

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra Chemie



Karotenoidy v pšenicích s netradiční barvou zrna

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Marie Míková

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: Ing. Zora Kotíková, Ph.D.

© 2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Karotenoidy v pšenících s netradiční barvou zrna" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13. 4. 2018 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Zoře Kotíkové, Ph.D. za cenné rady, ochotu a pomoc během zpracování diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Lubošovi Paznochtovi, za pomoc a cenné rady při psaní diplomové práce.

Karotenoidy v pšenicích s netradiční barvou zrna

Souhrn

V teoretické části práce je zpracován literární přehled se zaměřením na pšenici a na problematiku karotenoidů v obilovinách. V literární rešerši je uvedena historie pšenice, anatomická stavba a chemické složení pšeničného zrna. Dále se práce věnuje chemickému složení, biosyntéze, metabolismu a stabilitě karotenoidů. Zvláštní pozornost je věnována luteinu, kterého je v obilkách pšenice zastoupeno nejvíce. Netradičně zbarvené odrůdy pšenice mají vyšší obsah biologicky aktivních látek, (karotenoidy, antokyany, fenolické kyseliny) a další nutričně významné látky pro člověka. Tyto látky také vykazují antioxidační vlastnosti.

V praktické části práce byla pro analýzu karotenoidů použita pšenice (*T. aestivum* L.) s odlišným typem zbarvení zrn. Testováno bylo 8 odrůd pšenice – Citrus, Bona Vita (se žlutou barvou zrna), V1 131-15, UC 66049 (modrá barva zrna), Konini, AF Jumiko (purpurová barva zrna) a Bohemia, Annie (standardní barva zrna). Vybrané odrůdy pšenice byly hodnoceny ze dvou po sobě jdoucích sklizní z roku 2015 a 2016. Obsahy karotenoidů byly změřeny metodou HPLC s DAD detekcí. V jednotlivých odrůdách byl sledován vliv odrůdy a barvy zrna na celkový obsah a složení karotenoidů. Dále byl sledován vliv ročníku sklizně na obsah karotenoidů u jednotlivých genotypů.

Výsledky potvrdily hypotézu, že obsah karotenoidů v pšenicích je odrůdově závislý. Nejvyšší schopnost syntézy karotenoidů byla zjištěna v odrůdě Citrus s průměrnou hodnotou 6,695 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny a nejnižší schopnost tvorby v odrůdě UC 66049 (1,906 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny). Dále byla potvrzena hypotéza, že obsah a složení karotenoidů je závislý na barvě zrna. Nejvyšší obsah karotenoidů vykazovala pšenice se žlutým zrnem (6,597 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny). U klasické pšenice (červené) bylo naměřeno 2,304 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny, což představuje nejmenší množství karotenoidů v porovnání s modrou (3,726 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny) a purpurovou (3,642 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny) pšenicí. Hypotéza, že karotenoidy jsou ovlivněny ročníkem sklizně, také byla potvrzena. Pšenice sklizené v roce 2015 obsahovaly průměrně více karotenoidů (5,264 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny), než pšenice sklizené v roce 2016 (2,870 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny). V testovaných odrůdách byl sledován poměr volných a esterově vázaných karotenoidů. Nevětší podíly esterově vázaných karotenoidů v roce 2015 obsahovaly odrůdy Bona Vita a UC 66049 (67 %), V roce 2016 bylo zjištěno největší procento u odrůd Bona Vita a Konini (66 %). Genotypy pšenice: Bohemia, V1 131-15, Citrus a AF Jumiko uchovávají pouze volné formy karotenoidů.

Klíčová slova: pšenice, purpurový perikarp, modrý aleuron, žlutý endosperm, standardní barva zrna, karotenoidy, HPLC–DAD

Carotenoids in coloured wheat grains

Summary

The theoretical part of this essay describes a literary overview focused on wheat and on matters of carotenoids in cereal. The literary recherche presents the history of wheat, anatomical structure and chemical composition of a wheat grain. Next, this essay focuses on chemical composition, biosynthesis, metabolism and constancy of carotenoids. Special attention is paid to lutein, which makes the biggest part of the wheat grain. Unusually coloured types of wheat have higher content of biologically active substances (carotenoids, anthokyan, phenolic acids) and other substances that are nutritionally significant for people. These substances also show antioxidant features. In the practical part was used wheat for carotenoid analysis (*T.aestivum* L.) with different types of wheat colouring. 8 types of wheat were tested - Citrus, Bona Vita (yellow grain), V1 131-15, UC 66049 (blue grain), Konini, AF Jumiko (purple grain) and Bohemia, Annie (standard grain colour). Selected wheat types were evaluated from two harvests from years 2015 and 2016. The content of carotenoids was measured by HPLC-DAD detection. The effect of the type and grain colour on the entire content and structure of the carotenoids was observed in individual types. The effect of the year of harvest on the carotenoid content in individual genotypes was also observed. The results confirm the hypothesis that the carotenoid content in wheat depends on the type. The biggest capability of carotenoid synthesis was discovered in Citrus with the average value of dry matter $6,695 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, and the lowest capability was found in UC 66049 ($1,906 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of dry matter). The hypothesis that the carotenoid content and composition depends on wheat colour was also confirmed. The highest content of carotenoids was found in wheat with yellow grain ($6,597 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of dry matter). Standard wheat (red) contained $2,304 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of dry matter which means smaller amount of carotenoids in comparison with the blue ($3,726 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of dry matter) and purple ($3,642 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of dry matter) wheat. Hypothesis, that carotenoids are affected by the year of the harvest was also confirmed. Wheat harvested in 2015 contained on an average more carotenoids ($5,264 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DM) than wheat harvested in 2016 ($2,870 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of DM). The ratio of free and ester bond carotenoids was observed in the tested types. The highest ratio of ester bond carotenoids in 2015 contained Bona Vita and UC 66049 (67%), in 2016 was the highest percentage found in Bona Vita and Konini (66%). Wheat genotypes: Bohemia, V1 131-15, Citrus and AF Jumiko hold only free forms of carotenoids.

Keywords: wheat, purple pericarp, blue aleuron, yellow endosperm, standard wheat colour, carotenoids, HPLC-DAD.

1 Obsah

1	Obsah	3
2	Úvod	5
3	Cíl práce	6
4	Literární přehled	7
4.1	Pšenice setá (<i>Triticum aestivum</i> L.)	7
4.1.1	Původ a historie pěstování pšenice	7
4.1.2	Taxonomie pšenice	8
4.1.3	Rod pšenice <i>Triticum</i>	9
4.1.4	Využití pšenice	10
4.1.5	Anatomická stavba a složení pšeničného zrna	11
4.1.6	Chemické složení pšeničného zrna.....	13
4.1.7	Pšenice s barevným zrnem	15
4.2	Karotenoidy	18
4.2.1	Chemická struktura.....	19
4.2.2	Biosyntéza	20
4.2.3	Role karotenoidů v rostlinách.....	23
4.2.4	Výskyt.....	23
4.2.5	Použití karotenoidů.....	25
4.2.6	Stabilita Karotenoidů	26
4.2.7	Metabolismus a účinky karotenoidů na lidský organismus.....	27
4.2.8	Lutein.....	30
4.3	HPLC–DAD	32
5	Praktická část	33
5.1	Rostlinný materiál	33
5.2	Stanoviště a podmínky pěstování	34
5.3	Příprava vzorku	35
5.4	Stanovení sušiny	35
5.5	Použité chemikálie	35
5.5.1	Standardy	35
5.5.2	Chemikálie.....	36
5.6	Použité pomůcky a přístroje	36
5.6.1	Pomůcky	36
5.6.2	Přístroje.....	36
5.7	Vlastní stanovení karotenoidů	37
5.7.1	Extrakce	37
5.7.2	Chromatografická separace	38
5.7.3	Identifikace a kvantifikace vzorků	39

5.8	Statistická analýza	40
6	Výsledky	41
6.1	Celkové karotenoidy v obou ročních sklizně.....	41
6.1.1	Vliv odrůdy.....	41
6.1.2	Vliv barvy zrna	44
6.1.3	Vliv ročníku sklizně	45
6.2	Jednotlivé karotenoidy za oba ročníky sklizně	46
6.2.1	Antheraxanthin	46
6.2.2	Lutein.....	47
6.2.3	Zeaxanthin	48
6.2.4	α -karoten.....	49
6.2.5	β -karoten.....	50
6.3	Poměr esterově vázaných karotenoidů	51
6.3.1	Sklizeň 2015	51
6.3.2	Sklizeň 2016	52
7	Diskuze	53
7.1	Celkové karotenoidy	53
7.2	Jednotlivé karotenoidy	54
7.3	Estery	55
7.4	Podmínky prostředí	56
8	Závěr.....	58
9	Seznam použité literatury.....	59
10	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	70
11	Přílohy	71

2 Úvod

Největší význam mezi plodinami pěstovanými na orné půdě mají obiloviny, jež jsou v České republice nejdůležitější základní surovinou pro potravinářskou výrobu i krmivářský průmysl. Ročně se u nás vypěstuje 6,8–7,1 milionů tun obilovin, z toho 2,1 milionů tun se využije pro výrobu potravin. Obiloviny tvoří 60% rostlinné výroby, přičemž čtvrtina celkové produkce připadá na pšenici.

Tradičně a nejčastěji používané pšenice mají bílou a také červenou barvu obilky. Nevyužité a méně známé jsou však pšenice s netradičním zbarvením zrna. Tyto pšenice obsahují vyšší množství pigmentů, které zbarvují zrna pšenice do modré, purpurové a nebo žluté barvy. Modré a purpurové zbarvení obilky způsobují antokyany, za žluté zbarvení odpovídají přítomné karotenoidy. Pšenice s barevným zrnem je tedy lepším zdrojem biologicky aktivních látek (karotenoidů, anthokyanů, fenolických kyselin).

Právě proto, že pšenice zabezpečuje převážnou část výživy lidstva, se nabízí možnost začít využívat pro potravinářský průmysl více barevné pšenice a tím významně zlepšit kvalitu pekárenských výrobků a zvýšit přísun nejen antioxidantů.

3 Cíl práce

Hypotézy:

1. Obsah a složení karotenoidů jsou závislé na odrůdě
2. Obsah a složení karotenoidů jsou závislé na barvě zrna
3. Poměr volných a esterově karotenoidů je odrůdově závislý
4. Obsahy karotenoidů v zrnech pšenice jsou ovlivněny ročníkem sklizně

Cíle:

1. Stanovit obsah a složení karotenoidů ve vybraných odrůdách pšenice
2. Porovnat obsahy karotenoidů v pšenicích s netradiční barvou zrna s pšenicemi konvenčními
3. Stanovit množství volných a esterově vázaných karotenoidů v testovaných odrůdách
4. Vyhodnotit vliv ročníku sklizně na obsah karotenoidů v zrnech pšenice

4 Literární přehled

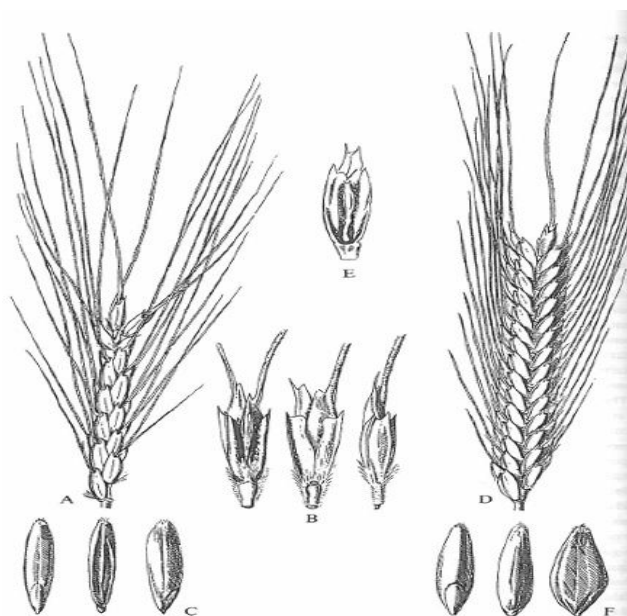
4.1 Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.)

4.1.1 Původ a historie pěstování pšenice

Nejstarší pěstované kulturní rostliny jsou obilniny, někdy se označují jako obilí, obiloviny, obilniny, případně cereálie. Obilí se stalo základem rostlinné stravy, díky tomu, že se dalo snadno pěstovat, poskytovalo relativně vysoké výnosy a především bylo dobře skladovatelné. Zemědělství se udrželo jako základ hospodářství od neolitu po novověk a dodnes jsou obilniny základem potravní pyramidy, díky tomu, že jsou kvalitním zdrojem energie a při vaření všestranně použitelnou surovinou (Beranová, 2005).

Botanicky obilniny náleží do čeledi lipnicovitých (*Poaceae*) a rozdělujeme je podle morfologických a fyziologických vlastností do dvou skupin. Pšenice, ječmen, žito, žitovec a oves jsou méně náročné na teplo a více na vodu a existují v jarních i ozimých formách. Obilniny více náročné na teplo a méně na vodu zastupuje kukuřice, proso, čirok a pohanka (Beranová, 2005).

Jednou z nejrozšířenějších plodin ve světě i u nás je pšenice. Je zároveň i nejstarší kulturní rostlinou s jedlými semeny (zrny), kterou člověk k zabezpečování potravy využívá. Nejstarší nalezená planá pšenice (obr 1) pravděpodobně pochází z doby 16 000 před naším letopočtem z města Hajfa v Izraeli (Čepička, 1995).



Obr. 1: Srovnání pšenice jednozrnky plané (v levo) a domestikované (v pravo)

[archeologienadosah, online]

Dnes již obtížně rozlišujeme období pouhého sběru pšenice a období záměrného pěstování, které je spojeno se změnou získávání hlavního zdroje obživy a vznikem zemědělství (Gajdošová et Štrudlík, 2004). Archeologické nálezy potvrzují pěstování pšenice jednozrnky (*Triticum monococcum*) a pšenice dvouzrnky (*Triticum dicoccum*) v období neolitu 8 000–7 500 let před naším letopočtem na území tzv. Úrodného půlměsíce, což zahrnuje Přední východ od Palestiny, Jordánska, Sýrie přes Turecko, Írán až k Perskému zálivu (Čepička, 1995).

V 6. století před naším letopočtem na území střední Evropy začali naši předkové pěstovat pšenici obecnou (*Triticum aestivum*). Pšenice setá (*Triticum aestivum*L.) vznikla dlouhodobým vývojem a šlechtěním z prapůvodních forem – pšenice jednozrnky a pšenice dvouzrnky (Brandolini et al., 2008).

4.1.2 Taxonomie pšenice

Během času a působením různých klimatických podmínek při šlechtění a pěstování se vytvářely rozdíly mezi jednotlivými botanickými rody a druhy i mezi jednotlivými odrůdami stejného druhu (např. ve složení, v obsahu tuku nebo v kvalitě bílkovin). Postupem doby jen některé druhy získaly dominantní postavení v potravinářské výrobě (Příhoda et al., 2006).

Pšenice je rostlinná plodina, s níže uvedeným taxonomickým zařazením:

Říše: rostliny (*Plantae*)

Podříše: cévnaté rostliny (*Tracheobionta*)

Oddělení: krytosemenné (*Magnoliophyta*)

Třída: jednoděložné (*Liliopsida*)

Čeleď: lipnicovité (*Poaceae*)

Rod: pšenice (*Triticum*)

Pšenice mají duté kolénkaté stéblo. Květenstvím je kláskový lichoklas s obilkami s výraznou podélnou rýhou. Kvítků v klásku je 2 až 5. Plevy jsou široké, mnohožilnaté. Pluchy jsou hladké. Pluška je blanitá. Osina je přisedlá k vrcholu pluchy. Plodem je tedy obilka, která zůstává až do zralosti volná a nesrůstá s pluchou a pluškou – nahé pšenice. Pšenice, u kterých přirůstá obilka k pluše a plušce, jsou nazývány pšenicemi pluchatými (plevnatými). Barva vzcházejících rostlin je zelená. Jazyček je krátký, po okraji vroubkovaný. Ouška jsou malá, ochmýřená (Kučerová, 2010).

4.1.3 Rod pšenice *Triticum*

Rod pšenice *Triticum* má několik planě rostoucích i kulturních druhů, největší význam má pšenice obecná (*Triticum vulgare*) a pšenice tvrdá (*Triticum durum*). Pšenice je charakteristická velkou genetickou rozmanitostí, její druhy se vytvářely rostoucím počtem chromozómů – rostoucí ploeditou ($2n = 14-28-42$). Rod *Triticum* se člení podle počtu chromozómů a podle pluchatosti obilek na řadu druhů, z nichž nejznámější jsou uvedeny v tabulce 1 (Pazdera 2010).

počet chromozómů	obilky nahé	obilky pluchaté
$2n = 14$		pšenice jednozrnka (<i>T.monococcum</i>)
$2n = 28$	pšenice tvrdá (<i>T. durum</i>)	pšenice dvouzrnka (<i>T. dicoccum</i>)
	pšenice perská (<i>T. carthlicum</i>)	pšenice Timofejevova (<i>T. timopheevi</i>)
	pšenice naduřelá (<i>T. turgidum</i> L.)	
	pšenice polská (<i>T. polonicum</i> L.)	
$2n = 42$	pšenice obecná (<i>T. aestivum</i> L.)	pšenice špalda (<i>T. spelta</i> L.)
	pšenice indická (<i>T. sphaerococcum</i>)	pšenice macha (<i>T. macha</i> L.)
	pšenice shloučená (<i>T. compactum</i> L.)	

Tab. 1: Významné kulturní druhy rodu *Triticum* (Pazdera, 2010)

Pšenice špalda (*Triticum spelta*) je známá nejméně 8000 let a její pravlastí je Írán či Mezopotámie a do Evropy byla dovezena před 4000 lety. Její ořechová chuť dodává této obilovině na zvláštnosti. Špalda je ceněna pro vyšší obsah vitamínů, bílkovin a vlákniny. Má však nižší hektarové výnosy než např. pšenice obecná a je oblíbená výrobci biopotravin.

Pšenice dvouzrnka (*T. dicoccum*) je archaická obilovina a pochází z oblasti dnešního Íránu, Iráku, Sýrie a Palestiny. Hrála významnou úlohu ve výživě starobylých národů Babylónu a Egypta.

Pšenice jednozrnka (*T.monococcum*) je historicky nejstarší. Je známa více jak 10000 let a dosud se na mnoha místech pěstuje. V Evropě dosáhla největšího rozšíření v Německu, vyznačuje se zlatožlutou barvou mouky (Brandolini et al., 2008).

Kamut (staroegyptsky „duše země“) byl znovuobjeven roku 1948 při archeologickém výzkumu v jedné z mnoha egyptských hrobek, později v roce 1977 byly nalezené vzorky zasety a rozmnoženy. Zrna Kamutu mají stejný tvar jako běžné druhy pšenice, jsou ovšem dvakrát tak velká. Mají v průměru o 30 % více bílkovin, esenciálních aminokyselin a zvýšený obsah vitamínů E, thiaminu, riboflavinu, kyseliny pantotenové, fosforu, hořčíku, zinku a mědi. Mouka z této odrůdy je velmi lehce stravitelná s jemnou oříškovou příchutí (Michalová et Hutař, 1998).

Z výše uvedených druhů jsou komerčně nejrozšířenější pěstované druhy: *Triticum durum* (těstářská pšenice), *Triticum durum* (pekařská pšenice) a *Triticum spelta* (špalda) (Příhoda et al., 2006).

Druhy pšenice je možné dále dělit na nižší taxonomické jednotky – variety a odrůdy. Odrůdy u nás nejrozšířenější pšenice obecné patří nejčastěji ke čtyřem varietám (tab 2), u kterých se dále rozlišují z pěstitelského hlediska dvě formy. Pšenice se dělí na ozimé, které se vysévají na podzim a jsou sklizeny na začátku léta. Dále na pšenice jarní vysévané na jaře, sklizené na konci léta, které však mají obecně nižší výnosy než pšenice ozimé (Pazdera, 2010).

varieta	barevnost klasu	osinatost klasu
<i>lutescens</i>	bílý	bezosinatý, osinatý
<i>milturum</i>	červený	bezosinatý
<i>ferrugineum</i>	červený	osinatý
<i>erythrosperrum</i>	bílý	osinatý

Tab. 2: Variety pšenice obecné – základní rozdělení podle barvy a osinatosti klasu (Pazdera, 2010)

4.1.4 Využití pšenice

K největším producentům pšenice patří Rusko, USA, Kanada, Indie, Francie a Čína. Zrno pšenice se zpracovává na mouku, jež se využívá v potravinářství při pečení chleba a jiného sortimentu pečiva a těstovin. Zrno se také zpracovává na kroupy a krupici.

Mlýnské odpady (otruby a krmné mouky) a zrno jsou krmivem pro drůbež a mladá hospodářská zvířata. Zrno se také využívá i jako průmyslová surovina k výrobě lihu, škrobu,

piva a plastů. Sláma se využívá ke krmení, na podestýlku a zaorávání, také se různě upravuje pro výrobu celulózy, lepenek a desek. (Zimolka, 2005).

4.1.5 Anatomická stavba a složení pšeničného zrna

4.1.5.1 Morfologie a anatomie pšeničné obilky

Plodem pšenice (obr 2) je jednosemenná nažka – obilka (caryopsis). Skládá se ze tří částí (obr 3): z obalů, vnitřního jádra (endospermu) a zárodku (embrya).



Obr. 2: Rostlina pšenice – *Triticum aestivum*, klas, obilka, zrno [Wikipedie, online]

Obaly chrání obilku před nepříznivými vnějšími vlivy, v mlýnské technologii je označujeme jako otruby, které jsou v potravě zdrojem nestravitelné vlákniny. Jejich podíl na celkové hmotnosti zrna činí asi 8–12 % (Kučerová, 2010). Obaly jsou dva – vnější oplodí a vnitřní osemení.

