

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2020

Jonáš Fibigr

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Možnosti stanovení celkového obsahu fenolických látek v čokoládách  
Bakalářská práce

2020

Jonáš Fibigr

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Jonáš Fibigr**  
Osobní číslo: **C18385**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**  
Téma práce: **Možnosti stanovení celkového obsahu fenolických látek v čokoládách**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Zásady pro vypracování

Na základě vámi získaných informací z literatury vypracujte rešerši, která bude především věnována laboratorní přípravě amperometrických biosenzorů obsahujících enzymy ze skupiny polyfenoloxidáz. Detailně popište katalytické vlastnosti jednotlivých enzymů a pokud možno vše ilustруйте odpovídajícími schémata. V neposlední řadě by měla práce obsahovat stručný přehled polyfenolických látek vyskytujících se v čokoládách a mimo jiné i přehled analytických metod zabývajících se jejich stanovením.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Tomáš Mikysek, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2019**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2020**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 21. 7. 2020

Jonáš Fibigr

## **PODĚKOVÁNÍ**

Rád bych poděkoval vedoucímu mé práce Ing. Tomáši Mikyskovi Ph.D. a konzultantovi Ing. Milanu Sýsovi Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce, trpělivost a ochotu při konzultacích. Dále bych chtěl poděkovat mé rodině, která mě celou dobu při tvorbě práce podporovala.

## **ANOTACE**

Práce se zabývá studiem stanovení polyfenolických látek. Pozornost je věnována především přípravě amperometrických biosenzorů využívajících polyfenoloxidázových enzymů ke stanovení obsahu polyfenolických látek v čokoládě. Práce také obsahuje výčet používaných enzymů sloužících ke konstrukci biosenzorů. Také zaměřuje na obsah fenolických látek v různých fázích výrobního procesu čokolády a hlavně na jejich biologickou aktivitu.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

analýza, polyfenolické látky, biosenzory, čokoláda

## **TITLE**

Possibilities for determination of total phenolic content in chocolates

## **ANNOTATION**

The thesis is about study of polyphenolic compounds. It mainly focuses on preparation of amperometric biosensors using polyphenoloxidase enzymes for determination of polyphenolic compounds in chocolate. The thesis also contains summary of enzymes used for construction of biosensors. It also considers the phenolic content in different phases of the chocolate production and mainly portraits their bioactivity.

## **KEYWORDS**

analysis, polyphenolic compounds, biosensors, chocolate

# OBSAH

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK.....	10
ÚVOD .....	12
1 Polyfenoloxidázové biosenzory na bázi pastových elektrod.....	13
1.1 Polyfenoloxidázové enzymy .....	13
1.1.1 Tyrozináza (EC 1.14.18.1) .....	14
1.1.2 Lakáza (EC 1.10.3.2).....	16
1.1.3 Katecholáza (EC 1.10.3.1) .....	17
1.2 Polyfenoloxidázami modifikované pastové elektrody .....	17
1.2.1 Tkáněmi modifikované elektrody .....	18
1.2.2 Enzymy modifikované elektrody .....	20
1.3 Amperometrické polyfenoloxidázové biosenzory .....	21
1.3.1 Amperometrie ve vsádkovém uspořádání .....	22
1.3.2 Průtoková injekční analýza .....	22
1.3.3 Sekvenční injekční analýza .....	23
2 Polyfenolické látky v čokoládách.....	25
2.1 Klasifikace polyfenolických látek v čokoládách.....	25
2.1.1 Rozpustné fenolické látky .....	25
2.1.1.1 Fenolové kyseliny .....	25
2.1.1.2 Flavonoidy.....	26
2.1.1.3 Stilbeny.....	27
2.2.1 Nerozpustné polyfenolické látky.....	27
2.2.1.1 Oligomerní proanthokyanidiny .....	28
2.2.1.2 Třisloviny .....	29
3 Biologická aktivita fenolických látek.....	31
3.1 Volné radikály .....	31
3.2 Akční mechanismus fenolických látek .....	32
3.2.1 Zdravotní účinky antioxidantů .....	33
3.3 Měření aktivity antioxidantů .....	35
4 Výroba čokolády .....	36
4.1 Kakaový prášek .....	37



4.2 Kakaové máslo .....	37
4.3 Kakaové slupky .....	37
4.4 Polyfenolické látky obsažené v různých částech procesu výroby čokolády .....	38
4.5 Ostatní sloučeniny v čokoládě.....	39
5 Příprava čokolády k analýze.....	41
5.1 Extrakce polyfenolických látek.....	41
ZÁVĚR.....	44
REFERENCE .....	45

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AV	<i>p</i> -anisidinové číslo
BIA	amperometrie ve vsádkovém uspořádání
CAT	kataláza
CD	číslo konjugovaných dienů
CNTs	uhlíkové nanotrubičky
COX	katecholáza (katechol oxidáza)
CPE	uhlíková pastová elektroda
DPPH	metoda stanovení aktivity radikálů založena na 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FIA	průtoková injekční analýza
FRAP	parametr železa redukující schopnosti plazmy
GSHPx	glutathion peroxidáza
HAT	metody přesunů atomu vodíku
HPLC	vysoceúčinná kapalinová chromatografie
iNOS	Indukovatelná NO-syntáza
LAC	lakáza
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyfenylalanin
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (protonovaný)
NOS	NO-syntáza
ORAC	parametr absorpční kapacity kyslíkových radikálů
pH	záporně vzatý logaritmus aktivity vodíkových iontů
PPO	polyfenoloxidázy
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
PV	peroxidové číslo

RNS	reaktivní dusíkové radikály
ROS	reaktivní kyslíkové radikály
SET	metody přesunu jednoho atomu vodíku
SIA	sekvenční injekční analýza
SOD	superoxid dismutázu
TBARS	číslo reaktivních substancí kyseliny thiobarbiturové
TEAC	troloxový ekvivalent antioxidační kapacity
TPC	celkový obsah fenolických látek
TRAP	celkový antioxidační parametr záchytu radikálů
TYR	tyrozináza

## ÚVOD

Tato práce pojednává o určení celkového obsahu fenolických látek v čokoládách a využití různých analytických technik k jejich přesnému stanovení. Před úvodní částí se nachází seznam zkratk základních látek, enzymů a parametrů, jenž jsou zde použity a slouží čtenáři k lepší orientaci v textu.

Začátek práce je věnován přípravě polyfenoloxidázových biosenzorů. Obsahuje výčet enzymů, jejich základní charakteristiku a především zaměření na jejich biologickou aktivitu. Kapitola pokračuje rozdělením různých modifikací uhlíkových pastových elektrod, kterých je využíváno jako detekčního média. Následně jsou zde rozebrány nejčastěji používané metody měření za pomoci amperometrických biosenzorů využívajících polyfenoloxidázových enzymů k detekci analytu.

Výzkum navazuje standardní diferenciací fenolických látek vyskytujících se v čokoládách. Důraz je kladen hlavně na rozdělení těchto sloučenin dle jejich rozpustnosti ve vodném prostředí a s tím související volbou vhodné metody stanovení.

Další část souvisí s měřením antioxidační kapacity a fyziologickými schopnostmi antioxidantů likvidovat volné radikály vznikající při biochemických procesech v lidském těle. Tyto látky jsou významné v posílení obranyschopnosti těla proti různým onemocněním spojených s oxidativním stresem.

Závěrem by neměl být opomenut hlavní předmět výzkumu, čímž je v tomto případě čokoláda. Můžeme se zde seznámit s procesem výroby počínaje kakaovými boby a finálními produkty jejich zpracování, a také s výskytem konkrétních látek během tohoto procesu. Neméně důležitou součástí je i příprava čokolády k samotné analýze pomocí extrakčních metod uvedených na konci této práce.

## 1 Polyfenoloxidázové biosenzory na bázi pastových elektrod

Tato kapitola zahrnuje výčet enzymů ze skupiny polyfenoloxidáz, jejich základní charakteristiku a možnosti využití jejich katalytických vlastností při přípravě analytických zařízení. Převážná část teoretické práce popisuje přípravu a vlastnosti amperometrických biosenzorů, které byly laboratorně připraveny vhodnou modifikací pastových uhlíkových elektrod (CPE). Celá práce je zaměřena na možnosti použití těchto elektrochemických senzorů v analýze čokolád a výrobcích z ní připravených. Diskuze zahrnuje výběr vhodného enzymu, pracovního elektrolytu, extrakci fenolických látek z čokolád atd.

### 1.1 Polyfenoloxidázové enzymy

Enzymatické zhnědnutí ovoce a zeleniny je příčinou mechanických a fyzikálních vlivů, které jsou doménou posklizňového procesu a skladování. Tato reakce je z většiny uskutečněna pomocí skupiny polyfenoloxidáz (PPO, EC 1.10.3.1), což je intracelulární *o*-difenol oxidáza hojně přítomna ve vyšších rostlinách a houbách. Tato měď obsahující oxidoreduktáza katalyzuje oxidaci polyfenolických substrátů na chinony, které následně polymerují v hnědé pigmenty neenzymatickou reakcí. Výsledkem toho je nejen výrazná změna zabarvení a degradace antioxidantů, ale také organoleptické a nutriční ztráty kvůli konjugaci chinonů s jinými sloučeninami, jako jsou aminokyseliny, proteiny, fenoly a sacharidy. Úroveň zhnědnutí je spojena s mnoha fyzikálně-chemickými parametry jako jsou substrátová specifita, pH, teplota okolního prostředí atd.

Většina živých systémů využívá proti zhnědnutí fyzikální a chemické metody inhibice polyfenoloxidázové aktivity. Tepelné technologie jsou nejvíce využívané fyzikální konzervačními systémy při zpracování šťáv, pyré, nektaru, konzervovaných ovocí a zelenin. Konvenční zahřívání mikrovlnami nebo ošetření ohmickým ohřevem se ukázaly jako efektivní při kontrole polyfenoloxidázové aktivity. Její tepelná inaktivace je z hlavní části ovlivněna teplotou a časem. Některé studie, ale uvádí negativní dopad tepelné úpravy na organoleptické a nutriční hodnoty.

Chemické metody kontroly enzymatického zhnědnutí v posklizňovém procesu zahrnují dva různé postupy. V prvním procesu se ovoce a zelenina namáčí do vodných roztoků se syntetickými aditivami. Zadruhé dojde k přidání látek proti zhnědnutí ve formě jedlého povlaku. Tradiční potravinové konzervanty, které jsou použity jako inhibitory polyfenoloxidáz mohou být rozděleny do čtyř skupin podle cílové látky a mechanismu akce. První skupina jsou redukční činidla, která nepřímo inhibují PPO a zapříčiňující redukci *o*-chinonů na bezbarvé

difenoly, mezi tyto látky patří například sloučeniny s obsahem síry nebo cysteinu. Druhou skupinou jsou okyselující prostředky, které jsou nespecifickými enzymovými inaktivátory působícími mechanismem snížení pH pod optimální hodnotu pH pro enzym, příkladem je například kyselina citrónová. Třetí skupinou jsou komplexní činidla jako cyklodextriny, jejichž hydrofobní jádro jim umožňuje vytvářet komplexy s mnoha molekulami, jako jsou například fenolické substráty. Čtvrtou skupinou jsou chelatační činidla, která inaktivují polyfenoloxidázy tím, že zachytí jejich měďnatý iont v aktivním místě enzymu, příkladem je (EDTA) a kyselina šťavelová. Umělá aditiva mohou být smíchána dohromady nebo použita ve spojení s tepelnou úpravou pro synergistické působení v inhibici PPO aktivity.

Bohužel toto spojení ústí v některé nežádoucí efekty jako je nízká stabilita vůči kyslíku a vodě, redukce obsahu bioaktivních složek, nežádoucí změna organoleptických a nutričních vlastností celkové potraviny. V souvislosti s tím byla sulfátová a antioxidační aditiva zakázána v potravinách a nápojích kvůli vedlejším efektům jako dermatitida, kopřivka, hypotenze, bolest na hrudi, průjem, život ohrožující anafylaktické a astmatické reakce. Nový výzkum proti fenoloxidázovým systémům je zaměřen na jemnější alternativy konvenčních úprav, které by mohly zvýšit nutriční vlastnosti potravin a zlepšit míru dopadu na zdraví konzumenta.

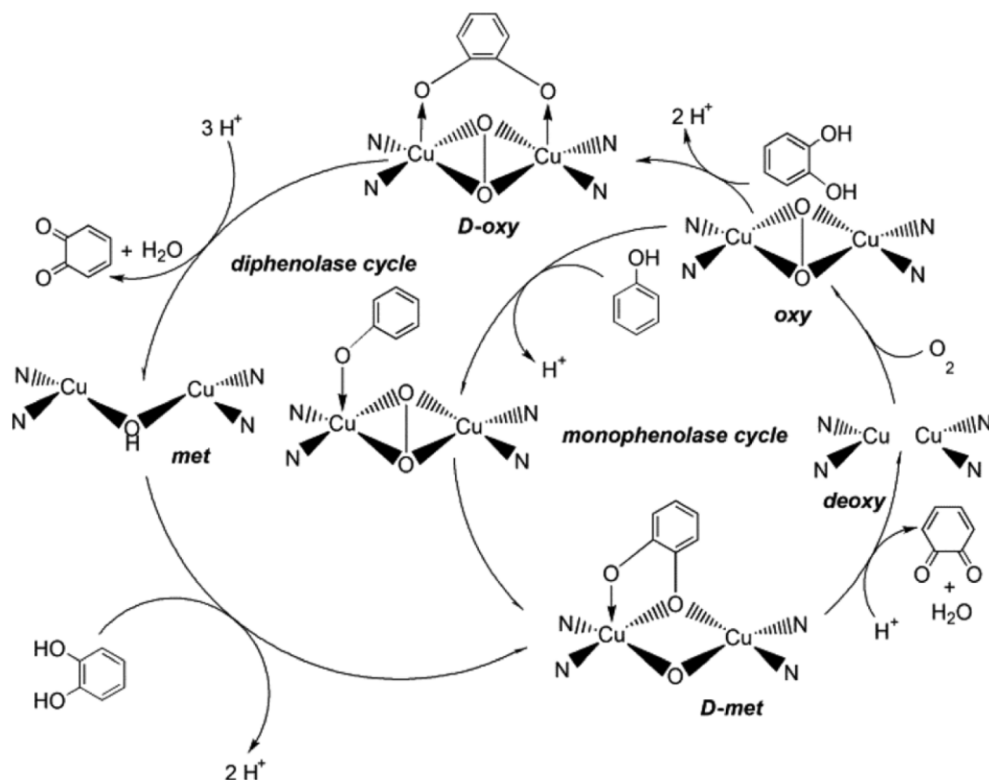
PPO enzymy lze charakterizovat jako skupinu metaloproteinů obsahující ve svém aktivním centru atomy mědi koordinovaných atomy dusíků z přítomných aminokyselin, nejčastěji histidiny. Typickou vlastností všech těchto enzymů představuje jejich rozpustnost ve vodě, aktivita ve vodném prostředí (některé i v ryze nevodném), oxidační katalýza fenolických látek na chinoidní sloučeniny v přítomnosti vzdušného kyslíku za vzniku vody. Ve volné přírodě jsou tyto enzymy součástí mnoha organismů, jmenovitě bakterií, hub, rostlin, vyšších živočichů, či člověka. Mezi tyto enzymy především řadíme tyrozinázu (EC 1.14.18.1), lakázu (EC 1.10.3.2) a katecholázu (EC 1.10.3.1) [1]. Základní charakterizace a rozdíly mezi těmito enzymy jsou popsány v následujících odstavcích.

