



**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

**DETOXIFIKACE KÁVOVÉ SEDLINY OXIDAČNÍMI  
PROCESY**

DETOXIFICATION OF COFFEE SEDIMENTS BY OXIDATION PROCESSES

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Helena Maňáková**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.**

**BRNO 2019**

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1447/2018 Akademický rok: 2018/19  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Helena Maňáková**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie  
Vedoucí práce: **doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Detoxifikace kávové sedliny oxidačními procesy

### Zadání bakalářské práce:

1. Zpracování literární rešerše
2. Příprava vzorků kávové sedliny
3. Charakterizace vzorků kávové sedliny (fenolické látky)
4. Aplikace detoxifikačních oxidačních procesů na kávovou sedlinu
5. Analýza detoxifikované kávové sedliny (fenolické látky)
6. Zpracování výsledků, diskuse

### 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.

---

Helena Maňáková  
student(ka)

---

doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.  
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 detoxifikací kávové sedliny za využití oxidačních procesů. V teoretické části je popsána charakterizace kávových zrn a kávové sedliny. Poté je popsána valorizace kávové sedliny se zaměřením využití kávové sedliny jako rostlinného substrátu. Na závěr jsou charakterizovány fenolické látky, které zapříčiňují toxicitu kávové sedliny, a jsou popsány metody jejich stanovení pomocí UV–VIS spektrofotometrie a pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Experimentální část práce se zaměřuje na přípravu vzorků, na aplikaci účinného oxidačního procesu a na analýzu detoxifikované kávové sedliny se zaměřením na obsah fenolických látek. Pro analýzu fenolických látek byly využity tři typy kávové sedliny: neupravená, odtučněná a odtučněná a zároveň hydrolyzovaná kávová sedlina. Při analýze vzorků byly ve zvýšených koncentracích identifikovány především fenolické kyseliny, přesněji kyseliny gallová, ferulová, chlorogenová a kávová. Po aplikaci oxidačního činidla byla potvrzena detoxifikace u všech vzorků kávové sedliny. Pro nejúčinnější a ekonomický nejúspornější oxidaci byl vybrán roztok 1% oxidačního činidla, které bylo schopné po 10minutové oxidaci zredukovat více než 90 % obsažených fenolických látek.

## **ABSTRACT**

This bachelor thesis deals with the detoxification of used coffee grounds by the oxidation processes. The theoretical section describes the characterization of coffee beans and used coffee grounds. Furthermore, this section describes the valorisation of coffee grounds, especially its application as a fertilizer. The final part of the theoretical section focuses on the characterization of phenolic compounds, which are responsible for toxic properties of used coffee grounds, and analytical methods are described, which include UV–VIS spectrophotometry and high–performance liquid chromatography.

The aim of the experimental part is the sample preparation, the application of the effective detoxification process and the analysis of the detoxified used coffee grounds, focusing on the content of phenolic compounds. At the end of the experimental part, data processing is described.

Three types of coffee grounds were used for determination of phenolic compounds: raw, defatted and the third type was defatted and simultaneously hydrolysed. High amounts of phenolic acids were identified in every sample, especially the gallic, ferulic, chlorogenic and caffeic acid. After an oxidizing agent was applied, positive detoxification of every sample of used coffee grounds was confirmed. For the most effective and most economical oxidation, a 1% oxidizing agent was chosen, which after a 10–minute oxidization efficiently reduced the content of the phenolic compound.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Káva, kávová sedlina, valorizace, fenolické látky, detoxifikace, oxidační procesy, UV–VIS spektrofotometrie, HPLC

## **KEY WORDS**

Coffee, spent coffee grounds, valorization, phenolic compounds, detoxification, oxidation proces, UV–VIS spectrophotometry, HPLC.

MAŇÁKOVÁ, Helena. *Detoxifikace kávové sedliny oxidačními procesy*. Brno, 49 s., 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/115772>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Pavel Diviš.

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem citovala správně a úplně. 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 studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce doc. Ing. Pavlu Divišovi, Ph.D za odborné vedení, trpělivost, cenné rady, připomínky, a ochotu při zpracování této práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Jakubovi Kříkalovi za pomoc při měření experimentální části této práce

## OBSAH

1	ÚVOD .....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1	Historie kávy .....	8
2.2	Vývoz kávy.....	8
2.3	Spotřeba kávy .....	9
2.4	Kávovník – taxonomie.....	9
2.4.1	Rod <i>Coffea</i> – taxonomie, morfologie .....	9
2.5	Zpracování kávy.....	10
2.5.1	Suchý způsob zpracování .....	10
2.5.2	Mokrý způsob zpracování .....	10
2.5.3	Sušení kávy .....	10
2.5.4	Pražení kávy .....	11
2.5.5	Vaření kávy.....	11
2.6	Výroba instantní kávy .....	13
2.7	Výroba kávy bez kofeinu .....	14
2.8	Složení surové (zelené) kávy .....	14
2.9	Reakce probíhající během pražení kávy .....	15
2.9.1	Maillardova reakce.....	15
2.9.2	Karamelizace .....	17
2.10	Složení pražené kávy .....	17
2.10.1	Obsah vody .....	17
2.10.2	Proteiny a aminokyseliny .....	18
2.10.3	Melanoidiny .....	18
2.10.4	Sacharóza .....	18
2.10.5	Chlorogenové kyseliny.....	18
2.10.6	Kofein .....	19
2.10.7	Trigonellin.....	19
2.11	Složení kávové sedliny .....	19
2.11.1	Olejová frakce .....	19
2.11.2	Hrubá vláknina .....	19
2.11.3	Fenolické látky.....	20
2.12	Valorizace kávové sedliny .....	23
2.12.1	Olejová frakce .....	23
2.12.2	Pevná odtučněná frakce.....	23
2.12.3	Fenolické látky.....	24
2.12.4	Využití kávové sedliny jako substrátu .....	24

2.13	Fenolické látky.....	24
2.14	Detoxifikace kávové sedliny.....	25
2.14.1	Odstranění fenolických látek.....	25
2.14.2	Odstranění melanoidinů.....	26
2.15	Stanovení celkových FL pomocí UV/VIS spektrofotometrie .....	26
2.15.1	Princip UV/VIS spektrofotometrie .....	26
2.15.2	Schéma UV/VIS spektrofotometru .....	26
2.15.3	Spektrofotometrická metoda za použití Folin-Ciocalteuova činidla....	27
2.16	Analýza fenolických látek pomocí HPLC.....	27
2.16.1	Princip separace.....	27
2.16.2	Schéma HPLC.....	28
2.16.3	UV/VIS detektor s diodovým polem (DAD).....	28
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	30
3.1	Příprava vzorků z kávové sedliny .....	30
3.1.1	Soxhletova extrakce kávové sedliny.....	30
3.1.2	Hydrolyza kávové sedliny.....	31
3.1.3	Extrakce vzorků nezoxidované kávové sedliny.....	31
3.2	Stanovení celkového obsahu FL pomocí UV/VIS spektrofotometrie.....	32
3.3	Sestavení absorpčního spektra melanoidinů .....	34
3.4	Kvalitativní a kvantitativní stanovení fenolických látek pomocí HPLC .....	34
3.5	Detoxifikace kávové sedliny za použití oxidačního činidla .....	36
3.6	Statistické zpracování dat .....	37
4	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	38
4.1	Stanovení celkového obsahu FL pomocí UV/VIS spektrofotometrie.....	38
4.2	Vliv celkového času oxidace a koncentrace ox. činidla.....	38
4.3	Identifikace a kvantifikace FL pomocí HPLC .....	39
4.4	Ověření vlivu oxidace na obsah melanoidinů .....	42
4.5	Studium vlivu úpravy kávové sedliny na celkový obsah FL.....	43
4.6	Vliv úpravy kávové sedliny na obsah melanoidinů .....	43
4.7	Oxidace upravené kávové sedliny .....	44
4.8	Oxidace pomocí plynného kyslíku .....	45
5	ZÁVĚR.....	46
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	51

# 1 ÚVOD

Druhá nejvýznamnější obchodovatelná surovina na světě, nápoj milovaný miliony lidí po celém světě. Učaruje svou vůní, chutí a svými povzbuzujícími účinky. Téměř žádný člověk si nedokáže bez tohoto nápoje představit své ráno. Tím vším je káva.

V 15. století, odkud pochází první zmínky o kávových zrnech, pravděpodobně nikdo neměl tušení, jakým způsobem dokáže tento nápoj v budoucnu rozhybat a udržet ekonomiku desítek států. Dalo by se s nadsázkou říci, že v této době půlka světa kávu produkuje a druhá spotřebuje. Každým rokem se díky největším vývozcům, jako je například Brazílie, průměrně vyprodukuje 9 milionů tun kávových zrn a v podobném měřítku se káva spotřebuje na druhém konci zeměkoule. Například za rok 2016 bylo na celém světě spotřebováno 9,2 milionů tun kávy.

Produkce i spotřeba kávy má však i své stinné stránky. Při pěstování a také při čistících procesech kávy se spotřebuje velké množství pitné vody. V technologickém procesu pak vzniká odpad z dření kávových třešní, z pergamenové vrstvy kávových zrn, avšak nejvíce odpadu se vyprodukuje z kávové sedliny. Celoročně se vyprodukuje přibližně 6 milionů tun kávové sedliny po celém světě. Jelikož toto množství není nezanedbatelné a také z důvodu, že kávová sedlina obsahuje potenciálně využitelné sekundární produkty, začala se v posledních letech řešit otázka valorizace kávové sedliny.

Kávová sedlina je bohatým zdrojem olejů, sacharidů, fenolických látek, minerálních látek a dalších využitelných látek. Po biotechnologickém zpracování kávové sedliny by získané sekundární produkty mohly nalézt široké uplatnění v různých odvětvích průmyslu. Sekundární produkty lze využít pro výrobu biodegradabilních polymerů (např. PHA), v podobě biopaliv by mohly nahradit fosilní paliva a díky svému chemickému složení by mohly být využity jako substráty podporující růst rostlin.

Využití odpadu z kávové sedliny jako substrátu pro růst mikroorganismů nebo rostlin je však limitováno obsahem inhibičních látek. Problematické jsou zejména fenolické látky a melanoidiny, které svými toxickými účinky růst živých organismů zpomalují. Množství inhibičních látek je možné zredukovat pomocí detoxifikačních procesů. Pro detoxifikaci je možné využít např. různé oxidační procesy.

Cílem této bakalářské práce bylo připravit vzorky kávové sedliny, které posloužily ke kvantitativnímu i kvalitativnímu stanovení obsahu fenolických látek před detoxifikací, dále aplikovat účinný a ekonomicky výhodný oxidační proces, analyzovat detoxifikovanou kávovou sedlinu se zaměřením na obsah fenolických látek a vyhodnotit účinnost detoxifikace kávové sedliny.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Historie kávy

Díky genetické analýze bylo zjištěno, že rodištěm kávovníku je Etiopie v severovýchodní Africe. Přesněji se jedná o oblast Velké příkopové propadliny [1]. Z Etiopie se káva dostala díky kočovným kmenům na Střední východ v 15. století. Zde ji poprvé lidé začali komerčně pěstovat v Jemenu [1,2,3]. V 16. století se káva stala velice oblíbeným nápojem na celém Středním východě, avšak do Evropy byla dovezena obchodníky a cestovateli o 200 let později [2,4].

Káva si našla cestu k srdci také u Evropanů, kteří se chopili šance a podnikli kroky v dalším komerčním pěstování. Angličané, Holanďané a Francouzi převezli kávová semena do jejich kolonií, takto se káva dostala do svých konečných a do této doby využívaných oblastí k jejímu pěstování. Jedná se o oblasti v takzvaném „kávovém pásmu“, tento pojem zahrnuje země střední Afriky, střední a Jižní Ameriky a Jihovýchodní Asie [1,4]. Od 17. století se káva stává jednou z nejvýznamnějších surovin na světě [2].

V dnešní době je káva po ropě druhou nejvýznamnější surovinou na světě [2]. Je jedním z nejrozšířenějších farmakologicky aktivních nápojů, to potvrzuje fakt, že v roce 2016 byla celosvětová spotřeba kávy přibližně 9,2 miliónů tun [3,5].

### 2.2 Vývoz kávy

Kávu pěstují ve více než 70 zemích, u většiny případů spadající do tzv. „kávového pásma“ [4,10]. Jsou to země ležící mezi obratníkem Raka a Kozoroha, kde se celoroční teplota pohybuje kolem 21 °C a spadne zde vysoké množství srážek [9]. Tyto podmínky splňují největší vývozci kávy: Brazílie, Vietnam, Kolumbie, Indonésie a Honduras [10,23].

Během dvanácti měsíců (období končící zářím 2018) bylo na světě vyprodukováno přibližně 4,26 milionů tun zelené kávy druhu Arabica a 2,35 milionů tun druhu Robusta [11]. Předpokládá se, že světová produkce kávy dosáhne ve sklizňovém období 2018/2019 rekordního objemu ve výši 10,47 milionů tun kávových zrn [14].

Brazílie má první pozici mezi exportujícími zeměmi. Její vývoz za rok 2018 činil 3,05 milionu tun kávy, což odpovídá 30 % celkové celosvětové spotřeby kávy. Asi 300 000 plantáží se rozkládá na více než 10 000 čtverečních kilometrech celkové brazilské krajiny. Káva hraje zásadní roli v rozvoji Brazílie a je již 150 let hnací silou ekonomiky země [10,13].

Vietnam je poněkud novějším vývozcem kávy, káva se zde začala komerčně vysazovat v 80. letech a zcela změnila národní ekonomiku. V hospodářském roce 2017/2018 bylo ve Vietnamu vyprodukováno 1,76 milionu tun kávy. Vietnam našel trhlinu na trhu a vsadil především na pěstování méně náročné Robusty [10].

Kolumbie je druhým největším vývozcem arabiky. Je známá svou kvalitní kávou s jemnou a vyváženou chutí a této kávy bylo za rok 2017/2018 vyprodukováno 864 000 tun [10].

Indonésie není zcela známa jako jeden z největších vývozců kávy, ale díky její vhodné poloze a klimatu se stala třetím největším dovozcem kávy Robusta. Na indonésckém kávovém průmyslu se podílí 1,5 milionu nezávislých drobných zemědělských podniků a několik větších pěstitelských farem. V Indonésii se produkuje také Arabica a velmi speciální druhy káv jako je například cibetková káva Kopi Luwak. Vyrábí se zrn, která byla fermentována v trávicím traktu asijských palmových cibet. Díky tomuto produkčnímu procesu a její unikátní chuti je to jedna z nejdražších káv na světě [10].



Třetím největším producentem kávy v Latinské Americe je Honduras. V roce 2017/2018 bylo v Honduras vyprodukováno 450 000 tun kávy. Je třetím největším producentem výběrové kávy [10,12].

## 2.3 Spotřeba kávy

Celosvětová spotřeba kávy v roce 2016 byla přibližně 9,2 miliónů tun [1]. Předpovídá se, že spotřeba ve sklizňovém období 2018/2019 dosáhne rekordního objemu ve výši 9,72 milionu tun. Spotřeba kávy se v posledních letech mění jen nepatrně nebo stagnuje [14].

Mezi největší spotřebitelé patří především evropské země (3 180 tun kávy za rok 2017/18), druhým největším spotřebitelem jsou země Asie a Oceánie (2 090 tun), následují je země Severní (1 800 tun) a Jižní Ameriky (1 620 tun), dále africké země (700 tun) a nakonec země střední Ameriky a Mexiko (310 tun) [15].

## 2.4 Kávovník – taxonomie

Káva se získává z plodů dvouděložné rostliny kávovníku. Botanici zařazují do pojmu „kávovník“ všechny druhy v čeledi mořenovitě (*Rubiaceae*), které jsou schopné plodit kávové třešně [7,8]. Do této čeledi patří dva rody *Coffea* a *Psilanthus*, které jsou považovány za původce „pravé kávy“. Odlišují se především různorodými morfologickými znaky květů (různé délky pestíku, délky koruny květu, vyčnívající/nevyčnívající prašník) [17].

### 2.4.1 Rod *Coffea* – taxonomie, morfologie

Existuje přibližně 100 druhů tohoto rodu, avšak nejznámějšími jsou tři druhy: *Coffea arabica*, *Coffea robusta* a *Coffea liberica*. Z komerčního hlediska jsou nejdůležitější *C. arabica* a *canephora*, známé také jako druhy kávy *Arabica* a *Robusta* [9,17].

Jedná se o víceleté, stálezelené a krátkodenní rostliny. K úspěšnému kvetení jim stačí dodávat světelnou energii přibližně 8–11 hodin, tedy kratší čas, než je délka dne v daných oblastech. Jejich stonek je vertikální, to znamená, že listy rostou v pravidelném uspořádání. Díky tomu se ke každému listu dostane dostatek slunečního svitu, vlhkosti a vzduchu. Listy jsou tmavě zelené, zvlněné, lesklé s výrazným žilkováním a květenství je složeno z okolíkovitých vrcholků. Délka kořenů se u každého rodu liší. U kávy *Arabica* jsou kořeny hluboce zarostlé v půdě, zatímco u druhu *Robusta* se kořeny koncentrují více u povrchu půdy [9,17].

Většina druhů (67 %) kávovníků roste v průměrné nadmořské výšce 1000 m. n. m., lze však nalézt výjimky, které rostou až nad 2300 m. n. m. Nejcenější druhy kávy *Arabica* a *Robusta* se pěstují v rozličných nadmořských podmínkách. *Robusta* neboli *Coffea canephora*, všeobecně brána jako méně kvalitní káva, roste i s dalšími druhy (např. *C. liberica*, *C. brevipes*) v nadmořské výšce od 500 do 1500 m. n. m., zatímco *Arabica* (*C. arabica*) je vhodné pěstovat v nadmořských výškách od 800 do 2000 m. n. m. [9,17].

Dalším rozdílem mezi kávou *Arabica* a *Robusta* je v jejich rozmnožování. *Arabica* je striktně autogamní (samosprašná – přenáší vlastní pyl z prašníku na bliznu) a *Robusta* naopak alogamní (cizosprašná – ke svému opylení potřebuje pyl z jiného květu) [9].

Tvar plodu (kávové třešně) je vejčitý nebo oválný. Plody jsou zpočátku zbarveny zeleně a časem zhnědnou. Nepodléhají samovolnému pučení, k získání dvou semen uschovaných uvnitř je potřeba využít určité vnější síly [9].

#### 2.4.1.1 Anatomie kávových plodů

Káva se vyrábí z kávových semen, které se nachází uvnitř plodů kávovníku tzv. kávových třešní. Vnější vrstva třešně se nazývá exokarp, která je pokryta tenkou vrstvou buničiny

nazývanou mezokarp. Pod touto vrstvou se nachází lepivá/slizká struktura typu pektinu. Samotná semena jsou pokryta endokarpem – stříbrnou blankou, pod touto vrstvou je konečně odkryt endosperm. Uvnitř každé kávové třešně jsou uschována dvě semena. Ačkoliv existují raritní kávy, které ve svých třešních ukrývají jediné semeno. Jsou známe jako „perlové kávy“ (Pearlberries) a představují 5 % z celkového vývozu kávy [1].

