



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM TĚKAVÝCH LÁTEK ČOKOLÁDY  
V ZÁVISLOSTI NA GEOGRAFICKÉM  
PŮVODU KAKAOVÝCH BOBŮ

STUDY OF VOLATILE COMPOUNDS OF CHOCOLATE DEPENDING ON  
GEOGRAPHICAL ORIGIN OF COCOA BEANS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Martina Kubínová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.

BRNO 2020

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1438/2019 Akademický rok: 2019/20  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Bc. Martina Kubínová**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: **doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Studium těkavých látek čokolády v závislosti na geografickém původu kakaových bobů

### Zadání diplomové práce:

- Zpracujte literární přehled dané problematiky:
  - charakteristika, složení a vlastnosti kakaových bobů a čokolády
  - stručný technologický postup výroby čokolády
  - vznik a vývoj čokoládového aroma a chuti v průběhu výroby
  - možnosti stanovení aromaticky aktivních látek v čokoládě – princip, provedení, přehled aplikací
- Pomocí metody HS–SPME–GC–MS identifikujte a kvantifikujte těkavé látky ve vzorcích kakaových bobů/čokolády
- Srovnejte „aromatický profil“ vzorků, diskutujte vliv původu kakaových bobů na složení čokolády

### Termín odevzdání diplomové práce: 31.7.2020:

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

-----  
Bc. Martina Kubínová  
student(ka)

-----  
doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Tato diplomová práce je zaměřena na studium těkavých látek kakaových bobů z různých oblastí (Tanzanie, Haiti, Ekvádoru, Madagaskaru a Peru) a čokolád vyrobených z nich. Hlavním cílem bylo posoudit rozdíly mezi vzorky v závislosti na geografickém původu kakaových bobů. Zároveň byly analyzovány vzorky čokolád s různým obsahem kakaové sušiny (50%, 70% „bio“, 70%, 78%, 90%) a vzorek kakaového prášku z běžné tržní sítě.

Těkavé látky byly identifikovány a semikvantifikovány pomocí metody HS-SPME-GC-MS. Celkem bylo ve vzorcích identifikováno 86 těkavých látek, podle charakteru vůně byly rozděleny do 7 skupin: nejpočetnější byly látky s ovocnými tóny (17), dále ořechové a čokoládové (16), neurčené (14), svíravé a kyselé (12), sladké a medové (10), zemité (9) a květinové (8). Analýzou hlavních komponent byla potvrzena rozdílnost těkavých látek kakaových bobů v závislosti na geografickém původu.

## **ABSTRACT**

Diploma thesis is focused on cocoa beans volatile compounds from various region (Tanzania, Haiti, Ecuador, Madagascar and Peru) and chocolate bars made of them. The main aim was to judge differences between samples according to geographical origin. At the same time, samples of chocolates with different content of cocoa solids (50%, 70% „organic“, 70%, 78%, 90%) and a sample of cocoa powder from the common market were analyzed.

Volatiles were identified and semiquantified by HS-SPME-GC-MS. A total of 86 volatile substances were identified, they were divided into 7 groups according to the nature of the odor: fruit tones (17), nut and chocolate (16), astringent and sour (12), unspecified (14), sweet nad honey (10), earthy (9) and floral (8). The data were transformed into a 2D graph by analyzing the main component according to selected distinguishing variables. The differences between volatile substances of cocoa beans depending on the geographical origin were confirmed using principal component analysis.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

*Theobroma cacao*, kakaové boby, těkavé látky, SPME, GC-MS.

## **KEYWORDS**

*Theobroma cacao*, cocoa beans, volatile substances, SPME, GC-MS.

KUBÍNOVÁ, Martina. *Studium těkavých látek čokolády v závislosti na geografickém původu kakaových bobů* [online]. Brno, 2020 [cit. 2020-04-07]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/124108>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D..

## **PROHLÁŠENÍ**

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

.....

podpis studenta

## **OBSAH**

<b>1. ÚVOD</b>	<b>8</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST</b>	<b>9</b>
<b>2.1 Kakaový bob</b>	<b>9</b>
2.1.1 Biologie a taxonomie	9
2.1.1.1 Stavba plodu a histologická studie	9
2.1.1.2 Genetika	10
2.1.2 Kvalitativní dělení kakaových bobů	11
2.1.3 Chemické složení nefermentovaných kakaových bobů	11
2.1.3.1 Lipidy	12
2.1.3.2 Sacharidy	13
2.1.3.3 Proteiny	14
2.1.3.4 Minerály	14
2.1.3.5 Sekundární metabolity	14
<b>2.2 Vývin těkavých látek</b>	<b>17</b>
2.2.1 Vývin těkavých látek posklizňovými úpravami	17
2.2.1.1 Průběh fermentace a mikrobiom	18
2.2.1.2 Lipidy	19
2.2.1.3 Sacharidy, cukry	19
2.2.1.4 Bílkoviny, peptidy, aminokyseliny	19
2.2.1.5 Flavonoidy, alkaloidy, tokoferol	21
2.2.1.6 Sušení	22
2.2.2 Vývin těkavých látek technologickou výrobou čokolád	22
2.2.2.1 Pražení	22
2.2.2.2 Konšování	24
<b>2.3 Čokoláda</b>	<b>24</b>
2.3.1 Legislativa	25
2.3.2 Technologie výroby	25
2.3.2.1 Suroviny	26
2.3.2.2 Technologie a zařízení	26
2.3.3 Chemické složení čokolády	28
2.3.3.1 Lipidy	28
2.3.3.2 Sacharidy	29

2.3.3.3	Proteiny	29
2.3.3.4	Flavonoidy, alkaloidy	29
<b>2.4</b>	<b>Metody stanovení těkavých látek v čokoládě</b>	<b>30</b>
2.4.1	Úprava vzorku, extrakce a izolace těkavých látek	30
2.4.2	Stanovení těkavých látek	31
2.4.3	Použitá metoda	32
2.4.3.1	Head-space mikroextrakce tuhou fází	33
2.4.3.2	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí	34
<b>3.</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>Laboratorní vybavení</b>	<b>35</b>
3.1.1	Přístroje	35
3.1.2	Chemikálie	35
3.1.3	Pracovní pomůcky	35
<b>3.2</b>	<b>Podmínky analýzy</b>	<b>35</b>
3.2.1	Podmínky HS-SPME extrakce	35
3.2.2	Podmínky GC-MS analýzy	35
<b>3.3</b>	<b>Vyhodnocení výsledků analýzy</b>	<b>36</b>
<b>3.4</b>	<b>Analyzované vzorky</b>	<b>36</b>
<b>3.5</b>	<b>Statistické zpracování výsledků</b>	<b>47</b>
<b>4.</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b>	<b>48</b>
<b>4.1</b>	<b>Identifikace těkavých látek ve vzorcích</b>	<b>48</b>
<b>4.2</b>	<b>Srovnání početního zastoupení těkavých látek ve vzorcích</b>	<b>62</b>
4.2.1	Kakaové boby vs. příslušná čokoláda	64
4.2.2	Kakaové boby různého geografického původu	65
4.2.3	Vzorky čokolád různého geografického původu	66
4.2.4	Vzorky čokolád různého geografického původu vs. čokoláda z běžné tržní sítě	67
4.2.5	Kakaové boby vs. komerční kakaový prášek	68
<b>4.3</b>	<b>Srovnání obsahu těkavých látek ve vzorcích</b>	<b>69</b>
4.3.1	Kakaové boby vs. příslušná čokoláda	69
4.3.2	Srovnání obsahu těkavých látek ve vzorcích kakaových bobů	70
4.3.3	Srovnání obsahu těkavých látek ve vzorcích čokolád o různém původu kakaových bobů	72
4.3.4	Čokolády různého geografického původu vs. čokolády z běžné tržní sítě	73

4.3.5 Srovnání obsahu těkavých látek kakaového prášku a kakaových bobů	75
<b>4.4 Srovnání aromatického profilu</b>	<b>76</b>
<b>4.5 Analýza hlavních komponent PCA</b>	<b>78</b>
<b>5. ZÁVĚR</b>	<b>81</b>
<b>6. PŘÍLOHA</b>	<b>82</b>
<b>7. SEZNAM ZKRATEK</b>	<b>91</b>
<b>8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b>	<b>92</b>

## 1. ÚVOD

Čokoláda je oblíbená cukrovinka i vysoce ceněná potravina. Kakaové boby, jako hlavní surovina, a jejich obsah polynenasycených mastných kyselin, tokoferolů, vitamínů, minerálů a polyfenolů, mají pozitivní vliv na kardiovaskulární systém, disponují antioxidační aktivitou a řadí se proto mezi superpotraviny.

Výrobou čokolády se zabývají velké firmy i rodinné manufaktury a jejich produkty vyhrávají mezinárodní ceny. Konzumace kvalitních čokolád se stala dostupnější a degustace čokolád je nabízena jako zážitek. Degustátor může rozlišit tóny květinové, kořenité, ovocné, bylinné, zemité, čokoládové, alkoholové a další. Hodnoceny jsou i fyzikální vlastnosti jako je lom, lesk, barva, textura i zvuková stopa při rozlomení čokolády. Degustaci čokolády lze připodobnit k degustaci vín, kde odrůda, společně se stanovištěm rostliny, umožní vytvoření charakteristických organoleptických vlastností. Jsou známy chuťové tóny čokolád vyrobených z kakaových bobů z různých zemí a regionů.

Pro výrobu kvalitní čokolády je třeba správný výběr kakaových bobů a třtinového cukru. Vývin aroma během technologického procesu je však omezen prekurzory aroma z kakaových bobů. Posklizňové úpravy kakaových bobů, fermentace a sušení, jsou esenciální kroky pro vývin prekurzorů aromatu. Podílejí se sloučeniny vlastní kakaovým bobům a pulpy, sacharidy, bílkoviny, lipidy i polyfenoly, a produkty jejich enzymatických i neenzymatických reakcí, látky syntetizované mikrobiomem, který se na kakaových bobech obvykle přirozeně objeví. Mikrobiom je charakteristický nástupem kvasinek, bakterií mléčného a octového kvašení. Může však dojít k napadení plísněmi, což může mít negativní vliv na aroma produktu.

Hlavním cílem této práce bylo stanovit profil těkavých látek vybraných čokolád/kakaových bobů z různých oblastí a posoudit rozdíly mezi vzorky v závislosti na geografickém původu kakaových bobů.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

Tato práce je zaměřena na stanovení profilu těkavých látek čokolády a kakaových bobů jako hlavní suroviny pro její výrobu. V teoretické části práce je kakaový bob popsán z pohledu biologického, genetického, ekonomického a chemického. Chemické složení čerstvých kakaových bobů ovlivňují posklizňové úpravy, fermentaci a sušení, kde dochází k vývinu prekurzorů specifického aroma výsledného produktu. Následuje popis technologického postupu výroby čokolády, její vlastnosti, legislativa. Poslední kapitola je věnována stanovení těkavých látek.

### 2.1 Kakaový bob

Kakaový bob je semenem tropického stromu kakaovníku pravého *Theobroma cacao*. Jeho domovinou je sever Jižní Ameriky (deštný prales v povodí Amazonky a Orinoka), kde byl před příchodem Evropanů využíván Mayi při náboženských obřadech, Aztéky jako platidlo, případně pokrm šlechty i prostředek k vyhlašování válek. Nápoj „čokolatl“ byl připravován z kakaových bobů, červené papriky, pepře a dalších bylin pro potřeby vysoké šlechty a krále. Tajemství kakaového povzbuzujícího nápoje svěřila dobyvateli Cortezovi jeho milenka a domorodá tlumočnice dona Marina. Ze Španělska došlo k rozšíření povědomí i receptury do Evropy. V dnešní době je pěstování kakaovníku pravého rozšířeno do všech kontinentů v pásu mezi 15° severní a jižní šířky.<sup>1,2</sup>

Dle platné legislativy České republiky se kakaovými boby rozumí fermentovaná a sušená semena kakaovníku pravého (*Theobroma cacao* L.).<sup>3</sup>

#### 2.1.1 Biologie a taxonomie

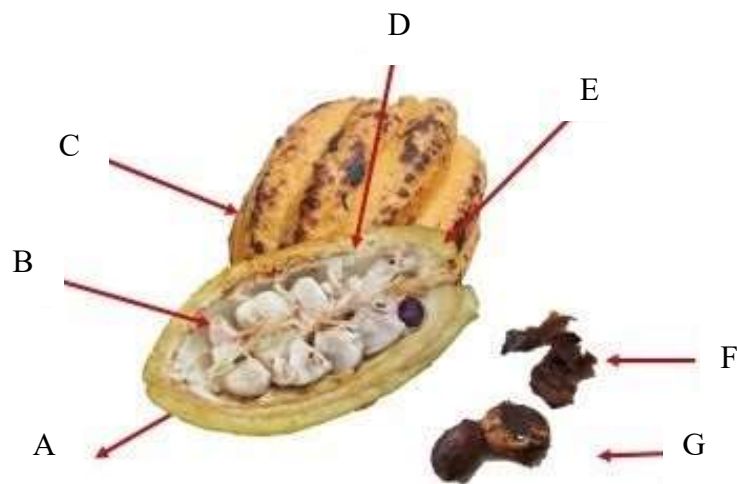
*Theobroma cacao* patří do řádu slézotvaré *Malvales* a čeledi slézovitých *Malvaceae*. Je to až 15 m vysoký strom s krátkým kmenem, ze kterého vyrůstají květy 1,5 cm velké, kališní lístky až 7 mm dlouhé, korunní plátky členěné ve spodní díl kýpovitého tvaru s růžovým nádechem a krémově zbarvený horní díl na stopce (kauliflorie). Plody jsou až 30 cm dlouhé, podlouhlé, nepukavé bobule, s tupou bází, většinou zašpičatělé, při zralosti zelené, žluté až hnědočervené s asi 2 cm tlustou slupkou a bílou dužninou, ve které jsou po 15-40 kusech až 3 cm velká semena.<sup>4,5</sup>

##### 2.1.1.1 Stavba plodu a histologická studie

Epikarp je silný s pigmentací. Mezokarp je složen z velkých buněk bohatých na vodu a menších buněk, které obsahují těsně pod membránou vezikuly s polyfenolickými látkami. Mezokarp neobsahuje katechiny, epikatechiny ani proanthokyanidiny. Endokarp je složen z velkých tubulárních buněk s velkými intercelulárními prostory, jejichž stěna obsahuje pektiny. Buňky endokarpu tvoří slizovitou dužninu, pevně přilnutou k semenům. Stavba plodu kakaovníku je na obrázku (viz Obrázek 1).

Plášť semene je tvořen jednou vrstvou prodloužených buněk „exotesta“ a mezofylem tvořeným zdřevnatělými hvězdovitými buňkami s početnými cévními svazky. Osemení je rozdělené na vnější epidermis, tvořený jednou vrstvou sklereidů s polyfenolickými látkami, několika vrstev poškozených buněk a jednovrstvou vnitřní epidermis. Osemení obsahuje velké množství  $\alpha$ -tokoferolu, kyselinu syringovou, ale neobsahuje katechiny a má vysokou antioxidační aktivitu. Endosperm je tvořen jednou vrstvou buněk se silnější vnější stěnou.

Kotyledon je těsně složen u zárodku a později se stává masitějším a tmavne díky syntéze anthokyanů, je tvořen dvěma vrstvami jednovrstvé emidermis a mezofylem bohatými na zásobní látky, který je složen z buněk s vakuolami s polyfenolickými látkami a anthokyany a menšími izodiametrickými buňkami bohatými na cytoplazmu a škrobová zrna. Kotyledon obsahuje nejvyšší množství tokoferolů ( $\beta$  a  $\delta$  izoforma). Zárodek je tvořen izodiametrickými, pevně přilnutými buňkami v paralelních vrstvách, které obsahují polyfenolické látky v povrchových vrstvách a škrobová zrna, neobsahuje však epikatechiny.<sup>6,7</sup>



*Obrázek 1: Stavba bobule kakaovníku. (A – Epikarp, B – Dužnina se semeny, C – Slupka bobule, D – Endokarp, E – Mezokarp, F – Skořápka kakaového bobu, G – Kakaový bob).*<sup>8</sup>

### 2.1.1.2 Genetika

Genofond rostliny ovlivňuje její pěstování i výnosy, nižší náchylnost k onemocnění rostliny, napadení škůdci, syntézu bioaktivních látek, které se podílejí na utváření žádoucího aroma při zpracování kakaových bobů. Šlechtěním kakaovníku byly získány genotypy s vysokou variabilitou ve složení kakaových bobů. Při šlechtění je sledován výnos rostliny (hmotnost kakaových bobů na plochu plantáže za časové období), výška „jorquette“, počet kakaových bobů v bobuli, velikost kakaových bobů (hmotnost/množství bobů) a koncentrace bioaktivních látek jako jsou flavonoidy, které se podílejí na obraně rostliny proti hmyzu a houbám, metylxanthiny, další polyfenoly (monomery i oligomery fenolických kyselin) a také organoleptický profil.<sup>9,10</sup>

Klasifikace genetického původu populací kakaovníku je možná pomocí „DNA fingerprinting“ metod, přičemž v roce 2008 nebylo možné označit asi 15-44 % spolehlivě („off types“). Mezi tyto metody patří „simple sequence repeats“ SSRs repetice jednoduchých sekvencí a „single nucleotide polymorphisms“ SNPs jednonukleotidový polymorfismus. Tímto způsobem byla studována zárodečná plazma kakaovníku a porovnávána s databází Mezinárodní databáze zárodečné plazmy kakaovníku ICGD a bylo odděleno 10 genetických populací v Amazonii, kterými jsou: *Amelonado*, *Contamana*, *Criollo*, *Curaray*, *Guiana*, *Iquitos*, *Marañon*, *Nacional*, *Nanay* a *Purús*.<sup>11</sup> Pro snížení nespolehlivě označených byla použita metoda „Duble mismatch allele specific quantitative PCR“ DMAS qPCR a došlo tak ke snížení na 15,38 %.<sup>12</sup>

### 2.1.2 Kvalitativní dělení kakaových bobů

Trh rozděluje kakaové boby na dvě kategorie z hlediska kvality: „fine and flavour“ a „bulk“ („ordinary“). Dle Mezinárodní organizace pro kakao (ICCO) jsou kritéria pro dělení kvality kakaových bobů tyto: genetický původ rostliny, morfologie rostliny, charakteristická chuť kakaových bobů, chemická charakteristika kakaových bobů, barva kakaových bobů, stupeň fermentace, sušení, kyselost, pachů, procento vnitřní plísňe, napadení hmyzem a procento nečistot. Nejdůležitější z kvalitativních charakteristik je však chuť a vůně, přičemž kvalitnější boby disponují ovocnými, květinovými, bylinnými, dřevnatými, oříškovými, karamelovými tóny s bohatým a vyváženým čokoládovým aroma. Stanovení některých kritérií je tedy subjektivní. Do první kategorie zahrnující kvalitnější kakaové boby patří semena kakaovníku var. *Criollo* a *Trinitario*, zatímco do druhé kategorie patří semena kakaovníku var. *Forastero*. Existují však výjimky tohoto dělení a další regionální odrůdy kakaovníku a jejich kříženci.

Dnešní produkce kakaových bobů kvality „fine and flavour“ činí asi 5 % celkové světové produkce kakaových bobů. Došlo k poklesu produkce těchto kakaových bobů z důvodu vysokého nároku na pěstování (změna na intenzivní monokulturní zemědělství, lepší rezistence vůči nepříznivým vlivům odrůd kakaovníku i zavádění výroby plněných čokoládových cukrovinek). Kvůli větší poptávce po původních recepturách, chuťovém zážitku i původu ze strany konzumenta a kompetici mezi manufakturami dochází k pomalému navýšení produkce kakaových bobů první kategorie.<sup>13</sup>

### 2.1.3 Chemické složení nefermentovaných kakaových bobů

Přibližné složení čerstvého kakaového bobu je následovné: voda (32-39 %), lipidy (30-32 %), bílkoviny (8-10 %), polyfenoly (5-6 %), škrob (4-6 %), pentozany (4-6 %), celulóza (2-3 %), sacharóza (1-2 %), teobromin (1-2 %), kyseliny (1 %), kofein (1 %).<sup>14</sup> Procentuální část složek čerstvých kakaových bobů se však podstatně liší v závislosti na genotypu, složení půdy, klimatu a podmínkách sklizně.<sup>15</sup>

### 2.1.3.1 *Lipidy*

Podstatná část lipidů kakaových bobů je syntetizována po 120. dni od opylení.<sup>19</sup> Tuk extrahovaný z kakaových bobů je označován jako kakaové máslo. Odchytky chemických a fyzikálních vlastností kakaového másla (složení triacylglycerolů, bod tání, charakteristiky krystalizace) jsou způsobeny genotypem rostliny a podmínkami prostředí, ve kterém je rostlina pěstována.<sup>15,16</sup> Triacylglyceroly a mastné kyseliny jsou v buňkách zachyceny v oleosomech, ohraničené proteinovou vrstvou i jako volné lipidy (jednotky procent), které nejsou zcela pokryty a stabilizovány amfifilní molekulou ani adsorbovány na proteinu anebo zcela chráněny matrixem na povrchu a uvnitř částice.<sup>17,18</sup>

#### **Mastné kyseliny**

Ve studii Almeida a kol.<sup>19</sup> byly extrahovány mastné kyseliny Soxhletovým extraktorem pomocí petroleteru po kyselé hydrolyze vzorku kakaových bobů. Průměrný obsah mastných kyselin činí 55,53 % sušiny s bodem tání 29,55 °C. V triacylglycerolech jsou zastoupeny primárně palmitová (27,55-29,63 %), stearová (37,21-34,19 %), olejová (30,92-33,59 %), linoleová (3,34-1,76 %), linolenová kyselina (0,09-0,17 %) a další mastné kyseliny s 12-24 uhlíky v řetězci<sup>16,20</sup>, až 4 dvojnými vazbami a až 3 hydroxylovými skupinami v řetězci s násobnými vazbami v surových kakaových bobech. Mastné kyseliny s hydroxylovými skupinami se v semenech vyskytují jen zřídka, avšak byly detekovány jako látky s obrannou funkcí ve vyšších rostlinách.<sup>21</sup>

Biosyntéza mastných kyselin probíhá v plastidech, odkud jsou mastné kyseliny transportovány do cytosolu a dále do endoplazmatického retikula, kde dochází k jejich modifikaci a výstavbě lipidů. Enzymatická biosyntéza mastných kyselin probíhá ve 4 krocích: kondenzace malonyl-ACP a acetyl-CoA za vzniku  $\beta$ -oxoacyl-ACP, který je redukován za současné oxidace NADPH na  $\beta$ -D-hydroxyacyl-ACP a následuje jeho dehydratace za vzniku enoyl-ACP, který je redukován za současné oxidace NADPH a vzniká acyl-ACP. Enzym KASIII kondenzuje jednotku acetyl-CoA a malonyl-ACP za vzniku 4:0-ACP. Enzym KASI umožňuje prodloužení 4:0-ACP na 16:0-ACP a enzym KASII umožní prodloužení 16:0-ACP na 18:0-ACP. První dvojná vazba 18:1-ACP vzniká působením enzymu  $\Delta$ 9stearoyl-ACPdesaturáza (SAD2). K terminaci prodloužení acylu dochází pomocí FATA a FATB thioesteráz. Arachidonová kyselina činností enzymu elongázy mastných kyselin (FAE). Polynenasycené mastné kyseliny vznikají v cytosolu pomocí desaturázy mastné kyseliny 2 (FAD2).<sup>22,23</sup>

#### **Triacylglyceroly, diacylglyceroly, monoacylglyceroly**

Acylglyceroly a fosfolipidy tvoří asi 97 % lipidů kakaových bobů.<sup>24</sup> Ve studii z roku 2018 bylo reportováno 83 různých triacylglycerolů ve vzorcích surových kakaových bobů s různým geografickým původem pomocí metody NARP-HPLC-ESI-MS.<sup>21</sup> Byl statisticky dokázán vztah mezi složením a obsahem mastných kyselin v triacylglycerolech, geografickým původem kakaových bobů a genotypem.<sup>25</sup>

Vliv geografického původu na poměrné zastoupení mastných kyselin v triacylglycerolech byl prokázán v mnoha studiích. Kakaové máslo z oblastí chladnějšího klimatu disponuje nižší teplotou tání díky vyššímu obsahu kyseliny olejové.<sup>26</sup> Obsah mastných kyselin v kakaovém bobu je vyšší při pěstování při vyšších teplotách a při vyšším množství srážek.

Konkrétně bylo pozorováno rapidní zvýšení obsahu kyseliny palmitové a mírnému navýšení obsahu kyseliny stearové při pěstování za vyšších teplot, naopak k poklesu obsahu olejové a linoleové kyseliny. Dešťové srážky mají pozitivní vliv na obsah palmitové, olejové a linoleové kyseliny, negativní však na obsah stearové a arachidonové kyseliny.<sup>6</sup>

### **Glykolipidy, fosfolipidy a nezmýdelnitelná frakce lipidů**

Glykolipidy, fosfolipidy a nezmýdelnitelná frakce lipidů tvoří 3 % celkových lipidů.<sup>24</sup> Tato frakce zahrnuje také sekundární metabolity, kterým je věnována samostatná kapitola 2.1.3.5. Glykolipidy a fosfolipidy obsahují polynenasycené mastné kyseliny ve větší míře než acylglyceroly. Během zrání je však hladina těchto látek snížena a dojde k navýšení obsahu polynenasycených mastných kyselin v acylglycerolech.<sup>27</sup> Tyto lipidy tvoří buněčné membrány společně s cholesterolem a proteinovými jednotkami. V případě zvýšení oxidačního stresu dojde k interakci polárního konce dimerů a trimerů prokyanidinů s fosfolipidy v membránách. Molekuly polyfenolů mohou dokonce proniknout hlouběji do dvojvrstvy. Buňka je tak chráněna před oxidanty a molekulami, které by mohly narušit fosfolipidovou dvouvrstvu, na druhou stranu částečně ztrácí svoji fluiditu.<sup>28</sup>

#### **2.1.3.2 Sacharidy**

Analýzou nízkomolekulárních sacharidů ze vzorků nefermentovaných kakaových bobů byla potvrzena přítomnost monosacharidů, disacharidů, trisacharidů, tetrasacharidů, cyklitolů a jejich derivátů obsahujících alkoholovou a imino skupinu. Mezi monosacharidy patří fruktóza, glukóza, galaktóza, cyklické inositoly jako např.: *scyllo*-inositol a *myo*-inositol a mannitol. Inositoly fungují jako mediátory metabolických drah, případně se účastní různých signálních drah v závislosti na podmínkách prostředí (stres, hormony, živiny) a to pomocí transkripční regulace genu. Obsah *scyllo*-inositolu byl ovlivněn geografickým původem kakaových bobů, resp. podmínkami prostředí. Mezi prokázané disacharidy patří sacharóza a melibióza, maltóza a galaktinol. Galaktinol není přítomen v kakaových bobech po jejich fermentaci. Mezi trisacharidy patří rafinóza, 1-kestóza, 6-kestóza, planteóza, glukosylsacharóza a jediným detekovaným tetrasacharidem je stachyóza. Dle obsahu je sacharóza nejvýznamnější oligosacharid (230-4086,8 mg ve 100 g sušiny), následuje rafinóza a stachyóza.<sup>29,30</sup>

Pektinové polysacharidy tvoří 60 % polysacharidů buněčné stěny buněk kotyledonu, kyselé polysacharidy, xylogalakturonan a glukoronylan jsou také přítomny. Celulóza tvoří 28 % polysacharidů buněčné stěny kotyledonu, xyloglukan 8 % a galaktoglukomannan 3 %. Pektiny jsou tvořeny rhamnogalakturonany s různými postranními řetězci neutrálních cukrů galaktózy a arabinózy. Hemicelulózy, jako xyloglukany a galaktoglukomannan, jsou tvořené xylózovými,

glukózovými a manózovými jednotkami. Škrob je uložen ve specializovaných buňkách kotyledonu.<sup>31</sup>

### 2.1.3.3 *Proteiny*

Složení a obsah bílkovin kakaových bobů je ovlivněn geografickým původem a genotypem.<sup>32</sup> Proteiny lze rozdělit dle funkce do těchto skupin: metabolismus a energie (55,7 %), syntéza proteinů (25,7 %), zásobní (0,9 %), membránový transport (2,9 %), signální přenos (1,0 %), stavební (3,6 %), DNA syntéza (1,0 %), růst a vývoj (1,1 %), obranná (4,9 %) a ostatní (3,2 %) a celkově bylo identifikováno 906 proteinů. V závorkách je uveden procentuální podíl z celkové bílkoviny.<sup>33</sup>

Pro extrakci proteinů z kakaových bobů je nutné ze vzorku nejprve odstranit tuk a polyfenoly, které mohou znemožnit jejich extrakci vytvářením komplexů.<sup>34</sup> Tuky jsou extrahovány Soxhletovou extrakcí petroletherem, polyfenoly pomocí úpravy na acetonový prach (ACDP „acetone-dried powder“).<sup>35</sup> Proteiny extrakcí roztokem močoviny, thiomčoviny a dithiotreitolu a trypsinovým štěpením, posledním krokem je analýza produktů štěpení UHPLC-MS/MS.<sup>36</sup>

Nejvíce zastoupené byly bílkoviny ze skupiny oleosinů, přičemž s vyšším obsahem olejů v semeni stoupá jejich obsah. Skupina bílkovin zajišťující metabolismus a energii je nejobsáhlejší a jejími nejvýznamnějšími zástupci jsou fosfoglycerátkinázy, glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázy a aldolázy, které se podílejí na glykolýze a Calvinově cyklu. Nejvýznamnějším enzymem ze skupiny bílkovin s funkcí syntézy proteinů je aspartylproteáza. Mezi proteiny s funkcí stresové odpovědi byly identifikovány především chitinázy a několik bílkovin s odpovědí na teplotní šok. Během fermentace dochází k degradaci zásobních proteinů pomocí endogenních proteáz a uvolnění peptidů a aminokyselin, které jsou důležitými prekurzory aroma. Hlavními zásobními proteiny jsou albumin (11,5 % celkového proteinu) a vicilin (3,9 % celkového proteinu).<sup>33</sup>

### 2.1.3.4 *Minerály*

Hladiny obsahu minerálů v kakaových bobech jsou charakterizovány minerálním bohatstvím půdy, ve které rostlina roste. Kakaové boby obsahují vysokou koncentraci draslíku (2558-2313 mg na 100 g), fosforu (237-382 mg na 100 g), hořčíku (287-349 mg na 100 g), vápníku (140-158 mg na 100 g) a menší množství železa, mědi, zinku i sodíku.<sup>37</sup>

### 2.1.3.5 *Sekundární metabolity*

#### **Polyfenoly**

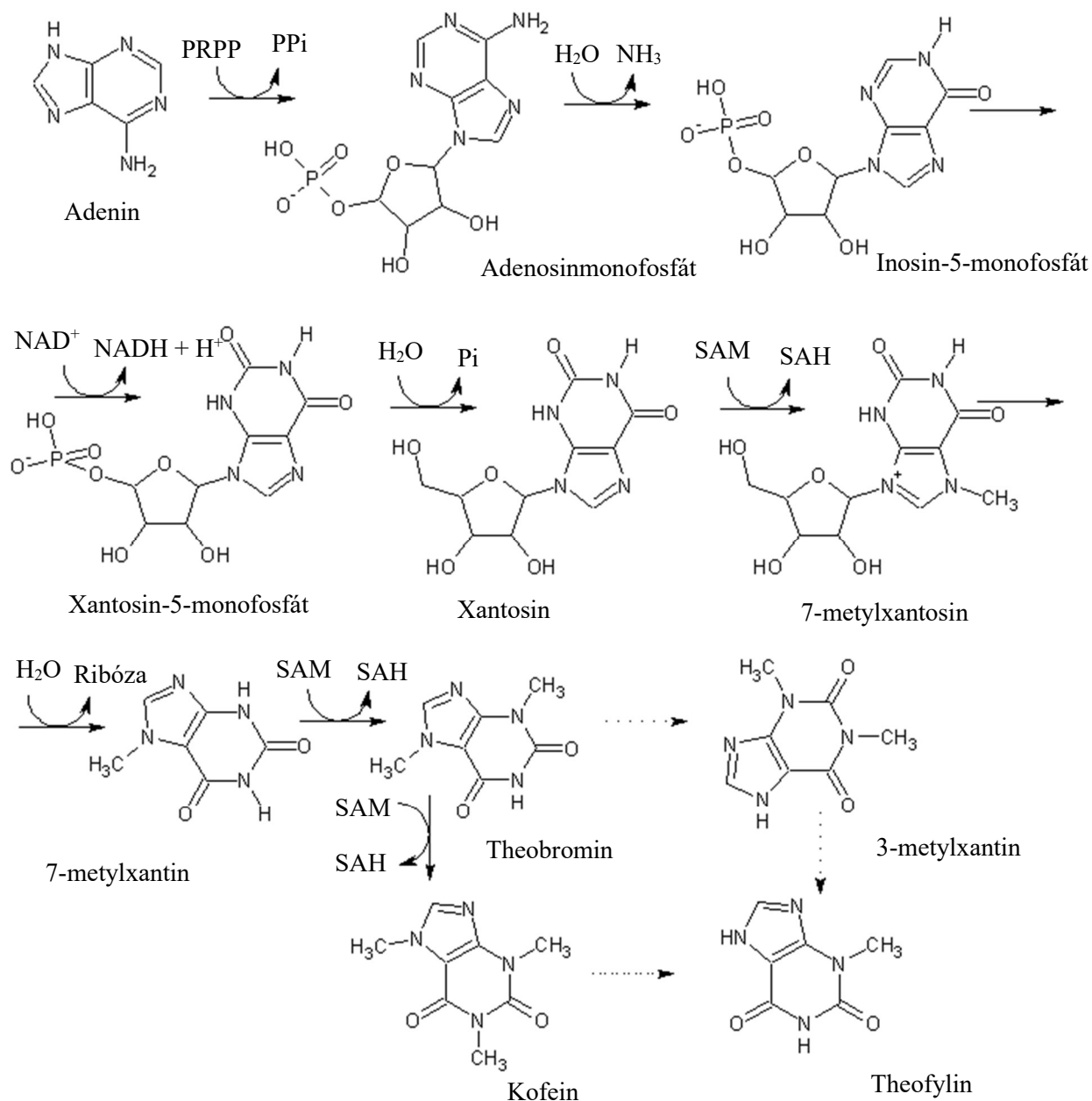
Polyfenoly vynikají svojí hořkou, svíravou chutí a přispívají k vývinu červenohnědé barvy kakaových bobů i čokolád. Monomery jsou syntetizovány šikimátovou a acetylpolymalonylovou dráhou s následnou oxidativní kondenzací mezi C<sub>4</sub> heterocyklu a C<sub>6</sub> či C<sub>8</sub>.<sup>64</sup> Biosyntéze epikatechinu vyžaduje anthokyanidisyntázu, která katalyzuje syntézu kyanidinu

a anthokyanidinreduktázu, která katalyzuje přeměnu kyanidinu na epikatechin.<sup>38</sup> Molekuly jsou uloženy v pigmentových buňkách kotyledonu a jsou příčinou zabarvení kakaových bobů před fermentací od bílé po tmavě fialovou.

Katechiny tvoří 37 % celkových polyfenolů a mezi zástupce této skupiny patří (-)-epikatechin a (+)-epikatechin. Skupina anthokyaninů (4 %) zahrnuje cyanidin-3- $\alpha$ -L-arabinosid a cyanidin-3- $\beta$ -D-galaktosid. Skupina prokyanidinů, taninů, (58 %) jsou převážně flavan-3,4-dioly, které tvoří dimery až oligomery s jednotkou epikatechinu.<sup>39</sup> Díky antioxidačním a chelatačním vlastnostem je jejich extrakt ceněn a mnoho vědeckých prací se zabývá studiem jejich pozitivního vlivu na kardiovaskulární systém člověka a zmírněním dopadů civilizačních chorob.<sup>40,41</sup> Polyfenoly lze extrahovat ze vzorků po extrakci tuků pomocí okyseleného roztoku metanolu či acetonu. Celkový obsah polyfenolů lze stanovit Folin-Ciocalteu testem a jejich identifikaci provést HPLC-TOF-MS. Tímto postupem bylo identifikováno a kvantifikováno 52 polyfenolů čerstvých kakaových bobů.<sup>42</sup>

## **Alkaloidy**

Purinové alkaloidy kakaových bobů jsou: teobromin, kofein, 1-metylxantin, 3-metylxantin, 7-metylxantosin, 7-metylxantin, teofylin a paraxantin. Xantinový skelet purinových alkaloidů je odvozený od purinových nukleotidů jejichž prekurzorem je adenin. Degradace purinových alkaloidů je vedena přes xantin, kyselinu močovou, alantoin, kyselinu alantoinová, oxid uhličitý, amoniak a glyoxylát. Biosyntéza purinových alkaloidů je soustředěna v kotyledonu kakaového bobu a její schéma je naznačeno na obrázku (viz Obrázek 2).<sup>43</sup>



Obrázek 2: Schéma biosyntézy purinových alkaloidů (PRPP je zkratka pro fosforibosylfosfát, SAM pro S-adenosylmethionin a SAH pro S-adenosylhomocystein).<sup>43</sup>

## Steroly

Byly identifikovány steroly jako např.: 4-desmetylsteroly (cholesterol, brasikasterol, kampesterol, stigmasterol, sitosterol, stigmastanol, isofukosterol, stigmastenol), 4-metylsteroly (lofenol, obtusifoliol, metylofenol, cykloeukalenol, gramisterol), 4,4-dimetylsteroly (lanostenol, cykloartanol,  $\beta$ -amyrin, cykloartenol), triterpeny atd. Tyto látky se vyskytují volně, ve formě esterů, glukosidů, acylovaných glukosidů, triterpenových alkoholů.<sup>24,44</sup>

## Tokoferoly, tokotrienoly

Obsah tokoferolu v nefermentovaných kakaových bobech různého původu stanovený pomocí HPLC s fluorescenční detekcí po saponifikaci se pohybuje kolem  $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  kakaového másla.<sup>18</sup> Tokoferol byl identifikován jako  $\alpha$ ,  $\delta$  a  $\gamma$  izomer a tokotrienol pouze jako  $\gamma$ -izomer.<sup>24</sup>

## 2.2 Vývin těkavých látek

K největším změnám ve složení těkavých látek kakaových bobů, kakaové a čokoládové hmoty dochází ve fázi posklizňových úprav při fermentaci a sušení a v technologickém procesu při pražení a konšování. Při konšování dochází především ke snížení obsahu těkavých látek. Tato kapitola je zaměřena na tyto fáze výroby především v souvislosti s vývinem organoleptických vlastností.

Analýzou nefermentovaných, nepražených a pražených kakaových bobů z Malajsie i jejich součástí byl stanoven obsah tuku, vlhkosti, popele, vlákniny, bílkoviny, sacharidů, fenolických látek, která jsou pro srovnání uvedena v tabulce (viz Tabulka 1). Významný je úbytek vlhkosti.