### **1.1.1 Tyrozináza (EC 1.14.18.1)**

Tyrozináza (TYR) je oxidázovým enzymem s molekulovou hmotností 119,5 kDa, skládající se ze dvou dvojic subjednotek (tetramer). Aktivní centrum enzymu tvoří dva atomy mědi, které jsou vázány k šesti (v některých případech i sedmi) histidinovým reziduíům a jednomu cysteinovému reziduu [2]. Optimální katalytické aktivity dosahuje při pH = 6 – 7. Z tohoto důvodu se většina měření provádí ve fosfátovém pufru za laboratorních podmínek.

Aktivita u komerčně dostupné tyrozinázy izolované z houby *Agaricus bisporus* se pohybuje kolem 1000 U mg<sup>-1</sup> pevné látky. Doporučuje se skladovat v suchu při teplotě -20°C [3].

TYR má v přírodě dvě základní úlohy, a to *ortho*-hydroxylaci monofenolů na difenoly pomocí kreolázové aktivity a následnou oxidaci difenolů na příslušné chinony katecholázovou aktivitou, a s tím související redukcí molekulárního kyslíku na vodu (Obrázek 1). To je důvod, proč také disponuje širokým spektrem substrátů pro různé fenolické látky. Zde jsou uvedeny jen některé, jmenovitě L-tyrozin, L-DOPA, katechol, kyselina kávová, tyramin, fenol, *p*-aminofenol, kresol, *p*-kresol, dopamin, 4-hydroxyanisol, L-isoproterenol, 4-ethoxyfenol, 4-butyلكatechol, pyrogallol, atd. Vzhledem ke své využitelnosti a velkému počtu možných substrátů je možné tyrozinázu využít v mnoha různých oborech. Například je studována pro biologické čištění kontaminace fenolickými látkami, dále také k sestavení biosenzorů, které by se daly využít při nemocničních diagnózách a zároveň pro detekci aromatických látek v jídle. Jednou ze zajímavých aplikací je třeba využití enzymu ve zdravotnictví, kde je využíván k produkci L-3,4-dihydroxyfenylalaninu (L-DOPA), což je běžný lék na Parkinsonovu chorobu [4].



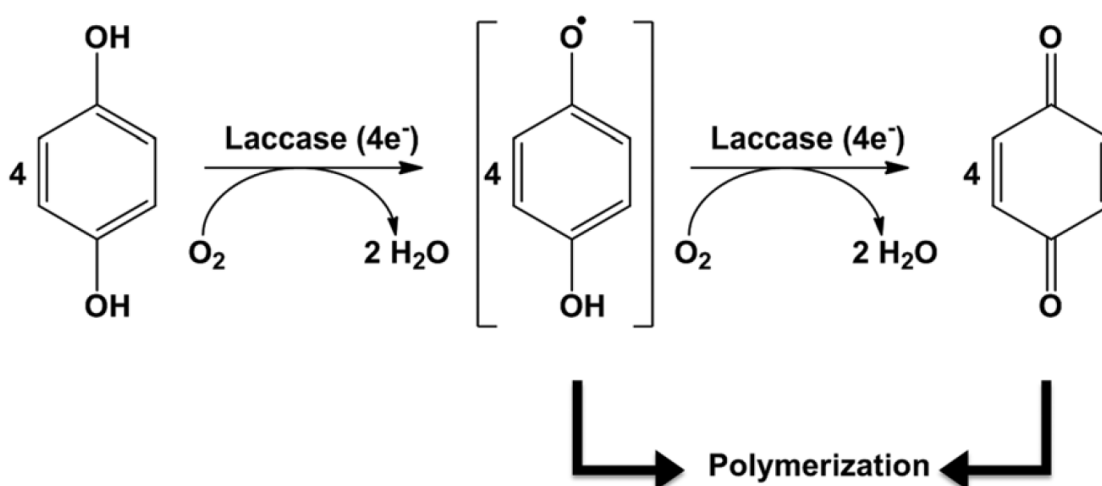
**Obrázek 1.** Katalytická aktivita tyrozinázy [5].

### 1.1.2 Lakáza (EC 1.10.3.2)

Jak už bylo výše zmíněno, i lakáza (LAC) představuje měď obsahující enzym, který patří do skupiny oxidáz. Tento enzym katalyzuje jednoelektronové oxidační procesy různých fenolických látek, a dokonce i aromatických aminů souvisejících s redukcí kyslíku. Pro ilustraci je mechanismus katalytické oxidace hydrochinonu uveden na Obrázku 2. Nejčastěji se nachází v různých typech hub, ale je přítomen také ve vyšších rostlinách, a bakteriích. Ve srovnání s TYR obsahuje LAC čtyři atomy mědi a přitom jsou velikostně srovnatelné [6].

Podobně jako TYR, tak i LAC katalyzuje oxidaci *ortho*-difenolů. Nicméně, *para*-substituované difenoly lze považovat za výhodnější substráty. LAC vykazuje svoji optimální aktivitu v lehce kyselém prostředí, kdy se acetátový pufr (pH = 4,5) považuje za vhodné pracovní prostředí. Vzhledem k relativně nízké aktivitě ( $\geq 0,5 \text{ U mg}^{-1}$ ), biosenzory obsahující LAC mají delší životnost, nežli v případě TYR [7].

Mimo jeho analytické aplikace jako biorekognizačního prvku a součástí bioelektrických článků, hraje LAC významnou roli v papírenském, potravinářském a farmaceutickém průmyslu. V současné době začínají být LAC biosenzory stále více významné v odvětvích jako je třeba analýza potravin a monitorování životního prostředí. Díky jejich vlastnostem jako jsou rychlá odezva, nízká cena, nízká spotřeba reakčních činidel, ale hlavně kvůli možnosti jejich využití jsou ideální v těchto průmyslových oblastech [6]. Za zmínku stojí uvést, že LAC biosenzor byl již vyvinut a použit při stanovení tatrazinu v čokoládě [8].



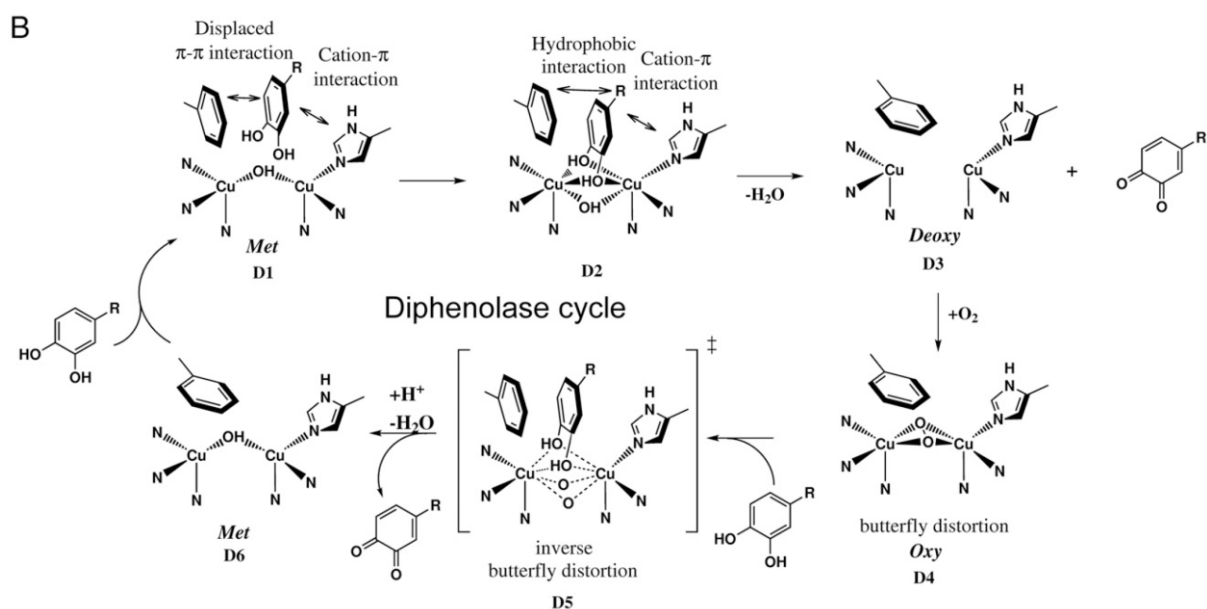
Obrázek 2. Reakční mechanismus lakázy [9].



### 1.1.3 Katecholáza (EC 1.10.3.1)

Tento enzym známý také jako katechol oxidáza (COX) má rovněž aktivní místo typu 3 a katalyzuje oxidační reakci katecholů na *o*-chinony (Obrázek 3) ve vyšších rostlinách. Od TYR se liší tím, že nedisponuje kreolázovou aktivitou. COX obsahuje obdobně jako TYR pouze dva atomy mědi, které jsou koordinovány třemi histidinovými atomy dusíku, jež zaujímají skoro tvar trigonální pyramidy.

Z literatury se lze dozvědět, že existují dvě základní cesty oxidace katecholu. V té první dochází ke generaci molekul *o*-chinonu a vody. Existuje mnoho enzymových modelů, které sledují tuto cestu reakce. Mnoho měďnatých enzymů ale tuto cestu neupřednostňuje a mimo to oxidují 3,5-diterc-butylkatechol alternativní cestou za vzniku peroxidu vodíku [10].



Obrázek 3. Reakční mechanismus katechol oxidázy [11].

## 1.2 Polyfenoloxidázami modifikované pastové elektrody

Z hlediska jednoduché laboratorní přípravy uhlíkových pastových elektrod (CPEs) a jejich následné modifikací (přimíchání) pomocí pletiv rostlin (části plodů) obsahujících PPO nebo čistým enzymem lze tyto jednoduché katalytické biosenzory považovat za vhodné analytické zařízení pro monitorování celkového obsahu fenolických látek v potravinách. Jelikož vzorky čokolády s vysokým obsahem kakaava obsahují vysoké množství těchto látek, nebylo cílem této práce popisovat strukturně složitější biosenzory (kovalentně imobilizované enzymy), které nachází své uplatnění spíše v klinické analýze.

V posledních dekádách je velký zájem o elektrochemické biosenzory pro jejich využití v mnoha polích výzkumu. Enzymové elektrody jsou zařízení využívající vysoké specifity v biokatalytických procesech a výhod elektrochemického transduktoru. CPEs jsou účinně využívány již 60 let a dokazují, že jsou velmi užitečným nástrojem k přípravě různých biosenzorů. Tento materiál vykazuje výhody, jako jsou nízký proud pozadí a široké potenciálové okno. Za zmínku stojí uvést i velmi nízké náklady na výrobu, kdy postačí grafitový prášek a vhodné pojivo, nejčastěji parafinový či silikonový olej.

Modifikace CPE katalytickými oxidy přechodných kovů a uhlíkovými nanočásticemi (CNTs) si získalo nemalou pozornost. Některé kovy jako jsou například rhodium, zlato či iridium se ukázaly být výbornými katalyzátory oxidace a redukce peroxidu vodíku, umožňující rychlou a vysoce selektivní kvantifikaci biologicky aktivních látek. Oxidy ruthenia byly také využity k přípravě bioelektrody pro fenoly a katecholy, založené na katalytickém efektu kovu redukovat chinon, vzniklý enzymatickou činností PPO. Při volbě iridia jako katalytického centra získáváme jisté výhody oproti využití například paladia nebo platiny. Iridium umožňuje pracovat za podmínek výborné selektivity i v přítomnosti vysokého nadbytku lehce oxidovatelných sloučenin jako jsou kyselina askorbová a kyselina močová, jež jsou běžnou součástí biologických vzorků [12].