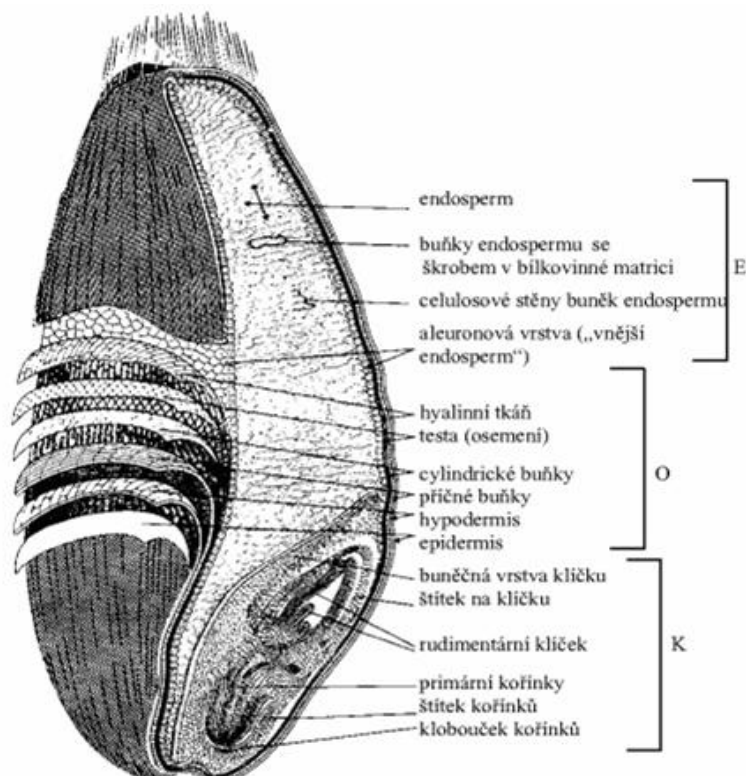
Oplodí (perikarp) je tvořeno z jednovrstevné pokožky (epidermis), pod ní se nachází jedna nebo dvě vrstvy podpokožkových buněk (buňky podélné). Jeho prvotním úkolem je chránit zrno před mechanickým poškozením, krátkodobými účinky vody a škodlivými látkami. Oplodí je proto tvořeno nerozpustnými a obtížně bobtnajícími materiály (celulosa).

Osemení (testa) se nachází pod oplodím, ale nesrůstá s ním, obě vrstvy ale k sobě těsně přimykají. Osemení nese v buňkách barviva, která dávají obilce typickou barvu. Některé

další vrstvy osemení obsahují polysacharidické látky, které přispívají k udržování rovnováhy vlhkosti zrna díky schopnosti zadržování vody bobtnáním škrobu (Příhoda et al., 2006; Žilić et al., 2011).

Vnitřní jádro (endosperm) zaujímá asi 80–85 % hmotnosti obilky. Vnější část endospermu je tvořena jednou nebo více vrstvami aleuronových buněk, které mají vysoký obsah bílkovin. Vlastní endosperm je tvořen velkými tenkostěnnými buňkami se škrobovými zrny (obr. 3).

Zárodek (embryo) je uložen na bázi hřbetní strany obilky a jeho podíl na hmotnosti obilky činí asi 1,5–3 %. Svrchu je zárodek kryt oplodím a osemením. Štítkem (scutellum), což je první děloha, přiléhá k endospermu. Na apikální straně je vzrostný vrchol (plumula) se základy listů, krytý blanitou pochvou (koleoptile). Na bazální straně je hypokotyl se zárodky kořínků (Zimolka, 2002).



O – vrstva přicházející při mletí do otrub, **E** – vrstva přicházející do mouky, **K** – část odstraňovaná s klíčkem

Obr. 3: Podélný řez pšeničným zrnem se znázorněním jeho morfologických vrstev (Zimolka, 2002)

4.1.6 Chemické složení pšeničného zrna

Chemické složení zrna pšenice (tab 3) určují genetické i ekologické faktory, stejně jako fyzikální a chemické vlivy působící při zpracování nebo skladování. Základními stavebními kameny jsou sacharidy, lipidy, bílkoviny, minerální látky a vitamíny (Gajdošová et Štrudlík, 2004).

4.1.6.1 Sacharidy

Monosacharidy se v zrna pšenice nacházejí velmi málo, převážně v klíčku a mezi nejdůležitějšími zástupci patří arabinosa, xyloza, glukosa, fruktosa, galaktosa a manosa. Oligosacharidy se vyskytují také ve velmi nízkých koncentracích. Z technologického hlediska jsou nejvýznamnější skupinou polysacharidy. Škrob se nachází převážně v endospermu a je zdrojem energie, představuje až 70 % hmotnosti zrna. Škrob obsahuje dva typy glukánů; amylosu (25 %) rozpustnou ve vodě a amylopektin (75 %), který ve vodě pouze bobtná. Dalším polysacharidem je celulóza, která podporuje fyziologii trávení jako vláknina a tím předchází cévním chorobám a některým nádorovým onemocněním. Vláknina je jedlá část rostliny, kterou tvoří komplexní sacharidy, někdy označované jako neškrobové polysacharidy. Do této skupiny řadíme celulosu, hemicelulosu, lignin, pektin a další. Hemicelulóza je uložena v obalových vrstvách a nachází se spolu s celulosou v buněčných stěnách. Strukturou jde o pentosan nerozpustný ve vodě. Dalším polysacharidem je arabinoxylan (max. 3 %), který je ve vodě naopak rozpustný a vytváří tzv. slizy (Příhoda et al., 2006).

4.1.6.2 Bílkoviny

Většinu bílkovin najdeme v endospermu a aleuronové vrstvě. Bílkoviny obsahují především aminokyseliny glutamin, prolin, leucin, cystein, lysin a glutamovou kyselinu. Ostatní proteinogenní aminokyseliny jsou zastoupeny v menším množství. Pšeničné bílkoviny rozdělujeme podle rozpustnosti v různých rozpouštědlech do čtyř skupin:

Gliadiny (Prolaminy) – rozpustné v 70% ethanolu

Gluteniny – částečně rozpustné ve zředěných roztocích kyselin a zásad

Albuminy – rozpustné ve vodě

Globuliny – rozpustné v roztocích solí

Gliadiny a gluteniny tvoří komplexní zásobní protein (lepek), který je uložen v endospermu vyvíjejícího se zrna a zásadně ovlivňuje konečné využití při zpracování (Zimolka, 2002).

4.1.6.3 Lipidy

Zárodek, klíček neboli embryo rostliny je zdrojem lipidů a minerálních látek, na něž jsou zrna poměrně chudá. Před mlýnským zpracováním se celý klíček odstraňuje, aby nedošlo k oxidačním a enzymatickým změnám lipidů, které by změnily případným žluknutím chuť i vůni mouky (Příhoda et al., 2006).

4.1.6.4 Vitaminy a minerální látky

Vitaminy jsou lokalizovány především v klíčku a aleuronové vrstvě. Většinou se jedná o vitaminy skupiny B: tiamin, riboflavin a niacin a též vitamin E. Minerální látky se nazývají popel a představují anorganický zbytek, který je získán po spálení rostlinného materiálu. Obsah popela v celých zrnech se pohybuje kolem 1,25–2,5 %, jeho koncentrace je nejvyšší v obalových vrstvách a nejnižší v endospermu. Nejvyšší podíl minerálií tvoří oxid fosforečný, draselný, hořečnatý a vápenatý. Cereálie mají nízký obsah sodíku, a jsou bohaté na draslík. Převládajícím mikro – prvkem je železo, jehož obsah v pšenici činí 33–66 mg.kg⁻¹ (Topping, 2007; Žilić et al., 2011).

Obsah jednotlivých složek pšeničného zrna v %				
chemické složky	zrno	aleuronová vrstva	zárodek	endosperm
bílkoviny	10–17	23–33	36–42	9–14
škrob	60–70	0	0	78–84
celulóza	2,5–3,3	12–20	3–5	0,13–0,18
jiné sacharidy	3,0–6,0	3,0–5,0	22–28	3,0–4,0
lipidy	2,0–2,5	7,0–8,5	12–16	0,5–0,7
minerální látky	1,4– 2,3	9–11	5–6	0,3–0,5

Tab. 3: Obsah jednotlivých složek pšeničného zrna v % (Příhoda et al., 2006)

4.1.7 Pšenice s barevným zrnem

Pšenice setá (ozimá i jarní forma) může mít různou barvou zrna. Nejvíce je zastoupeno červené (červenohnědé) zbarvení, které způsobuje přítomnost anthokyanů a dalších fenolických sloučenin v osemeni a oplodí (Martínek et Vyhnánek, 2014). Většina pšenic pěstovaných v Evropě má tedy červenou barvu. Kromě tohoto typu zbarvení existují i tzv. barevné odrůdy pšenice, mezi které patří pšenice se žlutým endospermem, purpurovým perikarpem a modrým aleuronem (Obr. 4) (Martínek et al., 2006). (obr. 4 až 8).



Obr. 4: Barvy zrna: a – červené (standardní), odrůda Bohemia; b – bílé (standardní), odrůda Heroldo; c – se žlutým endospermem, odrůda Citrus; d – tritordeum, odrůda JB1; e - s purpurovým perikarpem, odrůda Indigo; f – s modrým aleuronem, odrůda Skorpion; g - tmavé díky kombinaci barev (Karásek et al., 2014; Martínek et Vyhnánek 2014)

Žlutavé zbarvení pšenic způsobují karotenoidy, jejichž barevné pigmenty se nacházejí v endospermu. Výrazně žluté jsou také diploidní pšenice (jednozrnky), méně výrazné zbarvení mají i některé hexaploidní pšenice (Lachman et al., 2017; Pozniak et al., 2007)

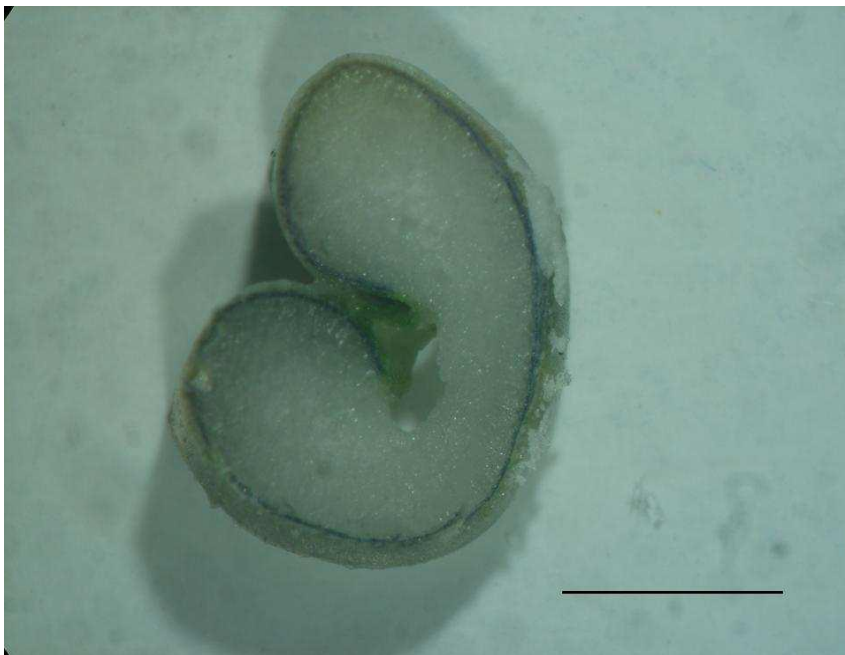
Purpurové zbarvení pšenice způsobují antokyanové pigmenty kyanidin-3-glukosidu, které se ukládají v perikarpu (např. odrůdy Konini, Purple, PurpleFeed, AbissinskajaArrasajta). Geny pro purpurový perikarp obilky byly přeneseny z purpurových tetraploidních a hexaploidních pšenic, pocházejících z Etiopie (Martínek et al., 2006).

Modravé zbarvení zrna je důsledkem ukládání antokyanových pigmentů do aleuronové vrstvy mezi obalovými vrstvami a endospermem (odrůda UC 66049). Modrozrné pšenice obsahují více antokyanů než standardně zbarvené obilky (Burešová et al., 2015). V porovnání s purpurovými odrůdami je stabilita pigmentů modrých pšenic, v důsledku jejich

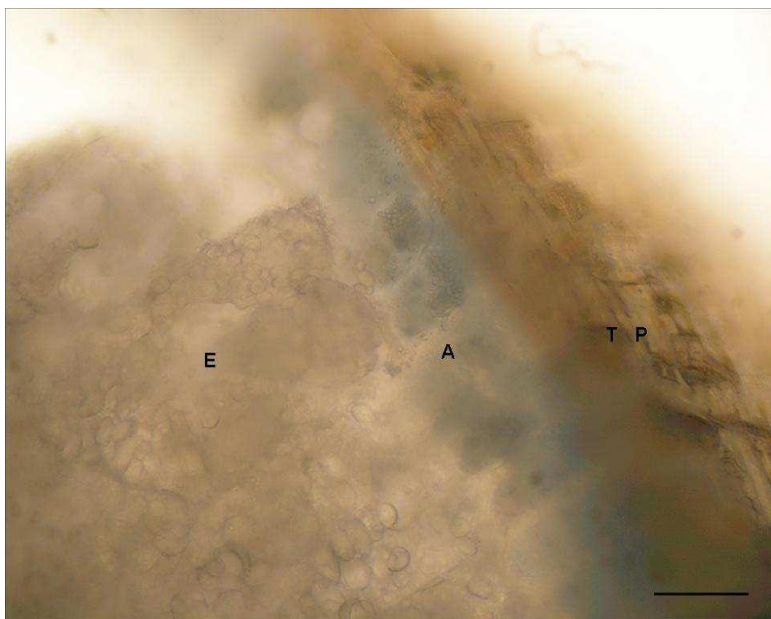
umístění v aleuronové vrstvě, lepší, neboť je chráněna vrstvami obalovými (Garg et al., 2016).

Přírodní pigmenty, antokyany a karotenoidy tedy ovlivňují specifické zbarvení zrna (obr. 4) a vyznačují se antioxidačními vlastnostmi. Můžeme předpokládat, že jejich dlouhodobější užívání bude mít příznivý vliv na zdraví konzumentů (Knievel, 2009; Lachman et al., 2017). Výzkumy prováděné na laboratorních potkanech, prokázaly vyšší hodnoty antioxidační aktivity v játrech potkanů krmených purpurovou pšenicí ve srovnání s kontrolní skupinou, která byla krmena běžnou pšenicí (Karásek et al., 2014).

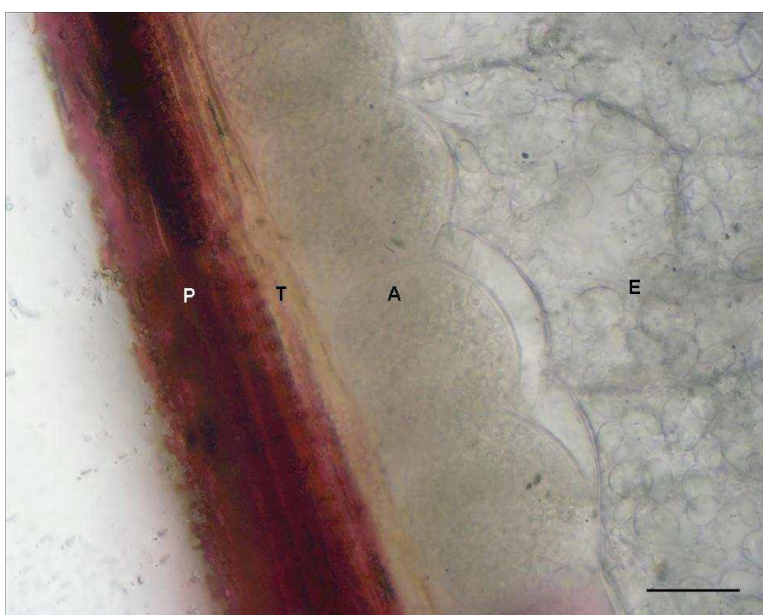
Barevné odrůdy pšenice mohou značně ovlivnit nutriční hodnotu potravin, pokud se budou využívat při výrobě různých celozrnných nebo cereálních výrobků (Chabinová et al., 2011).



Obr5: Příčný řez obilkou genotypu TschermaksBlaukörnigerSommerweizen, úsečka = 1 mm (Trojan et al., 2011)



Obr. 6: Příčný řez obilkou genotypu UC66049. Oplodí (P) neobsahuje zelené pigmenty. Osemení (T) je zbarveno stejně jako oplodí. Buňky aleuronové (A) vrstvy jsou zbarveny modře. Buňky endospermu (E) jsou bez pigmentů, úsečka = 200 μm (Trojan et al., 2010)



Obr. 7: Příčný řez obilkou genotypu ANK-28B. Oplodí (P) obsahuje purpurové pigmenty. Osemení (T), které srůstá s oplodím, neobsahuje pigment. Buňky aleuronové (A) vrstvy a buňky endospermu také nejsou zbarveny, úsečka = 200 μm (Trojan et al., 2010)



Obr. 8: Příčný řez obilkou genotypu Abissinskajaarrasajta. Oplodí (P) obsahuje purpurové pigmenty, úsečka = 200 μm (Trojan et al., 2010).

U ozimé pšenice PS Karkulka s purpurovým zabarvením zrna šlechtitelé uvádí 20x vyšší obsah antokyanů než u běžné pšenice. Zároveň má vysoký obsah bílkovin i lepku.

Novozélandská odrůda pšenice Konini s purpurovým perikarpem, má také vyšší obsah antokyanů než běžné pšenice zastoupených ve formě kyanidin-3-glukosidu, kyanidin-3-rutinosidu a peonidin-3-glukosidu. Antokyaniny mají výrazné antioxidační účinky, zmírňují riziko oxidačního poškození a zvyšují schopnost vazby těžkých kovů (Paulová et Bochořáková, 2004).

4.2 Karotenoidy

Karotenoidy jsou významnými a nejrozšířenějšími lipofilními barvivy. Dnes je známo asi 700 přirozeně se vyskytujících karotenoidních pigmentů (Kahlon et Keagy, 2003).

Nejjednodušším karotenem je acyklický polynenasycený uhlovodík lykopen, jehož isomerací a cyklizací lze odvodit postupně γ -, α - a β -karoten (Šivel et al., 2013).

Po chemické stránce jsou řazeny k polyenům, protože obsahují systém konjugovaných dvojných vazeb nejčastěji mezi 40 uhlíkovými atomy (Nisar et al., 2015).

Karotenoidní barviva tvoří skupinu žlutých, oranžových, červených a fialových pigmentů, které doprovázejí chlorofyly v rostlinách a řasách, také se ale vyskytují i v mikroorganismech a v živočišných organismech, jako je například humr nebo losos. V rostlinách jsou vázána v chloroplastech, ve formě chromoproteinů. Dále se také karotenoidy funkčně účastní fotosyntézy (Gul et al., 2015).

Lidský organismus není schopen biosyntézy karotenoidů, a proto je odkázán na jejich příjem potravou, zejména v zelenině, ovoci a popřípadě v doplňcích stravy (Britten et Khachik, 2009).

Počet objevených karotenoidů se od roku 1948, kdy bylo popsáno přibližně 30 druhů, rapidně zvyšuje (Britton et al., 2008).

4.2.1 Chemická struktura

Karotenoidy se dělí na dvě základní skupiny:

- uhlovodíky nazývané karoteny
- kyslíkaté sloučeniny odvozené od karotenů, které se nazývají xanthofyly (Howitt et Pogson, 2006).

Mezi xanthofyly patří například lutein, zeaxanthin, canthaxanthin a β -cryptoxanthin (Yamaguchi, 2010).

Podle uhlovodíkové struktury molekuly můžeme karotenoidy rozdělit na:

- karotenoidy s acyklickou strukturou (např. lykopen),
- karotenoidy s monocyklickou strukturou (např. γ -karoten, δ -karoten),
- karotenoidy s bicyklickou strukturou (α -karoten, β -karoten, lutein).

Struktura každého karotenoidu určuje jak jeho barvu, tak i jeho fotochemické vlastnosti molekuly. Polyenová struktura karotenoidů jim dodává barevnost (Šivel et al., 2013).

Konjugované dvojně vazby absorbují modrozelené světlo o vlnové délce 400–500 nm, díky čemuž se lidskému oku karotenoidy zdají jako žluté až červené (Svensson et Wong, 2011).

Čím vyšší je počet konjugovaných dvojných vazeb v molekule, tím vyšší je absorpční maximum daného karotenoidu a karotenoid se jeví více červenější (Rodriguez–Amaya, 2001).

Karotenoidy jsou převážně lipofilní látky, které jsou dobře rozpustné v nepolárních organických rozpouštědlech (chloroform, hexan, petrolether), nerozpustné ve vodě a jen omezeně rozpustné v etanolu (Ferruzzi and Mario, 1998).

Karotenoidy patří do skupiny tetraterpenoidů, což jsou sloučeniny tvořené osmi izoprenovými jednotkami. Mají buď acyklický řetězec, nebo řetězec zakončený jedním či dvěma cykly (šestičlenným nebo pětičlenným) (McGray et Hill, 2006)

Dvojně vazby karotenoidů umožňují *cis*- i *trans*-isomerii, většinou mají konfiguraci *all-trans*, protože *cis* konfigurace je termodynamicky nestabilní (Cross et al., 2006; de Klerk et al., 1998; Iwase, 2002; Rodriguez-Amaya et Kimura, 2004).

Teplem nebo světlem mohou být karotenoidy isomerovány. Vaření zeleniny tak působí isomerizaci části karotenoidů z *trans* formy na *cis* formu. Stupeň isomerizace závisí na intenzitě a době trvání tepelného procesu. Některé studie naznačují, že tepelná úprava může zlepšit biologickou dostupnost karotenoidů jako je lykopen (Stahl et Sies, 1992).

