3 | Cíl práce..... | 26 |
| 4 | Experimentální část..... | 27 |
| 4.1 | Použité chemikálie..... | 27 |
| 4.2 | Použité přístroje a pomůcky..... | 27 |
| 4.3 | Vzorky..... | 28 |
| 4.3.1 | Kávové základy..... | 28 |
| 4.3.2 | Rostlinné materiály..... | 28 |
| 4.4 | Příprava vzorků..... | 28 |
| 4.4.1 | Kávové základy..... | 28 |
| 4.4.2 | Rostlinné materiály..... | 28 |
| 4.5 | Spektrofotometrické metody..... | 29 |
| 4.5.1 | Stanovení celkových polyfenolů..... | 29 |
| 4.5.2 | Stanovení celkových flavonoidů..... | 30 |
| 4.5.3 | Stanovení antioxidační aktivity..... | 30 |
| 4.6 | Příprava liposomových částic..... | 30 |
| 4.7 | Charakterizace liposomů..... | 31 |
| 4.7.1 | Stanovení enkapsulační účinnosti..... | 31 |
| 4.7.2 | Stanovení velikosti částic pomocí DLS..... | 31 |
| 4.7.3 | Stanovení stability částic pomocí zeta potenciálu..... | 32 |
| 4.8 | Příprava modelových energetických nápojů..... | 32 |
| 4.9 | Charakterizace energetických nápojů..... | 32 |
| 4.9.1 | Stanovení sacharidů pomocí HPLC..... | 32 |
| 4.9.2 | Stanovení kofeinu pomocí HPLC..... | 33 |
| 4.9.3 | Stanovení pH..... | 33 |
| 4.9.4 | Stanovení dlouhodobé stability..... | 33 |
| 5 | Výsledky a diskuze..... | 34 |

| | | |
|-------|---|----|
| 5.1 | Charakterizace kávových základů | 34 |
| 5.1.1 | Stanovení celkových polyfenolů..... | 34 |
| 5.1.2 | Stanovení celkových flavonoidů..... | 34 |
| 5.1.3 | Stanovení antioxidační aktivity | 35 |
| 5.1.4 | Stanovení pH..... | 35 |
| 5.2 | Charakterizace rostlinných extraktů | 36 |
| 5.2.1 | Stanovení celkových polyfenolů..... | 36 |
| 5.2.2 | Stanovení celkových flavonoidů..... | 36 |
| 5.2.3 | Stanovení antioxidační aktivity | 37 |
| 5.2.4 | Stanovení pH..... | 37 |
| 5.3 | Charakterizace liposomových částic..... | 37 |
| 5.3.1 | Stanovení enkapsulační účinnosti | 38 |
| 5.3.2 | Stanovení velikosti a stability připravených liposomových částic | 38 |
| 5.3.3 | Stanovení dlouhodobé stability..... | 39 |
| 5.4 | Charakterizace energetického nápoje | 39 |
| 5.4.1 | Stanovení sacharidů pomocí HPLC | 39 |
| 5.4.2 | Stanovení kofeinu pomocí HPLC | 41 |
| 5.4.3 | Stanovení pH..... | 42 |
| 5.4.4 | Stanovení polyfenolů a antioxidační aktivity | 43 |
| 5.4.5 | Změny složení energetických nápojů v průběhu uchovávání..... | 43 |
| 5.5 | Senzorická analýza | 48 |
| 5.5.1 | Senzorické hodnocení vzhledu a vůně nápoje | 51 |
| 5.5.2 | Senzorické hodnocení chuti nápoje | 52 |
| 5.5.3 | Pořadový test energetických nápojů | 53 |
| 6 | Závěr..... | 54 |
| 7 | Seznam použitých zdrojů | 55 |
| 8 | Seznam použitých zkratk a symbolů | 60 |
| 9 | Přílohy | 61 |
| 9.1 | Příloha 1: Kalibrační křivka..... | 61 |
| 9.2 | Příloha 2: Dotazník senzorického hodnocení nových typů energetických nápojů | 62 |

1 ÚVOD

V poslední době roste obliba konzumace energetických nápojů hlavně u dětí a mladých lidí. Energetické nápoje spotřebitelům slibují, že dodají energii, zaženou únavu a povzbudí organismus k lepším výkonům. Konzumenty láká převážně jejich barevný obal a sladká chuť. Mnoho z nich si však neuvědomuje, že tyto nealkoholické nápoje v sobě skrývají velké množství kofeinu, taurinu, cukru nebo umělých sladidel, které na prospěšnosti nápoje rozhodně nepřidávají. Naopak jejich nadměrná konzumace může mít negativní vliv na fungování lidského organismu. Je proto nutné dodržovat doporučené dávkování uváděné na obalech výrobku. Energetické nápoje obsahují velké množství cukru, které představuje preferovaný zdroj energie pro lidský organismus. Příjem velkého množství cukru je však spojován s diabetem, obezitou a s poškozením zubní skloviny. Hlavní složkou v energetických nápojích je kofein, který stimuluje CNS a dodává tělu pocit čilosti. To může zvýšit krevní tlak a současně způsobit dehydrataci organismu.

V podstatě lze říci, že všechny energetické nápoje jsou složením téměř stejné a liší se pouze příchutí či přidavkem speciální složky. Rozdíl může být v jejich ceně, kdy si spotřebitel často připlácí za značku, která evokuje vyšší kvalitu produktu. Energetické nápoje by neměly být kombinovány s alkoholem. Látky přítomné v energetických nápojích maskují projevy opilosti, především únavu. To může vést ke konzumaci většího množství alkoholu a výsledkem může být až otrava alkoholem.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Charakteristika energetických nápojů

V dnešní době není uvedena jednotná a přesná definice energetického nápoje, a to jak v České republice, tak i v celé Evropě. Energetické nápoje jsou legislativou řazeny mezi nealkoholické nápoje, které jsou obohaceny například vitaminy, rostlinnými extrakty, taurinem a dalšími složkami. Existuje velké množství neoficiálních definic. Jedna z nich popisuje energetické nápoje jako nápoje, které obsahují kofein, taurin, vitaminy, bylinné doplňky a cukr nebo sladidla. Tyto nápoje jsou uváděny na trh, aby zlepšily vytrvalost, sportovní výkony, soustředění a příznivě ovlivňovaly energii a úbytek váhy [1].

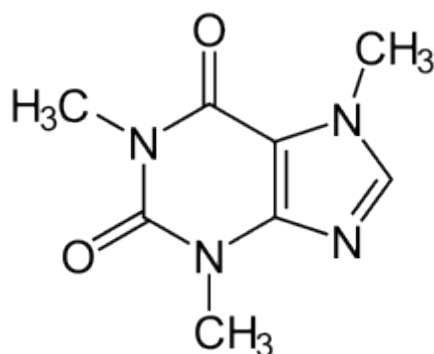
Poprvé byl termín energetický nápoj legislativně definován v Německu pomocí legislativy o ovocných šťávách jako nápoj obsahující kofein a minimálně jednu z dalších složek jako je taurin, inozitol, glukuronolakton. Německo a Španělsko navrhly předpisy stanovující horní limity pro kofein na 320 mg/l. Kromě limitu pro kofein byl stanoven limit pro taurin (4 000 mg/l), pro glukuronolakton (2 400 mg/l) a pro inozitol (200 mg/l). Další požadavek uvádí, že energetický nápoj nesmí obsahovat alkohol a výrobek musí být opatřen nápisem, že energetický nápoj nemá být kombinován s alkoholem ani s fyzickým cvičením [2]. Povzbuzující účinky kofeinu urychlují vstřebávání alkoholu a současně potlačují schopnost vnímat intenzitu opilosti, což vede ke konzumaci mnohem většího množství alkoholu. Uvádět varování před kombinací s alkoholem na etiketě výrobku je doposud nepovinné [1; 2].

2.2 Složení energetických nápojů

Hlavním důvodem růstu konzumace energetických nápojů mezi dospělými je schopnost dodávat energii a zlepšit fyzickou výkonnost [3]. Vzájemně se energetické nápoje liší především množstvím a poměrným zastoupením obsažených složek. Energetické nápoje obsahují složky, jejichž nadměrné dávky mohou mít negativní vliv na fungování lidského organismu [4].

2.2.1 Kofein

Nejdůležitější účinnou látkou energetického nápoje, která zajišťuje hlavní povzbudivý efekt je kofein [5]. Kofein se nachází ve formě bílé krystalické látky hořké chuti. Z chemického hlediska se jedná o purinový derivát 1,3,7-trimethylxantin (Obrázek 1) [6].



Obrázek 1: Strukturální vzorec kofeinu [5]

Skupina alkaloidů, do níž je zařazen kofein, je odvozena od xanthinu, který vzniká při oxidaci purinu [7]. Do významné skupiny methylxanthinů řadíme také theobromin i theofylin. Kofein je obsažen v plodech, semenech a listech rostlin. Tento alkaloid slouží jako přirozená ochrana rostlin před hmyzem, který se jednotlivými částmi dané rostliny živí. Kofein zde tedy hraje roli přírodního pesticidu [6]. Nalezneme ho ve více než 60 druhů rostlin. Mezi hlavní zdroje kofeinu patří kávovník (kávová zrna), čajovník (listy čajovníku), kakaovník (kakaové boby), maté, kolové semeno, guarana a mnoho dalších. Z těchto rostlin se nápoj připravuje přímo, nebo jsou jejich extrakty přidávány do nealkoholických nápojů [8]. Toto navýšení obsahu kofeinu způsobené přidávkou rostlinných extraktů, například guarany, nebývá zahrnuto do výpočtu celkového obsahu kofeinu uvedeného na etiketě nápoje. Často se proto stává, že nápoj obsahuje i několikanásobně vyšší množství kofeinu, než je uváděno výrobcem [9].

Tabulka 1: Průměrný obsah kofeinu ve vybraných nápojích [9; 20]

| Nápoj | Průměrný obsah kofeinu (mg) |
|--------------------------------|-----------------------------|
| Káva z mletých zrn (150 ml) | 85 |
| Káva bez kofeinu (150 ml) | 3 |
| Instantní káva (150 ml) | 60 |
| Čaj (150 ml) | 30 |
| Horká čokoláda, kakao (150 ml) | 4 |
| Coca-Cola (250 ml) | 34 |
| Red Bull (250 ml) | 80 |
| Monster, Rockstar (500 ml) | 160 |

2.2.1.1 Metabolismus kofeinu

Do lidského těla se kofein dostává orálně požitím kávy, energetického nápoje nebo čaje a je vstřebáván v gastrointestinálním traktu [6]. Pomocí tělních tekutin je distribuován do všech tkání včetně mozku a následně je metabolizován a vyloučen močí [10]. Při metabolickém odbourávání kofeinu, které probíhá v játrech, dochází k jeho oxidaci za vzniku theofylinu,

theobrominu a paraxanthinu [6]. Vytvořené metabolity kofeinu jsou z těla vyloučeny ve formě moči během 5–8 hodin [5]. Hlavním biochemickým účinkem kofeinu je antagonismus adenosinu A1 a A2 receptoru [8]. Výsledkem antagonismu je aktivace β -adrenoreceptorů a zvýšené uvolňování katecholaminů v mozku, což je doprovázeno stimulací CNS. Příkladem katecholaminů je serotonin, noradrenalin a dopamin. Kofein může působit jako inhibitor adenosinového receptoru, kdy se váže na tentýž receptor. Tak se zamezí vazbě adenosinu na receptory, je snížen pocit únavy v mozku a lidský organismus je nabuzen k delšímu výkonu [9]. Kofein je také schopen inhibovat enzym fosfodiesterázu, který je odpovědný za hydrolýzu cyklického AMP. V těle dojde k navýšení koncentrace cyklického AMP a zvýšené lipolýze, která se projeví nárůstem uvolňovaných katecholaminů a zvýšením plazmatických hladin glycerolů a volných mastných kyselin [11].

2.2.1.2 Účinky kofeinu na lidský organismus

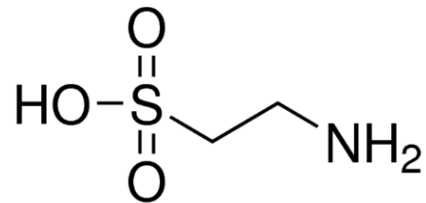
Jedná se o biologicky aktivní látku, která má na lidský organismus mnoho fyziologických účinků [12]. Účinek kofeinu na lidský organismus je zcela individuální. Je založen na denním rytmu konzumace, přijatém množství, biologickém poločasu u daného jedince, zdravotním stavu a věku jedince a interakci s dalšími látkami. Kofein může působit pozitivně i negativně v závislosti na množství (Tabulka 2) [13]. Při nižších koncentracích má kofein povzbudivé účinky na CNS, zlepšuje náladu, soustředěnost i celkovou tělesnou a duševní výkonnost [12]. Naopak po požití nadměrného množství dochází k intoxikaci, která se projeví nesoustředěností, nervozitou, nespavostí, bolestmi hlavy a ztrátou jemné motorické regulace [14].

Tabulka 2: Souhrn účinků různých množství kofeinu na lidský organismus

| Množství kofeinu (mg) | Vliv na lidský organismus |
|-----------------------|---|
| 20 – 400 | Zvýšení energie, soustředěnosti, výkonnosti, snížení pocitu únavy a ospalosti – pozitivní efekt. Mírné zvýšení krevního tlaku a zlepšení peristaltiky střev [11; 12]. |
| 400 – 800 | Podrážděnost, nervozita, hyperaktivita, třas rukou a poruchy spánku. Ke zvýšení rizika močové inkontinence dochází u žen, které konzumují denně více než 400 mg kofeinu [2; 15]. |
| 1 000 a více | Neklid, nespavost, bušení srdce, zvýšení krevního tlaku a srdečních potíží. Může vést k dehydrataci organismu, nedostatku vitaminů B a C i ke zvýšení hladiny cholesterolu. Dále může způsobovat fibrocystické změny v prsní žláze u žen, problémy s prostatou u mužů, interference při replikaci DNA a také bránit správnému vstřebávání železa [2; 15]. |

2.2.2 Taurin

Taurin se často řadí mezi aminokyseliny, ačkoliv ve své struktuře neobsahuje karboxylovou skupinu. Tato skupina byla nahrazena zbytkem kyseliny sulfonové. Chemicky se tedy jedná o 1-aminoethan-2-sulfonovou kyselinu (Obrázek 2) [4].



Obrázek 2: Strukturální vzorec taurinu [4]

Taurin je důležitý při regulaci buněčného objemu, agregaci trombocytů, jako antioxidant a dále hraje roli neurotransmiteru a stabilizátoru buněčných membrán. Je součástí několika důležitých fyziologických funkcí včetně syntézy ATP, osmoregulace, protizánětlivé a antioxidační aktivity. Taurin je považován za jednu z hlavních volných aminokyselin v centrálním nervovém systému [3]. Vyskytuje se přirozeně v lidském těle, převážně ve svalech a plicích, kde působí jako antioxidant. Detoxikaci podporuje tím, že se váže na škodlivé látky, a tak umožňuje jejich vyloučení z těla [3; 20]. Taurin je možné přijímat živočišnými potravinami, například v mléce, masě nebo mořských plodech [20]. Může docházet k buněčnému vyčerpání taurinu, které je spojováno s vývojovými vadami, oslabeným buněčným růstem, ztrátou imunity, rozvojem kardiomyopatie a s poškozením sítnice. Tyto poznatky přispěly k využití taurinu v kojeneckých výživách, potravinových doplňcích, energetických nápojích a nápojích určených pro vrcholové sportovce [3]. Taurin je schopen napodobovat funkci inzulinu, snižovat krevní tlak a hladinu LDL cholesterolu [20].

Taurin je pro své energizující účinky využívám sportovci, u kterých zlepšuje koordinaci pohybu, soustředění a slouží k potlačení únavy a zlepšení koncentrace. Taurin je schopen zesilovat pozitivní účinek kofeinu na lidský organismus, což se využívá právě u energetických nápojů a naopak tlumí nežádoucí účinky způsobené jeho nadbytkem [12; 20]. V souvislosti s tímto tvrzením byly prováděny testy nápojů, jejichž cílem bylo sledovat vliv kofeinu a taurinu na kardiovaskulární systém. Bylo zjištěno, že taurin v kombinaci s kofeinem snižuje tepovou frekvenci a sportovci jsou poté schopni podat lepší výkony [12].

2.2.3 Sladidla v energetických nápojích

Sacharidy jsou do energetických nápojů přidávány pro navýšení energetické hodnoty, a především k docílení sladké chuti nápoje. Pro oslazení nápojů se využívají cukry, ale i umělá sladidla [16].

2.2.3.1 Sacharidická sladidla

Jedná se o přírodní cukry získávané z rostlinných materiálů, které poskytují kromě sladké chuti i bohatý zdroj energie. Součástí energetických nápojů jsou nejčastěji jednoduché cukry jako sacharosa, fruktosa, sorbitol, xylitol, fruktosové sirupy a další. Jejich vysoký obsah v energetických nápojích slouží k získání tzv. rychlé energie [17; 18].

2.2.3.2 Umělá sladidla

Umělými sladidly se rozumí synteticky připravené látky sladké chuti. Hlavním úkolem těchto látek je vylepšit chuť potravin, neboť neobsahují téměř žádnou využitelnou energii. Tato nekalorická sladidla mají zpravidla mnohem vyšší sladivost než sacharosa, a jelikož nezvyšují hladinu krevního cukru, jsou vhodná pro diabetiky a lidi trpící obezitou [19].

Objevily se však pochybnosti o jejich zdravotní nezávadnosti pramenící z podezření, že mohou způsobovat rakovinu. Několikaleté studie však jednoznačně nepotvrzují ani nezpochybňují zdravotní nezávadnost umělých sladidel. Bezpečností se proto rozumí, že látka není za zamýšlených podmínek použití škodlivá. Je však důležité řídit se pokyny výrobce a nepřekračovat doporučené denní dávky (DDD) [18; 19]. Součástí energetických nápojů nejčastěji bývá aspartam, sacharin nebo acesulfam K [17].

2.2.4 Glukuronolakton

D-glukuronolakton neboli lakton kyseliny glukuronové je látka patřící do skupiny sacharidů. Jelikož se v malém množství nachází v organismu všech savců, je přirozeným metabolitem. Hlavním důvodem výskytu glukuronolaktonu v energetických nápojích je podle výrobců fakt, že zlepšují koncentraci a potlačují únavu. Vznikly pochybnosti o tom, zda má obsah glukuronolaktonu v energetickém nápoji nějaký prospěch, jelikož novější studie prokázaly, že většina pozitivních účinků nápoje je způsobena přítomností kofeinu. Případné negativní účinky způsobené vysokými koncentracemi zjišťovala EFSA a současně stanovila bezpečnou mez glukuronolaktonu na 1 g za den na 1 kg tělesné hmotnosti, při které nedochází k projevu nežádoucích účinků [20].

2.2.5 L-karnitin

Z chemického hlediska se jedná o kyselinu 3-hydroxy-4-N-trimethylaminomáselnou, která se svou strukturou podobá aminokyselinám [21]. Karnitin je syntetizován v játrech z lysinu a methioninu [20]. Význam karnitinu spočívá v produkci energie ve tkáních, které jsou závislé na β -oxidaci mastných kyselin. Za bohatý zdroj karnitinu je považováno hovězí, jehněčí a skopové maso. Naopak v rostlinné stravě zcela chybí [21]. V přírodě je přítomna pouze L-forma karnitinu. D-forma ve velkých dávkách inhibuje účinek L-karnitinu, neboť v lidském těle nemá žádnou fyziologickou funkci, a proto působí toxicky [20]. Závažné zdravotní komplikace může způsobovat nedostatek karnitinu, který se vyskytuje například u pacientů se selháním ledvin nebo těžkým jaterním onemocněním a může se podílet na rozvoji anémie, arytmie nebo aterosklerózy. V současné době je karnitin hojně využíván jako součást dietních doplňků pro sportovce z důvodu zvýšení výkonnosti, utilizace tuků jako zdroje energie a zlepšení regenerace [21].