### **1.2.1 Tkáněmi modifikované elektrody**

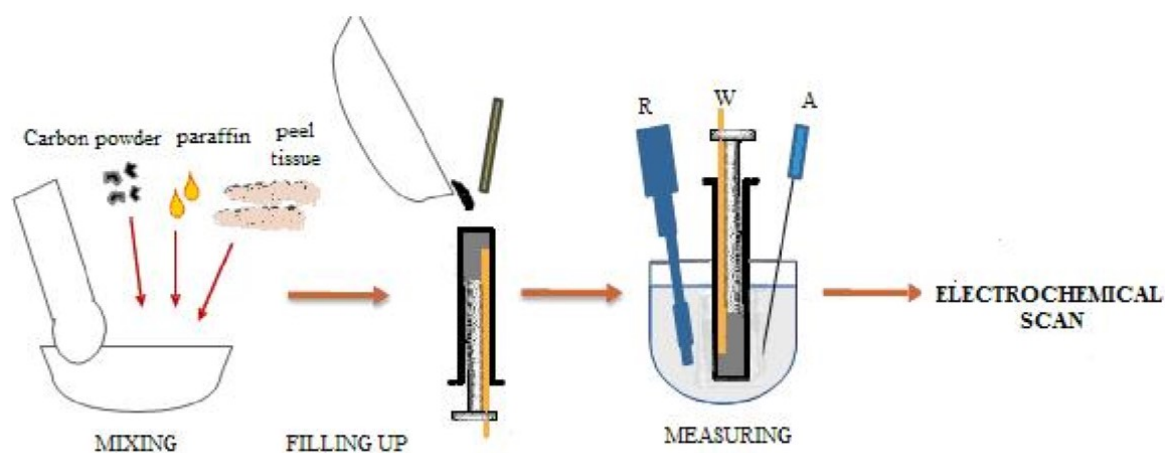
Tkáněmi modifikované biosenzory jsou analytická zařízení, která využívají živé buňky jako rozpoznávacího média spolu s fyziologicko-chemickým převodníkem (transduktorem) k detekci mnoha látek. Tyto senzory prošly v posledních desetiletích k modernizaci a jsou hojně využívány pro testování škodlivých látek v potravinách, polutantů životního prostředí a farmaceutických přípravků. Při výrobě těchto biosenzorů mohou být použity buňky vyšších živočichů, celé mikroorganismy (bakterie a kvasinky), části rostlin, atd. Díky všeobecnému zastoupení v přírodě, rychlému růstu, snadné kultivaci, nízkých nákladech, snadné genetické manipulaci a jejich schopnosti metabolizovat širokou škálu chemických látek bývají bakterie a kvasinky velmi oblíbené. Bylo zaznamenáno několik vědeckých prací, které využívaly právě přítomnost mikroorganismů pro stanovení antioxidantů. Lyzáty buněk bohaté na celou řadu enzymů nacházejí rovněž své využití v přípravě biosenzorů.

Některé tyto biosenzory mohou sloužit i ke studiu vlivu antioxidantů (polyfenolických látek) na přítomné buňky. Nejrůznější imobilizační technologie, využívající nanomateriály

s dobrou biologickou kompatibilitou, hrají klíčovou roli v zachování základní buněčné morfologie, tudíž vylepšují stabilitu a senzitivitu konečného biosenzoru.

Bylo dokázáno, že změny v intracelulárním oxidativním stresu mohou být vyhodnoceny nepřímo v závislosti na stanovení produkce volných kyslíkových radikálů. Antioxidativní kapacita analytu může být stanovena stimulací buňky produkující peroxid vodíku, který lze elektrochemicky detekovat. Výsledkem je nárůst oxidačního proudu odpovídající množství generovaného peroxidu vodíku [13].

Jako příklad poslouží modifikovaná CPE, která obsahovala 7 % (w/w) nerafinované banánové tkáň, 72 % (w/w) grafitového prášku a 21 % (w/w) parafinu. Homogenizace se prováděla postupným smícháním všech těchto komponent v třecí porcelánové misce po dobu 30 minut. Nejdříve byl grafitový prášek smísen s parafínem, a poté byla přidána banánová tkáň. Tato směs byla dále rozemleta v hmoždíři až do vzniku uniformní pasty (Obrázek 4). Modifikovaná pasta byla uchována v lednici při teplotě 4°C po dobu 24 hodin. Před vlastním měřením byla pasta vměstnána do dutiny teflonového elektrodového držáku, jenž byl opatřen kovovým trnem umožňující elektrický kontakt [14].



**Obrázek 4.** Různé kroky procesu analýzy při použití CPE [15]

Kromě části banánu byly využity pro přípravu amperometrických PPO biosenzorů části ovoce (*Persea americana* [16]) a (*Pyrus communis* [17]), zeleniny (*Ipomoea batatas* [18] a *Dioscorea bulbifera* [19]), hub (*Agaricus bisporus* [20]), a celé bakterie (*Streptomyces glaucescens* [21]). Výhodou těchto typů biosenzorů je rychlá příprava bez větších finančních nákladů. Co se týče citlivosti, je nutné podotknout, že se pohybuje řádově v desítkách mikromolů na litr, což v případě analýzy čokolád s vysokým obsahem kakaá nemuselo být

překážkou. Z literatury se lze dozvědět, že jako standardní látky pro stanovení celkového obsahu fenolických látek (TPC) se používají jednoduché sloučeniny jako hydrochinon, katechol, kyselina kávová, kyselina gallová atd.

### 1.2.2 Enzymy modifikované elektrody

V současné době bylo izolováno a charakterizováno více než 2000 různých enzymů. Izolování genetické sekvence vytváří prostor pro charakterizaci všech enzymů daného organismu na genomové úrovni. Nejmenší známý organismus, *Mycoplasma genitalium* obsahují přibližně 470 genů z nichž 145 jsou geny spojené s replikací a transkripcí. Kvasinky obsahují přibližně 7000 genů kódujících asi 3000 enzymů. Jsou známy tisíce různých variant přírodních enzymů. Počet 3-dimenzionálních enzymových struktur se rapidně zvyšuje, například v roce 2000 jich byla známa struktura pouze 1300 různých proteinů. Byl zaveden list založený na numerické notaci enzymů s číslem EC, který vytvořila komise pro enzymy Mezinárodní unie biochemie a molekulární biologie v roce 1961 [22].

Zvýše uvedených skutečností vyplývá, že existuje několik typu TYR či LAC v závislosti na organismu, ze kterého byl daný enzym izolován. Tyto enzymy mají téměř totožnou katalytickou funkci. Nicméně jejich aktivita může být zcela odlišná, např. v závislosti na teplotě prostředí. TYR izolovaná z houby *Agaricus bisporus* vykazuje svoji biologickou aktivitu v širokém teplotním rozsahu od 30 do 60°C (s optimem při 35°C). Na rozdíl TYR izolována z houby *Trichoderma reesei* má maximální katalytickou aktivitu při 30°C. Za zmínku stojí uvést TYR z houby *Lentinula boryana* mající optimální katalýzu při 40°C [23-26].

Enzymy modifikované CPEs se laboratorně připravují zcela stejně jako ty v předchozím případě, kdy je zapotřebí mnohem menší obsah biologicky aktivní látky. Většinou se uvádí množství modifikátoru do 5 % (w/w). Důvodem je mnohem vyšší katalytická aktivita čistých enzymů, nežli těch obsažených v tkáních. Oproti tkáněmi modifikovanými CPEs, tyto biosenzory poskytují o řád nižší detekční limity, a tudíž i menší spotřeba vzorku je pro ně typická. Obecně platí, že enzymy obsažené uvnitř tkáně nebo i ty čisté enzymy bývají uvnitř uhlíkové pasty chráněny před okolními vlivy, zejména přítomností oxidačních činidel, proto nedochází k degradaci enzymů (proteinů), což má za následek relativně dlouhou životnost.

Za hlavní nedostatky těchto typů biosenzorů je možné považovat velkou spotřebu enzymu, kdy jen ta část na povrchu (a navíc správně orientovaná) se podílí na katalytické oxidaci polyfenolických látek. Pokud si uvědomíme, že všechny PPO jsou ve vodě rozpustné

proteiny, je zřejmé, že bude docházet k vyplavování molekul enzymu do pracovního roztoku. Aby byla zaručena reprodukovatelnost naměřených analytických dat, je zapotřebí mít dokonale homogenně rozptýlen enzym v uhlíkové pastě, kdy po každém otření pracovního povrchu, bude zaručen stejný obsah enzymu na povrchu elektrody [22].

### 1.3 Amperometrické polyfenoloxidázové biosenzory

Většinou rozlišujeme tři typy elektrochemických převodníků, jmenovitě potenciometrický, amperometrický a konduktometrický. Potenciometrické PPO biosenzory fungují principiálně na měření pH pracovního roztoku. V tomto případě lze použít komerční pH měrnou elektrodu pokrytou tenkou membránou obsahující PPO enzymy, neboť katalytická oxidace polyfenolů probíhá za účasti protonů. Z tohoto důvodu lze potenciometrické převodníky považovat za univerzální. Nicméně je nutné podotknout, že citlivost takto připravených biosenzorů není nijak uspokojivá.

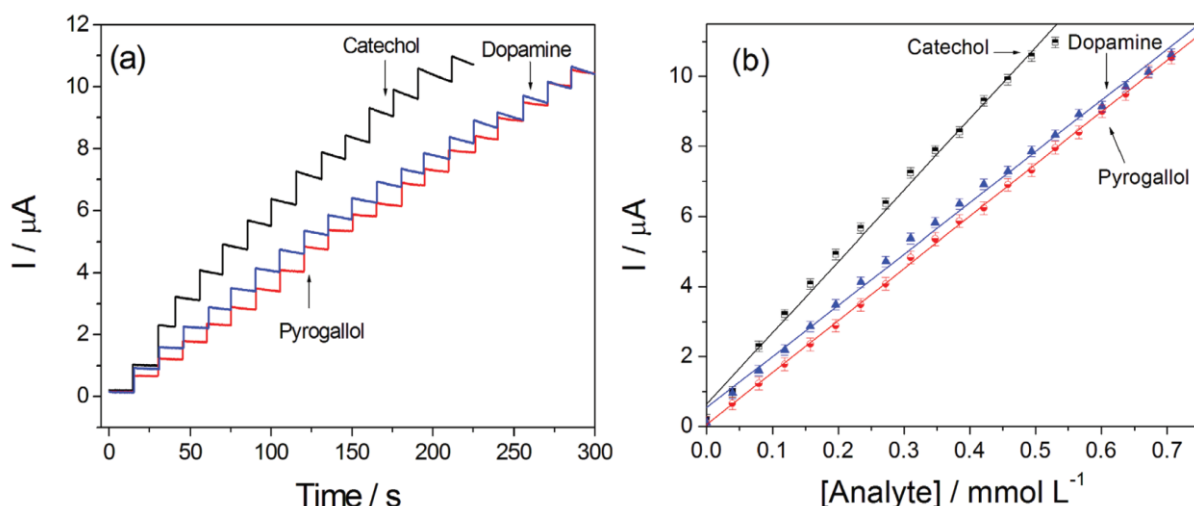
V nynější době představují amperometrické techniky nejpoužívanější přístup v oblasti vývoje PPO biosenzorů. Uvědomíme-li si že oxidace fenolických látek je uskutečněna přítomným kyslíkem, kdy se celková přeměna fenolu skládá ze dvou následných kroků zahrnujících molekulární kyslík. V prvním kroku je monofenol hydroxylován na jeho příslušný *o*-difenol (hydroxylázová aktivita), difenol je v dalším kroku oxidován na příslušný *o*-chinon a tím je enzym oxidován molekulárním kyslíkem zpět do své základní formy (catecholázová aktivita). Principiálně se zde nabízí možnost přímého měření spotřeby kyslíku amperometrickým čidlem, též známým jako Clarkova elektroda [23]. Dále je možné elektrochemicky detekovat (redukovat při konstantním záporném potenciálu) vzniklé chinoidní sloučeniny. Množství vznikajících publikací naznačuje, že tento přístup dominuje při vývoji amperometrických PPO biosenzorů [24].

Hlavním problémem většiny PPO biosenzorů je nedostatek potřebné operační a skladovací kapacity důležité pro komerční využití. Nestálost TYR biosenzorů v roztocích čistých standardů je především následkem vysoké reaktivity chinonů ve vodě a tvorbou meziproductových radikálů v enzymatických i elektrochemických reakcích, které jsou schopny reagovat a polymerovat na polyaromatické sloučeniny. Polyaromáty poté mohou inaktivovat enzym a zároveň znečistit elektrodu. Některé studie popisují zakomponování různých aditiv a modifikací TYR biosenzorů pro ovlivnění stability a aktivity TYR biosenzorů. Bohužel při analýze skutečných vzorků například povrchových či odpadních vod se projeví další faktory, které ovlivní účinnost senzoru. Tyto faktory jsou hlavně výskyt látek

inhibujících TYR a znečištění elektrody látkami usazujícími se na jejím povrchu. Toto by mohlo vést k tradičnímu kroku předčištění před každým měřením, kdy CPEs se nabízí jako nejjednodušší varianta [27].

### 1.3.1 Amperometrie ve vsádkovém uspořádání

Systém amperometrie ve vsádkovém uspořádání byl poprvé představen v roce 1991. Stejně jako tomu je u průtokové injekční analýzy je amperometrie ve vsádkovém uspořádání (BIA) schopna získání gausovských modelů pomocí injekce malých objemů roztoku (většinou v řádu od 10 až 150  $\mu\text{L}$ ). Toho všeho je možné dosáhnout bez použití hadiček a spojení (bez úniku kapaliny a bez vzduchových bublinek), tlakových systému, a dávkovačů. Všechny tyto komponenty jsou nahrazeny mikropipetou (většinou elektronickou). Proto je většinou kompletní vsádková analýza založena pouze na elektrochemické měrné cele a elektronické mikropipetě. Pokud se jedná o velký vnitřní objem amperometrické cely, může být při analýze provedeno velké množství měření (vysoké zředění uvnitř cely) bez nutnosti upravovat elektrodu nebo měnit roztok elektrolytu uvnitř cely (výhodné u přenosných měření). Transport analytu k enzymu situovanému na povrchu elektrody se provádí prostřednictvím míchání pracovního roztoku magnetickým míchadlem [28]. Pro ilustraci, jak může vypadat záznam z amperometrického měření v sádkovém uspořádání na TYR biosenzoru, je níže uveden Obrázek 5.