Většina karotenoidů obsahuje chirální centra, a proto se mohou vyskytovat v různých stereoisomerních formách. Ve většině rostlin dominuje jeden stereoisomer kvůli stereospecifické biosyntéze. (Stahl et Sies, 2004).

Zajímavostí je, že karotenoidy jsou pojmenovány původním objevitelem podle biologického zdroje, ze kterého byly izolovány, jako karoten, který byl izolován z mrkve (Carrot), zeaxanthin z kukuřice (Zeamays) a lutein ze žluté skvrny v oku (Macula lutea). Obecně platí, že tyto triviální názvy nejsou užitečné při popisu chemické struktury a vlastností karotenoidů. Takže byl navržen systematický název umožňující pojmenování karotenoidů způsobem, který definuje a popisuje jejich strukturu. (Gul et al., 2015).

4.2.2 Biosyntéza

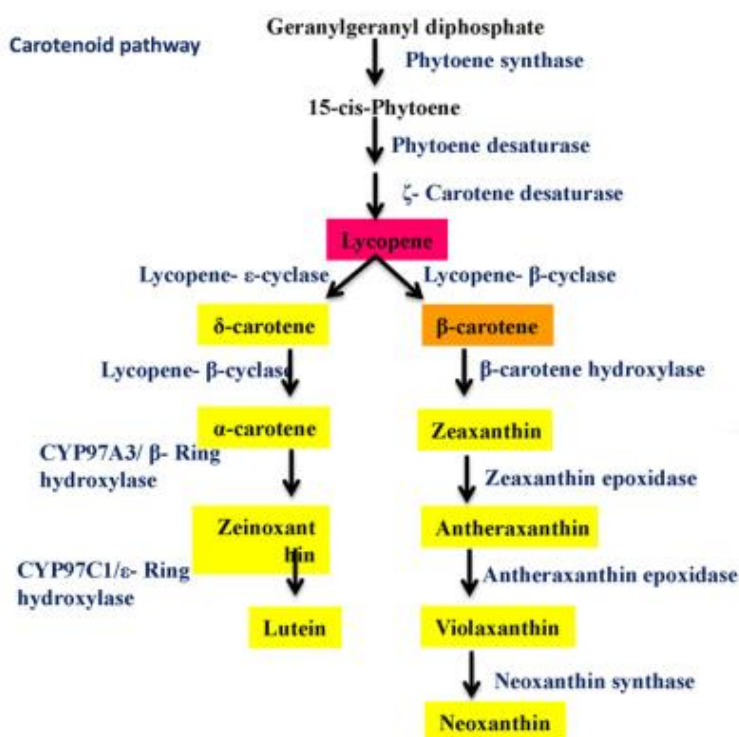
Nejjednodušším prototypem karotenů je acyklický polynenasycený uhlovodík fytoen. Biosyntéza karotenoidů (Obr 9) začíná kondenzací dvou geranylgeranyldifosfátových molekul (GGPP) za vzniku 15-*cis*-fytoenu, při reakci katalyzované enzymem fytoensyntázou (PSY). Desaturací 15-*cis*-fytoenu následně vzniká lykopen (systematický název. ψ,ψ -karoten) (Cazzonelli et Pogson, 2010). Při syntéze lykopenu 15-*cis*-fytoen prochází čtyřmi desaturačními a isomeračními reakcemi, které katalyzují lykopensaturázy (PDS), zeta-karotendesaturázy (ZDS), karotenoidníisomerázy (CRTISO) a zeta-karotenisomerázy (Z-ISO) (Saini et al., 2015).

GGPP také slouží jako prekurzor pro několik dalších metabolitů, jako jsou terpeny, terpenoidy, chlorofyly, ubichinony a tokoferoly (Saini et al., 2015).

Cyklizace je klíčovým bodem v biosyntéze karotenoidů. Alicyklické karoteny vznikají enzymově katalyzovanou cyklizací na jednom nebo na obou koncích acyklických ψ,ψ -karotenů, kdy se tvoří β -jononové nebo α -jononové struktury v karotenech. Cyklizací pouze jedné strany lykopenu a to buď lykopen- ϵ -cyklázou (ϵ -LCY) nebo lykopen- β -cyklázou (β -LCY) vznikne δ -karoten (systematický název: ϵ,ψ -karoten) nebo γ -karoten (systematický název: β,ψ -karoten).

β -karoten (systematický název: β,β -karoten) vznikne cyklizací na obou koncích lykopenu, pomocí β -LCY, která katalyzuje syntézu β -jononových cyklů. β -karoten může být dále hydroxylován za vzniku zeaxanthinu a to působením β -karoten hydroxylázy.

Aby mohl být vytvořen α -karoten (systematický název: β,ϵ -karoten), který vede později ke vzniku luteinu, je nutná přítomnost jak ϵ -LCY tak i β -LCY enzymu. Na každé straně má tedy α -karoten jiný jononový cyklus. Na jedné straně β -jononový a na druhé ϵ -jononový cyklus. Z α -karotenu se působením hydroxylasy syntetizuje zeinoxanthin, který je poté hydroxylován hydroxylázou ϵ -kruhu za vzniku luteinu. Zeaxanthin může být následně epoxidován na antheraxanthin a violaxanthin. Violaxanthin se dále převádí na neoxanthin působením neoxanthinsyntázy.



Obr: 9: Znárodnění biosyntézy (Saini et al., 2015).

Provitaminová aktivita karotenoidů je dána přítomností nesubstituovaného β -iononového kruhu (Send et Sundholm, 2007; Šivel et al., 2013; Saini et al., 2015). Lykopen

proto postrádá aktivitu provitaminu A v důsledku nepřítomnosti β -jononového cyklu. Aktivitu provitaminu A postrádají také i lutein a zeaxanthin, kteří mají β -jononový kruh substituovaný hydroxylovými skupinami

Po biosyntéze se karotenoidy shromažďují ve specializovaných plastidech, chromoplastech, chloroplastech nebo leukoplastech (Saini et al., 2015).

Převládajícími karotenoidy v chromoplastech jsou xanthofyly, které jsou esterifikovány mastnými kyselinami. Esterifikace usnadňuje akumulaci xanthofylů uvnitř chromoplastů. Nedávná studie ukazuje, že většina xanthofylů přítomných v okvětních plátcích rajčat, existuje jako směs volných (neesterifikovaných) a esterifikovaných forem. Více než 85 % xanthofylů v okvětních lístcích žlutých květin je přítomno v esterifikované formě, sestávající z neoxanthinu a violaxanthinu (Ariizumi et al., 2014). Esterifikace zabraňuje jejich degradaci.

Kromě biosyntézy jsou hladiny karotenoidů také modulovány enzymatickými degradacemi v plastidech. Karotenoidy lokalizované v plastidech jsou štěpeny dioxygenázami (CCD). CCD pravděpodobně hrají základní roli v degradaci karotenoidů v rostlinách, jejich aktivitou dochází ke snížení jejich celkového obsahu (Gonzalez-Jorge et al., 2013).

V rostlině jsou identifikovány různé třídy CCD, které katalyzují důležité kroky v biosyntéze apokarotenoidů a mnoho dalších aromatických sloučenin. Karotenoidy štěpené dioxygenázami jsou zdrojem hlavních apokarotenoidů v rostlinách. Tyto sloučeniny hrají zásadní roli v komunikaci a ochraně rostlin, např. přilákání opylovačů, odrazování býložravců a obranu proti patogenům (Walter et al., 2015).

Přístup světla hraje důležitou roli při regulaci obsahu karotenoidů v nadzemních částech rostliny. Změny diferenciací plastidů, které jsou závislé na světle, také ovlivňují akumulaci karotenoidů v rostlinách (Fuentes et al., 2012).

Biosyntéza karotenoidů v rostlinách byla rozsáhle studována kvůli jejich významu ve výživě zvířat a přežití rostlin. Procesy biosyntézy karotenoidů, regulace a role různých karotenoidních derivátů v rostlinách a zvířatech ještě nejsou zcela pochopeny a prozkoumány. Podrobné zkoumání biochemického procesu vedoucího k esterifikaci karotenoidů může pomoci pochopit nejen degradaci, ale hlavně i procesy při zpracování a skladování karotenoidů (Su et al., 2015).

Správné pochopení biochemické cesty, která vede k esterifikaci xanthofylů, je rozhodující pro realizaci strategií zvýšení obsahu karotenoidů v plodinách (Mellado-Ortega et Hornero-Méndez, 2012).

4.2.3 Role karotenoidů v rostlinách

Ve fotosyntéze hrají tyto pigmenty hned několik rolí. Úloha karotenoidů ve fotosyntéze je silně závislá na jejich umístění v buňce a orientaci vůči ostatním komponentám pigment–proteinových komplexů fotosyntetických membrán, zvláště pak vůči chlorofylu. Při jakémkoliv přenosu energie je důležitá zejména malá vzdálenost molekuly karotenoidu od molekuly chlorofylu (Van der Waalsův kontakt).

V současnosti odborníci rozlišují pět hlavních úloh karotenoidů ve fotosyntéze:

- 1) světlo–sběrná funkce – přenos energie mezi singletními stavy karotenoidů a chlorofylů (s dalšími pigmenty se podílejí na zachycení fotonů a následném přenosu excitační energie do reakčního centra).
- 2) Fotoochrana – zhášení chlorofylových tripletních stavů
- 3) likvidace singletního kyslíku (jejich nejvýznamnější funkce je ochrana fotosyntetického aparátu před vysoce reaktivním singletním kyslíkem, a to jeho přímým zhášením nebo zhášením tripletních stavů chlorofylů. Nebýt karotenoidů fungujících tímto způsobem, fotosyntéza v aerobním prostředí by nebyla vůbec možná).
- 4) disipace přebytečné absorbované energie (v rámci tzv. xanthofylového cyklu se podílejí na regulaci množství energie, která byla přijata do reakčního centra při nadměrném ozáření).
- 5) stabilizace struktury (pomáhají udržovat strukturní celistvost a pevnost vnějších i vnitřních světlo – sběrných antén) (Avendaño-Vázquez et al., 2014; Joyard et al., 2009; Nisar et al., 2015; Welsch et al., 2000).

Vedle esenciální funkce fotoprotektantů a antioxidantů se karotenoidy chovají jako “senzory” při oxidačním stresu a jako signály oxidace radikálním kyslíkem (Havaux, 2014; Ramel et al., 2012; Shumbe et al., 2014).

4.2.4 Výskyt

Karotenoidy jsou přítomny v celé řadě potravin, od plísní, hub, ovoce, zeleniny až k vajíčkům, tukům, olejům a rybám. Vyskytují se jak volné, tak i jako estery mastných kyselin nebo v komplexech s proteiny či sacharidy (Murray et al., 2003).

Přibližně 40 karotenoidů se vyskytuje v typické racionální lidské stravě a cca 20 je jich přítomno v měřitelném množství v tkáních a krvi. V největších koncentracích se v krvi

nacházejí: β -karoten, lykopen, α -karoten, lutein, zeaxanthin a β -kryptoxanthin (Cooper et al., 1999).

Listy všech zelených rostlin obsahují též hlavní karotenoidy: β -karoten, α -karoten, lutein, violaxanthin a neoxanthin. Zeaxanthin a kryptoxanthin jsou minoritní složky takzvané xantofylové frakce (Ferruzzi et al., 1998). Ve většině ovoci a zelenině obecně dominuje β -karoten ve srovnání s jeho geometrickým isomerem α -karotenem. Významný vysoký obsah α -karotenu se nachází v omezeném množství ovoce a zeleniny, jako jsou sladké brambory, mrkev, dýně a tmavě zelená zelenina, jako jsou zelené fazole, špenát a brokolice (Khoo et al., 2011).

Karotenoidy se vyskytují ve všech fotosyntetizujících rostlinných pletivech, kde jsou přítomny jako složky chromoplastů ve formě chromoproteinů. Často je doprovázejí další barviva, u broskví, meruněk a netradiční pšenice jsou to např. anthokyany. Přítomnost karotenoidů v zelených částech rostlin bývá maskována chlorofylem (Ferruzzi et al., 1998; Šivel et al., 2013).

Více než 90 % rostlinných karotenoidů je obsaženo v buňkách listů, obvykle jako směs 20–40 % karotenů a 60–80 % jejich oxidačních produktů. Lutein (téměř 45 %) a β -karoten (25–30%), následovány violaxanthinem (10–15%) a neoxanthinem (10–15%) jsou převládajícími formami karotenoidů v zelené listové zelenině (Lakshminarayana et al., 2005; Priyadarshani et Jansz, 2014).

Přesto, že obilné zrno má poměrně nízký obsah karotenoidů ve srovnání s většinou ovoce a zeleniny, vysoký denní příjem obilovin a výrobků z obilovin činí tyto základní potraviny nezanedbatelným a cenově dostupným zdrojem karotenoidů a jiných fytochemikálií (Graham a Rosser, 2000), stávají se ideálními prostředky pro použití v biofortifikačních a nutričních strategiích (Farré Martinez et al., 2011).

Obsah a typy karotenoidů v rostlinách závisí na mnoha faktorech před a po sklizni době zrání, druhu a odrůdě rostliny, sezóně, kultivační metodě, klimatických podmínkách a zpracování. Různé části téže rostliny mohou také obsahovat různé typy a množství karotenoidů. Například kůra plodů je obecně bohatší na karotenoidy ve srovnání s dužinou. Metody balení a zpracování produktů také značně ovlivňují obsah karotenoidů ve zpracovaných potravinách (De Moura et al., 2015).

U živočichů jsou karotenoidy přítomné hlavně v povrchových tkáních (kůže, krovky, šupiny, peří, zobáky), ale také jsou přítomné ve žloutku ptačích vajec, a nebo jako zrakové pigmenty (Velíšek, 1999).

Rostliny a mikroorganismy jsou schopny syntetizovat karotenoidy samy, živočichové je musí získávat od primárních producentů a pouze je přeměňují na látky odlišné struktury nebo je skladují jako takové v tukové tkáni (Koolman et al., 2005; Velíšek, 1999).

Degradační produkty karotenoidů jsou zodpovědné za vůni a chuť potravin (hlavně ovoce a zeleniny) a vůni mnoha květin. Vyskytují se jako složky vonných látek malin, borůvek, ostružin, meruněk, manga, banánů, višní, švestek, rajčat, papriky, mrkve, petržele a mnoha jiných druhů ovoce a zeleniny, ale také zeleného a černého čaje a tabáku (Šivel et al., 2013).

Ovoce a zelenina jsou obecně považovány za hlavní zdroj karotenoidů ze stravy, avšak některé obiloviny, jako pšenice tvrdá a původní druhy pšenice (např. jednozrnka a kamut), obsahují poměrně vysoké množství karotenoidů, zejména luteinu a zeaxanthinu (Abdel–Aal et al., 2007).

4.2.5 Použití karotenoidů

Karotenoidy nacházejí využití jako potravinářská barviva, buď přímo přidávaná, nebo nepřímo jako součást potravy zvířat. Komerčně je řadíme do dvou typů: „přírodní nebo přírodně identická syntetická barviva (Caballero et al., 2003). V množství zpravidla 1–10 mg.kg⁻¹ jsou karotenoidy používány k barvení mnoha potravin, např. margarínů, sýrů, jogurtů, mouky, zmrzlin, ovocných džusů, dressingů, těstovin, cukrářských výrobků a dalších (Velíšek, 1999).

Karotenoidy se přidávají do krmiva dojníc a drůbeže pro zajištění žádoucí pigmentace mléka, mléčných výrobků, vajec a masa.

Karotenoidní pigmenty jsou hojně využívány také ve farmaceutickém průmyslu především jako doplňky stravy. Pro své antioxidační vlastnosti se používají také jako antikarcinogenní látky. β -Karoten a ostatní prekurzory vitamínu A slouží lidem, kteří nemají dostatečný přísun těchto látek v potravě, jako doplněk stravy.

Některé karotenoidní pigmenty jsou jako čerstvé nebo sušené části rostlin nebo extrakty používány k barvení potravin velmi dlouho např. mrkev, slupky pomerančů, rajčat, šafrán, a paprika (Britton et al, 2009).

Hlavní výhody karotenoidů jako potravinářských barviv jsou:

- přírodní původ
- vysoká barvicí schopnost
- nemající vliv na kvalitativní vlastnosti

- nekoroziivnost (nemají rozkládající vlastnosti)
- dobrá stabilita v širokém záběru pH u většiny potravinářských produktů
- přítomnost a aktivita karotenoidů jako provitaminu A
- další výhodné vlastnosti pro lidské zdraví.

Jejich nevýhody jsou:

- omezené rozmezí barev
- vyšší cena v porovnání se syntetickými barvivy
- citlivost na rozklad oxidací
- problémy s rozpustností (Caballero et al., 2003).

4.2.6 Stabilita Karotenoidů

Karotenoidy nejsou příliš stabilní látky. Účinkem enzymů, světla, tepla a kyslíku dochází k isomeraci, tvorbě epoxyderivátů, oxidaci nebo dokonce až degradaci těchto pigmentů. Většina xanthofylů je náchylnější k těmto vlivům a snadněji degradují než karoteny (Eder, 2000; Koolman et al., 2005).

V kyselém prostředí podléhají karotenoidy isomeraci. Při zahřívání kyselých roztoků dochází mezi jednotlivými karotenoidy k ustavení rovnováhy, která je dána různým typem karotenoidu, hodnotou pH, teplotou a dobou působení vyšší teploty. Stabilita karotenoidních barviv v rostlinných pletivech se liší během technologických operací podle typu přítomných karotenoidů. Ve většině případů se změny karotenoidních barviv posuzují z celkového poklesu obsahu pigmentů (Ferruzzi et al., 1998).

Oxidace karotenoidů probíhá za přítomnosti kyslíku, za nepřístupu kyslíku jsou karotenoidy velmi stálé. Oxidace je urychlována ionty Cu^{2+} , při této reakci vzniká aceton, methylheptenon, kyselina levulová a glyoxal. Oxidací β -karotenu vzniká acetaldehyd, 2-methylpropanol, 1-butanol, biacetyl a 1-pentanol (Ferruzzi et al., 1998)

Rozsah degradačních reakcí karotenoidních látek v konzervovaném ovoci a zelenině je zpravidla malý, záleží na druhu a skladovacích teplotách. Ztráty 20–30 % (u mrkve až 50 %) byly pozorovány u sušené zeleniny skladované na vzduchu v důsledku oxidace. Tyto ztráty byly minimalizovány při skladování za vakua nebo v inertním plynu, za nižší teploty a bez přístupu světla. K rozsáhlým ztrátám karotenoidů dochází také při výrobě ovocných vín a destilátů. Degradací karotenoidů vzniká také řada produktů, které jsou významnou složkou aroma (vůně) mnoha potravin (Meyers, 2001; Koolman and Rohm, 2004).

Je známo, že karotenoidy v různých potravinářských matricích jsou při skladování vysoce degradovány kyslíkem, teplotou a světlem (De Moura et al., 2015; Rodriguez-Amaya et Kimura, 2004). Přirozené retinoly, jako je β -karoten v potravinách rostlinného původu, estery retinolu v potravinách živočišného původu, jsou látky relativně stabilní za nepřítomnosti vzduchu (kyslíku). Za vyšších teplot a na světle (např. při konzervování potravin) však mohou isomerovat na tzv. neokaroteny .

Bez ohledu na tepelné (tepelné sušení) nebo netepelné (např. vysokotlaké, impulsní elektrické pole, ultrazvukové sušení) může zpracování významně snížit hladinu karotenoidů v potravinářských produktech. Stabilita v dehydrované (sušené) a práškové podobě je u ovoce a zeleniny obecně horší, pokud nejsou produkty šetrně zpracovány a uskladněny v inertní atmosféře a v obalech zamezujících přístupu vzduchu a světla. U většiny zeleniny způsobilo sušení 10–20% ztráty karotenoidů (Saini et al., 2014).

Značná část karotenoidů může být odstraněna mletím a drcením semen. Časová prodleva mezi loupáním a mletím se během zpracování až po balení musí zkrátit na minimum, aby se předešlo enzymatické oxidaci karotenoidů, která může být větším problémem než tepelný rozklad (Caballero et al., 2003).

4.2.7 Metabolismus a účinky karotenoidů na lidský organismus

Metabolismus karotenoidů zahrnuje všechny jejich chemické přeměny, transport po organismu a působení na buňku.

Kromě role provitaminu A (obr 10) se karotenoidy účastní dalších procesů v organismu jako antioxidanty, regulátory buněčné proliferace a diferenciace, modulátory imunitních reakcí a metabolismu karcinogenů, stimulanty komunikace mezi buňkami a jako filtry UV záření. Příjem karotenoidů snižuje riziko kardiovaskulárních onemocnění (ischemická choroba srdeční, městnavé srdeční selhání, ateroskleróza, diabetická kardiomyopatie aj.) a některých nádorových onemocnění (rakovina tlustého střeva) (Murray et al., 2003)

Vstřebatelnost uvolněných karotenoidů (přirozeně vázaných v chloroplastech nebo chromoplastech) z potravinové matrice je v trávicím traktu člověka obecně relativně nízká (Rěblová, 2011). Dostupnost a metabolismus jsou ovlivněny několika faktory, včetně vlastností potravinové matrice, způsobu přípravy jídla, podáváním tuku a vlákniny, chorobami trávicího traktu, množstvím vitamínu A v těle, nebo mírou podvýživy. Existují důkazy, že různé enzymy zaměřené na různá místa štěpení jsou schopny metabolizovat karotenoidy na apokarotenoidy a retinoly (Von Lintig et Vogt, 2000; Wyss, 2004).

Vstřebaný β -karoten je oxidativně štěpen β -karoten-15,15'-monooxygenasou. Vznikají dvě molekuly retinalu. Ve střevní sliznici je redukován retinaldehydreduktasou a NADPH na retinol, který je esterifikován. Estery retinolu jsou ze střeva transportovány v chylomikronech (VLD lipoproteiny) přes lymfatický systém do krevního oběhu, kde jsou vychytávány játry. V játrech je vitamin A ukládán do zásoby jako ester v lipocytech (Hlúbik et Opltová, 2004).