*Tabulka 1: Procentuální stanovení obsahu tuku, vlhkosti, popele, bílkoviny, sacharidů a množství fenolických látek v nefermentovaných, nepražených a pražených kakaových bobech z Malajsie (GAE kyselina gallová).<sup>45</sup>*

	<i>Nefermentované</i>	<i>Nepražené</i>	<i>Pražené</i>
Tuk [%]	41,51	42,65	30,00
Vlhkost [%]	51,63	5,72	2,44
Popel [%]	3,95	9,93	11,67
Bílkovina [%]	9,47	27,43	25,07
Sacharidy [%]	34,64	25,84	43,63
Fenoly [ $\mu\text{g GAE}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	2,417	11,9	10,93

### 2.2.1 Vývin těkavých látek posklizňovými úpravami

Při sklizni jsou sbírány bobule, pomocí nože či mačety rozříznuty a semena jsou manuálně oddělena. Přezrálé bobule jsou vadou, která se projevuje naklíčením semen, hnědnutím, hnitím či fialovým zbarvením semen. Semena jsou pak ponechána k fermentaci nejčastěji přímo u plantáže na hromadách přikryté listy banánovníku, v koších či bedýnkách. Sladká pulpa je přilnuta k povrchu semen, vlivem vlastních enzymů dochází k degradaci cukrů a pektinu a jejímu ztekucení. Jednoduché cukry, vlhkost a anaerobní prostředí jsou ideálním prostředím pro pomnožení kvasinek, které jsou iniciační kulturou fermentace kakaových bobů. Dochází ke zvyšování teploty a změnám pH masy.

### 2.2.1.1 *Průběh fermentace a mikrobiom*

Metagenomické sekvenování fermentace kakaových bobů určilo zastoupení domény *Bacteria* (90 %), domény *Eukaryota* (9 %) a virů (1 %) všech studovaných sekvencí. Obecně je přirozená fermentace spojena s velkou diverzitou mikroorganismů, které se podílejí na produkci organických kyselin, aromatických látek a dalších metabolitů.<sup>46</sup>

Prvními mikroorganismy, které se podílejí na fermentaci jsou kvasinky, které produkují z jednoduchých cukrů etanol a oxid uhličitý. Etanol je dále oxidován bakteriemi octového kvašení na kyselinu octovou, která difunduje do kakaových bobů a společně s dalšími organickými kyselinami způsobí pokles pH z původních asi 6,6 na hodnotu 4,9 a to během asi 48 hodin. Později hladina pH znovu roste k hodnotě 5,5 a to z důvodu vytěkání a oxidace kyseliny octové.<sup>47</sup>

Dužina bobulí, ulpělá na kakaových semenech, má nízké pH díky obsahu kyseliny citronové (0,6-0,7 %), vysoký obsah jednoduchých sacharidů (glukóza 5,4-6,6 %, fruktóza 6,3-7,4 %, sacharóza 0,3 %) a zároveň vysoký obsah složitějších sacharidů (pektiny), které ji činí vazkou a tvoří tak anaerobní prostředí. Tyto podmínky jsou ideálními pro pomnožení kvasinek. Během prvních 24 hodin kvasinky spotřebují 80 % jednoduchých sacharidů dužiny a vyloučí etanol jehož koncentrace dosahuje 2 %. V této fázi jsou dominantními rody *Candida*, *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Issatchenkia*, *Torulasporea*, *Schizosaccharomyces*, *Saccharomycopsis*. Významné jsou i bakteriofágy, které se podílejí na destrukci mikroorganismů a tím přispívají k obohacení masy.<sup>48,49</sup> Některé estery, jako třeba etylfenylacetát a 2-fenyletylacetát a další estery kyseliny octové, jsou pravděpodobně syntetizovány kvasinkami, jejich koncentrace s delším trváním fermentace klesá.<sup>50</sup>

Anaerobní prostředí umožňuje růst bakterií mléčného kvašení, které také přeměňují jednoduché sacharidy Embden-Meyerhofovou drahou či hexozovou monofosfátovou drahou, kyselinu citronovou na kyselinu mléčnou, etanol, kyselinu octovou, mannitol a oxid uhličitý.<sup>51</sup> Majoritními druhy bakterií mléčného kvašení jsou *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus*.<sup>52</sup> Maximální koncentrace mléčné kyseliny je během 24-48 hodin fermentace 1 %.<sup>48</sup>

Pektinolytická aktivita kvasinek a spotřeba kyseliny citronové je příčinou růstu pH a aerace, čímž dochází k pomnožení aerofilních bakterií octového kvašení. Bakterie octového kvašení metabolizují etanol na kyselinu octovou za uvolňování tepla. Etanol a kyselina octová difundují do kakaového bobu a společně se zvyšující se teplotou jsou příčinou usmrcení semen a iniciace biochemické změny vedoucí ke kvalitně fermentovaným kakaovým bobům.<sup>53</sup> Majoritní druhy bakterií octového kvašení jsou *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* a *Acetobacter*.<sup>54,46</sup> Koncentrace kyseliny octové je maximální po 60-72 hod. fermentace a činí 2 %, po ukončení fermentace její obsah klesá na 0,7-1 %.<sup>48</sup>

Růst teploty při fermentaci až na 50 °C limituje pomnožení mnoha mikroorganismů, dochází zde k růstu bakterií i hub druhů *Bacillus*, *Penicillium*, *Aspergillus* které vynikají svojí enzymatickou výbavou a produkují např.: mastné kyseliny s krátkým řetězcem, pyraziny, butan-2,3-diol.<sup>55</sup>

Podle délky fermentace a míry degradace makrobiomolekul lze kakaové boby dělit na nedostatečně fermentované, plně fermentované a příliš fermentované, kde milníkem je doba 5-6 dnů. Indikátorem probíhající fermentace je potvrzení mannitolu a snížení hladiny disacharidů a oligosacharidů. Při delší době vedení fermentace než 6 dnů dochází ke zvyšování mannitolu a fruktózy, úplné absenci disacharidů. Hladina trisacharidů je však konstantní, což může znamenat, že jsou tyto sacharidy produktem enzymatické reakce či degradace polysacharidů kakaových bobů.<sup>30</sup> Poměr obsahu fruktózy a glukózy je jeden z ukazatelů kvality zpracování kakaových bobů (nefermentované kakaové boby 1:1, plně fermentované 7:1).<sup>47</sup>

#### 2.2.1.2 *Lipidy*

Během fermentace nedochází k výraznějším změnám ve složení ani koncentraci mastných kyselin vázaných v triacylglycerolech. Po 72 hodinách fermentace byl zjištěn nárůst volných mastných kyselin ve vzorcích kakaových bobů různého geografického původu a po 144 hodinách činil nárůst volných mastných kyselin 4 % sušiny. Tento jev je vysvětlen poklesem pH a nárůstem teploty během fermentace a enzymatickou aktivitou lipáz. Obsah tokoferolu během fermentace není změněn a nemá žádný vliv na nárůst lipidů.<sup>18</sup> Mastné kyseliny s hydroxylovými skupinami nebyly identifikovány ve vzorcích fermentovaných kakaových bobů.<sup>21</sup>

#### 2.2.1.3 *Sacharidy, cukry*

Obsah sacharózy během fermentace klesá z 21 mg·g<sup>-1</sup> (asi 93 % celkových cukrů) na hodnotu 6-13 mg·g<sup>-1</sup>. Pokles je vysvětlen přeměnou sacharózy na glukózu a fruktózu vlivem invertáz z kotyledonu. Aktivita enzymu je nejvyšší na začátku fermentace a v jejím průběhu je inhibována zvyšující se aciditou a teplotou. Glukóza a fruktóza je během fermentace přeměněna činností mikroorganismů na etanol a kyseliny. Vyšší hodnota zbytkové fruktózy v kakaovém bobu po fermentaci je vysvětlována preferencemi mikroorganismů. Redukující cukry jsou prekurzory organolepticky významných látek, které vznikají především během sušení a pražení (karamelizace, reaktanty Maillardova reakce).<sup>47</sup>

Pro průběh fermentace jsou esenciální změny sacharidů v pulpě, která obsahuje velké množství jednoduchých cukrů i pektinu.<sup>56</sup> Štěpení pektinů pulpy pektinolytickými enzymy kvasinek, bakterií rodu *Bacillus* a některých hub i zvyšující se teplotou vede k jejímu ztekucení. Optimum pektolytických enzymů (endopolygalakturonáza) kvasinek je při teplotě 40 °C, zvyšující se teplota při fermentaci má tedy také vliv na intenzitu enzymatické reakce.<sup>57</sup>

#### 2.2.1.4 *Bílkoviny, peptidy, aminokyseliny*

Proteolýza je ovlivněna teplotou, aerací, mikrobiomem a zakyslením. Po 24-48 hodinách fermentace dochází k inhibici enzymů a aminokyseliny mohou být transaminovány a dekarboxylovány mikroorganismy, které využijí kyselé volné aminokyseliny jako zdroj dusíku a uhlíku.<sup>58</sup>

Během fermentace bylo identifikováno 1058 peptidů. Na počátku bylo 315 identifikovaných peptidů, 2. a 4. den bylo identifikováno 710 a 626 peptidů a 6. pouze 286 peptidů. Téměř polovina detekovaných peptidů jsou deriváty vicilinu (502) a menší část 21kDa albuminu (144), lipoxygenáz, RmLC cupin sf. proteiny, glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenáz a peroxygenáz. Pouze 37 peptidů bylo přítomno po celou dobu fermentace. Obecně dochází ke snižování obsahu proteinů během fermentace, jejich odbourání, zabudování do větších struktur. Počet peptidů na konci fermentace je však téměř stejný jako na začátku, liší se však složení.<sup>58</sup>

Zvyšování celkové koncentrace volných aminokyselin v kakaovém bobu během prvních 24 hodin fermentace je vysvětleno proteolytickou aktivitou aspartylendoproteázy a karboxypeptidázy, kterým jsou vystaveny zásobní proteiny kakaových bobů. Koncentrace kyselých aminokyselin však klesá o 30 % v důsledku poklesu koncentrace kyseliny glutamové a asparaginu. Koncentrace hydrofobních aminokyselin během fermentace stoupá, tyto látky jsou prekurzory specifického aroma. Aspartylproteáza preferenčně štěpí proteiny v blízkosti hydrofobního zbytku aminokyseliny, čímž produkuje hydrofobní oligopeptidy. Karboxypeptidáza štěpí tyto oligopeptidy na hydrofilní oligopeptidy a hydrofobní volné aminokyseliny, což je prospěšné pro vývin prekurzorů aroma.<sup>58</sup> Enzymatická hydrolyza bílkovin je nejrychlejší při pH 3,8-5,8.<sup>69</sup>

Volné aminokyseliny jsou prekurzory aroma, které vzniká jejich degradací či jejich syntézou. Profil zastoupení aminokyselin v nefermentovaném a fermentovaném kakaovém bobu je přiložen v tabulce (viz *Tabulka 2*). Kvasinky přemění volné aminokyseliny na vyšší alkoholy v Ehrlichově enzymatické dráze. Vyšší alkoholy mohou být esterifikovány za vzniku aromaticky aktivních esterů. Vyšší teplota fermentace iniciuje Maillardovu reakci. Aminokyseliny jako valin, leucin, izoleucin jsou prekurzory 2-metylpropanalu, 3-metylbutanal, 2-metylbutanal. Fenylalanin je prekurzor 2-fenylacetaldehydu, benzaldehydu a acetofenonu a cystein a methionin jsou prekurzory dimetylsulfidu a methionalu.<sup>58</sup> Během fermentace dochází ke zvýšení volných hydrofobních aminokyselin, avšak k poklesu volných kyselých aminokyselin. Hydrofobní aminokyseliny, jako leucin, alanin a fenylalanin, jsou reaktanty k produkci Streckerových aldehydů a pyrazinů. Tryptofan je přeměněn na biogenní aminy, 5-hydroxytryptamin a tryptamin. Hydrofobní oligopeptidy jsou substrátem serinkarboxyexopeptidázy. Dekarboxylace aminokyselin během fermentace vede také k produkci biogenních aminů (2-fenyletylamin, 2-metylpropylamin, 2-/3-metylbutylamin).<sup>69</sup>

Tabulka 2: Profil základních aminokyselin nefermentovaných a fermentovaných kakaových bobů.<sup>59</sup>

<i>Aminokyselina</i>	<i>Nefermentované [mg·g<sup>-1</sup>]</i>	<i>Fermentované [mg·g<sup>-1</sup>]</i>
Lys	42,0	52,6
His	20,0	23,3
Arg	43,6	51,4
Asp	100,0	82,5
Thr	29,9	23,3
Ser	23,7	32,6
Glu	128	153
Pro	12,5	12,5
Gly	20,5	32,0
Ala	29,8	40,1
Cys	7,8	6,9
Val	32,1	35,1
Met	9,9	8,0
Ile	21,4	29,3
Leu	72,2	62,4
Tyr	18,6	27,0
Phe	28,6	36,3

#### 2.2.1.5 *Flavonoidy, alkaloidy, tokoferol*

K poklesu 80-90 % celkových polyfenolů dochází během prvních dvou dní fermentace. Tato změna je vyvolána difuzí rozpustných polyfenolů a odtokem z kakaových bobů se šťávou, enzymatickou oxidací a neenzymatickou oxidací, hydrolýzou anthokyanů, oligomerací produktů oxidace. Enzymatická oxidace polyfenoloxidázou či peroxidázou je silně inhibována přítomností vzdušného kyslíku a po 24 hodinách je účinnost enzymu snížena na jednotky procent původní rychlosti. Produkty oxidace, chinony a semichinony, mohou polymerovat, působit jako chelatační činidla či dále oxidovat za tvorby hnědých struktur. Neenzymatická oxidace polyfenolů probíhá dále také při sušení a pražení. Produkty oxidace mohou polymerovat a působit jako chelatační činidla.

Katechiny jsou bezbarvé. Hnědý pigment vzniká jejich oxidací. Prokyany jsou mírně nažloutlé až oranžové. Faktory, ovlivňující barvu anthokyanů, jsou struktura molekuly, přítomnost některých enzymů, pH prostředí, teplota a přítomnost kyslíku. Nefermentovaná semena mají

nažloutlou barvu díky vysokému obsahu prokyaninu, katechinu a epikatechinu. Následuje odbarvení semen přes bílou na lehce narůžovělou barvu. Snížením pH (4-4,5) dojde k oxidaci anthokyanu na karbinolovou pseudobázi. V další fázi fermentace dochází ke zvýšení pH (5-7) a prokyaniny přecházejí do neutrální chinoidní báze a společně s produkty oxidace zabarvují semena do červena. A v poslední fázi dochází k tvorbě melanoidinů a zhnědnutí bobů.

Pro přenos pozitivních účinků polyfenolů, tokoferolů i alkaloidů do produktů je fermentace omezena na kratší čas, může být také zamezeno pražení. Povědomí o antioxidační aktivitě polyfenolů a jejich blahému vlivu na lidský organismus je důvodem pro soudobé výzkumy vedení fermentace k produkci kakaa s vysokým obsahem polyfenolů.<sup>60,38,61,62,63</sup>

#### 2.2.1.6 *Sušení*

Sušení může být vedeno přirozeně na slunci či uměle v halách. Nepřirozené sušení může vést k vývinu benzínového či gumového aroma, na druhou stranu umožňuje rychlejší vysušení a vyšší homogenitu. Tato cesta je proto výhodnější pro sušení „bulk“ kakaových bobů. Dochází k difuzi alkaloidů z jádra kakaového bobu do jeho slupky, která je odpadním produktem výroby. Neenzymatické oxidační procesy, započaté ve fázi fermentace, pokračují díky zvýšené teplotě a snižující se vlhkosti. Dochází k redukci kyselé, hořké a trpké chuti a vývinu charakteristického hnědého zbarvení.<sup>64</sup> Redukující cukry s aminokyselinami reagují za vzniku hnědých pigmentů, tzv. Maillardova reakce. Dochází také k syntéze pyrazinů Streckerovou degradací.

### 2.2.2 **Vývin těkavých látek technologickou výrobou čokolád**

#### 2.2.2.1 *Pražení*

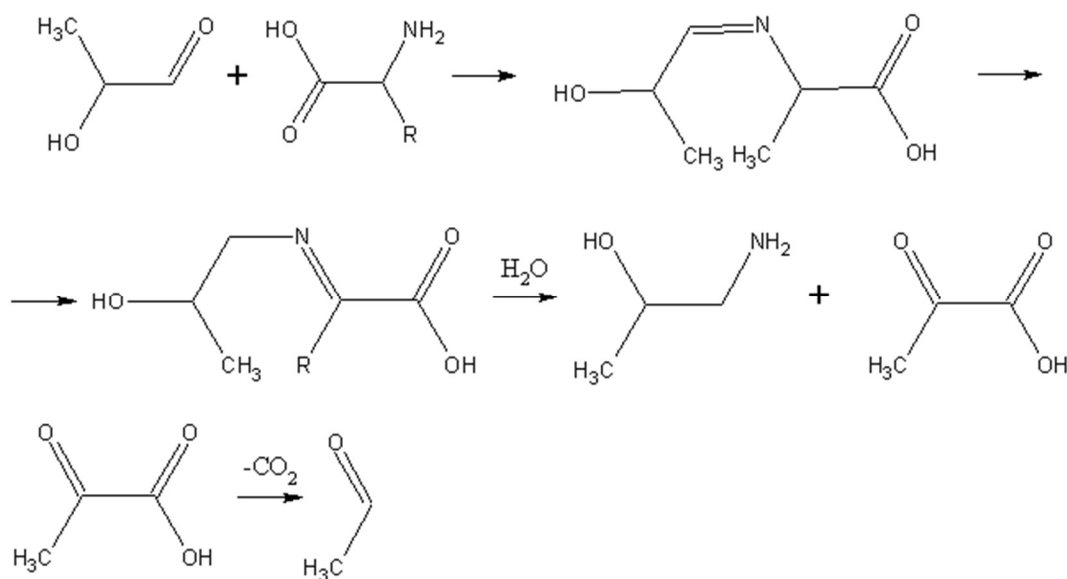
Pražení je proces vývinu barvy, aroma, chuti a křehké struktury. Jde o změnu fyzikálních i chemických vlastností. Chemické reakce, které v této fázi mají svůj význam jsou Maillardova reakce, karamelizace, Streckerova degradace, oxidace lipidů a oxidativní degradace fenolů.

Maillardova reakce je reakce karbonylové skupiny redukujícího cukru a nukleofilní aminové skupiny aminokyseliny (peptidů či proteinů). Může dojít ke vzniku kondenzátu, Schiffovy báze a Amadoriho či Heynsova přesmyku. V první fázi jsou produkty menší molekuly, které nemají hnědé zbarvení, ale jsou významnými chuťovými látkami. Kondenzace reaktivních intermediátů v pozdější fázi reakce vede ke vzniku vysokomolekulárních polymerů hnědé barvy, melanoidinů, jejichž velikost je v jednotkách až desítkách kilodaltonů. Vysoký obsah polyfenolů, nízká teplota, odstranění jednoho z reaktantů, středně až silně kyselé pH může inhibovat Maillardovu reakci.<sup>65</sup> Oxidace lipidů v přítomnosti kyslíku a vysoké teploty vede ke vzniku struktur s vysoce reaktivní karbonylovou skupinou, které ochotně reagují s aminovou skupinou.<sup>66</sup>

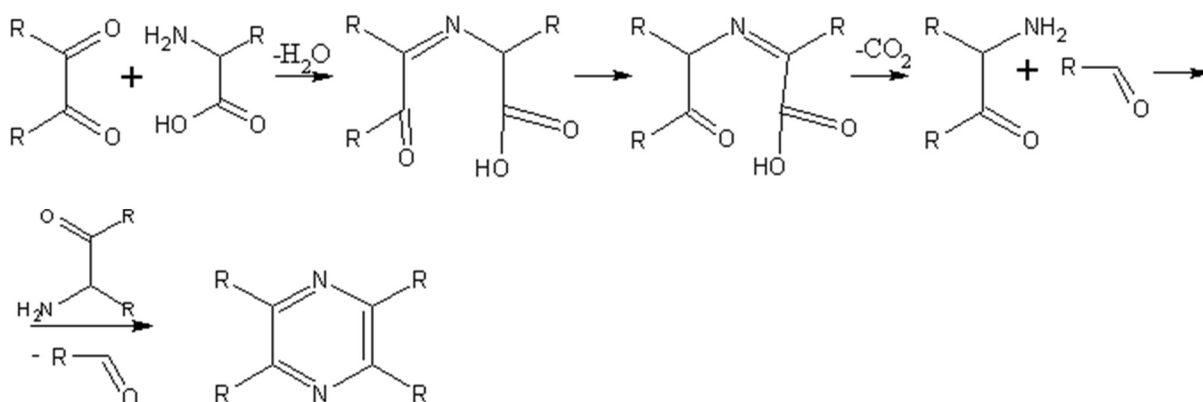
Melanoidiny mohou mít trojí strukturu. Jsou to polymery furanových či pyrrolových jednotek, struktury se sacharidovým skeletem, který vznikl aldolovou kondenzací degradovaných cukrů s dusíkatými rezidui a proteinové struktury vzniklé cross-linkem mezi proteiny

a nízkomolekulárními sloučeninami z pokročilých stádií neenzymového hnědnutí. Reaktivní karbonyl můžou však nabídnout i polyfenoly či lipidy. Studie prokázala, že teplota nad 135 °C a vlhkosti 0,3 % vede k významně vyšším výtěžkům melanoidinů.<sup>67</sup> Melanoidiny jsou významné nejen pro senzorycké vlastnosti, ale také pro svoji antioxidační aktivitu, protizánětlivost a funkčnost prebiotika.<sup>68</sup>

Streckerovou degradací vznikají sloučeniny jako 2-etylpropanal, 2-metylbutanal, 3-metylbutanal i pyraziny jak znázorňuje obrázek (viz Obrázek 4). Pyraziny jsou důležité pro vývin typického čokoládového aroma, jsou významné i díky svému vyššímu podílu mezi těkavými látkami. Nízký obsah více substituovaných pyrazinů vzniká jako metabolit při fermentaci činností *Bacillus subtilis* (tetrametylpirazin) a bakteriemi především.

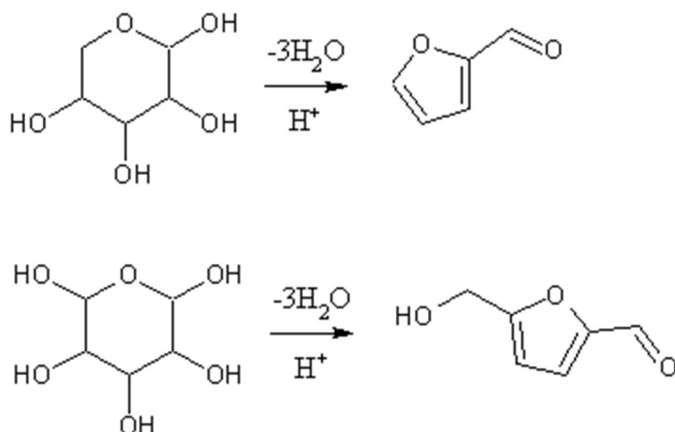


Obrázek 3: Schéma Streckerovy degradace.<sup>69</sup>



Obrázek 4: Schéma syntézy pyrazinů.<sup>69</sup>

Karamelizace je reakce jednoduchých cukrů, které jsou neenzymaticky dehydratovány vlivem vysokých teplot (nad 110 °C) a nízké vlhkosti. Schéma je na obrázku (viz Obrázek 5). Produkty jsou významnými chuťovými, vonnými i barevnými látkami.



Obrázek 5: Dehydrogenace cukrů.<sup>69</sup>

#### 2.2.2.2 Konšování

Při konšování dochází k odstranění nepříjemných těkavých látek a úpravy textury čokolády pomocí vyšší teploty a aerace. Obsah kyselin, pyrazinů, fenolů, aldehydů a ketonů během procesu klesá téměř o polovinu. Nově vznikají 2-deken-1-ol, hexadekanová kyselina, 2-methylheptadekan, 2-oxoetyler kyseliny propanové. Došlo k nárůstu alkoholů. Během kapalné fáze dochází k nejmarkantnějšímu poklesu počtu i obsahu kyselin, pyrazinů, benzaldehydu a nárůst v obsahu 2-metylpropanolu a 2-methylheptadekanu. Obsah polyfenolů, kofeinu a theobrominu klesá o 11-3 %. Touto úpravou dojde ke změně ze zelené nakouřené vůně v ořechovou, sladkou a karamelovou.<sup>70</sup>

### 2.3 Čokoláda

Čokoláda je polotuhá suspenze pevných částic cukru a kaka v tukové fázi. Primárně ji lze dělit na tmavou, mléčnou a bílou.<sup>71</sup> Její sensorické atributy zahrnují vzhled (barva, lesk), texturu (struktura, lom, tvrdost, písčítost), vlastnosti povrchu (vlhkost, kluzkost), aroma (vůně, chuť) a další (rozpustnost, doznívání).<sup>72</sup>

Tuková fáze ovlivňuje rozpouštění a pocit v ústech. Během rozpouštění čokolády v ústech dojde ke ztekucení tuků, které se mísí se slinami a rozpouští částice cukru. Lipidy a částice kaka pokrývají epitel dutiny ústní. Vnímání chuti ovlivňuje distribuce velikosti částic a složení. Reologické vlastnosti čokolády jsou upravovány technologickým zpracováním pro vysokou kvalitu produktu a dobře definovanou texturu.<sup>71</sup>

### 2.3.1 Legislativa

Dle platné legislativy České republiky je čokoláda dělena do několika skupin uvedených v tabulce (viz Tabulka 3) s jejich výkladem. Pro účely této diplomové práce je však nejdůležitější pojem hořká čokoláda. Legislativní požadavky na hořkou čokoládu z přílohy č. 9 vyhlášky jsou tyto: nejméně 18 %<sub>hmot.</sub> kakaového másla, nejméně 14 %<sub>hmot.</sub> tukuprosté kakaové sušiny a nejméně 35 %<sub>hmot.</sub> celkové kakaové sušiny (%<sub>hmot.</sub> je vztaženo na sušinu).<sup>3</sup>

Tabulka 3: Rozdělení čokolád dle legislativy.<sup>3</sup>

<i>Název</i>	<i>Popis</i>
Čokoláda (hořká čokoláda)	Potravina vyrobená z kakaových součástí, přírodních sladidel, sladidel) nebo jejich kombinací (dále jen "sladidel"), přídatných látek nebo látek určených k aromatizaci, popřípadě z dalších složek, a která vyhovuje požadavkům uvedeným v příloze č. 9.
Mléčná čokoláda	Potravina vyrobená z kakaových součástí, sladidel, mléka nebo mléčných výrobků, popřípadě z dalších složek, a která vyhovuje požadavkům uvedeným v příloze č. 9.
Bílá čokoláda	Potravina vyrobená z kakaového másla, mléka nebo mléčných výrobků, sladidel, popřípadě z dalších složek, a která vyhovuje požadavkům uvedeným v příloze č. 9.
Plněná čokoláda	Potravina, jejíž vnější vrstva je složena z čokolády, mléčné čokolády, family mléčné čokolády nebo bílé čokolády; vnitřní náplň nesmí být složena z pekařských výrobků nebo mražených krémů (zmrzliny); vnější čokoládový podíl musí činit nejméně 25 % celkové hmotnosti výrobku.
Chocolate a la taza	Čokoláda vyrobená z kakaových součástí, sladidel, mouky nebo pšeničného, rýžového nebo kukuřičného škrobu, přičemž obsah mouky nebo škrobu je nejvýše 8 % celkové hmotnosti, a která vyhovuje požadavkům uvedeným v příloze č. 9.
Chocolate familiar a la taza	Čokoláda vyrobená z kakaových součástí, sladidel, mouky nebo pšeničného, rýžového nebo kukuřičného škrobu, přičemž obsah mouky nebo škrobu je nejvýše 18 % celkové hmotnosti, a která vyhovuje požadavkům uvedeným v příloze č.9.
Family mléčná čokoláda	Potravina vyrobená z nižšího podílu kakaových součástí, sladidel a vyššího podílu mléka nebo mléčných výrobků, a která vyhovuje požadavkům stanoveným v příloze č. 9.

### 2.3.2 Technologie výroby

V současné době probíhá globalizace výroby čokolády. Řada světových výrobců vyrábí kakaovou hmotu, která je skupována výrobními řetězci a továrnami buď tekutou v kontejnerech anebo v pevném stavu. Další velcí výrobci nakupují čokoládovou hmotu. Objevují se však

spotřebitelé, kteří oceňují čokoládu z určité pěstitelské oblasti, které motivuje podpora tzv. „fair trade“ výrobců. Do popředí se dostává nízká objemová výroba čokolády z kakaových bobů, která se stává populárnější. Jsou zakládány malé společnosti, které využívají menší strojní zařízení a vyrábějí čokoládu z kakaových bobů z určité pěstitelské oblasti, tzv. „bean to bar“ produkce.

V České republice je také několik desítek těchto menších firem. Vyrábí čokolády ze směsí kakaových bobů z různých pěstitelských oblastí „blend“ i z kakaových bobů jediného původu „single origin bars“. Výrobci vyvíjejí pro stále náročnější zákazníky nové receptury od čokolád vyrobených pouze z kakaových bobů, přes přidání cukru a emulgátoru (nejčastěji sójový lecitin) případně mléka (nejčastěji sušené) a dále pevných příměsí či aromat (vanilín). Takové tabulky mohou být oceněny Academy of Chocolate, která uděluje nejprestižnější ocenění.<sup>73,74</sup>

### 2.3.2.1 *Suroviny*

Základní surovinou pro výrobu hořké čokolády jsou kakaové boby, které jsou zpracovány na kakaové máslo a kakaový prášek. Další suroviny jsou cukr a případně lecitin. Odpadním produktem jsou slupky a klíčky kakaových bobů. Náhražky kakaového másla v podobě rostlinných tuků mohou být maximálně 5 % dle platné legislativy.<sup>75</sup>

Kakaové máslo vyniká svým složením mastných kyselin a vlastností krystalizace do 6 polymorfismů. Nejvíce zastoupené mastné kyseliny jsou palmitová (P), stearová (S) a olejová (O) kyselina a nejvíce zastoupené triacylglyceroly jsou v tomto složení: POP, POS, SOS. Polymorfismus je schopnost krystalizovat v různých krystalických formách. Díky těmto informacím je možné předcházet tukovému květu, který je následkem vzniku 6. polymorfismu kakaového másla při skladování za nevhodných podmínek (kolísající teplota, vlhkost). Při výrobě čokolády je cílem 5. polymorfismus s teplotou tání 31 °C. Tekuté kakaové máslo je ochlazeno z 60 °C na 4 °C, následuje temperace, krystalizace kakaového másla a uskladnění 7 dní při teplotě 25 °C, tzv. zrání čokolády. Kakaový prášek je alkalizován kvůli vývinu tmavé barvy a obsahuje 20-24 % kakaového másla.<sup>76,77</sup>

### 2.3.2.2 *Technologie a zařízení*

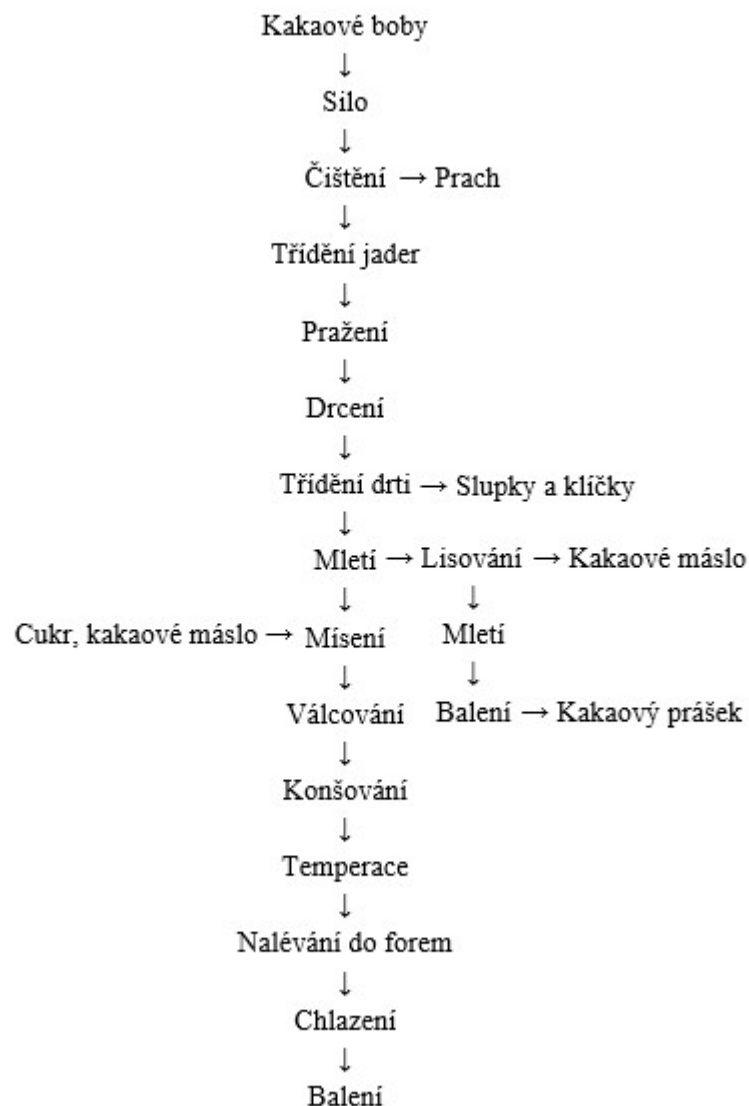
Schéma výroby čokolády je znázorněno na obrázku (viz Obrázek 6). Kakaové boby jsou čištěny od prachu pomocí vibračních sít a máčením v pračkách a magnety od kovových částic. Během pražení dochází k chemickým a fyzikálním změnám, snížení vody na 2-3 %, snížení obsahu těkavých látek (kyselina octová, tříslovina, polyfenoly) a vývinu barvy. Pražit lze celé kakaové boby, kakaovou drť anebo kakaovou hmotu, rozdílné jsou ztráty kakaového másla a rozložení teploty ve hmotě. Odpadem tohoto kroku jsou po drcení slupky a klíčky. Kakaová drť je mleta na kakaovou hmotu za uvolnění tuku a jeho tání.

Kakaové máslo je vyráběno lisováním na hydraulických lisech alkalizované kakaové hmoty za použití  $K_2CO_3$ ,  $Na_2CO_3$  a  $(NH_4)_2CO_3$ . Dochází tak k tmavnutí tříslovin a uvolňování tuku.

Vylisováním jsou získány kakaové pokrutiny, které jsou rozemílány na kakaový prášek, který tvoří částice o velikosti 20-50  $\mu\text{m}$ .

Dalším krokem je mísení kakaové hmoty s cukrem a kakaovým máslem v míchacích strojích (kontinuální či periodické), čímž vzniká čokoládová hmota. Čokoládovou hmotu je třeba dále dispergovat a zjemňovat válčováním na válčovacích stolicích, čímž dojde ke zvětšení povrchu částic a jejich zmenšení. Konšování zabezpečí další zušlechtění sypké hmoty, odstranění nepříjemných těkavých látek, snížení obsahu vody, zjemnění pomocí míchání, roztírání a provzdušňování. Hořké čokolády jsou konšovány asi 24 hodin při teplotě 65-90 °C. Ve fázi homogenizace je možné přidat lecitin, čímž je zabezpečeno rovnoměrné rozptýlení tuku po povrchu pevných částic.

Následuje temperace, při níž jsou nejprve rozpuštěny krystaly kakaového másla, následně je iniciována jejich krystalizace. Nakonec jsou odstraněny nestabilní formy krystalů kakaového másla a zachován 5. polymorfismus. Vytemperovaná čokoláda je dávkována do forem ve tvaru tabulky, zbavena vzduchových bublin pomocí vibrační dráhy, chlazena a vyklepávána z formy. Další vychladnutí a dokončení krystalizace má velký vliv na vytvoření tukového či cukerného květu.<sup>78</sup>



Obrázek 6: Schéma technologie výroby čokolád, kakaového másla a kakaového prášku.<sup>79</sup>

### 2.3.3 Chemické složení čokolády

#### 2.3.3.1 *Lipidy*

Kakaové máslo obsahuje více než 70 % triacylglycerolů, které zahrnují 1-palmitoyl-3-stearoyl-2-oleoglycerol (POS), 1-distearoyl-2-oleoylglycerol (SOS) a 1,3-dipalmitoyl-2-oleoylglycerol (POP). Poměrný obsah mastných kyselin triacylglycerolů čokolády, kakaového másla, je uveden v tabulce (viz Tabulka 4). V případě hořkých čokolád se během procesu mění minimálně. Kakaové máslo je možné nahradit mléčným tukem či náhradami (pouze ekvivalenty do 5 %). Náhradami jsou rostlinné tuky (palmový olej, palmojádrový olej, mangojádrový olej, slunečnicový olej, bambucké máslo apod.) a jejich směs či enzymatická úprava.<sup>80,81</sup>

Tabulka 4: Obsah mastných kyselin kakaového másla.<sup>80</sup>

<b>Mastná kyselina</b>	<b>Obsah [%]</b>
Palmitová	24,5-33,7
Stearová	33,7-40,2
Myristová	0-4
Arachidová	1
Laurová	0-1
Olejová	26,3-35
Palmitoleová	0-4
Linoleová	1,7-3
$\alpha$ -Linolenová	0-1
Ostatní	1,6

### 2.3.3.2 *Sacharidy*

Obsah sacharidů v čokoládě je 40-50 % a sacharóza tvoří 55 %.<sup>82</sup> Při tradiční výrobě čokolád je používána sacharóza (třtinový cukr, řepný cukr). Výrobci mají možnost výběru z bezpočtu sladidel. Nutritivními sladily jsou cukerné alkoholy (sorbitol, mannitol, xylitol, isomalt, erythritol, laktitol a maltitol) a disacharidy (trihalóza, tagatóza, izamaltulóza). Nenutritivními sladily jsou aspartam, sacharin, neotam, steviol apod.<sup>83</sup>

### 2.3.3.3 *Proteiny*

Obsah proteinů v čokoládách může být navýšen přidávkem kaka, mléčného či rostlinného proteinu a jeho hodnota se proto může pohybovat od jednotek po desítky procent. Současný trend navyšování bílkoviny v potravině přinesl i možnost přidávat do čokolád biomasu. Přídavek 2 % biomasy *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) způsobil dvojnásobné navýšení bílkovin čokolády.<sup>84</sup>

### 2.3.3.4 *Flavonoidy, alkaloidy*

Nejvyšší obsah těchto látek byl zjištěn v čokoládách vyrobených z kakaových bobů var. *Forastero*. Alkaloidy převyšují flavonoidy v obsahu (57,5 %), patří sem theobromin a kofein. Polyfenolové kyseliny (2,6-9,1 % celkových polyfenolů) čokolád jsou především kyselina skořicová, chlorogenová, ferulová, kávová, kumarová a benzoová a největší počet těchto látek spadá do skupiny protokatechové kyseliny (85 % polyfenolových kyselin). Čokolády z bobů var. *Forastero* obsahují až dvojnásobek těchto látek ve srovnání s čokoládami var. *Criolo* či *Trinitario*. Flavanoly (katechin a epikatechin) a prokyanidiny tvoří nejvíce zastoupenou

skupinu flavonoidů (47,0-52,8 %). Dalšími flavonoidy s vysokým obsahem jsou naringenin-7-rhamnosidoglucosid, quercetin-3-D-galaktosid, quercetin-3-D-rhamnosid, kaempferol-3-O-rutinosid, luteolin, apigenin-8-C-glukosid, apigenin-7-rutinosid a amentoflavon.<sup>85</sup>

## 2.4 Metody stanovení těkavých látek v čokoládě

Stanovení těkavých látek je díky automatizaci poměrně snadné a rychlé. Za krátký čas je možné analyzovat velké množství vzorků. Analýza geografického původu produktů i surovin je průkazem jejich autenticity a chrání výrobce i spotřebitele. Některé studie se zaměřují na vyhledávání specifických chemických „markerů“ v potravinách, např.: med<sup>86</sup>, olej<sup>87</sup>, brambory<sup>88</sup>, houby<sup>89</sup>, ocet<sup>90</sup> atd.