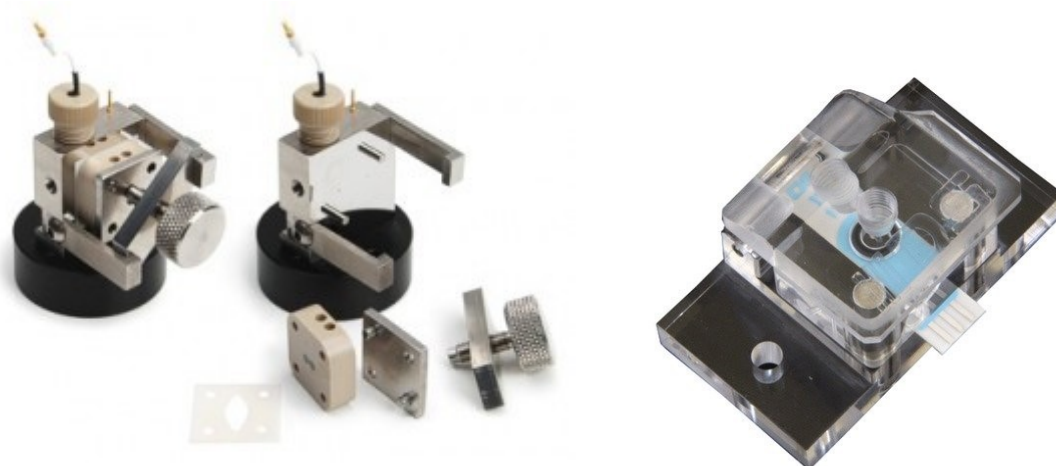
**Obrázek 5.** Amperometrický záznam kalibračních měření pro tři různé fenolické látky (a) s příslušnými kalibračními křivkami (c) obdržených na TYR biosenzoru [29].

### 1.3.2 Průtoková injekční analýza

Metoda průtokové injekční analýzy (FIA) je především určena k automatické chemické analýze organických látek, kterými mohou být kontaminanty životního prostředí, farmaka,

potravin, atd. Obecně platí, že průtokové systémy zajišťují vysoký přesun hmoty do detekční cely obsahující PPO biosenzor, a tím pádem dostačující citlivost. Protože dochází nepřetržitěmu omývání pracovních elektrod, nedochází k usazování vzniklých chinoidních polymerů, a tak FIA má ve srovnání s BIA lepší reprodukovatelnost výsledků.

Pro zvýšení citlivosti, především pro klinické aplikace, je tato technika kombinována s pastovými uhlíkovými elektrodami, elektrodami modifikovanými uhlíkovými nanotrubicemi, molekulově natisknutými polymery, grafémem nebo kvantovými tečkami. Tato kombinace vytváří hodnotné systémy, které se mohou svou selektivitou a citlivostí vyrovnat svým chromatografickým alternativám, ale s tou výhodou, že tyto systémy jsou přenosné a snadné k použití a umožňují tak *in-situ* analýzu v reálném čase. Nevýhodou, jako u všech biosenzorů, je schopnost stanovit vždy pouze jednu látku nebo úzkou skupinu látek ve směsi, proto bývá FIA doménou farmaceutické analýzy [30]. Ukázka dvou různých typů průtokových cel používaných ve FIA jsou uvedeny na Obrázku 6.

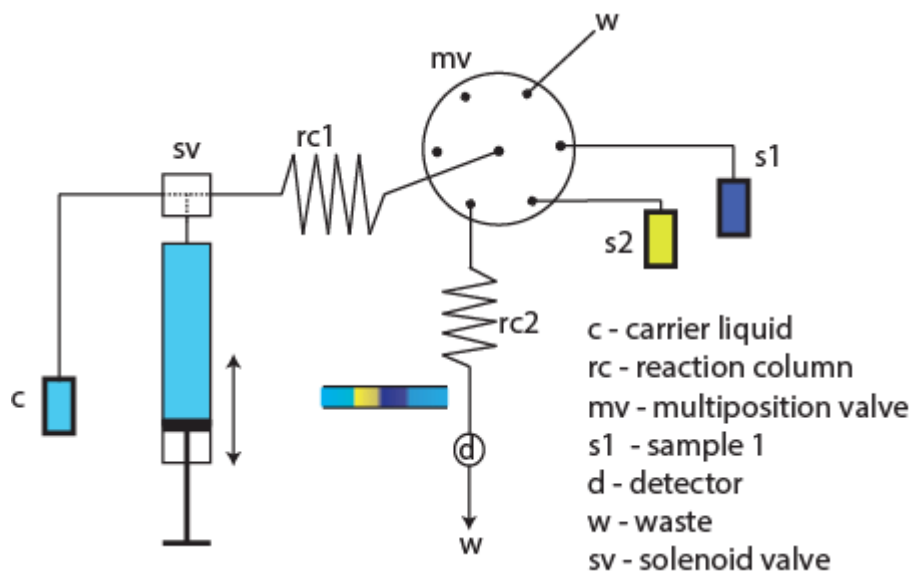


**Obrázek 6.** Průtokové detekční cely pro FIA [31,32].

### 1.3.3 Sekvenční injekční analýza

Metoda sekvenční injekční analýzy (SIA) je nejnovější metodou v oboru průtokových technik. Je založena na zavádění vzorku a roztoků činidel do cívky způsobem separovaných zón, následovaných přesunem zón k detektoru skrze reakční cívku (Obrázek 7). Výhodami této techniky oproti konvenční FIA jsou především snížená spotřeba činidel, možnost nastavení chemických a instrumentálních operačních parametrů, jednoduchost kalibrace a adaptivnost a jednoduchost díky jednokanálové sestavě. Možnosti detekce v případě SIA (tak i FIA) je možný pomocí UV-Vis spektrofotometrie, IR spektrometrie, atomové absorpční spektroskopie, amperometrie a potenciometrie. Bylo demonstrováno že, metoda SIA je

ideální pro techniky předúpravy, ošetření před měřením nebo pro fázi koncentrování vzorku před měřením jako jsou enzymatická a imunologická stanovení, extrakce pevnou fází atd. [33].



**Obrázek 7.** Instrumentální sestava SIA [34].



## 2 Polyfenolické látky v čokoládách

V této kapitole se bude pojednávat o tom, jaké polyfenolické látky se v čokoládě nacházejí. Dále je popsán původ a charakteristika těchto látek. Klasifikace polyfenolických látek v čokoládě je taktéž obsažena v této kapitole. Důraz je kladen především na využitelnost PPO enzymů při konstrukci bio-elektrochemických senzorů.

### 2.1 Klasifikace polyfenolických látek v čokoládách

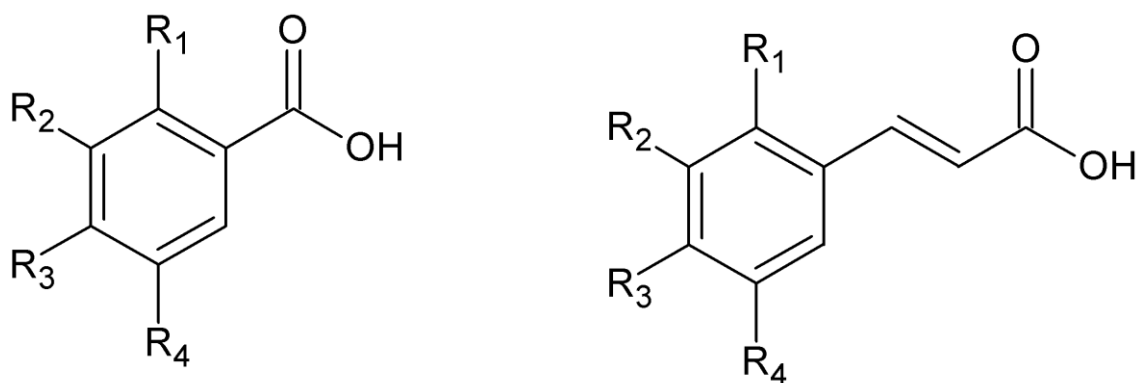
Polyfenolické látky můžeme chápat jako složitější organické molekuly složené z jednodušších fenolických látek. Z hlediska rozpustnosti je lze rozdělit na rozpustné či nerozpustné ve vodě. Níže jsou popsány jednotliví významní zástupci fenolických a polyfenolických sloučenin obsažených v čokoládě.

#### 2.1.1 Rozpustné fenolické látky

Rozpustné fenolické látky nevykazují tak vysokou biologickou aktivitu jako ty nerozpustné, jelikož dochází k jejich částečnému nebo úplnému rozkladu ještě před absorpcí ve střevě. V rostlinách se nachází ve volné nebo esterifikované formě obvykle vázané na nějakou cukernou jednotku [35]. Z hlediska analytického stanovení pomocí PPO biosenzorů je nutné konstatovat, že právě tyto jednoduché fenolické látky se dají stanovit, protože většina PPO enzymů není aktivní ve vodně organických směsích. Navíc u méně rozpustných polyfenolických látek může docházet k adsorpci na povrch CPE, jelikož povrch tvoří nepolární kompozitní materiál (disperze uhlíku v oleji).

##### 2.1.1.1 Fenolové kyseliny

Fenolové kyseliny obsahují ve své molekulové struktuře vždy jeden fenolový kruh a alespoň jednu karboxylovou skupinu, buď přímo na aromatickém kruhu, nebo na alifatickém řetězci. Tyto kyseliny se především vyskytují v rostlinách a představují nejjednodušší zástupce fenolických látek. V souvislosti s počtem karboxylových skupin se přírodní fenolové kyseliny dělí na dvě základní skupiny: hydroxybenzoové a hydroxyskořicové (Obrázek 8) [36]. Mezi významné zástupce těchto fenolových kyselin, které jsou obsaženy v čokoládě, patří kyselina gallová, protokatechová, chlorogenová, atd. V závislosti na počtu a poloze hydroxy skupin na benzenovém jádře je možné uvažovat jaký typ PPO enzymu by bylo vhodné použít jako bio-rozpoznávací prvek. Například pro protokatecholovou kyselinu se více hodí TYR, protože obsahuje hydroxy skupiny v *ortho* poloze. Na rozdíl v případě kyseliny gentisové, mající hydroxy skupiny v *para* poloze, bude lepší použít LAC.



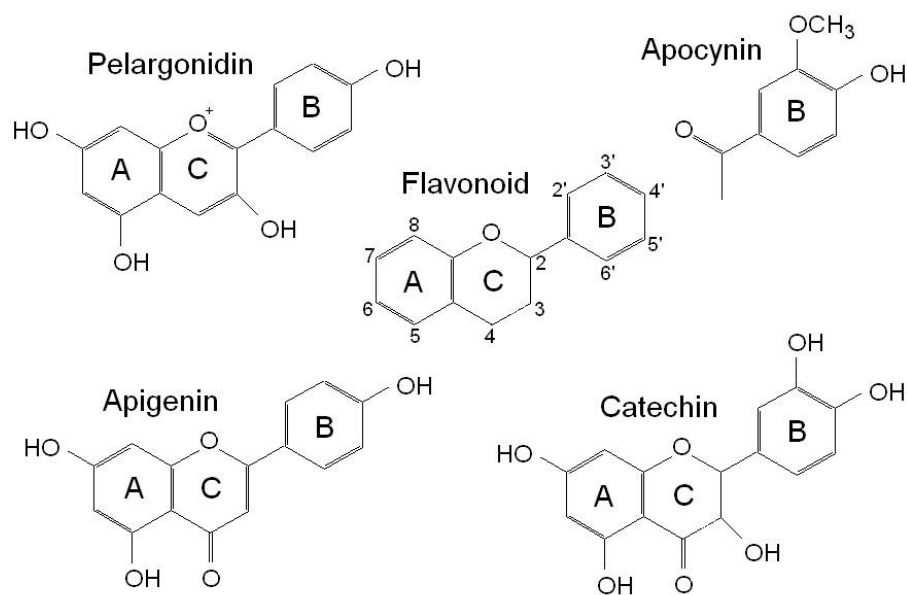
**Obrázek 8.** Strukturální rozdíl hydroxybenzoových a hydroxycinnových kyselin.

### 2.1.1.2 Flavonoidy

Flavonoidy jsou polyfenolické látky (Obrázek 9), které se hojně vyskytují v rostlinných zdrojích. Jejich základní strukturou jsou dvě benzenová jádra (A kruh a C kruh), která jsou spojena heterocyklickým kruhem obsahujícím kyslíkový atom. Dále na výše zmíněný C kruh je napojen další benzenové jádro obsahující hydroxy či methoxy skupiny (B kruh). Základní rozdělení flavonoidů je popsán na Obrázku 9.

Tyto látky jsou přítomny hlavně v ovoci, zelenině, čaji nebo tmavé čokoládě. Některé části, jako například slupka, obsahují více těchto sloučenin než části jiné [37]. Během zpracování kakaových bobů (fermentace, sušení, pražení a mletí) dochází k jejich degradaci, i tak jsou stále hojně zastoupeny především v hořkých čokoládách a těch s vysokým obsahem kaka.

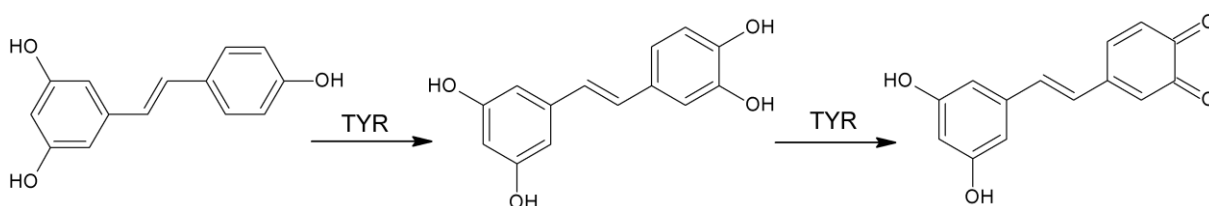
U flavonoidů odvozených od pelargonidinu a epigeninu je TYR schopna katalyzovat syntézu hydroxy skupiny do volné *ortho* polohy (kreolázová aktivita) a dále katalyzovat oxidaci této dvojice hydroxy skupin, jako v případě katechinů, na *o*-chinony (katecholázová aktivita), které je možné elektrochemicky redukovat, a tedy stanovit. Z této skutečnosti vyplývá, že B kruh se zúčastňuje biochemických reakcí a většina flavonoidů by mohla být stanovena amperometrickým TYR biosenzorem.