2.2.6 Inozitol

Inozitol je látka, kterou si naše tělo nedokáže v dostatečném množství vytvořit samo, a proto ji musíme přijímat v potravě. Velké množství inositolu je obsaženo převážně v rostlinných potravinách jako je ovoce, zelenina, celozrnné potraviny, ale také v mléce a mase. Inozitol působí pozitivně na svaly, činnost mozku a podílí se na snižování hladiny nežádoucího LDL cholesterolu. Na druhou stranu zvyšuje hladinu potřebného HDL cholesterolu, což působí jako prevence obezity a ochrana jater před tukovou degradací. Odstraňuje únavu, zlepšuje paměť i fyzickou kondici. Z těchto důvodů je inozitol přidáván do energetických nápojů, obvykle v množství 50 mg inositolu na 250 ml nápoje [20].

2.2.7 Vitaminy

Vitaminy jsou esenciální látky, které si naše tělo nedokáže samo syntetizovat. Jejich nedostatek má negativní vliv na lidský organismus, proto je musíme přijímat v potravě. Energetické nápoje jsou obohacovány především vitaminy ze skupiny B a vitamínem C [20].

2.2.8 Barviva

Potravinářská barviva se dělí na barviva přírodní a barviva syntetická. Přírodní barviva se získávají z přírodních rostlinných, živočišných nebo nerostných zdrojů [20]. Barviva mají za úkol estetickou úpravu nápoje. Dodávají nápoji novou barvu nebo zesilují intenzitu zbarvení, která byla při výrobním procesu zeslabena. Definice potravinářských barviv je dána zákonem č. 110/1997 Sb. [22]. Do energetických nápojů se nejčastěji přidávají barviva jako

riboflavin (žlutá), karamel (hnědá), azorubin (červená), karoteny (oranžová), tartrazin (žlutá), chinolinová žlut' (žlutá) [20].

2.2.9 Konzervanty

Konzervanty jsou přídavné látky, které se společně s barvivy souhrnně označují jako aditiva. Definice konzervantů jako látek, které prodlužují údržnost a které chrání proti zkáze způsobené činností mikroorganismů, je dána zákonem č. 110/1997 Sb. Jejich využití v potravinářském průmyslu je velmi rozšířené. Nejvíce se využívá kyselina sorbová a benzoová [20; 22].

2.3 Rostlinné materiály s obsahem povzbuzujících látek

2.3.1 Káva

Káva vzniká z upravených semen plodů tropických a subtropických keřů kávovníku z rodu *Coffea*. Tento rod zahrnuje mnoho druhů, jejichž semena se liší chemickými, technologickými a senzorickými vlastnostmi. Mezi nejvýznamnější druhy patří zejména *Coffea arabica* tzv. arabika a *Coffea canephora* též nazývána jako robusta. Kávovník arabský představuje téměř 70 % světové produkce kávy, kdežto robusta se na světové produkci kávy podílí necelými 30 % [23].

Plody kávovníku se mechanicky zbavují dužiny a zbytky jsou odstraněny fermentací. Kávová semena se oloupou a poté se praží, čímž získávají charakteristickou vůni, chuť a barvu. Během pražení dochází ke vzniku pigmentu melanoidinu, těkavých látek a k uvolnění oxidu uhličitého odstraněním organických látek [24]. V čerstvých kávových zrnech je kofein zastoupen přibližně 2,5 % a váže se na různé druhy kyselin, jež jsou v nich obsaženy. Příkladem jsou chlorogenové kyseliny. Pražením obsah kofeinu klesá na 0,8–2,5 % původního obsahu. Dochází ke vzniku kafeotoxinů, aromatického kofeinu a část kofeinu se přeměňuje na nikotinamid [23]. Semena obsahují minerální látky zejména draslík, vápník, hořčík, železo a fosfor a nepatrné množství sacharidů (glukosu, fruktosu a sacharosu) [24]. Rozkladem glykosidů, tříslovin a dalších látek během procesu pražení vzniká z kávy pochutina s nejvyšším obsahem aromatických látek. V kávě bylo identifikováno více než 700 těkavých příměsí, jako jsou karbonylové sloučeniny, kyseliny, alkoholy, uhlovodíky, dusíkaté a sirné sloučeniny a další. Z kávy se do nápoje může vyloučit 40–100 % těchto příměsí [23].

Jednotlivé druhy kávovníku se liší obsahem tuků, kofeinu a jiných látek. V kávě arabika je vysoký obsah tuků - asi kolem 20 % a kofeinu pouze 1,3 %, v robustě je skoro dvojnásobné množství, tedy 2,4 % kofeinu a obsah tuků je nad 10 % [24].

2.3.1.1 Bezkofeinová káva

Bezkofeinová káva je nápoj připravený ze zelených zrn, z nichž byl kofein vyextrahován. Tato káva však není zcela bez kofeinu a stále jej určité množství obsahuje. Zpravidla se jeho zastoupení pohybuje v rozmezí mezi 0,02 a 0,03 mg/ml. Pro představu běžný šálek kávy arabika obsahuje asi 0,4–0,7 mg/ml a zelený čaj 0,07–0,2 mg/ml. Existuje několik metod dekofeinizace [25]. Jednou z nich je metoda, která využívá extrakci. Nejprve je zvýšen obsah vody o 10 až 30 % pod tlakem v autoklávu a poté je kofein vyextrahován organickými rozpouštědly jako například petroletherem, ethylacetátem nebo metylenchloridem [26]. Kofein lze dále odstranit superkritickou extrakcí CO₂ nebo extrakcí vodou, kdy nejsou použity chemikálie ani oxid uhličitý a tím si káva ponechá většinu chuti. Tento způsob, tzv. švýcarský vodní proces je založený na rozpustnosti chuťových částic i kofeinu a na jeho uvolnění do vody na principu osmózy [25; 26]. Tyto metody odstraňování kofeinu ovlivňují chuť výsledné kávy, která závisí na obsahu zbytků chemických látek používaných při dekofeinizaci. Spolu s kofeinem dochází také k odstranění žádoucích těkavých aromatických látek a olejů [27].

2.3.1.2 Instantní káva

Jedná se o kávu vyrobenou sušením mleté pražené kávy a následnou úpravou granulováním. Sušina na bázi kávy zaujímá nejméně 95 % z celkové hmotnosti sušiny [26]. Na výrobu této kávy se většinou používá robusta nižší kvality. Využívají se dvě základní metody výroby. Při prvním způsobu se připraví silný kávový extrakt, který musí být co nejdříve ochlazen na teplotu 4 °C, aby se zamezilo úniku aromatických látek. Ochlazený extrakt se poté pod tlakem stříká na stěny vyhřívaných bubnů a padá dolů v podobě usušených zrnků (sprejové sušení). Pomocí dalších technologií je možné vyrábět granule. Druhý způsob je dražší, a protože nedochází k opětovnému zahřívání, získaný produkt se více podobá kávě připravované klasickým způsobem. Tato metoda je také založena na přípravě silného kávového extraktu a následném zchlazení. Rozdíl nastává ve způsobu sušení, kdy je kávový extrakt ve vakuu šokově zmrazen (sprejová sublimace). Tekutina se za nízkých teplot odpaří a zmražená sedlina se rozbije na malé granulky [27]. Instantní káva je navíc obohacena o karamelovou vůni a chuť a na sensorické vlastnosti jejího nálevu jsou kladeny stejné požadavky jako na nálev z mleté nebo zrnkové pražené kávy [26].

2.3.1.3 Zelená káva

Zelená káva je surovinou pro výrobu pražené kávy. Pražením káva získává své typické sensorické vlastnosti. Tímto procesem však dochází k poklesu obsahu kofeinu v pražených zrnech a také k rozkladu některých aromatických látek [23; 26].

2.3.2 Guarana

Guarana neboli *Paullinia cupana* je rostlina pocházející z Jižní Ameriky, přesněji z Amazonské oblasti. Rostlina produkuje žluto-oranžové plody, které v sobě skrývají 1–3 hnědá semena (Obrázek 3). Semena svým vzhledem připomínají lidské oko a obsahují velké množství kofeinu, 4–8 % [28]. 1 g guarany obsahuje asi 40 mg kofeinu [29]. Semena jsou dále bohatá na alkaloidy jako je theofylin a theobromin, třísloviny, saponiny a flavonoidy. Účinky způsobené přítomností guarany a účinky kofeinu jsou v energetických nápojích totožné. Avšak díky obsahu tříslovin v semenech guarany je doba působení mnohem delší. Guarana působí jako stimulant, napomáhá při bolestech hlavy a horečce, proto byla díky svým účinkům zařazena mezi léčivé rostliny [28]. Guarana je stále častěji přidávána do energetických nápojů především z důvodu navýšení množství obsaženého kofeinu. Jak již zde bylo zmíněno, zvýšení obsahu kofeinu rostlinnými složkami není uváděno na etiketě nápoje [9].



Obrázek 3: Guarana [28]

2.3.3 Kustovnice čínská

Jedná se o keřovitou rostlinu patřící do čeledi lilkovité. Kustovnice se pěstuje kvůli svým plodům. Plodem jsou jasně červené bobule, které v sobě skrývají až 3 cm dlouhá semena (Obrázek 4). Plody jsou konzumovány jako ovoce, jako zelenina se používají mladé zelené výhony a ze semen je lisován olej. Je využívána zejména jako doplněk stravy nebo se připravuje v podobě výluhu. Kromě plodů se využívají i listy, kůra a kořeny. Komerčně je pěstována především v Číně. Dále se rozšířila do Japonska, Nepálu, Vietnamu a na Havajské ostrovy. Plod obsahuje 18 druhů aminokyselin včetně osmi esenciálních aminokyselin, 21 stopových prvků jako například zinek, železo, vápník a selen. Kustovnice obsahuje velké množství karotenoidů, díky nimž získala své typické červené zbarvení. Dále je bohatým zdrojem na vitaminy B1, B2, B6 a E [30].



Obrázek 4: Kustovnice čínská [31]

Již od starověku byl plod kustovnice využíván jako lék pro jeho protihnisavé, diuretické, hypnotické a afrodiziakální účinky [31]. Více než 2000 let je využíván jako čaj díky svým uklidňujícím a obranyschopnost zvyšujícím účinkům [32]. Dnes je kustovnice konzumována pro své protinádorové, protirakovinné, antioxidační a imunologické účinky, dále jako lék proti stárnutí a jako prostředek pro zlepšení imunologické schopnosti lidského těla [33]. Součástí plodů jsou také antioxidanty, které podporují imunitní systém, snižují krevní tlak, zlepšují tvorbu krve a redukuje množství antigenů, které souvisejí s alergickými onemocněními [30].

2.3.4 Matcha

Matcha se jako každý čaj vyrábí ze zelených lístků keře čajovníku čínského (*Camellia sinensis*). Na světě existuje mnoho různých druhů matchy. Některý druh matchy je vhodnější na přípravu nápoje a jiný naopak na vaření. Druhy se rozdělují podle oblastí jejich výskytu. Chuť matchy je jedinečná a nelze ji přirovnat k žádnému jinému čaji na světě. Velmi se liší také vzhledem, a přestože je často zaměňována s instantním práškem, matcha jsou celé lístky čajovníku umleté na jemný prášek. Oproti zelenému práškovému čaji se v tomto případě jedná o rostlinu s jasně zelenými lístky pěstovanou ve stínu. Zelené lístky se napařují, tím čaj získá jasně zelenou barvu a nasládlou chuť. Zelený práškový čaj je naopak pěstován na slunci, jeho žlutohnědé lístky se praží na pánvi a výsledný nahnědlý čaj má hořkou chuť [34]. Matcha obsahuje vyšší množství kofeinu i zdravích prospěšných látek než v běžných zelených čajích, neboť jsou konzumovány celé lístky [35]. Obsahuje vysoký podíl přírodních flavonoidů (katechinů), jejichž hlavním zástupcem je EGCG (epigalokatechin-3-galát), který je znám svými protirakovinnými účinky [36]. Čaj jako jeden z mála rostlinných potravin obsahuje také L-teanin. Matcha je pěstována ve stínu, a to má za následek vyšší tvorbu L-teaninu než v běžném zeleném čaji. L-teanin zklidňuje mysl, snižuje zátěž nervové soustavy, podporuje mentální uvolněnost a pozitivně ovlivňuje paměť a koncentraci [34; 36]. Díky konzumaci celých čajových lístků napomáhá matcha také k detoxikaci organismu a k posílení imunitního systému [36].

2.3.5 Kakao

Kakao je hnědý prášek hořké chuti vyrobený ze semen kakaovníku. Jedná se o stále zelený a kvetoucí strom pocházející z tropické Ameriky z oblasti Orinoka mezi Kolumbií a Venezuelou. Plody kakaovníku o hmotnosti 300–500 g mají tvar ragbyového míče a dorůstají do délky 30 cm. Při dozrávání se jejich barva mění ze zelené na žlutou, a nakonec na hnědou. V dužině plodu je uloženo 20–50 bobů. Plody zrají pět až šest měsíců a poté jsou opatrně odřezány mačetou tak, aby nedošlo k poškození stromu [37; 38]. Kakaovníky jsou hojně pěstovány v Africe, v jihovýchodní Asii, Jižní a Střední Americe a v Karibiku. K hlavním odrůdám kakaovníku patří odrůda Criollo, Forastero a Trinitario [37].

Při průmyslovém zpracování kakaových bobů probíhá mimo jiné proces pražení, kdy dochází k mnoha chemickým a fyzikálním změnám. Ty jsou spojovány se změnou barvy, vůně i chuti. Snížení obsahu vody z 6–8 % na 2–3 % má za následek změnu struktury bobů, která umožňuje snazší rozemílání kakaové drti. Jestliže jsou boby určeny pro výrobu čokolád, praží se méně než boby určené pro výrobu kakaového prášku. Typické kakaové aroma a barva

se získá snížením obsahu těkavých látek, především kyseliny octové, dále se sníží obsah tříslovin a také dochází ke změnám zastoupení polyfenolických látek [39].



Obrázek 5: Kakaovník



Obrázek 6: Kakaové plody

2.4 Přírodní aktivní složky

Mezi přírodní aktivní složky využívané v potravinářství patří zejména polyfenolické látky, které jsou přirozenou součástí ovoce a zeleniny. Tyto látky představují velmi rozsáhlou skupinu sloučenin, kam se řadí například flavonoidy. Polyfenoly jsou obecně silnými antioxidanty a hlavními důvody jejich využití jsou pozitivní účinky na lidský organismus a prevence mnoha onemocnění [40; 41].

2.4.1 Antioxidační aktivita

Antioxidační látky jsou schopny zachycovat volné radikály a tím jsou spojovány s pozitivními vlivy na lidský organismus [41]. Chemická struktura antioxidantu určuje jeho reaktivitu vůči volným radikálům a tím i antioxidační aktivitu. Přírodním zdrojem antioxidantů jsou například fenolické látky přítomné v rostlinách [40].

Antioxidanty jsou klasifikovány na základě jejich mechanismu účinku proti reaktivním formám kyslíku na primární a sekundární antioxidanty. Antioxidanty chrání před oxidací pomocí kombinace různých mechanismů. Účinnost antioxidantu při inhibici oxidace je dána převažujícím mechanismem. Primární antioxidanty jsou ty, které porušují řetězovou reakci oxidace vodíkem a generací stabilnějších radikálů. Sekundární antioxidanty zpomalují rychlost oxidace několika mechanismy, včetně chelatace kovů, regenerace primárních antioxidantů, rozkladu hydroperoxidů a mimo jiné vychytáváním kyslíku. Účinnost je

ovlivněna několika faktory včetně jejich strukturních charakteristik, koncentrace v místě reakce a povahy oxidovatelného substrátu [40].

2.4.2 Polyfenoly

Polyfenoly představují jednu z nejdůležitějších skupin sekundárních metabolitů rostlin [40]. Jejich chemická struktura se skládá z aromatického kruhu substituovaného alespoň jednou hydroxylovou skupinou [40; 41]. Zahrnují látky jako katechol, různé taniny, flavonoidní pigmenty a kyselinu skořicovou [41]. Jsou široce distribuovány v rostlinách a získány mohou být přímo z rostlin, potravin bohatých na jiné antioxidanty nebo z potravinových doplňků. Pravidelná konzumace potravin s vysokým obsahem polyfenolů je zdraví přínosná. Polyfenoly fungují jako antioxidanty. Byly prokázány jejich stimulační, protinádorové a ochranné účinky. Napomáhají minimalizovat oxidační stres v těle, snižují rizika vzniku rakoviny a kardiovaskulárních onemocnění [40]. Hlavním zdrojem přírodních polyfenolů jsou různé druhy zeleniny a ovoce, obilniny, kakao, zelený čaj, káva, ořechy, sója, olivový olej, červené víno a pivo. Polyfenoly představují více než 8 tisíc fenolických struktur. Z toho se asi 4 tisíce druhů řadí do skupiny flavonoidů [41].

2.4.3 Flavonoidy

Flavonoidy patří mezi nejsledovanější složky polyfenolyckých látek. Jedná se o hydroxylované fenolické aromatické sloučeniny odvozené od heterocyklické sloučeniny flavanu. Společně sdílejí flavanové jádro tvořené 15 atomy uhlíku, které jsou uspořádány do dvou benzenových jader propojených heterocyklickým pyranem. Flavonoidy se dělí na flavanoly (katechin, epikatechin), flavonoly, anthokyanidiny, flavony, flavanony a chalkony [41].

2.5 Enkapsulace aktivních látek

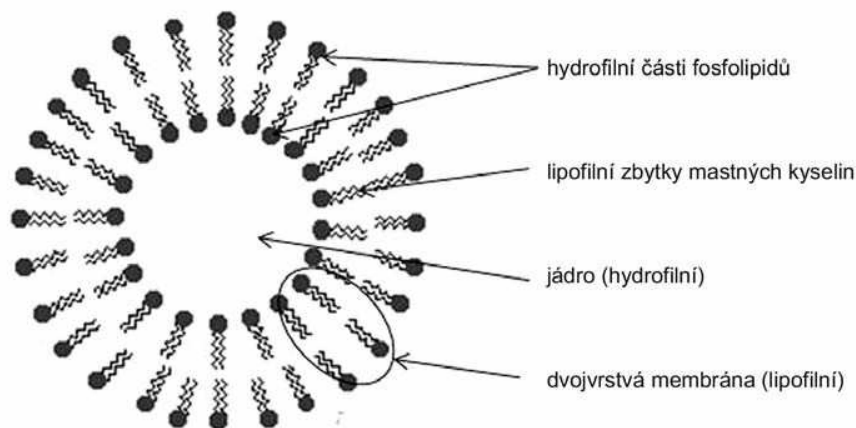
Enkapsulace neboli zapouzdření je proces, kdy jsou biologicky aktivní látky obaleny a chráněny membránou. Proces zapouzdření je hojně využíván v potravinářském průmyslu pro zlepšení dodávání bioaktivních molekul (například antioxidantů, minerálů, vitamínů, ale i probiotik) do potravin. Vyrobené částice mají většinou průměr od několika nm až do několika mm. Cílem zapouzdření je zachovat stabilitu bioaktivních sloučenin během zpracování nebo skladování. Bioaktivní potravinářské sloučeniny jsou většinou charakterizovány rychlou inaktivací. Zapouzdření těchto sloučenin je prospěšné z důvodu zpomalení degradačních procesů (například oxidace nebo hydrolýzy) a zabránění degradace do doby doručení produktu na požadovaná místa [42].

2.5.1 Materiály pro enkapsulaci

Materiály využívané k zapouzdřování musí být biologicky rozložitelné a schopny vytvořit bariéru mezi vnitřní fází a okolním prostředím. K enkapsulaci se využívají například polysacharidové (alginát), bílkovinné (želatina, lepek, kasein) a lipidové materiály. Mezi lipidové materiály pro potravinářské aplikace jsou řazeny mastné kyseliny, vosky, glyceridy a fosfolipidy, z nichž byl v experimentální části využit lecithin [42].

2.5.2 Liposomy

Liposomy jsou částice s velikostí v rozmezí od 30 nm do několika mm. Tvorba liposomů je založena na hydrofilně-hydrofobní interakci mezi molekulami vody a fosfolipidy [42]. Liposomy jsou tvořeny lipidovou dvojvrstvou amfifilních lipidů, které se svou hydrofilní částí orientují na vnější stranu membrány. Lipofilní části lipidových molekul jsou otočeny proti sobě a tvoří tak vnitřní vrstvu membrány, která je hydrofobní [43].



