

**ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE**  
**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra chemie**



**Anthokyany pšenice s barevným  
zrnem**

doktorská disertační práce

Autor: Ing. Marie Hemmrová

Školitel: prof. Ing. Jaromír Lachman, CSc.

Konzultant: Ing. Miloslav Šulc, Ph.D., Ing. Zora Kotíková, Ph.D.

Praha, 2021

## **ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma „Anthokyany pšeníc s barevným zrnem“ vypracovala samostatně, že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu a že nebyla porušena autorská práva třetích osob.

V Praze dne .....

.....

Podpis autora

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych na tomto místě poděkovala všem, kteří se podíleli na výzkumu, jehož výstupem je i tato disertační práce, která by bez jejich přispění nemohla vzniknout. Na prvním místě bych chtěla poděkovat vedoucímu mé disertační práce prof. Ing. Jaromíru Lachmanovi, CSc. za odborné vedení práce, za trpělivost, podporu, rady a za veškerou pomoc, kterou mně během psaní práce a celého studia poskytl. Ráda bych také poděkovala konzultantům práce, Ing. Miloslavu Šulcovi, PhD. za pomoc a rady při vývoji analytických metod, a Ing. Zoře Kotíkové, PhD. za trpělivost, pomoc a četné rady při výzkumu a publikaci výsledků.

Velký dík patří také Ing. Petru Martinkovi, CSc., který byl významnou hnací silou celého výzkumu a bez jehož intenzivní šlechtitelské činnosti by výzkum barevných genotypů pšenice vůbec nebyl možný. Děkuji též všem kolegům z Katedry chemie, kteří mi při práci poskytovali pomoc a podporu, zejména Ing. Luboši Paznochtovi, PhD. za rozsáhlou pomoc při analýzách vzorků, Ing. Vladimíru Pivcovi, CSc. za rady a pomoc při vývoji analytických metod a Ing. Matyáši Orsákovi, PhD, za pomoc na jednotlivých experimentech. Dík patří také spolukolegům z Katedry rostlinné výroby, jmenovitě prof. Ing. Ivaně Capouchové, CSc., Ing. Monice Zrckové, PhD. a Ing. Aleně Škeříkové za poskytnutí vzorků pšenic pro dílčí část výzkumu.

Velké poděkování patří i všem těm, kteří se na výzkumu a tvorbě této práce podíleli nepřímou a poskytovali mi zejména psychickou podporu, cenné rady a pomoc po celou dobu mého studia. Z mých kolegů a přátel si poděkování zaslouží zejména Ing. Kamil Kraus, Ing. Klára Podhorecká, Ing. Štěpánka Nedvědová a Ing. Jana Culková, bez jejichž podpory bych nezískala motivaci a odhodlání k dokončení studia. Závěrečný dík patří i všem mým nejbližším a nejdražším, především mému skvělému manželovi Honzovi, mamince Hance a sestře Báře bez jejichž psychické podpory bych byla už dávno členem zcela jiného ústavu...

## **POZNÁMKA K CHEMICKÉMU NÁZVOSLOVÍ**

Text disertační práce využívá pro pojmenování anthokyanů termíny odvozené z názvosloví platného pro anglický jazyk, které neodpovídá pravidlům českého názvosloví. Např. správné pojmenování 3-*O*-glukosid kyanidinu, či kyanidin-3-*O*-glukosid je v textu práce označován pouze jako kyanidin-3-glukosid. Tento způsob pojmenování anthokyanů byl zvolen pro větší přehlednost psaného textu. Zvláště v kapitole Výsledky a diskuse je v textu vysoká četnost názvů anthokyanů a psaná forma odpovídající zásadám českého chemického názvosloví by text činila hůře srozumitelným a méně přehledným.

## OBSAH

1.	LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	3
1.1.	Úvod.....	3
1.2.	Chemie anthokyanů .....	4
1.2.1.	Vliv pH.....	6
1.2.2.	Stabilita .....	8
1.3.	Biosyntéza anthokyanů .....	10
1.4.	Výskyt a význam anthokyanů v rostlinách .....	13
1.5.	Anthokyaniny v potravinách.....	14
1.6.	Zdravotní účinky anthokyanů .....	16
1.7.	Extrakce a analýza anthokyanů.....	19
1.8.	Anthokyaniny v pšenici .....	21
1.8.1.	Možnosti zpracování a využití pšenice s barevným zrnem .....	23
2.	CÍLE A HYPOTÉZY PRÁCE .....	28
3.	METODIKA PRÁCE.....	29
3.1.	Materiál .....	29
3.2.	Metody .....	31
3.2.1.	Metody pro stanovení anthokyanů.....	31
3.2.2.	Metoda pro stanovení antioxidační aktivity.....	34
3.2.3.	Stanovení sušiny .....	34
3.2.4.	Metody pro jednotlivé experimenty .....	34
3.3.	Statistická analýza.....	37
4.	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	38
4.1.	Validace analytických metod.....	38
4.1.1.	UHPLC-MS metoda.....	39
4.1.2.	Spektrofotometrická metoda .....	41
4.1.3.	Metoda pro stanovení antioxidační aktivity.....	42
4.2.	Analýza pšenice s barevným zrnem .....	44

4.2.1.	Obsahy anthokyanů v barevných genotypch pšenice .....	44
4.2.2.	Anthokyany pšeníc s purpurovým zrnem .....	51
4.2.3.	Anthokyany pšeníc s modrým zrnem .....	52
4.2.4.	Anthokyany pšeníc s černým zrnem.....	54
4.2.5.	Vliv vybraných parametrů na obsah anthokyanů .....	55
4.2.6.	Stanovení antioxidační aktivity .....	57
4.3.	Změny anthokyanů vlivem skladování.....	63
4.4.	Změny anthokyanů vlivem zpracování.....	67
4.4.1.	Pečení.....	67
4.4.2.	Vaření.....	74
4.4.3.	Extruze .....	85
4.4.4.	Pufování.....	91
4.4.5.	Souhrnné výsledky zpracování .....	96
5.	ZHODNOCENÍ CÍLŮ A HYPOTÉZ PRÁCE .....	99
6.	ZÁVĚR A DOPORUČENÍ PRO PRAXI .....	103
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	107
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	124
	SEZNAM TABULEK .....	127
	SEZNAM GRAFŮ .....	128
	SEZNAM OBRÁZKŮ .....	129
	SEZNAM AUTORSKÝCH PUBLIKACÍ.....	130
	PŘÍLOHA.....	I

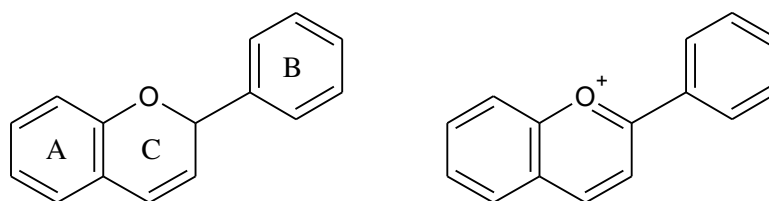
# 1. LITERÁRNÍ PŘEHLED

## 1.1. Úvod

Anthokyany jsou rozsáhlou skupinou rostlinných barviv poskytující širokou škálu barev od oranžové a červené až po fialovou a modrou. Jejich název pochází z řeckých slov *anthos* (květ) a *kyanos* (modrý). Jak již jejich název napovídá, anthokyany zbarvují květy, ale také jiné části rostlinných těl. Pro jejich velké rozšíření v rostlinné říši jsou i neodmyslitelnou součástí lidské stravy, nejčastěji jako složka ovoce a zeleniny. Ze spotřebitelského hlediska je atraktivní zejména jejich pozitivní efekt na lidské zdraví, neboť anthokyany jsou přirozenými antioxidanty, a jejich benefit tak spočívá v prevenci celé řady civilizačních chorob. Pro své účinky jsou antioxidanty v poslední době stále častěji vyhledávanou složkou stravy a důraz je kladen zejména na jejich přirozené potravinové zdroje. V tomto ohledu však zůstávají v pozadí další komodity s obsahem anthokyanů, jejichž nutriční benefity v této oblasti stále nejsou dostatečně doceněny. V první řadě se jedná o obiloviny s přirozeným výskytem anthokyanů v obilkách, které představují zajímavou alternativu konvenčních druhů obilovin, a měly by tak potenciál stát se dalším významným zdrojem anthokyanů v lidské stravě. Vývoj odrůd obilovin s obsahem anthokyanů je v současné době předmětem intenzivní šlechtitelské práce, jejímž cílem je nejen získání nových genotypů, které budou mít vysoký obsah anthokyanů, ale zároveň i takových odrůd, které budou mít dostatečně vhodné výnosové a kvalitativní charakteristiky, které přispějí k jejich konkurenceschopnosti a možnosti rozšíření na trhu s konvenčními obilovinami.

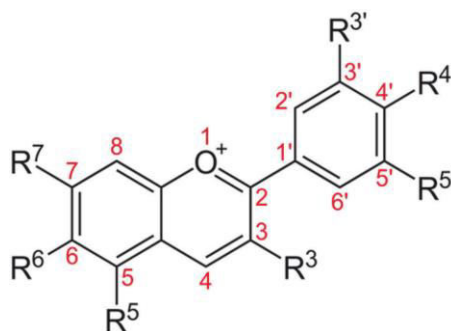
## 1.2. Chemie anthokyanů

Z chemického hlediska se anthokyanany řadí do skupiny flavonoidů. Základní strukturou těchto látek je tzv. flavan, který je tvořen jedním heterocyklickým (C) a jedním aromatickým (A) jádrem, spolu s aromatickým jádrem (B) spojeným C – C vazbou s řetězcem C (viz obr. 1). Jednotlivé skupiny flavonoidů se vzájemně odlišují stupněm oxidace středního C řetězce. Základem anthokyanů je flavan obsahující systém konjugovaných dvojných vazeb nazývaný se flavyliový kationt (viz obr. 1). Flavyliový kationt tvoří základ tzv. aglykonu, který se nazývá anthokyanidin (Miguel 2011).



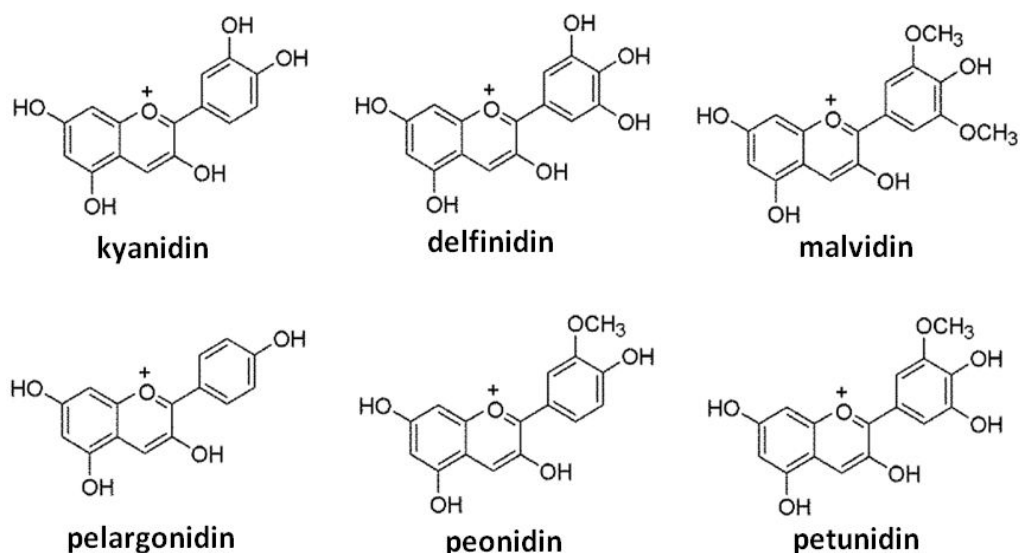
**Obr. 1** Flavan (vlevo) a flavyliový kationt (vpravo) (podle: Miguel 2011)

Jednotlivé anthokyanidiny se vzájemně odlišují hydroxylací či methoxylací na různých místech struktury, nejčastěji na pozicích 3, 5, 7 a 3', 4' a 5' (viz obr. 2). V přírodě se vyskytuje celkem 17 různých typů anthokyanidinů (někteří autoři uvádí až 23 typů), které jsou pomyslně děleny do dvou skupin, na methylované a nemethylované. Nejdůležitějších a nejběžnějších je 6 základních anthokyanidinů: kyanidin, delphinidin, pelargonidin, peonidin, petunidin a malvidin (viz obr. 3). V přírodě se častěji vyskytují hydroxylované nemethylované aglykony a jejich deriváty – tedy kyanidin (50 %), delphinidin (12 %) a pelargonidin (12 %). Oproti tomu methylované aglykony a jejich deriváty tvoří spíše minoritní složku přirozeně se vyskytujících anthokyanidinů – peonidin 12 %, petunidin 7 % a malvidin 7 %. Základní barva anthokyanidinu ve formě flavyliového kationtu závisí na druhu substituentu. Přítomnost hydroxylových skupin posouvají odstín do fialova až purpurova, přítomnost methoxylových skupin spíše do růžova až červena (Castaneda-Ovando et al. 2009; Miguel 2011; Francavilla & Joye 2020).



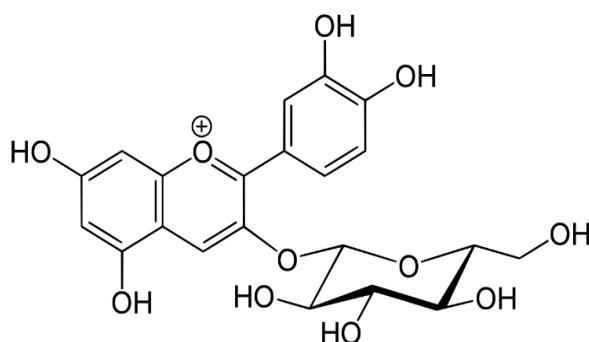
**Obr. 2** Flavyliový kation s označením substitučních pozic (Khoo et al. 2017)





**Obr. 3** Nejběžnější anthokyany (podle: Khoo et al. 2017)

Aglykony ve volné formě se však v přírodních materiálech nachází jen ve stopovém množství, neboť mají velmi nízkou stabilitu. Základním mechanismem stabilizace, který umožňuje jejich výskyt ve volném prostředí, je glykosylace. Glykosylovaný anthokyanidin se nazývá anthokyan. Glykosylací základních 17 (resp. 23) anthokyanidinů vzniká až 500 různých anthokyanů. Primárně je glykosylace téměř vždy lokalizována na pozici C3 a účastní se jí mono-, di- nebo trisacharidy. Nejčastěji vytváří glykosidy glukóza, rhamnóza, galaktóza, xylóza, arabinóza (vznikají monosidy) a rutinóza (vznikají biosidy). Anthokyany mohou mít též formu diglykosidů, kdy je jeden aglykon glykosylován dvěma sacharidy, zpravidla v pozicích C3 a C5, nebo C3 a C7. Zcela nejčastějším anthokyanem je kyanidin-3-glukosid, viz obr. 4. Glykosylace posouvá barevný odstín anthokyanu blíže k modré barvě (Castaneda-Ovando et al. 2009, Miguel 2011).



**Obr. 4** Kyanidin-3-glukosid (Miguel 2011)

Všechny anthokyany jsou rozpustné ve vodě a také ve většině organických rozpouštědel (např. v ethanolu). Nejlepší rozpustnost vykazují molekuly ve formě

flavyliového kationtu. Rozpustnost konkrétních anthokyanů však závisí také na jejich polaritě. Nejlépe rozpustným aglykonem je delphinidin, který se velmi dobře rozpouští ve vodě i v organických rozpouštědlech (hlavně v methanolu a ethanolu). Oproti tomu kyanidin se rozpouští stejně dobře ve vodě, ale o něco hůře v organických rozpouštědlech. Naopak nejhůře rozpustným aglykonem v organických rozpouštědlech je nejméně polární aglykon malvidin, který se však velmi dobře rozpouští ve vodě (Khoo et al. 2017).

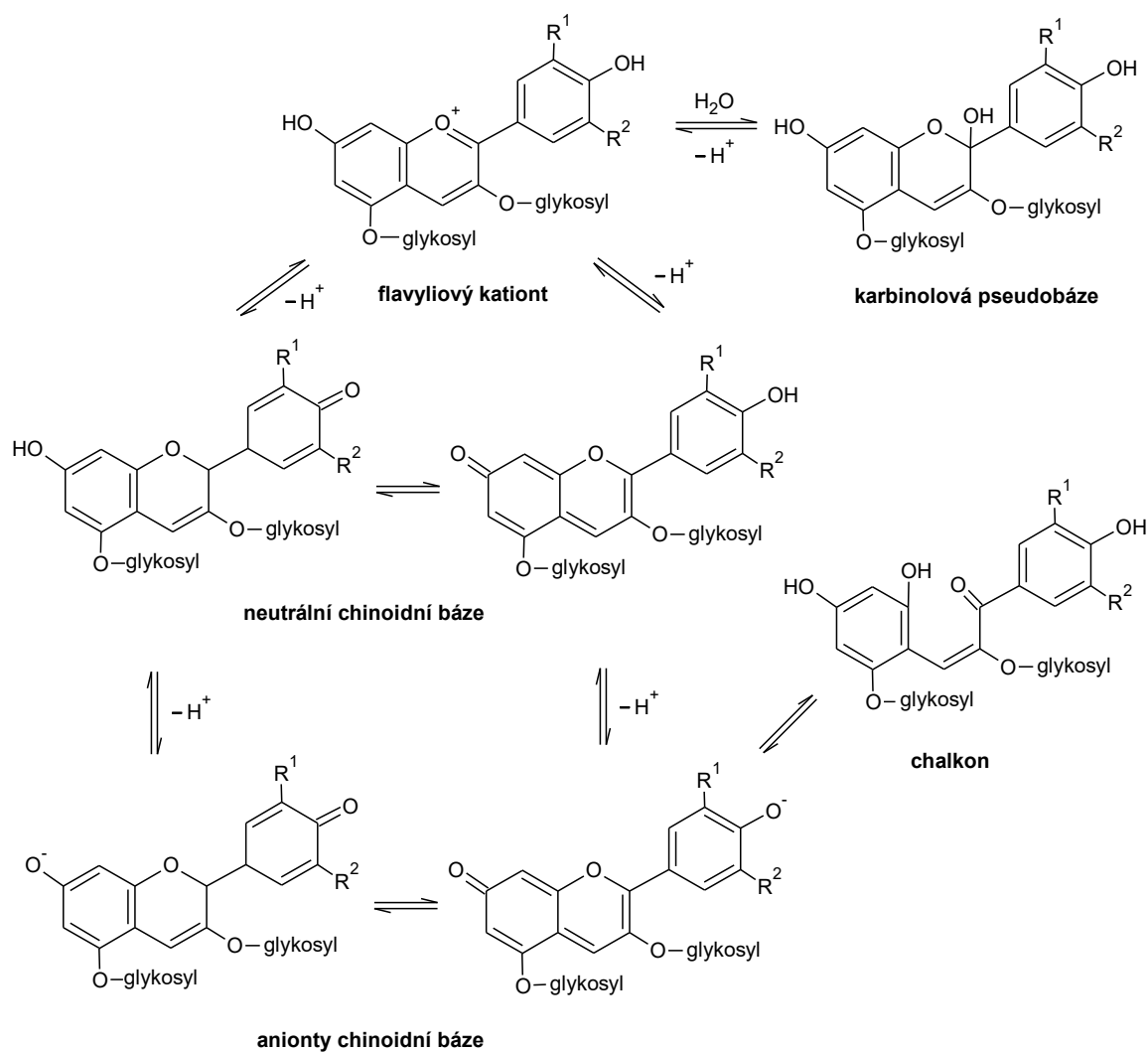
### 1.2.1. Vliv pH

Ve vodném prostředí podléhají anthokyaniny strukturním změnám podle pH roztoku. Existuje celkem 5 forem struktury, přičemž v roztoku se při neměnném pH mohou vyskytovat všechny formy současně, ale v konkrétním rozmezí pH většinou jedna forma převažuje. S měnící se strukturou se také mění barva anthokyanu (Khoo et al. 2017). Tab. 1 uvádí přehled forem anthokyanů včetně jejich barvy a oblasti pH, v níž je daná forma dominantní. Na obr. 5 je pak znázorněna vzájemná přeměna jednotlivých struktur.

**Tab. 1** Formy struktury anthokyanů ve vodném prostředí

<b>forma struktury</b>	<b>barva</b>	<b>dominance v oblasti pH</b>
flavyliový kationt	červená	< 1 – 2
karbinolová pseudobáze	bezbarvá	4,0 – 4,5
neutrální chinoidní báze	purpurově-červená	2 – 4; 4,5 – 7
aniont chinoidní báze	modrá	7,5 – 11
chalkon	žlutá	> 11

podle: Castaneda-Ovando et al. 2009; Khoo et al. 2017



**Obr. 5** Přeměny struktur anthokyanů (Velíšek & Hajšlová 2009)

Při nejnižších hodnotách pH < 1 existují anthokyany v roztoku výhradně ve formě flavyliového kationtu, který je zároveň nejstabilnější anthokyanovou strukturou. Barva anthokyanů v této formě je jasně červená. Při zvyšování pH podle Velíška a Hajšlové (2009) vzrůstá podíl karbinolové pseudobáze, která je dominantní v oblasti pH 4,0 – 4,5 a je bezbarvá. Při dalším zvyšování pH v roztoku začíná dominovat purpurově-červená neutrální chinoidní báze, která se při pH okolo 7,5 přeměňuje na modrý aniont chinoidní báze a při dalším zvýšení pH dominuje již pouze žlutý chalkon.

Odlišně popisují změny strukturálních forem Castaneda-Ovando et al. (2009). Podle těchto autorů je flavyliový kationt dominantní při pH < 1 a v rozmezí hodnot pH 2 – 4 dominuje červená neutrální chinoidní forma. Při pH 5 – 6 anthokyany existují pouze ve formě karbinolové pseudobáze a zároveň chalkonu. Pokud se pH zvýší nad 7, anthokyany degradují a rozpadají se za vzniku aldehydu a fenolické kyseliny.

Karbinolová a chinoidní forma při okyselení kvantitativně přechází opět do formy flavyliového kationtu. Oproti tomu přeměna na chalkon je již určitou formou degradace barviva, neboť tato struktura se sice také může zpětně měnit na flavyliový kationt, ovšem přeměna je pomalá a není kvantitativní (Velíšek & Hajšlová, 2009).

### **1.2.2. Stabilita**

Stabilita anthokyanů bývá nízká a je ovlivněna různými faktory. Klíčovými faktory jsou především pH prostředí, teplota, přítomnost kyslíku a světla a vliv enzymů (zejména glykosidáz a polyfenoloxidáz). Tyto faktory zároveň ovlivňují výslednou barvu anthokyanu, neboť jejich působením může barvivo degradovat za tvorby jinak barevných či bezbarvých produktů. Zvláštní postavení v tomto ohledu má vliv pH, s jehož změnou dochází ke změnám struktury, barvy a zároveň i stability anthokyanu (Castaneda-Ovando et al. 2009; Francavilla & Joye 2020). Oproti tomu existuje řada mechanismů, které stabilitu anthokyanů zvyšují. Jedná se o proces již zmíněné glykosylace a dále pak mechanismy acylace nebo kopigmentace.

#### **1.2.2.1. Faktory zvyšující stabilitu**

Jedním mechanismem zvyšujícím stabilitu již glykosylovaného anthokyanidinu je acylace. V rámci acylace je na hydroxylovou skupinu glykosylujícího sacharidu navázána organická kyselina. Nejčastěji se jedná o fenolické kyseliny (p-kumarovou, kávovou, ferulovou nebo sinapovou) či o jiné organické kyseliny resp. jejich anionty – acetát (kyselina octová), sukcinát (kyselina jantarová) či malonát (kyselina malonová). Acylací se zvyšuje stabilita anthokyanové molekuly (Welch et al. 2009).

Zvláštním stabilizačním mechanismem je kopigmentace. Jedná se o zvýšení stability anthokyanů vazbou s dalšími látkami různého typu, např. s flavonoidy, alkaloidy, organickými kyselinami nebo kovovými ionty. Kopigmentace je přirozeným a spontánním procesem, který je zřejmě nejdůležitějším mechanismem stabilizace anthokyanů v rostlinách. Ke kopigmentaci dochází nejvíce v rozmezí pH 4 – 6 a vznikající komplexy jsou zbarveny výrazněji než samotné anthokyany, neboť dochází vlivem reakce ke změně spektrálních vlastností barviva, a to zejména k hyperchromnímu efektu a bathochromnímu posunu. Kopigmentací mohou být stabilizovány různé formy anthokyanů, např. kopigmentace při nízkém pH stabilizuje flavyliový kationt a dává vznik komplexu výrazně červené barvy, zatímco stejná reakce při vyšším pH (okolo 6) stabilizuje chinoidní bázi a poskytuje modře zbarvené komplexy. Komplexace probíhá více mechanismy, nejčastěji intermolekulárně, kde hrají roli kovalentní vazby mezi glykosidy dvou molekul, a

intramolekulárně, kde jsou podstatou slabé hydrofobní interakce. Vedle těchto dvou mechanismů se v rostlinách běžně uplatňuje i kopigmentace s kovovými ionty. Tvorba komplexů s ionty  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  nebo  $\text{Al}^{3+}$  je považována za hlavní mechanismus vzniku modré barvy v rostlinách, neboť tyto kovy stabilizují anthokyaniny ve formě chinoidní báze (Castaneda-Ovando et al. 2009). Kopigmentace významně zvyšuje rezistenci molekuly anthokyaninu vůči hydrataci, a umožňuje tak jeho existenci v rostlinných pletivech, ovšem nezlepšuje nijak jeho citlivost na teplo a světlo (Welch et al. 2009).

#### **1.2.2.2. Faktory snižující stabilitu**

Samotné anthokyaniny a zvláště anthokyanidiny jsou obecně nestabilní sloučeniny. K jejich zvýšené degradaci dochází vlivem teploty, přítomností kyslíku a činností enzymů při současném vlivu pH prostředí. Nejvyšší stabilitu vykazují anthokyaniny při pH do 4 za nepřístupu světla, kyslíku a tepla (Castaneda-Ovando et al. 2009). Ovšem v přítomnosti kyslíku je anthokyanin stabilní pouze do hodnoty pH 2. Vysoké teploty vyvolávají rozkladné reakce – už při působení teploty 35 °C může být degradace dvojnásobná oproti degradaci za stejných podmínek při 25 °C. Problematická je také přítomnost enzymů. Nejčastějšími enzymy působící degradaci anthokyaninů jsou glykosidázy, které štěpí barvivo za vzniku nestabilního aglykonu, a polyfenoloxidázy, které dávají vznik produktům reakcí enzymatického hnědnutí (Khoo et al. 2017).

Ovšem vliv teploty na stabilitu anthokyaninů nemusí být vždy jednoznačný. Vysoké teploty mohou zároveň vyvolávat kondenzaci barviv za vzniku oligomerů, které jsou stabilnější než monomery. Tímto mechanismem za současné změny barvy bývají anthokyaniny často konzervovány při zpracování ovoce (Velíšek & Hajšlová, 2009). Navíc působení teplot okolo 50 °C může rovněž působit konzervačně, neboť při tomto opracování dochází k inaktivaci enzymů, které jsou jinak dalším původcem degradace anthokyaninů (Khoo et al. 2017). Vliv teploty je blíže popsán v kap. 1.5 v rámci tepelného zpracování potravin s obsahem anthokyaninů.

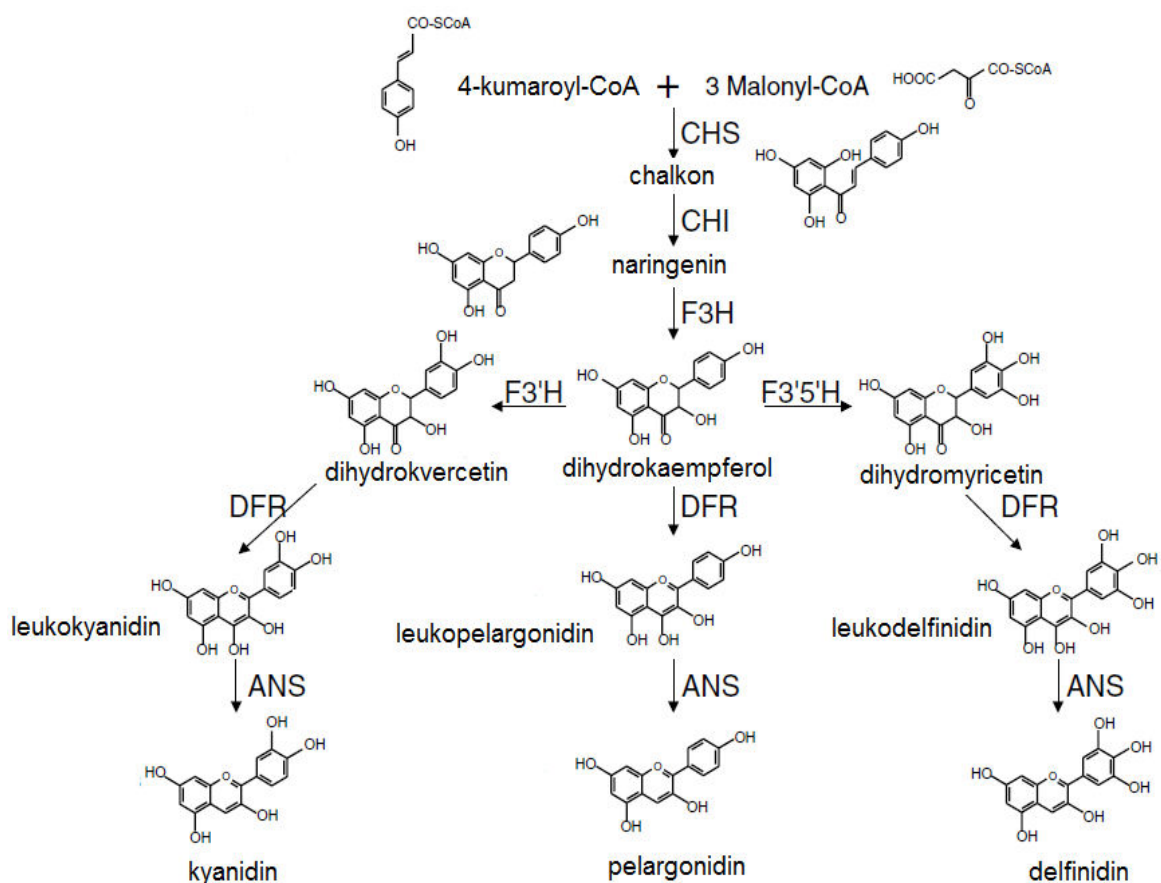
### 1.3. Biosyntéza anthokyanů

Podobně jako u mnohých fenolických sloučenin vychází i biosyntéza anthokyanů z kyseliny šikimové. Tato biosyntetická dráha – tzv. šikimátová cesta se vyskytuje pouze v metabolismu rostlin, bakterií, parazitů a hub. Kyselina šikimová je pak výchozím substrátem tvorby aromatických aminokyselin – fenylalaninu, tyrosinu a tryptofanu. Pro samotnou syntézu anthokyanů (respektive jejich aglykonů anthokyanidinů) má význam pouze fenylalanin, který je prekurzorem pro vznik naringeninů, z kterého jsou následně odvozeny jednotlivé anthokyanidiny. Biosyntéza anthokyanů probíhá v cytosolu buňky a výsledné produkty se kumulují ve vakuolách (Tanaka et al. 2008).

Celý proces biosyntézy začíná biosyntézou šikimátu. Prvním krokem biosyntézy je spojení fosfoenolpyrohroznové kyseliny s erytróza-4-fosfátem. Z nich vzniká 3-deoxy-d-arabino-heptulozonát-7-fosfát, který se v dalším kroku mění na 3-dehydrochinát. Následná reakce je katalyzována bifunkčním enzymem za vzniku šikimátu. Ten se postupnou reakcí mění až na chorizmát, který je klíčovým prekurzorem tvorby anthokyanů (a flavonoidů obecně). Z chorizmátu se vytváří prefenát a z něj dvěma možnými cestami (přes arogenát nebo fenylpyruvát) vzniká fenylalanin (Tzin & Gallili 2010).

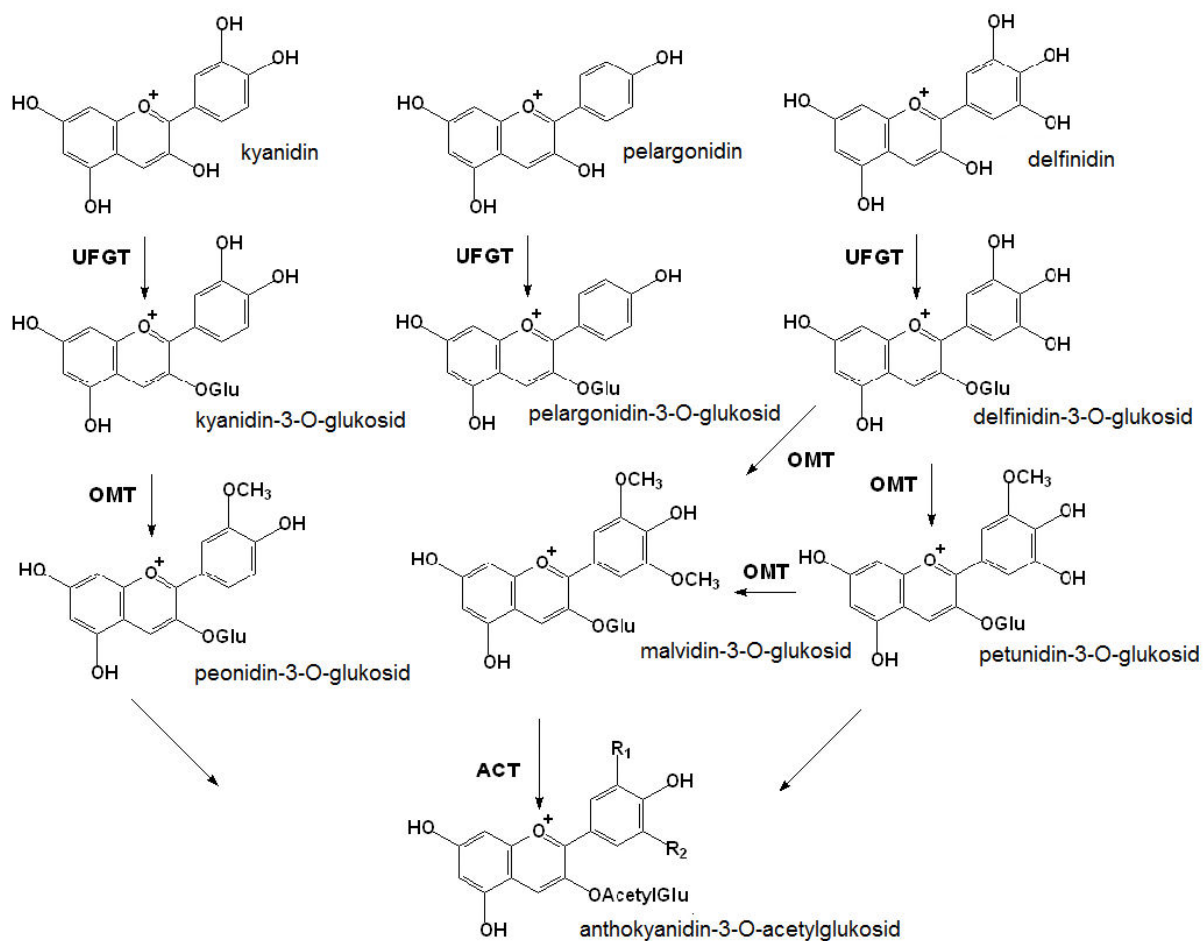
Biosyntéza flavonoidů z fenylalaninu je zahájena jeho přeměnou na kyselinu skořicovou a dále postupnou přeměnou na kyselinu p-kumarovou až na 4-kumaroyl-CoA. Za klíčový enzym syntézy flavonoidů je považována *chalkon syntáza* (CHS), která katalyzuje kondenzaci 4-kumaroyl-CoA s třemi molekulami malonyl-CoA za vzniku chalkonu. Příмым prekurzorem flavonoidů je pak naringenin vznikající izomerací chalkonu (Delgado-Vargas & Paredes-López 2002; Zhang et al. 2014).

Vlastní syntéza anthokyanů z naringeninů může probíhat třemi různými cestami, z nichž každá vede ke vzniku jiného metabolitu (nejprve bezbarvého leukoanthokyanidinu a následně barevného anthokyanidinu). V prvním kroku se naringenin oxidací a následnou redukcí přeměňuje na dihydrokaempferol. Ten může být substrátem pro působení dvou různých enzymů, čímž vzniká na jedné straně dihydrokvercetin a na straně druhé dihydromyricetin. Tyto oxidované sloučeniny (tedy dihydrokaempferol, dihydrokvercetin a dihydromyricetin) jsou v dalším kroku redukovány na leukoanthokyanidiny, které následně podléhají působení konkrétní *anthokyanidin syntázy* a vytváří definitivní anthokyanidiny. Tímto způsobem vzniká z dihydrokaempferolu pelargonidin, z dihydrokvercetinu kyanidin a z dihydromyricetinu delphinidin (He 2010; Jaakola 2013). Tento proces je systematicky znázorněn na obr. 6.



**Obr. 6** Biosyntéza anthokyanidinů (He et al. 2010)

Syntetizované anthokyanidiny dále podléhají reakcím, jejichž cílem je metabolit dále stabilizovat, a to glykosylací, methylací nebo acylací. Glykosylací provádí skupina *glykosyltransferáz* (UGT). Methylací aglykonů vznikají další tři anthokyaniny: z kyanidinu vzniká peonidin a z delphinidinu vzniká po jedné methylaci petunidin a po druhé methylaci také malvidin (He et al. 2010; Routray a Orsat 2011; Zhang et al. 2014). Vznik těchto anthokyanidinů je patrný z obr. 7. Poslední možnou reakcí je acylace.



**Obr. 7** Vznik dalších forem anthokyanidinů methylací původních produktů (He et al. 2010)



#### 1.4. Výskyt a význam anthokyanů v rostlinách

V rostlinách mohou být anthokyaniny přítomny ve všech strukturách – nejčastěji v květech, listech a plodech, ale také ve stoncích, hlízách, kořenech a semenech. Molekuly anthokyanů jsou běžně lokalizovány v buněčných vakuolách, kde jsou stabilizovány iontovými interakcemi s organickými kyselinami. Nicméně v některých rostlinách nejsou anthokyaniny volně rozpuštěny ve vakuolárním roztoku, ale jsou soustředěny do specifických vakuolárních segmentů nazývaných anthokyanoplasty (de Pascual-Teresa & Sanches-Ballesta 2008). Anthokyaninové spektrum vyskytující se v jedné rostlině může být různě rozmanité a je dáno výhradně genotypem. Některé rostliny mají relativně chudé anthokyaninové spektrum, ovšem zpravidla jsou v jedné rostlině přítomny různé glykosidy odvozené od více aglykonů (Horbowicz et al. 2008).

Přítomnost anthokyanů v rostlinách má více významů – poskytují zbarvení, a fungují tudíž jako atraktanty opylovačů, mají antioxidační a antibiotické vlastnosti a mohou zvyšovat odolnost i vůči napadení hmyzem (Kong et al. 2003). Zároveň byly popsány případy, kdy přítomnost anthokyanů přímo inhibovala vývoj housenek můry *Heliothis virescens*, významného škůdce tabáku. V této souvislosti se o anthokyanech uvažuje i jako o možném prostředku biologické ochrany (Escribano-Bailón et al. 2004). Přítomnost anthokyanů může být také významným parametrem ochrany při stresové zátěži rostliny, především světelné a chladové. Při vysoké míře osvětlení se v listech ve zvýšeném množství kumulují anthokyaniny, čímž dochází k zastínění chloroplastů a výraznému snížení rizika světelného poškození chlorofylu (Pietrini et al. 2002). Podobně kumulace anthokyanů zvyšuje osmolaritu buněčných roztoků, a pomáhá tak zvýšit odolnost pletiv vůči působení mrazu (Delgado-Vargas & Paredes-López 2002).

Množství anthokyanů v rostlině je ovlivněno více faktory. Z vnitřních podmínek je nejvýznamnějším podmiňujícím parametrem genotyp, zatímco z vnějších podmínek je produkce a kumulace anthokyanů dána okolní teplotou, intenzitou světla, chladem či mrazem nebo množstvím kyslíku v ovzduší. Obsah anthokyanů je též ovlivněn např. hnojením hořčíkem nebo dobou sklizně rostliny. Výrazně se může projevit také vliv ročníku (Garg et al. 2016) a vliv lokality, kdy zejména ve vyšších nadmořských výškách bývá produkce anthokyanů v rostlinách vyšší (Brown et al. 2008).

## 1.5. Anthokyanany v potravinách

Jako již bylo řečeno, významným zdrojem anthokyanů v stravě je zejména ovoce a zelenina. Z ovoce k celkovému příjmu anthokyanů ve stravě přispívají zejména jablka, hroznové víno, třešně, švestky, jahody a drobné bobulové ovoce, jako jsou borůvky, ostružiny, maliny a rybíz. Méně zastoupeny jsou ve stravě barevné druhy zeleniny – cibule, lilek, zelí nebo ředkvičky. V našich podmínkách mají zatím pouze okrajový význam další plodiny – brambory, rýže, pšenice nebo kukuřice (Horbowicz et al. 2008).

Kromě přirozeného výskytu v potravinách se anthokyanany používají také jako potravinářské barvivo (pod označením E 163). Používají se např. do nápojů, jogurtů, cukrovinek, zmrzlin nebo sladkého pečiva. Pro tento účel jsou anthokyanany extrahovány z rostlinných materiálů bohatých na jejich obsah – tím je nejčastěji exokarp bobulí hroznového vína. Kvůli nízké stabilitě barviv je však použití anthokyanů v potravinách omezené, neboť jsou většinou stabilní pouze při  $\text{pH} < 3,5$ . Nejvýhodnější je jejich použití do okyselených nápojů, jelikož toto prostředí umožňuje nejlepší rozpustnost a tudíž homogenizaci barviva a zároveň nejvyšší stabilitu látky. I přes omezené možnosti použití se anthokyanany s výhodou používají jako alternativa barviv syntetických (Khoo et al. 2009).

Stabilitu anthokyanů jako potravinářského barviva však lze zvýšit určitými technologickými procesy. Jedním způsobem stabilizace je využití přirozeného jevu kopigmentace, kdy jsou barviva stabilizována za použití kovových iontů (viz. kap. 1.2.2.1). Další technikou může být enkapsulace. Při enkapsulaci je molekula anthokyanu uzavřena do pevné struktury přírodního nebo syntetického materiálu. Vzniklá kapsula nejen chrání barvivo před degradací, ale může také sloužit k jeho řízenému uvolňování (Cavalcanti et al. 2011). Guan a Zhong (2015) navrhuji stabilizaci anthokyanů v roztoku pomocí arabské gumy, která výrazně zvyšuje odolnost vůči tepelné degradaci. Chung et al. (2016) uvádí, že anthokyanany v roztoku lze stabilizovat také přidáním pektinu nebo rutinu.

Největším omezením významu anthokyanů v potravinách je problematika degradace při tepelné úpravě a skladování. Při tepelné úpravě hraje roli způsob tepelné úpravy, doba a teplota, ale obecně degradace anthokyanů probíhá podle kinetiky prvního řádu. Volden et al. (2008) uvádí, že při tepelném opracování červeného zelí je úbytek anthokyanů 29 % po 10 min dušení, 41 % po 10 min vaření a 59 % po 3 min blanšírování. Podobnou degradaci anthokyanů uvádí Brownmiller et al. (2008) při zpracování borůvek. Blanšírování a vysoká pasterizace při výrobě borůvkového pyré snížily obsah anthokyanů o 43 %. Při zavařování borůvek došlo k poklesu 28 % barviv při zavaření se sirupem a

34 % při zavaření s vodou. Loypimai et al. (2016) uvádí, že rychlost degradace anthokyanů je ovlivněna nejen teplotou, ale také hodnotou pH. Při prováděném experimentu autoři pozorovali nejmírnější úbytek anthokyanů při teplotě 60 °C a pH 2, zatímco nejvyšší úbytek barviv zaznamenali při teplotě 100 °C a pH 5. Rozporuplné výsledky však byly zjištěny při tepelném zpracování brambor. Zatímco Mulinacci et al. (2008) uvádí, že při vaření brambor se obsah anthokyanů snižuje o 16 – 29 %, Brown et al. (2008) zjistili, že vařením se může obsah dostupných anthokyanů zvýšit až o 33 %. Podobně také Lachman et al. (2012) uvedli, že při pečení brambor se obsah dostupných anthokyanů zvyšuje asi 3,5× a u brambor vařených ve vodě a dokonce až 5× u brambor vařených v páře.

Tuto heterogenitu ve výsledcích potvrzují ve své meta-analýze také Murador et al. (2014). Konkrétně při vaření, vaření v páře a vaření v tlakovém hrnci byly výsledky nejednoznačné. Některé zdroje (které převažovaly) prokazovaly vysokou degradaci, zatímco jiné zjistily výrazné zvýšení obsahu anthokyanů. Oproti tomu pečení a příprava v mikrovlnné troubě v naprosté většině případů způsobily výrazný nárůst obsahu anthokyanů. Vzhledem k dobré rozpustnosti anthokyanů ve vodě autoři uvedli, že způsoby přípravy za použití vlhkého tepla (vaření apod.) způsobují pokles obsahu anthokyanů také v důsledku výluhu, zatímco způsoby přípravy za použití suché tepla (pečení, mikrovlnná trouba) snižují obsah vody v tkáních, čímž se obsah anthokyanů může zakonzentrovat a zvýšit. Ovšem Brennan et al. (2011) a Sommer & Cohen (2018) efekt zvyšování obsahu anthokyanů za působení suchého tepla vysvětlují spíše jako důsledek lepší extraktibility a uvolňování anthokyanů z rostlinných buněk popraskaných vlivem působení vysoké teploty.

Kromě degradace anthokyanů vlivem tepelné úpravy je jejich význam v potravinách limitován také přirozeným úbytkem během skladování. Ten negativně ovlivňuje spotřebitelskou jakost výrobků, neboť způsobuje blednutí barvy. V mnoha potravinách, především nápojích, se projevuje negativní vliv kyseliny askorbové (vitaminu C), která je přirozeným antioxidantem a způsobuje degradaci anthokyanů (Chung et al. 2016). Na druhou stranu správné skladování plodin může vést i k nárůstu barviv. Bylo prokázáno, že při skladování ovoce (konkrétně jahod, brusinek, borůvek a třešní) či brambor ve 4 °C dochází k biosyntéze anthokyanů, a jejich obsah se tudíž během skladování zvyšuje. Tento efekt však nenastává při skladování plodin za zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub>, který může naopak indukovat degradaci anthokyanů. Mírný nárůst obsahu anthokyanů byl pozorován také při dlouhodobém skladování jahod a malin při -24 °C (de Pascual-Teresa & Sanchez-Ballesta 2008).