## **2.5 Zpracování kávy**

Když se kávové třešně začnou zbarvovat do červena nebo do žluta (dle odrůdy) začíná sklizeň kávy. Většinou se káva sbírá ručně po jednom plodu, ale například v Brazílii se využívá mechanické výpomocí strojů, kdy se bobule setřásávají. Nicméně mechanický sběr má své výhody i nevýhody; sběr je díky této technice rychlejší, ale mezi kvalitní zralá zrna se dostanou zrna nezralá, poškozená i květy kávovníku. Ruční sběr je tedy vhodnější přinejmenším pro výběrovou kávu, i když je pracovní síla dražší a proces sběru pomalejší [1]. Existují dvě základní techniky zpracování kávy: mokrou a suchou cestou [18].

### **2.5.1 Suchý způsob zpracování**

Při suchém zpracování se kávová zrna nezbavují dužiny a suší se i s ní. Čerstvě sklizené plody se rovnoměrně rozloží na čistém sušícím dvoře. Vrstva rozložených plodů, která má přibližně tloušťku 8 cm, se musí přes den převracet přibližně jedenkrát za hodinu. Tento proces trvá 12–15 dní za jasného počasí. Suché plody se poté musí chránit před zpětným zvlhnutím, aby se zabránilo tvorbě plísní. Při tomto procesu se získají zrna nižší jakosti, jelikož se zpracovávají se i méně kvalitní plody [9,16].

### **2.5.2 Mokrý způsob zpracování**

Mokrá úprava slouží k odstranění dužiny před samotným sušením. Mokrý proces zpracování se používá především na velkých kávových farmách. Získávají se tak velmi kvalitní kávová zrna, avšak tato metoda není příliš šetrná k životnímu prostředí. Vzniká příliš velké množství odpadu, především znečištěné vody, kterou se zrna promývají [18].

V první fázi se nasbírané plody umístí do speciálních vodních nádrží, kde dojde k selekci kvalitních zrn. Zralá a zdravá zrna jsou těžší a klesají na dno nádrže. Zatímco nezralé, seschlé a jinak znehodnocené plody vyplavou nad hladinu vody a stahují se pryč. Potom se plody zbaví svrchní slupky a části dužiny. První fáze mytí musí proběhnout do 24 hodin od sběru plodů, protože později by se slupka s dužinou odstraňovala mnohem náročnějším způsobem a mohlo by dojít k poškození zrna [1,18].

V druhé fázi mytí se oloupaná zrna přesunou do kvasných nádrží, kde proběhne jedno až dvoudenní fermentace. Během tohoto procesu se díky enzymům zbavují kávová zrna zbytku své lepkavé vrstvy. Po této fázi jsou zrna čistá a drsná na dotek [1,17].

### **2.5.3 Sušení kávy**

Kávovníková zrna po suché či mokré metodě stále nachází ve svých bělavých pergamenových obalech. Obaly obsahují asi 50 % vlhkosti a spolu se zrnem se nazývají pergamino. Vlhkost se musí snížit zhruba na 8-12 %, aby se káva mohla bezproblémově skladovat [1,9,18].

Sušení probíhá buď v mechanických jednotkách pomocí horkého vzduchu, nebo se kávová zrna rozprostírají na betonovou plochu na dvoře a suší se přirozeně vzduchem. Na betonových podlahách se musí během dne často prohrabovat a obracet, aby neshnila [1,18].

Po dalším sušení se pak kávová zrna melou nebo loupou, aby se pergamen odstranil. Po tomto kroku se zrna zbaví celé sušené slupky, skládající se z exokarpu, mesokarpu a endokarpu sušených plodů [1,9].

Někdy se po sušení využívá i leštícího procesu, aby se odstranily poslední zbytky nežádoucích vrstev. Podle některých zpracovatelů tento krok přispívá k vyšší kvalitě kávy, někteří ho však považují za nadbytečný [1].

#### **2.5.4 Pražení kávy**

Mokrou či suchou metodou se získá promývaná nebo nepromývaná zelená káva, která se nejprve přečistí od vláken ze žoků, dřeva, kovových částí, kamínků, prachu a cizích příměsí [18]. Zelená káva má však houbovitou strukturu, je měkká a voní travnatě, proto není vhodná ke konzumaci. Pražením těchto nevalně chutnajících zrn se získá pochutina na nesrovnatelné úrovni. Potravina získá na přidané hodnotě, což je proces, kdy syrová neupravená surovina je pomocí určitých technologických procesů upravována až zdokonalována. Tím potravina získá nové a naprosto odlišné vlastnosti oproti syrové surovině [19].

Proces, kdy jsou zrna pražena se nazývá pyrolýza. Jedná se o termochemické a fyzikální rozložení organických pletiv bez přítomnosti kyslíku. Pražení probíhá kontinuálně nebo diskontinuálně. Praží se většinou při atmosférickém tlaku a při velmi vysokých teplotách (přibližně okolo 200 °C), díky tomu dochází k důležitým chemickým změnám. Kávová zrna se praží většinou pomocí plynu, výhřevného oleje nebo elektřinou [18].

V prvním kroku se zelená zrna suší do té doby, než získají žluté zbarvení. Tato fáze pražení je endotermická a probíhá přibližně při 50 °C, kdy se denaturují obsažené proteiny v kávových zrnech a dojde k vypaření vody. V tomto prvotním kroku pražení zároveň dochází k prvnímu vzniku aroma. Travnaté aroma sloučenin jako chlorofylu a antokyanů se začne měnit v příjemnější vůni [1,9].

V druhém kroku se zvýší teplota průměrně na 100 °C a nastane první zhnědnutí. Zhnědnutí je zapříčiněno pyrolýzou organických sloučenin. Zároveň voda mění se v páru zvyšuje tlak uvnitř zrn. Při teplotě 150 °C potom tento tlak způsobí bobtnání zrna, a tak zrno získá až dvakrát větší objem [1].

Další zahřátí okolo 175-200 °C způsobí prasknutí buněk uvnitř zrna, což se projeví charakteristickým praskavým zvukem. Zároveň se uvolní vnější blanka kávového zrna a barva se změní na tmavohnědou. Podle daného stupně pražení je v této fázi proces ukončen, hladina vlhkosti je snížena z původních 8,0-12,0 % na 1,5-5,0 %. Zrna se poté zchladí, aby se proces zastavil. Po dokončení pražení jsou zrna křehká a lehčí než původní díky ztrátě vlhkosti [1].

Po procesu pražení získá káva svou charakteristickou chuť a vůni. Typické organoleptické vlastnosti jsou výsledkem kombinace stovky vzniklých sloučenin, které vznikají během pražení. Při posuzování kvality pražené kávy se pozoruje velikost, tvar, barva, tvrdost, vůně a chuť zrn. Barva opražených zrn může sloužit jako identifikátor chutě a vůně budoucího kávového nápoje [1,9].

#### **2.5.5 Vaření kávy**

Vaření kávy neboli extrakce kávy je dvofázový proces vedoucí k získání požadované emulze kávy tzv. kávového nápoje. U přípravy kávového nápoje je použita voda, která hraje roli kapalného media, a namletá káva, která je brána jako extrahující se hmota pevného

skupenství Mezi různorodé metody přípravy kávového nápoje patří vyvařovací, infuzní a tlakové metody [9,19].

Vaření kávy není tak jednoduchý proces, jak by se na první pohled mohlo zdát. Organoleptickou kvalitu výsledného šálku kávy ovlivňuje kvalita a teplota rozpouštědla (vody), čas extrakce, stupeň pražení a rozpustnost namleté kávy ve vodě [1].

#### **2.5.5.1 Vliv kvality a teploty vody**

Káva jako nápoj je složena z 95-98 % vodou, její kvalita se tedy musí brát v potaz při přípravě tohoto nápoje [1]. Voda by měla být bez zápachu a bez jakéhokoliv zbarvení [20].

Chuť vody je ovlivněna obsahem chloru, který je používán na dezinfekci pitné vody. Většina chloru sice po vaření z kávy vytěká [1], avšak pro dokonalý šálek kávy se vyžaduje nulová tolerance obsahu chloru. Prvním důvodem je již mírné ovlivnění chuti a druhým důvodem je možný vznik kyseliny chlorovodíkové. Její vznik podporuje vysoká teplota a vysoký tlak, které v kávovaru panují. Chlorovodíková kyselina rozežírá ocelové příslušenství kávovaru a poté v šálku kávy zanechává kovovou pachut' [1,20].

Tvrdost vody, která je dána obsahem minerálů, ovlivňuje chuť kávy v širším měřítku. Extrakce namleté kávy do tvrdé vody probíhá pomaleji, což například způsobí zakalení a snížení pěny v espresso a zároveň neutralizuje kyseliny obsažené v kávě [1]. Měkká voda naopak způsobí rychlejší a intenzivnější extrakci a podporuje kyselost kávy. Káva poté zanechává na patře slanou chuť a nepříjemnou kyselou chuť. Destilovaná voda pro přípravu kávy také není vhodná, káva získá nevýraznou chuť [1,20]. Ideální voda pro přípravu kávy obsahuje nižší množství minerálních solí, ideální je střední hodnota tvrdosti vody [1].

Voda by měla mít pH neutrální, rovno 7, po ukončení extrakce by tak měl kávový nápoj získat ideální pH s hodnotou okolo 5 [1]. Tolerance rozmezí pH je však od 6,5 do 7,5. Tvrdá voda podporuje vyšší hodnotu pH [20].

Voda pro přípravu výběrové kávy by měla splňovat požadavky znázorněné v tabulce 1.

*Tabulka 1: Kvalita vody pro přípravu kávového nápoje [20]*

<b>Charakteristika</b>	<b>Optimum</b>	<b>Přijatelný rozsah</b>
Vůně	Bez zápachu	Bez zápachu
Barva	Bez zbarvení	Bez zbarvení
Obsah celkového chlóru	0 mg/l	0 mg/l
Celkový obsah rozpuštěných látek	150 mg/l	75-250 mg/l
Vápenatá tvrdost (CaCO <sub>3</sub> )	68 mg/l	17-85 mg/l
Celková alkalita	40 mg/l	Přibližující se 40 mg/l
pH	7,0	6,5 až 7,5
Obsah sodíku	10 mg/l	Přibližující se 10 mg/l

#### **2.5.5.2 Vliv času extrakce, rozpustnosti kávy a teploty vody**

Aby káva měla příjemnou chuť musí se použít přiměřené množství kávy, které se bude v horké vodě extrahovat, dále záleží na době kontaktu kávy s vodou a velikosti částic kávy [1].

Při nedostatečné extrakci, například z hrubě namletých bobů nebo nedostatečného kontaktu namleté kávy s vodou, následný nápoj získá vodnatou a nakyslou chuť. Jemné mletí nebo dlouhá extrakce způsobí ostrou a hořkou chuť výsledného kávového nápoje. U

vařené kávy by ideální extrakce měla trvat 1-3 minuty u jemně namletých částic a 6-8 minut u hrubě namletých částic [1].

Dalším faktorem ovlivňující kvalitu kávy je teplota vody. Ideální teplota pro vaření kávy je 85 až 93 °C, Při vyšších teplotách se vyextrahuje větší množství hořkých sloučenin [1].

### **2.5.5.3 Vliv stupně pražení kávy**

V závislosti na teplotě pražení, získají kávová zrna vždy jinou intenzitu zbarvení a jiné organoleptické vlastnosti [1].

Pokud se zrna opraží na lehký až střední stupeň (196-205 °C), tak získají středně hnědý odstín s lehkou nakyslou chutí. Při tomto stupni pražení se totiž kyseliny obsažené v zelených zrnech (kyseliny citronová a jablečná) smíchají s cukry, které vznikly během pyrolýzy, a přemění se v jiné kyseliny (mravenčí, octovou a mléčnou), které kávě předají mírnou až střední nakyslou příchut' [1].

Zrna středně opražená (210-225 °C) vynikají svou tmavší hnědou barvou. Během těchto teplotních podmínek jsou degradovány fenolové a chlorogenové kyseliny. To sníží trpkou a kyselou chuť kávy a zvýrazní to tak původ a charakter dané odrůdy. Ve vyšších teplotách (nad 200 °C) lze také u kávových zrn zaslechnout jejich typické druhé pučení, které je způsobené zvýšením tlaku při vzniku CO, CO<sub>2</sub> a dalších plynů [1].

Třetím stupněm pražení jsou zrna tmavě pražená (225-230 °C). Tyto vyšší teploty vedou ke snížení obsahu kyselin, taninů a rozpustných sacharidů a sníží se bohatost kávy. Při tom se také zvyšuje hořkost díky některým chemickým reakcím a ta zakrývá původní charakter zrn a jejich typickou chuť [1].

## **2.6 Výroba instantní kávy**

První rozpustný kávový nápoj vyrobil v roce 1901 japonsko-americký chemik Satori Kato. Během 2. světové války se instantní káva těšila velké oblibě především u amerických vojáků, v 80. letech představovala spotřeba instantní kávy desetinu spotřeby kávy zrnkové [21].

Při výrobě rozpustné kávy se zelená zrna praží na vyšším stupni, než je obvyklé. Opražená zrna se poté rozemelou na průměrnou velikost 1 až 3 mm. V dalším kroku se připraví kávový koncentrát. Extrakce probíhá pod tlakem pomocí horké vody. Extrakční zařízení se naplní kávovým šrotem, na který se přivádí horká voda. Teplota vody se pohybuje přibližně do 180 °C a použitý tlak do 1,5 MPa. Tyto podmínky umožní získat větší výtěžky, než je tomu při domácím vaření kávy. Poté se extrakt zchladí na 80 °C až na 90 °C a přečistí se pomocí naplavovacích filtrů nebo separátorů [18].

Tekutý kávový extrakt se potom suší pomocí těchto metod: sušení sprejováním, aglomerováním nebo sušení vymrazováním [21].

Sušení sprejováním je proces, kdy je kávový extrakt s horkým vzduchem vstřikován do vysoké věže. Ve věži panují vysoké teploty a díky tomu vznikne suchý kávový prášek, který dopadá na dno věže. Tato metoda je účinná a jednodušší než sušení vymrazováním, ale kvůli, již zmíněným, vysokým teplotám může být negativně ovlivněna chuť a vůně kávy. Po tomto procesu následuje aglomerace [21].

Při aglomerování neboli shlukování dochází po vysušení kávového extraktu. K vysušenému extraktu se ještě přidá menší množství vody nebo kávového oleje a tím se malé částičky kávy poslepují do větších shluků tzv. granulí a okamžitě se vysuší [21].

Sušení vymrazováním probíhá tak, že se kávový koncentrát zchladí na teploty -45 °C až -50 °C. Využívá se vakuového vymražení neboli lyofilizace, kdy se pomocí vakua a

nízkých teplot odstraní vlhkost v daném extraktu. Díky nízkým teplotám vznikne krystalická instantní káva s výborně zachovanou chutí a aromatem kávy [21].

Po vysušení jsou kávové extrakty extrémně hygroskopické, takže se musí ihned balit do vhodných obalů. Většinou do skleněných nádob s dobře těsnícím víčkem nebo do plastových, vzduchotěsných obalů [18].

## 2.7 Výroba kávy bez kofeinu

Běžný obsah kofeinu v kávě Arabica je 1,0 až 1,3 % a v kávě Robusta 2,0 až 2,6 %. Aby káva mohla být definovaná jako káva bezkofeinová může obsahovat maximálně 0,1 % zbytkového kofeinu [18,21].

Dekofeinizace se provádí před pražením. Jako nejméně nákladná metoda se osvědčila ta, kdy se použijí organická rozpouštědla (dichlormethan nebo etylacetát), která jsou schopna z kávových zrn vyextrahovat kofein. Před i po samotné extrakci se zrna očistí vodou či párou, tento krok pomůže otevřít póry v kávových zrnech. Po odstranění kofeinu se zrna suší do té doby, dokud neobsahují stejnou vlhkost jako před extrakcí [22].

Novější metodou je metoda odstranění kofeinu superkritickým oxidem uhličitým [30].

Vyextrahovaný a přečištěný kofein se může dále použít při výrobě kolových, energetických nápojů či může být využit ve farmaceutickém průmyslu [22].

## 2.8 Složení surové (zelené) kávy

Chemické složení kávy se mění v závislosti na místě pěstování, na věku rostliny a na půdních podmínkách. Nejvíce známou sloučeninou získanou z kávy je bezesporu methylxanthin kofein, v druhu Arabica se nachází v rozmezí 0,8 % až 1,4 %, zatímco u Robusty jsou tyto hodnoty zřetelně vyšší, mezi 1,7 % až 4,0 % [23].

Zelená kávová zrna jsou složena z mnoha dalších sloučenin, zahrnující celulózu, minerální látky, cukry, lipidy, tannin a fenolické látky. V minerálních látkách jsou zahrnuty dusík, hořčík, vápník, sodík, chrom, vanad, baryum, nikl, kobalt, olovo, molybden, titan a kadmium [23].

Dále nepražená káva obsahuje ze skupiny sacharidů sacharózu, glukózu, fruktózu, arabinózu, galaktózu a mannózu. Obsahuje aminokyseliny, přítomny jsou alanin, arginin, asparagin, cystein, glutamová kyselina, glycin, histidin, izoleucin, leucin, lysin, methionin, fenylalanin, prolin, serin, threonin, tyrosin a valin. V menší míře obsahuje i komplex vitamínu B, niacin (vitamin B3 a PP), chlorogenové kyseliny (7-12 %) [23].

Netěkavou část zelené kávy sestavují hlavně sacharidy, vláknina, bílkoviny a volné diterpeny [22].

Těkavé složky předávají neopražené zelené kávě slabé ale charakteristické aroma. Bylo identifikováno přibližně 100 druhů těkavých složek. Toto množství zahrnuje hlavně alkoholy, estery, uhlovodíky a aldehydy. Dále ketony, pyraziny, furany a sirné sloučeniny [22].

Z hlediska zaměření bakalářské práce není obsah surové zelené kávy více rozebrán. Podrobněji je práce zaměřena na složení pražené kávy v kapitole 2.10, ze které se kávová sedlina získává a dále na složení samotné kávové sedliny v kapitole 2.11.

## 2.9 Reakce probíhající během pražení kávy

Zelená káva má houbovitou strukturu a voní a chutná „travnatě“. Pražením káva získá zcela jiný půvab díky probíhajícím termochemickým a fyzikálním reakcím a její organoleptické vlastnosti jsou poté zcela na jiné úrovni.

Pražením zelené kávy vzniká několik set těkavých látek. Podle podmínek pražení lze získat praženou kávu s rozdílnými sensorickými vlastnostmi. Během pražení dochází nejprve k rozkladu redukujících sacharidů (Maillardova reakce), v pozdějších stádiích pražení se zapojují i neredukující oligosacharidy a polysacharidy, po rozštěpení na sacharidy redukující [31].

Při nižších teplotách pražení je rychlost uvolňování redukujících sacharidů z oligosacharidů a polysacharidů vyšší než rychlost jejich rozkladu. Káva pražená tímto způsobem obsahuje 1 % glukosu a fruktosu a má světlejší barvu [31].

