

Stanovení biologicky aktivních látek v různých druzích kávy

Bc. Michaela Neduchalová

Diplomová práce
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie potravin
akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Bc. Michaela Neduchalová
Osobní číslo: T11119
Studijní program: N2901 Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin
Forma studia: prezenční

Téma práce: Stanovení biologicky aktivních látek v různých druzích kávy

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakteristika a srovnání různých druhů kávy.
2. Chemické složení kávy.
3. Charakteristika a rozdělení biologicky aktivních látek v různých druzích kávy.

II. Praktická část

1. Získání různých vzorků kávy.
 2. Stanovení antioxidační aktivity, celkových polyfenolů a antiproliferační aktivity v různých druzích kávy.
 3. Zpracování výsledků a vyhodnocení.
-

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin II*. Tábor, OSSIS, 2009. 623 s. ISBN 978-80-86659-16-9.

[2] POSPÍŠIL, J. *Antioxidanty*. Praha: Academia, 1968. 274 s.

[3] ŠTÍPEK, S. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. Praha: Grada, 2000. 314 s. ISBN 80-7169-704-4.

[4] BRANAD-WILLIAMS W. a kol. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT-Food Science Technology*, 1995, 28, s. 25-30, ISSN 1023-367.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Jiří Mlček, Ph.D.

Ústav technologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

16. ledna 2013

Termín odevzdání diplomové práce:

2. května 2013

Ve Zlíně dne 4. února 2013


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 22.4.2013

Neduchalová Michaela

¹¹ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²¹ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³¹ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užit či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jim dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce je zaměřena na studium množství biologicky významných látek v různých druzích kávy. Jednotlivé kávy se od sebe lišily svým složením a původem. V praktické části bylo provedeno stanovení celkových polyfenolů a antioxidační aktivity. Celkový obsah polyfenolů byl stanoven spektrometricky s pomocí Follinova činidla a antioxidační aktivita byla stanovena metodou DPPH. Součástí práce je také stanovení životaschopnosti buněk ve vybraných vzorcích káv. Výsledné hodnoty byly porovnány a vyhodnocovány.

Klíčová slova: káva, polyfenoly, antioxidanty, DPPH, aktivita.

ABSTRACT

This diploma thesis is focused on the study of biologically important compounds in different types of coffee. Each coffee from one another in composition, and origin. In the practical part, the determination of total polyphenols and antioxidant activity. Total polyphenol content was determined spectrophotometrically using Follinova agent and antioxidant activity was determined by DPPH. The work also includes the determination of cell viability in selected samples of coffees. The resulting values were compared and evaluated.

Keywords: coffee, polyphenols, antioxidants, DPPH, activity.

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu mé diplomové práce, panu Ing. Jiřímu Mlčkovi, Ph.D. za rady, informace a také za čas, která mi věnoval. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za všestrannou pomoc a oporu při studiu.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 HISTORIE KÁVY	12
2 KÁVOVNÍK	14
2.1 DRUHY KÁVOVNÍKU	15
2.1.1 Kávovník arabský (<i>Coffea arabica</i>).....	15
2.1.2 Kávovník robusta (<i>Coffea robusta canephora</i>).....	16
2.1.3 Kávovník liberijský (<i>Coffea liberica</i>)	16
2.1.4 Kávovník Dawevrey (<i>Coffea excelsa</i>)	16
3 CHEMICKÉ SLOŽENÍ	17
4 ANTIOXIDANTY	20
4.1 ANTIOXIDAČNÍ TERAPIE	21
4.2 ÚČINEK ANTIOXIDANTŮ	22
4.3 KLASIFIKACE ANTIOXIDANTŮ	22
4.3.1 Přírodní antioxidanty.....	22
4.3.1.1 Jednoduché fenoly, fenolové kyseliny a jejich deriváty	23
4.3.1.2 Flavonoidy	23
4.3.1.3 Lignany	23
4.3.1.4 Diterpeny a chinony.....	24
4.3.2 Syntetické antioxidanty	24
4.3.2.1 BHA	24
4.3.2.2 BHT	24
4.3.2.3 TBHQ.....	24
4.3.2.4 Galláty.....	25
4.4 TOXICITA A BIOLOGICKÉ PŮSOBNÍ ANTIOXIDANTŮ	25
5 POLYFENOLY	27
5.1 FENOLOVÉ KYSELINY	29
5.2 FLAVONOIDY.....	30
5.3 STILBENY	33
5.4 LIGNANY	34
5.5 ANTIOXIDAČNÍ ÚČINKY POLYFENOLŮ	34
6 ANTIOXIDANTY A POLYFENOLY V KÁVĚ	36
7 BUNĚČNÁ PROLIFERACE A ŽIVOTASCHOPNOST	39
7.1 BUNĚČNÉ LINIE	39
II PRAKTICKÁ ČÁST	40
8 CÍL PRÁCE	41
9 MATERIÁL A METODIKA	42

9.1	MATERIÁL.....	42
9.2	PŘÍPRAVA VZORKŮ.....	42
9.3	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY METODOU DPPH.....	43
9.4	ANALÝZA CELKOVÝCH POLYFENOLŮ.....	44
9.5	STANOVENÍ ŽIVOTASCHOPNOSTI BUNĚK.....	44
10	VÝSLEDKY.....	46
10.1	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY.....	46
10.2	OBSAH CELKOVÝCH POLYFENOLŮ.....	48
10.3	ŽIVOTASCHOPNOST BUNĚK.....	50
11	DISKUZE.....	52
11.1	DISKUZE - ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA.....	52
11.2	DISKUZE - OBSAH CELKOVÝCH POLYFENOLŮ.....	54
11.3	DISKUZE – ŽIVOTASCHOPNOST BUNĚK.....	57
	ZÁVĚR.....	59
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	61
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	66
	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	67
	SEZNAM TABULEK.....	68
	SEZNAM PŘÍLOH.....	69

ÚVOD

Naše tělo je už po celá staletí vystavováno účinkům volných radikálů, které vznikají v našem organismu a představují potencionální nebezpečí. Mohou poškodit buněčnou membránu, ničí genetickou informaci buněk, urychlují proces degenerace a stárnutí buněk, čímž oslabují imunitní systém a tak napomáhají vzniku řady onemocnění.

Jedním ze způsobů, jak chránit lidský organismus před nežádoucími vlivy volných radikálů, je přísun antioxidantů, které mají schopnost volné radikály nejen blokovat, ale i ničit.

Lidský organismus je schopný si produkovat vlastní účinné antioxidanty, ale jejich množství a složení není vždy tak účinné, a proto je nutné antioxidanty přijímat. Antioxidanty jsou přítomny nejen přirozeně v potravinách, ale také se mohou do potravin přidávat, čímž přispívají k jejich údržnosti.

Během několika desítek let se dostaly do popředí zájmu, ať už u laické veřejnosti nebo odborníků, právě látky s antioxidačními účinky. Mezi tyto látky patří i káva.

Slovo káva je odvozené z arabského výrazu „qahwah“, který znamená sílu a vzrušení. Je jedním z nejvíce konzumovaných nápojů na celém světě a to nejen pro svoji příjemnou chuť a aroma, ale také pro své povzbuzující účinky. Představy, že se po vypití šálku kávy cítíme dobře, že se nám i lépe pracuje, duševně i tělesně, jsou už na světě velmi dlouho.

V posledních letech dochází ke zvýšenému zájmu o možné pozitivní vlastnosti kávy na organismus. Je známo, že uvařená káva má velmi silnou antioxidační aktivitu v důsledku přítomnosti fenolických sloučenin.

Pití kávy je všeobecně považováno za zlovyk, který sebou nese určité zdravotní obtíže jako například vysoký krevní tlak. V řadě experimentálních studií se ale uvádí, že látky obsažené v kávě mohou příznivě ochraňovat lidský organismus před řadami nemocí.

Předložená diplomová práce je zaměřena na analýzu obsahu vybraných biologicky aktivních látek v různých druzích kávy a jejich následný vliv na životaschopnost buněk.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 HISTORIE KÁVY

Kávovník byl poprvé znám ve východní Africe, mezi Etiopií a oblastí velkých jezer, někde v prostoru provincie Kafa, v hornaté a lesnaté oblasti mezi 5° a 7° severní šířky. Podle pověsti ho objevily pasoucí se kozy, které po požití červených bobulí byly nápadně čilé. Jejich pastýř Kaldi pak tyto bobule také ochutnal a pocítil jejich osvěžující účinky [1].

Pro pražení kávy existuje mnoho starých a zajímavých legend, které vyprávějí o chuti a vlastnostech pražené kávy. Jedna taková pověst říká, že hořel les, kde divoce rostly kávovníky, bobule nestačily zcela shořet a jejich chuť byla po lesním požáru tak příjemná, že lidé začali plody kávovníku dávat k ohni úmyslně. A od té doby se káva praží. Mnoho přímořských národů vydávajících se na daleké námořní výpravy poprvé ochutnalo kávu v Arábii. Tato země ji také začala ve skromném množství vyvážet. Chtěla si však udržet svůj monopol, a proto neměla zájem, aby se káva pěstovala i jinde. Zakázala vývoz klíčících kávových semen. Před naložením musel být klíček zničen ve vařící vodě. Přesto si však káva našla do Evropy cestu. Už v roce 1517 Turci propašovali kávu z Arábie do Turecka, avšak nápoj konzumovali tajně. Mohamedánští kněží totiž po mnohých úvahách rozhodli, že korán mohamedánům nepovoluje pít kávu, rozmarný to nápoj podobný alkoholu, avšak tento zákaz byl brzy zrušen. Od tohoto historického okamžiku na všech válečných výpravách Turky doprovázely vaky s kávou. Odtud už byl jen krůček k tomu, aby se s kávou seznámila ostatní Evropa. Pro zdejší pěstitele a obchodníky byla káva velkým zdrojem příjmů. Vývoz zelených zrn kávy byl pod těžkými tresty zakázán a Arabové záměrně znehodnocovali kávová semena varem, aby nemohlo dojít k vypěstování keřů kávovníku mimo Arábii. Pěstování kávy bylo výsadou obyvatel Arabského poloostrova až do konce 18. století. Největší zásluhu na rozšíření pěstování kávy i v jiných oblastech světa mají zejména Holanďané, kteří na počátku 17. století tajně přivezli zelená kávová semena z Jemenu. Rozhodli se pro pěstování této plodiny ve svých zámořských koloniích a v krátké době počali kultivovat první keře kávovníku na Ceylonu, v Indii a posléze se pěstování kávy rozšířilo i na Jávě. Pití kávy se na rozdíl od jejího pěstování rozšířilo již v 15. století mimo oblast Arabského poloostrova do blízkých zemí Orientu, kde v jednotlivých městech vznikaly hojně navštěvované kavárny [2,3].

V roce 1554 byla otevřena první kavárna v Cařihradu, téměř o sto let (1652) později v Anglii, v roce 1685 získal Polák Koleczycki od císaře Leopolda I. privilej k založení první kavárny ve Vídni. V Praze první kávu prodával Arab Georgius Deodatus Damascenus,

který zřídil první pražskou kavárnu roku 1714 na Starém Městě poblíž Mostecké věže. Praha měla tedy svoji kavárnu dříve než např. Berlín (1721) a Řím (1750) [1].

Vedle čaje a kakaa je káva společensky nepříjemnější konzumovanou stimulační látkou. Spotřeba kávy v západním světě v současné době stále roste. Američané spotřebují průměrně 8 kg kávy ročně. V Čechách spotřeba kávy také stoupá, je však zhruba poloviční ve srovnání s Američany. Zajímavostí je, že právě v zemi, která díky kávě v Evropě získala takovou popularitu, tedy v Turecku, jí poslední dobou mohutně konkuruje jiná kofeinová droga, a to silný, velmi sladký čaj [2].

2 KÁVOVNÍK

Kávovníky jsou poměrně početnou skupinou nižších tropických rostlin. Jsou pěstovány v Asii, Jižní a Střední Americe, v Africe, Arabském poloostrově a Indonésii, především v hornatých krajinách. Všechny druhy jsou dřevnaté, jejich velikost se pohybuje od nízkých keřů až k 15 m vysokým stromům. Kořeny dosahují hloubky 1,5 m. Vyžaduje teplé a vlhké podnebí se stálými teplotami mezi 18-22 °C [2,4].

Jde o původně pralesně vegetující keř. Proto v oblastech se silnými větry či nadměrným osvětlením jsou kávovníkové plantáže chráněny pásy jiných rostlin (banánovníky, kukuřice aj.), čímž se jejich výnos zároveň reguluje. Keříky kávovníku se předpěstují v bavlněných obalech a po dosažení výšky cca 30 až 50 cm jsou pak vysazovány na plantážích, především na slabě kyselých, hlinitých pískách. Rostliny kávovníku plodí po 3 až 6 letech po vysazení a jsou životaschopné 20 až 30 let, což úzce souvisí s místními podmínkami a agrotechnickou péčí. Potom se musí vyměnit za mladé čerstvé kultivary [4].

Listy kávovníku bývají značně rozmanité, jsou stále zelené, asymetrické i symetrické, obdélníkově oválné, zbarvení zelené barvy s nádechem žlutavým, tmavozeleným, bronzovým nebo až fialovým, všechny však s voskovitým povrchem. Vzdálenost mezi listovými páry je okolo 2-7 cm. Okraje listů bývají mírně zvlněné, mladší rostliny mají jiný okraj listů, který je závislý na druhu rostliny. Vršek a konec listu je vždy špičatý, což je charakteristická vlastnost pro všechny druhy. List chrání citlivou rostlinu v noci před mrazem a přes den před intenzivním slunečním žářem. Květy kávovníku jsou bílé, hvězdicového tvaru, kvetou v trsech po 8 až 15 květech a nacházejí se v úžlabí listů. Květ se skládá z pětičlenného zoubkovaného kalyxu, což je vnější strana květu. Rostlina kvete jen několik dní, zpravidla po dešti a květy mají intenzivní vůni [3].

Z oplozeného květu se vyvíjí bobule, které jsou nejdříve zelené, pak žloutnou, až nakonec zčervenají. Tento děj trvá v závislosti na odrůdě a poloze plantáže, dozrávají průběžně 6 až 9 měsíců po odkvětu [2].

V každé bobulce je po dvou zrnkách obrácenými plochými stranami k sobě. Pokud se v plodu vyvine pouze jedno semeno, bývá oválné a je nazývána jako perlová káva. Vnější vrstva kávové bobule (kůže) je poměrně hrubá a tím dostatečně odolná proti poškození (exokarp). Dále následuje vnitřní vlhká (gelovitá) část nasládlé šťavnaté dužiny (mezokarp). U několika druhů kávovníkových bobulí je tato vrstva cennější než samotné kávovníkové zrno. Obsahuje sacharidové složky, které lze zkvasit na kvalitní kávový

extrakt, resp. likér. Další vrstvou bobule kávovníku je slupka tzv. pergamentový obal (endokarp), který je v průběhu zpracování dost tuhý, stejně jako i tenká vrstva stříbřité blanky, která zůstává podobně přilnutá na samém povrchu kávovníkového zrna až do jeho pražení. Po pražení se tato stříbřitá vrstva samovolně odstraní, protože neexpanduje jako vnitřek kávovníkového semena. Odstranění této vrstvy se provádí z důvodu přípravy suroviny pro kosmetické účely [3].

2.1 Druhy kávovníku

Na celém světě existuje kolem 50 druhů kávovníku, obchoduje se však jen se zrny 4 z nich:

- kávovník arabský (*Coffea arabica*) - pochází z Etiopie a vyznačuje se celkově nižším obsahem kofeinu,
- kávovník robusta (*Coffea robusta canephora*) – pochází z Jávy, je to silně aromatická káva s vysokým obsahem kofeinu,
- kávovník liberijský (*Coffea liberica*) - velká zrna s trpkou chutí, pěstována v Libérii, používá se hlavně do směsí,
- kávovník Dawevrey (*Coffea exelsa*) - zrna tohoto odolného kávovníku pocházejí hlavně z Brazílie [5].