## 1.6. Zdravotní účinky anthokyanů

Anthokyaniny jsou považovány za sloučeniny s pozitivním zdravotním účinkem a z mnohých studií vyplývá jejich potenciál v prevenci některých civilizačních chorob. Jejich účinek je však ovlivněn biologickou dostupností, která je obecně velmi nízká. Zatímco anthokyaniny ze směsi jsou absorbovány z 3,3 %, dostupnost samotného kyanidin-3-glukosidu je pouhých 1,7 % (Marczylo et al. 2009). Absorpce závisí na zdroji, dávce a chemické formě anthokyanů, přičemž methoxylované molekuly (petunidin, peonidin, malvidin) se vstřebávají méně. Nejvyšší dostupnost mají anthokyaniny ve formě flavyliového kationtu, čili v kyselém prostředí žaludku, ale dobře vstřebatelné jsou i v chinoidní formě vznikající v zásaditém prostředí tenkého střeva. Vstřebatelnost je také negativně ovlivněna přítomností kovových iontů v potravě, s nimiž anthokyaniny tvoří nerozpustné komplexy. Po vstřebání se anthokyaniny kumulují především v játrech, ale také v ledvinách, žaludeční a střevní stěně a v nízkých koncentracích jsou detekovatelné i v krvi a moči. Část anthokyanů zůstává intaktní, ovšem větší část je následně metabolizací přeměněna na fenolické kyseliny (protokatechovou, syringovou, vanilovou nebo gallovou) a na aldehydy. Některé z těchto metabolitů mohou mít rovněž pozitivní zdravotní účinky (Norberto et al. 2013; Pojer et al. 2013). Intaktní anthokyaniny i jejich metabolity jsou eliminovány žlučí, přičemž mohou podléhat enterohepatální cirkulaci, díky které se jejich setrvání v organismu prodlužuje, a potenciální pozitivní účinek se tak zvyšuje (Martín et al. 2017).

Pozitivní zdravotní účinky přičítané anthokyanům jsou důsledkem antioxidační aktivity, tedy schopnosti eliminovat aktivitu volných radikálů, a bránit tak vzniku oxidačního poškození buněčných struktur. Volné radikály se souhrnně dělí na reaktivní formy kyslíku (ROS), kam patří např. superoxidový radikál, hydroxylová radikál či peroxylový radikál, a reaktivní formy dusíku (RNS) (Pojer et al. 2013). Obě skupiny jsou přirozeně vedlejšími produkty lidského metabolismu. ROS vznikají v různých buněčných strukturách (mitochondrie, cytosol, peroxisomy, endoplazmatické retikulum apod.) a nejčastěji jsou produkty dýchacího řetězce. RNS jsou zase uvolňovány při metabolismu aminokyselin (Khoo et al. 2017). Produkce volných radikálů je tak přirozenou součástí lidského metabolismu a organismus vlastní řadu efektivních mechanismů pro jejich neutralizaci (např. enzymy superoxid dismutázu, glutathion peroxidázu a katalázu). Nicméně v případě, kdy produkce volných radikálů překročí kapacitu těchto přirozených mechanismů (např. vlivem nemoci, dietními vlivy nebo vlivy vnějšího prostředí), dojde k poruše rovnováhy a vzniku oxidačního stresu. Ten se projevuje oxidací lipidových a

proteinových komponent buněčných membrán, nukleových kyselin, DNA, enzymů a LDL cholesterolu, čímž dochází k poškození a poruše funkcí těchto sloučenin (Martín et al. 2017). V této chvíli, kdy je kapacita endogenních antioxidačních mechanismů nedostatečná, se začínají významně uplatňovat právě antioxidanty exogenního původu (Masisi et al. 2016).

Míra antioxidačního potenciálu anthokyanů je závislá na struktuře molekuly. Antioxidační účinky vykazují zejména hydroxylové skupiny B kruhu, ale také ketoskupina přítomná v chalkonové a chinoidní formě a pravděpodobně i oxoniový kation v C kruhu u flavyliového kationtu. Antioxidační účinky tak mohou mít všechny formy anthokyanu (Khoo et al. 2017). Nejvýznamnější příspěvek k antioxidačnímu účinku je připisován počtu hydroxylových skupin, které jsou donorem  $H^+$  iontu – antioxidační schopnosti molekuly se tak zvyšují s vyšším počtem hydroxylových skupin. Nejsilnějším antioxidantem je tudíž delfinidin a nejslabším pelargonidin (Pojer et al. 2013). Zároveň se však liší i efektivita vychytávání volných radikálů podle jejich typu. Zatímco delfinidin nejlépe vychytává superoxidový aniont, pelargonidin je účinnější vůči hydroxylovému radikálu (Miguel 2011). Obecně jsou za silnější antioxidanty považovány samotné aglykony, zatímco přítomnost cukerné jednotky, zejména na pozici C3, antioxidační aktivitu zpravidla snižuje. Tento pokles je markantnější v případě, kdy je daná pozice glykosylována disacharidem, zatímco přítomnost monosacharidu neovlivňuje antioxidační aktivitu tak významně. Obecně jsou tedy silnějšími antioxidanty např. glukosidy než rutinosidy. Oproti tomu acylace anthokyanu má na antioxidační aktivitu nejednoznačný vliv – účinek může být pozitivní i negativní (Miguel 2011; Baskan et al. 2015; Khoo et al. 2017).

Anthokyanany působí antioxidačně již při velmi nízkých koncentracích pod 1  $\mu\text{g/l}$ . Tato aktivita přitom nemusí být pouze přímým důsledkem vychytávání volných radikálů, neboť je možné, že kromě toho také anthokyanany fungují jako spouštěče mechanismu pro indukci endogenního antioxidačního systému buňky (Bornsek et al. 2012). Některé studie dokonce uvádí, že anthokyanany mohou být účinnějšími antioxidanty než běžnější vitaminy C a E a  $\beta$ -karoten (Welch et al. 2009). Khoo et al. (2017) také upozorňují, že vedle přímého antioxidačního účinku mají anthokyanany i nepřímý ochranný účinek před vznikem civilizačních chorob, neboť likvidací volných radikálů inhibují buněčnou proliferaci a apoptózu. Navíc se anthokyanany vychytáváním volných radikálů podílí na downregulaci enzymu cyklooxygenázy (COX), jejíž funkce je za opačných okolností přítomností volných radikálů indukována. COX je významným katalyzátorem prozánětlivých látek typu leukotrienů, prostacyklinů a prostaglandinů, a její nadměrná funkce je tak mediátorem

zánětlivých procesů v lidském těle. Anthokyany dále chrání před oxidací lipidové látky buněčných struktur (buněčné membrány) a navíc jsou schopny regenerovat lipofilní antioxidanty, jako je např. vitamin E (Martín et al. 2017). Od antioxidační aktivity se tak odvíjí celá řada zdravotních účinků anthokyanů, mezi které patří protizánětlivý a antiproliferační účinek (Bowen-Forbes et al. 2010), hypoglykemický a hypotenzivní účinek (Lee et al. 2013) a dále pozitivní vliv na hladinu LDL cholesterolu a riziko aterosklerózy (Reed 2002). Všemi uvedenými mechanismy se anthokyany významně podílí na prevenci vzniku civilizačních chorob, jako jsou obezita, diabetes mellitus, kardiovaskulární choroby, rakovina a neurodegenerativní choroby (Tsuda 2012).

Avšak antioxidanty mohou mít i negativní zdravotní účinky, pokud je jejich příjem příliš vysoký. V případě nadbytku antioxidantů dochází naopak k prooxidačnímu efektu, který paradoxně oxidační poškození sám vyvolává. K tomu může docházet při suplementaci antioxidantů potravními doplňky, zatímco při přirozeném příjmu ze stravy toto riziko nenastává. Tento fakt ještě více vyzdvihuje přednosti antioxidantů obsažených přirozeně ve složkách stravy oproti antioxidantům přidávaným do stravy uměle ve formě fortifikace potravin či ve formě doplňků stravy (Bjelakovic & Gluud 2007).

Potenciální míru pozitivního zdravotního účinku lze stanovit různými metodami. Častější a levnější jsou metody *in vitro*, které ovšem oproti *in vivo* modelům nedosahují takové přesnosti v hodnocení funkce antioxidantu. V analytické rutinní praxi se používají zejména jednoduché *in vitro* metody, např. metody DPPH, ABTS, ORAC nebo FRAP. U anthokyanů je často používanou metodou stanovení antioxidační aktivity metoda s použitím DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyllovým radikálem). Jedná se o radikál, který je neutralizovatelný fenolickými látkami (a tedy i anthokyany) na základě transferu elektronu. Míra redukce radikálu je poměřována dle změny barvy roztoku radikálu z fialové na redukovanou bezbarvou formu. Tato metoda má stejně jako další antioxidační metody spíše orientační charakter, neboť nemusí zcela přesně odrážet účinek antioxidantu v živém systému (organismu), který je oproti modelovému systému mnohem komplexnější. V případě anthokyanů může být výsledek měření ovlivněn také formou anthokyanu. Deprotonované struktury anthokyanů, které vznikají se zvyšujícím se pH, snáze redukují radikál, a antioxidační aktivita se tak může jevit vyšší (Lemanska et al. 2001; Khoo et al. 2017).

## 1.7. Extrakce a analýza anthokyanů

Anthokyaniny jsou polární sloučeniny a pro jejich extrakci z matrice lze použít různá polární rozpouštědla. Mezi nejčastěji používané patří methanol, ethanol nebo aceton a jejich vodné roztoky. Tyto roztoky se často používají okyselené buď organickými kyselinami (mravenčí, octovou) nebo kyselinou chlorovodíkovou. Díky okyselení lze anthokyaniny extrahovat ve formě flavyliového kationtu, který je nejstabilnější formou anthokyanů. Při použití kyseliny chlorovodíkové je vhodné volit její nízkou koncentraci (např. odpovídající pH 2), aby nedocházelo k hydrolyze acylovaných anthokyanů. Vhodnější je z tohoto hlediska použít slabší organické kyseliny. K extrakci anthokyanů lze použít také vodný roztok SO<sub>2</sub>, který oproti samotné vodě díky obsahu SO<sub>2</sub> zvyšuje účinnost extrakce a stabilizuje anthokyaniny. Vedle tradičních extrakčních přístupů (Soxhletova extrakce, macerace) jsou častěji používány přístupy zlepšující extraktibilitu anthokyanů – např. superkritická fluidní extrakce (SFE), ultrazvuková či mikrovlnná extrakce (Escribano-Bailon et al. 2004; Castaneda-Ovando et al. 2009; Khoo et al. 2017).

Tyto způsoby extrakce však nejsou selektivní a do roztoku se kromě analytů uvolňují také další látky, např. sacharidy, organické kyseliny apod., které je následně vhodné odstranit purifikací. Nejčastěji používanou purifikační technikou je extrakce tuhou fází (SPE) s adsorbentem C18. Díky obsahu hydroxylových skupin mají anthokyaniny vůči tomuto sorbentu vysokou afinitu, což zajišťuje jejich pevnou vazbu a umožňuje promývání vzorku dalšími rozpouštědly pro odstranění nečistot. Po přečištění jsou anthokyaniny ze sorbentu vymyty vhodným rozpouštědlem. V případě výskytu lipofilních látek se extrakt ještě dále čistí nepolárními rozpouštědly, např. hexanem. Pro účinnou separaci anthokyanů ze směsného vzorku lze využít také chromatografické metody či kapilární elektroforézu (Escribano-Bailon et al. 2004; Castaneda-Ovando et al. 2009; Khoo et al. 2017).

Pro analýzu anthokyanů lze použít řadu analytických metod. Velice jednoduchou, ale nespecifickou analytickou metodou, je spektrofotometrie. Díky spektrálním vlastnostem anthokyanů má tato metoda vysokou vypovídající schopnost jak z hlediska kvalitativního, tak i kvantitativního, ale pouze pro směs anthokyanů – jednotlivé anthokyaniny ve směsi touto technikou nelze stanovit (Castaneda-Ovando et al. 2009). Pro analýzu jednotlivých anthokyanů se používají separační analytické metody spojené s vhodnou detekční technikou. Výhodou použití separační techniky je možnost snáze identifikovat ve směsném vzorku jednotlivé analyty. Nejčastějšími separačními technikami v analýze anthokyanů jsou metody chromatografické – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), tenkovrstvá chromatografie (TLC) a historicky také papírová

chromatografie (PC). Separaci však lze provést také za použití kapilární elektroforézy, která pracuje na principu pohyblivosti nabitých molekul v elektrickém poli. Nejpoužívanější chromatografickou technikou je HPLC na reverzní fázi, při níž jsou anthokyaniny separovány po adsorpci na sorbent C18, z něhož se postupně uvolňují vymýváním mobilní fází se zvyšující se afinitou vůči analytům (Escribano-Bailon et al. 2004; Welch et al. 2008; Castaneda-Ovando et al. 2009).

Přesnou identifikaci a kvantifikaci jednotlivých analytů umožňuje vhodně zvolená detekční technika. První často využívanou technikou pro detekci anthokyanů je DAD (detekce pomocí diodového pole), jejímž principem je UV/Vis spektrofotometrická detekce, která identifikuje anthokyaniny na základě stanovení vlnové délky, v níž vykazují absorpční maximum. Jediným omezením této techniky je limit detekce (hodnota analytu, pod níž jej přístroj není schopen zaznamenat), který se běžně pohybuje v řádech ng/ml analytu. Druhou hojně využívanou technikou je hmotnostní spektrometrie (MS), která identifikuje analyty na základě jejich molekulové hmotnosti. Tento detektor je ještě o něco citlivější než DAD, limit detekce běžně dosahuje řádů pg/ml. Podle typu konstrukce také tento detektor umožňuje identifikaci analytu s vyšší jistotou než DAD. Poslední hojně používanou technikou je nukleární magnetická rezonance (NMR), která identifikuje analyty podle jejich absorpce záření v magnetickém poli při působení elektromagnetického záření. Velkou výhodou této metody je možnost popisu struktury neznámých látek (Welch et al. 2008).



## 1.8. Anthokyany v pšenici

Obiloviny jsou základní složkou lidské stravy. Díky vysokému obsahu škrobu fungují ve výživě především jako zdroj energie, ovšem obsahují i bílkoviny a řadu minerálních látek a vitaminů. Velkou pozornost si obiloviny získávají díky přirozenému obsahu vlákniny, která se v zrně obilovin nachází ve vnějších obalových vrstvách a má řadu pozitivních zdravotních účinků. Za významné obsahové látky lze označit vitaminy skupiny B, vitamin E, fosfor, železo a také biologicky aktivní látky – fenolické kyseliny a polyfenolické látky. Mnohé z těchto látek fungují jako antioxidanty a spolu s vlákninou jsou hlavními nositeli pozitivního zdravotního účinku obilovin. Většina těchto látek je však obsažena v obalových nebo povrchových částech obilných zrn (jako jsou otruby nebo aleuronová vrstva), což je důvod, proč jsou tyto účinky vázány pouze na celozrnné výrobky. Zatímco výrobky z rafinované mouky obsahují pouze škrob, a plní tak zejména energetickou funkci, celozrnné výrobky mají přidanou hodnotu právě v obsahu látek s pozitivním zdravotním účinkem. Tento fakt vysvětluje celosvětový trend současné doby, kdy se neustále zvyšuje spotřebitelský zájem o celozrnné produkty (Narwal et al. 2014).

Pšenice je jednou z nejrozšířenějších plodin na světě. Hned po kukuřici je druhou nejvíce pěstovanou obilovinou s celosvětovou roční produkcí 765,8 milionů tun v roce 2019 (FAOSTAT 2021). Její roční produkce v České republice byla v roce 2019 4,81 milionů tun (FAOSTAT 2021). V České republice tvoří pšenice hlavní spotřební obilovinu, v roce 2019 byla její spotřeba 124,4 kg/obyv./rok (ČSÚ 2020) a tvořila 84,0 % všech zkonsumovaných obilovin. Pekárenské produkty se v ČR dlouhodobě těší vysoké oblibě, v roce 2019 dosáhla konzumace chleba 39,0 kg/obyv./rok a konzumace pšeničného pečiva 51,7 kg/obyv./rok (ČSÚ 2020).

V České republice se nejčastěji pěstují běžné odrůdy pšenice seté (*Triticum aestivum* L.), které patří mezi tzv. pšenice červené. Navzdory označení nemá zrno těchto odrůd barvu červenou, ale okrovou – toto zbarvení je podmíněno obsahem látek polyfenolického typu, hlavně katechinů a taninů (resp. proanthokyanidinů) (Lachman et al. 2017). Tyto druhy pšenice jsou prakticky jedinými druhy pro konvenční pěstování v České republice. Zajímavou vlastností pšenice je schopnost syntetizovat v zrně barevné látky jako mechanismus adaptace na podmínky prostředí. Touto schopností disponují plané druhy pšenice i dalších obilovin a některé částečně domestikované druhy, zatímco šlechtěné odrůdy využívané v konvenčním pěstování tuto schopnost ztratily. V současné době se výzkum začíná zaměřovat na možnosti znovuoživení této schopnosti s cílem vyšlechtit

nové odrůdy obilovin, které by měly oproti konvenčním druhům zvýšený obsah barevných látek (Martinek et al. 2014).

Jednou skupinou barevných látek syntetizovaných v pšeničném zrně jsou karotenoidy. Jedná se o pomocná fotosyntetická barviva, která jsou zároveň přirozenými antioxidanty a některé z nich jsou též provitaminy. V zrně jsou lokalizovány v endospermu a odrůdy s jejich zvýšeným obsahem se nazývají žluté. Druhou skupinou barviv, které se mohou v pšenici přirozeně vyskytovat, jsou anthokyaniny (Ficco et al. 2014b), o nichž pojednává tato práce. Jejich význam pro rostlinu a jejich pozitivní zdravotní efekty uvádí kapitoly 1.4 a 1.6.

Pšenice syntetizující anthokyaniny tvoří dvě základní barevné varianty – purpurovou a modrou. Odrůdy pšenice s purpurovým zrnem mají perikarp zbarven do červeno-purpurova a jejich hlavním anthokyanem je kyanidin-3-glukosid (Abdel-Aal et al. 2006). Geny pro tvorbu anthokyanů označené *Pp1* a *Pp3* pochází z tetraploidní pšenice *Triticum turgidum* L. subsp. *abyssinicum* Vavilov – druh pšenice původem z Etiopie, která se též nazývá pšenice habešská (Martinek et al. 2014). Odrůdy pšenice s modrým zrnem obsahují anthokyaniny v aleuronové vrstvě a zrna mají zbarveno šedo-modře. Hlavním anthokyanem těchto odrůd je delphinidin-3-rutinosid (Abdel-Aal et al. 2006). Je známo více genů podmiňujících modré zbarvení, z čehož jsou nejčastější dva, z nichž gen označovaný *Ba1* pochází z plané traviny *Thinopyrum ponticum* Podp. a druhý gen *Ba2* z pšenice jednozrnky (*Triticum monococcum* L.) (Martinek et al. 2014). Zároveň existují také kříženci obou uvedených barevných typů, kteří jsou někdy označováni jako černá pšenice. Tyto linie jsou charakteristické tmavě purpurovým zrnem s fialovým nádechem a lokalizací anthokyanů v perikarpu i aleuronové vrstvě (Martinek et al. 2014; Garg et al. 2016).

Míra exprese barvy zrna je u jednotlivých barevných typů odlišná. U purpurového zrna jsou anthokyaniny umístěny v perikarpu, který je diploidní tkání, a sdílí stejnou genetickou výbavu s mateřskou rostlinou. U genů pro tvorbu anthokyanů v perikarpu tedy nedochází ke genetické segregaci (rozdělování alelických párů a kombinaci mateřských a otcovských alel). Oproti tomu modré zrna pšenic má anthokyaniny uloženo v aleuronové vrstvě, která je součástí triploidního endospermu a kromě mateřské genetické výbavy se na genové expresi projeví i geny přenesené z otcovské rostliny, a dochází tak k segregaci (Lachman et al. 2017). Tím je podmíněn efekt genové dávky u pšenic s modrým a černým zrnem, kdy je intenzita barvy dána počtem alel daného genu – čím více alel je přítomno, tím je barva intenzivnější. Tento efekt nenastává u pšenic s purpurovým zrnem, neboť anthokyaniny uložené v perikarpu nepodléhají segregaci (Burešová et al. 2015). Míru

syntézy anthokyanů v pšenici podmiňuje také její genotyp, ovšem výsledné množství anthokyanů je ovlivněno i podmínkami vnějšího prostředí – především teplotou, intenzitou světla či množstvím kyslíku – a dále agronomickými parametry, např. dobou sklizně nebo hnojením hořčíkem. Kumulace anthokyanů v pšeničném klasu není rovnoměrná – více barviv obsahují obilky umístěné na vrcholové části klasu (Garg et al. 2016).

Odrůdy (resp. genotypy) pšenice s barevným zrnem tak oproti konvenčním odrůdám představují plodiny se zvýšeným obsahem antioxidantů, a tedy s přidanou hodnotou pozitivního zdravotního efektu. Z důvodů vysoké spotřeby pšenice a pšeničných produktů v České republice by tyto nové barevné odrůdy potravinářské pšenice měly vysoký potenciál stát se v našich podmínkách dalším významným zdrojem antioxidantů ve stravě. V jiných oblastech světa se tímto způsobem jako „zdravější“ alternativy používají barevné odrůdy jiných obilovin, především kukuřice (v Americe) a rýže (v Asii) (Ficco et al. 2014b). Prozatím však pšenice s barevným zrnem v našich podmínkách nenachází praktické uplatnění. To je limitováno (v některých případech až téměř znemožněno) negativními charakteristikami, které jsou s těmito genotypy spjaty. Jedná se zejména o problematiku nízkého výnosu, která se projevuje u všech barevných typů pšenice, zejména však u modrých typů pšenice. Nízký výnos je podmíněn pevnou vazbou genu pro syntézu anthokyanů s genem pocházejícím z divokých druhů, který je příčinou nízkého výnosu. Rozbití této vazby je tudíž jedním z cílů šlechtění barevných odrůd pšenice (Burešová et al. 2015; Martinek et al. 2014). Modré pšenice jsou kromě nízkého výnosu zatíženy také špatnou odolností vůči klasovým fusariózám, v jejichž důsledku se nejen snižuje výnos, ale klesá také kvalita osiva a dochází k produkci mykotoxinů, které znemožňují užití zrna pro potravinářské i krmivářské účely (Martinek a Vyhnánek 2014).

### **1.8.1. Možnosti zpracování a využití pšenice s barevným zrnem**

Barevné odrůdy pšenice jsou v zásadě použitelné stejným způsobem jako běžné druhy pšenice. Z běžného využití tedy připadá v úvahu použití pro konzumní nebo krmné účely. Možností konzumního využití je více, stejně jako běžnou pšenici je barevné odrůdy možné použít na výrobu pečiva, těstovin, extrudovaných nebo expandovaných produktů. Zatím málo známým využitím je vaření pšeničných zrn, která se dají použít jako příloha nebo plnidlo do pokrmů. S konzumním využitím však vyvstává otázka stability anthokyanů při tepelném zpracování. Problematika degradace anthokyanů při tepelném zpracování byla uvedena v kapitole 1.5, ovšem studií, které se věnují přímo pšenici je pouze omezené množství.

### **1.8.1.1. Pečení**

V naší oblasti je pečení nejběžnějších způsobem zpracování pšenice. Odrůdy pšenice s barevným zrnem lze využít pro přípravu širokého spektra čerstvých i trvanlivých výrobků, jako jsou chleba, housky, muffiny, sušenky, tyčinky apod. (Bartl et al. 2015; Pasqualone et al. 2015; Yu a Beta 2015; Karakaya et al. 2016; Croitoru et al. 2018). V případě barevných pšeníc přichází v úvahu pouze zpracování na celozrnné produkty, neboť celozrnná mouka obsahuje povrchové vrstvy zrna, v nichž jsou anthokyany obsaženy. Rafinovaná mouka připravená z odrůd pšenice s barevným zrnem by obsahovala pouze stopové množství anthokyanů, a pro tyto účely by tedy nebyla vhodná. Hlavní otázkou však je, zda je vzhledem k tepelné degradaci anthokyanů vůbec možné tyto odrůdy pro pekařské účely využít.

Změny obsahu anthokyanů v průběhu výroby chleba podrobně popsali Yu a Beta (2015). První krok přípravy těsta, tedy hnětení, snížil obsah anthokyanů až o 21 % a v průběhu pečení obsah anthokyanů poklesl až na 45 % původního obsahu. Vysokou teplotu jako klíčový faktor degradace anthokyanů potvrzuje i Bartl et al. (2015), který uvádí, že na degradaci anthokyanů má vliv také způsob pečení chleba. U chlebů připravovaných z celozrnné mouky modrých a purpurových pšeníc vždy zaznamenali výraznější úbytek anthokyanů u chlebů pečených 31 min při 180 °C než u chlebů pečených 21 min při 240 °C. Zajímavým poznatkem byl také výraznější úbytek anthokyanů v chlebu připraveném z purpurové pšenice než v chlebu z pšenice modré. To autoři vysvětlují odlišnostmi ve stabilizaci anthokyanových molekul – zatímco modrá odrůda obsahovala anthokyanu acylované kyselinou kumarovou, v purpurové odrůdě výrazně převažovaly acyly kyseliny octové, které jsou pravděpodobně náchylnější k degradaci než acyly kyseliny kumarové.

Celkový úbytek anthokyanů v důsledku pečení při přípravě pekárenského výrobku může být velmi variabilní v závislosti na technologii, typu výrobku či charakteru použitého zrna. Bartl et al. (2015) uvádí degradaci anthokyanů vlivem pečení v rozmezí 10 a 73 %, podle autorů Yu a Beta (2015) způsobuje pečení pokles anthokyanů o 55 %, zatímco Karakaya et al. (2016) popisují pokles anthokyanů při pečení o pouhých 4 %. Podobně různorodá míra degradace platí i pro další produkty. Při výrobě sušenek byl zaznamenán pokles obsahu anthokyanů o méně než 2 % (Karakaya et al. 2016), ale může činit až 55 % (Pasqualone et al. 2015). V případě tyčinek byla popsána degradace 37 % obsažených anthokyanů (Karakaya et al. 2016) podobně jako při přípravě muffinů, kde činila degradace anthokyanů 36 – 40 % (Croitoru et al. 2018).

Z uvedených faktů vyplývá, že barevné odrůdy pšenice mají potenciál pro pekárenské či pečivářenské využití, nicméně samotný proces pečení významně snižuje obsah anthokyanů. Z tohoto důvodu by bylo vhodné pro tyto účely používat odrůdy s vysokým obsahem anthokyanů.

### **1.8.1.2. Vaření**

Vaření není tak častým způsobem přípravy pšeničných produktů a prakticky jediným produktem tohoto typu jsou těstoviny. Těstoviny se připravují ze semoliny – mouky připravené z pšenice tvrdé (*Triticum turgidum* subsp. *durum*). Jelikož semolina vzniká po odstranění povrchových částí zrna, dochází při její přípravě ke značnému snížení obsahu anthokyanů až o 66 %. Dalším kritickým krokem při přípravě těstovin je jejich sušení, které může způsobit až úplnou ztrátu anthokyanů v porovnání s těstovinami čerstvými. Vaření těstovin pak k celkové degradaci anthokyanů přispívá ztrátou dalších 20 % (Ficco et al. 2016). Z důvodu vysoké degradace a nízkého obsahu anthokyanů v semolině navrhuje Zanoletti et al. (2017) připravovat těstoviny ze semoliny zpětně obohacené o povrchové části zrna. Ty se po vymílání semoliny oddělí, nejmenno namelou a vrátí zpět. Oproti klasickému způsobu přípravy semoliny tak vzniká surovina obohacená nejen o anthokyany, ale také o vlákninu. Ficco et al. (2016) navíc doplňují, že těstoviny z barevné pšenice mají nižší glykemický index v porovnání s klasickými těstovinami.

Jiná situace nastává při vaření celých obilných zrn. V praxi je tento způsob nejčastější, neboť se používá při přípravě rýže. V takovém případě je degradace anthokyanů významně nižší, jak uvádí Tang et al. (2016), kteří při vaření rýže zaznamenali u celkových anthokyanů úbytek pouhých 15 – 32 %. Oproti těstovinám je tento způsob přípravy vůči obsahu anthokyanů šetrnější, jelikož nezahrnuje fázi výroby těsta a následného sušení.

Obecně jsou kritickými parametry vaření jednak teplota (která je zpravidla 100 °C, ale může být vyšší u vaření za zvýšeného tlaku) a doba vaření (Hiemori et al. 2009). Významnou měrou se však na úbytku anthokyanů může podílet i jejich výluh, který může zapříčinit degradaci až 34 % anthokyanů (Zaupa et al. 2015). Této ztrátě nutričně významných látek se dá do určité míry předejít optimálním poměrem vody a vařeného zrna, který zajistí plné nasáknutí vody do zrna, a znemožní tak výluh látek do prostředí (Catena et al. 2019).

Z uvedených faktů je patrné, že šetrnější než příprava těstovin, je z hlediska anthokyanů vaření celého zrna. Tento způsob přípravy sice není u pšenice obvyklý,

nicméně v poslední době se jako nový typ produktu objevuje pšeničná lámanka (trhanka) či celé pšeničné zrno určené pro vaření. Tyto produkty lze využít jako alternativu klasických příloh, jako přídavek do salátů, plnidlo do pokrmů či jako zavářku do polévky. Vzhledem k potenciálnímu nutričnímu přínosu anthokyanů v pšeničném zrně se tento způsob přípravy jeví jako mnohem šetrnější a výhodnější oproti zpracování pšenice na těstoviny.

### **1.8.1.3. Extruze a pufování**

Extruze a pufování jsou způsoby tepelné úpravy, u kterých je kombinována vysoká teplota záhřevu (nad 100 °C) s krátkou dobou působící teploty (jednotky až desítky sekund) za nepřítomnosti tekutiny (tzv. zpracování za použití suchého tepla). Vlivem prudkého záhřevu nitrobuněčné vody obsažené v materiálu dochází k popraskání buněk pletiv a objemové expanzi zpracovávaného materiálu (Hirth et al. 2015). Tento typ metod, které používají záhřev na vysoké teploty po krátký čas, jsou považovány za šetrnější vůči termolabilním sloučeninám, jakými jsou např. anthokyany (Camacho-Hernández et al. 2014). Základní odlišností obou metod je jiná forma zpracování suroviny – zatímco pufováním se zpracovávají celá obilná zrna, pro extruzi je základní surovinou mletá a vlhčená obilná kaše.

Martinek et al. (2014) uvádí, že extruze a pufování by mohly být vhodnou alternativou tepelného zpracování pšenice. Jelikož během těchto procesů je zrno vystavováno nižší a kratší dobu působícím teplotám, lze předpokládat, že účinné látky obsažené v zrně budou degradovat v menší míře a zůstane jich zachováno větší množství. Vliv extruze na obsah anthokyanů v zrně kukuřice zkoumali Escalante-Aburto et al. (2013). Nejšetrnější bylo zpracování kukuřičného extrudátu při teplotě 130 °C a vlhkosti materiálu 16 %. Celkový obsah anthokyanů při zpracování za těchto podmínek poklesl o 66 %. Autoři zároveň zjistili, že vyšší teplota (140 °C) a jiné úroveň vlhkosti vedly k výraznější degradaci anthokyanů, která byla v průměru 77 %, ale v některých případech i 84 %. Podobným způsobem zkoumali Hirth et al. (2015) vliv extruze na anthokyany v extraktu z arónie přidaného do výrobku z kukuřičného škrobu. Podle parametrů extruze dosahovala úroveň degradace anthokyanů 42 – 90 %, přičemž nejnižší úbytek byl pozorován při teplotě 100 °C s vlhkostí výchozího materiálu 22 %. Oproti tomu pufování je pro experimentální účely používáno zřídka. Pufováním zrn rýže se zabývali Pal et al. (2019), kteří pozorovali při zpracování za teploty 220 °C po dobu 15 – 20 s průměrný úbytek 79 % obsažených anthokyanů.

U obou metod je výsledná degradace anthokyanů ovlivněna parametry výrobního procesu (kombinací teploty a vlhkosti výchozího materiálu, dobou záhřevu) a jejich optimalizací lze degradaci anthokyanů zmírnit (Escalante-Aburto et al. 2013; Camacho-Hernández et al. 2014;).

V porovnání jednotlivých typů tepelné úpravy produktů z pšenice lze soudit, že nejméně šetrným způsobem přípravy je vaření, kdy může celkový úbytek anthokyanů činit 86 % až téměř 100 % (Ficco et al. 2016). Podobně destruktivním způsobem přípravy je pufování s průměrným úbytkem anthokyanů 79 % (Pal et al. 2019). Oproti tomu při pečení dochází ke snížení obsahu anthokyanů „pouze“ o 55 %, jak shodně uvedli Yu a Beta (2015) a Pasqualone et al. (2015). Extruze pšenice způsobuje asi 66% pokles obsahu anthokyanů (Escalante-Aburto et al. 2013) a o něco nižší pokles (42 %) v případě anthokyanů, které byly do extrudovaného materiálu přidány. Výsledky naznačují, že extruze může být v tomto ohledu vhodnou alternativou zpracování pšenice s barevným zrnem, pokud budou optimalizovány její parametry (teplota procesu, vlhkost suroviny).

#### ***1.8.1.4. Pšenice s barevným zrnem jako krmivo***

Dalším možným využitím barevných odrůd pšenice jsou krmné účely. Řada studií na zvířatech prokázala, že anthokyaniny působí antioxidačně, protizánětlivě, protirakovinně, antidiabeticky, hepatoprotektivně a neuroprotektivně. Díky těmto účinkům lze předpokládat, že přítomnost anthokyanů v krmivu by mohla mít pozitivní zdravotní efekt i na hospodářská zvířata a mohla by představovat vhodnější a bezpečnější alternativu syntetických léčiv a dalších krmných aditiv (Changxing et al. 2018). Tento předpoklad potvrzují např. Mrkvicová et al. (2016), kteří zkoumali vliv krmné pšenice na jaterní tkáň brojlerových kuřat. Krmení brojlerových kuřat pšenicí purpurového typu odrůdy Konini prokazatelně zvyšovalo antioxidační i enzymatickou aktivitu jaterní tkáně. Navíc Šťastník et al. (2014) popsali, že krmení brojlerových kuřat odrůdou Konini nemělo žádný vliv na hmotnostní přírůstky, výslednou hmotnost ani jatečnou výtěžnost. Je tedy pravděpodobné, že barevná pšenice při krmení nemá na drůbež negativní vliv, a mohla by tedy tvořit alternativu pšenice klasické.

## 2. CÍLE A HYPOTÉZY PRÁCE

Hlavním záměrem disertační práce bylo navázat na současné poznatky ve výzkumu anthokyanů v obilkách barevných odrůd pšenice seté (*Triticum aestivum* L.), tyto znalosti dále doplňovat a prohlubovat a posoudit možnosti využití barevných genotypů pšenice pro potravinářské účely. S ohledem na to byly stanoveny následující cíle.

### Cíle práce

1. Vývoj, optimalizace a validace analytické UHPLC-MS metody pro stanovení anthokyanů v barevných genotypech pšenice.
2. Zmapování obsahu a kompozice anthokyanů v širokém spektru barevných genotypů pšenice.
3. Stanovení mezigenotypových a popř. i meziročníkových rozdílů v obsahu anthokyanů.
4. Stanovení antioxidační aktivity jednotlivých genotypů.
5. Sledování změn v obsahu anthokyanů v jednotlivých genotypech během skladování a zpracování.

### Hypotézy

1. Vyvinutá UHPLC-MS metoda bude vhodná pro analýzu anthokyanů obsažených v obilkách barevných genotypů pšenice.
2. Kompozice anthokyanového spektra jednotlivých barevných typů pšenice bude odlišná.
3. Obilky barevných genotypů pšenice budou vykazovat kvalitativní i kvantitativní mezigenotypové a meziročníkové rozdíly v obsahu anthokyanů.
4. Antioxidační aktivita jednotlivých genotypů a barevných typů pšenice se bude lišit.
5. Obsah anthokyanů barevných genotypů pšenice bude ovlivněn skladováním a zpracováním.

Disertační práce byla vázána na projekt NAZV č. QJ1510206 Výzkum odlišných typů zbarvení zrna pšenice způsobených látkami s antioxidačním účinkem, jejich využití pro tvorbu odrůd s příznivým zdravotním benefitem pro výživu člověka a zvířat.



### 3. METODIKA PRÁCE

#### 3.1. Materiál

Rostlinný materiál byl získán ve spolupráci se Zemědělským výzkumným ústavem v Kroměříži (resp. jeho dceřinnou společností Agrotest Fyto, s.r.o.) ze sklizní v letech 2014 až 2018. Pro analýzy byly použity genotypy pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) v různých barevných variantách – modrá, purpurová, černá a pro doplnění při stanovení antioxidační aktivity také genotypy bez obsahu anthokyanů: červené, žluté a bílé. Všechny použité genotypy jsou uvedeny v Tab. 2. Pro zjednodušení jsou v dalším textu barevné typy označovány zkratkami: Pp (purpurový perikarp), Ba (modrý aleuron), Ba+Pp (kombinace obou typů, odpovídá černé pšenici), R (červený typ), Ye (žlutý typ) a W (bílý typ).

**Tab. 2** Genotypy pšenic použitých v experimentální části disertační práce (*pokračování tabulky na další straně*)

genotyp	typ	forma	země původu	status
AF Jumiko	Pp	ozimá	Česká republika	registrovaná odrůda
Purple	Pp	jarní	Kanada	šlechtitelská linie
PS Karkulka	Pp	ozimá	Slovensko	registrovaná odrůda
RU 687-12	Pp	jarní	Česká republika	šlechtitelská linie
ANK-28B	Pp	jarní	Rusko	téměř izogenní linie
Purple Feed	Pp	jarní	Austrálie	šlechtitelská linie
Konini	Pp	jarní	Nový Zéland	registrovaná odrůda
ANK-28A	Pp	jarní	Rusko	téměř izogenní linie
AF Oxana	Ba	ozimá	Česká republika	registrovaná odrůda
Skorpion	Ba	ozimá	Česká republika	registrovaná odrůda
H 90-15-2	Ba	jarní	USA	genetický zdroj
V1 131-15	Ba	ozimá	Česká republika	šlechtitelská linie
Tschermaks B. S.	Ba	jarní	Rakousko	šlechtitelská linie
EF02-54/9	Ba	jarní	USA	genetický zdroj
EF02-5426-3	Ba	jarní	USA	genetický zdroj
UC 66049	Ba	jarní	USA	genetický zdroj
Aoi Yu	Ba	jarní	Japonsko	genetický zdroj
Xiao Yian	Ba	jarní	Čína	genetický zdroj
V1 133-15	Ba	ozimá	Česká republika	šlechtitelská linie

<b>genotyp</b>	<b>typ</b>	<b>forma</b>	<b>země původu</b>	<b>status</b>
AF Zora	Ba+Pp	ozimá	Česká republika	registrovaná odrůda
V1-118-17	Ba+Pp	ozimá	Česká republika	šlechtitelská linie
V1-122-17	Ba+Pp	ozimá	Česká republika	šlechtitelská linie
V1-129-17	Ba+Pp	ozimá	Česká republika	šlechtitelská linie
V1-130-17	Ba+Pp	ozimá	Česká republika	šlechtitelská linie
V1-142-17	Ba+Pp	ozimá	Česká republika	šlechtitelská linie
V1-143-17	Ba+Pp	ozimá	Česká republika	šlechtitelská linie
V1-144-17	Ba+Pp	ozimá	Česká republika	šlechtitelská linie
V1-145-17	Ba+Pp	ozimá	Česká republika	šlechtitelská linie
V1-208-17	Ba+Pp	ozimá	Česká republika	šlechtitelská linie
V2-11a-17	Ba+Pp	ozimá	Česká republika	šlechtitelská linie
V2-15a-17	Ba+Pp	ozimá	Česká republika	šlechtitelská linie
Novosibirskaya 67	W	jarní	Rusko	recipientní odrůda
Julie	R	ozimá	Česká republika	registrovaná odrůda
Vanessa	R	ozimá	Česká republika	registrovaná odrůda
Bohemia	R	ozimá	Česká republika	registrovaná odrůda
TA 4024	Ye	jarní	Izrael	genetický zdroj
Bona Vita	Ye	ozimá	Slovensko	registrovaná odrůda
Citrus	Ye	ozimá	Německo	registrovaná odrůda
V3-109-18	Ye	ozimá	Slovensko, Česká republika	registrovaná odrůda

Standardy jednotlivých analytů pocházely od firem Extrasynthese (Genay, Francie) a Polyphenols (Sandnes, Norsko). Chemikálie a rozpouštědla, konkrétně 35% kyselina chlorovodíková, methanol (p. a.), methanol (HPLC grade), acetonitril (HPLC grade) pocházely od firmy Lach-Ner (Neratovice, ČR), kyselina mravenčí (analytická, čistota 99 %) pocházela od firmy Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) a DPPH od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Voda pro analýzu byla připravena za použití přístroje Simplicity UV (Merck Millipore, Darmstadt, Německo).

## 3.2. Metody

V rámci kapitoly jsou popsány jednak analytické metody sloužící pro identifikaci a kvantifikaci anthokyanů (metoda UHPLC-MS, spektrofotometrická metoda), metoda pro stanovení antioxidační aktivity (DPPH) a pro stanovení sušiny a metodické postupy jednotlivých experimentů (pokus pro stanovení vlivu genotypu, skladovací pokus a experimenty s pečením, vařením, extruzí a pufováním).

### 3.2.1. Metody pro stanovení anthokyanů

#### 3.2.1.1. UHPLC-MS metoda

Metoda pro extrakci anthokyanů byla převzata od autorů Syed Jaafar et al. (2013) a Klavins et al. (2017) a dále optimalizována (zvýšení počtu extrakcí, zmenšení navážky a celkového objemu extraktu). Všechny vzorky byly analyzovány ve 3 opakováních. Zrno k analýze bylo jemně namleto na laboratorním mlýnku IKA (Janke & Kunkel Co., Stanfen, Německo) a po umletí zhomogenizováno. Navážka pro jeden vzorek činila 800 mg v případě pšenic purpurových a 400 mg v případě pšenic modrých. K navážce v suchém stavu byl přidán roztok interního standardu – kyanidin-3-galaktosid v MeOH s přídavkem HCl (pH = 1) v objemu odpovídající výsledné koncentraci 1 µg/ml v proměřovaném vzorku. K navážce s interním standardem v 50ml plastové kyvetě bylo přidáno 10 ml extrakčního rozpouštědla MeOH:1 M HCl v poměru 85:15. Vzorek byl promíchán na vortexové třepačce (Basic 3, IKA, KG, Staufen, Německo) po dobu 10 vteřin a dále sonikován 30 min v ultrazvukové lázni (PS 04, Powersonic-Notus, Ltd., Vrábce, Slovensko). Po sonikaci byl vzorek třepán při 150 rpm po dobu 18 hodin na vratné třepačce (3006, GFL, Burgwedel, Německo). Po této době byl vzorek zcentrifugován na centrifuze 5810 R (Eppendorf, Hamburk, Německo) po dobu 5 minut při 5000 rpm. Supernatant byl slit do 10ml odměrné baňky a doplněn rozpouštědlem na objem 10 ml.

Dalším krokem přípravy vzorku bylo přečištění extraktů za pomoci SPE (extrakce tuhou fází), jejíž postup byl převzat z Diczhazi a Kursinszki (2014) a dále optimalizován. Vzorky byly přefiltrovány membránovým filtrem (PTFE, 0,22 µm) a odpařeny do sucha při 40 °C na vakuové odparce (Rotavapor R-200, Büchi Labortechnik, AG, Flawil, Švýcarsko). Objem vzorku pro odpaření byl 900 µl v případě purpurových pšenic a 450 µl v případě modrých pšenic (kvůli rozdílu v následujícím zakoncentrování). Byly použity SPE kolony Strata® C-18 (500 mg, 3 ml, Phenomenex), které byly aktivovány nejprve 2 ml roztoku 0,1% HCOOH v MeOH a pak 2 ml 0,1% HCOOH ve vodě. Odpařené vzorky byly rekonstituovány 1 ml 0,01% HCOOH ve vodě a naložovány do SPE kolonek. Pro

vymytí vzorků byly použity 2 ml téhož roztoku (0,01% HCOOH ve vodě) a v posledním kroku byly analyty ze sorbentu vymyty 2 ml 0,01% HCOOH v roztoku MeOH:voda = 50:50. Takto získaný extrakt byl znovu odpařen do sucha a následně rekonstituován do 150 µl čistého MeOH. Výsledný roztok byl přefiltrován membránovým filtrem (PTFE, 0,22 µm) do vialek a byl ihned analyzován.

Vzorky byly analyzovány metodou UHPLC-MS, kapalinovým chromatografem byl UltiMate 3000 RS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a hmotnostním spektrometrem 3200 QTRAP s trojitým kvadrupólem a elektrosprejovou ionizací (ESI) (Sciex, Framingham, MA, USA). Parametry kapalinové chromatografie byly převzaty od autorů Syed Jaafar et al. (2013) a drobnými úpravami. Použitou kolonou byla Zorbax SB-C18, 5 µm, 30 x 150 mm a mobilními fázemi pro gradientovou eluci A: 1 % HCOOH ve vodě a B: 1 % HCOOH ve vodě s 22,5 % MeOH a 22,5 % ACN. Podmínky separace byly následující: teplota kolony 35 °C, teplota autosampleru 10 °C, rychlost průtoku 0,5 ml/min, objem nástřiku 2 µl, doba analýzy 27 min. Gradient byl: 0. – 7. min 15 % B, 7. – 19. min z 15 % na 50 % B, 19. – 21. min 50 % B, 21. – 23. min z 50 % na 15 % B, 23. – 27. min 15 % B. Parametry ionizace byly optimalizovány empiricky a jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 3).