Naopak při vyšších teplotách pražení dochází k rychlému rozkladu redukujících sacharidů a ke vzniku polymerních pigmentů. Dochází zároveň ke vzniku kyselin z redukujících sacharidů. Tato káva obsahuje jen stopy redukujících sacharidů, má tmavé zbarvení a mírně nakyslou chuť [31].

V poslední době je také známo tzv. rychlé pražení, jedná se o pražení při vyšších teplotách (cca nad 230 °C), obsah sacharózy při tomto procesu rychle klesá, ale polysacharidy jsou obsaženy v menším množství než při klasickém pražení, to se projeví sníženým obsahem kyselin [31].

Během pražení vzniká také řada chuťových, hlavně hořkých látek. Na rozdíl od vonných látek vzniklých Maillardovou reakcí je o chuťových látkách známo jen málo [31].

### 2.9.1 Maillardova reakce

V rozvoji chuti, vůně a barvy kávy mají klíčovou roli sloučeniny, vznikající během Maillardovy reakce. Maillardova reakce zahrnuje soubor reakcí, při kterém vzniká řada velmi reaktivních karbonylových sloučenin, které reagují vzájemně a také s přítomnými aminosloučeninami. Tyto sloučeniny vznikají při pražení od 150 do 200 °C. Při této reakci reagují karbonylové skupiny (z redukujících sacharidů) s aminokyselinami, pocházejících z proteinů, a tvoří sloučeniny s novou a jedinečnou chutí a vůní. Vzniká přibližně 100 druhů chemických sloučenin, mezi kterými se nachází také velmi aromatická sloučenina 2-furfurylthiol, zodpovědná za výrazné aroma kávy [22,31].

Průvodním jevem těchto reakcí je vznik hnědých pigmentů, melanoidinů, a proto se tyto reakce nazývají reakce neenzymového hnědnutí [31]. U karamelizace cukrů nebo u reakce bílkovin s oxidovanými lipidy dochází také k neenzymovému hnědnutí, vzniklé sloučeniny jsou převážně stále nízkomolekulární sloučeniny. Monosacharidy jako jsou glukosa, fruktosa, pentosa a ribosa, a disacharidy laktosa a maltosa, patří mezi nejvýznamnější sacharidy, které se podílejí na Maillardově reakci [25,33].

Dosud se podařilo popsat jen malou část sloučenin, které vznikají pomocí těchto reakcí. Převážně se jedná o nízkomolekulární sloučeniny. Méně charakterizované jsou reaktivní meziprodukty, které vznikají ve velmi nízkých koncentracích a jsou během izolace obvykle rozloženy. Ještě v menší míře je známo o vznikajících volných radikálech. Znalost struktury těchto sloučenin je důležitá, jelikož tyto sloučeniny hrají významnou roli při tvorbě chuťových a vonných sloučenin, vysokomolekulárních barevných pigmentů (melanoidinů) [31].

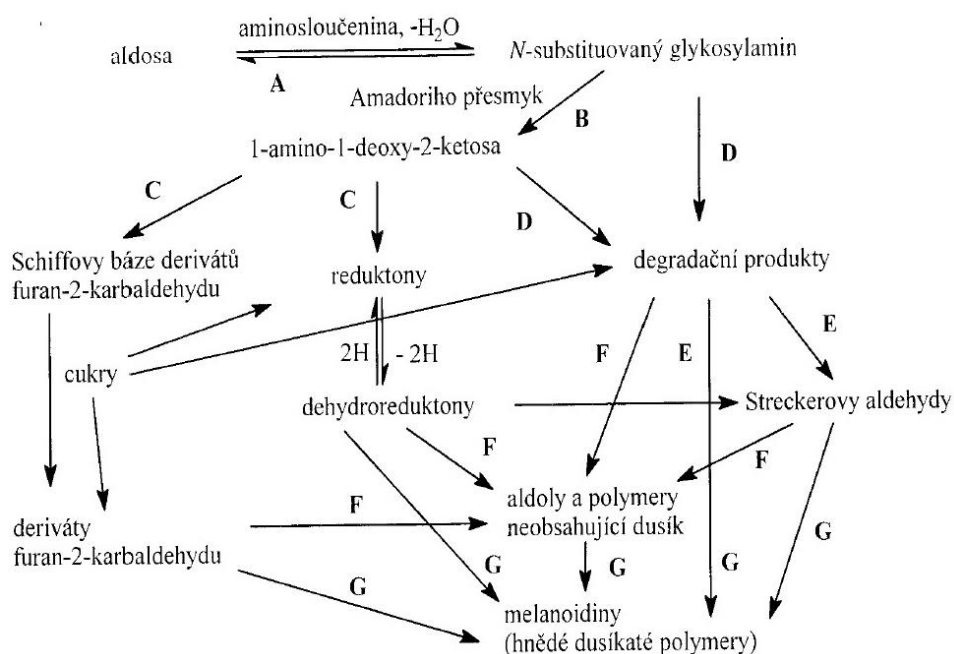
## Reakce se rozděluje do tří fází:

- v první fázi vznikají glykosylaminy a dochází k Amadoriho přesmyku (reakce A a B)
- v druhé fázi probíhá dehydratace a fragmentace sacharidů a Streckerova degradace aminokyselin (reakce C, D a E)
- a v poslední fázi dochází k reakcím meziproductů, které vedou k tvorbě heterocyklických sloučenin a vysokomolekulárních pigmentů melanoidinů (reakce F a G) [31].

### 2.9.1.1 Tvorba glykosilaminů a Amadoriho přesmyk

Prvním krokem Maillardovy reakce je adice neprotonované aminoskupiny aminosloučeniny na elektrodeficitní uhlíkový atom polarizované karbonylové skupiny redukujícího cukru. Dehydratací vzniklého produktu vzniká imin neboli Schiffova báze [31]. Schiffova báze je nestabilní aldimin a jeho tvorba je reverzibilní. Později podléhá přesmyku, který vede k tvorbě více stabilního Amadoriho produktu (pokud je reagujícím cukrem aldosa) či Heynsovu produktu (pokud je cukrem ketosa) [25,33].

Amadoriho produkty mohou být rozloženy buď na původní amin (jedná se o amin 1-, 3- nebo 4-deoxyglukosan); nebo se nevratně oxidují (při oxidaci vznikne N-karboxymethylalkylamin). Podle hodnoty pH se Amadoriho produkty enolizují do různých pozic. Pokud je pH vyšší, Amadoriho produkty enolizují v pozici mezi 2. a 3. uhlíkem a eliminují amin z 1. uhlíku za vzniku 1-deoxyglukosonu (1-DG). Při nižším pH se ketoaminy přesmykují a enolizují v pozici mezi 1. a 2. uhlíkem za vzniku 3-deoxyglukosonů (3-DG). Některé z diketonů tímto způsobem tvoří 4-deoxyglukosony (4-DG). Deoxyglukosony jsou velmi reaktivní sloučeniny, které opět reagují s volnou aminoskupinou a tím propagují Maillardovu reakci a způsobují tak nevratné molekulární změny proteinů tvorbou heterocyklických produktů a inter- a in-tramolekulárních můstků [25]. Maillardova reakce je schematicky znázorněna na obrázku 1.



Obrázek 1 Schématické znázornění Maillardovy reakce [31]



### **2.9.1.2 Streckerova degradace aminokyselin**

Streckerova degradace aminokyselin, je interakce aminokyselin s dikarbonylovými sloučeninami. Jedná se o oxidaci aminokyselin působením oxidačních činidel. Vzniká při ní karbonylová sloučenina obsahující o jeden atom uhlíku méně než výchozí aminokyselina.

Význam této reakce spočívá především ve vzniku reaktivních a často senzoricky aktivních aldehydů a amoniaku (volného anebo vázaného v reaktivních  $\alpha$ -aminokarbonylových sloučeninách). Streckerovy aldehydy se spolu s  $\alpha$ -aminokarbonylovými sloučeninami podílejí významně na tvorbě mnoha heterocyklických sloučenin (významných pro aroma potravin) a hnědých pigmentů, melanoidinů. Z aldolů současně vznikají odpovídající 2-deoxyaldosy nebo 1-amino-1-deoxyaldityly a 2-oxokyseliny [30].

Podle druhu oxidačního činidla a reagující aminokyseliny se liší mechanismus reakce. Touto reakcí jsou produkovány chuťové a vonné látky, které vzniknou následnými reakcemi těchto aldehydů a dalších produktů Streckerovy degradace [33].

### **2.9.1.3 Vznik heterocyklických sloučenin a pigmentů melanoidinů**

V závěrečné fázi dochází k tvorbě AGEs (Advanced Glycation End Products) neboli koncových produktů glykace. Vznikají nové látky: heterocyklické sloučeniny jako furfuraldehyd, pyranony nebo reduktony. Deoxoglukosany reagují s aminy za vzniku pyrrolů, pyrrolinonů a pyrrolinon reduktonů. Tyto produkty jsou bezbarvé a jsou schopny absorbovat záření v UV oblasti a někdy jsou nazývány jako premelanoidiny. Tyto látky mohou dále reagovat s aminy a dalšími karbonylovými sloučeninami na hnědé sloučeniny. Koncové produkty jsou termodynamicky stabilní a terminují Maillardovu reakci [25].

Během konečné fáze vznikají také barevné produkty. Jedná se o nízkomolekulární látky i o vysokomolekulární pigmenty (molekulovou hmotnost je vyšší než 1000 Da), jedná se o tzv. melanoidiny, které jsou nositeli hnědého zbarvení [31,33].

## **2.9.2 Karamelizace**

Při teplotách 170-200 °C dochází v kávě ke karamelizaci cukrů, vznikají hnědé až hnědočerné amorfnní produkty různého složení nazývané karamel, zároveň se uvolňují aromatické sloučeniny a kyseliny. Během pražení je většina sacharózy přeměněna na karamelizované sloučeniny [31].

Reakce probíhající při karamelizaci sacharidů jsou obdobné jako ty, ke kterým dochází při Maillardově reakci (dehydratace, isomerace, retroaldolisace aj.). Proto vznikají i obdobné reakční produkty (kromě dusíkatých sloučenin) [31].

## **2.10 Složení pražené kávy**

Chemické složení zrn se během pražení dramaticky změní, je to zapříčiněno probíhající pyrolýzou, karamelizací a Maillardovými reakcemi. Tvoří se bioaktivní látky, které se stávají důležité pro aroma a chuť výsledného kávového nápoje. Složení pražené kávy závisí na použitém druhu kávy; stupni, době a teplotě pražení; dále na rychlosti proudění vzduchu v pražárně a také na daném typu pražárny [22].

### **2.10.1 Obsah vody**

První změnou ve složení pražené kávy a zelené kávy je obsah vody. Obsah vlhkosti závisí na stupni pražení, ale průměrné množství obsažené vody je 1,5–5,0 % [22].

## 2.10.2 Proteiny a aminokyseliny

Obsažené proteiny jsou pražením z části degradovány na volné aminokyseliny a peptidy jsou zapojeny do Streckerových reakcí. Určité aminokyseliny reagují s redukujícími cukry za vzniku sloučenin s nízkou molekulovou hmotností a vzniku *melanoidinů*.

## 2.10.3 Melanoidiny

Melanoidiny do svých struktur vážou další složky jako jsou chlorogenové kyseliny, galaktomanany a arabinogalaktové proteiny. Do melanoidinů je začleněna také rozpustná vláknina, která byla pražením částečně degradována.

Jak již bylo zmíněno výše v kapitole 2.9.1, melanoidiny jsou zodpovědné za hnědou barvu pražené kávy. Některé studie tvrdí, že melanoidiny mají antioxidační, antibakteriální vlastnosti a jsou schopné vázat určité kovy do komplexních struktur. Lze je tedy považovat za bioaktivní látky, tj. látky mající vliv na živý organismus [22]. Jejich obsah v kávové sedlině však zvyšuje její toxicitu. Aby mohla být kávová sedlina využita jako substrát pro mikroorganismy a rostliny je tedy kromě FL potřeba odstranit i melanoidiny.

## 2.10.4 Sacharóza

Sacharóza se spotřebuje karamelizací a Maillardovými reakcemi. Díky degradaci sacharózy, polysacharidů a dalších sloučenin se začne zvyšovat kyselost kávy, je to způsobeno vzrůstající hladinou alifatických kyselin (mravenčí, octová, glykolová a mléčná) a tento děj nastává především při krátké době pražení [22].

## 2.10.5 Chlorogenové kyseliny

Chlorogenové kyseliny jsou hlavními zástupci fenolických látek a hlavními aromatickými kyselinami kávy. Nejsou tepelně stabilní a díky izomeraci, epimerizaci, laktonizaci jsou přeměněny na sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností (např. fenoly) a na melanoidiny. Pražením se obsah kyseliny chlorogenové sníží přibližně o 1 % než bylo obsaženo v zelené kávě. V komerčních pražírnicích se obsah kyseliny chlorogenové v opražené kávě pohybuje od 0,5 do 6 gramů na 100 gramů sušiny. Aby nedocházelo k velké ztrátě těchto sloučenin, bylo by zapotřebí použít rychlé pražení při vysoké teplotě (230 °C) [22].

Obsah chlorogenových kyselin v pražené kávě a nápojích závisí na druhu kávovníku a způsobu pražení semen. Semena kávy arabské, obsahují méně chlorogenových kyselin než semena kávy robusta. Některé kyseliny se nacházející pouze u druhu robusta, jedná se o dikaffeoyl-chinové kyseliny a smíšené diestery, feruloylkaffeoyl-chinové kyseliny, a také deriváty některých aminokyselin (N-kaffeoyl-L-tryptofan a N-kaffeoyl-L-tyrosin).

Chlorogenové kyseliny se při pražení semen z 30-70 % rozkládají za vzniku  $\gamma$ -laktonů 3-O a 4-O-cinnamoylchinových kyselin (cinnamoyl-1,5-chinolaktonů) a dalších produktů. Uvedené laktony jsou nejvýznamnějšími hořkými látkami pražené kávy. Hlavní složkou bývá 3-O-kaffeoyl-L-chin-1,5-lakton (3-O-kaffeoyl- $\gamma$ -chinid). Obsah kyselin v pražené kávě je uveden v tabulce 2 [30].

Tabulka 2: Obsah hlavních kyselin v pražené kávě (*C. arabica*) [30].

Kyseliny	Obsah [g·kg <sup>-1</sup> ]
3-kaffeoyl-chinová (chlorogenová)	20,0
4-kaffeoyl-chinová (krytochlorogenová)	2,0
5-kaffeoyl-chinová (neochlorogenová)	1,0
3,4-dikaffeoyl-chinová (isochlorogenová a)	0,1
3,5-dikaffeoyl-chinová (isochlorogenová b)	0,9
4,5-dikaffeoyl-chinová (isochlorogenová c)	0,1

### 2.10.6 Kofein

Kofein neboli 1,3,5-trimethylxanthin je jeden z nejrozšířenějších methylderivátů xanthinu, patřících do skupiny purinových alkaloidů. Obsah kofeinu se během pražení výrazně nemění, protože je termostabilní. Jeho množství v šálku kávy je závislé na teplotě vody, době extrakce a dalších aspektech [22,30].

### 2.10.7 Trigonellin

Trigonellin doprovázející alkaloidy kávy se díky pražení degraduje, vznikají nové sloučeniny včetně kyseliny nikotinové a těkavých sloučenin, jako jsou těkavé a senzoricky aktivní pyridiny, pyrroly, pyridiny, pyraziny a methylnikotinát. Vzniklá kyselina nikotinová se nazývá také jako niacin, vitamin B nebo vitamin PP a vzniká demethylací trigonellinu. Rychlé pražení vede k vyšší produkci trigonellinu než při pomalém pražení. Díky vlastnostem kofeinu a trigonellinu se využívá jejich poměr obsahů jako indikátor stupně pražení kávy [30,31].

## 2.11 Složení kávové sedliny

SCG je složena z polysacharidů, jako je celulóza a hemicelulózy (zejména manany, galaktany a v menší míře arabinany), dále z oligosacharidů, lipidů (obsahuje celkem 15 % hm. olejů), alifatických kyselin, aminokyselin, proteinů, alkaloidů (např. kofein, trigonelin), fenolů (ty jsou složeny především z chlorogenových kyselin), minerálů (např. P, Ca, K, Mg), ligninu, melanoidinů a těkavých sloučenin [24,27]. Podrobná charakterizace SCG je uvedena v tabulce 3.

### 2.11.1 Olejová frakce

Z kávové sedliny se extrakcí ve vhodném rozpouštědle (např. n-hexanu) může získat olejová frakce. Hlavní třídy lipidů jsou triacylglyceroly, estery diterpenových alkoholů a mastné kyseliny. Podrobněji se kávový olej skládá z 75 % triacylglycerolů, 14 % terpenových esterů, 5 % parciálních acylglycerolů, 1 % volných mastných kyselin, 1,5 % volných sterolů, 1 % esterů sterolů a 1 % polárních lipidů [27].

### 2.11.2 Hrubá vláknina

Hrubá vláknina je lignocelulózová frakce, která je složena z celulózy, hemicelulózy a ligninu [27].

#### 2.11.2.1 Celulóza

Celulóza je zastoupena ve značně menší míře než hemicelulózy. Celulóza je složena z několika stovek až deseti tisíců jednotek D-glukózy. Tyto jednotky jsou mezi sebou propojeny  $\beta(1,4)$ -glykosidovými vazbami. Molekuly celulózy se agregují na mikrofibrily a vytváří vysoce uspořádané (krystalické) nebo méně uspořádané (amorfní) oblasti. Krystalická část poskytuje tuhost a amorfní část naopak měkkost a pružnost. Neuspořádaná forma zároveň umožňuje vstřebávání vody a také u ní probíhá významně rychleji hydrolyza, než u formy krystalické [28].

#### 2.11.2.2 Hemicelulóza

V kávové sedlině je hemicelulóza zastoupena především mannany a arabinogalaktany. Mannany jsou složeny z opakujících se jednotek mannosy, které jsou propojené  $\beta(1,4)$ -glykosidovými vazbami. Arabinogalaktany jsou v kávové sedlině zastoupeny třemi typy, avšak převládající arabinogalaktany jsou arabino-3,6-galaktany, které jsou kovalentní vazbou připojeny k proteinům. Hemicelulózy vynikají amorfním a hydrofilním charakterem, mají vysokou mechanickou odolnost vůči vodě a oproti celulóze a ligninu jsou méně hydrolyzovatelné [27].

### 2.11.2.3 Lignin

Lignin je trojrozměrný amorfni přírodní polymer, složený z fenylypropanových jednotek s karbonylovými, hydroxylovými a methoxylovými substituenty. Má funkci stabilizátoru proti mechanickému poškození a přispívá k vysoké výhřevnosti SCG. Pro biotechnologické využití se musí lignin rozštěpit na zkvasitelné cukry, obvykle se tak děje pomocí hydrolytického procesu. Hydrolyza může probíhat buď enzymaticky, nebo chemicky. Záleží na typu hydrolyzy, avšak obecně se lignin rozštěpí na směs zkvasitelných cukrů s přítomností jiných látek jako jsou fenolické látky, proteiny a melanoidiny [27].