Obrázek 7: Struktura liposomu [44]

2.5.2.1 Lecithin

Pro přípravu liposomů se využívá lecithin, který se řadí mezi fosfolipidy. Z chemického hlediska se jedná o fosfatidylcholin. Bohatým zdrojem lecithinu je vaječný žloutek, sádlo, vnitřnosti, obilí nebo zelenina. Lecithin je také možné získat rafinací rostlinného oleje [45].

2.5.2.2 Cholesterol

Cholesterol je považován za jednu z nejvýznamnějších složek živočišných plazmatických membrán. Je zastoupen převážně ve vaječném žloutku, svalovině, mléce nebo sádle. Při enkapsulaci je využíván zejména díky jeho schopnosti začleňovat se do fosfolipidové dvojvrstvy a tím zvyšuje stabilitu liposomu [45].

2.5.3 Příprava liposomů pomocí ultrazvuku

Liposomy je možné připravit sonikací v ultrazvukové lázni nebo využitím sondového ultrazvuku. Při přípravě liposomů pomocí tyčového ultrazvukového homogenizátoru je lipidové suspenzi dodávána vysoká energie. Výsledná suspenze je typická svým zakalením. Nevýhodou sonikace je možná degradace částic způsobená zvýšením teploty suspenze v důsledku dodání vysoké energie [46]. Tu je možné eliminovat chlazením vzorku.

2.6 Metody charakterizace liposomových částic

Liposomové částice lze charakterizovat pomocí absorpční spektrometrie na základě obsahu polyfenolů, flavonoidů a antioxidační aktivity, stanovením stability částic nebo metodou využívající dynamický rozptyl světla.

2.6.1 Absorpční spektrometrie

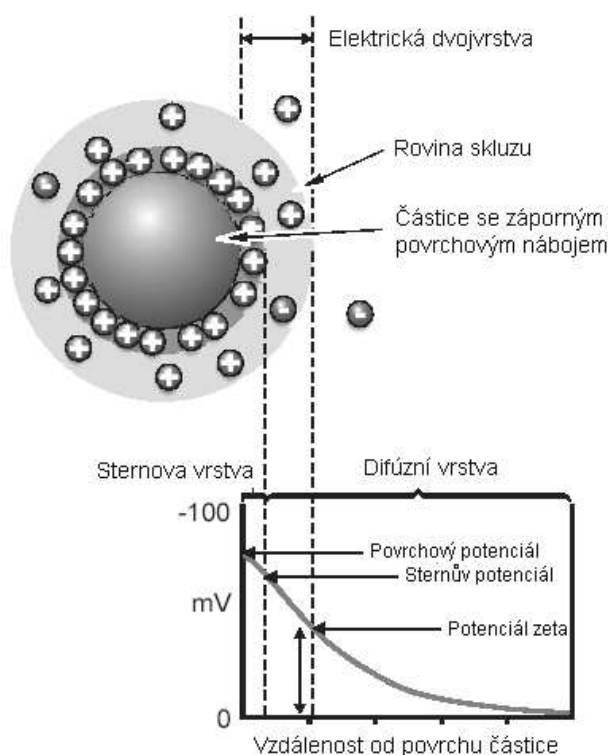
Absorpční spektrofotometrie je optická metoda založena na absorpci viditelného nebo ultrafialového záření látkami v roztoku. Tuto metodu je možné využít v rozmezí vlnových délek 200–400 nm v UV oblasti a 400–800 nm pro viditelné záření. Stanovení se provádí při maximální vlnové délce analyzované látky, která je schopna v této oblasti absorbovat nejvíce dopadajícího záření. Spektrofotometrické stanovení je založeno na Lambert-Beerově zákoně, podle kterého je intenzita zbarvení roztoku při dané vlnové délce a tloušťce vrstvy přímo úměrná molární koncentraci [47].

2.6.2 Stanovení stability částic

Stabilita částic se stanovuje na základě zeta potenciálu, který se měří pomocí kombinace elektroforézy a laserové Dopplerovy velocimetrie. Tato metoda měří rychlost pohybu částice kapalinou v elektrickém poli. Zeta potenciál lze vypočítat pomocí dielektrické konstanty a viskozity po zjištění rychlosti pohybu částic a při známé velikosti aplikovaného elektrického pole [48].

Mezi povrchem částic a disperzní kapalinou existuje potenciál, který se mění v závislosti na vzdálenosti od povrchu částic. K povrchu částice jsou přitahovány ionty z roztoku s opačným nábojem, než jaký má částice. Okolo každé částice se vytvoří elektrická dvojvrstva. Ionty blízko povrchu částice jsou silně vázány a vytváří Sternovu vrstvu. Ionty vzdálenější od částice jsou vázány volně, což vytvoří difúzní vrstvu. Součástí difúzní vrstvy je teoretická hranice. Všechny ionty uvnitř této hranice se pohybují společně s částicí při jejím pohybu kapalinou, avšak ionty mimo tuto hranici se s částicí nepohybují. Tato hranice se označuje za rovinu skluzu a potenciál vytvořený na této hranici se nazývá zeta potenciál [48].

Velikost zeta potenciálu vzorku určuje, zda částice uvnitř kapaliny budou mít tendenci flokulovat, tedy držet se pohromadě, nebo ne. Faktorem, který značně ovlivňuje velikost zeta potenciálu je pH. Za hranici hodnot zeta potenciálu je považováno rozmezí -30 mV a 30 mV. Jestliže mají částice značný negativní nebo pozitivní zeta potenciál, dochází k jejich vzájemnému odpuzování, nedochází ke shlukování částic a tyto částice jsou považovány za stabilní. Částice se zeta potenciálem v rozmezí hraničních hodnot se neodpužují, dochází k jejich shlukování a jsou tedy považovány za částice nestabilní [48].



Obrázek 8: Schéma elektrické dvojvrstvy [48]

2.6.3 Dynamický rozptyl světla

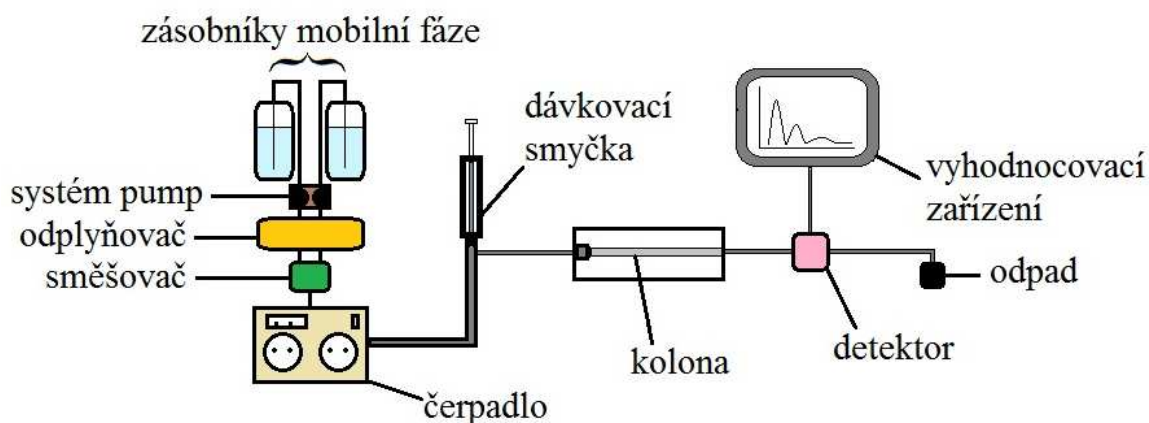
Velikost částic se stanovuje pomocí procesu zvaného dynamický rozptyl světla. Dynamický rozptyl světla (DLS) je také známý jako fotonová korelační spektroskopie (PCS). Metoda je založena na měření Brownova pohybu. V důsledku Brownova pohybu jsou částice neustále v pohybu. Jde tedy o pohyb částic způsobený náhodnými srážkami s molekulami kapaliny, které částici v roztoku obklopují. Rychlost pohybu částice je závislá na jejich velikosti. Malé částice se pohybují rychle a velké částice se naopak pohybují pomaleji. Měření dynamického rozptylu lze provést osvětlením částic laserem a analýzou fluktuací intenzity rozptýleného světla [48].

2.7 Metody charakterizace aktivních látek

Pro analýzu aktivních látek rostlinných materiálů je vhodná absorpční spektrometrie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie nebo zjištění hodnoty pH.

2.7.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je separační metoda založená na dělení látek mezi dvě fáze (Obrázek 9). Mobilní (pohyblivou) fází je kapalina. Stacionární (nepohyblivou) fází tvoří tuhá látka nebo kapalina, která je ukotvena na pevném nosiči. Vzorek je unášen soustavou pomocí mobilní fáze, která je do systému přiváděna za vysokého tlaku pomocí čerpadla. Mobilní fáze prochází náplňovou kolonou se stacionární fází, kde je vzorek zdržován. Zde dochází k dělení složek na základě interakce vzorku se stacionární i mobilní fází. Separované analyty jsou detekovány při průchodu například refraktometrickým detektorem. Signál z detektoru je počítačem převeden na chromatogram [47; 49].



Obrázek 9: Schéma kapalinového chromatografu [49]

2.7.2 Hodnota pH

Hodnota pH je bezrozměrné číslo vztahující se k obsahu vodíkových iontů v médiu. Je definována jako záporně vzatý dekadický logaritmus aktivity oxoniových kationtů. Pro měření se využívá pH metr se skleněnou elektrodou. Voda má při 25 °C hodnotu pH velmi blízko 7, proto tato hodnota definuje neutrální médium. Média s pH nižší než 7 jsou charakterizována jako kyselá, zatímco média s hodnotou pH vyšší jsou alkalická [50].

3 CÍL PRÁCE

Cílem práce je vývoj nových energetických nápojů na bázi různých druhů kávy s přídavkem biologicky aktivních složek.

V rámci této bakalářské práce byly řešeny následující dílčí úkoly:

- literární rešerše zaměřená na komplexní problematiku energetických nápojů, jejich složek a účinků,
- příprava modelových energetických nápojů na bázi kávy s přídavkem dalších aktivních rostlinných složek ve volné a enkapsulované formě,
- stanovení fyzikálně-chemických charakteristik a stability liposomů s aktivními složkami v nápojích,
- sledování dynamiky uvolňování kofeinu z částic a změny celkového složení nápojů v průběhu času.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt), Sigma-Aldrich (SRN)

Dusičnan sodný - p.a., Lach-Ner (ČR)

Etanol 98% - p.a., Lach-Ner (ČR)

Folin- Ciocalteu roztok - p.a., PENTA (ČR)

Hydroxid sodný - p.a., Lach-Ner, (ČR)

Chlorid hlinitý – Lach-Ner (ČR)

Cholesterol - Sigma-Aldrich (SRN)

Katechin - Sigma-Aldrich (SRN)

Kofein - Sigma-Aldrich (SRN)

Kyselina gallová - Sigma-Aldrich (SRN)

Kyselina octová 99,8% - p.a., Lach-Ner (ČR)

Kyselina sírová 96% - p.a., PENTA (ČR)

L- α -Phosphatidylcholine - Sigma-Aldrich (SRN)

Lecithin - Sigma-Aldrich (SRN)

Methanol pro HPLC – Lach-Ner (SRN)

Peroxodisíran draselný – p.a., Lach-Ner (ČR)

Trolox - Sigma-Aldrich (SRN)

Uhličitan sodný - p.a., Lach-Ner (ČR)

4.2 Použité přístroje a pomůcky

Analytická váha, Boeco (SRN)

Běžné laboratorní sklo

Centrifuga - U-32R, Boeco (SRN)

Dip cell - ZEN 1002, Malvern (UK)

DLS analyzátor - Zetasizer ZS, Malvern (UK)

Elektrický vařič – ETA (ČR)

Kolona Zorbax RX-C8

Kolona Rezex ROA - Phenomenex

Mikropipety

Nylonové filtry (stříkačkové) - 25 mm, velikost pórů 0,45 μ m, Chromservis (ČR)

pH metr se skleněnou elektrodou - pH 211, Hanna Instruments (USA)

Spektrofotometr – NanoPhotometr UV/VIS, IMPLEN (SRN)

ThermoFisherScientific – sestava pro HPLC (USA)

Třepačka

Ultrazvukový homogenizátor – Sonoplus HS 3200, Bandelin (SRN)

4.3 Vzorky

4.3.1 Kávové základy

Kávovými základy byly různé druhy kávy zakoupené ve specializovaných prodejnách se zdravou výživou.

Tabulka 3: Kávové základy

| Vzorky | Výrobce |
|-------------------|-------------------------------------|
| Mletá káva | Lobodis BIO Espresso - 100% arabika |
| Instantní káva | Destination Premium - 100% arabika |
| Zelená káva | Kávoviny |
| Bezkofeinová káva | DiCaf - směs arabiky a robusty |

4.3.2 Rostlinné materiály

V praktické části byly pro přípravu extraktů použity na trhu běžně dostupné rostlinné materiály jako guarana (GuaranaPlus), kustovnice (Bionebio), matchatea (Zelenáčky) a kakao (dmBio), které byly také zakoupeny v obchodních řetězcích zdravé výživy.

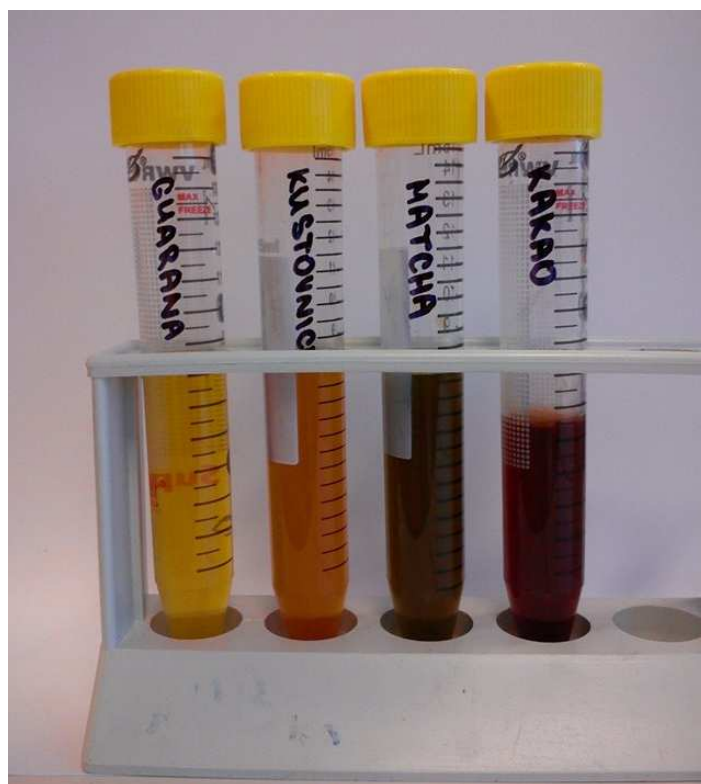
4.4 Příprava vzorků

4.4.1 Kávové základy

K přípravě kávových základů byl využit 1 g vybraných druhů kávy. Odvážené množství kávy bylo louhováno ve 250 ml horké vody po dobu 5 minut.

4.4.2 Rostlinné materiály

Rostlinné extrakty byly připraveny 30minutovou extrakcí 1 g rostlinné látky v 10 ml destilované vody. Vyzkoušeny byly i 24hodinové extrakty.



Obrázek 10: Vzorky rostlinných extraktů. Zleva: extrakt z guarany, extrakt z kustovnice, extrakt z matchy, extrakt z kakaá.

4.5 Spektrofotometrické metody

U připravených základů i extraktů rostlinného původu byl stanoven obsah celkových polyfenolů, flavonoidů a antioxidační aktivita.

4.5.1 Stanovení celkových polyfenolů

Celková koncentrace polyfenolů se stanovuje spektrofotometricky po reakci Follin-Ciocaltauvova činidla se vzorkem, kdy se proměří intenzita zbarvení roztoku. Standardem pro sestrojení kalibrační závislosti je kyselina gallová.

Do zkumavky byl napipetován 1 ml Follin-Ciocaltauvova činidla zředěného vodou v poměru 1 : 9, byl přidán 1 ml destilované vody a 50 μ l vzorku. Obsah zkumavky byl pomocí vortexu promíchán a ponechán 5 minut stát. Poté byl do zkumavky přidán 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného. Po opětovném promíchání byl vzorek ponechán 15 minut stát. Následně byla změřena absorbance zbarveného roztoku při vlnové délce 750 nm oproti blanku, kde byla místo vzorku přidána voda. Každý vzorek byl analyzován třikrát a ze získaných hodnot byl vypočten průměr i směrodatná odchylka. Ze standardního roztoku kyseliny gallové byla připravena kalibrační řada v koncentračním rozmezí od 0,1 do 0,7 mg/ml. Koncentrace neznámých vzorků byla vypočtena z rovnice regrese získané sestrojením grafu kalibrační závislosti absorbance na koncentraci.

$$y = 1,597x \quad (1)$$
$$R^2 = 0,994$$

4.5.2 Stanovení celkových flavonoidů

Koncentrace flavonoidů je stanovena pomocí kalibrační krivky. Standardem pro sestavení kalibrační závislosti je katechin. Do zkumavky s 0,5 ml analyzovaného vzorku bylo přidáno 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml 5% roztoku NaNO₂. Obsah zkumavky byl promíchán a po 5 minutách byly přidány 0,2 ml 10% AlCl₃. Roztok byl opět promíchán na vortexu a ponechán 5 minut stát. Poté bylo k roztoku přidáno 1,5 ml 5% NaOH a 1 ml destilované vody. Po 15 minutách byla změřena absorbance při vlnové délce 510 nm oproti blanku, kterým byla destilovaná voda. Ze standardního roztoku katechinu rozpustného v ethanolu byla připravena kalibrační řada v koncentračním rozmezí od 0,05 do 0,3 mg/ml. Koncentrace neznámých vzorků byla vypočtena z rovnice regrese získané sestavením grafu kalibrační závislosti absorbance na koncentraci.

$$y = 3,837x \quad (2)$$
$$R^2 = 0,997$$

4.5.3 Stanovení antioxidační aktivity

Určení antioxidační aktivity využívá činidlo ABTS^{•+}. Standardním roztokem pro sestavení kalibrační závislosti je trolox.

ABTS byl rozpuštěn v destilované vodě na koncentraci $c = 7$ mmol/l. Pro získání radikálového kationtu byl roztok smíchán s 2,45 mmol/l peroxodisíranem draselným a ponechán ve tmě nejméně 12 hodin. Před použitím bylo třeba roztok ABTS naředit UV-VIS 96% ethanolem na absorbanci přibližně 0,700 při vlnové délce 734 nm oproti ethanolu. K měření byla využita zúžená kyveta, do které byl napipetován 1 ml ABTS^{•+}, bylo přidáno 10 μ l vzorku a po 10 minutách byl zaznamenán pokles absorbance. Jako blank byl použit 1 ml ABTS^{•+} a 10 μ l destilované vody. Ze standardního roztoku troloxu rozpuštěného v 60% ethanolu byla sestavena kalibrační řada o koncentraci v rozmezí od 50 do 400 μ g/ml.

$$y = 0,00132x \quad (3)$$
$$R^2 = 0,99006$$

4.6 Příprava liposomových částic

Do kádinky k 10 mg cholesterolu a 90 mg lecitinu bylo přidáno 9 ml destilované vody a 1 ml extraktu. Připravená směs byla intenzivně míchána po dobu 1 minuty pomocí tyčového

ultrazvukového homogenizátoru do vzniku liposomů. Liposomy byly připraveny z rostlinných extraktů guarany, kustovnice, matchy a kakaá.

4.7 Charakterizace liposomů

Liposomové částice byly charakterizovány enkapsulační účinností, velikostí a stabilitou.

4.7.1 Stanovení enkapsulační účinnosti

Enkapsulační účinnost byla založena na stanovení obsahu celkových polyfenolů. Připravené liposomové částice byly odstředěny na centrifuze nejprve 5 minut při 14 000 otáčkách. Oddělený supernatant byl odpipetován do čisté zkumavky typu Eppendorf a zcentrifugován při 11 000 ot/min po dobu 60 minut. Ve stočeném supernatantu byla následně stanovena koncentrace polyfenolů podle stejného postupu jako při stanovení celkových polyfenolů ve vzorcích před enkapsulací. Enkapsulační účinnost byla vypočtena jako rozdíl koncentrace polyfenolů v roztoku před a po enkapsulaci.