**Tab. 3** Parametry ionizace pro jednotlivé analyty

analyt	RT (min)	[M+H] + (m/z)	MS/MS (m/z)	DP (V)	EP (V)	CEP (V)	CE (V)	CXP (V)
kyanidin-3-glukosid	12,55	449,4	287,3; 241,3	35	5	20	30	3.5
kyanidin-3-rutinosid	13,41	595,3	287,3; 449,3	45	7	22	35	3.5
delfinidin-3-glukosid	10,65	465,2	303,2; 257,3	45	5	15	30	4.0
delfinidin-3-rutinosid	11,45	611,3	303,3; 229,4	55	6	30	40	4.0
peonidin-3-glukosid	15,55	463,3	301,1; 286,1	45	5	20	30	3.5
petunidin-3-glukosid	13,63	479,2	317,2; 302,2	40	5	15	30	4.5
kyanidin-3-galaktosid	11,63	449,4	287,2; 213,2	45	4	17	30	3.5

Z dvojice analyzovaných iontů (MS/MS) v jednotlivých buňkách je vždy uveden nejprve kvantitativní a následně konfirmační iont.

RT – retenční čas, DP – deklasterizační potenciál, EP – vstupní potenciál, CEP – vstupní potenciál kolizní cely, CXP – výstupní potenciál kolizní cely

Koncentrace analytů v extraktu byla vypočtena metodou kalibrační křivky s použitím interního standardu. Obsah jednotlivých anthokyanů byl vyjádřen v µg/g sušiny. Pro sestavení kalibrace byly použity zásobní roztoky standardů. Zásobní roztok byl

vytvořen rozředěním 1 mg práškového standardu v 25 ml MeOH okyseleném HCl na pH 1 (odpovídá 40 µg/ml). Přesná koncentrace byla stanovena spektrofotometricky za využití extinkčních koeficientů převzatých z odborné literatury (Wrolstad et al. 2004). Stejným způsobem byl připraven zásobní roztok interního standardu. Spike interního standardu do vzorků odpovídal výsledné koncentraci 1 µg/ml. Metodou UHPLC-MS bylo v pšenici sledováno celkem 8 anthokyanů: kyanidin-3-glukosid, kyanidin-3-rutinosid, delphinidin-3-glukosid, delphinidin-3-rutinosid, peonidin-3-glukosid, petunidin-3-glukosid, pelargonidin-3-glukosid a malvidin-3-glukosid. Interním standardem byl kyanidin-3-galaktosid. Před samotným měřením byla orientační analýzou ve všech vzorcích prokázána nepřítomnost kyanidin-3-galaktosidu.

### **3.2.1.2. Spektrofotometrická metoda**

Metoda pro extrakci anthokyanů byla převzata od autorů Syed Jaafar et al. (2013) a dále optimalizována. Zrno k analýze bylo jemně namleto na laboratorním mlýnku IKA (Janke & Kunkel Co., Stanfen, Německo) a po umletí zhomogenizováno. Navážka pro jeden vzorek činila 800 mg v případě pšenic purpurových a 400 mg v případě pšenic modrých. Navážka v 50ml plastové kyvetě byla zalita 2,5 ml extrakčního rozpouštědla MeOH:1 M HCl v poměru 85:15. Vzorek byl promíchán na vortexové třepačce (Basic 3, IKA, KG, Staufen, Německo) po dobu 10 vteřin a dále třepán při 200 rpm po dobu 30 minut na vratné třepačce (3006, GFL, Burgwedel, Německo). Po této době byl vzorek zcentrifugován na centrifuze 5810 R (Eppendorf, Hamburk, Německo) po dobu 5 minut při 5000 rpm. Získaný supernatant byl oddělen do 10ml odměrné baňky a celý proces extrakce byl ještě 3x zopakován (přidání 2,5 ml rozpouštědla, třepání, centrifugace). Všechny 4 supernatanty byly v 10ml odměrné baňce smíseny a výsledný extrakt byl doplněn rozpouštědlem na objem 10 ml. Po promíchání roztoku bylo do 1,5ml eppendorfy odlito 1,5 ml a zcentrifugováno na centrifuze MiniSpin plus (Eppendorf, Hamburk, Německo) při 8000 rpm po dobu 4 minut.

Čistý extrakt byl přelit do 1,5ml mikrokyvety a proměřen na spektrofotometru (Spectronic Helios  $\gamma$ , Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Koncentrace analytů v extraktu byla získána metodou kalibrační křivky pro kyanidin-3-glukosid v extrakčním rozpouštědle (MeOH:1M HCl = 85:15). Obsah celkových anthokyanů byl vyjádřen jako ekvivalent kyanidin-3-glukosidu při 527 nm. Každý vzorek byl připraven ve 3 opakováních.

### **3.2.2. Metoda pro stanovení antioxidační aktivity**

Metoda pro stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH byla převzata od autorů Lachman et al. (2012) a dále upravena. Mletý a homogenizovaný vzorek zrna (1 g) byl vložen do 10ml odměrné baňky, která byla asi do poloviny objemu doplněna čistým MeOH. Vzorek byl třepán 2 hod při 150 rpm (vratná třepačka 3006, GFL, Burgwedel, Německo), objem extraktu byl následně doplněn do 10 ml rozpouštědlem a pasivní extrakce dále probíhala po dobu 1 týdne ve tmě při pokojové teplotě. Před samotným měřením byl extrakt homogenizován a zcentrifugován při 8000 rpm po dobu 2 min (centrifuga 5810 R, Eppendorf, Hamburk, Německo). Roztok DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyllový radikál) byl připraven v čistém MeOH, přičemž koncentrace roztoku byla upravena na absorbanci 0,600 AU při 515 nm. Ve spektrofotometrické 1,5ml kyvetě byl smíchán 1 ml roztoku DPPH a 100 µl extraktu, roztok byl promíchán a po 20 minutové inkubaci proměřen při 515 nm (spektrofotometr Spectronic Helios  $\gamma$ , Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Výsledné hodnoty byly získány z kalibrační křivky roztoku Troloxu v MeOH po reakci s DPPH a vyjádřeny jako ekvivalent mg Troloxu/kg sušiny. Každý vzorek byl připraven ve 3 opakováních.

### **3.2.3. Stanovení sušiny**

Pro stanovení sušiny bylo naváženo 10 g jemně namletého homogenizovaného zrna a vzorek byl sušen v sušárně Venticell 111 (BMT, Brno, Česká republika) při 105 °C po dobu 48 hod. Sušina byla stanovena jako procentuální rozdíl hmotnosti před a po usušení.

### **3.2.4. Metody pro jednotlivé experimenty**

#### ***3.2.4.1. Vliv genotypu, ročníku a pěstebního systému***

Sledování vlivu jednotlivých parametrů na obsah anthokyanů byl dílčí součástí pokusu organizovaného a provedeného Katedrou rostlinné výroby FAPPZ ČZU a celá metodika je uvedena v příslušné publikaci Zrcková et al. (2018). Použité odrůdy, v nichž byl sledován obsah anthokyanů byly AF Jumiko (Pp), PS Karkulka (Pp), AF Oxana (Ba) a Skorpion (Ba). Vzorky byly vypěstovány ve Výzkumné stanici Uhřetěves (FAPPZ ČZU) v letech 2015 – 2017 vždy ve variantě konvenční a ekologické produkce. Vzorky pěstované konvenčním způsobem byly během vegetace hnojeny dusíkem v celkové dávce 120 kg N/ha a byly ošetřovány herbicidem (Agritox 50SL, 1 l/ha), fungicidem (Amistar XTRA, 2,5 l/ha) a insekticidem (Nurelle D, 6 l/ha). U vzorků v ekologickém pěstebním

systemu nebyly použity žádné fertilizéry ani pesticidy, kontrola plevelu byla zajištěna pomocí řádkování pšenice. Podnebné podmínky jsou uvedeny v tabulce (Tab. 4).

**Tab. 4** Podnebné podmínky při experimentu v letech 2016 a 2017

roční dekáda	měsíc	průměrná teplota (°C)		úhrn srážek (mm)	
		2016	2017	2016	2017
1.		19,97	18,00	17,00	23,60
2.	červen	19,95	18,95	10,40	25,20
3.		20,52	20,91	18,00	51,80
1.		20,55	19,90	3,60	9,40
2.	červenec	19,14	19,40	19,00	15,40
3.		20,24	21,56	32,30	41,80
průměrná teplota		20,26	19,79		
úhrn srážek				100,3	167,2
průměrná teplota (dlouhodobý standard)		17,25			
celkový úhrn srážek (dlouhodobý standard)				148,0	

#### 3.2.4.2. Skladovací pokus

Pro skladovací pokus byly využity následující odrůdy a linie pšenice seté: AF Jumiko (Pp), Konini (Pp), UC 66049 (Ba) a V1 131-15 (Ba). 3 kg zrna od každého genotypu byly odděleně uloženy v textilním pytli a všechny pytle byly uloženy společně v neprůhledném plastovém pytli. Vzorky byly skladovány po dobu 24 měsíců v temnu při 22 °C. Měření bylo prováděno v pravidelných intervalech (nejprve po měsíci, po prvním půlroce vždy po 3 měsících), při každém měření byla vždy stanovena aktuální sušina zrna. Anthokyaniny byly kvantifikovány pomocí spektrofotometrické metody a jejich obsah ve formě celkových anthokyanů byl vyjádřen jako mg/kg sušiny kyanidin-3-glukosidu.

#### 3.2.4.3. Pečení

Pro pekařský pokus byly použity genotypy pšenice seté: AF Jumiko (Pp), Konini (Pp), ANK 28-A (Pp), UC 66049 (Ba) a V1 131-15 (Ba). Zrno bylo namleto na laboratorním mlýnu na celozrnnou mouku, která dále zrála 21 dní. Na vzorek od každé odrůdy bylo použito 300 g mouky, 6 g droždí, 4,8 g soli a 180 ml vody o teplotě 30 °C. Těsto bylo 30 min hněteno a 1 hodinu kynulo a uprostřed doby kynutí bylo ještě jednou

prohněteno. Po vykynutí bylo těsto rozděno na 3 klonky. Jeden klonek byl ihned zamražen a z dalších dvou klonků byly vyrobeny bulky. Bulky byly pečeny 14 minut při 240 °C, trouba byla před samotným pečením zapařena 70 ml destilované vody. Po upečení byla jedna bulka s odstupem 1,5 hodiny zamražena a poslední bulka byla ponechána pod utěrkou při pokojové teplotě 24 hodin a poté zamražena. Všechny zmražené vzorky byly před analýzou lyofilizovány. Anthokyany byly stanoveny v následujících fázích: mouka po zrání, těsto po kynutí, bulka po upečení a bulka po 24 hodinách po upečení. Anthokyany byly stanoveny spektrofotometricky jako obsah celkových anthokyanů (ekvivalent kyanidin-3-glukosidu) a pomocí UHPLC-MS byly kvantifikovány jednotlivé analyty.

#### **3.2.4.4. Vaření**

Pro vaření byly použity genotypy AF Jumiko (Pp), Konini (Pp), ANK 28-A (Pp), RU 687-12 (Pp), Skorpion (Ba), UC 66049 (Ba) a V1 131-15 (Ba). Vždy 200 g celého zrna pšenice bylo namočeno na 2 hodiny do vody, poté byla voda vyměněna a pšenice byla vařena po dobu 30 min. V průběhu vaření byla voda podle potřeby doplňována tak, aby bylo pšeničné zrno při vaření neustále ponořeno pod hladinou. Po uvaření bylo pšeničné zrno ihned zmrazeno a lyofilizováno pro analýzu. Zbytková voda po uvaření byla odpařena v sušárně při teplotě 50 °C a reziduum bylo rozpuštěno a analyzováno na obsah anthokyanů dle standardních postupů (viz metody pro stanovení anthokyanů).

#### **3.2.4.5. Extruze**

Pro extruzi byly použity genotypy AF Jumiko (Pp), Konini (Pp), ANK 28-A (Pp), RU 687-12 (Pp) a Skorpion (Ba) a UC 66049 (Ba). Extruzi materiálu provedla firma Extrudo Bečice, s.r.o. (Bečice, Česká republika). Celé zrno bylo namleto na kladívkovém mlýnu (VM 4, Taurus s.r.o., Chrudim, Česká republika) a surovina byla navlhčena na vlhkost 20 %. Po 10 min odležení byla hmota extrudována při teplotě 130 °C na extrudéru s kónickým šnekem Schaaf (Schaaf Technologie, Bad Camberg, Německo) s průměrem 6 mm a rychlostí otáčení 200 rpm.

#### **3.2.4.6. Pufování**

Pro pufování byly použity odrůdy AF Jumiko (Pp), Konini (Pp), ANK 28-A (Pp), RU 687-12 (Pp), Skorpion (Ba) a UC 66049 (Ba) a AF Zora (Ba+Pp). Pufování provedla firma Racio, s.r.o. (Břeclav, Česká republika). Před pufováním bylo zrno navlhčeno na vlhkost 17,5 % a ponecháno na 24 hod v pokojové teplotě. Proces pufování byl proveden při teplotě 270 – 280 °C a trval 6 s.



### 3.3. Statistická analýza

Statistická analýza dat byla provedena za použití programu Statistica 12 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Pro statistické hodnocení dat byla využita jednofaktorová analýza rozptylu a analýza rozptylu s interakcemi (ANOVA), Fisherova LSD (Least Significance Difference) metoda a korelační analýza. Všechna data byla vyhodnocena ze 3 opakování pro každý vzorek, hladina statistické významnosti byla  $p < 0,05$ .

Data byla získána z programů Chromeleon 6.8 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), Analyst 1.4 (Sciex, Framingham, MA, USA) a Vision (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

## 4. VÝSLEDKY A DISKUSE

### 4.1. Validace analytických metod

Pro použité analytické metody byly stanoveny základní validační parametry: linearita, limit detekce, limit kvantifikace, pracovní rozsah, výtěžnost a opakovatelnost. Další validační parametry (reprodukovatelnost, selektivita a robustnost) nebyly stanoveny.

**Limit detekce** (LOD – limit of detection) udává nejnižší množství analytu ve vzorku, který je statisticky odlišitelný od šumu. Hodnota LOD byla vypočtena podle vztahu:

$$\text{LOD} = 3,3 \cdot \frac{\sigma}{S}$$

kde  $\sigma$  udává směrodatnou odchylku členu  $a$  v regresní rovnici ( $y = a + bx$ ) a  $S$  udává průměrný sklon kalibrační křivky (Boqué a Heyden 2009).

**Limit kvantifikace** (LOQ – limit of quantification) udává mez stanovitelnosti, tedy množství analytu, které lze (na rozdíl od limitu detekce) kvantifikovat. Hodnota LOQ byla vypočtena analogicky vůči LOD ze vztahu:

$$\text{LOQ} = 10 \cdot \frac{\sigma}{S}$$

(Nováková a Douša 2013)

**Linearita** odráží existenci přímé závislosti odezvy detektoru vůči koncentraci analytu a je obecným předpokladem pro hodnocení výsledků. Grafickým vyjádřením linearity je kalibrační křivka (která je ideálně přímkou), která je definována obecnou rovnicí regrese:

$$y = a + bx$$

kde  $a$  je konstantní hodnotou udávající posun přímky na ose  $y$  a  $b$  je regresní koeficient udávající sklon přímky. Přesnost kalibrační křivky vyjadřuje korelační koeficient  $r$ , jehož hodnota by měla být co nejvyšší ( $r_{\max} = 1$ ) (Van Loco et al. 2002). Standardy AOAC International pro validaci chemických metod doporučují hodnotu  $r > 0,99$  (AOAC International, 2002). Pro validované analytické metody byla linearita vyjádřena jak rovnicí regrese, tak korelačním koeficientem.

**Pracovní rozsah** je dán intervalem hodnot, v němž byla validací potvrzena přijatelnost metody. Může být chápán jako rozmezí hodnot analytu, v němž měření vykazuje uspokojivou linearitu a opakovatelnost a jehož spodní mez není nižší než hodnota

LOQ. Pracovní rozsah by měl nabývat hodnot minimálně 80 – 120 % běžné stanovované hodnoty analytu (Huber 2010).

**Výtěžnost** (recovery) udává schopnost extrakční metody získat analyty z matrice. Je žádoucí, aby byla výtěžnost metody co nejvyšší, optimálně mezi 80 a 120 %. Výtěžnost je jednou z dílčích hodnot pro stanovení základního validačního parametru – správnosti metody (Huber 2010). Pro stanovení výtěžnosti byl použit tzv. spike – přídavek známého množství analytu do blankové matrice (tedy matrice bez obsahu tohoto analytu). Blankovou maticí byl vzorek pšenice bez obsahu anthokyanů (odrůda Bohemia). Výtěžnost byla vyjádřena jako procentuální hodnota naměřeného množství analytu vůči jeho teoretickému množství.

**Opakovatelnost** je dílčím měřením základního validačního parametru – přesnosti. Opakovatelnost (repeatability) udává těsnost shody mezi vzájemně nezávislými výsledky měření vzorků. Může být vyjádřena jako krátkodobá opakovatelnost měření v rámci jednoho dne (též intra-day repeatability), nebo jako dlouhodobá opakovatelnost měření během delšího časového úseku (inter-day repeatability) (Nováková a Douša 2013). Požadavky na hodnotu opakovatelnosti nejsou jednotné, např. standardy AOAC International pro validaci chemických metod uvádí jako přijatelnou krátkodobou opakovatelnost 8 % (AOAC International 2002).

Krátkodobá opakovatelnost byla vyjádřena jako variační koeficient ( $V_k$ ) poměru směrodatné odchylky souboru  $s$  a průměru souboru  $x$  podle vztahu:

$$V_k = 100 \cdot \frac{s}{x}$$

Dlouhodobá opakovatelnost byla vyjádřena jako RSD (repeatability standard deviation):

$$RSD = \tau \cdot s \cdot \sqrt{2}$$

kde  $s$  je směrodatná odchylka souboru a  $\tau$  předpokládaná hodnota normálního rozdělení s pravděpodobností 95 % (Pryseley et al. 2010).

#### 4.1.1. UHPLC-MS metoda

Cílem této disertační práce bylo podrobně charakterizovat obsah, skladbu a změny anthokyanů v různých genotypech pšenice. Z tohoto důvodu byla pro celou disertační práci klíčová právě UHPLC-MS metoda, která byla pro tento účel nově vyvinuta (na rozdíl od ostatních metod, které byly tou dobou už rutinně používány a byly pouze optimalizovány pro matici pšenice). Také validace byla provedena ve větším rozsahu než u ostatních

metod, neboť bylo potřeba ověřit validitu metody pro všechny stanovované analyty. LOD, LOQ, parametry linearity a pracovní rozsah byly stanoveny za použití roztoku standardů, zatímco pro stanovení výtěžnosti a opakovatelnosti byly použity reálné vzorky (v případě výtěžnosti spikované). Výsledné validační parametry metody jsou uvedeny v Tab. 5.

**Tab. 5** Validační parametry UHPLC-MS metody

	kya-3-glu	kya-3-rut	del-3-glu	del-3-rut
LOD ( $\mu\text{g/g}$ )	0,01	0,05	0,05	0,01
LOQ ( $\mu\text{g/g}$ )	0,03	0,15	0,16	0,04
rovnice regrese	$y = 1,87x + 0,0039$	$y = 2,96x - 0,0089$	$y = 2,88x + 0,0138$	$y = 2,43x - 0,0156$
korelační koeficient $r$	0,9999	0,9998	0,9995	0,9996
pracovní rozsah ( $\mu\text{g/g}$ )	0,03 – 41,6	0,15 – 41,6	0,16 – 41,6	0,04 – 41,6
výtěžnost (%)	99,3	105	96,3	101
krátkodobá opakovatelnost	6,00	6,16	8,93	4,72
Vk (%)				
dlouhodobá opakovatelnost	9,32	7,57	9,44	11,2
RSD (%)				
	peo-3-glu	pet-3-glu	pel-3-glu	mal-3-glu
LOD ( $\mu\text{g/g}$ )	0,04	0,01	0,02	0,03
LOQ ( $\mu\text{g/g}$ )	0,13	0,04	0,06	0,10
rovnice regrese	$y = 5,72x - 0,0020$	$y = 5,76x - 0,0316$	$y = 3,96x - 0,0009$	$y = 4,05x + 0,0157$
korelační koeficient $r$	0,9999	0,9997	0,9998	0,9997
pracovní rozsah ( $\mu\text{g/g}$ )	0,13 – 41,6	0,04 – 41,6	0,06 – 41,6	0,10 – 41,6
výtěžnost (%)	97,7	98,1	99,5	97,3
krátkodobá opakovatelnost	8,96	7,60	8,59	5,43
Vk (%)				
dlouhodobá opakovatelnost	11,0	6,19	9,41	11,7
RSD (%)				

kya-3-glu – kyanidin-3-glukosid; kya-3-rut – kyanidin-3-rutinosid; del-3-glu – delphinidin-3-glukosid; del-3-rut – delphinidin-3-rutinosid; peo-3-glu – peonidin-3-glukosid; pet-3-glu – petunidin-3-glukosid; pel-3-glu – pelargonidin-3-glukosid; mal-3-glu – malvidin-3-glukosid

Výhodou této metody jsou velmi nízké hodnoty LOD a LOQ, díky nimž bylo možné spolehlivě kvantifikovat i vzorky s minimálními obsahy anthokyanů. Metoda vykázala i vysokou linearitu a uspokojivý pracovní rozsah plně dostačující pro účely disertační práce. Také výtěžnost dosáhla vynikajících hodnot, které při statistickém zhodnocení nebyly významně odlišné od 100 %. Parametry opakovatelnosti (jak krátkodobé, tak dlouhodobé) dosáhly o něco vyšších hodnot než u ostatních metod. Mírně zvýšená variabilita oproti ostatním metodám může být důsledkem určité nestability odezvy při hmotnostní analýze, která byla v rámci vývoje metody opakovaně pozorována.

V odborné literatuře nebyly nalezeny žádné validované LC-MS metody pro analýzu anthokyanů v pšenici či jiných obilovinách, nicméně bylo nalezeno validační parametry několika metod využívajících LC-MS pro analýzu anthokyanů v jiných materiálech. Z jejich vzájemného porovnání je zřejmé, že validační parametry nově vyvinuté metody a obdobných publikovaných metod jsou velmi podobné. Schoedl et al. (2011) uvádí LOD a LOQ pro kyanidin-3-glukosid 1,6 a 6,6  $\mu\text{g/g}$  a Ieri et al. (2011) LOQ pro malvidin-3-diglukosid 0,072  $\mu\text{g/g}$ . Parametry opakovatelnosti stanovili Ling et al. (2010) 2,89 % ( $V_k$ ) a 6,74 % (RSD) pro kyanidin-3-glukosid a Giordano et al. (2007) 6,1 % ( $V_k$ ) a 9,1 % (RSD) pro delphinidin-3-glukosid. Zároveň hodnoty výtěžnosti odpovídají požadavkům AOAC International (2002), které uvádí dosažené limity výtěžnosti 80 – 115 %. Všechny uvedené hodnoty jsou velmi podobné validačním parametrům nově vyvinuté metody, a lze tedy soudit, že tato metoda je vhodná pro uvedení do rutinní praxe, neboť validace prokázala její dobrou použitelnost pro matici pšenice.

#### **4.1.2. Spektrofotometrická metoda**

Spektrofotometrická metoda pro stanovení anthokyanů byla použita u většiny měření souběžně s UHPLC-MS analýzou jako doplňková metoda. Zatímco UHPLC-MS metoda dovede zcela přesně stanovit jednotlivé analyty, spektrofotometrická metoda určí jejich celkovou sumu. Neposkytuje tudíž detailní výsledky obsahu anthokyanů, ale na druhou stranu vyjádří veškeré obsažené anthokyaniny včetně těch, které UHPLC-MS metoda neidentifikuje, neboť pro ně není optimalizována. Hodnoty získané oběma metodami jsou ve vzájemné korelaci a běžně se pro analýzu anthokyanů využívají obě souběžně pro potvrzení výsledků. Stanovené validační parametry metody jsou uvedeny v Tab. 6.

**Tab. 6** Validační parametry spektrofotometrické metody

validační parametr	ekvivalent kyanidin-3-glukosidu
LOD ( $\mu\text{g/g}$ )	2,48
LOQ ( $\mu\text{g/g}$ )	8,17
rovnice regrese	$y = 0,0825x + 0,0043$
korelační koeficient $r$	0,9998
pracovní rozsah ( $\mu\text{g/g}$ )	8,17 – 100
výtěžnost (%)	99,4
krátkodobá opakovatelnost – $V_k$ (%)	1,57
dlouhodobá opakovatelnost – RSD (%)	4,46

Metoda vykázala vyhovující výtěžnost a parametry opakovatelnosti, ovšem poměrně vysoký LOQ. Tento fakt byl způsoben vlivem samotné matrice. I odrůdy pšenice bez obsahu anthokyanů (červené, bílé a žluté) totiž vykazují určitou absorpční vlnu v oblasti absorpčního maxima anthokyanů, která však není způsobena přítomností barviv (jak bylo potvrzeno mnohem citlivější UHPLC-MS metodou), ale přítomností jiných látek, které zbarvují extrakt do žluta. Na základě empiricky stanoveného LOQ lze tedy říct, že naměřené hodnoty anthokyanů pod  $8,17 \mu\text{g/g}$  nelze obecně považovat za průkaz obsahu těchto barviv. Na druhou stranu výborné hodnoty krátkodobé i dlouhodobé opakovatelnosti velmi dobře odpovídají parametrům oficiální pH-diferenční metody pro stanovení anthokyanů (AOAC metoda 2005.02), u níž je udávána nerozlišená opakovatelnost v rozmezí 1,06 – 4,16 %.

#### 4.1.3. Metoda pro stanovení antioxidační aktivity

Tato metoda je jedním z nejjednodušších způsobů posouzení antioxidační aktivity. Její výpovědní hodnota je jen omezená, vykazuje přítomnost jakýchkoliv látek uvolňujících  $\text{H}^+$ , tedy nejen antioxidantů, reakce probíhá v nepřírodně kyselém prostředí a detekuje pouze látky rozpustné v polárních organických rozpouštědlech (methanol, ethanol), ale i tak je jednou z nejčastěji používaných antioxidačních metod v rostlinných materiálech a potravinách. Zcela běžně je používána pro stanovení antioxidační aktivity v souvislosti s analýzou anthokyanů. Stanovené validační parametry metody jsou uvedeny v Tab. 7.

Tab. 7 Validační parametry antioxidační metody s použitím DPPH

validační parametr	ekvivalent Troloxu
LOD ( $\mu\text{g/g}$ )	1,03
LOQ ( $\mu\text{g/g}$ )	3,40
rovnice regrese	$y = -0,0088 + 0,5465$
korelační koeficient $r$	0,9963
pracovní rozsah ( $\mu\text{g/g}$ )	3,40 – 500
krátkodobá opakovatelnost – $V_k$ (%)	2,77
dlouhodobá opakovatelnost – RSD (%)	4,84

Výsledky validace jasně ukazují, proč se tato metoda těší tak široké oblibě i přes spornou výpovědní hodnotu výsledků. Validační parametry prokazují, že se jedná o metodu poskytující stabilní výsledky, s nízkým detekčním a kvantifikačním limitem a výbornou linearitou v širokém pracovním rozpětí. To potvrzují také další autoři, kteří uvádí podobně nízké hodnoty opakovatelnosti – např. Rafael et al. (2007) ( $V_k$  1,5 % a RSD 2,6 %) a Bobo-García et al. (2015) ( $V_k$  1,0 – 3,4 % a RSD 1,9 – 3,2 %). V tomto ohledu tedy metoda splňuje všechny požadavky na metodu užívanou v rutinní praxi.

Záměrem práce bylo stanovit antioxidační aktivitu v extraktech barevných pšeníc tak, aby bylo možné posoudit vliv přítomných anthokyanů na míru antioxidační aktivity. Během optimalizace metody se však ukázalo, že rozpouštědlo vhodné pro extrakci anthokyanů (MeOH:1M HCl = 85:15) nelze v tomto případě použít, neboť přítomnost HCl způsobovala falešnou pozitivitu výsledků (což je důsledkem hlavní nevýhody této metody – tedy, že radikál DPPH reaguje s jakýmkoliv uvolněným  $\text{H}^+$ , který v tomto případě pocházel z kyseliny a nikoliv z přítomných antioxidantů). Proto muselo být extrakční činidlo pro tuto metodu nahrazeno čistým MeOH, který však neměl pro anthokyany tak vysokou extrakční účinnost.

Validace prokázala aplikovatelnost všech uvedených metod a na základě těchto výsledků bylo rozhodnuto o uvedení metod do rutinní praxe.

## 4.2. Analýza pšenice s barevným zrnem

Celkem 30 genotypů pšenice bylo podrobena analýzám za použití validovaných metod. Ve všech uvedených odrůdách byly stanoveny jednotlivé anthokyaniny UHPLC-MS metodou, spektrofotometricky stanovena suma anthokyaninů a dále antioxidační aktivita metodou DPPH. Vzhledem k vysokému rozsahu analyzovaného souboru (30 odrůd po 3 opakováních měřených třemi analytickými metodami) byl pokus v tomto rozsahu proveden pouze v roce 2015. Uvedené výsledky jsou tedy výstupem z pouze jednoho ročníku a nezohledňují variabilitu v obsahu bioaktivních látek ve více letech.

### 4.2.1. Obsahy anthokyaninů v barevných genotypech pšenice

Anthokyaniny byly stanoveny dvěma metodami: pomocí UHPLC-MS byla provedena analýza a kvantifikace jednotlivých monoglykosidů anthokyaninů a spektrofotometrickou metodou byl nespecificky kvantifikován sumární obsah anthokyaninů.

Metodou UHPLC-MS bylo identifikováno celkem 8 analytů: kyanidin-3-glukosid (K-3-G), kyanidin-3-rutinosid (K-3-R), delphinidin-3-glukosid (D-3-G), delphinidin-3-rutinosid (D-3-R), peonidin-3-glukosid (Po-3-G), petunidin-3-glukosid (Pt-3-G), malvidin-3-glukosid (M-3-G) a pelargonidin-3-glukosid (Pl-3-G). Prvních 6 analytů se v odrůdách pšenice s barevným zrnem běžně vyskytuje, ovšem malvidin-3-glukosid a pelargonidin-3-glukosid jsou v pšeničném zrně zastoupeny ojediněle.

Výsledné hodnoty obsahu anthokyaninů v jednotlivých genotypech pšenice s barevným zrnem jsou uvedeny na následujících stránkách v tabulkách Tab. 8 a Tab. 9. Tab. 8 uvádí průměrné obsahy jednotlivých anthokyaninů v analyzovaných genotypech. Kvůli velkému rozsahu dat není tabulka v této kapitole kompletní, obsahuje pouze průměrné hodnoty naměřených monoglykosidů bez směrodatných odchylek. Kompletní verze této tabulky je uvedena v příloze. Tab. 9 shrnuje výsledky UHPLC-MS měření a uvádí obecné rozdíly mezi purpurovými, modrými a černými pšenicemi v průměrném obsahu a skladbě anthokyaninů.



**Tab. 8** Obsahy anthokyanů v genotypch pšenice seté (UHPLC-MS metoda)

genotyp	typ	obsah anthokyanů v mg/kg sušiny								suma
		K-3-G	K-3-R	D-3-G	D-3-R	Po-3-G	Pt-3-G	M-3-G	Pl-3-G	
AF Jumiko	Pp	0,046	-	-	-	0,257	0,008	-	-	<b>0,311</b>
Purple	Pp	0,270	0,029	-	-	0,277	0,009	-	0,017	<b>0,602</b>
PS Karkulka	Pp	0,157	-	-	-	0,758	0,010	-	-	<b>0,925</b>
RU 687-12	Pp	0,395	0,027	-	-	0,404	0,041	-	0,167	<b>1,034</b>
ANK-28B	Pp	0,631	-	-	-	0,512	-	-	-	<b>1,143</b>
Purple Feed	Pp	0,479	0,131	-	-	0,466	0,013	-	0,055	<b>1,144</b>
Konini	Pp	0,735	0,174	-	-	0,838	0,006	-	-	<b>1,752</b>
ANK-28A	Pp	1,648	0,237	-	-	1,454	-	-	-	<b>3,340</b>
AF Oxana	Ba	0,961	4,561	3,80	9,408	-	0,030	-	-	<b>18,76</b>
Skorpion	Ba	1,905	6,714	4,79	11,13	-	0,141	-	-	<b>24,68</b>
H 90-15-2	Ba	6,135	14,52	9,896	19,34	-	0,665	-	-	<b>50,56</b>
V1 131-15	Ba	3,034	6,671	14,93	25,02	-	0,753	0,241	-	<b>50,64</b>
Tschermaks B. S.	Ba	6,962	12,98	14,53	23,53	-	0,580	-	-	<b>58,59</b>
EF02-54/9	Ba	6,467	12,72	16,19	27,23	-	0,863	-	-	<b>63,47</b>
UC 66049	Ba	4,803	12,98	16,06	32,22	-	0,543	-	-	<b>66,61</b>
Aoi Yu	Ba	4,466	12,55	15,12	35,60	-	0,720	-	-	<b>68,45</b>
Xiao Yian	Ba	9,338	14,24	21,58	25,97	-	0,985	-	-	<b>72,12</b>
V1 133-15	Ba	5,808	9,428	25,59	33,12	-	1,598	0,276	-	<b>75,82</b>
V1-208-17	Ba+Pp	0,070	-	-	-	0,045	-	-	-	<b>0,115</b>
V1-122-17	Ba+Pp	0,130	-	-	-	0,174	-	-	-	<b>0,304</b>
V1-143-17	Ba+Pp	1,884	4,999	5,845	5,601	0,160	0,126	-	-	<b>18,62</b>
V1-142-17	Ba+Pp	1,911	4,869	6,056	5,611	0,277	0,205	-	-	<b>18,93</b>
V1-129-17	Ba+Pp	1,570	4,177	8,331	6,442	0,268	0,330	-	-	<b>21,12</b>
V1-130-17	Ba+Pp	1,675	3,982	8,743	6,370	0,318	0,291	-	-	<b>21,38</b>
V1-145-17	Ba+Pp	1,899	6,241	6,543	6,300	0,248	0,217	-	-	<b>21,45</b>
V1-144-17	Ba+Pp	2,052	5,410	6,911	6,927	0,230	0,205	-	-	<b>21,74</b>
V2-11a-17	Ba+Pp	1,926	4,558	12,50	8,779	0,317	0,417	-	-	<b>28,49</b>
V2-15a-17	Ba+Pp	2,672	5,856	14,49	11,19	0,568	0,480	-	-	<b>35,26</b>
V1-118-17	Ba+Pp	2,859	5,998	16,05	10,52	0,391	0,604	-	-	<b>36,43</b>
AF Zora	Ba+Pp	2,991	5,676	17,59	11,30	0,575	0,566	-	-	<b>38,69</b>

**Tab. 9** Průměrné obsahy a skladba jednotlivých anthokyanů (UHPLC-MS metoda)

analyt	průměrný obsah (mg/kg sušiny)	průměrný podíl na celkovém obsahu (%)
<b>purpurové genotypy</b>		
peonidin-3-glukosid	0,621 ± 0,031	53,3
kyanidin-3-glukosid	0,545 ± 0,044	37,9
kyanidin-3-rutinosid*	0,120 ± 0,007	16,6
pelargonidin-3-glukosid*	0,079 ± 0,005	7,90
petunidin-3-glukosid*	0,015 ± 0,004	1,30
<b>suma monoglykosidů</b>	<b>1,281 ± 0,052</b>	
<b>modré genotypy</b>		
delfinidin-3-rutinosid	24,26 ± 0,85	44,6
delfinidin-3-glukosid	14,25 ± 0,539	24,9
kyanidin-3-rutinosid	10,74 ± 0,473	20,6
kyanidin-3-glukosid	4,988 ± 0,295	8,74
petunidin-3-glukosid	0,688 ± 0,041	1,12
malvidin-3-glukosid*	0,258 ± 0,076	0,42
<b>suma monoglykosidů</b>	<b>54,97 ± 1,771</b>	
<b>černé genotypy</b>		
delfinidin-3-glukosid	10,31 ± 0,565	38,1
delfinidin-3-rutinosid	7,904 ± 0,552	30,2
kyanidin-3-rutinosid	5,177 ± 0,318	20,9
kyanidin-3-glukosid	1,803 ± 0,170	8,37
petunidin-3-glukosid	0,344 ± 0,034	1,26
peonidin-3-glukosid	0,298 ± 0,039	1,26
<b>suma monoglykosidů</b>	<b>21,88 ± 1,048</b>	

\* označené analyty jsou přítomny jen v některých odrůdách

Pro kvantifikaci obsahu celkových anthokyanů byla využita spektrofotometrická metoda. Ta na rozdíl od UHPLC-MS metody sice neumožňuje detekci a kvantifikaci velmi nízkých obsahů anthokyanů ani přesnou identifikaci jednotlivých analytů, ale postihuje veškeré formy a typy anthokyanů obsažené ve vzorku. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 10, kvantifikovány jako ekvivalent kyanidin-3-glukosidu (mg/kg sušiny).

**Tab. 10** Obsahy anthokyanů v genotypech pšenice seté (spektrofotometrická metoda)

genotyp	typ	celkové anthokyany (mg/kg sušiny kya-3-glu)	genotyp	typ	celkové anthokyany (mg/kg sušiny kya-3-glu)
AF Jumiko	Pp	17,96 ± 0,541	V1-208-17	Ba+Pp	9,801 ± 0,197
PS Karkulka	Pp	30,01 ± 1,706	V1-122-17	Ba+Pp	15,31 ± 0,544
Konini	Pp	33,53 ± 1,104	V1-142-17	Ba+Pp	48,36 ± 0,898
RU 687-12	Pp	35,23 ± 0,837	V1-144-17	Ba+Pp	52,13 ± 0,192
Purple Feed	Pp	36,43 ± 0,718	V1-143-17	Ba+Pp	52,21 ± 0,673
ANK-28B	Pp	38,23 ± 3,941	V1-145-17	Ba+Pp	54,12 ± 0,829
ANK-28A	Pp	46,26 ± 1,224	V1-130-17	Ba+Pp	54,77 ± 3,598
Purple	Pp	52,44 ± 0,855	V1-129-17	Ba+Pp	60,68 ± 1,094
Skorpion	Ba	68,90 ± 1,277	V2-11a-17	Ba+Pp	61,87 ± 1,556
AF Oxana	Ba	69,27 ± 5,376	V2-13a-17	Ba+Pp	71,32 ± 2,072
Tschermaks B. S.	Ba	116,7 ± 0,935	AF Zora	Ba+Pp	73,41 ± 1,322
UC 66049	Ba	122,0 ± 1,760	V1-118-17	Ba+Pp	78,80 ± 0,883
Xiao Yian	Ba	134,0 ± 4,828			
H 90-15-2	Ba	135,6 ± 3,383			
V1 133-15	Ba	144,3 ± 5,004			
EF02-54/9	Ba	149,0 ± 2,154			
Aoi Yu	Ba	177,8 ± 2,757			
V1 131-15	Ba	202,8 ± 4,616			
<b>průměrný obsah anthokyanů (mg/kg sušiny)</b>					
		purpurové genotypy	36,26 ± 1,365		
		modré genotypy	132,0 ± 3,209		
		černé genotypy	52,73 ± 1,155		

Purpurové pšenice měly obecně nejnižší obsah anthokyanů, průměrně 1,281 mg/kg sušiny sumy monoglykosidů a 36,26 mg/kg sušiny celkových anthokyanů. Vyšší obsah anthokyanů byl pozorován v pšenicích s černým zrnem – 21,88 resp. 52,73 mg/kg sušiny, a nejvyšší pak v pšenicích s modrým zrnem – 54,97 resp. 132,0 mg/kg sušiny. Všechny tyto výsledky byly statisticky významně odlišné. Několikanásobně nižší obsah anthokyanů v purpurových pšenicích oproti modrým potvrdila řada autorů (Syed Jaafar et al. 2013; Varga et al. 2013; Ficco et al. 2014a; Böhmendorfer et al. 2018). Ficco et al. (2014a) popisuje průměrný obsah celkových anthokyanů 22,6 mg/kg sušiny v purpurových pšenicích a 118,4 mg/kg sušiny v modrých pšenicích. Podobně Abdel-Aal et al. (2006)

naměřili obsahy anthokyanů v průměru 12,8 mg/kg sušiny v purpurových a 153 mg/kg sušiny v modrých pšenicích. Tyto hodnoty jsou v dobré shodě s výsledky stanovenými v této práci a zároveň vykazují i stejný trend. Určité rozdíly mezi uvedenými hodnotami anthokyanů mohou být dány odlišností analyzovaných genotypů nebo jiným vlivem environmentálních faktorů, jako jsou lokalita, teplota nebo intenzita světla, dále ročníkem, pěstitelskými technologiemi a agronomickými parametry, např. dobou sklizně nebo hnojením (Garg et al. 2016; Böhmendorfer et al. 2018). Abdel-Aal a Hucl (2003) navíc uvádí, že environmentální faktory ovlivňují syntézu anthokyanů mnohem výrazněji u purpurových než u modrých odrůd, což je pravděpodobně důsledek odlišné lokalizace anthokyanů v pšeničném zrně. Méně jednoznačné je porovnání získaných výsledků s odbornou literaturou týkající se obsahu anthokyanů v pšenicích s černým zrnem. Dostupná literatura (Garg et al. 2016; Böhmendorfer et al. 2018) uvádí vyšší obsahy anthokyanů v černých pšenicích oproti genotypům purpurovým i modrým, což není ve shodě s výsledky této práce. Garg et al. (2016) naměřili ve třech liniích černé pšenice průměrně 170,8 mg/kg sušiny celkových anthokyanů, což je o 64 % více než obsahovaly v témže experimentu modré pšenice. Tento rozdíl je s největší pravděpodobností způsoben odlišnostmi v genetické výbavě analyzovaných kříženců, kdy někteří kříženci mohou vykazovat vyšší a jiné naopak nižší obsah anthokyanů než pšenice modré a purpurové. To potvrzují i Böhmendorfer et al. (2018), kteří u všech barevných typů rozlišují světlou a tmavou formu. Tyto dvě formy se v obsazích anthokyanů v rámci jednoho barevného typu významně liší, a to i více než dvojnásobně. V této konkrétní studii autoři pozorovali nejvyšší obsahy anthokyanů u tmavě černých genotypů, zatímco světle černé genotypy měly obsahy anthokyanů nižší než tmavě modré genotypy. Tyto výsledky tedy napovídají, že genotypy černých pšenic prezentované v rámci této disertační práce odpovídají v porovnání s odbornou literaturou spíše formám světle černým, které mají nižší obsahy anthokyanů než modré genotypy.

#### **4.2.1.1. Srovnání výsledků obou metod**

Výsledné hodnoty obsahu anthokyanů získané UHPLC-MS metodou a spektrofotometrickou metodou byly vzájemně porovnány, aby bylo možné posoudit míru korelace mezi výsledky obou analytických metod. Srovnání je uvedeno v Tab. 11.

**Tab. 11** Porovnání sumy anthokyanů UHPLC-MS metody a celkových anthokyanů spektrofotometrické metody

genotyp	typ	UHPLC (mg/kg sušiny)	spektrofotometrie (mg/kg sušiny kya-3-glu)
AF Jumiko	Pp	0,311 ± 0,010	17,96 ± 0,541
Purple	Pp	0,602 ± 0,040	52,44 ± 0,855
PS Karkulka	Pp	0,925 ± 0,036	30,01 ± 1,706
RU 687-12	Pp	1,034 ± 0,019	35,23 ± 0,837
ANK-28B	Pp	1,143 ± 0,078	38,23 ± 3,941
Purple Feed	Pp	1,144 ± 0,025	36,43 ± 0,718
Konini	Pp	1,752 ± 0,059	33,53 ± 1,104
ANK-28A	Pp	3,340 ± 0,151	46,26 ± 1,224
AF Oxana	Ba	18,76 ± 1,270	69,27 ± 5,376
Skorpion	Ba	24,68 ± 2,037	68,90 ± 1,277
H 90-15-2	Ba	50,56 ± 0,661	135,6 ± 3,383
V1 131-15	Ba	50,64 ± 0,867	202,8 ± 4,616
Tschermaks B. S.	Ba	58,59 ± 2,936	116,7 ± 0,935
EF02-54/9	Ba	63,47 ± 1,705	149,0 ± 2,154
UC 66049	Ba	66,61 ± 2,283	122,0 ± 1,760
Aoi Yu	Ba	68,45 ± 1,652	177,8 ± 2,757
Xiao Yian	Ba	72,12 ± 3,258	134,0 ± 4,828
V1 133-15	Ba	75,82 ± 1,037	144,3 ± 5,004
V1-208-17	Ba+Pp	0,115 ± 0,007	9,801 ± 0,197
V1-122-17	Ba+Pp	0,304 ± 0,012	15,31 ± 0,544
V1-143-17	Ba+Pp	18,62 ± 0,404	52,21 ± 0,673
V1-142-17	Ba+Pp	18,93 ± 0,238	48,36 ± 0,898
V1-129-17	Ba+Pp	21,12 ± 0,348	60,68 ± 1,094
V1-130-17	Ba+Pp	21,38 ± 0,221	54,77 ± 3,598
V1-145-17	Ba+Pp	21,45 ± 0,684	54,12 ± 0,829
V1-144-17	Ba+Pp	21,74 ± 0,332	52,13 ± 0,192
V2-11a-17	Ba+Pp	28,49 ± 0,073	61,87 ± 1,556
V2-13a-17	Ba+Pp	35,26 ± 0,259	71,32 ± 2,072
V1-118-17	Ba+Pp	36,43 ± 0,171	78,80 ± 0,883
AF Zora	Ba+Pp	38,69 ± 0,451	73,41 ± 1,322

Ve všech případech byly spektrofotometricky stanovené obsahy celkových anthokyanů výrazně vyšší, než byla prostá suma anthokyanů identifikovaných pomocí UHPLC-MS. Oběma metodami bylo prokázáno, že obecně mají purpurové pšenice obsah nejnižší a modré pšenice nejvyšší. Mezi výsledky obou měření byla zjištěna vysoká korelace sumárně pro všechny barevné typy ( $r = 0,9198$ ), která se ovšem výrazně lišila v závislosti na konkrétním barevném typu – nejvyšší korelace byla pozorována u černých pšenic ( $r = 0,9698$ ) zatímco dva další typy vykazovaly korelaci významně nižší ( $r = 0,4151$  u purpurových a  $r = 0,5716$  u modrých pšenic). Relativně nízké hodnoty korelace u purpurového a modrého typu poukazují na skutečnost, že výsledky měření jsou na sobě závislé jen do určité míry a z určité části jsou pravděpodobně ovlivněny ještě jiným faktorem. V tomto případě se jedná o vliv jiných forem anthokyanů, které při spektrofotometrickém měření přispívají k celkové sumě, ovšem při UHPLC-MS měření se neprojeví, neboť hmotnostní detekce není naladěna na jejich zachycení. Rozsáhlým popisem anthokyanového spektra v pšenici se zabývali Abdel Aal et al. (2018) a Garg et al. (2016). Kromě běžných monoglykosidických forem anthokyanů identifikovali i některé méně typické analyty – např. rutinosidy peonidinu a malvidinu. Dále popsali také výskyt několika dalších forem anthokyanů: diglykosidy – např. kyanidin-3,5-diglukosid a delfinidin-3-sambubiosid; triglykosidy – např. kyanidin-3-(2G-xylosylrutinosid) a kyanidin-3-rutinosid-3'-glukosid; anthokyanu acylované organickými kyselinami: např. kyanidin-3-(6''-malonylglukosid) a kyanidin-3-(6''-sukcinylglukosid); a anthokyanu acylované fenolickými kyselinami – např. delfinidin-3-kaffeyolglukosid a kyanidin-3-(6''-feruoylglukosid)-5-glukosid. Všechny tyto analyty tvoří součást anthokyanového spektra, a přispívají tudíž k intenzitě barvy stanovované spektrofotometricky. Jak vidno z již zmíněné korelace výsledků obou metod, příspěvek těchto anthokyanů k celkové intenzitě barvy ovšem není konstantní, což vypovídá o variabilitě v obsahu těchto forem anthokyanů v jednotlivých odrůdách (Garg et al. 2016; Abdel Aal et al. 2018). Výrazný rozdíl v hodnotách získaných HPLC a spektrofotometricky popsali také Abdel Aal et al. (2006), kteří uvedli 1,5 – 5× vyšší hodnotu celkových anthokyanů stanovených spektrofotometricky oproti sumě jednotlivých identifikovaných anthokyanů pomocí HPLC-PDA. Podobně Ficco et al. (2014a) zjistili 1,5 – 2× vyšší hodnotu nespécificky stanovených celkových anthokyanů (pomocí pH-diferenční metody) oproti sumě jednotlivých analytů identifikovaných pomocí HPLC-UV/vis. Na tomto místě je vhodné poukázat také na fakt, že výsledky získané různými metodami jsou v mnoha případech jen obtížně porovnatelné, neboť tyto metody jsou samy o sobě z hlediska způsobu detekce analytů naprosto diametrálně odlišné.