### 2.4.1 Úprava vzorku, extrakce a izolace těkavých látek

Vzorek čokolády je nejprve nutné rozmělnit na prášek. V případě analýzy kakaových bobů je třeba rozhodnout, zda jsou analyzovány těkavé látky ze slupky či jádra, danou část separovat a následně rozmělnit a homogenizovat. Následuje extrakce těkavých látek z matrice s vysokým obsahem tuku, což je problematické, protože triacylglyceroly i těkavé látky jsou extrahovány společně.<sup>91</sup> Následující kroky mohou být tyto:

- Destilace

Destilace s vodní parou umožňuje oddělení těkavých látek za nižších teplot než bodu varu látek a je tak zabráněno jejich ztrátám. Těkavé látky jsou extrahovány do ultra čisté vody a destilovány s vodní parou. Chlazení předlohy zabráňuje ztrátám nedostatečně ochlazených látek před vytěkáním. Roztok je pak extrahován izooktanem a je odebrán extrakt organické fáze k detekci.<sup>92</sup>

- Extrakce kapalina-kapalina

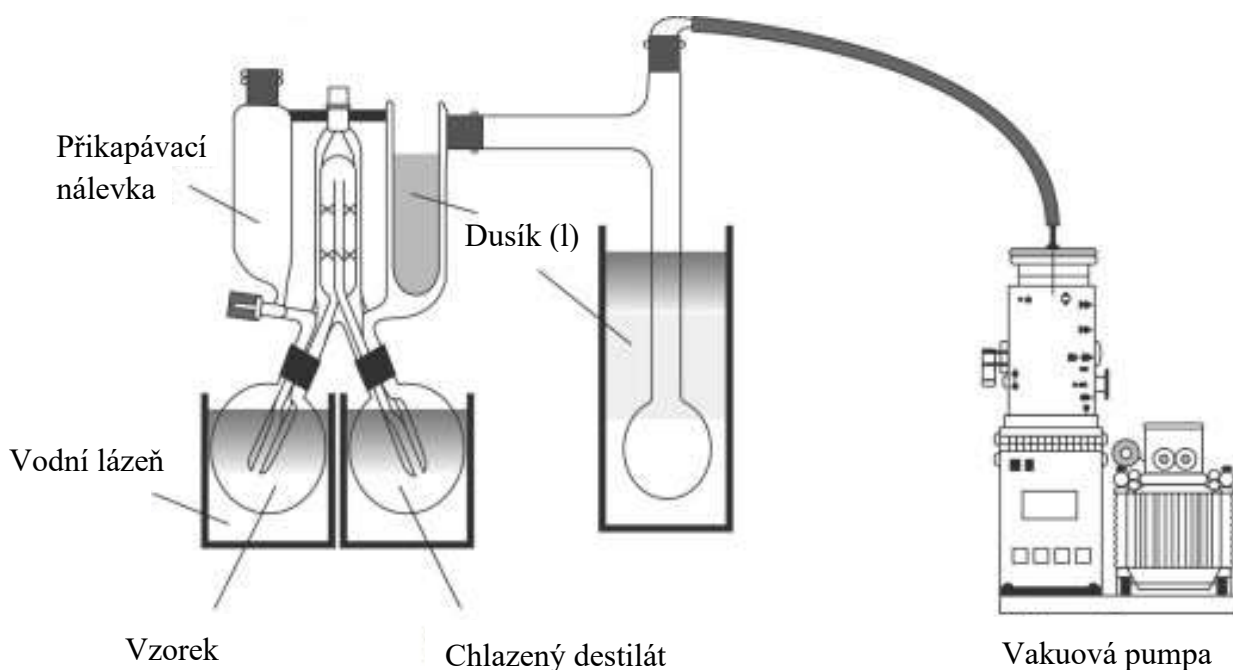
Další možností je použití organických rozpouštědel. Upravený vzorek je třeba několikrát extrahovat hexanem a centrifugovat a poté několikrát extrahovat metanolem. Po spojení obou extraktů je oddělen hexanový extrakt s triacylglyceroly. Lze zde využít tzv. „oiling-out effect“. Triacylglyceroly extrahované do hexanu způsobí jeho nižší rozpustnost v metanolu. K metanolovému extraktu je přidána voda, čímž je oddělena část hexanu dříve rozpuštěná v metanolu. Metanolový extrakt s těkavými látkami lze zředit vodou a dichlormetanem. Po její několikanásobné extrakci dichlormetanem je extrakt upraven dehydratací pomocí bezvodého Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a zakoncentrován pomocí destilační kolony. Tímto způsobem je minimalizována ztráta těkavých látek a zároveň zabezpečen vysoký výtěžek. Nevýhodou této metody je však nepatrné rozpouštění hexanu v metanolu a používání množství organických rozpouštědel.<sup>93</sup>

- SAFE („Solvent assisted flavour evaporation“)

Izolace těkavých látek pomocí SAFE je možná pouze ze šťáv, roztoků, extraktů. SAFE se skládá z difuzní pumpy, vakuové pumpy, přítoku a odpadního vývodu, pracuje za velmi nízké teploty (-196 °C) a vysokého vakua ( $10^{-2}$ - $10^{-3}$  Pa). Schéma je na obrázku (viz Obrázek 7). Vzorek je nejčastěji extrahován dichlorometanem a homogenizován. Těkavé látky jsou z organické fáze odděleny destilací pomocí SAFE, výtěžek je možné promýt vodným roztokem  $\text{NaHCO}_3$  a nasyceným roztokem  $\text{NaCl}$ . Neutrální těkavé látky jsou obsaženy ve spodní vrstvě. Kyselé těkavé látky, obsažené ve vrchní vodné fázi, je nutné okyselin pomocí  $\text{HCl}$  a extrahovat dichlorometanem.<sup>94</sup>

- HS-SPME

Je velice často používanou metodou. Není však vhodná pro extrakci látek s vysokým bodem varu, vysokou molekulární hmotností a silnou vazbou k matrixu. Další informace jsou uvedeny v kapitole 2.4.3.1.



Obrázek 7: Schéma SAFE.<sup>95</sup>

## 2.4.2 Stanovení těkavých látek

- GC-MS (Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí)

Tato metoda je používána pro detekci těkavých látek ve vzorcích čokolád nejčastěji.<sup>92</sup>

- GC-FID (Plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem)

Analýza pomocí plynového chromatografu s plamenovým ionizátorem je často porovnávána s hmotnostní detekcí. Tato metoda disponuje dobrou selektivitou, linearitou a vyšší horní hranicí rozsahu koncentrace. Ionizace probíhá v proudu elektronů.<sup>92</sup>

- SIFT-MS (Hmotnostní spektrometrie v proudové trubici s vybranými ionty)

Umožňuje analýzu těkavých látek v reálném čase bez nutnosti jejich extrakce. Analyzován je vzduch s výpary, který putuje přímo do přívodu přístroje a prvním krokem je ionizace magneticky indukovanou plazmou, následně jsou vzniklé ionty vzorku navedeny na kvadrupól, kde se odstíní frakce iontů podle poměru hmotnosti a náboje, následně pokračují do hmotnostního spektrometru. Dochází k další ionizaci, analýze iontu, jeho detekci a identifikaci na základě porovnání s knihovnou. Metodu lze využít k optimalizaci technologie výrobního procesu v kterékoliv fázi manipulace s potravinou a analýze vzorku těkavých látek.<sup>96</sup>

- GC-olfaktometr

Odtok z plynového chromatografu je paralelně veden do konvenčního detektoru a čichacího portu a vůni vyhodnocuje školený hodnotitel. Problém může nastat, pokud čichací port a detektor pracují pod různými tlaky (typicky MS ve vakuu x port v atmosférickém tlaku), pak je třeba vyrovnat odchylku v retenčních časech pomocí restriktoru. Vlastnosti látek, které ovlivní analýzu, jsou práh vnímání, práh rozpoznání, fyzikální a chemické vlastnosti (těkavost, rozpustnost ve vodě a tucích), intenzita, hedonický tón, kvalita a molekulární struktura. K detekci dochází pomocí frekvenčních metod (tým hodnotitelů analyzuje jeden vzorek, analyzují těkavou látku v daný retenční čas), ředění k prahové hodnotě (udává kvantitu na základě poměru koncentrace ve vzorku a vzduchu), přímá intenzita (intenzita a trvání je měřeno pomocí různých stupnic), metoda úpravy vzorku. Metodou lze zjistit přímou reakci čichového vjemu hodnotitele a použití je především pro studium aromatického profilu vzorku, jeho změny a odlišnosti v příbuzných potravinách.<sup>91,97</sup>

- Elektrický nos

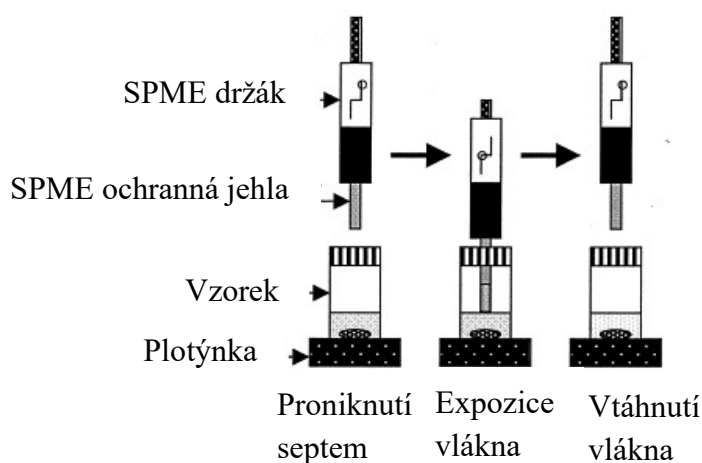
Tento přístroj obsahuje senzorové pole s nescifickými, biologickými či chemickými senzory. Zápach generuje charakteristický otisk odezvy senzorů, který je porovnáván s databází vzorů těchto otisků k jejich rozpoznání a identifikaci. Přístroj se skládá ze systému jímání těkavých látek ze vzorku, detekce stimulu a systému zpracování dat. Detekčním systémem mohou být hmotnostní spektrometr, spektrometrie iontové mobility, piezoelektrické, elektrochemické, optické, kalorimetrické senzory. Systémem zpracování dat je založen na technice rozpoznání vzorku. Obraz signálu komplexního vzorku, generovaného každým senzorem, je identifikován bez nutnosti rozpoznávání jednotlivých komponent.<sup>98,99</sup>

### 2.4.3 Použitá metoda

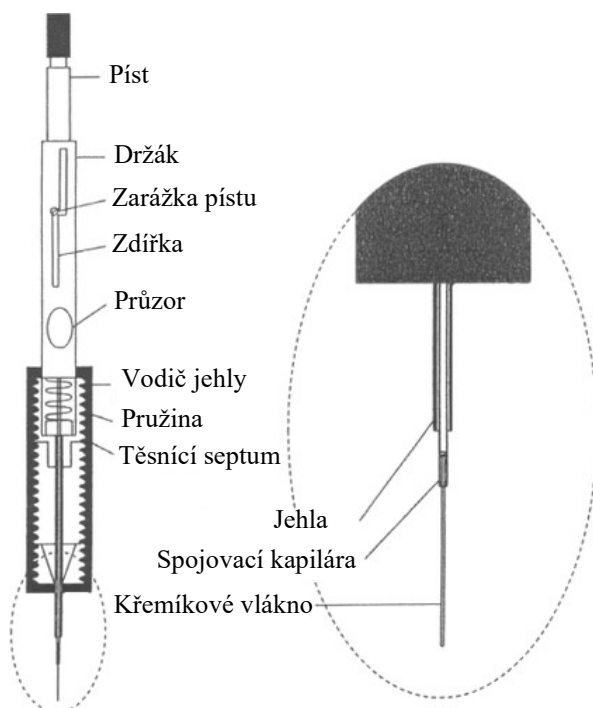
Metoda „head-space“ mikroextrakce tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí je metoda, která má v oboru Potravinářské chemie široké využití. Byla používána pro studium těkavých látek koření<sup>100</sup>, alkoholických nápojů<sup>101</sup> a dalších potravin, dále pro identifikaci markerů ke studiu autenticity potravin<sup>102</sup>, pro detekci pesticidů<sup>103</sup> i optimalizace výrobních procesů<sup>104</sup>. Metoda je použitelná pro všechny analyty, které mají dostatečnou afinitu k sorpční fázi vzorkovacího vlákna a jsou dostatečně těkavé a termostabilní.

### 2.4.3.1 *Head-space mikroextrakce tuhou fází*

Tento krok zabezpečuje kromě extrakce analytu také zakoncentrování a transfer do kolony chromatografu, čímž značně ulehčuje proces přípravy vzorku k analýze. Mikroextrakce tuhou fází zahrnuje dva rovnovážné procesy, kterými jsou látková výměna mezi matricí vzorku a „head-space“ a látková výměna mezi „head-space“ a vláknem se sorbentem.<sup>105</sup> Celý proces je rozdělen do tří kroků, které jsou znázorněny na obrázku (viz Obrázek 8). Přičemž výkon mikroextrakce závisí na chemických a fyzikálních vlastnostech analytu, typu sorbentu, extrakčním čase a teplotě.<sup>106</sup> Na obrázku 9 je schéma zařízení pro mikroextrakci tuhou fází.



Obrázek 8: *Extrakce pomocí SPME zařízení ve třech krocích.*<sup>107</sup>



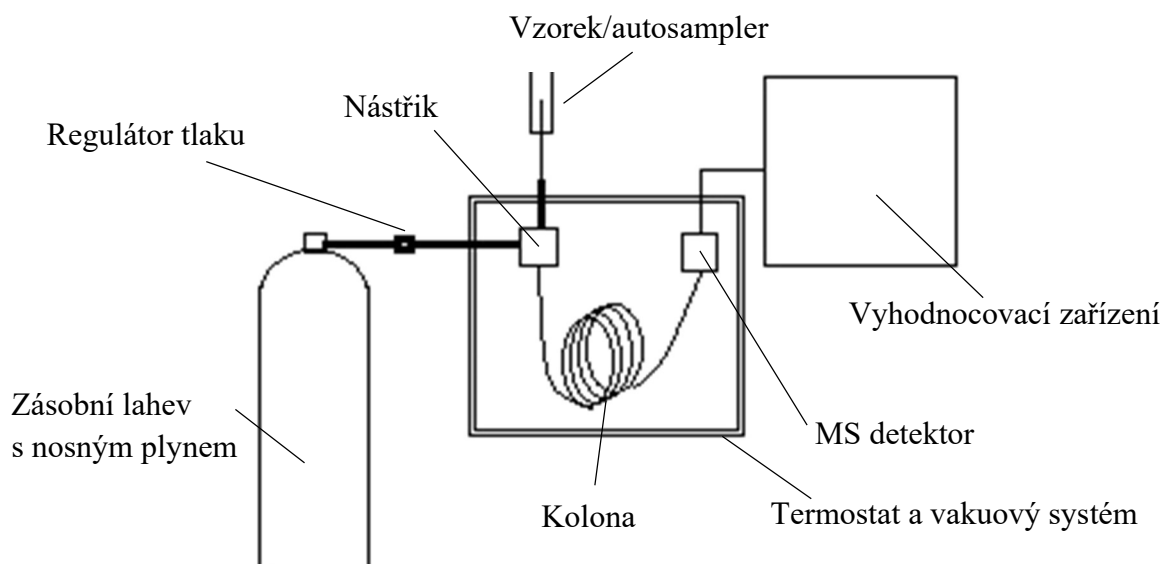
Obrázek 9: *Zařízení pro SPME.*<sup>108</sup>

### 2.4.3.2 Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

Plynová chromatografie je separační technika, jejímž principem je rozdělení koncentrace analytu mezi stacionární a mobilní fázi na základě adsorpce a rozpouštění, přičemž se předpokládá, že toto rozdělení je rovnovážné. Chromatografický děj je sledován měřicím zařízením, jehož signál je funkcí množství analytu a citlivosti pro kvalitativní a kvantitativní určení analytu.<sup>109,110</sup>

Hmotnostní detekce je zaležena na hmotnostní spektrometrii. Hmotnostní spektrometr je analyzátor, který ionizuje eluát, následně směs iontů uspořádá dle jejich poměru hmotnosti a náboje za užití elektrického či magnetického pole či jejich spojení. Uspořádané ionty jsou detekovány a výstupem je spektrum závislosti intenzity signálu na poměru hmotnosti a náboje. V tomto systému je zásadní výkon vakuového systému.<sup>111</sup>

Spojení plynové chromatografie a hmotnostní detekce bylo používáno už od roku 1957.<sup>112</sup> Schéma zařízení je načrtnuto na obrázku (viz Obrázek 10).



Obrázek 10: Schéma zařízení.<sup>109</sup>

## 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Laboratorní vybavení

#### 3.1.1 Přístroje

- Plynový chromatograf Trace™ 1310 se split/splitless injektorem (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA),
- hmotnostní detektor ISQ™ LT Single Quadrupole (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA),
- knihovna spekter NIST/EPA/NIH, Verze 20 (Gaithersburg, Maryland, USA),
- počítač PC, Intel Pentium Procesor s programem Xcalibur 2.2 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

#### 3.1.2 Chemikálie

- Nosný plyn – Helium, čistota 4.8., v tlakové lahvi s redukčním ventilem (SIAD, Česká republika).

#### 3.1.3 Pracovní pomůcky

- SPME vlákno, DVB/CAR/PDMS 50/30 µm Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA,
- vialky Headspace 10 ml se šroubovacím magnetickým uzávěrem,
- běžné laboratorní sklo.

### 3.2 Podmínky analýzy

#### 3.2.1 Podmínky HS-SPME extrakce

- Doba temperace: 10 minut,
- doba extrakce: 20 minut,
- teplota agitátoru: 40 °C,
- agitátor zapnutý: 5 s,
- agitátor vypnutý: 60 s,
- množství vzorku: 1,5 g,
- hloubka ponoření vlákna do vialky: 20 mm.

#### 3.2.2 Podmínky GC-MS analýzy

- Kapilární kolona TG-WaxMS (30 m x 0,25 mm x 0,5 µm),

- teplota injektoru 240 °C,
- doba desorpce: 20 minut,
- dávkování: splitless, ventil uzavřen 10 minut,
- hloubka ponoření vlákna do injektoru: 40 mm,
- nosný plyn: helium, průtok 1 ml·min<sup>-1</sup>,
- teplotní program: 40 °C s výdrží 1 minutu, vzestupný gradient 5 °C·min<sup>-1</sup> do 220 °C s výdrží 22 minut, celková doba analýzy 60 minut,
- hmotnostní detektor v modu EI: energie ionizačních elektronů: 70 eV, teplota iontového zdroje: 200 °C, skenovací rozsah m/z: 30-370 amu, rychlost skenování: 0,2 s.

### 3.3 Vyhodnocení výsledků analýzy

Identifikace těkavých látek proběhla na základě srovnání hmotnostních spekter s knihovnamí spekter pomocí programu Xcalibur 2.2, byly tak získány hodnoty retenčního času, procentuální shody hmotnostních spekter vzorku s knihovnou a plochy píku. Výsledky měření byly zpracovány pomocí MS Excel. V rámci statistického zpracování byl vypočítán retenční čas jednotlivých těkavých látek a jeho směrodatná odchylka. Obsah identifikovaných sloučenin je vyjádřen semikvantitativně pomocí ploch jednotlivých píků a vyjádřen v procentech ze sumy plochy identifikovaných píků. Všechny vzorky byly analyzovány dvakrát (n = 2).

### 3.4 Analyzované vzorky

Bylo analyzováno celkem 16 vzorků: 5 vzorků kakaových bobů (Peru, Madagaskar, Ekvádor, Tanzanie, Haiti), 5 vzorků čokolád vyrobených z nich, 5 vzorků čokolád s různým obsahem kakaové sušiny z běžné tržní sítě (50%, 70% „bio“, 70%, 78%, 90%) a 1 vzorek kakaového prášku. Všechny vzorky jsou na obrázku (viz Obrázek 11 až Obrázek 19), informace uvedené na obalu v tabulkách (viz Tabulka 5 až Tabulka 13) a výživové údaje jsou shrnuty v tabulce (viz Tabulka 14). Kódy přidělené jednotlivým vzorkům jsou uvedeny v tabulce (viz Tabulka 15). Všechny vzorky byly skladovány při laboratorní teplotě na suchém místě. Vzorky kakaových bobů i čokolády byly rozdrceny a bylo naváženo 1,5 g drti pro analýzu.



Obrázek 11: BIO kakaové boby a BIO 70% tmavá čokoláda.

Tabulka 5: Informace na obalu vzorku čokolád a bobů z Haiti.

	Čokoláda	Kakaové boby
<b>Složení</b>	BIO kakaové boby z Haiti, BIO třtinový cukr.	BIO nepražené kakaové boby z Haiti
<b>Obsah kakaové sušiny</b>	70 %	-
<b>Výrobce</b>	Chocolate Hill s.r.o., Žižkova 430/1, 602 00 Brno, ČR	



Obrázek 12: BIO kakaové boby a BIO 70% tmavá čokoláda.

Tabulka 6: Informace na obalu vzorku kakaových bobů a čokolády z Tanzanie.

	Čokoláda	Kakaové boby
<b>Složení</b>	BIO kakaové boby z Tanzanie, BIO třtinový cukr.	BIO nepražené kakaové boby z Tanzanie.
<b>Obsah kakaové sušiny</b>	70 %	-
<b>Výrobce</b>	Chocolate Hill s.r.o., Žižkova 430/1, 602 00 Brno, ČR	



Obrázek 13: BIO kakaové boby a BIO 70% tmavá čokoláda.

Tabulka 7: Informace na obalu vzorku kakaových bobů a čokolády z Ekvádoru.

	Čokoláda	Kakaové boby
<b>Složení</b>	BIO kakaové boby z Ekvádoru, BIO třtinový cukr.	BIO nepražené kakaové boby z Ekvádoru.
<b>Obsah kakaové sušiny</b>	70 %	-
<b>Výrobce</b>	Chocolate Hill s.r.o., Žižkova 430/1, 602 00 Brno, ČR	



Obrázek 14: BIO kakaové boby a BIO 70% tmavá čokoláda.

Tabulka 8: Informace na obalu vzorku kakaových bobů a čokolád z Peru.

	Čokoláda	Kakaové boby
<b>Složení</b>	BIO kakaové boby z Peru, BIO třtinový cukr.	BIO nepražené kakaové boby z Peru.
<b>Obsah kakaové sušiny</b>	70 %	-
<b>Výrobce</b>	Chocolate Hill s.r.o., Žižkova 430/1, 602 00 Brno, ČR	



Obrázek 15: BIO kakaové boby a BIO 70% tmavá čokoláda.

Tabulka 9: Informace na obalu vzorku kakaových bobů a čokolády z Madagaskaru.

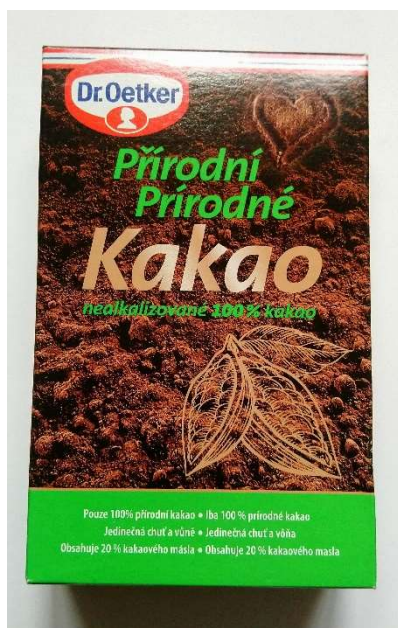
	Čokoláda	Kakaové boby
<b>Složení</b>	BIO kakaové boby z Madagaskaru, BIO třtinový cukr.	BIO nepražené kakaové boby z Madagaskaru.
<b>Obsah kakaové sušiny</b>	70 %	-
<b>Výrobce</b>	Chocolate Hill s.r.o., Žižkova 430/1, 602 00 Brno, ČR	



Obrázek 16: BIO 70% tmavá čokoláda.

Tabulka 10: Informace na obalu vzorku čokolády z Peru.

<b>Složení</b>	BIO kakaové boby Criollo z Peru, BIO třtinový cukr
<b>Obsah kakaové sušiny</b>	70 %
<b>Výrobce</b>	Chocolate Hill s.r.o., Žižkova 430/1, 602 00 Brno, ČR



Obrázek 17: Přírodní kakao.

Tabulka 11: Informace na obalu vzorku kakaového prášku.

<b>Složení</b>	Kakaový prášek ze země západní Afriky
<b>Obsah kakaového másla</b>	20 %
<b>Výrobce</b>	Dr. Oetker, s.r.o., Americká 2335, 272 01 Kladno, ČR



Obrázek 18: Extra hořká čokoláda

Tabulka 12: Informace na obalu vzorků hořkých čokolád.

	90 %	78 %	70 %
<b>Složení</b>	Kakaová hmota, kakaové máslo, kakaový prášek se sníženým obsahem tuku, cukr, vanilka.	Kakaová hmota, kakaové máslo, cukr, kakaový prášek se sníženým obsahem tuku, bezvodý mléčný tuk.	Kakaová hmota, cukr, kakaové máslo, vanilka.
<b>Obsah kak. sušiny</b>	nejméně 90 %	nejméně 78 %	nejméně 70 %
<b>Prodejce</b>	Lindt & Sprüngli (CEE) s.r.o., Karolinská 1, 18600 Praha 8, ČR		



Obrázek 19: Čokoláda.

Tabulka 13: Informace na obalu vzorku čokolády.

<b><i>Složení</i></b>	Kakaová hmota, cukr, laktóza (mléko), emulgátor (sójový lecitin), vanilkový extrakt
<b><i>Obsah kakaové sušiny</i></b>	Nejméně 50 %
<b><i>Prodávající</i></b>	Tesco Stores ČR s.r.o., Vršovická 1527/68b, 100 00 Praha 10

Tabulka 14: Výživové údaje na 100 g kakaových bobů z Peru (1), Madagaskaru (2), Ekvádoru (3), Haiti (4) a Tanzanie (5), čokolády z bobů z Peru (6), Madagaskaru (7), Ekvádoru (8), Haiti (9) a Tanzanie (10), 52% čokolády (11), 70% čokolády (12), 79% čokolády (13), 90% čokolády (14) a 70% čokolády z ekologické produkce (15) kakaového prášku (16).

<b>Vzorek č.</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
<b>Energie [kJ]</b>	2195	2195	2195	2195	2195	1687	1687	1687
<b>Tuky [g]</b>	25	25	25	25	25	15,3	15,3	15,3
<b>Nasyčené [g]</b>	20	20	20	20	20	9	9	9
<b>Sacharidy [g]</b>	50	50	50	50	50	59	59	59
<b>Cukry [g]</b>	1	1	1	1	1	42	42	42
<b>Bílkoviny [g]</b>	25	25	25	25	25	15,9	15,9	15,9
<b>Sůl [g]</b>	0	0	0	0	0	0,11	0,11	0,11
<b>Vzorek č.</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>
<b>Energie [kJ]</b>	1687	1687	2143	2350	2384	2483	1687	1589
<b>Tuky [g]</b>	15,3	15,3	29	41	46	55	15,3	20
<b>Nasyčené [g]</b>	9	9	17	24	29	30	9	13
<b>Sacharidy [g]</b>	59	59	52	34	24	14	59	12
<b>Cukry [g]</b>	42	42	47	29	17	7	42	0,09
<b>Bílkoviny [g]</b>	15,9	15,9	6,8	9,5	10	10	15,9	20
<b>Sůl [g]</b>	0,11	0,11	<0,01	0,1	0,05	0,03	0,11	0,05

Tabulka 15: Kódy analyzovaných vzorků.

<b>Vzorek:</b>	<b>Kód:</b>
Kakaové boby nepražené Peru	A01
Kakaové boby nepražené Madagaskar	A02
Kakaové boby nepražené Ekvádor	A03
Kakaové boby nepražené Haiti	A04
Kakaové boby nepražené Tanzanie	A05
Čokoláda Peru	A06
Čokoláda Madagaskar	A07
Čokoláda Ekvádor	A08
Čokoláda Haiti	A09
Čokoláda Tanzanie	A10
Čokoláda 50 %	A11
Čokoláda 70 %	A12
Čokoláda 79 %	A13
Čokoláda 90 %	A14
Čokoláda Bio 70 %	A15
Kakaový prášek	A16

### 3.5 Statistické zpracování výsledků

Ke grafickému znázornění rozdílů mezi vzorky a zkoumání korelačních vztahů mezi jednotlivými parametry byla provedena PCA. Veškeré statistické testování bylo provedeno na hladině statistické významnosti  $\alpha = 0,05$ . Ke statistickému vyhodnocení byl použit software MS Excel doplněk XLSTAT 2020.

## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato práce je zaměřena na stanovení těkavých látek v 5 vzorcích kakaových bobů a z nich vyrobených čokolád, dále 5 vzorcích čokolád a kakaovém prášku z běžných tržních řetězců. Kakaové boby mají původ v pěti státech ze tří kontinentů, Afriky a Severní a Jižní Ameriky, přičemž jsou zastoupeny ostrovní a přímořské státy: Peru, Ekvádor, Madagaskar, Haiti a Tanzanie.

Čokolády z běžné tržní sítě zahrnují 70% čokoládu vyrobenou z kakaových bobů *Criollo* ekologické produkce (CZ-BIO-001), 50% čokoládu a čokolády jednoho výrobce o obsahu kakaového prášku 70 %, 78 % a 90%.

Hlavním záměrem práce bylo posoudit těkavé látky (aromatický profil) kakaových bobů vs. čokolády v závislosti na geografickém původu a produktů deklarovaných jako „bio“ vs. běžných z tržní sítě.

### 4.1 Identifikace těkavých látek ve vzorcích

Pomocí metody HS-SPME-GC-MS byly identifikovány aromatické látky ve vzorcích. Podmínky analýzy jsou uvedeny v kapitole 3.2.

Těkavé látky byly rozděleny do následujících tříd dle jejich chemické struktury: kyseliny, aldehydy, ketony, alkoholy, estery, alkany, alkeny, furany, terpeny, dusíkaté sloučeniny, a ostatní. Přehled identifikovaných těkavých látek v jednotlivých vzorcích je uveden v tabulce (viz Tabulka 16), která zahrnuje zařazení jednotlivých těkavých látek do chemické skupiny a průměrný retenční čas ( $n = 2$ ). Relativní směrodatná odchylka je pro 90 % naměřených dat nižší než 1 %.

Podle charakteru vůně lze rozdělit identifikované látky do 7 skupin: květinová, ovocná, sladká, čokoládová/ořechová, zemitá, svíravá/kyselá a skupina neurčených. Nejpočetnější skupinou jsou látky s ovocnými tóny (17), dále ořechové a čokoládové (16), svíravé a kyselé (12), neurčené (14), sladké a medové (10), zemité (9) a květinové (8). Identifikované těkavé látky s popisem majoritního prekurzoru jejich syntézy či fáze v technologickém procesu a popisem jejich aroma jsou v tabulce (viz Tabulka 17).

Tabulka 16: Identifikované těkavé látky ve vzorcích. Značení vzorků viz Tabulka 15.

Název	Skupina	Tr [min]	A0 1	A0 2	A0 3	A0 4	A0 5	A0 6	A0 7	A0 8	A0 9	A1 0	A1 1	A1 2	A1 3	A1 4	A1 5	A1 6
Etanol	alkohol	4,09	✓				✓				✓		✓					
2,4,5-trimetyl-1,3-dioxolan	ostatní	4,17			✓												✓	
2,2,4,6,6-pentmethylheptan	alkan	4,25																✓
Pentan-2-on	keton	4,85	✓									✓	✓		✓		✓	
Pentanal	aldehyd	4,89			✓									✓		✓		
N-propan-2-ylacetamid	dusíkatá sloučenina	4,93				✓	✓											
Butan-2,3-dion	keton	5,04			✓													
2,2,4,4-tetrametyloktan	alkan	5,27																✓
2-metylpropylacetát	ester	5,59	✓	✓	✓	✓	✓							✓	✓	✓	✓	✓
2-etyl-5-metylfuran	furan	5,97			✓													
Toluen	alken	6,20			✓								✓		✓			
Etyl-2-metylbutanoát	ester	6,40			✓													
2,6,6-trimetylbicyklo[3.1.1]hept-2-en	cyklický terpen	6,65		✓	✓	✓	✓		✓									
Butan-2-ylacetát	ester	6,90	✓										✓		✓	✓		

Tabulka 16: (pokračování)

<i>Název</i>	<i>Skupina</i>	<i>Tr</i> <i>[min]</i>	<i>A0</i> <i>1</i>	<i>A0</i> <i>2</i>	<i>A0</i> <i>3</i>	<i>A0</i> <i>4</i>	<i>A0</i> <i>5</i>	<i>A0</i> <i>6</i>	<i>A0</i> <i>7</i>	<i>A0</i> <i>8</i>	<i>A0</i> <i>9</i>	<i>A1</i> <i>0</i>	<i>A1</i> <i>1</i>	<i>A1</i> <i>2</i>	<i>A1</i> <i>3</i>	<i>A1</i> <i>4</i>	<i>A1</i> <i>5</i>	<i>A1</i> <i>6</i>
Hexanal	aldehyd	7,17			✓						✓	✓	✓				✓	✓
6,6-dimetyl-2-metylidenebicyklo[3.1.1] heptan	cyklický terpen	7,67																✓
3-metylbutan-2-ol	alkohol	8,04		✓	✓	✓	✓							✓	✓	✓		
3-metylbutylacetát	ester	8,08	✓										✓					
1-metoxypropan-2-ol	alkohol	8,18		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓					✓	✓
2-tert-butyl-5-propan-2-yl-1,3-dioxolan-4-on	ostatní	8,85		✓									✓					
7-metyl-3-metylidenocta-1,6-dien	terpenový uhlovodík	9,12			✓								✓					
1-etoxypropan-2-ol	alkohol	9,2																✓
Heptan-2-on	keton	9,70	✓	✓	✓		✓						✓		✓	✓		
Heptanal	aldehyd	9,82																✓
1-metyl-4-prop-1-en-2-ylcyklohexen	cyklický terpen	10,18		✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓	
1-metoxypropan-2-ylacetát	ester	10,82																✓
2-metylbutan-1-ol	alkohol	10,87	✓	✓	✓	✓	✓					✓	✓					
2-pentylfuran	furan	11,01																✓

Tabulka 16: (pokračování)

<i>Název</i>	<i>Skupina</i>	<i>Tr</i> <i>[min]</i>	<i>A0</i> <i>1</i>	<i>A0</i> <i>2</i>	<i>A0</i> <i>3</i>	<i>A0</i> <i>4</i>	<i>A0</i> <i>5</i>	<i>A0</i> <i>6</i>	<i>A0</i> <i>7</i>	<i>A0</i> <i>8</i>	<i>A0</i> <i>9</i>	<i>A1</i> <i>0</i>	<i>A1</i> <i>1</i>	<i>A1</i> <i>2</i>	<i>A1</i> <i>3</i>	<i>A1</i> <i>4</i>	<i>A1</i> <i>5</i>	<i>A1</i> <i>6</i>
(3Z,5E)-3,7-dimetylocta-1,3,5-trien	terpenový uhlovodík	11,02											✓		✓	✓		
3,7,7-trimetylbicyklo[4.1.0]hept-3-en	cyklický terpen	11,53			✓													
Pentan-1-ol	alkohol	11,64		✓	✓	✓	✓	✓				✓					✓	
Heptylacetát	ester	11,78	✓															
2-metylpyrazin	dusíkatá sloučenina	12,11											✓			✓		✓
1,3,5-trimetylbenzen	alken	12,44													✓			
3-hydroxybutan-2-on	keton	12,58	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓	✓
Heptan-2-ol	alkohol	13,26	✓	✓	✓	✓	✓						✓		✓	✓	✓	
2-hydroxyetyl-3-oxobutanoát	ester	13,59					✓						✓					
2,5-dimetylpyrazin	dusíkatá sloučenina	13,52											✓		✓	✓		✓
2,6-dimetylpyrazin	dusíkatá sloučenina	13,63											✓					
2-etylpyrazin	dusíkatá sloučenina	13,80											✓					

Tabulka 16: (pokračování)

<i>Název</i>	<i>Skupina</i>	<i>Tr</i> <i>[min]</i>	<i>A0</i> <i>1</i>	<i>A0</i> <i>2</i>	<i>A0</i> <i>3</i>	<i>A0</i> <i>4</i>	<i>A0</i> <i>5</i>	<i>A0</i> <i>6</i>	<i>A0</i> <i>7</i>	<i>A0</i> <i>8</i>	<i>A0</i> <i>9</i>	<i>A1</i> <i>0</i>	<i>A1</i> <i>1</i>	<i>A1</i> <i>2</i>	<i>A1</i> <i>3</i>	<i>A1</i> <i>4</i>	<i>A1</i> <i>5</i>	<i>A1</i> <i>6</i>
2,3-dimethylpyrazin	dusíkatá sloučenina	14,17			✓								✓					
(Z)-5-metyl-2-propan-2-ylhex-2-enal	terpenový keton	14,41											✓				✓	
(4E,6E)-2,6-dimetylocta-2,4,6-trien	terpenový uhlovodík	14,82			✓													
2-etyl-6-methylpyrazin	dusíkatá sloučenina	15,12											✓					
1-hydroxypropan-2-on	keton	15,25							✓	✓	✓							
2-etyl-5-methylpyrazin	dusíkatá sloučenina	15,29											✓					
3-oxobutylacetát	ester	15,13	✓															
Nonan-2-on	keton	15,21	✓														✓	
Nonanal	aldehyd	15,37						✓						✓	✓	✓	✓	✓
2,3,5-trimethylpyrazin	dusíkatá sloučenina	15,66		✓	✓		✓						✓	✓	✓	✓	✓	✓
Etyloktanoát	ester	16,34		✓	✓												✓	
2-(eten-5-yl-5-metyloxolan-2-yl)propan-2-yletylkarbonát	ester	16,61			✓													