Obrázek 11: Liposomy. S-stočené, N-nestočené. 1 – Kakao N., 2 – Kakao S., 3 – Kustovnice N., 4 – Kustovnice S., 5 – Matcha N., 6 – Matcha S., 7 – Guarana N., 8 – Guarana S.

4.7.2 Stanovení velikosti částic pomocí DLS

Liposomové částice připravené ze čtyř různých extraktů byly 100x zředěny destilovanou vodou. Pomocí přístroje MalvernZetasizerNano ZS byla proměřena velikost částic i index polydisperzity.

4.7.3 Stanovení stability částic pomocí zeta potenciálu

Liposomové částice byly 100x zředěny destilovanou vodou. Do kyvety byl v tomto případě vložen nástavec s elektrodou, který pomocí koloidního analyzátoru Malvern Zetasizer Nano ZS umožnil proměřit zeta potenciál částic, a tím zjistit jejich stabilitu. Koloidní stabilita liposomových částic byla sledována v průběhu 6 týdnů.

4.8 Příprava modelových energetických nápojů

Energetické nápoje byly připraveny smícháním rostlinných extraktů. Základ energetických nápojů tvořily 4 druhy kávy. Kávové základy byly obohacovány rostlinnými extrakty z guarany, kustovnice, kaka a matchy. Rostlinné extrakty v nápoji tvořily 10% přídavek. Pro porovnání byly připraveny energetické nápoje s 10% přídavkem enkapsulovaných extraktů. Připravené energetické nápoje byly oslazeny třtinovým cukrem nebo stévií.

Byl kombinován vždy jeden kávový základ se všemi volnými rostlinnými extrakty, a ty byly v jedné řadě oslazeny stévií a ve druhé řadě třtinovým cukrem. Jak již bylo zmíněno, se základy byly vyzkoušeny i enkapsulované extrakty. Tyto kombinace byly provedeny se všemi kávovými základy.

4.9 Charakterizace energetických nápojů

4.9.1 Stanovení sacharidů pomocí HPLC

Stanovení sacharidů ve vzorcích energetických nápojů ve dvou typech slazení bylo provedeno pomocí metody HPLC s RI detekcí. Připravené energetické nápoje byly nejprve 10x zředěny, přefiltrovány přes nylonový filtr a následně aplikovány na kolonu pomocí dávkovací smyčky o objemu 20 μ l. Dělení směsi probíhalo na koloně Rezex-Phenomenex s reverzní fází ROA Organic Acid 8% (7,8 x 300 mm) při 30 °C. Mobilní fázi tvořil 5 mM roztok kyseliny sírové, jejíž průtok byl nastaven na 1 ml/min. Vzorky byly detekovány na refraktometrickém detektoru. Analýza probíhala 15 minut. Výsledná data byla zpracována pomocí programu Chromeleon. Ze získaných chromatogramů byly zjištěny plochy píků pro jednotlivé zastoupené sacharidy v energetických nápojích. Pro kvantitativní stanovení sacharidů byla sestrojena kalibrační křivka, díky níž bylo možné vypočítat obsah sacharidů ve vzorcích energetických nápojů.

$$\text{Glukosa: } y = 0,1611x - 0,2924 \quad (4)$$

4.9.2 Stanovení kofeinu pomocí HPLC

Ke stanovení kofeinu ve vzorcích energetických nápojů slazených třtinovým cukrem bylo využito vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV/VIS detektorem. Připravené energetické nápoje byly nejprve 10x zředěny, přefiltrovány přes nylonový filtr a následně aplikovány na kolonu pomocí dávkovací smyčky o objemu 20 μ l. Dělení směsi probíhalo na koloně Zorbax RX-C8 (5 μ m, 4,6 x 250 mm) při 35 °C za přítomnosti mobilní fáze složené ze směsi metanolu a vody s 0,1% kyselinou octovou v poměru 60:40. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 ml/min. Vzorky byly detekovány na UV/VIS detektoru při vlnové délce 270 nm. Analýza probíhala 7 minut. Výsledná data byla zpracována pomocí programu Chromeleon. Ze získaných chromatogramů byly zjištěny plochy píků. Pro kvantitativní stanovení koncentrace kofeinu byla sestrojena kalibrační křivka (Příloha 1), díky níž bylo možné vypočítat obsah kofeinu ve vzorcích energetických nápojů. Retenční čas pro kofein byl 4 minuty.

$$y = 912,5x - 0,103 \quad (5)$$
$$R^2 = 1$$

4.9.3 Stanovení pH

Jelikož stabilita enkapsulovaných částic je ovlivňována okolním prostředím, byla stanovena kyselost, případně zásaditost jednotlivých čistých extraktů i celkových směsí energetických nápojů.

4.9.4 Stanovení dlouhodobé stability

Pro studium dlouhodobé stability energetického nápoje s enkapsulovnými částicemi byly vzorky skladovány při teplotě 5 °C. Dlouhodobá stabilita byla sledována každý týden po dobu 6 týdnů a byla vypočtena z uvolněného množství polyfenolů z částic a ze změny antioxidační účinnosti.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato práce je zaměřena na návrh nového energetického nápoje. Cílem byla nejprve charakterizace jednotlivých rostlinných extraktů z hlediska obsahu aktivních látek. Dále byly připraveny různé kombinace energetických nápojů, které byly následně také charakterizovány. Vybrané energetické nápoje byly nakonec podrobeny senzorické analýze.

5.1 Charakterizace kávových základů

Vodné kávové extrakty byly ze čtyř druhů kávy připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 4.4.1. U zkoumavých kávových extraktů byla sledována celková koncentrace polyfenolů, celkový obsah flavonoidů, antioxidační aktivita i pH roztoků.

5.1.1 Stanovení celkových polyfenolů

Pro určení celkové koncentrace polyfenolů byla nejprve sestrojena kalibrační závislost absorbance celkových polyfenolů na koncentraci podle postupu v kapitole 4.5.1.

Celková koncentrace polyfenolů v kávových extraktech byla vypočtena z rovnice regrese získané z kalibrační závislosti kyseliny gallové. Každý extrakt byl analyzován třikrát a ze získaných hodnot byl vypočten průměr a směrodatná odchylka. Výsledná koncentrace polyfenolů byla přepočtena na obsah polyfenolů v 1 g vzorku.

Tabulka 4: Koncentrace polyfenolů v kávových základech

| Vzorek | Koncentrace [mg/g] |
|-------------------|--------------------|
| Mletá káva | 45,6 ± 1,0 |
| Instantní káva | 140,4 ± 0,6 |
| Bezkofeinová káva | 46,9 ± 0,9 |
| Zelená káva | 42,0 ± 0,6 |

Z naměřených dat je zřejmé, že největší množství polyfenolů je obsaženo ve vzorku instantní kávy. Přibližně stejné koncentrace polyfenolů obsahovaly vzorky kávy mleté a bezkofeinové. Naopak nejnižší množství bylo naměřeno v extraktu zelené kávy.

5.1.2 Stanovení celkových flavonoidů

Pro určení celkové koncentrace flavonoidů byla sestrojena kalibrační závislost absorbance celkových flavonoidů na koncentraci podle postupu v kapitole 4.5.2. Každý kávový extrakt byl analyzován třikrát a ze získaných hodnot byl vypočten průměr a směrodatná odchylka. Z kalibrační závislosti katechinu byla získána rovnice regrese, z níž byla vypočtena celková koncentrace flavonoidů. Výsledná koncentrace flavonoidů byla přepočtena na obsah flavonoidů v 1 g vzorku.

Tabulka 5: Koncentrace flavonoidů v kávových základech

| Vzorek | Koncentrace [mg/g] |
|-------------------|--------------------|
| Mletá káva | 33,3 ± 0,8 |
| Instantní káva | 69,9 ± 2,9 |
| Bezkofeinová káva | 28,4 ± 0,3 |
| Zelená káva | 33,6 ± 0,4 |

Z Tabulky 5 je patrné, že největší množství flavonoidů obsahovala instantní káva (69,9 mg/g). Ostatní kávové základy byly jako v případě obsahu polyfenolů vyrovnané. Nejnižší množství obsahovala káva bezkofeinová (28,4 mg/g).

5.1.3 Stanovení antioxidační aktivity

Celková antioxidační aktivita byla stanovena pomocí kalibrační závislosti sestrojené podle postupu uvedeného v kapitole 4.5.3. Každé měření kávových extraktů bylo provedeno ve třech opakováních, z nichž byl vypočten průměr a směrodatná odchylka. Antioxidační aktivita byla stanovena v $\mu\text{g/ml}$ a následně byla přepočítána na mg/g .

Tabulka 6: Antioxidační aktivita kávových základů

| Vzorek | Koncentrace [mg/g] |
|-------------------|--------------------|
| Mletá káva | 79,8 ± 0,9 |
| Instantní káva | 133,0 ± 2,9 |
| Bezkofeinová káva | 47,9 ± 2,1 |
| Zelená káva | 43,5 ± 1,7 |

Nejvyšší celková aktivita antioxidačně aktivních látek byla stanovena v kávě instantní, mleté a bezkofeinové, nejnižší naopak v zelené kávě. Instantní káva dominuje svým obsahem aktivních látek nad ostatními druhy kávy. Je bohatá na polyfenoly a prokázala se i jako výborný antioxidant.

5.1.4 Stanovení pH

Pomocí pH metru se skleněnou elektrodou byla stanovena kyselost/zásaditost kávových základů. Měření bylo provedeno 3x, z čehož byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka.

Tabulka 7: Hodnoty pH kávových základů

| Vzorek | Hodnota pH |
|-------------------|-------------|
| Mletá káva | 5,19 ± 0,00 |
| Instantní káva | 5,49 ± 0,02 |
| Bezkofeinová káva | 5,33 ± 0,01 |
| Zelená káva | 6,25 ± 0,02 |

Hodnoty pH kávových základů byly proměřeny především z důvodu charakterizace roztoků, které tvoří prostředí pro enkapsulované extrakty. Kávové extrakty vykazovaly mírnou kyselost.

5.2 Charakterizace rostlinných extraktů

Vodné rostlinné extrakty byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 4.4.2 z guarany, kustovnice, kakaa a matchy. Celková koncentrace polyfenolů, celkový obsah flavonoidů a antioxidační aktivita byly sledovány u rostlinných 30minutových a 24hodinových extraktů. Dále bylo proměřeno pH extraktů.

5.2.1 Stanovení celkových polyfenolů

Spektrofotometrické stanovení celkových polyfenolů v rostlinných extraktech bylo provedeno podle postupu v kapitole 4.5.1. Všechna měření byla provedena 3x a z průměrných hodnot byla vypočtena koncentrace polyfenolů.

Tabulka 8: Koncentrace polyfenolů ve 30minutových a 24hodinových extraktech

| Vzorek | Koncentrace [mg/g] | |
|------------|---------------------|---------------------|
| | 30minutové extrakty | 24hodinové extrakty |
| Kakao | 25,8 ± 0,5 | 25,5 ± 0,5 |
| Matcha | 71,2 ± 1,6 | 97,9 ± 4,9 |
| Kustovnice | 11,2 ± 0,4 | 12,1 ± 0,2 |
| Guarana | 32,3 ± 0,2 | 36,0 ± 0,5 |

Byly analyzovány dva typy extraktů, které se lišily dobou extrakce rostlinných složek ve vodném prostředí. Porovnáním koncentrací polyfenolů v obou extraktech uvedených v Tabulka 8 je zřejmé, že obsah extrahovaných látek byl velmi podobný (s výjimkou matchy). Jelikož mezi zastoupením polyfenolů ve většině extraktů nebyly velké rozdíly, bylo možné pro další aplikace využívat roztoky připravené pouze 30minutovou extrakcí.

Z rostlinných materiálů je na polyfenoly bohatá zejména matcha, guarana nebo kakao. Nejnižší množství polyfenolů obsahovala kustovnice.

5.2.2 Stanovení celkových flavonoidů

Stanovení celkových flavonoidů bylo provedeno podle postupu v kapitole 4.5.2. Každý rostlinný extrakt byl analyzován 3x a ze získaných hodnot byl vypočten průměr.

Tabulka 9: Koncentrace flavonoidů ve 30minutových a 24hodinových extraktech

| Vzorek | Koncentrace [mg/g] | |
|------------|---------------------|---------------------|
| | 30minutové extrakty | 24hodinové extrakty |
| Kakao | 14,2 ± 0,2 | 18,7 ± 0,1 |
| Matcha | 13,2 ± 2,9 | 16,8 ± 0,2 |
| Kustovnice | 0,9 ± 0,2 | 1,0 ± 0,0 |
| Guarana | 21,5 ± 1,0 | 23,1 ± 0,2 |

Stejně jako v případě polyfenolů, tak i zde byly analyzovány dva typy extraktů. Při stanovení celkových flavonoidů bylo jejich množství v obou extraktech podobné. Největší

obsah flavonoidů byl naměřen v guaraně, kakau a matche. Naopak nejnižší koncentraci obsahovala kustovnice.

5.2.3 Stanovení antioxidační aktivity

Celková antioxidační aktivita byla stanovena pomocí kalibrační závislosti připravené podle postupu uvedeného v kapitole 4.5.3. Každé měření rostlinných extraktů bylo provedeno ve třech opakováních, z nichž byl vypočten průměr a směrodatná odchylka. Antioxidační aktivita byla stanovena v $\mu\text{g/ml}$ a následně byla přepočítána na mg/g .

Tabulka 10: Antioxidační aktivita ve 30minutových a 24hodinových extraktech

| Vzorek | Koncentrace [mg/g] | |
|------------|---------------------|---------------------|
| | 30minutové extrakty | 24hodinové extrakty |
| Kakao | $5,0 \pm 0,1$ | $5,4 \pm 0,0$ |
| Matcha | $5,2 \pm 0,0$ | $4,6 \pm 0,0$ |
| Kustovnice | $5,0 \pm 0,0$ | $4,9 \pm 0,0$ |
| Guarana | $5,3 \pm 0,0$ | $5,4 \pm 0,0$ |

I v tomto případě byly analyzovány dva typy extraktů lišící se dobou jejich extrakce. Všechny vybrané rostlinné materiály disponují velmi podobnou antioxidační aktivitou, která se pohybuje blízko koncentrace 5 mg/g .

5.2.4 Stanovení pH

Měření hodnoty pH rostlinných extraktů bylo provedeno ve třech opakováních, z nichž byl vypočten průměr a směrodatná odchylka.

Tabulka 11: Hodnota pH rostlinných extraktů

| Vzorek | Hodnota pH |
|------------|-----------------|
| Kakao | $7,17 \pm 0,01$ |
| Matcha | $5,33 \pm 0,01$ |
| Kustovnice | $5,25 \pm 0,01$ |
| Guarana | $6,29 \pm 0,01$ |

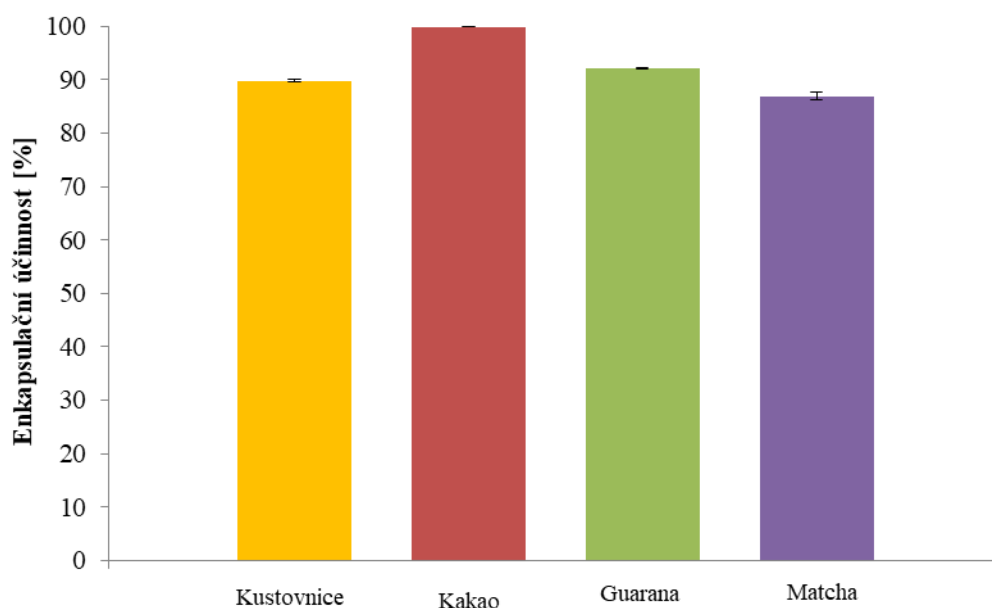
Z Tabulky 11 je patrné, že extrakt kakaava má neutrální charakter. Extrakt matchy, kustovnice a guarany poskytuje slabě kyselé prostředí.

5.3 Charakterizace liposomových částic

Enkapsulované částice s aktivními složkami připravené podle postupu uvedeného v kapitole 4.6 byly podrobeny následné analýze. U enkapsulovaných částic byla stanovena enkapsulační účinnost, velikost částic i jejich stabilita.

5.3.1 Stanovení enkapsulační účinnosti

Stanovení enkapsulační účinnosti bylo provedeno na základě postupu uvedeného v kapitole 4.7.1. Připravené liposomové částice byly zcentrifugovány a v získaném supernatantu byl stanoven obsah polyfenolů stejným způsobem jako v roztoku před enkapsulací. Z rozdílů těchto hodnot byla vypočítána enkapsulační účinnost, která byla vyjádřena v procentech.



Obrázek 12: Stanovení enkapsulační účinnosti

Z výsledků je patrné, že nejvyšší enkapsulační účinnost mělo kakao (99,8 %), guarana a kustovnice. Menší enkapsulační účinnost měla matcha (86,9 %), přesto však byla enkapsulační účinnost u všech analyzovaných vzorků velmi vysoká.

5.3.2 Stanovení velikosti a stability připravených liposomových částic

Velikost a stabilita částic byla stanovena podle postupu v kapitole 4.7.2 a 4.7.3.

Tabulka 12: Velikost, polydisperzita a zeta potenciál čerstvých částic

| Vzorek | Velikost [nm] | PdI | Zeta potenciál [mV] |
|------------|---------------|-------------|---------------------|
| Kakao | 163,1 ± 2,2 | 0,33 ± 0,05 | -37,7 ± 1,0 |
| Matcha | 179,2 ± 6,0 | 0,35 ± 0,01 | -39,9 ± 1,5 |
| Kustovnice | 165,5 ± 3,0 | 0,30 ± 0,03 | -41,8 ± 2,0 |
| Guarana | 172,2 ± 6,0 | 0,28 ± 0,03 | -35,1 ± 1,0 |

Z naměřených dat v Tabulce 13 je zřejmé, že všechny připravené liposomové částice měly přibližně stejnou velikost, která se pohybovala v rozmezí 163–180 nm. Největší průměrnou velikost měly částice z matchy, které současně disponovaly i největší hodnotou indexu polydisperzity. Nejmenší velikost měly částice z kaka, jejichž index polydisperzity byl 0,33.

Zeta potenciál připravených liposomových částic byl v rozmezí od -42 mV do -35 mV. Hodnoty zeta potenciálů přesahovaly hranici -30 mV, z čehož lze usuzovat, že připravené částice byly koloidně stabilní.