2.1.1 Kávovník arabský (*Coffea arabica*)

Kávovník arabský dorůstá výšky 3 m a za příznivých podmínek dává první plody 3 roky po vysazení, přičemž přiměřené výnosy lze očekávat od 6 roku po výsadbě. Úrodu pak poskytuje 25-35 let podle odrůdy a půdně klimatických podmínek. Keř se většinou pěstuje ve výškách od 1000 m do 1800 m. Ačkoli cca 75 % světové produkce kávy jsou typy arabica, pouze jedna pětina z vypěstovaného množství jsou velmi kvalitní zrna (v 1 kg je cca 2200 větších semen). Ostatní úroda vykazuje určité vady zrna a spadají do nižších tříd. Jednotlivé odrůdy kávovníku arabského jsou pěstovány v různých produkčních oblastech s přihlédnutím k pěstitelským a historickým podmínkám a liší se především vzrůstem keře a tvarem jeho listů a květů [2,4].

Plod je drsný, plochý a obsahuje dvě zploštělá semena. Když se vyvine jen jedno zrno, má kulovitý tvar a je označováno jako perlové. Sklízí se dvakrát až třikrát ročně, a to především ručně. Arabská káva má výraznější aroma, je méně hořká než káva robusta a obsahuje také menší množství kofeinu 1,1 - 1,7 %. Znakem kvality jemných propíraných

zrníček arabiky je světlý vroubek, květinová až ovocná kyselina a lehce pryskyřičnaté aroma. Nepocházející zrnka mají vroubek tmavší, silnější tělo a neutrální aroma. Mezi velké pěstitele kávy patří Brazílie, Kolumbie, Mexiko a státy Střední Ameriky [6].

2.1.2 Kávovník robusta (*Coffea robusta canephora*)

Kávovník robusta poskytuje první úrodu již 2 roky po vysazení a plody uzrávají průběžně po celý rok [2].

Jde nejčastěji o keř či strom dosahující výšky až 15 m, který se pěstuje v nadmořských výškách do 900 m, a kterému vyhovuje teplota až do 30 °C. Je značně odolný proti nižším teplotám a nemocím postihující kávovníkové plantáže [6].

Skližená kávová zrna nedosahují kvality arabiky a jsou menší (v 1 kg je cca 3300 semen). Robusta vznikla zkřížením káv Arabica a Mauritian a v současné době tvoří přibližně 25 % světové produkce a její podíl se stále zvyšuje v důsledku větší přizpůsobivosti a odolnosti. Robusta se sbírá jak ručně, tak i strojově. Její semena obsahují třikrát více kofeinu než káva Arabica (2 - 4,5 %) a méně kyselin, které zabraňují tvorbě kvalitní pěny. Vyznačuje se zemitější a méně aromatickou drsnější chutí a tmavší barvou. Pro horší kvalitu semen se tento druh kávy používá do směsí. Mezi úspěšné pěstitele patří Vietnam, Brazílie a Indonésie [2,6].

2.1.3 Kávovník liberijský (*Coffea liberica*)

Tato silná dlouholetá rostlina dorůstá výšky až 18 m je velmi plodná a velikost jejích semen dosahuje téměř dvojnásobku velikosti semen kávovníku arabského. Je také mnohem odolnější vůči útokům parazitů. Pro svůj život potřebuje vysokou teplotu vzduchu a dostatek vláhy [3,7].

Jeho velká, nahořklá zrna se používají téměř výhradně do směsí. Před několika desetiletími byla tato káva oblíbená zejména ve Skandinávii. Dnes se pěstuje v menší míře jen v Malajsii a v oblastech Libérie, Konga a Pobřeží slonoviny [2,3,].

2.1.4 Kávovník Dawevrey (*Coffea excelsa*)

Strom dorůstající do výšky až 20 m. Roste v oblasti Konga a Vietnamu a je velmi odolný vůči chorobám. Káva je nízké kvality, má ostrou, výraznou až odpornou vůni a vysoký obsah kofeinu. Je nejméně náročný na vláhu a půdu [8,9].

3 CHEMICKÉ SLOŽENÍ

Kávová zrna obsahují desítky organických látek, o jejichž fyziologických účincích zatím nemáme dostatek informací [10].

Nepražená káva obsahuje 10 – 15 % vody, 5 – 15 % sacharidů, 10 – 15 % bílkovin, 20 – 25 % tříslovin, 10 % kyseliny kávové a chinové, 4 – 5 % kyseliny chlorogenové, okolo 2,5 % kofeinu a přibližně 4 % minerálních látek (draslík, hořčík, vápník, fosfor, železo), jejichž množství se mění podle původu kávy, metod pěstování a používaných hnojiv. Obsah tuků je v zelené kávě cca 10 – 20 %, více v odrůdách arabiky. Větší část těchto tuků je obsažena i v uvařené kávě (turek), při užití papírových filtrů (překapávaná káva) jejich množství v šálku výrazně klesá [10,11].

Káva získává svoje typické vlastnosti až pražením, při kterém klesá obsah kofeinu na 0,8 – 2,5 % svého původního obsahu a obsah kyselin, na které je kofein vázán. Obsah chlorogenových kyselin se pražením snižuje o 30 – 70 % jejich původního množství. Tukové složky zůstanou zachovány a pokryjí povrch pražených kávových zrn lesklou vrstvou. Obsah vody se pražením redukuje na 1 – 2,5 %, přípustný je limit 5 %. Chemické složení hotové kávy je ovlivněno různými faktory, například teplotou při pražení, způsobem přípravy nápoje, přísadami, přítomností příměsí a také původem kávy [12].

Tab. 1. Obsahové látky v zelené a pražené kávě [13].

Zelená káva			Pražená káva		
Přítomná látka	C. arabica	C. robusta	Přítomná látka	C. arabica	C. robusta
Kofein	1,2 %	2,2 %	Kofein	1,3 %	2,4 %
Minerály	4,2 %	4,4 %	Minerály	4,5 %	4,7 %
Tuky	16,0 %	10,0 %	Tuky	17,0 %	11,0 %
Trigonellin	1,0 %	0,7 %	Trigonellin	1,0 %	0,7 %
Proteiny	11,5 %	11,8 %	Proteiny	10,0 %	10,0 %
Mastné kyseliny	1,4 %	1,4 %	Mastné kyseliny	2,4 %	2,5 %
Kyselina chlorogenová	6,5 %	10,0 %	Kyselina chlorogenová	2,7 %	3,0 %
Uhlohydráty	58,0 %	59,5 %	Uhlohydráty	38,0 %	41,5 %

Roku 1820 objevil vatislavský chemik Friedlib Fedinand Runge v kávě alkaloid, který byl později nazván kofein a popsal jeho účinky na lidský organizmus. Kofein je farmakologicky nejvýznamnější látkou v kávě [14].

Kofein je purinový alkaloid, jehož obsah v pražené kávě je u *Coffea arabica* 0,7-1,4 % a u *Coffea robusta* 2,2 - 2,4 %. V rostlině je kofein vázán na kyselinu chlorogenovou (kyselina kávová a kyselina chinová). Pražením se část kofeinu i kyseliny chlorogenové ztrácí a naproti tomu se objevují nové látky. Kofein je hořký a přispívá k celkové chuti kávy. Množství kofeinu v běžném šálku kávy (50-150 ml) se pohybuje 50 – 150 mg v závislosti na druhu a sortě použité kávy. U kávy bez kofeinu jsou to 1 – 4 mg kofeinu. Smrtná dávka je odhadována na 10 g kofeinu, což odpovídá 100 – 200 šálkům [2].

Kofein působí stimulačně na centrální nervovou soustavu. Již v malých dávkách krátkodobě posiluje některé funkce mozku a zvyšuje schopnost soustředění, snižuje únavu a vyčerpání, ovlivňuje i svalovou činnost, zvyšuje schopnost těla spalovat tuk a energii. Má výrazné močopudné účinky a podporuje vylučování žaludečních i žlučových šťáv. Kofein také narušuje nutriční rovnováhu, kdy zvyšuje vylučování vápníku močí a výrazně snižuje

absorpci železa. Má vliv na psychiku a chování, zhoršuje úzkost a depresi, může zesilovat panické reakce [15].

Nejvyšší koncentrace kofeinu je v těle dosaženo asi 30 minut po požití kávy. Metabolizuje se v játrech na více než 25 různých látek, které jsou posléze vyloučeny močí. Polovina vstřebaného kofeinu se vyloučí u dětí za 2,5 hodiny, u dospělých za 3 – 7 hodin. Vylučování je podstatně zpomaleno u těhotných žen a u žen užívajících hormonální antikoncepci, naopak je zrychleno u kuřáků. Káva nemá vliv na stavy vzniklé po požití alkoholu, dokonce ani nezrychluje odbourávání alkoholu, právě naopak odbourávání alkoholu zpomaluje a tím zpomaluje i jeho vylučování [16,17,18].

Z kávy se získává kofein také pro lékařské účely. Využívá se především jako terapeutická přísada do analgetických a antipyretických směsí. V injekční formě se aplikuje k povzbuzení dechu a krevního oběhu při horečnatých stavech a u infekčních onemocnění. Užívá se také jako protijed při otravách narkotiky, alkoholem a jinými drogami [19].

Tab. 2. Množství kofeinu v oblíbených surovinách [15].

Surovina	Množství kofeinu [mg]
Šálek čaje	20 – 50
Sklenka kolového nápoje	40
Šálek kakaa	2 – 6
Tabulka čokolády	15 – 115
Energetický nápoj	80
Analgetika	30 - 100

4 ANTIOXIDANTY

Jednou z možností, jak chránit organismus před vlivem volných radikálů, je působení antioxidantů. Antioxidanty jsou molekuly, které mohou zpomalovat nebo zabraňovat degeneraci, poškození nebo zničení tkáně způsobené oxidací [20,21].

Kromě endogenních nízkomolekulárních antioxidantů jako je glutathion, kyselina močová, koenzym Q a další se v poslední době do centra pozornosti řadí mnoho látek přírodního původu, které se do lidského organismu dostávají společně s potravou. Některé potraviny rostlinného původu tak vedle své nutriční a energetické hodnoty mají důležitou roli jako zdroj antioxidantů. K přírodním látkám s antioxidantními účinky, které jsou přijímané potravou, jsou v první řadě tradičně řazeny antioxidantní vitaminy C, E a karotenoidy. V poslední době se však mnohem větší význam přikládá dalším přírodním látkám, zejména polyfenolickým sloučeninám. Mezi ně patří např. flavonoidy, katechiny a fenolické kyseliny. Zdrojem těchto látek je zelenina, ovoce, vláknina, čaj, káva, víno a aromatické léčivé rostliny. V řadě experimentálních studií bylo zjištěno, že antioxidantní aktivita mnoha rostlinných fenolických látek je vyšší než u antioxidantních vitamínů. Klinické a epidemiologické studie rovněž prokazují korelaci mezi antioxidantní aktivitou látek přijímaných v potravě a prevencí některých onemocnění např. kardiovaskulárních chorob, karcinogeneze, neurologických poruch nebo procesů stárnutí [22].

Volné radikály exogenního i endogenního původu v přírodě lidskou činností stále přibývají a v současné době je často porušována rovnováha mezi nimi a antioxidanty. Převaha volných radikálů nad antioxidanty se nazývá oxidační stres. Volné radikály jsou charakterizovány nepárovými elektrony. V přítomnosti kyslíku se na místo nepárového elektronu okamžitě naváže molekula kyslíku a vzniká peroxylový radikál, který se snaží získat z jiné sloučeniny chybějící elektron, čímž vytváří jiný volný radikál. Tato řetězová reakce je přerušena buď vazbou dvou radikálů na sebe, nebo reakcí s antioxidantem. Nejznámější vznik volných radikálů probíhá v dýchacím řetězci, kde oxidací vzdušným kyslíkem vzniká energie a jako vedlejší produkty volné radikály superoxid (O_2) a volný hydroxylový radikál ($OH\cdot$). Za normálních okolností 98 – 99 % energie vzniká cestou přes cytochromový systém a jen 1-2 % jednoelektronovou redukcí, tj. přes volné radikály. Ovšem v kritických stavech nemocí může vznikat velká většina energie touto vedlejší cestou. Protivníkem těchto volných radikálů jsou právě antioxidanty. Těch se vytvořilo během historického vývoje veliké množství. Je však třeba uvědomit, že ne každý

antioxidant dokáže odstranit každý volný radikál. Antioxidanty jsou hydrofilní, vyskytují se zejména v extracelulární tekutině a jsou také lipofilní. Pronikají buněčnou membránou a mohou tedy účinkovat intracelulárně, i když jejich účinek nastává se zpožděním. Volné radikály, které uniknou antioxidačnímu působení, mohou způsobit lokální, ale i celková poškození. Proto se dnes uznává, že antioxidační terapie musí obsahovat více antioxidantů, aby pokryla celou škálu různých volných radikálů [23].

Káva jako čistě přírodní produkt je výborným zdrojem antioxidantů, má dokonce vyšší procento antioxidantů než zelený čaj a některé druhy ovoce, obzvláště jedné jejich skupiny, která se nazývá polyfenoly. Nejbohatším polyfenolem v kávě je kyselina chlorogenová (kombinace kyseliny kávové a chinové), která reprezentuje důležitou část antioxidantů kávy podílejících se na neutralizaci volných radikálů, které se do našeho těla dostávají především vzduchem, potravou a tekutinami [24].

4.1 Antioxidační terapie

Mnoho experimentálních studií prokazuje příznivý vliv antioxidantů v různých kombinacích a modelech. Na celém světě proběhlo a stále probíhá mnoho klinických studií s antioxidační terapií lidí. Jejich výsledky nejsou jednoznačné nejspíše proto, že oxidační stres je jen jedním z dějů probíhajících při těchto onemocněních. Sledované parametry jsou závislé i na dalších faktorech. Problémem při hodnocení je také srovnání dávky, délky podávání a načasování antioxidační terapie v průběhu léčby nemoci, které může být významným faktorem úspěchu či neúspěchu antioxidační terapie. Kombinace antioxidantů též může zlepšit jejich vstřebávání ze střeva. Nejlépe se vstřebávají přirozené antioxidanty z ekologických přírodních látek. Na tuto formu je organizmus dlouhým vývojem zvyklý a přirozené produkty obsahují ty nejúčinnější formy antioxidantů. Některé klinické studie dokazují, že podáváním antioxidačních látek se sníží riziko vzniku onemocnění nebo selepší jeho průběh. Stárnutím klesá zásoba antioxidantů u člověka a ten snáze onemocní různými nemocemi z volných radikálů. U mladého jedince je vhodná suplementace antioxidanty jen v určitých případech a stavech (vrcholný sportovní výkon, těžký úraz apod.), u starých lidí by pak antioxidační podpora organismu měla být pravidlem, které prodlouží a zkvalitní život [23,25].

4.2 Účinek antioxidantů

Účinek antioxidantů lze shrnout do několika bodů. Antioxidanty převážně interferují s procesem oxidace lipidů a jiných oxylabilních sloučenin tak, že:

- 1) reagují s volnými radikály (antioxidanty primární) nebo redukují vzniklé hydroperoxydy (antioxidanty sekundární),
- 2) váží do komplexů katalyticky působící kovy,
- 3) eliminují přítomný dusík.

K primárním antioxidantům náleží všechny povolené látky (askorbová a erythorbová kyselina a jejich deriváty, tokoferoly, fenolové antioxidanty, galláty).

K sekundárním antioxidantům se řadí např. cystein, peptidy obsahující cystein, lipoová kyselina, methionin aj. přirozeně se vyskytující sloučeniny, které se však jako antioxidanty nepoužívají. Ze syntetických sloučenin se jako sekundární antioxidant používal dilaurylester 3,3' – thiodipropionové kyseliny [26].

4.3 Klasifikace antioxidantů

Podle původu rozeznáváme antioxidanty:

- 1) přírodní
- 2) syntetické

4.3.1 Přírodní antioxidanty

Nejvýznamnějšími přírodními antioxidanty jsou tokoferoly a jim příbuzné tokotrienoly, které jsou přirozenou složkou všech rostlinných olejů a mají vedle antioxidační účinnosti také vitaminovou účinnost (vitamin E). Jsou zvláště účinné pro stabilizaci živočišných tuků např. másla nebo vepřového sádla, protože ty neobsahují skoro žádné přírodní antioxidanty [27].

Po staletí se k prodloužení údržnosti potravin používají převážně různé byliny a koření. Tyto antioxidanty se do potravy dostávají z přírodních zdrojů. Mezi tyto potravinářské suroviny patří především koření jako například majoránka, tymián, šalvěj, rozmarýna, obiloviny a olejniny (hlavně pšenice, žito, rýže, arašídy, řepka) nebo ovoce a zelenina (cibule, paprika) [26].