Tabulka 16: (pokračování)

<i>Název</i>	<i>Skupina</i>	<i>Tr</i> <i>[min]</i>	<i>A0</i> <i>1</i>	<i>A0</i> <i>2</i>	<i>A0</i> <i>3</i>	<i>A0</i> <i>4</i>	<i>A0</i> <i>5</i>	<i>A0</i> <i>6</i>	<i>A0</i> <i>7</i>	<i>A0</i> <i>8</i>	<i>A0</i> <i>9</i>	<i>A1</i> <i>0</i>	<i>A1</i> <i>1</i>	<i>A1</i> <i>2</i>	<i>A1</i> <i>3</i>	<i>A1</i> <i>4</i>	<i>A1</i> <i>5</i>	<i>A1</i> <i>6</i>
3-etyl-2,5-dimethylpyrazin	dusíkatá sloučenina	16,68											✓					✓
Kyselina octová	mastná kyselina	16,95	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
1-(1-metoxypropan-2-yloxy) propan-2-ol	alkohol	17,40																✓
2,3,5,6-tetramethylpyrazin	dusíkatá sloučenina	17,45	✓	✓	✓	✓	✓	✓					✓	✓	✓	✓	✓	✓
2-ethylhexan-1-ol	alkohol	17,73	✓	✓	✓		✓	✓					✓				✓	
2-etyl-3,5,6-trimethylpyrazin	dusíkatá sloučenina	18,37											✓					
1-(2-metoxypropoxy)propan-2-ol	alkohol	18,68		✓	✓		✓						✓					✓
Benzaldehyd	aldehyd	18,93		✓	✓								✓	✓	✓	✓	✓	✓
Butan-2,3-diol	alkohol	19,07	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
3,7-dimetylokta-1,6-dien-3-ol	terpenový alkohol	19,17			✓												✓	
2-etylbutanová kyselina	mastná kyselina	19,62						✓			✓							
Etylacetát	ester	19,63	✓	✓	✓	✓	✓		✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓	

Tabulka 16: (pokračování)

<i>Název</i>	<i>Skupina</i>	<i>Tr [min]</i>	<i>A0 1</i>	<i>A0 2</i>	<i>A0 3</i>	<i>A0 4</i>	<i>A0 5</i>	<i>A0 6</i>	<i>A0 7</i>	<i>A0 8</i>	<i>A0 9</i>	<i>A1 0</i>	<i>A1 1</i>	<i>A1 2</i>	<i>A1 3</i>	<i>A1 4</i>	<i>A1 5</i>
2-metylpropanová kyselina	mastná kyselina	20,12		✓	✓	✓	✓						✓				
2-metylpropylbutanoát	ester	20,63											✓				
4-hydroxybutanová kyselina	mastná kyselina	21,59		✓	✓		✓						✓				
Oxolan-2-ylmethylacetát	ester	21,70											✓				
Furan-2-ylmetanol	furan	22,06											✓				
3-metylbutanová kyselina	mastná kyselina	22,45												✓	✓	✓	
2-metylbutanová kyselina	mastná kyselina	22,47	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓				✓
Metyl-(Z)-N-hydroxybenzen karboximidát	dusíkatá sloučenina	23,94				✓		✓							✓		
Eten-6-yl-2,2,6-trimetyloxan-3-ol	alkohol	24,30			✓												
Acetamid	dusíkatá sloučenina	24,48															
Etyl-2-fenylacetát	ester	24,93					✓										✓
Etyl-2-(4-acetylfenyl)acetát	ester	25,61	✓	✓	✓	✓	✓	✓				✓	✓	✓	✓	✓	✓

Tabulka 16: (pokračování)

<i>Název</i>	<i>Skupina</i>	<i>Tr</i> <i>[min]</i>	<i>A0</i> <i>1</i>	<i>A0</i> <i>2</i>	<i>A0</i> <i>3</i>	<i>A0</i> <i>4</i>	<i>A0</i> <i>5</i>	<i>A0</i> <i>6</i>	<i>A0</i> <i>7</i>	<i>A0</i> <i>8</i>	<i>A0</i> <i>9</i>	<i>A1</i> <i>0</i>	<i>A1</i> <i>1</i>	<i>A1</i> <i>2</i>	<i>A1</i> <i>3</i>	<i>A1</i> <i>4</i>	<i>A1</i> <i>5</i>	<i>A1</i> <i>6</i>
(E)-3-metyl-4-(2,6,6-trimetyl cyklohex-2-en-1-yl)but-3-en-2-on	cyklicky terpen	26,31							✓							✓		✓
[2,4,4-trimetyl-3-(2-metylpropan oyloxy)pentyl]-2-metylpropanoát	ester	26,71	✓															
2-fenyletanol	alkohol	27,67	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
1-(1H-pyrrol-2-yl)etanoát	dusíkatá sloučenina	28,95											✓	✓	✓	✓		
2,6-di- <i>tert</i> -butylbenzen-1,4-diol	alkohol	34,15	✓															
2-benzylidenoktanal	aldehyd	36,18							✓									✓
2,4,6-tri- <i>tert</i> -butylfenol	alkohol	36,41	✓															
Decyldekanoát	ester	40,17	✓					✓	✓		✓							
2,6-di- <i>tert</i> -butyl-4-prop-2- enoxyfenol	ostatní	40,32	✓															
Metyl-2-(6- <i>tert</i> -butyl-1,1-dimetyl- 2,3-dihydroinden-4-yl)acetát	ester	41,39	✓															

Identifikovanými kyselinami ve vzorcích jsou kyselina octová<sup>100,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124</sup>, 2-metylpropanová<sup>100,122-124</sup>, 2-metylbutanová<sup>118,122</sup>, 3-metylbutanová<sup>100,117-120, 122-124</sup>, 2-etylbutanová<sup>119</sup> a 4-hydroxybutanová. Kyselina octová je kyselinou s největší plochou píku na chromatogramu těkavých látek a její obsah je nejvyšší také v porovnání s netěkavými kyselinami (mléčná, šťavelová, jablečná)<sup>113</sup>. Kyselina 2-etylbutanová nebyla identifikována v kakaových bobech var. *Trinitario*.<sup>119</sup> Kyseliny s delším uhlíkovým řetězcem nebyly zjištěny a identifikace kyseliny s hydroxylovou skupinou, 4-hydroxybutanová kyselina, je zde popsána poprvé.

Identifikovanými alkoholy jsou: etanol<sup>100,121,122</sup>, 3-metylbutan-2-ol<sup>114,121,122,124</sup>, 1-etoxypropan-2-ol, 2-metylbutan-1-ol<sup>114,122</sup>, pentan-1-ol<sup>115,117,119,123</sup>, heptan-2-ol<sup>100,113-116,118,119,123</sup>, 1-(1-metoxypropan-2-yloxy)propan-2-ol, 2-ethylhexan-1-ol<sup>116,118,119,122</sup>, 1-(2-metoxypropoxy)propan, butan-2,3-diol<sup>100,113-121,123,124</sup>, 6-etenyl-2,2,6-trimetyloxan, 2-fenyletanol<sup>113,114,99,117,119,121-123</sup>, 2,6-di-*tert*-butylbenzen-1,4-diol a 2,4,6-tri-*tert*-butylfenol. Alkoholy jsou především produktem metabolismu mikroorganismů a jejich obsah je možné regulovat ve fázi fermentace, jsou nositelé především květinových a sladkých tónů. Substituované fenoly jsou původci kouřového aroma.<sup>114</sup> Poprvé identifikované jsou 1-etoxypropan-2-ol, 1-(1-metoxypropan-2-yloxy)propan-2-ol, 1-(2-metoxypropoxy)propan-2-ol, 6-etenyl-2,2,6-trimetyloxan, 2,6-di-*tert*-butylbenzen-1,4-diol a 2,4,6-tri-*tert*-butylfenol.

Identifikované aldehydy jsou: pentanal<sup>117,124</sup>, hexanal<sup>114-117,119</sup>, heptanal<sup>117</sup>, nonanal<sup>113,115-119</sup>, benzaldehyd<sup>100,113-121</sup> a 2-benzylidenoktanal (hexilcinnamal).<sup>115</sup> Identifikované ketony jsou: pentan-2-on<sup>100,114-116,121,124</sup>, hexan-2,3-dion (diacetyl)<sup>113,100,119,120,123,124</sup>, heptan-2-on<sup>100,113-118,122,123</sup>, 3-hydroxybutan-2-on<sup>100</sup>, 1-hydroxypropan-2-on a nonan-2-on<sup>100,113-117,119,122,123</sup>. Technologie výroby čokolády je optimalizována pro co nejnižší úbytek a syntézu aldehydů a ketonů, jelikož tyto látky jsou nositeli čokoládových, květinových i ovocných tónů. Tyto látky jsou produkty metabolismu mikroorganismů, přeměn aminokyselin, Maillardovy reakce.<sup>113</sup>

Identifikované estery jsou: 2-metylpropylacetát (izobutylacetát)<sup>113-115,123,124</sup>, etyl-2-metylbutanoát<sup>114,100,121,123</sup>, butan-2-ylacetát (*sec*-butylacetát)<sup>113</sup>, 3-metylbutylacetát<sup>113,121</sup>, 1-metoxypropan-2-ylacetát<sup>114</sup>, heptylacetát<sup>100,118</sup>, 2-hydroxyetyl-3-oxobutanoát, 3-oxobutylacetát, etyloktanoát<sup>113,116-118,123</sup>, 2-(eten-5-yl-5-metyloxolan-2-yl)propan-2-yletylkarbonát, etylacetát<sup>113,114,100,119,123,124</sup>, 2-metylpropylbutanoát, oxolan-2-ylmetylacetát, etyl-2-fenylacetát<sup>100,113-121,123,124</sup>, etyl-2-(4-acetylfenyl)acetát, 2,4,4-trimetyl-3-(2-metylpropanoyloxy)pentyl-2-metylpropanoát, decyldekanoát, metyl-2-(6-*tert*-butyl-1,1-dimethyl-2,3-dihydroinden-4-yl)acetát (1H-4-indenacetát). Nejčastěji je základním skeletem kyselina octová. Vysoký obsah etyl-2-fenylacetátu je typický pro typ *Criollo*<sup>113</sup>, což bylo potvrzeno. Nejvyšší obsah této látky byl určen ve vzorku A15.

Identifikované terpeny jsou:  $\alpha$ -pinen<sup>114,115</sup>,  $\beta$ -pinen<sup>119</sup>,  $\beta$ -myrcen<sup>100,113-119</sup>, limonen<sup>100,114-117,119</sup>, *trans*- $\beta$ -ocimen<sup>100,116-118</sup>,  $\delta$ -3-careen<sup>114,117,119</sup>, *trans*-ocimen<sup>116-118</sup>,  $\alpha$ -isometylionon, 2-isopropyl-5-methylhex-2-enal, linalool<sup>113,100,117-119</sup>. Obsah terpenů je nejvíce markantní ve skupině kakaových bobů, především  $\alpha$ -pinen, odkud jsou přeneseny také do čokolád.

Identifikované dusíkaté látky a deriváty pyrazinu jsou: 2-metylpyrazin<sup>115,117,120</sup>, 2,5-dimetylpyrazin<sup>100,115,117,118,120</sup>, 2,6-dimetylpyrazin<sup>113,115,100,117,120</sup>, 2-etylpyrazin<sup>113</sup>, 2,3-

dimethylpyrazin<sup>113,115,118,120,123</sup>, 2-etyl-6-methylpyrazin<sup>100,113,117,118,120</sup>, 2-etyl-5-methylpyrazin<sup>100,117,120</sup>, 2,3,5-trimethylpyrazin<sup>100,113,115,117,118,120</sup>, 3-etyl-2,5-dimethylpyrazin<sup>113,118</sup>, 2,3,5,6-tetramethylpyrazin<sup>100,113,115,,117,118,120,123,124</sup>, 2-etyl-3,5,6-trimethylpyrazin<sup>113,117,118,123</sup>, 2-acetylpyrrol<sup>100,113,115,117,118,120,123</sup>, metyl-N-hydroxybenzenkarboximidát, N-propan-2-ylacetamid a acetamid. Klíčové čokoládové aroma je tvořeno pyraziny s alkylovými zbytky, především tetramethylpyrazin a trimethylpyrazin. Tetramethylpyrazin je nejvýznamněji obsaženou dusíkatou látkou ve vzorcích především ve skupině kakaových bobů. V čokoládě vyrobených z těchto kakaových bobů je obsah pyrazinů minimální z důvodu použité technologie. Technologie komerčních výrobců je zaměřena na zvýšení a udržení pyrazinů, což vyžaduje vyšší teplotu pražení, která má však neblahý vliv na obsah jedinečných květinových a ovocných aromat, alkoholů, aldehydů a ketonů. Obsah těchto látek je v komerčních čokoládách nižší v obsahu i diverzitě.

Identifikované deriváty furanu jsou: 2-etyl-5-methylfuran<sup>115</sup>, 2-pentylfuran<sup>100,115,117</sup> a furan-2-ylmetanol<sup>100</sup>. Dalšími identifikovanými látkami jsou deriváty oxolanu, substitované alkany a fenoly: 2,4,5-trimetyl-1,3-dioxolan<sup>114</sup>, 2-*tert*-butyl-5-propan-2-yl-1,3-dioxolan-4-on, 4-allyloxy-2,6-dibutylfenol, 2,2,4,6,6-pentamethylheptan, 2,2,4,4-tetrametyloktan, toluen<sup>116</sup> a 1,3,5-trimetylbenzen.

Tabulka 17: Identifikované těkavé látky, jejich charakteristická vůně a fáze vzniku či chemické prekurzory, pozn.: F-pochází z fermentace, S-pochází z fáze sušení, P-pochází z fáze pražení, K-pochází z fáze konšování.

Název	Aroma	Prekurzory/dráha vývinu látky
Etanol	Neurčeno	F
2,4,5-trimetyl-1,3-dioxolan	Spíše nepříjemné	P, kondenzace acetaldehydu a butan-2,3-diolu
2,2,4,6,6-pentametylheptan	Není dostupná literatura	
Pentan-2-on	Ovocná	F, konečná fáze <sup>125</sup>
Pentanal	Sladká, mandlová	F <sup>126</sup>
N-propan-2-ylacetamid	Není dostupná literatura	
Butan-2,3-dion	Máslová, zemitá	F, bakterie a kvasinky <sup>126</sup>
2,2,4,4-tetrametyloktan	Není dostupná literatura	
2-metylpropylacetát	Ovocná	F, metabolity kvasinek <sup>127</sup>
2-etyl-5-metylfuran	Sladká karamelová	P, Maillardova reakce <sup>70</sup>
Toluen	Není dostupná literatura	
Etyl-2-metylbutanoát	Ovocná	P <sup>127</sup>
2,6,6-trimetylbicyklo[3.1.1]hept-2-en	Sladká, dřevitá	P
Butan-2-ylacetát	Ovocná, banánová	F, metabolit kvasinek <sup>126</sup>
Hexanal	Čokoládová, ořechová	F <sup>126</sup>
6,6-dimetyl-2-metylidenebicyklo[3.1.1]heptan	Dřevitá, zemitá	
3-metylbutan-2-ol	Čokoládová, ořechová	F <sup>126</sup>
3-metylbutylacetát	Banánová, ovocná	F, metabolit kvasinek <sup>128</sup>
1-metoxypropan-2-ol	Čokoládová, ořechová	<sup>126</sup>
2-tert-butyl-5-propan-2-yl-1,3-dioxolan-4-on	Svíravá	Reakce polyfenolů
7-metyl-3-metylidenocta-1,6-dien	Bylinná, zemitá	Terpen <sup>126</sup>
1-etoxypropan-2-ol	Není dostupná literatura	
Heptan-2-on	Ovocná	<sup>126</sup>

Tabulka 17: (pokračování)

Název	Aroma	Prekurzory/dráha vývinu látky
Heptanal	Čokoládová, oříšková	F <sup>126</sup>
1-metyl-4-prop-1-en-2-ylcyklohexen	Citrusová, ovocná	
1-metoxypropan-2-ylacetát	Sladká	129
2-metylbutan-1-ol	Ovocná	Pravděpodobně produkt metabolismu kvasinek <sup>130</sup>
2-pentylfuran	Máslová, zemitá	Pravděpodobně činností <i>Aspergillus fumigatus</i> <sup>131</sup>
(3Z,5E)-3,7-dimetylocta-1,3,5-trien	Sladká	
3,7,7-trimetylbicyklo[4.1.0]hept-3-en	Sladká	
Pentan-1-ol	Trávová, zemitá	126
Heptylacetát	Ovocná	132
2-metylpyrazin	Ořechová, čokoládová	P, Streckerova degradace <sup>70</sup>
1,3,5-trimetylbenzen	Sladká	
3-hydroxybutan-2-on	Ovocná	produkt alkoholového kvašení z pyruvátu či butanediolu a je prekurzorem tetrametylpyrazinu <sup>126</sup>
Heptan-2-ol	Ovocná, citrusová	vzniká termickou degradací aminokyselin <sup>126</sup>
2-hydroxyetyl-3-oxobutanoát	Není dostupná literatura	
2,5-dimetylpyrazin	Ořechová, čokoládová	P, Streckerova degradace <sup>126</sup>
2,6-dimetylpyrazin	Ořechová, čokoládová	P, Streckerova degradace <sup>126</sup>
2-etylpyrazin	Ořechová, čokoládová	P, Streckerova degradace <sup>126</sup>
2,3-dimetylpyrazin	Karamelová, oříšková, čokoládová	P, Streckerova degradace <sup>126</sup>
(Z)-5-metyl-2-propan-2-ylhex-2-enal	Bylinná, zemitá	

Tabulka 17: (pokračování)

<i>Název</i>	<i>Aroma</i>	<i>Prekurzory/dráha vývinu látky</i>
(4E,6E)-2,6-dimetylocta-2,4,6-trien	Neurčeno	133
2-etyl-6-metylpyrazin	Ořechová, čokoládová	P, Streckerova degradace <sup>126,70</sup>
1-hydroxypropan-2-on	Sladká	Produkt Maillarovy reakce <sup>134</sup>
2-etyl-5-metylpyrazin	Ořechová, karamelová, čokoládová	P, Streckerova degradace <sup>126,70</sup>
3-oxobutylacetát	Není dostupná literatura	
Nonan-2-on	Květinová	126
Nonanal	Květinová	126
2,3,5-trimetylpyrazin	Kakaová, čokoládová	Bakterie v poslední fázi fermentace <sup>126</sup>
Etyloktanoát	Ovocná	126
2-(eten-5-yl-5-metyloxolan-2-yl)propan-2-yletylkarbonát	Sladká	135
3-etyl-2,5-dimetylpyrazin	Uzená, zemitá	P, Streckerova degradace <sup>126</sup>
Kyselina octová	Kyselá, svíravá	126
1-(1-metoxypropan-2-yloxy)propan-2-ol	Není dostupná literatura	
2,3,5,6-tetrametylpyrazin	Čokoládová, oříšková	P, Streckerova degradace <sup>126</sup>
2-ethylhexan-1-ol	Sladká	126
2-etyl-3,5,6-trimetylpyrazin	Čokoládová, oříšková	P, Streckerova degradace <sup>127</sup>
1-(2-metoxypropoxy)propan-2-ol	Neurčeno	136
Benzaldehyd	Ořechová, čokoládová	126
Butan-2,3-diol	Sladká, květinová	F <sup>127</sup>
3,7-dimetylokta-1,6-dien-3-ol	Květinová	137
2-etylbutanová kyselina	Kyselá, svíravá	
Etylacetát	Ovocná	127
2-metylpropanová kyselina	Žluklá, svíravá	126

Tabulka 17: (pokračování)

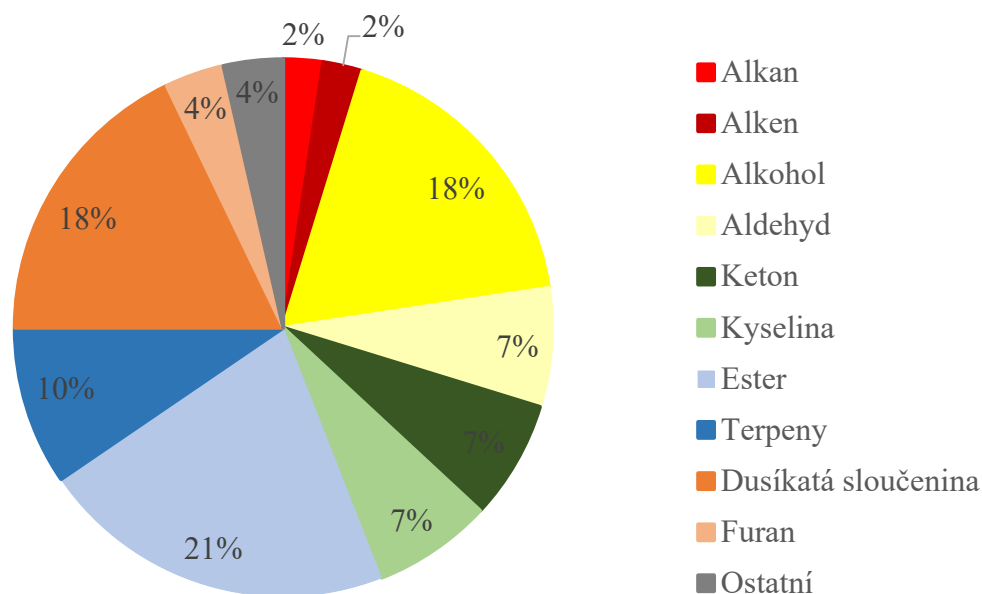
<i>Název</i>	<i>Aroma</i>	<i>Prekurzory/dráha vývinu látky</i>
2-metylpropylbutanoát	Ovocná	138
4-hydroxybutanová kyselina	Kyselá, svíravá	
Oxolan-2-ylmethylacetát	Ovocná	P, Maillardovou reakcí
Furan-2-ylmetanol	Hořká, svíravá	P, produkt Maill.reakce
3-metylbutanová kyselina	Kyselá, svíravá	F
2-metylbutanová kyselina	Kyselá, svíravá	F
Metyl-(Z)-N-hydroxybenzen karboximidát	Neurčeno	139
eten-6-yl-2,2,6-trimetyloxan-3- ol	Citrusová	
Acetamid	Uzená, zemitá	
Etyl-2-fenylacetát	Květinová	F, během fermentace koncentrace klesá, prekurzor Phe <sup>124</sup>
Etyl-2-(4-acetylfenyl)acetát	Ovocná	
(E)-3-metyl-4-(2,6,6-trimetyl cyklohex-2-en-1-yl)but-3-en-2- on	Květinová	
[2,4,4-trimetyl-3-(2-metylpropan oyloxy)pentylyl]2-metylpropanoát	Není dostupná literatura	
2-fenyletanol	Květinová	F, prekurzor Phe, <i>K. apiculata</i> , <i>S. cerevisiae</i> var. <i>chevalieri</i> <sup>124</sup>
1-(1H-pyrrol-2-yl)etanoát	Čokoládová, oříšková	P <sup>140</sup>
2,6-di- <i>tert</i> -butylbenzen-1,4-diol	Svíravá	Patří mezi chinony a pravděpodobně vzniká oxidací polyfenolů během pražení
2-benzylidenoktanal	Květinová	141
2,4,6-tri- <i>tert</i> -butylfenol	Svíravá	142
Decyldekanoát	Sladká	143
2,6-di- <i>tert</i> -butyl-4-prop-2- enoxyfenol	Svíravá	Pravděpodobně reziduum polyfenolů

Tabulka 17: (pokračování)

Název	Aroma	Prekurzory/dráha vývinu látky
Metyl-2-(6- <i>tert</i> -butyl-1,1-dimetyl-2,3-dihydroinden-4-yl)acetát	Neurčeno	144

#### 4.2 Srovnání početního zastoupení těkavých látek ve vzorcích

Identifikované těkavé látky byly rozděleny do 11 chemických skupin dle jejich chemické struktury a funkčních skupin. Celkem bylo identifikováno 86 těkavých látek, z nich 18 esterů, 15 dusíkatých sloučenin, 15 alkoholů, 10 terpenů (z nich 8 terpenových uhlovodíků, 1 terpenový keton a 1 terpenový alkohol), 6 aldehydů, ketonů a kyselin, 3 furany a ostatní látky a 2 alkany i alkeny. Poměrné zastoupení jednotlivých chemických skupin je znázorněno pomocí koláčového grafu (viz Graf 1).



Graf 1: Poměrné zastoupení identifikovaných těkavých látek dělených dle chemické skupiny.

Tabulka 18: Početní zastoupení těkavých látek dle chemických skupin vzorků. Značení vzorků viz Tabulka 15.

<i>Vzorky:</i>	<i>A01</i>	<i>A02</i>	<i>A03</i>	<i>A04</i>	<i>A05</i>	<i>A06</i>	<i>A07</i>	<i>A08</i>	<i>A09</i>	<i>A10</i>	<i>A11</i>	<i>A12</i>	<i>A13</i>	<i>A14</i>	<i>A15</i>	<i>A16</i>
<i>Alkan</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>Alken</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	2	0	0
<i>Alkohol</i>	8	5	9	3	10	4	7	5	10	3	7	6	3	4	4	6
<i>Aldehyd</i>	0	1	1	1	0	1	0	1	3	0	2	3	3	2	3	5
<i>Keton</i>	4	1	2	2	2	2	1	2	3	2	3	3	0	3	1	1
<i>Kyselina</i>	2	3	4	2	4	2	3	3	4	2	4	2	2	2	2	3
<i>Ester</i>	10	2	4	2	5	2	3	1	6	0	7	5	3	4	4	4
<i>Terpenový uhlovodík</i>	0	0	2	3	2	1	2	1	5	1	3	1	1	1	2	2
<i>Terpenový keton</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
<i>Terpenový alkohol</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
<i>Dusíkatá sloučenina</i>	1	2	2	0	3	0	3	0	3	0	12	2	3	5	5	6
<i>Furan</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2
<i>Ostatní</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
<i>Celkem</i>	26	14	25	13	26	12	19	13	38	8	42	25	15	23	21	31

#### 4.2.1 Kakaové boby vs. příslušná čokoláda

Při porovnání početního zastoupení těkavých látek ve vzorku bobů s příslušným vzorkem čokolády se stejným geografickým původem je možné sledovat jejich shodu v 3-4 alkoholech, 2 kyselinách 1 ketonu a 1 terpenu (kromě vzorku z Peru). Početné zastoupení identifikovaných těkavých látek je znázorněno pomocí sloupcového grafu (viz Graf 2). Je dobře patrné, že v kakaových bobech (nepražených) je vždy výrazně vyšší počet identifikovaných látek (cca 2krát, v případě vzorků z Ekvádoru dokonce cca 4krát), než v čokoládě. To by mohlo naznačovat, že podstatná část těkavých látek se tvoří už při zpracování kakaových bobů, a během výroby čokolády dochází naopak k rozkladu nebo vytěkání některých sloučenin (především alkoholů a esterů).

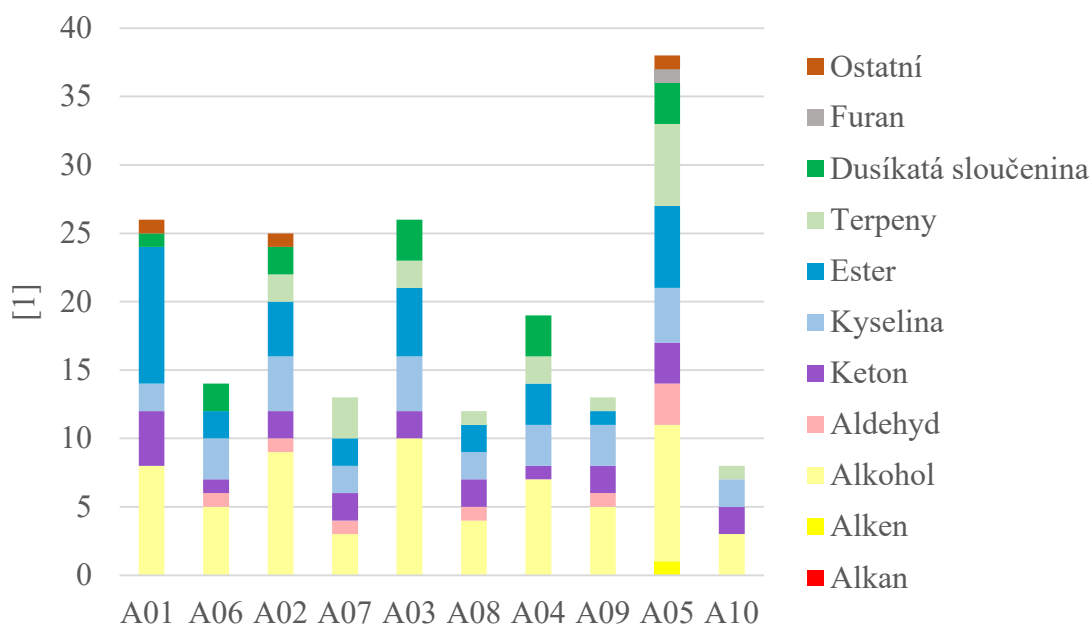
Vzorek kakaových bobů z Peru se shoduje se vzorkem čokolády z těchto bobů v 10 těkavých látkách celkem. Shodné jsou 3 alkoholy, 2 kyseliny a estery a 1 keton a dusíkatá sloučenina. Vzorek čokolády je bohatší o 4 těkavé látky, kterými jsou 2 alkoholy a 1 aldehyd a kyselina. Vzorek kakaových bobů je pak bohatší o 16 těkavých látek, kterými jsou 8 esterů, 5 alkoholů a 3 ketony.

Vzorek kakaových bobů z Haiti se shoduje se vzorkem čokolády z těchto bobů v 8 těkavých látkách celkově. Shodné jsou 4 alkoholy, 2 kyseliny a 1 keton a terpenový uhlovodík. Vzorek čokolády je bohatší o 5 těkavých látek, kterými je 1 alkohol, aldehyd, keton, kyselina a ester. Vzorek kakaových bobů je bohatší o 10 těkavých látek, kterými jsou 3 alkoholy a dusíkaté sloučeniny, 2 estery a 1 kyselina a terpenový uhlovodík.

Vzorek kakaových bobů z Tanzanie se shoduje se vzorkem čokolády z těchto bobů v 10 sloučeninách, kterými jsou 4 alkoholy, 2 kyseliny a estery a v 1 ketonu a terpenového uhlovodíku. Vzorek čokolády je bohatší o 2 těkavé látky a to 1 aldehyd a keton. Vzorek kakaových bobů je bohatší o 16 těkavých látek, kterými je 6 alkoholů, 3 estery a dusíkaté sloučeniny, 2 kyseliny a 1 keton a terpenový uhlovodík.

Vzorek kakaových bobů z Madagaskaru se shoduje se vzorkem čokolády vyrobené z těchto bobů v 9 těkavých látkách, kterými jsou 3 alkoholy, 2 kyseliny a 2 terpenové uhlovodíky a 1 keton a ester. Vzorek čokolády je bohatší o 4 těkavé látky, kterými jsou 1 aldehyd, keton, ester a terpenový uhlovodík. Vzorek kakaových bobů je bohatší o 16 těkavých látek, kterými je 6 alkoholů, 3 estery, 2 kyseliny a dusíkaté sloučeniny a 1 aldehyd, keton a nezařazená látka.

Vzorek kakaových bobů z Ekvádoru se shoduje se vzorkem čokolády vyrobené z těchto bobů v 7 těkavých látkách, kterými jsou 3 alkoholy, 2 kyseliny a 1 keton a terpen. Vzorek čokolády je bohatší o 1 keton. Vzorek kakaových bobů je bohatší o 29 těkavých látek, kterými je 7 alkoholů, 6 esterů, 4 terpeny, 3 aldehydy a dusíkaté sloučeniny, 2 ketony a kyseliny a 1 furan a nezařazená látka.



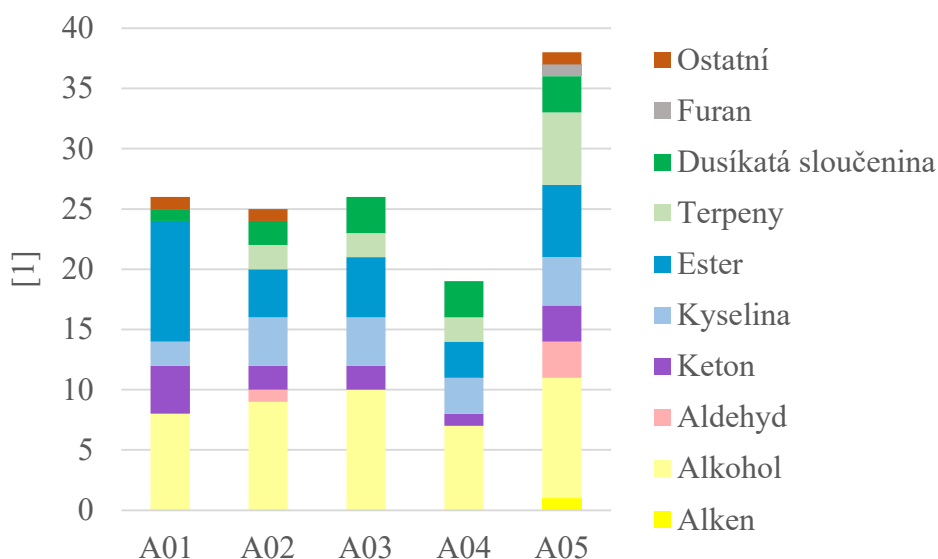
Graf 2: Početní zastoupení identifikovaných těkavých látek ve vzorcích (kakaové boby vs. příslušná čokoláda). Značení vzorků viz Tabulka 15.

#### 4.2.2 Kakaové boby různého geografického původu

Všechny vzorky kakaových bobů se shodují v 10 identifikovaných těkavých látkách, kterými jsou 3 alkoholy a estery, 2 kyseliny a 1 keton a dusíkatá sloučenina. Početní zastoupení těkavých látek ve vzorcích kakaových bobů je znázorněno pomocí sloupcového grafu (viz Graf 3). Nejbohatší vzorek podle počtu i skupin těkavých látek je vzorek kakaových bobů z Ekvádoru, jehož analýzou bylo identifikováno 38 sloučenin. Naopak nejméně bohatým vzorkem v počtu těkavých látek je vzorek kakaových bobů z Haiti, při jehož analýze bylo identifikováno pouze 19 sloučenin.

Vzorek kakaových bobů z Ekvádoru se liší o 14 identifikovaných těkavých látek, kterými jsou 4 terpeny, 2 aldehydy a estery a 1 alken, alkohol, keton, dusíkatá sloučenina, furan a ostatní látka. Vzorek kakaových bobů z Peru se odlišuje o 11 těkavých látek, kterými je 6 esterů, 2 alkoholy a aldehydy a 1 ostatní těkavou látku. Vzorek kakaových bobů z Tanzanie se liší o 2 estery. Vzorek kakaových bobů z Haiti se odlišuje o 1 dusíkatou sloučeninu a vzorek kakaových bobů z Madagaskaru se liší o 1 ostatní látku.

Ve všech vzorcích bylo nejvíce alkoholů, zajímavý je výrazně vyšší počet identifikovaných sloučenin ve vzorku z Ekvádoru, způsobený především vyšším počtem (5) identifikovaných terpenových uhlovodíků. Vzorky z Peru, Madagaskaru a Tanzanie jsou si z hlediska složení podobné, mírně se odlišuje vzorek z Peru, kde nebyly detekovány žádné terpenové uhlovodíky, ale zato nejvíce esterů (10).



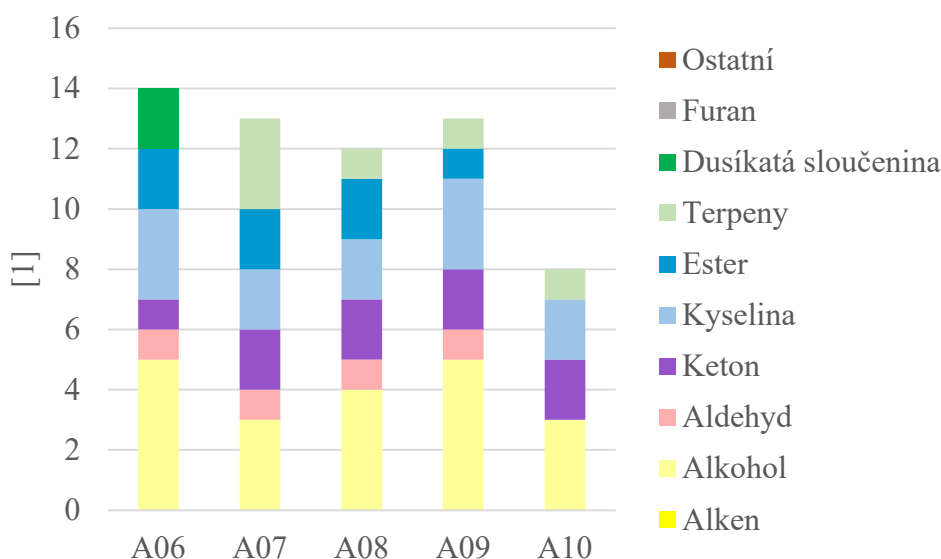
Graf 3: Početní zastoupení těkavých látek ve vzorcích kakaových bobů (kakaové boby různého geografického původu). Značení vzorků viz Tabulka 15.

#### 4.2.3 Vzorky čokolád různého geografického původu

Ve všech vzorcích čokolád bylo identifikováno 6 identických těkavých látek, kterými jsou 3 alkoholy, 2 kyseliny a 1 keton. Početní zastoupení identifikovaných těkavých látek ve vzorcích čokolád se známým původem kakaových bobů je znázorněno pomocí sloupcového grafu (viz Graf 4). Nejbohatším vzorkem v počtu identifikovaných těkavých látek je vzorek čokolády vyrobené z kakaových bobů z Peru, ve kterém bylo identifikováno 14 těkavých látek ze 6 chemických skupin. Naopak nejmenší počet těkavých látek byl identifikován ve vzorku čokolády vyrobené z kakaových bobů z Ekvádoru, ve kterém bylo identifikováno 8 těkavých látek ze 4 chemických skupin. To je zajímavé, protože v kakaových bobech z Ekvádoru byl nalezen naopak nejvyšší počet (38) sloučenin (viz kap. 4.2.2).

Ve všech vzorcích bylo nejvíce alkoholů, obdobně jako v bobech. Vzorky z Madagaskaru, Tanzanie a Haiti jsou si z hlediska složení podobné, mírně se odlišuje vzorek z Madagaskaru vyšším počtem terpenových uhlovodíků.