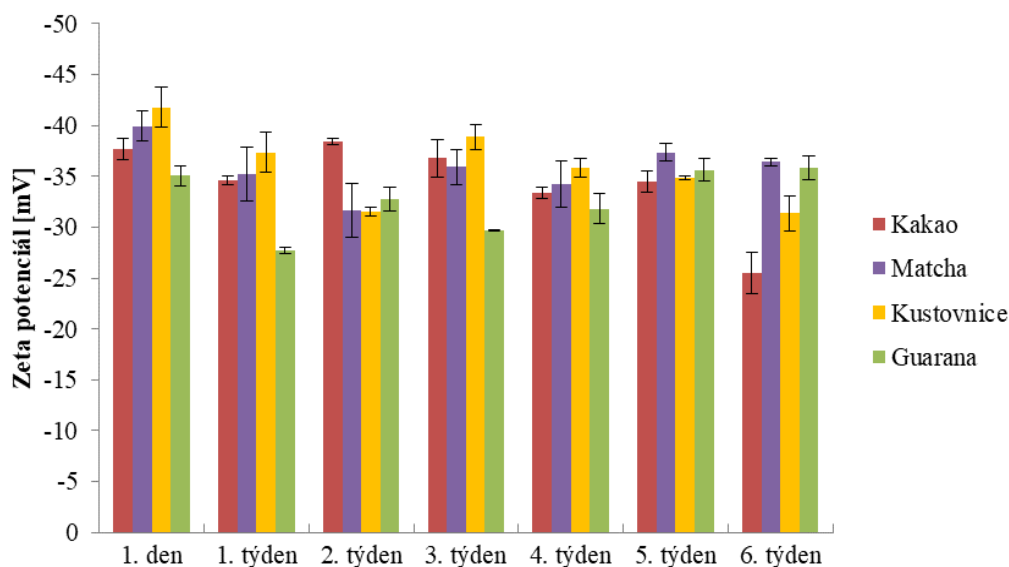
5.3.3 Stanovení dlouhodobé stability

Připravené liposomové částice s enkapsulovanými extrakty byly měřeny po dobu 6 týdnů, kdy byla sledována jejich dlouhodobá stabilita v závislosti na čase.

Tabulka 13: Stabilita enkapsulovaných částic po dobu 6 týdnů

| Vzorek | Zeta potenciál [mV] | | | | | |
|------------|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | 1. týden | 2. týden | 3. týden | 4. týden | 5. týden | 6. týden |
| Kakao | $-34,6 \pm 0,4$ | $-38,4 \pm 0,3$ | $-36,8 \pm 1,9$ | $-33,4 \pm 0,5$ | $-34,4 \pm 1,1$ | $-25,5 \pm 2,0$ |
| Matcha | $-35,2 \pm 2,7$ | $-31,6 \pm 2,6$ | $-35,9 \pm 1,7$ | $-34,2 \pm 2,3$ | $-37,4 \pm 0,9$ | $-36,4 \pm 0,3$ |
| Kustovnice | $-37,4 \pm 2,0$ | $-31,5 \pm 0,5$ | $-38,9 \pm 1,3$ | $-35,8 \pm 0,9$ | $-34,9 \pm 0,2$ | $-31,4 \pm 1,8$ |
| Guarana | $-27,7 \pm 0,3$ | $-32,8 \pm 1,2$ | $-29,7 \pm 0,1$ | $-31,8 \pm 1,4$ | $-35,6 \pm 1,1$ | $-35,8 \pm 1,2$ |

Všechny liposomové částice vykazovaly dobrou stabilitu s výjimkou guarany, kde došlo k určité degradaci částice už po 1. týdnu. Částice z kustovnice a matchy byly nejstabilnější. U těchto částic nedošlo k degradaci ani po 6 týdnech. Částice z kakaa degradovala až v 6. týdnu.



Obrázek 13: Stabilita enkapsulovaných liposomových částic

5.4 Charakterizace energetického nápoje

5.4.1 Stanovení sacharidů pomocí HPLC

Všechny smíchané kombinace energetických nápojů byly podrobeny analýze na obsah sacharidů, která byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 4.9.1. Energetické

nápoje byly měřeny ve dvou typech slazení: třtinovým cukrem a stévií. Do všech energetických nápojů bylo přidáváno stejné minimální množství cukru, po jehož přidavku bylo možné nápoj konzumovat. Z důvodu četnosti vzorků a dlouhé doby analýzy byla každá kombinace energetického nápoje změřena pouze jednou.

Na stanovení obsahu cukrů byly proměřeny i samotné kávové základy a rostlinné extrakty.

Tabulka 14: Obsah cukrů v kávových základech

| Vzorek | Koncentrace [mg/ml] |
|-------------------|---------------------|
| Mletá káva | 17,4 |
| Instantní káva | 22,1 |
| Bezkofeinová káva | 27,6 |
| Zelená káva | 28,6 |

Nejvyšší obsah cukru z kávových extraktů obsahoval vzorek zelené a bezkofeinové kávy. Menší množství celkových cukrů bylo zjištěno u kávy mleté a instantní.

Tabulka 15: Obsah cukrů v rostlinných extraktech

| Vzorek | Koncentrace [mg/ml] |
|------------|---------------------|
| Kakao | 25,8 |
| Matcha | 34,5 |
| Kustovnice | 65,2 |
| Guarana | 38,2 |

Nevyšší množství cukrů obsahovala kustovnice (65,2 mg/ml), která je sama o sobě charakteristická sladkou chutí. Matcha i guarana obsahovaly srovnatelné množství cukrů. Nejnižší obsah byl naměřen v extraktu z kakaa.

Tabulka 16: Obsah cukrů v energetických nápojích obohacených extrakty ve dvou typech slazení

| | Vzorek | Koncentrace sacharidů [mg/ml] | | | |
|---------------|------------|-------------------------------|----------------|-------------------|-------------|
| | | Mletá káva | Instantní káva | Bezkofeinová káva | Zelená káva |
| Cukr | Kakao | 231,1 | 327,1 | 612,7 | 312,5 |
| | Matcha | 238,6 | 359,7 | 461,5 | 643,5 |
| | Kustovnice | 883,5 | 625,5 | 916,5 | 658,0 |
| | Guarana | 230,3 | 377,0 | 502,7 | 797,8 |
| Stévie | Kakao | 127,0 | 280,4 | 281,0 | 424,0 |
| | Matcha | 229,6 | 368,4 | 245,8 | 351,8 |
| | Kustovnice | 227,1 | 268,7 | 547,1 | 625,3 |
| | Guarana | 485,0 | 222,2 | 234,4 | 263,8 |

Z Tabulky 17 je zřejmé, že stévie je schopna svými sladivými vlastnostmi nahradit třtinový cukr. Na rozdíl od třtinového cukru byla ve stévií při stanovení celkových cukrů častěji detekována kyselina mléčná, octová nebo etanol, které indikují stupeň degradace cukru v prostředí.

Tabulka 17: Obsah cukrů v energetických nápojích obohacených enkapsulovanými extrakty ve dvou typech slazení

| | Vzorek | Koncentrace sacharidů [mg/ml] | | | |
|---------------|------------|-------------------------------|----------------|-------------------|-------------|
| | | Mletá káva | Instantní káva | Bezkofeinová káva | Zelená káva |
| Cukr | Kakao | 53,4 | 22,0 | 20,4 | 27,9 |
| | Matcha | 45,7 | 20,4 | 21,0 | 30,9 |
| | Kustovnice | 18,8 | 19,6 | 30,5 | 22,4 |
| | Guarana | 43,7 | 71,2 | 21,4 | 23,9 |
| Stévie | Kakao | 19,2 | 20,9 | 36,0 | 31,1 |
| | Matcha | 18,6 | 26,3 | 20,4 | 33,5 |
| | Kustovnice | 16,1 | 17,6 | 22,6 | 29,3 |
| | Guarana | 26,0 | 23,1 | 22,4 | 45,4 |

Srovnáním hodnot v Tabulce 18 a Tabulce 17 lze vidět, že enkapsulované částice neobalují jen aktivní látky, ale i sacharidové složky. Po enkapsulaci se koncentrace volných cukrů v celém roztoku sníží.

5.4.2 Stanovení kofeinu pomocí HPLC

Všechny kombinace energetických nápojů, avšak pouze v jednom typu slazení (třtinový cukr), byly podrobeny analýze na obsah kofeinu, která byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 4.9.2.

Tabulka 18: Obsah kofeinu v energetických nápojích obohacených extrakty

| Vzorek | Koncentrace kofeinu [mg/250 ml] | | | |
|------------|---------------------------------|----------------|-------------------|-------------|
| | Mletá káva | Instantní káva | Bezkofeinová káva | Zelená káva |
| Kakao | 82,0 | 42,3 | 8,3 | 198,5 |
| Matcha | 107,5 | 54,0 | 29,5 | 208,5 |
| Kustovnice | 125,5 | 77,3 | 45,8 | 239,0 |
| Guarana | 76,5 | 40,5 | 3,5 | 200,0 |

Z naměřených dat je zřejmé, že nejvyšší koncentrace kofeinu obsahovaly kombinace energetických nápojů na bázi zelené kávy. Jejich koncentrace byla mnohdy i více než dvojnásobná oproti ostatním energetickým nápojům. Druhé nejvyšší množství kofeinu vykazoval nápoj na bázi mleté kávy následovaný nápoji s instantní kávou. Při zanedbání malého množství kofeinu, které obsahuje bezkofeinová káva, lze říci, že v těchto vzorcích bylo stanoveno množství kofeinu zejména ze samotných rostlinných extraktů.

Tabulka 19: Obsah kofeinu v energetických nápojích obohacených enkapsulovanými extrakty

| Vzorek | Koncentrace kofeinu [mg/250 ml] | | | |
|------------|---------------------------------|----------------|-------------------|--------------|
| | Mletá káva | Instantní káva | Bezkofeinová káva | Zelená káva |
| Kakao | 6,3 | 39,8 | 4,8 | 192,5 |
| Matcha | 83,0 | 41,3 | 7,0 | nedetekováno |
| Kustovnice | 80,8 | 39,0 | 4,0 | 368,5 |
| Guarana | 84,8 | 29,3 | 8,8 | 356,3 |

Pro porovnání byl proměřen obsah kofeinu v energetických nápojích s přidavkem liposomů. Částice jsou schopny enkapsulovat část kofeinu z rostlinných extraktů. Některé hodnoty kofeinu se oproti samotným extraktům zvýšily. V průběhu skladování při teplotě $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ mohlo dojít k degradaci částic, která se projevila uvolněním enkapsulovaného kofeinu.

5.4.3 Stanovení pH

Měření hodnoty pH všech kombinací energetických nápojů bylo provedeno ve třech opakováních, z nichž byl vypočten průměr a směrodatná odchylka.

Tabulka 20: Hodnoty pH pro energetické nápoje obohacené extrakty ve dvou typech slazení

| | Vzorek | Hodnota pH | | | |
|---------------|------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|
| | | Mletá káva | Instantní káva | Bezkofeinová káva | Zelená káva |
| Cukr | Kakao | $6,26 \pm 0,02$ | $6,54 \pm 0,01$ | $6,16 \pm 0,04$ | $6,26 \pm 0,02$ |
| | Matcha | $5,65 \pm 0,01$ | $5,82 \pm 0,00$ | $5,64 \pm 0,02$ | $6,75 \pm 0,01$ |
| | Kustovnice | $5,64 \pm 0,04$ | $5,76 \pm 0,00$ | $5,57 \pm 0,04$ | $5,87 \pm 0,00$ |
| | Guarana | $5,97 \pm 0,01$ | $6,33 \pm 0,00$ | $5,82 \pm 0,01$ | $6,43 \pm 0,01$ |
| Stévie | Kakao | $6,18 \pm 0,04$ | $6,47 \pm 0,01$ | $6,09 \pm 0,00$ | $6,75 \pm 0,03$ |
| | Matcha | $5,62 \pm 0,00$ | $5,82 \pm 0,01$ | $5,59 \pm 0,01$ | $6,17 \pm 0,01$ |
| | Kustovnice | $5,58 \pm 0,01$ | $5,71 \pm 0,01$ | $5,58 \pm 0,03$ | $5,99 \pm 0,01$ |
| | Guarana | $5,91 \pm 0,00$ | $6,27 \pm 0,02$ | $5,73 \pm 0,00$ | $6,42 \pm 0,03$ |

Tabulka 20 uvádí, že hodnota pH připravených nápojů se pohybovala v rozmezí pH od 5,4 do 6,8. Všechny energetické nápoje jsou mírně kyselé, což se také projevilo na jejich chuti viz kapitola 5.5.

Tabulka 21: Hodnoty pH pro energetické nápoje obohacené enkapsulovanými extrakty ve dvou typech slazení

| | Vzorek | Hodnota pH | | | |
|---------------|------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|
| | | Mletá káva | Instantní káva | Bezkofeinová káva | Zelená káva |
| Cukr | Kakao | $6,34 \pm 0,01$ | $6,57 \pm 0,01$ | $6,10 \pm 0,01$ | $6,60 \pm 0,01$ |
| | Matcha | $6,12 \pm 0,01$ | $6,38 \pm 0,01$ | $5,69 \pm 0,01$ | $6,63 \pm 0,01$ |
| | Kustovnice | $6,29 \pm 0,01$ | $6,51 \pm 0,01$ | $5,83 \pm 0,00$ | $6,63 \pm 0,00$ |
| | Guarana | $6,06 \pm 0,01$ | $6,44 \pm 0,02$ | $5,75 \pm 0,00$ | $6,71 \pm 0,01$ |
| Stévie | Kakao | $6,36 \pm 0,00$ | $6,59 \pm 0,01$ | $6,07 \pm 0,01$ | $6,62 \pm 0,02$ |
| | Matcha | $6,10 \pm 0,01$ | $6,05 \pm 0,01$ | $5,85 \pm 0,01$ | $6,28 \pm 0,00$ |
| | Kustovnice | $6,26 \pm 0,01$ | $6,48 \pm 0,01$ | $5,81 \pm 0,01$ | $6,57 \pm 0,00$ |
| | Guarana | $5,82 \pm 0,01$ | $6,11 \pm 0,00$ | $5,92 \pm 0,01$ | $6,27 \pm 0,01$ |

Z Tabulky 21 je patrné, že energetické nápoje s enkapsulovanými extrakty jsou stejně jako nápoje s extrakty volnými mírně kyselé. Enkapsulace aktivních látek však způsobila, že se nápoje staly méně kyselými. pH vytvořených nápojů se pohybovalo mezi 5,6 a 6,7. Hodnota pH má velký vliv na stabilitu liposomových částic, kdy v kyselejším prostředí

dochází k rychlejší degradaci liposomových částic a tím i k rychlejšímu uvolnění aktivních látek.

5.4.4 Stanovení polyfenolů a antioxidační aktivity

Připravené energetické nápoje obohacené volnými extrakty byly dále charakterizovány z hlediska obsahu celkových polyfenolů a antioxidační aktivity. Měření bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitolách 4.5.1 a 4.5.3.

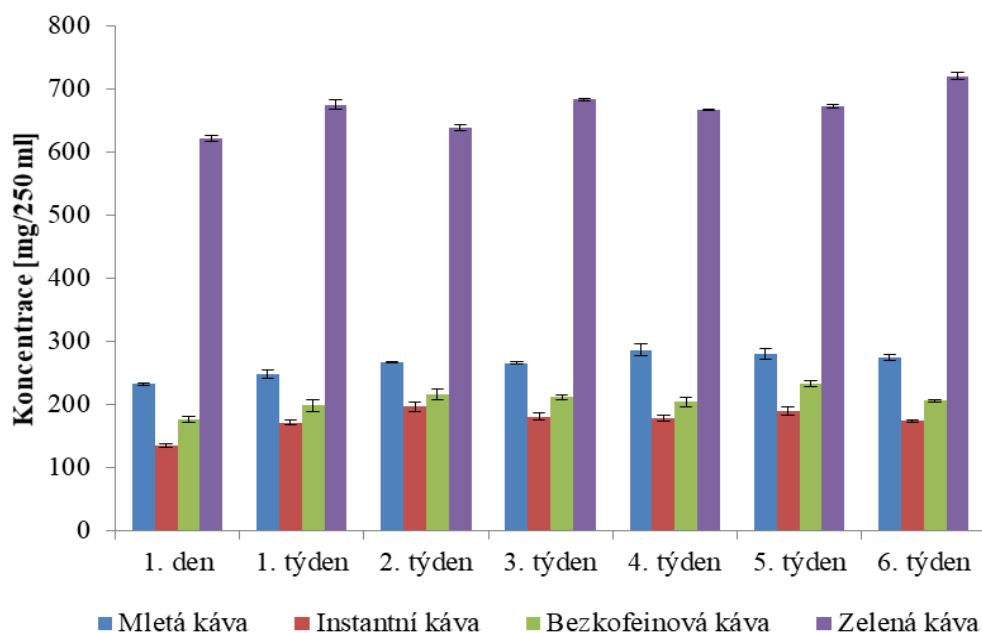
Tabulka 22: Obsah polyfenolů a antioxidační aktivity v nápojích

| | Vzorek | Koncentrace [mg/250 ml] | | | |
|------------------------------|------------|-------------------------|----------------|--------------|-------------|
| | | Mletá káva | Instantní káva | Bezkofeinová | Zelená káva |
| Polyfenoly | Kakao | 322,0 ± 5,0 | 164,4 ± 8,3 | 179,0 ± 5,0 | 811,4 ± 7,7 |
| | Matcha | 434,2 ± 8,0 | 316,2 ± 8,3 | 334,5 ± 3,3 | 945,5 ± 1,6 |
| | Kustovnice | 266,7 ± 4,5 | 146,6 ± 2,4 | 164,4 ± 9,4 | 569,3 ± 1,8 |
| | Guarana | 328,7 ± 4,7 | 231,2 ± 3,9 | 257,3 ± 6,3 | 905,3 ± 3,3 |
| Antioxidační aktivita | Kakao | 123,7 ± 0,5 | 123,0 ± 0,1 | 122,1 ± 1,2 | 120,6 ± 1,1 |
| | Matcha | 122,0 ± 0,3 | 122,0 ± 0,8 | 124,1 ± 0,3 | 120,4 ± 1,2 |
| | Kustovnice | 124,1 ± 0,5 | 123,0 ± 0,1 | 123,0 ± 0,1 | 121,6 ± 0,8 |
| | Guarana | 123,0 ± 0,1 | 123,1 ± 0,5 | 125,1 ± 1,5 | 120,5 ± 0,7 |

Z naměřených dat lze vyčíst, že nejvyšší koncentrace polyfenolů obsahovaly nápoje na bázi zelené kávy. Největší množství vykazovala kombinace s extraktem z matchy, jelikož samotná matcha obsahovala až dvojnásobné množství polyfenolů oproti ostatním extraktům. Z hlediska antioxidační aktivity byly vzorky poměrně vyrovnané a jsou tedy stejně dobrými antioxidanty.

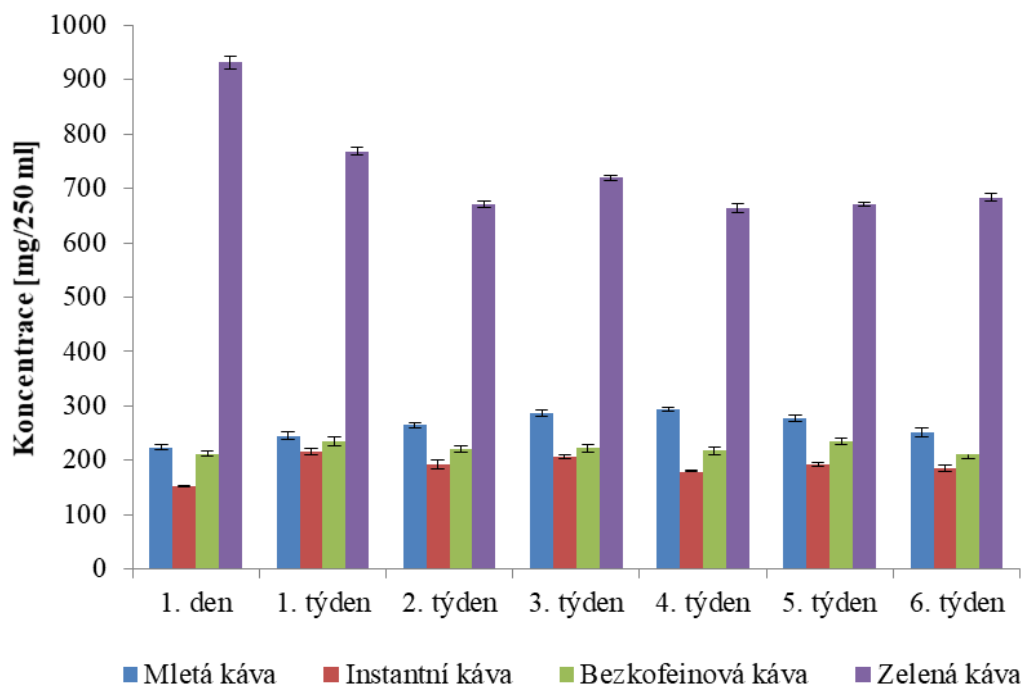
5.4.5 Změny složení energetických nápojů v průběhu uchování

Změna ve složení energetických nápojů byla sledována z hlediska obsahu celkových polyfenolů a hodnoty antioxidační aktivity. Energetické nápoje s přídavkem enkapsulovaných rostlinných extraktů byly analyzovány po dobu 6 týdnů, kdy bylo možné sledovat dynamiku uvolňování polyfenolů a antioxidantů z částic.