Antioxidační aktivita přírodních látek je zpravidla nižší než aktivita syntetických antioxidantů, a proto se jich musí přidávat větší množství. Větší přídavky antioxidantů již mohou mít vliv na senzoryckou jakost, a to na barvu, vůni a chuť. Hlavním důvodem je, že účinné látky tvoří jen část hmoty přidávaného materiálu. Přírodní antioxidanty jsou zpravidla dražší než syntetické antioxidanty. Zvláště extrakce zdražuje výrobek. Ideální jsou proto látky, které odpadají při výrobě jiných potravin (např. tokoferoly nebo rozmarýnové pryskyřice, které zůstávají po oddestilování etherického oleje z rozmarýnových listů) nebo se mohou přidávat bez jakékoli frakcionace (např. mleté koření do masných výrobků) [27].

K nejčastějším přírodním antioxidantům lze zařadit:

4.3.1.1 Jednoduché fenoly, fenolové kyseliny a jejich deriváty

Fenoly jsou běžnou složkou koření, například v tymiánu se vyskytuje thymol a karvakrol. Některé jednoduché fenoly (zejména hydrochinon, guajakol, isoeugenol a salicylaldehyd) se vyskytují jako složky kouře používaného odedávna k uzení potravin. Také fenolové kyseliny jsou složkami kouře. Fenolové kyseliny a jejich deriváty vykazují účinky primárních antioxidantů. Aktivita závisí na počtu hydroxylových skupin v molekule [26].

Mezi nejběžnější estery fenolových kyselin patří depsidy. Zástupcem depsidů je velmi rozšířená kyselina chlorogenová vyskytující se hlavně v kávě a v syrových bramborách [28].

4.3.1.2 Flavonoidy

Flavonoidní látky jsou antioxidanty primární. Pro antioxidační aktivitu flavonoidů je důležitý počet hydroxylových skupin a jejich poloha [26].

Mají protizánětlivý, protisklerotický a protinádorový účinek, působí jak v hydrofilním, tak v lipofilním prostředí. Flavonoidy chrání vitamin C před předčasným poškozením a zvyšují jeho účinnost někdy až dvacetinásobně. Tyto látky se často vyskytují především v zelenině (rajčatech, paprice, brokolici) a ovoci, především v bílé dužině citrusových plodů, dále v červeném víně, zeleném a černém čaji [25,29].

4.3.1.3 Lignany

Patří mezi fytoestrogeny, což jsou vícesytné fenoly strukturou podobné steroidním hormonům. Jedním z nejznámějších ligninů je NDGA (kyselina nordihydroguajaretová),

která se z počátku používala jako antioxidant, ale pro její nepříznivé toxikologické hodnocení se dnes už nepoužívá [26].

Lignany jsou obsaženy hlavně v ovesných vločkách, lněných semínkách, ječmeni či žitě [29].

4.3.1.4 Diterpeny a chinony

K neaktivnějším patří tzv. fenolové diterpeny jako je karnosová kyselina a karnosol, které se vyskytují nejčastěji v extraktech z rozmarýnu a šalvěje. Významnou skupinou látek odvozenou od diterpenů jsou chinony neboli deriváty fenanthrenchinonů (s jiným biochemickým významem). Kromě antioxidantních účinků mají i sedativní, antimikrobní, antikoagulační nebo protizánětlivý účinek [26].

4.3.2 Syntetické antioxidanty

Přirozené antioxidanty nemají většinou konstantní složení, jsou obvykle málo účinné a dosti drahé. Proto se potraviny častěji stabilizují antioxidanty syntetickými. Nejdůležitější syntetické antioxidanty patří do skupiny gallátů. Přidávají se do rostlinných olejů a margarínů k inhibici žluknutí a zachování jejich chuti. K dalším důležitým syntetickým antioxidantům patří monofenolové antioxidanty BHA, BHT a difenol TBHQ [26,30].

4.3.2.1 BHA

Komerční butylhydroxyanisol je směsí dvou isomerů. Asi 90 % představuje 3-terc-butyl-4-hydroxyanisol a 10 % jeho isomer 2-terc-butyl-4-hydroxyanisol. BHA je účinný zejména pro ochranu tuků obsahujících mastné kyseliny s kratším řetězcem (kokosový, palmojadrový olej) [26].

Může být obsažen i v obalech, ze kterých poté proniká do jídla. Jeho použití je zakázáno ve výrobcích pro děti. Můžeme ho nalézt i v kosmetických výrobcích [31].

4.3.2.2 BHT

Butylhydroxytoluen, dříve známý jako Ionol, je ve srovnání s BHA mnohem účinnější antioxidant živočišných tuků, ale je vhodný i pro rostlinné tuky. Stejně jako BHA se často používá do obalových materiálů, a tím se dostává do potravin [26,30].

4.3.2.3 TBHQ

2-terc-butylhydrochinon patří jako jediný antioxidant do skupiny difenolů. TBHQ patří k nejlepším antioxidantům tuků určeným na smažení. Další zvýšení antioxidantní aktivity

speciálně pro ochranu rostlinných olejů, je možné v kombinaci s chelatačními činidly (např. citrónovou kyselinou) [26].

4.3.2.4 Galláty

Galláty jsou estery gallové kyseliny, které se v malém množství nacházejí v potravinách rostlinného původu. Účinnost gallátů je vyšší v bezvodých tucích. Galláty vykazují synergismus s BHA a BHT, použití společně s TBHQ není povoleno [26].

4.4 Toxicita a biologické působení antioxidantů

Pomocí antioxidantů je možno nejen zlepšit trvanlivost organických látek citlivých ke kyslíku, ale i zabránit tvorbě toxických oxidačních produktů. Z hygienického hlediska se však jejich používání v potravinářství ve větší míře nedoporučuje a legislativními opatřeními je v jednotlivých státech přísně stanoveno, za jakých podmínek smějí být aplikovány. Není snadné stanovit toxicitu antioxidantů tak, aby mohly být výsledky jednoznačně interpretovány pro člověka. Pro posouzení symptomů toxicity antioxidantů a jejich metabolitů jsou důležité výsledky biologických studií, prováděných dlouhodobě na zvířatech. U každé látky se sleduje především akutní a chronická toxicita a stanovení letální dávky. Údaje se většinou uvádějí v mg testované látky/kg živé váhy. Při hodnocení antioxidantů pro potravinářství mají údaje o akutní toxicitě pouze omezený význam, protože mohou kolísat podle druhu pokusných zvířat. Za prakticky nezávadné je možno považovat látky, při jejichž dlouhodobém používání se neobjeví toxicita. Toxické symptomy však mohou vzniknout v důsledku kumulativního účinku, způsobeného při opakovaném používání chemickým vázáním antioxidantů nebo jejich rozpuštěním v lipidech. Taková kumulace může též nepřímou ovlivnit některé fyziologické funkce. Dosavadní údaje o biologickém působení antioxidantů se především zabývají ovlivněním činnosti různých orgánů, metabolismem antioxidantů, stabilitou tukového podílu v živé tkáni, následky nedostatku antioxidantů v potravě a toxicitou produktů autooxidace. Velmi významným problémem je možnost výběru netoxických antioxidantů, které by chránily potraviny nebo krmivo po dobu skladování, spolu s nimi byly konzumovány, absorbovány zažívacím traktem, ukládaly se ve tkáni a tam dále chránily před oxidací tukové složky a další citlivé látky, především vitaminy A, D a E, pyridoxin a kyselinu pantotenovou. Tento postup by umožnil ochranu potravin před vznikem primárních i sekundárních oxidačních produktů, z nichž některé mohou být biologicky závadné, a současně by byly chráněny před rozkladem další důležité citlivé látky obsažené v potravě i v různých živočišných

orgánech. Na základě studií toxicity schvalují příslušné orgány v jednotlivých státech podklady pro zákonná opatření, kterými se přesně definuje rozsah použití v potravinářství. Použití antioxidantu musí být deklarováno na obalu potraviny. Podobné předpisy jako pro potraviny platí i pro kosmetické výrobky, které přicházejí do dlouhodobého styku s pokožkou a sliznicemi [32].

5 POLYFENOLY

Představují více než 6 000 identifikovaných látek, které jsou děleny do různých kategorií podle jejich základní chemické struktury a do různých podtříd [33].

Polyfenoly jsou látky obsahující několik fenolických funkčních skupin na jednotlivých aromatických jádrech molekuly (někdy jen na jádře jediném). Nejběžnější typy rostlinných fenolických látek lze přehledně klasifikovat např. podle počtu uhlíků a jejich vzájemných vazeb (viz. Tab. 3.) [34].

Tab. 3. Nejběžnější typy fenolických látek v rostlinách seřazené podle počtu uhlíků [34].

Složení	Počet uhlíků	Typy fenolických látek	Příklady
C_6	6	jednoduché fenoly, benzochinony	katechol, hydrochinon
$C_6 - C_1$	7	fenolické kyseliny /aldehydy	kyselina salicylová
$C_6 - C_2$	8	acetofenony, benzofurany	isobenzofuranon
$C_6 - C_3$	9	fenylpropanoidy, benzopyrany (kumariny)	chromen
$C_6 - C_4$	10	naftochinony	juglon, plumbagin
$C_6 - C_5$	11	ageratochromeny (prekoceny)	prekocen I, II
$(C_6)_2$	12	dibenzofurany, dibenzochinony, bifenyly	difenyleter, PCB
$C_6 - C_1 - C_6$	13	dibenzopyrany, benzofenony, xantony	difenylmetan, fluoren
$C_6 - C_2 - C_6$	14	stilbeny, antrachinony, fenantreny	resveratrol, emodin
$C_6 - C_3 - C_6$	15	flavonoidy, izoflavony, chalkony, aurony	auronykvercetin, genistein
$C_6 - C_4 - C_6$	16	norlignany, (difenylbutadieny)	hinokiresinol
$C_6 - C_5 - C_6$	17	norlignany (conioidy)	sugiresinol
$(C_6 - C_3)_2$	18	lignany, neolignany	
$(C_6 - C_3 - C_6)_2$	30	biflavonoidy	amentoflavon
$(C_6 - C_3 - C_6)_n$	n	kondenzované taniny (flavonaly)	gallotaniny, ellagitaniny
$(C_6 - C_3)_n$	n	ligniny	
$(C_6)_n$	n	katecholmelaniny	rostlinné pigmenty

V současnosti roste zájem o studium těchto přírodních látek, protože jejich příjem v potravě je dáván do souvislosti se snížením výskytu závažných nemocí, jako je rakovina a kardiovaskulární choroby. Mnohé z těchto látek jsou zastoupeny v běžných potravinách, zejména v ovoci, zelenině a některých nápojích. Celkový denní příjem polyfenolů byl odhadnut na 1 g a je tedy vyšší než příjem antioxidantních vitaminů. V řadě experimentálních studií bylo také prokázáno, že antioxidantní aktivita mnoha rostlinných fenolických látek je vyšší než účinek antioxidantních vitaminů. Jsou rozlišovány čtyři hlavní skupiny:

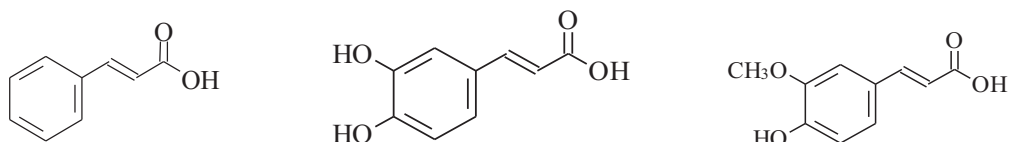
1. Fenolové kyseliny
2. Flavonoidy
3. Stilbeny
4. Lignany

Na celkovém příjmu polyfenolů se flavonoidy podílí asi ze dvou třetin, fenolové kyseliny zhruba jednou třetinou a ostatní polyfenoly (např. lignany a stilbeny) tvoří minoritní podíl [35,36].

Přítomnost polyfenolů v rostlinných potravinách je do značné míry ovlivněna genetickými faktory. Jiné faktory jako je stupeň zralosti odrůdy, zpracování a skladování mají také vliv na obsah fenolických látek. Polyfenoly jsou částečně odpovědné za sensorické a nutriční vlastnosti rostlinných potravin [37].

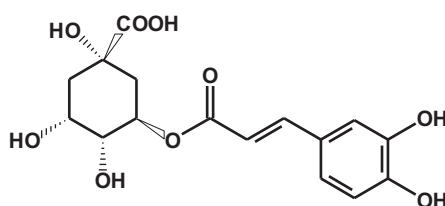
5.1 Fenolové kyseliny

Fenolické kyseliny jsou přítomné v řadě potravin. Podle současných poznatků tvoří přibližně jednu třetinu polyfenolů v potravě. V naší stravě jsou fenolické kyseliny zastoupeny především hydroxyskořicovými kyselinami, převážně ve formě esterů. Nejčastěji je to kyselina ferulová a kyselina kávová [35].



Obr. 1. Kyselina skořicová, kyselina kávová, kyselina ferulová [35].

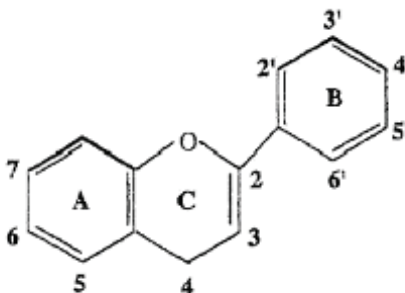
Kyselina ferulová je obvykle asociována s potravinovou vlákninou a je v ní esterovou vazbou vázána k hemicelulose. Jeden z hlavních zdrojů kyseliny ferulové jsou tak např. pšeničné otruby (5 mg/g). Nejběžnějším esterem kávové kyseliny je kyselina chlorogenová (5-caffeoylchinová kyselina), která je přítomná v řadě druhů ovoce a zeleniny a v kávě. Šálek kávy obsahuje 50 - 150 mg kyseliny chlorogenové. Kromě kávy jsou bohatým zdrojem též brambory, jablka, hrušky, meruňky, broskve. Významný obsah chlorogenové kyseliny a jejích derivátů je rovněž v artyčoku, který v některých zemích patří k oblíbené zelenině [35].



Obr. 2. Chlorogenová kyselina [35].

5.2 Flavonoidy

Nejčastěji se vyskytující polyfenoly v naší výživě jsou flavonoidy. Flavonoidy jsou účinnými antioxidanty díky své schopnosti reagovat s volnými radikály mastných kyselin a kyslíku. Odhadovaný příjem flavonoidů ve výživě člověka je v rozmezí několika desítek až stovek gramů za den, v závislosti na výživových zvyklostech. Bylo např. prokázáno, že japonská populace má vyšší příjem flavonoidů, což je přičítáno konzumaci zeleného čaje. Velká část flavonoidů je glykosylována. Navázaný cukr bývá glukosa, rhamnosa, méně často galaktosa, arabinosa, xylosa, glukuronová kyselina a další cukry. Obvykle je navázána jedna cukerná jednotka, ale mohou být i dvě, tři či více [35,36].



Obr. 3. Flavan – základní struktura flavonoidů [38]

Podle stupně oxidace kyslíkového heterocyklu (kruh C) rozeznáváme šest podtříd flavonoidů:

Flavonoly

Flavony

Isoflavony

Flavanony

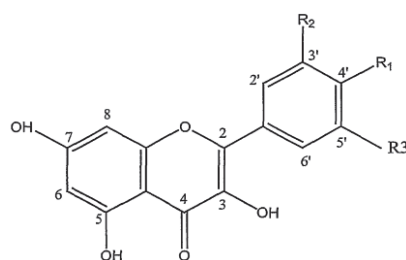
Anthokyanidiny

Flavanoly (katechiny a proanthokyanidiny) [39].

Flavonoly

Hlavním zástupcem početné skupiny flavonoidů jsou flavonoly. Jsou zastoupeny v relativně nízkých koncentracích 15 – 30 mg.kg⁻¹ čerstvé hmotnosti. Nejbohatšími zdroji jsou česnek (až 1,2 g.kg⁻¹ čerstvé hmotnosti), pór, brokolice, borůvky a jablka. Nejznámějšími aglykony jsou kvercetin, kemferol a myricetin [39,40].

Kvercetin se nachází ve vysokých koncentracích v běžně přijímaných potravinách jako cibule, jablka, kapusta, červené víno, zelený a černý čaj. Kemferol se nachází převážně v listové zelenině a ovoci, také v bobulích, bylinách, luštěninách a kořenové zelenině. Myricetin najdeme v bobulích, kukuřici a čaji [35,40].



Obr. 4. Chemická struktura flavonolů - Kemferol: R₁ = OH, R₂=H, R₃=H, Kvercetin: R₁ = OH, R₂=OH, R₃=H, Myricetin: R₁=OH, R₂=OH, R₃=OH [41].