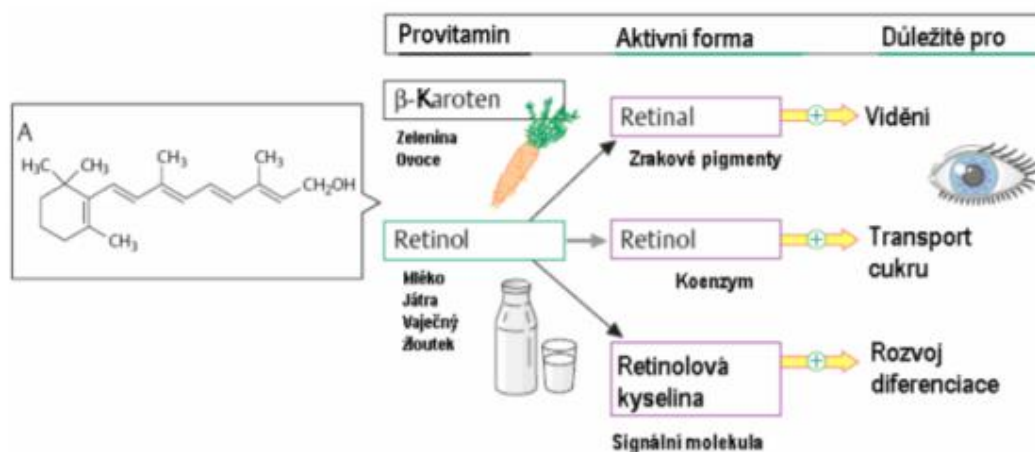
Vyšší denní dávky karotenoidů než doporučené, získané ať už z potravy nebo z doplňků stravy, mohou oranžově zbarvit kůži, zvláště na dlaních a chodidlech. Tento příznak je neškodný a postupně vymizí, snížíme-li denní dávky karotenoidů (Jordán et Hemzalová, 2001).

U živočichů, ale i u ptáků a ryb, jsou provitaminy A (karotenoidy obsahující alespoň jeden nesubstituovaný β -jononový cyklus) transformovány na all-*trans*-retinal neboli retinaldehyd. Z β -karotenu vznikají dvě molekuly retinalu, ostatní provitaminy A poskytují pouze jednu molekulu retinalu. Retinal je reverzibilně redukován retinoldehydrogenasou na all-*trans*-retinol, který je nejvýznamnějším biologicky aktivním apokarotenoidem živočišných tkání. Retinol je významný v biochemii zrakového vjemu. Biochemie vidění je složitý proces. V tomto procesu isomeruje all-*trans*-retinol na 11-*cis*-retinol a ten je enzymově oxidován na příslušný aldehyd, 11-*cis*-retinal, který se specificky váže na zrakový protein opsin, čímž dojde k vytvoření rhodopsinu. Vzniklý komplex je vizuálním pigmentem (fotoreceptorem), který zahajuje kaskádu, jež světlo (fotony) dopadající na sítnici oka převádí na elektrický impuls čili nervový signál. Pohlcením fotonu ze světla se rhodopsin štěpí na opsin a all-*trans*-retinal, který je nezbytný pro udržování této cyklické reakce (Šivel et al., 2013).

Teoreticky je možné získat z jedné molekuly β -karotenu dvě molekuly vitamínu A, prakticky je to jinak: 6 μg β -karotenu je ekvivalentní 1 μg retinolu (vitamínu A) (Hoza et al., 2006; Murray et al., 2003).

Odhaduje se, že karotenoidy obsažené v séru jsou asi 1 % z celkem se vyskytujících karotenoidů u člověka. Tuková tkáň (80–85 %) a játra (8–12 %) jsou hlavními místy, kde se karotenoidy v lidském organismu vyskytují (Britton et al, 2004).

Skupina karotenoidů má vysokou schopnost vychytávat volné kyslíkové radikály. Například β -karoten dokáže inhibovat oxidaci cholesterolu a tím redukovat riziko vzniku onemocnění srdce a cév a ochraňovat před poškozením volnými radikály. Určité karotenoidy neutralizují toxické formy volného kyslíku, které se často vyskytují v cigaretovém kouři, znečištěném ovzduší, UV záření a ozonu (Stranský et Kohout, 2015)



Obr.10: Funkce karotenu jako provitaminu A (Koolman and Rohm, 2004).

Ačkoliv je β -karoten dobrý neutralizátor těchto toxických molekul, studie prokázaly, že lykopen, γ -karoten a α -karoten jsou značně silnější než β -karoten. Byly pozorovány inhibiční účinky na růst leukemických buněk, když byl lykopen aplikován v kombinaci s vitamínem D3 a zároveň byla pozorována inhibice růstu lidského karcinomu prostaty při podání lykopenu v kombinaci s tokoferoly (Stahl et Sies, 2005).

Karotenoidy lutein a zeaxanthin jsou silnými antioxidanty uvnitř oční tkáně a jejich vysoký příjem chrání oči před degenerací žluté skvrny (makulární degenerace sítnice).

I pro konzumaci vitaminů platí: všeho s mírou. Tělo potřebuje vitaminy v nepatrném množství a doporučenou denní dávku (DDD) stanovuje Světová zdravotnická organizace (WHO) a národní ústavy zdraví. DDD je průměrné množství jednotlivého vitamínu nebo minerálu, které postačuje potřebám zdravých osob při běžném způsobu normální stravy. U nás je pro určování DDD směrodatná vyhláška číslo 450/2004 Sb. (Strunecká, 2013).

Doporučená denní dávka karotenů není nijak stanovena, běžně se ale udává doporučení ve výši 2 až 4 mg.den⁻¹ (Hoza et al., 2006).

Karotenoidy se v potravě nikdy nenacházejí jednotlivě, vždy je společně více karotenoidů a ochranných složek. Ochrana buněk, která byla prezentována různými studiemi, byla dána synergickým efektem karotenoidů a dalších antioxidantů nalézajících se v potravě. Nicméně testy *in vitro* a na zvířatech prokázaly ochranný účinek jednotlivých karotenoidů. Několik málo *in vivo* studií na lidech, zahrnujících suplementaci syntetickým β -karotenem, neprokázalo ochranný efekt diety s vysokým obsahem karotenoidů na buňky. Bylo to díky tomu, že byl používán syntetický β -karoten.

Vysoký příjem karotenoidů je silně spojen se zmírněním rizika infekce. Například β -karoten ochraňuje největší žlázu imunitního systému – brzlík – před působením volných radikálů a jeho suplementace také značně povzbuzuje aktivitu bílých krvinek (Szpylka et DeVries, 2005).

Vyšší příjem karotenoidů, speciálně β -karotenu a luteinu může pomoci oddálit nebo dokonce zamezit počátku onemocnění ALS (Amiotrofická laterální skleróza), říkají američtí vědci publikující v „Annals of neurology“. ALS je formou poškození nervové soustavy známou jako Lou Gehringova choroba. Harvardská studie použila data od jednoho milionu lidí, kteří se účastnili pěti studií. Tímto výzkumem bylo zjištěno, že zvýšení celkového příjmu karotenoidů je přímo úměrné snížení výskytu ALS, speciálně u diet s vysokým obsahem β -karotenu a luteinu (Fitzgerald et al., 2013).

Pouze 10 % v přírodě se vyskytujících karotenoidů spadá do kategorie provitaminu A tzn., že mohou být v těle přeměněny na vitamín A. Produkce vitamínu A z karotenoidů vyžaduje adekvátní hladinu hormonů štítné žlázy, proteiny, zinek a vitamín C. Za předpokladu, že tato přeměna probíhá efektivně, jsou karotenoidy dobrým zdrojem vitamínu A bez rizika jeho předávkování (Ferruzzi et al., 1998). Odhaduje se, že karotenoidy z ovoce a zeleniny poskytují více než 70 % vitamínu A. Závisí to však na stravovacích návycích a dostupných zdrojích potravin (Sies et Stahl, 2004).

Karotenoidy s provitamin A aktivitou:

- β -karoten – 100 % aktivity vitamínu A
- kryptoxanthin – 50–60 % aktivity vitamínu A
- α -karoten – 50–54 % aktivity vitamínu A
- γ -karoten – 42–50 % aktivity vitamínu A

Karotenoidy, které nejsou provitaminem A: lykopen, zeaxanthin, lutein (Haskell, 2013)

Několik studií na lidech ukázalo, že hladiny karotenoidů v plazmě a v kůži se při vystavení UV zářením snižují. Lykopen je nejvíce snížen ve srovnání s jinými karotenoidy (Stahl et Sies, 2005).

4.2.8 Lutein

Sumární vzorec: $C_{40}H_{56}O_2$

Mr: 568, 88 $g \cdot mol^{-1}$

Teplota tání: 190 °C

CAS: 127–40–2

Lutein je přirozeně se vyskytující karotenoid v rostlinách. Je to endogenní rostlinný pigment, který se nachází v plastidových membránách. Dále je také důležitou mikroživinou pro člověka (Ahmad et al., 2015).

Lutein je žluté rostlinné barvivo. Vyskytuje se ve vaječném žloutku, v ovoci a zelenině, zejména v té listové, ale také v očních a tkáních. Lutein a zeaxanthin jsou karotenoidy, které sice nefungují jako provitamin A, ale hrají významnou roli při podpoře a ochraně zdraví očí a pokožky, protože dokážou neutralizovat volné radikály, které vznikají působením UV paprsků. Přispívají k ochraně před rakovinou a kardiovaskulárních onemocnění. Dále také při snižování rizika makulární degenerace související s věkem a šedého zákalu (Michaud et al., 2000; O'Neill et al., 2001).

V rostlinných materiálech se lutein vyskytuje ve dvou formách:

- ve formě volného luteinu – nejvíce v listové zelenině, např. špenátu, kapustě, brokolici;
- ve formě esterů mastných kyselin – v ovoci (např. mango, pomeranč či papája) v zelenině (červená a zelená paprika, kukuřice) (Ligor et Buszewski, 2012; Šivel et al., 2013).

V lidském organismu je jeho podíl na celkové koncentraci cirkulujících karotenoidů značný (lykopen 20–40 %, β -karoten 15–30 % a lutein 10–20 %). Lykopen a β -karoten převládají v krevním séru, zatímco lutein převládá v erythrocytech. Průměrná koncentrace luteinu v krevním séru člověka je $0,36 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ($0,20 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) (Šivel et al., 2013).

Mnoho vědeckých studií se zabývalo antioxidační aktivitou luteinu v modelových systémech, ale většina z nich nemůže být použita k porovnání antioxidačního účinku luteinu, získaného z přírodních zdrojů (z potravy), na lidské zdraví (Calvo, 2005).

Rostlinné materiály obsahují *all-trans*-isomer luteinu, ale byly detekovány i *cis* isomery luteinu, které vznikají působením světla, teploty a dalších faktorů během extrakce a analýzy vzorků (Calvo, 2005). Lutein doprovází hlavně 9-*cis*- a 9'-*cis*-, 13-*cis*- a 13'-*cis*-isomery a méně 15-*cis* a 15'-*cis*-isomerů. (Velíšek et Cejpek, 2008).

Karotenoidy a především lutein jsou hlavním zdrojem žluté barvy pšenice a dalších příbuzných obilovin. Lutein je hlavní karotenoid přítomný v pšenici (Ficco et al., 2014; Rodríguez-Suárez et al., 2010).

Studie provedená autory Abdel-Aal et al. (2002) ukázala, že lutein je převládající karotenoid u pšenice a tvoří 80 až 90% všech karotenoidů s malým množstvím zeaxanthinu, β -karotenu a estery luteinu.

Různé druhy pšenice (zahrnujících pšenici tvrdou neboli semolinu, jednozrnku a Kamut) byly identifikovány jako slibné suroviny pro vývoj funkčních potravin s vysokým obsahem luteinu. Zmíněné druhy obsahují relativně vyšší hladiny tohoto karotenoidu ve srovnání s druhy špaldy a pšenice měkké (Abdel–Aal et al., 2010).

Ve zralých zrnech pšenice je lutein přítomen primárně jako volný. Je tedy náchylný k oxidativní degradaci a lipoxidaci (oxidaci lipidů) během skladování a zpracování (Leenhardt et al., 2006).

Během posklizňového skladování může být lutein přeměněn na estery mastných kyselin, které se zdají být stabilnější než volný lutein (Ahmad et al., 2013).

Luteinové mono– a di– estery mohou tvořit vysoké podíly luteinu v endospermu, oplodí a osemení ne však v klíčku pšenice (Ahmad et al., 2015).

Vysoké teploty při dozrávání zrna má za následek nižší celkový obsah karotenoidů a volného luteinu. Estery luteinu však nevykazovaly významné rozdíly, z čehož vyplývá jejich vyšší stabilita oproti volnému luteinu (Mattera et al., 2017).

4.3 HPLC–DAD

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je jednou z nejčastěji využívaných metod pro stanovení karotenoidů. Tato metoda odděluje složky vzorku na základě jejich průchodu dvěma odlišnými fázemi: mobilní a stacionární fází. Mobilní fází je zde kapalina (metanol, hexan, atd.), která je do systému vháněna pomocí vysokotlakých čerpadel. Stacionární fáze je tvořena buď tuhým látkou, nebo kapalinou ukotvenou na tuhém nosiči a je umístěna ve formě sorbentu v chromatografické koloně (nejčastěji na bázi silikagelu). Při separaci látek využíváme 2 typy eluce: isokratickou (jedna mobilní fáze, jejíž složení se během procesu nemění) gradientovou (v průběhu separace je pomocí směšovače přidáváno rostoucí množství jedné mobilní fáze s větším elučním účinkem k druhé). Separace a následná eluce látek je ovlivněna nejen charakterem obou fází, ale i kvalitou sorbentu. Mezi faktory ovlivňující separaci hraje také významnou roli tlak. HPLC je flexibilní, automatizovaná, přesná a vysoce reprodukovatelná. K detekci látek můžeme využít optické, elektrochemické nebo fotometrické detektory (např. fluorimetrický detektor, refraktometrický detektor nebo hmotnostní spektrometr). Detektory používané při HPLC musí splňovat určité požadavky jako je: vysoká citlivost, univerzálnost, nezávislost odezvy na změně složení mobilní fáze při gradientové eluci, reprodukovatelnost a linearita odezvy. V praktické části této práce byl použit detektor diodového pole (DAD) (Nováková, 2013, Nováková et Douša, 2013).

5 Praktická část

Praktická část této diplomové práce je zaměřená na stanovení obsahu karotenoidů v pšenicích se standardním a netradičním zbarvením zrna. Karotenoidy byly ve vzorcích stanoveny pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s detektorem diodového pole (HPLC-DAD)

5.1 Rostlinný materiál

Do pokusu bylo zařazeno 8 genotypů pšenice (UC 66049, Konini, KM 131-15, Annie, Bohemia, Citrus, AF Jumiko, Bona Vita). Charakteristika jednotlivých genotypů je uvedena v tabulce č. 4. Vzorky byly poskytnuty od Výzkumného institutu Agritestfyto s.r.o. v Kroměříži.

Tab. 4: Popis genotypů pšenice

Odrůda	Typ	Země původu	Status odrůdy	Barva zrna	
UC 66049	<i>Triticum aestivum L.</i>	Jarní	USA	Genetický zdroj	Modrý aleuron
Konini	<i>Triticum aestivum L.</i>	Jarní	NZL	Uznaná odrůda	Purpurový perikarp
V1 131-15	<i>Triticum aestivum L.</i>	Ozimá	CZE	Šlechtitelská linie	Modrý aleuron
Annie	<i>Triticum aestivum L.</i>	Ozimá	CZE	Uznaná odrůda	Standardní
Bohemia	<i>Triticum aestivum L.</i>	Ozimá	CZE	Uznaná odrůda	Standardní
Citrus	<i>Triticum aestivum L.</i>	Ozimá	GER	Uznaná odrůda	Žlutý endosperm
AF Jumiko	<i>Triticum aestivum L.</i>	Ozimá	CZE	Uznaná odrůda	Purpurový perikarp
Bona Vita	<i>Triticum aestivum L.</i>	Ozimá	SVK	Uznaná odrůda	Žlutý endosperm

5.2 Stanoviště a podmínky pěstování

Všechny odrůdy pšenic byly sklizeny v letech 2015 a 2016 v zemědělském výzkumném institutu (Agrotestfyto s.r.o.) v Kroměříži.

Tabulky 5a 6 ukazují přesné klimatické podmínky během dvou vegetačních období. Rostliny byly pěstovány na malých experimentálních plochách (10 m²) podle zásad běžné agrotechniky.

Po sklizni byly vzorky uloženy v papírových sáčkích v krabici v tmě při pokojové teplotě (25 °C) po dobu 2 měsíců před analýzou.

Charakteristika stanoviště:

- poloha: GPS 49.2851172 N, 17.3646269E,
- nadmořská výška: 235m
- půdní typ: černozem hnědozemní
- výrobní oblast: řepařská
- dlouhodobá průměrná roční teplota: 8,7 °C

Tab. 5: Přehled průměrných teplot vzduchu v měsících pěstování vzorků (°C)

Měsíc	Rok 2014/15			Rok 2015/16		
	Průměrná teplota (°C)	Odchylka od dlouhod. průměru (°C)	Charakteristika měsíce	Průměrná teplota (°C)	Odchylka od dlouhod. průměru (°C)	Charakteristika měsíce
Září	15,7	1,4	teplý	15,6	1,3	teplý
Říjen	10,9	1,6	teplý	9,1	0,2	normální
Listopad	7,5	3,5	silně teplý	6,5	2,5	silně teplý
Prosinec	2,2	2,1	silně teplý	3,1	3,0	silně teplý
Leden	1,7	3,0	silně teplý	-1,1	0,2	normální
Únor	1,3	0,9	normální	4,9	4,5	mimořádně teplý
Březen	9,7	1,2	teplý	5,2	0,9	normální
Duben	9,7	0,3	normální	9,6	0,2	normální
Květen	13,9	-0,6	studený	16,9	0,4	normální
Červen	18,1	0,8	normální	19,3	2,0	teplý
Červenec	22,1	2,4	silně teplý	20,6	1,4	teplý
Srpen	23,1	4,3	mimořádně teplý	22,0	1,2	normální

Tab. 6: Suma srážek v měsících pěstování vzorků (mm)

Měsíc	Rok 2014/15			Rok 2015/16		
	Suma srážek (mm)	Procenta k průměrnému dlouhodobému úhrnu (%)	Charakteristika měsíce	Suma srážek (mm)	Procenta k průměrnému dlouhodobému úhrnu (%)	Charakteristika měsíce
Září	119,9	221	mimořádně vlhký	22,6	42	suchý
Říjen	42,0	109	vlhký	24,6	64	normální
Listopad	27,8	70	normální	31,1	78	normální
Prosinec	35,7	107	vlhký	13,7	41	suchý
Leden	41,7	167	vlhký	21,8	88	normální
Únor	18,9	71	normální	69,9	263	mimořádně vlhký
Březen	39,6	121	vlhký	21,8	66	normální
Duben	13,6	33	suchý	73,8	181	silně vlhký
Květen	41,9	63	suchý	39,1	59	suchý
Červen	47,0	58	suchý	51,4	64	suchý
Červenec	42,0	57	suchý	123,0	167	vlhký
Srpen	65,1	99	normální	25,8	58	normální

5.3 Příprava vzorku

Pro přípravu reprezentativního vzorku bylo z každého papírového sáčku odebráno větší množství čerstvých zrn. Zrna byla před extrakcí homogenizována pomocí mlýnku IKA.

5.4 Stanovení sušiny

Procento sušiny bylo stanoveno z rozdílu hmotnosti čerstvého a usušeného vzorku. Sušina byla stanovena sušením 10 g namletých zrn při teplotě 105 °C po dobu 24h do konstantní hodnoty.

5.5 Použité chemikálie

5.5.1 Standardy

- antheraxanthin (HPLC, 95%, CaroteNature, GmbH, Lupsingen, Švýcarsko)

- lutein (UV, $\geq 95\%$, $\geq 98\%$, Extrasynthese, Genay, Francie)
- zeaxanthin (UV, $\geq 95\%$, $\geq 98\%$, Extrasynthese, Genay, Francie)
- β -karoten (HPLC, $\geq 95\%$, Sigma–Aldrich, St. Louis, USA)
- α -karoten (HPLC, 95%, 97%, CaroteNature, GmbH, Münsingen, Švýcarsko)

5.5.2 Chemikálie

- ethanol (absolutní, Ph.Eur., Sigma–Aldrich, St. Louis, USA)
- butylovanýhydroxytoulén (BHT, Ph.Eur., Sigma–Aldrich, St. Louis, USA)
- *tert*-butylmethyl ether (HPLC grade, Sigma–Aldrich, St. Louis, USA)
- methanol (HPLC grade, Lachner Ltd., Neratovice, Česká republika)
- aceton (p.a., Lachner Ltd., Neratovice, Česká republika)
- ethanol (p.a., Lachner Ltd., Neratovice, Česká republika)
- hexan (p.a., Lachner Ltd., Neratovice, Česká republika)
- ultra čistá HPLC voda byla připravena pomocí Simplicity UV (MerckMillipore, KGaA, Darmstadt, Německo).