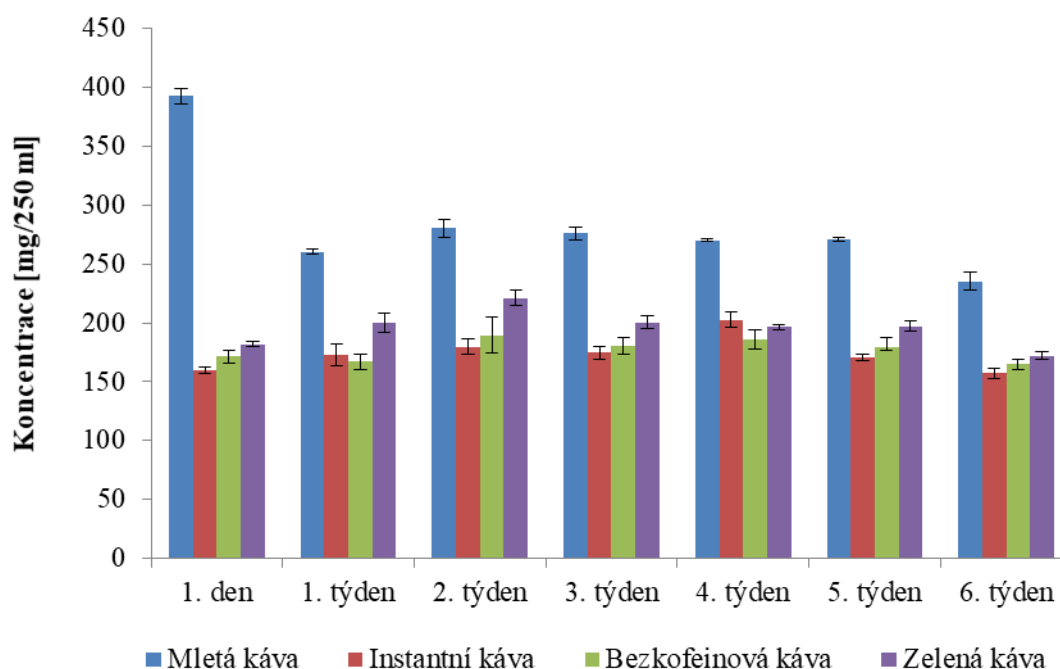
Obrázek 14: Změny množství polyfenolů v energetických nápojích s enkapsulovanými částicemi s extraktem z kakaava

Z grafu (Obrázek 14) je patrné, že liposomové částice s obsahem extraktu z kakaava měly v prostředí kávy dobrou stabilitu. V průběhu času docházelo k postupnému uvolňování polyfenolů z částic. V prostředí mleté, instantní i bezkofeinové kávy došlo k degradaci polyfenolů po třech týdnech. Po dvou týdnech byl rozklad enkapsulované částice s kakaem pozorován v nápoji na bázi zelené kávy.



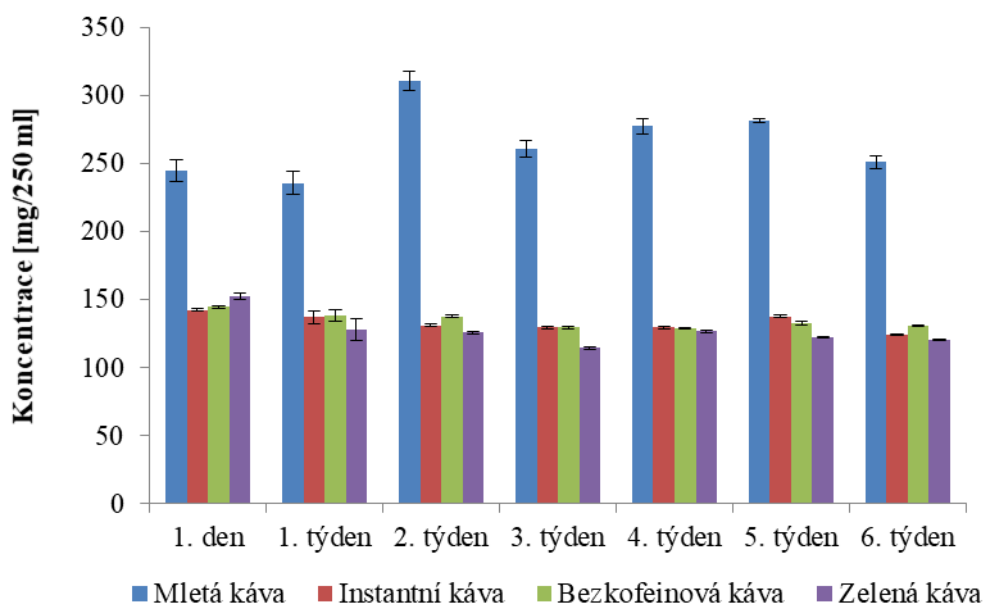
Obrázek 15: Změny množství polyfenolů v energetických nápojích s enkapsulovanými částicemi s extraktem z matchy

Z grafu (Obrázek 15) lze vyčíst, že koncentrace polyfenolů v zelené kávě s částicemi z matchy klesala už od 1. týdne. To mohlo být způsobeno rychlým rozpadem liposomových částic a následnou degradací aktivních látek vlivem mírně kyselého pH matchy a zelené kávy. V prostředí mleté kávy byly liposomové částice podstatně stabilnější. Polyfenoly byly z částic postupně uvolňovány a k degradaci aktivních látek došlo po pěti týdnech.



Obrázek 16: Změny množství polyfenolů v energetických nápojích s enkapsulovanými částicemi s extraktem z guarany

Graf (Obrázek 16) znázorňuje, že liposomová částice s extraktem z guarany se v prostředí mleté kávy rozpadla už po 1. týdnu. Současně docházelo k degradaci polyfenolů způsobené vlivem mírně kyselého prostředí mleté kávy (pH 5,19). Po 1. týdnu došlo k degradaci aktivních látek i v prostředí bezkofeinové kávy. Mnohem lepší stability částic a tedy postupného uvolňování polyfenolů bylo dosaženo v instantní a zelené kávě. Degradace látek nastala v případě instantní kávy po třech týdnech a v případě zelené kávy po čtyřech týdnech. Bylo dosaženo mnohem lepších výsledků než při měření stability samotné liposomové částice s extraktem guarany pomocí DLS ve vodném prostředí.



Obrázek 17: Změny množství polyfenolů v energetických nápojích s enkapsulovanými částicemi s extraktem z kustovnice

Z graficky znázorněných hodnot lze usoudit, že k degradaci polyfenolů i částice z kustovnice došlo už po 1. týdnu. To mohlo být způsobeno vlivem okolního prostředí nebo vlivem pH extraktu z kustovnice, které bylo ze všech využívaných rostlinných extraktů nejkyselější (pH 5,25).

Tabulka 23: Koncentrace polyfenolů v energetických nápojích s liposomy

| Čas | Extrakt | Koncentrace [mg/250 ml] | | | |
|----------|------------|-------------------------|----------------|-------------------|--------------|
| | | Mletá káva | Instantní káva | Bezkofeinová káva | Zelená káva |
| 1. den | Kakao | 232,2 ± 2,4 | 135,3 ± 2,3 | 175,9 ± 5,0 | 621,0 ± 4,1 |
| | Matcha | 223,3 ± 4,8 | 152,5 ± 1,4 | 211,3 ± 4,7 | 931,4 ± 11,1 |
| | Kustovnice | 244,7 ± 7,9 | 142,5 ± 6,8 | 144,8 ± 1,1 | 152,4 ± 2,4 |
| | Guarana | 392,5 ± 6,6 | 159,7 ± 2,2 | 171,4 ± 5,5 | 181,6 ± 2,2 |
| 1. týden | Kakao | 247,3 ± 6,8 | 171,2 ± 3,9 | 198,7 ± 7,1 | 674,7 ± 7,2 |
| | Matcha | 245,3 ± 6,3 | 216,0 ± 5,6 | 235,3 ± 8,0 | 768,1 ± 7,1 |
| | Kustovnice | 235,8 ± 8,6 | 137,2 ± 6,3 | 138,3 ± 4,5 | 127,8 ± 7,9 |
| | Guarana | 260,4 ± 2,4 | 172,7 ± 9,4 | 166,9 ± 6,3 | 200,4 ± 8,3 |
| 2. týden | Kakao | 266,7 ± 0,9 | 196,7 ± 7,8 | 216,0 ± 8,3 | 637,7 ± 5,0 |
| | Matcha | 264,6 ± 4,7 | 192,0 ± 8,6 | 220,0 ± 6,5 | 670,0 ± 5,6 |
| | Kustovnice | 311,0 ± 7,1 | 131,3 ± 0,3 | 137,8 ± 1,0 | 126,1 ± 1,0 |
| | Guarana | 279,7 ± 7,2 | 179,5 ± 6,5 | 221,3 ± 6,3 | 221,3 ± 6,3 |
| 3. týden | Kakao | 265,6 ± 2,4 | 181,1 ± 4,8 | 211,9 ± 3,9 | 682,5 ± 2,7 |
| | Matcha | 286,5 ± 5,4 | 207,2 ± 3,9 | 222,3 ± 6,8 | 719,1 ± 3,9 |
| | Kustovnice | 260,9 ± 6,3 | 129,6 ± 0,4 | 129,8 ± 0,9 | 114,6 ± 0,7 |
| | Guarana | 276,0 ± 5,5 | 174,8 ± 5,5 | 180,6 ± 7,4 | 200,4 ± 5,6 |

| Čas | Extrakty | Koncentrace [mg/250 ml] | | | |
|----------|------------|-------------------------|----------------|-------------------|-------------|
| | | Mletá káva | Instantní káva | Bezkofeinová káva | Zelená káva |
| 4. týden | Kakao | 286,5 ± 9,8 | 178,5 ± 4,7 | 204,0 ± 7,4 | 665,8 ± 0,9 |
| | Matcha | 293,3 ± 3,3 | 178,5 ± 4,1 | 217,6 ± 7,2 | 664,3 ± 8,6 |
| | Kustovnice | 277,6 ± 5,9 | 129,8 ± 0,2 | 129,3 ± 0,5 | 126,8 ± 1,3 |
| | Guarana | 270,3 ± 0,9 | 202,5 ± 6,5 | 186,3 ± 8,3 | 196,2 ± 2,4 |
| 5. týden | Kakao | 279,7 ± 8,9 | 188,9 ± 6,3 | 232,2 ± 4,5 | 672,6 ± 2,4 |
| | Matcha | 277,6 ± 6,5 | 193,1 ± 3,9 | 234,3 ± 6,5 | 670,0 ± 3,2 |
| | Kustovnice | 281,8 ± 1,6 | 137,8 ± 0,8 | 132,9 ± 1,1 | 122,5 ± 0,7 |
| | Guarana | 270,8 ± 1,6 | 170,6 ± 3,1 | 179,5 ± 3,3 | 197,2 ± 4,1 |
| 6. týden | Kakao | 274,5 ± 5,5 | 173,8 ± 1,6 | 206,1 ± 1,8 | 720,1 ± 5,6 |
| | Matcha | 251,5 ± 7,4 | 185,8 ± 6,5 | 210,8 ± 7,1 | 683,6 ± 7,4 |
| | Kustovnice | 251,2 ± 4,8 | 124,5 ± 0,1 | 131,3 ± 0,5 | 120,8 ± 0,4 |
| | Guarana | 235,3 ± 7,4 | 157,1 ± 4,8 | 165,4 ± 4,8 | 172,2 ± 3,1 |

Jako další byla pro charakterizaci energetického nápoje sledována koncentrace antioxidantů. V následující tabulce můžeme vidět množství antioxidační aktivity ve všech kombinacích energetických nápojů s enkapsulovanými rostlinnými extrakty v závislosti na čase. V případě liposomů z kakaa a matchy došlo po 1. týdnu ke zvýšení koncentrace antioxidantům ve všech kávových základech. Aktivní částice byly degradovány po dvou týdnech. Naopak u částic z kustovnice a guarany došlo k degradaci antioxidantů už v 1. týdnu.

Tabulka 24: Antioxidační aktivita energetických nápojů s liposomy

| Čas | Extrakty | Koncentrace [mg/250 ml] | | | |
|----------|------------|-------------------------|----------------|-------------------|-------------|
| | | Mletá káva | Instantní káva | Bezkofeinová káva | Zelená káva |
| 1. den | Kakao | 125,6 ± 1,1 | 124,7 ± 1,5 | 124,4 ± 0,3 | 123,4 ± 0,4 |
| | Matcha | 125,3 ± 0,4 | 126,3 ± 0,8 | 126,2 ± 0,9 | 123,8 ± 0,1 |
| | Kustovnice | 131,9 ± 0,4 | 126,6 ± 0,4 | 122,3 ± 1,1 | 125,7 ± 0,1 |
| | Guarana | 132,8 ± 0,3 | 131,6 ± 0,8 | 131,1 ± 0,5 | 132,9 ± 0,4 |
| 1. týden | Kakao | 132,0 ± 0,8 | 130,1 ± 1,3 | 132,3 ± 0,7 | 130,0 ± 0,1 |
| | Matcha | 133,3 ± 0,0 | 131,2 ± 0,1 | 132,6 ± 0,0 | 129,9 ± 1,3 |
| | Kustovnice | 121,2 ± 0,8 | 119,9 ± 0,0 | 119,8 ± 1,5 | 109,3 ± 0,5 |
| | Guarana | 120,7 ± 0,7 | 119,2 ± 0,1 | 119,9 ± 0,5 | 121,8 ± 1,3 |
| 2. týden | Kakao | 120,7 ± 0,7 | 118,2 ± 1,6 | 123,0 ± 0,9 | 119,8 ± 1,2 |
| | Matcha | 121,1 ± 0,1 | 120,3 ± 0,5 | 120,8 ± 0,8 | 119,2 ± 0,7 |
| | Kustovnice | 123,9 ± 0,3 | 122,5 ± 1,1 | 123,5 ± 0,3 | 113,3 ± 2,1 |
| | Guarana | 122,4 ± 0,9 | 120,9 ± 0,4 | 121,0 ± 1,6 | 123,1 ± 0,5 |
| 3. týden | Kakao | 123,5 ± 0,3 | 120,2 ± 1,5 | 123,9 ± 1,6 | 120,4 ± 0,1 |
| | Matcha | 122,8 ± 0,9 | 123,6 ± 0,4 | 125,0 ± 0,8 | 121,8 ± 0,3 |
| | Kustovnice | 135,9 ± 0,7 | 131,7 ± 0,7 | 126,0 ± 0,7 | 115,2 ± 0,4 |
| | Guarana | 135,1 ± 1,2 | 134,0 ± 0,1 | 133,6 ± 0,4 | 136,5 ± 1,2 |
| 4. týden | Kakao | 135,5 ± 0,1 | 134,4 ± 0,1 | 135,9 ± 0,7 | 132,5 ± 0,1 |
| | Matcha | 132,5 ± 0,9 | 135,5 ± 0,1 | 136,7 ± 0,5 | 133,9 ± 0,5 |

| Čas | Extrakty | Koncentrace [mg/250 ml] | | | |
|----------|------------|-------------------------|----------------|-------------------|-------------|
| | | Mletá káva | Instantní káva | Bezkofeinová káva | Zelená káva |
| 4. týden | Kustovnice | 118,8 ± 0,1 | 112,9 ± 0,5 | 116,3 ± 0,3 | 98,0 ± 0,9 |
| | Guarana | 116,5 ± 0,8 | 116,0 ± 0,1 | 115,0 ± 1,9 | 118,5 ± 0,1 |
| 5. týden | Kakao | 119,7 ± 0,0 | 118,8 ± 0,3 | 120,6 ± 1,1 | 118,7 ± 0,1 |
| | Matcha | 120,2 ± 0,1 | 119,3 ± 0,0 | 116,6 ± 1,5 | 118,3 ± 0,1 |
| | Kustovnice | 123,3 ± 1,6 | 117,7 ± 3,6 | 116,7 ± 1,1 | 105,6 ± 4,7 |
| | Guarana | 123,7 ± 1,3 | 117,7 ± 3,6 | 121,5 ± 2,3 | 123,3 ± 0,3 |
| 6. týden | Kakao | 123,7 ± 0,0 | 120,2 ± 1,5 | 123,6 ± 0,1 | 119,6 ± 0,7 |
| | Matcha | 122,5 ± 1,1 | 122,4 ± 0,4 | 124,9 ± 0,1 | 120,3 ± 1,9 |
| | Kustovnice | 124,2 ± 0,8 | 119,2 ± 2,0 | 118,9 ± 0,5 | 107,6 ± 1,6 |
| | Guarana | 124,2 ± 0,3 | 119,8 ± 1,2 | 122,4 ± 1,5 | 124,1 ± 0,1 |

Hodnota antioxidační aktivity v průběhu času rostla vlivem uvolňování aktivních látek do roztoku.

5.5 Senzorická analýza

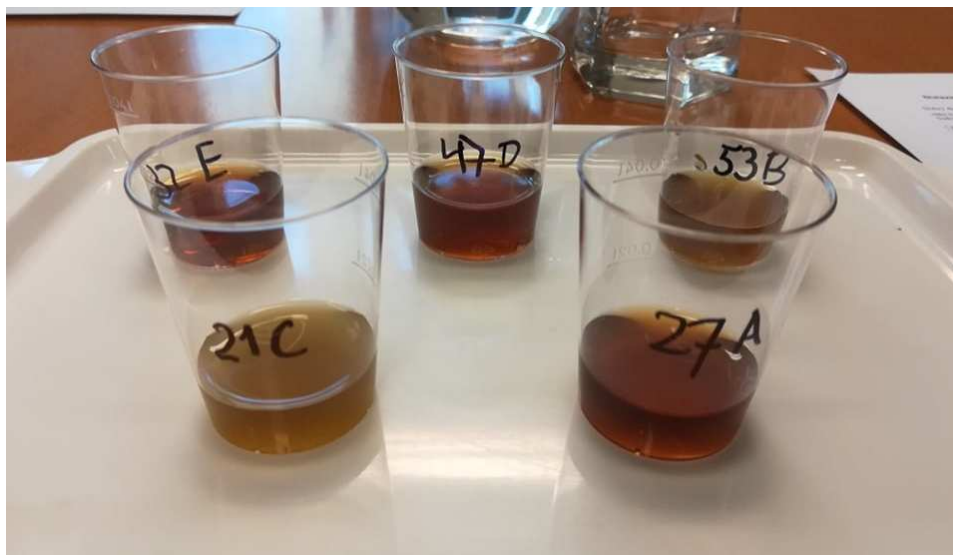
Senzorické hodnocení bylo provedeno u pěti vzorků nových typů energetických nápojů na bázi kávy. Energetické nápoje posuzovala čtyřicetiletá skupina hodnotitelů složená ze zaměstnanců a studentů Fakulty chemické VUT v Brně. Pro sensorické hodnocení byly vybrány energeticky i antioxidačně nejlepší kombinace nápojů, které na základě předběžného výběru vykazovaly současně nejpříjemnější chuťové vlastnosti. Hodnotitelům bylo předloženo 5 vzorků energetických nápojů společně s dotazníkem sensorického hodnocení, který je uveden v Příloze 2. Hodnocena byla nejen celková chuť nápoje, ale i vzhled, barva, vůně, sladkost, hořkost a acidita.