**Obrázek 9.** Strukturní vzorce flavonoidů [38].

### 2.1.1.3 Stilbeny

Stilbeny jsou polyfenolické látky, které jsou přírodně součástí potravin, jako jsou například ovoce, hroznové víno, borůvky, burské oříšky nebo právě kakao. Historie jejich nalezení je spojena s objevem obranných mechanismů rostlin v reakci na externí podněty. Nejvýznamnějším stilbenem, který se nachází v čokoládách, je resveratrol. Tato látka představuje substrát pro TYR enzym. Celý mechanismus katalytické oxidace resveratrolu až na *o*-chinon je zobrazen na Obrázku 10 [39]



**Obrázek 10.** Katalytická oxidace resveratrolu.

### 2.2.1 Nerozpustné polyfenolické látky

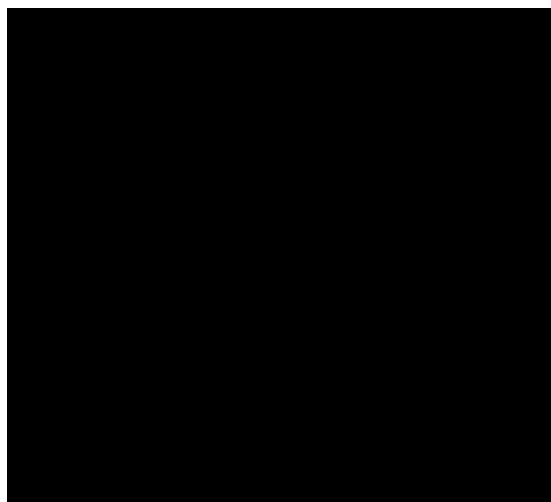
Nerozpustné polyfenolické látky jsou kovalentně vázány na strukturální komponenty buněčné stěny jako je například pektin, celulóza, hemicelulóza, lignin, arabinogalaktan nebo strukturální proteiny. Konvenční extrakční metody nejsou příliš efektivní pro uvolnění vázaných fenolických látek z těchto strukturálních komponent. V mnoha in vitro antioxidačních

měřeních vykazovaly vázané fenolické sloučeniny významně vyšší antioxidační aktivitu oproti rozpustným polyfenolům [34]

### **2.2.1.1 Oligomerní proanthokyanidiny**

Proanthokyanidiny jsou známé také jako kondenzované třísloviny. Jedná se o polyfenolické látky o vysoké molekulové hmotnosti získané polymerizací flavan-3-olu. Ke spojení jednotlivých monomerních jednotek probíhá mezi uhlíkem C-4 a C-8 a občas také mezi uhlíkem C-4 a C-6 tento typ proanthokyanidinů je označován jako B-typ (Obrázek 11). V některých případech se zde nachází etherové spojení mezi uhlíkem C-2 a kyslíkem O-5 nebo O-7. Tyto polyfenolické sloučeniny jsou všudypřítomné v rostlinné říši, zároveň mají jedno z nejpočetnějších zastoupení z polyfenolických látek vůbec [40].

I přesto, že proanthokyanidiny obsahují ve své polymerní struktuře jednotky flavan-3-olu, který lze považovat za substrát TYR, tak i LAC, není možné tyto látky přímo stanovit PPO biosenzory kvůli jejich nízké rozpustnosti ve vodě. Protože není možné měření provádět ve vodně-organických směsích, nezbyvá než provést předúpravu vzorku a rozbít polymerní strukturu, ať už chemickými činidly nebo dalšími enzymy z řad hydroláz.



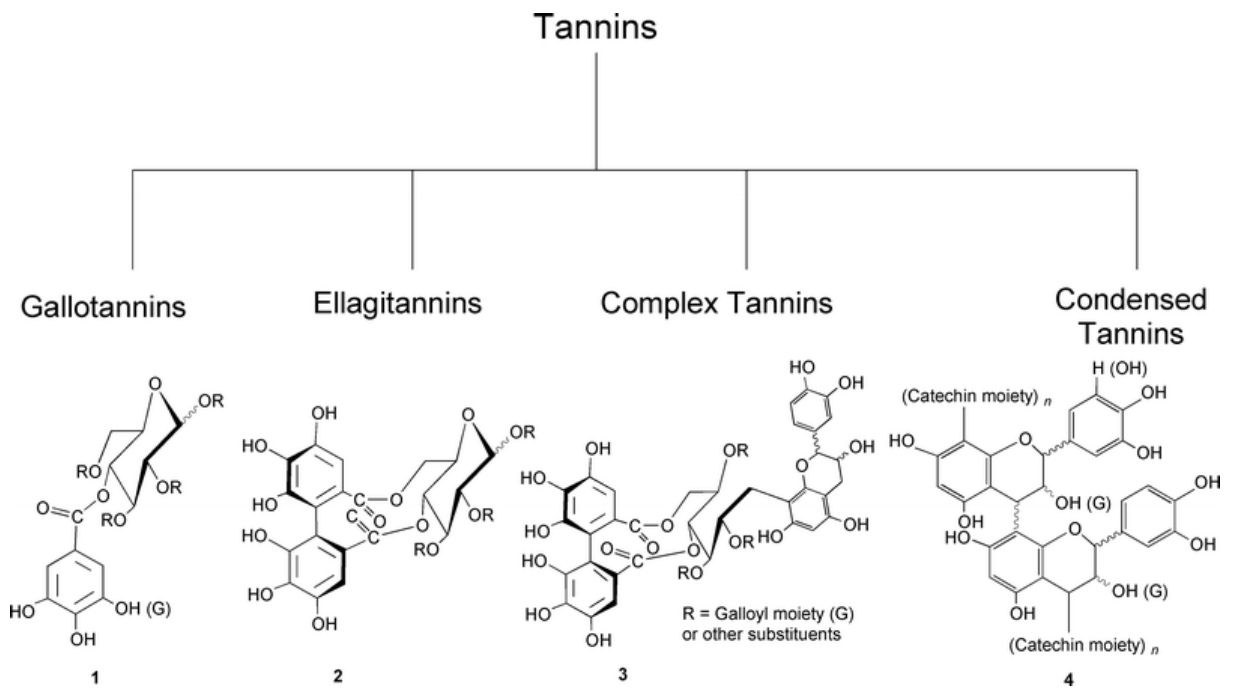
**Obrázek 11.** Strukturní vzorec proanthokyanidinu A2 [41].

### 2.2.1.2 Třísloviny

Třísloviny, též známé jako taniny, jsou čtvrté nejvíce zastoupené složky extrahované z biomasy po celulóze, hemicelulózách a ligninu. Jejich zastoupení je vysoké v půdních i vodních životních prostředích. V některých suchozemských rostlinách nalézáme opravdu vysoké koncentrace jako například u *Acacia mearnsii* (kůra černé mimózy), *quercus spp* (dubová kůra) a *Castanea sativa* (dřevo kaštanovníku). Dalšími významnými zdroji jsou různá semena například kakaovníku nebo guarany. Ve vodním prostředí se vyskytují v menších množstvích a jsou doménou zejména různých druhů řas.

Kategorizace tříslovin závisí na jejich strukturních aspektech a chemických charakteristikách. Tradičně jsou třísloviny rozděleny do dvou hlavních skupin, jmenovitě kondenzované a hydrolyzovatelné třísloviny. Chemicky jsou kondenzované třísloviny definovány jako polymerní flavonoidy. Mohou se ale také objevovat jako oligomery, v případě že jsou složeny ze dvou až deseti monomerních jednotek. Ve formě polymerních flavonoidů disponují malou nebo žádnou rozpustností ve vodě, zatímco v oligomerní podobě jsou ve vodě rozpustné. Tyto oligomerní třísloviny by mohli být přímo stanoveny pomocí PPO biosenzorů, neboť podléhají katalytické oxidaci. Vzhledem k jejich velikosti, je možné předpokládat, že jejich katalytická oxidace bude mnohem pomalejší nežli v případě jednoduchých fenolických látek.

Vzhledem ke skupinám flavonoidů jsou kondenzované třísloviny označovány jako flavanoly, protože flavan-3-ol je jejich základní stavební jednotkou. Flavan-3-olové jednotky mohou zobrazovat různé struktury v závislosti na přítomnosti kruhů A a B. Prvně uvedený kruh může vystupovat jako floroglucinol nebo resorcinol. B kruh zaujímá rozložení katecholových či pyrogallolových jednotek. Tyto kombinace vedly k formaci několika monomerů kondenzovaných tříslovin (Obrázek 13) [42].



**Obrázek 12.** Základní rozdělení tříslovin [43].

### 3 Biologická aktivita fenolických látek

Obecně jsou fenolické látky známy pro svou antioxidační aktivitu, neboť ochotně reagují s volnými radikály za vzniku pro zdraví člověka méně škodlivých aduktů. V krátkém časovém období jsou schopny nahradit i biologické funkce kyseliny askorbové, označované jako vitamin C. Jak tyto látky reagují s volnými radikály, je vysvětleno v následujících kapitolách.

#### 3.1 Volné radikály

Běžné biochemické reakce či vysoký příjem xenobiotik v potravě má za následek vznik reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) a reaktivních dusíkových radikálů (RNS). ROS a RNS jsou zodpovědné za oxidativní stres při různých patofyziologických stavech. Buněčné komponenty našeho těla, které jsou přeměněny během oxidativního stresu, mohou zapříčinit vážná onemocnění. Oxidativní stres může být efektivně neutralizován posílením buněčných obranných mechanismů pomocí antioxidantů. Některé látky vystupují jako antioxidanty *in-vivo*, tím že zvyšují hladiny endogenní antioxidační obrany. Také exprese genů kódujících enzymy superoxid dismutázu (SOD), katalázu (CAT), glutathion peroxidázu (GSHPx) má za následek zvýšení hladiny endogenních antioxidantů.

Proces generace ROS začíná rychlou spotřebou kyslíku spolu s aktivací NADPH oxidázy vzniká superoxidový radikál. ROS mohou reagovat dvěma na kyslíku závislými mechanismy vyústujícími zničením mikroorganismů či cizorodých látek. Reaktivní sloučeniny mohou být také generovány myeloperoxidázovými systémy. Enzym myeloperoxidáza (MPO) se nachází v neutrofilních cytoplazmatických granulech.

RNS se generují pomocí enzymu NO-syntázy (NOS), příkladem je třeba radikál oxidu dusnatého vznikající z argininu. Indukovatelná NO-syntáza (iNOS) je schopna nepřetržitě vytvářet velké množství radikálů oxidu dusnatého, který působí jako lapač superoxidových radikálů. Spojením těchto dvou radikálů vzniká peroxynitrilový radikál. Peroxynitrilový radikál je jedním z nejsilnějších oxidačních činidel v lidském těle, velmi dobře reaguje například s aromatickými aminokyselinovými zbytky, což nakonec může vést k inaktivaci enzymů. Navzdory negativním efektům je radikál oxidu dusnatého významným efektem v obraně proti rakovinným buňkám, plísním a mykobakteriím. Dalšími významnými zdroji volných radikálů jsou reakce lipooxygenace, peroxidace lipidů, metabolismus xenobiotik a UV radiace.

Oxidativní stres způsobený ROS je především spojován s chronickými onemocněními, jako jsou rakovina, chronická zánětlivá střevní onemocnění, koronární srdeční choroby (infarkt myokardu a mozková příhoda) a osteoporóza. Volné radikály reagují se všemi hlavními třídami biomolekul, hlavně pak s polynenasycenými mastnými kyselinami (PUFA) obsažených v buněčných stěnách. Oxidativní porucha PUFA, též známá jako peroxidace lipidů, je zejména destruktivní poruchou protože ústí v řetězovou reakci [44].

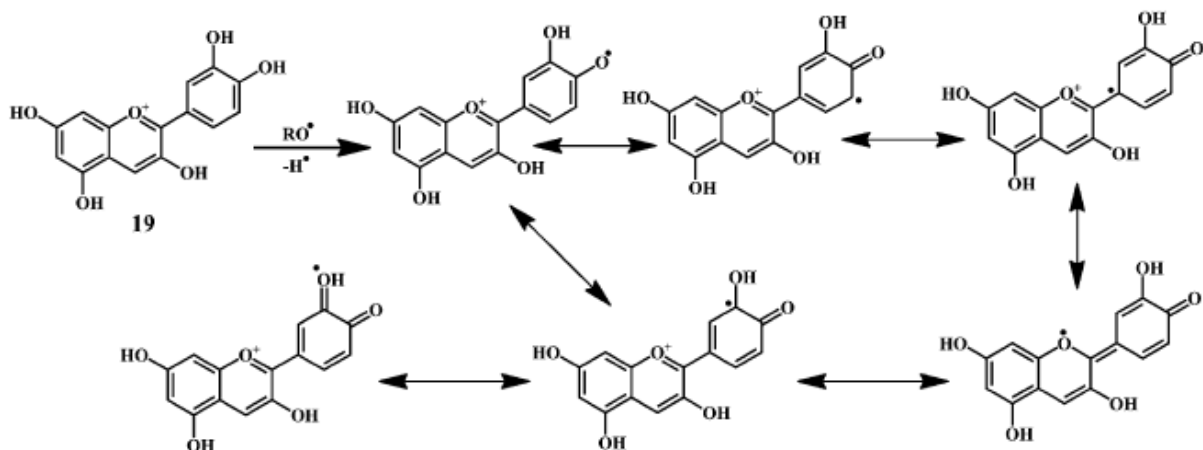
Ať už ROS nebo RNS, oba tyto typy volných radikálů jsou pro lidské zdraví škodlivé, a proto pravidelný příjem látek s antioxidační aktivitou by měl být samozřejmostí. Není proto náhodou, že národy, které tradičně konzumují potraviny bohaté na antioxidanty, méně trpí na civilizační onemocnění nežli ty ze střední a východní Evropy.

### 3.2 Akční mechanismus fenolických látek

Antioxidační potenciál fenolických sloučenin záleží na počtu a uspořádání hydroxylových skupin. Tyto látky jsou schopny poskytnout vodíkové atomy lipidovým radikálům a tímto způsobem jsou schopny vytvořit lipidové deriváty a antioxidační radikály, které jsou více stabilní a tím pádem odolnější ke spuštění autooxidace.