Vzorek čokolády s původem kakaových bobů v Peru se liší od ostatních vzorků čokolád 4 těkavými látkami, kterými jsou 2 dusíkaté látky, 1 alkohol a aldehyd. Vzorek čokolády s původem kakaových bobů v Madagaskaru se liší 3 těkavými látkami, kterými jsou 2 terpeny a 1 aldehyd. Vzorek čokolády s původem kakaových bobů v Tanzanii se liší o 2 těkavé látky, kterými je 1 alkohol a keton. Vzorek čokolády s původem kakaových bobů v Haiti se liší o 1 alkohol. Ve vzorku čokolády vyrobené z kakaových bobů z Ekvádoru nebyla identifikována těkavá látka, která není obsažena v jiném vzorku čokolády.



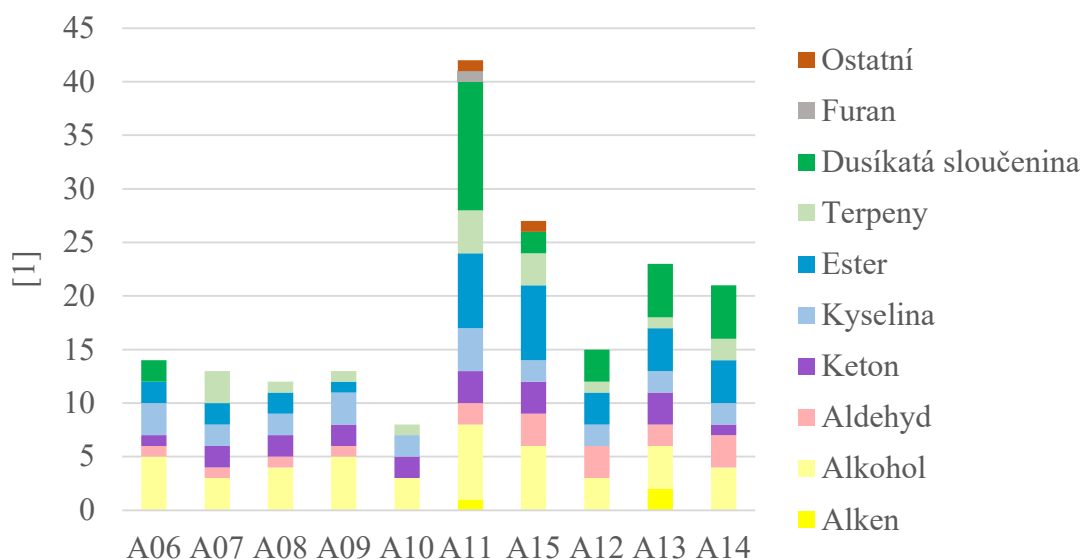
Graf 4: Početní zastoupení těkavých látek ve vzorcích čokolád se známým původem kakaových bobů (dle chemických skupin). Značení vzorků viz Tabulka 15.

#### 4.2.4 Vzorky čokolád různého geografického původu vs. čokoláda z běžné tržní sítě

Početní zastoupení identifikovaných těkavých látek ve vzorcích čokolád se známým původem kakaových bobů a vzorcích čokolád z běžné tržní sítě je znázorněno pomocí sloupcového grafu (viz Graf 5).

Je zajímavé, že ve vzorcích „bio“ bylo identifikováno výrazně méně sloučenin, než ve vzorcích „běžných“ čokolád. To mohlo být způsobeno šetrnějšími podmínkami během výroby. Nejvyšší počet těkavých látek byl identifikován ve vzorku 50% čokolády z běžné tržní sítě (celkem 42), přičemž nejvíce zastoupenou skupinou jsou látky dusíkaté a to především látky obsahující strukturu pyrazinu. Substituované pyraziny vznikají částečně činností bakterií v poslední fázi fermentace a při pražení Maillardovou reakcí a jsou to velice významné chuťové látky s čokoládovými a karamelovými tóny. Je možné, že fermentace byla vedena déle než 6 dní a díky tomu byl vývin těchto látek tak markantní. Pro výrobu čokolády byly použity další ingredience: laktóza (mléko), emulgátor (sójový lecitin), vanilkový extrakt (viz Tabulka 13).

Všechny vzorky čokolád se shodují ve 3 těkavých látkách, kterými jsou kyselina octová a 2 alkoholy, 2-fenyletanol a butan-2,3-diol. Pokud porovnáme čokolády s různým obsahem kakaové sušiny (50 %, 70 %, 78 %, 90 %), lze předpokládat zvyšující se počet sloučenin s vyšším obsahem sušiny, tento předpoklad se však nepotvrdil (viz Graf 5).

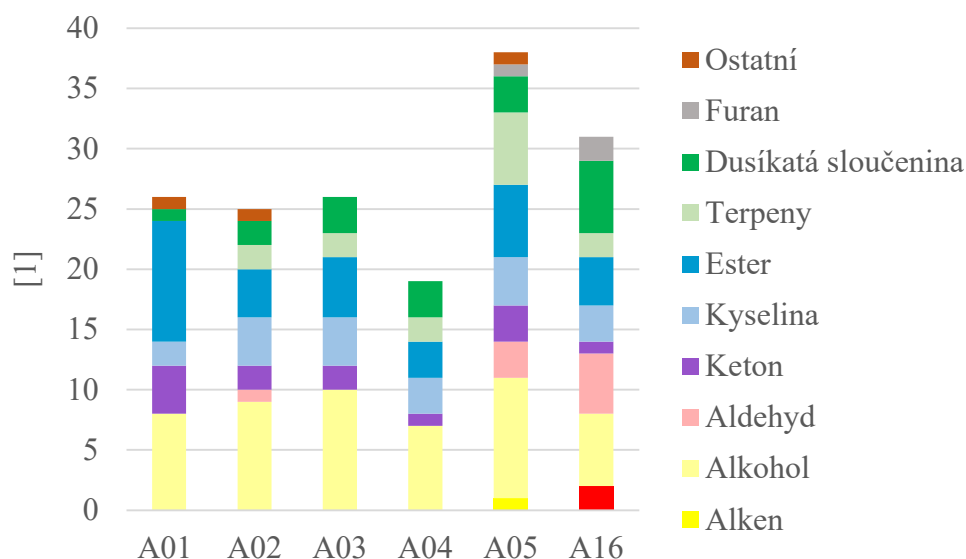


Graf 5: Početní zastoupení identifikovaných těkavých látek ve vzorcích čokolád (čokolády různého geografického původu vs. čokolády z běžné tržní sítě) (dle chemických skupin). Značení vzorků viz Tabulka 15.

#### 4.2.5 Kakaové boby vs. komerční kakaový prášek

Všechny vzorky kakaových bobů a kakaového prášku se shodují v 8 těkavých látkách, kterými jsou 3 estery, 2 alkoholy a 1 keton, kyselina a dusíkatá sloučenina. Vzorek kakaového prášku se od kakaových bobů liší v 16 těkavých látkách, kterými jsou 4 dusíkaté látky, 3 aldehydy, 2 alkany, alkoholy a terpeny a 1 kyselina, ester a furan. Početní zastoupení těkavých látek ve vzorcích kakaových bobů z Peru, Haiti, Tanzanie, Madagaskaru a Ekvádoru a vzorku kakaového prášku rozdělených podle zařazení do chemické skupiny je znázorněno pomocí sloupcového grafu (viz Graf 6).

Vzhledem k tomu, že kakaový prášek jsou vlastně rozemleté kakaové boby, resp. Kakaová sušina po odlisování kakaového másla, lze předpokládat podobné složení těkavých látek. Z Graf 6 je patrný mírně vyšší počet sloučenin v komerčním kakau (kromě bobů z Ekvádoru, které se svým složením, jak již bylo zmíněno, liší od ostatních) a těkavý profil je bohatší o alkany, aldehydy, dusíkaté látky a furany. To může být opět způsobeno šetrnějším postupem výroby „bio“ produktů.



Graf 6: Početní zastoupení identifikovaných těkavých látek ve vzorcích (kakaové boby vs. komerční kakaový prášek) (dle chemických skupin). Značení vzorků viz Tabulka 15.

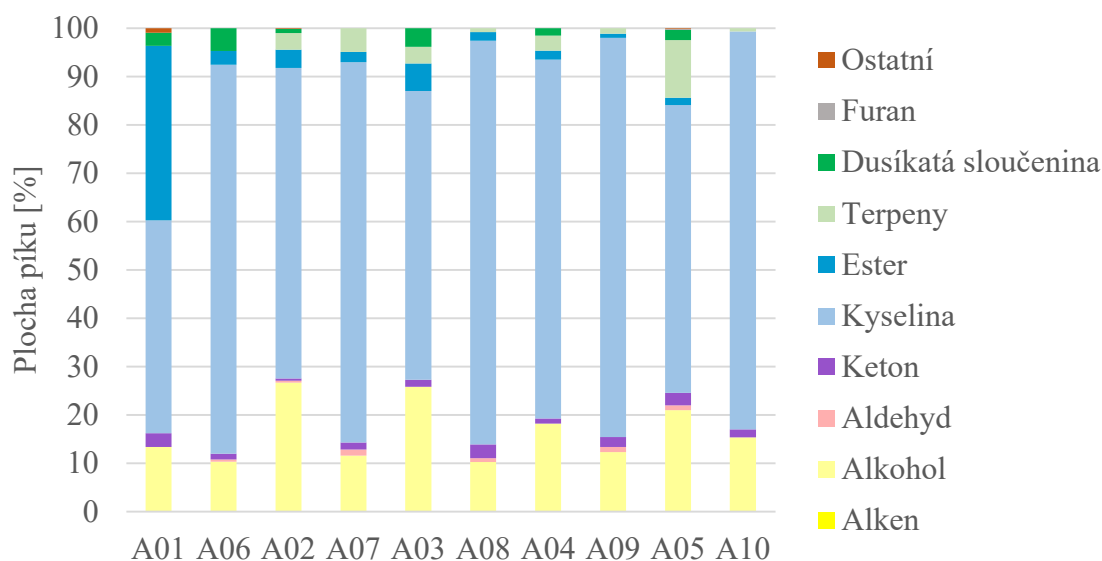
### 4.3 Srovnání obsahu těkavých látek ve vzorcích

Zajímavější než porovnávat pouze počet identifikovaných sloučenin, je sledování jejich obsahu v jednotlivých vzorcích. Obsah těkavých látek ve vzorcích je vyjádřen semikvantitativně metodou vnitřní normalizace, tj. z poměru plochy konkrétního píku k sumě ploch všech píků a výsledná hodnota je uvedena procentuálně. K analýze tak stačí pouze jeden nástřík, není třeba znát jeho objem. Předpokladem je, že všechny složky mají na detektoru stejnou odezvu.<sup>145</sup> Je to sice určité zjednodušení, přesto však lze tímto způsobem poměrně dobře postihnout rozdíly mezi vzorky.

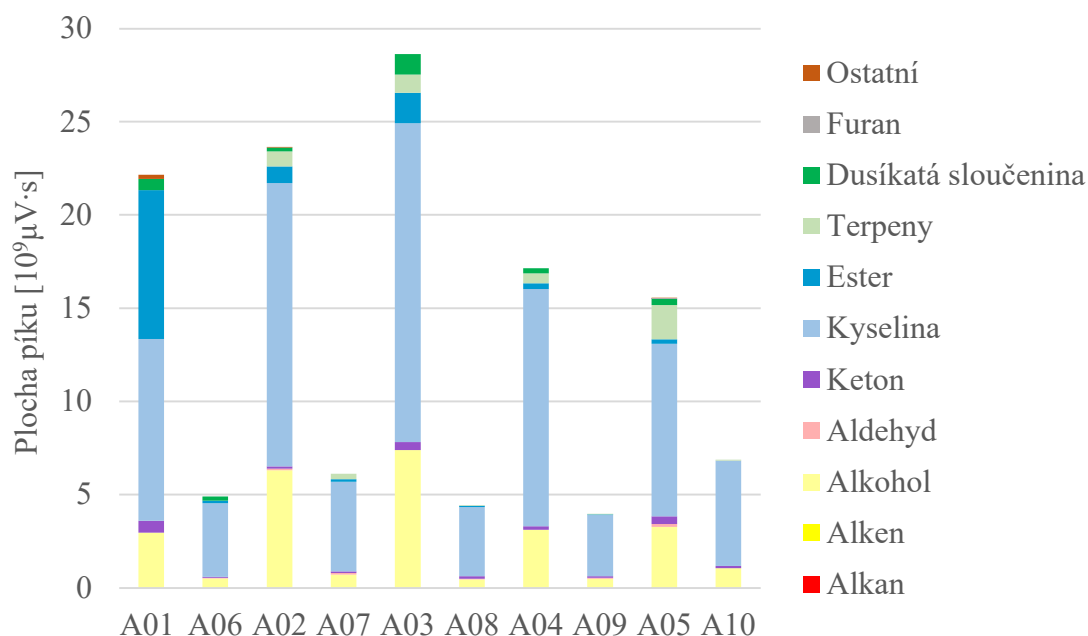
V následujících kapitolách je uvedeno srovnání obsahu identifikovaných sloučenin ve vzorcích, opět rozdělené podle chemických skupin. Výsledky jsou vyjádřeny jako „poměrný obsah“, tj. % z celkové plochy všech píků na chromatogramu a pro lepší přehlednost také jednoduše srovnáním ploch píků.

#### 4.3.1 Kakaové boby vs. příslušná čokoláda

Srovnání je uvedeno v grafu (viz Graf 7). Je patrné, že obsah těkavých látek ve vzorcích čokolád je nižší než v kakaových bobech a to několikanásobně. Ve všech vzorcích jsou nejvíce zastoupeny kyseliny, a to především kyselina octová. Kyselina octová je hlavní produkt fermentace kakaových bobů, v průběhu výroby dochází k jejímu postupnému vytěkání. Zároveň došlo ke snížení obsahu alkoholů a terpenoidů.



Graf 7: Poměrný obsah těkavých látek ve vzorcích (kakaové boby vs. příslušná čokoláda). Značení vzorků viz Tabulka 15.

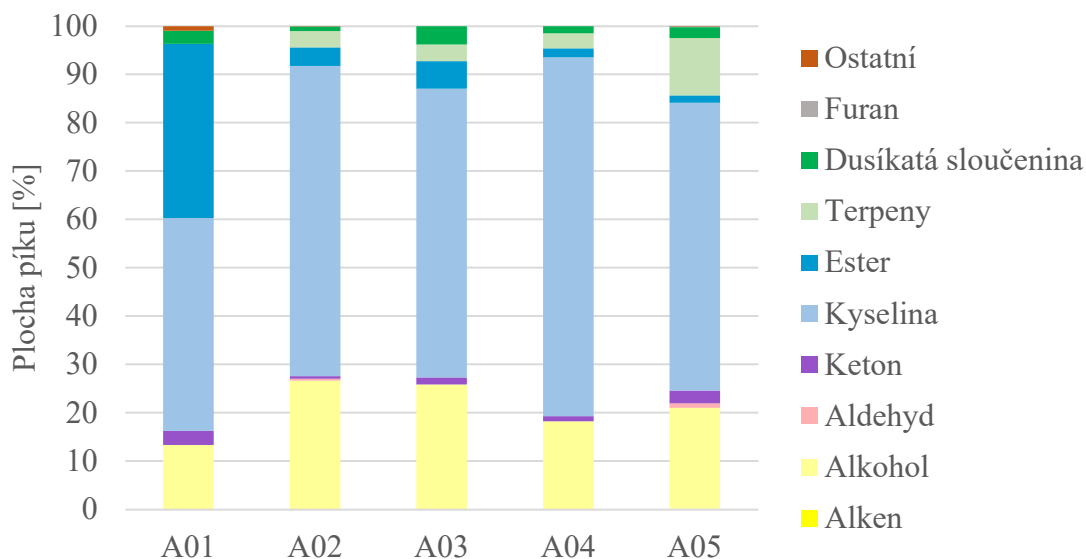


Graf 8: Plocha píků těkavých látek ve vzorcích (kakaové boby vs. příslušná čokolády). Značení vzorků viz Tabulka 15.

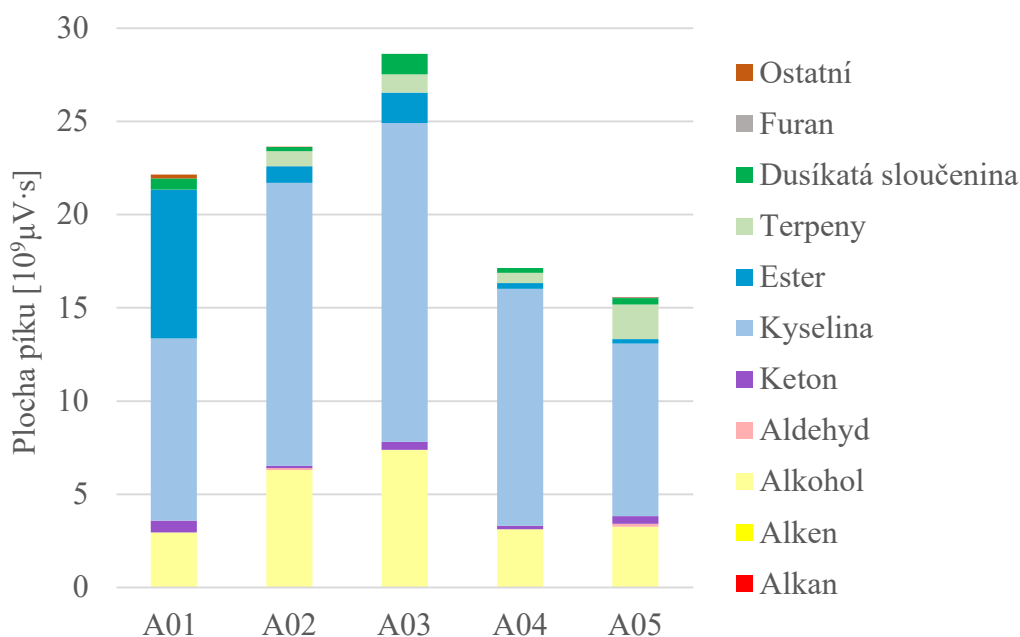
#### 4.3.2 Srovnání obsahu těkavých látek ve vzorcích kakaových bobů

Srovnání obsahu těkavých látek ve vzorcích kakaových bobů je možné pozorovat na sloupcovém grafu (viz Graf 9). Jak je vidět, složení je obdobné u všech vzorků, nicméně jsou mezi nimi patrné rozdíly.

Vzorek kakaových bobů z Tanzanie a Madagaskaru obsahují vysoké množství kyselin, kakaové boby z Ekvádoru a Peru obsahují méně. Obsah alkoholů ukazuje podobný vztah. Vysoké množství alkoholů obsahují kakaové boby z Tanzanie a Madagaskaru a nižší velmi blízké množství kakaové boby z Ekvádoru, Haiti i Peru. Peruánské kakaové boby se vyznačují vysokým obsahem esterů. Nejvyšší obsah terpenů byl zjištěn ve vzorku kakaových bobů z Ekvádoru.



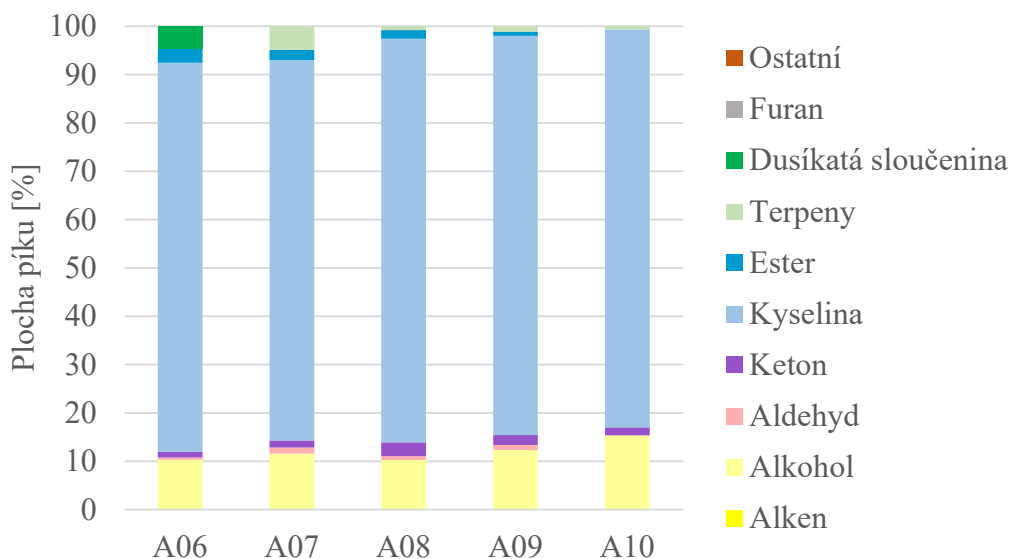
Graf 9: Poměrný obsah těkavých látek ve vzorcích kakaových bobů (kakaové boby různého geografického původu). Značení vzorků viz Tabulka 15.



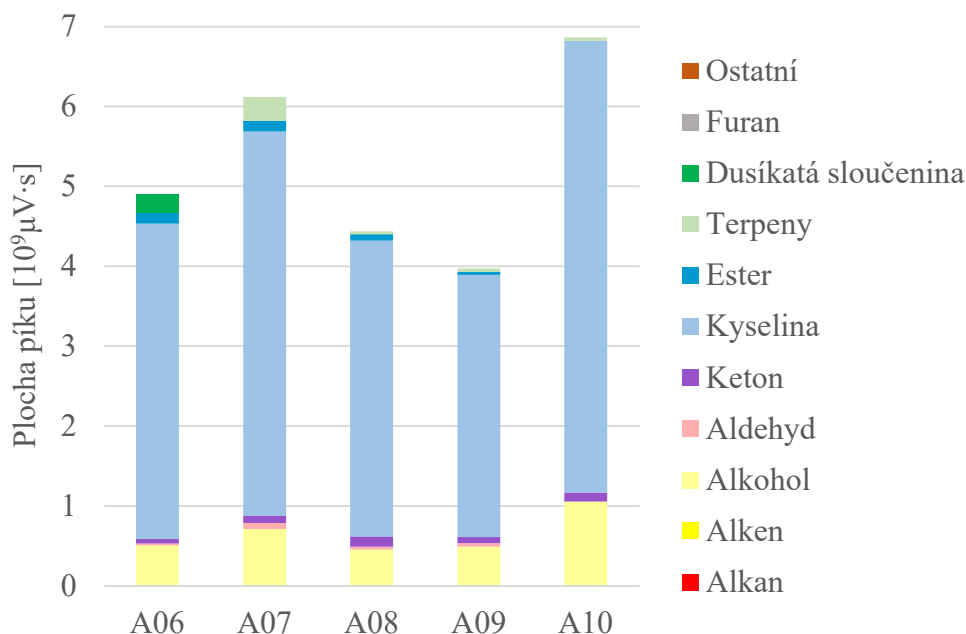
Graf 10: Plocha piků těkavých látek ve vzorcích kakaových bobů (kakaové boby různého geografického původu). Značení vzorků viz Tabulka 15.

#### 4.3.3 Srovnání obsahu těkavých látek ve vzorcích čokolád o různém původu kakaových bobů

Srovnání obsahu těkavých látek ve vzorcích čokolád o různém původu kakaových bobů je znázorněno pomocí sloupcového grafu (viz Graf 11). Jak je vidět, podobné jako v případě kakaových bobů, i složení čokolád je obdobné, nicméně jsou mezi nimi patrné rozdíly. Ve všech vzorcích stále převažují kyseliny, nejvyšší množství kyselin je ve vzorcích z ekvádorských a madagaskarských kakaových bobů.



Graf 11: Poměrný obsah těkavých látek ve vzorcích čokolád (čokolády různého geografického původu). Značení vzorků viz Tabulka 15.



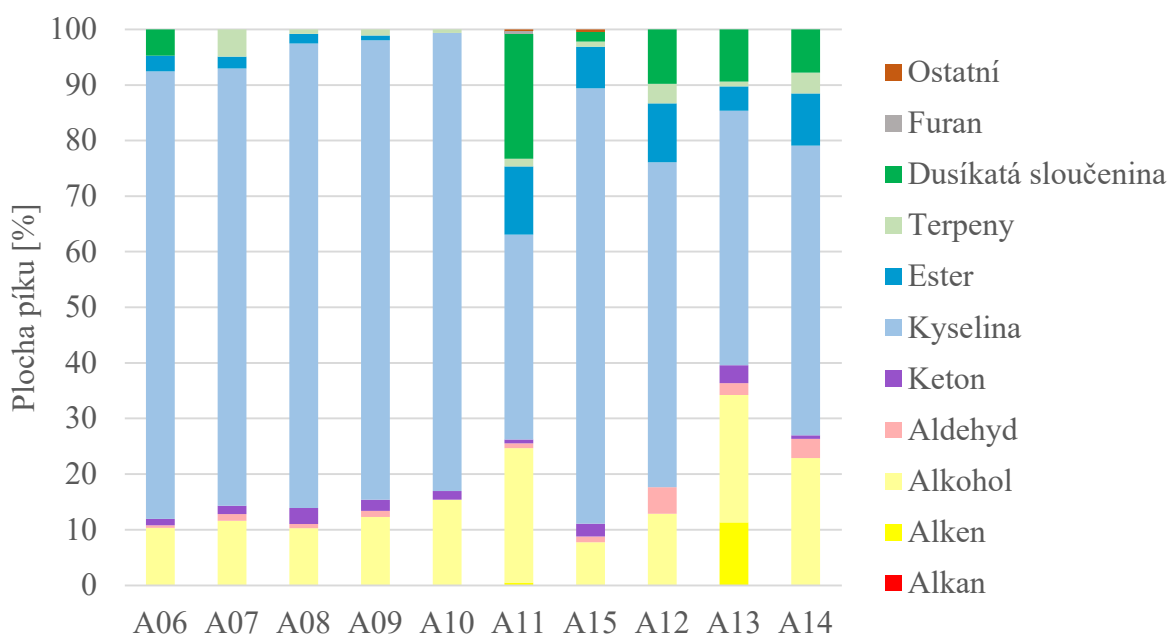
Graf 12: Plocha píků těkavých látek ve vzorcích čokolád (čokolády různého geografického původu). Značení vzorků viz Tabulka 15.

#### 4.3.4 Čokolády různého geografického původu vs. čokolády z běžné tržní sítě

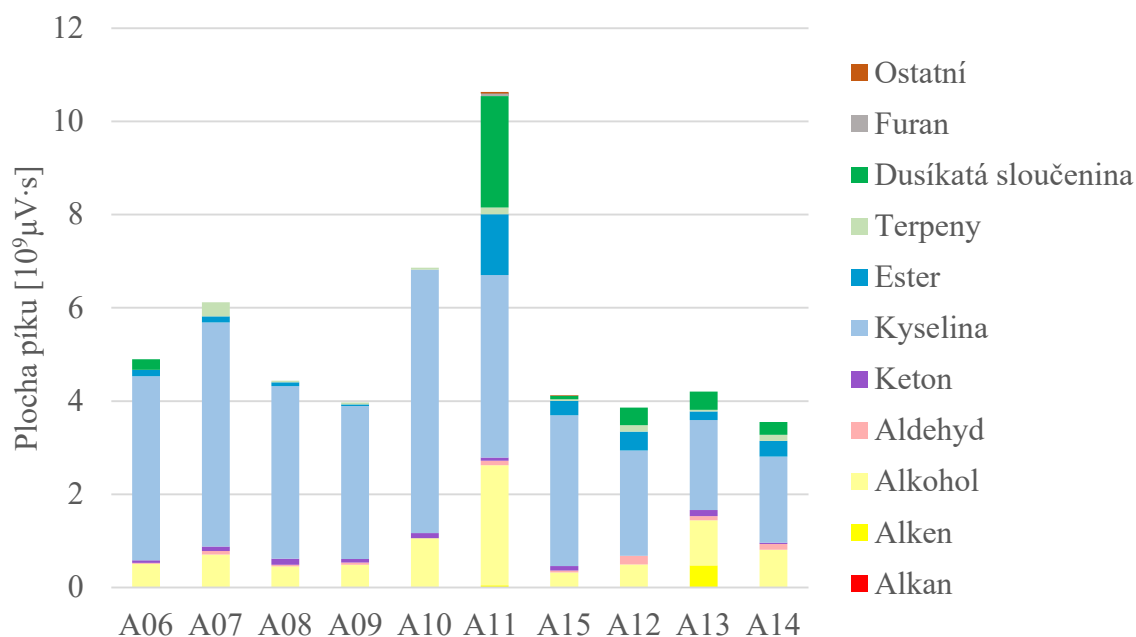
Srovnání obsahu těkavých látek ve vzorcích čokolád je znázorněno pomocí sloupcového graf (viz Graf 13). Je vidět, že komerční čokolády mají mírně nižší obsah těkavých látek, než čokolády „bio“. Jejich složení je podobné, opět se nepotvrdil předpoklad, že s vyšším obsahem kakaové sušiny (50 %, 70 %, 78 %, 90 %) se bude zvyšovat obsah těkavých sloučenin.

Nejvyšší obsah (stejně jako největší počet) těkavých látek byl zjištěn ve vzorku 50% čokolády, především díky vysokému obsahu dusíkatých látek, pyrazinů. Tyto sloučeniny vznikají především při pražení Maillardovou reakcí. Tento vzorek měl poněkud odlišné složení (viz kap. 3.4, Tabulka 13), na obalu je uvedeno použití mléka a laktózy, což mohou být prekurzory mnoha dalších těkavých látek.

Jak již bylo zmíněno, ve vzorcích výrazně převažují kyseliny, největší obsah kyselin obsahuje vzorek čokolády vyrobené z ekvádorských kakaových bobů. Nejnižší obsah kyselin obsahují vzorky čokolád 70%, 78% a 90%.



Graf 13: Poměrný obsah těkavých látek ve vzorcích čokolád (čokolády různého geografického původu vs. čokolády z běžné tržní sítě). Značení vzorků viz Tabulka 15.

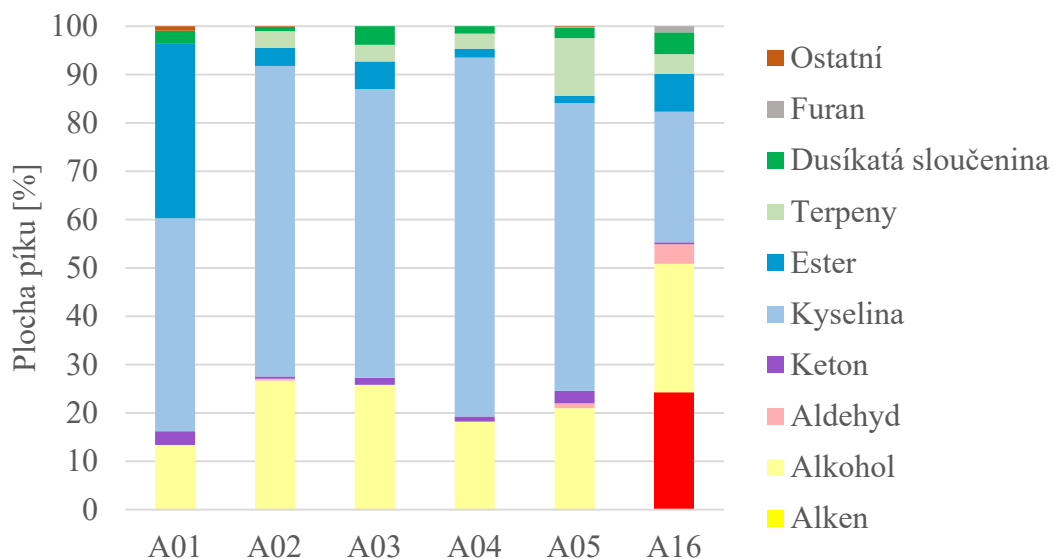


Graf 14: Plocha píků těkavých látek ve vzorcích čokolád (čokolády různého geografického původu vs. čokolády z běžné tržní sítě). Značení vzorků viz Tabulka 15.

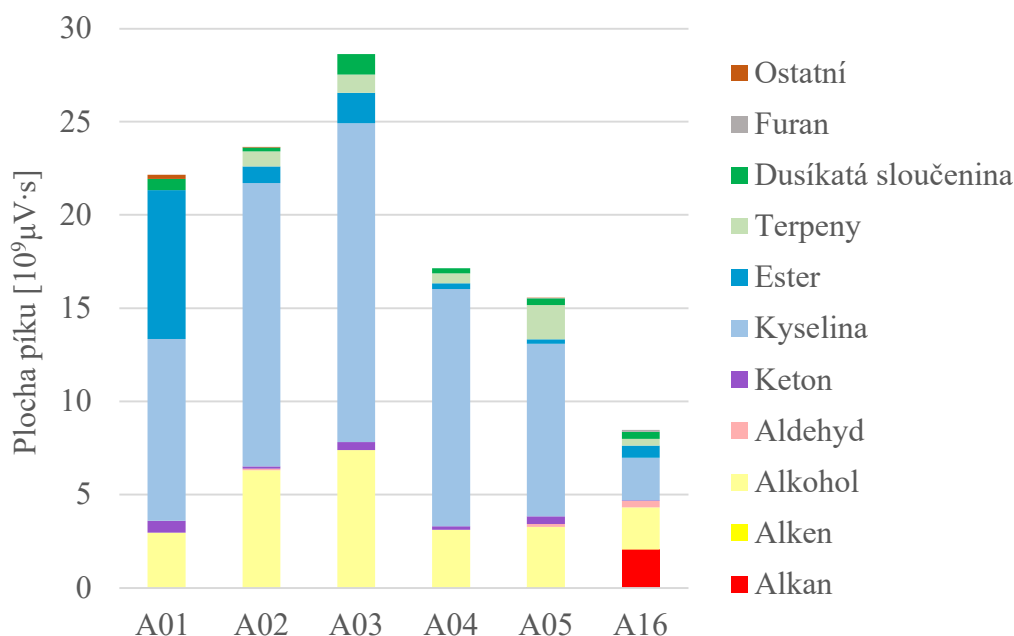
#### 4.3.5 Srovnání obsahu těkavých látek kakaového prášku a kakaových bobů

Srovnání obsahu těkavých látek ve vzorcích kakaového prášku a kakaových bobů je znázorněno pomocí sloupcového grafu (viz Graf 15). Z grafu je patrný výrazně nižší celkový obsah a odlišná skladba sloučenin komerčního kaka.

Kakaový prášek ve srovnání s kakaovými boby obsahuje především výrazně nižší množství kyselin a alkoholů. Jak již bylo uvedeno, je to pravděpodobně způsobeno odlišnostmi v technologickém postupu, kdy došlo k jejich rozkladu nebo vytěkání.



Graf 15: Poměrný obsah těkavých látek ve vzorcích (kakaové boby vs. kakaový prášek). Značení vzorků viz Tabulka 15.

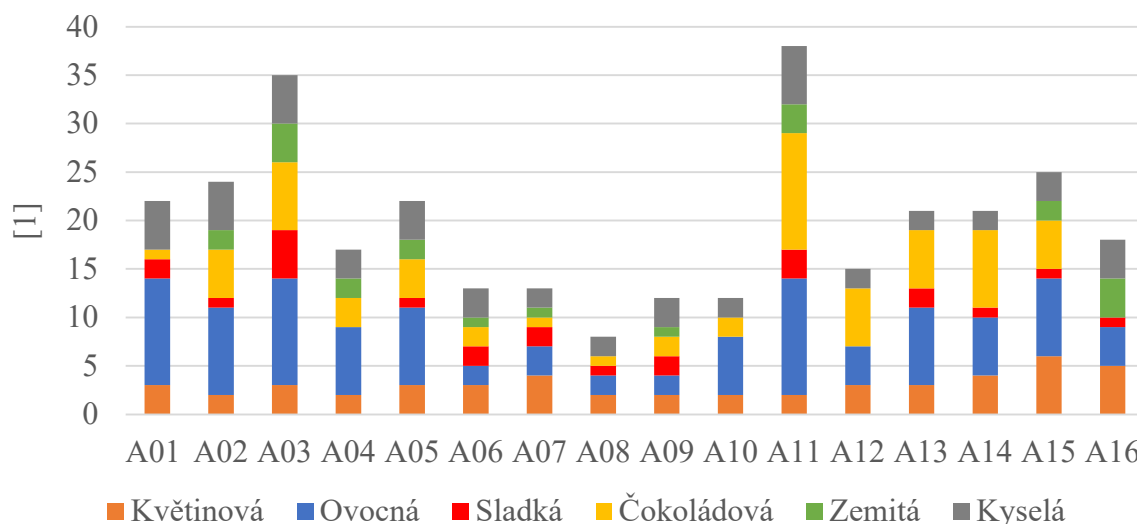


Graf 16: Plocha píků těkavých látek ve vzorcích (kakaové boby vs. kakaový prášek). Značení vzorků viz Tabulka 15.

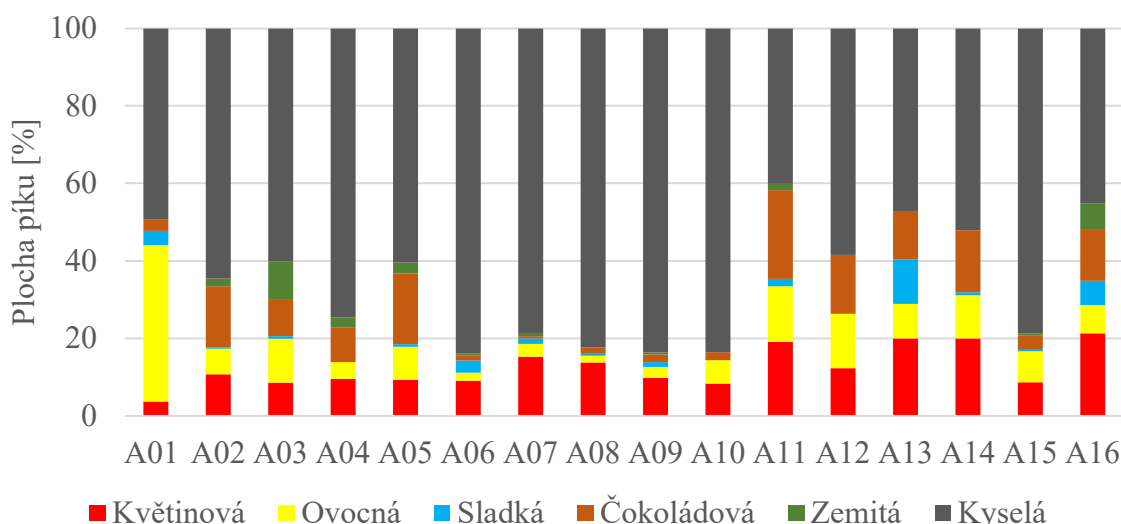
#### 4.4 Srovnání aromatického profilu

Během zpracování nepražených kakaových bobů dochází k významnému poklesu obsahu těkavých látek. Ve všech vzorcích převládá koncentrace těkavých látek kyselé vůně především pro vysokou koncentraci kyseliny octové ve vzorcích. Došlo k poklesu obsahu těchto látek v čokoládách na 61-22 % původního obsahu v kakaových bobech. Kakaové boby z Peru

vynikají vysokým obsahem látek s ovocným charakterem vůně. Kakaové boby z Tanzanie i Madagaskaru mají vyšší obsah těkavých látek s ovocnou a květinovou charakteristikou vůně v porovnání s ostatními vzorky kakaových bobů. Kakaové boby z Ekvádoru vynikají obsahem těkavých látek zemitého charakteru vůně. Kakaový prášek má nižší obsah těkavých látek s kyselým charakterem a zároveň poměrně vyrovnaný obsah látek s květinovým, ovocným, čokoládovým i zemitým charakterem vůni. Početní zastoupení i poměrný obsah těkavých látek vzorků v závislosti na charakteru vůně je možné porovnat graficky (viz Graf 17 a Graf 18).