Obrázek 18: Záznam ze sensorické analýzy

Tabulka 25: Seznam energetických nápojů pro sensorické hodnocení

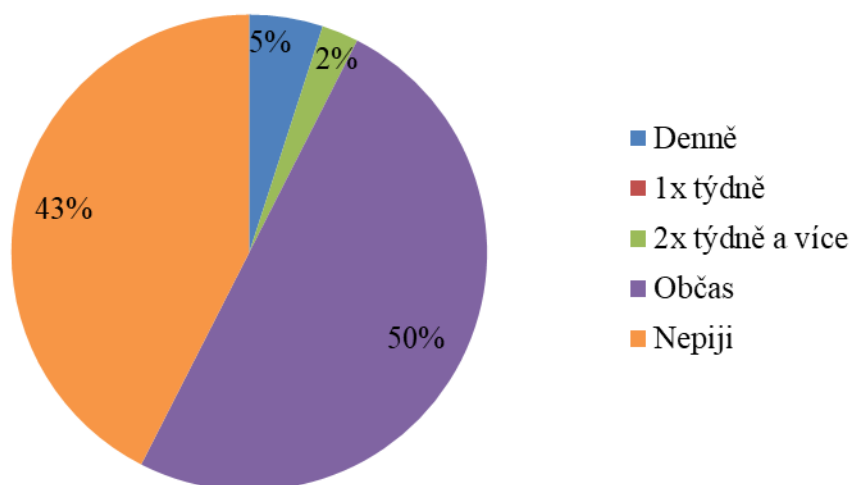
| Číslo vzorku | Složení energetického nápoje |
|--------------|---|
| 32 E | Mletá káva s přídavkem extraktu z kakaa |
| 47 D | Instantní káva s přídavkem extraktu z guarany |
| 21 C | Zelená káva s přídavkem extraktu z matchy |
| 27 A | Mletá káva s přídavkem extraktu z guarany |
| 53 B | Zelená káva s přídavkem extraktu z kustovnice |



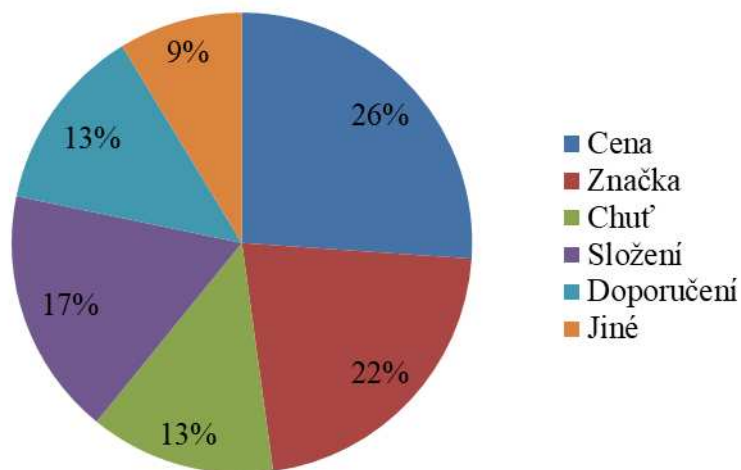
Obrázek 19: Energetické nápoje pro sensorické hodnocení

Všechny energetické nápoje využitě k sensorickému hodnocení byly z chuťových důvodů slazené třtinovým cukrem.

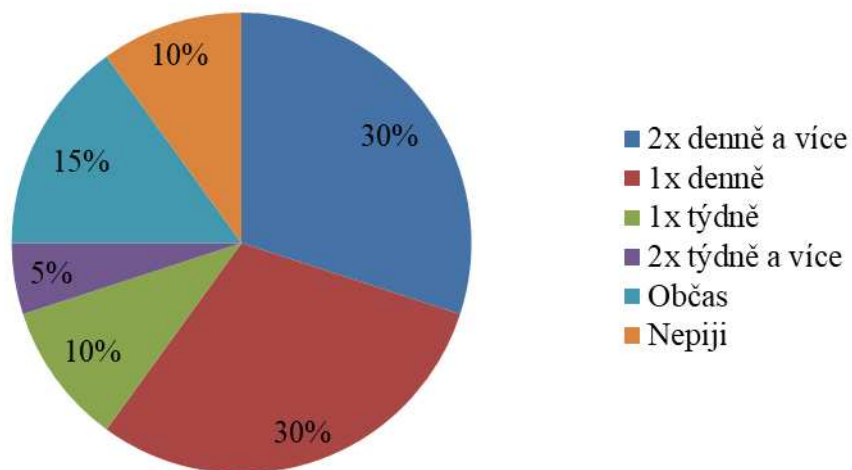
Energetické nápoje hodnotilo 26 žen a 14 mužů a pouze 5 % z nich byli kuřáci. Převážná většina respondentů konzumuje energetický nápoj jen občas nebo vůbec, pouhých 5 % konzumuje nápoj denně a další 2 % minimálně 2x týdně.



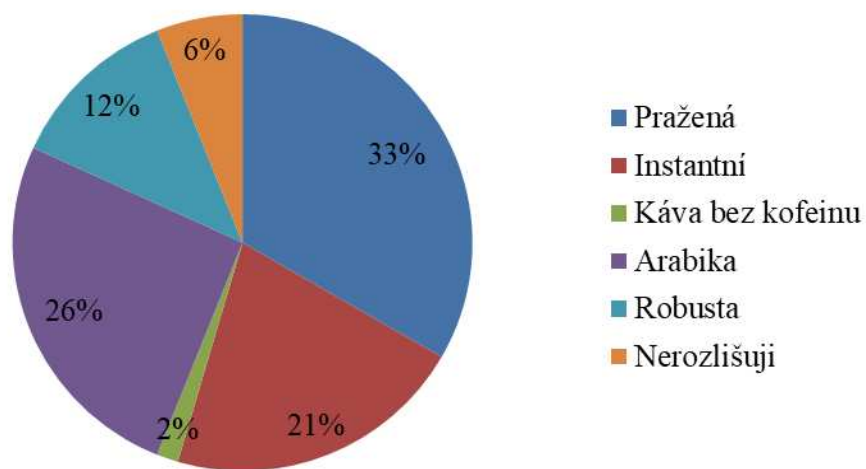
Obrázek 20: Četnost konzumace energetických nápojů



Obrázek 21: Kritéria výběru energetických nápojů



Obrázek 22: Četnost konzumace kávy

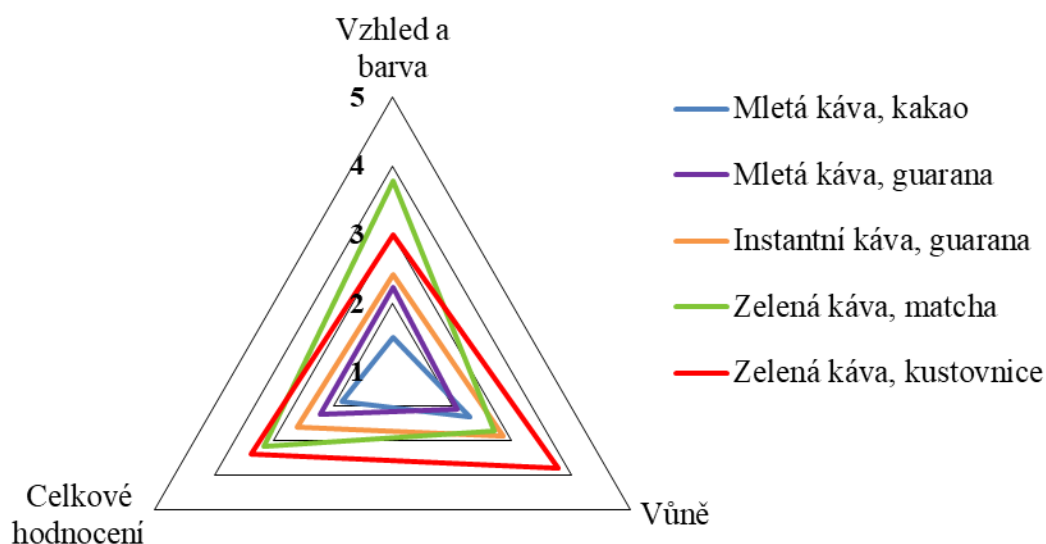


Obrázek 23: Přefrované druhy kávy

Bylo zjištěno, že 20 % hodnotitelů nevěnuje pozornost složení energetického nápoje. Největší roli při výběru energetického nápoje hraje cena, značka, případně složení. Nejmenší vliv pak má chuť společně s doporučením od známých či jiné faktory, kde respondenti uvedli, že jejich výběr ovlivňuje účinnost daného energetického nápoje. Minimálně 1x denně kávu konzumuje asi 60 % hodnotitelů, 15 % ji konzumuje minimálně 1x týdně a dalších 15 % jen občas. Naopak 10 % respondentů kávu vůbec nepije. Konzumenty je preferována zejména pražená nebo instantní káva arabika. Menší část z nich dává přednost robustě, případně kávě bezkofeinové. Dále bylo zjištěno, že převážná většina hodnotitelů konzumuje nápoje slazené cukrem. Pouze 18 % respondentů upřednostňuje nápoje s umělými sladidly.

5.5.1 Senzorické hodnocení vzhledu a vůně nápoje

V této části byl hodnocen vzhled, barva a vůně energetického nápoje. Výsledkem je graf, kde hodnota 1 je vynikající a hodnota 5 naopak nevyhovující.



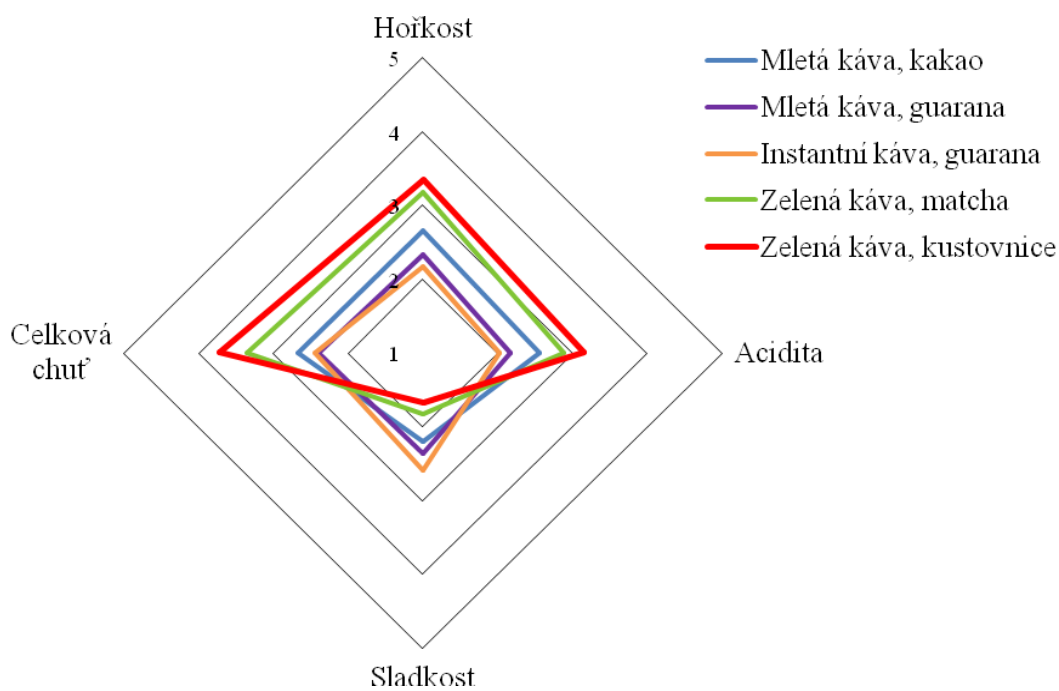
Obrázek 24: Senzorické hodnocení vzhledu a vůně energetického nápoje

Z výsledků senzoričné analýzy lze vyčíst, že z hlediska vzhledu a barvy byla nejlépe hodnocena směs mleté kávy a kaka, která byla hodnocena průměrnou známkou 1,5. Druhou nejlepší směsí byla mletá káva s guaranou se známkou 2,2. Známkou 2,4 získala směs instantní kávy a guarany, známku 3,0 dostala směs zelené kávy a kustovnice a poslední místo obsadila směs zelené kávy a matchy s průměrnou známkou 3,8. Nejhůře hodnocená směs měla zelenou barvu a mírné zakalení, což mohl být důvod, proč tato směs nebyla konzumenty preferována. Dalším parametrem hodnocení nápojů byla jejich vůně. Nejlepší hodnocení získaly směsi se základem z mleté kávy obohacené kakaem nebo guaranou. Na místě třetím byla směs zelené kávy s matchou hodnocená známkou 2,7. Známkou 2,9 obdržela směs instantní kávy

a guarany. Jako nejhorší z hlediska vůně byla hodnocena směs zelené kávy a kustovnice s průměrnou známkou 3,8. Další částí bylo celkové hodnocení energetického nápoje. Z hlediska již zmíněných hodnocených parametrů se v celkovém hodnocení na prvním místě s průměrným hodnocením 1,9 umístil nápoj z mleté kávy a kakaa. Druhé místo obsadil nápoj z mleté kávy a guarany, který byl hodnocen průměrnou známkou 2,2. Třetí místo se známkou 2,6 obsadila směs instantní kávy a guarany. Na čtvrtém místě se umístila směs zelené kávy a matchy. Poslední místo získal nápoj zelené kávy s kustovnicí. A byl hodnocen známkou 3,4.

5.5.2 Senzorické hodnocení chuti nápoje

Dalším parametrem hodnocení byla hořkost, kyselost, sladkost i celková chuť připravených energetických nápojů. Výsledkem je graf, kde hodnota 1 je vynikající a hodnota 5 naopak nevyhovující.



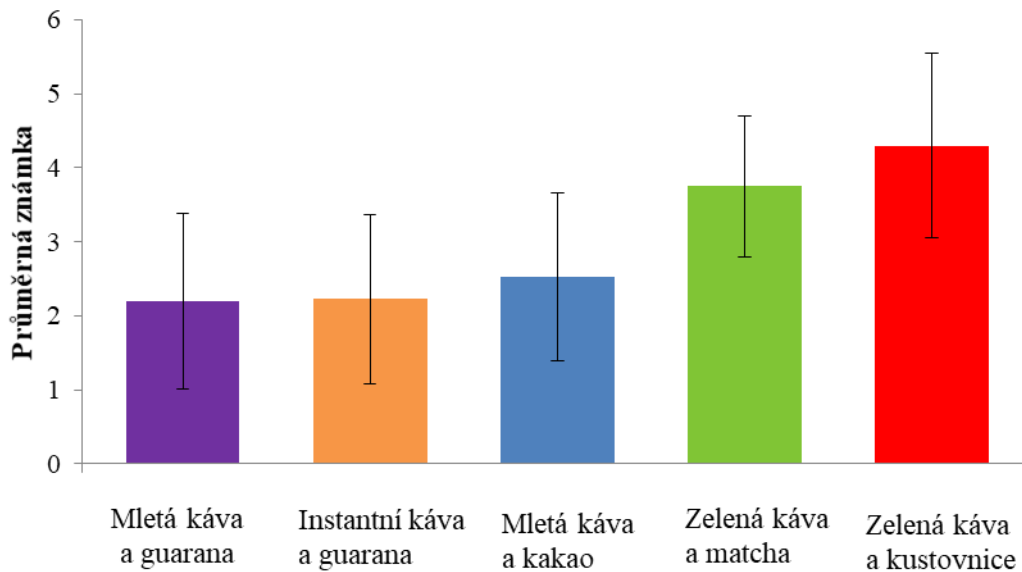
Obrázek 25: Senzorické hodnocení chuti

Ze získaných výsledků vyplývá, že vzorek s nejvyšší hořkostí měl nejvyšší kyselost a naopak vzorky s nižší hořkostí vykazovaly nižší kyselost. Z hlediska chuti byl nejlépe hodnocen energetický nápoj složený z mleté kávy a guarany, který získal známku 2,4. Jeho hodnocení v rámci hořkosti, kyselosti i sladkosti bylo vyrovnané a průměrná známka se pohybovala kolem 2,3. Druhým nejlepším vzorkem se známkou 2,5 byla směs instantní kávy a guarany. Ta byla z hlediska hořkosti, kyselosti i sladkosti hodnocena nejlépe a průměrná známka se ve všech částech pohybovala kolem 2,2. Třetím vzorkem byla směs mleté kávy a kakaa, která byla ve všech částech hodnocena průměrnou známkou 2,7.

Podle respondentů se jednalo o nejvíce chuťově vyrovnaný vzorek. Nejhoršími vzorky z hlediska chuti byly energetické nápoje na bázi zelené kávy. Směs zelené kávy s matchou byla hodnocena známkou 3,4 a směs zelené kávy s kustustovnicí známkou 3,7. Tyto vzorky měly oproti ostatním vzorkům vysokou kyselost, hořkost a nejnižší sladkost.

5.5.3 Pořadový test energetických nápojů

Na konci sensorického hodnocení byl respondenty proveden pořadový test, který určil pořadí nápojů dle jejich preferencí.



Obrázek 26: Schéma preferencí energetických nápojů

V konečném hodnocení byly nejlépe hodnoceny energetické nápoje z mleté kávy a guarany a instantní káva s guaranou, které společně obsadily první příčku. Jako druhá se umístila směs mleté kávy a kakaa a třetí místo obsadila zelená káva s matchou. Poslední, a tedy nejhůře hodnocena byla směs zelené kávy s kustovnicí.

6 ZÁVĚR

Předložená bakalářská práce byla zaměřena na vývoj nového energetického nápoje na bázi kávy. Cílem práce bylo připravit nový energetický nápoj s přidavkem aktivních látek ve formě rostlinných extraktů, charakterizovat nový nápoj a provést jeho senzoryckou analýzu.

V experimentální části práce byla provedena charakteristika kávových základů mleté, instantní, bezkofeinové a zelené kávy. Z hlediska obsahu polyfenolů, flavonoidů i antioxidační aktivity byla nejlepším zdrojem instantní káva. Další část byla zaměřena na charakterizaci rostlinných extraktů z kakaa, matchy, guarany a kustovnice, kterými byl energetický nápoj obohacován. Největší množství polyfenolů bylo obsaženo v čaji matcha. Nejvyšší hodnoty flavonoidů byly naměřeny v extraktu z guarany. Všechny rostlinné extrakty disponovaly podobnými hodnotami antioxidační aktivity.

Pro přípravu energetického nápoje bylo využito metody přidavku enkapsulovaných částic. Rostlinné extrakty byly enkapsulovány do liposomových částic. Enkapsulace byla provedena z důvodu ochrany aktivních látek před okolním prostředím a zamezení jejich degradace. Enkapsulační účinnost liposomových částic byla stanovena na základě rozdílné koncentrace polyfenolů před a po enkapsulaci. Enkapsulační účinnost liposomových částic se pohybovala v rozmezí 86,9–99,8 %. Nejvíce polyfenolů bylo do liposomů enkapsulováno z extraktu matchy.

Dále byla pomocí DLS změřena velikost částic, která se pohybovala v rozmezí 163–180 nm a stabilita částic dána hodnotou zeta potenciálu. Zeta potenciál připravených liposomových částic byl v rozmezí od –42 mV do –35 mV. Za hranici hodnot zeta potenciálu je považováno rozmezí –30 mV a 30 mV. Hodnoty zeta potenciálů přesahovaly hranici –30 mV, z čehož lze usoudit, že připravené částice byly stabilní. Dále byla u částic po dobu 6 týdnů sledována dlouhodobá stabilita. Všechny liposomové částice vykazovaly dobrou stabilitu s výjimkou guarany, kde částice degradovaly už po 1. týdnu. Stabilita liposomových částic závisí na pH prostředí. Nejstabilnější byly liposomové částice s kustovnicí a matchou.