Tabulka 3: Podrobná charakterizace SCG [24]

Parametr	Množství
Výhřevnost [MJ·kg <sup>-1</sup> ]	19,0-26,9
Vlhkost [%]	1,18-65,7
Celkový dusík [%, dwt]	1,9-2,3
Celkový uhlík [%, dwt]	47,8-69,5
Celulóza [mg·kg <sup>-1</sup> ]	8,6-15,3
Hemicelulóza [mg·kg <sup>-1</sup> ]	36,7 ± 5,0
Arabinóza [mg·kg <sup>-1</sup> ]	1,7
Galaktany [mg·kg <sup>-1</sup> ]	13,8
Mannany [mg·kg <sup>-1</sup> ]	21,2
Bílkoviny [mg·kg <sup>-1</sup> ]	6,7-13,7
Tuky [mg·kg <sup>-1</sup> ]	10,0-15,0
Celkové cukry [mg·kg <sup>-1</sup> ]	8,5 ± 1,2
Celkové fenolické látky [%, dwt]	1,5 ± 1,0
Pektiny [%, dwt]	0,01 ± 0,005
Nerostupný lignin [%, dwt]	30,9-31,9
Rozpustný lignin [%, dwt]	1,6-1,7
Celkový lignin [%, dwt]	32,5-33,6
Tanniny [%, dwt]	0,02 ± 0,1
Chlorogenové kyseliny [%, dwt]	0,4789-3,3
Kofein [%, dwt]	0,02-0,4526
Acetylové skupiny [%, dwt]	2,2
Popel [%, dwt]	0,43-2,2
Draslík [mg·kg <sup>-1</sup> ]	3549,0
Fosfor [mg·kg <sup>-1</sup> ]	1475,1
Hořčík [mg·kg <sup>-1</sup> ]	1293,3
Vápník [mg·kg <sup>-1</sup> ]	777,4
Hliník [mg·kg <sup>-1</sup> ]	279,3
Železo [mg·kg <sup>-1</sup> ]	118,7
Mangan [mg·kg <sup>-1</sup> ]	40,1
Měď [mg·kg <sup>-1</sup> ]	32,3
Zinek [mg·kg <sup>-1</sup> ]	15,1

\*dwt = troy pennyweight; 643,015 troy pennyweight = 1 kilogram

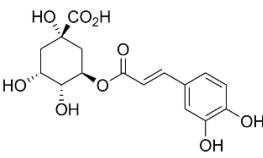
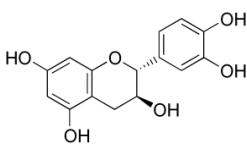
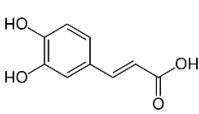
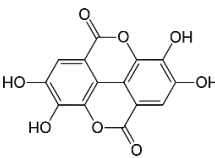
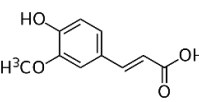
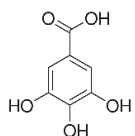
### 2.11.3 Fenolické látky

Fenolické látky (FL) představují skupinu více než 10 000 různých sloučenin obsahujících aromatické kruhy s hydroxylovými skupinami. Bylo zjištěno, že v kávové sedlině je obsaženo přibližně 4,6-9,9 mg fenolických látek na 1g SCG [27]. Fenolické sloučeniny v SCG spadají do skupiny polyfenolových esterů. Mezi tyto estery patří kyselina kávová, kyselina ferulová, kyselina gallová, kyselina p-kumarová a chlorogenové kyseliny.

Fenolické látky patří do široké skupiny antioxidantů. Tyto sloučeniny mají antioxidační, antibakteriální, hepatoprotektivní, hypoglykemické, protinádorové a antivirotické schopnosti. Dalšími aktivními FL v SCG jsou hydrolyzovatelné taniny [27,32].

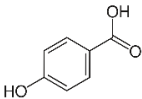
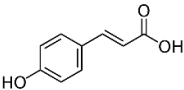
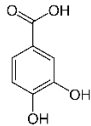
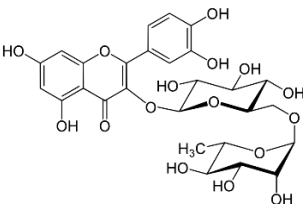
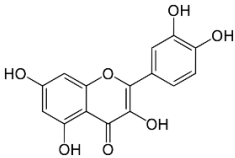
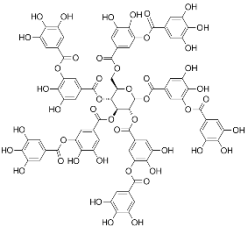
FL mohou být z SCG extrahovány použitím polárního nebo středně polárního rozpouštědla, jako je například etanol nebo metanol smíchaný s deionizovanou vodou [27]. Podrobnější seznam FL obsažených v SCG je uveden v tabulce 4.

Tabulka 4: Seznam fenolických látek obsažených v SCG [27]

Název sloučeniny	Vzorec	[ $\mu\text{gGAE} \cdot \text{g}^{-1}$ ]	[ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ]
Chlorogenová kyselina		0,3-41,3	1,8-5,6
Katechin, Epikatechin		0,3	0,3-0,6
Kávoová kyselina		0,1	0,03-0,07
Kyselina ellagová		nd	0,06-0,1
Kyselina ferulová		nd	0,004-0,01
Kyselina gallová		14,3	1,3-2,5

nd = nebyl detekován (angl. not determined)

Tabulka 4: Seznam fenolických látek obsažených v SCG - pokračování

Název sloučeniny	Vzorec	[ $\mu\text{gGAE} \cdot \text{g}^{-1}$ ]	[ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ]
Kyselina <i>p</i> -hydroxybenzoová		3,1	nd
Kyselina <i>p</i> -kumarová		nd	0,01
Kyselina protocatechová		0,6-33,1	nd
Rutin		nd	0,06
Quercetin		nd	0,96-1,0
Kyselina taninová		0,7	nd

nd = nebyl detekován (angl. not determined)

## 2.12 Valorizace kávové sedliny

Jak již bylo zmíněno, káva jako jedna z oblíbených světových pochutin je po ropě druhou nejvýznamnější obchodovatelnou surovinou na světě. Jak produkce, tak spotřeba kávy každoročně roste nebo jen mírně stagnuje. Při výrobě kávy však vzniká vysoké množství pevného i kapalného odpadu. Celkově se na světě celoročně vyprodukuje přibližně 9 milionů tun kávových zrn, z tohoto množství vzniká nezanedbatelné množství, cca 6 milionů tun, kávové sedliny [5]. Kávová sedlina je jedna z nejvýznamnějších částí pevného kávového odpadu. Vzniká při přípravě kávového nápoje, ale větší množství vzniká při výrobě instantní kávy. Na výrobu 1 kilogramu instantní kávy připadá přibližně 0,9-1,2 kg kávové sedliny [29].

V poslední době se mnoho studií zaměřilo na zkoumání složení a přímé aplikace SCG, nově se také některé výzkumy zajímají o aplikaci jejích sekundárních produktů. Vzhledem ke svému složení má SCG plno využitelných vlastností. Díky její vysoké výhřevnosti (cca 5000 kcal/kg), která je srovnatelná s uhlím, se může používat jako palivo do průmyslových kotlů. SCG má výbornou kapacitu zadržování vody (5,7 g vody/g suché SCG), kapacitu zadržování olejů (5,2 g oleje/g suché SCG), dále má i významný antioxidační potenciál. Absorpční vlastnosti SCG by mohla sloužit pro její aplikaci jako absorbentu pro úpravu kontaminovaných vod, například pro odstranění iontů těžkých kovů z pitné vody [27,32].

Vzhledem k její vysoké nutriční hodnotě byla SCG testována také jako přísada do zvířecích krmiv. V tomto případě však bylo zjištěno, že pokud je koncentrace kofeinu a fenolických látek v SCG vyšší než 2,5 %, tak je krmivo zcela nepoživatelné [29].

Široké veřejnosti je známo využití SCG jako hnojiva, jelikož obsahuje vysoké množství minerálů (všechny jsou zaznamenány v tabulce 3), jejichž přítomnost stimuluje růst rostlin [29]. Jelikož toto využití souvisí s hlavním cílem práce, o použití kávové sedliny jako substrátu podrobněji pojednává kapitola 2.12.4.

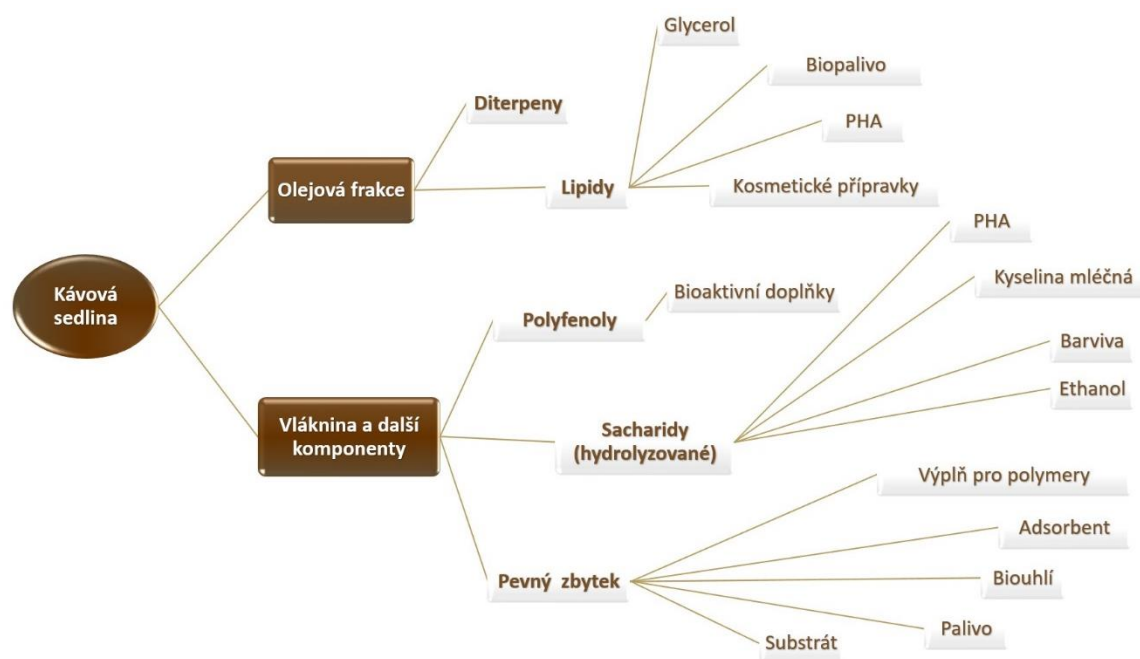
Nicméně mnoho prací poukázalo na to, že frakcionace SCG může znásobit její využití [32]. Frakcionací je míněno oddělení všech částí a sloučenin kávové sedliny, které mohou být využity pro výrobu nových produktů. Celkově možná frakcionace je znázorněna na obrázku 2 a využití jednotlivých frakcí jsou popsány v následujících podkapitolách.

### 2.12.1 Olejová frakce

Lipidy mohou sloužit pro výrobu glycerolu, biopaliva a v dnešní době velmi atraktivní PHA. PHA neboli polyhydroxyalkanoáty jsou polyesteru bakteriálního původu. Díky svým mechanickým vlastnostem by mohly zastoupit místo syntetických polymerů, jelikož PHA jsou plně biodegradovatelné a biokompatibilní [27,29].

### 2.12.2 Pevná odtučněná frakce

Kávová sedlina zbavená olejové frakce je složena z pevné části, ze které se dalšími kroky mohou získat fenolické látky, sacharidy a konečný zbytek pevného podílu. Sacharidy mohou být využity jako surovina pro výrobu PHA, mléčné kyseliny, barviv a ethanolu. Konečný pevný zbytek bez sacharidů a fenolických sloučenin může být využit jako adsorbent, jako surovina pro výrobu biouhlí (zuhlňatelná biomasa) či biopaliva. Jelikož je v této části zbaven fenolických látek (FL), tak se nabízí varianta jeho přímého využití jako substrátu, tato část je více probrána v kapitole 2.12.4 [27].



Obrázek 2: Schéma možné valorizace kávové sedliny [27]

### 2.12.3 Fenolické látky

Fenolické látky (FL) jsou při přípravě kávy jen částečně do vody extrahovány, z toho důvodu SCG obsahuje značné množství FL (přesné množství je uvedeno tabulce 3) [32].

FL jsou bioaktivní sloučeniny, které na sebe přilákaly velkou pozornost díky svým silným antioxidačním a chelatačním vlastnostem [32]. FL získané z SCG vynikají svou výraznou schopností absorpce radikálů kyslíku, protinádorovými, protizánětlivými a antialergickými vlastnostmi [27]. Fenolové extrakty izolované z SCG mohou být použity jako antioxidanty, protizánětlivá aditiva nebo dermatologická antimelagenogenní činidla ve farmaceutickém průmyslu. Navíc v poslední době vzrůstá zájem o přírodní fenolické sloučeniny extrahované z rostlin, protože syntetické antioxidanty mají určité nežádoucí účinky [32].

### 2.12.4 Využití kávové sedliny jako substrátu

Jak již bylo výše zmíněno, kávová sedlina je v této době známá svými účinky podporující růst rostlin, jelikož obsahuje vysoké množství minerálů. Nicméně informace v kapitole o složení SCG (2.11) sdělují, že SCG obsahuje také kofein, fenolické látky a melanoidiny, které mají naopak neblahý vliv na růst rostlin a také na růst půdních mikroorganismů.

Jedním z řešení pro snížení obsahu těchto látek by mohlo být kompostování, které by zapříčinilo snížení toxicity SCG [29,32]. Větší význam pro tuto práci má ale fakt, že pro očištění SCG mohou posloužit detoxifikační metody, speciálně metody využívající oxidační procesy.

## 2.13 Fenolické látky

Fenolické látky jsou hlavní příčinou vysoké toxicity kávové sedliny, a proto je tato kapitola věnována jejich stručné charakteristice.

Fenolické látky se ve většině svých reakcí chovají jako nukleofily a činidla na ně působící jako elektrofil. Fyzikální vlastnosti FL jsou několika ohledech podobné vlastnostem alkoholů. Je to způsobené přítomností hydroxylových skupin v jejich strukturách. Jsou schopné tvořit silné vodíkové vazby, díky tomu jsou mírně rozpustné ve vodě. Jejich teploty varu jsou vyšší



než u uhlovodíků se stejnou molekulou hmotností. FL jsou silnější kyseliny než alkoholy. Reagují dobře s bázemi za vzniku fenolátových iontů. Jsou však slabšími kyselinami než karboxylové kyseliny a nereagují s hydrogenuhličitanem sodným [49].

## 2.14 Detoxifikace kávové sedliny

### 2.14.1 Odstranění fenolických látek

Jak již bylo zmíněno výše, toxicita kávové sedliny je způsobena především přítomností fenolických látek. Jelikož fenolické látky jsou obsaženy také v průmyslových odpadech, které znečišťují podzemní vody, bylo vyvinuto již několik metod, které umožňují jejich odstranění [49]. Tyto metody by mohly být použity také při detoxifikaci kávové sedliny.

Vysoké množství fenolických látek může být účinně odstraněno konvenčními způsoby, jako je extrakce, destilace, elektrochemická oxidace či redoxní reakce. Mezi pokročilé metody pro odstranění FL patří Fentonova metoda, ozonace, oxidace mokřím vzduchem, membránová separace, fotokatalytická degradace a ultrafiltrace. V poslední době se pro odstranění FL využívá adsorpce, kdy dochází k zachycení FL pomocí syntetických či přírodních materiálů, jako je například aktivní uhlí či jíly [34,49]. Na obrázku 3 je znázorněno reakční schéma oxidace kyseliny gallové pomocí elektrochemického procesu.



Obrázek 3: Reakční schéma oxidace kyseliny gallové pomocí elektrochemického procesu [51]

V této práci byly pro detoxifikaci kávové sedliny využity redoxní reakce, při kterých dochází k oxidaci fenolických látek pomocí oxidačních činidel. Pro odstranění fenolických látek lze použít obvyklá oxidační činidla, kterými jsou například  $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  a  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  nebo pokročilých oxidačních technik, které se označují jako pokročilé oxidační procesy (AOP, advanced oxidation processes). Tyto procesy využívají hydroxylové radikály a lze je charakterizovat společnými znaky:

- Reakčním činidlem jsou vysoce reaktivní hydroxylové radikály  $\text{OH}^*$  (a to bez ohledu na reakční mechanismus)
- rychlostní konstanty reakce druhého řádu dosahují hodnot  $10^6$ - $10^9 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ , atak  $\text{OH}^*$  na organický substrát je tedy velmi rychlý,
- atak  $\text{OH}^*$  se vyznačuje nízkou selektivitou, což umožňuje široké uplatnění AOP (např. při předúpravě odpadních vod s obsahem toxické organické matrice)
- jelikož AOP probíhají za normální teploty a tlaku, náklady na energii nejsou příliš náročné
- atak  $\text{OH}^*$  může být aplikován různými chemickými reakcemi, procesy AOP jsou díky tomu variabilní při řešení ekologických problémů v praxi
- činidla potřebná pro tvorbu  $\text{OH}^*$  jsou však v této době stále drahá ( $\text{O}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), jejich použité množství by z ekonomického důvodu nemělo přesáhnout hodnotu CHSK resp. TSK  $< 5000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , nebo by se měla kombinovat s aerobním biologickým stupněm.

Nejstarším procesem ze skupiny pokročilých oxidačních procesů je Fentonová metoda. Je pojmenována podle svého objevitele, chemického inženýra H. J. H. Fentona. Oxidace probíhá pomocí činidla, které obsahuje ionty  $\text{Fe}^{2+}$  a peroxid vodíku. V různých pracích je reakce zmiňována v souvislosti s oxidačním odbouráváním etherů, alkoholů, fenolů, aldehydů, ketonů a dále aromátů včetně polycyklických, aminů či barviv. Pro silné urychlení Fentonové oxidace se využívá působení UV záření, tato reakce se nazývá Foto-Fentonova oxidace [34].

### 2.14.2 Odstranění melanoidinů

Jak již bylo zmíněno výše, melanoidiny jsou dalšími látkami v SCG, které inhibují růst rostlin a mikroorganismů. Pro jejich odstranění lze využít podobných metod jako u FL. Například membránou filtraci, ozonaci nebo reakcí s řadou organických a anorganických oxidačních činidel [50].

## 2.15 Stanovení celkových FL pomocí UV/VIS spektrofotometrie

Pro stanovení celkového obsahu fenolických látek lze využít UV/VIS spektrofotometrii. Jedná se o fyzikálně-chemickou metodu, která je zařazena pod molekulovou absorpční spektrometrii [42]. Mezi nejpoužívanější spektrofotometrické metody patří stanovení pomocí Folin-Denisova a Folin-Ciocalteuova činidla, Pruskou modří nebo spektrální analýza v UV oblasti [42]

### 2.15.1 Princip UV/VIS spektrofotometrie

Princip UV/VIS spektrofotometrie spočívá v měření absorpce vzorku při průchodu ultrafialového (UV) nebo viditelného (VIS) záření. Absorpcí elektromagnetického záření molekulou dochází k excitaci valenčních elektronů, které jsou součástí molekulových orbitalů. Z tohoto důvodu se poté změní elektronový stav dané molekuly a dojde k elektronovým přechodům. Na konci měření jsou získána absorpční spektra. Jedná se o grafické znázornění závislosti absorbance na vlnové délce [42,43].