5.6 Použité pomůcky a přístroje

5.6.1 Pomůcky

- plastové uzavíratelné kyvety
- kovové lžičky
- skleněné pipety
- automatické pipety
- plastové injekční stříkačky
- membránové mikrofiltry
- laboratorní sklo (odměrné válce, kádinky, skleněné vialky, odparné baňky)

5.6.2 Přístroje

- sušárna (Venticell 111, BMT, Medical Technology, Brno, Česká republika)
- laboratorní mlýnek (A 11basic, IKA, Staufen, Německo)

- analytické váhy s přesností na 3 a 4 desetinná místa (Kern&SohnGmbH, Německo)
- vortex (Basic 3, IKA, KG, Staufen, Německo)
- přístroj na přípravu deionizované vody (Simplicity UV, EMD, Millipore)
- ultrazvuková lázeň (PS 04, Powersonic–Notus, Vráble, Slovensko)
- laboratorní centrifuga (5810R, Eppendorf, Hamburg, Německo)
- vakuová rotační odparka (Rotavapor R–200, BüchiLabortechnik, AG, Flawil, Švýcarsko)
- třepačka GFL 3006 (Burgwedel, Germany)
- kapalinový chromatogram Ultimate 3000 (HPLC): (ThermoFisherScientific, Waltham, MA, USA) (vysokotlaká kvartérní pumpa Ultimate 3000; autosampler Ultimate 3000; detektor diodového pole (DAD) Ultimate 3000; termostat kolon Ultimate 3000)

5.7 Vlastní stanovení karotenoidů

5.7.1 Extrakce

5.7.1.1 Volné karotenoidy

Do plastových uzavíratelných kyvet bylo naváženo na analytických váhách 2,0 g homogenizovaného vzorku obilných zrn. K naváženému vzorku bylo přidáno 12 ml extrakční směsi ethanol:aceton:hexan v objemovém poměru 1:1:2. Plastové uzavíratelné kyvety se vzorky byly řádně uzavřeny a na 24 hodin byly umístěny do lednice při 4 °C. Po denní extrakci byly vzorky promíchány na vortexu a poté byly na 10 min vloženy do ultrazvukové lázně k podpoře homogenizace a rozpustnosti částic. Následovalo odstředění vzorků po dobu 10 min při 8228 rcf. 9 ml supernatantu bylo převedeno do 50ml odparných baněk. Ke zbylému sedimentu bylo přidáno dalších 12 ml extrakční směsi a celý postup extrakce byl proveden ještě jednou. Spojené extrakty (18 ml) byly odpařeny do sucha při 40 °C na vakuové rotační odparce, residuum obsahující karotenoidy bylo rekonstituováno do 2 ml směsi ethanol:aceton (3:2) s přísávkem 0,2% BHT. Vzorky byly následně přefiltrovány přes 0,45 µm PVDF membránový mikrofiltr do tmavých vialek a ve třech opakováních byly ihned analyzovány na HPLC s DAD detekcí. Po celou dobu zmiňovaných operací bylo důležité uchovávat vzorky v temnu, aby nedocházelo ke světelné degradaci karotenoidů.

5.7.1.2 Xanthofylové estery

Extrakce karotenoidů až do suchého zbytku proběhla stejným způsobem. Suchý zbytek byl rekonstituován do 6 ml diethyletheru a dále bylo přidáno hydrolyzační činidlo, které bylo připraveno smísením 50% vodného roztoku KOH a ethanolu v objemovém poměru 1:9). Výsledná koncentrace hydroxidu použitého pro hydrolýzu činila 2,5%. Vzorky byly třepány na třepačce ve tmě po dobu dvou hodin při pokojové teplotě. Poté bylo 6 ml hydrolyzátu převedeno do 50 ml uzavíratelných kyvet a následně bylo přidáno 6 ml směsi diethylether:hexan (1:1) a 6 ml vody. Směs byla třepána po dobu 10 minut a následně centrifugována při 4 °C a 2057 rcf po dobu 10 minut. Poté byla spodní fáze (vodná) obsahující KOH odstraněna injekční stříkačkou s jehlou. Do zbytku bylo přidáno 6 ml vody a znovu bylo protřepáno na 10 minut a centrifugováno. Organická vrstva byla kvantitativně převedena do 25 ml odparné baňky a odpařena do sucha při 30 °C na vakuové rotační odparce. Organické residuum bylo rekonstituováno do 1 ml směsi ethanol:aceton (3:2) spřídkem 0,2% BHT. Vzorky byly následně přefiltrovány přes 0,45 µm PVDF membránový mikrofiltr do tmavých vialek a ve třech opakováních byly ihned analyzovány na HPLC s DAD detekcí. Po celou dobu zmiňovaných operací bylo důležité stejně jako při analýze volných karotenoidů uchovávat vzorky v temnu.

5.7.2 Chromatografická separace

Analýza karotenoidů ve vzorcích byla provedena na kapalinovém chromatografu Ultimate 3000. K separaci analytů byla použita C30 kolona. Vzorky byly měřeny za následujících podmínek chromatografické separace:

- Mobilní fáze: methanol (MeOH), voda (H₂O), *tert*-butylmethyl ether (TBME)
- Eluce: gradientová

0–1 min	90 % MeOH; 10 % H ₂ O, 0 % TBME (isokrat.)
1–6 min	90 % MeOH, 0 % H ₂ O, 10 % TBME (lin. gr.)
6–22 min	40 % MeOH; 0 % H ₂ O, 60 % TBME (lin. gr.)
22–24 min	20% MeOH; 0 % H ₂ O, 80 % TBME (lin. gr.)
24–30 min	90% MeOH; 10 % H ₂ O, 0 % TBME (lin. gr.)
30–33 min	90 % MeOH; 10 % H ₂ O, 0 % TBME (isokrat.)

- Průtok: 0,6 ml.min⁻¹
- Teplota kolony: 25 °C
- Teplota sampleru: 10 °C
- Objem nástřiku: 10 µl
- Doba analýzy: 33 min
- Detekce: 445 nm (spektrální akvizice 300–700nm)

5.7.3 Identifikace a kvantifikace vzorků

Karotenoidy lutein, zeaxanthin, antheraxantin, α-karoten a β-karoten byly ve vzorcích identifikovány porovnáním retenčních časů a absorpčních spekter se zakoupenými externími standardy. Kvantifikace karotenoidů ve vzorcích byla provedena metodou externí kalibrace.

Ze zakoupených standardů byly vytvořeny zásobní roztoky o koncentraci 100 µg.ml⁻¹ (aceton s přísadkou 0,2 % BHT). Ze zásobních roztoků byly připraveny pracovní standardy o koncentracích 0,1–20 µg.ml⁻¹. Před každou analýzou byla spektrofotometricky stanovena přesná koncentrace standardů, která byla vypočítána z níže uvedeného vztahu:

$$C_{std} = \frac{A_{sk}}{A_I} ,$$

Kde C_{std} je koncentrace příslušného standardu, A_{sk} je skutečná absorbance extraktu standardu při předpokládané koncentraci 1 µg.ml⁻¹ a A_I je absorbance extraktu standardu o koncentraci 1 µg.ml⁻¹.

Pro jednotlivé standardy byly použity extinkční koeficienty (EC, L.g⁻¹.cm⁻¹): uvedeny v tabulce 7.

Množství xanthofylů vázaných v esterech bylo stanoveno jako rozdíl mezi volnými xanthofyly a xanthofyly uvolněnými alkalickou hydrolyzou.

Obsah karotenoidů ve vzorcích obilovin byl vyjádřen v µg.g⁻¹ suchého zrna. Všechny analýzy byly provedeny ve třech opakováních.

Tab. 7: Extinkční koeficienty standardů

Solvent	EC	λ_{\max}(nm)	Rozpouštědlo
antheraxanthin	235	446	ethanol
lutein	255	445	ethanol
zeaxanthin	234	452	aceton
α -karoten	271	445	hexan
β -karoten	259,2	453	hexan

5.8 Statistická analýza

Data byla zpracována v programu Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA). Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí softwaru STATISTICA 12.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Ke zjištění vlivu odrůdy a ročníku slizně na obsah karotenoidů byla použita statistická metoda: dvoufaktorová analýza rozptylu (ANOVA) o hladině významnosti $\alpha = 0,05$. K podrobnějšímu statistickému zhodnocení byl použit Tukeyův Post Hoc HSD test.

6 Výsledky

Provedený pokus byl zaměřen na sledování vlivu ročníku sklizně na obsah a složení karotenoidů u různých genotypů pšenice. Dále byl sledován poměr volných a esterově vázaných karotenoidů v jednotlivých odrůdách pšenice. Také byl sledován vliv barvy zrna na obsah karotenoidů. Naměřené hodnoty jsou v celé kapitole uváděny v $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny.

6.1 Celkové karotenoidy v obou ročnících sklizně

Stanovení celkového obsahu karotenoidů bylo v roce 2015 a v roce 2016 provedeno ve třech opakováních. Průměrné hodnoty obsahu karotenoidů, které byly naměřeny ve vzorcích, jsou shrnuty v tabulce 8.

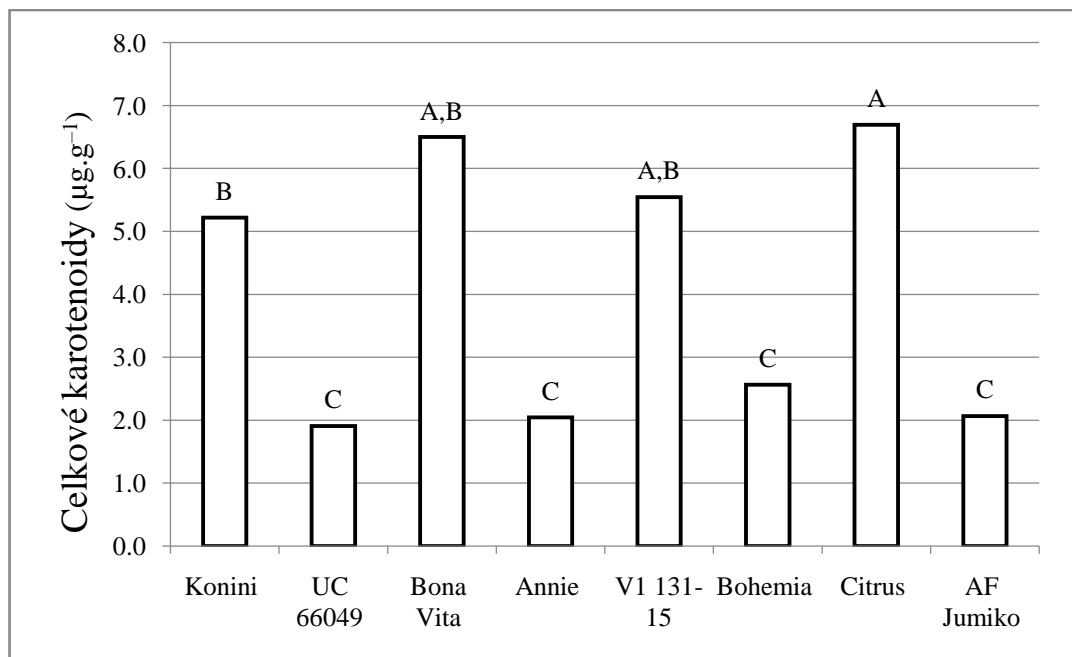
6.1.1 Vliv odrůdy

Obsah celkových karotenoidů se pohyboval v rozmezí $1,906\text{--}6,695 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny v závislosti na odrůdě.

Nevyšší schopnost syntézy karotenoidů byla zjištěna u genotypu Citrus s průměrnou hodnotou $6,695 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny (Obr 11). Ze statisticky zhodnocených výsledků (příloha 3, obrázek 1a) je patrné, že vzorky Bona Vita s průměrnou hodnotou $6,499 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny a V1 131-15 s průměrnou hodnotou $5,546 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny nebyly vyhodnoceny jako statisticky průkazně odlišné vůči genotypu Citrus.

Oproti tomu nejnižší schopnost tvorby karotenoidů měla odrůda UC 66049 s průměrnou hodnotou $1,906 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny. Srovnatelné obsahy s odrůdou UC 66049 byly také naměřeny v odrůdách Annie ($2,046 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny), AF Jumiko ($2,066 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny) a Bohemia ($2,562 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny). Tyto čtyři odrůdy se statisticky významně liší od ostatních.

Odrůda Konini vykazovala střední obsah celkových karotenoidů s průměrnou hodnotou $5,218 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny, která se významně statisticky nelišila od odrůd V1 131-15 a Bona Vita.



Obr 11: Celkové karotenoidy v jednotlivých odrůdách pšenice

Rok	Odrůda	Barva	Antheraxanthin	Lutein	Zeaxanthin	α -Karoten	β -Karoten	Celkové
2015	Konini	Pp	0,183 \pm 0,005	5,282 \pm 0,308	1,433 \pm 0,061	0,049 \pm 0,003	0,233 \pm 0,038	7,516 \pm 0,258
2015	UC 66049	Ma	0,278 \pm 0,010	1,717 \pm 0,063	0,791 \pm 0,015	n.d	0,076 \pm 0,009	2,863 \pm 0,063
2015	Bona Vita	Že	0,327 \pm 0,026	5,719 \pm 0,090	0,823 \pm 0,030	n.d	n.d	6,915 \pm 0,213
2015	Annie	S	0,070 \pm 0,005	1,988 \pm 0,040	0,452 \pm 0,031	n.d	0,051 \pm 0,023	2,586 \pm 0,030
2015	V1 131-15	Ma	0,447 \pm 0,006	5,796 \pm 0,162	1,259 \pm 0,042	n.d	n.d	7,571 \pm 0,076
2015	Bohemia	S	0,209 \pm 0,008	2,624 \pm 0,144	0,809 \pm 0,063	n.d	n.d	3,713 \pm 0,103
2015	Citrus	Že	0,484 \pm 0,044	6,934 \pm 0,263	0,878 \pm 0,054	0,022 \pm 0,002	0,295 \pm 0,022	8,734 \pm 0,145
2015	AF Jumiko	Pp	0,060 \pm 0,002	2,151 \pm 0,017	0,271 \pm 0,002	n.d	0,072 \pm 0,003	2,562 \pm 0,011
2016	Konini	Pp	0,034 \pm 0,006	2,650 \pm 0,060	0,189 \pm 0,003	0,015 \pm 0,002	0,033 \pm 0,003	2,945 \pm 0,019
2016	UC 66049	Ma	0,020 \pm 0,007	0,081 \pm 0,017	0,112 \pm 0,004	n.d	0,011 \pm 0,001	1,918 \pm 0,026
2016	Bona Vita	Že	0,074 \pm 0,003	5,619 \pm 0,062	0,205 \pm 0,012	0,050 \pm 0,001	0,180 \pm 0,006	6,158 \pm 0,095
2016	Annie	S	0,027 \pm 0,003	1,323 \pm 0,025	0,165 \pm 0,003	n.d	0,016 \pm 0,001	1,542 \pm 0,007
2016	V1 131-15	Ma	0,046 \pm 0,005	3,272 \pm 0,042	0,214 \pm 0,006	0,027 \pm 0,002	0,033 \pm 0,002	3,609 \pm 0,021
2016	Bohemia	S	0,032 \pm 0,001	1,331 \pm 0,022	0,101 \pm 0,003	n.d	0,020 \pm 0,003	1,492 \pm 0,041
2016	Citrus	Že	0,048 \pm 0,001	4,439 \pm 0,075	0,188 \pm 0,009	n.d	0,104 \pm 0,005	4,807 \pm 0,022
2016	AF Jumiko	Pp	0,023 \pm 0,001	1,429 \pm 0,046	0,108 \pm 0,010	n.d	0,019 \pm 0,004	1,597 \pm 0,075

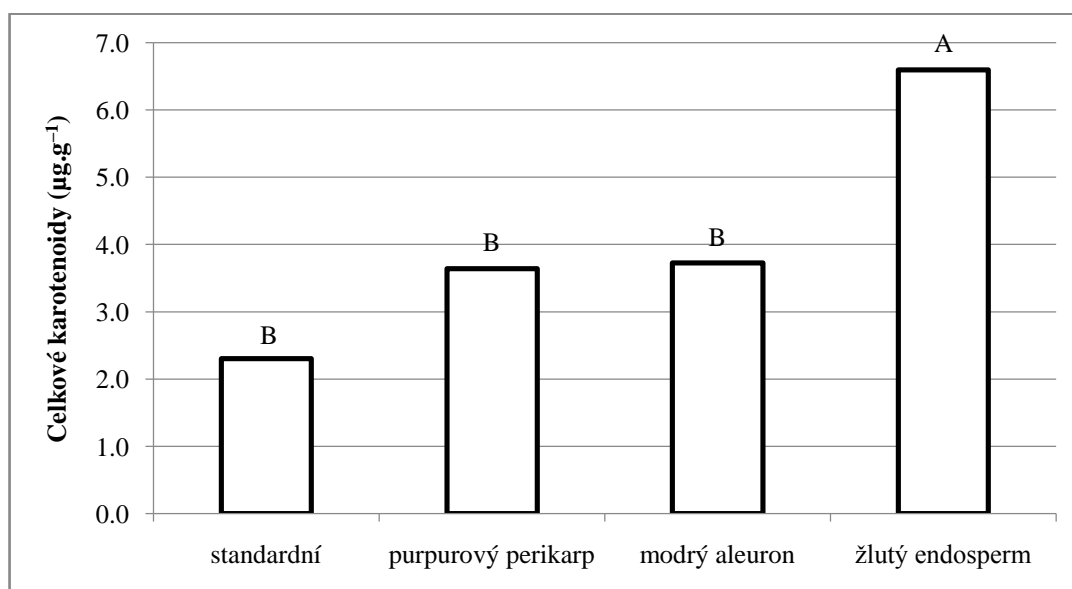
Tabulka č. 8: Průměrné hodnoty obsahu karotenoidů; Pp – purpurový perikarp; Ma – modrý aleuron; Že – žlutý endosperm; S – standardní barva (červená); n.d – nebylo detekováno

6.1.2 Vliv barvy zrna

Z obrázku 12 je patrné, že celkový obsah karotenoidů byl závislý na barvě zrna. Nejvyšší obsah byl stanoven u pšenice se žlutým endospermem s průměrným obsahem $6,597 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny a statisticky se výrazně odlišoval od ostatních barev zrn (příloha 2, obrázek 1c).

Nejnižší obsah byl naměřen u pšenice se standardním neboli červeným zbarvením zrna a průměrnou hodnotou $2,304 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny. Rozdíly v obsazích celkových karotenoidů v pšenicích se standardní barvou zrna, s purpurovým perikarpem ($3,642 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny) a modrým aleuronem ($3,726 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny) byly vyhodnoceny jako statisticky neprůkazné.

Výsledky naznačují, že obsah karotenoidů v závislosti na zbarvení zrna je výrazně odlišný pouze u žlutého zbarvení.

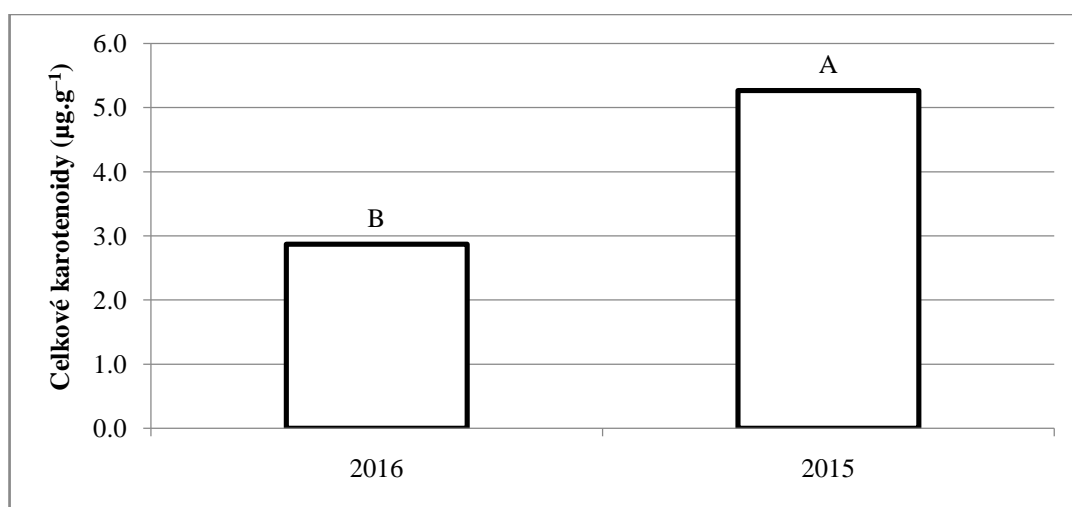


Obr. 12: Celkový obsah karotenoidů v závislosti na barvě zrna

6.1.3 Vliv ročníku sklizně

Rozdíl v celkovém obsahu karotenoidů v roce 2015 a 2016 je uveden na obrázku 13. V rámci dvouletého sledování byl shledán statisticky průkazný rozdíl mezi rokem 2015 a 2016. Jak také ukazuje statistické zhodnocení výsledků (příloha 3 obrázek 1b). V roce 2015 dosáhl celkový obsah karotenoidů ve všech pšenících průměrné hodnoty $5,264 \mu\text{g}^{-1}$ sušiny, oproti slabšímu roku 2016 ($2,870 \mu\text{g}^{-1}$ sušiny).

Dle výsledků lze usuzovat silnou závislost celkového obsahu karotenoidů na ročníku sklizně (podmínky prostředí).