Flavony

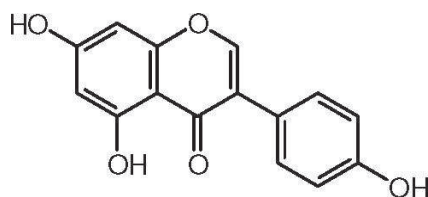
Flavony jsou společně s flavonoly žlutými pigmenty rostlin. Jsou mnohem méně běžné než flavonoly. Hlavními zástupci této skupiny jsou glykosidy apigenin a luteolin, obsažené

hlavně v bylinách (petržel), červených paprikách a celeru. Pokud jsou přítomné ve vyšších koncentracích, přispívají k barvě rostlinných tkání [40].

Isoflavony

Nachází se hlavně v luštěninách, jejich vydatným zdrojem je sója (1 – 3 mg/g) a veškeré produkty z ní. Obsahují tři hlavní sloučeniny: genistein, daidzein a glycitein v poměru 1:1:0,2. Jejich průměrný příjem potravou je v Japonsku vzhledem k vysoké konzumaci sóji 30 – 40 mg za den, zatímco u evropské populace jen 1 – 9 mg za den [35].

V těle jsou podle potřeby měněny na fytoestrogeny, což jsou rostlinné produkty chemickou stavbou velmi podobné v těle vyráběným hormonům. Jejich působení se orientuje na potlačování růstu rakovinných buněk. Pomáhají také snižovat hladinu cholesterolu v krvi a potlačují návaly horka v menopauze [42].



Obr. 5. Genistein [43].

Flavanony

Flavanony jsou také nazývány jako „citrusové“ flavonoidy. Jsou to látky vyskytující se v pomerančích a grapefruitech. K hlavním se řadí naringenin, hesperetin a jejich glykosidy. A protože se tyto látky nalézají nejvíce pod slupkou a v tkáních mezi jednotlivými segmenty, obsah flavanonů je až pětikrát vyšší v celém ovoci než ve sklenici džusu [35,40].

Anthokyanidiny

Anthokyaniny jsou glykosidy různých aglykonů, které se nazývají anthokyanidiny. Anthokyaniny, též nazývané anthokyaniny jsou nejrozšířenější skupinou rostlinných barviv nalézajících se v buněčných vakuolách. Jsou nositeli růžové, červené, modré a nachové barvy. Dosud bylo identifikováno kolem 300 různých anthokyanů. Anthokyaniny se nacházejí především v ovoci, bobulích modrých odrůd révy vinné, v cereáliích a v některých druzích listové a kořenové zeleniny (červené zelí, fazole, lilek baklažán, cibule a ředkvička). Obsah anthokyanů v rostlinných materiálech značně kolísá, a to jak z hlediska

kvantitativního, tak i kvalitativního. To je také příčinou značné barevné různorodosti řady rostlinných tkání. Tato různorodost je ještě zvýšena možnými interakcemi těchto barviv s jinými složkami rostlinné buňky, např. s kovy nebo flavonoidními látkami [30,40].

Flavanoly

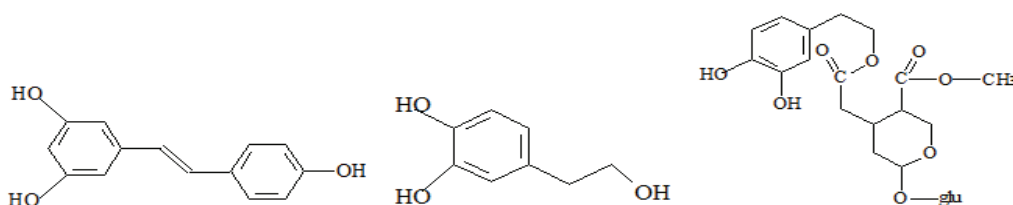
Flavanoly existují jako monomery (katechiny) a polymery (proanthokyanidiny). Katechiny se nalézají v mnoha druzích ovoce, ale jsou také zastoupeny v révovém víně. Zelený čaj a čokoláda však představují zdaleka jejich nejbohatší zdroj. Proanthokyanidiny, také známé jako kondenzované tanniny, jsou dimery, oligomery a polymery katechinů. Kondenzované tanniny jsou díky tvorbě komplexů se slinnými proteiny zodpovědné za svíravou chuť ovoce (vinná réva, broskve, bobule, jablka, hrušky), nápojů (víno, čaj, pivo, jablečný mošt) a za hořkost čokolády. Svíravost se mění i během procesu zrání a s dosažením zralosti mizí [39,40].

5.3 Stilbeny

Nejsou v rostlinné oblasti příliš rozšířeny, avšak jeden z nich v nedávné minulosti vyvolal zvýšenou pozornost vědců. Jedná se o resveratrol, který je obsažen v červeném víně. Jeho účinky jsou nejen antioxidační, ale také antikarcinogenní [35].

Resveratrol je přírodně se vyskytující fytoalexin, produkováný některými rostlinami klasifikovanými jako spermatofyty, jako odpověď na biotický a abiotický stres, např. napadení patogeny, UV záření, expozice ozónem nebo mechanické poškození. Při podrobnějších výzkumech byl nalezen např. v révě vinné, podzemnici olejné, v mnoha léčivých rostlinách a dalších [44,45].

Významný obsah stilbenů byl prokázán také v olivovém oleji. Jsou to např. hydroxytyrosol, oleuropein a jeho aglykon a některé fenolické kyseliny (kávová, vanilová, syringová, protokatechová). Jejich obsah se uvádí až 1 g/kg oleje, závisí však na odrůdě, podmínkách pěstování a způsobu zpracování [35].



Obr. 6. Resveratrol, Hydroxytyrosol, Oleuropein [35].

5.4 Lignany

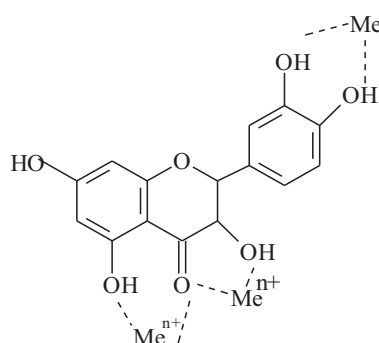
Lignany patří mezi fytoestrogeny, které jsou přítomny v rostlinných potravinách, včetně lněných semen a zrna (kukuřice, oves, pšenice a žito). Mezi lignany patří sekoizolariciresinol, matairesinol, lariciresinol, pinoresinol a syringaresinol. Všechny mají polyfenolickou strukturu a mohou mít antioxidační účinky [46].

Lignany byly nalezeny v 55 druzích cévnatých rostlin. Jejich biologická funkce není zatím dokázána, avšak existují důkazy o tom, že jsou důležité pro chemické interakce mezi rostlinami a houbami, rostlinami navzájem nebo rostlinami a hmyzem. Mají tedy roli v obranném systému hostitelských rostlin a ovlivňují spolužití organismů [47].

5.5 Antioxidační účinky polyfenolů

Antioxidační účinek polyfenolů je komplexní a lze jej přičíst několika mechanismům:

1. Řada flavonoidů i dalších polyfenolů inhibuje enzymy zodpovědné za produkci superoxidového anion-radikálu (např. xantinoxidasu, proteinkinasu C). Inhibují i další enzymy, které se podílejí na tvorbě volných radikálů (cyklooxygenasa, lipoxygenasa, mikrosomální monooxygenasy ad.),
2. Mnohé polyfenoly vytváří chelátové vazby s kovy, především s mědí a dvojmocným železem. Volné ionty těchto kovů se účastní tvorby reaktivních kyslíkových forem např. při Fentonově reakci,



Obr. 7. Vazebná místa pro kovy v molekulách flavonoidů [35].

3. Řada polyfenolů je snadno oxidovatelná. Snadnost oxidace závisí na redoxním potenciálu. Látky s nízkou hodnotou redox potenciálu ($< 0,75$ V) jsou schopny redukovat některé volné radikály s oxidačními účinky např. superoxidový, peroxylový, alkoxylový a hydroxylový. Při reakcích poskytují vodík a samy se

přítom většinou přeměňují na málo reaktivní fenoxylový radikál (F1-O[•]) nebo neradikálové chinoidní struktury. Význam reakce spočívá v tom, že radikály jsou eliminovány dříve, než reagují s dalšími buněčnými komponentami [35].

Je však třeba poznamenat, že za určitých okolností mohou některé fenolické látky působit i jako prooxidanty. Za přítomnosti zvýšeného množství přechodných kovů může aroxylový radikál (F1-O[•]) reagovat i s kyslíkem za vzniku superoxidu a chinonu [35].

6 ANTIOXIDANTY A POLYFENOLY V KÁVĚ

Jako dobrý zdroj antioxidantů je obecně udáváno ovoce a zelenina, ale poslední výzkumy potvrdily, že velmi důležitým zdrojem antioxidantů je právě káva. Antioxidanty jsou spojovány s mnoha vlivy na zdraví člověka zahrnující také ochranu před srdečními chorobami a rakovinou. Proces vstřebávání a utilizace v organismu je stále nejasný, ale stále více studií zabývajících se právě touto problematikou, poukazuje na možný příznivý vliv pití kávy. V naší stravě bylo nalezeno mnoho druhů antioxidantů, nejvýznamnější z nich jsou vitamín C, vitamín E (tokoferoly), vitamín A (karotenoidy), a také flavonoidy a polyfenoly obsažené právě v kávě. Z nedávné studie vyplývá, že káva je velmi důležitým příspěvkem do celkového denního příjmu antioxidantů. Antioxidanty jsou prospěšné našemu zdraví a zlepšují kvalitu našeho života prevencí nebo oddálením příchodu degenerativních chorob a onemocnění. Káva obsahuje víc antioxidantů než kakaové boby, červené víno a dokonce 4 krát víc než zelený čaj [48,49].

Je to čistě přírodní produkt, který je výborným zdrojem antioxidantů, obzvláště jedné jejich skupiny, která se nazývá polyfenoly. Nejbohatším polyfenolem v kávě je kyselina chlorogenová (kombinace kyseliny kávové a chinové), která reprezentuje důležitou část antioxidantů kávy podílejících se na neutralizaci volných radikálů. Ty se do našeho těla dostávají především vzduchem, potravou a tekutinami. Účinky volných radikálů na naše buňky lze přirovnat k procesu hnědnutí ovoce- fáze, kdy začíná proces poškození jednotlivých buněk [50].

Hlavními aromatickými kyselinami kávy jsou právě chlorogenové kyseliny, estery L-chinové kyseliny s převážně (E)-skořicovými kyselinami, kávovou, ferulovou a 4-kumarovou kyselinou. V menším množství se nacházejí v čaji, kakau, jablkách, hruškách, v dalším ovoci, v zelenině a v bramborách. V zelené a pražené kávě se kupříkladu vyskytuje více než 30 esterů skořicových kyselin. Jejich množství v zelených kávových zrnech se pohybuje v rozmezí 4 – 14%. Hlavními skupinami jsou zde kaffeoyl-chinové, dikaffeoyl-chinové, feruloyl-chinové, 4-kumaryl-chinové a kaffeoylferuloyl-chinové kyseliny. Minoritní chlorogenové kyseliny, např. diferuloyl-chinové, di-4-kumaryl-chinové, dimethoxycinnamoyl-chinové a další, představují celkově méně než 1 % veškerých chlorogenových kyselin. 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. Chlorogenové kyseliny se při pražení semen z 30 – 70 % rozkládají [26].

Z výživového hlediska důležité chlorogenové a kávové kyseliny reprezentují 7-10 % sušiny zelené kávy, i když při pražení dochází k významnému úbytku jejich množství. Bylo prokázáno, že obě kyseliny, jak chlorogenová, tak kávová, jsou silnými antioxidanty. Kávové boby jsou tedy jedním z nejbohatších potravních zdrojů kyseliny chlorogenové a pro mnoho spotřebitelů může káva zajišťovat až 70 % celkového množství přísunu antioxidantů [48].

Hromadí se důkazy, že některé polyfenoly, jako je například kyselina chlorogenová, mají biologické účinky v tenkém střevě, které mění formu přijímané glukózy. Bylo prokázáno, že chlorogenová kyselina inhibuje činnost glukózy-6-fosfát, která má klíčovou úlohu v regulaci glukózy v metabolismu. Zvyšuje pozornost a motivaci, pomáhá snížit riziko vzniku depresí a zvyšuje potřebu pohybu [49].

Vlastní obsah antioxidantů v kávě však závisí na druhu a způsobu úpravy kávových zrn [51].

Zelená kávová zrna obsahují kolem 1 000 druhů antioxidantů a jejich následné pražení dokonce účinky antioxidantů ještě zvyšuje, a navíc vytváří další zdraví prospěšné složky typické pouze pro kávu. Tím, že zelená kávová zrna nejsou pražená, drží mnohonásobně více chlorogenové kyseliny než typická pražená káva. Chlorogenová kyselina urychluje metabolismus a změní rozložení tělesného tuku na energii pro svaly [49,52].

Pražením kávy celková antioxidační aktivita kávy roste, k čemuž přispívají tzv. melanoidy, což jsou hnědé polymerní látky, které vznikají tzv. Maillardovými reakcemi právě během pražení zelené kávy. Při pražení kávy se štěpí především kyselina chlorogenová a alkaloid trigonelin. Jejich štěpný produkt n-metylpyridin je považován za antioxidant a je využíván jako chemický indikátor stupně pražení. Z trigonelinu se vytváří mj. kyselina nikotinová, takže káva patří k významným zdrojům tohoto vitamínu [48,53].

Navíc bylo pozorováno, že extrakt pražené kávy má antibakteriální účinky vůči několika mikroorganismům jako je *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus mutans* a několika kmenům enterobakterií, což je pravděpodobně způsobeno antibakteriální aktivitou několika složek kávy jako je kyselina kávová, trigonelin, kofein, kyselina chlorogenová, stejně jako melanoidy, které vznikají při procesu pražení [54,55,56].

Podle odborníků má z běžně dostupných druhů kávy druh odrůda robusta silnější antioxidační potenciál než více konzumovaná arabica. Naproti tomu však arabica vyniká intenzivnější kávovou chutí a aroma. Vzhledem k uvedeným faktorům je tedy z hlediska zdravotních účinků vhodné střídat oba druhy kávy, případně používat k přípravě kávy kávové směsi, které obsahují směsi robusty i arabiky [51].

Kromě čisté kávy odrůdy robusta a arabica se můžeme také setkat s různými složkami, které jsou do kávy přimíchávány. Jedním z takových látek je i houba Reishi. Houba Reishi se už víc jako 4 000 let používá v Číně a Japonsku v tradiční medicíně, protože je všeobecně známo, že zlepšuje fyzickou odolnost a celkový zdravotní stav. Reishi je antioxidant, má protinádorové účinky, chrání játra a má schopnost regulovat hladinu cholesterolu. Je také často používaná pro léčbu špatně fungujících jater. Dobře fungující játra jsou důležitá pro distribuci tuků v lidském těle a pro detoxikaci volných radikálů a choroboplodných zárodků [49].

7 BUNĚČNÁ PROLIFERACE A ŽIVOTASCHOPNOST

Polyfenoly mají mnoho chemických, biochemických či biologických vlastností. Mohou působit nejen protizánětlivě, antioxidačně, ale také antikarcinogenně. Buněčná proliferace je nárůst počtu buněk v důsledku buněčného růstu a následného dělení buněk. Je vyjadřována počtem buněk, které se v kultuře namnoží. Jedním ze způsobů měření tohoto parametru je provedení klonogenních testů. V těchto testech je definovaný počet buněk na příslušné matrici a počet kolonií, které vznikají po období růstu. Obvykle jedním z parametrů pro měření zdraví buněk je životaschopnost. Může být definována jako počet zdravých buněk ve vzorku. Využívá se pro stanovení optimálních podmínek v případě, že nejsou primární buňky izolovány a udržovány v kultuře. Nejjednodušší metodou pro stanovení životaschopnosti buněk je přímé počítání buněk [57,58].