Pro kvantitativní analýzu se používá Lambert-Beerův zákon,

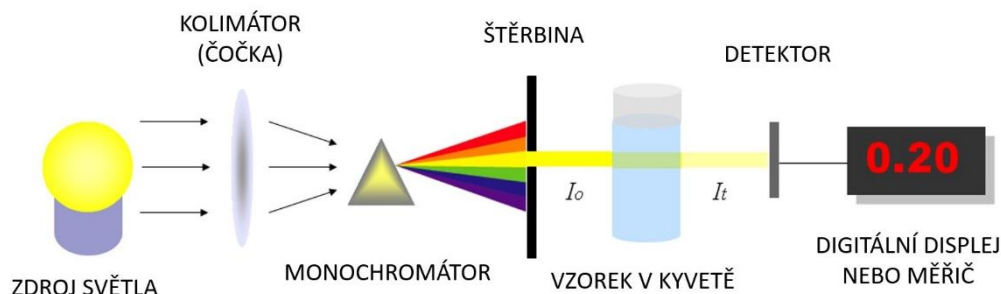
$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (1)$$

kde  $\varepsilon$  molární absorpční koeficient [ $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ],  $l$  je tloušťka kyvety [cm] a  $c$  je koncentrace analytu [ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ]. Lambert-Beerův zákon tedy vyjadřuje závislost absorbance na koncentraci a tloušťce absorbující vrstvy (tloušťky kyvety). Lambert-Beerův zákon je však omezený jen pro zředěné roztoky do koncentrace  $10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-3}$ . U koncentrací nad  $10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-3}$  je extinkční neboli molární absorpční koeficient  $\varepsilon$  závislý na indexu lomu roztoku, a z toho důvodu jej již nelze považovat za koeficient [42,43].

### 2.15.2 Schéma UV/VIS spektrofotometru

Na trhu jsou dostupné spektrofotometrické přístroje, které se liší svým určením, velikostí, modularitou a výbavou. Existují dva základní druhy spektrofotometrů, prvním je tzv. jednopaprskový, který obsahuje jen jeden monochromátor, a druhým dvoupaprskový, který obsahuje dva monochromátory. Dvoupaprskový spektrofotometr je výhodnější, jelikož obsahuje dělič paprsků, který rozdělí světlo do dvou paprsků. Jeden paprsek prochází kyvetou srovnávací (blank) a druhý prochází kyvetou se zředěným stanovovaným vzorkem. U měření pomocí jednopaprskového spektrofotometru je potřeba nejdříve změřit referenční vzorek a poté je možné změřit vlastní vzorky [45]. Jednopaprskový spektrofotometr je však více využíván díky jeho nižším nákladům na pořízení [43].

Každý spektrofotometr obsahuje zdroj záření, kterým je deuteriová výbojka pro UV oblast a wolframová lampa pro oblast VIS. Xenonová výbojka zahrnuje obě oblasti. Za zdrojem záření se nachází kolimátor, monochromátor, štěrbinu (díky které se volí vlnová délka), kyveta se vzorkem, detektor (fotonásobič, fotodioda, diodové pole) a digitální displej nebo měřič. Základní schéma spektrofotometru znázorňuje obrázek 4.



Obrázek 4: Základní schéma spektrofotometru [44]

### 2.15.3 Spektrofotometrická metoda za použití Folin-Ciocalteuova činidla

Ke stanovení celkového obsahu fenolických látek (FL) se nejčastěji využívá jejich reakce s Folin-Ciocalteuovým činidlem (F-C). Jedná se o směs fosfomolybdenové a fosfowolframové kyseliny [46].

Ke vzorku fenolických látek se musí přidat nasycený roztok  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , který zajistí alkalické prostředí (výsledné  $\text{pH} \approx 10$ ). Po přidavku F-C do této směsi dochází k oxidaci fenolických sloučenin (ale také oxidovatelných forem jiných sloučenin) a současně se redukuje fosfowolframovo-fosfomolybdenový komplex za vzniku modrého zbarvení. Vznik tohoto modrého komplexu umožňuje měření ve viditelné části spektra, přesněji při  $50^\circ\text{C}$  při vlnové délce  $760\text{ nm}$  [46].

Jako standardní látka se používá kyselina gallová. Výsledná hodnota je přepočítávána na ekvivalentní množství kyseliny gallové (např. jako miligram kyseliny gallové na kilogram nebo litr měřeného vzorku) [46,47].

## 2.16 Analýza fenolických látek pomocí HPLC

HPLC (z angl. high-performance liquid chromatography) neboli vysokotlaká kapalinová chromatografie je metoda, při které probíhá dělení látek na základě rozdílné afinity ke stacionární fázi. Díky využití velkého množství kolon se jedná o široce uplatnitelnou metodu. V analýze fenolických látek HPLC zaujímá vedoucí postavení [35].

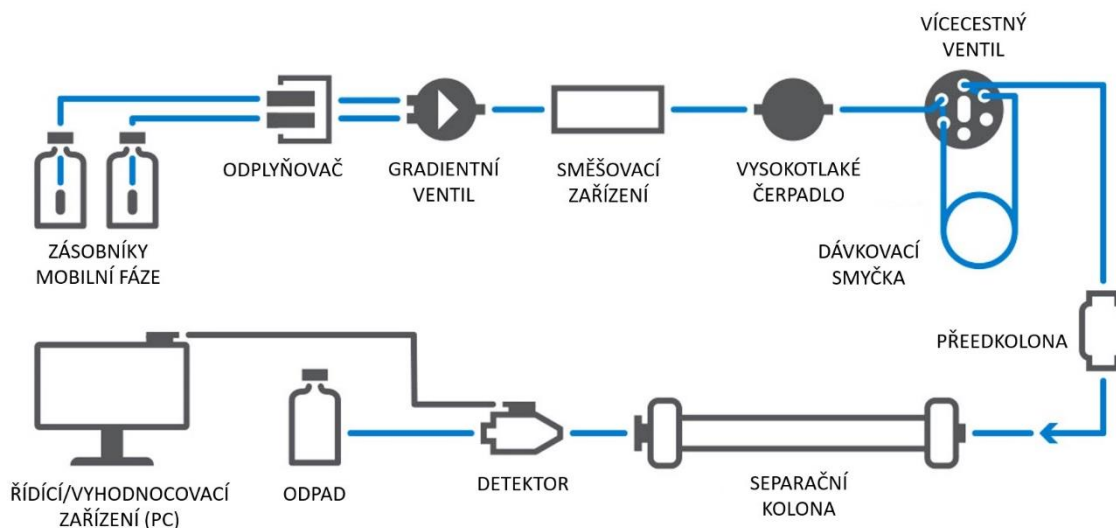
### 2.16.1 Princip separace

Principem separace je rozdělení látek mezi stacionární fázi, která je přítomna v koloně a mobilní fázi, která protéká kolonou pod vysokým tlakem. Daný vzorek je vháněn do kolony obsahující stacionární fázi, ke které má stanovovaná sloučenina pozitivní afinitu (je k ní tažena elektrostatickými, chemickými nebo jinými silami). Vzorek je díky mobilní fázi pod vysokým tlakem unášen až na konec kolony. Stanovovaná látka je však díky afinitní síle naopak zadržována až zdržována v koloně [36].

## 2.16.2 Schéma HPLC

Kapalinový chromatograf je přístroj obsahující zásobníky mobilní fáze s odplyňovačem. Mobilní fáze se čerpá ze zásobníků vysokotlakým čerpadlem do směšovače mobilní fáze. Podle toho, zda mají či nemají látky podobné eluční vlastnosti, se pro separaci používá buď izokratická, nebo gradientová eluce. Izokratická eluce se používá pro separaci látek s podobnými elučními vlastnostmi. Při izokratické eluci se používá jedna mobilní fáze, jejíž složení se během separace nemění. Gradientová eluce je vhodná pro separaci analytů, jejichž eluční parametry jsou rozdílné. Při gradientové eluci se k jedné mobilní fázi v průběhu separace přimíchává druhá, případně třetí mobilní fáze, jejich vzájemné poměry se v průběhu separace mění. Pro stanovení fenolických látek je vhodné využít gradientové eluce [35,36,37]. Schéma HPLC systému je znázorněno na obrázku 5.

Pomocí pístových nebo membránových čerpadel je zajišťován průtok mobilní fáze. Membránové čerpadlo je složeno ze dvou částí: vlastního pracovního prostoru a prostoru s pístem, tyto dva prostory jsou od sebe odděleny membránou. Pístový prostor je naplněný hydraulickou kapalinou. Jelikož je potřebné, aby byl zajištěn bezpulzní tok mobilní fáze, je nutné zařadit dvě čerpadla, díky kterým budou na sebe navazovat fáze výtlačku a fáze sání [37].



Obrázek 5: Schéma HPLC systému [38]

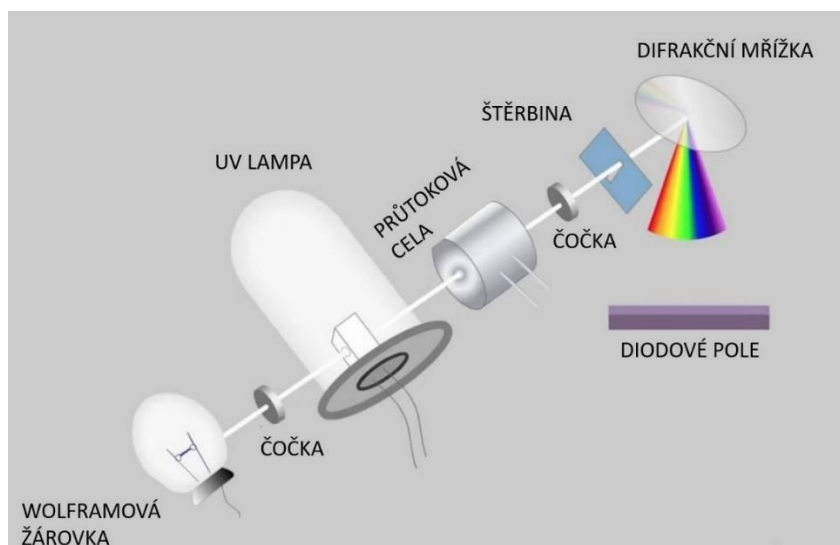
Separace látek probíhá na trubici z borosilikátového skla nebo nerezové oceli, na tzv. náplňové koloně. Její délka se pohybuje v rozmezí 5-30 cm, vnitřní průměr v rozmezí 2-8 mm. Kolona obsahuje náplň ze stacionární fáze, která je nepolárního charakteru (v případě chromatografie s obrácenými fázemi). Stacionární fází bývá obvykle silikagel s chemicky vázanými alkyly (oktadecyl, oktyl). Jako mobilní fáze bývá často využíván methanol, acetonitril nebo tetrahydrofuran. Jako polární sorbenty mohou posloužit alumina nebo silikagel [35,36,37].

## 2.16.3 UV/VIS detektor s diodovým polem (DAD)

K detekci byl použit DAD detektor, který je dostatečně citlivý a použitelný pro gradientovou eluci. DAD snímá celé absorpční spektrum eluátu každou sekundu bez přerušení chromatografické separace a je založen na principu absorpce záření v oblasti vlnových délek 190 do 800 nm. Kvantitativní vyhodnocení je založeno na Lambert-Beerově zákoně (více informací o zákoně viz kapitola 2.14) [39,40].

DAD má dva zdroje světla: wolframovou žárovku, která je zdrojem viditelného světla a deuteriovou lampu, která je zdrojem ultrafialového (UV) světla. UV lampa je umístěna za wolframovou lampou [41].

Schéma DAD detektoru je znázorněno na obrázku 6. Záření ze zdroje (celé spektrum světla) prochází čočkou, průtokovou celou, druhou čočkou, štěrbinou a dopadá na disperzní mřížku. Na disperzní mřížce dochází k spektrálnímu rozkladu záření a na každou fotodiodu poté dopadá zářivý tok o určité vlnové délce, který je zeslabený absorpcí v cele detektoru. Intenzita dopadajícího záření je závislá na typu a množství sloučeniny, která prochází přes průtokovou celu a také na délce průtokové cely (nejčastěji cca 10 mm) [39,40,41].



Obrázek 6: Schéma DAD detektoru

Dispergované (rozptýlené) světlo je měřeno fotosensitivními diodami neboli fotodiodami. Fotodiody jsou pasivní součástka (tedy nechová se jako zdroj), jejíž elektrický odpor v závěrném směru je závislý na osvětlení. Fotodiody jsou propojeny kondenzátorem předem nabitým na určitou hodnotu. Kondenzátor se po dopadu záření na diodu vybije díky vznikajícímu fotoelektrickému proudu. V další fázi se kondenzátory nabíjí a měří se proud, který je potřebný na dobití příslušných kondenzátorů. Do paměti řídicí jednotky (PC) se poté ukládá velikost tohoto proudu. Vybíjení a nabíjení kondenzátoru se rychle opakuje v rámci milisekund. Údaje o absorptanci se tedy zaznamenávají v každé vlnové délce při každém čase [39,40].

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Příprava vzorků z kávové sedliny

Pro práci byly využity tři vzorky kávové sedliny. Prvním vzorkem byla samotná neupravená kávová sedlina (SCG), druhým vzorek byla odtučněná SCG a třetím vzorkem odtučněná a zároveň hydrolyzovaná kávová sedlina. Bylo tedy nutné ve dvou případech kávovou sedlinu upravit. Pro přípravu odtučněné SCG bylo zapotřebí využít Soxhletovy extrakce a pro hydrolyzovaný vzorek využít hydrolyzu probíhající v autoklávu.

#### 3.1.1 Soxhletova extrakce kávové sedliny

##### Použité laboratorní pomůcky

- Běžné laboratorní sklo
- Odměrný válec 250 ml
- Extrakční patrony
- Extrakční skleněné tuby
- Odtučněná vata
- Exsikátor

##### Použité chemikálie

- *n*-hexan (Sigma-Aldrich, Německo)

##### Použité přístroje

- Jednotka pro automatickou extrakci SOX THERM (Gerhardt, Německo)

##### Postup

Z vysušené odpadní kávové sedliny byl odebrán vzorek. Bylo naváženo 4 x 20 g kávové sedliny (s přesností na 4 desetinná místa), vzorek byl nasypán do extrakční patrony a nahoře byl utěsněn vatou. Patrona byla vložena do extrakční tuby s varným kamínkem a následně bylo do této tuby nalito 150 ml *n*-hexanu. Poté se extrakční tuba vložila do extrakční jednotky Soxtherm (viz obrázek 7) a pomocí počítače byly zadány příslušné parametry pro extrakci. Extrakce probíhala 3 hodiny a 38 minut při 180 °C. Po ukončení extrakce byl získaný olej přemístěn do vakuové rotační odparky, kde se olej vyčistil od zbytkového množství *n*-hexanu. Poté se kávová sedlina spolu s patronami a vatou sušila při teplotě 70 °C až do té doby, než zůstala hmotnost konstantní, sušení probíhalo přibližně 1 hodinu.



Obrázek 7: Extrakce olejové frakce SCG v SoxThermu

### 3.1.2 Hydrolýza kávové sedliny

#### Použité laboratorní pomůcky

- Běžné laboratorní sklo
- Erlenmeyerovy baňky 500 ml
- Petriho misky
- Büchnerova nálevka
- Odsávací baňka
- Vatové zátky
- Hliníková folie
- Indikační pH papírky

#### Použité chemikálie

- Kyselina sírová 96%
- Destilovaná voda

#### Použité přístroje

- Autokláv
- Horkovzdušná sušárna

#### Použité vzorky

- Odtučněná kávová sedlina

#### Postup

Pro hydrolýzu kávové sedliny bylo nejprve nutno si připravit 80 ml 4 % obj. kyseliny sírové (80 ml na každých 20 g kávové sedliny). Do Erlenmeyerovy baňky bylo odváženo přibližně 20 g odtučněné kávové sedliny. Baňka byla uzavřena vatovou zátkou, která byla posléze obalena hliníkovou folií. Takto připravená baňka byla vložena do autoklávu po dobu 2 hodin. Po ukončení hydrolýzy byl obsah baňky přenesen na Büchnerovu nálevku s odsávací baňkou, kde byl promýván destilovanou vodou do té doby, než bylo pomocí pH papírků prokázáno neutrální pH, tedy okolo hodnoty 7. V následujícím kroku byla hydrolyzovaná kávová sedlina přemístěna na Petriho misky a usušena v sušárně při teplotě 70 °C do konstantní hmotnosti.

### 3.1.3 Extrakce vzorků nezoxidované kávové sedliny

Všechny vzorky byly extrahovány pomocí směsi ethanol-voda (3:2). Postup extrakce probíhal stejným způsobem u vzorků před oxidací i po oxidaci.

#### Použité laboratorní pomůcky

- Běžné laboratorní sklo a pomůcky
- Automatická pipeta Finnpiquette 0,5-5 ml (Thermo Scientific, USA)
- Odměrný válec 100 ml
- Injekční stříkačky 5/6 ml (NORM-JECT, Německo)
- Stříkačkové filtry 0,45 µm NYLON (VWR, Evropa)
- Magnetická míchadla
- Centrifugační zkušavky, PP, se šroubovým uzávěrem 50 ml



## Použité chemikálie

- Destilovaná voda z laboratorní jednotky ELGA
- Ethanol, čistota HPLC (Sigma-Aldrich, Německo)

## Použité přístroje

- Vícemístná magnetická míchačka
- Chladnička (Electrolux, ČR)
- Laboratorní centrifuga

## Postup

Všechny tři druhy vzorků kávové sedliny byly extrahovány ve dvou paralelních řadách. Pro extrakci byla připravena směs ethanol-voda v poměru 3:2. Od každého vzorku byl navážen 1 g vzorku kávové sedliny s přesností na 4 desetinná místa. Každý vzorek byl poté umístěn do kádinek, kde k nim posléze bylo přidáno 10 ml připravené směsi ethanol-voda, magnetické míchadlo a posléze se spustila extrakce (viz obrázek 8). Po 15minutové extrakci bylo odebráno přibližně 5 ml vzniklého roztoku pomocí injekčních stříkaček. Roztok se poté přefiltroval pomocí nylonových stříkačkových filtrů do předem připravených a označených plastových zkumavek, které poté byly uzavřeny plastovými zátkami. Nakonec byly zkumavky se vzorky umístěny do chladničky.