#### 4.2.2. Anthokyanany pšeníc s purpurovým zrnem

Anthokyanový profil purpurových pšeníc byl variabilnější než u genotypů modrých a černých. Z celkového hlediska byl dominantním identifikovaným anthokyanem peonidin-3-glukosid – ve 4 genotypech převažoval a ve zbylých 4 bylo jeho množství srovnatelné s kyanidin-3-glukosidem, který byl jinak druhým analytem v pořadí. Tyto dva analyty byly identifikovány ve všech analyzovaných vzorcích, zatímco další analyty – kyanidin-3-rutinosid, pelargonidin-3-glukosid a petunidin-3-glukosid – byly identifikovány jen v některých odrůdách či liniích. Pelargonidin-3-glukosid byl zároveň jediným anthokyanem, který byl identifikován výhradně v purpurových genotypech. Variabilitu anthokyanového profilu u purpurových pšeníc dokládají také jiní autoři. Jako hlavní anthokyany jsou uváděny kyanidin-3-glukosid a kyanidin-3-rutinosid (Knievel et al. 2009), kyanidin-3-glukosid, kyanidin-galaktosid a peonidin-3-glukosid (Abdel-Aal & Hucl, 2003; Abdel-Aal et al. 2006) a kyanidin-3-glukosid, peonidin-3-galaktosid a malvidin-3-glukosid (Ficco et al. 2014a). Kyanidin-3-galaktosid a malvidin-3-glukosid nebyly v našich purpurových pšenicích nalezeny, na druhou stranu byly v odrůdě Konini identifikovány delfinidin-3-rutinosid a delfinidin-3-glukosid, které ostatní autoři neuvádí. Je zřejmé, že anthokyanový profil v purpurových genotypech je velmi různorodý a může se u jednotlivých genotypů zásadně lišit (Knievel et al. 2009; Ficco et al. 2014a).

Pšenice s purpurovým zrnem obsahovaly až několikanásobně méně anthokyanů než pšenice se zrnem modrým a černým. Průměrná suma obsahu identifikovaných anthokyanů činila 1,281 resp. 36,26 mg/kg sušiny – nejméně anthokyanů (shodně u obou analytických metod) obsahovala odrůda AF Jumiko (0,311 resp. 17,96 mg/kg sušiny). Nejvyšší suma monoglykosidů byla zaznamenána v genotypu ANK 28-A (3,340 mg/kg sušiny), zatímco celkových anthokyanů obsahovala nejvíce odrůda Purple (52,44 mg/kg sušiny). Nižší obsahy anthokyanů v purpurových pšenicích oproti modrým ve svých studiích potvrdili např. Syed Jaafar et al. (2013) a Varga et al. (2013), Ficco et al. (2014a), Böhmdorfer et al. (2018). Z porovnání průměrných hodnot celkových anthokyanů uvedených v odborné literatuře je patrná i značná variabilita v obsazích anthokyanů u pšeníc s purpurovým perikarpem. V těch různí autoři naměřili průměrně 11,1 mg/kg sušiny (Liu et al. 2010), 14,7 mg/kg sušiny (Varga et al. 2013), 22,6 mg/kg sušiny (Ficco et al. 2014a), 42,56 mg/kg sušiny (Garg et al. 2016), 69,3 mg/kg sušiny (Syed Jaafar et al. 2013) a 72,5 mg/kg sušiny (Abdel-Aal et al. 2006)

Na obsahu anthokyanů se významně podílí řada faktorů (environmentální podmínky, pěstební technologie, agronomické parametry), které v důsledku odlišné

lokalizace v zrně ovlivňují výrazněji obsah anthokyanů v purpurových než v modrých pšenicích (Abdel-Aal & Hucl 2003). Významný vliv vnitřních i vnějších podmínek na obsah anthokyanů potvrzují i Ficco et al. (2014a), kteří uvádí, že vedle genotypu je největší rozdíl způsoben vlivem ročníku a lokality. Brown et al. (2008) navíc doplňují, že při hodnocení vlivu lokality je pozorován též významný efekt nadmořské výšky daného místa a udává, že se zvyšující se nadmořskou výškou úroveň syntézy anthokyanů v pšeničném zrně roste. Ovšem Francavilla a Joye (2020) také upozorňují, že případné nízké hodnoty anthokyanů detekované v purpurových pšenicích mohou být též zkresleny horší extraktibilitou anthokyanů z perikarpu oproti extraktibilitě anthokyanů z aleuronové vrstvy u pšenice modrých. Vysokou variabilitu obsahu anthokyanů v purpurových pšenicích dokládá i prosté porovnání různých experimentů analyzujících obsah anthokyanů v odrůdě Konini. Např. v roce 2006 bylo ve vzorku této odrůdy zaznamenáno 3 810 mg/kg v Kanadě (Abdel Aal et al. 2006), 25,4 mg/kg v Dánsku v roce 2008 (Liu et al. 2010), 6,7 mg/kg v Maďarsku v roce 2010 a 1,3 mg/kg tamtéž v roce 2011 (Varga et al. 2013).

#### **4.2.3. Anthokyaniny pšenice s modrým zrnem**

Dominantním anthokyanem všech modrých genotypů byl delfinidin-3-rutinosid, který tvořil průměrně 44,6 % sumy všech identifikovaných anthokyanů. Dalšími analyty byly delfinidin-3-glukosid, kyanidin-3-rutinosid a kyanidin-3-glukosid a petunidin-3-glukosid. Ve většině vzorků byly anthokyaniny zastoupeny dle obsahu přesně v tomto pořadí, pouze 3 odrůdy a linie (AF Oxana, H 90-15-2 a Skorpion) obsahovaly více kyanidin-3-rutinosidu než delfinidin-3-glukosidu. Dvě linie obsahovaly navíc i malé množství malvidin-3-glukosidu a tento anthokyan byl zároveň jediným, který byl identifikován výhradně v modrých pšenicích. Až na tyto drobné výjimky byl anthokyanový profil pšenice s modrým zrnem napříč všemi liniemi a odrůdami prakticky totožný. To potvrzují také výsledky jiných autorů (Abdel Aal et al. 2006; Knievel et al. 2009; Ficco et al. 2014a), kteří ve všech analyzovaných odrůdách shodně potvrdili bezvýhradní přítomnost 4 majoritních anthokyanů (delfinidin-3-rutinosid, delfinidin-3-glukosid, kyanidin-3-rutinosid, kyanidin-3-glukosid). Také petunidin-3-glukosid (Abdel-Aal et al. 2006) a malvidin-3-glukosid (Ficco et al. 2014a) byly v některých odrůdách identifikovány. Dále byly v pšenicích s modrým zrnem popsány i jiné minoritní monoglykosidové anthokyaniny – např. peonidin-3-arabinosid a peonidin-3-galaktosid (Ficco et al. 2014a), malvidin-3-rutinosid a peonidin-3-rutinosid (Garg et al. 2016), které ovšem v rámci této práce nebyly pomocí UHPLC-MS sledovány. Výjimkou byl peonidin-3-galaktosid, který byl v rámci disertační práce původně také sledován a metoda



UHPLC-MS pro něj byla rovněž optimalizována. Tento analyt však nebyl nikdy v žádném vzorku identifikován, a tudíž byl z finální metodiky pro zjednodušení vyřazen. Genotyp Sebesta Blue, který peonidin-3-galaktosid podle Ficco et al. (2014a) obsahuje, nebyl v souboru vzorků pro tuto práci přítomen.

Měření ukázalo, že jednotlivé odrůdy a linie jsou v obsahu anthokyanů velmi variabilní. Pšenice s modrým zrnem obsahovaly průměrně 54,97 mg/kg sušiny sumy monoglykosidů a 132,0 mg/kg sušiny celkových anthokyanů. Při hodnocení sumy monoglykosidů obsahovala nejméně anthokyanů odrůda AF Oxana (18,76 mg/kg sušiny) a nejvíce linie V1 133-15 (75,82 mg/kg sušiny). V případě celkových anthokyanů byly výsledky odlišné, nejnižší obsah anthokyanů byl zaznamenán v odrůdě Skorpion (68,90 mg/kg sušiny) a nejvyšší v linii V1 131-15 (202,8 mg/kg sušiny). Tyto výsledky jsou obdobné hodnotám uvedeným v odborné literatuře, kde byly zaznamenány obsahy celkových anthokyanů 90,7 mg/kg sušiny (Knievel et al. 2009), 104,3 mg/kg sušiny (Garg et al. 2016), 118,4 mg/kg sušiny (Ficco et al. 2014a) a 165,1 mg/kg sušiny (Syed Jaafar et al. 2013). Podobně stanovili Abdel-Aal et al. (2016) v odrůdě Purendo 38 průměrnou sumu monoglykosidů 73,5 mg/kg sušiny. Tato odrůda sice nebyla součástí souboru pro analýzu v této disertační práci, nicméně její výsledky jsou v dobré shodě s jinými vzorky v našem souboru. Za zmínku také stojí fakt, že i u modrých genotypů (podobně jako u purpurových) uvádí odborná literatura odlišné hodnoty celkových anthokyanů, ovšem oproti purpurovým pšenicím jsou hodnoty anthokyanů napříč studii mnohem méně variabilní. To může potvrzovat domněnku autorů Abdel-Aal a Hucl (2003), že míra syntézy anthokyanů v zrně je u modrých genotypů méně ovlivněna působením vnějších podmínek, než je tomu u purpurových pšenic.

Celkově obsahovaly pšenice s modrým zrnem vyšší množství anthokyanů než pšenice purpurové a černé. Francavilla a Joye (2020) se domnívají, že zvýšený obsah anthokyanů v modrých pšenicích je důsledkem lepší stability díky jejich lokalizaci v zrně. Aleuronová vrstva je kryta několika povrchovými vrstvami, a je tedy lépe chráněna před vlivy vnějšího prostředí oproti perikarpu, v němž jsou uloženy anthokyaniny purpurových pšenic. Vysoká variabilita v obsahu anthokyanů je ovlivněna environmentálními faktory (Garg et al. 2016; Böhmendorfer et al. 2018), ale pravděpodobně také tzv. efektem genové dávky, který je u pšenic s modrým zrnem velice dobře pozorovatelný, jak uvádí Burešová et al. (2015). Tento jev je podmíněn počtem kopií genu pro syntézu anthokyanů. Čím je v genotypu obsaženo více chromozómů nesoucích tento gen, tím je výsledný efekt genu – tedy intenzita barvy – vyšší. Odrůdy a linie, které mají ve svém genotypu přítomen pouze

jeden chromozóm nesoucí tento gen, mají zrno světle modré barvy, zatímco disomie tohoto chromozómu se projevuje tmavě modrou barvou zrna. Je tedy možné, že zatímco linie s vysokým obsahem anthokyanů (např. V1 133-15 nebo Xiao Yian) prezentují právě disomický křížence, odrůdy s výrazně nižším obsahem anthokyanů (Skorpion nebo AF Oxana) jsou naopak monosomiční kříženci.

#### **4.2.4. Anthokyany pšenice s černým zrnem**

V rámci charakterizace odrůd byly analyzovány i anthokyanové profily několika kříženců pšenice s modrým a purpurovým zrnem (v práci označovány jako černé pšenice). Pro měření bylo použito celkem 12 linií ze 4 různých původů (viz tab). U dvou linií V1-208-17 a V1-122-17 byl zjištěn výrazně nižší obsah anthokyanů než u ostatních linií, 0,115 a 0,304 mg/kg sušiny oproti průměru ostatních linií 26,21 mg/kg sušiny anthokyanů. Tyto dvě linie však zřejmě nelze považovat za typické zástupce černých pšenic. Od ostatních černých pšenic se totiž tyto linie lišily výrazně světlejší barvou zrna a odlišností anthokyanového profilu, který v tomto případě charakterem odpovídal purpurovým pšenícím (obsažený byl pouze kyanidin-3-glukosid a peonidin-3-glukosid). Je tedy pravděpodobné, že tyto linie křížením nezískaly geny pro modrý aleuron a z genetického hlediska by se tak spíše řadily mezi pšenice s purpurovým zrnem. Přitom např. linie V1-122-17 má naprosto stejný původ (z křížení RU-440/Bohemia//Indigo/Bohemia) jako linie V1-118-17, V2-11a-17 a V2-15a-17 a jako odrůda AF Zora, které naopak dosáhly vysokých obsahů anthokyanů. Tyto čtyři linie, na rozdíl od V1-122-17, pravděpodobně v rámci křížení získaly geny jak pro modrý aleuron, tak pro purpurový perikarp.

S výjimkou dvou odlišných linií měly všechny ostatní linie velmi podobný anthokyanový profil. Majoritními anthokyany byly v sestupném pořadí delfinidin-3-glukosid, delfinidin-3-rutinosid a kyanidin-3-rutinosid. Mnohem méně byl zastoupen kyanidin-3-glukosid a minoritní podíl tvořily petunidin-3-glukosid a peonidin-3-glukosid. Všechny tyto anthokyany identifikovali v černých pšenících také Garg et al. (2016), podle kterých se zde mohou vyskytovat i malvidin-3-glukosid, malvidin-3-rutinosid, peonidin-3-rutinosid a pelargonidin-3-glukosid. Tento anthokyanový profil (zejména majoritní analyty) odpovídá do určité míry kombinaci profilů modrých a purpurových pšenic. Obsažené glykosidy delfinidinu jsou typickými analyty modrých pšenic, zatímco přítomný peonidin-3-glukosid je naopak charakteristický pouze pro purpurové odrůdy. Jediným významným rozdílem je pořadí dvou prvních majoritních analytů – černé pšenice obsahují

více delfinidin-3-glukosidu, zatímco modré pšenice mají vyšší obsah delfinidin-3-rutinosidu.

Stejně jako v případě purpurových i modrých genotypů, byla také u černých linií zaznamenána vysoká variabilita v obsahu anthokyanů. Obsah sumy monoglykosidů byl (s výjimkou dvou vyloučených linií) nejnižší u linie V1-143-17, 18,62 mg/kg sušiny, a nejvyšší u odrůdy AF Zora, 38,69 mg/kg sušiny. Celkových anthokyanů obsahovala nejméně linie V1-142-17 (48,36 mg/kg sušiny) a nejvíce linie V1-118-17 (78,80 mg/kg sušiny). Obecně obsahovaly pšenice s černým zrnem více anthokyanů než pšenice purpurové, ale méně než pšenice s modrým zrnem. V odborné literatuře doposud není mnoho zdrojů, které by pojednávaly o černých pšenicích a byly nalezeny pouze 2 články zabývající se tímto tématem. Garg et al. (2016) uvádí, že analyzované linie černých pšeníc měly ve všech případech vyšší průměrný obsah anthokyanů (170,8 mg/kg) než pšenice purpurové (42,56 mg/kg) i modré (104,3 mg/kg). Všechny tyto linie byly potomky černé donorové linie křížené s dalšími barevnými typy. Böhmendorfer et al. (2018) ve výsledcích uvedli stejný obecný trend. V rámci studie však každý barevný typ (purpurová, modrá, černá) autoři rozdělili na 2 skupiny – světlou a tmavou formu. Z podrobnějších výsledků vyplývá, že zatímco tmavě černé pšenice mají jednoznačně nejvyšší průměrný obsah anthokyanů (888,2 mg/kg), světle černé pšenice (421,4 mg/kg) mají nižší obsah anthokyanů než pšenice tmavě modré (514,0 mg/kg). Z těchto výsledků je zřejmé, že původ a zděděná kombinace genů významně ovlivňuje barevný fenotyp resp. jeho intenzitu. Oproti uvedeným studiím obsahovaly všechny linie černých pšeníc použitých v této práci méně anthokyanů než modré pšenice. Jelikož všechny tyto linie byly potomky vždy jednoho purpurového a jednoho modrého genotypu, může tento fakt souviset s genetickou segregací a tzv. efektem genové dávky (viz kap. 4.2.3.). V důsledku toho nemusí potomek získat kompletní sadu všech alel a kopií daného genu pro syntézu anthokyanů, ale pouze jejich část, čímž bude celková fenotypová exprese barvy slabší.

#### **4.2.5. Vliv vybraných parametrů na obsah anthokyanů**

Jak již bylo opakovaně uvedeno, odborná literatura zmiňuje vliv různých vnitřních a vnějších parametrů na míru syntézy anthokyanů v pšeničném zrně. Pro ověření vlivu některých těchto parametrů byl proveden dvouletý pokus, jehož cílem bylo ověřit vliv genotypu, ročníku a pěstebního systému na obsah anthokyanů v pšenicích s barevným zrnem. V experimentu byly použity odrůdy AF Jumiko (Pp), PS Karkulka (Pp), AF Oxana (Ba) a Skorpion (Ba). Výsledky uvedené v této práci jsou pouze dílčím výstupem pokusu,

který byl v plném rozsahu publikován autory Zrcková et al. (2018). Obsahy anthokyanů byly hodnoceny spektrofotometrickou metodou a výsledky byly vyjádřeny jako obsah celkových anthokyanů (mg/kg sušiny). Výsledky jsou uvedeny v tabulce (Tab. 12).

**Tab. 12** Hodnoty celkových anthokyanů (mg/kg sušiny) pro jednotlivé vzorky z ekologického (EKO) a konvenční (KON) pěstebního systému v letech 2016 a 2017

odrůdy	typ	2016		2017	
		EKO	KON	EKO	KON
AF Jumiko	Pp	18,89 ± 2,502 <i>b</i>	18,32 ± 0,667 <i>b</i>	16,24 ± 0,432 <i>a</i>	22,50 ± 0,591 <i>c</i>
PS Karkulka	Pp	35,46 ± 1,993 <i>c</i>	26,35 ± 1,357 <i>a</i>	31,81 ± 0,468 <i>b</i>	33,76 ± 0,281 <i>bc</i>
AF Oxana	Ba	48,84 ± 3,304 <i>a</i>	45,67 ± 2,549 <i>a</i>	102,3 ± 3,883 <i>c</i>	95,66 ± 1,362 <i>b</i>
Skorpion	Ba	46,78 ± 1,525 <i>a</i>	48,99 ± 5,399 <i>a</i>	109,8 ± 2,946 <i>b</i>	114,8 ± 4,488 <i>b</i>

hodnoty v rádcích označené odlišnými písmeny jsou statisticky významně odlišné

Jednotlivé odrůdy se v obsahu anthokyanů výrazně lišily. Jak již bylo uvedeno dříve, odrůdy s purpurovým perikarpem obsahují zpravidla nižší obsahy anthokyanů než odrůdy s modrým aleuronem, jak bylo ostatně potvrzeno i ve výše uvedených výsledcích v této práci. Efekt genotypu byl statisticky významný ( $p < 0,0001$ ), čímž byla potvrzena obecně vysoká variabilita v obsazích anthokyanů v jednotlivých genotypech.

Vliv ročníku je dán zejména průměrnou teplotou a úhrnem srážek (Garg et al. 2016; Böhmendorfer et al. 2018). Při srovnání podnebných podmínek byly oba ročníky ve sledovaném období teplotně nadprůměrné, přičemž mírně vyšší teplota (20,26 °C) byla zaznamenána v prvním roce experimentu (2016) oproti druhému roku 2017 (teplota 19,79 °C). V případě úhrnu srážek však byly mezi ročníky výrazné rozdíly. Rok 2016 byl ve sledovaném období srážkově výrazně podprůměrný (100,3 mm srážek oproti dlouhodobému průměru 148,0 mm), zatímco rok 2017 byl naopak srážkově nadprůměrný (167,2 mm srážek). Vliv ročníku byl statisticky významný ( $p < 0,0001$ ), výrazné rozdíly v průměrných obsazích anthokyanů v obou letech zaznamenaly zejména modré odrůdy, zatímco u purpurových byl rozdíl mezi ročníky minimální. Celkově vyšší hodnoty byly zaznamenány v roce 2017, který byl srážkově nadprůměrný s mírně nižší teplotou oproti předchozímu roku. Tyto výsledky mohou být vysvětleny právě nižší teplotou, která obecně v rostlinách zvyšuje syntézu anthokyanů (de Pascual-Teresa & Sanchez-Ballesta, 2008). Jako statisticky významný byl vyhodnocen i vliv interakce genotypu s ročníkem ( $p < 0,0001$ ). Tyto výsledky potvrzují také Abdel-Aal et al. (2016), kteří uvádí, že obsah anthokyanů je významně ovlivněn nejen samotným genotypem a ročníkem, ale také jejich interakcí, a to zejména u purpurových genotypů. V této disertační práci byl naopak

zaznamenán výraznější vliv ročníku i kombinace genotyp  $\times$  ročník u modrých pšeníc. Na tomto místě je však nezbytné upozornit, že výsledky uvedených autorů pochází z Kanady, a mohou tak být dány výrazně odlišnými podmínkami lokality než tomu bylo u vzorků vypěstovaných v České republice.

Významný vliv pěstebního systému na syntézu anthokyanů nebyl potvrzen ( $p = 0,4915$ ). To je v rozporu s meta-analýzou Barański et al. (2014), kteří prokázali, že organicky pěstované plodiny obsahují zpravidla vyšší obsahy anthokyanů. Tento efekt je patrný zejména v případě ovoce a zeleniny, zatímco u pšenice se odlišnosti mezi pěstebními systémy projevit nemusí (Almuayrifi 2013). I v případě experimentu v této práci lze mezi vzorky z obou pěstebních systémů pozorovat dílčí rozdíly. V roce 2016, který byl pro syntézu anthokyanů méně příznivý, byl rozdíl v ekologické a konvenční produkci pozorován pouze u odrůdy PS Karkulka, přičemž vzorek pocházející z ekologického pěstebního systému měl signifikantně vyšší obsah anthokyanů (o 34,6 %). Mírně zvýšený obsah anthokyanů byl pozorován i u odrůdy AF Oxana, tento rozdíl však nebyl statisticky významný. Jinak tomu však bylo v roce 2017, který byl charakterizován příznivějšími podmínkami pro syntézu anthokyanů v pšeničném zrně. V tomto ročníku se ekologický pěstební systém pozitivně projevil na obsahu anthokyanů u odrůdy AF Oxana (o 6,94 % než u konvenční varianty), ovšem zároveň byl pozorován i pozitivní efekt konvenčního pěstování u odrůd AF Jumiko (obsah anthokyanů vyšší o 28,5 %) a Skorpion (rozdíl o 4,62 %). Je tedy patrné, že pěstební systém má pravděpodobně různé účinky na odlišné odrůdy a že v tomto ohledu může hrát roli také interakce s ročníkem, ani jeden z těchto efektů však při statistickém hodnocení nebyl významný (genotyp  $\times$  systém  $p = 0,0993$ ; systém  $\times$  ročník  $p = 0,6938$ ; genotyp  $\times$  systém  $\times$  ročník  $p = 0,2570$ ).

Výsledky ukázaly, že syntéza a kumulace, resp. celkový obsah anthokyanů v pšeničném zrně je významně ovlivněn genotypem a ročníkem. Naopak vliv pěstebního systému (ve smyslu pozitivního efektu ekologického produkčního systému) potvrzen nebyl. Další parametry s potenciálním vlivem na obsah anthokyanů (vliv lokality, výživy apod.) v rámci této práce hodnoceny nebyly.

#### **4.2.6. Stanovení antioxidační aktivity**

Antioxidační aktivita pomocí metody DPPH byla stanovena u všech genotypů hodnocených v této práci z hlediska obsahu anthokyanů a pro porovnání také u dalších barevných typů pšenice bez obsahu anthokyanů – jednalo se o typ bílý (bez obsahu barevných látek), červený (standardní zbarvení) a žlutý (se zvýšeným obsahem

karotenoidů). Celkově bylo do pokusu stanovení antioxidační aktivity (AOX) zahrnuto celkem 41 genotypů – 1 bílý, 5 červených, 4 žluté, 9 purpurových, 10 modrých a 12 černých. Výsledky měření pro jednotlivé genotypy uvádí Tab. 13, jejich souhrn a pro lepší porovnání s odbornou literaturou i přepočtené hodnoty na procentuální úbytek DPPH radikálu uvádí Tab. 14.

**Tab. 13** Antioxidační aktivita různých genotypů pšenice stanovených metodou DPPH

genotyp	typ	AOX DPPH (mg Troloxu/ kg sušiny)	genotyp	typ	AOX DPPH (mg Troloxu/ kg sušiny)
Novosibirskaya 67	W	202,7 ± 1,534	Xiao Yian	Ba	201,4 ± 0,166
Annie	R	133,1 ± 0,663	UC 66049	Ba	203,2 ± 3,461
Rebell	R	163,3 ± 0,550	Aoi Yu	Ba	204,4 ± 0,951
Julie	R	170,6 ± 0,285	Skorpion	Ba	205,1 ± 0,870
Vanessa	R	188,2 ± 0,286	V1 133-15	Ba	216,0 ± 2,296
Bohemia	R	186,1 ± 2,097	Tschermaks B. S.	Ba	224,3 ± 0,182
Bona Vita	Ye	142,9 ± 0,288	AF Oxana	Ba	224,7 ± 1,767
V3-109-18	Ye	179,9 ± 0,428	V1 131-15	Ba	225,4 ± 0,404
Citrus	Ye	188,7 ± 0,890	H 90-15-2	Ba	254,5 ± 1,627
TA 4024	Ye	247,1 ± 0,412	EF02-54/9	Ba	267,0 ± 0,189
Purple	Pp	174,2 ± 0,108	V1-118-17	Ba+Pp	196,5 ± 0,457
Rosso	Pp	192,3 ± 1,244	V1-208-17	Ba+Pp	197,4 ± 0,231
RU 687-12	Pp	202,5 ± 0,300	V1-122-17	Ba+Pp	201,7 ± 0,653
PS Karkulka	Pp	206,6 ± 0,212	V1-129-17	Ba+Pp	211,9 ± 0,137
ANK-28B	Pp	210,4 ± 0,929	V2-15a-17	Ba+Pp	212,9 ± 0,664
Konini	Pp	211,1 ± 0,676	AF Zora	Ba+Pp	212,9 ± 0,933
ANK-28A	Pp	215,8 ± 0,725	V1-145-17	Ba+Pp	218,2 ± 0,498
AF Jumiko	Pp	231,6 ± 1,139	V1-143-17	Ba+Pp	219,3 ± 0,494
Purple Feed	Pp	240,6 ± 1,041	V2-11a-17	Ba+Pp	221,2 ± 0,097
			V1-142-17	Ba+Pp	225,0 ± 0,116
			V1-144-17	Ba+Pp	225,7 ± 1,052
			V1-130-17	Ba+Pp	229,7 ± 0,748

**Tab. 14** Souhrnné porovnání průměrné hodnoty AOX u jednotlivých barevných typů

barevný typ	označení	průměrná hodnota AOX (mg Troloxu/kg sušiny)	průměrná hodnota AOX (jako % redukce DPPH)
bílá*	W	202,8 ± 1,534	39,6
červené	R	168,3 ± 2,276	35,9
žluté	Ye	189,4 ± 4,144	36,2
purpurové	Pp	209,5 ± 1,997	38,3
modré	Ba	228,0 ± 2,908	39,2
černé	Ba+Pp	214,5 ± 0,499	39,8

\* jedná se o výsledky jediné odrůdy, více bílých genotypů nebylo k dispozici

Z výsledků je patrné, že jednotlivé barevné genotypy dosahují odlišné AOX. Nejnižší hodnota (168,3 mg Troloxu/kg sušiny) byla zaznamenána u červeného typu, kterému odpovídají běžné konvenční odrůdy pšenice s okrovým zbarvením zrna. Žluté genotypy se zvýšeným obsahem karotenoidů měly hodnotu AOX vyšší (189,4 mg Troloxu/kg sušiny) stejně jako jediná odrůda bílého typu (202,8 mg Troloxu/kg sušiny). Barevné typy s obsahem anthokyanů se v hodnotách AOX také lišily a celkově dosahovaly vyšších hodnot AOX než barevné typy bez obsahu anthokyanů. Hodnota AOX se mírně zvyšovala v řadě: purpurové < černé < modré genotypy (konkrétně 209,5 < 214,5 < 228,0 mg Troloxu/kg sušiny). Rozdíly mezi nimi však byly relativně nízké a jejich statisticky významná odlišnost nebyla prokázána ( $p = 0,0825$ ) vzhledem k vysoké mezigenotypové variabilitě v hodnotách AOX. Nicméně všechny typy s obsahem anthokyanů souhrnně dosahovaly statisticky významně vyšší hodnoty AOX než souhrnně genotypy bez obsahu anthokyanů (souhrnně  $p = 0,0385$ , konkrétně  $p = 0,0052$  pro Pp,  $p = 0,0001$  pro Ba a  $p = 0,0009$  pro Ba+Pp). Tyto výsledky tedy poukazují na fakt, že na rozdíl od běžně dostupných odrůd pšenice představují genotypy pšenic s obsahem anthokyanů zdroj zdravotně prospěšných látek, a lze je tak označit za produkt s přidanou nutriční hodnotou.

Hodnoty AOX v této práci byly ekvivalentem 133 – 267 mg Troloxu/kg sušiny. Podobné hodnoty zaznamenali ve svých pokusech i Brandolini et al. (2013) (138 mg Troloxu/kg sušiny u pšenice bez barevného zrna) nebo Yu a Beta (2015) (317 mg Troloxu/kg sušiny u pšenice s barevným zrnem), zatímco jiní autoři zaznamenali hodnoty AOX výrazně vyšší (viz dále). Pro porovnání výsledků s více autory byly vzaty v potaz také studie uvádějící AOX jako procentuální pokles DPPH. Iqbal et al. (2007) uvedli u různých genotypů s purpurovým perikarpem redukci 24 – 48 % DPPH, podobně jako Abdel-Aal et al. (2016), kteří pozorovali 44 – 51 % poklesu DPPH. Tyto hodnoty jsou

v dobré shodě a AOX stanovené v této práci, kdy hodnoty redukce DPPH odpovídaly souhrnně 36 – 40 %.

Hodnocení antioxidační aktivity pomocí DPPH se věnuje řada odborných publikací, jednotliví autoři však dochází k výrazně odlišným hodnotám. Při hodnocení vzorků konvenčních druhů pšenice s červeným zrnem byla zaznamenána AOX (jako mg Troloxu/kg sušiny) v řádech stů, např. 300,0 (Yilmaz et al. 2015), tisíců, např. 2500 (Fogarasi et al. 2015) i desetitisíců, např. 27 532 (Mazzoncini et al. 2015). Podobně se hodnoty antioxidační aktivity liší i ve studiích s barevnými genotypy pšenice. U genotypů s purpurovým zrnem rozdílně zaznamenali Yu a Beta (2015) 317 mg Troloxu/kg sušiny, Abdel-Aal et al. (2018) 775 mg Troloxu/kg sušiny, Liu et al. (2010) až 2144 mg Troloxu/kg sušiny a Saini et al. (2020) až 10 286 mg Troloxu/kg sušiny. Je nezbytné podotknout, že všechny uvedené výsledky se týkají výhradně stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH s vyjádřením výsledků jako ekvivalent Troloxu, výsledky jiných antioxidačních metod (ABTS, ORAC apod.) nebo výsledky přepočtené na jiný standard (kyselina askorbová, BHT apod.) nebyly brány v potaz. Je vysoce pravděpodobné, že v těchto rozdílech hraje roli jednak variabilita vzorků, ale zřejmě také určité rozdíly v metodikách. Jak upozornili Mishra et al. (2012), metoda s použitím DPPH je zatížena nepřesností při nevhodném nastavení určitých parametrů. Významným parametrem ovlivňujícím výsledky této metody je rozpouštědlo, v němž reakce antioxidantu s radikálem probíhá, neboť jeden antioxidant může vykazovat různou kinetiku redukce DPPH v roztoku methanolu, ethanolu nebo v prostředí s obsahem vody. Schaich et al. (2015) dodává, že přítomnost vody usnadňuje přenos vodíkového radikálu, a reakci vedoucí k redukci DPPH tak významně urychluje. Stejně tak se mohou výsledky lišit při různých koncentracích DPPH a antioxidantu, jelikož kinetika reakce se při jiných relativních poměrech antioxidantu a DPPH může měnit. Výsledky jsou také ovlivněny časem, po němž je odečten výsledek redukce DPPH bez ohledu na to, zda reakce ještě probíhá. Zatímco pro některé typy antioxidantů jsou vhodné studie sledující míru redukce DPPH v krátkém čase (např. 2 min pro tzv. rychlé antioxidanty), jiné molekuly reagují pomaleji a výsledky je vhodné pozorovat v delším čase (20 či 60 min) (Mishra et al. 2015). Problém také může představovat přítomnost kyseliny v extraktu vzorku, neboť uvolněný  $H^+$  z kyseliny interaguje s DPPH, a může tak způsobit falešně pozitivní výsledek. Přídavek kyseliny navíc ovlivňuje také pH roztoku, s nímž se může měnit i rychlost redukce DPPH (Schaich et al. 2015). Popsaná úskalí metody DPPH mohou alespoň částečně vysvětlovat velké rozdíly ve zjištěné antioxidační aktivitě vzorků pšenice s barevným zrnem.



Z tohoto důvodu byla metoda s použitím DPPH optimalizována tak, aby docházelo k co nejnižší zátěži výsledků nepřesnostmi. V rámci optimalizace parametrů metody v přípravné fázi experimentu byla věnována pozornost zejména použitému rozpouštědлу, optimálnímu času reakce a poměru koncentrace DPPH a antioxidantů ve vzorku (výsledky nejsou uvedeny). Jako rozpouštědlo byl zvolen čistý methanol, který má dobrou extrakční účinnost pro získání anthokyanů z matrice a zároveň se v něm radikál DPPH dobře rozpouští. Čistý methanol byl přitom alternativou methanolu s přidávkou HCl, který byl pro použití v této metodě zvolen primárně, ovšem i minimální přítomnosti HCl (0,01 % v roztoku) vedla k významné redukci radikálu a způsobovala falešně pozitivní výsledky. Pro volbu optimálního času reakce byl proveden pokus s kontinuálním sledováním úbytku absorbance roztoku DPPH v čase. Jako optimální byla vyhodnocena doba trvání reakce 20 min. Po tomto čase již byly rozdíly v poklesu absorbance minimální, zatímco kratší časy sledování výsledku (např. 2 a 10 min) byly pro maximální poklesy absorbance příliš krátké. Poměr objemu roztoku DPPH a objemu přidávaného extraktu byl zvolen empiricky tak, aby se výsledný pokles absorbance DPPH pohyboval v rozmezí 25 – 75 %.

I přes významně odlišné absolutní hodnoty AOX pšenic s barevným zrnem se většina autorů shoduje v tvrzení, že pšenice s barevným zrnem dosáhly vyšší hodnoty AOX než genotypy bez obsahu anthokyanů. Vyšší hodnotu AOX u purpurových pšenic oproti bílým, červeným a žlutým genotypům uvedli Abdel-Aal et al. (2016), zároveň však pozorovali, že při prodloužení času reakce z 10 na 30 min dochází k vyrovnání hodnot AOX – to autoři odůvodňují efektem pomaleji působících antioxidantů – zejména fenolických kyselin, které podle nich reagují pomaleji než anthokyaniny. Liu et al. (2010) také popsali podobný trend jako v experimentu v této disertační práci: nejnižší hodnotu AOX měly červené pšenice (1621 mg Troloxu/kg sušiny), o trochu vyšší bílé pšenice (1674 mg Troloxu/kg sušiny) a nejvyšší pšenice purpurové (1934 mg Troloxu/kg sušiny). Vyšší hodnoty AOX purpurových oproti červeným pšenicím popsali také Li et al. (2007), Pasqualone et al. (2015) a Yu a Beta (2015). U více barevných genotypů zkoumali rozdíly v AOX Sharma et al. (2018), kteří pozorovali sníženou hodnotu AOX u bílých pšenic (2 352 mg Troloxu/kg sušiny), podobné hodnoty AOX u purpurových a modrých pšenic (3 641 resp. 3 441 mg Troloxu/kg sušiny) a vyšší hodnoty AOX u černých pšenic (3892 mg Troloxu/kg sušiny).

Vedle konkrétní míry antioxidační aktivity byla také hodnocena korelace mezi hodnotou AOX a množstvím obsažených celkových anthokyanů. I přes jasnou vizuální souvislost pozorovanou ve výsledcích byla potvrzena pouze nízká míra korelace mezi

hodnotami AOX a obsahem anthokyanů – konkrétně  $r = 0,4749$  pro celkové anthokyaniny stanovené spektrofotometricky a  $r = 0,3961$  pro sumu monoglykosidů stanovených UHPLC-MS. I přes jednoznačný trend patrný z průměrných hodnot AOX pro jednotlivé barevné typy se v tomto výsledku s největší pravděpodobností odrazila relativně vysoká variabilita výsledků v rámci jednotlivých barevných typů. Tyto výsledky jsou ve shodě s většinou odborné literatury, avšak hodnoty korelace jsou nižší, než uvádí některé literární zdroje – např. Yilmaz et al. (2015) uvádí ve vzorcích pšenice korelaci mezi anthokyaniny a hodnotou AOX stanovenou DPPH  $r = 0,68$ . S pozitivní korelací anthokyanů s antioxidační aktivitou v barevných genotypech pšenice souhlasí i Hu et al. (2007), Abdel-Aal et al. (2008) a Li et al. (2015), podobně jako tuto korelaci potvrdili Catena et al. (2019) v rýži s barevným zrnem a Takahata et al. (2011) v bramborách s barevnou dužninou. Na druhou stranu Li et al. (2007) neshledali žádný rozdíl v AOX v porovnání konvenční a purpurové pšenice, stejně jako Shao et al. (2014), kteří porovnávali genotypy rýže s a bez obsahu anthokyanů.

Výsledky tedy napovídají, že by obsah anthokyanů pozitivně ovlivňuje míru antioxidační aktivity, podílí se na této hodnotě i další nezávislé parametry. Tím jsou zejména fenolické resp. polyfenolické látky, které představují skupinu významných rostlinných antioxidantů (Bobo-García et al. 2015). Podíl obsahu fenolických resp. polyfenolických látek na celkové antioxidační aktivitě pšenic s barevným zrnem potvrzují Hu et al. (2007), Liu et al. (2010) a Ivanišová et al. (2014), kteří dokonce uvádí vysokou míru korelace AOX s celkovými polyfenoly ( $r = 0,87$ ). Podíl fenolických látek na antioxidační aktivitě byl potvrzen také v rýži (Surh & Koh 2014) a v ječmeni, kde popsána korelace dosáhla dokonce hodnoty 0,94. Tyto výsledky tedy jednoznačně poukazují na fakt, že vedle obsahu anthokyanů je antioxidační aktivita pšenic ovlivněna zejména obsahem fenolických látek, což ostatně potvrdila i dřívější studie související s touto disertační prací, kde byla v různých druzích obilovin (mimo jiné i v genotypech pšenice s barevným zrnem) potvrzena vysoká míra korelace AOX s obsahem celkových polyfenolů ( $r = 0,93$ ) (Eliášová & Paznocht, 2015). Hu et al. (2007) navíc uvádí, že kromě fenolických látek se na antioxidační aktivitě mohou podílet také karotenoidy a tokoferoly. Nicméně bez ohledu na podíl jednotlivých typů sloučenin na antioxidační aktivitě pšenic s barevným zrnem lze souhrnně konstatovat, že barevné genotypy pšenic představují obiloviny s obsahem nutričně hodnotných antioxidantů.

### 4.3. Změny anthokyanů vlivem skladování

Dílčím cílem disertační práce bylo sledování úbytku obsahu anthokyanů v zrnu barevných pšenic v delším časovém úseku. Záměrem pokusu bylo posoudit vhodnost barevných pšenic pro dlouhodobé skladování. Úbytek byl sledován po dobu 24 měsíců, prvních 6 měření bylo provedeno po měsíci a zbytek měření potom v 3měsíčních intervalech. Pro pokus byly použity 4 genotypy: AF Jumiko (Pp), Konini (Pp), UC 66049 (Ba) a V1 131-15 (Ba). Černé linie pšenic do pokusu nebyly zařazeny, neboť tou dobou nebyly jejich vzorky ještě k dispozici. Anthokyany byly kvantifikovány pouze spektrofotometricky a vyjádřeny jako ekvivalent kyanidin-3-glukosidu (mg/kg sušiny). Původně byly anthokyany souběžně analyzovány též pomocí UHPLC-MS, ovšem během celé doby sledování byl přístroj opakovaně mimo provoz, data pro posouzení vlivu skladování byla tudíž nekompletní, a do finálního hodnocení proto nebyla zahrnuta. Tab. 15 uvádí hodnoty obsahu celkových anthokyanů vždy jako průměr ze 3 opakování.

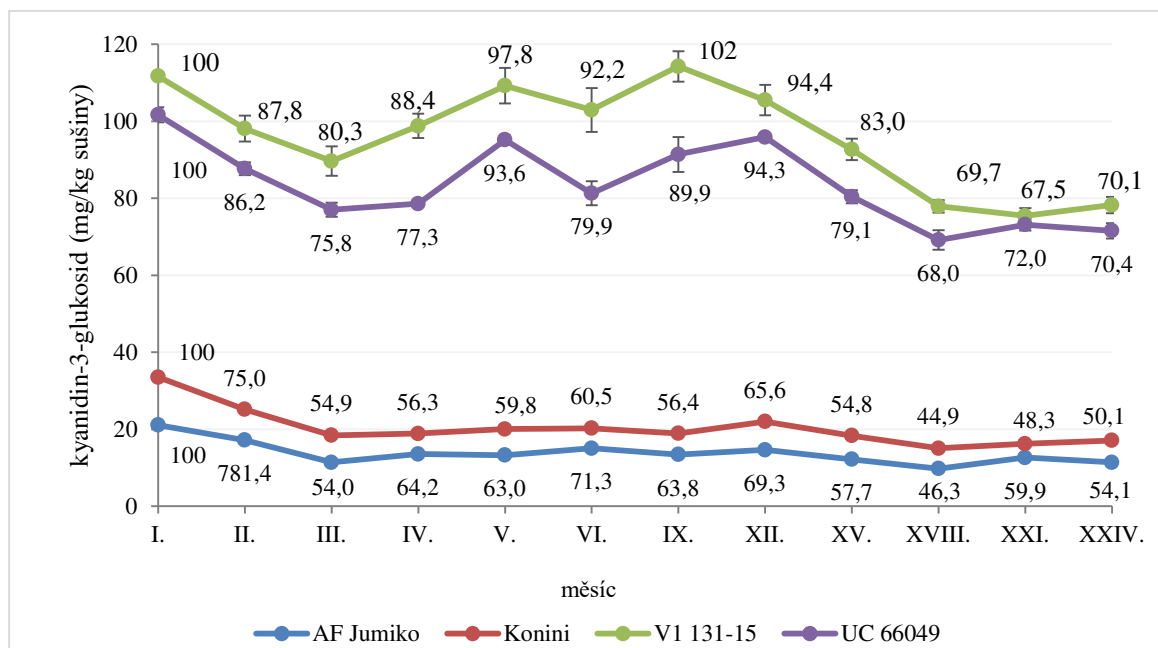
**Tab. 15** Průměrné obsahy anthokyanů (mg/kg sušiny) v jednotlivých měsících skladování

měsíc	AF Jumiko	Konini	V1 131-15	UC 66049
I.	21,10 ± 0,173 a	33,53 ± 0,386 a	111,7 ± 0,892 a	101,7 ± 1,940 a
II.	17,18 ± 0,059 b	25,15 ± 0,585 b	98,10 ± 3,387 b	87,68 ± 1,635 b
III.	11,40 ± 0,534 c	18,41 ± 0,324 c	89,65 ± 3,808 c	77,02 ± 1,857 c
IV.	13,55 ± 0,266 d	18,89 ± 0,042 c	98,79 ± 3,156 b	78,59 ± 0,423 c
V.	13,29 ± 0,284 d	20,06 ± 0,465 d	109,2 ± 4,596 a	95,17 ± 1,140 d
VI.	15,05 ± 0,398 e	20,27 ± 0,326 d	102,9 ± 5,696 ab	81,27 ± 3,115 c
IX.	13,45 ± 0,043 d	18,90 ± 0,237 c	114,3 ± 3,943 a	91,38 ± 4,542 bd
XII.	14,63 ± 0,608 de	21,99 ± 0,310 e	105,5 ± 3,957 b	95,87 ± 0,575 bd
XV.	12,18 ± 0,447 c	18,36 ± 0,215 c	92,68 ± 2,767 c	80,41 ± 1,681 c
XVIII.	9,771 ± 0,521 f	15,07 ± 0,096 f	77,91 ± 1,628 d	69,15 ± 2,519 e
XXI.	12,63 ± 0,351 cd	16,21 ± 0,117 fg	75,44 ± 1,965 d	73,15 ± 1,487 e
XXIV.	11,41 ± 0,388 c	17,11 ± 0,263 cg	78,25 ± 2,143 d	71,54 ± 1,958 e

hodnoty v jednotlivých sloupcích označené odlišnými písmeny jsou statisticky významně odlišné

V Grafu 1 jsou znázorněny změny v obsahu anthokyanů v relativních hodnotách. Barevné linky v grafu znázorňují průběh absolutních hodnot kyanidin-3-glukosidu (mg/kg sušiny) a čísla popisující jednotlivé body vyjadřují průměrnou procentuální hodnotu daného obsahu vztaženou k prvnímu měření (100 %). Všechny uvedené hodnoty odpovídají průměru ze 3 opakování.