7.1 Buněčné linie

Jedná se o kultury oddělené z původní tkáně. Buňky se oddělí (mechanicky nebo enzymaticky) do suspenze, která pak může být kultivována jako jednovrstevná na pevný podklad nebo jako suspenze na kultivačním médiu. Buněčné kultury mohou být charakterizovány a definovány populací a mohou být zakonzervovány zmrazením. Mohou být konečné (dále poroste pouze pro omezený počet zdvojení) nebo kontinuální, kde se buňky množí na dobu neurčitou za předpokladu, že jsou sériově pasovány do čerstvého média. Pro buněčné linie je třeba, aby nastala „nesmrtelnost“, aby se staly trvalými. To může nastat přirozeně v kultuře (somatickou mutací), virovou transformací nebo vyvolané jinou mutací či hybridizací (spojení hostitelské buňky s „nesmrtelnou“ buněčnou linií). Tyto buněčné linie jsou často velmi užitečné, protože mohou být uloženy v tekutém dusíku a uchovány pro pozdější použití, aniž by bylo nutné získat jiný vzorek tkáně. Buněčné kultury mají velmi mnohostranné využití. Jejich kontinuálním sledováním je možno pozorovat řadu buněčných procesů včetně mitózy, cytokineze apod. Buněčné kultury dnes slouží jako referenční model pro studium toxického působení látek. Dále je možno sledovat působení látek chemických, ale i vnějších faktorů fyzikálních. ATTC je firma, která nabízí více než 3 600 buněčných linií z více než 150 různých druhů, které mají více než 950 rakovinných buněk, 1 000 hybridů a několik speciálních buněk, včetně buněk kmenových (např. HepG2, HaCaT, NIH/3T3). V této diplomové práci při zjišťování životaschopnosti buněk byla použita buněčná linie lidských keratinocytů (HaCaT) [59].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

8 CÍL PRÁCE

V této diplomové práci jsem se zabývala stanovením obsahu celkových polyfenolů, antioxidační aktivity a životaschopnosti buněk u vybraných druhů káv. Tato práce má za cíl po provedení laboratorního měření zhodnotit výsledky a porovnat, zda se obsah liší vůči hodnotám naměřených v jiných pracích.

Cíle práce:

- 1) získání různých vzorků kávy
- 2) popsat metody použité při stanovení obsahu celkových polyfenolů, antioxidační aktivity a životaschopnosti buněk ve vybraných druzích káv
- 3) vyhodnotit zjištěné výsledky a porovnat je s dostupnými studiemi

9 MATERIÁL A METODIKA

9.1 Materiál

Pro analýzu bylo vybráno 17 druhů káv, z toho 6 nepražených, 6 pražených, 1 pražená bio káva, 1 pražená bezkofeinová káva, 1 komerční káva s přísadou houby Reishi, 1 komerční káva s podílem nepražených zelených zrn a 1 namíchaná káva s podílem pražených i nepražených zrn. Vzorky byly získány v brněnské kavárně, jejíž součástí je i vlastní pražírna. Kávy byly namlety prodejcem. Vzorek č. 15 byl namíchán ze získaných vzorků tak, aby se složením co nejvíce podobal vzorku č. 16.

9.2 Příprava vzorků

Všechny druhy kávy byly zpracovány stejným způsobem. Na analytických váhách navážené množství namleté kávy bylo extrahováno horkou vodou, poté bylo přefiltrováno přes filtrační papír. Bylo použito 7 g kávy na 60 ml vody. Takto připravený vzorek byl použit ke stanovení antioxidační aktivity, celkového obsahu polyfenolů a životaschopnosti buněk.

Tab. 4. Přehled vzorků káv

Číslo	Druh kávy
1.	Bio Dominicana Paraiso – pražená
2.	Brasil Santos – pražená
3.	Brasil Facenda – nepražená
4.	Kolumbie – pražená
5.	Kolumbie – nepražená
6.	Kolumbie bezkofeinová – pražená
7.	Kostarika – pražená
8.	Kostarika – nepražená
9.	Guatemala – pražená
10.	Guatemala – nepražená
11.	Nicaragua – pražená
12.	Nicaragua – nepražená
13.	Robusta Indie – pražená
14.	Robusta Indie – nepražená
15.	Směs (Kolumbie – pražená + Robusta – pražená + Kolumbie – nepražená = 1/3+1/3+1/3)
16.	Komerční káva s obsahem nepražených zelených zrn (2/3 pražená zrna + 1/3 nepražená zrna)
17.	Komerční káva s přísávkem houby Reishi

9.3 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

Stanovení antioxidační aktivity v kávových extraktech bylo provedeno metodou DPPH.

Tato metoda spočívá v reakci volného radikálu DPPH (2,2-difenyl-1-pikryl-hydrazyl) s antioxidanty obsaženými ve vzorku. Během reakce dochází ke změně barvy a úbytku absorbance. Absorbance byla měřena při vlnové délce 515 nm.

Nejdříve, stejně jako při stanovování obsahu celkových polyfenolů, byl připraven extrakt vzorku. Byl připraven zásobní roztok z 0,024 g DPPH a 100 ml metanolu. Z tohoto roztoku byl připraven pracovní roztok, který vznikl smícháním 10 ml zásobního roztoku s 45 ml metanolu. Byla proměřena absorbance. Byla vytvořena reakční směs přidáním 450 μ l

zfiltrovaného vzorku s 8,55 ml pracovního roztoku a tato směs byla ponechána hodinu ve tmě. Poté byla proměřena absorbance jednotlivých vzorků. Byla provedena vždy dvě měření vedle sebe.

Kalibrační řada byla vytvořena ze zásobního roztoku kyseliny askorbové o koncentracích 40, 80, 120, 160, 200 mg/l. Absorbance byla opět proměřena při vlnové délce 515 nm. Antioxidační aktivita byla vyjádřena z poklesu absorbance v % podle vztahu:

$$\% = \frac{A_0 - A}{A_0} \cdot 100$$

Výsledky byly vyneseny do grafu a získala se kalibrační křivka. Výsledky jsou pak vyjádřeny jako ekvivalent odpovídající antioxidační kapacitě, kterou by způsobilo množství kyseliny askorbové [60].

9.4 Analýza celkových polyfenolů

Stanovení celkového množství polyfenolů v kávových extraktech bylo provedeno spektrometrickou metodou s Folin-Ciocaltauovým činidlem.

Do 10 ml odměrné baňky bylo vždy napipetováno 0,1 ml vzorku, 0,5 ml Folin-Ciocaltauova činidla, 1,5 ml 20% Na₂CO₃ a obsah byl doplněn destilovanou vodou. Připravený roztok ve zkumavkách byl řádně promíchán. Zároveň byl také připraven slepý pokus (blanc), který obsahoval pouze destilovanou vodu, Folin-Ciocaltauova činidlo a 20% Na₂CO₃. Proti němu byly pak měřeny ostatní vzorky při vlnové délce 765 nm. Měření bylo prováděno dvakrát vedle sebe.

Ze zásobního roztoku kyseliny gallové byla vytvořena kalibrační řada o koncentracích 50, 100, 200, 400, 600, 800 mg/l. Dále bylo přidáno 0,5 ml Folin-Ciocaltauova činidla, 1,5 ml 20% Na₂CO₃. Absorbance byla opět proměřena při vlnové délce 765 nm. Pomocí sestavené kalibrační křivky kyseliny gallové bylo vypočítáno množství celkových polyfenolů ve vzorku [46].

9.5 Stanovení životaschopnosti buněk

Cílem práce bylo zjistit vliv polyfenolů extrahovaných z kávy na životaschopnost buněk. V první fázi bylo nutné polyfenoly z vína extrahovat. Tyto koncentrované roztoky byly přidány k buňkám a nechaly se kultivovat za vhodných podmínek. Následně se proliferace vyhodnotila spektrometrickou metodou MTT.

Životaschopnost buněk byla provedena pomocí buněčné linie - lidské keratinocyty (HaCaT; Human immortalized non-tumorigenic keratinocyte), které poskytla firma Cell Lines Service (Catalog No. 300493). Jako kultivační médium bylo použito Dulbecco's Modified Eagle Medium se zvýšeným obsahem glukózy s přidavkem 10% fetálního hovězího séra a obsahem antibiotik Penicillin/ Streptomycin, 100 U/ml (100 µg/ml; PAA Laboratorie GmbH, Rakousko). Buňky byly kultivovány v 96-ti jamkových testovacích destičkách při výchozí koncentraci 1×10^5 buněk/ml v médiu, v jedné jamce tak bylo 1×10^4 buněk. Buňky byly předkultivovány 24 hodin. Po kultivaci bylo médium vyměněno za médium s extrakty v koncentraci 1:1. Jako kontrola byla použita kultivace buněk bez přidavku extraktů. Pro posouzení životaschopnosti buněk byl po 24 hodinách použit MTT test (Invitrogen Corporation, USA). Tento test je založen na redukci žlutého solubilního 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) na nerozpustný formazan (modré krystaly hvězdicového tvaru). Reakce probíhá na mitochondriální membráně živých buněk. Formazan se rozpustí přidáním silného detergentu a zabarvení se vyhodnocuje spektrometricky. Absorbance byla měřena při vlnové délce 540 nm pomocí Sunrise microplate absorbance reader (Tecan, Švýcarsko). Hodnota absorbance roztoku odpovídá množství živých buněk (čím tmavší barva a tedy vyšší absorbance, tím vyšší procento živých buněk). Kultivace buněk probíhala v inkubátoru s řízenou atmosférou CO₂ při teplotě 37°C a atmosféře 5% CO₂. K mikroskopování byl použit mikroskop s fázovým kontrastem (Olympus, CKX41). Všechny testy byly provedeny čtyřikrát [59].

10 VÝSLEDKY

10.1 Stanovení antioxidační aktivity

Stanovení antioxidační aktivity v kávových extraktech bylo provedeno metodou DPPH. Na přípravu kávového extraktu bylo naváženo na analytických váhách vždy 7 g kávy, zalito 60 ml horké, ne však vařící vody. Vzorky byly proměřeny postupem uvedeným v metodách (viz kapitola 8.3), každý extrakt kávy byl proměřen třikrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Výpočet antioxidační aktivity byl proveden s použitím kalibrační křivky standardu kyseliny askorbové (viz. Příloha PI.).

Rovnice kalibrace: $y = 0,4503x + 5,4779$

Naměřená průměrná absorbance byla dosazena do rovnice a byla vypočtena koncentrace antioxidační aktivity. Hodnoty antioxidační aktivity káv jsou uvedeny v Tab. 5.

Naměřené množství antioxidační aktivity se pohybovalo v rozmezí 89,43 - 349,51 mg/100 ml kávy.

Největší obsah antioxidační aktivity byl naměřen v kávě Guatemala - nepražená s obsahem 349,51 mg/100 ml. Naopak nejnižší množství, téměř čtyřikrát menší, bylo naměřeno v kávě Bio Dominicana Paraiso - pražená s obsahem 89,43 mg/100 ml. Druhá nejvyšší hodnota byla naměřena u kávy Kostarika – nepražená s obsahem 348,22 mg/100 ml. Jen o něco nepatrně menší hodnotu měla káva Kolumbie – nepražená s obsahem 342,77 mg/100 ml a káva Nicaragua – nepražená s obsahem 41,62 mg/100 ml.

Ostatní kávy se mezi sebou jen nepatrně lišily a to v důsledku toho, zda byly pražené nebo nepražené. Jejich obsah se pohyboval v rozmezí 210 – 340 mg/100 ml.

Tab. 5. Průměrný obsah antioxidační aktivity v jednotlivých kávách

Číslo	Druh kávy	Obsah antioxidační aktivity [mg/100 ml]
1.	Bio Dominicana Paraiso – pražená	89,43 ± 6,05
2.	Brasil Santos – pražená	256,03 ± 1,53
3.	Brasil Facenda – nepražená	324,71 ± 0,20
4.	Kolumbie – pražená	259,18 ± 0,73
5.	Kolumbie – nepražená	342,77 ± 0,54
6.	Kolumbie bezkofeinová – pražená	270,94 ± 0,20
7.	Kostarika – pražená	293,88 ± 0,00
8.	Kostarika – nepražená	348,22 ± 0,73
9.	Guatemala – pražená	333,16 ± 0,20
10.	Guatemala – nepražená	349,51 ± 0,20
11.	Nicaragua – pražená	306,21 ± 0,20
12.	Nicaragua – nepražená	341,62 ± 1,27
13.	Robusta Indie – pražená	289,15 ± 0,93
14.	Robusta Indie – nepražená	332,59 ± 0,35
15.	Směs (Kolumbie–pr.+ Robusta Indie–pr. + Kolumbie–nepr. = 1/3+1/3+1/3)	298,75 ± 0,41
16.	Komerční káva s obsahem nepražených zelených zrn (2/3 pražená zrna + 1/3 nepražená zrna)	127,86 ± 0,35
17.	Komerční káva s přídavkem houby Reishi	210,01 ± 0,61

10.2 Obsah celkových polyfenolů

Celkové polyfenoly byly stanoveny spektrometricky. Na přípravu kávového extraktu bylo naváženo na analytických váhách vždy 7 g kávy, zalito 60 ml horké, ne však vařící vody. Vzorky byly proměřeny postupem uvedeným v metodách (viz kapitola 8.4), každý extrakt kávy byl proměřen třikrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Výpočet celkového obsahu polyfenolů byl proveden s použitím kalibrační křivky standardu kyseliny gallové (viz. Příloha PII.).

Rovnice kalibrace: $y = 0,0011x + 0,0124$

Naměřená průměrná absorbance byla dosazena do rovnice a byla vypočtena koncentrace polyfenolů. Hodnoty celkových polyfenolů káv jsou uvedeny v Tab 6.

Hodnoty celkových polyfenolů se pohybovaly v rozmezí 178,06 - 380,29 mg/100 ml kávy.

Největší obsah celkových polyfenolů byl naměřen v komerční kávě s obsahem nepražených zelených zrn 380,29 mg/100 ml. Tato hodnota je mnohem vyšší než u komerční kávy s přídavkem houby Reishi 178,06 mg/100 ml, kde je hodnota skoro poloviční. Druhá nejvyšší hodnota byla naměřena u kávy Kostarika, která byla nepražená s obsahem 367,61 mg/100 ml. O něco menší hodnotu měla káva Nicaragua – nepražená s obsahem 362,29 mg/100 ml, Robusta Indie – pražená s obsahem 357,93 mg/100 ml a Guatemala – pražená s obsahem 340,20 mg/100 ml. Ostatní kávy se mezi sebou jen nepatrně lišily a to v důsledku toho, zda byly pražené nebo nepražené. Jejich obsah se pohyboval kolem 230 – 300 mg/100 ml.

Tab. 6. Průměrný obsah celkových polyfenolů v jednotlivých kávách

Číslo	Druh kávy	Obsah celkových polyfenolů [mg/100ml]
1.	Bio Dominicana Paraiso – pražená	265,20 ± 0,70
2.	Brasil Santos – pražená	235,75 ± 1,02
3.	Brasil Facenda – nepražená	263,57 ± 1,65
4.	Kolumbie – pražená	257,02 ± 1,51
5.	Kolumbie – nepražená	298,75 ± 2,84
6.	Kolumbie bezkofeinová – pražená	245,84 ± 0,70
7.	Kostarika – pražená	258,79 ± 1,86
8.	Kostarika – nepražená	367,61 ± 1,86
9.	Guatemala – pražená	340,20 ± 1,67
10.	Guatemala – nepražená	296,02 ± 3,76
11.	Nicaragua – pražená	271,34 ± 2,37
12.	Nicaragua – nepražená	362,29 ± 1,53
13.	Robusta Indie – pražená	357,93 ± 3,35
14.	Robusta Indie – nepražená	269,97 ± 1,84
15.	Směs (Kolumbie-pr.+ Robusta Indie -pr. + Kolumbie -nepr. = 1/3+1/3+1/3)	275,84 ± 4,35
16.	Komerční káva s obsahem nepražených zelených zrn (2/3 pražená zrna + 1/3 nepražená zrna)	380,29 ± 0,58
17.	Komerční káva s přídavkem houby Reishi	178,06 ± 0,84

10.3 Životoschopnost buněk

V této diplomové práci byl také sledován vliv polyfenolů z vybraných druhů káv na jednom typu buňky. Každý vybraný vzorek se nechal působit na buněčné linii lidských keratinocytů (HaCaT).

Extrakty káv ovlivňují životoschopnost buněk v různé míře, přičemž v porovnání s kontrolním měřením jí nejvíce snižuje vzorek kávy Bio Dominicana Paraiso – pražená a nejnižší vliv má komerční káva s obsahem nepražených zelených zrn. Ostatní vzorky ovlivňují životoschopnost keratinocytů v podobné míře. Z Tab. 7. je patrné, že o něco větší účinek v porovnání pražené a nepražené kávy, má vždy káva pražená.