Obrázek 8: Extrakce vzorků SCG do směsi ethanol-voda (3:2)

## 3.2 Stanovení celkového obsahu FL pomocí UV/VIS spektrofotometrie

### Použité laboratorní pomůcky

- Běžné laboratorní sklo
- Automatická pipeta Finnpiquette 100-1000  $\mu$ l (Thermo Scientific, USA)
- Automatická pipeta Finnpiquette 0,5-5 ml (Thermo Scientific, USA)
- Odměrný válec 100 ml
- Odměrné baňky 100 ml
- Skleněná kyveta
- Injekční stříkačky 5/6 ml (NORM-JECT, Německo)
- Stříkačkové filtry 0,45  $\mu$ m NYLON (VWR, Evropa)
- Magnetická míchadla

### Použité chemikálie

- Destilovaná voda z laboratorní jednotky ELGA
- Uhličitán sodný
- Folin-Ciocalteuovo činidlo



## Použité přístroje

- UV/VIS spektrofotometr Helios  $\gamma$  (ThermoSpectronic, VB)

## Postup

Prvním krokem byla příprava roztoku 7,5% uhličitanu sodného. Bylo naváženo 7,5 g krystalického uhličitanu sodného, který byl dále v kádince rozpuštěn pomocí 50 ml destilované vody. Kádinka s roztokem byla poté vložena do ultrazvukové vany po dobu cca 2 minut. Poté byl tento roztok kvantitativně převeden do 100 ml odměrné baňky a byl doplněn destilovanou vodou po značku. V druhém kroku byl připraven roztok Folin-Ciocalteuova činidla v poměru 1:9.

*Příprava kalibrační křivky:* Prvně byl připraven standardní roztok kyseliny gallové. Z tohoto roztoku byly dále postupným ředěním destilovanou vodou získány roztoky o přibližné koncentraci 100, 200, 300, 400 a 500  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Poté bylo do předpřipravených zkumavek pomocí automatické pipety napipetován 1 ml 10x zředěného Folin-Ciocalteuova činidla, dále byl přidán 1 ml destilované vody a 100  $\mu\text{l}$  vzorku. Obsah zkumavek se promíchal a nechal se 5 minut v klidu stát. Po pěti minutách byl do každé zkumavky přidán 1 ml 7,5% roztoku uhličitanu sodného. Tato směs se ponechala stát 15 minut. Reakcí F-C s fenolickými látkami vznikl roztok modrého zbarvení, viz obrázek 9. Poté se změřila absorbance pomocí UV/VIS spektrofotometru Helios při vlnové délce 750 nm proti slepému vzorku. Slepý vzorek byl připraven stejným způsobem, avšak namísto 100  $\mu\text{l}$  vzorku bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  destilované vody.



Obrázek 9: Zbarvení vzorků před (žluté) a po (modré) přidání F-C

*Vlastní stanovení:* Vzorky roztoku kávové sedliny byly napipetovány do zkumavek. Poté bylo postupováno stejným způsobem jako při přípravě kalibrační křivky. Pokud naměřená absorbance měla vyšší hodnotu než 1, byl roztok kávové sedliny naředěn.

*Výpočet:* Obsah celkových fenolických látek ve vzorku se poté vypočítal pomocí rovnice regresivní přímky a poté byla přepočítána na obsah fenolických látek v mg na g suché kávové sedliny podle vzorce:

$$c = \frac{A \cdot V}{k \cdot m} [\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}] \quad (2)$$

Kde  $c$  znázorňuje koncentraci fenolických látek v mg na 1 g SCG,  $A$  je naměřená absorbance,  $V$  je objem roztoku (objem extrakčního roztoku),  $k$  je směrnice získána z kalibrační rovnice a  $m$  je hmotnost navážky SCG.

### 3.3 Sestavení absorpčního spektra melanoidinů

#### Použité laboratorní pomůcky

- Běžné laboratorní sklo

#### Použité chemikálie

- Destilovaná voda

#### Analyzované vzorky

- Extrahovaný roztok z neupravené SCG (NSCG)
- Extrahovaný vzorek z odtučněné SCG (OSCG)
- Extrahovaná vzorek z odtučněné a zároveň hydrolyzované SCG (OHSCG)
- Extrahovaný vzorek neupravené SCG po oxidaci (OX-SCG)

#### Použité přístroje

- UV/VIS spektrofotometr Helios  $\gamma$  (ThermoSpectronic, VB)

#### Postup

Do kyvety byl nalit analyzovaný vzorek SCG a poté byla změřena absorbance při vlnových délkách v rozmezí 250-600 nm (jeden krok byl 10 nm).

Pro měření absorbance v oblasti při vlnových délkách od 250 do 370 nm, musely být vzorky 100x ředěny, v oblasti od 370 do 600 nm vzorky byly ředěny 10x. Protože ředění nebylo jednotné byla zavedena absolutní hodnota, tzv. *relativní signál*. Relativní signál je bezrozměrná veličina a jeho hodnota se získá výpočtem:

$$R_s = A \cdot F [-] \quad (3)$$

kde  $R_s$  znázorňuje relativní signál,  $A$  naměřenou absorbanci a  $F$  použité ředění. Poté byl vykreslen graf závislosti tohoto relativního signálu v závislosti na vlnové délce.

### 3.4 Kvalitativní a kvantitativní stanovení fenolických látek pomocí HPLC

#### Použité laboratorní pomůcky

- Běžné laboratorní sklo
- Automatická pipeta Finn timer 100-1000  $\mu$ l (Thermo Scientific, USA)
- Vialky se septy (Chromservis, ČR)

#### Použité chemikálie

- Kyselina mravenčí, čistota HPLC (Sigma-Aldrich, Německo)
- Acetonitril, čistota HPLC (Sigma-Aldrich, Německo)
- Destilovaná vody z laboratorní jednotky ELGA
- Ethanol, čistota HPLC (Sigma-Aldrich, Německo)
- Kyselina chlorogenová, čistota titrace (Aldrich, Německo)
- Kyselina kávová, čistota HPLC (Sigma, Německo)
- Kyselina ferulová, čistota titrace (Aldrich, Německo)
- Kyselina gallová, čistota HPLC (Sigma-Aldrich, Německo)
- Kofein, čistota HPLC (Sigma-Aldrich, Německo)

#### Použité přístroje

- HPLC systém Agilent infinity 1260 (Agilent, USA)

## Analyzované vzorky

Pro kvalitativní i kvantitativní analýzu fenolických látek pomocí HPLC byly použity vzorky kávové sedliny: nezoxidované – neupravená, odtučněná, odtučněná a zároveň hydrolyzovaná; zoxidované – neupravená.

## Podmínky pro HPLC

- Kolona: Kinetex 2,6  $\mu\text{m}$  EVO C18, 150 x 4,6 mm (Phenomenex, USA)

Tabulka 5: Chromatografické podmínky

<b>nástřik vzorku</b>	5 $\mu\text{l}$
<b>teplota kolony</b>	40 °C
<b>mobilní fáze</b>	acetonitril + 2% kys. mravenčí
<b>průtok mobilní fáze</b>	0,700 $\text{ml}\cdot\text{l}^{-1}$
<b>typ eluce</b>	Gradientová (viz tabulka 6)
<b>celková doba analýzy</b>	45 min

Tabulka 6: Průběh gradientu mobilní fáze

Čas [min]	ACN [%]	2% HCOOH [%]
0	10	90
15	10	90
20	13	87
25	17	83
30	20	80
35	20	80
40	10	90
45	10	90

## Postup

**Kalibrační řada:** Pro analýzu pomocí HPLC byly připraveny kalibrační roztoky rozpuštěním určitého množství krystalických látek, přesněji se jednalo o kyselinu kávovou, kyselinu gallovou, kyselinu ferulovou, kyselinu kávovou, kyselinu chlorogenovou a kofein. Od každé látky byly připraveny roztoky o koncentraci 100, 250 a 500  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Poté byly roztoky ihned nadávkovány do vialek, zajištěny uzávěrem s víčkem a poté analyzovány.

**Vlastní stanovení:** Pro vlastní stanovení byly použity neřaděné vzorky roztoku kávové sedliny. Do vialek byl pomocí automatické pipety nadávkován vždy 1 ml vzorku kávové sedliny, vialky byly uzavřeny uzávěrem se septem a poté analyzovány.

Analýza byla provedena pomocí přístroje Agilent 1260 infinity s detekcí na diodovém poli (DAD) při reverzní fázi. Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitrilu a 2,0% roztoku kyseliny mravenčí, s gradientovou elucí. Stacionární fází byla náplň kolony Kinetex 2,6  $\mu\text{m}$  EVO C18, 150 x 4,6 mm. Po analýze byly vykresleny chromatogramy závislosti absorbance na vlnové délce.

### 3.5 Detoxifikace kávové sedliny za použití oxidačního činidla

#### Použité laboratorní pomůcky

- Běžné laboratorní sklo
- Automatická pipeta Finnpiquette 0,5-5 ml (Thermo Scientific, USA)
- Kádinky 100 ml
- Odměrné baňky 100 ml
- Odměrný válec 100 ml
- Centrifugační zkumavky, PP, se šroubovým uzávěrem, 50 ml
- Injekční stříkačky 5/6 ml (NORM-JECT, Německo)
- Stříkačkové filtry 0,45 µm NYLON (VWR, Evropa)
- Magnetická míchadla

#### Použité chemikálie

- Destilovaná voda z laboratorní jednotky ELGA
- Ethanol, čistota HPLC (Sigma-Aldrich, Německo)

#### Použité přístroje

- Vícemístná magnetická míchačka
- Laboratorní centrifuga

#### Analyzované vzorky

Pro oxidaci daným oxidačním činidlem byly použity tyto vzorky kávové sedliny: neupravená (NSCG), odtučněná (OSCG), odtučněná a zároveň hydrolyzovaná (OHSCG).

#### Postup

*Příprava roztoků oxidačního činidla:* Pro oxidaci SCG byly připraveny roztoky oxidačního činidla o koncentracích 0,5; 1,0; 2,0 a 5,0 %. Do kádinek bylo naváženo dané množství oxidační látky (0,5; 1,0; 2,0 a 5,0 g), rozpustilo se pomocí cca 50 ml destilované vody. Poté byl roztok převeden kvantitativně do 100 ml odměrné baňky, doplněn po vodou po rysku a uzavřen zátkou.

*Sestavení časové závislosti oxidace na obsahu FL:* Pro stanovení časové závislosti byla použita neupravená kávová sedlina a byly použity 1% a 5% roztoky oxidačního činidla. Oxidace probíhala v těchto časových intervalech: 10, 20, 30, 40 a 50 minut. Do kádinek byl navážen přibližně 1 g od každého vzorku SCG (váženo na čtyři desetinná místa), k tomuto množství SCG bylo přidáno 10 ml roztoku oxidačního činidla o dané koncentraci. Poté byly kádinky umístěny na vícemístnou magnetickou míchačku, do každé kádinky bylo umístěno magnetické míchadlo a bylo spuštěno míchání. V následujícím kroku byl celý obsah kádinky převeden do centrifugační zkumavky, kde byl doplněn destilovanou vodou do 45 ml. Zkumavka byla umístěna do centrifugy (5 min při 3500 ot/min). Po odstředění byl oddělený roztok odlit a obsah zkumavky byl opět doplněn destilovanou vodou na 45 ml. Obsah byl odstředěn stejným způsobem. Obsah zkumavky byl nakonec přenesen na Petriho misku s filtračním papírem. Vzorek byl rozprostřen na filtrační papír do tenké vrstvy a byl takto ponechán jeden den k sušení při pokojové teplotě (viz obrázek 10).



Obrázek 10: Sušení vzorků SCG po oxidaci

Suchý vzorek zoxidované SCG byl poté extrahován do 10 ml směsi ethanol-voda (3:2), po dobu 15 minut. Po ukončení extrakce byl roztok odebrán injekční stříkačkou, přefiltrován přes stříkačkový filtr do zkumavky a poté určen ke spektrofotometrickému stanovení celkových fenolických látek.

*Detoxifikační proces za využití ox. činidla:* Pro oxidaci byly použity vzorky NSCG, OSCG a OHSCG, dále 0,5; 1,0; 2,0 a 5,0 % roztoky oxidačního činidla. Oxidace probíhala 5 a 10 minut a dále se postupovalo stejným způsobem jako v předchozím bodě při stanovení časové závislosti oxidace.

### 3.6 Oxidace pomocí plynného kyslíku

#### Použité laboratorní pomůcky

- Běžné laboratorní sklo
- Promývací láhev

#### Použité chemikálie

- Kyslík v tlakové láhvi

#### Použité přístroje

- Laboratorní třepačka

#### Analyzované vzorky

- Pro oxidaci plynným kyslíkem byly použity vzorky neupravené kávové sedliny (NSCG)

#### Postup

Proud plynného kyslíku z tlakové láhve byl 3 hodiny vháněn do promývací láhve, ve které byla umístěna SCG. Promývací láhev byla umístěna na třepačce, aby docházelo k lepšímu kontaktu všech částic SCG s kyslíkem.

### 3.7 Statistické zpracování dat

Naměřená data byla zpracována v softwaru Microsoft Excel (Office Professional Plus 2016) a v programu XL Stat (Addinsoft Inc., version 2013). Pro porovnání rozdílů mezi naměřenými průměrnými hodnotami byl proveden Tukeyho srovnávací test. Hladina významnosti byla zvolena  $\alpha=0.05$ .

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

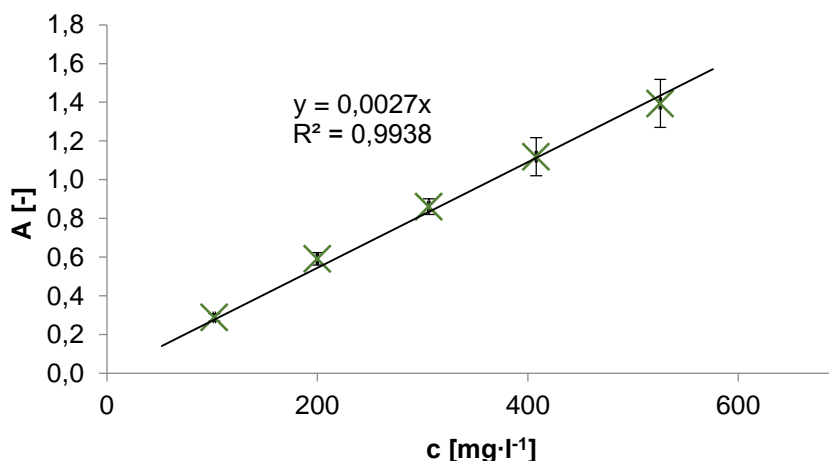
### 4.1 Stanovení celkového obsahu FL pomocí UV/VIS spektrofotometrie

Aby bylo možné vyhodnotit provedení experimentů a kvantitativně stanovit obsah FL ve vzorcích, byla nejprve provedena kalibrace přístroje UV-VIS.

Pro kalibraci byla použita kyselina gallová a bylo postupováno způsobem popsaným v kapitole 3.2. Z naměřených hodnot znázorněných v tabulce 7 byl sestrojen graf závislosti absorbance na koncentraci kyseliny gallové – kalibrační křivka (viz obrázek 11), získaná kalibrační rovnice poté sloužila pro výpočet koncentrace fenolických látek při vlastním měření.

Tabulka 7: Hodnoty pro sestavení kalibrační křivky

c [mg/l]	Absorbance			
	A1 [-]	A2 [-]	A3 [-]	Průměr A [-]
102	0,298	0,286	0,284	0,290 ± 0,008
200	0,594	0,578	0,603	0,592 ± 0,013
306	0,861	0,845	0,878	0,861 ± 0,017
408	1,164	1,106	1,088	1,119 ± 0,040
526	1,378	1,354	1,450	1,394 ± 0,050



Obrázek 11: Kalibrační křivka

### 4.2 Vliv celkového času oxidace a koncentrace ox. činidla

Oxidace probíhala po dobu 10, 20, 30, 40 a 50 minut a byly použity 1% a 5% roztoky oxidačního činidla. Výsledky časového testu jsou znázorněny v tabulce 8.

Nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi obsahem fenolických látek v sedlině upravené 5% oxidačním činidlem v rozmezí času 10-50 minut. Dále také nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi obsahem fenolických látek v sedlině upravené 1% oxidačním činidlem v rozmezí času 10-50 minut. Byl nalezen statisticky významný rozdíl mezi obsahem FL v SCG po úpravě 5%, resp. 1% roztokem oxidačního činidla.

Tabulka 8: Výsledky časového testu

t [min]	5% ox. činidlo		1% ox. činidlo	
	c [mg·g <sup>-1</sup> ]	Δc [mg·g <sup>-1</sup> ]	c [mg·g <sup>-1</sup> ]	Δc [mg·g <sup>-1</sup> ]
10	0,104 ± 0,008	15,136 ± 0,430	0,404 ± 0,062	14,836 ± 0,376
20	0,130 ± 0,020	15,110 ± 0,419	0,385 ± 0,027	14,855 ± 0,411
30	0,112 ± 0,019	15,128 ± 0,419	0,472 ± 0,061	14,768 ± 0,377
40	0,098 ± 0,016	15,142 ± 0,423	0,373 ± 0,083	14,867 ± 0,356
50	0,114 ± 0,021	15,126 ± 0,418	0,362 ± 0,047	14,878 ± 0,392

Dospělo se k závěru, že oxidační proces probíhá rychle a díky tomu stačí kratší kontaktní čas SCG s oxidačním činidlem pro oxidaci FL.

I když byly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi použitím mezi 5% a 1% roztokem oxidačního činidla, tyto rozdíly byly velmi malé. Například u 10minutové oxidace byl rozdíl obsahu FL roven 0,299 mg·g<sup>-1</sup>. Z ekonomických důvodů je pravděpodobně tedy lepší použít 1% roztok oxidačního činidla pro úpravu SCG.

V další části práce byly nalezené závislosti dále ověřovány v širším měřítku. Pro oxidaci byl použit 0,5%; 1%; 2% a 5% roztok oxidačního činidla a časy oxidace 5 a 10 minut. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 9.