**Graf 1** Změna obsahu anthokyanů v průběhu skladování



U všech genotypů byl v porovnání začátku a konce pokusu pozorován statisticky významný úbytek anthokyanů v čase, ani v jednom případě však úbytek anthokyanů nebyl lineární. U všech odrůd byl pozorován významný pokles anthokyanů v počáteční fázi pokusu (během prvních 3 měsíců), který byl následován jejich postupným nárůstem a ve finální části pokusu jejich opětovným poklesem. Dočasný nárůst obsahu anthokyanů byl pozorován od 3. do 9. nebo 12. měsíce, pak začal obsah anthokyanů opět klesat a v 15. měsíci měření byl obsah anthokyanů prakticky roven obsahu ve 3. měsíci. Nejnižší obsahy anthokyanů v jednotlivých genotypěch byly pozorovány až v závěrečné fázi pokusu (v 18. popř. 21. měsíci). Do 3. měsíce po začátku měření byl zároveň pozorován nárůst podílu sušiny následovaný mírnou fluktuací. Změny v hodnotě sušiny v žádném z případů nepřesáhly 1,5 % (ve srovnání nejnižší a nejvyšší hodnoty pro jednotlivé odrůdy).

U modrých linií pšenice byla pozorována výraznější fluktuace obsahu anthokyanů, ovšem nižší relativní úbytek v porovnání s pšenicemi purpurovými. Obě modré linie měly velmi podobný průběh změn obsahu anthokyanů, který klesal téměř lineárně až do 3. měsíce a od 3. do 9. – 12. měsíce naopak narůstal (s výjimkou měření v 6. měsíci, kdy byl zaznamenán snížený obsah anthokyanů). V jednom případě byl dokonce naměřen vyšší obsah anthokyanů než byla jejich výchozí hodnota (tato hodnota však nebyla statisticky odlišná od 100 %). V posledních 3 měřeních (od 18. do 24. měsíce) byla fluktuace obsahu anthokyanů už pouze nepatrná. Konečný obsah anthokyanů po 24 měsících měření byl u obou linií prakticky shodný – 70,3 % původního obsahu anthokyanů. U purpurových pšenic byl pozorován vyšší relativní úbytek anthokyanů s méně výraznou fluktuací hodnot,

ale s výraznějším počátečním poklesem než u pšenic modrých. Lineárním úbytkem došlo ke snížení obsahu anthokyanů na 54,0 – 54,9 % původního obsahu anthokyanů v prvních 3 měsících, poté začal obsah anthokyanů opět narůstat a to až do 12. měsíce, kdy byl nárůst vystřídán opětovným lineárním poklesem. Konečný obsah anthokyanů po 24 měsících skladování dosáhl 51,0 a 54,1 % původního obsahu anthokyanů.

Pro porovnání výsledků pokusu s odbornou literaturou byl nalezen pouze jeden obdobný experiment, který sledoval degradaci anthokyanů v obilkách rýže s purpurovým perikarpem skladované při 25 °C. Po prvním měsíci skladování byl zaznamenán pokles obsahu anthokyanů na 82,5 % původní hodnoty a po 6 měsících skladování činil obsah anthokyanů 78,9 % jejich původního obsahu (Yamuangmorn et al. 2018). Podobné hodnoty degradace anthokyanů byly zaznamenány v experimentu sledujícím nezpracovaná semena sóji skladované při 25 °C. Obsah anthokyanů po 2 měsících skladování činil 86,4 – 90,1 % a po 6 měsících skladování 82,7 – 87,6 % původního obsahu anthokyanů (Wang et al. 2010). Oba uvedené experimenty prokázaly v celých zrnech či semenech skladovaných při pokojové teplotě postupný úbytek anthokyanů, který dosahoval podobných hodnot, jako uvádí výsledky této disertační práce. Ani jeden z uvedených experimentů nezaznamenal v průběhu skladování fluktuaci v obsahu anthokyanů, ale vzhledem k designu obou pokusů (pouze 2 měření obsahu anthokyanů během doby skladování) nelze případné výkyvy v obsahu anthokyanů vyloučit.

Nárůst obsahu anthokyanů během skladování byl pozorován v některých pokusech při skladování brambor s barevnou dužninou. Například Hamouz et al. (2018) popsali při 6měsíčním skladování brambor ve 4 °C nejen zhruba pokles 30 % obsahu anthokyanů, ale zároveň i významný nárůst obsahu anthokyanů (až o 77 %) v některých odrůdách. Podle autorů se obsah anthokyanů při posklizňovém uskladnění zvyšuje díky biosyntéze. To potvrzují také Carmona et al. (2017), kteří popsali posklizňovou biosyntézu anthokyanů u pomerančů skladovaných v chladu (9 °C). Autoři uvádí, že nízké teploty indukují tvorbu enzymů biosyntetické dráhy anthokyanů. Tomu odpovídá i obecně známý fakt, že stres nízkými teplotami zvyšuje tvorbu anthokyanů v různých částech rostliny zřejmě jako obranný mechanismus (Ahmed et al. 2015). Je však otázkou, zda může být nárůst obsahu anthokyanů při skladování v této práci dán zvýšenou biosyntézou. Ta by totiž musela být indukována i za výrazně vyšší teploty (20 °C) než bylo popsáno v uvedených pracích.

Nárůst obsahu anthokyanů však může souviset také s polymerací a kopigmentací barviv, jak popsali např. Eiro a Heinonen (2002), Stávek et al. (2006) nebo Türkyılmaz a Özkan (2012). Vlivem těchto procesů vznikají složitější sloučeniny, které mají

intenzivnější barvu, poskytují vyšší absorpenci a jsou stabilnější než prosté monoglykosidy anthokyanů (Eiro & Heinonen, 2002). Míra hyperchromního efektu u vznikajících kopigmentů je dána mimo jiné koncentrací látek interagujících s anthokyanem (zejména fenolickými kyselinami), přičemž čím vyšší je koncentrace těchto látek, tím je hyperchromní efekt výraznější (Marković et al. 2005). Stávek et al. (2006) uvádí, že polymerace a kopigmentace je velmi důležitá při stažení vína, kdy při jeho skladování dochází k rozvoji zmíněných sloučenin, a tím se zintenzivňuje barva vína. Türkyilmaz a Özkan (2012) popsali polymeraci anthokyanů při skladování koncentráta z černé mrkve. Obsah polymerovaných barviv se v průběhu skladování zvyšoval, zatímco obsah jednoduchých anthokyanů se úměrně tomu snižoval.

Nelze tedy vyloučit, že zvyšování absorpence v popsáném skladovacím pokusu neodráželo zvyšující se obsah anthokyanů, ale pouze tvorbu intenzivněji barevných sloučenin. V takovém případě přítomnost polymerů a kopigmentů anthokyanů může do určité míry maskovat skutečný úbytek jednoduchých anthokyanů. Průběh křivky obsahu anthokyanů při skladování by pak mohl být interpretován následovně: V počáteční fázi skladování (první 3 měsíce) docházelo k lineárnímu úbytku obsahu anthokyanů. V období od 3. do 12. měsíce absorpence extraktů vzrostla, což mohlo být způsobeno tvorbou produktů polymerace a kopigmentace anthokyanů. Od 12. měsíce hodnota absorpence začala opět klesat, buď v důsledku postupného úbytku těchto látek nebo vlivem degradace zbylých jednoduchých anthokyanů.

Skladovací pokus poukázal na významný úbytek anthokyanů v celém zrnu pšenice v dlouhodobém měřítku. Na druhou stranu i po 24 měsících skladování si pšenice zachovala významný podíl obsahu anthokyanů (zhruba 50 % u purpurových a 70 % u modrých pšeníc). Z hlediska obsahu anthokyanů by bylo nejvýhodnější začít pšenici zpracovávat co nejdříve po sklizni, v praxi však toto není možné. Pšenice z nové sklizně se běžně začíná používat až zhruba 3 měsíce po sklizni, neboť do té doby prochází posklizňovým dozráváním, které zvyšuje technologickou kvalitu bílkovin (Faměra, 2019, pers. comm.). Bohužel však právě v tomto období je úbytek anthokyanů nejvyšší. Pro praktické účely tedy lze doporučit výběr odrůd s vysokým obsahem anthokyanů, v nichž i po počátečním úbytku zůstane obsaženo ještě dostatečné množství anthokyanů. Také lze doporučit zpracování pšenice v období mezi 5. a 12. měsícem skladování, kdy nedochází k významné degradaci barviv a zároveň neodkládat zpracování do doby po 12. měsíci, kdy se prokazatelně obsah anthokyanů opět začíná snižovat.

#### **4.4. Změny anthokyanů vlivem zpracování**

Nízkou stabilitu anthokyanů při zpracování popsala řada autorů (např. Brownmiller et al. 2008; Mulinacci et al. 2008; Loypimai et al. 2016; Volden et al. 2018). Nejvíce citlivé jsou anthokyaniny na přítomnost kyslíku, světla, kovových iontů a na vyšší teploty.

Z hlediska disertační práce je významná především otázka vlivu tepelné úpravy na degradaci anthokyanů – vzhledem k faktu, že obiloviny pro lidskou spotřebu vyžadují před konzumací tepelnou úpravu. Proto bylo dalším cílem výzkumu popsat vliv působení vysokých teplot na obsah anthokyanů v pšenici. V potaz byly vzaty různé typy tepelných úprav, kromě nejběžnějšího pečení také vaření, extruze a pufování. Tyto úpravy se vzájemně liší výší působící teploty, dobou jejího působení a vlhkostí prostředí resp. materiálu při zpracování. Záměrem experimentů bylo popsat vliv jednotlivých tepelných úprav, vzájemně je porovnat a na základě toho vytipovat nejvhodnější typ tepelné úpravy, popř. nejvhodnější genotypy pro tyto účely.

Pro zpracování byly vybrány genotypy pšenic s purpurovým a modrým zrnem. Nejmenší soubor (3 purpurové a 2 modré pšenice) byl zastoupen v pekařském pokusu, který byl v provedení nejsložitější, protože degradace analytů byla sledována v různých fázích zpracování zrna. Následující pokusy (vaření, extruze, pufování) byly v provedení jednodušší, (obsah anthokyanů byl sledován pouze na začátku a po provedení tepelné úpravy) a provedeny byly v delším časovém odstupu, během kterého bylo rozhodnuto o rozšíření sledovaného souboru (na 4 purpurové a 3 modré pšenice). K pokusu pufování byla navíc přidána černá pšenice, jejíž vzorky nebyly pro dřívější experimenty k dispozici. Změny anthokyanů vlivem zpracování byly stanoveny jak UHPLC-MS metodou, tak spektrofotometricky. Spektrofotometrickou metodou byl kvantifikován obsah všech extrahovatelných anthokyanů, zatímco metoda UHPLC-MS identifikovala a kvantifikovala pouze vybrané monoglykosidy. Porovnáním výsledků z obou metod bylo zjišťováno, jak se liší degradace všech forem anthokyanů vůči jednotlivým monoglykosidům.

##### **4.4.1. Pečení**

Pro pekařský pokus byly použity genotypy AF Jumiko (Pp), Konini (Pp), ANK-28A (Pp), UC 66049 (Ba) a V1 131-15 (Ba). Změny v obsahu anthokyanů byly sledovány ve 4 fázích přípravy pekárenského výrobku: v mouce po zrání, v těstu, ve výrobku po upečení a ve výrobku 24 hod po upečení. Konkrétní hodnoty obsahu anthokyanů (mg/kg sušiny) v jednotlivých fázích pečení jsou uvedeny v Tab. 16. a procentuální vyjádření míry degradace uvádí Graf 2.

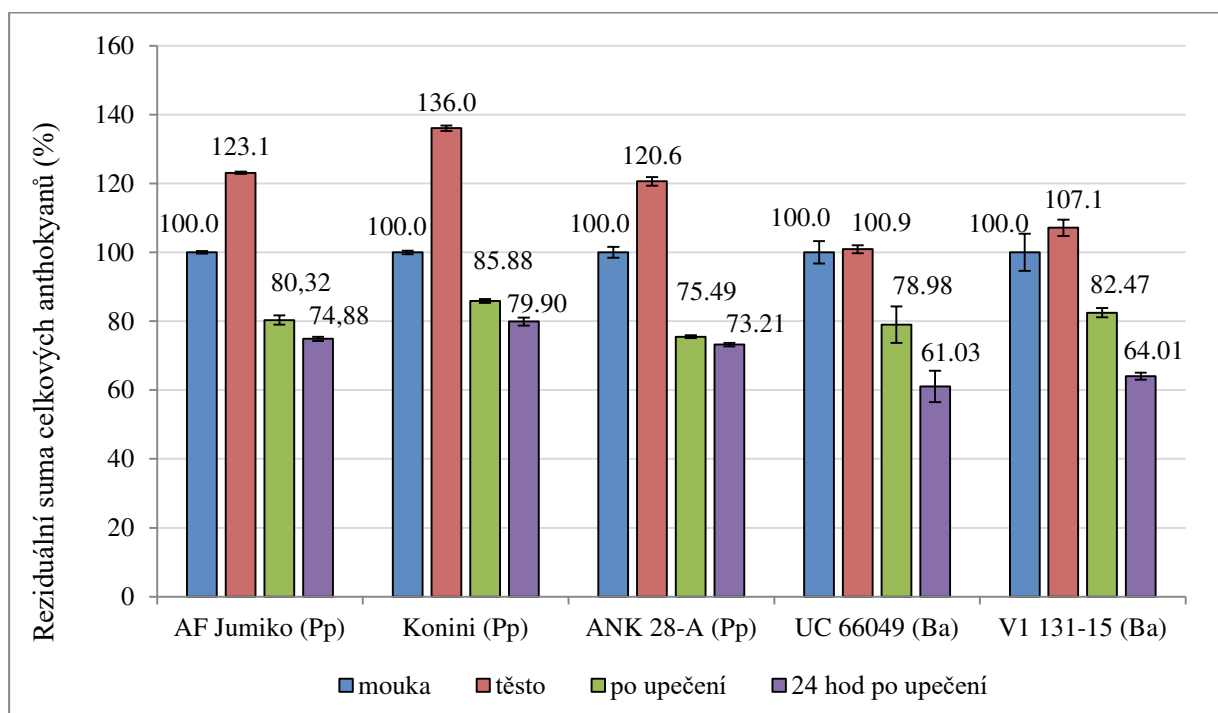
**Tab. 16** Změny v obsahu celkových anthokyanů a sumy monoglykosidů (mg/kg sušiny)

genotyp	mouka	těsto	výrobek po upečení	výrobek 24 hod po upečení
<b>spektrofotometrická metoda</b>				
(ekvivalent mg/kg sušiny kyanidin-3-glukosidu)				
AF Jumiko	15,45 ± 0,384 <i>a</i>	19,02 ± 0,322 <i>b</i>	12,41 ± 1,366 <i>c</i>	11,57 ± 0,607 <i>c</i>
Konini	23,00 ± 0,507 <i>a</i>	31,29 ± 0,750 <i>b</i>	19,75 ± 0,244 <i>c</i>	18,38 ± 1,188 <i>d</i>
ANK 28-A	28,46 ± 1,560 <i>a</i>	34,34 ± 1,250 <i>b</i>	21,49 ± 0,396 <i>c</i>	20,84 ± 0,489 <i>c</i>
UC 66049	69,92 ± 3,285 <i>a</i>	70,55 ± 1,191 <i>a</i>	55,23 ± 5,276 <i>b</i>	42,68 ± 4,564 <i>c</i>
V1 131-15	135,0 ± 5,382 <i>a</i>	144,6 ± 2,402 <i>a</i>	111,3 ± 1,346 <i>b</i>	86,40 ± 1,030 <i>c</i>
<b>UHPLC-MS metoda</b>				
(mg/kg sušiny)				
AF Jumiko	0,209 ± 0,010 <i>a</i>	0,154 ± 0,004 <i>b</i>	0,172 ± 0,020 <i>b</i>	0,174 ± 0,004 <i>b</i>
Konini	1,510 ± 0,298 <i>a</i>	1,065 ± 0,072 <i>b</i>	0,925 ± 0,042 <i>bc</i>	0,705 ± 0,046 <i>c</i>
ANK 28-A	2,113 ± 0,287 <i>a</i>	1,304 ± 0,040 <i>bc</i>	1,414 ± 0,046 <i>c</i>	1,055 ± 0,044 <i>d</i>
UC 66049	41,51 ± 2,650 <i>a</i>	36,05 ± 0,611 <i>b</i>	14,99 ± 0,084 <i>c</i>	9,564 ± 0,166 <i>d</i>
V1 131-15	68,27 ± 3,263 <i>a</i>	63,29 ± 4,492 <i>b</i>	32,46 ± 1,265 <i>c</i>	17,32 ± 0,398 <i>d</i>

hodnoty v rádcích označené odlišnými písmeny jsou statisticky významně odlišné

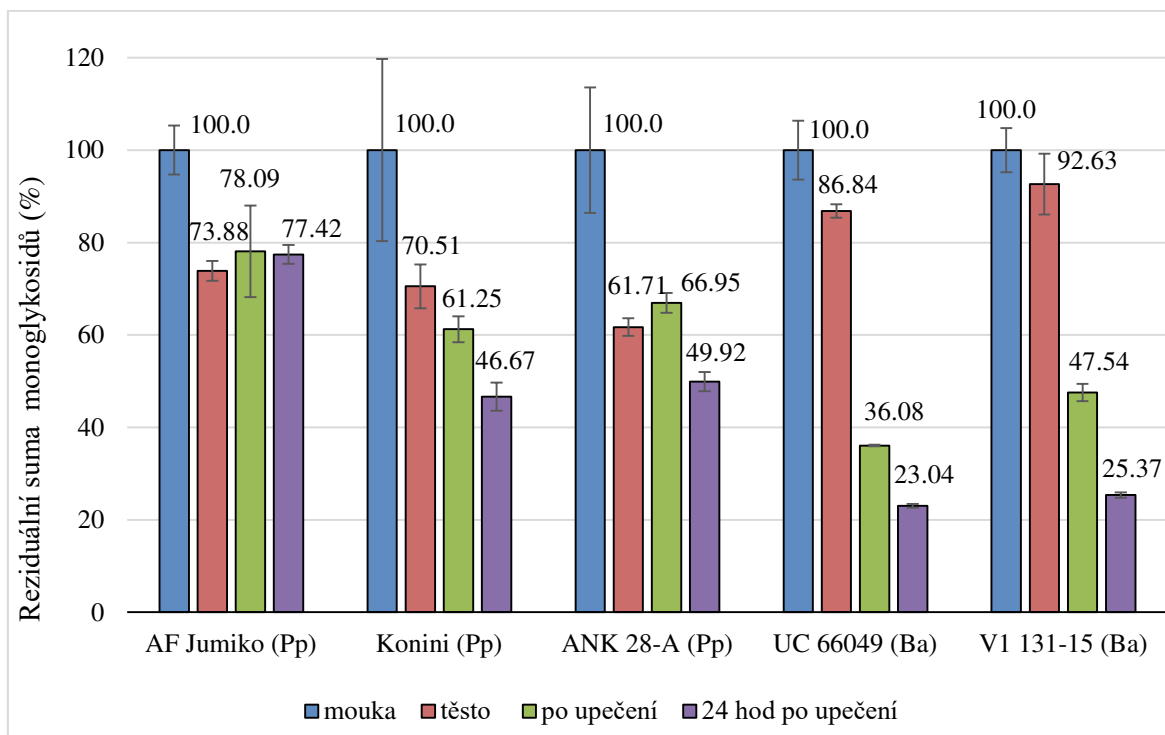
**Graf 2** Změna obsahu anthokyanů při pečení (% původního obsahu anthokyanů)

A) všech extrahovatelných anthokyanů (měřeno spektrofotometricky)





B) všech sledovaných monoglykosidů (měřeno UHPLC-MS metodou)



U všech sledovaných odrůd došlo v průběhu pečení k prokazatelnému úbytku celkových anthokyanů (Graf 2A). Obecný charakter degradace byl u všech sledovaných odrůd obdobný, ovšem s drobnými rozdíly v porovnání purpurových a modrých genotypů. Ve fázi přípravy těsta došlo u všech sledovaných vzorků k nárůstu obsahu celkových anthokyanů. Tento nárůst byl mnohem výraznější u genotypů purpurových, u nichž bylo zaznamenáno statisticky významné zvýšení obsahu anthokyanů průměrně o 26,6 %. U modrých genotypů byl tento nárůst pouze nepatrný a ani v jednom případě nebyl statisticky významný. Oproti tomu obě další fáze (pečení a krátkodobé skladování) vedly u všech genotypů k postupnému snižování obsahu celkových anthokyanů. Pečení vedlo k výraznější degradaci v případě genotypů purpurových (průměrně o 46,0 %) než tomu bylo v případě modrých genotypů (průměrný úbytek o 23,3 %), jejichž celkový obsah anthokyanů byl při pečení stabilnější. Pro tento fakt svědčí i výsledky dalších autorů, kteří udávají degradaci vlivem pečení 39 – 55 % v případě purpurových pšenic (Bartl et al. 2015; Pasqualone et al. 2015; Yu a Beta 2015), ale pouze 10 % v případě pšenic modrých (Bartl et al. 2015). Na druhou stranu srovnání z hlediska typu barvy v tomto experimentu také ukázalo, že obsah anthokyanů po upečení je naopak stabilnější v purpurových genotypech, kde se výsledné hodnoty po upečení a po krátkodobém skladování příliš nelišily (v průměru o 4,6 %). V modrých genotypech však celkový obsah anthokyanů během krátkodobého skladování poklesl průměrně o 18,2 %. Celkově byl pozorován vyšší

absolutní i relativní pokles obsahu anthokyanů (vztaženo k výchozí hodnotě) v rámci celého procesu u modrých genotypů (průměrně 37,5 %) oproti genotypům purpurovým (průměrně 24,0 %). Nicméně i přesto obsahovaly modré genotypy po pečení významně vyšší absolutní obsahy anthokyanů než genotypy purpurové.

Při sledování degradace sumy jednotlivých monoglykosidů (Graf 2B) byly na první pohled patrné výrazné odlišnosti v porovnání se změnami obsahů celkových anthokyanů. Ve všech fázích zpracování těsta byl pozorován úbytek sumy monoglykosidů. I v tomto případě byly pozorovány charakteristické rozdíly v průběhu degradace u purpurových a modrých genotypů. Fáze zpracování mouky na těsto byla hlavním faktorem degradace monoglykosidů v purpurových genotypech (pokles průměrně o 31,3 %), zatímco v modrých genotypech byl zaznamenán nižší pokles (pouze průměrně 10,3 %). Naopak fáze pečení byla klíčovým faktorem degradace monoglykosidů modrých genotypů (způsobila pokles průměrně o 47,9 %), zatímco u purpurových genotypů byl negativní vliv vysoké teploty prokázán pouze u odrůdy Konini (degradace zde však byla významně nižší, pouze 9,3 %). Naopak u genotypů AF Jumiko a ANK 28-A byl pozorován mírný nárůst sumy monoglykosidů ve fázi pečení. Tento nárůst nebyl ani v jednom případě statisticky významný. Poslední sledovaná fáze zpracování (krátkodobé skladování) vedlo, s výjimkou odrůdy AF Jumiko, k dalšímu statisticky významnému poklesu sumy monoglykosidů u jednotlivých genotypů. Na rozdíl od výše uvedené odlišnosti v úbytku celkového obsahu anthokyanů, nebyl v případě poklesu sumy monoglykosidů při krátkodobém skladování shledán významný rozdíl v porovnání purpurových a modrých odrůd (úbytek 15,8 resp. 17,6 %).

Nejvýraznějším rozdílem v porovnání charakteru degradace celkových anthokyanů a sumy monoglykosidů byla změna obsahu analytů ve fázi zpracování mouky na těsto. Tento významný rozdíl byl pravděpodobně důsledkem skutečnosti, že na obsažené anthokyaniny v této fázi působí řada rozdílných faktorů. Pokles sumy monoglykosidů lze přičíst zejména prostému efektu přidání dalších přísad k mouce (droždí, sůl), čímž dochází k nárůstu hmotnosti celkové hmoty a snížení relativního podílu obsažené mouky na zhruba 96 % (přídavek vody není započten, neboť vzorek byl pro analýzu lyofilizován). Dalším faktorem vedoucím ke snížení obsahu monoglykosidů je hnětení, při němž je do těsta zapracován vzduch, který aktivuje enzymy polyfenoloxidázy a peroxidázy způsobující degradaci monoglykosidů (Nayak et al. 2015). Rozdílné míry degradace monoglykosidů v porovnání purpurových a modrých genotypů jsou pravděpodobně způsobeny meziodrůdovými rozdíly v obsahu těchto oxidačních enzymů. Ty mohou mít

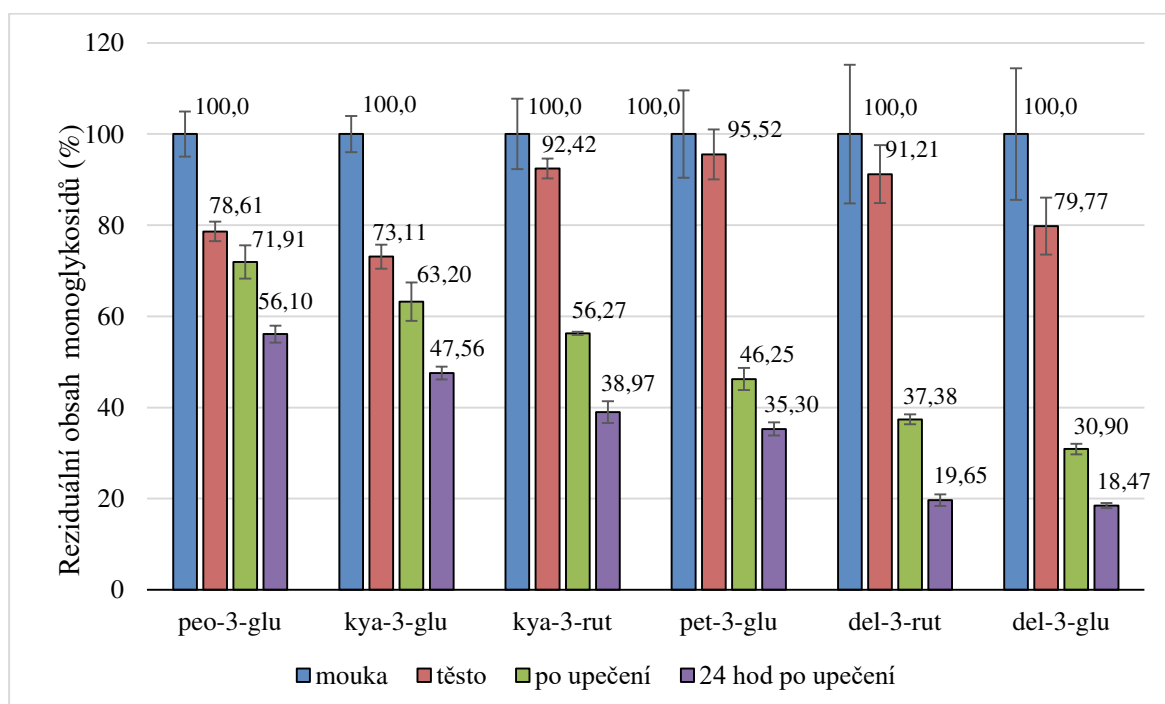
v jednotlivých odrůdách pšenice významně proměnlivý obsah i aktivitu (Geng et al. 2019). Na druhou stranu přítomnost droždí, resp. kvasinek, obsah anthokyanů prokazatelně zvyšuje. Yu a Beta (2015) uvádí, že proces fermentace v těstu zvyšuje obsah anthokyanů jejich uvolňováním z vázaných forem. Sui et al. (2015) navíc doplňuje, že kvasinky konzumují přítomný kyslík, čímž mohou zmírnit následnou degradaci volných anthokyanů. Z porovnání uvedených výsledků je patrné, že efekt účinku kvasinek bude mít významný vliv na nárůst obsahu jiných než monoglykosidických forem anthokyanů, které v této fázi přípravy výrobku naopak prokazatelně degradovaly. Jak již bylo uvedeno dříve, v anthokyanovém profilu se kromě monoglykosidů vyskytují i složitější formy anthokyanů (např. diglykosidy a triglykosidy), které jsou ve fázi mouky pravděpodobně vázané na buněčné komponenty a při zpracování mouky se z těchto komponent uvolňují, čímž se zvyšuje jejich extraktibilita (Yu & Beta 2015).

Fáze pečení těsta vedla jak v případě obsahu celkových anthokyanů, tak v případě sumy monoglykosidů k více či méně významným úbytkům analytů. To potvrzuje Cavalcanti et al. (2011), který označuje působení vysoké teploty za hlavní faktor degradace anthokyanů. Zejména významný byl tento efekt v případě celkového obsahu anthokyanů u purpurových genotypů a v případě sumy monoglykosidů u modrých genotypů. Obě tato dílčí pozorování napovídají, že degradace různých forem anthokyanů je významně ovlivněna genotypem a jeho konkrétním anthokyanovým profilem. To potvrzují také Szalóki-Dorkó et al. (2015), kteří uvádí, že mezigenotypové rozdíly jsou významným faktorem míry degradace anthokyanů. Uplatňuje se zde zejména rozdílná stabilita jednotlivých anthokyanů (Fleschhut et al. 2006; Hou et al. 2013; Sui et al. 2015) jak demonstrují i dále uvedené míry degradace jednotlivých monoglykosidů (viz dále Graf 3). Na druhou stranu nelze vyloučit ani fakt, že pečení může obsah anthokyanů (konkrétně monoglykosidů) mírně zvyšovat, jak je patrné z výsledků sumy monoglykosidů u genotypů AF Jumiko a ANK 28-A. Přestože rozdíly mezi hodnotou ve fázi těsta a ve fázi pečení nebyly ani v jednom případě statisticky významné, může tento jev zároveň poukazovat na fakt, že pečením se může mírně zvyšovat extraktibilita anthokyanů, jak popisují např. Lambri et al. (2015), kteří při tepelném zpracování pozorovali vyšší míru uvolňování anthokyanů vázaných na buněčné komponenty v exokarpu bobulí hroznového vína. Podobně popsali lepší extraktibilitu i Wathon et al. (2019), kteří zaznamenali lepší účinnost extrakce anthokyanů z plodů arónie po tepelné úpravě. Tento efekt byl pozorován i u jiných tepelných úprav, např. u extruze (Escalante-Aburto et al., 2013) a vaření (Melini & Acquistucci 2017), a i u ostatních experimentů s tepelnými úpravami v rámci této práce.

Krátkodobé skladování po dobu jednoho dne vedlo ve všech případech k prokazatelnému snížení obsahu jak celkových anthokyanů, tak sumy monoglykosidů. V případě celkových anthokyanů byla degradace vlivem krátkodobého skladování nižší a činila průměrně pokles o 5,6 % u purpurových a o 22,5 % u modrých genotypů pšenice. Vyšší míra degradace byla pozorována v případě sumy monoglykosidů, kdy byl zaznamenán úbytek anthokyanů průměrně o 24,6 % u purpurových a o 41,4 % u modrých genotypů pšenice. Výjimkou byla odrůda AF Jumiko, u níž nebyl pokles anthokyanů při krátkodobém skladování statisticky signifikantní. Výsledky poukazují na fakt, že monoglykosidy anthokyanů jsou při krátkodobém skladování méně stabilní než složitější formy anthokyanů, jak potvrzují Eiro a Heinonen (2002). Degradaci anthokyanů při krátkodobém skladování pekárenských výrobků při pokojové teplotě potvrzují i jiné literární zdroje. Croitoru et al. (2018) zaznamenal pokles méně než 5 % anthokyanů při krátkodobém skladování muffinů z obilok rýže s obsahem anthokyanů. Oproti tomu Karakaya et al. (2016) uvedli vyšší míru degradace anthokyanů v houskách a sušenkách připravených z pšeničné mouky obohacené o anthokyanový extrakt z exokarpu hroznového vína. Pokles anthokyanů podle druhu výrobku činil při krátkodobém skladování 9 – 18 %.

Z dílčích výsledků pekařského pokusu byly blíže popsány i míry degradace jednotlivých sledovaných monoglykosidů. Uvedené procentuální hodnoty jednotlivých monoglykosidů jsou průměrem jejich hodnot v jednotlivých odrůdách (Graf 3).

**Graf 3** Degradace jednotlivých anthokyanů (% původního obsahu anthokyanů).



Analyty podle zvyšující se míry degradace (uvedena v závorce) byly: peonidin-3-glukosid (44 %) < kyanidin-3-glukosid (52 %) < kyanidin-3-rutinosid (61 %) < petunidin-3-glukosid (65 %) < delphinidin-3-rutinosid (80 %) < delphinidin-3-glukosid (82 %). Nejvyšší míra degradace byla pozorována u glykosidů delphinidinu, zatímco glykosidy peonidinu a kyanidinu byly při působení vysokých teplot stabilnější. Ke stejným závěrům dospěli také Sui et al. (2015), kteří popsali nižší míru degradace u kyanidin-3-glukosidu než u kyanidin-3-rutinosidu, a Hou et al. (2013), kteří uvedli vzrůstající míru degradace v řadě: peonidin-3-glukosid < kyanidin-3-glukosid < kyanidin-3-rutinosid. Konkrétněji popisují vztah struktury anthokyanů a jejich tepelné stability Fleschhut et al. (2006), kteří udávají pokles stability jednotlivých aglykonů se vzrůstající mírou jejich hydroxylace a methoxylace. Podle této zásady se míra degradace jednotlivých aglykonů zvyšuje v řadě: pelargonidin < peonidin < kyanidin < malvidin < petunidin < delphinidin. To odpovídá i výsledkům získaným z pekařského pokusu. Je tedy zřejmé, že míra degradace sumy anthokyanů může být u jednotlivých genotypů ovlivněna charakterem anthokyanového profilu. Zejména genotypy obsahující vysoké podíly peonidin-3-glukosidu a kyanidin-3-glukosidu (profil charakteristický pro purpurové pšenice) tak mohou vykazovat nižší procentuální úbytek anthokyanů při působení vysoké teploty než odrůdy s dominantním obsahem glykosidů delphinidinu (typickým pro modré genotypy).

V souhrnu z výsledků popsaného experimentu vyplývá, že v procesu výroby pekárenských produktů dochází k významné degradaci obsažených anthokyanů. Přestože purpurové genotypy zkoumané v této práci vykazovaly vyšší stabilitu anthokyanů při pečení, lepších finálních hodnot z hlediska reziduálního obsahu anthokyanů dosahovaly modré genotypy s přirozeně vysokým obsahem anthokyanů – u těch byl obsah anthokyanů po pečení a krátkodobém skladování až 86,40 mg/kg (genotyp V1 131-15), zatímco u analyzovaných purpurových genotypů to bylo maximálně 20,84 mg/kg (genotyp ANK 28-A). Přestože genotyp je významným faktorem ovlivňujícím míru degradace anthokyanů, nejdůležitějším ukazatelem v tomto ohledu je jednoznačně obsah anthokyanů ve výchozím materiálu. Z tohoto hlediska tudíž lze pro pekárenské účely jednoznačně doporučit genotypy s vysokým obsahem anthokyanů, jako jsou např. genotypy UC 66049 a V1 131-15 zkoumané v tomto experimentu. Takové a podobné genotypy představují potenciál pro výrobu produktů s přidanou nutriční hodnotou.

#### 4.4.2. Vaření

V experimentu pro ověření vlivu vaření na obsah anthokyanů bylo použito celkem 7 barevných genotypů: AF Jumiko (Pp), Konini (Pp), ANK 28-A (Pp), RU 687-12 (Pp), UC 66049 (Ba), Skorpion (Ba) a V1 131-15 (Ba). Před samotným vařením bylo celkem 200 g celého zrna od každého genotypu namočeno na 2 hodiny do vody, poté byla voda vyměněna a pšenice byla vařena po dobu 30 min. Pšeničné zrno bylo ihned po uvaření zmrazeno a lyofilizováno pro analýzu. Vedle pšeničného zrna byla na obsah anthokyanů analyzována také zbytková voda po vaření. Voda byla odpařena v sušárně při teplotě 50 °C a reziduum bylo rozpuštěno a analyzováno dle standardních postupů. Obsahy anthokyanů byly analyzovány a kvantifikovány pomocí spektrofotometrické a UHPLC-MS metody, výsledky jsou uvedeny v Tab. 17. Procentuální změny obsažených celkových anthokyanů a sumy monoglykosidů uvádí Graf 4.

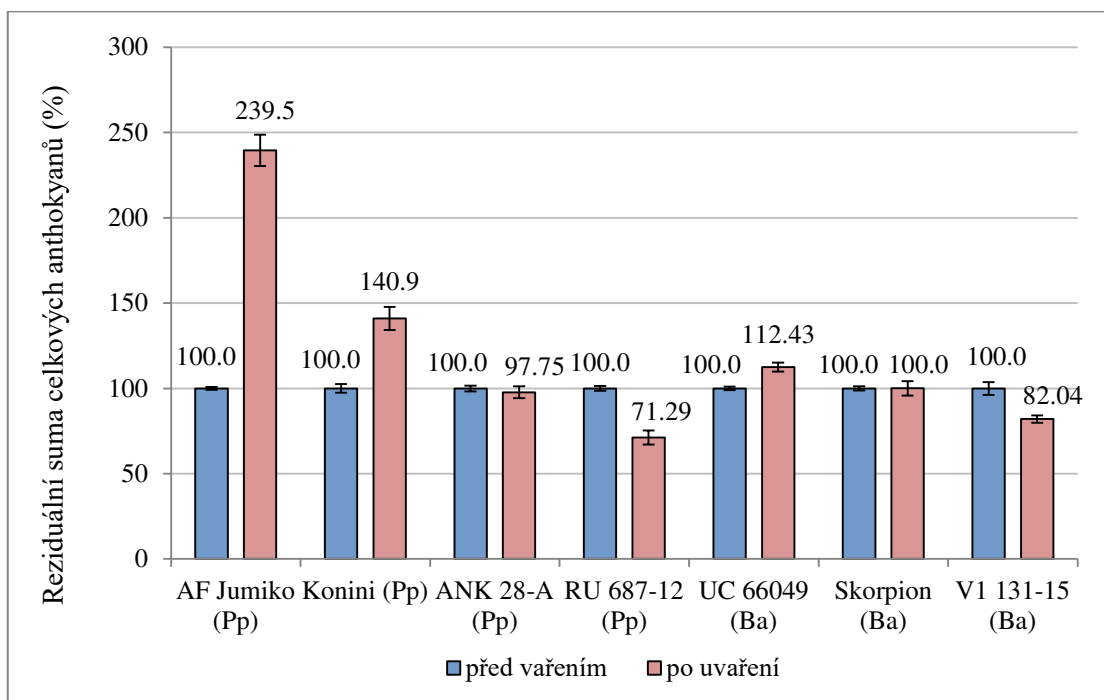
**Tab. 17** Změny v obsahu celkových anthokyanů a sumy monoglykosidů (mg/kg sušiny)

genotyp	celkové anthokyany (mg/kg sušiny)		suma jednotlivých anthokyanů (mg/kg sušiny)	
	spektrofotometrická metoda		UHPLC-MS metoda	
	před vařením (celé zrno)	po uvaření	před vařením (celé zrno)	po uvaření
AF Jumiko	6,531 ± 0,054 <i>a</i>	15,63 ± 1,443 <i>b</i>	0,065 ± 0,013 <i>a</i>	0,094 ± 0,007 <i>b</i>
Konini	8,943 ± 0,229 <i>a</i>	12,60 ± 0,851 <i>b</i>	0,147 ± 0,010 <i>a</i>	0,172 ± 0,012 <i>b</i>
ANK 28-A	17,22 ± 0,293 <i>a</i>	16,83 ± 0,598 <i>a</i>	0,841 ± 0,042 <i>a</i>	0,244 ± 0,007 <i>b</i>
RU 687-12	37,77 ± 0,558 <i>a</i>	26,94 ± 1,114 <i>b</i>	1,061 ± 0,049 <i>a</i>	0,195 ± 0,013 <i>b</i>
UC 66049	46,87 ± 0,493 <i>a</i>	52,70 ± 1,378 <i>b</i>	37,40 ± 1,490 <i>a</i>	15,78 ± 0,334 <i>b</i>
Skorpion	61,46 ± 0,775 <i>a</i>	61,50 ± 2,602 <i>a</i>	29,02 ± 1,056 <i>a</i>	15,49 ± 0,244 <i>b</i>
V1 131-15	105,5 ± 3,957 <i>a</i>	86,53 ± 1,847 <i>b</i>	35,17 ± 1,448 <i>a</i>	23,47 ± 0,833 <i>b</i>

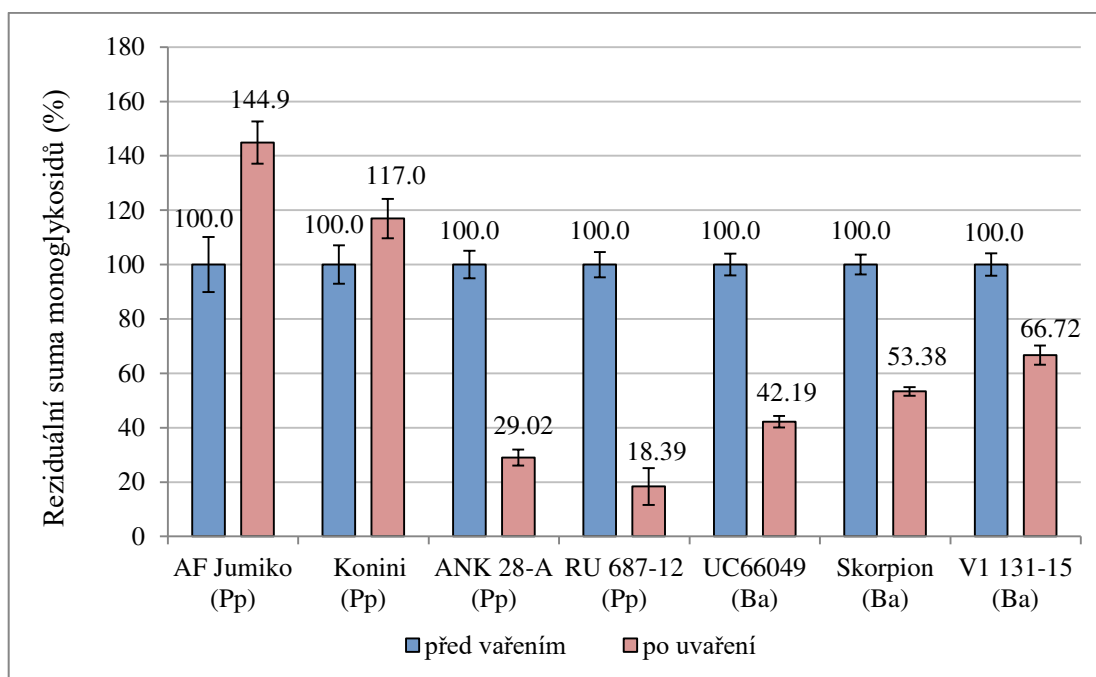
odlišná písmena určují statisticky významný rozdíl ve dvojicích hodnot (před a po pufování) odděleně pro jednotlivé odrůdy a analytické metody

**Graf 4** Změna obsahu anthokyanů při vaření (% původního obsahu anthokyanů)

A) všech extrahovatelných anthokyanů (měřeno spektrofotometricky)

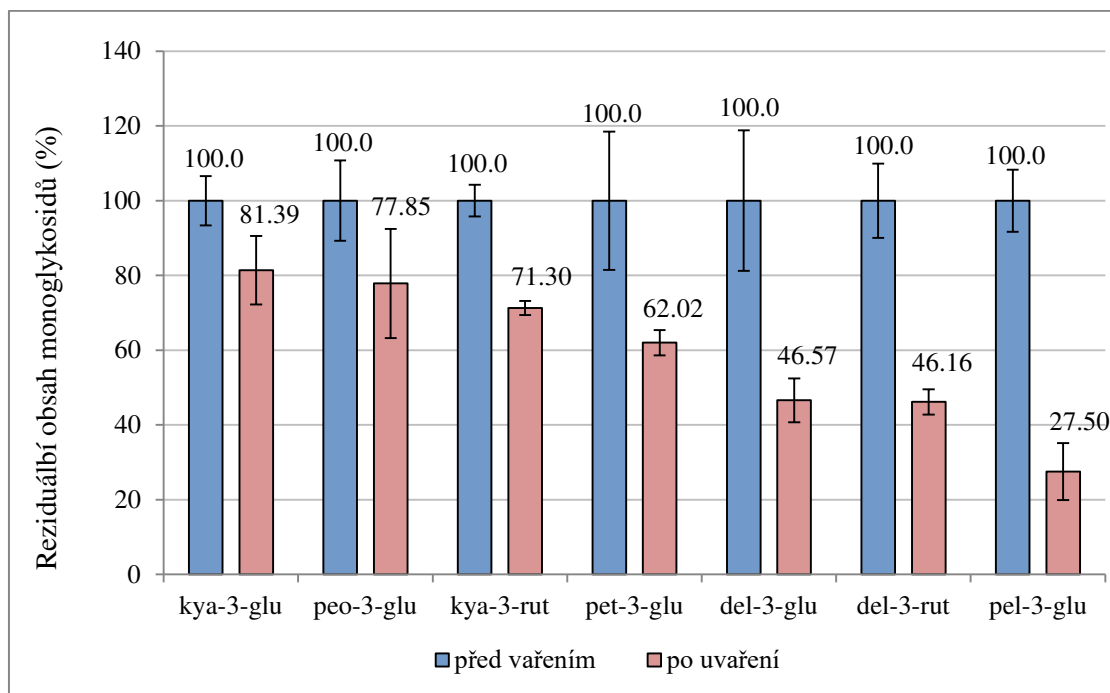


B) všech sledovaných monoglykosidů (měřeno UHPLC-MS metodou)



Graf 5 uvádí efekt vaření na stabilitu jednotlivých monoglykosidů. Procentuální změny jednotlivých monoglykosidů jsou hodnocené jako průměr jejich hodnot v jednotlivých genotypch.