Přenos vodíku na volný radikál se zrychluje, protože je to energeticky výhodnější, když dochází ke snížení vazebné energie vodíku ve volném radikálu. Každá sloučenina, která má redukční potenciál nižší, než je ten volného radikálu je schopna poskytnout atom vodíku volnému radikálu, tedy jen pokud není reakce kineticky neuskutečnitelná. Například volné radikály  $\alpha$ -tokoferolu ( $E^{\circ\prime} = 500 \text{ mV}$ ), což je redukční potenciál nižší než u peroxylového radikálu ( $E^{\circ\prime} = 1000 \text{ mV}$ ) jsou schopny poskytnout vodík peroxylovému radikálu za vzniku peroxidu vodíku. Fenoxylový radikál je stabilizován delokalizací nepárových elektronů v aromatickém kruhu, jenž přispívají k terminační reakci. Substituce v *para* pozici s ethylovou nebo n-butylovou skupinou spíše vylepšuje aktivitu antioxidantu než skupina methylová. Zároveň přítomnost rozvětvených alkylových skupin naopak snižuje aktivitu antioxidantu. Efekt antioxidačních koncentrací na autooxidační hodnoty závisí na struktuře antioxidantu, podmínkách oxidace a na povaze vzorku, který je oxidován. Často se stává, že fenolické antioxidanty ztrácí svoji aktivitu ve vysokých koncentracích a stávají se prooxidanty. Proto by měly být antioxidanty přidávány do potravin, co nejdříve to je možné, aby byla zajištěna maximální ochrana proti oxidaci. Pro názornost, je reakce kvercetinu s volnými radikály popsána na Obrázku 13.





**Obrázek 13.** Mechanismus reakce superoxid anionového radikálu s kvercetinem [44].

### 3.2.1 Zdravotní účinky antioxidantů

Denní dávka fenolických látek je z velké části závislá na stravovacích návycích jedince. Doporučená denní dávka je přibližně 1 g na osobu. Hlavními zdroji polyfenolů jsou ovoce a zelenina a nápoje z nich připravené. Jednoduché fenolické látky jako jsou fenolové kyseliny a flavonoidy vykazují velký rozsah antioxidačních schopností in vitro. Tyto látky mají významný obranný efekt proti rakovině a kardiovaskulárním onemocněním. Oxidativní stres vyvolávaný reaktivními kyslíkovými radikály (ROS) hraje významnou roli v patofyziologii asociované s neoplazií (vznik novotvarů), aterosklerózou a neurodegenerativními chorobami.

Přestože je známo, že tyto látky přímo reagují s volnými radikály, mohou některé antioxidanty však vykazovat prooxidační aktivitu za určitých podmínek, a tím pádem zvýšit potenciální riziko vzniku rakoviny. Z tohoto důvodu se užívání velkých dávek jednoho antioxidantu nedoporučuje.

V současné době je výskyt rakoviny úzce spojen s doplňky stravy bohatými na více různých antioxidantů než na ty s obsahem pouze jednoho. Kombinace antioxidantů s různými typy účinku je cestou zvýšení efektivity a snížení toxicity. Synergistické efekty potravinových fytochemikálií získaných z ovoce a zeleniny jsou nejspíše více odpovědné za antikarcinogenní působení s vyšší efektivitou než doplňky stravy. Bylo zjištěno že, kombinací jablek, pomerančů, hroznového vína a borůvek dochází k synergistickému působení, protože maximální efektivní koncentrace ( $EC_{50}$ ) in vitro je při jejich individuálním použití pětkrát vyšší. Přijímání extraktu z pomerančové kůry, extraktu z černého čaje a kofeinu potravou mělo protiobeztní efekt díky potlačení příbytku tělesné hmoty a tvorbě adipózní tkáně.

Důležité je si uvědomit, že pozřené polyfenolické látky jsou vystaveny hydrolýze a degradaci ve střevech pomocí enzymů střevní mikroflóry. Konjugované polyfenoly jsou přítomny v menších kvantitách než produkty jejich rozkladu a následným metabolizováním v játrech. Z tohoto hlediska se zdá být pro tělo prospěšnější konzumovat potraviny bohaté na méně rozpustné polyfenolické látky, které se v těle poté rozloží na reaktivní subjednotky.

Experimentální a epidemiologické studie ukázaly pozitivní efekt isoflavonů proti chronickým onemocněním jako například rakovina prsu, prostaty, kolorektální karcinom, a rakovina plic. Dále isoflavony redukují vznik osteoporózy, kardiovaskulárních chorob a oddaluje symptomy menopauzy.

Zároveň bylo zjištěno že, vysoký příjem flavonoidů a isoflavonů může být spojen s redukcí výskytu alergického zánětu nosohltanu. Se strukturální podobností isoflavonů a steroidních estrogenů dochází k vázání isoflavonů na beta-estrogenové receptory zapříčiňující jejich transaktivaci. Resveratrol je další látka s významnou antioxidační aktivitou. Tato sloučenina se nalézá v mnoha rostlinách, jako jsou například hroznové víno, burské ořechy a bobulovité plody, má pozitivní zdravotní výsledky u nemocí spojených s věkem jako jsou třeba rakovina, diabetes druhého typu, kardiovaskulární onemocnění a neurologické problémy [45].

Fenolové kyseliny mají významný antioxidační, antimutagenní, antikarcinogenní, protizánětlivý a antimikrobiální účinek. Díky jejich biologickým vlastnostem jsou tyto kyseliny schopny inhibovat růst mnoha patogenních bakterií a hub jako jsou například: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus*, a proto jsou využívány jako přírodní konzervanty potravin [36]. Hlavní působení tříslovin je odvozeno od jejich fenolického původu, třeba jejich antioxidační kapacita je spojena s fenolovými kruhy v jejich struktuře, která funguje jako elektronový lapač volných radikálů a iontů. Proto je tříslovin hojně využíváno ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu [42]. Spolu s výše uvedenými fenolovými kyselinami hrají proanthokyanidiny významnou roli v první linii obrany organismu proti mikrobiálním patogenům inhibicí růstu spor hub, nebo vyčerpáním železa v médiu, což vede k inhibici bakteriálního růstu [40].

Studie potvrdily také vysoké antioxidační účinky stilbenů, a to zejména ve směru posílení stability těla vůči stresovým faktorům vnějšího prostředí. Zároveň také zlepšují

adaptivní schopnost nervového a imunitního systému, poté působí pozitivně pro ochranu srdečního svalu a ke snižování lipidového obsahu v těle [39].

### 3.3 Měření aktivity antioxidantů

Tato měření zajišťují porovnání potravin a produktů, dodržení standardů kvality a zdravotní nezávadnosti. Nejvíce sledovaná je oxidace lipidů, a to za pomoci zjištění peroxidového čísla (PV), čísla reaktivních substancí kyseliny thiobarbiturové (TBARS), čísla konjugovaných dienu (CD) nebo anisidinového čísla (AV). Existuje mnoho metod k měření aktivity antioxidantů, ty mohou být klasifikovány do dvou skupin. První skupina sleduje schopnost antioxidantů k inhibici oxidace v modelovém systému monitorováním změn pomocí fyzikálních, chemických nebo instrumentálních postupů. Radikálová vyšetření zahrnují metody založené na přenosu atomů vodíku (HAT) nebo metody přesunu jednoho elektronu (SET). Absorpční kapacita kyslíkových radikálů (ORAC), celkový parametr záchytu antioxidantů (TRAP) a krocinové bělicí metody jsou hlavními metodami měření HAT. Trolox ekvivalentní kapacita antioxidantů (TEAC), železo redukující antioxidační síla (FRAP) a stanovení záchytu volných radikálů pomocí 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH) jsou metody v sekci SET. HAT metody vyšetřují základní schopnost antioxidantů zhášení volných radikálů poskytnutím vodíkových atomů. SET metody detekují schopnost antioxidantu k přesunu jednoho elektronu a tím redukcí nějaké sloučeniny jako jsou třeba kovy, karbonylové skupiny a radikály [45].

Drtivá většina výše uvedených spektrofotometrických metod jsou založena na poklesu absorbance relativně stabilního radikálu, kdy například fialový DPPH radikál při reakci s antioxidantem (polyfenolická látka) se odbarvuje do žluta. Měření absorbance se provádí u DPPH testu při 517 nm. U této metody se používá metanolický roztok  $0.0250 \text{ g l}^{-1}$  DPPH radikálu. Neboť je tento radikál na světle labilní, provádí se inkubace (reakce s antioxidantem) za tmy při laboratorní teplotě po dobu 10 min [46].

Kalibrační měření se většinou provádí na Trolox, což je vodně rozpustný analog vitamínu E, odvozený od jeho nejvýše aktivní biologické formy  $\alpha$ -tokoferolu. Výsledky analýzy jsou tudíž potom přepočteny na koncentrační ekvivalent právě Troloxu. TEAC hodnoty pro různé potraviny bývají často tabelovány (USDA National Nutrient Database for Standard Reference) [47].

## 4 Výroba čokolády

Čokoláda je produktem, který si užívají všechny generace. Je bohatá na tuk, proteiny, karbohydráty (cukry), polyfenolické látky a jiné bioaktivní látky. Kakaové boby jsou hlavní surovinou pro výrobu čokolády. Proces produkce čokolády se skládá z fermentačního procesu, sušení, pražení, mletí kakaových bobů, míchání všech surovin (kakaová hmota, cukr, kakaové máslo, emulzifikátory, aroma a mléčné složky, pokud je tedy třeba), konšování a temperace. Hlavní chemické reakce probíhají během těchto procesů. Tyto reakce jsou nejvíce důležité pro organoleptické vlastnosti finálního produktu. Fermentace kakaových bobů je proces, při kterém dochází k růstu kvasinek a bakterií v dužině a provádí se na kakaových plantážích jako součást produkce kakaových bobů. V této fázi dochází k rozkladu cukrů a slizovatění, tento proces se skládá se ze tří fází. V první fázi dominují anaerobní kvasinky a trvá asi 24 – 36 hodin. Při této fázi je udržován nízký obsah kyslíku a nízké pH (<4). V druhé fázi dominují bakterie mléčného kvašení. Jsou přítomny od začátku, ale začnou být aktivní mezi 48 – 96 hodinami. Třetí fázi dominují bakterie kyseliny octové, když se zvyšuje okyselení. Během této poslední fáze dochází k exotermické reakci (přeměna alkoholu na kyselinu octovou), která je odpovědná za zvýšení teploty (50°C nebo vyšší). Fermentace je klíčovou fází výroby prekurzorů pro vývoj správné čokoládové vůně.

Sušení kakaových bobů je prováděno po fermentaci kvůli snížení koncentrace vlhkosti a k úplnému dokončení oxidačních procesů vyvolaného během fermentace kakaových bobů. Po sušení mají kakaové boby 6–8 % vlhkosti. Nízký obsah vlhkosti zabraňuje růstu plísní a zajišťuje, že boby jsou stabilnější při přepravě a skladování.

Pražení kakaových bobů se obvykle provádí v továrně na čokoládu jako první fáze výroby čokolády. Jedná se o vysokoteplotní proces, obvykle prováděný při teplotách mezi 120 a 140°C, což je důležité pro vznik Maillardových reakcí, které ovlivňují sensorické vlastnosti. Pečení snižuje obsah nežádoucích složek, produkuje aroma a vůni specifické pro čokoládu a dekontaminuje kakaové boby. V této fázi reagují všechny prekurzory vytvořené v předchozích fázích a vytvářejí mnoho sloučenin.

Mletí a míchání všech čokoládových ingrediencí je velmi důležité pro dosažení správné velikosti částic všech ingrediencí. Hlavními složkami používanými při výrobě čokolády jsou kakaový likér (získaný mletím kakaových bobů), kakaové máslo (získané lisováním kakaového likéru), cukr a mléko (v případě mléčné čokolády). Konšování je míchání a zahřívací proces, kterým je zajištěna produkce tekuté čokolády (všechny pevné částice jsou

povlečeny tukem), odpaření těkavých kyselin, dosažení správné viskozity, odstranění přebytečné vlhkosti a vytvoření požadované barvy. Konšování je proces, kterým se získá stabilní produkt. Tento proces se provádí tepelně a má za následek stabilní a stejné krystaly kakaového másla, které pak během chlazení ovlivňuje růst stabilní krystalické sítě [48].

#### **4.1 Kakaový prášek**

Jak již bylo výše uvedeno, kakaový prášek (kakao) vzniká při mletí fermentovaných a pražených kakaových bobů. Typická hořká chuť kakaa je způsobena vysokou přítomností právě polyfenolických látek (tříslovin). V literatuře se uvádí, že čistý kakaový prášek obsahuje nejvyšší koncentrační úroveň polyfenolů ve srovnání s jinými potravinářskými výrobky, ve kterých je prášek aplikován. Lze se tedy domnívat, že čokolády s vysokým obsahem kakaa obsahují více polyfenolů než ty mléčné [49]. Domnívám se, že by mohly právě PPO biosenzory být tím pravým analytickým nástrojem pro sledování obsahu kakaa v čokoládách. Z tohoto důvodu, by bylo zapotřebí zjistit, zda existuje nějaká korelace mezi deklarovaným obsahem kakaa a proudovým výtěžkem. Pokud by se ukázalo, že jsou tyto údaje tolerovatelné, mohl by TPC posloužit jako biomarker pravosti čokolád, stejně jako tomu je u teobrominu.

#### **4.2 Kakaové máslo**

Kakaové máslo, jakožto odpadní produkt výroby kakaa, reprezentuje tuhý nažloutlý rostlinný tuk, který vzniká lisováním rozdrcených pražených kakaových bobů. Jak lze se předpokládat, získává se lisováním. Kakaové máslo se nejčastěji uchovává v tuhé podobě. Z kakaového másla se vyrábí čokoládové cukrovinky, používá se v kosmetice a farmacii. Má jemnou čokoládovou chuť a vůni. Tento produkt představuje hlavní ingredienci bílé čokolády. Jelikož se jedná o tuk, obsahuje většinou ve vodě nerozpustné polyfenolické sloučeniny, které zabraňují žluknutí a je možno jej uchovávat dva až pět let bez výrazné změny struktury. Mezi tyto látky patří dimery prokyanidů, kvercetin a mnohé další biologicky aktivní látky [50].