Obr. 13: Celkový obsah karotenoidů závislý na ročníku sklizně

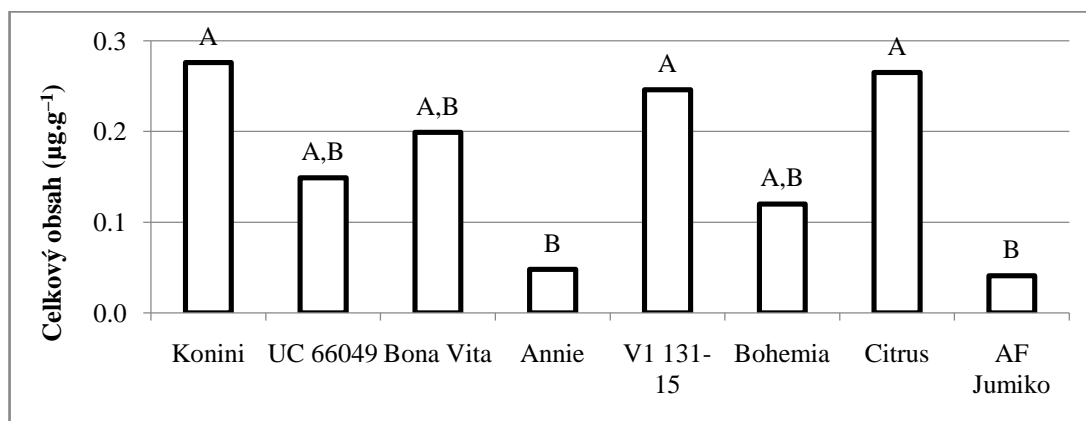
6.2 Jednotlivé karotenoidy za oba ročníky sklizně

6.2.1 Antheraxanthin

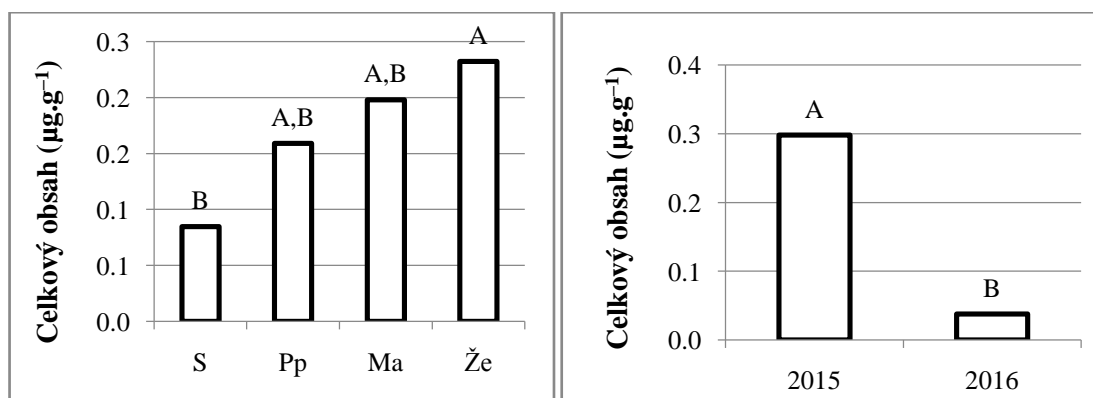
Nejvyšší obsah antheraxanthinu byl naměřen u pšenic se žlutým endospermem $0,232 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny (Obr. 15). Mezi purpurovým a modrým zbarvením nebyly statisticky prokazatelné rozdíly. Nejnižší obsah antheraxanthinu byl nalezen u pšenic se standardním zbarvením ($0,084 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny).

Pokud srovnáme obsahy podle odrůdy (Obr. 14), byly stanoveny významné difference mezi genotypy: Konini, V1 131-15, Citrus ($0,246 - 0,276 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny) a genotypy: Annie, AF Jumiko ($0,041-0,048 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny).

Statistiky průkazný rozdíl byl také zjištěn u ročníku sklizně (Obr. 16). V roce 2015 byla naměřena vyšší průměrná hodnota $0,298 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny na rozdíl od slabšího roku 2016 ($0,0381 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny).



Obr. 14: Celkový obsah antheraxanthinu v jednotlivých odrůdách



Obr. 15

Obr. 16

Obr. 15: Celkový obsah antheraxanthinu podle zbarvení zrna

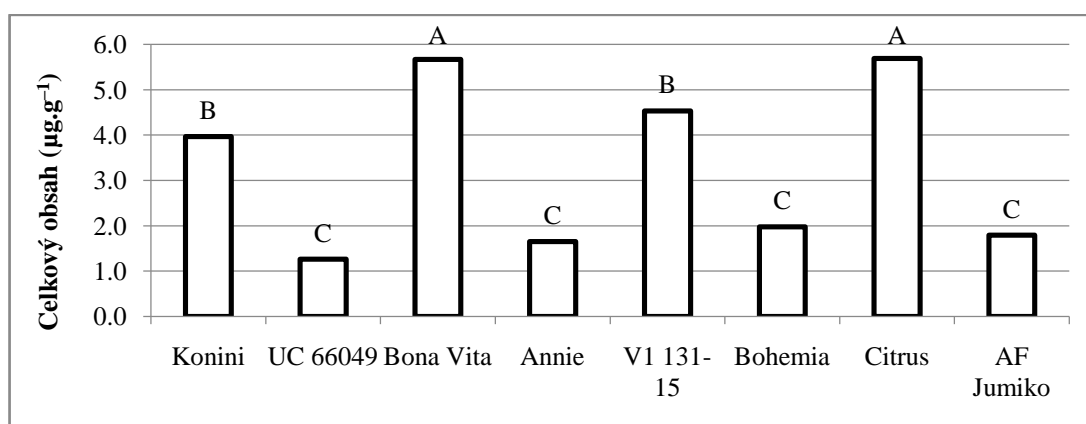
Obr. 16: Celkový obsah antheraxanthinu podle roku sklizně

6.2.2 Lutein

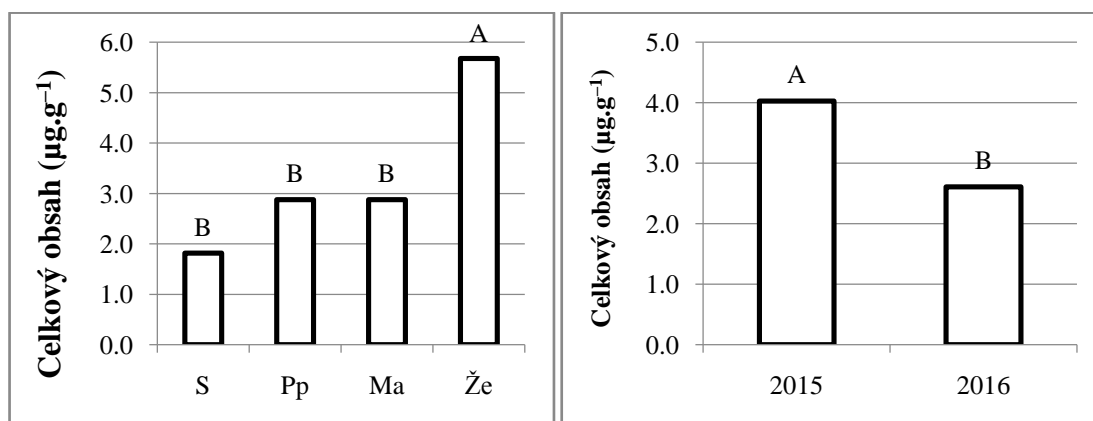
Nejvyšší obsah luteinu byl naměřen u pšenic se žlutým endospermem $5,686 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny (Obr. 18). Mezi purpurovým, modrým a standardním zbarvením nebyly statisticky prokazatelné rozdíly.

Nejnižší obsahy luteinu (Obr. 17), byly stanoveny v odrůdách UC 66049 ($1,261 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny), Annie ($1,655 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny), AF Jumiko ($1,790 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny) a Bohemia ($1,977 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny). Oproti tomu statisticky významně odlišné hodnoty byly naměřeny u odrůd Citrus ($5,686 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny) a Bona Vita ($5,669 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny), které obsahovaly největší množství luteinu.

Statistiky průkazný rozdíl byl také zjištěn u ročníku sklizně (Obr. 19). V roce 2016 byla naměřena nižší průměrná hodnota $2,608 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny na rozdíl od roku 2015 ($4,026 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny).



Obr. 17: Celkový obsah luteinu v jednotlivých odrůdách



Obr. 18

Obr. 19

Obr. 18: Celkový obsah luteinu podle zbarvení zrna

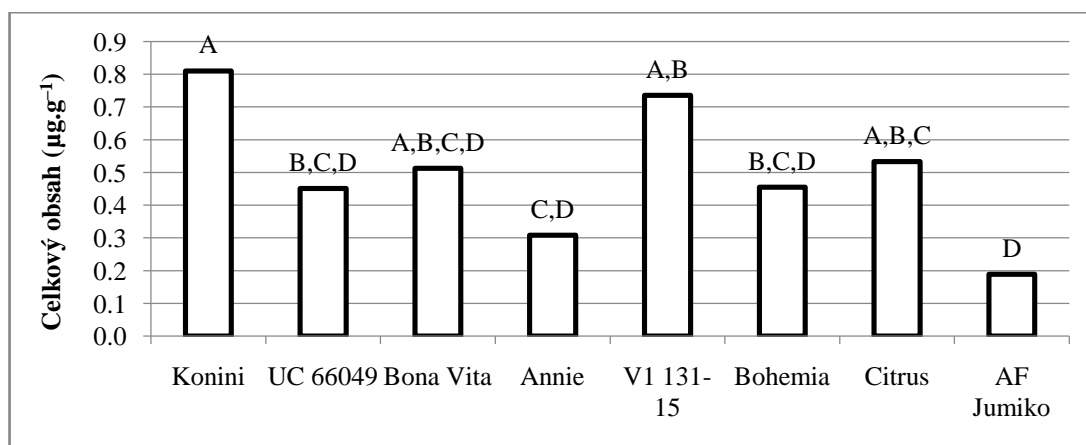
Obr. 20: Celkový obsah luteinu podle roku sklizně

6.2.3 Zeaxanthin

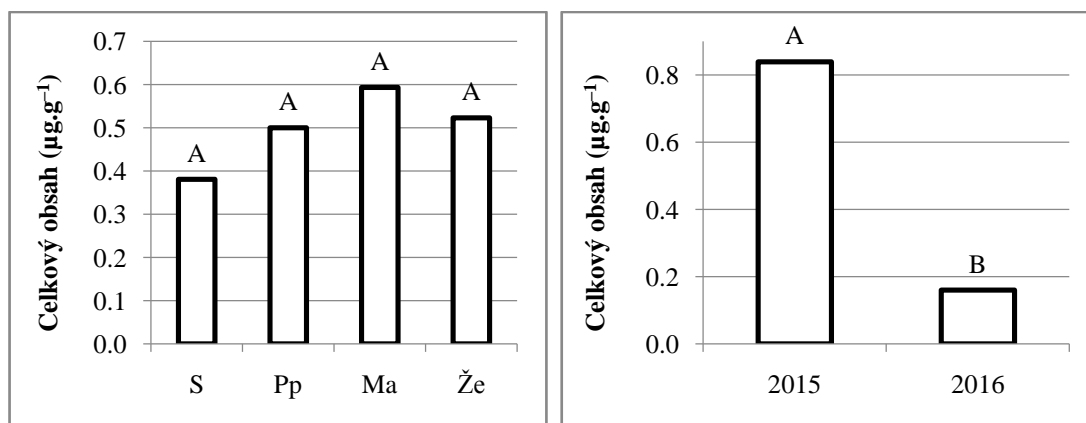
Vliv barvy zrna na obsah zeaxanthinu v pšenici byl po statistické analýze vyhodnocen jako neprůkazný (Obr. 21). Obsah zeaxanthinu se pohyboval od 0,381 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny (standardní barva) do 0,593 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny (modrá barva).

Statistiky průkazný rozdíl byl zjištěn u vlivu ročníku sklizně na obsah zeaxanthinu v zrnech (Obr. 22). V roce 2015 byla naměřena významně vyšší průměrná hodnota 0,839 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny na rozdíl od slabšího roku 2016 (0,160 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny).

Nejvyšší obsah zeaxanthinu byl naměřen u genotypu Konini 0,810 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny (Obr. 20) a nejnižší obsah byl stanoven u genotypu AF Jumiko (0,189 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny).



Obr. 20: Celkový obsah zeaxanthinu v jednotlivých odrůdách



Obr. 21

Obr. 22

Obr. 21: Celkový obsah zeaxanthinu podle zbarvení zrna

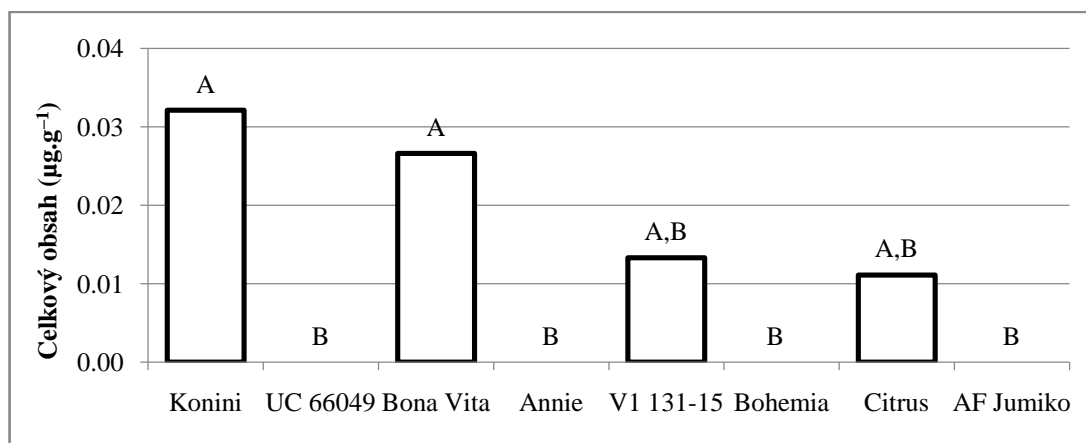
Obr. 22: Celkový obsah zeaxanthinu podle roku sklizně

6.2.4 α -karoten

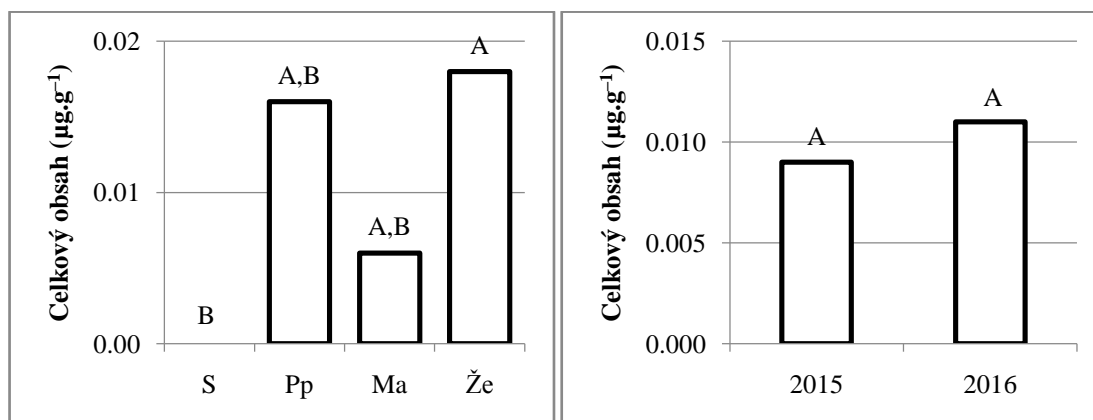
Z obrázku 23 je patrné, že v odrůdách UC 66049, Annie, Bohemia a AF Jumiko nebylo stanoveno žádné zjistiitelné množství α -karotenu. Nejvyšší obsah byl zjištěn u odrůdy Konini 0,032 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny a nejnižší obsah byl stanoven u pšenice Citrus (0,011 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny).

Statistiky neprůkazný rozdíl byl zjištěn u ročníku sklizně (Obr. 25). V roce 2015 byla průměrná hodnota α -karotenu 0,009 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny a v roce 2016 byla průměrná hodnota α -karotenu 0,011 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny

Standardní zbarvení pšenice neobsahovala žádné zjistiitelné množství α -karotenu (Obr. 24). Pšenice se žlutým ednospermem se významně statisticky nelišily od pšeníc s modrým aleuronem a purpurovým perikarpem. Nejvíce α -karotenu bylo však naměřeno u pšeníc se žlutým zbarvením zrna (0,018 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny)



Obr. 23: Celkový obsah α -karotenu v jednotlivých odrůdách



Obr. 24

Obr. 25

Obr. 24: Celkový obsah α -karotenu podle zbarvení zrna

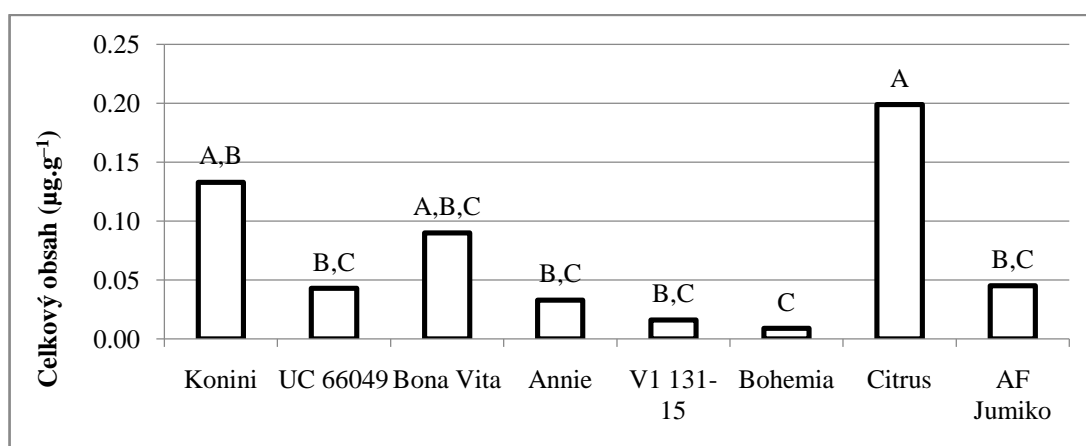
Obr. 25: Celkový obsah α -karotenu podle roku sklizně

6.2.5 β -karoten

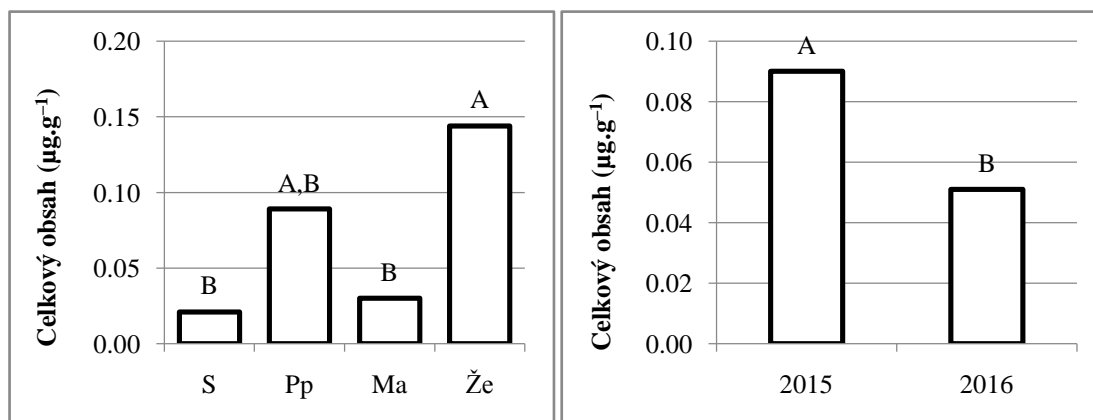
Nejvyšší obsah β -karotenu byl naměřen u pšeníc se žlutým zbarvením $0,144 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny (Obr. 27), tento obsah se statisticky významně neodlišoval od pšeníc s purpurovým zbarvením ($0,089 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny). Nejnížší obsahy β -karotenu byl nalezeny u pšeníc se standardním zbarvením zrna ($0,021 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny) a s modrým zbarvením zrna ($0,030 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny).

Pokud srovnáme obsahy podle odrůdy (Obr. 26), byly stanoveny významné difference mezi genotypy: Konini, Bona Vita, Citrus ($0,090$ – $0,199 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny) a genotypy: Annie, AF Jumiko, V1 131-15, UC 66049 a Bohemia ($0,009$ – $0,045 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny).

Statistiky průkazný rozdíl byl zjištěn u ročníku sklizně (Obr. 28). V roce 2015 byla naměřena vyšší průměrná hodnota $0,090 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny na rozdíl od roku 2016 ($0,051 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny).