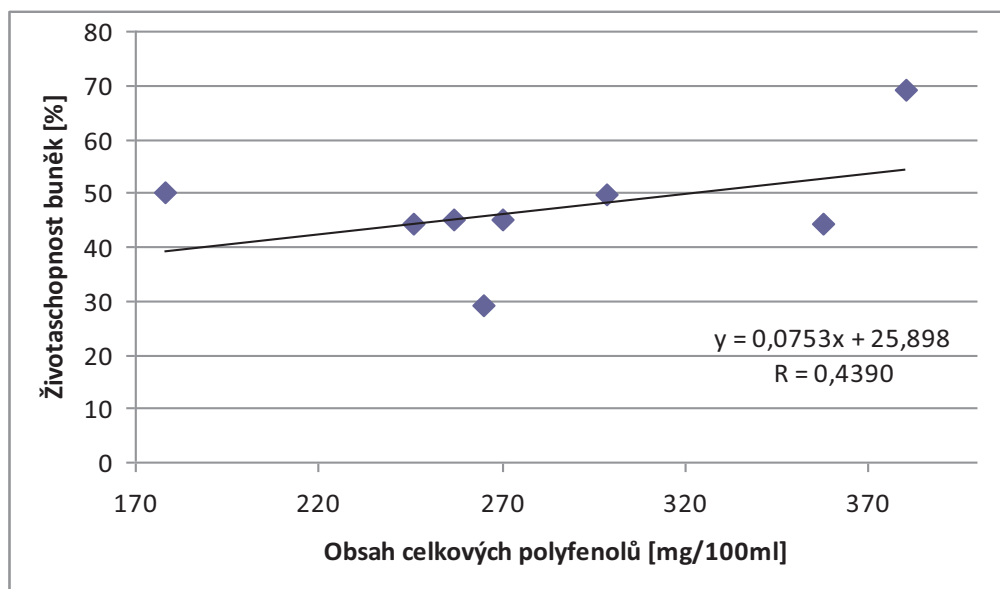
Tab. 7. Přehled obsahu celkových polyfenolů ve vzorcích káv a jejich vliv na životoschopnost buněk

Druh kávy	Obsah celkových polyfenolů [mg/100ml]	Životoschopnost buněk [%]
Bio Dominicana Paraiso – pražená	265,20	29,15
Kolumbie – pražená	257,02	44,89
Kolumbie – nepražená	298,75	49,79
Kolumbie bezkofeinová – pražená	245,84	44,12
Komerční káva s obsahem nepražených zelených zrn (2/3 pražená zrna + 1/3 nepražená zrna)	380,29	69,15
Komerční káva s přidavkem houby Reishi	178,06	50,16
Robusta Indie – pražená	357,93	44,37
Robusta Indie – nepražená	269,97	45,23

Bylo zjištěno, že nejvyšší celkové množství polyfenolů nemusí mít vždy největší účinek na životoschopnost buněk. Přestože měla komerční káva s obsahem nepražených zelených zrn obsah polyfenolických látek nejvyšší, působení extraktů právě z tohoto vzorku ovlivnilo životoschopnost buněk nejméně. Nejvyšší vliv působení extraktů bylo u kávy Bio

Dominicana Paraiso – pražená, u které byl obsah celkových polyfenolů spíše nižší. Druhý nejvyšší účinek působení extraktů bylo u kávy Kolumbie bezkofeinová – pražená, kde obsah celkových polyfenolů byl druhý nejvyšší.

Polyfenoly tedy ovlivňují více nebo méně proliferační účinek. I nižší obsah celkových polyfenolů ve vzorku může mít vysoký účinek na životaschopnost buněk. Toto vyjadřuje i obrázek 8. Vzájemný vztah mezi obsahem celkových polyfenolů a životaschopností buněk je dána nízkou závislostí, kde korelační koeficient je roven 0,4390. Důvodem může být zastoupení jednotlivých dílčích polyfenolů ve směsi, které ale nebyly stanoveny, neboť toto již nebylo cílem diplomové práce.



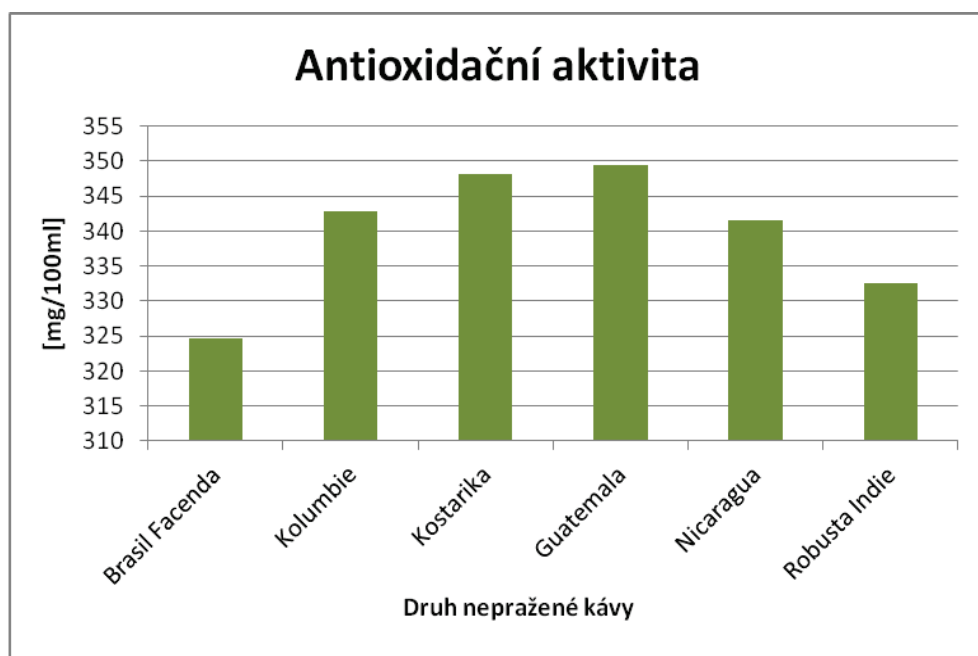
Obr. 8. Korelace celkových polyfenolů a životaschopností buněk

11 DISKUZE

11.1 Diskuze - antioxidační aktivita

Z grafu (viz. Obr. 9.) je zřejmé, že naměřená antioxidační aktivita u nepražených druhů káv je relativně velmi vyrovnaná.

Největší antioxidační aktivita byla naměřena u kávy Guatemala (349,51 mg/100 ml) a nejnižší u kávy Brasil Facenda (324,71 mg/100 ml). Antioxidační aktivita u nepražených druhů káv se mezi sebou výraznou měrou neliší, dosahují velice podobných hodnot.



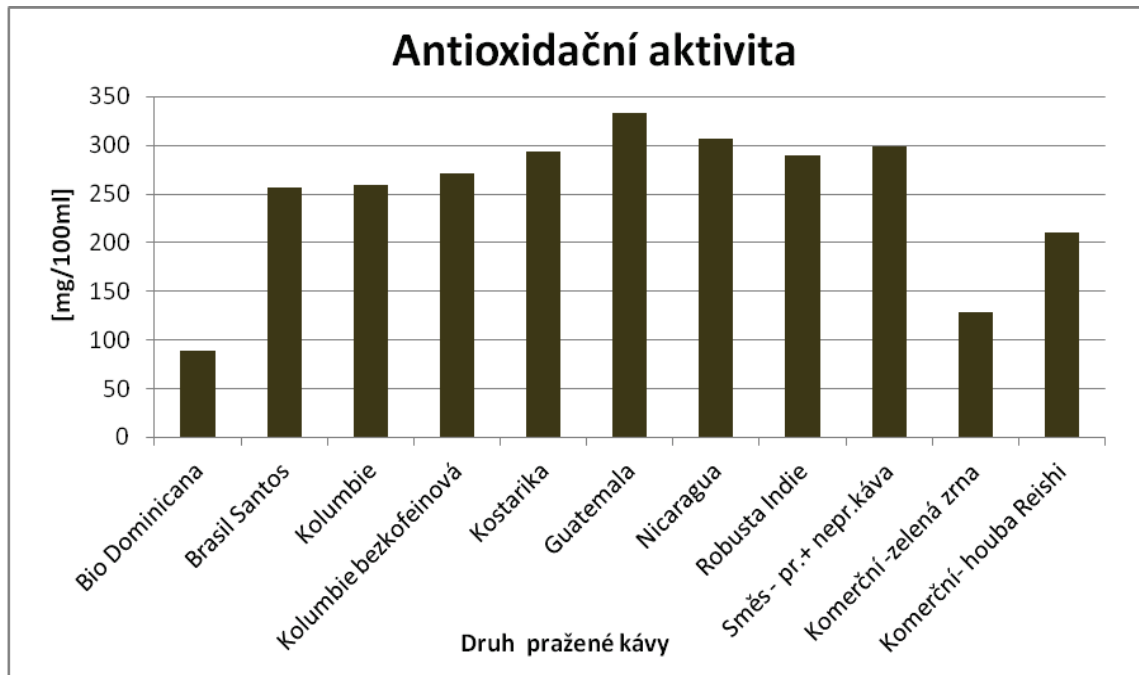
Obr. 9 Antioxidační aktivita u nepražených druhů káv

V grafu (viz Obr. 10.) můžeme sledovat stanovenou antioxidační aktivitu u pražených druhů káv. Hodnoty jsou zde oproti nepražené kávě dosti rozdílné. Dle tohoto zjištění má největší antioxidační aktivitu káva Guatemala (333,16 mg/100 ml). Téměř stejných hodnot dosahuje také káva Nicaragua (306,21 mg/100 ml), směs obsahující praženou i nepraženou zelenou kávu (298,75 mg/100 ml), Kostarika (293,88 mg/100 ml), Robusta Indie (289,15 mg/100 ml). Káva s nejnižší antioxidační aktivitou je Bio Dominicana (89,43 mg/100 ml) a hned za ní následuje komerční káva s obsahem nepražených zelených zrn (127,86 mg/100 ml).

Z literatury, která se zabývala zjišťováním antioxidační aktivity v pražené kávě Arabica a Robusta bylo zjištěno, že káva Robusta má vyšší antioxidační aktivitu než kávová zrna

kávy Arabica. Z mých zjištěných výsledků je zřejmé, že v porovnání s článkem měla vyšší antioxidační aktivitu káva Arabica. [56].

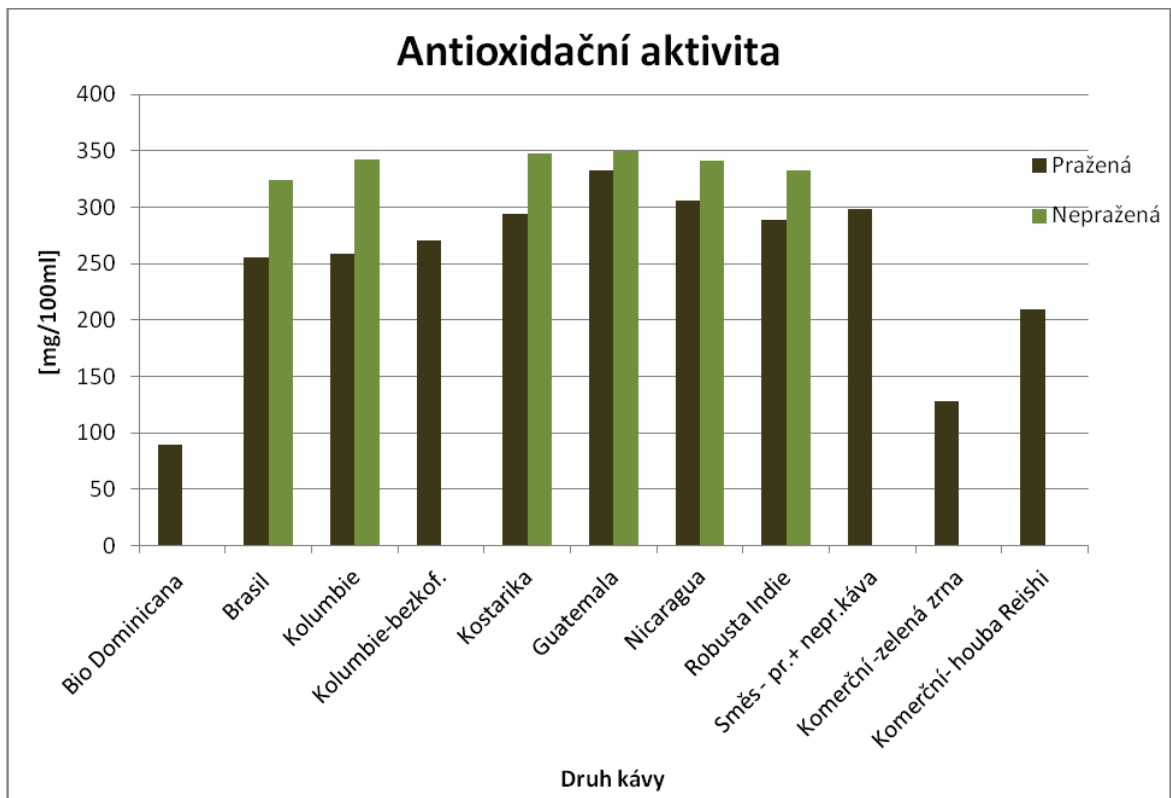
Antioxidační aktivita u pražené kávy Robusta byla stanovena na 289,15 mg/100 ml, ale literatura udává hodnotu nižší, a to 167,9 mg/100 ml [61].



Obr. 10. Antioxidační aktivita u pražených druhů káv

Z grafu (viz. Obr. 11.) vyplývá, že naměřené hodnoty antioxidační aktivity u pražených a nepražených káv jsou také rozdílné. Značný rozdíl je vidět u kávy Brasil a Kolumbie. Patrný je také rozdíl mezi komerční kávou s obsahem nepražených zelených (127,86 mg/100 ml) a mnou namíchanou směsí (298,75 mg/100 ml). Obě kávy zahrnují podíl pražených a nepražených zelených kávových zrn v poměru 2/3 + 1/3. U všech druhů káv byla zjištěna vyšší antioxidační aktivita u nepražených druhů káv.

Ze studie univerzity Mnichov, která spolupracuje s firmou Tchibo vyplývá, že nápoj z pražené kávy má příznivější antioxidační aktivitu než káva z nepražené suroviny [53]. V mé práci je ale zřejmé, že vyšší antioxidační aktivitu vykazuje právě káva nepražená. Jedním ze zkoušených vzorků byla i komerční káva, která právě obsahuje podíl nepražených zelených zrn a výrobce uvádí, že právě tento podíl přispívá k antioxidačnímu působení.

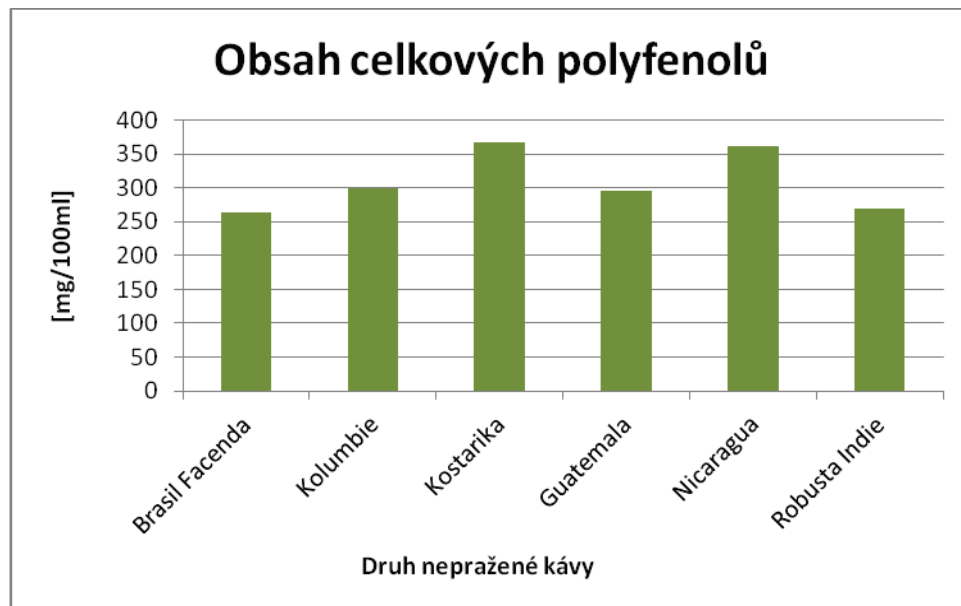


Obr. 11. Antioxidační aktivita u pražených a nepražených druhů káv

11.2 Diskuze - obsah celkových polyfenolů

V grafu (viz. Obr. 12.) můžeme sledovat stanovený obsah celkových polyfenolů u nepražených druhů káv. Hodnoty jsou stejné jako u pražené kávy, tedy relativně vyrovnané.