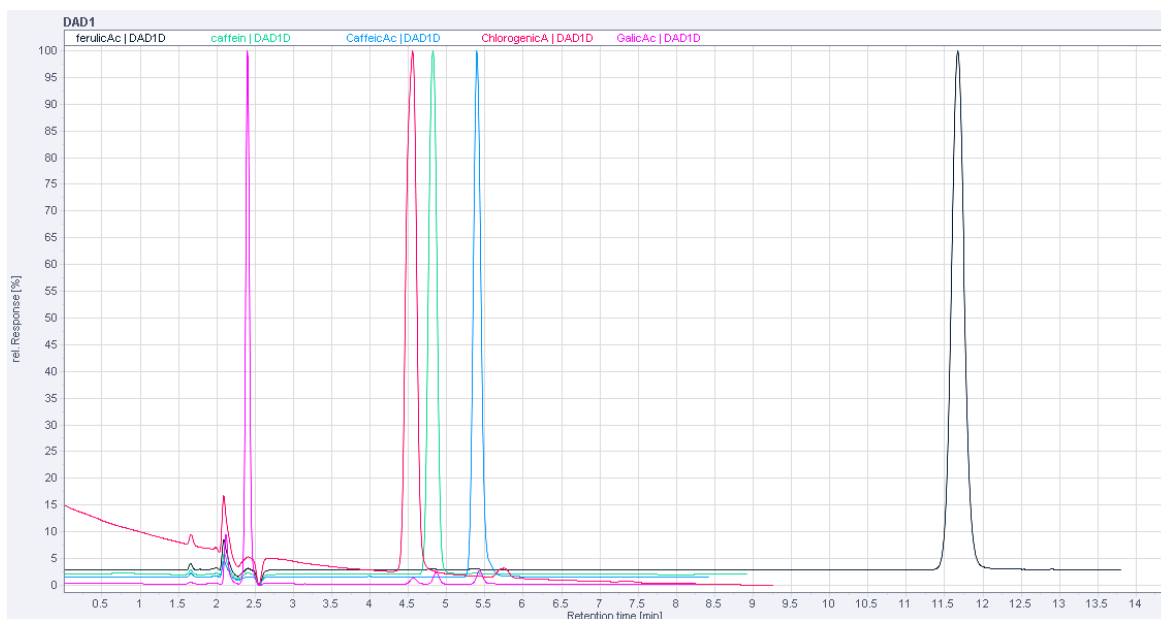
Tabulka 9: Výsledky oxidace SCG za použití různé koncentrace ox. činidla a různé doby oxidace. (hodnoty se stejným označením mezi sebou nevykazují statisticky významný rozdíl)

t [min]	c <sub>ox.č.</sub> [%]	c <sub>FL</sub> [mg·g <sup>-1</sup> ]
5	5,0	0,118 ± 0,018 <sup>c</sup>
	2,0	0,210 ± 0,028 <sup>c</sup>
	1,0	0,475 ± 0,038 <sup>b</sup>
	0,5	0,633 ± 0,055 <sup>a</sup>
10	5,0	0,133 ± 0,012 <sup>c</sup>
	2,0	0,179 ± 0,010 <sup>c</sup>
	1,0	0,221 ± 0,013 <sup>c</sup>
	0,5	0,576 ± 0,075 <sup>ab</sup>

Experimentem byly potvrzeny předchozí dosažené výsledky. Byl nalezen statisticky významný rozdíl mezi koncentrací FL v kávové sedlině (SCG) upravené oxidačním činidlem o různé koncentraci a nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi koncentrací FL v SCG oxidované po dobu 5 a 10 minut při použití různé koncentrace oxidačního činidla. Rozdíly obsahu FL v SCG oxidované 0,5-5,0% roztokem oxidačního činidla byly velmi malé.

### 4.3 Identifikace a kvantifikace FL pomocí HPLC

Pro kvalitativní a zároveň kvantitativní stanovení fenolických látek byla využita metoda HPLC s DAD detektorem. Postup a všechny potřebné informace o separaci jsou popsány v kapitole 3.4.



Obrázek 12: Proložené chromatogramy analyzovaných standardů KCH (červená), KG (růžová), KF (černá), KK (modrá) a kofeinu (zelená)

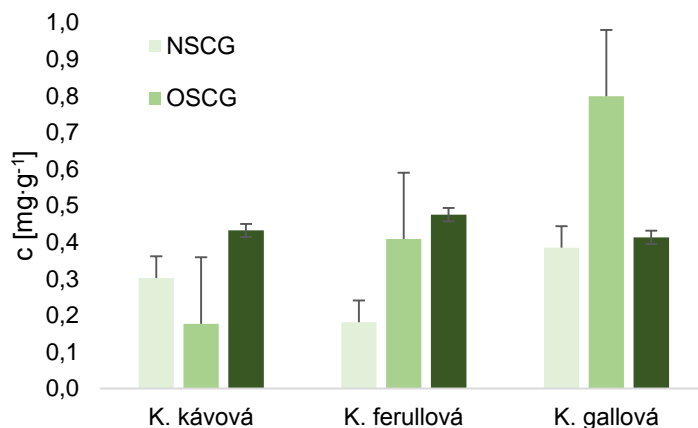
Prvně byly sestaveny kalibrační křivky ze standardních roztoků o různé koncentraci (100, 250 a 500  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Pomocí softwaru Agilent infinity 1260 byly vykresleny chromatogramy roztoků standardů kyselin chlorogenové (KCH), ferulové (KF), gallové (KG), kávové (KK) a kofeinu. Tyto chromatogramy byly proloženy do jednoho společného chromatogramu viz obrázek 12. Poté byly pro separaci připraveny i roztoky vzorků NSCG, OSCG a OHSCG. Pomocí PC programu Agilent Infinity byly automaticky přepočítány koncentrace daných kyselin a kofeinu v každém vzorku pomocí kalibrační křivky, výsledky viz v tabulce 10. Výsledky byly také pro přehlednější znázornění vyneseny do grafů, viz obrázek 13 a obrázek 14.

Tabulka 10: Výsledky stanovení fenolických látek v nezoxidovaných vzorcích SCG pomocí HPLC, porovnání koncentrací FL s hodnotami udávanými v literatuře

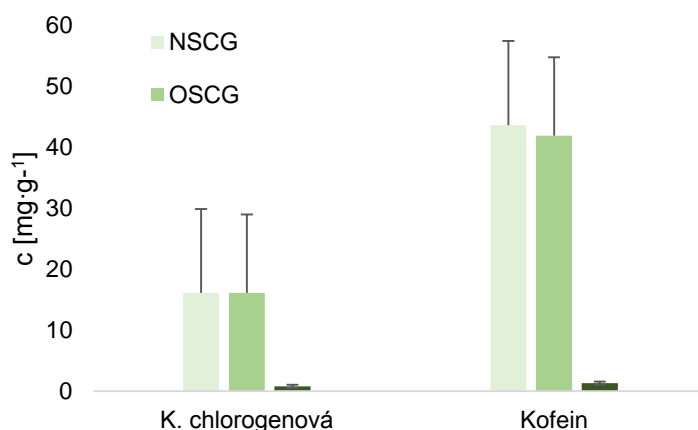
Typ SCG	Sloučenina	$c_{\text{exp}} [\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}]$	$c_{\text{lit}} [\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}]$
NSCG	Kyselina gallová	0,385	1,3-2,5 [27]
	Kyselina chlorogenová	16,097	1,8-5,6 [27]
	Kofein	43,667	0,3-7,0 [24]
	Kyselina kávová	0,302	0,03-0,07 [27]
	Kyselina ferulová	0,181	0,004-0,01 [27]
OSCG	Kyselina gallová	0,408	-
	Kyselina chlorogenová	16,096	-
	Kofein	41,893	-
	Kyselina kávová	0,298	-
	Kyselina ferulová	0,177	-
OHSCG	Kyselina gallová	0,413	-
	Kyselina chlorogenová	0,799	-
	Kofein	1,316	-
	Kyselina kávová	0,432	-
	Kyselina ferulová	0,475	-



V tabulce 10 jsou zaznamenány také hodnoty obsahu FL a kofeinu v SCG, které jsou udávány v literatuře. Z literatury bylo možné dohledat pouze koncentrace FL a kofeinu pro vzorek NSCG. Porovnáním výsledků z literatury a experimentu této práce lze konstatovat, že koncentrace stanovených látek byla vyšší, než je udáváno v literatuře. Rozdíly mohou být způsobeny odlišným druhem kávy či typem a dobou extrakce.

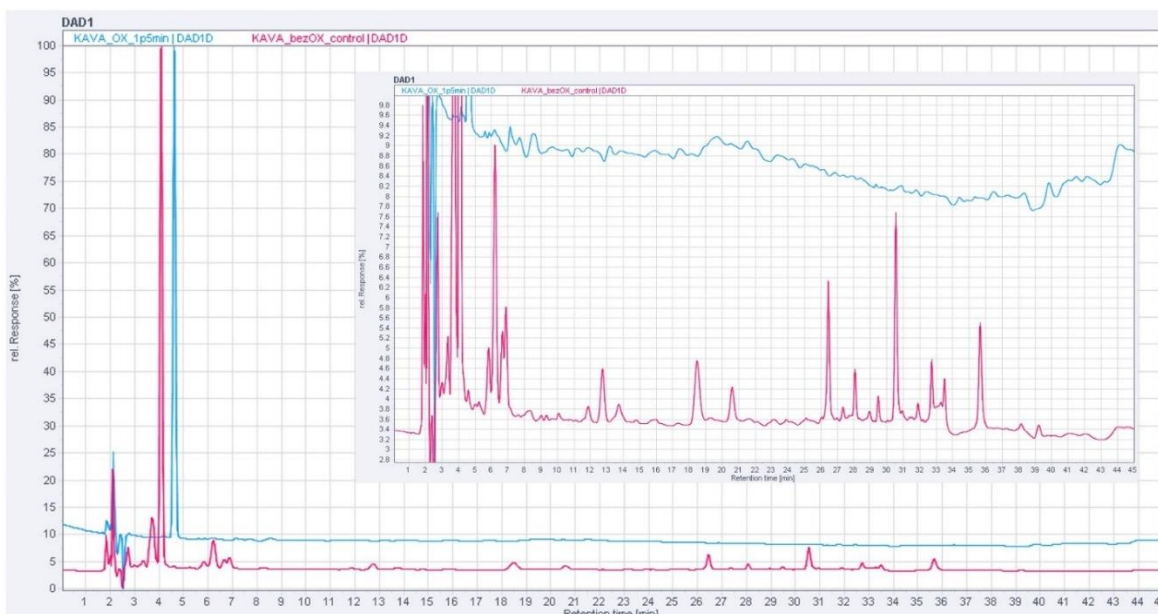


Obrázek 13: Grafické znázornění obsahů fenolických kyselin KK, KG a KF v různých typech SCG stanovených pomocí HPLC metody



Obrázek 14: Grafické znázornění obsahů KCH a kofeinu v různých typech SCG stanovených pomocí HPLC metody

V následujícím kroku byla provedena analýza fenolických látek obsažených v zoxidovaných vzorcích SCG. Z výsledků bylo zřejmé, že obsah fenolických látek po oxidaci SCG značně poklesl, ačkoliv množství kofeinu v oxidovaném vzorku zůstalo víceméně neměnné. Pro ukázkou je přiložen chromatogram (viz obrázek 15), který vznikl proložení chromatogramů vzorku NSCG a vzorku OX-NSCG.

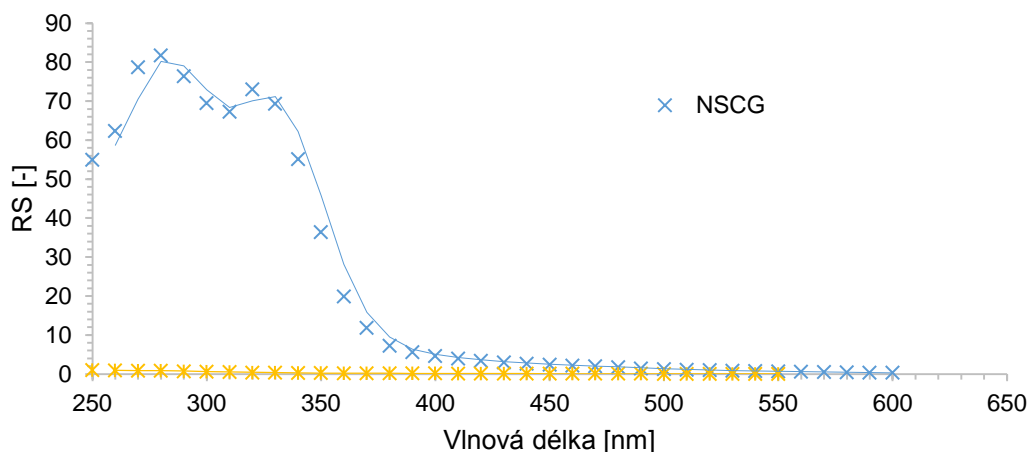


Obrázek 15: Proložené chromatogramy stanovovaných vzorků NSCG (modrá) a OX-NCG (růžová)

#### 4.4 Ověření vlivu oxidace na obsah melanoidinů

Pomocí postupu popsaném v kapitole 3.3 byly získány hodnoty absorbancí při vlnových délkách v rozmezí od 370 do 600 nm. Jelikož ředění vzorků nebylo jednotné, byl zaveden relativní signál, který se vypočítal dle rovnice (3). Poté byl sestaven graf závislosti relativního signálu (RS) na vlnové délce (viz obrázek 16). Z absorpčního spektra si lze povšimnout, že absorpční maximum melanoidinů se vyskytuje přibližně při vlnové délce 280 nm.

Hlavním výsledkem této části práce byl fakt, že byl nalezen statisticky významný rozdíl mezi neupravenou kávovou sedlinou před oxidací (NSCG) a po oxidaci (OX-NCG). Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že 10minutová oxidace pomocí 1% oxidačního činidla je účinná také pro odstranění melanoidinů.

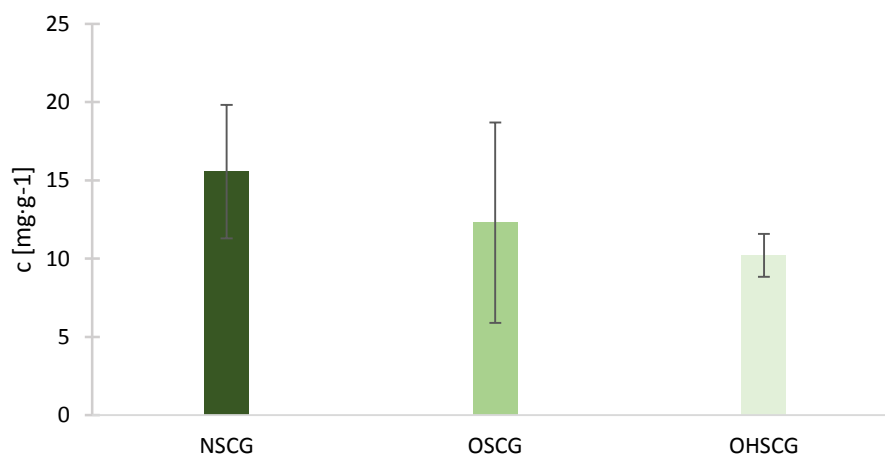


Obrázek 16: UV-VIS spektrum vzorku NSCG před a po oxidaci 1% oxidačním činidlem

#### 4.5 Studium vlivu úpravy kávové sedliny na celkový obsah FL

Úprava kávové sedliny proběhla podle postupu uvedeném v kapitole 3.1. Byly získány tři typy kávové sedliny: neupravená, odtučněná a odtučněná a zároveň hydrolyzovaná. Bylo provedeno stanovení celkového množství fenolických látek pomocí UV-VIS spektrofotometrie.

Z naměřených dat byl sestrojen sloupcový graf (viz obrázek 17), znázorňující obsah FL v závislosti na úpravě kávové sedliny. Rozdíly obsahu fenolických látek v NSCG a OSCG nejsou statisticky významné a jsou zanedbatelné. Obsah FL v OSCG není extrakcí nijak významně ovlivněn. Při extrakci dochází jen k odstranění olejů z kávové sedliny. FL jsou hydrofilní, a proto nejsou spolu s olejovou frakcí odstraněny a zůstávají v odtučněném zbytku kávové sedliny.



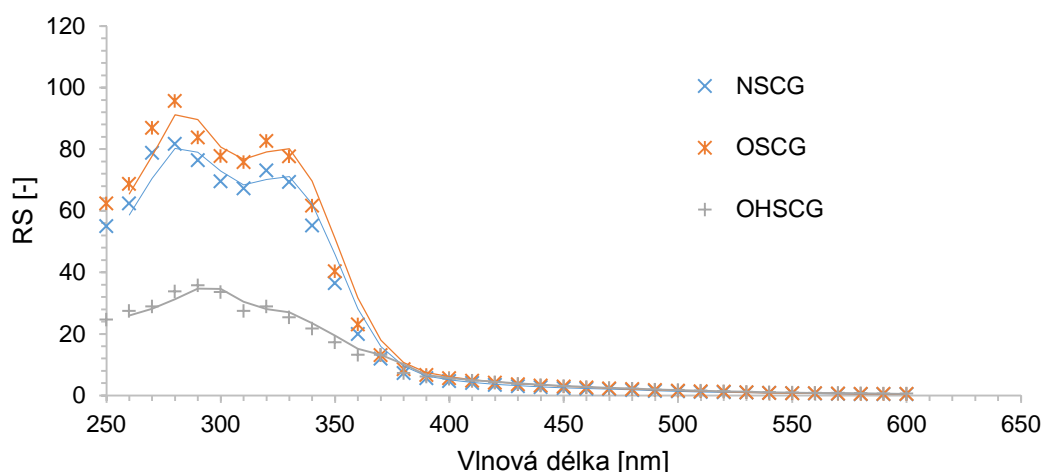
Obrázek 17: Grafické znázornění závislosti koncentrace FL na typu úpravy SCG

Na druhou stranu byl nalezen statisticky významný rozdíl mezi obsahem FL v NSCG a OHSCG. Dále byl také nalezen statisticky významný rozdíl mezi obsahem FL v OSCG a OHSCG. Při kyselé hydrolyze, kdy byla použita kyselina sírová, dochází k významnému snížení obsahu FL ve vzorku OHSCG. Snížení obsahu FL může být způsobeno použitím kyseliny sírové, která je samotná považována za již mírné oxidační činidlo. Zároveň při hydrolyze dochází k rozštěpení polysacharidů a oligosacharidů. Většina FL je na tyto polysacharidy a oligosacharidy vázána a tímto krokem je zapříčiněno jejich odštěpení z polysacharidové, resp. oligosacharidové struktury. Jelikož jsou FL hydrofilní, tak v dalším kroku, kdy se pro promývání OHSCG používá destilovaná voda, poté dochází k vyplavení těchto FL z OHSCG.

#### 4.6 Vliv úpravy kávové sedliny na obsah melanoidinů

Jak již bylo zmíněno výše, pomocí postupu v kapitole 3.3. byl sestrojen graf (viz obrázek 18), který znázorňuje závislost RS melanoidinů na vlnové délce.

U stanovení obsahu melanoidinů si lze všimnout podobného trendu, který byl zaznamenán u stanovení fenolických látek v různě upravené kávové sedlině. Rozdíly obsahu melanoidinů v NSCG a OSCG nebyly statisticky významné. Naopak byl nalezen statisticky významný rozdíl mezi obsahem melanoidinů v NSCG a OHSCG. Dále byl také nalezen statisticky významný rozdíl mezi obsahem melanoidinů v OSCG a OHSCG. Pokles FL v OHSCG je způsoben aplikací kyselé hydrolyzy. Došlo k rozštěpení polymerních molekul melanoidinů a při promývání vzorků došlo pravděpodobně k jejich vyplavení společně s destilovanou vodou.



Obrázek 18: Grafická závislost RS melanoidinů na vlnové délce

#### 4.7 Oxidace upravené kávové sedliny

Na základě výsledků z kapitoly 4.2 byl pro oxidaci zvolen 1% roztok oxidačního činidla a čas oxidace 10 minut. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 11.

Po zpracování výsledků se dospělo k závěru, že je potřeba zoxidovat i hydrolyzovanou SCG, jelikož po hydrolyze obsahuje stále velké množství FL. Účinnost oxidace upravené kávové sedliny byla stejná pro OSCG i OHSCG. Oxidací se podařilo vždy odstranit kolem 96 % FL obsažených v kávové sedlině.