Na závěr byly připraveny kombinace energetických nápojů, které byly charakterizovány a senzorycky analyzovány. Orientační senzoryckou zkouškou bylo zjištěno, že kombinace mleté kávy s guaranou a instantní kávy s guaranou byly spotřebitelsky nejpříjemnější. Toto zjištění lze považovat za pozitivní, poněvadž guarana je velmi dobrým přírodním zdrojem kofeinu a může být využita k vývoji nového typu energetických nápojů na bázi kávy s přírodní složkou a s řízeným uvolňováním aktivních látek.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] SEIFERT, Sara M., Judith L. SCHAECHTER, Eugene R. HERSHORIN a Steven E. LIPSHULTZ. Health Effects of Energy Drinks on Children, Adolescents, and Young Adults. *Pediatrics* [online]. 2016, 137(5), 511-528 [cit. 2018-09-30]. DOI: 10.1542/peds.2016-0454. ISSN 0031-4005. Dostupné z: <https://pediatrics.aappublications.org/content/137/5/e20160454>
- [2] SUKOVÁ, Irena. Návrh pravidel pro energetické nápoje [online]. [cit. 2018-09-30]. Dostupné z: <http://www.agronavigator.cz/default.asp?ch=13&typ=1&val=100019&ds=158>
- [3] SCHAFFER, Stephen W., Kayoko SHIMADA, ChianJu JONG, Takashi ITO, Junichi AZUMA a Kyoko TAKAHASHI. Effect of taurine and potential interactions with caffeine on cardiovascular function. *Amino Acids* [online]. 2014, 46(5), 1147-1157 [cit. 2018-10-03]. DOI: 10.1007/s00726-014-1708-0. ISSN 0939-4451. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00726-014-1708-0>
- [4] SEIDL, Rainer, A. PEYRL, R. NICHAM a E. HAUSER. A taurine and caffeine containing drink stimulates cognitive performance and well-being. *Amino Acids* [online]. 2000, 19(3-4), 635-642 [cit. 2018-10-03]. DOI: 10.1007/s007260070013. ISSN 0939-4451. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s007260070013>
- [5] FAZLUL, Huq. Molecular Modelling Analysis of the Metabolism of Caffeine. *Asian Journal of Biochemistry* [online]. *Academic Journals Inc*, 2006, 1(4), 276-286 [cit. 2018-10-25]. DOI: 10.3923/ajb.2006.276.286 ISSN 1815-9923. Dostupné z: <https://scialert.net/abstract/?doi=ajb.2006.276.286>
- [6] CHAMBERS, Kenneth P. Caffeine and health research. New York: *Nova Biomedical Books*, 2009. ISBN 9781607416791.
- [7] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [8] WINSTON, Anthony P., Elizabeth HARDWICK a Neema JABERI. Neuropsychiatric effects of caffeine. *Advances in Psychiatric Treatment* [online]. 2005, 11(11), 432-439. [cit. 2018-10-05]. DOI: 10.1192/apt.11.6.432. ISSN 1472-1481. Dostupné z: <https://doi.org/10.1192/apt.11.6.432>
- [9] BABU, Kavita M., Richard J. CHURCH a William LEWANDER. Energy Drinks: The New Eye-Opener For Adolescents. *Clinical Pediatric Emergency Medicine* [online]. 2008, 9(1), 35-42 [cit. 2018-11-06]. DOI: 10.1016/j.cpem.2007.12.002. ISSN 15228401. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1522840107000997>
- [10] HIGDON, Jane V., Balz FREI. Coffee and Health: A Review of Recent Human Research. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2006, 46(2), 101-

- 123 [cit. 2019-03-12]. DOI: 10.1080/10408390500400009. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408390500400009>
- [11] MINERS, John O. a Donald J. BIRKETT. The use of caffeine as a metabolic probe for human drug metabolizing enzymes. *General Pharmacology: The Vascular System* [online]. 1996, 27(2), 245-249 [cit. 2018-12-14]. DOI: 10.1016/0306-3623(95)02014-4. ISSN 03063623. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0306362395020144>
- [12] GRANDJEAN, Ann C., Kristin J. REIMERS, Karen E. BANNICK a Mary C. HAVEN. The Effect of Caffeinated, Non-Caffeinated, Caloric and Non-Caloric Beverages on Hydration. *Journal of the American College of Nutrition* [online]. 2000, 19(5), 591-600 [cit. 2018-12-14]. DOI: 10.1080/07315724.2000.10718956. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/12300700>
- [13] Čas na kávu V. dTest. 2000, 4, 20-21. ISSN 1210-731X.
- [14] ZIMMERMAN, Michael P., Joseph PULLIAM, Julie SCHWENGELS a Steven E. MACDONALD. Caffeine intoxication: A near fatality. *Annals of Emergency Medicine* [online]. 1985, 14(12), s. 1227-1229 [cit. 2018-10-05]. ISSN 01960644. DOI: 10.1016/S0196-0644(85)81035-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196064485810350>
- [15] GOKULAKRISHNAN, Subramanian, Krishnan CHANDRARAJ a Sathyanarayana N. GUMMADI. Microbial and enzymatic methods for the removal of caffeine. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2005, 37(2), 225-232 [cit. 2018-10-16]. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.03.004. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022905001055?via%3Dihub>
- [16] LEVINE, Allens S., Catherine M. KOTZ, Blake A. GOSNELL. Sugars: hedonic aspects, neuroregulation, and energy balance. *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. 2003, 78(4), 834-842 [cit. 2018-10-05]. ISSN 0002-9165. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/ajcn/78.4.834S>.
- [17] POPKIN, Barry M., Kiyah J. DUFFEY. Sugar and Artificial Sweeteners: Seeking the Sweet Truth. *Nutrition Guide for Physicians*. 2010, 25-38 [cit. 2018-10-05]. ISBN: 978-1-60327-431-9. DOI: 10.1007/978-1-60327-431-9_3. Dostupné z: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-60327-431-9_3
- [18] STRUNECKÁ, Anna a Jiří PATOČKA. Doba jedová 2. Praha: Triton, 2012. ISBN 978-80-7387-555-8.
- [19] RENWICK, Andrew G., Acceptable daily intake and the regulativ of intense sweeteners. *Food Additives Contaminants* [online]. 1990, 7(4), 463-475 [cit. 2018-10-05]. DOI: 10.1080/02652039009373909. Dostupné z: <https://scihub.se/10.1080/02652039009373909>
- [20] BROMOVÁ, Martina, Jiří PATOČKA, Andrea DALIHODOVÁ, Petra HOLINKOVÁ, Iva LICHTENBERGOVÁ, Marie MAXOVÁ a Nawa MUBIANA.

- Zdravotní rizika energetických nápojů. *Prevence úrazů, otrav a násilí* [online]. 2010, 4(2), 205-224 [cit. 2018-10-05]. ISSN1804-7858. Dostupné z:<http://casopis-zsfju.zsf.jcu.cz/prevence-urazu-otrav-a-nasili/clanky/2~2010/170-zdravotni-rizika-energetickych-napoju>
- [21] CIBULKA, Roman. Metabolické účinky karnitinu a jeho význam v medicíně. *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. 2005, 13(34), 24-28 [cit. 2018-10-05]. Dostupné z: <http://nts.prolekare.cz/cls/Ukazobsahf698.html?cislo=1277&jazyk=&typ=1>
- [22] Zákon č. 110/1997Sb., zákon o potravinách a tabákových výrobcích. [online] Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1997-110>
- [23] KADLEC, Pavel, Karel MELZUCH a Michal VOLDŘICH. Co byste měli vědět o výrobě potravin?: technologie potravin. Ostrava: KeyPublishing, 2009, 536 s. ISBN 978-80-7418-051-4.
- [24] KREJČÍ, Ivan: O kávě a čaji, aneb, Víme, proč je pijeme?. Praha: Grada. 2000, 100 s. ISBN 80-7169-535-1.
- [25] EASTO, Jessica a Andreas WILLHOFF. Manuál pro milovníka kávy: jak si doma připravit tu nejlepší craft kávu. Praha: GradaPublishing. 2018, 261 s. ISBN 978-80-271-0640-0.
- [26] KADLEC, Pavel. Technologie potravin II. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. 2002, 236 s. ISBN 80-7080-510-2.
- [27] PÖSSL, Martin. Káva jako životní styl. Praha: Grada, 2010, 116 s. *Zdraví & životní styl*. ISBN 978-80-247-2822-3.
- [28] SCHIMPL, C. Flávia, José F. da SILVA, José F. de Carvalho GONÇALVES a Paulo MAZZAFERA. Guarana: Revisiting a highlycaffeinated plant from the Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*[online]. 2013, 150(1), 14-31 s. [cit. 2019-04-15]. DOI: 10.1016/j.jep.2013.08.023. ISSN 03788741. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0378874113005771>
- [29] FINNEGAN, Derek. The health effects of stimulant drinks. *Nutrition Bulletin*, 2003. 28(2), 147-155 [cit. 2019-04-15].DOI: 10.1046/j.1467-3010.2003.00345.x. ISSN 1471-9827. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/227789917_A_Review_of_the_Health_Effects_of_Stimulant_Drinks
- [30] ARMITAGE, James; Dawn EDWARDS, Neil LANCASTER, John G. HILLIER, Roy LANCASTER a Richard SANFORD. *The Hillier manual of trees & shrubs*. 8th ed. London: Royal Horticultural Society. 2014. 565 s. ISBN 9781907057472.
- [31] ALTINTAS, Ayhany, Müberra KOSAR, Neşe KIRIMER, K. Husnu Can BASER, Betuel DEMIRCI. Composition of the essential oils of *Lyciumbarbarum* and *L. ruthenicum*fruits. *Chemistry of natural compounds* [online]. 2006, 42(1), 24-25 [cit. 2019-04-15]. DOI: 10.1007/s10600-006-0028-3. ISSN 0009-3130. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10600-006-0028-3>.

- [32] YEH, Yi-Chun, Tae-Shik HAHM, Cristina M. SABLIOV a Y. Martin LO. Effects of Chinese wolfberry (*Lycium chinense* P. Mill.) leaf hydrolysates on the growth of *Pediococcus acidilactici*. *Bioresource Technology* [online]. 2008, 99(5), 1383-1393 [cit. 2019-04-21]. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.01.058. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852407001575>
- [33] YIN, Guihao a Yuli DANG. Optimization of extraction technology of the *Lycium barbarum* polysaccharides by Box–Behnken statistical design. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2008, 74(3), 603-610 [cit. 2018-04-21]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2008.04.025. ISSN 01448617. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861708001872>
- [34] CHEADLE, Louise a Nick KILBY. *Kniha o čaji matcha: vše, co jste o tomto úžasném zeleném superčaji chtěli vědět*. Praha: Euromedia, 2017. Esence. ISBN 978-80-7549-284-5.
- [35] GAYLARD, Linda. *Čajové opojení*. Praha: Euromedia, 2017. Esence. ISBN 978-80-7549-282-1.
- [36] YUSUF, Nabihah, Cynthia IRBY, Santosh K. KATIYAR a Craig A. ELMETS. Photoprotective effects of green tea polyphenols. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* [online]. 2007, 23(1), 48-56 [cit. 2019-04-21]. DOI: 10.1111/j.1600-0781.2007.00262.x. ISSN 0905-4383. Dostupné z: <https://scihub.se/10.1111/j.1600-0781.2007.00262.x>
- [37] PEHLE, Tobias. *Čokoláda: antidepresivum, afrodiziakum, antioxidant*. Čestlice: Rebo, 2009. ISBN 978-80-255-0049-1.
- [38] COADY, Chantal. *Čokoláda: Průvodce znalce světem nejjemnějších čokoládových cukrovinek*. Praha: Fortuna Print. ISBN 80-86144-54-2.
- [39] SMÍŠEK, J., 1982: *Technologie výroby cukrovinek a trvanlivého pečiva: učební texty pro učební obor 06-97-02 Potravinářská výroba se zaměřením pro cukrovinky*. Praha: Čokoládovny, o.p., 1982.
- [40] LOSADA-BARREIRO, Sonia a Carlos BRAVO-DÍAZ. Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2017, 133, 379-402 s. [cit. 2018-10-05]. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.03.061. ISSN 02235234. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523417302258>
- [41] CURIN, Yann a Ramarason ANDRIANTSITOHAINA: Polyphenols as potential therapeutic agents against cardiovascular diseases. *Pharmacological Reports* [online]. 2005, 57, 97-107 s. [cit. 2018-10-05]. ISSN 1734-1140. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/7357835_Polyphenols_as_potential_therapeutic_agents_against_cardiovascular_diseases
- [42] NEDOVIC, Viktor, Ana KALUSEVIC, Verica MANOJLOVIC, Steva LEVIC a Branko BUGARSKI. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science* [online]. Elsevier, 2011, 1, 1806-1815 [cit. 2019-

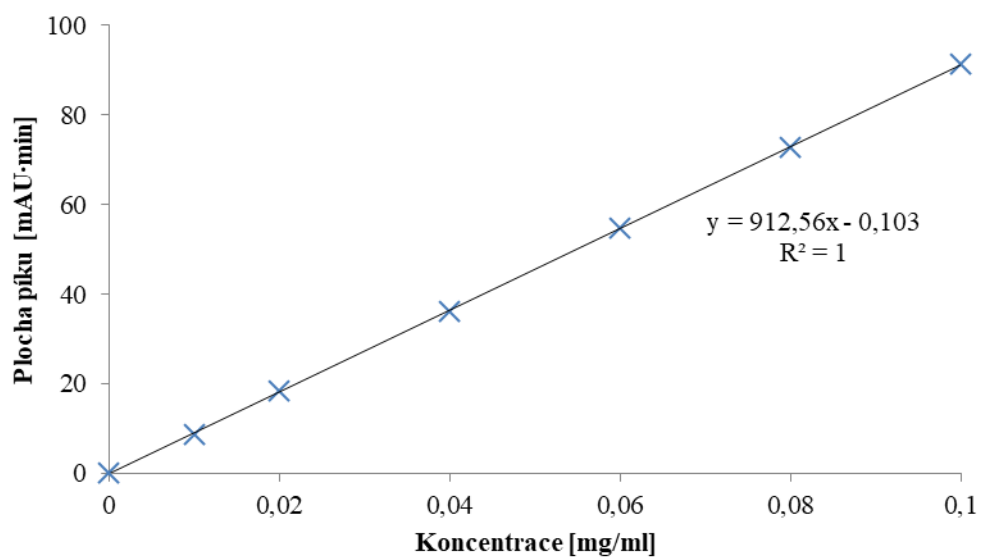
- 04-11]. DOI: 10.1016/j.profoo.2011.09.265. ISSN 2211601X. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211601X11002665?via%3Dihub>
- [43] HADAŠOVÁ, Eva. Lipozomální lékové formy. *Remedia* [online]. 2006, 16(4), 433-437 [cit. 2019-04-03]. Dostupné z: <http://www.remédia.cz/Clanky/Lekoveformy/Lipozomalnikove-formy/6-H-gC.magarticle.aspx>
- [44] VRANÍKOVÁ, Barbora a Jan GAJDZIOK. Metody používané ve farmaceutické technologii ke zvyšování biologické dostupnosti špatně rozpustných léčiv po perorálním podání. *Česká a slovenská farmacie* [online]. 2015, 64(5), 159-172 [cit. 2019-04-11]. ISSN 1805-4439. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-slovenska-farmacie/2015-5-6/metody-pouzivane-ve-farmaceuticke-technologie-ke-zvysovani-biologicke-dostupnosti-spatne-rozpustnych-leciv-po-peroralnim-podani-57254>
- [45] FERNANDES, D. Gabriel, Rosana M. ALBERICI, Gustavo G. PEREIRA, Elaine C. CABRAL, Marcos N. EBERLIN a Daniel BARRERA-ARELLANO. Direct characterization of commercial lecithins by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry* [online]. 2012, 135(3): 1855-1860 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.06.072. Dostupné z: <https://sci-hub.se/10.1016/j.foodchem.2012.06.072>
- [46] International Journal of Pharmaceutical Studies and Research: Liposome: Methods of Preparation and Applications [online]. 2012, 3(2) [cit. 2019-04-07]. ISSN 2229-4619. Dostupné z: <http://www.technicaljournalsonline.com/ijpsr/VOL%20III/IJPSR%20VOL%20III%20ISSUE%20II%20APRIL%20JUNE%202012/Article%204%20April%20June%202012.pdf>
- [47] KLOUDA, Pavel. Moderní analytické metody. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
- [48] MALVERN INSTRUMENTS LTD. 2007, 2009, 2012, 2013. ZetasizerNanoSeries User Manual. 1.1. Anglie, 2013. Dostupné z: <https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Malvern%20Zetasizer%20ZS%20DLS%20user%20manual.pdf>
- [49] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. Moderní HPLC separace v teorii a praxi. 1. vyd. Praha: Lucie Nováková, 2013, ISBN 978-80-260-4243-3.
- [50] KARASTOGIANNI, Sofia, Stella GIROUSI a Sotiris SOTIROPOULOS. pH: Principles and Measurement. *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier [online]. 2016, 333-338 [cit. 2019-04-15]. DOI: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00538-9. ISBN 9780123849533. Dostupné také z: <https://sci-hub.se/10.1016/B978-0-12-384947-2.00538-9>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

| | |
|------|--|
| ABTS | 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt |
| AMP | Adenosinmonofosfát |
| ATP | Adenosintrifosfát |
| CSN | Centrální nervová soustava |
| DDD | Doporučená denní dávka |
| DNA | Deoxyribonukleová kyselina |
| EFSA | Evropský úřad pro bezpečnost potravin |
| HDL | High-density lipoprotein |
| HPLC | Vysokoučinná kapalinová chromatografie |
| LDL | Low-density lipoprotein |

9 PŘÍLOHY

9.1 Příloha 1: Kalibrační křivka



Obrázek 27: Kalibrační závislost kofeinu

9.2 Příloha 2: Dotazník senzorického hodnocení nových typů energetických nápojů

Dobrý den,

ráda bych Vás požádala o vyplnění krátkého dotazníku, který se týká energetických nápojů.

Výsledky budou použity ke zpracování mé bakalářské práce. Dotazník je zcela anonymní.

Datum:

Pohlaví:

Věk:

1. Jste kuřák?

- a. Ano
- b. Ne

2. Jak často pijete energetické nápoje?

- a. Denně
- b. 1x týdně
- c. 2x týdně a více
- d. Občas
- e. Nepiji

3. Víte, jaké je složení energetických nápojů?

- a. Ano
- b. Ne

4. Podle čeho si vybíráte energetické nápoje?

- a. Cena
- b. Značka
- c. Chuť
- d. Složení
- e. Doporučení
- f. Jiné

5. Jaké nápoje upřednostňujete?

- a. Slazené cukrem
- b. Slazené umělými sladidly

6. Jak často pijete kávu?

- a. 2x denně a více
- b. 1x denně
- c. 1x týdně
- d. 2x týdně a více
- e. Občas
- f. Nepiji

7. Jaký druh kávy konzumujete? Můžete označit více možností.

- a. Pražená
- b. Instantní

- c. Káva bez kofeinu
 - d. Zelená
 - e. Arabika
 - f. Robusta
 - g. Nerozlišuji
 - h. Jiné
-

8. Senzorické hodnocení chuti energetických nápojů

Oznámkuje jako ve škole:

1 - Vynikající; 2 - Velmi dobrá; 3 - Dobrá; 4 - Uspokojivá; 5 – Nevyhovující

| | Hořkost | Acidita | Sladkost | Celková chuť |
|------------|----------------|----------------|-----------------|---------------------|
| 32E | | | | |
| 47D | | | | |
| 21C | | | | |
| 27A | | | | |
| 53B | | | | |

9. Souhrn sensorického hodnocení energetických nápojů

Senzoricky zhodnoťte - Vzhled a barvu, konzistenci i vůni nápoje

Oznámkuje jako ve škole:

1 - Vynikající; 2 - Velmi dobrá; 3 - Dobrá; 4 - Uspokojivá; 5 – Nevyhovující

| | Vzhled a barva | Vůně | Celkové hodnocení |
|------------|-----------------------|-------------|--------------------------|
| 32E | | | |
| 47D | | | |
| 21C | | | |
| 27A | | | |
| 53B | | | |

10. Pořadový test energetických nápojů

Seřaďte vzorky nápojů podle Vašich preferencí (1 – vzorek nejlepší, nejpříjemnější → 5 – vzorek nejhorší, nepříjemný). Dva vzorky nesmí mít stejné pořadí.

| Číslo pořadí | Označení vzorku |
|---------------------|------------------------|
| 1. | |
| 2. | |
| 3. | |
| 4. | |
| 5. | |

Děkuji Vám za vyplnění dotazníku.