Nejvyšší obsah celkových polyfenolů byl zjištěn u kávy Kostarika (367,61 mg/100 ml) a u kávy Nicaragua (362,29 mg/100 ml). Ostatní druhy nepražených káv se pohybovaly v rozmezí 263 – 296 mg/100 ml, jejich hodnota se tedy výrazně neměnila.



Obr. 12. Obsah celkových polyfenolů u nepražených druhů káv

Jak je patrné z grafu (viz. Obr. 13.), tak naměřený obsah celkových polyfenolů u pražených druhů káv je relativně vyrovnaný.

Nejvyšší obsah celkových polyfenolů byl naměřen u komerční kávy s obsahem nepražených zelených zrn (380,29 mg/100 ml) a Robusta Indie (357,93 mg/100 ml). Nejnižší obsah se vyskytoval u komerční kávy s přídavkem houby Reishi (178,06 mg/100 ml). Výrobce uvádí, že právě tato káva má antioxidační účinky a může pomoci snižovat vytváření volných radikálů. Zde se ale naskytuje otázka, zdali má tento výrobek opravdu takové vlastnosti, jaké výrobce uvádí. Ostatní kávy se ve stanoveném obsahu celkových polyfenolů od sebe výrazně nelišily.

Obsah polyfenolických látek u bezkofeinové pražené kávy Arabica byl stanoven na 245,84 mg/100 ml, ale literatura udává hodnotu nižší, a to konkrétně 149 mg/100 ml [62].

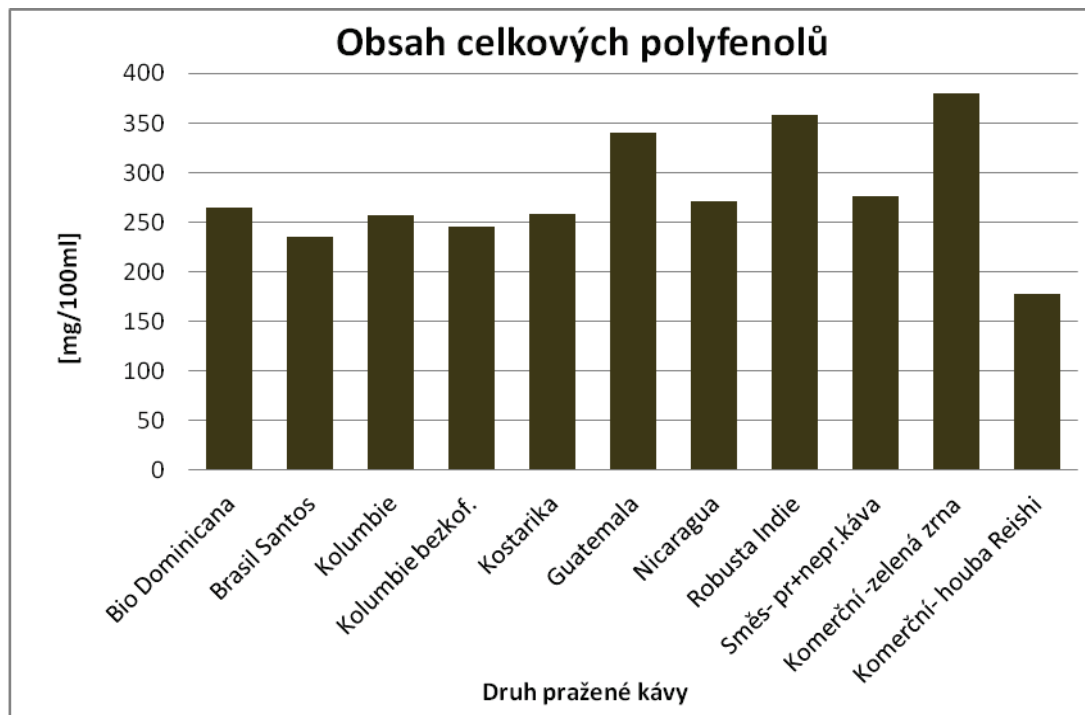
Stejně tak tomu bylo u pražené kávy Robusta, kde byl obsah polyfenolů stanoven na hodnotu 357,93 mg/100 ml, ale článek udává hodnotu 219,10 mg/100 ml, tedy hodnotu nižší [63].

Naopak tomu bylo v jiné literatuře, která udávala obsah celkových polyfenolů v kávě robusta vyšší, a to 423,7 mg/100 ml [64].

Z článků, v nichž byly stanovovány obdobné druhy pražených káv, se obsah celkových polyfenolů pohyboval v rozmezí 149 – 172 mg/100 ml, jiná literatura uvádí rozmezí 140 –

374 mg/100 ml [62,65]. Z mé práce (viz. Obr. 13.) je patrné, že v porovnání s literaturou je obsah podobný a to 148 - 380 mg/100 ml.

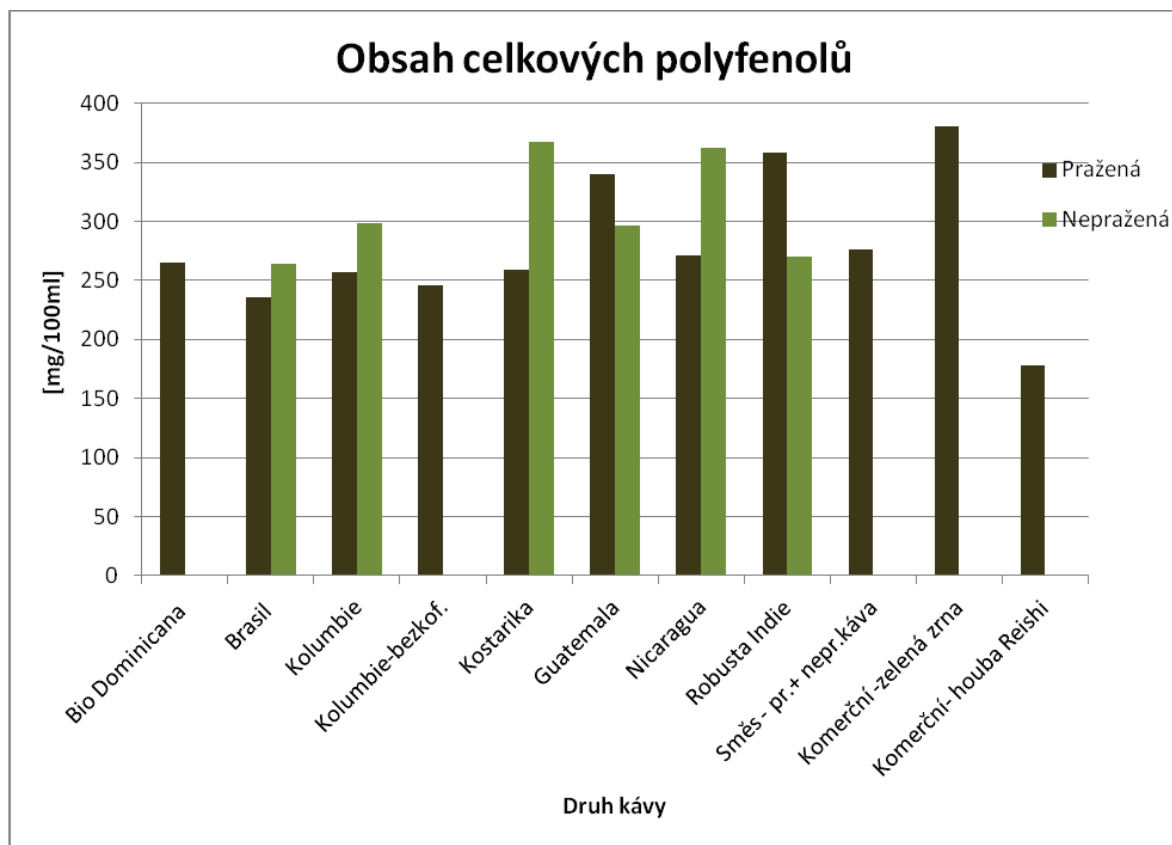
Jiná literatura udává rozmezí obsahu celkových polyfenolů podstatně vyšší v porovnání s mými naměřenými hodnotami, a to 304 – 408 mg/100 ml [66].



Obr. 13. Obsah celkových polyfenolů u pražených druhů káv

Z grafu (viz. Obr. 14.) vyplývá, že naměřené hodnoty celkového obsahu polyfenolů u pražených a nepražených druhů káv se liší.

Největší rozdíl je vidět u kávy Kostarika, Nicaragua a Robusta Indie. Téměř u všech druhů káv bylo zjištěno, že celkový obsah polyfenolů je vyšší u nepražených druhů káv.



Obr. 14. Obsah celkových polyfenolů u pražených a nepražených druhů káv

11.3 Diskuze – životaschopnost buněk

Fenolické sloučeniny a jejich protinádorové účinky jsou studovány již řadu let. Hroznová jádra a slupky, čaj nebo ovoce jsou považovány za bohatý zdroj těchto látek. Každá rostlina má nejen různé koncentrace fenolických sloučenin, ale i jejich složení a obsah je v každé části odlišný. Pozornost vědců z hlediska vlivů na nádorová onemocnění byla většinou zaměřena na fenolické sloučeniny u vína nebo čaje [67].

Součástí této diplomové práce bylo zjistit vliv polyfenolů obsažených v kávě na životaschopnost eukaryotických buněk. Vybrané vzorky se nechaly působit na buněčné linii lidských keratinocytů (HaCaT). K posouzení životaschopnosti buněk byl použit MTT test. Na buněčnou linii HaCaT byl zaznamenán nejvyšší účinek v případě vzorku Bio Dominicana Paraiso – pražená. Při působení vzorku komerční kávy s obsahem nepražených zelených zrn nebyla u této linie zaznamenána vysoká životaschopnost buněk i přesto, že tento vzorek obsahoval největší obsah celkových polyfenolů. Druhý nejvyšší účinek byl u kávy Kolumbie bezkofeinová – pražená, kde byl obsah celkových polyfenolů druhý nejnižší.

Nelze tedy říct, že nejvyšší koncentrace celkových polyfenolů je nejúčinnější, rozhodující zřejmě bude obsah jednotlivých polyfenolických látek ve vzorku, protože z každé odrůdy kávy můžeme získat rozdílné zastoupení dílčích polyfenolů ve směsi. Z výsledků ale vyplývá pozitivní účinek polyfenolů kávy na snižování proliferaci lidských keratinocytů.

ZÁVĚR

Předložená diplomová práce byla zaměřena na analýzu vybraných biologicky aktivních látek u různých druhů káv. V teoretické části byla pozornost věnována historii kávy, významným druhům kávovníku, složení kávového zrna, dále charakterizaci antioxidantů a polyfenolů. V praktické části byla stanovena antioxidační aktivita a obsah celkových polyfenolů. Složení kávových zrn je závislé na mnoha faktorech, převážně na botanickém druhu, původu, na klimatických podmínkách a také se liší v závislosti na různorodosti a rozsahu pražení zrn, proto se naměřené hodnoty lišily. Pro stanovení antioxidační aktivity byla použita metoda DPPH, pro stanovení celkového obsahu polyfenolů byla použita metoda s Folin-Ciocalteuovým činidlem.

Průměrné hodnoty antioxidační aktivity se pohybovaly v rozsahu 89,43 – 349,51 mg/100 ml. Největší obsah antioxidační aktivity byl naměřen v kávě Guatemala a naopak nejnižší množství, skoro čtyřikrát menší, bylo naměřeno v kávě Bio Dominicana Paraiso – pražená. Při porovnání pražené a nepražené kávy bylo zjištěno, že antioxidační aktivita u nepražených druhů káv se mezi sebou výraznou měrou neliší, dosahují velice podobných hodnot, naopak tomu bylo u pražených druhů káv, kde hodnoty byly dosti rozdílné. Dále bylo zjištěno, že vyšší antioxidační aktivitu vykazovala káva Arabica oproti kávě Robusta, a že při porovnání všech druhů káv byla zjištěna vyšší antioxidační aktivita v jejich nepražené formě.

Průměrné hodnoty celkových polyfenolů se pohybovaly v rozsahu 178,06 – 380,29 mg/100 ml. Největší obsah celkových polyfenolů byl naměřen v komerční kávě s obsahem nepražených zelených zrn a nejnižší množství u komerční kávy s přídavkem houby Reishi, kde je hodnota skoro poloviční. Při porovnání pražené a nepražené kávy jsou zjištěné hodnoty relativně vyrovnané.

Součástí diplomové práce bylo také popsat vliv polyfenolů z různých druhů káv na buněčnou linii lidských keratinocytů (HaCaT). Všechny použité vzorky výrazně ovlivňovaly životaschopnost buněk. Nejmenší vliv měla komerční káva s obsahem nepražených zelených zrn i přesto, že tato káva obsahovala největší zastoupení celkových polyfenolů. Největší vliv vykazoval vzorek Bio Dominicana Paraiso - pražená, následně vzorek Kolumbie bezkofeinová – pražená. Oba tyto vzorky vykazovaly nižší obsah celkových polyfenolů. Zvýšení životaschopnosti buněk u vzorků s nižším obsahem celkových polyfenolů může být způsobeno vlivem jednotlivého zastoupení určitého

polyfenolu ve vzorku. Po zpracování výsledků můžeme říct, že testované vzorky kávy jsou dobrými zdroji fenolických sloučenin, a že se jejich koncentrace mění s jednotlivými druhy. Výsledky také prokázaly, že fenolové sloučeniny obsažené v kávě mohou výrazně ovlivnit buněčnou proliferaci.

Řada fenolových látek jsou nositeli žádoucích antioxidačních účinků a patří mezi ochranná opatření biologických systémů. Z tohoto hlediska svými vlastnostmi vzbuzují stále větší zájem a pozornost. Proto je žádoucí provádět stále nové studie. Vzhledem k tomu, že antioxidanty chrání před vznikem rakoviny a káva jich obsahuje čtyřikrát více než např. zelený čaj, může pomoci v prevenci proti některým druhům rakoviny, ale i jiným nemocem.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] *Káva* [online]. [cit.2012-25-11]. Dostupný z [www: http://www.quido.cz/objevy/kava.htm](http://www.quido.cz/objevy/kava.htm).
- [2] *Historie* [online]. [cit.2012-25-11]. Dostupný z [www: http://www.biotox.cz/enpsyro/pj3rcoa.html](http://www.biotox.cz/enpsyro/pj3rcoa.html).
- [3] AUGUSTÍN, J. *Povídání o kávě*. Olomouc: Fontána, 2003. 354 s. ISBN: 80-7336-040-3.
- [4] *Kávovník* [online]. [cit.2012-25-11]. Dostupný z [www: http://www.svetkavy.cz/info_kavovnik.php](http://www.svetkavy.cz/info_kavovnik.php).
- [5] PETŘÍKOVÁ, V. a kol. Káva očima toxikologa. *Vojenské zdravotnické listy*, 2006, 75, s. 120–125.
- [6] *Arabský kávovník* [online]. [cit.2012-30-11]. Dostupný z [www: http://www.institutkavy.cz/vse-o-kave/clanek/:nejoblíbenější-druhy-kavovniku/arabsky-kavovnik-cofee-arabica](http://www.institutkavy.cz/vse-o-kave/clanek/:nejoblíbenější-druhy-kavovniku/arabsky-kavovnik-cofee-arabica).
- [7] *Druhy kávy* [online]. [cit.2012-30-11]. Dostupný z [www: http://www.presentcafe.cz/kava-druhy-kavy/druhy-kavy-arabica-robusta-liberica](http://www.presentcafe.cz/kava-druhy-kavy/druhy-kavy-arabica-robusta-liberica).
- [8] ŠTRUNCOVÁ, S. a kol. Čas na kávu. *D test*, 1999, 6, s. 20–23.
- [9] ŽÁČEK, Z. *Zajímavě o kávě, čaji a kakau*. 2. upr. dopl. vyd. Praha: Vydavatelství obchodu, 1962. 249 s.
- [10] O kofeinu [online]. [cit.2012-5-12]. Dostupný z [www: http://www.svetkavy.cz/info_o_kofeinu.php](http://www.svetkavy.cz/info_o_kofeinu.php).
- [11] *Co ještě nevíte o kávě* [online]. [cit.2012-5-12]. Dostupný z [www: http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1000538&docType=ART&nid=11327](http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1000538&docType=ART&nid=11327).
- [12] ŠTRUNCOVÁ, S. a kol. Čas na kávu IV. *D test*, 2000, 7, s. 24–25.
- [13] *Pražení kávy* [online]. [cit.2012-5-12]. Dostupný z [www: http://www.excelso.cz/prazeni.htm](http://www.excelso.cz/prazeni.htm).
- [14] TIMSON, J. Caffeine. Mutation Research. *Reviews in Genetic Toxicology*, 1977, 47, s. 1–52.
- [15] ŠTRUNCOVÁ, S. a kol. Čas na kávu V. *D test*, 2000, 7, s. 20–23.