Graf 17: Počet těkavých látek ve vzorcích (podle charakteru vůně). Značení vzorků viz Tabulka 15.



Graf 18: Poměrný obsah těkavých látek ve vzorcích (podle charakteristické vůně). Značení vzorků viz Tabulka 15.

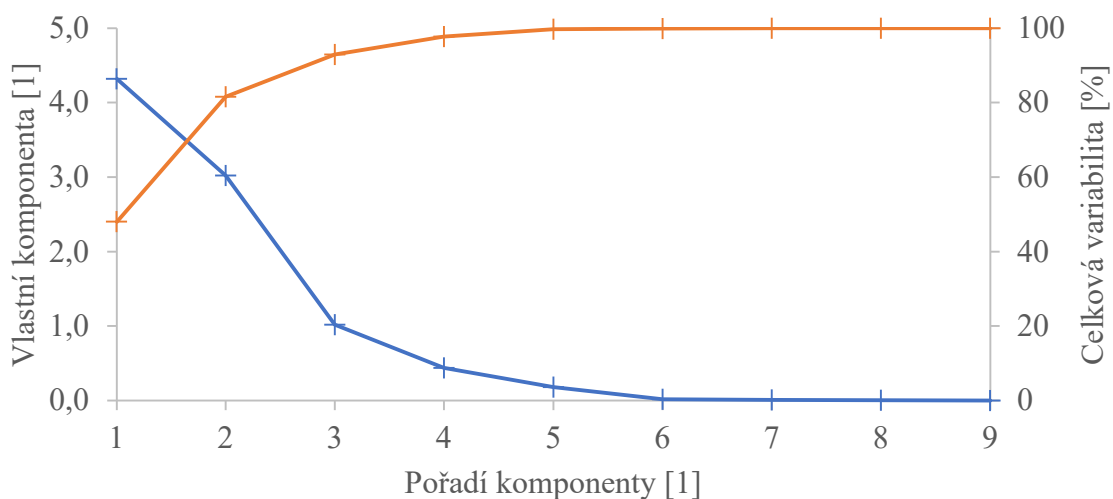
## 4.5 Analýza hlavních komponent PCA

Analýza hlavních komponent (PCA „Principal component analysis“) je multivariační technikou statistického zpracování dat. Cílem je extrakce nejdůležitějších informací z dat, komprese velikosti souboru dat, zjednodušení jejich popisu a analýza struktury měření i proměnných. Výsledkem je výpočet nových proměnných, hlavních komponent, které jsou získány lineární kombinací původních proměnných. První komponenta je získána tak, aby postihla co nejvyšší variabilitu původních dat. Druhá komponenta je dopočítána tak, aby byla v ortogonální pozici k první. Nové proměnné mohou být geometricky interpretovány jako projekce měření do komponent.<sup>146</sup> Určení počtu komponent je individuální, je však ideální vycházet z míry variability, aby byl zachován přenos informace.

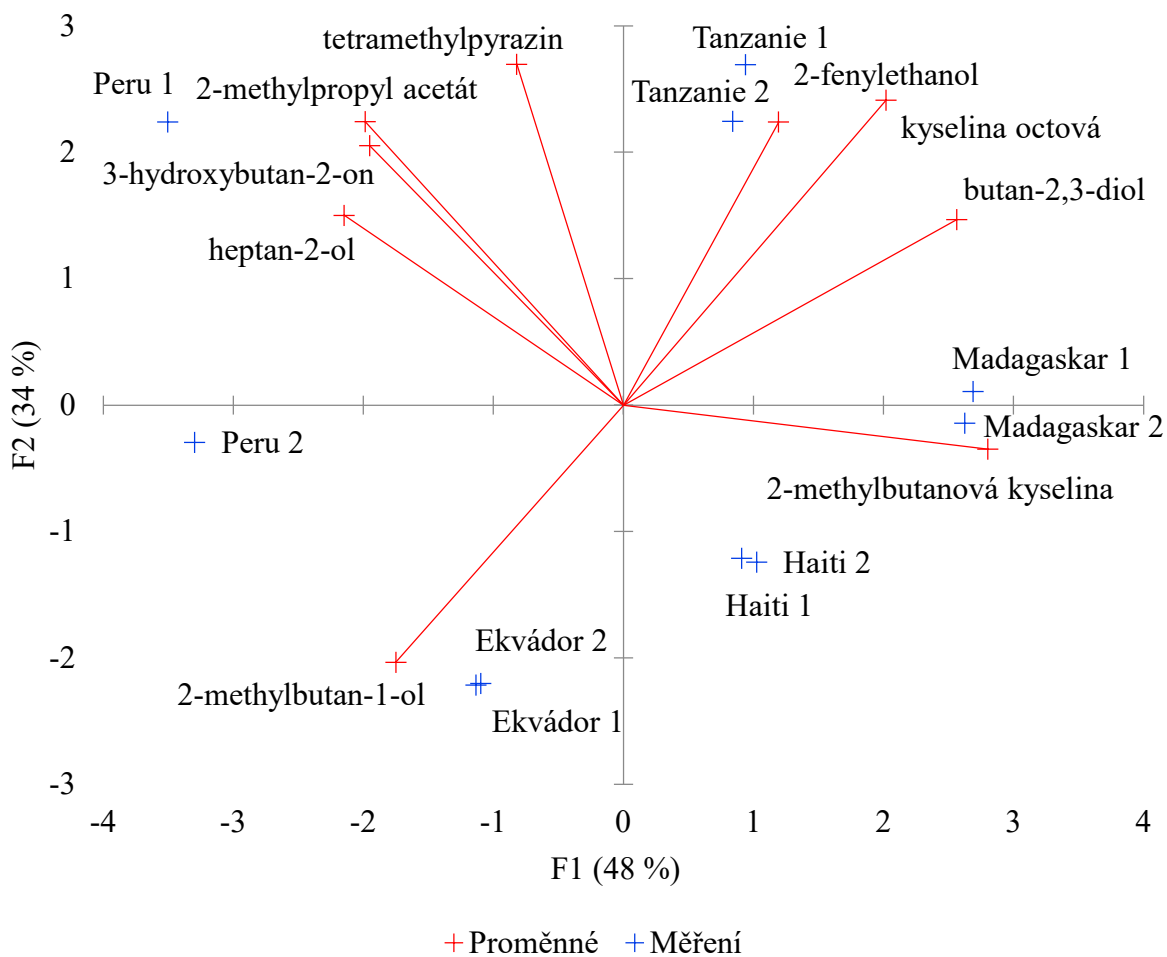
Pro konstrukci grafu i výpočet komponent byla použita naměřená data obsahu těkavých látek, které byly identifikovány ve všech vzorcích kakaových bobů, tedy celkem deset měření. Bylo vybráno 9 proměnných: 2-metylbutan-1-ol, 3-hydroxybutan-2-on, heptan-2-ol, kyselina octová, tetrametylpyrazin, butan-2,3-diol, 2-metylbutanová kyselina, 2-fenyletanol, 2-metylpropyl acetát. Proměnné byly vybrány na základě vysoké korelace s komponentami.

První komponenta vysvětluje 48 % celkové variability dat, druhá komponenta vysvětluje 34 % celkové variability. Součet těchto dvou komponent činí 82 % celkové variability dat. Následující komponenty se podílejí pouze v řádu jednotek procent. Pro interpretaci původních proměnných datového souboru stačí graf prvních dvou komponent, jak je také znázorněno v sutinovém grafu (viz Graf 19). První komponenta koreluje s daty těchto proměnných: 2-metylbutan-1-ol, 3-hydroxybutan-2-on, heptan-2-ol, kyselina octová, butan-2,3-diol, 2-metylbutanová kyselina a 2-metylpropylacetát. Druhá komponenta koreluje s daty těchto proměnných: tetrametylpyrazin a 2-fenyletanol.

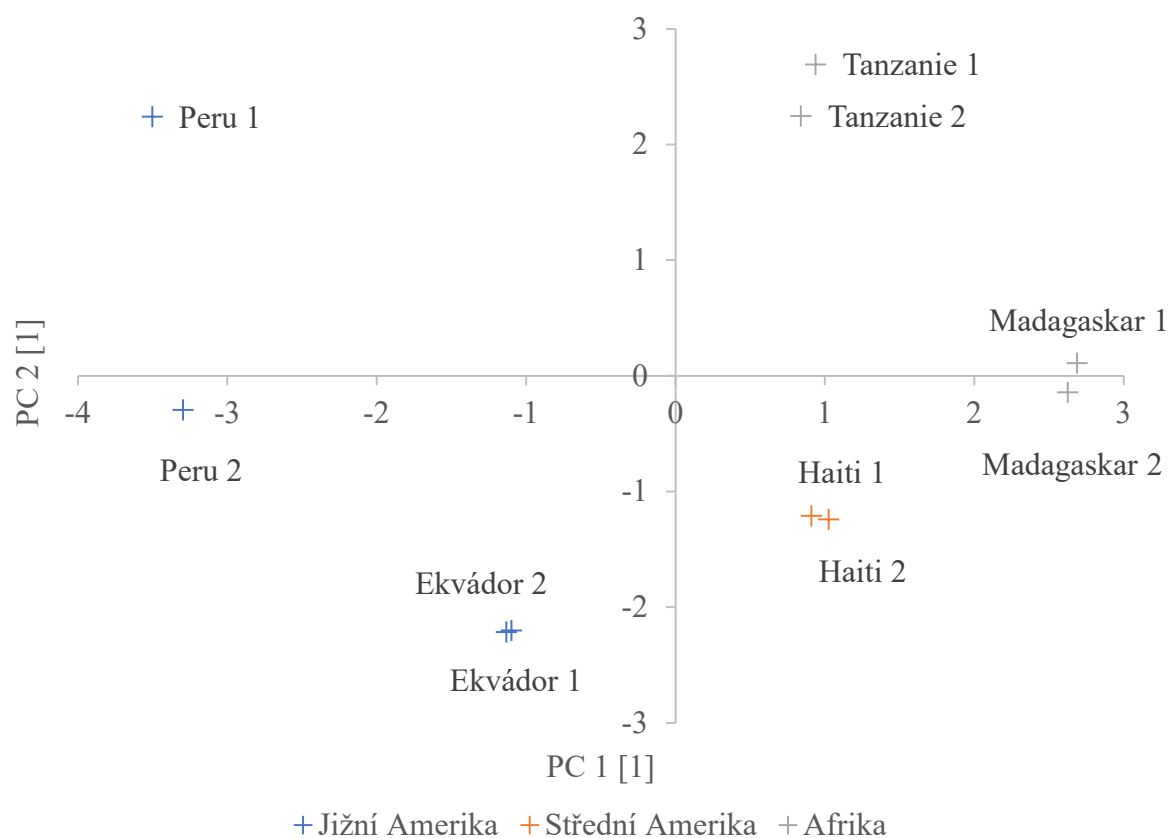
Analýzou hlavních komponent byla data transformována do 2D grafu. Vzorky kakaových bobů z různých geografických oblastí (Afrika, Jižní a Střední Amerika) bylo možné oddělit pomocí určených komponent a zjistit významnost jednotlivých těkavých látek k určení geografického původu. Pomocí první komponenty byla měření oddělena do skupin Afrika společně se střední Amerikou (Haiti, Tanzanie a Madagaskar) a Jižní Amerika (Peru, Ekvádor). Pomocí druhé komponenty byla měření oddělena do skupin Afrika (Madagaskar, Tanzanie) a Amerika (Haiti, Peru, Ekvádor). Výsledné grafy jsou přiloženy (viz Graf 20 a Graf 21).



Graf 19: Sutinový graf.



Graf 20: Analýza hlavních komponent – projekce výsledků měření vybraných těkavých látek do faktorové roviny komponent F1 a F2.



Graf 21: Analýza hlavních komponent – diferenciacie vzorků kakaových bobů.

## 5. ZÁVĚR

Tato diplomová práce je zaměřena na těkavé látky v kakaových bobech, kakaovém prášku a čokoládách.

Teoretická část popisuje biologii a fyziologii rostliny, zpracování kakaových bobů, chemii hlavních živin a jejich změny během procesu zpracování kakaových bobů, vliv posklizňových úprav plodiny a technologického zpracování na vývin těkavých látek.

V praktické části byly analyzovány vzorky kakaových bobů z Tanzanie, Madagaskaru, Haiti, Ekvádoru a Peru, čokolády vyrobené z nich, kakaový prášek a další komerčně dostupné čokolády. Cílem bylo zjistit, zda existují rozdíly mezi vzorky v závislosti na geografickém původu kakaových bobů, příp. zda se liší od vzorků komerčních.

Těkavé látky byly stanoveny pomocí metody HS-SPME-GC-MS. Celkem bylo identifikováno 86 těkavých látek, z nich 18 esterů, 15 dusíkatých sloučenin (především pyraziny), 15 alkoholů, 10 terpenů (z nich 8 terpenových uhlovodíků, 1 terpenový keton a 1 terpenový alkohol), 6 aldehydů, ketonů a kyselin, 3 furany, 2 alkany a alkeny a ostatní. Skupina látek označená jako ostatní zahrnuje heterocyklické sloučeniny a složitější deriváty uhlovodíků, které nebylo možné jednoznačně zařadit do skupiny.

Podle charakteru vůně lze rozdělit identifikované látky do 7 skupin: květinové, ovocné, sladké, čokoládové/ořechové, zemité, svíravé/kyselé aroma a skupina neurčených, které zahrnují látky především doposud neidentifikované vůně či vůně, která nepatří do žádné uvedené skupiny. Nejpočetnější skupinou jsou látky s ovocnými tóny (17), dále ořechové a čokoládové (16), svíravé a kyselé (12), neurčené (14), sladké a medové (10), zemité (9) a květinové (8).

Byla provedena transformace dat do 2D grafu pomocí analýzy hlavních komponent podle vybraných rozlišujících proměnných (2-metylbutan-1-ol, 3-hydroxybutan-2-on, heptan-2-ol, kyselina octová, tetrametylpyrazin, butan-2,3-diol, 2-metylbutanová kyselina, 2-fenyletanol, 2-metylpropylacetát). Byla tak potvrzena rozdílnost těkavých látek kakaových bobů v závislosti na geografickém původu.

## 6. PŘÍLOHA

Příloha 1: Chromatogram – těkavé látky ve vzorku kakaových bobů Tanzanie.

Příloha 2: Chromatogram – těkavé látky ve vzorku kakaových bobů Peru.

Příloha 3: Chromatogram – těkavé látky ve vzorku kakaových bobů Haiti.

Příloha 4: Chromatogram – těkavé látky ve vzorku kakaových bobů Madagaskar.

Příloha 5: Chromatogram – těkavé látky ve vzorku kakaových bobů Ekvádor.

Příloha 6: Chromatogram – těkavé látky ve vzorku čokolády Madagaskar.

Příloha 7: Chromatogram – těkavé látky ve vzorku čokolády Peru.

Příloha 8: Chromatogram – těkavé látky ve vzorku čokolády Ekvádor.

Příloha 9: Chromatogram – těkavé látky ve vzorku čokolády Tanzanie.

Příloha 10: Chromatogram – těkavé látky ve vzorku čokolády Haiti.

Příloha 11: Chromatogram – těkavé látky ve vzorku kakaového prášku.

Příloha 12: Chromatogram – těkavé látky ve vzorku čokolády 50 %.

Příloha 13: Chromatogram – těkavé látky ve vzorku čokolády 70 %.

Příloha 14: Chromatogram – těkavé látky ve vzorku čokolády 78 %.

Příloha 15: Chromatogram – těkavé látky ve vzorku čokolády 90 %.

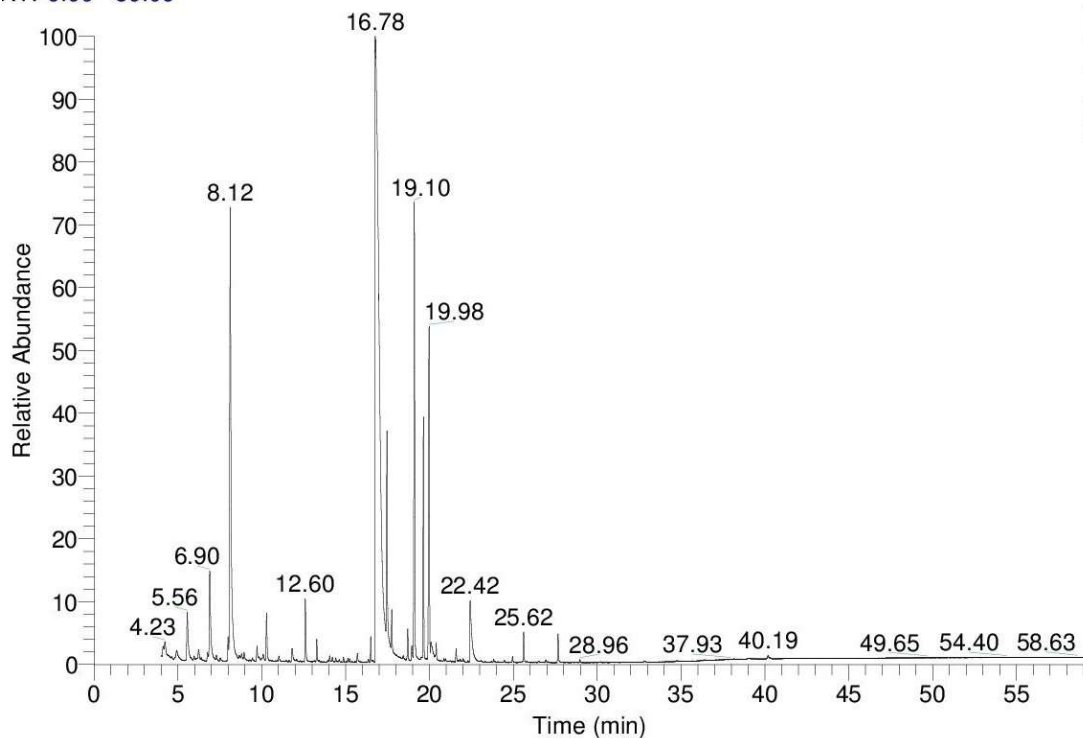
Příloha 16: Chromatogram – těkavé látky ve vzorku čokolády Criollo 70 %.

*Příloha 1: Chromatogram – těkavé látky ve vzorku kakaových bobů Tanzanie.*

C:\Vitova\Data\kubinova\tanzaniebob

04/30/19 17:40:46

RT: 0.00 - 59.09



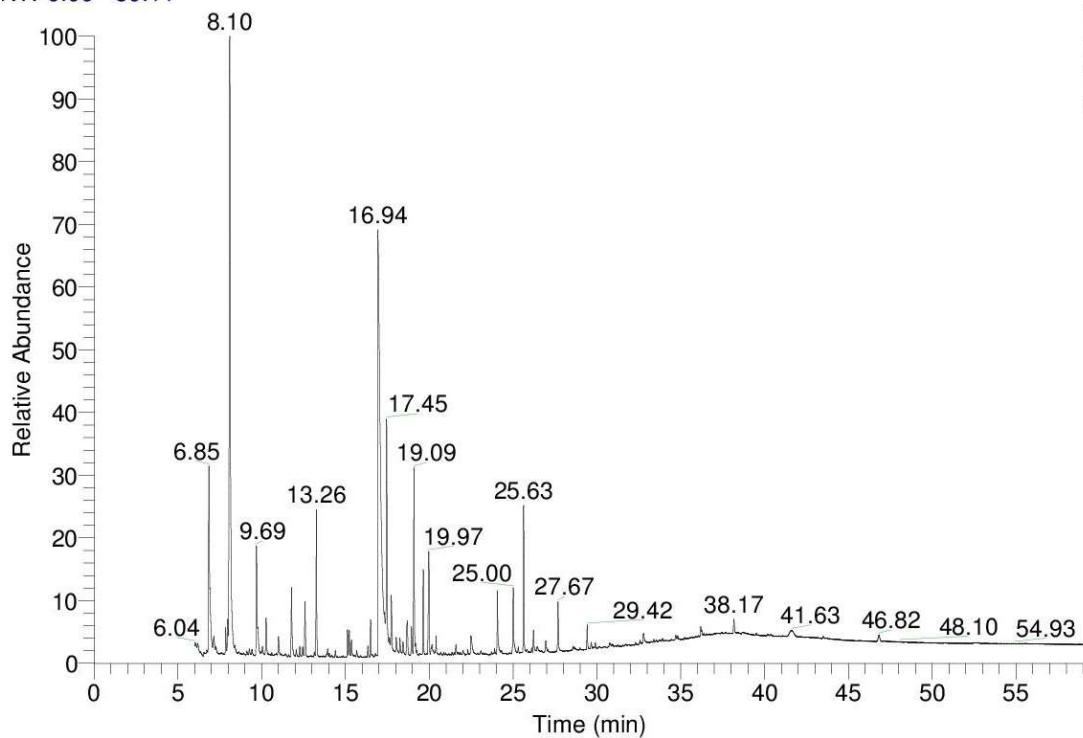
NL:  
1.05E9  
TIC MS  
tanzaniebo  
b

*Příloha 2: Chromatogram – těkavé látky ve vzorku kakaových bobů Peru.*

C:\Vitova\Data\kubinova\peru

04/26/19 12:56:18

RT: 0.00 - 59.11



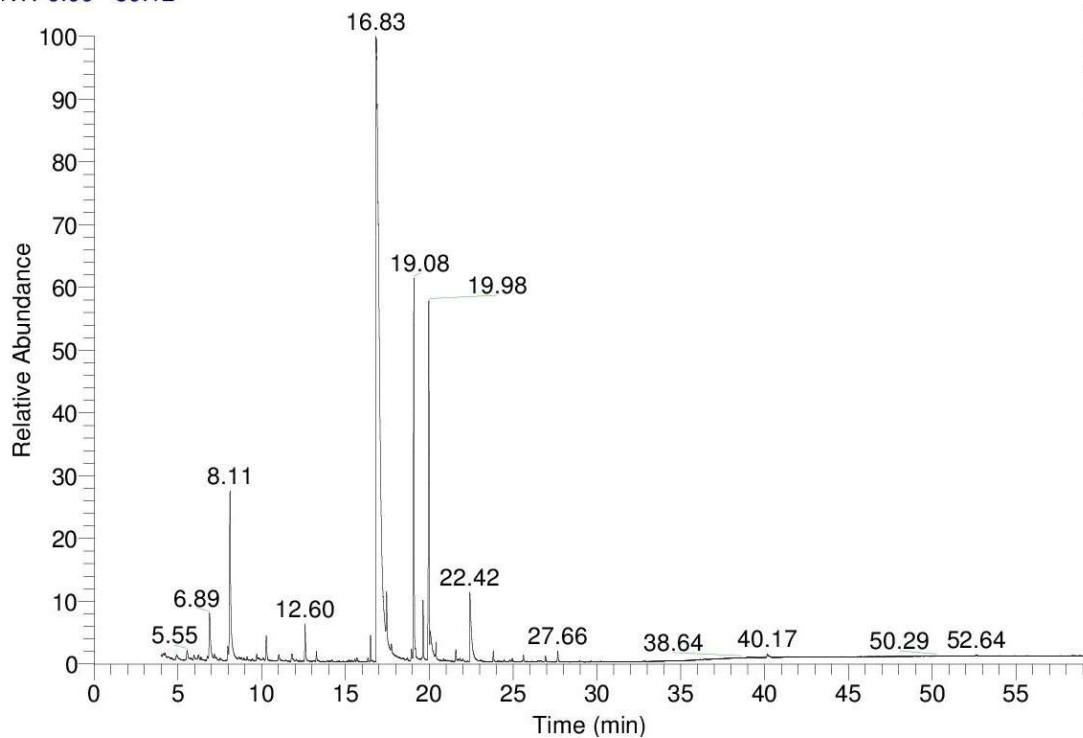
NL:  
7.80E8  
TIC MS  
peru

*Příloha 3: Chromatogram – těkavé látky ve vzorku kakaových bobů Haiti.*

C:\Vitova\Data\kubinova\haitibob

04/30/19 15:28:57

RT: 0.00 - 59.12



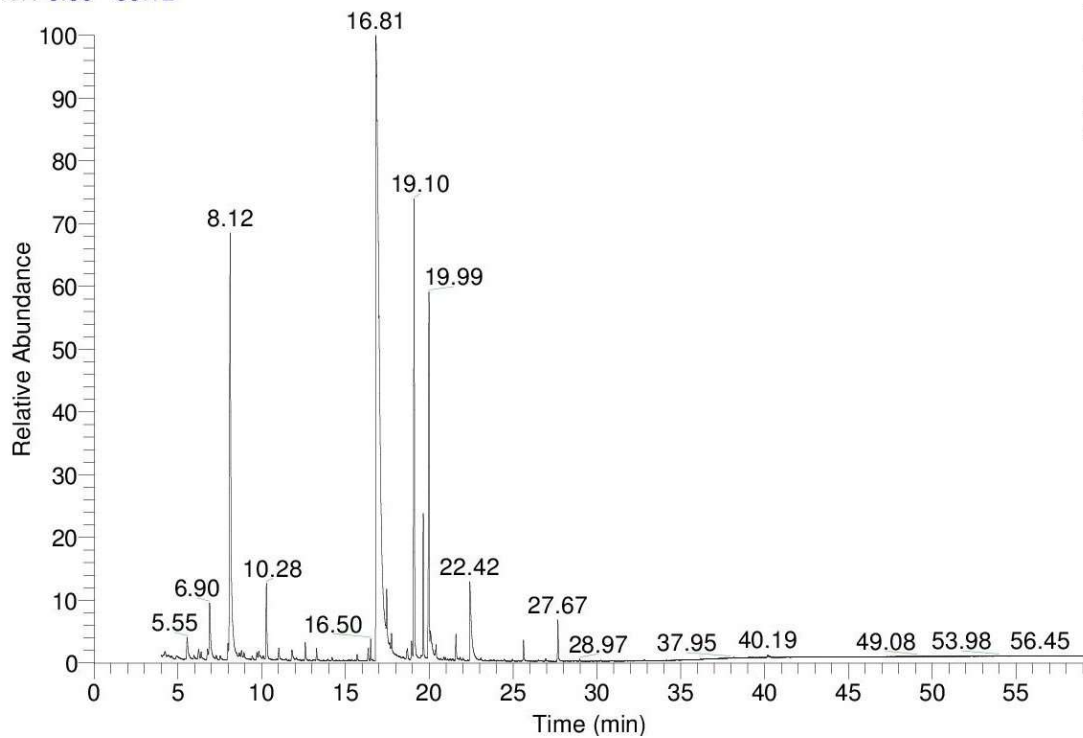
NL:  
9.06E8  
TIC MS  
haitibob

*Příloha 4: Chromatogram – těkavé látky ve vzorku kakaových bobů Madagaskar.*

C:\Vitova\Data\kubinova\madagascarbob

05/02/19 09:23:45

RT: 0.00 - 59.12



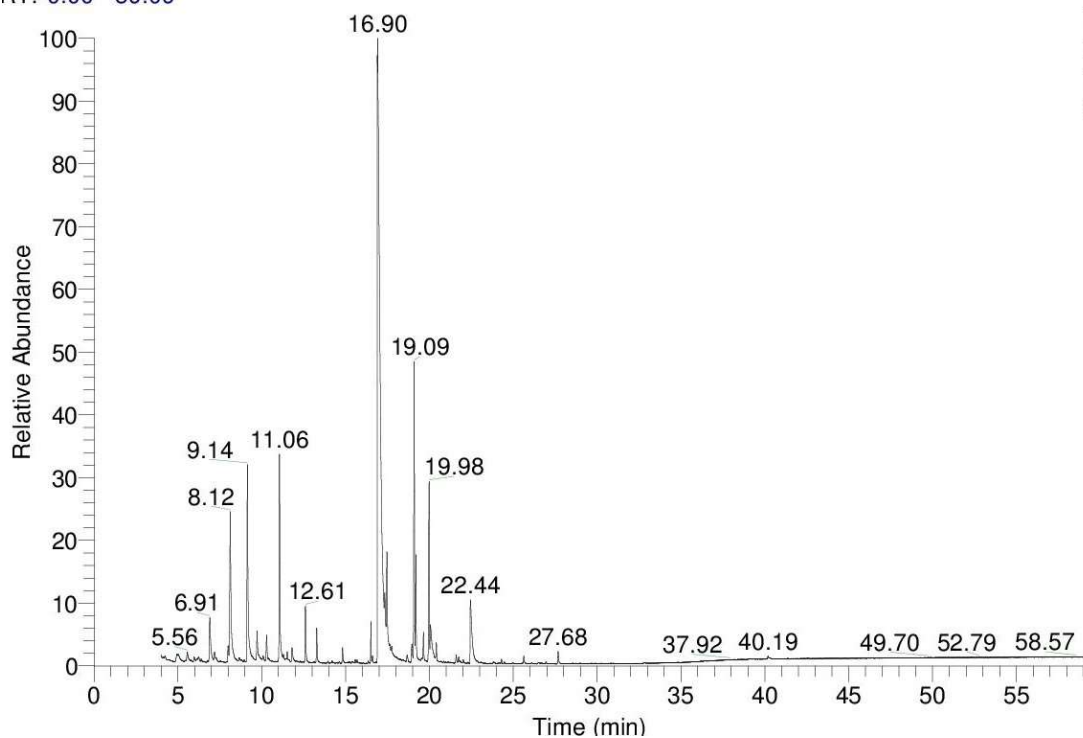
NL:  
1.02E9  
TIC MS  
madagasca  
rbob

*Příloha 5: Chromatogram – těkavé látky ve vzorku kakaových bobů Ekvádor.*

C:\Vitova\Data\kubinova\ekvadorbob

05/02/19 11:35:28

RT: 0.00 - 59.09



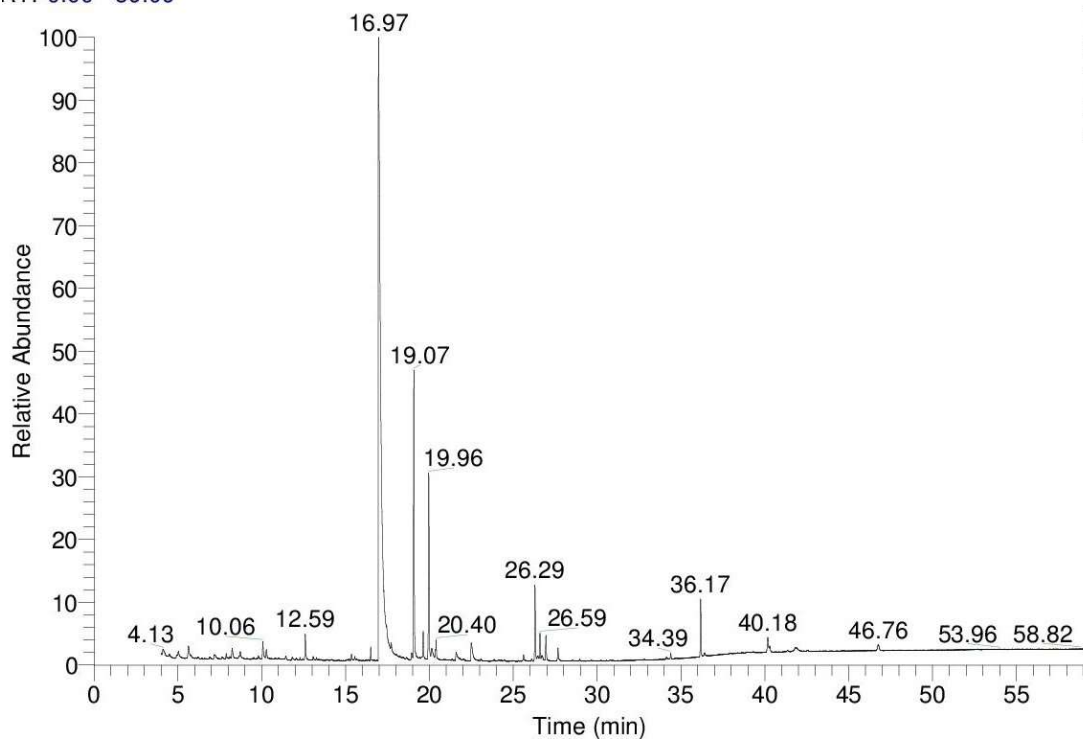
NL:  
7.97E8  
TIC MS  
ekvadorbob

*Příloha 6: Chromatogram – těkavé látky ve vzorku čokolády Madagaskar.*

C:\Vitova\Data\kubinova\madagasarcoko

04/29/19 17:59:39

RT: 0.00 - 59.09



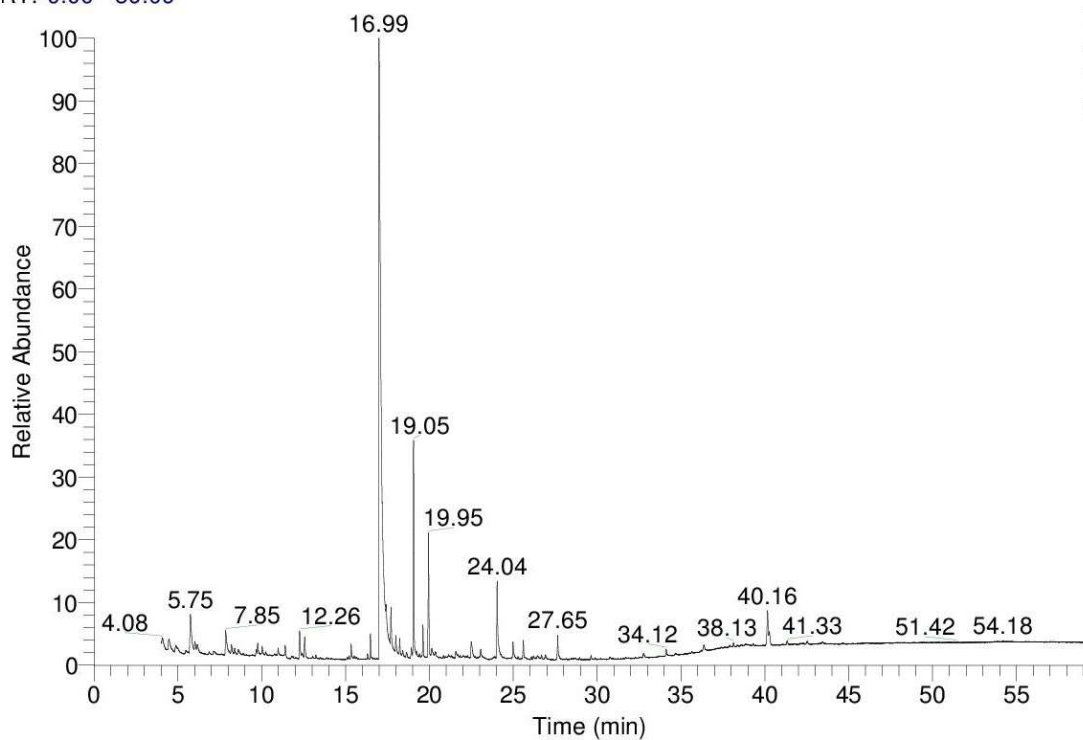
NL:  
5.08E8  
TIC MS  
madagasca  
rcoko