**Graf 5** Procentuální změny obsahu jednotlivých monoglykosidů



Při hodnocení výsledků experimentu nebyl ve změně obsahu anthokyanů pozorován jednoznačný trend. V případě spektrofotometrického stanovení celkových anthokyanů byl statisticky významný pokles (který je v případě anthokyanů očekávatelný u všech tepelných úprav) pozorován pouze u dvou genotypů z celkových 7. V obou případech se přitom jednalo o zástupce s nejvyšším obsahem anthokyanů pro konkrétní barevný typ – linie V1 131-15 (Ba) zaznamenala pokles celkových anthokyanů o 18,0 % a linie RU 687-12 (Pp) o 28,7 %. U dalších dvou zástupců, purpurového genotypu ANK 28-A a modré odrůdy Skorpion, se obsah celkových anthokyanů po uvaření nelišil od výchozí hodnoty v nevařeném zrna a celkem u třech genotypů byl pozorován statisticky signifikantní nárůst hodnoty celkových anthokyanů. U modré linie UC 66049 vzrostl obsah anthokyanů o 12,4 %, u odrůdy Konini o 40,9 % a u odrůdy AF Jumiko dokonce o 140 %. Souhrnně byl při hodnocení vlivu vaření celého zrna pozorován jednoznačně pozitivní efekt, kdy ve většině vzorků byl obsah anthokyanů zachován nebo vzrostl a případné degradace u menšího množství vzorků nepřesáhly třetinový úbytek.

Také změna sumy monoglykosidů (UHPLC-MS metoda) vykazovala u různých genotypů odlišné trendy. U většiny vzorků došlo k signifikantnímu poklesu barviv s výjimkou purpurových odrůd AF Jumiko a Konini, kde byl (stejně jako v předchozím případě) zaznamenán statisticky významný nárůst sumy monoglykosidů o 17,0 % (Konini) a 44,9 % (AF Jumiko). Naopak u dalších zástupců s purpurovým zrnem (linie ANK 28-A a RU 687-12) byly zaznamenány vůbec největší poklesy sumy monoglykosidů v tomto



experimentu (71,0 a 81,6 %), zatímco u genotypů s modrým zrnem se degradace sumy anthokyanů pohybovala v rozmezí 33,3 – 57,8 %. Výsledky z měření UHPLC-MS metodou tak byly výrazně odlišné od trendu pozorovaného při spektrofotometrickém stanovení celkových anthokyanů.

Neshoda mezi výsledky obou měření poukazuje na odlišný vliv vaření celého zrna na jednoduché a složité formy anthokyanů. V případě monoglykosidů ve většině případů docházelo k degradaci jejich celkového obsahu, což odpovídá všeobecně nízké stabilitě těchto látek při zvýšené teplotě (Hiemori et al. 2009; Harakotr et al. 2014). Složité formy anthokyanů, které jsou zahrnuty v celkové sumě anthokyanů při spektrofotometrickém měření, jsou vůči zvýšené teplotě při vaření odolnější (Hiemori et al. 2009; Abdel-Moemin 2016;). Jak ovšem naznačují dílčí výsledky signifikantního navýšení obsahu anthokyanů v důsledku vaření, významnou roli hraje také zvýšení extraktibility anthokyanů vlivem vaření, díky čemuž se analyty z buněčné matrix snáze uvolňují do extrakčního rozpouštědla (Melini & Acquistucci 2017). Z výsledků lze soudit, že po uvaření jsou z pšeničného zrna lépe extrahovatelné složité formy anthokyanů (celkově více pozorování navýšení obsahu celkových anthokyanů, viz Graf 4A), tento efekt však funguje zřejmě i u jednodušších monoglykosidických forem, jak napovídají vyšší sumy monoglykosidů u odrůd AF Jumiko a Konini po uvaření (viz Graf 4B). Efekt navýšení sumy monoglykosidů může být i důsledkem uvolňování těchto analytů při rozpadu složitých forem anthokyanů vlivem vaření, jak se domnívají Salinas-Moreno et al. (2003).

Sledování míry degradace jednotlivých monoglykosidů poskytlo podobné výsledky, jaké byly pozorovány i u ostatních experimentů s tepelnými úpravami v této práci. U všech analytů došlo k degradaci, nejvíce stabilní byl kyanidin-3-glukosid a peonidin-3-glukosid (v míře degradace u těchto analytů nebyl statisticky významný rozdíl), zatímco nejnižší stabilitu měly glykosidy delfinidinu. Zajímavým dílčím výsledkem byla detekce kyanidin-3-rutinosidu v odrůdě Konini po uvaření, zatímco v nevařeném zrně tento analyt nebyl v detekovatelném množství vůbec přítomen. Tento výsledek může být dalším důkazem lepší extraktibility anthokyanů nebo jejich uvolňování ze složitějších forem po uvaření jak bylo uvedeno výše. Celkově výsledky degradace jednotlivých analytů vizuálně zcela neodráží výsledky sumy monoglykosidů, a je proto namístě tyto diskrepance blíže vysvětlit. Zatímco u většiny analytů byly míry degradace v jednotlivých genotypech víceméně podobné, v případě kyanidin-3-glukosidu a peonidin-3-glukosidu byl úbytek v jednotlivých vzorcích výrazně variabilní. Na dané variabilitě výsledků se nejvíce odrazily hodnoty z genotypů ANK 28-A a RU 687-12, u nichž byla pro oba analyty

zaznamenána výrazně vyšší labilita než u ostatních genotypů (u kyanidin-3-glukosidu dosáhla degradace u těchto dvou odrůd průměrně až 78 %, u peonidin-3-glukosidu pak 68 %). Naopak zejména u odrůdy AF Jumiko oba analyty zaznamenaly po uvaření významný nárůst hodnoty (u kyanidin-3-glukosidu o 18 %, u peonidin-3-glukosidu o 56 %). Je tedy zřejmé, že stabilita jednotlivých monoglykosidů podléhá velké mezigenotypové variabilitě. Ve vysvětlení této variability pravděpodobně hraje roli řada parametrů. Lze se domnívat, že rozdíly v míře degradace mohou být ovlivněny jinou úrovní vlhkosti v zrně při vaření. Jak upozornili Escalante-Aburto et al. (2013), monoglykosidy při vyšší úrovni vlhkosti podléhají při působení vysoké teploty rychlejší degradaci než složitější formy anthokyanů. Rozdílná úroveň vlhkosti v zrně může být důsledkem namáčení suchého zrna před započítáním vaření. Všechny vzorky byly namáčeny po dobu 2 hod a byla u nich pozorována odlišná míra bobtnání zrna (výsledky nejsou uvedeny). Je tedy pravděpodobné, že rozdílné kvalitativní charakteristiky u jednotlivých genotypů mohou vést k odlišným rychlostem pronikání vody do vnitřních pletiv zrna, čímž může být úroveň vlhkosti ve chvíli započítání vaření u jednotlivých genotypů významně odlišná. Také objemy zbytkové vody po vaření byly při stejných podmínkách vaření u jednotlivých vzorků odlišné (výsledky nejsou uvedeny), což napovídá dalšímu bobtnání zrna i při procesu vaření. Ve výsledku tak mohla odlišná míra vlhkosti v zrně při vaření vést k větší degradaci anthokyanů u některých genotypů. Pro ověření této hypotézy by bylo zapotřebí podrobit jednotlivé vzorky analýze hmotnosti před a po namáčení a po vaření, což nebylo součástí experimentu.

Při vaření vzorků pšenice byly brány v potaz také ztráty anthokyanů způsobené výluhem. Po uvaření byly u všech vzorků odděleny pevné podíly a zbytková voda (výluh) byla dále analyzována. Kvantifikace obsažených anthokyanů byla provedena oběma metodami, ovšem spektrofotometrická metoda hodnocení celkových anthokyanů v tomto případě neposkytla dostatečné výsledky, neboť v naprosté většině výluhů byl obsah celkových anthokyanů nižší než mez detekce. Výjimkou byl výluh linie RU 687-12, který na rozdíl od ostatních vzorků byl i viditelně zbarven a jako jediný obsahoval množství anthokyanů kvantifikovatelné i spektrofotometricky. Objemy výluhů (resp. zbytkové vody po vaření) vykazovaly velké mezigenotypové rozdíly, mezi jednotlivými vzorky se lišily až téměř dvojnásobně (výsledky nejsou uvedeny). Z tohoto důvodu byl konečný výsledek sumy anthokyanů vyjádřen nikoliv ve formě koncentrace v roztoku, ale jako množství analytu ( $\mu\text{g}$ ), které se do výluhu uvolnilo z 1 g pšeničného zrna, resp. jako procentuální

podíl anthokyanů uvolněných do roztoku vzhledem k jejich výchozí hodnotě ve vzorku pšenice před vařením. Výsledky měření jsou uvedeny v Tab. 18.

**Tab. 18** Obsahy anthokyanů ve výluhu u jednotlivých genotypů

genotyp	UHPLC-MS metoda			spektrofotometrická metoda		
	výchozí obsah anth. ( $\mu\text{g/g}$ ) *	výluh anth. z 1 g zrna ( $\mu\text{g}$ ) **	podíl (%)***	výchozí obsah anth. ( $\mu\text{g/g}$ ) *	výluh anth. z 1 g zrna ( $\mu\text{g}$ ) **	podíl (%)***
AF Jumiko	0,065 $\pm$ 0,013	0,033 $\pm$ 0,004	50,01	6,531 $\pm$ 0,054	n. d.	n. d.
Konini	0,147 $\pm$ 0,010	0,106 $\pm$ 0,019	72,93	8,943 $\pm$ 0,229	n. d.	n. d.
ANK 28-A	0,841 $\pm$ 0,042	0,187 $\pm$ 0,033	22,25	17,22 $\pm$ 0,293	n. d.	n. d.
RU 687-12	1,061 $\pm$ 0,049	0,561 $\pm$ 0,015	52,87	37,77 $\pm$ 0,558	18,47 $\pm$ 1,114	48,90
UC 66049	37,40 $\pm$ 1,490	0,052 $\pm$ 0,007	0,140	46,87 $\pm$ 0,493	n. d.	n. d.
Skorpion	29,02 $\pm$ 1,056	0,192 $\pm$ 0,010	0,662	61,46 $\pm$ 0,775	n. d.	n. d.
V1 131-15	35,17 $\pm$ 1,448	0,147 $\pm$ 0,008	0,417	105,5 $\pm$ 3,957	n. d.	n. d.

\* výchozí obsah anthokyanů v zrně před vařením ( $\mu\text{g/g}$ )

\*\* suma anthokyanů uvolněných do výluhu z 1 g pšenice ( $\mu\text{g}$ )

\*\*\* podíl vyluhovaných anthokyanů vůči jejich obsahu v zrně před vařením (%)

n. d. nedetekovatelné

Výluh představoval významný podíl na ztrátě anthokyanů ve všech genotypech pšenice s purpurovým zrnem, nejméně u genotypu ANK 28-A a nejvíce u odrůdy Konini – množství anthokyanů ve výluhu odpovídalo 22,3 % resp. 72,9 % původního obsahu anthokyanů v pšeničném zrně před vařením. Oproti tomu v genotypech s modrým zrnem nedošlo výluhem prakticky k žádným ztrátám anthokyanů, množství anthokyanů v těchto výluzích představovalo pouhých 0,14 – 0,66 % z výchozí sumy anthokyanů. Tento rozdíl v porovnání modrých a purpurových genotypů poukazuje na skutečnost, že k výluhu ve větší míře dochází pouze u anthokyanů, které jsou lokalizovány v perikarpu (purpurové zrně), a jsou tak v přímém kontaktu s vnějším roztokem. Oproti tomu anthokyanů uložené v aleuronové vrstvě (modré zrně) jsou lokalizovány hlouběji, od vnějšího prostředí jsou odděleny a chráněny vrstvou perikarpu a k výluhu u nich dochází pouze v minimálním množství. Tento efekt pozorovali také Salinas-Moreno et al. (2003) při vaření kukuřice, kdy potvrdili, že výluhu podléhají zejména anthokyanů lokalizované v perikarpu.

Podrobnější analýza anthokyanů uvolněných výluhem přinesla i některá zajímavá zjištění. V první řadě se jednalo o zaznamenání přítomnosti určitých monoglykosidů, které nebyly v detekovatelném množství přítomny v zrně daného vzorku ani před ani po uvaření. Takto bylo u modrých genotypů Skorpion a V1 131-15 ve výluhu nově detekováno

stopové (ale kvantifikovatelné) množství malvidin-3-glukosidu a peonidin-3-glukosidu. Malvidin-3-glukosid se v detekovatelném množství vyskytuje v anthokyanovém spektru pšenice s barevným zrnem velmi výjimečně a výhradně u modrých genotypů. Oproti tomu peonidin-3-glukosid byl v této práci zaznamenán vždy výhradně v purpurových genotypech a jeho minoritní zastoupení i v modrých odrůdách bylo proto úplnou novinkou. Stejným způsobem byl u purpurových genotypů AF Jumiko, Konini a ANK 28-A ve výluhu zaznamenán na hranici kvantifikace pelargonidin-3-glukosid, který se za běžného stavu v detekovatelném množství vyskytuje pouze u malého množství purpurových genotypů. Podobně byl ve výluhu odrůdy Konini nalezen kyanidin-3-rutinosid. Tento analyt nebyl zaznamenán v zrně před vařením, ale v detekovatelném množství se objevil v zrně po vaření. Jak již bylo zmíněno, u anthokyanů se vlivem vaření zlepšuje extraktibilita (Melini & Acquistucci 2017) a může docházet i k uvolňování monoglykosidů ze složitějších forem anthokyanů (Salinas-Moreno et al. 2003). Oba tyto efekty mohou být důvodem, proč jsou ve výluzech patrné známky analytů, které jsou za jiných okolností v daném vzorku nedetekovatelné.

Pro porovnání výsledků experimentu s odbornou literaturou byly brány v potaz články věnující se degradaci anthokyanů vlivem vaření v obilovinách a výrobcích z nich. Celá řada autorů sleduje tento efekt za použití rýže či kukuřice (v tomto případě se jedná o experimenty s vařením celého zrna), zatímco pšenici se v tomto ohledu věnuje menší množství odborných článků. Většinou se jedná o experimenty s použitím pšenice ve formě těstovin, v nichž je obsah anthokyanů zajištěn přidáním jiného rostlinného materiálu.

Maximální úbytek zaznamenaný v tomto experimentu byl 28,7 % u celkových anthokyanů a 81,6 % u sumy monoglykosidů. Popsané ztráty anthokyanů vlivem vaření se v jednotlivých literárních zdrojích liší, ale v případě obsahu celkových anthokyanů (vyjádřených spektrofotometricky) dosahují vesměs přijatelných hodnot. V těstovinách s příměsí slupek z hroznového vína popsali Marinelli et al. (2018) úbytek pouhých 11,6 % celkových anthokyanů. O trochu vyšší (26 %) byla ztráta celkových anthokyanů v těstovinách s extraktem z černé mrkve (Singh et al. 2018) a na ještě vyšší úroveň (41,8 %) narostla u těstovin obohacených otrubami z obilí s barevným perikarpem (Parizad et al. 2020). V obilkách rýže byla zaznamenána degradace celkových anthokyanů 15 – 32 % (Tang et al. 2016) a v kukuřici, která je pro účely testování vaření využívána minimálně, byl v obilkách úbytek celkových anthokyanů 19,2 % (Harakotr et al. 2014). Méně příznivé hodnoty degradace anthokyanů jsou popisovány v případě sumy monoglykosidů. Při vaření rýže zaznamenali různí autoři úbytek sumy monoglykosidů 64 % (Zaupa et al. 2015), 65 %

(Tang et al. 2016), 65 – 79 % (Hiemori et al. 2009) i 70 – 92 % (Catena et al. 2019). Jiné studie uvádějící degradaci sumy monoglykosidů v dalších obilovinách nebyly nalezeny. Tyto výsledky poukazují na fakt, který byl patrný i z výsledků experimentu v této práci. Zatímco míry degradace obsahu celkových anthokyanů dosahují relativně nízkých hodnot (v dostupné odborné literatuře průměrně zhruba 25,3 %), úbytek sumy monoglykosidů je mnohem výraznější (v odborné literatuře průměrně 72,5 %). V experimentu v této práci byl zaznamenán maximální úbytek 28,7 % v obsahu celkových anthokyanů a 81,6 % v sumě monoglykosidů. V tomto ohledu jsou výsledky této práce v dobré shodě s odbornou literaturou. Rozdílné míry degradace monoglykosidických a složitých forem anthokyanů jsou dány odlišností ve stabilitě obou forem – jak již bylo zmíněno, složité formy anthokyanů jsou při vaření stabilnější než monoglykosidy, jejichž degradace je při vaření rychlejší (Hiemori et al. 2009; Harakotr et al. 2014; Abdel-Moemin 2016). Na druhou stranu jsou v literatuře zaznamenány i případy navýšení obsahu anthokyanů v důsledku vaření, a to v rýži (Melini & Acquistucci 2017) a v kukuřici (Salinas-Moreno et al. 2003). Konkrétně Melini a Acquistucci (2017) uvádí nárůst obsahu sumy monoglykosidů oproti nevařenému zrně o 25 %. Podobné výsledky byly zaznamenány i v experimentu v této práci, kdy zejména v případě celkových anthokyanů došlo ke statisticky významnému navýšení obsahu analytů u 3 genotypů ze 7 testovaných. Podobně byl stejný efekt pozorován i u dvou vzorků při hodnocení sumy monoglykosidů. Tato zjištění svědčí pro zvýšení extraktibility anthokyanů, jak potvrzují Melini a Acquistucci (2017). Kromě obilovin byl efekt zvýšení obsahu anthokyanů vlivem vaření pozorován i v hlízách brambor s barevnou dužninou (Brown et al. 2008; Lachman et al. 2012). I zde vysvětlují autoři tento efekt jako důsledek zlepšené extrakce.

Při hodnocení stability jednotlivých monoglykosidů byla v tomto experimentu pozorována nejvyšší stabilita u kyanidin-3-glukosidu a peonidin-3-glukosidu. Zároveň pro tyto dva analyty existuje v odborné literatuře dostatek studií zkoumajících jejich stabilitu při vaření v zrně obilovin (většina těchto studií totiž pracuje s tmavými genotypy rýže, které ve svém anthokyanovém spektru obsahují výhradně oba zmíněné analyty). Surh a Koh (2014) pozorovali při vaření rýže vyšší stabilitu u kyanidin-3-glukosidu (ztráta 20 %) než u peonidin-3-glukosidu (ztráta 23 %). Tyto údaje odpovídají velmi přesně výsledkům této práce – ztráta 18,6 % kyanidin-3-glukosidu a 22,1 % peonidin-3-glukosidu. Také Zaupa et al. (2015) popsali při vaření rýže vyšší stabilitu u kyanidin-3-glukosidu (úbytek 45 %), zatímco u peonidin-3-glukosidu se ztráta pohybovala kolem 53 %. Jinými autory však byl zaznamenán i opačný trend, kdy stabilnější z dvojice analytů byl naopak

peonidin-3-glukosid (Hiemori et al. 2009; Harakotr et al. 2014). V literatuře jsou však zaznamenány i případy statisticky významného nárůstu anthokyanů při vaření (Salinas-Moreno et al. 2003; Melini & Acquistucci 2017). Například při vaření rýže vzrostl obsah kyanidin-3-glukosidu o 73 %, kteří si autoři vysvětlují jako pozitivní důsledek zlepšené extrakce. V tom samém vzorku byl však zároveň pozorován i pokles peonidin-3-glukosidu o 46 % (Melini & Acquistucci 2017). Tyto výsledky dokládají různou míru stability hlavních anthokyanů u různých obilovin. V této disertační práci byla vedle kyanidin-3-glukosidu a peonidin-3-glukosidu i u ostatních analytů pozorována relativně dobrá míra retence. Např. u glykosidů delfinidinu, které obecně podléhají vysoké míře degradace, byla po vaření zaznamenána retence 46 %. Jako nejméně stabilní byl při vaření v této práci vyhodnocen pelargonidin-3-glukosid (degradace 72,5 %), tento výsledek však neodpovídá obecným poznatkům o obecně vysoké stabilitě glykosidů pelargonidinu při vysoké teplotě (např. Fleschhut et al. 2006; Hiemori et al. 2009). I Harakotr et al. (2014) uvádí, že při vaření kukuřičných zrn byla nejvyšší stabilita pozorována právě u pelargonidin-3-glukosidu. Nízká stabilita pozorovaná v tomto experimentu tedy zřejmě neodpovídá skutečnosti, neboť se jednalo o data získaná pouze z jednoho genotypu (ve více vzorcích se tento analyt nevyskytoval). Navíc se v tomto případě jednalo o linii RU 687-12, která obecně vykázala abnormálně vysokou míru degradace anthokyanů, a je tedy pravděpodobné, že tato data mají pouze omezenou výpovědní hodnotu.

Dle vysoké variability jednotlivých výsledků je zřejmé, že úroveň degradace vlivem vaření závisí na řadě faktorů. Hlavním faktorem úbytku anthokyanů vlivem vaření je bezpochyby teplota, jak potvrzuje řada autorů (Hiemori et al. 2009; Harakotr et al. 2014; Zaupa et al. 2015; Parizad et al. 2020). Stejně jako u jiných tepelných úprav i v tomto případě platí, že se zvyšující se teplotou degradace anthokyanů vzrůstá. Zatímco při standardním způsobu vaření dosahuje teplota 100 °C, při vaření za zvýšeného tlaku je teplota vyšší při současném zkrácení doby vaření. Tento typ tepelné úpravy je hojně využíván zejména při přípravě rýže. Nicméně jak Hiemori et al. (2009), tak Tang et al. (2016) popsali, že vaření rýže za zvýšeného tlaku vede k významně vyšší míře degradace (o 14,4 % resp. 17,0 % oproti vaření za normálního tlaku). Příčinou je právě rychlejší degradace anthokyanů vlivem vyšší teploty, přičemž zkrácení doby vaření tento negativní efekt není schopno vykompenzovat. Vedle teploty hraje roli také doba vaření. Například při zpracování rýže je nejlepší retence anthokyanů dosaženo při době vaření 20 min, přičemž s prodlužujícím se časem degradace narůstá (ze ztráty 10 % anthokyanů ve 20. minutě vaření až na ztrátu 32 % anthokyanů v 35. minutě vaření) (Tang et al. 2016).

Catena et al. (2019) také uvádí, že dalším významným parametrem degradace anthokyanů v rýži je poměr vody a zrna při vaření. Tento poměr by měl být vhodně zvolen tak, aby během vaření došlo k úplné absorpci vody do zrna, čímž bude zkrácena doba vaření, a zároveň se tak omezí možný výluh. Vzhledem k odlišným mírám bobtnavosti zrn u různých obilovin i u různých genotypů nelze stanovit jednotný optimální poměr. Kupříkladu Hiemori et al. (2009) a Catena et al. (2019) zkoumali dva různé genotypy rýže seté (*Oryza sativa* L.) a dospěli ke zcela odlišným optimálním poměrům voda:zrno – 3:1 resp. 8:1. V otázce významu výluhu anthokyanů z vařených obilovin nepanuje v odborné literatuře plná shoda. Zatímco Harakotr et al. (2014), Surh a Koh (2014) a Catena et al. (2019) ve svých experimentech nepozorovali ztráty anthokyanů vlivem výluhu, většina autorů (Salinas-Moreno et al. 2003; Zaupa et al. 2015; Tang et al. 2016; Parizad et al. 2020) popsala ztráty anthokyanů výluhem jako významné. K výluhu přitom dochází jak vlivem namáčení zrna ve studené vodě před započítím vaření, tak i během vaření (Tang et al. 2016). Například Zaupa et al. (2015) uvádí rozdíl v poklesu obsahu anthokyanů až o 34 % v porovnání vzorku vařeného za přebytku vody (kdy dochází k výluhu) a vzorku, u něž dochází k plné absorpci vody do zrna (k výluhu tedy nedochází). Míra výluhu však významně závisí na lokalizaci anthokyanů v zrně, kdy anthokyaniny uložené v perikarpu vykazují výrazně vyšší míru degradace (Salinas-Moreno et al. 2003), jak bylo ostatně pozorováno i v této práci. Harakotr et al. (2014) také doplňují, že nejvyšší míry výluhu lze pozorovat při vaření mechanicky poškozených zrn. V experimentu s vařením kukuřice autoři pozorovali ztrátu 19,2 % obsahu anthokyanů v obilkách v případě, kdy byl kukuřičný klas vařen vcelku. Oproti tomu ve chvíli, kdy byly kukuřičné obilky od vřetena odděleny a vařeny samostatně, se vlivem poškození zrn při oddělování z klasu úbytek anthokyanů zvýšil na 60,7 %.

Zatímco při vaření celých zrn obilovin se v degradaci anthokyanů uplatňují výše popsané faktory, v případě těstovin je nezbytné brát navíc v úvahu také degradaci anthokyanů vlivem dalších faktorů při samotné výrobě těstovin. Tím je zejména fáze sušení, kdy jsou čerstvě připravené těstoviny vystaveny několikahodinovému působení teplot v rozmezí 50 – 60 °C (doba sušení bývá dle výše teploty 6 – 12 hod). Tento krok může vést k úbytku 11,5 – 35,5 % obsažených anthokyanů (Parizad et al. 2020), míra degradace však může dosáhnout až 46 % (Singh et al. 2018). Retence anthokyanů v těstovinách je však dána nejen působením vnějších faktorů, a také vlastnostmi přidávané suroviny. Výhodné je obohacování takovou surovinou, která obsahuje složitější formy anthokyanů – jako je například extrakt z černé mrkve, jejíž anthokyanové spektrum tvoří

zejména velmi stabilní triglykosidy (Abdel-Moemin 2016). Vyšší retence anthokyanů je pozorována i v případě, kdy je přidávanou surovinou bohatou na anthokyaniny rostlinný perikarp (ovocné slupky, otruby apod.), neboť strukturní složky perikarpu chrání anthokyaniny před nadměrnou degradací více, než je tomu např. v případě přidávání anthokyanů do těstovin ve formě práškového extraktu (Marinelli et al. 2018). V případě těstovin se na vyšší výsledného extrahovatelného obsahu anthokyanů může podílet i matricový efekt. Ten je dán kvalitativními parametry zrna daného genotypu, zejména skladbou a kvalitou glutenových proteinů. Vyšší obsah proteinů a vyšší zastoupení kovalentních vazeb (např. disulfidických můstků) v proteinové struktuře zhoršují extraktibilitu anthokyanů. Naopak druhy a genotypy pšenice s vyšším zastoupením hydrofobních interakcí v proteinové síti vykazují lepší extraktibilitu anthokyanů po tepelném zpracování. Tento efekt je zřetelný zejména při porovnání těstovin z pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) a pšenice tvrdé – semoliny (*Triticum durum* L.). Proteinová struktura semoliny s vysokým zastoupením kovalentních vazeb zhoršuje extrakci anthokyanů o 24 % (Parizad et al. 2020).

Experiment prokázal, že vaření pšeničného zrna způsobuje variabilní změny anthokyanů. Zatímco v některých případech byla pozorována zřejmá degradace barviv, v jiných vzorcích se obsah anthokyanů zvýšil. Výsledky poukazují na fakt, že během vaření podléhají anthokyaniny vlivu různých faktorů. Jejich degradace je ovlivněna výší a dobou působící teploty, vlhkostí zrna při vaření, poměrem zrna a tekutiny a také výluhem. Optimalizací těchto parametrů lze maximalizovat retenci nebo podpořit efekt nárůstu obsahu anthokyanů. Lze očekávat, že optimální retence anthokyanů bude dosaženo při kratší době vaření, při vhodném poměru zrna a tekutiny tak, aby nedocházelo k výluhu (a zrna se tak spíše dusila, než vařila) a také při vaření celého nepoškozeného zrna. V opačném případě kdy by bylo zrno mechanicky poškozeno (jako je tomu např. u lámanky nebo bulguru) by ztráty výluhem byly mnohem výraznější. Naopak vnitřní parametry zrna, jako jsou bobtnavost a lokalizace anthokyanů v zrnu, nejsou ovlivnitelné a mohou sloužit jako ukazatele vhodnosti daného genotypu pro tento typ tepelné úpravy. Jako optimální se pro vaření jeví obecně pšenice s modrým zrnem, u nichž byly zaznamenány nízké míry degradace anthokyanů, minimální podíl výluhu a obecně vyšší obsah anthokyanů, avšak i některé genotypy purpurových pšenic mohou dosahovat dobrých výsledků díky zvýšení obsahu anthokyanů v zrnu v důsledku vaření. Jako méně vhodná byla pro vaření vyhodnocena purpurová linie RU 687-12, která podléhá vyšší míře degradace anthokyanů a jejich výluhu. Na druhou stranu se jedná o purpurovou linii s obecně nejvyšším obsahem



anthokyanů a při optimalizaci parametrů vaření a minimalizaci ztrát anthokyanů výluhem by i tento genotyp měl potenciál pro širší využití.

V porovnání s jinými tepelnými úpravami pšeničného zrna uvedených v této práci lze v případě vaření zaznamenat určité rozdíly. Jedná se o jediný způsob úpravy, při němž byla pozorována vyšší míra degradace u purpurových genotypů, zatímco u všech ostatních tepelných úprav více degradovala barviva modrých genotypů. Zároveň byly zaznamenány ztráty anthokyanů výluhem, ale zároveň i častý trend zvyšování obsahu anthokyanů vlivem tepelné úpravy. Je tedy patrné, že v metodách úprav za použití vlhkého tepla (vaření) a suchého tepla (pečení, extruze, pufování) jsou významné rozdíly.

Experiment prokázal, že vaření celého pšeničného zrna může být zajímavou alternativou tepelného zpracování, neboť vykazuje lepší retenci anthokyanů než např. při vaření těstovin nebo při pečení z mouky. Přestože v tradičním spotřebitelském využití se vařené pšeničné zrno neobjevuje, mohlo by nepochybně být využito jako přílohová potravina stejně jako rýže, kukuřice nebo např. bulgur, pohanka či quinoa.

#### 4.4.3. Extruze

Pro stanovení vlivu extruze na obsah anthokyanů v obilkách barevných genotypů pšenice bylo vybráno 6 genotypů: AF Jumiko (Pp), ANK 28-A (Pp), Konini (Pp), RU 687-12 (Pp), Skorpion (Ba) a UC 66049 (Ba). Zpracovaná surovina s obsahem vody 20 % byla extrudována při 130 °C a 200 rpm. Obsahy anthokyanů byly kvantifikovány pomocí spektrofotometrické a UHPLC-MS metody, viz Tab. 19. Graf 6 uvádí procentuální změny v obsazích celkových anthokyanů a sumy monoglykosidů.

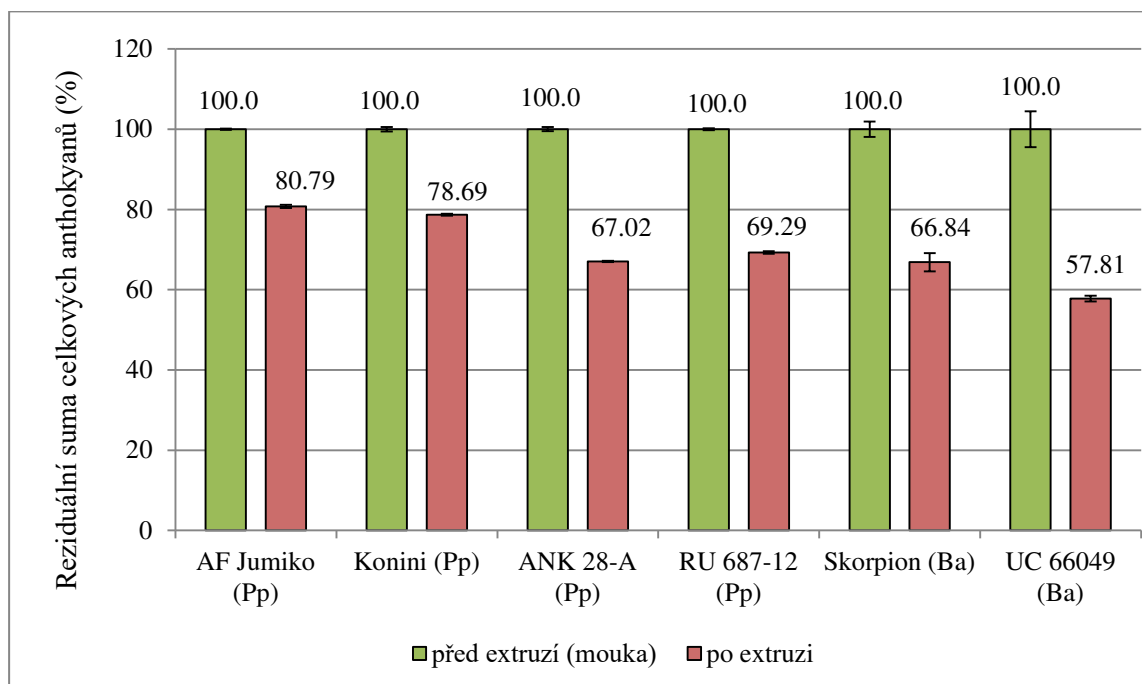
**Tab. 19** Změny v obsahu celkových anthokyanů a sumy monoglykosidů (mg/kg sušiny)

genotyp	celkové anthokyaniny (mg/kg sušiny)		suma anthokyanů (mg/kg sušiny)	
	spektrofotometrická metoda		UHPLC-MS metoda	
	před extruzí (mouka)	po extruzi	před extruzí (mouka)	po extruzi
AF Jumiko	12,80 ± 0,136 <i>a</i>	10,34 ± 0,389 <i>b</i>	0,152 ± 0,024 <i>a</i>	0,317 ± 0,052 <i>b</i>
Konini	20,48 ± 0,562 <i>a</i>	16,12 ± 0,242 <i>b</i>	1,217 ± 0,313 <i>a</i>	1,214 ± 0,059 <i>a</i>
ANK 28-A	20,78 ± 0,525 <i>a</i>	13,93 ± 0,151 <i>b</i>	0,803 ± 0,113 <i>a</i>	0,840 ± 0,171 <i>a</i>
RU 687-12	41,39 ± 0,238 <i>a</i>	28,68 ± 0,315 <i>b</i>	3,060 ± 0,030 <i>a</i>	1,924 ± 0,039 <i>b</i>
Skorpion	63,91 ± 1,883 <i>a</i>	42,72 ± 2,274 <i>b</i>	30,70 ± 3,658 <i>a</i>	15,42 ± 1,447 <i>b</i>
UC 66049	101,4 ± 4,478 <i>a</i>	58,59 ± 0,725 <i>b</i>	85,84 ± 3,441 <i>a</i>	35,27 ± 1,253 <i>b</i>

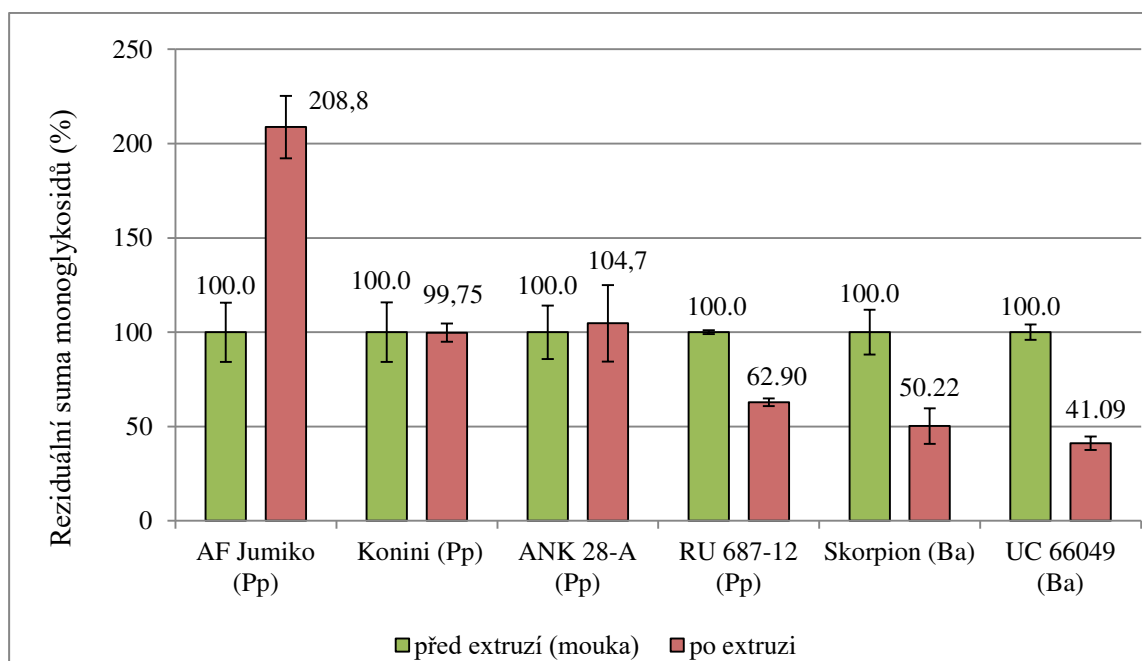
odlišná písmena určují statisticky významný rozdíl ve dvojicích hodnot (před a po pufování) odděleně pro jednotlivé genotypy a analytické metody

**Graf 6** Změna obsahu anthokyanů při extruzi (% původního obsahu anthokyanů)

A) všech extrahovatelných anthokyanů (měřeno spektrofotometricky)



B) všech sledovaných monoglykosidů (měřeno UHPLC-MS metodou)



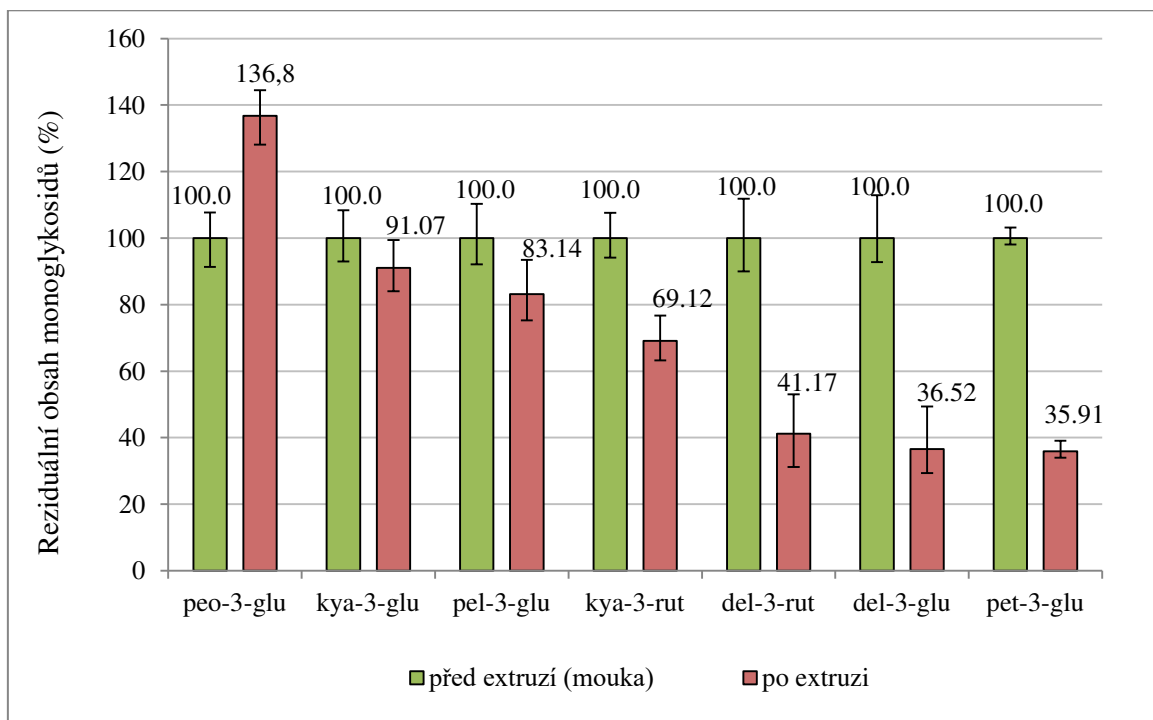
Oproti jiným tepelným úpravám byl vliv extruze na obsah celkových anthokyanů u jednotlivých genotypů obdobný. Ve všech případech byl zaznamenán úbytek anthokyanů v rozsahu 19,2 – 42,2 %, který byl u všech vzorků statisticky významný. Nejnižší míra degradace byla pozorována u purpurové odrůdy AF Jumiko, nejvyšší naopak u modrého genotypu UC 66049. Navzdory nejvyššímu zaznamenanému úbytku měl však tento

genotyp po extruzi zároveň stále nejvyšší reziduální obsah celkových anthokyanů. V případě purpurových genotypů obsahoval nejvíce anthokyanů po extruzi genotyp RU 687-12.

V případě sledování sumy monoglykosidů (Graf 6B) byly změny obsahu anthokyanů značně variabilní. U obou modrých genotypů byla degradace anthokyanů minimálně 50 % podobně jako u genotypu RU 687-12, kde vlivem extruze ubylo 37,1 % sumy anthokyanů. Naproti tomu u dvou purpurových genotypů Konini a ANK 28-A nebyla změna v obsahu anthokyanů statisticky významná a u odrůdy AF Jumiko dokonce došlo k více než dvojnásobnému nárůstu sumy monoglykosidů. Z hlediska relativní změny sumy monoglykosidů dosahovaly lepších výsledků purpurové genotypy, u nichž pozorované změny v obsahu anthokyanů svědčily pro mnohem lepší retenci než u modrých genotypů. Ovšem i v tomto případě byl nejvyšší obsah reziduální sumy monoglykosidů zaznamenán u genotypu UC 66049.

Vedle vlivu extruze na celkové či sumární obsahy anthokyanů byl sledován i efekt z hlediska jednotlivých monoglykosidů. Graf 7 uvádí procentuální změny jednotlivých monoglykosidů hodnocené jako průměr jejich hodnot v jednotlivých odrůdách.

**Graf 7** Procentuální změny obsahu jednotlivých monoglykosidů



Na rozdíl od ostatních tepelných úprav pšenice zkoumaných v této práci byl v případě extruze vedle degradace jednotlivých analytů zaznamenán i statisticky významný

nárůst peonidin-3-glukosidu (o 36,8 %). Vysoká míra retence byla pozorována i v případě kyanidin-3-glukosidu (91,1 %) a pelargonidin-3-glukosidu (83,1 %), charakteristických zástupců anthokyanového spektra purpurových odrůd pšenice, zatímco typické anthokyany modrých genotypů (glykosidy delphinidinu a petunidinu) vlivem extruze degradovaly více. Tyto výsledky vysvětlují, proč byla u purpurových genotypů pozorována významně vyšší retence sumy monoglykosidů než u modrých genotypů.

Degradace anthokyanů v rostlinných materiálech vlivem extruze byla popsána v řadě vědeckých publikací, ovšem pro přesnou komparaci nebyl nalezen žádný článek, který by studoval tento efekt za použití pšenice. Většina autorů uvádí obdobné míry degradace celkových anthokyanů v obilovinách vlivem extruze. V případě výrobků z kukuřice popsali Escalante-Aburto et al. (2013) a Camacho-Hernández et al. (2014) úbytek 61 – 82 %, resp. 70 – 85 % anthokyanů. Velmi podobné výsledky uvedli i Hu et al. (2018), kdy při extruzi výrobků z rýže pozorovali úbytek 74 % anthokyanů. I v případě jiných než obilných výrobků byly popsány obdobné hodnoty degradace anthokyanů vlivem extruze – u prášku z brambor s purpurovou dužninou 60 – 70 % (Nayak et al. 2011), v extraktu z aronie 42 – 90 % (Hirth et al. 2015) a v extraktech z borůvek a hroznového vína 90 % resp. 74 % (Camire et al. 2002). Ve všech případech se však jednalo o významně vyšší míry degradace, než byly zaznamenány v této práci (úbytek celkových anthokyanů činil pouze 19,2 – 42,2 %). Podobnou míru degradace jako v této práci však popsali Khanal et al. (2009), kteří u výlisků z borůvek zaznamenali úbytek 33 – 42 % celkových anthokyanů. Vzhledem k obecně vysoké variabilitě rostlinných materiálů však určité rozdíly nejsou překvapivé. Všechny studie ovšem shodně poukazují na více či méně negativní vliv extruze na obsah anthokyanů.

Na druhou stranu byl v důsledku extruze pozorován i nárůst sumy monoglykosidů u genotypů AF Jumiko (statisticky významný) a ANK 28-A (statisticky nevýznamný). Tento nárůst byl způsoben zejména zvýšením obsahu peonidin-3-glukosidu, který v obou genotypech představuje významného zástupce anthokyanového spektra. Nárůst obsahu monoglykosidů v důsledku extruze popsali i Escalante-Aburto et al. (2013), kteří při extruzi výrobků z kukuřice pozorovali nárůst 11 % obsahu kyanidin-3-glukosidu oproti nezpracovanému materiálu. Menchaca-Armenta et al. (2020) k tomu dodávají, že při extruzi jsou kombinovány efekty rozpadu termolabilních látek spolu se zlepšováním biologické dostupnosti anthokyanů v důsledku rozpadu kovalentních vazeb struktury a porušování buněčných stěn. Výsledný obsah anthokyanů tak závisí na tom, který z těchto dvou efektů při extruzi převládne. Salinas-Moreno et al. (2003) uvádí, že tento efekt může

být způsoben uvolněním monoglykosidů při degradaci složitějších forem anthokyanů. Roli zde může hrát například forma stabilizace jednotlivých glykosidů, kdy zejména acyly kyseliny malonové jsou za vysokých teplot nestabilní a vázanou kyselinu snáze odštěpují (a stávají se tak monoglykosidy). Brennan et al. (2011) tento efekt vysvětlují spíše vyšší extraktibilitou určitých forem anthokyanů po extruzi, vlivem které dojde k lepšímu uvolňování anthokyanů z buněčné matrix. To potvrzují i Sommer a Cohen (2018), kteří vysvětlují, že vlivem prudké evaporace vody v surovině dochází k masivnímu praskání buněčných stěn následovanému uvolňováním anthokyanů z buněk. Escalante-Aburto et al. (2013) dále uvádí, že zejména vhodná kombinace parametrů vlhkosti a teploty zpracování ovlivňuje míru uvolňování monoglykosidů z buněčné matrix.