- [16] MAGKOS, F. Caffeine use in sports, pharmacokinetics in man, and cellular mechanisms of action. *Food Science and Nutrition*, 2005, 45, s. 535–562.
- [17] BRODERICK, P. et al. Caffeine and psychiatric medication interactions: a review. *The Journal of the Oklahoma State Medical Association*, 2005, 98, s. 380–384.
- [18] MARCZINSKI, C. Dissociative antagonistic effects of caffeine on alcohol-induced impairment of behavioral control. *Psychopharmacology*, 2003, 11, s. 228–236.
- [19] LODER, E. Fixed drug combinations for the acute treatment of migraine: Place in therapy. *CNS Drugs*, 2005, 19, s. 769–784.
- [20] FIDLER, M. a kol. Analýza antioxidantů v chmelu a pivu. *Chemické listy*, 2009, 103, s. 232 – 235.
- [21] YOUNGSON, R. *Antioxidanty-cesta ke zdraví*. 1. vyd. Praha: Jota, 1995. 143 s. ISBN: 80-85617-56-0.
- [22] PAULOVÁ, H. a kol. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy*, 2004, 98, s. 174 – 179.
- [23] *Volné radikály a antioxidanty* [online]. [cit.2012-17-12]. Dostupný z www: <http://www.celostnimediceina.cz/volne-radikaly-a-antioxidanty-mudr-vaclav-holecek-csc.htm>.
- [24] *Antioxidanty* [online]. [cit.2012-17-12]. Dostupný z www: <http://www.institutkavy.cz/kava-a-zdravi/clanek/:antioxidanty/antioxidanty-pokracovani>.
- [25] ŠTÍPEK, S. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. Praha: Grada, 2000. 314 s. ISBN 80-7169-704-4.
- [26] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin II*. Tábor: OSSIS, 2009. 623 s. ISBN: 978-80-86659-16-9.
- [27] *Trendy použití přírodních antioxidantů pro stabilizaci tuků a olejů proti oxidačnímu žluknutí* [online]. [cit.2012-17-12]. Dostupný z www: www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/I/L_31.doc.
- [28] LACHMAN, J. a kol. Červeně a modře zbarvené brambory významný zdroj antioxidantů v lidské výživě. *Chemické listy*, 2005, 99, s. 474 – 482.
- [29] JORDÁN, V. a kol. *Antioxidanty zázračné zbraně*. Brno: Jota, 2001. 153 s.

- [30] DAVÍDEK, J. a kol. *Chemie potravin*. Praha: SNTL Alfa, 1983. 632 s.
- [31] *E320-Butylhydroxyanisol (BHA)* [online]. [cit.2013-05-01]. Dostupný z [www: http://www.emulgatory.cz/seznam-ecek?prisada=E320](http://www.emulgatory.cz/seznam-ecek?prisada=E320).
- [32] POSPÍŠIL, J. *Antioxidanty*. Praha: Academia, 1968. 274 s.
- [33] RAWEL, H. a kol. Nutritional contribution of coffee, cacao and tea phenolics to human health. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 2007, 2, s. 399 - 406.
- [34] HARMATHA, J. Strukturní bohatství a biologický význam ligninů a jim příbuzných rostlinných fenylpropanoidů. *Chemické listy*, 2005, 99, s. 622 – 632.
- [35] *Přírodní polyfenolové antioxidanty* [online]. [cit.2013-05-01]. Dostupný z [www: www.med.muni.cz/biochem/seminare/prirantiox.rtf](http://www.med.muni.cz/biochem/seminare/prirantiox.rtf).
- [36] KOLOUCHOVÁ, I. a kol. Obsah resveratrolu v zelenině a ovoci. *Chemické listy*, 2005, 99. s. 492 – 495.
- [37] LUGASI, A. a kol. Antioxidant properties of commercial alcoholic and nonalcoholic beverages. *Nahrung/Food*, 2003, 47, s. 79 - 86.
- [38] *Substanzname: Flavonoide* [online]. [cit.2013-05-01]. Dostupný z [www: http://www.bcsi-team.de/content/substanzen/flavan_grund.png](http://www.bcsi-team.de/content/substanzen/flavan_grund.png)
- [39] MANACH, C. a kol. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Society for Clinical Nutrition*, 2004, 79. s. 727-747.
- [40] MANDELOVÁ, L. Antimutagenní aktivita obsahových látek v zelenině a ovoci, Disertační práce. Brno: MU, 2006
- [41] *Use of plants with increased levels of flavonol glycosides in reducing hypertension* [online]. [cit.2013-05-01]. Dostupný z [www: http://www.google.com/patents/EP1648250A1?cl=en](http://www.google.com/patents/EP1648250A1?cl=en)
- [42] MINDELL, E. Nová vitamínová bible. Praha, IKAR, 2010. 576 s. ISBN 978-80-249-1419-0.
- [43] *Genistein* [online]. [cit.2013-10-01]. Dostupný z [www: http://content.answcdn.com/main/content/img/oxford/oxfordBiochemistry/0198529171.genistein.1.jpg](http://content.answcdn.com/main/content/img/oxford/oxfordBiochemistry/0198529171.genistein.1.jpg)
- [44] Oleszek, W. a kol. Resveratrol and other phenolics from the bark of *Yucca schidigera* roezl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, s. 747-752.

- [45] SLANINA, J. a kol. Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chemické listy*, 2004, 98. s. 239–245.
- [46] MRÁZOVÁ, E. *Stanovení fenolických látek a antioxidační aktivity u cereálií*. Zlín, 2011. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati, technologická fakulta.
- [47] ELEFANTOVÁ, P. *Stanovení polyfenolických látek v rostlinách*. Brno, 2010. Bakalářská práce. Masarykova univerzita.
- [48] *Něco málo o kávě* [online]. [cit.2013-10-02]. Dostupný z [www: http://www.caffitaly.cz/aktualne/18-nco-malo-o-kav.html](http://www.caffitaly.cz/aktualne/18-nco-malo-o-kav.html).
- [49] *Zelená káva* [online]. [cit.2013-10-02]. Dostupný z [www: http://www.zelenakava.sk/zelena_kava.html](http://www.zelenakava.sk/zelena_kava.html).
- [50] *Víte, že káva prospívá zdraví* [online]. [cit.2013-10-02]. Dostupný z [www: http://www.plusprovas.cz/clanky/zdravi/vite-ze-kava-prospiva-zdravi](http://www.plusprovas.cz/clanky/zdravi/vite-ze-kava-prospiva-zdravi).
- [51] *Káva obsahuje více antioxidantů než zelený čaj* [online]. [cit.2013-10-02]. Dostupný z [www: http://www.institutkavy.cz/pro-lekare/clanek/:kava-obsahuje-vice-antioxidantu-nez-zeleny-caj/kap-1](http://www.institutkavy.cz/pro-lekare/clanek/:kava-obsahuje-vice-antioxidantu-nez-zeleny-caj/kap-1).
- [52] *Šálek kávy denně pro zdraví* [online]. [cit.2013-10-02]. Dostupný z [www: http://www.oxalis.cz/salek-kavy-denne-pro-zdravi/cz/t-206/](http://www.oxalis.cz/salek-kavy-denne-pro-zdravi/cz/t-206/).
- [53] *Zdravotní aspekty stupně pražení kávy* [online]. [cit.2013-10-02]. Dostupný z [www: http://www.agronavigator.cz/default.asp?ch=13&typ=1&val=118110&ids=150](http://www.agronavigator.cz/default.asp?ch=13&typ=1&val=118110&ids=150).
- [54] DAGLIA, M. et al. Antiadhesive effect of green and roasted coffee on *Streptococcus mutans*' adhesive properties on saliva-coated hydroxyapatite beads. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50, s. 1225-1229.
- [55] DAGLIA, M. et al. Isolation, identification, and quantification of roasted coffee antibacterial compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55, s. 10208-10213.
- [56] ESQUIVEL, P. et al. Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*, 2012, 83, s. 488-495.
- [57] DARZYNKIEWICZ, Z. et al. Assay of cell viability discrimination of cells dying by apoptosis. *Methods Cell Biology*. 1994, 41, s. 15-38.

- [58] GERDES, J. et al. Cell cycle analysis of a cell proliferation: associated human unclear antigen defined by the monoclonal antipody. *J Immunol*, 1984, 133, s. 1710-1715.
- [59] NEORALOVÁ, L. Vliv polyfenolů obsažených v jedlých květech na eukaryotické buňky, Diplomová práce, UTB Zlín, 2012, Vedoucí práce: Ing. Petr Humpolíček, Ph.D
- [60] BRAND-WILLIAMS, W. et al. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science Technology*, 1995, 28, s. 25–30.
- [61] VIGNOLI, J.A. et al. Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee. The influence of processing conditions and raw material. *Food Chemistry*, 2011, 124, s. 863 – 868.
- [62] BUTT, M. et al. Evaluating the effect of decaffeination on nutritional and antioxidant status of different coffee brands. *Internet Journal of Food Safety*, 2011, 13, s. 198-207.
- [63] MRÁZKOVÁ, G. Obsah polyfenolických látek v kávě. Brno, 2011. Diplomová práce. Mendelova univerzita. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Jindřiška Kučerová, Ph.D.
- [64] HECIMOVIC, I. et al. Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. *Food Chemistry*, 2011, 129, s. 991-1000.
- [65] SANCHEZ-GONZALEZ, I. et al. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (italian, espresso and filter). *Food Chemistry*, 2005, 90, 133–139.
- [66] RAMALAKSHMI, K. et al. Antioxidant potential of low-grade coffee beans. *Food Research International*, 2008, 41, s. 96–103.
- [67] KUČEKOVÁ, Z. et al. Phenolic Compounds from *Allium schoenoprasum*, *Tragopogon pratensis* and *Rumex acetosa* and Their Antiproliferative Effects. *Molecules*, 2011, 16, s. 9207-9217.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

O ₂	superoxid
OH [•]	hydroxylový radikál
NDGA	kyselina nordihydroguajaretová
BHA	butylhydroxyanisol
BHT	butylhydroxytoluen
TBHQ	2-terc-butylhydrochinon
Fl-O [•]	fenoxylový radikál
HaCaT	lidské keratinocyty
DPPH	2,2-difenyl-1-pikryl-hydrazyl

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Kyselina skořicová, kyselina kávová, kyselina ferulová [35].....	29
Obr. 2. Chlorogenová kyselina [35].....	30
Obr. 3. Flavan – základní struktura flavonoidů [38].....	30
Obr. 4. Chemická struktura flavonolů - Kemferol: R1 = OH, R2=H, R3=H, Kvercetin: R1 = OH, R2=OH, R3=H, Myricetin: R1=OH, R2=OH, R3=OH [41].....	31
Obr. 5. Genistein [43].....	32
Obr. 6. Resveratrol, Hydroxytyrosol, Oleuropein [35].....	33
Obr. 7. Vazebná místa pro kovy v molekulách flavonoidů [35].....	34
Obr. 8. Korelace celkových polyfenolů a životaschopností buněk.....	51
Obr. 9. Antioxidační aktivita u nepražených druhů kávy.....	52
Obr. 10. Antioxidační aktivita u pražených druhů kávy.....	53
Obr. 11. Antioxidační aktivita u pražených a nepražených druhů kávy.....	54
Obr. 12. Obsah celkových polyfenolů u nepražených druhů kávy.....	55
Obr. 13. Obsah celkových polyfenolů u pražených druhů kávy.....	56
Obr. 14. Obsah celkových polyfenolů u pražených a nepražených druhů kávy.....	57

SEZNAM TABULEK

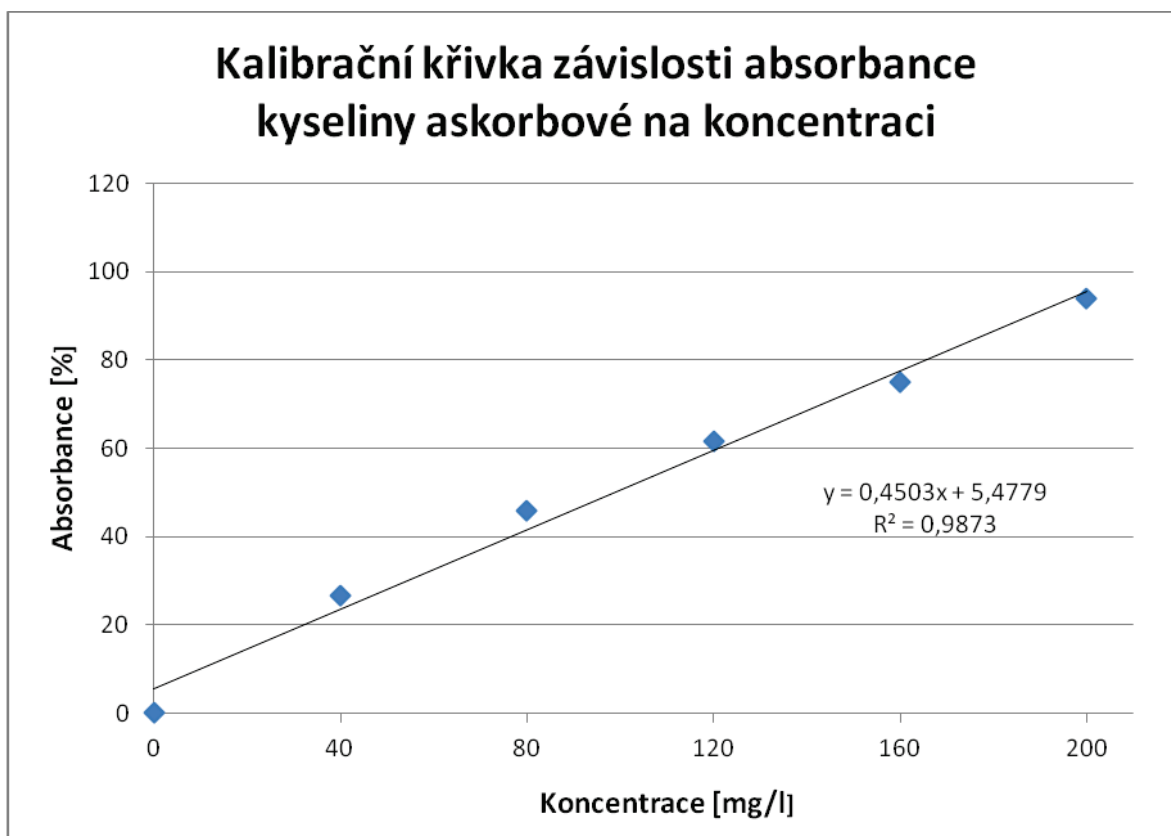
Tab. 1. Obsahové látky v zelené a pražené kávě [13].....	18
Tab. 2. Množství kofeinu v oblíbených surovinách [15].....	19
Tab. 3. Nejběžnější typy fenolických látek v rostlinách seřazené podle počtu uhlíků[34]..	28
Tab. 4. Přehled vzorků káv.....	43
Tab. 5. Průměrný obsah antioxidační aktivity v jednotlivých kávách.....	47
Tab. 6. Průměrný obsah celkových polyfenolů v jednotlivých kávách.....	49
Tab. 7. Přehled obsahu celkových polyfenolů ve vzorkách káv a jejich vliv na životaschopnost buněk.....	50

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Kalibrační křivka závislosti absorbance kyseliny askorbové na koncentraci

Příloha P II: Kalibrační křivka závislosti absorbance kyseliny gallové na koncentraci

Příloha P I: Kalibrační křivka závislosti absorbance kyseliny askorbové na koncentraci



Příloha P II: Kalibrační křivka závislosti absorpance kyseliny gallové na koncentraci