*Příloha 7: Chromatogram – těkavé látky ve vzorku čokolády Peru.*

C:\Vitova\Data\kubinovalperucoko

04/29/19 10:37:19

RT: 0.00 - 59.09



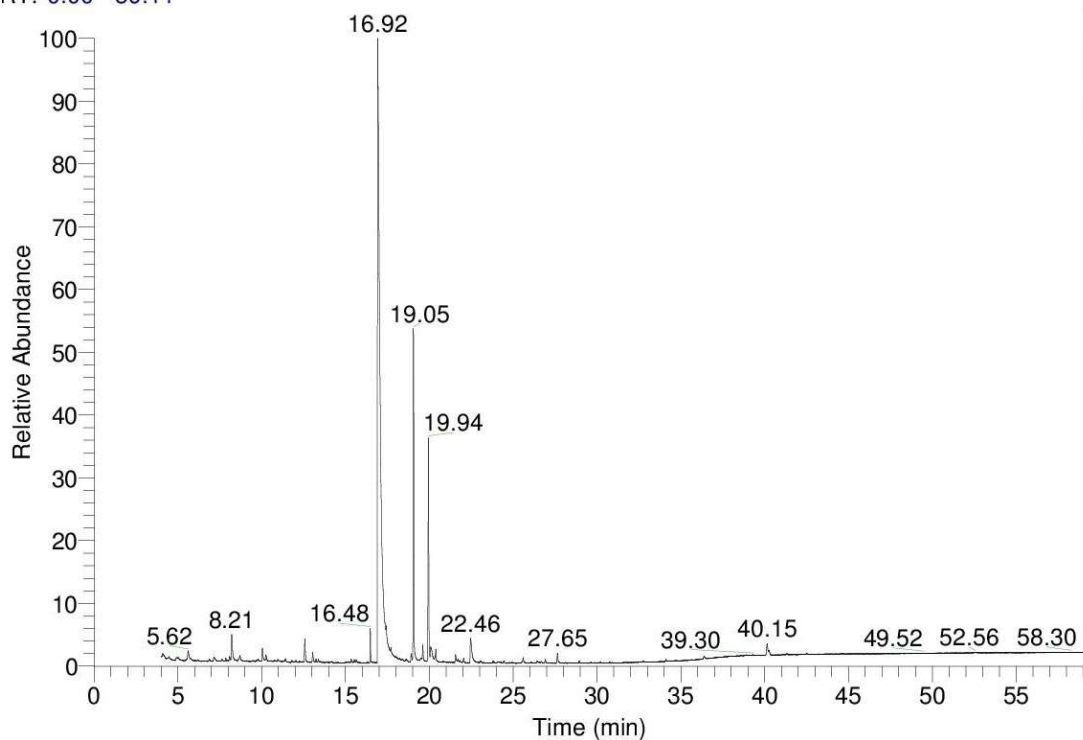
NL:  
4.05E8  
TIC MS  
perucoko

*Příloha 8: Chromatogram – těkavé látky ve vzorku čokolády Ekvádor.*

C:\Vitova\Data\kubinovalkvadorcoko

04/29/19 13:27:28

RT: 0.00 - 59.11



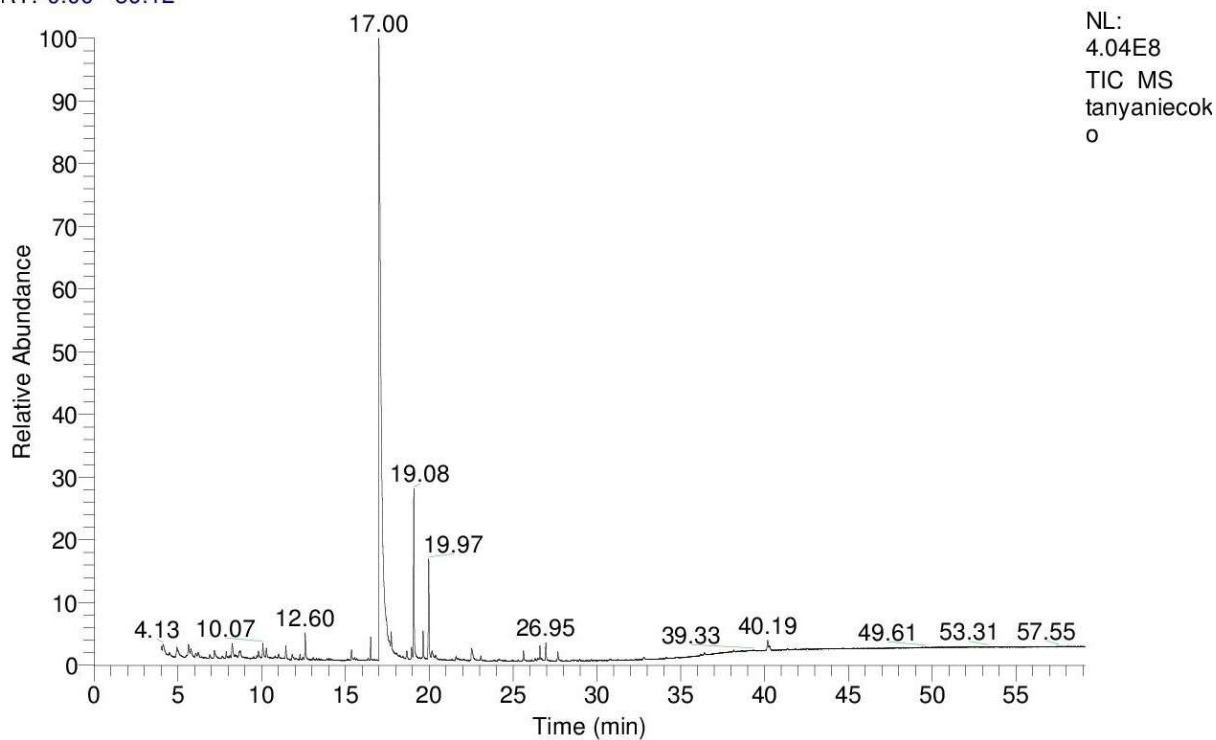
NL:  
6.27E8  
TIC MS  
ekvadorcoko

*Príloha 9: Chromatogram – tĕkavé látky ve vzorku čokolády Tanzanie.*

C:\Vitova\Data\kubinoval\tanyaniecoko

04/30/19 13:17:53

RT: 0.00 - 59.12

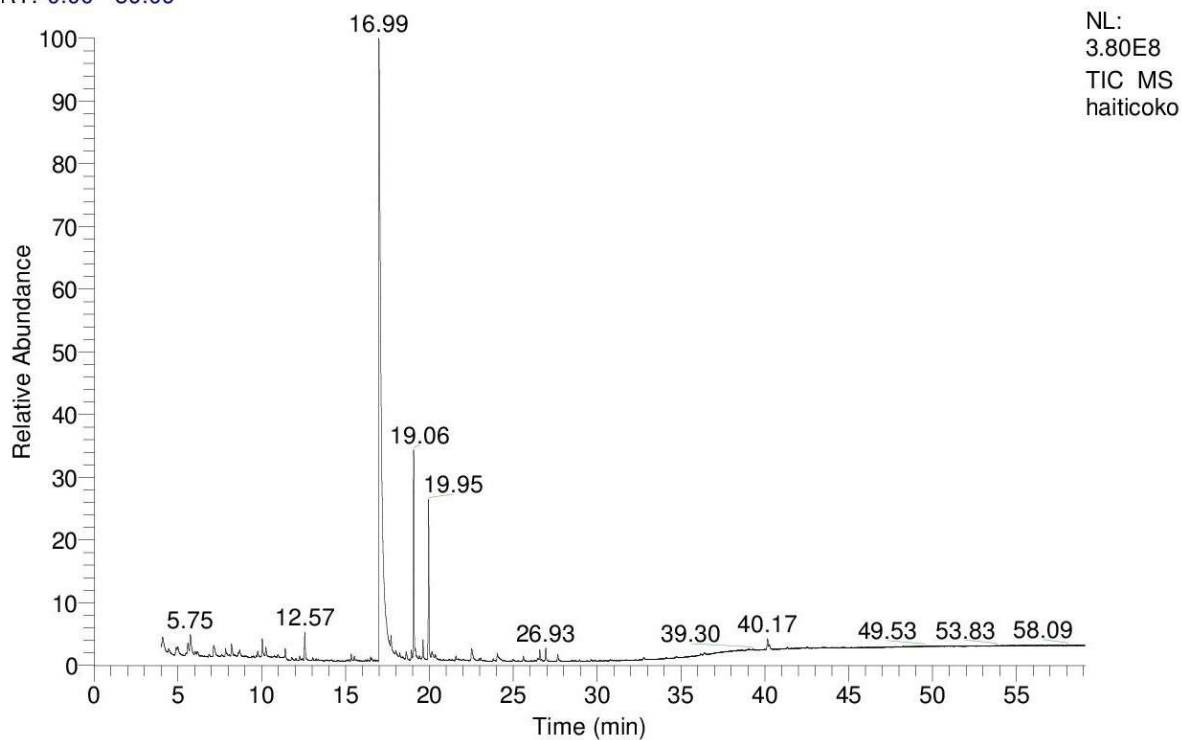


*Príloha 10: Chromatogram – tĕkavé látky ve vzorku čokolády Haiti.*

C:\Vitova\Data\kubinoval\haiticoko

04/30/19 11:06:44

RT: 0.00 - 59.09

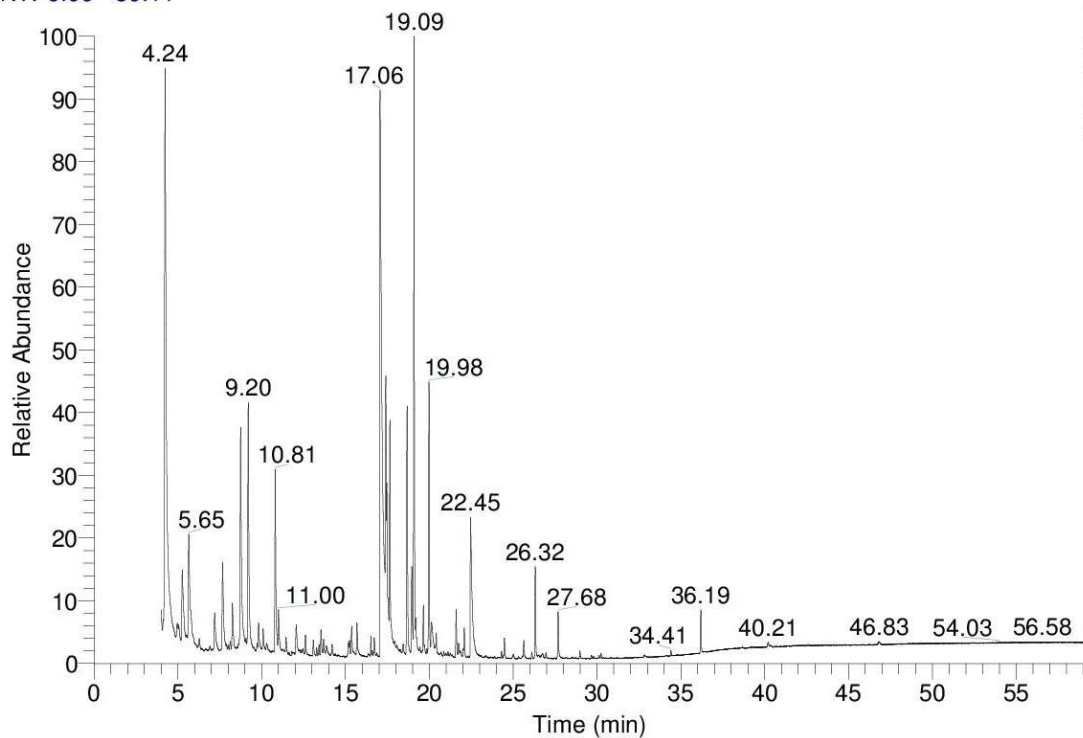


*Příloha 11: Chromatogram – těkavé látky ve vzorku kakaového prášku.*

C:\Vitova\Data\kubinova\kakaovyprasek

05/09/19 15:43:45

RT: 0.00 - 59.11



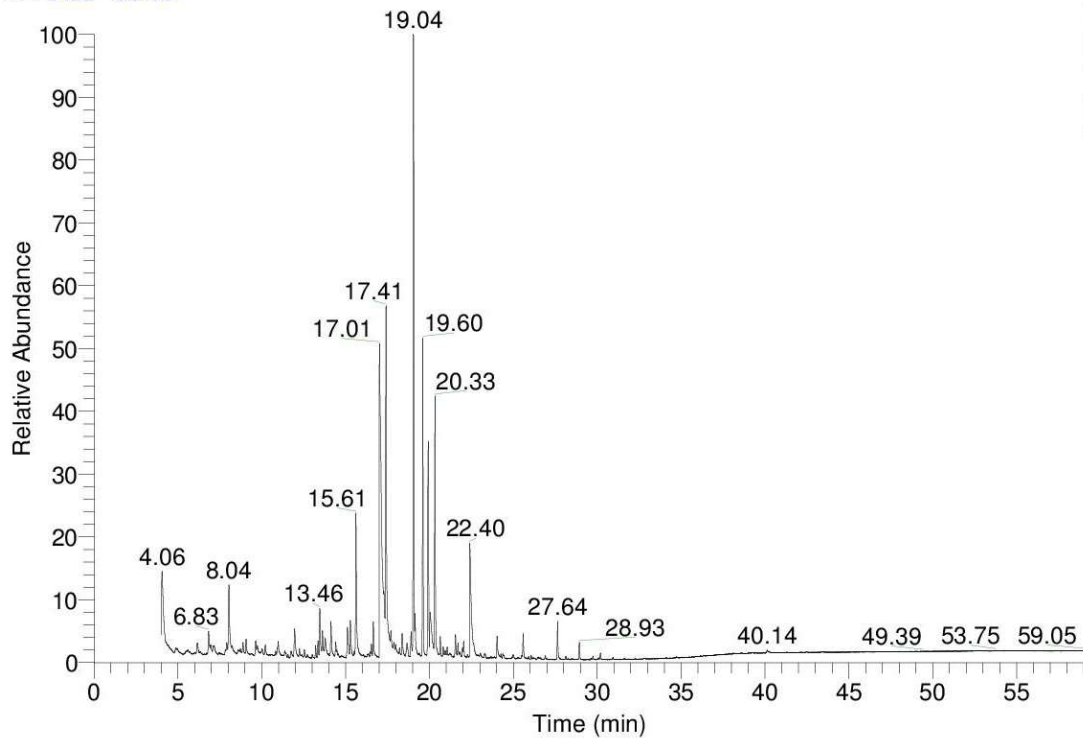
NL:  
3.02E8  
TIC MS  
kakaovypra  
sek

*Příloha 12: Chromatogram – těkavé látky ve vzorku čokolády 50 %.*

C:\Vitova\Data\kubinova\tescocokolada

05/06/19 12:04:18

RT: 0.00 - 59.08



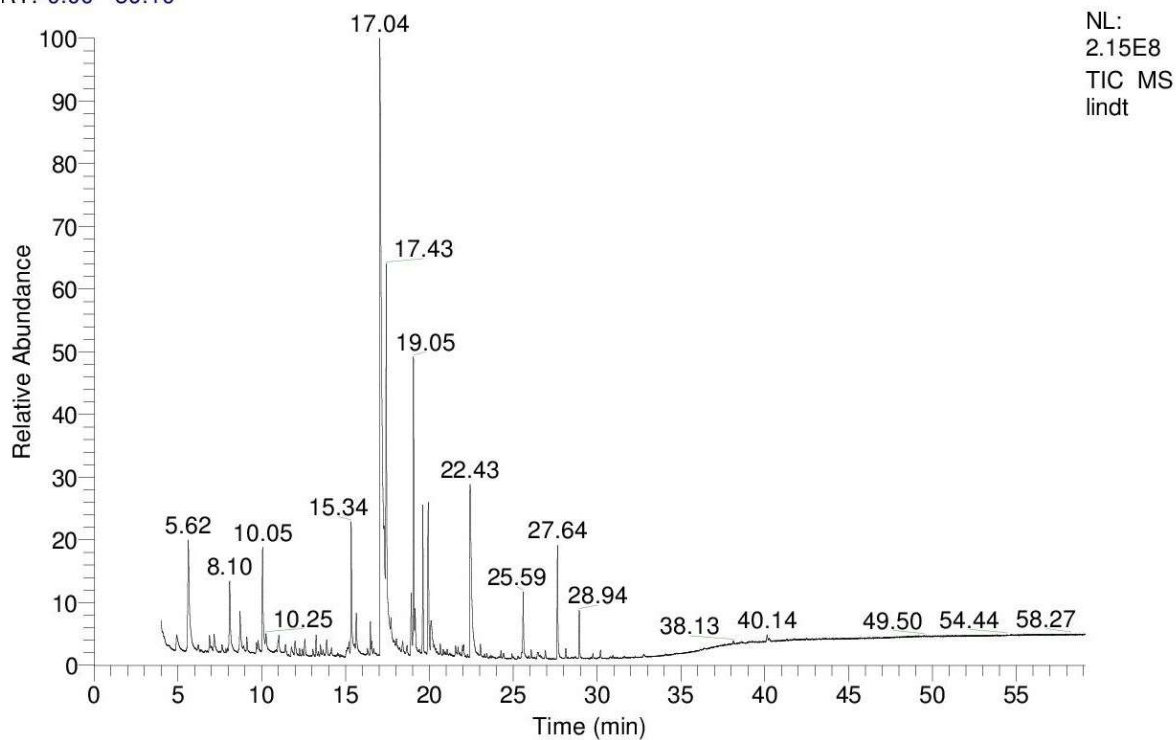
NL:  
5.82E8  
TIC MS  
tescocokola  
da

*Příloha 13: Chromatogram – těkavé látky ve vzorku čokolády 70 %.*

C:\Vitova\Data\kubinoval\lindt

05/06/19 16:26:25

RT: 0.00 - 59.10

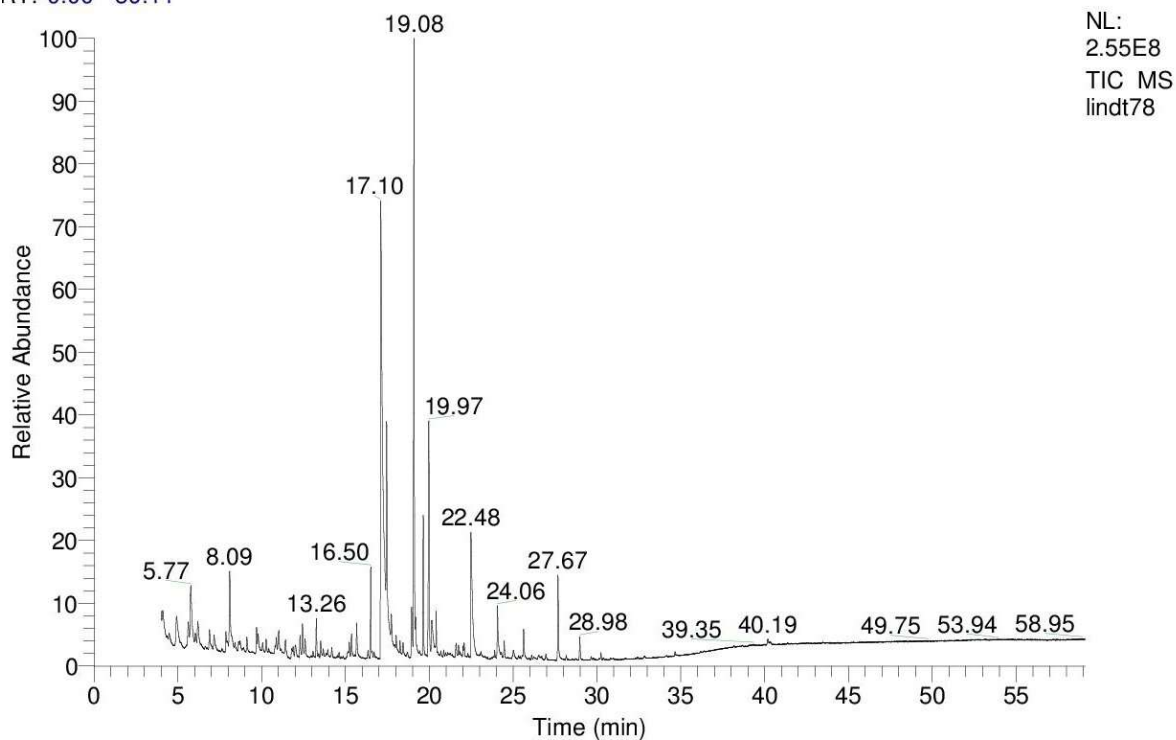


*Příloha 14: Chromatogram – těkavé látky ve vzorku čokolády 78 %.*

C:\Vitova\Data\kubinoval\lindt78

05/09/19 11:21:36

RT: 0.00 - 59.11

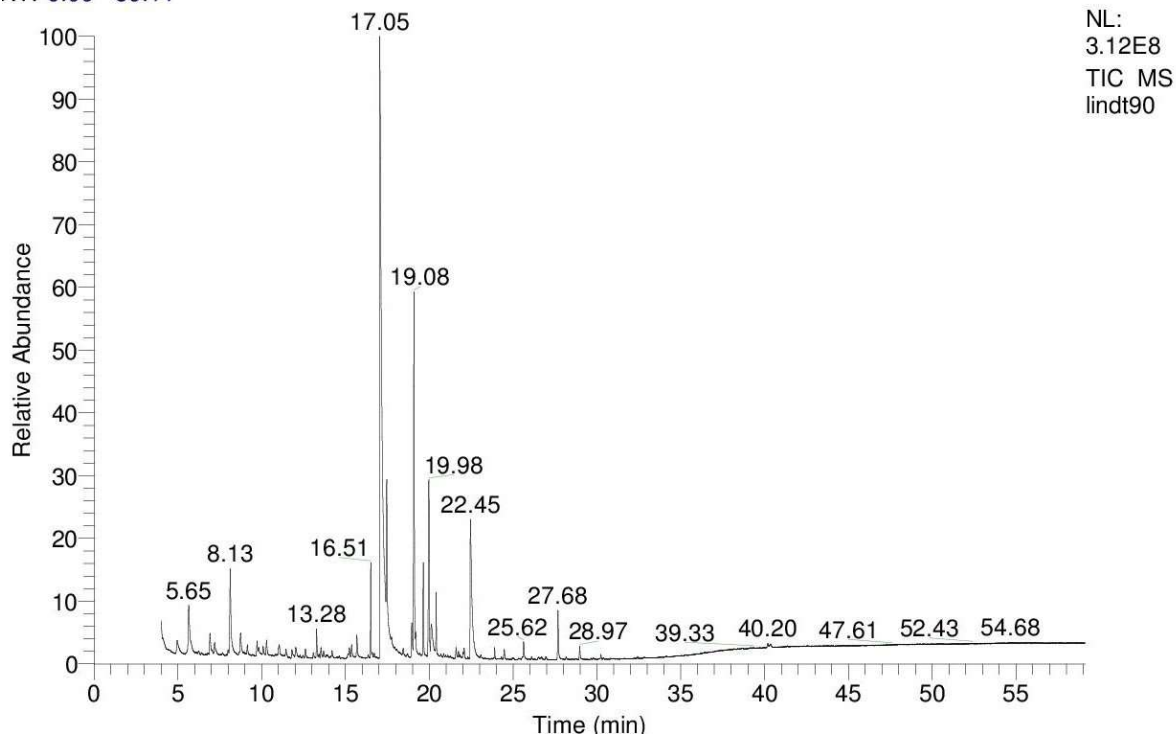


Příloha 15: Chromatogram – těkavé látky ve vzorku čokolády 90 %.

C:\Vitova\Data\kubinoval\lindt90

05/09/19 13:32:40

RT: 0.00 - 59.11

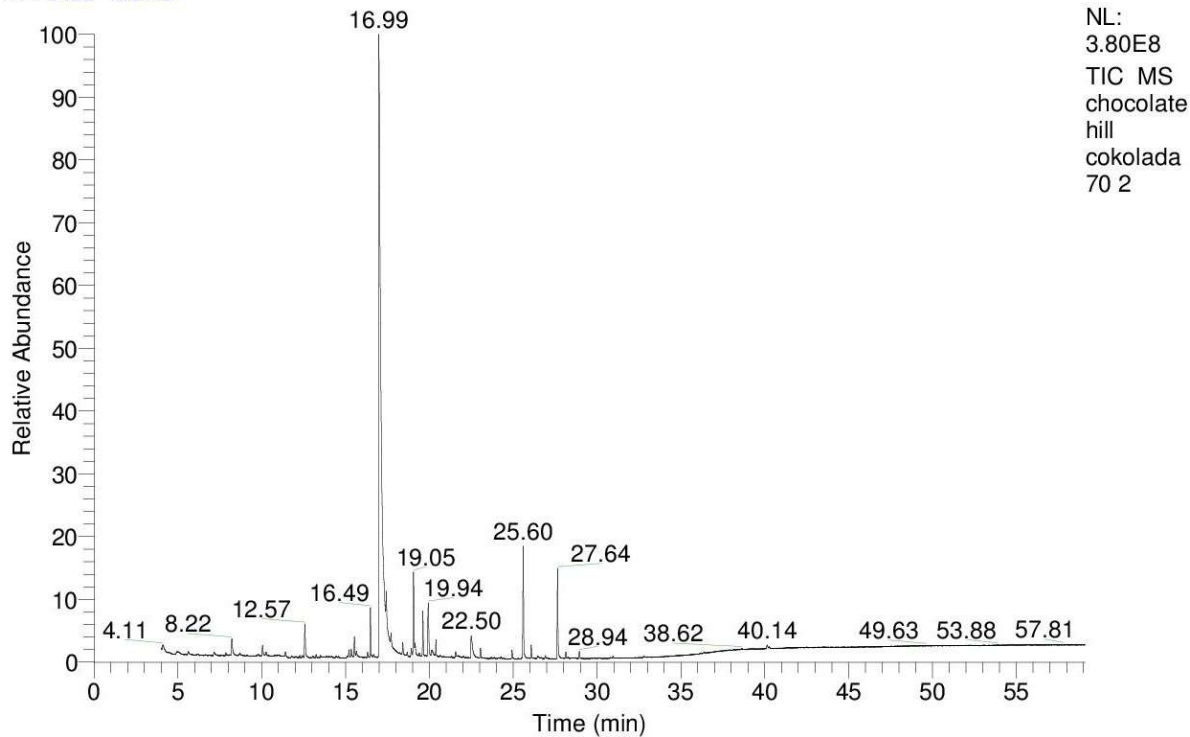


Příloha 16: Chromatogram – těkavé látky ve vzorku čokolády Criollo 70 %.

chocolate hill cokolada 70 2

05/06/19 15:20:53

RT: 0.00 - 59.10



## 7. SEZNAM ZKRATEK

HS-SPME-GC-MS „Head-space Solid Phase Microextraction Gas Chromatography Mass Spektrometry“

PCA „Principal Component Analysis“

POP 1,3-dipalmitoyl-2-oleoylglycerol

SOS 1,3,-distearoyl-2-oleoylglycerol

POS 1-palmitoyl-2-oleoyl-3-stearoylglycerol

PRPP fosforibosylfosfát,

SAM S-adenosylmethionin

SAH S-adenosylhomocystein

GAE kyselina gallová

GC-MS „Gas Chromatography Mass Spectrometry“ Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

GC-FID „Gas Chromatography Flame Ionization Detector“ Plynová chromatografie s plamenovým ionizátorem

SIFT-MS „Selected Ion Flow Tube Mass Spectrometry“

SAFE „Solvent Assisted Flavour Evaporation“

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- <sup>1</sup> ČOPIKOVÁ, Jana. *Čokoláda, kakao a výrobky z nich*. Praha: Sdružení českých spotřebitelů, z.ú. a Potravinářská komora ČR v rámci priorit České technologické platformy pro potraviny, 2015. Jak poznáme kvalitu? ISBN 978-80-87719-26-8.
- <sup>2</sup> ARCIMOVIČOVÁ, Jana a Pavel VALÍČEK. *Čokoláda pokrm bohů*. Benešov: Start, 1999. ISBN 80-862-3107-0.
- <sup>3</sup> ČESKÁ REPUBLIKA. Vyhláška ze dne 6. března 2003, kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony. In: *Sbírka zákonů*. 2003, ročník 2003, 32/2003, 76/2003 Sb.
- <sup>4</sup> ROHWER, Jens G. *Tropické rostliny*. Vyd. 2. V Praze: Knižní klub, 2006. Průvodce přírodou (Euromedia Group - Knižní klub). ISBN 80-242-1652-3.
- <sup>5</sup> LEHARI, Gabriele a Peter COLDITZ. *Exotické plody: [ovoce, zelenina, ořechy]*. Vyd. 2. Praha: NS Svoboda, 2002. Příroda do kapsy (NS Svoboda). ISBN 80-205-1032-X.
- <sup>6</sup> CERRI, Martina, Lara REALE a Claudia ZADRA. Metabolite Storage in Theobroma cacao L. Seed: Cyto-Histological and Phytochemical Analyses. *Frontiers in Plant Science*. 2019, **10**. DOI: 10.3389/fpls.2019.01599. ISSN 1664-462X. Dostupné také z: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2019.01599/full>
- <sup>7</sup> ALEMANNI, L., M. BERTHOULY a N. MICHAUX-FERRIÈRE. Histology of somatic embryogenesis from floral tissues cocoa. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* [online]. 1996, **46**(3), 187-194 [cit. 2020-04-07]. DOI: 10.1007/BF02307094. ISSN 0167-6857. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02307094>
- <sup>8</sup> CAMPOS-VEGA, Rocio, Karen H. NIETO-FIGUEROA a B. Dave OOMAH. Cocoa (Theobroma cacao L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2018, **81**, 172-184 [cit. 2020-04-06]. DOI: 10.1016/j.tifs.2018.09.022. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224417307513>
- <sup>9</sup> FEBRIANTO, Noor Ariefandie a Fan ZHU. Diversity in Composition of Bioactive Compounds Among 26 Cocoa Genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2019, **67**(34), 9501-9509. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b03448. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.9b03448>
- <sup>10</sup> OFORI, Atta, Alfred ARTHUR a Francis K. PADI. Extending the cacao (Theobroma cacao L.) gene pool with underrepresented genotypes: growth and yield traits. *Tree Genetics & Genomes* [online]. 2019, **15**(5) [cit. 2020-04-07]. DOI: 10.1007/s11295-019-1382-1. ISSN 1614-2942. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11295-019-1382-1>
- <sup>11</sup> MOTAMAYOR, Juan C., Philippe LACHENAUD, Jay Wallace DA SILVA E MOTA, Rey LOOR, David N. KUHN, J. Steven BROWN, Raymond J. SCHNELL a Justin O. BOREVITZ. Geographic and Genetic Population Differentiation of the Amazonian Chocolate Tree

(Theobroma cacao L). *PLoS ONE*. 2008, **3**(10). DOI: 10.1371/journal.pone.0003311. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0003311>

<sup>12</sup> DE WEVER, Jocelyn, Helena EVERAERT, Frauke COPPIETERS, Hayley ROTTIERS, Koen DEWETTINCK, Steve LEFEVER, Kathy MESSENS a Justin O. BOREVITZ. The development of a novel SNP genotyping assay to differentiate cacao clones. *Scientific Reports*. 2019, **9**(1). DOI: 10.1038/s41598-019-45884-8. ISSN 2045-2322. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/s41598-019-45884-8>

<sup>13</sup> Fine or flavour cocoa. *International Cocoa Organization* [online]. Plateaux ENA - Avenue Boga Doudou, Abidjan, Côte d'Ivoire: ICCO Building, 13.5.2019 [cit. 2020-01-08]. Dostupné z: <https://www.icco.org/about-cocoa/fine-or-flavour-cocoa.html>

<sup>14</sup> LOPEZ, Alex S. a Paul S. DIMICK. Cocoa Fermentation. REHM, H.-J. a G. REED, ed. *Biotechnology* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag, 1995, 2008-03-04, s. 561-577 [cit. 2020-04-10]. DOI: 10.1002/9783527620920.ch14. ISBN 9783527620920. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9783527620920.ch14>

<sup>15</sup> GU, Fenglin, Lehe TAN, Huasong WU, Yiming FANG, Fei XU, Zhong CHU a Qinghuang WANG. Comparison of Cocoa Beans from China, Indonesia and Papua New Guinea. *Foods* [online]. 2013, **2**(2), 183-197 [cit. 2020-04-10]. DOI: 10.3390/foods2020183. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2304-8158/2/2/183>

<sup>16</sup> MUSTIGA, Guiliana M., Joe MORRISSEY, Joseph Conrad STACK, et al. Identification of Climate and Genetic Factors That Control Fat Content and Fatty Acid Composition of Theobroma cacao L. Beans. *Frontiers in Plant Science*. 2019, **10**, 125-132. DOI: 10.3389/fpls.2019.01159. ISSN 1664-462X. Dostupné také z: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2019.01159/full>

<sup>17</sup> VIGNOLLES, Marie-Laure, Romain JEANTET, Christelle LOPEZ a Pierre SCHUCK. Free fat, surface fat and dairy powders: interactions between process and product. A review. *Le Lait*. 2007, **87**(3), 187-236. DOI: 10.1051/lait:2007010. ISSN 0023-7302. Dostupné také z: <http://www.lelait-journal.org/10.1051/lait:2007010>

<sup>18</sup> SERVENT, Adrien, Renaud BOULANGER, Fabrice DAVRIEUX, Marie-Neige PINOT, Eric TARDAN, Nelly FORESTIER-CHIRON a Clotilde HUE. Assessment of cocoa (Theobroma cacao L.) butter content and composition throughout fermentations: interactions between process and product. A review. *Food Research International*. 2018, **107**(3), 675-682. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.02.070. ISSN 09639969. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996918301625>

<sup>19</sup> ALMEIDA, C.M.V.C., V.A. FACUNDO, H.O.B. BRAZIL, L.A.S. DIAS, J.R.P. MEDEIROS a J.L.A. COSTA. Diversity of cacao fat in germplasm from Rondônia, Brazil. *Cropp Breeding and Applied Biotechnology* [online]. 2008, **8**(2), 141-148 [cit. 2020-04-11]. DOI: 10.12702/1984-7033.v08n02a07. ISSN 1984-7033. Dostupné z: <http://www.sbmp.org.br/cbab/siscbab/modules/news/article.php?storyid=473>

- <sup>20</sup> GRASSIA, Melania, Giancarlo SALVATORI, Maria ROBERTI, Diego PLANETA a Luciano CINQUANTA. Polyphenols, methylxanthines, fatty acids and minerals in cocoa beans and cocoa products: Polyphenols, methylxanthines, fatty acids and minerals in cocoa beans and cocoa products. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2019, **13**(3), 1721-1728. DOI: 10.1007/s11694-019-00089-5. ISSN 2193-4126. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11694-019-00089-5>
- <sup>21</sup> SIRBU, Diana, Marcello CORNO, Matthias S. ULLRICH a Nikolai KUHNERT. Characterization of triacylglycerols in unfermented cocoa beans by HPLC-ESI mass spectrometry: characterisation and fatty acid content. *Food Chemistry*. 2018, **254**(15), 232-240. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.01.194. ISSN 03088146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814618302188>
- <sup>22</sup> NOFIANI, Risa, Benjamin PHILMUS, Yosi NINDITA a Taifo MAHMUD. 3-Ketoacyl-ACP synthase (KAS) III homologues and their roles in natural product biosynthesis. *MedChemComm*. 2019, **10**(9), 1517-1530. DOI: 10.1039/C9MD00162J. ISSN 2040-2503. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C9MD00162J>
- <sup>23</sup> PIDKOWICH, M. S., H. T. NGUYEN, I. HEILMANN, et al. Modulating seed -ketoacyl-acyl carrier protein synthase II level converts the composition of a temperate seed oil to that of a palm-like tropical oil. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007, **104**(11), 4742-4747. DOI: 10.1073/pnas.0611141104. ISSN 0027-8424. Dostupné také z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0611141104>
- <sup>24</sup> LIPP, M., C. SIMONEAU, F. ULBERTH, et al. Composition of Genuine Cocoa Butter and Cocoa Butter Equivalents. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2001, **14**(4), 399-408 [cit. 2020-04-11]. DOI: 10.1006/jfca.2000.0984. ISSN 08891575. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157500909840>
- <sup>25</sup> TORRES-MORENO, M., E. TORRESCASANA, J. SALAS-SALVADÓ a C. BLANCH. Nutritional composition and fatty acids profile in cocoa beans and chocolates with different geographical origin and processing conditions. *Food Chemistry*. 2015, **166**, 125-132. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.05.141. ISSN 03088146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614008589>
- <sup>26</sup> BOTTARI, Emilio, Maria Rosa FESTA a Simone MAZZONI. Comparison between cocoa and chocolate: characterisation and fatty acid content. *Natural Product Research*. 2018, **33**(15), 2243-2252. DOI: 10.1080/14786419.2018.1499597. ISSN 1478-6419. Dostupné také z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14786419.2018.1499597>
- <sup>27</sup> TSAI, C. H. a J. E. KINSELLA. Tissue culture of cocoa bean (*Theobroma cacao* L.): changes in lipids during maturation of beans and growth of cells and calli in culture. *Lipids* [online]. 1981, **16**(8), 577-582 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1007/BF02534902. ISSN 0024-4201. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1007/BF02534902>

<sup>28</sup> VERSTRAETEN, Sandra V., John F. HAMMERSTONE, Carl L. KEEN, César G. FRAGA a Patricia I. OTEIZA. Antioxidant and Membrane Effects of Procyanidin Dimers and Trimers Isolated from Peanut and Cocoa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2005, **53**(12), 5041-5048 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1021/jf058018m. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf058018m>

<sup>29</sup> MEGÍAS-PÉREZ, Roberto, Ana Isabel RUIZ-MATUTE, Marcello CORNO a Nikolai KUHNERT. Analysis of minor low molecular weight carbohydrates in cocoa beans by chromatographic techniques coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2019, **1584**, 135-143. DOI: 10.1016/j.chroma.2018.11.033. ISSN 00219673. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967318314328>

<sup>30</sup> MEGÍAS-PÉREZ, Roberto, Sergio GRIMBS, Roy N. D'SOUZA, Herwig BERNAERT a Nikolai KUHNERT. Profiling, quantification and classification of cocoa beans based on chemometric analysis of carbohydrates using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Food Chemistry*. 2018, **258**, 284-294. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.03.026. ISSN 03088146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814618304539>

<sup>31</sup> REDGWELL, Robert J. a Carl E. HANSEN. Isolation and characterisation of cell wall polysaccharides from cocoa ( *Theobroma cacao* L.) beans. *Planta* [online]. 2000, **210**(5), 823-830 [cit. 2020-04-11]. DOI: 10.1007/s004250050685. ISSN 0032-0935. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s004250050685>

<sup>32</sup> ZAK, Dennis L. a Philip G. KEENEY. Extraction and fractionation of cocoa proteins as applied to several varieties of cocoa beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 1976, **24**(3), 479-483 [cit. 2020-04-07]. DOI: 10.1021/jf60205a055. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf60205a055>

<sup>33</sup> SCOLLO, Emanuele, David NEVILLE, M. Jose ORUNA-CONCHA, Martine TROTIN a Rainer CRAMER. Characterization of the Proteome of *Theobroma cacao* Beans by Nano-UHPLC-ESI MS/MS. *PROTEOMICS* [online]. 2018, **18**(3-4) [cit. 2020-04-07]. DOI: 10.1002/pmic.201700339. ISSN 16159853. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pmic.201700339>

<sup>34</sup> VOIGT, Jürgen, Böle BIEHL a Syed Kamaruddin Syed WAZIR. The major seed proteins of *Theobroma cacao* L. *Food Chemistry* [online]. 1993, **47**(2), 145-151 [cit. 2020-04-14]. DOI: 10.1016/0308-8146(93)90236-9. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0308814693902369>

<sup>35</sup> VOIGT, J, D WRANN, H HEINRICHS a B BIEHL. The proteolytic formation of essential cocoaspecific aroma precursors depends on particular chemical structures of the vicilin-class globulin of the cocoa seeds lacking in the globular storage proteins of coconuts, hazelnuts and sunflower seeds. *Food Chemistry* [online]. 1994, **51**(2), 197-205 [cit. 2020-04-14]. DOI: 10.1016/0308-8146(94)90257-7. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0308814694902577>

- <sup>36</sup> SCOLLO, Emanuele, David C.A. NEVILLE, M. Jose ORUNA-CONCHA, Martine TROTIN a Rainer CRAMER. UHPLC–MS/MS analysis of cocoa bean proteomes from four different genotypes. *Food Chemistry* [online]. 2020, **303** [cit. 2020-04-14]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125244. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814619313524>
- <sup>37</sup> AFOAKWA, Emmanuel Ohene, Jennifer QUAO, Jemmy TAKRAMA, Agnes Simpson BUDU a Firibu Kwesi SAALIA. Chemical composition and physical quality characteristics of Ghanaian cocoa beans as affected by pulp pre-conditioning and fermentation. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2013, **50**(6), 1097-1105 [cit. 2020-04-15]. DOI: 10.1007/s13197-011-0446-5. ISSN 0022-1155. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13197-011-0446-5>
- <sup>38</sup> ROJAS, Luisa F., Adriana GALLEGO, Andrés GIL, Julián LONDOÑO a Lucía ATEHORTÚA. Monitoring accumulation of bioactive compounds in seeds and cell culture of *Theobroma cacao* at different stages of development. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* [online]. 2015, **51**(2), 174-184 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1007/s11627-015-9684-y. ISSN 1054-5476. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11627-015-9684-y>
- <sup>39</sup> AFOAKWA, Emmanuel Ohene, Alistair PATERSON, Mark FOWLER a Angela RYAN. Flavor Formation and Character in Cocoa and Chocolate: A Critical Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2008, **48**(9), 840-857 [cit. 2020-05-12]. DOI: 10.1080/10408390701719272. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408390701719272>
- <sup>40</sup> PONS-ANDREU, Jose Vicente, Elena CIENFUEGOS-JOVELLANOS a Sixto Alvin IBARRA. *Process for producing cocoa polyphenol concentrate*. 2008. United States. US2008/0193629A1. Uděleno 31.3.2008. Zapsáno 14.8.2008.
- <sup>41</sup> APROTOSOAI, Ana, Anca MIRON, Adriana TRIFAN, Vlad LUCA a Irina-Iuliana COSTACHE. The Cardiovascular Effects of Cocoa Polyphenols—An Overview. *Diseases* [online]. 2016, **4**(4) [cit. 2020-04-15]. DOI: 10.3390/diseases4040039. ISSN 2079-9721. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2079-9721/4/4/39>
- <sup>42</sup> D'SOUZA, Roy N., Sergio GRIMBS, Britta BEHREND, Herwig BERNAERT, Matthias S. ULLRICH a Nikolai KUHNERT. Origin-based polyphenolic fingerprinting of *Theobroma cacao* in unfermented and fermented beans. *Food Research International* [online]. 2017, **99**, 550-559 [cit. 2020-04-15]. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.06.007. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996917302582>
- <sup>43</sup> ZHENG, Xin-Qiang, Yoko KOYAMA, Chifumi NAGAI a Hiroshi ASHIHARA. Biosynthesis, accumulation and degradation of theobromine in developing *Theobroma cacao* fruits. *Journal of Plant Physiology* [online]. 2004, **161**(4), 363-369 [cit. 2020-04-15]. DOI: 10.1078/0176-1617-01253. ISSN 01761617. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0176161704705970>