Obr. 26: Celkový obsah β -karotenu v jednotlivých odrůdách



Obr. 27

Obr. 28

Obr. 24: Celkový obsah β -karotenu podle zbarvení zrna

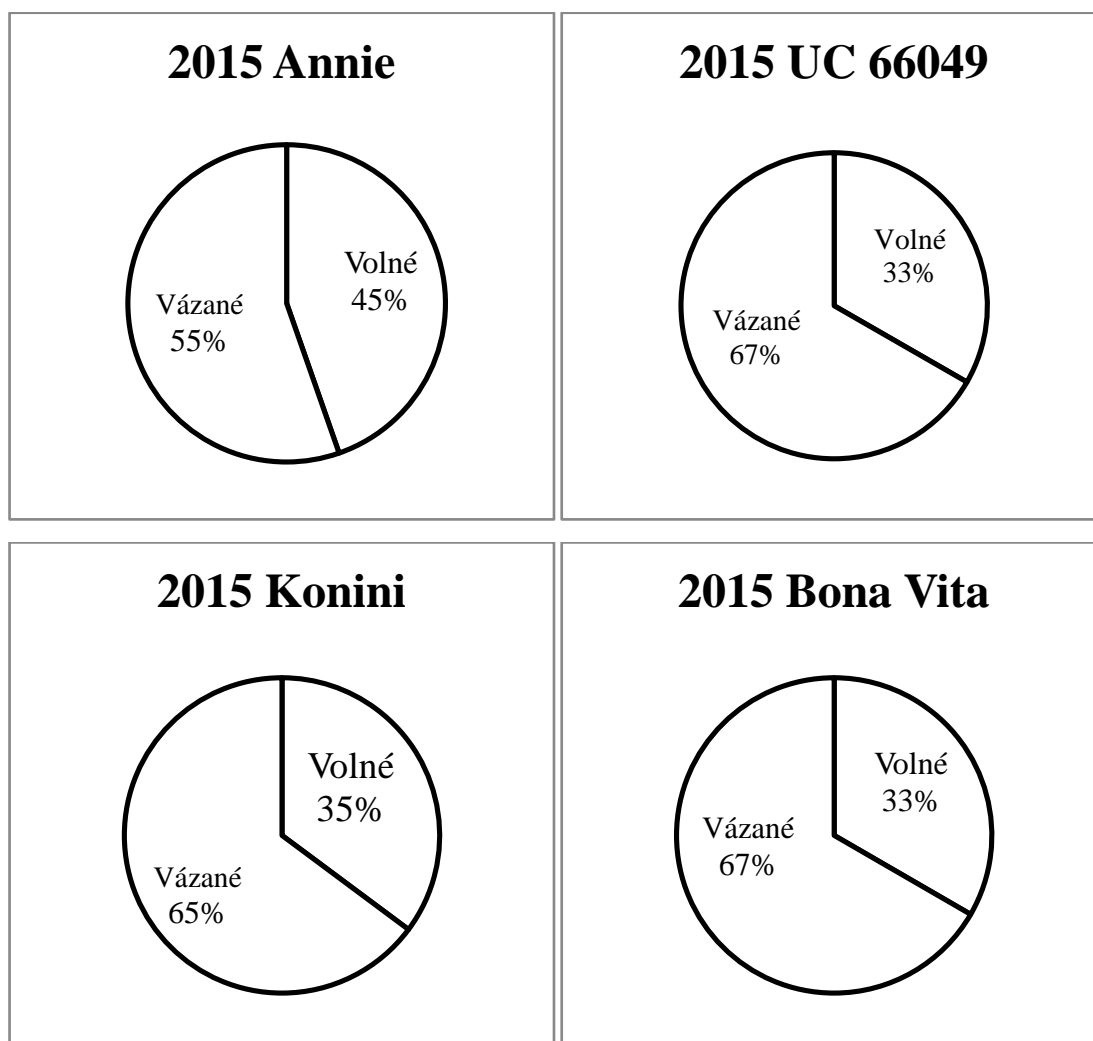
Obr. 25: Celkový obsah β -karotenu podle roku sklizně

6.3 Poměr esterově vázaných karotenoidů

Genotypy pšenice Bohemia, V1 131–15, Citrus a AF Jumiko uchovávají pouze volné formy karotenoidů. Proto nejsou v této kapitole uvedeny.

6.3.1 Sklizeň 2015

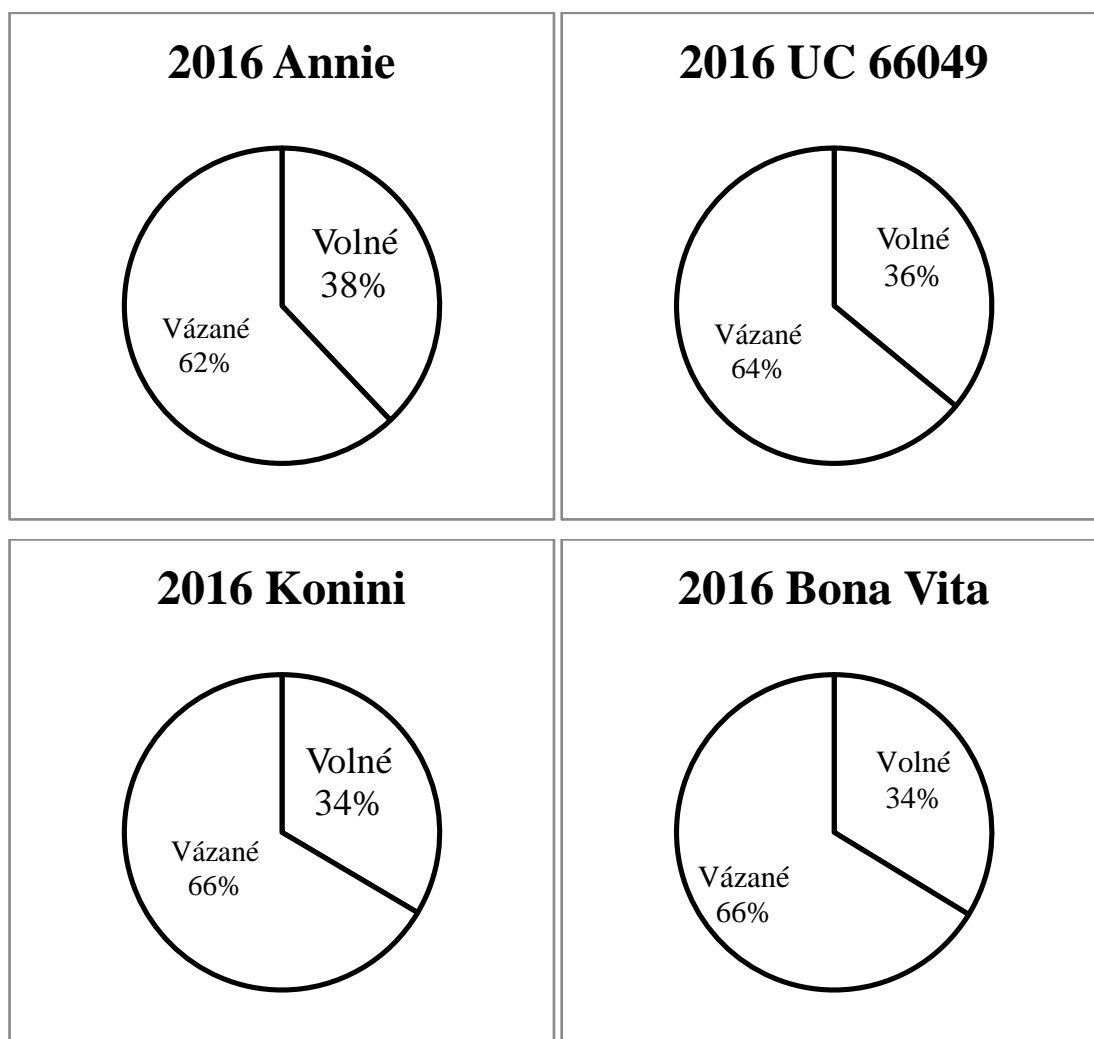
Největší podíl esterově vázaných karotenoidů byl detekován v odrůdách Bona Vita a UC 66049. U obou genotypů, jak je patrné z obrázku 26, bylo zjištěno stejné procento esterů a to 67 %. Velmi podobných hodnot dosáhla také odrůda Konini (65 %). Nejnižší procento (55 %) bylo stanoveno v odrůdě Annie.



Obr. 26: Poměry esterově vázaných karotenoidů

6.3.2 Sklizeň 2016

Největší procento esterů karotenoidů bylo zjištěno v odrůdách Bona Vita a Konini. U obou genotypů, jak je zřejmé z obrázku 27, bylo zjištěno stejné procento esterů (66 %). Nejnižšího procenta esterově vázaných karotenoidů dosáhla, stejně jako v předchozím roce, odrůda Annie (62 %), což je přibližně o 7 % více než v předchozím roce. Zároveň jde o jediný genotyp, u kterého došlo k meziročníkovému nárůstu zastoupení esterů. Odrůda UC 66049 obsahovala 64 % esterů.



Obr. 27: Poměry esterově vázaných karotenoidů

7 Diskuze

V praktické části byl sledován obsah jednotlivých karotenoidů ve vzorcích pšenice. Množství i složení jednotlivých karotenoidů může záviset na mnoha faktorech, jako je genotyp, stanoviště, pěstitelské podmínky, ročník sklizně, podmínky skladování a další. V diplomové práci byl zkoumán vliv odrůdy, ročníku sklizně a barvy zrna na obsah a složení karotenoidů. Lze předpokládat, že vliv počasí a odrůdy by měl vést k výrazným změnám ve složení i obsahu karotenoidů v zrnech pšenice.

7.1 Celkové karotenoidy

Průměrná hodnota celkových karotenoidů v pšenících s Pp byla $3,642 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny ($5,039 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny v roce 2015 a $2,271 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny v roce 2016). V zrnech sklizených v roce 2016 byly naměřeny nižší průměrné obsahy u pšenic s purpurovým zbarvením zrna: $1,597 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny (AF Jumiko) a $2,945 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny (Konini) ve srovnání s předcházející sezónou: $2,562 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny (AF Jumiko) a $7,516 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny (Konini).

Pšenice s modrým zbarvením obsahovala v průměru $3,726 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny (celkových karotenoidů). Stejně jako u pšenice s purpurovým zbarvením, byly v roce 2016 naměřeny nižší obsahy celkových karotenoidů v průměru $2,764 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny ($1,918 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny v UC 66049, $3,609 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny ve V1 131–15). V předešlém roce sklizně, byla průměrná hodnota celkových karotenoidů $5,217 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny, $2,863 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny (UC 66049) a $7,571 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny (V1 131–15).

Hodnoty celkových karotenoidů v pšenících s modrým zbarvením zrna zahrnují i neobvyklou šlechtitelskou linii V1 131–15, která je specifická velmi tmavým zbarvením aleuronové vrstvy obilky (v důsledku přítomnosti anthokyanových pigmentů) a zároveň obsahuje vysoká množství volných karotenoidů. Zmíněná šlechtitelská linie by tak mohla představovat potenciálně významný zdroj těchto látek v lidské stravě. Autoři Paznocht et al. (2018) uvádějí, že vysoké obsahy karotenoidů jsou spíše netypické pro pšenice s modrou barvou zrna.

Konvenční pšenice s červenou barvou zrna, v pekařském průmyslu tradičně užívané pro výrobu chleba, dosáhly průměrné hodnoty celkových karotenoidů $2,304 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny ($3,150 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny v roce 2015 a $1,517 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny v roce 2016). Naše průměrné hodnoty přibližně souhlasí s výsledky jiných autorů, jako jsou Hidalgo et al. (2006), kteří uvádějí obsah celkových karotenoidů v konvenčních odrůdách $2,12 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny. Srovnatelný obsah ($1,94 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny) stanovili také autoři Abdel-Aal et al. (2007). Na druhou stranu jsou námi

stanovené hodnoty zhruba 3,5krát vyšší, než udává Mattera a kol. (2017) ($0,63 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ v čerstvé hmoty) a přibližně 1,7krát vyšší než hodnoty publikované Lachmanem et al. (2013) ($1,36 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny).

V našem měření vykazovaly červené pšenice ($2,304 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny) o téměř 40 % nižší obsahy karotenoidů ve srovnání s purpurově ($3,642 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny) a modře pigmentovanými odrůdami ($3,726 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny). Purpurové a modré pšenice jsou tak celkovým obsahem karotenoidů srovnatelné s pšenicí tvrdou (*Triticum durum*), která je známá pro svůj vysoký obsah karotenoidů ($3,02 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny), jak udává Hidalgo et al. (2006). Pšenice s Pp a Ma by tudíž mohly být cennými zdroji nejen antokyanů, ale také karotenoidů jak shrnul Lachman et al. (2017).

Celkově nejvyšší obsah karotenoidů byl stanoven v odrůdě Citrus (Že, $6,695 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny). Tento obsah je srovnatelný s obsahem karotenoidů v tritordeu ($6,50 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ čerstvé hmoty), kterému se ve své studii věnovali autoři Mellado-Ortega et al. (2015). O tritordeu, kříženci pšenice tvrdé (*Triticum durum*) a ječmene čilského (*Hordeum chilense*) je obecně známo, že obsahuje velmi vysoká množství karotenoidů (až 5,2krát více oproti pšenici tvrdé). Díky tomu je tritordeum řazeno mezi tzv. funkční potraviny (Atienza et al., 2007). Na základě našich výsledků lze tedy usuzovat, že pšenice Citrus (Že) by v budoucnu mohla být taktéž využívána jako funkční potravina s vysokým obsahem karotenoidů.

7.2 Jednotlivé karotenoidy

Analýza HPLC-DAD potvrdila přítomnost celkem pěti karotenoidů. Jmenovitě antheraxanthinu, luteinu, zeaxanthinu, α -karotenu a β -karotenu, které byly kvantifikovány celkem v osmi genotypech, přičemž xanthofyly byly analyzovány jak ve volné, tak i ve vázané esterové formě.

Naše výsledky celkového obsahu luteinu, které zahrnují lutein volný i lutein vázaný v esterech (průměrně $2,878 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a $2,897 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny v Pp a Ma pšenicích) byly asi 4,8krát vyšší v porovnání s výsledky Pp pšenice ($0,60 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny) uvedenými ve studii autorů Ndolo a Beta (2013).

Velmi vysoký obsah luteinu (průměrně $4,534 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny) byl naměřen u pšenice V1 131–15 s modrým aleuronem, což je bezmála 4 násobně více v porovnání s jinou pšenicí stejné barvy zrna označované jako UC 66049. Veliký rozdíl lze přisuzovat, jak již bylo

zmíněno, vlivu šlechtění pšenice V1 131–15 (velké množství volných karotenoidů + antokyanových barviv).

Zeaxanthin byl druhý nejvíce zastoupený xanthofyl identifikovaný u sledovaných pšenic. Koncentrace zeaxanthinu v pšenicích s purpurovým perikarpem a v pšenicích s modrým aleuronem byla v průměru 0,500 a 0,593 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny, což je podobné s výsledky autorů Ndolo a Beta (2013), kteří udávají 0,540 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ v Pp.

U našich vzorků pšenice byly karoteny v porovnání s xantofyly v mnohem nižších koncentracích. Obsah β -karotenu dosahoval v průměru 0,089 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny v pšenicích s Pp a 0,144 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny v pšenicích se žlutým endospermem. Výsledky, které byly naměřeny u pšenic se \check{Z} e, souhlasí se zjištěními výsledky (0,11 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny) od autorů Hidalgo et al. (2006) a také s výsledky (0,13 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny) uvedené ve studii od autorů Abdel-Aal et al. (2007).

α -Karoten nebyl nalezen v odrůdách UC 66049, Bohemia, Annie, AF Jumiko ani v jednom roce sklizně. Z výsledků vyplývá, že standardní zbarvení pšenice (kontrola) neobsahuje žádné zjiřitelné množství α -karotenu. Naše výsledky se výrazně liší od studie autorů Hidalgo et al. (2006), kteří naměřili průměrně 0,11 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny α -karotenu v konvenční pšenicích. V ostatních odrůdách byla zjiřtjena pouze stopová množství tohoto karotenu: od 0,006 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny (Ma) do 0,018 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny (\check{Z} e).

Průměrný obsah α -karotenu, jako jediného ze sledovaných karotenoidů, mírně vzrostl v roce 2016 v porovnání s předchozím rokem (o 23 %; z 0,009 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny na 0,012 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny). Statistické hodnocení však tento nárůst nevyhodnotilo jako statisticky průkazný. α -karoten se tak odlišuje od všech ostatních karotenoidů, u kterých byl v roce 2016 zaznamenán velmi výrazný pokles. Z toho lze usuzovat, že obsah α -karotenu v zrně je méně závislý na podmínkách prostředí v porovnání s ostatními karotenoidy.

7.3 Estery

Xanthofyly se v přírodě často vyskytují ve formě esterů s různými mastnými kyselinami. Esterifikace zvyšuje jejich stabilitu, jelikož je chrání před oxidací vlivem vysokých teplot či působením UV záření nebo degradací během skladování a technologického zpracování (Ahmad et al., 2015; Fu et al., 2010; Subagio et al., 1999). Schopnost obilovin tvořit estery tak může být důležitým kritériem pro selekci genotypů v rámci šlechtitelských programů.

Nejvyšší zastoupení esterově vázaných karotenoidů bylo zaznamenáno ve vzorcích Bona Vita (Že, 67 %) a UC 66049 (Ma, 67 %) ze sklizně z roku 2015. Odrůda Annie (55 %) obsahovala nejmenší podíl esterově vázaných karotenoidů. V roce 2016 se podíly esterů příliš nezměnily. U genotypu Bona Vita (66 %) a UC 66049 (64 %) a Konini (66 %) byl rozdíl obsahů esterově vázaných karotenoidů vůči roku 2015 přibližně jen o 1 %. Odrůda Annie (62 %) zaznamenala vyšší rozdíl mezi lety, přibližně 7 %. Z výsledků bychom mohly usuzovat, že počasí nemá veliký vliv na přítomnost esterů v zrnech pšenice. Lze tedy předpokládat, že obsahy byly z větší míry ovlivněny genotypem. Výsledky pro Bohemii (S), V1 131–15 (Ma), Citrus (Že) a AF Jumiko (Pp), v jejichž zrnech byly v obou letech nalezeny karotenoidy pouze ve volných (tedy neesterovaných) formách naznačují, že by tvorba xanthofylových esterů mohla také mohla záležet na genotypu pšenice,

7.4 Podmínky prostředí

Pro určení vlivu ročníku byly hodnoceny obsahy karotenoidů ve vybraných genotypech pšenice ve dvou po sobě jdoucích vegetačních sezónách.

Sezóna 2015 se vyznačovala mimořádně nízkými srážkovými úhrny, a také, v porovnání s rokem 2016, vyššími průměrnými teplotami v průběhu prakticky celého vegetačního období. V roce 2015 přesáhla teplota v červenci a srpnu o 2,9 °C a o 4,3 °C dlouhodobý průměr, navíc v období od dubna do července téhož roku došlo k poklesu průměrného srážkového úhrnu o 37–67 % pod dlouhodobý průměr. Všechny odrůdy zahrnuté do našeho pokusu vykazovaly v roce 2015 výrazné zvýšení celkového obsahu karotenoidů. Jelikož pěstební podmínky zůstaly v obou letech zachovány, lze předpokládat výrazný vliv vnějších faktorů, vyšší teploty (pravděpodobně i vyšší intenzity slunečního záření) a nižších srážkových úhrnů na celkový obsah karotenoidů v zrně.

Všechny jednotlivé karotenoidy vykazovaly podobný trend vyššího obsahu v roce 2015. Výjimkou byl pouze α -karoten, jehož obsah v zrně se mezi oběma lety prakticky nezměnil (již bylo uvedeno výše 1.2).

K poněkud odlišnému názoru však dospěli, na základě výsledků šest let trvajícího experimentu s pšenicí jednozrnkou, autoři Abdel-Aal et al. (2007). Dle jejich výsledků je syntéza a ukládání luteinu naopak podporována chladnějším a vlhčím počasím. Obdobně pak Mattera et al. (2017) zjistili, že vysoká teplota v průběhu dozrávání zrna snižuje celkový obsah karotenoidů.

Z výsledků studií výše uvedených autorů vyplývá, že celkový obsah karotenoidů v obilovinách je ovlivněn celou řadou vnějších i vnitřních faktorů (podmínkami prostředí, biotickými stresory, genotypem nebo původem odrůd). Z toho lze předpokládat, že odrůdy pocházející z oblastí mírného podnebného pásu, kde se nachází také Česká republika (tradiční odrůda Bohemia), mohou reagovat odlišně na zvýšenou teplotu.

S výjimkou α -karotenu byla zjištěna závislost mezi obsahem jednotlivých i celkových karotenoidů na roku sklizně.

Pro ověření výsledků by tedy bylo vhodné tento pokus provést opakovaně se stejnými odrůdami a ve stejné lokalitě, aby mohla být přesněji vyhodnocena míra vlivu klimatických podmínek na obsah karotenoidů v pšenících.

8 Závěr

Cíle stanovit obsah a složení karotenoidů, stanovit množství volných a esterově vázaných karotenoidů v testovaných odrůdách, porovnat obsahy v pšenících s netradiční barvou zrna s pšenicemi konvenčními a vyhodnotit vliv ročníku sklizně byly splněny.

Statistické zhodnocení výsledků potvrdilo, hypotézu číslo 1, že existuje významný rozdíl ve schopnosti odrůd syntetizovat karotenoidy. Nejvyšší schopnost tvorby karotenoidů byla zjištěna v odrůdě Citrus.

Na základě statistického zhodnocení vlivu barvy zrna na obsah a složení karotenoidů byla potvrzena hypotéza číslo 2. Nejvíce karotenoidů bylo stanoveno u pšenice se žlutým zbarvením zrna.

Hypotéza, že obsahy karotenoidů v zrnech pšenice jsou ovlivněny ročníkem sklizně, byla statisticky potvrzena. V ročníku sklizně 2015 byl významně vyšší obsah celkových karotenoidů.

Poměr volných a esterově karotenoidů je odrůdově závislý, tato hypotéza byla také prokázána. Odrůdy Bohemia (S), V1 131-15 (Ma), Citrus (Že) a AF Jumiko (Pp), netvořily žádné estery, ani v jednom roce sklizně.

9 Seznam použité literatury

- Abdel-Aal, E.-S. M., Young, J. C., Akhtar, H., Rabalski, I. 2010. Stability of lutein in wholegrain bakery products naturally high in lutein or fortified with free lutein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58 (18). 10109–10117.
- Abdel-Aal, E.-S. M., Young, J. C., Rabalski, I., Hucl, P., Fregeau-Reid, J. 2007. Identification and quantification of seed carotenoids in selected wheat species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55 (3). 787–794.
- Acquistucci, R., Melini, V., Carbonaro, M., Finotti, E. 2013. Bioactive molecules and antioxidant activity in durum wheat grains and related millstream fractions. *International journal of food sciences and nutrition*, 64(8), 959-967.
- Ahmad, F. T., Asenstorfer, R. E., Soriano, I. R., Mares, D. J. 2013. Effect of temperature on lutein esterification and lutein stability in wheat grain. *Journal of Cereal Science*. 58 (3). 408–413.
- Ahmad, F. T., Mather, D. E., Law, H.-Y., Li, M., Yousif, S. A.-J., Chalmers, K. J., Asenstorfer, R. E., Mares, D. J. 2015. Genetic control of lutein esterification in wheat (*Triticum aestivum* L.) grain. *Journal of Cereal Science*. 64 . 109–115.
- Ariizumi, T., Kishimoto, S., Kakami, R., Maoka, T., Hirakawa, H., Suzuki, Y., Ozeki, Y., Shirasawa, K., Bernillon, S., Okabe, Y. 2014. Identification of the carotenoid modifying gene PALE YELLOW PETAL 1 as an essential factor in xanthophyll esterification and yellow flower pigmentation in tomato (*Solanum lycopersicum*). *The Plant Journal*. 79 (3). 453–465.
- Atienza, S. G., Ballesteros, J., Martín, A., Hornero-Méndez, D. (2007). Genetic variability of carotenoid concentration and degree of esterification among tritordeum (× *Tritordeum* Ascherson et Graebner) and durum wheat accessions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 4244–4251.