Míra degradace anthokyanů při zpracování extruzí je významně závislá na různých parametrech tohoto procesu, zejména na teplotě bubnu (neboli válce) a vlhkosti vstupní suroviny a o něco méně i na rychlosti šroubu (Escalante-Aburto et al. 2013; Camacho-Hernández et al. 2014). Extruze jako proces je obecně charakterizována zpracováním suroviny při teplotě více než 100 °C, přičemž tato teplota může dosahovat libovolných hodnot (zpravidla se pohybuje mezi 120 – 180 °C) (Hirth et al. 2015; Durge et al. 2013). Čím je teplota bubnu vyšší, tím vzrůstá i degradace anthokyanů, které se vlivem vysoké teploty rozpadají na bezbarvé chalkony podléhající následně rychlé degradaci, případně dochází k hydrolýze glykosidických forem a vzniku nestabilních aglykonů, nebo anthokyanů podléhají tvorbě produktů neenzymatického hnědnutí vlivem Maillardovy reakce (Nayak et al. 2011). Markantní rozdíly v degradaci lze pozorovat zejména při teplotě nad 140 °C (Nayak et al. 2011; Durge et al. 2013). V otázce optimální vlhkosti vstupní suroviny nejsou literární zdroje zcela jednotné. Escalante-Aburto et al. (2013) popisují nejlepší retenci anthokyanů v extrudovaném produktu z kukuřice při vlhkosti suroviny 16,5 %, zatímco výraznější poklesy obsahu anthokyanů pozorovali jak při vlhkosti 14 %, tak při vlhkosti 20,5 %. Oproti tomu ostatní autoři uvádí jako optimální obsah vody vyšší hodnoty vlhkosti – u kukuřice 23,8 – 25,2 % (Camacho-Hernández et al. 2014), u rýže 18 % (Durge et al. 2013) a u aronie 22 % (Hirth et al. 2015). Jak ovšem upozorňují Camacho-Hernández et al. (2014) spíše než samotná vlhkost ovlivňuje degradaci anthokyanů kombinace vlhkosti a teploty. Zatímco při nízkých teplotách zpracování (kolem 100 °C) obsah vlhkosti na degradaci příliš velký vliv nemá, při zvyšující se teplotě (140 °C a více) lze pozorovat významný vliv vlhkosti na úbytek anthokyanů. To potvrzují také Menchaca-Armenta et al. (2020), kteří u výrobků z kukuřice zpracovávaných při 90 °C pozorovali nejlepší retenci anthokyanů v širokém rozpětí hodnot

vlhkosti 15 – 22,5 %, ovšem při teplotě procesu nad 110 °C se při vyšším obsahu vody (nad 22,5 %) začala degradace anthokyanů významně zvyšovat. Určitý obsah vody v surovině je nezbytný pro její protektivní efekt na obsah anthokyanů a při jejím nedostatku lze pozorovat jejich zvýšenou degradaci (Hirth et al., 2015; Brennan et al. 2011). Stejný efekt má však i příliš vysoký obsah vody v surovině, neboť vysoká vlhkost způsobí želatinizaci škrobu a vznik pastovité konzistence směsi, která zpomalí tok směsi extrudérem a způsobí vyšší degradaci anthokyanů vlivem zvýšené teploty směsi kvůli jejímu delšímu setrvání ve válci (Camacho-Hernández et al. 2014). Tento efekt je zvláště významný v případě monoglykosidů, jejichž úbytek je při vysoké vlhkosti rychlejší než u složitějších forem anthokyanů (Escalante-Aburto et al. 2013). Navíc vyšší vlhkost extrudované suroviny vede k vyšší míře komplexace a asociace anthokyanů, čímž vznikají složité molekuly s vysokou hmotností a zhoršenou extraktibilitou (Menchaca-Armenta et al. 2020). Vedle teploty a vlhkosti se na degradaci anthokyanů podílí i rychlost šroubu extrudéru, která ovlivňuje dobu setrvání směsi ve válci. Čím déle směs prochází válcem extrudéru, tím více je tepelně namáhána a tím se i zvyšuje degradace anthokyanů (Hirth et al. 2015). Durge et al. (2013) popsali jako optimální rychlost otáčení šroubu 190 rpm, jelikož nižší rychlosti otáčení vedly v jejich experimentu k horší retenci anthokyanů. Menchaca-Armenta et al. (2020) však doplňují, že pokud je nízká rychlost šroubu (do 100 rpm) kombinována zároveň s nízkou teplotou (90 °C), je při tomto nastavení retence anthokyanů nejvyšší. Hirth et al. (2015) uvedli, že dobrých retencí anthokyanů lze dosáhnout i při rychlosti šroubu 300 rpm, zatímco příliš vysoká rychlost nad 500 rpm může paradoxně degradaci anthokyanů zhoršit, neboť vede k vyššímu tepelně-mechanickému namáhání směsi vlivem většího tření.

Optimalizace výrobního procesu při extruzi pšenice nebyla předmětem zkoumání této disertační práce. Ovšem dle poznatků z odborné literatury lze soudit, že nastavení parametrů extruze (teplota zpracování 130 °C, vlhkost suroviny 20 % a rychlost otáčení šroubu 200 rpm) relativně dobře odpovídalo požadavkům na šetrné zpracování a pravděpodobně nezpůsobilo intenzivní úbytek anthokyanů, čemuž by odpovídala i přijatelná míra degradace anthokyanů 19 – 42 %, která byla výrazně nižší, než uvádí většina odborné literatury. Pro ověření této hypotézy by však byl zapotřebí detailnější experiment.

Vzhledem k ostatním tepelným úpravám zkoumaným v rámci této práce, dosáhly retence anthokyanů po extruzi spíše méně příznivých hodnot. Míra degradace způsobená vlivem extruze byla sice vyšší než v případě vaření a pečení, nicméně stále byla přijatelná.

Extruzi prováděnou za popsáných parametrů lze tedy jednoznačně označit za použitelnou tepelnou úpravu z hlediska obsahu anthokyanů.

#### 4.4.4. Pufování

Vliv pufování na obsah anthokyanů byl sledován v 7 genotypech: AF Jumiko (Pp), Konini (Pp), ANK 28-A (Pp), RU 687-12 (Pp), UC 66049 (Ba), Skorpion (Ba) a AF Zora (Ba+Pp). V rámci této práce se jednalo o jediný experiment, do nějž byla zahrnuta i jedna odrůda černé pšenice, která bohužel nebyla k dispozici v době provádění ostatních pokusů. Pufování zrna navlhčeného na 17,5 % bylo provedeno při teplotě 270 – 280 °C po dobu 6 s. Obsahy anthokyanů byly analyzovány a kvantifikovány pomocí spektrofotometrické a UHPLC-MS metody a výsledky jsou uvedeny v Tab. 20. Procentuální změny v obsahu celkových anthokyanů a sumy monoglykosidů jsou uvedeny v Grafu 8.

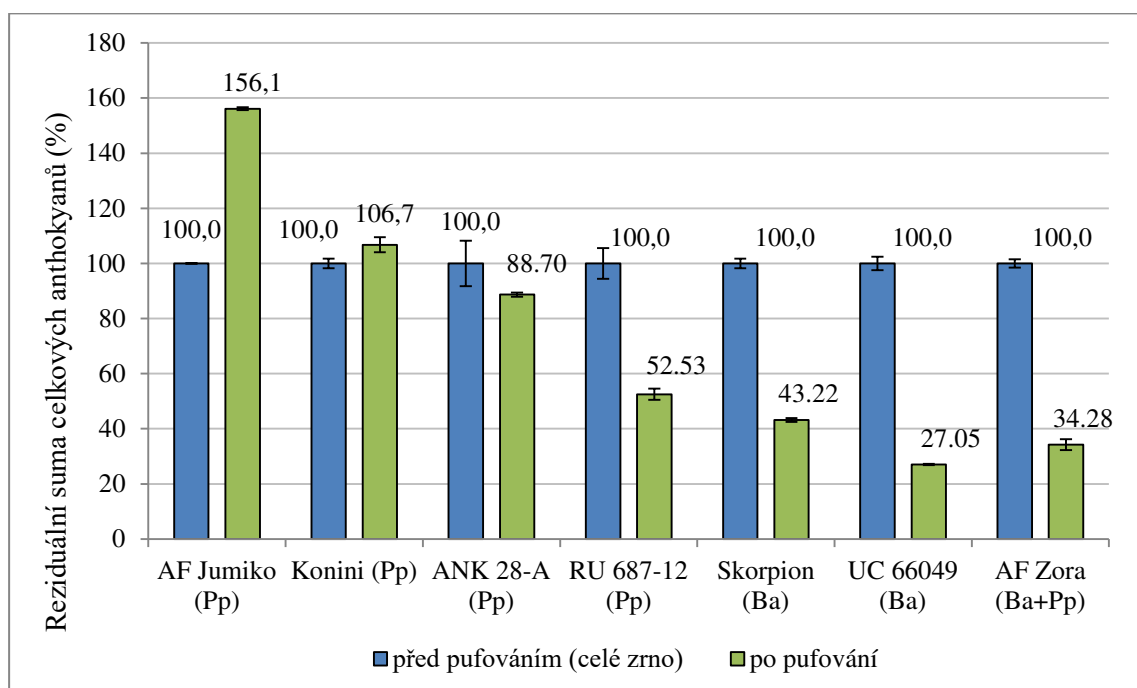
**Tab. 20** Změny v obsahu celkových anthokyanů a sumy monoglykosidů (mg/kg sušiny)

genotyp	celkové anthokyany (mg/kg sušiny)		suma anthokyanů (mg/kg sušiny)	
	spektrofotometrická metoda		UHPLC-MS metoda	
	před pufováním (celé zrno)	po pufování	před pufováním (celé zrno)	po pufování
AF Jumiko	13,04 ± 0,154 <i>a</i>	20,35 ± 0,555 <i>b</i>	0,182 ± 0,005 <i>a</i>	0,095 ± 0,037 <i>b</i>
Konini	22,74 ± 1,714 <i>a</i>	24,28 ± 2,712 <i>a</i>	1,205 ± 0,124 <i>a</i>	0,191 ± 0,049 <i>b</i>
ANK 28-A	25,31 ± 8,250 <i>a</i>	22,45 ± 0,740 <i>a</i>	0,719 ± 0,052 <i>a</i>	0,193 ± 0,061 <i>b</i>
RU 687-12	54,14 ± 5,564 <i>a</i>	28,44 ± 1,994 <i>b</i>	2,806 ± 0,563 <i>a</i>	0,413 ± 0,018 <i>b</i>
Skorpion	63,01 ± 1,705 <i>a</i>	27,23 ± 0,700 <i>b</i>	42,04 ± 3,891 <i>a</i>	1,375 ± 0,227 <i>b</i>
UC 66049	102,7 ± 2,400 <i>a</i>	27,79 ± 0,251 <i>b</i>	65,12 ± 3,784 <i>a</i>	1,331 ± 0,439 <i>b</i>
AF Zora	97,73 ± 1,525 <i>a</i>	33,50 ± 1,979 <i>b</i>	52,16 ± 0,807 <i>a</i>	1,643 ± 0,192 <i>b</i>

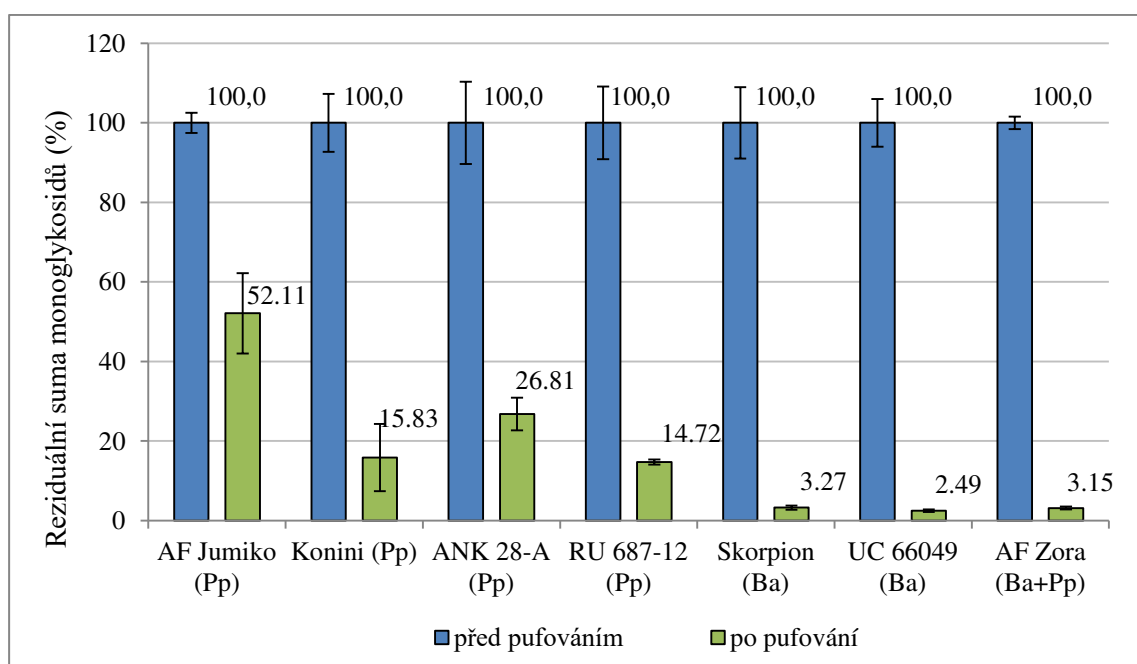
odlišná písmena určují statisticky významný rozdíl ve dvojicích hodnot (před a po pufování) odděleně pro jednotlivé odrůdy a analytické metody

**Graf 8** Změna obsahu anthokyanů při pufování (% původního obsahu anthokyanů)

A) všech extrahovatelných anthokyanů (měřeno spektrofotometricky)



B) všech sledovaných monoglykosidů (měřeno UHPLC-MS metodou)



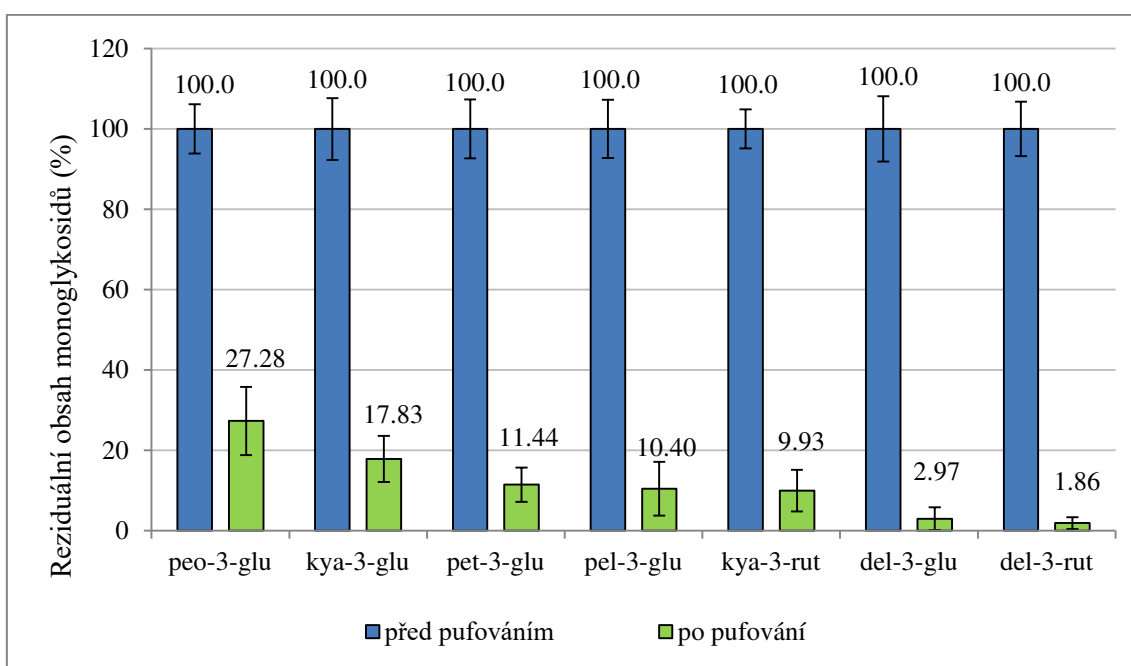
Efekt pufování zrna na obsah celkových anthokyanů (viz Graf 8A) byl u jednotlivých genotypů odlišný. U obou modrých a jednoho černého genotypu došlo shodně k úbytku anthokyanů. Největší degradace celkových anthokyanů byla zaznamenána u genotypu UC 66049, téměř 72,9 %. Oproti tomu vliv pufování na zrna purpurových odrůd vykazoval velké mezigenotypové rozdíly. Jediným purpurovým genotypem, u něhož došlo



ke statisticky významné degradaci, byl RU 687-12, úbytek anthokyanů zde činil 47,5 %. Mnohem mírnější úbytek byl zaznamenán ještě u genotypu ANK 28-A (11,3 %), tato degradace však nedosáhla statisticky významné hranice. Naopak u odrůd Konini a AF Jumiko byl oproti ostatním genotypům zaznamenán nárůst obsahu anthokyanů, který byl signifikantní zejména v případě odrůdy AF Jumiko a dosáhl více než 1,5násobku původní hodnoty. Z hlediska absolutních hodnot dosahovala nejvyššího obsahu celkových anthokyanů po pufování černá pšenice AF Zora, která po zpracování obsahovala 33,50 mg/kg anthokyanů. U zbylých genotypů byl pozorován stejný trend jako v případě pečení a extruze – přestože degradace u purpurových genotypů pšenice byla celkově nižší, vyšší reziduální obsahy anthokyanů stále obsahovaly modré pšenice.

Sledování úbytku jednotlivých monoglykosidů prokázalo oproti změnám celkových anthokyanů jednoznačný trend. U všech genotypů došlo vlivem pufování k výraznému poklesu hladin monoglykosidů. Lepších výsledků v tomto ohledu dosáhly opět purpurové pšenice, u nichž byla zaznamenána významná variabilita v úbytku monoglykosidů, od 47,9 % do 85,3 %. Oproti tomu obě modré pšenice, stejně jako odrůda černé pšenice, vykazaly velmi podobný pokles průměrně o 97,0 %. Z rozdílů mezi výsledky celkových anthokyanů a jednotlivých monoglykosidů je zřejmé, že jednoduché monoglykosidy jsou při pufování mnohem labilnější než složitější formy anthokyanů. Rozdíl v úbytku sumy monoglykosidů v porovnání purpurových a modrých genotypů pšenice lze vysvětlit různou mírou lability jednotlivých monoglykosidů, jak je uvedeno v Grafu 9.

**Graf 9** Procentuální degradace jednotlivých monoglykosidů



Z výsledků je patrné, že pufování lépe odolávají peonidin-3-glukosid a kyanidin-3-glukosid, které tvoří hlavní analyty anthokyanového spektra purpurových pšenic. Naopak anthokyany typické pro modré resp. černou pšenici – glykosidy delfinidinu – vykázaly v důsledku pufování téměř absolutní degradaci. Konkrétní míra degradace pro jednotlivé monoglykosidy v tomto experimentu byla: peonidin-3-glukosid (72,7 %) < kyanidin-3-glukosid (82,2 %) < petunidin-3-glukosid (88,6 %) < pelargonidin-3-glukosid (89,6 %) < kyanidin-3-rutinosid (90,1 %) < delfinidin-3-glukosid (97,0 %) < delfinidin-3-rutinosid (98,1 %). V porovnání těchto výsledků se stabilitou jednotlivých monoglykosidů při dalších tepelných úpravách sledovaných v této práci byl při pufování sledován jednoznačně nejvýznamnější úbytek jednotlivých monoglykosidů. Byl zde však pozorován stejný trend týkající se glykosidů majoritních aglykonů – stabilita postupně klesala v pořadí peonidin > kyanidin > delfinidin.

Pro porovnání výsledků pufování s odbornou literaturou byl nalezen pouze jeden článek týkající se pufování obilovin, konkrétně rýže (Pal et al. 2019). Pro uvedený experiment byly použity odrůdy tzv. černé rýže a pufování zrn bylo provedeno při teplotě 220 °C po dobu 15 – 20 s. U všech použitých odrůd byl zaznamenán významný úbytek anthokyanů, který představoval degradaci 46 – 96 % obsahu celkových anthokyanů (průměrně 79 %). Podobné míry degradace uvedli i další autoři sledující změny anthokyanů vlivem pufování v bobulových plodech. Si et al. (2016) při zpracování malin pufováním při 97 °C uvedli ztrátu 47 % anthokyanů ve výsledném produktu. Oproti tomu Chen et al. (2017) použili při pufování plodů moruše nižší teplotu (80 °C), ovšem ztráta anthokyanů byla v tomto případě vyšší, 62 %. Všechny uvedené práce shodně popsaly jednoznačný úbytek celkových anthokyanů vlivem pufování bez ohledu na zkoumaný materiál. Podobné míry degradace (do 73 %) byly zaznamenány i v experimentu v rámci této práce, ale pouze v případě některých genotypů, zejména u druhů s modrým a černým zrnem. Naopak nárůst celkových anthokyanů vlivem pufování tak, jak byl popsán v této práci, nebyl zaznamenán v žádném z dohledaných odborných zdrojů. Je však třeba upozornit na celou řadu odlišností v designu jednotlivých experimentů (použitá surovina, doba a teplota pufování) a na celkově velmi malý počet relevantních odborných zdrojů. Nicméně lze v tomto případě poukázat na fakt, že i v případě extruze, která je povahou zpracování podobná procesu pufování, byl zaznamenán nárůst obsahu celkových anthokyanů vlivem zpracování (Escalante-Aburto et al. 2013). Je tudíž pravděpodobné, že i v případě pufování může hrát roli lepší extraktibilita složitých forem anthokyanů z perikarpu vlivem praskání buněčných stěn (Brennan et al. 2011; Sommer & Cohen

2018). Vzhledem k faktu, že nárůst obsahu celkových anthokyanů v uvedených odrůdách byl doprovázen výrazným úbytkem monoglykosidů, lze polemizovat o tom, zda v tomto případě nemůže hrát roli také proces tvorby složitějších anthokyanových komplexů či vznik barevně intenzivnějších forem anthokyanů, jak bylo popsáno např. v případě polymerace a kopigmentace (Eiro a Heinonen 2002). Pro podporu tohoto dohadu se však nepodařilo dohledat žádnou odbornou literaturu. Pro bližší diskuzi výsledků tohoto experimentu by bylo zapotřebí více zdrojů zkoumajících pufování s odpovídajícími parametry pokusu a se stejnou vstupní surovinou, žádný takový zdroj se však v odborných databázích nepodařilo nalézt.

Degradaci jednotlivých monoglykosidů vlivem pufování zkoumali ve svém experimentu pouze Chen et al. (2017). Při pufování plodů moruše zaznamenali autoři u majoritního kyanidin-3-glukosidu úbytek 63 %, zatímco minoritní kyanidin-3-rutinosid s úbytkem 58 % byl mírně stabilnější. Ani tyto výsledky nejsou v dobré shodě s pozorováním v této práci, kdy byl při pufování genotypů pšenice popsán opačný trend, neboť kyanidin-3-glukosid vykazoval vyšší stabilitu než kyanidin-3-rutinosid. Také míry degradace, které autoři u obou analytů zaznamenali (63 a 58 %), byly výrazně nižší, než bylo pozorováno v případě pšenice v této práci (82,2 a 90,1 %). Tento rozdíl mohl být způsoben odlišností suroviny (pšenice vs. bobulové ovoce), nižší teplotou pufování nebo jinými odlišnostmi v technologickém procesu (např. jiná míra vlhkosti).

Vzhledem k celkově nízké stabilitě anthokyanů lze očekávat, že míra degradace celkových anthokyanů bude významně záviset na technologických parametrech procesu zpracování. Relevantní literární zdroje uvedené výše se diskuzi této problematiky bohužel nevěnují, ale vzhledem k vzájemné podobnosti se lze domnívat, že kritické parametry degradace anthokyanů budou podobné jako v případě extruze – teplota procesu, doba působení teploty a vlhkost suroviny (Hirth et al. 2015; Escalante-Aburto et al. 2013; Camacho-Hernández et al. 2014). Také Mu et al. (2013) se domnívají, že příliš vysoká teplota v kombinaci s dlouhou dobou trvání procesu může vést k nadměrné degradaci anthokyanů. Výsledky jejich studie s pufováním produktu z malin za použití mikrovlnného ohřevu napovídají, že k dosažení nejlepší retence anthokyanů musí být teplota zpracování nepřímo úměrná době působení. Nejvyšších reziduálních hodnot celkových anthokyanů tudíž dosahovaly produkty, u nichž se doba pufování úměrně s rostoucí teplotou zkracovala. Kromě těchto dvou parametrů sledovali autoři tohoto experimentu také vliv vlhkosti zpracovávané suroviny a stanovili jako vhodnou úroveň vlhkosti výchozí suroviny 17 %, zatímco při vlhkosti okolo 20 % zaznamenali vyšší degradaci anthokyanů.

Z hlediska reziduálního obsahu celkových anthokyanů poskytly výsledky pufování v této práci nejednoznačné výsledky. Zatímco u modrých genotypů a černé odrůdy pšenice dosáhla míra degradace anthokyanů až 73 %, u odrůd AF Jumiko a Konini byl pozorován nárůst obsahu celkových anthokyanů. Vzhledem k faktu, že optimalizace parametrů pufování nebyla předmětem této práce, lze polemizovat o tom, zda by jiné nastavení parametrů procesu v tomto experimentu vedlo k lepší retenci anthokyanů u pšenice s modrým a černým zrnem. Při porovnání s výsledky autorů Mu et al. (2013) se zdá pravděpodobné, že míra vlhkosti vstupního materiálu v této práci (17,5 %) byla pro účel zpracování zvolena vhodně. Bez další optimalizace však nelze jednoznačně soudit, zda byla vhodně zvolena kombinace teploty a doby zpracování (270 – 280 °C, 6 s). V porovnání s ostatními relevantními zdroji je patrné, že teplota použitá v tomto experimentu byla výrazně vyšší než v pokusech jiných autorů, na druhou stranu tomu úměrně odpovídala velmi krátká doba zpracování (6 s). Právě kombinace vysoké teploty a krátké doby zpracování je klíčová pro dobrou retenci anthokyanů, jak popsali Mu et al. (2013). Z výsledků je však zřejmé, že zejména s ohledem na modré genotypy pšenice by bylo zapotřebí další optimalizace parametrů pufování.

#### **4.4.5. Souhrnné výsledky zpracování**

Tato disertační práce se věnovala získávání nových poznatků o genotypech pšenice s barevným zrnem v návaznosti na možnosti jejich spotřebitelského využití. Na rozdíl od jiných komodit bohatých na anthokyaniny, jako je ovoce a zelenina, vyžadují obiloviny před konzumací tepelnou úpravu. V jakékoliv otázce využitelnosti obilovin jakožto potraviny, musí být zohledněn vliv tepelné úpravy. Z tohoto důvodu ověřovala tato práce možnosti využití různých typů tepelných úprav – konkrétně pečení, vaření, extruze a pufování. Cílem těchto experimentů bylo zjistit, jak destruktivní či šetrné jsou dané metody zpracování s ohledem na obsah anthokyanů, a posoudit jejich vhodnost pro tento účel.

Nejšetrnější metodou zpracování bylo jednoznačně vaření. Na rozdíl od ostatních tepelných úprav zde byl zaznamenán relativně nejmenší úbytek celkových anthokyanů – 18,0 a 28,7 % u dvou sledovaných odrůd – zatímco u ostatních genotypů buď ke statisticky významnému úbytku anthokyanů nedošlo, nebo bylo dokonce zaznamenáno zvýšení jejich celkového obsahu – tento neobvyklý výsledek byl při vaření pozorován dokonce ve 3 ze 7 zkoušených genotypů. Velmi uspokojivých výsledků s nadprůměrnou retencí anthokyanů dosáhlo také pečení, kdy byla pozorována degradace nejvýše 24,5 % celkových anthokyanů. Oproti tomu v případě extruze docházelo k úbytku až 42,2 % celkových

anthokyanů a jednoznačně nejhorší výsledky byly zaznamenány v případě pufování, kde maximální ztráta celkových anthokyanů dosáhla 82,9 %.

Celkově byly výraznější úbytky anthokyanů pozorovány u modrých genotypů pšenice, kde téměř ve všech případech byla míra degradace signifikantně vyšší než u purpurových genotypů. Lepší retence anthokyanů v purpurových genotypech je podmíněna odlišným uložením analytů v zrně. Strukturní složky perikarpu, v němž jsou typicky umístěny anthokyaniny purpurových genotypů, poskytují analytům vyšší ochranu před ztrátou vlivem působící teploty, než je tomu u barviv uložených v aleuronové vrstvě (modré genotypy). Avšak zcela opačný efekt byl pozorován u vaření, kdy naopak vyšším ztrátám anthokyanů podléhaly genotypy purpurové. Lokalizace anthokyanů v perikarpu byla v tomto konkrétním případě nevýhodou, neboť přítomnost tekutiny jako teplotonosného média výrazně zvýšila nejen přímou destrukci jednotlivých analytů, ale také jejich výluh z povrchové vrstvy zrna. Naopak aleuronová vrstva byla v případě vaření mechanicky chráněna okolním perikarpem před kontaktem s tekutinou, čímž se retence anthokyanů modrých genotypů výrazně zlepšila. Tyto výsledky poukazují na fakt, že degradace anthokyanů má zcela jiný charakter při použití suchého či vlhkého tepla. Ve všech případech byly vyšší absolutní obsahy anthokyanů po tepelné úpravě zaznamenány u genotypů s modrým zrnem, které i přes vyšší míru degradace po zpracování stále obsahovaly větší množství analytů. Stejný efekt byl zaznamenán i u jediné odrůdy černé pšenice (AF Zora), která byla zařazena do experimentu s pufováním – stejně jako u modrých pšenic i u tohoto vzorku byl přes vyšší míru degradace pozorován vysoký obsah zachovaných anthokyanů.

Při sledování anthokyanů ve formě sumy monoglykosidů bylo možné jednoznačně konstatovat, že jednoduché formy anthokyanů glykosylované jednou sacharidovou jednotkou jsou významně méně stabilní než složité formy anthokyanů. Téměř u všech tepelných úprav byl totiž pozorován trend, kdy monoglykosidy vlivem tepelné úpravy ubývaly mnohem výrazněji než celkové anthokyaniny. Zároveň byla napříč experimenty pozorována odlišná stabilita jednotlivých monoglykosidů, která si ve všech případech zachovávala stejný charakter – nejstabilnějším analytem byl peonidin-3-glukosid a kyanidin-3-glukosid, zatímco nejméně stabilními byly ve všech případech delfinidin-3-rutinosid a delfinidin-3-glukosid.

U všech tepelných úprav byl pozorován efekt zlepšení extraktibility anthokyanů po tepelném zpracování. Nejvýraznější byl tento efekt v případě vaření, kde docházelo vlivem působení tepla i ke značným nárůstům obsahu anthokyanů. V menší míře se tento efekt

projevil při pufování a extruzi a u pečení byl jeho podíl sice patrný, ale nevýznamný. Jak je uvedeno v příslušných kapitolách, tento efekt zvýšené extraktibility může být důsledkem uvolňování anthokyanů vázaných na složky buněčných stěn, popř. jejich uvolňování do prostoru vlivem praskání buněčných struktur, nebo i uvolňováním jednodušších analytů ze složitějších anthokyanových forem.

Výzkum vlivu jednotlivých tepelných úprav na jednu stranu poukázal na obecnou nestabilitu anthokyanů při zpracování zrna, ale na druhou stranu prokázal, že pšeničné zrno může i po zpracování stále obsahovat významná množství anthokyanů. Zatímco některé tepelné úpravy se jeví jako vyloženě vhodné (vaření, pečení), u jiných (extruze, pufování) byl negativní vliv na obsah anthokyanů zřetelnější. Ani tyto úpravy však nelze ztracovat, protože mohou být přínosné zejména z důvodu rozšíření portfolia produktů z pšenice s barevným zrnem. Dalším krokem by proto měla být optimalizace parametrů výrobních procesů tak, aby mohla být ztráta anthokyanů minimalizována. Obecně lze pro výrobu produktů z pšenice s barevným zrnem doporučit zejména genotypy s vysokým obsahem anthokyanů, u nichž bude i přes případný úbytek po zpracování přítomno stále významné množství anthokyanů. Do této kategorie spadají prakticky všechny genotypy s modrým a černým zrnem, ale i ve skupině purpurových pšenic lze najít dost zástupců, kteří budou tuto podmínku bez obtíží splňovat. Pšenice s barevným zrnem tudíž v tomto ohledu mají velký potenciál pro spotřebitelské využití a vedle tradičních komodit s obsahem anthokyanů (ovoce a zelenina) tak mohou představovat další typ potravin bohaté na nutričně významné látky.

## 5. ZHODNOCENÍ CÍLŮ A HYPOTÉZ PRÁCE

Cíle této disertační práce byly zaměřeny na zlepšení a doplnění poznatků o genotypech pšenice seté s obsahem anthokyanů v zrně. Za použití analytických metod byly identifikovány a kvantifikovány obsažené anthokyaniny a dalšími pokusy byla ověřována vhodnost pšenice s barevným zrnem pro zpracování a potravinářské využití. Bylo stanoveno celkem 5 cílů práce s příslušnými hypotézami, které byly ověřovány dílčími experimenty.

**1. cíl práce:** Vývoj, optimalizace a validace analytické UHPLC-MS metody pro stanovení anthokyanů v barevných genotypech pšenice.

**1. hypotéza:** Vyvinutá UHPLC-MS metoda bude vhodná pro analýzu anthokyanů obsažených v obilkách barevných genotypů pšenice.

V rámci práce byla vyvinuta funkční analytická UHPLC-MS metoda umožňující identifikaci jednotlivých anthokyanů obsažených v zrně pšenice. Vhodnost metody pro účely této práce byla ověřena zhodnocením validačních parametrů, které byly ve všech ohledech uspokojivé. Zejména nízké limity detekce a kvantifikace umožnily použití této metody při analýze i stopových množství anthokyanů. Nevýhodou metody byla především větší časová náročnost pracovního postupu, tuto nevýhodu však dostatečně vyvážily cenné informace získané jejím použitím. Pro doplnění výsledků byla souběžně s UHPLC-MS metodou používána i méně specifická, ale zároveň jednodušší kvantifikace anthokyanů spektrofotometrickou analýzou. Tato metoda je vhodná pro rutinní analýzu velkého množství vzorků a poskytuje přesné údaje o souhrnném obsahu anthokyanů, je ovšem limitována vyšší mezí detekce a kvantifikace a neumožňuje ani detailní identifikaci jednotlivých anthokyanů. Vysoká míra korelace mezi výsledky obou metod ( $r = 0,9198$ ) poukázala na možnost jejich souběžného použití a vyjádření anthokyanů ve dvou doplňujících se hodnotách: jako suma jednotlivých monoglykosidů anthokyanů (stanovena UHPLC-MS) a jako celková suma anthokyanů (stanovena spektrofotometricky).

**První cíl práce byl splněn a související hypotéza byla potvrzena,** vhodnost využití UHPLC-MS metody byla ověřena její validací.

**2. cíl práce:** Zmapování obsahu a kompozice anthokyanů v širokém spektru barevných genotypů pšenice.

**2. hypotéza:** Kompozice anthokyanového spektra jednotlivých barevných typů pšenice bude odlišná.

Anthokyanany pšenice s barevným zrnem byly identifikovány a kvantifikovány pomocí UHPLC-MS metody. Anthokyanové spektrum s podrobnou kvantifikací jednotlivých analytů a stanovení obsahu celkových anthokyanů bylo provedeno u celkem 30 genotypů pšenice s různým zbarvením zrna. Tyto barevné genotypy zastupovaly pšenice s purpurovým perikarpem (Pp), pšenice s modrým aleuronem (Ba) a tzv. černé pšenice s kombinací purpurového perikarpu a modrého aleuronu (Ba+Pp). Výsledky prokázaly výrazné rozdíly v obsahu anthokyanů jak z hlediska kvalitativního, tak kvantitativního. I přes vysokou mezigenotypovou variabilitu v obsahu anthokyanů bylo zjištěno, že purpurové pšenice mají obecně nejnižší obsahy anthokyanů, zatímco modré pšenice obsahují nejvyšší sumy anthokyanů. Pšenice černé, které jsou genetickými kříženci dvou předešlých typů, vykazovaly střední hodnoty obsahu anthokyanů. Celkem bylo v barevném pšeničném zrně identifikováno 8 různých anthokyanů (resp. monoglykosidů). Pro každý barevný typ bylo popsáno charakteristické anthokyanové spektrum, které se mezi jednotlivými barevnými typy významně lišilo, ovšem z rámce daného zbarvení vykazovalo pouze minimální rozdíly. Spektrum purpurových pšenic bylo relativně chudé, standardně bylo tvořeno pouze dvěma anthokyanami s občasným výskytem 3 dalších anthokyanů, zatímco modré pšenice měly anthokyanové spektrum ve všech případech tvořeno minimálně 5 anthokyanami. Nejbohatší bylo anthokyanové spektrum černých pšenic, které vykazovalo kombinaci Pp a Ba spektra a bylo tvořeno vždy 6 monoglykosidy.

**Druhý cíl práce byl splněn a související hypotéza byla potvrzena.** Pomocí identifikace jednotlivých anthokyanů UHPLC-MS metodou byly ověřeny významné rozdíly ve skladbě anthokyanového spektra u jednotlivých barevných typů pšenice.

**3. cíl práce:** Stanovení mezigenotypových a popř. i meziročníkových rozdílů v obsahu anthokyanů.

**3. hypotéza:** Obilky barevných genotypů pšenice budou vykazovat kvalitativní i kvantitativní mezigenotypové a meziročníkové rozdíly v obsahu anthokyanů.

Po charakterizaci anthokyanového spektra všech 30 genotypů pšenice s barevným zrnem byly obsahy anthokyanů kvantifikovány nezávisle UHPLC-MS metodou a spektrofotometrickou metodou. Výsledky obou metod prokázaly vysokou mezigenotypovou variabilitu v obsahu anthokyanů, která se mezi jednotlivými vzorky lišila i několikanásobně. Tyto rozdíly byly statisticky významné a genotyp byl vyhodnocen jako nejvýznamnější parametr variability anthokyanů v pšeničném zrně. Statisticky



prokazatelný efekt genotypu byl ověřen i v samostatném experimentu, v němž byl zároveň potvrzen i statisticky významný vliv ročníku a též vliv interakce genotyp × ročník na obsah anthokyanů v pšeničném zru.

**Třetí cíl práce byl splněn a související hypotéza byla potvrzena.** Mezigenotypové rozdíly byly pozorovány ve výsledcích jak UHPLC-MS analýzy, tak ve výsledcích stanovených spektrofotometricky. Genotyp a ročník se ukázaly jako významné parametry ovlivňující obsah anthokyanů v pšeničném zru.

**4. cíl práce:** Stanovení antioxidační aktivity jednotlivých genotypů.

**4. hypotéza:** Antioxidační aktivita jednotlivých genotypů a barevných typů pšenice se bude lišit.

Míra antioxidační aktivity pšenice s barevným zrnem byla hodnocena pomocí metody s redukcí radikálu DPPH. I přes určité limity metody byl posouzen vliv přítomnosti anthokyanů na antioxidační aktivitu pšenice s barevným zrnem. Přestože celková míra antioxidační aktivity byla z větší části ovlivněna přítomností jiných látek než anthokyanů, i obsah těchto barviv se na hodnotě antioxidační aktivity projevil příznivě. V tomto dílčím experimentu byly porovnávány výsledky jednotlivých barevných genotypů s výsledky genotypů bez obsahu anthokyanů. Barevné typy obsahující anthokyaniny (Pp, Ba a Ba+Pp) dosahovaly signifikantně vyšších hodnot antioxidační aktivity než ostatní typy pšenice (bílý, červený a žlutý). I přestože nebyl mezi jednotlivými genotypy s obsahem anthokyanů stanoven žádný mezigenotypový statisticky významný rozdíl, byl ve výsledcích pozorován trend mírného navyšování antioxidační aktivity s nárůstem průměrného množství anthokyanů v řadě Pp < Ba+Pp < Ba. Tento trend byl potvrzen i zjištěnou (i když ne příliš silnou) korelací mezi hodnotou antioxidační aktivity a obsahem anthokyanů ( $r = 0,4749$ ). Na druhou stranu významné mezigenotypové rozdíly v rámci jednotlivých barevných typů nebyly až na výjimky pozorovány.

**Čtvrtý cíl práce byl splněn a související hypotéza byla částečně potvrzena.** Výsledky prokázaly souvislost anthokyanů s antioxidační aktivitou pšenice s barevným zrnem, přičemž genotypy obsahující anthokyaniny měly významně vyšší antioxidační aktivitu než genotypy bez obsahu anthokyanů. Nebyly však prokázány statisticky významné rozdíly mezi genotypy v rámci jednotlivých barevných typů.

**5. cíl práce:** Sledování změn v obsahu anthokyanů v jednotlivých genotypech během skladování a zpracování.

**5. hypotéza:** Obsah anthokyanů barevných genotypů pšenice bude ovlivněn skladováním a zpracováním.

Změny anthokyanů vlivem skladování a zpracování představovaly klíčovou část výzkumu charakterizujícího možnosti využití barevných pšenic jako spotřební komodity. Pokusy prokázaly, že k významným změnám anthokyanů dochází již během skladování. V prvních třech měsících obsah celkových anthokyanů prokazatelně klesá a dále během jednoho roku skladování fluktuuje. V průběhu této doby lze pozorovat i dočasný nárůst relativního obsahu anthokyanů, který je v období po 12. měsíci skladování následován opětovným poklesem analytů. Celkově byl pozorován úbytek obsahu anthokyanů, který nepřevýšil 30 % u modrých genotypů a 50 % u purpurových genotypů. Skladování představuje důležitý krok v celém procesu využití zrna a nelze jej eliminovat. Poznatky o úbytku anthokyanů v této fázi jsou tedy důležité pro výběr vhodného genotypu tak, aby v důsledku skladování nedošlo k natolik výrazné degradaci, že by daná obilovina po skladování jako významný zdroj anthokyanů již nebyla použitelná. Jako vhodné se v tomto ohledu jeví genotypy s vysokým obsahem anthokyanů, u nichž lze očekávat retenci dostatečného množství barviv, a zároveň genotypy modré, jejichž anthokyany při skladování degradují méně než u purpurových typů. S dalším úbytkem anthokyanů je nezbytné počítat i při následném tepelném zpracování. V experimentech byly dopodrobna rozebrány efekty jednotlivých tepelných úprav a jejich příspěvek k celkové degradaci anthokyanů obsažených v zrnu. Jako šetrné metody zpracování byly vyhodnoceny vaření a pečení, kde byl zaznamenaný úbytek anthokyanů výrazně nižší (degradace 28,7 a 24,5 % anthokyanů) než v případě extruze a pufování (degradace 42,2 a 82,9 % anthokyanů). Pro tyto tepelné úpravy lze před dalším použitím doporučit optimalizaci, díky které by bylo možné retenci anthokyanů zlepšit. Jak skladovací pokus, tak experimenty s tepelnými úpravami poukázaly na vhodnost výběru genotypů s vysokým obsahem anthokyanů, které budou i přes nevyhnutelné degradace po zpracování stále hodnotným zdrojem anthokyanů.

**Pátý cíl práce byl splněn a související hypotéza byla potvrzena.** Výsledky prokázaly významný vliv skladování a tepelné úpravy na obsahy anthokyanů, čímž byla potvrzena obecně známá nestabilita anthokyanů vlivem působení vnějších faktorů. I přes tyto negativní vlivy však obsahy anthokyanů v některých genotypech byly stále významné.

## 6. ZÁVĚR A DOPORUČENÍ PRO PRAXI

Disertační práce byla věnována výzkumu genotypů pšeníc s obsahem anthokyanů a možnostem jejich využití v praxi. V rámci jednotlivých experimentů bylo prostudováno celkem 30 genotypů pšeníc s purpurovým, modrým nebo černým zrnem. U všech genotypů byla potvrzena přítomnost rostlinných barviv – anthokyanů, které představují přírodní bioaktivní látky s antioxidačním účinkem a s příznivým efektem na lidské zdraví. Trendem současného vývoje v oblasti potravinářství (či medicíny) je zavádění přirozených zdrojů těchto prospěšných látek do lidské stravy. Genotypy pšeníc s barevným zrnem v současné době nejsou běžnou veřejně dostupnou komoditou a nachází zatím spíše okrajové využití v produkci speciálních potravin. Cílem výzkumu v této práci bylo posoudit potenciál těchto genotypů s obsahem anthokyanů pro běžnou potravinářskou produkci.

Při zvažování potenciálu konkrétní odrůdy nebo linie je nezbytné posoudit řadu parametrů a faktorů, které mají vliv na jakostní i jiné kvalitativní charakteristiky pšeničného zrna. V případě anthokyanů je důležitým parametrem zejména genotyp, který významně ovlivňuje syntézu a výsledný obsah anthokyanů v zrně. Obecně vysokými obsahy anthokyanů v této práci vynikaly zejména modré a černé genotypy, ale i v oblasti purpurových pšeníc byly evidovány genotypy s konstantně vysokými obsahy anthokyanů. Mezi purpurové genotypy s vysokými obsahy anthokyanů se řadí např. odrůdy Purple a PS Karkulka a šlechtitelská linie RU 687-12. U modrých genotypů byly v tomto ohledu nejlepší výsledky konstantně pozorovány u šlechtitelských linií V1 131-15 a Va 133-15 a u genetického zdroje EF 02-54/9. Z černých genotypů byly vysoké obsahy zaznamenány zejména u odrůdy AF Zora a u šlechtitelských linií V1-118-17 a V2-15a-17. Nevhodně zvolený genotyp s přirozeně nízkou produkcí anthokyanů přitom nemusí přinést požadovaný nutriční benefit.

Vedle genotypu je produkce anthokyanů významně ovlivněna také ročníkem. Meziročníkové rozdíly jsou dány především rozdíly v ročních úhrnech srážek, průměrné teplotě a intenzitě světla. Přestože efekt ročníku není ovlivnitelným parametrem, je vhodné ho brát v potaz. Z hlediska velkoprodukce může být zvláště výhodné použití odrůd s relativně stabilním meziročníkovým obsahem anthokyanů, u nichž je pravděpodobně vliv ročníku nízký. Vedle neovlivnitelných parametrů je obsah anthokyanů podmíněn také ovlivnitelnými parametry, mezi které odborná literatura řadí například vliv lokality, hnojení či doby sklizně. Tyto faktory nebyly v rámci práce ověřovány. Naopak vliv ekologického vůči konvenčnímu způsobu produkce na míru syntézy anthokyanů vliv

neměl. Z výše uvedeného vyplývá, že rozhodujícím parametrem pro výběr vhodného genotypu může být zejména vysoký obsah anthokyanů. Z hlediska nutričního benefitu totiž hraje roli pouze celkové množství anthokyanů bez ohledu na jejich přesnou skladbu. Neboť přestože se jednotlivé monoglykosidy anthokyanů ve svém antioxidačním potenciálu mírně liší, z hlediska obsahu anthokyanů v pšenících se jedná o nevýznamný rozdíl. Při výběru genotypu se tedy může jednat o libovolný barevný typ, neboť z hlediska potenciálního antioxidačního účinku je rozhodující výhradně kvantita anthokyanů.