- <sup>44</sup> STAPHYLAKIS, K. a D. GEGIOU. Free, esterified and glucosidic sterols in cocoa butter. *Lipids* [online]. 1985, **20**(11), 723-728 [cit. 2020-05-17]. DOI: 10.1007/BF02534394. ISSN 0024-4201. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1007/BF02534394>
- <sup>45</sup> AGUS, Baizura Aya Putri, Nurul Nadzirah MOHAMAD a Norhayati HUSSAIN. Composition of unfermented, unroasted, roasted cocoa beans and cocoa shells from Peninsular Malaysia. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2018, **12**(4), 2581-2589. DOI: 10.1007/s11694-018-9875-4. ISSN 2193-4126. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11694-018-9875-4>
- <sup>46</sup> AGYIRIFO, Daniel S., Mark WAMALWA, Emmanuel Plas OTWE, Isaac GALYUON, Steven RUNO, Jemmy TAKRAMA a Joseph NGERANWA. Metagenomics analysis of cocoa bean fermentation microbiome identifying species diversity and putative functional capabilities. *Heliyon* [online]. 2019, **5**(7) [cit. 2020-04-05]. DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e02170. ISSN 24058440. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S240584401935830X>
- <sup>47</sup> ROTTIERS, Hayley, Daylan Amelia TZOMPA SOSA, Ann DE WINNE, et al. Dynamics of volatile compounds and flavor precursors during spontaneous fermentation of fine flavor Trinitario cocoa beans. *European Food Research and Technology*. 2019, **245**(9), 1917-1937. DOI: 10.1007/s00217-019-03307-y. ISSN 1438-2377. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-019-03307-y>
- <sup>48</sup> NIELSEN, D.S., O.D. TENIOLA, L. BAN-KOFFI, M. OWUSU, T.S. ANDERSSON a W.H. HOLZAPFEL. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2007, **114**(2), 168-186 [cit. 2020-04-04]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.010. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160506005204>
- <sup>49</sup> JESPERSEN, L, D NIELSEN, S HONHOLT a M JAKOBSEN. Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. *FEMS Yeast Research* [online]. 2005, **5**(4-5), 441-453 [cit. 2020-04-05]. DOI: 10.1016/j.femsyr.2004.11.002. ISSN 15671356. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1016/j.femsyr.2004.11.002>
- <sup>50</sup> ACULEY, Patrick C., Pia SNITKJAER, Margaret OWUSU, Marc BASSOMPIERE, Jemmy TAKRAMA, Lars NØRGAARD, Mikael A. PETERSEN a Dennis S. NIELSEN. Ghanaian Cocoa Bean Fermentation Characterized by Spectroscopic and Chromatographic Methods and Chemometrics. *Journal of Food Science* [online]. 2010, **75**(6), S300-S307 [cit. 2020-05-01]. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01710.x. ISSN 00221147. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2010.01710.x>
- <sup>51</sup> SCHWAN, Rosane F. a Alan E. WHEALS. The Microbiology of Cocoa Fermentation and its Role in Chocolate Quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2004, **44**(4), 205-221 [cit. 2020-04-05]. DOI: 10.1080/10408690490464104. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408690490464104>

- <sup>52</sup> PASSOS, FLAVIA M. L., DAISON OLZANY SILVA, ALEX LOPEZ, CÉLIA L. L. F. FERREIRA a WALTER VIEIRA GUIMARÃES. Characterization and Distribution of Lactic Acid Bacteria from Traditional Cocoa Bean Fermentations in Bahia. *Journal of Food Science* [online]. 1984, **49**(1), 205-208 [cit. 2020-04-05]. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1984.tb13708.x. ISSN 0022-1147. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.1984.tb13708.x>
- <sup>53</sup> Cocoa and Coffee. DOYLE a BUCHANAN, ed. *Food Microbiology* [online]. American Society of Microbiology, 2013, 2013-1-1, s. 881-899 [cit. 2020-04-05]. DOI: 10.1128/9781555818463.ch35. ISBN 9781555816261. Dostupné z: <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555818463.chap35>
- <sup>54</sup> ARDHANA, M. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2003, **86**(1-2), 87-99 [cit. 2020-04-05]. DOI: 10.1016/S0168-1605(03)00081-3. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160503000813>
- <sup>55</sup> ZAK, O. L., K. OSTOVAR a P. G. KEENEY. IMPLICATION OF *Bacillus subtilis* IN THE SYNTHESIS OF TETRAMETHYLPYRAZINE DURING FERMENTATION OF COCOA BEANS. *Journal of Food Science* [online]. 1972, **37**(6), 967-968 [cit. 2020-04-05]. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1972.tb03717.x. ISSN 0022-1147. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.1972.tb03717.x>
- <sup>56</sup> REHM, H.-J. a G. REED, ed. *Biotechnology Set* [online]. Wiley, 2001 [cit. 2020-05-12]. DOI: 10.1002/9783527620999. ISBN 9783527257621.
- <sup>57</sup> MEERSMAN, Esther, Nore STRUYF, Clare KYOMUGASHO, et al. Characterization and Degradation of Pectic Polysaccharides in Cocoa Pulp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2017, **65**(44), 9726-9734 [cit. 2020-05-13]. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b03854. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.7b03854>
- <sup>58</sup> SCOLLO, Emanuele, David C.A. NEVILLE, M. Jose ORUNA-CONCHA, Martine TROTIN, Pathmanathan UMAHARAN, Darin SUKHA, Rena KALLOO a Rainer CRAMER. Proteomic and peptidomic UHPLC-ESI MS/MS analysis of cocoa beans fermented using the Styrofoam-box method. *Food Chemistry* [online]. 2020, **316** [cit. 2020-04-09]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.126350. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814620302041>
- <sup>59</sup> ADEYEYE, E.I., R.O. AKINYEYE, I. OGUNLADE, O. OLAOFE a J.O. BOLUWADE. Effect of farm and industrial processing on the amino acid profile of cocoa beans. *Food Chemistry* [online]. 2010, **118**(2), 357-363 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.04.127. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814609006128>

- <sup>60</sup> ALBERTINI, Barbara, Aurélie SCHOUBBEN, Davide GUARNACCIA, Filippo PINELLI, Mirco DELLA VECCHIA, Maurizio RICCI, Gian Carlo DI RENZO a Paolo BLASI. Effect of Fermentation and Drying on Cocoa Polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2015, **63**(45), 9948-9953 [cit. 2020-05-12]. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b01062. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.5b01062>
- <sup>61</sup> PELÁEZ, Pedro. P., Saulo GUERRA a David CONTRERAS. Changes in physical and chemical characteristics of fermented cocoa (*Theobroma cacao*) beans with manual and semi-mechanized transfer, between fermentation boxes. *Scientia Agropecuaria* [online]. 2016, **07**(02), 111-119 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.17268/sci.agropecu.2016.02.04. ISSN 20779917. Dostupné z: <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop/article/view/1105>
- <sup>62</sup> CABRITA, Luis, Torgils FOSSEN a Øyvind M ANDERSEN. Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. *Food Chemistry* [online]. 2000, **68**(1), 101-107 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1016/S0308-8146(99)00170-3. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814699001703>
- <sup>63</sup> DANG, Yen K. T. a Ha V. H. NGUYEN. Effects of Maturity at Harvest and Fermentation Conditions on Bioactive Compounds of Cocoa Beans. *Plant Foods for Human Nutrition* [online]. 2019, **74**(1), 54-60 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1007/s11130-018-0700-3. ISSN 0921-9668. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11130-018-0700-3>
- <sup>64</sup> URBAŃSKA, Bogumiła, Dorota DEREWIKA, Andrzej LENART a Jolanta KOWALSKA. Changes in the composition and content of polyphenols in chocolate resulting from pre-treatment method of cocoa beans and technological process. *European Food Research and Technology* [online]. 2019, **245**(10), 2101-2112 [cit. 2020-05-11]. DOI: 10.1007/s00217-019-03333-w. ISSN 1438-2377. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-019-03333-w>
- <sup>65</sup> LUND, Marianne N. a Colin A. RAY. Control of Maillard Reactions in Foods: Strategies and Chemical Mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2017, **65**(23), 4537-4552 [cit. 2020-04-17]. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b00882. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.7b00882>
- <sup>66</sup> ZAMORA, Rosario a Francisco J. HIDALGO. The Maillard reaction and lipid oxidation. *Lipid Technology* [online]. 2011, **23**(3), 59-62 [cit. 2020-05-14]. DOI: 10.1002/lite.201100094. ISSN 0956666X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/lite.201100094>
- <sup>67</sup> ORACZ, Joanna a Ewa NEBESNY. Effect of roasting parameters on the physicochemical characteristics of high-molecular-weight Maillard reaction products isolated from cocoa beans of different *Theobroma cacao* L. groups. *European Food Research and Technology* [online]. 2019, **245**(1), 111-128 [cit. 2020-04-17]. DOI: 10.1007/s00217-018-3144-y. ISSN 1438-2377. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-018-3144-y>

<sup>68</sup> MESÍAS, Marta a Cristina DELGADO-ANDRADE. Melanoidins as a potential functional food ingredient. *Current Opinion in Food Science* [online]. 2017, **14**, 37-42 [cit. 2020-05-14]. DOI: 10.1016/j.cofs.2017.01.007. ISSN 22147993. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214799317300103>

<sup>69</sup> BARIŠIĆ, Veronika, Mirela KOPJAR, Antun JOZINOVIĆ, et al. The Chemistry behind Chocolate Production. *Molecules* [online]. 2019, **24**(17) [cit. 2020-05-12]. DOI: 10.3390/molecules24173163. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/17/3163>

<sup>70</sup> ALBAK, F. a A.R. TEKIN. Variation of total aroma and polyphenol content of dark chocolate during three phase of conching. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2016, **53**(1), 848-855 [cit. 2020-04-17]. DOI: 10.1007/s13197-015-2036-4. ISSN 0022-1155. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13197-015-2036-4>

<sup>71</sup> AFOAKWA, Emmanuel Ohene, Alistair PATERSON a Mark FOWLER. Factors influencing rheological and textural qualities in chocolate – a review. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2007, **18**(6), 290-298 [cit. 2020-05-17]. DOI: 10.1016/j.tifs.2007.02.002. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224407000489>

<sup>72</sup> MIRKOVIĆ, Milica, Sanja SERATLIĆ, Kieran KILCAWLEY, David MANNION, Nemanja MIRKOVIĆ a Zorica RADULOVIĆ. The Sensory Quality and Volatile Profile of Dark Chocolate Enriched with Encapsulated Probiotic *Lactobacillus plantarum* Bacteria. *Sensors* [online]. 2018, **18**(8) [cit. 2020-05-17]. DOI: 10.3390/s18082570. ISSN 1424-8220. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1424-8220/18/8/2570>

<sup>73</sup> KRÁMSKÝ, S a J ČOPÍKOVÁ. Přehled současných výrobců čokolády od kakaových bobů "bean to bar" v ČR. *Chemické listy*. 2018, **112**(10), 718-719. ISSN 1213-7103.

<sup>74</sup> *Academy of Chocolate* [online]. [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://academyofchocolate.org.uk>

<sup>75</sup> VYHLÁŠKA ze dne 6. března 2003, kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony In: *ASPI* [právní informační systém]. Praha: Wolters Kluwer ČR [vid. 2020-03-02]

<sup>76</sup> BRESSON, Serge, Dérick ROUSSEAU, Supratim GHOSH, Mimoun El MARSSI a Vincent FAIVRE. Raman spectroscopy of the polymorphic forms and liquid state of cocoa butter. *European Journal of Lipid Science and Technology* [online]. 2011, **113**(8), 992-1004 [cit. 2020-04-16]. DOI: 10.1002/ejlt.201100088. ISSN 14387697. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.201100088>

<sup>77</sup> TORO-VAZQUEZ, Jorge F., David PÉREZ-MARTÍNEZ, Elena DIBILDOX-ALVARADO, Miriam CHARÓ-ALONSO a Jaime REYES-HERNÁNDEZ. Rheometry and polymorphism of cocoa butter during crystallization under static and stirring conditions. *Journal of the American Oil Chemists' Society* [online]. 2004, **81**(2), 195-202 [cit. 2020-04-15]. DOI: 10.1007/s11746-004-0881-z. ISSN 0003021X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1007/s11746-004-0881-z>.

<sup>78</sup> ČOPÍKOVÁ, Jana. *Technologie čokolády a cukrovinek*. Praha: VŠCHT, 1999. ISBN 80-7080-365-7.

<sup>79</sup> HRABĚ, Jan, František BUŇKA a Ignác HOZA. *Technologie výroby potravin rostlinného původu: pro kombinované studium*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2007. ISBN 978-80-7318-520-6.

<sup>80</sup> GUNSTONE, Frank D., ed. *Vegetable Oils in Food Technology* [online]. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2011 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1002/9781444339925. ISBN 9781444339925.

<sup>81</sup> KADIVAR, Sheida, Nathalie DE CLERCQ, Davy VAN DE WALLE a Koen DEWETTINCK. Optimisation of enzymatic synthesis of cocoa butter equivalent from high oleic sunflower oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2014, **94**(7), 1325-1331 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1002/jsfa.6414. ISSN 00225142. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.6414>

<sup>82</sup> WOHLMUTH, Edward G. Recipes. BECKETT, Stephen T., Mark S. FOWLER a Gregory R. ZIEGLER, ed. *Beckett's Industrial Chocolate Manufacture and Use* [online]. Chichester, UK: John Wiley, 2017, 2017-03-07, s. 492-508 [cit. 2020-05-17]. DOI: 10.1002/9781118923597.ch20. ISBN 9781118923597. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118923597.ch20>

<sup>83</sup> KROGER, Manfred, Kathleen MEISTER a Ruth KAVA. Low-calorie Sweeteners and Other Sugar Substitutes: A Review of the Safety Issues. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2006, **5**(2), 35-47 [cit. 2020-05-17]. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2006.tb00081.x. ISSN 1541-4337. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1541-4337.2006.tb00081.x>

<sup>84</sup> ŞAHIN, Oya Irmak. Effect of Spirulina Biomass Fortification for Biscuits and Chocolates. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology* [online]. 2019, **7**(4), 583-587 [cit. 2020-05-17]. DOI: 10.24925/turjaf.v7i4.583-587.2204. ISSN 2148-127X. Dostupné z: <http://agrifoodscience.com/index.php/TURJAF/article/view/2204>

<sup>85</sup> RODRÍGUEZ-CARRASCO, Yelko, Anna GASPARI, Giulia GRAZIANI, Antonello SANTINI a Alberto RITIENI. Fast analysis of polyphenols and alkaloids in cocoa-based products by ultra-high performance liquid chromatography and Orbitrap high resolution mass spectrometry (UHPLC-Q-Orbitrap-MS/MS). *Food Research International* [online]. 2018, **111**, 229-236 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.05.032. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996918303879>

<sup>86</sup> PATRIGNANI, Mariela, Guillermina Andrea FAGÚNDEZ, Chrysoula TANANAKI, Andreas THRASYVOULOU a Cecilia Elena LUPANO. Volatile compounds of Argentinean honeys: Correlation with floral and geographical origin. *Food Chemistry* [online]. 2018, **246**, 32-40 [cit. 2020-04-26]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.11.010. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814617318125>

- <sup>87</sup> TSAI C., S. RODRÍGUEZ-TECEDOR, N. PÉREZ-DEL-NOTARIO a J.M. GONZÁLEZ-SÁIZ. Recognition of volatile compounds as markers in geographical discrimination of Spanish extra virgin olive oils by chemometric analysis of non-specific chromatography volatile profiles. *Journal of Chromatography A* [online]. 2011, **1218**(3), 518-523 [cit. 2020-04-26]. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.11.045. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967310016195>
- <sup>88</sup> LONGOBARDI, F., G. CASIELLO, D. SACCO, L. TEDONE a A. SACCO. Characterisation of the geographical origin of Italian potatoes, based on stable isotope and volatile compound analyses. *Food Chemistry* [online]. 2011, **124**(4), 1708-1713 [cit. 2020-04-26]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.07.092. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881461000960X>
- <sup>89</sup> LI, Qiang, Li ZHANG, Wanhua LI, Xiaolin LI, Wenli HUANG, Hua YANG a Linyong ZHENG. Chemical compositions and volatile compounds of *Tricholoma matsutake* from different geographical areas at different stages of maturity. *Food Science and Biotechnology* [online]. 2016, **25**(1), 71-77 [cit. 2020-04-26]. DOI: 10.1007/s10068-016-0010-1. ISSN 1226-7708. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10068-016-0010-1>
- <sup>90</sup> CHINNICI, Fabio, Enrique DURÁN GUERRERO, Francesca SONNI, Nadia NATALI, Ramón NATERA MARÍN a Claudio RIPONI. Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC–MS) Characterization of Volatile Compounds in Quality Vinegars with Protected European Geographical Indication. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2009, **57**(11), 4784-4792 [cit. 2020-04-26]. DOI: 10.1021/jf804005w. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf804005w>
- <sup>91</sup> AFOAKWA, Emmanuel Ohene, Alistair PATERSON, Mark FOWLER a Angela RYAN. Matrix effects on flavour volatiles release in dark chocolates varying in particle size distribution and fat content using GC–mass spectrometry and GC–olfactometry. *Food Chemistry* [online]. 2009, **113**(1), 208-215 [cit. 2020-04-27]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.07.088. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814608009199>
- <sup>92</sup> CAMBRAI, Amandine, Christophe MARCIC, Stéphane MORVILLE, Pierre SAE HOUER, Françoise BINDLER a Eric MARCHIONI. Differentiation of Chocolates According to the Cocoa's Geographical Origin Using Chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2010, **58**(3), 1478-1483 [cit. 2020-04-26]. DOI: 10.1021/jf903471e. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf903471e>
- <sup>93</sup> SUZUKI, Daisuke, Yuko SATO, Hiromi NISHIURA, Risa HARADA, Hiroshi KAMASAKA, Takashi KURIKI a Hirotohi TAMURA. A Novel Extraction Method for Aroma Isolation from Dark Chocolate Based on the Oiling-Out Effect. *Food Analytical Methods* [online]. 2019, **12**(12), 2857-2869 [cit. 2020-04-26]. DOI: 10.1007/s12161-019-01642-0. ISSN 1936-9751. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12161-019-01642-0>

- <sup>94</sup> LIU, Jianbin, Mengya LIU, Congcong HE, Huanlu SONG, Jia GUO, Ye WANG, Haiying YANG a Xiaoxia SU. A comparative study of aroma-active compounds between dark and milk chocolate: relationship to sensory perception. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2015, **95**(6), 1362-1372 [cit. 2020-04-27]. DOI: 10.1002/jsfa.6831. ISSN 00225142. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.6831>
- <sup>95</sup> REINECCIUS, G. a D. PETERSON. Principles of food flavor analysis. *Instrumental Assessment of Food Sensory Quality* [online]. Elsevier, 2013, 2013, s. 53-102 [cit. 2020-04-27]. DOI: 10.1533/9780857098856.1.53. ISBN 9780857094391. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780857094391500031>
- <sup>96</sup> HUANG, Yang a Sheryl A. BARRINGER. Monitoring of Cocoa Volatiles Produced during Roasting by Selected Ion Flow Tube-Mass Spectrometry (SIFT-MS). *Journal of Food Science* [online]. 2011, **76**(2), C279-C286 [cit. 2020-04-26]. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01984.x. ISSN 00221147. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2010.01984.x>
- <sup>97</sup> BRATTOLI, Magda, Ezia CISTERNINO, Paolo DAMBRUOSO, Gianluigi DE GENNARO, Pasquale GIUNGATO, Antonio MAZZONE, Jolanda PALMISANI a Maria TUTINO. Gas Chromatography Analysis with Olfactometric Detection (GC-O) as a Useful Methodology for Chemical Characterization of Odorous Compounds. *Sensors* [online]. 2013, **13**(12), 16759-16800 [cit. 2020-05-07]. DOI: 10.3390/s131216759. ISSN 1424-8220. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1424-8220/13/12/16759>
- <sup>98</sup> PERIS, Miguel a Laura ESCUDER-GILABERT. A 21st century technique for food control: Electronic noses. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2009, **638**(1), 1-15 [cit. 2020-05-07]. DOI: 10.1016/j.aca.2009.02.009. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267009002268>
- <sup>99</sup> ROTTIERS, Hayley, Daylan Amelia TZOMPA SOSA, Valérie LEMARCQ, et al. A multipronged flavor comparison of Ecuadorian CCN51 and Nacional cocoa cultivars. *European Food Research and Technology* [online]. 2019, **245**(11), 2459-2478 [cit. 2020-05-07]. DOI: 10.1007/s00217-019-03364-3. ISSN 1438-2377. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-019-03364-3>
- <sup>100</sup> SGORBINI, Barbara, Carlo BICCHI, Cecilia CAGLIERO, Chiara CORDERO, Erica LIBERTO a Patrizia RUBIOLO. Herbs and spices: Characterization and quantitation of biologically-active markers for routine quality control by multiple headspace solid-phase microextraction combined with separative or non-separative analysis. *Journal of Chromatography A*. 2015, **1376**(9), 9-17. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.12.007. ISSN 00219673. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967314018925>

<sup>101</sup> GUERRINI, Lorenzo, Giulia ANGELONI, Piernicola MASELLA, Luca CALAMAI, Alessandro PARENTI a Patrizia RUBIOLO. A Technological Solution to Modulate the Aroma Profile during Beer Fermentation: Characterization and quantitation of biologically-active markers for routine quality control by multiple headspace solid-phase microextraction combined with separative or non-separative analysis. *Food and Bioprocess Technology*. 2018, **11**(6), 1259-1266. DOI: 10.1007/s11947-018-2099-0. ISSN 1935-5130. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11947-018-2099-0>

<sup>102</sup> D'ARCHIVIO, Angelo Antonio, Luciana DI PIETRO, Maria Anna MAGGI a Leucio ROSSI. Optimization using chemometrics of HS-SPME/GC-MS profiling of saffron aroma and identification of geographical volatile markers. *European Food Research and Technology*. 2018, **244**(9), 1605-1613. DOI: 10.1007/s00217-018-3073-9. ISSN 1438-2377. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-018-3073-9>

<sup>103</sup> NOVÝ, Pavel, Matěj BOŽIK, Lenka KOUŘIMSKÁ, Pavel KLOUČEK, Lenka ZÁRUBOVÁ, Miloslav ZOUHAR a Ondřej DOUDA. *Stanovení reziduí botanických pesticidů pomocí SPME-GC: uplatněná certifikovaná metodika*. V Praze: Česká zemědělská univerzita, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, 2015. ISBN 978-80-213-2635-4.

<sup>104</sup> NOBRE, Ana, Áfia DE ALMEIDA, Ana LEMOS, Hilton MAGALHÃES, Deborah GARRUTI a Patrizia RUBIOLO. Volatile Profile of Cashew Apple Juice Fibers from Different Production Steps: Characterization and quantitation of biologically-active markers for routine quality control by multiple headspace solid-phase microextraction combined with separative or non-separative analysis. *Molecules*. 2015, **20**(6), 9803-9815. DOI: 10.3390/molecules20069803. ISSN 1420-3049. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/20/6/9803>

<sup>105</sup> VAS, György a Károly VÉKEY. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry*. 2004, **39**(3), 233-254. DOI: 10.1002/jms.606. ISSN 1076-5174. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jms.606>

<sup>106</sup> KAYA, Meltem, Melek MERDIVAN, Paniz TASHAKKORI, Pelin ERDEM a Jared L. ANDERSON. Analysis of Echinacea flower volatile constituents by HS-SPME-GC/MS using laboratory-prepared and commercial SPME fibers: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Essential Oil Research*. 2018, **31**(2), 91-98. DOI: 10.1080/10412905.2018.1545707. ISSN 1041-2905. Dostupné také z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10412905.2018.1545707>

<sup>107</sup> KATAOKA, Hiroyuki, Heather L LORD, Janusz PAWLISZYN, Pelin ERDEM a Jared L. ANDERSON. Applications of solid-phase microextraction in food analysis: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Chromatography A*. 2000, **880**(1-2), 35-62. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00309-5. ISSN 00219673. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967300003095>

<sup>108</sup> ZHANG, Zhouyao, Min J. YANG, Janusz PAWLISZYN, Pelin ERDEM a Jared L. ANDERSON. Solid-Phase Microextraction. A Solvent-Free Alternative for Sample Preparation: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Analytical Chemistry*. 2008, **66**(17), 844A-853A. DOI: 10.1021/ac00089a001. ISSN 0003-2700. Dostupné také z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00089a001>

<sup>109</sup> ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.

<sup>110</sup> ČÁSLAVSKÝ, Josef a Jiří Georg Kamil ŠEVČÍK. *Analýza organických látek: učební text projektu "Příprava kurzů a učebních textů v oboru vzorkování a chemické analýzy" : modul K02-2014*. Český Těšín: 2 THETA, 2014. Analytical standards and equipment. ISBN 978-80-260-7085-6.

<sup>111</sup> GREAVES, John a John ROBOZ. *Mass spectrometry for the novice*. Boca Raton: CRC Press, c2014. ISBN 978-1-4200-9418-3.

<sup>112</sup> DAY, E.A., D.A. FORSS a S. PATTON. Flavor and Odor Defects of Gamma-Irradiated Skimmilk. II. Identification of Volatile Components by Gas Chromatography and Mass Spectrometry. *Journal of Dairy Science*. 1957, **40**(8), 932-941. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(57)94577-0. ISSN 00220302. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030257945770> RETTINGER, Klaus, Christian BURSCHKA, Peter SCHEEBEN, Heike FUCHS a Armin MOSANDL. Chiral 2-alkylbranched acids, esters and alcohols. Preparation and stereospecific flavour evaluation. *Tetrahedron: Asymmetry* [online]. 1991, 2(10), 965-968 [cit. 2020-04-18]. DOI: 10.1016/S0957-4166(00)86137-6. ISSN 09574166. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0957416600861376>

<sup>113</sup> MARSEGLIA, Angela, Marilena MUSCI, Massimiliano RINALDI, Gerardo PALLA a Augusta CALIGIANI. Volatile fingerprint of unroasted and roasted cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) from different geographical origins. *Food Research International* [online]. 2020, **132** [cit. 2020-07-15]. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109101. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996920301265>

<sup>114</sup> PEROTTI, Pamela, Chiara CORDERO, Cristian BORTOLINI, Patrizia RUBIOLO, Carlo BICCHI a Erica LIBERTO. Cocoa smoky off-flavor: Chemical characterization and objective evaluation for quality control. *Food Chemistry* [online]. 2020, **309** [cit. 2020-07-15]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125561. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814619316851>

<sup>115</sup> UTRILLA-VÁZQUEZ, Marycarmen, Jacobo RODRÍGUEZ-CAMPOS, Carlos Hugo AVENDAÑO-ARAZATE, Anne GSCHAEDLER a Eugenia LUGO-CERVANTES. Analysis of volatile compounds of five varieties of Maya cocoa during fermentation and drying processes by Venn diagram and PCA. *Food Research International* [online]. 2020, **129** [cit. 2020-07-15]. DOI: 10.1016/j.foodres.2019.108834. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996919307203>

- <sup>116</sup> BASTOS, Valdeci S., Thais M. UEKANE, Neyde A. BELLO, Claudia M. DE REZENDE, Vânia M. FLOSI PASCHOALIN a Eduardo M. DEL AGUILA. Dynamics of volatile compounds in TSH 565 cocoa clone fermentation and their role on chocolate flavor in Southeast Brazil. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2019, **56**(6), 2874-2887 [cit. 2020-07-15]. DOI: 10.1007/s13197-019-03736-3. ISSN 0022-1155. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13197-019-03736-3>
- <sup>117</sup> HINNEH, Michael, Enoch Enorkplim ABOTSI, Davy VAN DE WALLE, et al. Pod storage with roasting: A tool to diversifying the flavor profiles of dark chocolates produced from ‘bulk’ cocoa beans? (part I. *Food Research International* [online]. 2019, **119**, 84-98 [cit. 2020-07-15]. DOI: 10.1016/j.foodres.2019.01.057. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996919300663>
- <sup>118</sup> ASCRIZZI, Roberta, Guido FLAMINI, Cecilia TESSIERI a Luisa PISTELLI. From the raw seed to chocolate: Volatile profile of Blanco de Criollo in different phases of the processing chain. *Microchemical Journal* [online]. 2017, **133**, 474-479 [cit. 2020-07-15]. DOI: 10.1016/j.microc.2017.04.024. ISSN 0026265X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026265X17302692>
- <sup>119</sup> QIN, Xiao-Wei, Jian-Xiong LAI, Le-He TAN, Chao-Yun HAO, Fu-Peng LI, Shu-Zhen HE a Ying-Hui SONG. Characterization of volatile compounds in Criollo, Forastero, and Trinitario cocoa seeds ( *Theobroma cacao* L.) in China. *International Journal of Food Properties* [online]. 2016, **20**(10), 2261-2275 [cit. 2020-07-15]. DOI: 10.1080/10942912.2016.1236270. ISSN 1094-2912. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10942912.2016.1236270>
- <sup>120</sup> VAN DURME, Jim, Isabel INGELS a Ann DE WINNE. Inline roasting hyphenated with gas chromatography–mass spectrometry as an innovative approach for assessment of cocoa fermentation quality and aroma formation potential. *Food Chemistry* [online]. 2016, **205**, 66-72 [cit. 2020-07-15]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.03.004. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814616303442>
- <sup>121</sup> CAPRIOLI, Giovanni, Dennis FIORINI, Filippo MAGGI, et al. Nutritional composition, bioactive compounds and volatile profile of cocoa beans from different regions of Cameroon. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* [online]. 2016, **67**(4), 422-430 [cit. 2020-07-15]. DOI: 10.3109/09637486.2016.1170769. ISSN 0963-7486. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/09637486.2016.1170769>
- <sup>122</sup> GRONDIN, Eric, Alain SHUM CHEONG SING, Yanis CARO, et al. A comparative study on the potential of epiphytic yeasts isolated from tropical fruits to produce flavoring compounds. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2015, **203**, 101-108 [cit. 2020-07-15]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.032. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160515001233>

- <sup>123</sup> RODRIGUEZ-CAMPOS, J., H.B. ESCALONA-BUENDÍA, S.M. CONTRERAS-RAMOS, I. OROZCO-AVILA, E. JARAMILLO-FLORES a E. LUGO-CERVANTES. Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa. *Food Chemistry* [online]. 2012, **132**(1), 277-288 [cit. 2020-07-15]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.10.078. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814611015317>
- <sup>124</sup> RODRIGUEZ-CAMPOS, J., H.B. ESCALONA-BUENDÍA, I. OROZCO-AVILA, E. LUGO-CERVANTES a M.E. JARAMILLO-FLORES. Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Research International* [online]. 2011, **44**(1), 250-258 [cit. 2020-07-15]. DOI: 10.1016/j.foodres.2010.10.028. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996910004035>
- <sup>125</sup> CEVALLOS-CEVALLOS, Juan Manuel, Laura GYSEL, Maria Gabriela MARIDUEÑA-ZAVALA a María José MOLINA-MIRANDA. Time-Related Changes in Volatile Compounds during Fermentation of Bulk and Fine-Flavor Cocoa (*Theobroma cacao*) Beans. *Journal of Food Quality* [online]. 2018, 2018, 1-14 [cit. 2020-04-18]. DOI: 10.1155/2018/1758381. ISSN 0146-9428. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/jfq/2018/1758381/>
- <sup>126</sup> BIANCHI, Federica, Maria CARERI, Alessandro MANGIA a Marilena MUSCI. Retention indices in the analysis of food aroma volatile compounds in temperature-programmed gas chromatography: Database creation and evaluation of precision and robustness. *Journal of Separation Science* [online]. 2007, 30(4), 563-572 [cit. 2020-04-17]. DOI: 10.1002/jssc.200600393. ISSN 16159306. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200600393>
- <sup>127</sup> CRAFACK, Michael, Hanna KEUL, Carl Emil ESKILDSEN, et al. Impact of starter cultures and fermentation techniques on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. *Food Research International* [online]. 2014, 63, 306-316 [cit. 2020-04-17]. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.04.032. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996914002816>
- <sup>128</sup> Isoamyl acetate. *PubChem* [online]. [cit. 2020-04-18]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isoamyl-acetate>
- <sup>129</sup> KHAIRY, H. Luma, A. Fered SAADOON, Wahidu ZZAMAN, Tajul A. YANG a Azhar MAT EASA. Identification of flavor compounds in rambutan seed fat and its mixture with cocoa butter determined by SPME-GCMS. *Journal of King Saud University - Science* [online]. 2018, 30(3), 316-323 [cit. 2020-04-18]. DOI: 10.1016/j.jksus.2017.03.001. ISSN 10183647. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1018364716306486>
- <sup>130</sup> 2-Methyl-1-butanol. *PubChem* [online]. [cit. 2020-04-18]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-methyl-1-butanol>
- <sup>131</sup> 2-Pentylfuran. *PubChem* [online]. [cit. 2020-04-18]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/19602>

- <sup>132</sup> HUI, Y. H. Handbook of fruit and vegetable flavors. Hoboken, N.J.: Wiley, c2010. ISBN 978-0470227213.
- <sup>133</sup> THANG, Tran D., Do N. DAI, Tran M. HOI a Isiaka A. OGUNWANDE. Essential Oils from Five Species of Annonaceae from Vietnam. Natural Product Communications [online]. 2013, 8(2) [cit. 2020-04-18]. DOI: 10.1177/1934578X1300800228. ISSN 1934-578X. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1934578X1300800228>
- <sup>134</sup> PAGONAS, Nikolaos, Wolfgang VAUTZ, Luzia SEIFERT, Rafael SLODZINSKI, Joachim JANKOWSKI, Walter ZIDEK, Timm H. WESTHOFF a Shree Ram SINGH. Volatile Organic Compounds in Uremia. PLoS ONE [online]. 2012, 7(9) [cit. 2020-04-18]. DOI: 10.1371/journal.pone.0046258. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0046258>
- <sup>135</sup> JASICKA-MISIAK, Izabela, Ewa MAKOWICZ a Natalia STANEK. Polish Yellow Sweet Clover (*Melilotus officinalis* L.) Honey, Chromatographic Fingerprints, and Chemical Markers. Molecules [online]. 2017, 22(1) [cit. 2020-04-18]. DOI: 10.3390/molecules22010138. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/22/1/138>
- <sup>136</sup> KUMAR TYAGI, Amit, Danka BUKVICKI, Davide GOTTARDI, Milan VELJIC, Maria Elisabetta GUERZONI, Anushree MALIK a Petar D. MARIN. Antimicrobial Potential and Chemical Characterization of Serbian Liverwort (*Porella arboris-vitae*): SEM and TEM Observations. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine [online]. 2013, 2013, 1-7 [cit. 2020-04-18]. DOI: 10.1155/2013/382927. ISSN 1741-427X. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/382927/>
- <sup>137</sup> CHEBI:17580 - linalool. *EMBL-EBI* [online]. [cit. 2020-04-18]. Dostupné z: <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:17580>
- <sup>138</sup> YANNAI, Shmuel. Dictionary of food compounds with CD-ROM: additives, flavors, and ingredients. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC, c2004. ISBN 1-58488-416-9.
- <sup>139</sup> MUELLER, Carsten W., Andrea CARMINATI, Christina KAISER, Jens-Arne SUBKE a Caroline GUTJAHR. Editorial: Rhizosphere Functioning and Structural Development as Complex Interplay Between Plants, Microorganisms and Soil Minerals. Frontiers in Environmental Science [online]. 2019, 7 [cit. 2020-04-18]. DOI: 10.3389/fenvs.2019.00130. ISSN 2296-665X. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fenvs.2019.00130/full>
- <sup>140</sup> COUNET, Christine, Delphine CALLEMIEN, Caroline OUWERX a Sonia COLLIN. Use of Gas Chromatography–Olfactometry To Identify Key Odorant Compounds in Dark Chocolate. Comparison of Samples before and after Conching. Journal of Agricultural and Food Chemistry [online]. 2002, 50(8), 2385-2391 [cit. 2020-04-17]. DOI: 10.1021/jf0114177. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf0114177>

<sup>141</sup> DI SOTTO, Antonella, Francesca MAFFEI, Patrizia HRELIA, Silvia DI GIACOMO, Ester PAGANO, Francesca BORRELLI a Gabriela MAZZANTI. Genotoxicity assessment of some cosmetic and food additives. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* [online]. 2014, 68(1), 16-22 [cit. 2020-04-18]. DOI: 10.1016/j.yrtph.2013.11.003. ISSN 02732300. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0273230013001876>

<sup>142</sup> YADAV, Anjana a Pavan MATHUR. Aerobic oxidation of 2,4,6-tri-tert-butylphenol to quinones catalyzed by copper(II) complexes of an N-octylated bis-benzimidazolyl ligand. *Inorganica Chimica Acta* [online]. 2015, 435, 206-214 [cit. 2020-04-18]. DOI: 10.1016/j.ica.2015.06.026. ISSN 00201693. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020169315003242>

<sup>143</sup> ESPELIE, Karl E., Vivian M. BUTZ a Alfred DIETZ. Decyl Decanoate: A Major Component of the Tergite Glands of Honeybee Queens ( *Apis Mellifera* L.). *Journal of Apicultural Research* [online]. 2015, 29(1), 15-19 [cit. 2020-04-18]. DOI: 10.1080/00218839.1990.11101192. ISSN 0021-8839. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00218839.1990.11101192>.

<sup>144</sup> AHMED, Maqsood, Qin PEIWEN, Zumin GU, et al. Insecticidal activity and biochemical composition of *Citrullus colocynthis*, *Cannabis indica* and *Artemisia argyi* extracts against cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae* L.). *Scientific Reports* [online]. 2020, 10(1) [cit. 2020-04-18]. DOI: 10.1038/s41598-019-57092-5. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/s41598-019-57092-5>

<sup>145</sup> KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody. 2., upr. a dopl. vyd.* Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.

<sup>146</sup> ABDI, Hervé a Lynne J. WILLIAMS. Principal component analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics* [online]. 2010, 2(4), 433-459 [cit. 2020-07-22]. DOI: 10.1002/wics.101. ISSN 19395108. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/wics.101>