#### **4.3 Kakaové slupky**

Složky kakaové slupky je celkem variabilní stejně jako složení samotných kakaových bobů. Bohužel je 90 % alfa-amino dusíkatých sloučenin silně vázáno na oxidované polyfenolické látky, proto bílkoviny obsažené ve slupce jsou nevázané asi jen z 1 %, z tohoto důvodu je také hloupost pokoušet se extrahovat bílkovinný koncentrát jako doplněk stravy, když je přítomno pouze tak malé množství. Zpopelněním slupky získáme přibližně 7 % obsah sodíku, 3 % obsah draslíku a 33 % uhlíčitanu sodného. Obsah rozpustných cukrů je

zanedbatelný, což je výhodou produktu, protože se jedná o sníženou kalorickou hodnotu. Vlákna je naopak zastoupena hojně a představuje až 50 % celkového materiálu. Obsažené tuky se také hodně často liší svým zastoupením (20 – 185 g kg<sup>-1</sup>) ve vysušené kakaové slupce [51].

#### 4.4 Polyfenolické látky obsažené v různých částech procesu výroby čokolády

Polyfenolické látky jsou produkty sekundárního metabolismu rostlin. Díky jejich antioxidačním účinkům potlačují oxidativní stres a tím chrání buněčné komponenty před poškozením. Je dobře známo, že kakao a čokoláda jsou bohaté na polyfenoly. Nefermentované kakaové boby obsahují v průměru 12 – 18 % polyfenolů v sušině. Kakaové polyfenoly se skládají z přibližně 37 % flavan-3-olů, 4 % anthokyanů a 58 % proanthokyanidinů. Tyto sloučeniny jsou uloženy v polyfenolických buňkách v nefermentovaných bobech. V této podobě dávají nefermentovaným bobům bílou až tmavě fialovou barvu. Katechiny tvoří přibližně 29 – 38 % celkových polyfenolů. V kakau a čokoládě jsou polyfenolické látky zastoupeny (-)-epikatechinem, (+)-katechinem, (+)-gallokatechinem a (-)-epigallocatechinem, kdy (-)-epikatechin tvoří až 35 % celkových polyfenolů. Tyto látky jsou nezbytné pro vývoj chuti a barvy bobů. Anthokyanidiny v kakau jsou zastoupeny kyanidin-3- $\alpha$ -l-arabinosidem a kyanidin-3- $\beta$ -d-galaktosidem. Prokyanidiny jsou reprezentovány dimery, trimery a oligomery flavan-3,4-diolů. Epikatechin je hlavní podjednotkou propojenou vazbami 4–8 nebo 4–6. Prokyanidiny mohou existovat ve formě A nebo B. Všechny tyto sloučeniny přispívají k trpkosti a specifické hořkosti nefermentovaného kaka.

Ve fázi fermentace se polyfenolické buňky ničí a polyfenoly vycházejí z buněk. Během fermentace dochází k aerobní oxidaci polyfenolů. Tato reakce je řízena PPO, která je uvolněna díky změnám v děložních lístcích způsobených fermentací. Výsledkem tohoto procesu je snížená hořkost a trpkost a více hnědá barva. Během oxidace polyfenoly reagují s proteiny a přeměňují se na nerozpustné formy. Obsah katechinu se hlavně snižuje během fermentačního procesu (více než 90 % původního obsahu). Bylo zjištěno, že (-)-epikatechin je výrazně snížen. Během fermentace prokyanidin A2 epimerizuje na prokyanidin F2. Prokyanidiny F1 a F2 jsou specifické pro fermentované kakaové boby. Hydrolýza glykosidů (zejména anthokyanů), neenzymatická oligomerace katechinu a přenos proanthokyanidinů do složitější formy vedou k projasnění děložního lístku. Protože pokles obsahu anthokyanidinů během kvašení je významný, považuje se za dobrý fermentační index. Z výše uvedených

poznatků vyplývá, že PPO biosenzory by mohly nalézt své uplatnění i v kontrole fermentace kakaových bobů, tzv. „*real-time monitoring*“.

Ve fázi sušení se také snižuje obsah polyfenolů v bobech. Tento pokles je katalyzován PPO, po které vznikají nové aromatické sloučeniny spolu s tvorbou hnědého pigmentu a dochází ke snížení hořkosti a trpkosti.

Jak již bylo výše zmíněno, fáze pražení se, provádí při vysokých teplotách, a proto významně ovlivňuje obsah a složení termolabilních molekul, jako jsou právě polyfenoly. V řadě studií bylo pozorováno snížení celkového obsahu polyfenolů během pražení. Pokles vysokomolekulárních proanthokyanidinů je výraznější. Během pražení se také mění poměr epikatechin/katechin, kdy se obsah (-)-epikatechinu sníží. Byl sledován i pokles (-)-epikatechinu, ale bylo zjištěno, že je podroben epimeraci, a že dochází ke zvýšení obsahu (-)-katechinu.

Vysoké teploty mohou také indukovat (+)-katechinovou epimerizaci na (+)-epikatechin. Během pražení se také snižuje obsah prokyanidinu B2, zatímco prokyanidin B1 se zvyšuje. Proanthokyanidiny jsou rovněž podrobeny epimeraci, takže je třeba poznamenat, že po pražení je obsah velkých proanthokyanidinů zvýšen. Během pražení byl pozorován úbytek (-)-epikatechinu a prokyanidinu B2 a příbytek (+)-katechinu a prokyanidinu B1.

V počátečním stádiu konšování se těkavé polyfenoly ztrácí v důsledku odpařování společně s vodou a mastnými kyselinami s krátkým řetězcem. Bylo zjištěno, že se v tomto procesu obsah těkavých polyfenolů sníží o 80 %. Během konšování dochází k oxidaci tříslovin a ke změně pigmentace. Některé studie ukázaly pokles prokyanidinu B2 během konšování, ale došlo ke zvýšení obsahu epikatechinu a katechinu. Dospělo se k závěru, že oxidace tříslovin a některé enzymatické mechanismy ovlivňují obsah polyfenolů po konšování. Během tohoto procesu se tvoří komplexy mezi polyfenoly, aminokyselinami, peptidy a proteiny. To je jedním z důvodů, proč konšování ovlivňuje chuť čokolády a snižuje trpkost. Reakce během konšování nejsou rozsáhlé ani tolik důležité jako přerozdělení aromatických sloučenin mezi čokoládovými částicemi, v počáteční fázi (suché fázi) jsou aromatické sloučeniny obsaženy v kakaových částicích. Jejich smíchání a trháním se však rozdělí mezi cukr, kakao a tuk, čímž se cukr stává také nosičem aroma [48].

#### **4.5 Ostatní sloučeniny v čokoládě**

Dietní vláknina je jedlou součástí rostlin, spolu s ostatními podobnými karbohydráty, které jsou rezistentní k rozkladu a absorpci v lidském střevě. Jisté studie naznačují, že

kakaová slupka by mohla být dobrým a levným alternativním zdrojem dietní vlákniny s výhodou nízkého kalorického obsahu, která by mohla významně ovlivnit hladinu cholesterolu a zároveň glukózy v krvi.

Methylxanthiny jsou známy pro svoje psychoaktivní účinky, a proto je velký zájem v jejich stanovení. Kakaové produkty jsou bohaté právě na metxylxanthiny, jako jsou kofein (1,3,7-trimethylxanthin), theobromin (3,7-dimethylxanthin) a theofilin. Jednotlivé látky mají podobný fyziologický efekt v těle, působí stimulaci centrální nervové soustavy, srdečního svalu, kosterního svalstva, relaxaci hladké svaloviny a mají diuretický efekt. Jejich efekt je u každého jedince individuální. Kakao obsahuje relativně malé množství kofeinu, ale někdy až desetinásobné množství theobrominu, což se využívá v analytické chemii jakožto biomarker pravosti čokolády.

Theobromin je bílý krystalický prášek, který se nachází hlavně v slupce kakaových bobů. Na rozdíl od kofeinu se jedná jen o slabý stimulant centrální nervové soustavy a vyznačuje se i některými antioxidačními účinky. Hlavní syntéza theobrominu probíhá v kakaových bobech samotných. Jeho koncentrace se mění hlavně během procesu fermentace, kdy dochází k 25% poklesu koncentrace.

Hlavním využití analýzy methylxanthinů je zájmem hlavně v oblasti zvířecí výživy, protože zvířata jsou většinou krmena vedlejšími produkty ze zpracování kakaových bobů. Bylo zjištěno, že zejména vysoké koncentrace theobrominu působí toxicky na zvěř. Nynější nejpoužívanější metodou identifikace theobrominu v kakaových produktech je vysokoúčinná kapalinová chromatografie kvůli své vysoké citlivosti a účinnosti [51].



## 5 Příprava čokolády k analýze

Jak je zřejmé z popisů ingrediencí (Obrázek 14), které běžná tabulka čokolády obsahuje, lze čokoládu považovat za vysoce komplexní matici, neboť jde o směs mléčných proteinů, sacharidů (glukózový sirup) a tuků (palmový olej a tuky pocházející z ořechů). Dále čokoláda většinou obsahuje emulgátor sójový lecitin, soli a aroma. Za zdroj polyfenolických látek lze považovat pouze kakaový prášek (1 % w/w), kakaové máslo a kakaovou hmotu. Každému musí být ze složení zřejmé, že mléčné čokolády musí mít několikanásobně nižší antioxidační kapacitu nežli ty hořké s vysokým obsahem kakaá.

The image shows the back of a Milka milk chocolate wrapper. It features a barcode on the right with the number 7 622210 078100. The label contains text in Czech, Polish, and English. The English section includes a table of nutritional values per 100g and 20g, and a list of ingredients. The ingredients list includes: milk, milk powder, cocoa powder, cocoa butter, sugar, palm oil, soy lecithin, and vanilla. The table shows energy, fat, carbohydrates, and protein content.

Wartość odżywcza / Хранителна информация / Átlagos tápérték	100 g	20 g	%* / 20 g
Energia / Энергия / Energia	2335 kJ / 560 kcal	467 kJ / 112 kcal	6 %
Tłuszcz / Мазнина / Zsír	35,0 g	7,0 g	10 %
w tym kwasy nasycone / от които наситени мастни киселини / ameyből telített zsírsavak	19,5 g	3,9 g	20 %
Węglowodany / Върлекидрати / Szenhidrát	55,0 g	11,0 g	4 %
w tym cukry / от които захари / ameyből cukrok	49,0 g	9,8 g	11 %
Błonnik / Влакнини / Rost	1,3 g	0,3 g	-
Białko / Белтъчини / Fehérje	5,5 g	1,1 g	2 %
Sól / Con / Só	0,53 g	0,10 g	2 %

\*Referenčná hodnota pre priemernú dospelú osobu (8400 kJ / 2000 kcal). / Референтни количества за прием на среднестатистически възрастник (8400 kJ / 2000 kcal). / Referenciai bevitteli érték egy Átlagos felnőtt számára (8400 kJ / 2000 kcal). 3 kuski = 20 g. Опаковка съдържа 5 x 3 парчета. / 3 kuska = 20 g. A csomagolás 5x3 kecskát tartalmaz.

Ingredients (English): Milk, milk powder, cocoa powder, cocoa butter, sugar, palm oil, soy lecithin, vanilla. / **MIŁKA SÓJOKRIDA**

Obrázek 14. Zadní etiketa mléčné čokolády Milka.

### 5.1 Extrakce polyfenolických látek

Obecně platí, že nejvíce používanou extrakční metodou pro získání polyfenolických látek z rostlinných vzorků je extrakce pevné látky kapalinou vzhledem k jednoduchosti jejího použití. K této metodě se využívá mnoho různých činidel, jako jsou například ethanol, methanol, aceton nebo jejich příslušné směsi s vodou jsou hlavními rozpouštědly této procedury. Účinnost extrakce z rostlinných vzorků může být ovlivněna typem rozpouštědla, metodou extrakce, podmínkami během extrakčního procesu, velikostí částic vzorku nebo přítomností interferujících částic.

Extrakce pomocí činidla má několik nevýhod, třeba nutnost použití velkého množství rozpouštědla, dlouhé extrakční časy a stejně tak možnost degradace polyfenolických látek během procesu extrakce. Tyto nevýhody vedly k vývoji alternativních metod extrakce jako je extrakce nadkritickou tekutinou, extrakce tekutinou pod tlakem, mikrovlnami asistovaná extrakce a ultrazvukem asistovaná extrakce. Při těchto procedurách je nutné zjistit výtěžnost extrakce, tak aby mohlo být možné zpětně dopočítat opravdové množství v daném vzorku

čokolády. Účinnost extrakce se provádí na modelových vzorcích, kdy se spočítá návratnost nebo pomocí standartního přídatku nějaké polyfenolické látky, většinou která se přirozeně nenachází ve vzorku (interní standard).

Je důležité mít na paměti, že polyfenoly se nevyskytují pouze uniformně v tkáních rostlin. Nerozpustné (známé také jako vázané) polyfenoly jsou součástí buněčné stěny rostlin, zatímco rozpustné (známe také jako nevázané) polyfenoly se vyskytují uvnitř buněčných vakuol. Nové technologie dokáží zvýšit efektivitu extrakce polyfenolů, ale většina nerozpustných polyfenolů se těmito metodami extrahovat nedá.

Použitím procesu biokonverze, který byl vyvinut jako cesta k získání nerozpustných polyfenolických látek, můžeme dosáhnout jejich efektivního uvolnění. Tyto procesy jsou označovány jako reakce katalyzované biologickými systémy, což mohou být enzymy či mikroorganismy (pomocí účinku jejich hydrolyzačních enzymů). Enzymy produkované těmito procesy jsou schopny rozkládat spojení mezi komponenty buněčné stěny a nerozpustnými polyfenoly.

Proces přípravy čokolády ke stanovení začíná vytvořením vzorků z čokolády nadrcením na malé kousky, tyto vzorky jsou před samotným stanovením uchovány v lednici při  $-20^{\circ}\text{C}$ , pokud nejsou okamžitě dále zpracovávány. V případě přípravy vzorku pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC), se nejdříve lipidická část (10 g čokolády) odstraní vytřepáním do 50 ml hexanu po dobu půl hodiny. Po odstranění organického rozpouštědla, se polyfenolické látky obsažené v 0,5 g zbylé čokolády dále extrahuje 80% acetonem půl hodiny při  $80^{\circ}\text{C}$ . Poté je vzorek zfiltrován a připraven k analýze [52].