Tabulka 11: Výsledky oxidace 1% oxidačním činidlem po dobu 10 minut

Typ SCG	$c_{FL}$ [ $mg \cdot g^{-1}$ ]	$\Delta c_{FL}$ [ $mg \cdot g^{-1}$ ]	%ox <sub>FL</sub>
NSCG	$15,556 \pm 0,474$	$15,081 \pm 0,461$	96,9
OX-NSCG	$0,475 \pm 0,013$		
OSCG	$12,113 \pm 0,454$	$11,758 \pm 0,399$	97,1
OX-OSCG	$0,355 \pm 0,055$		
OHSCG	$10,318 \pm 0,305$	$9,934 \pm 0,290$	96,3
OX-OHSCG	$0,384 \pm 0,015$		

#### **4.8 Oxidace pomocí plynného kyslíku**

V závěru experimentálního měření bylo také studováno působení čistého plynného kyslíku na SCG a jeho vliv na obsah FL. Proud plynného kyslíku z tlakové láhve byl 3 hodiny vháněn do promývací láhve, ve které byla umístěna SCG. Promývací láhev byla umístěna na třepačce, aby docházelo k lepšímu kontaktu všech částic SCG s kyslíkem. Po analýze vzorku však nebyla potvrzena pozitivní detoxifikace SCG. U oxidace plynem nedochází k takovému kontaktu jako je tomu u oxidačního roztoku. Oxidační roztok jako kapalina se snáze dostala až pod povrch částic SCG a tím došlo k výraznějšímu redukcí FL.

## 5 ZÁVĚR

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo nalézt účinný a ekonomicky výhodný oxidační proces, který by dokázal zredukovat obsah fenolických látek v kávové sedlině na přijatelnou mez. Detoxifikovaná kávová sedlina by se poté mohla využít jako substrát podporující růst rostlin nebo jako živné médium pro mikroorganismy. Pro oxidaci byly použity roztoky připravené z chemikálie s vysokými oxidačními účinky.

V časovém testu oxidace bylo zjištěno, že proces probíhá rychle a není potřeba delšího kontaktu kávové sedliny s oxidačním činidlem. Byly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi použitím 5% a 1% roztoku oxidačního činidla, avšak tyto rozdíly byly velmi malé. Nicméně pro detoxifikaci se doporučuje z ekonomických důvodů použít 1% oxidační činidlo.

Nalezené závislosti byly ověřeny v širším měřítku. Byly použity 0,5%; 1%; 2% a 5% roztoky oxidačního činidla a doby oxidace 5 a 10 minut. Tímto experimentem byly potvrzeny předchozí dosažené výsledky. Nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi obsahem FL v SCG oxidované po dobu 5 a 10 minut při použití různé koncentrace OČ, rozdíly koncentrace FL v SCG oxidované 0,5-5,0% roztokem OČ byly velmi malé. Na druhou stranu byl nalezen statisticky významný rozdíl mezi obsahem FL v SCG upravené oxidačním činidlem o různé koncentraci.

Po kvalitativním i kvantitativním stanovení FL látek pomocí HPLC metody byly naměřené koncentrace FL v NSCG vyšší, než je udáváno v literatuře. Rozdíly mohly být způsobeny odlišným typem kávy či dobou a typem extrakce. HPLC analýza mimo jiné potvrdila úspěšné odstranění FL ze zoxidovaných vzorků neupravené kávové sedliny (OX-NSCG) od FL. Množství kofeinu však zůstalo v zoxidovaných vzorcích víceméně neměnné.

Další studium bylo zaměřeno na vliv oxidace NSCG na obsah melanoidinů. Změřením absorpčního spektra byl nalezen statisticky významný rozdíl obsahu melanoidinů v NSCG a OX-NSCG. Tím bylo potvrzeno, že 10minutová oxidace 1% OČ dokáže z NSCG odstranit kromě FL také vysoké množství melanoidinů.

Studiem vlivu úpravy kávové sedliny na celkový obsah celkový obsah FL bylo zjištěno, že rozdíl obsahu FL v NSCG a OSCG je zanedbatelný. Naopak rozdíl obsahu FL v NSCG a OHSCG vykazuje statisticky významný rozdíl. Stejně tak tomu je u rozdílu mezi obsahem FL v OSCG a OHSCG. Příčinou poklesu FL v OHSCG bylo pravděpodobně použití kyselá hydrolyzy, kdy samotná  $H_2SO_4$  mohla způsobit oxidaci FL. Po hydrolyze mohlo také dojít k uvolnění FL, které byly navázány na polysacharidy. V OSCG je obsah FL stabilní, jelikož jsou FL hydrofilní a při oddělení olejové frakce nemohlo tedy dojít k jejich odstranění.

Vliv úpravy kávové sedliny na obsah melanoidinů vykazoval podobný trend, který byl zaznamenán u stanovení FL v různě upravené SCG.

Po výsledcích z přechodících experimentů bylo zjištěno, že OHSCG obsahuje nižší obsah FL než NSCG a OSCG. Po oxidaci OHSCG nicméně bylo zjištěno, že obsahuje stále vysoké množství FL. U všech tří typů se během 10minutové oxidace pomocí 1% OČ podařilo odstranit přibližně 96 % FL obsažených v kávové sedlině.

V rámci této práce byla testována také možnost oxidace FL kyslíkem, nebylo však dosaženo pozitivních výsledků. Další práce by se v budoucnu mohla věnovat jiným způsobům oxidace ve vodném prostředí.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] GIBSON, Mark a Pat NEWSHAM. *Food science and the culinary arts*. London, United Kingdom: Academic Press, an imprint of Elsevier, [2018]. ISBN 978-0-12-811816-0.
- [2] TUCKER, Catherine M. *Coffee culture: local experiences, global connections*. [online]. 2nd edition. New York: Routledge, Taylor & Francis Group, 2017. ISBN 978-1-138-93302-6.
- [3] BAE, Jae-Hoon, Jae-Hyung PARK, Seung-Soon IM a Dae-Kyu SONG. Coffee and health. *Integrative Medicine Research*. 2014, 3(4), 189-191.
- [4] PÖSSL, Martin. Káva jako životní styl. Praha: Grada, 2010. *Zdraví & životní styl*. ISBN 978-80-247-2822-3.
- [5] *Coffee market ends 2016/17 coffee year in deficit for the third consecutive year*. *International Coffee Organization*, 2017. [online]. Dostupné z: <http://www.ico.org/documents/cy2016-17/cmr-0917-e.pdf>
- [6] PATAY, Éva Brigitta, Tímea BENCSIK a Nóra PAPP. Phytochemical overview and medicinal importance of *Coffea* species from the past until now. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2016, 9(12), 1127-1135. DOI: 10.1016/j.apjtm.2016.11.008. ISSN 19957645.  
Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1995764516304680>
- [7] HERRERA, Juan Carlos a Charles LAMBOT. The Coffee Tree—Genetic Diversity and Origin. FOLMER, Britta. *The craft and science of coffee*. Boston, MA: Elsevier, 2017, s. 1-16. ISBN 9780128035207.
- [8] DAVIS, AARON P., RAFAEL GOVAERTS, DIANE M. BRIDSON a PIET STOFFELEN. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2006, 152(4), 465-512. DOI: 10.1111/j.1095-8339.2006.00584.x. ISSN 1095-8339. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/botlinnean/article-lookup/doi/10.1111/j.1095-8339.2006.00584.x>
- [9] MURTHY, Pushpa S. a M. MADHAVA NAIDU. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—A review. *Resources, Conservation and Recycling*. 2012, 66, 45-58. DOI: 10.1016/j.resconrec.2012.06.005. ISSN 09213449. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921344912000894>
- [10] WALTON, James. The 5 Countries That Produce the Most Coffee. *Investopedia* [online]. 2019 [cit. 2019-04-18].  
Dostupné z: <https://www.investopedia.com/articles/investing/091415/5-countries-produce-most-coffee.asp>
- [11] Record exports in coffee year 2017/18. In: *International Coffee Organization* [online]. London, 2018 [cit. 2019-04-23]. Dostupné z: <http://www.ico.org/documents/cy2018-19/cmr-1018-e.pdf>
- [12] What is Specialty Coffee?. In: *Specialty Coffee Association* [online]. California: SCA, 2019 [cit. 2019-04-24]. Dostupné z: <https://sca.coffee/research/what-is-specialty-coffee>
- [13] SMITH, Oliver. Mapped: The countries that drink the most coffee. In: *The Telegraph* [online]. London: The Telegraph, 2017, 1 October 2017 [cit. 2019-04-23]. Dostupné z: <https://www.telegraph.co.uk/travel/maps-and-graphics/countries-that-drink-the-most-coffee/>
- [14] LAVIČKA, Václav, Jaroslav KREKČÍ a Jan KAČER. Světová produkce kávy bude v letošní sezoně rekordní. Největší zásluhu má Brazílie. In: *Hospodářské noviny* [online]. Hospodářské noviny, 2019, 20. února 2019 [cit. 2019-04-23]. Dostupné z: <https://infografiky.ihned.cz/extra-kava-produkce-svet/r~1022f4c4351c11e98aa4ac1f6b220ee8/>
- [15] World coffee consumption. In: *International Coffee Organization* [online]. London: ICO, 2019 [cit. 2019-04-23]. Dostupné z: <http://www.ico.org/prices/new-consumption-table.pdf>
- [16] VESELÁ, Petra. Kniha o kávě: Průvodce světem kávy s recepty na její přípravu. Praha: Smart Press, 2010. ISBN 978-80-87049-34-1

- [17] DAVIS, AARON P., RAFAEL GOVAERTS, DIANE M. BRIDSON a PIET STOFFELEN. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* [online]. 2006, **152**(4), 465-512 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1111/j.1095-8339.2006.00584.x. ISSN 1095-8339.  
Dostupné z: <https://academic.oup.com/botlinnean/article-lookup/doi/10.1111/j.1095-8339.2006.00584.x>
- [18] DRDÁK, Milan, J. STUDNICKÝ, E. MÓROVÁ a J. KAROVIČOVÁ. *Základy potravinárskych technológií spracovania rastlinných a živočíšnych surovín, cereálne a fermentačné technológie uchovávanie, hygiena a ekológia potravín: spracovanie rastlinných a živočíšnych surovín, cereálne a fermentačné technológie, uchovávanie, hygiena a ekológia potravín*. Bratislava: Malé Centrum, 1996. ISBN 80-967-0641-1.
- [19] RAO, L a K RAMALAKSHMI, ed. Recent trends in value addition. *Recent Trends in Soft Beverages*. New York: Woodhead Publishing India, 2011, 2011-04-14, s. 31-47. DOI: 10.1201/b18247.
- [20] BEEMAN, David, Paul SONGER a Ted R. LINGLE. *The Water Quality Handbook*. 2nd ed. Long Beach: Specialty Coffee Association of America, 2011. ISBN 1882552083.
- [21] BRZOŇOVÁ, Lenka. *Svět kávy*. 2. přepracované vydání. Praha: Sdružení českých spotřebitelů, z.ú., [2017]. Jak poznáme kvalitu?. ISBN 978-80-88019-20-6.
- [22] FARAH, Adriana. Coffee Constituents. *Coffee* [online]. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2012, 2012-02-06, s. 21-58 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1002/9781119949893.ch2. ISBN 9781119949893. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781119949893.ch2>
- [23] MUSSATTO, Solange I., Ercília M. S. MACHADO, Silvia MARTINS a José A. TEIXEIRA. Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. *Food and Bioprocess Technology* [online]. 2011, **4**(5), 661-672 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1007/s11947-011-0565-z. ISSN 1935-5130.  
Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11947-011-0565-z>
- [24] MATA, Teresa M., António A. MARTINS a Nídia S. CAETANO. Bio-refinery approach for spent coffee grounds valorization. *Bioresource Technology* [online]. 2018, **247**, 1077-1084 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.09.106. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852417316711>
- [25] OBŠIL, Tomáš a Zdeněk PAVLÍČEK. Glykace proteinů a fosfolipidů: Maillardova reakce in vivo. *Chemické listy*. 1997, **91**, 558-569.
- [26] OBRUCA, Stanislav, Pavla BENESOVA, Dan KUCERA, Sinisa PETRIK a Ivana MAROVA. Biotechnological conversion of spent coffee grounds into polyhydroxyalkanoates and carotenoids. *New Biotechnology*. 2015, **32**(6), 569-574. DOI: 10.1016/j.nbt.2015.02.008. ISSN 18716784.  
Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678415000333>
- [27] KOVALCIK, Adriana, Stanislav OBRUCA a Ivana MAROVA. Valorization of spent coffee grounds: A review. *Food and Bioprocess Technology* [online]. 2018, **110**, 104-119 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1016/j.fbp.2018.05.002. ISSN 09603085.  
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960308518302797>
- [28] SKŘIVANOVÁ, Veronika. *Hydrolytické štěpení odpadů po zpracování kávy*. Brno, 2014. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií.
- [29] OBRUČA, Stanislav. *Valorizace odpadů potravinářského průmyslu*. Brno, 2015. Zkrácená verze habilitační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií.
- [30] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin II*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [31] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin I*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [32] SEO, Ho Seong a Byung Heung PARK. Phenolic compound extraction from spent coffee grounds for antioxidant recovery. *Korean Journal of Chemical Engineering*. 2019, **36**(2),



- 186-190. DOI: 10.1007/s11814-018-0208-4. ISSN 0256-1115. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11814-018-0208-4>
- [33] MARXOVÁ, Žaneta. *Maillardova reakce*. Zlín, 2011. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.
- [34] DUŠEK, Libor. Čištění odpadních vod chemickou oxidací hydroxylovými radikály. *Chemické listy* [online]. 2010, **104**, 846-854 [cit. 2019-05-05]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010\\_09\\_846-854.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_09_846-854.pdf)
- [35] SPÁČIL, Zdeněk, Lucie NOVÁKOVÁ a Petr SOLICH. Analysis of phenolic compounds by high performance liquid chromatography and ultra performance liquid chromatography. *Talanta* [online]. 2008, **76**(1), 189-199 [cit. 2019-05-05]. DOI: 10.1016/j.talanta.2008.02.021. ISSN 00399140. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914008001471>
- [36] KARLÍČEK, Rolf. *Analytická chemie pro farmaceuty*. 3. vyd. Praha: Karolinum, 2007. ISBN 978-80-246-1453-3.
- [37] PERTILE, Eva a Vladimír ČABLÍK. *Instrumentální metody analýzy*. Ostrava: VŠB - Technická univerzita Ostrava, 2006. ISBN 80-248-1049-2.
- [38] HPLC Center. Fluidic Systems - Fluid Path Components | IDEX Health & Science [online]. Oak Harbor: IDEX Corporation, c2016 [cit. 2019-05-22]. Dostupné z: <https://www.idexhs.com/education-and-tools/educational-materials/hplc-center>
- [39] NOVÁKOVÁ, Lucie a DOUŠA, Michal. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Hradec Králové : Lucie Nováková ; Klatovy : Michal Douša, 2013. 1. vyd. 299 s. ISBN 978-80-260-4243-3
- [40] NOVÁKOVÁ, Lucie a DOUŠA, Michal. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Hradec Králové : Lucie Nováková ; Klatovy : Michal Douša, 2013. 1. vyd. 235 s. ISBN 978-80-260-4244-0
- [41] HPLC Instrumentation 26 - Diode Array Detector. In: YouTube [online]. Melbourne: Ardent Scientific, 2016 [cit. 2019-05-22]. Dostupné z: <https://www.youtube.com/watch?v=6K7EYMkBbFk>
- [42] HEJSKOVÁ, Veronika. *UV/VIS spektrofotometrie a možnosti jejího využití v rámci vzdělávání učitelů chemie*. Praha, 2016. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Pedagogická fakulta, Katedra chemie a didaktiky chemie.
- [43] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
- [44] SHIM, Heesung. Basic structure of spectrophotometers. In: *LibreTexts libraries* [online]. California: LibreTexts, 2019 [cit. 2019-05-22]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\\_Textbook\\_Maps/Supplemental\\_Modules\\_\(Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\)/Kinetics/Reaction\\_Rates/Experimental\\_Determination\\_of\\_Kinetics/Spectrophotometry](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Kinetics/Reaction_Rates/Experimental_Determination_of_Kinetics/Spectrophotometry)
- [45] NĚMCOVÁ, I. ČERMÁKOVÁ, L. a RYCHLOVSKÝ, P. *Spektrometrické analytické metody*. Praha : Karolinum, 1997. ISBN 80-7184-365-2.
- [46] AINSWORTH, Elizabeth A a Kelly M GILLESPIE. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols* [online]. 2007, **2**(4), 875-877 [cit. 2019-05-22]. DOI: 10.1038/nprot.2007.102. ISSN 1754-2189. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nprot.2007.102>
- [47] DAI, Jin a Russell J. MUMPER. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* [online]. 2010, **15**(10), 7313-7352 [cit. 2019-05-22]. DOI: 10.3390/molecules15107313. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/15/10/7313>
- [48] SHAHIDI, Fereidoon a Marian NACZK. *Phenolics in food and nutraceuticals*. Boca Raton: CRC Press, 2003. ISBN 15-871-6138-

- [49] RAMÍREZ, Eduardo Enrique Pérez, Miguel de la Luz ASUNCIÓN, Veronica Saucedo RIVALCOBA, Ana Laura Martínez HERNÁNDEZ a Carlos Velasco SANTOS. Removal of Phenolic Compounds from Water by Adsorption and Photocatalysis. Phenolic Compounds - Natural Sources, Importance and Applications [online]. *InTech*, 2017, 2017-03-15, , 343-372 [cit. 2019-05-22]. DOI: 10.5772/66895. ISBN 978-953-51-2957-8. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/phenolic-compounds-natural-sources-importance-and-applications/removal-of-phenolic-compounds-from-water-by-adsorption-and-photocatalysis>
- [50] NGUYEN, T., L. FAN a F.A. RODDICK. Removal of Melanoidins from an Industrial Wastewater. Melbourne. School of Civil, Enviromental and Chemical Engineering, RMIT University. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/266462068\\_REMOVAL\\_OF\\_MELANOIDINS\\_FROM\\_AN\\_INDUSTRIAL\\_WASTEWATER](https://www.researchgate.net/publication/266462068_REMOVAL_OF_MELANOIDINS_FROM_AN_INDUSTRIAL_WASTEWATER)
- [51] SU, Ya-Ling a Shu-Hua CHENG. Sensitive and selective determination of gallic acid in green tea samples based on an electrochemical platform of poly(melamine) film. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2015, 901, 41-50 [cit. 2019-05-23]. DOI: 10.1016/j.aca.2015.10.026. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267015012921>

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AOP	Pokročilé oxidační procesy
DAD	Detektor s diodovým polem
F-C	Folin-Ciocalteuovo činidlo
FL	Fenolické látky
KF	Kyselina ferulová
KG	Kyselina gallová
KCH	Kyselina chlorogenová
KK	Kyselina kávová
NSCG	Neupravená kávová sedlina
OČ	Oxidační činidlo
OHSCG	Odtučněná a zároveň hydrolyzovaná kávová sedlina
OSCG	Odtučněná kávová sedlina
OX-NSCG	Zoxidovaná neupravená kávová sedlina
OX-OHSCG	Zoxidovaná odtučněná a zároveň hydrolyzovaná sedlina
OX-OSCG	Zoxidovaná odtučněná kávová sedlina
SCG	Kávová sedlina