- Avendaño-Vázquez, A.-O., Córdoba, E., Llamas, E., San Román, C., Nisar, N., De la Torre, S., Ramos-Vega, M., de la Luz Gutiérrez-Nava, M., Cazzonelli, C. I., Pogson, B. J. 2014. An uncharacterized apocarotenoid-derived signal generated in ζ -carotene desaturase mutants regulates leaf development and the expression of chloroplast and nuclear genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 26 (6). 2524–2537.
- Beranová, M. 2005. *Jídlo a pití v pravěku a ve středověku*. Praha. Academia. p. 360. ISBN: 80-200-1340-7.
- Brandolini, A., Hidalgo, A., Moscaritolo, S. 2008. Chemical composition and pasting properties of einkorn (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum*) whole meal flour. *Journal of Cereal Science*. 47 (3). 599–609.
- Britton, G. 2008. Functions of intact carotenoids. In G. Britton, S. Liaaen-Jensen, & H. Pfander (Eds.), *Carotenoids* (pp. 189–212). Basel: Birkhäuser (Retrieved from http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-7643-7499-0_10).
- Britton, G., Khachik, F. 2009. Carotenoids in food. In G. Britton, S. Liaaen-Jensen, & H. Pfander (Eds.), *Carotenoids* (pp. 45–66). Basel: Birkhäuser (Retrieved from http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-7643-7501-0_3).
- Burešová, V., Kopecký, D., Bartoš, J., Martinek, P., Watanabe, N., Vyhnánek, T.,
- Caballero, B., Trugo, L., Finglas, P. 2003. *Encyclopedia of food sciences and nutrition: Volumes 1-10*. Elsevier Science BV. ISBN: 012227055X.
- Calvo, M. M. 2005. Lutein: a valuable ingredient of fruit and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 45 (7–8). 671–696.
- Cooper, D. A., Eldridge, A. L., Peters, J. C. 1999. Dietary carotenoids and certain cancers, heart disease, and age-related macular degeneration: a review of recent research. *Nutrition Reviews*. 57 (7). 201–214.
- Cross, A. J., Gunter, M. J., Wood, R. J., Pietinen, P., Taylor, P. R., Virtamo, J., Albanes, D., Sinha, R. 2006. Iron and colorectal cancer risk in the α -tocopherol, β -carotene cancer prevention study. *International Journal of Cancer*. 118 (12). 3147–3152.

- Čepička, J. 1995. *Obecná potravinářská technologie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1995, 246 s. ISBN 80-7080-239-1.
- Doležel, J. (2015). Variation in genome composition of blue-aleurone wheat. *Theoretical and applied genetics*, 128(2), 273-282.
- de Klerk, N. H., Musk, A. W., Ambrosini, G. L., Eccles, J. L., Hansen, J., Olsen, N., Watts, V. L., Lund, H. G., Pang, S. C., Beilby, J. 1998. Vitamin A and cancer prevention II: Comparison of the effects of retinol and β - carotene. *International Journal of Cancer*. 75 (3). 362–367.
- De Moura, F. F., Miloff, A., Boy, E. 2015. Retention of provitamin A carotenoids in staple crops targeted for biofortification in Africa: cassava, maize and sweet potato. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 55 (9). 1246–1269.
- Eder, R. 2000. Pigments. *Food Analysis by HPLC*. 825–880.
- Farré Martínez, G., Bai, C., Twyman, R. M., Capell Capell, T., Christou, P., Zhu, C. 2011. Nutritious crops producing multiple carotenoids—a metabolic balancing act. *Trends in Plant Science*, 2011, Vol. 16, Núm. 10, P. 532-540.
- Ferruzzi, M. G., Sander, L. C., Rock, C. L., Schwartz, S. J. 1998. Carotenoid determination in biological microsamples using liquid chromatography with a coulometric electrochemical array detector. *Analytical Biochemistry*. 256 (1). 74–81.
- Ficco, D. B. M., Mastrangelo, A. M., Trono, D., Borrelli, G. M., De Vita, P., Fares, C., Beleggia, R., Platani, C., Papa, R. 2014. The colours of durum wheat: a review. *Crop and Pasture Science*. 65 (1). 1–15.
- Fitzgerald, K. C., O'reilly, É. J., Fondell, E., Falcone, G. J., McCullough, M. L., Park, Y., Kolonel, L. N., Ascherio, A. 2013. Intakes of vitamin C and carotenoids and risk of amyotrophic lateral sclerosis: pooled results from 5 cohort studies. *Annals of Neurology*. 73 (2). 236–245.
- Fu, H. F., Xie, B. J., Fan, G., Ma, S. J., Zhu, X. R., & Pan, S. Y. 2010. Effect of esterification with fatty acid of β -cryptoxanthin on its thermal stability and antioxidant activity by chemiluminescence method. *Food Chemistry*, 122(3), 602–609.

- Fuentes, P., Pizarro, L., Moreno, J. C., Handford, M., Rodriguez-Concepcion, M., Stange, C. 2012. Light-dependent changes in plastid differentiation influence carotenoid gene expression and accumulation in carrot roots. *Plant Molecular Biology*. 79 (1–2). 47–59.
- Gajdošová, A., Štrudlík, E. 2004. Biologické, chemické a nutrično-zdravotné charakteristiky pekárskych cereálií. *Nova Biotechnologica*. 4 (1). 133–154.
- Gonzalez-Jorge, S., Ha, S.-H., Magallanes-Lundback, M., Gilliland, L. U., Zhou, A., Lipka, A. E., Nguyen, Y.-N., Angelovici, R., Lin, H., Cepela, J. 2013. Carotenoid cleavage dioxygenase4 is a negative regulator of β -carotene content in *Arabidopsis* seeds. *The Plant Cell*. 25 (12). 4812–4826.
- Gul, K., Tak, A., Singh, A. K., Singh, P., Yousuf, B., Wani, A. A. 2015. Chemistry, encapsulation, and health benefits of β -carotene-A review. *Cogent Food & Agriculture*. 1 (1). 1018696.
- Haskell, M. J. 2013. Provitamin A carotenoids as a dietary source of vitamin A. In: Provitamin A carotenoids as a dietary source of vitamin A. In S. A. Tanumihardjo (Ed.), *Carotenoids and human health*. p. 249–260. Humana press.
- Havaux, M. 2014. Carotenoid oxidation products as stress signals in plants. *The Plant Journal*. 79 (4). 597–606.
- Hlúbik, P., Opltová, L. 2004. *Vitaminy*. Praha: Grada, 2004. 232 s. ISBN 80-247-0373-4.
- Hidalgo, A., Brandolini, A., Pompei, C., Piscozzi, R. 2006. Carotenoids and tocopherols of einkorn wheat *Triticum monococcum* ssp. *monococcum* L.). *Journal of Cereal Science*, 44(2), 182–193
- Howitt, C. A., Pogson, B. J. 2006. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant, Cell & Environment*. 29 (3). 435–445.
- Hoza, I., Kramařová, D., Budínský, P. 2006. *Potravinářská biochemie II*. 1. vydání. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2006, 104 s. ISBN 80-7318-395-1.

- Chabinová, J., Zítka, O., Húska, D., Klejdus, B., Kizek, R. 2011. Optimization chromatographic isolation of anthocyanins. . Poster ze: Zborníka.
- Garg, M., Chawla, M., Chunduri, V., Kumar, R., Sharma, S., Sharma, N. K., Singh, S. P. (2016). Transfer of grain colors to elite wheat cultivars and their characterization. *Journal of Cereal Science*, 71, 138-144.
- Iwase, H. 2002. Simultaneous sample preparation for high-performance liquid chromatographic determination of Vitamin A and β -carotene in emulsified nutritional supplements after solid-phase extraction. *Analytica Chimica Acta*. 463 (1). 21–29.
- Jordán, V., Hemzalová, M. 2001. Antioxidanty: zázračné zbraně: vitaminy, minerály, stopové prvky, aminokyseliny a jejich využití pro zdravý život. Jota. ISBN: 8072171569.
- Joyard, J., Ferro, M., Masselon, C., Seigneurin-Berny, D., Salvi, D., Garin, J., Rolland, N. 2009. Chloroplast proteomics and the compartmentation of plastidial isoprenoid biosynthetic pathways. *Molecular Plant*. 2 (6). 1154–1180.
- Kahlon, T. S., Keagy, P. M. 2003. Benefits and sources of functional foods. *Cereal Foods World*.
- Karásek, F., Mrkvicová, E., Šťastník, O., Trojan, V., Vyhnánek, T., Hřivna, L., Mrázková, E. 2014. The influence of colored wheat Konini feeding on antioxidant activity parameters in rats. In: Proceeding of the International PhD Student Conference MendelNet2014. Brno: Mendel University in Brno. p. 160–162.
- Khoo, H.-E., Prasad, K. N., Kong, K.-W., Jiang, Y., Ismail, A. 2011. Carotenoids and their isomers: color pigments in fruits and vegetables. *Molecules*. 16 (2). 1710–1738.
- Knievel, D. C., Abdel-Aal, E. S., Rabalski, I., Nakamura, T., Hucl, P. (2009). Grain color development and the inheritance of high anthocyanin blue aleurone and purple pericarp in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of cereal science*, 50(1), 113-120.
- Koolman, J., Röhm, K.-H., Wirth, J., Robertson, M. 2005. Color atlas of biochemistry. Vol. 2. Thieme Stuttgart.
- Kučerová, J. Technologie cereálií, Brno. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. 2008. ISBN 978-80-7157-811-6.

- Lachman, J., Martinek, P., Kotíková, Z., Orsák, M., Šulc, M. (2017). Genetics and chemistry of pigments in wheat grain – A review. *Journal of Cereal Science*, 74, 145-154.
- Lachman, J., Hejtmánková, K., Kotíková, Z. 2013. Tocols and carotenoids of einkorn, emmer and spring wheat varieties: Selection for breeding and production. *Journal of Cereal Science*, 57(2), 207–214.
- Lakshminarayana, R., Raju, M., Krishnakantha, T. P., Baskaran, V. 2005. Determination of major carotenoids in a few Indian leafy vegetables by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 (8). 2838–2842.
- Leenhardt, F., Lyan, B., Rock, E., Boussard, A., Potus, J., Chanliaud, E., Remesy, C. 2006. Wheat lipoxygenase activity induces greater loss of carotenoids than vitamin E during breadmaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54 (5). 1710–1715.
- Ligor, M., Buszewski, B. 2012. Study of Xanthophyll Concentration in Spinach Leaves by Means of HPLC Coupled with UV–VIS and Corona CAD Detectors. *Food Analytical Methods*. 5 (3). 388–395.
- Martinek, P., Coufalová, O., Kurečka, R., Nováková, E., Mikulcová, J. (2006). Netradiční barva obilok pšenice (*Triticum aestivum*, L.), její genetická podmíněnost a možnost využití v potravinářství. *Nové poznatky z genetiky a šlechtění polnohospodářských rostlin*, 95-98.
- Masisi, K., Diehl-Jones, W. L., Gordon, J., Chapman, D., Moghadasian, M. H., & Beta, T. 2015. Carotenoids of aleurone, germ, and endosperm fractions of barley, corn and wheat differentially inhibit oxidative stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(10), 2715–2724.
- Mattera, M. G., Hornero-Méndez, D., Atienza, S. G. 2017. Lutein ester profile in wheat and tritordeum can be modulated by temperature: Evidences for regioselectivity and fatty acid preferential of enzymes encoded by genes on chromosomes 7D and 7Hch. *Food Chemistry*. 219 . 199–206.
- McGray, K. J., Hill, G. E. 2006. Mechanics of carotenoid-based coloration. *Bird Coloration*. 1 . 177–242.

- Mellado-Ortega, E., Hornero-Méndez, D. 2012. Isolation and identification of lutein esters, including their regioisomers, in tritordeum (\times Tritordeum Ascherson et Graebner) grains: evidence for a preferential xanthophyll acyltransferase activity. *Food Chemistry*. 135 (3). 1344–1352.
- Mellado-Ortega, E., Atienza, S. G., & Hornero-Méndez, D. 2015. Carotenoid evolution during postharvest storage of durum wheat (*Triticum turgidum* conv. durum) and tritordeum (\times Tritordeum Ascherson et Graebner) grains. *Journal of Cereal Science*, 62, 134–142
- Michalová, A., Hutař, M. 1998. Pohánka setá. *Výž. Potrav.* 53 . 11–12.
- Michaud, D. S., Feskanich, D., Rimm, E. B., Colditz, G. A., Speizer, F. E., Willett, W. C., Giovannucci, E. 2000. Intake of specific carotenoids and risk of lung cancer in 2 prospective US cohorts-. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 72 (4). 990–997.
- Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W., Biochemistry, H. I. 2003. a LANGE medical book. Harper's Illustrated Biochemistry. 26th Ed. New York: McGraw-Hill Companies, Inc.
- Ndolo, V. U., Beta, T. 2013. Distribution of carotenoids in endosperm, germ, and aleurone fractions of cereal grain kernels. *Food Chemistry*, 139(1–4), 663–671.
- Neel, D. V, Hoseney, R. C. 1984. Factors affecting flowability of hard and soft wheat flours. *Cereal Chem.* 61 (4). 262–266.
- Nisar, N., Li, L., Lu, S., Khin, N. C., Pogson, B. J. 2015. Carotenoid metabolism in plants. *Molecular Plant*. 8 (1). 68–82.
- O'neill, M. E., Carroll, Y., Corridan, B., Olmedilla, B., Granado, F., Blanco, I., Van den Berg, H., Hininger, I., Rousell, A.-M., Chopra, M. 2001. A European carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five-country comparative study. *British Journal of Nutrition*. 85 (4). 499–507.
- Paulová, H., Bochořáková, H. 2004. METODY STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY PŘÍRODNÍCH LÁTEK IN VITRO. *Chem. Listy*. 98 . 174–179.

- Paznocht, L., Kotíková, Z., Šulc, M., Lachman, J., Orsák, M., Eliášová, M., & Martinek, P. 2018. Free and esterified carotenoids in pigmented wheat, tritordeum and barley grains. *Food chemistry*, 240, 670-678.
- Pozniak, C. J., Knox, R. E., Clarke, F. R., & Clarke, J. M. (2007). Identification of QTL and association of a phytoene synthase gene with endosperm colour in durum wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 114(3), 525-537.
- Pazdera, J. et al. Pěstování rostlin: Obilniny - cvičení [online]. Praha. ČZU, 2006
- [cit. 2016-01-05]. Dostupné z <http://etext.czu.cz/sekce.php?titul_key=81&id=detail>.
- Priyadarshani, A. M. B., Jansz, E. R. 2014. A critical review on carotenoid research in Sri Lankan context and its outcomes. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 54 (5). 561–571.
- Příhoda, J., Skřivan, P., Hrušková, M. 2006. Cereální chemie a technologie I: cereální chemie, mlýnská technologie, technologie výroby těstovin. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2004. 203 s. ISBN 80-7080-530-7.
- Ramel, F., Birtic, S., Ginies, C., Soubigou-Taconnat, L., Triantaphylidès, C., Havaux, M. 2012. Carotenoid oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109 (14). 5535–5540.
- Réblová, Z. 2011. Vliv vnějších faktorů na aktivitu antioxidantů. *Chem. Listy*. 105 . 667–673.
- Rodriguez-Amaya, D. B. 2001. A guide to carotenoid analysis in foods. ILSI press Washington, DC. ISBN: 1578810728.
- Rodriguez-Amaya, D. B., Kimura, M. 2004. HarvestPlus handbook for carotenoid analysis. Vol. 2. International Food Policy Research Institute (IFPRI) Washington.
- Rodríguez-Suárez, C., Giménez, M. J., Atienza, S. G. 2010. Progress and perspectives for carotenoid accumulation in selected Triticeae species. *Crop and Pasture Science*. 61 (9). 743–751.
- Saini, R. K., Nile, S. H., Park, S. W. 2015. Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry,

- analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. *Food Research International*. 76 . 735–750.
- Saini, R. K., Shetty, N. P., Prakash, M., Giridhar, P. 2014. Effect of dehydration methods on retention of carotenoids, tocopherols, ascorbic acid and antioxidant activity in *Moringa oleifera* leaves and preparation of a RTE product. *Journal of Food Science and Technology*. 51 (9). 2176–2182. doi: 10.1007/s13197-014-1264-3.
- Send, R., Sundholm, D. 2007. The role of the β -ionone ring in the photochemical reaction of rhodopsin. *The Journal of Physical Chemistry A*. 111 (1). 27–33.
- Shumbe, L., Bott, R., Havaux, M. 2014. Dihydroactinidiolide, a high light-induced β -carotene derivative that can regulate gene expression and photoacclimation in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*. 7 (7). 1248–1251.
- Sies, H., Stahl, W. 2004. Carotenoids and UV protection. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 3 (8). 749–752.
- Stahl, W., Sies, H. 1992. Uptake of lycopene and its geometrical isomers is greater from heat-processed than from unprocessed tomato juice in humans. *The Journal of Nutrition*. 122 (11). 2161–2166.
- Stahl, W., Sies, H. 2005. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 1740 (2). 101–107.
- Stranský, M., Kohout, P. 2015. Aktualizace Referenčních hodnot pro příjem živin DACH. *Výživa a Potraviny*. 90–91.
- Su, L., Diretto, G., Purgatto, E., Danoun, S., Zouine, M., Li, Z., Roustan, J.-P., Bouzayen, M., Giuliano, G., Chervin, C. 2015. Carotenoid accumulation during tomato fruit ripening is modulated by the auxin-ethylene balance. *BMC Plant Biology*. 15 (1). 114.
- Subagio, A., Wakaki, H., Morita, N. 1999. Stability of lutein and its myristate esters. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 63(10), 1784–1786.
- Svensson, P. A., Wong, B. B. M. 2011. Carotenoid-based signals in behavioural ecology: a

- review. *Behaviour*. 148 (2). 131–189.
- Szpylka, J., DeVries, J. W. 2005. Determination of β -carotene in supplements and raw materials by reversed-phase high pressure liquid chromatography: Collaborative study. *Journal of AOAC International*. 88 (5). 1279–1291.
- Šivel, M., Klejdus, B., Kráčmar, S., Kubáň, V. 2013. Lutein–Významný karotenoid ve výživě člověka. *Chemické Listy*. 107 . 456–463.
- Topping, D. 2007. Cereal complex carbohydrates and their contribution to human health. *Journal of Cereal Science*. 46 (3). 220–229.
- Trojan, V., Milena, M., Vyhnánek, T., Havel, L. 2011. THE GENETIC VARIABILITY OF COLOURED GRAIN WHEAT.
- Velíšek, J. 1999. *Chemie potravin 3*. Tábor, 1. vydání, : ISBN 80-902391-5-3.
- Velíšek, J., Cejpek, K. 2008. *Biosynthesis of food components*. Tábor: ISBN 978-80-86659-12-1.
- Von Lintig, J., Vogt, K. 2000. Filling the gap in vitamin a research molecular identification of an enzyme cleaving β -carotene to retinal. *Journal of Biological Chemistry*. 275 (16). 11915–11920.
- Walter, M. H., Stauder, R., Tissier, A. 2015. Evolution of root-specific carotenoid precursor pathways for apocarotenoid signal biogenesis. *Plant Science*. 233 . 1–10.
- Welsch, R., Beyer, P., Hugueney, P., Kleinig, H., Von Lintig, J. 2000. Regulation and activation of phytoene synthase, a key enzyme in carotenoid biosynthesis, during photomorphogenesis. *Planta*. 211 (6). 846–854.
- Wyss, A. 2004. Carotene oxygenases: a new family of double bond cleavage enzymes. *The Journal of Nutrition*. 134 (1). 246S–250S.
- Yamaguchi, M. 2010. *Carotenoids: Properties, Effects, and Diseases*. Nova Science Publishers. ISBN: 1612097138.
- Žilić, S., Šukalović, V. H.-T., Dodig, D., Maksimović, V., Maksimović, M., Basić, Z. 2011.

Antioxidant activity of small grain cereals caused by phenolics and lipid soluble antioxidants. *Journal of Cereal Science*. 54 (3). 417–424.

Ziegler, J. U., Wahl, S., Würschum, T., Longin, C. F. H., Carle, R., Schweiggert, R. M. 2015. Lutein and lutein esters in whole grain flours made from 75 genotypes of 5 *Triticum* species grown at multiple sites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(20), 5061–5071

Zimolka, J. a kol. (2005). Pšenice, pěstování, hodnocení a užití zrna. *Nakladatelství Profi Press, sro Praha, 180*.

10 Seznam použitých zkratek a symbolů

BHT- butylhydroxytoluen

β -LCY - enzym lykopen- β -cykláza

CRTISO - enzym karotenoidníisomeráza

EC - extinkční koeficient

ε -LCY - enzym lykopen- ε -cykláza

GGPP – geranylgeranyldifosfát

H₂O – voda

MeOH – methanol

PSY – enzym fytoensyntáza

PDS - enzym lykopensaturáza

TBME - *tert*-butylmethyl ether

ZDS - enzym zeta-karoten desaturáza

Z-ISO - enzym zeta-karoten someráza

11 Přílohy

Seznam příloh:

Příloha 1 Statistické vyhodnocení výsledků - dvoufaktorová ANOVA ($\alpha=0,05$)

Příloha 2 Statistické vyhodnocení vlivu odrůdy (a), ročníku sklizně (b) a barvy zrna (c) – Tukeyův HSD test

Příloha 3 Naměřené hodnoty esterů karotenoidů za rok 2015 a 2016