Výše uvedený postup však nebude vyhovovat analýze pomocí PPO biosenzorů, protože TYR, LAC a COX jsou enzymy, které běžná organická rozpouštědla mísitelná s vodou inaktivují. V tomto případě je mnohem schůdnější použít extrakci směsí voda/aceton/ledová kyselina octová (70 % + 29,8 % + 0,2 % v/v/v). Polyfenolické látky se touto směsí (50 ml) extrahují z 5 g čokolády v ultrazvukové lázni po dobu 30 min při teplotě  $30^{\circ}\text{C}$ . Poté je aceton odpařen při  $60^{\circ}\text{C}$  (teplota varu acetonu  $56,53^{\circ}\text{C}$ ) po 20 min (Obrázek 15). Dále je zbylý roztok doplněn na objem vodou na 100 ml, kdy předtím je zneutralizován  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$  NaOH na požadované pH (pro TYR pH 7, pro LAC pH 5 a pro COX pH 7). Po odstředění sedimentu je supernatant zfiltrován a je možné jej analyzovat [53].



extrakce polyfenolů z 5 g  
čokolády (74% kakaá)



centrifugace při 5000 rpm  
po dobu 4 minuty



filtrace supernatantu  
(velikost póru do 1 µm)

**Obrázek 15.** Jednotlivé kroky k přípravě čokolády k analýze.

## ZÁVĚR

Cílem práce bylo zjistit možnosti využití enzymových amperometrických biosenzorů při stanovení celkového obsahu fenolických látek v čokoládách. Bylo zjištěno, že jako nejlépe použitelné analytické metody se jeví ty využívající enzymově modifikovaných uhlíkových pastových elektrod s amperometrickou detekcí. Vzhledem k jejich dostatečné citlivosti, mobilitě a nízkým provozním nákladům představují nejvhodnější pomocníky dnešní doby při těchto detekcích. Uvedené metody jsou dostatečnou konkurencí konvenčních postupů využívajících například měření pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Dalším rozumným krokem tohoto výzkumu by mohlo být experimentální vyšetření, které by zjistilo jestli existuje případná korelace hodnot obsahu fenolických látek a množství kakaava v čokoládách.

Práce splnila stanovený cíl a byla pro mě přínosem z hlediska prohloubení znalostí v oblasti analytických instrumentálních metod a biochemie.

## REFERENCE

- [1] T. Federica, A. Lante, Recent advances in controlling polyphenol oxidase activity of fruit and vegetable products, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **50**, 2018, 73-83.
- [2] M. Sýs, K. Vytřas, Tyrosinase electrochemical biosensors monitoring medicinally significant substances, *Current Medicinal Chemistry*, **25**, 33, 2018, 3988-4006.
- [3] J. P. Gillespie, et al., *Comparative Biochemistry and Physiology*, **98**, 1991, 351-358.
- [4] K. Min, G. W. Park, Y. J. Yoo, J. S. Lee, A perspective on the biotechnological applications of the versatile tyrosinase, *Bioresource Technology*, **289**, 2019, 121730.
- [5] Á. Sánchez-Ferrer, J. N. Rodríguez-López, F. García-Cánovas, F. García-Carmona, Protein structure and molecular enzymology, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1247**, 1995, 1.
- [6] D. Suman Kr, A. Mukherjee, Catechol oxidase and phenoxazinone synthase: Biomimetic functional models and mechanistic studies, *Coordination Chemistry Reviews*, **310**, 2016, 80-115.
- [7] M. Sýs, R. Metelka, A. Frangu, K. Vytřas, T. Arbnesi, Electrochemical study of *trametes versicolor* laccase compatibility to different polyphenolic substrates, *Chemosensors*, **5**, 2017, 2.
- [8] S. Z. Mazlan, Y. H. Lee, S. A. Hanifah, A new laccase based biosensor for tartrazine, *Sensors*, **17**, 2017.
- [9] C. S. Karigar, S. S. Rao, *Enzyme Research*, **2011**, 2011, 1-11.
- [10] V. Ioana, S. A. V. Eremia, M. Kusko, A. Radoi, E. Vasile, G. L. Radu, Molybdenum disulphide and graphene quantum dots as electrode modifiers for laccase biosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, **75**, 2016, 232-237.
- [11] C. Molitor, S. G. Mauracher, and A. Rompel, Aurone synthase is a catechol oxidase with hydroxylase activity and provides insights into the mechanism of plant polyphenol oxidases, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **113**, 13, 2016, 1806-1815.
- [12] M. D. Rubianes, G. A. Rivas. Amperometric biosensor for phenols and catechols Based on iridium-polyphenol oxidase-modified carbon paste, *Electroanalysis*, **12**, 2000, 1159-1162.

- [13] Y. Yongli, J. Ji, Z. Sun, P. Shen, X. Sun, Recent advances in electrochemical biosensors for antioxidant analysis in foodstuff, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **122**, 2020.
- [14] N. Broli, L. Vallja, A. Shehu, M. Vasjari, Determination of catechol in extract of tea using carbon paste electrode modified with banana tissue, *Journal of Food Processing and Preservation*, **43**, 6, 2019, 2.
- [15] M. Vasjari, N. Parroj, Phenolic biosensor based on carbon paste electrode modified with crude tissue, 2012, 4.
- [16] O. Fatibello-Filho, K. O. Lupetti, I. C. Vieira, Chronoamperometric determination of paracetamol using an avocado tissue (*Persea americana*) biosensor, *Talanta*, **55**, 2001, 685-692.
- [17] J. B. Bakhsh Raof, A. Kiani, R. Ojani, R. Valiollahi, Electrochemical determination of dopamine using banana MWCNTs modified carbon paste electrode, *Analytical and Bioanalytical Electrochemistry*, **3**, 2011, 59-66.
- [18] I. Cruz Vieira, O. Fatibello-Filho, Biosensor based on paraffin graphite modified with sweet potato tissue for the determination of hydroquinone in cosmetic cream in organic phase, *Talanta*, **52**, 2000, 681-689.
- [19] C. S. Caruso, I. Cruz Vieira, O. Fatibello-Filho, O. Determination of epinephrine and dopamine in pharmaceutical formulations using a biosensor based on carbon paste modified with crude extract of Cara root (*Dioscorea bulbifera*), *Analytical Letters*, **32**, 1999, 39-50.
- [20] S. Topcu, M. K. Sezginurk, E. Dinckaya, Evaluation of a new biosensor-based mushroom (*Agaricus bisporus*) tissue homogenate: investigation of certain phenolic compounds and some inhibitor effects, *Biosensors Bioelectronics*, **20**, 2004, 592-597.
- [21] K. Lerch, L. Ettinger, Purification and characterization of a tyrosinase from *Streptomyces glaucescens*. *European Journal of Biochemistry*, **31**, 1972, 427-437.
- [22] K. Sevinc, C. Erkmen, B. Uslu, Frontiers in electrochemical enzyme based biosensors for food and drug analysis, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **124**, 2020, 115718.
- [23] M. Stoytcheva, R. Zlatev, M. Beleno, G. Montero, Detection of Phenolic Compounds by tyrosinase modified clark type electrode, *Current Analytical Chemistry*, **11**, 1, 2014, 50-55.
- [24] K. U. Zaidi, A. S. Ali, Comparative evaluation of purified and characterized tyrosinases from two edible mushrooms, *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus*

- and their clinical potential, *Bioscience Biotechnology Research Communications*, **8**, 2015, 161-170.
- [25] E. Selinheimo, M. Saloheimo, E. Ahola, A. Westerholm-Parvinen, N. Kalkkinen, K. Buchert, K. Kruus, Production and characterization of a secreted, C-terminally processed tyrosinase from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*, *the FEBS Journal*, **273**, 2006, 4322-4335.
- [26] J. A. Kenney, Jr. Melanin pigmentation, *Journal of National Medical Association*, **53**, 1961, 447-455.
- [27] N. Catalin, J. Emnéus, L. Gorton, A. Ciucu, Improved stability and altered selectivity of tyrosinase based graphite electrodes for detection of phenolic compounds, *Analytica Chimica Acta*, **387**, 1999, 309-326.
- [28] S. André, L. Rodrigo, A. A. Munoz, Craig E. Banks, E. M. Richter, An overview of recent electroanalytical applications utilizing screen-printed electrodes within flow systems, *ChemElectroChem*, **7**, 2020, 2211-2221.
- [29] M. T. Laranjo, F. Morawski, S. Dias, E. Benvenuti, L. Arenas, T. Costa, Silica/Titania Graphite Composite Modified with Chitosan and Tyrosinase Employed as a Sensitive Biosensor for Phenolic Compounds, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **30**, 12, 2019.
- [30] M. Camila, D. V. Rahemi, J. Hereijgers, T. Breugelmans, S. A. S. Machado, K. De Wael. Integration of a photoelectrochemical cell in a flow system for quantification of 4-aminophenol with titanium dioxide, *Electrochemistry Communications*, **117**, 2020, 106767.
- [31] Autor Neuveden, *perfect-lab* [online], [cit. 4.7.2020], Dostupný na <http://perfect-lab.pl/wp-content/uploads/2015/10/CellBlock-300x230.jpg>.
- [32] Cflwcl-We-Tef, *metrohm* [online], [cit. 5.7.2020], Dostupný na [http://cdn.www.metrohm.com/easydb/CFLWCL\\_WE/450](http://cdn.www.metrohm.com/easydb/CFLWCL_WE/450).
- [33] E. Anastasios, M. Nika, A fully automated sequential-injection analyser for dual electrogenerated chemiluminescence/amperometric detection, *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry*, **2006**, 2006, 1-9
- [34] S. Idinyang, Automated Liquid Handling Systems for Microfluidic Applications, doctoral thesis, University of Nottingham, 2017, 40.

- [35] Z. Gulsunoglu, F. Karbancioglu-Guler, K. Raes, M. Kilic-Akyilmaz, Soluble and insoluble-bound phenolics and antioxidant activity of various industrial plant wastes, *International Journal of Food Properties*, **22**, 1, 2019, 1501-1510.
- [36] R. Mark, X. Lyu, J. J. L. Lee, R. Parra-Saldívar, W. N. Chen, Sustainable production of natural phenolics for functional food applications, *Journal of Functional Foods*, **57**, 2019, 233-254.
- [37] S. J. Maleki, J. F. Crespo, B. Cabanillas, Anti-inflammatory effects of flavonoids, *Food Chemistry*, **299**, 2019, 125124.
- [38] Autor neueden, *robertbarrington* [online], [cit. 5.7.2020]. Dostupný na <http://www.robertbarrington.net/b-ring-hydroxylation-of-flavonoids-and-hypertension/>
- [39] H. Krawczyk, The stilbene derivatives, nucleosides, and nucleosides modified by stilbene derivatives, *Bioorganic Chemistry*, **90**, 2019, 103073.
- [40] R. T. Neto, S. A. O. Santos, J. Oliveira, A. J. D. Silvestre, Biorefinery of high polymerization degree proanthocyanidins in the context of circular economy, *Industrial Crops and Products*, **151**, 2020, 112450.
- [41] R. Bansode, J. Khatiwada, J. Losso, L. Williams, Targeting microRNA in cancer using plant-based proanthocyanidins, *Diseases*, **4**, 4, 2016, 21.
- [42] P. L. de Hoyos-Martínez, J. Merle, J. Labidi, F. Charrier – El Bouhtoury, Tannins extraction: A key point for their valorization and cleaner production, *Journal of Cleaner Production*, **206**, 2019, 1138-1155.
- [43] Autor neueden, *feedadditive* [online], [cit. 8.7.2020]. Dostupný na <http://www.feedadditive.com/wp-content/uploads/2016/01/Tannins.gif>
- [44] S. B. Nimse, D. Pal, Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms, *RSC Advances*, **5**, 35, 2015, 27986-28006.
- [45] F. Shahidi, P. Ambigaipalan, Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review, *Journal of Functional Foods*, **18**, 2015, 820-897.



- [46] S. Aryal, M. K. Baniya, K. Danekhu, P. Kunwar, R. Gurung, N. Koirala, Total Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Potential of Wild Vegetables from Western Nepal, *Plants*, **8**, 4, 2019.
- [47] C. P. Rubio, J. Hernández-Ruiz, S. Martínez-Subiela, A. Tvarijonavičiute, J. J. Ceron, Spectrophotometric assays for total antioxidant capacity (TAC) in dog serum: an update, *BMC Veterinary Research*, **12**, 1, 2016.
- [48] V. Barišić, M. Kopjar, A. Jozinović, I. Flanjak, Đ. Ačkar, B. Miličević, D. Šubarić, S. Jokić, J. Babić, The Chemistry behind Chocolate Production, *Molecules*, **24**, 17, 2019, 3163.
- [49] J. Wollgast, E. Anklam, Polyphenols in chocolate: Is there a contribution to human health?, *Food Research International*, **33**, 6, 2000, 449-459.
- [50] M. Lipp and E. Anklam, Review of cocoa butter and alternative fats for use in chocolate—Part A. Compositional data, *Food Chemistry*, **62**, no. 1, 1998, 73-97.
- [51] D. C. G. Okiyama, S. L. B. Navarro, and C. E. C. Rodrigues, Cocoa shell and its compounds: Applications in the food industry, *Trends in Food Science & Technology*, **63**, 2017, 103-112.
- [52] K. Azin, S. H. Razavi, The role of bioconversion processes to enhance bioaccessibility of polyphenols in rice, *Food Bioscience*, **35**, 2020, 100605.
- [53] R. González-Barrio, V. Nuñez-Gomez, E. Cienfuegos-Jovellanos, F. J. García-Alonso, M. <sup>a</sup> J. Periago-Castón, Improvement of the Flavanol Profile and the Antioxidant Capacity of Chocolate Using a Phenolic Rich Cocoa Powder, *Foods*, **9**, 2, 2020.