Dalším experimentem bylo ověřeno, že v důsledku skladování pšeničného zrna obsah anthokyanů přirozeně klesá. Vývoj obsahu celkových anthokyanů sledoval ve všech experimentálních odrůdách zhruba stejný trend, kdy došlo k výraznému poklesu obsahu anthokyanů v prvních 3 měsících. Následovalo období, v němž nebyl prokázán úbytek celkových anthokyanů, avšak v 15. měsíci sledování došlo k opětovnému poklesu obsahu anthokyanů na hodnotu zhruba odpovídající jejich množství ve třetím měsíci. Z těchto výsledků je patrné, že posklizňové dozrávání je také významným parametrem ovlivňujícím obsah anthokyanů. V praxi se pšeničné zrna začíná používat zhruba od třetího měsíce po sklizni dále. V tomto okamžiku je však obsah anthokyanů v pšenici nejnižší, a lze v tomto ohledu tudíž doporučit, aby bylo zpracování takové pšenice odloženo ideálně do období od 5. do 12. měsíce po sklizni, kdy se obsah celkových anthokyanů opět zvyšuje. I v tomto bodě platí již dříve uvedená skutečnost, že výhodné může být použití těch odrůd, které mají vysoký počáteční obsah anthokyanů a i po degradaci vlivem skladování si zachovávají dostatečná množství barviv.

Klíčovou fází experimentů bylo ověření vlivu různých tepelných úprav na obsah anthokyanů. Jak již bylo řečeno, vzhledem k praktickému potravinářskému využití nelze tuto fázi opomenout, neboť tepelně neupravené obiloviny není možné v běžné spotřebitelské praxi využít. Zároveň se jedná o kritickou fázi významně limitující využití jakéhokoliv rostlinného materiálu v obsahem anthokyanů, neboť tato barviva mají obecně nízkou stabilitu při působení vysokých teplot. Cílem tedy bylo zjistit, zda nezbytná tepelná úprava pšenice a s ní nevyhnutelně spojená degradace anthokyanů zcela neznemožňuje využití barevných typů pšenice v praxi. Výsledky nicméně přinesly poměrně pozitivní výstupy, neboť se ukázalo, že v rámci jednotlivých tepelných úprav (pečení, vaření, extruze a pufování) k úbytku anthokyanů sice prokazatelně dochází, ale zdaleka ne natolik, aby tím bylo využití pšenic znemožněno. Nicméně i v této fázi využití zrna barevných pšeníc platí, že vyšší obsah anthokyanů v daném genotypu je v důsledku degradace anthokyanů jednoznačně výhodou. Překvapivě nízká míra degradace byla zaznamenána u

pečení, kde bylo po zpracování zachováno 75,5 % obsažených anthokyanů. Ještě lepší výsledky přinesl experiment s vařením pšenice, kde byl pozorován nejen na jedné straně relativně mírný úbytek anthokyanů (nepřesahující 28,7 %), ale na druhé straně i zvýšení obsahu anthokyanů vlivem působícího tepla. Naopak významnější pokles byl zaznamenán v případě extruze (retence anthokyanů se pohybovala na 57,8 %) a zejména v případě pufování, u něž byla prokázána největší míra destrukce obsažených anthokyanů, který bylo po zpracování zachováno pouze 17,1 %. V tomto ohledu lze tedy pro tepelné zpracování pšenice jednoznačně doporučit pečení a vaření. Ovšem v případě pečení mohou být jednotlivé genotypy barevných pšenic významně limitovány jinými kvalitativními charakteristikami. Zejména pro pekárenské využití musí vybrané odrůdy splňovat řadu přísných jakostních kritérií, aby bylo jejich využití vůbec možné. Je tedy otázkou, pro jakou skupinu pekárenských výrobků budou dané genotypy využitelné. Na druhou stranu je možné tyto odrůdy doporučit např. pro pečivárenské zpracování, kde zpravidla nejsou jakostní kritéria tak přísná. V tomto ohledu může být mnohem výhodnější využití barevných pšenic na vaření, kde problém s jakostními parametry z velké míry odpadá. Pro vaření mohou být vhodné prakticky jakékoliv genotypy barevných pšenic, i když drobným limitem může být odlišná bobtnavost jednotlivých genotypů, která se může nepříznivě projevit na zvýšené degradaci anthokyanů. Jak ovšem bylo patrné z výsledků, byť bobtnavost určitý efekt má, tento vliv není pravděpodobně nijak dramatický. Jediným limitujícím parametrem u tohoto využití tak může být rozdílná sensorická jakost, jejíž hodnocení však nebylo součástí této práce. V tomto případě však praktické využití samozřejmě naráží na jinou překážku – totiž že vařené pšeničné zrně není v běžné spotřebitelské praxi nijak využíváno. Přitom by se mohlo jednat o zajímavou alternativu přílohových potravin, neboť může plnit podobný účel jako rýže, bulgur, kroupy nebo jáhly. Nicméně nebylo by správné vyloučit z praxe ani dvě poslední tepelné úpravy – extruzi a pufování. Po optimalizaci parametrů výrobních procesů, která by zlepšila retenci anthokyanů, by oba způsoby úpravy mohly do potravinářského portfolia přispět dalšími zajímavými produkty. Paleta možných výrobků z pšenic s barevným zrnem tak může být velmi široká – od klasického pečiva přes pečivárenské výrobky (tyčinky, sušenky, suchary apod.), k extrudovaným výrobkům (křupky, lupínky a jiné snídaňové cereálie), pufovaným chlebičkům či burizonům a v neposlední řadě i k využití vařené pšenice ve formě přílohy.

Ve shrnutí lze genotypy pšenic s barevným zrnem jednoznačně doporučit pro komerční využití. Větší potenciál mají zejména genotypy s vysokým obsahem anthokyanů, u nichž lze garantovat, že i v případě nepříznivých podmínek pěstování budou mít po

skladování a zpracování dostatečně vysoký obsah nutričně prospěšných anthokyanů. Zavedení takových výrobků nejen do povědomí spotřebitelů, ale i do běžné potravinářské praxe by tak mělo být cílem všech zainteresovaných šlechtitelů, pěstitelů i výrobců, neboť tyto výrobky mají velký nutriční potenciál a mohly by významně přispět ke zlepšení výživy a zdraví široké veřejnosti. Další šlechtitelská práce by však měla být zaměřena nejen na zlepšování nutričně kvalitativních parametrů (zejména obsahu anthokyanů), ale také na zvýšení výnosového potenciálu, zvýšení odolnosti vůči houbovým chorobám a na zlepšení dalších parametrů, které v současné době komerční využití těchto obilovin limitují.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Abdel-Aal ESM, Abou-Arab AA, Gamel TH, Hucl P, Young JC, Rabalski I. 2008. Fractionation of Blue Wheat Anthocyanin Compounds and Their Contribution to Antioxidant Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**:11171-11177.

Abdel-Aal ESM, Hucl P. 2003. Composition and stability of anthocyanins in blue-grained wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**:2174-2180.

Abdel-Aal ESM, Hucl P, Rabalski I. 2018. Compositional and antioxidant properties of anthocyanin-rich products prepared from purple wheat. *Food Chemistry* **254**:13-19.

Abdel-Aal ESM, Hucl P, Shipp J, Rabalski I. 2016. Compositional Differences in Anthocyanins from Blue- and Purple-Grained Spring Wheat Grown in Four Environments in Central Saskatchewan. *Cereal Chemistry* **93**:32-38.

Abdel-Aal ESM, Young JC, Rabalski I. 2006. Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**:4696-4704.

Abdel-Moemin AR. 2016. Analysis of phenolic acids and anthocyanins of pasta-like product enriched with date kernels (*Phoenix dactylifera* L.) and purple carrots (*Daucus carota* L. sp *sativus* var. *atrorubens*). *Journal Of Food Measurement And Characterization* **10**:507-519.

Ahmed NU, Park JI, Jung HJ, Hur Y, Nou IS. 2015. Anthocyanin biosynthesis for cold and freezing stress tolerance and desirable color in *Brassica rapa*. *Functional & Integrative Genomics* **15**:383-394.

Almuayrifi M. 2013. Effect of fertilisation, crop protection, pre-crop and variety choice on yield of phenols content diseases severity and yield of winter wheat. [DSc. Thesis]. Newcastle University, Newcastle.

AOAC International. 2002. Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for Dietary Supplements and Botanicals. AOAC, Arlington (VA). Available from

[https://members.aoac.org/AOAC\\_Docs/StandardsDevelopment/SLV\\_Guidelines\\_Dietary\\_Supplements.pdf](https://members.aoac.org/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf) (accessed February 2021).

Barański M, Średnicka-Tober D, Volakakis N, Seal C, Sanderson R, Stewart GB, Benbrook C, Biavati B, Markellou E, Giotis C, Gromadzka-Ostrowska J, Rembiałkowska E, Skwarło-Sońta K, Tahvonen R, Janovská D, Niggli U, Nicot P, Leifert C. 2014. Higher antioxidant and lower cadmium concentrations and lower incidence of pesticide residues in organically grown crops: a systematic literature review and meta-analyses. *British Journal of Nutrition* **112**:794-811.

Bartl P, Albrecht A, Skrt M, Tremlová B, Ošťádalová M, Šmejkal K, Vovk I, Ulrich NP. 2015. Anthocyanins in purple blue wheat grains and in resulting bread: quantity, composition, and thermal stability. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **66**:514-519.

Baskan KS, Tutem E, Akyuz E, Apak R. 2015. Assessment of the contributions of anthocyanins to the total antioxidant capacities of plant foods. *European Food Research and Technology* **241**:529-541.

Bjelakovic G, Gluud C. 2007. Surviving antioxidant supplements. *Journal of the National Cancer Institute* **99**:742-743.

Bobo-García G, Davidov-Pardo G, Arroqui C, Virseda P, Marin-Arroyo MR, Navarro M. 2015. Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **95**:204-209.

Böhmdorfer S, Oberlerchner JT, Fuchs C, Rosenau T, Grausgruber H. 2018. Profiling and quantification of grain anthocyanins in purple pericarp x blue aleurone wheat crosses by high-performance thin-layer chromatography and densitometry. *Plant Methods* 14 (29) DOI: 10.1186/s13007-018-0296-5.

Boqué R, Heyden YV. 2009. The Limit of Detection. *LC GC Europe* **22**:82-85



Bornsek SM, Ziberna L, Polak T, Vanzo A, Ulrich NP, Abram V, Tramer F, Passamonti S. 2012. Bilberry and blueberry anthocyanins act as powerful intracellular antioxidants in mammalian cells. *Food Chemistry* **134**:1878-1884.

Bowen-Forbes CS, Zhang Y, Nair MG. 2010. Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. *Journal of Food Composition and Analysis* **23**:554-560.

Brandolini A, Castoldi P, Plizzari L, Hidalgo A. 2013. Phenolic acids composition, total polyphenols content and antioxidant activity of *Triticum monococcum*, *Triticum turgidum* and *Triticum aestivum*: A two-years evaluation. *Journal of Cereal Science* **58**:123-131.

Brennan C, Brennan M, Derbyshire E, Tiwari BK. 2011. Effects of extrusion on the polyphenols, vitamins and antioxidant activity of foods. *Trends in Food Science & Technology* **22**:570-575.

Brown CR, Durst RW, Wrolstad R, De Jong W. 2008. Variability of Phytonutrient Content of Potato in Relation to Growing Location and Cooking Method. *Potato Research* **51**:259-270.

Brownmiller C, Howard LR, Prior RL. 2008. Processing and storage effect on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blueberry products. *Journal of Food Science* **73**:H72-H79.

Burešová V, Kopecný D, Bartoš J, Martinek P, Watanabe N, Vyhnánek T, Doležel J. 2015. Variation in genome composition of blue-aleurone wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **128**:273-282.

Camacho-Hernández IL, Zazueta-Morales JJ, Gallegos-Infante JA, Aguilar-Palazuelos E, Rocha-Guzman NE, Navarro-Cortez RO, Jacobo-Valenzuela N, Gomez-Aldapa CA. 2014. Effect of extrusion conditions on physicochemical characteristics and anthocyanin content of blue corn third-generation snacks. *CYTA – Journal of Food* **12**:320-330.

Camire ME, Chaovanalikit A, Dougherty MP, Briggs J. 2002. Blueberry and grape anthocyanins as breakfast cereal colorants. *Journal of Food Science* **67**:438-441.

Carmona L, Alquezar B, Marques VV, Pena L. 2017. Anthocyanin biosynthesis and accumulation in blood oranges during postharvest storage at different low temperatures. *Food Chemistry* **237**:7-14.

Castaneda-Ovando A, Pacheco-Hernández MD, Páez-Hernández ME, Rodríguez JA, Galán-Vidal CA. 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* **113**:859-871.

Catena S, Turrini F, Boggia R, Borriello M, Gardella M, Zunin P. 2019. Effects of different cooking conditions on the anthocyanin content of a black rice (*Oryza sativa* L. 'Violet Nori'). *European Food Research And Technology* **245**:2303-2310.

Cavalcanti RN, Santos DT, Meireles AA. 2011. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems-An overview. *Food Research International* **44**:499-509.

Croitoru C, Muresan C, Turturica M, Stanciuc N, Andronoiu DG, Dumitrascu L, Barbu V, Enachi E, Horincar G, Rapeanu G. 2018. Improvement of Quality Properties and Shelf Life Stability of New Formulated Muffins Based on Black Rice. *Molecules* 23 (2047) DOI: 10.3390/molecules23113047.

ČSÚ. 2020. Spotřeba potravin – 2019. ČSÚ, Praha. Available from <https://www.czso.cz/csu/czso/spotreba-potravin-2019> (accessed January 2021).

de Pascual-Teresa S, Sanchez-Ballesta MT. 2008. Anthocyanins: From plant to health. *Phytochemistry Reviews* **7**:281-299. Delgado-Vargas a Paredes-López, 2002

Delgado-Vargas F, Paredes-López O. 2002. *Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses*. CRC Press, Boca Raton (Florida).

Diczhazi I, Kursinszki L. 2014. Anthocyanin Content and Composition in Winter Blue Barley Cultivars and Lines. *Cereal Chemistry* **91**:195-200.

Durge AV, Sarkar S, Singhal RS. 2013. Stability of anthocyanins as pre-extrusion colouring of rice extrudates. *Food Research International* **50**:641-646.

Eiro MJ, Heinonen M. 2002. Anthocyanin color behavior and stability during storage: Effect of intermolecular copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**:7461-7466.

Eliášová M, Paznocht L. 2015. Total phenolic content and antioxidant activity of tritordeum wheat and barley. *Agronomy Research* **15**:1287-1294.

Escalante-Aburto A, Ramirez-Wong B, Torres-Chavez PI, Figueroa-Cardenas JD, Lopez-Cervantes J, Barron-Hoyos JM, Morales-Rosas I. 2013. Effect of extrusion processing parameters on anthocyanin content and physicochemical properties of nixtamalized blue corn expanded extrudates. *CyTA-Journal of Food* **11**:29-37.

Escribano-Bailon MT, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC. 2004. Anthocyanins in cereals. *Journal of Chromatography A* **1054**:129-141.

FAOSTAT. 2021. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO, Rome. Available from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (accessed January 2021).

Ficco DBM, de Simone V, Colecchia SA, Pecorella I, Platani C, Nigro F, Finocchiaro F, Papa R, De Vita P. 2014a. Genetic Variability in Anthocyanin Composition and Nutritional Properties of Blue, Purple, and Red Bread (*Triticum aestivum* L.) and Durum (*Triticum turgidum* L. ssp. *turgidum* convar. *durum*) Wheats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**:8686-8695.

Ficco DBM, de Simone V, De Leonardis AM, Giovanniello V, Del Nobile MA, Padalino L, Lecce L, Borrelli GM, De Vita P. 2016. Use of purple durum wheat to produce naturally functional fresh and dry pasta. *Food Chemistry* **205**:187-195.

Ficco DBM, Mastrangelo AM, Trono D, Borrelli GM, De Vita P, Fares C, Beleggia R, Platani C, Papa R. 2014b. The colours of durum wheat: a review. *Crop & Pasture Science* **65**:1-15.

Fleischhut J, Kratzer F, Rechkemmer G, Kulling SE. 2006. Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *European Journal of Nutrition* **45**:7-18.

Fogarasi AL, Kun, S, Tanko G, Stefanovits-Banyai E, Hegyesne-Vecseri B. 2015. A comparative assessment of antioxidant properties, total phenolic content of einkorn, wheat, barley and their malts. *Food Chemistry* **167**:1-6.

Francavilla A, Joye IJ. 2020. Anthocyanins in Whole Grain Cereals and Their Potential Effect on Health. *Nutrients* 12 (2922). DOI: 10.3390/nu12102922.

Garg M, Chawla M, Chunduri V, Kumar R, Sharma S, Sharma NK, Kaur N, Kumar A, Munday JK, Saini MK, Singh SP. 2016. Transfer of grain colors to elite wheat cultivars and their characterization. *Journal of Cereal Science* **71**:138-144.

Geng HW, Shi J, Fuerst EP, Wei JX, Morris CF. 2019. Physical mapping of peroxidase genes and development of functional markers for *TaPod-D1* on bread wheat chromosome 7D. *Frontiers in Plant Science* 10 (523) DOI: 10.3389/fpls.2019.00523.

Giordano L, Coletta W, Rapisarda P, Donati MB, Rotilio D. 2007. Development and validation of an LC-MS/MS analysis for simultaneous determination of delphinidin-3-glucoside, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-(6-malonylglucoside) in human plasma and urine after blood orange juice administration. *Journal of Separation Science* **30**:3127-3136.

Guan YG, Zhong QX. 2015. The improved thermal stability of anthocyanins at pH 5.0 by gum arabic. *LWT-Food Science and Technology* **64**:706-712.

Hamouz K, Lachman J, Bečka D, Pulkrábek J. 2018. Effect of growing conditions and storage on the total anthocyanin content in potatoes with coloured flesh. *Plant Soil and Environment* **64**:435-440.

Harakotr B, Suriharn B, Tangwongchai R, Scott MP, Lertrat K. 2014. Anthocyanin, phenolics and antioxidant activity changes in purple waxy corn as affected by traditional cooking. *Food Chemistry* **164**:510-517.

He F, Mu L, Yan GL, Liang NN, Pan QH, Wang J, Reeves MJ, Duan CQ. 2010. Biosynthesis of Anthocyanins and Their Regulation in Colored Grapes. *Molecules* **15**:9057-9091.

Hiemori M, Koh E, Mitchell AE. 2009. Influence of Cooking on Anthocyanins in Black Rice (*Oryza sativa* L. *japonica* var. SBR). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**:1908-1914.

Hirth M, Preiss R, Mayer-Miebach E, Schuchmann HP. 2015. Influence of HTST extrusion cooking proces parameters on the stability of anthocyanins, procyanidins and hydroxycinnamic acids as the main bioactive chokeberry polyphenols. *LWT-Food Science and Technology* **62**:511-516.

Horbowicz M, Kosson R, Grzesiuk A, Debski H. 2008. Anthocyanins in Fruits and Vegetables – Their Occurrence, Analysis and Role in Human Nutrition. *Vegetable Crops Research Bulletin*. Available from: <https://www.degruyter.com/downloadpdf/j/vcrb.2008.68.issue--1/v10032-008-0001-8/v10032-008-0001-8.pdf> (accessed August 2014).

Hou ZH, Qin PY, Zhang Y, Cui SH., Ren GX. 2013. Identification of anthocyanins isolated from black rice (*Oryza sativa* L.) and their degradation kinetics. *Food Research International* **50**:691–697.

Hu C, Cai YZ, Li WD, Corke H, Kitts DD. 2007. Anthocyanin characterization and bioactivity assessment of a dark blue grained wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Hedong Wumai) extract. *Food Chemistry* **104**:955-961.

Hu ZQ, Tang XZ, Zhang M, Hu XQ, Yu C, Zhu ZW, Shao YF. 2018. Effects of different extrusion temperatures on extrusion behavior, phenolic acids, antioxidant activity, anthocyanins and phytosterols of black rice. *RSC Advances* **8**:7123-7132.

Huber L. 2010. *Validation of Analytical Methods*. Agilent Technologies, Germany. Publication Number 5990-5140EN.

Changxing L, Chenling M, Alagawany M, Jianhua L, Dongfang D, Gaichao W, Wenyin Z, Syed SF, Arain MA, Saeed M, Hassan FU, Chao S. 2018. Health benefits and potential applications of anthocyanins in poultry feed industry. *Worlds Poultry Science Journal* **74**:251-263.

Chen QQ, Li ZL, Bi JF, Zhou LY, Yi JY, Wu XY. 2017. Effect of hybrid drying methods on physicochemical, nutritional and antioxidant properties of dried black mulberry. *LWT-Food Science and Technology* **80**:178-184.

Chen W, Muller D, Richling E, Wink M. 2013. Anthocyanin-rich Purple Wheat Prolongs the Life Span of *Caenorhabditis elegans* Probably by Activating the DAF-16/FOXO Transcription Factor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**:3047-3053.

Chung C, Rojanasasithara T, Mutilangi W, McClements DJ. 2016. Stabilization of natural colors and nutraceuticals: Inhibition of anthocyanin degradation in model beverages using polyphenols. *Food Chemistry* **212**:596-603.

Ieri F, Innocenti M, Andrenelli L, Vecchio V, Mulinacci N. 2011. Rapid HPLC/DAD/MS method to determine phenolic acids, glycoalkaloids and anthocyanins in pigmented potatoes (*Solanum tuberosum* L) and correlations with variety and geographical origin. *Food Chemistry* **125**:750-759.

Iqbal S, Bhangar MI, Anwar F. 2007. Antioxidant properties and components of bran extracts from selected wheat varieties commercially available in Pakistan. *LWT-Food Science and Technology* **40**:361-367.

Ivanišová E, Ondrejovič M, Chmelová D, Maliar T, Havrlentová M, Rückschloss L. 2014. Antioxidant Activity and Polyphenol Content in Milling Fractions of Purple Wheat. *Cereal Research Communications* **42**:578-588.

Jaakola L. 2013. New Insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits. *Trends in Plant Science* **18**:477-483.

Karakaya S, Simsek S, Eker AT, Pineda-Vadillo C, Dupont D, Perez B, Viadel B, Sanz-Buenhombre M, Rodriguez AG, Kertesz Z, Hegyi A, Bordoni A, El SN. 2016. Stability and bioaccessibility of anthocyanins in bakery products enriched with anthocyanins. *Food & Function* **7**:3488-3496.

Khanal RC, Howard LR, Brownmiller CR, Prior RL. 2009. Influence of Extrusion Processing on Procyanidin Composition and Total Anthocyanin Contents of Blueberry Pomace. *Journal of Food Science* **74**:H52-H58.

Khoo HE, Azlan A, Tang ST, Lim SM. 2017. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research* **61**:1-21.

Klavins L, Kviešis J, Klavins M. 2017. Comparison of methods of extraction of phenolic compounds from American cranberry (*Vaccinium macrocarpon* L.) press residues. *Agronomy Research* **15**:1316-1329.

Knievel DC, Abdel-Aal ESM, 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**:113–120.

Kong JM, Chia LS, Goh NK, Chia TF, Brouillard R. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* **64**:923-933.

Lachman J, Hamouz K, Orsák M, Pivec V, Hejtmánková K, Pazderů K, Dvořák P, Čepl J. 2012. Impact of selected factors – Cultivar, storage, cooking and baking on the content of anthocyanins in coloured-flesh potatoes. *Food Chemistry* **133**:1107-1116.

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.

Lambri M, Torchio F, Colangelo D, Segade SR, Giacosa S, De Faveri DM, Gerbi V, Rolle L. 2015. Influence of different berry thermal treatment conditions, grape anthocyanin profile, and skin hardness on the extraction of anthocyanin compounds in the colored grape juice production. *Food Research International* **77**:584–590.

Lee C, Han D, Kim B, Baek N, Baik BK. 2013. Antioxidant and anti-hypertensive activity of anthocyanin-rich extracts from hullless pigmented barley cultivars. *International Journal of Food Science and Technology* **48**:984-991.

Lemanska K, Szymusiak H, Tyrakowska B, Zielinski R, Soffers AEMF, Rietjens IMCM. 2001. *Free Radical Biology and Medicine* **31**:869-881.

Li Y, Ma DY, Sun DX, Wang CY, Zhang J, Xie YX, Guo TC. 2015. Total phenolic, flavonoid content, and antioxidant activity of flour, noodles, and steamed bread made from different colored wheat grains by three milling methods. *Crop Journal* **3**:328-334.

Li WD, Pickard MD, Beta T. 2007. Effect of thermal processing on antioxidant properties of purple wheat bran. *Food Chemistry* **104**:1080-1086.

Ling YH, Ren C, Mallery SR, Ugalde CM, Pei P, Sahadri UVRV, Stoner GD, Chan KK, Liu ZF. 2009. A rapid and sensitive LC-MS/MS method for quantification of four anthocyanins and its application in a clinical pharmacology study of a bioadhesive black raspberry gel. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **877**:4027-4034.

Liu Q, Qui Y, Beta T. 2010. Comparison of Antioxidant Activities of Different Colored Wheat Grains and Analysis of Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**:9235-9241.

Loypimai P, Moongngarm A, Chottanom P. 2016. Thermal and pH degradation kinetics of anthocyanins in natural food colorant prepared from black rice bran. *Journal of Food Science and Technology-Mysore* **53**:461-470.

Marczylo TH, Cooke D, Brown K, Steward WP, Gescher AJ. 2009. Pharmacokinetics and metabolism of the putative cancer chemopreventive agent cyanidin-3- glucoside in mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **64**:1261-1268.

Marinelli V, Padalino L, Conte A, Del Nobile MA, Briviba K. 2018. Red Grape Marc Flour as Food Ingredient in Durum Wheat Spaghetti: Nutritional Evaluation and Bioaccessibility of Bioactive Compounds. *Food Science and Technology Research*. **24**:1093-1100.

Marković JMD, Petranović NA, Baranac JM. 2005. The copigmentation effect of sinapic acid on malvin: a spectroscopic investigation on colour enhancement. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* **78**:223-228.



Martín B, Kuskoski EM, Navas MJ, Asuero AG. 2017. Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Pages 205-255 in Justino G, editor. *Flavonoids – From Biosynthesis to Human Health*. IntechOpen. DOI: 10.5772/65575.

Martinek P, Jirsa O, Vaculová K, Chrpová J, Watanabe N, Burešová V, Kopecký D, Štiasna K, Vyhnánek T, Trojan V. 2014. Use of wheat gene resources with different grain colour in breeding. *Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs* **64**:75-78.

Martinek P, Vyhnánek T. 2014. Barevné zrno jako zdroj antioxidantů. *Úroda* **7**:68-70.

Masisi K, Beta T, Moghadasian MH. 2016. Antioxidant properties of diverse cereal grains: A review on in vitro and in vivo studies. *Food Chemistry* **196**:90-97.

Mazzoncini M, Antichi D, Silvestri N, Ciantelli G, Sgherri C. 2015. Organically vs conventionally grown winter wheat: Effects on grain yield, technological quality, and on phenolic composition and antioxidant properties of bran and refined flour. *Food Chemistry* **175**:445-451.

Melini V, Acquistucci R. 2017. Health-Promoting Compounds in Pigmented Thai and Wild Rice. *Foods* **6** (9). DOI: 10.3390/foods6010009.

Menchaca-Armenta M, Ramírez-Wong B, Torres-Chávez PI, Quintero-Ramos A, Ledesma-Osuna AI, Frutos MJ, Gutiérrez-Dorado R, Campas-Baypoli ON, Morales-Rosas I. 2020. Effect of extrusion conditions on the anthocyanin content, functionality, and pasting properties of obtained nixtamalized blue corn flour (*Zea mays* L.) and process optimization. *Journal of Food Science* **87**:2143-2152.

Miguel MG 2011. Anthocyanins: Antioxidant and/or anti-inflammatory activities. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* **1**:7-15.

Mishra K, Ojha H, Chaudhury NK. 2012. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH center dot assay: A critical review and results. *Food Chemistry* **130**:1036–1043.

Mrkvicová E, Pavlata L, Karásek F, Šťastník O, Doležalová E, Trojan V, Vyhnánek T, Hřivna L, Holeksová V, Mareš J, Brabec T, Horký P, Ruttkay-Nedecký B, Adam V, Kizek R. 2016. The influence of feeding purple wheat with higher content of anthocyanins on antioxidant status and selected enzyme activity of animals. *Acta Veterinaria Brno* **85**:371-376.

Mu Y, Zhao XH, Liu BX, Liu CH, Zheng XZ. 2013. Influences of microwave vacuum puffing conditions on anthocyanin content of raspberry snack. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering* **6**:80-87.

Mulinacci N, Ieri F, Giaccherini C, Innocenti M, Andrenelli L, Canova G, Saracchi M, Casiraghi MC. 2008. Effect of Cooking on the Anthocyanins, Phenolic Acids, Glycoalkaloids, and Resistant Starch Content in Two Pigmented Cultivars of *Solanum tuberosum* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**:11830-11837.

Murador DC, da Cunha DT, de Rosso VV. 2014. Effects of cooking techniques on vegetable pigments: A meta-analysis approach to carotenoid and anthocyanin levels. *Food Research International* **65**:177-183.

Narwal S, Thakur V, Sheoran S, Dahyia S, Jaswal S, Gupta RK. 2014. Antioxidant activity and phenolic content of the Indian wheat varieties. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* **23**:11-17.

Nayak B, Berrios JD, Powers JR, Tang J. 2011. Effect of Extrusion on the Antioxidant Capacity and Color Attributes of Expanded Extrudates Prepared from Purple Potato and Yellow Pea Flour Mixes. *Journal of Food Science* **76**:C874-C883.

Nayak B, Liu RH, Tang JM. 2015. Effect of processing on phenolic antioxidants of fruits, vegetables, and grains – a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **55**: 887-918.

Norberto S, Silva S, Meireles M, Faria A, Pintado M, Calhau C. 2013. Blueberry anthocyanins in health promotion: A metabolic overview. *Journal of Functional Foods* **5**:1518-1528.

Nováková L, Douša M. 2013. Moderní HPLC separace v teorii a praxi (II). Lucie Nováková (Hradec Králové) a Michal Douša (Klatovy), Praha.

Pal S, Bagchi TB, Dhali D, Kar A, Sanghamitra P, Sankar S, Samaddar M, Majumder J. 2019. Evaluation of sensory, physicochemical properties and Consumer preference of black rice and their products. *Journal of Food Science and Technology-Mysore* **56**:1484-1494.

Parizad P, Marengo M, Bonomi F, Scarafoni A, Cecchini C, Pagani MA, Marti A, Iametti S. 2020. Bio-Functional and Structural Properties of Pasta Enriched with a Debranning Fraction from Purple Wheat. *Foods* **9** (163). DOI: 10.3390/foods9020163.

Pasqualone A, Bianco AM, Paradiso VM, Summo C, Gambacorta G, Caponio F, Blanco A. 2015. Production and characterization of functional biscuit obtained from purple wheat. *Food Chemistry* **180**:64-70.

Pietrini F, Ianelli MA, Massacci A. (2002). Anthocyanin accumulation in the illuminated surface of maize leaves enhances protection from photo-inhibitory risks at low temperature, without further limitation to photosynthesis. *Plant Cell and Environment* **25**:1251-1259.

Pojer E, Mattivi F, Jonhson D. 2013. The Case for Anthocyanin Consumption to Promote Human Health: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **12**:483-508.

Pryseley A, Mintiens K, Knapen K, Van der Stede Y, Molenberghs G. 2010. Estimating precision, repeatability, and reproducibility from Gaussian and non-Gaussian data: a mixed models approach. *Journal of Applied Statistics* **37**:1729-1747.

Rafael JA, Jabor JR, Casagrande R, Georgetti SR, Borin MDF, Fonseca MJV. 207. Validation of HPLC, DPPH<sup>•</sup> and nitrosation methods for mesalamine determination in pharmaceutical dosage forms. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **43**:97-103.

Reed J. 2002. Cranberry flavonoids, Atherosclerosis and Cardiovascular Health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **42**:301-316.

Routray W, Orsat V. 2011. Blueberries and Their Anthocyanins: Factors Affecting Biosynthesis and Properties. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **10**:303-320.

Saini P, Kumar N, Kumar S, Mwaurah PW, Panghal A, Attkan AK, Singh Vk, Garg MK, Singh V. 2020. Bioactive compounds, nutritional benefits and food applications of colored wheat: a comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. DOI: 10.1080/10408398.2020.1793727.

Salinas-Moreno Y, Martinez-Bustos F, Soto-Hernandez M, Ortega-Paczka R, Arellano-Vazquez JL. 2003. Effect of alkaline cooking process on anthocyanins in pigmented maize grain. *Agrosciencia* **37**:617-628.

Sharma S, Chunduri V, Kumar A, Kumar R, Khare P, Kondepudi KK, Bishnoi M, Garg M. 2018. Anthocyanin bio-fortified colored wheat: Nutritional and functional characterization. *PLOS One* 13 (e0194367). DOI: 10.1371/journal.pone.0194367.

Schaich KM, Tian X, Xie J. 2015. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods* **14**:111-125.

Schoedl K, Forneck A, Sulyok M, Schuhmacher R. 2011. Optimization, In-House Validation, and Application of a Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)-Based Method for the Quantification of Selected Polyphenolic Compounds in Leaves of Grapevine (*Vitis vitifera* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**:10787-10794

Si X, Chen QQ, Bi JF, Wu XY, Yi JY, Zhou LY, Li ZL. 2016. Comparison of different drying methods on the physical properties, bioactive compounds and antioxidant activity of raspberry powders. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **96**:2055-2062.

Singh J, Kaur S, Rasane P. 2018. Evaluation of the Nutritional and Quality Characteristics of Black Carrot Fortified Instant Noodles. *Current Nutrition & Food Science* **14**:442-449.

Sommer S, Cohen SD. 2018. Comparison of Different Extraction Methods to Predict Anthocyanin Concentration and Color Characteristics of Red Wines. *Fermentation*-Basel (39) DOI: 10.3390/fermentation4020039.

Stávek J, Balík J, Bednář P, Barták P, Lemr K. 2006. Reakce antokyanů – stabilizace a změny barvy vína. *Vinařský obzor* **11**:550-552

Sui XN, Yap PY, Zhou WB. 2015. Anthocyanins During Baking: Their Degradation Kinetics and Impacts on Color and Antioxidant Capacity of Bread. *Food & Bioprocess Technology* **8**:983-994.

Surh J, Koh E. 2014. Effects of four different cooking methods on anthocyanins, total phenolics and antioxidant activity of black rice. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **94**:3296-3304.

Syed Jaafar SN, Baron J, Siebenhandl-Ehn S, Rosenau T, Böhmendorfer S, Grausgruber H. 2013. Increased anthocyanin content in purple pericarp × blue aleurone wheat crosses. *Plant Breeding* **132**:546-552.

Szalóki-Dorkó L, Végvári G, Ladányi M, Ficzek G, Stéger-Máté M. 2015. Degradation of anthocyanin content in sour cherry juice during heat treatment. *Food Technology and Biotechnology* **53**:354–360.

Šťastník O, Mrkvicová E, Karásek F, Trojan V, Vyhnánek T, Hřivna L, Jakubcová Z. 2014. The influence of colored wheat feeding on broiler chickens performance parameters. Mendel University in Brno, Brno. 196-198.

Takahata Y, Kai Y, Tanaka M, Nakayama H, Yoshinaga M. 2011. Enlargement of the variances in amount and composition of anthocyanin pigments in sweetpotato storage roots and their effect on the differences in DPPH radical-scavenging activity. *Scientia Horticulturae* **127**:469-474.

Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A. 2008. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant Journal* **54**:733-749.

Tang YY, Cai WX, Xu BJ. 2016. From rice bag to table: Fate of phenolic chemical compositions and antioxidant activities in waxy and non-waxy black rice during home cooking. *Food Chemistry* **191**:81-90.

Tsuda T. 2012. Dietary anthocyanin-rich plants: Biochemical basis and recent progress in health benefits studies. *Molecular Nutrition & Food Research* **56**:159-170.

Türkyılmaz M, Özkan M. (2012). Kinetics of anthocyanin degradation and polymeric colour formation in black carrot juice concentrates during storage. *International Journal of Food Science and Technology* **47**:2273-2281.

Tzin V, Galili G. 2010. New Insight into the Shikimate and Aromatic Amino Acids Biosynthesis Pathway in Plants. *Molecular Plant*. **3**:956-972.

Van Loco J, Elskens M, Croux C, Beernaert H. 2002. Linearity of calibration curves: use and misuse of the correlation coefficient. *Accreditation and Quality Assurance* **7**:281-285.

Varga M, Banhidy J, Cseuz L, Matuz J. 2013. The Anthocyanin Content of Blue and Purple Coloured Wheat Cultivars and their Hybrid Generations. *Cereal Research Communications* **41**: 284-292.

Velíšek J, Hajšlová J. 2009. *Chemie potravin II* (3. vyd.). Osis, Tábor.

Volden J, Borge GIA, Bengtsson GB, Hansen M, Thygesen IE, Wicklund T. 2008. Effect of thermal treatment on glucosinolates and antioxidant-related parameters in red cabbage (*Brassica oleracea* L. ssp. *capitata* f. *rubra*). *Food Chemistry* **109**:595-605.

Wang YJ, Sheen LY, Chou CC. 2010. Storage effects on the content of anthocyanin, mutagenicity and antimutagenicity of black soybean koji. *LWT-Food Science and Technology* **43**:702-707.

Wathon MH, Beaumont N, Benohoud M, Blackburn RS, Rayner CM. 2019. Extraction of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* skin waste as a sustainable source of natural colorants. *Coloration Technology* **135**:5-16.

Welch CR, Wu QL, Simon JE. 2008. Recent advances in anthocyanin analysis and characterization. *Current Analytical Chemistry* **4**:75-101.

Wrolstad RE, Acree TE, Decker EA, Penner MH, Reid DS, Schwartz SJ, Shoemaker CF, Smith DM, Sporns P. 2005. *Handbook of Analytical Chemistry, Volumes a 1 and 2*. John Wiley and Sons, Hoboken (New York).

Yamuangmorn S, Dell B, Rerkasem B, Prom-u-thai C. Stability of Anthocyanin Content and Antioxidant Capacity Among Local Thai Purple Rice Genotypes in Different Storage Conditions. *Chiang Mai Journal of Science* **45**:927-936.

Yilmaz VA, Brandolini A, Hidalgo A. 2015. Phenolic acids and antioxidant activity of wild, feral and domesticated diploid wheats. *Journal of Cereal Science* **64**:168-175.

Yu LL, Beta T. 2015. Identification and Antioxidant Properties of Phenolic Compounds during Production of Bread from Purple Wheat Grains. *Molecules* **20**:15525-15549.

Zanoletti M, Parizad PA, Lavelli V, Cecchini C, Menesatti P, Marti A, Pagani MA. 2017. Debranning of purple wheat: recovery of anthocyanin-rich fractions and their use in pasta production. *LWT-Food Science and Technology* **75**:663-669.

Zaupá M, Calani L, Del Rio D, Brighenti F, Pellegrini N. 2015. Characterization of total antioxidant capacity and (poly)phenolic compounds of differently pigmented rice varieties and their changes during domestic cooking. *Food Chemistry* **187**:338-347.

Zhang Y, Butelli E, Martin C. 2014. Engineering anthocyanin biosynthesis in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **19**:81-90.

Zrcková M, Capouchová I, Eliášová M, Paznocht L, Pazderů K, Dvořák P, Konvalina P, Orsák M, Štěrbá Z. 2018. The effect of genotype, weather conditions and cropping system on antioxidant activity and content of selected antioxidant compounds in wheat with coloured grain. *Plant Soil and Environment* **64**:530-538.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina (též název antioxidační metody)
ACN	acetonitril
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
AOX	antioxidační aktivita
AU	jednotka absorbance ( <i>absorption unit</i> )
Ba	modrý aleuron ( <i>blue aleurone</i> ), označení barevného typu zrna
Ba+Pp	kombinace modrého aleuronu a purpurového perikarpu, označení barevného typu zrna
BHT	butylhydroxytoluen
CoA	koenzym A
CEP	vstupní potenciál kolizní cely ( <i>collision cell entrance potencial</i> )
COX	cyklooxygenáza
CUPRAC	antioxidační kapacita redukcí mědi ( <i>cupric reducing antioxidant capacity</i> )
CXP	výstupní potenciál kolizní cely ( <i>collision cell exit potencial</i> )
ČSÚ	Český statistický úřad
D-3-G	delfinidin-3-glukosid
D-3-R	delfinidin-3-rutinosid
DAD	detektor diodového pole ( <i>diode array detector</i> )
del-3-glu	delfinidin-3-glukosid
del-3-rut	delfinidin-3-rutinosid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DP	deklasterizační potenciál ( <i>declustering potencial</i> )
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyllový radikál (též název antioxidační metody)
EKO	ekologický pěstební systém
EP	vstupní potenciál ( <i>entrance potencial</i> )
ESI	elektrosprejová ionizace ( <i>electrospray ionization</i> )
FAOSTAT	název statistické databáze Organizace pro výživu a zemědělství Spojených národů (FAO)
FAPPZ ČZU	Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity
FRAP	<i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i> (název antioxidační metody)
HCl	kyselina chlorovodíková
HCOOH	kyselina mravenčí
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
CHS	chalkon syntáza



K-3-G	kyanidin-3-glukosid
K-3-R	kyanidin-3-rutinosid
KON	konvenční pěstební systém
kya-3-glu	kyanidin-3-glukosid
kya-3-rut	kyanidin-3-rutinosid
LC	kapalinová chromatografie ( <i>liquid chromatography</i> )
LDL	lipoprotein o nízké hustotě ( <i>low-density lipoprotein</i> )
LOD	limit detekce ( <i>limit of detection</i> )
LOQ	limit kvantifikace ( <i>limit of quantification</i> )
M	mol/l
M-3-G	malvidin-3-glukosid
mal-3-glu	malvidin-3-glukosid
MeOH	methanol
MS	hmotnostní detekce ( <i>mass detection</i> )
NAZV	Národní agentura pro zemědělský výzkum
NMR	nukleární magnetická rezonance
obr.	obrázek
obyv.	obyvatel
ORAC	<i>Oxygen-Radical Absorbance Capacity</i> (název antioxidační metody)
p. a.	analytická čistota chemikálie ( <i>per analysis</i> )
PC	papírová chromatografie ( <i>paper chromatography</i> )
PDA	fotodiodový detektor ( <i>photodiode array detector</i> )
pel-3-glu	pelargonidin-3-glukosid
peo-3-glu	peonidin-3-glukosid
pet-3-glu	petunidin-3-glukosid
Pl-3-G	pelargonidin-3-glukosid
Po-3-G	peonidin-3-glukosid
Pp	purpurový perikarp ( <i>purple pericarp</i> ), označení barevného typu zrna
Pt-3-G	petunidin-3-glukosid
PTFE	polytetrafluorethylen
QTRAP	
r	korelační koeficient
R	červený ( <i>red</i> ), označení barevného typu zrna
RNS	reaktivní formy dusíku ( <i>reactive nitrogen species</i> )
ROS	reaktivní formy kyslíku ( <i>reactive oxygen species</i> )
rpm	otáčky za minutu ( <i>rotation per minute</i> )

RSD	dlouhodobá opakovatelnost ( <i>repeatability standard deviation</i> )
RT	retenční čas
SFE	superkritická fluidní extrakce
SPE	extrakce tuhou fází ( <i>solid-phase extraction</i> )
tab.	tabulka
TLC	tenkovrstvá chromatografie ( <i>thin-layer chromatography</i> )
UFGT	glykosyltransferáza
UHPLC-MS	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní detekcí ( <i>ultra-high performance liquid chromatography coupled with mass detection</i> )
UV/Vis	detektor v oblasti ultrafialového a viditelného záření (spektrofotometrický detektor)
$V_k$	variační koeficient
W	bílý ( <i>white</i> ), označení barevného typu zrna
Ye	žluté ( <i>yellow</i> ), označení barevného typu zrna

## SEZNAM TABULEK

Tab. 1	Formy struktury anthokyanů ve vodném prostředí .....	6
Tab. 2	Genotypy pšenice použitých v experimentální části disertační práce.....	29
Tab. 3	Parametry ionizace pro jednotlivé analyty .....	32
Tab. 4	Podnebné podmínky při experimentu v letech 2016 a 2017 .....	35
Tab. 5	Validační parametry UHPLC-MS metody .....	40
Tab. 6	Validační parametry spektrofotometrické metody .....	42
Tab. 7	Validační parametry antioxidační metody s použitím DPPH .....	43
Tab. 8	Obsahy anthokyanů v genotypch pšenice seté (UHPLC-MS metoda).....	45
Tab. 9	Průměrné obsahy a skladba jednotlivých anthokyanů (UHPLC-MS metoda).....	46
Tab. 10	Obsahy anthokyanů v genotypch pšenice seté (spektrofotometrická metoda).....	47
Tab. 11	Porovnání sumy anthokyanů UHPLC-MS metody a celkových anthokyanů spektrofotometrické metody .....	49
Tab. 12	Hodnoty celkových anthokyanů pro jednotlivé vzorky z ekologického a konvenční pěstebního systému v letech 2016 a 2017 .....	56
Tab. 13	Antioxidační aktivita různých genotypů pšenice stanovených metodou DPPH ....	58
Tab. 14	Souhrnné porovnání průměrné hodnoty AOX u jednotlivých barevných typů.....	59
Tab. 15	Průměrné obsahy anthokyanů v jednotlivých měsících skladování.....	63
Tab. 16	Změny v obsahu celkových anthokyanů a sumy monoglykosidů.....	68
Tab. 17	Změny v obsahu celkových anthokyanů a sumy monoglykosidů.....	74
Tab. 18	Obsahy anthokyanů ve výluhu u jednotlivých genotypů .....	79
Tab. 19	Změny v obsahu celkových anthokyanů a sumy monoglykosidů.....	85
Tab. 20	Změny v obsahu celkových anthokyanů a sumy monoglykosidů.....	91

## SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Změna obsahu anthokyanů v průběhu skladování .....	64
Graf 2 Změna obsahu anthokyanů při pečení (% původního obsahu anthokyanů) .....	68
Graf 3 Degradace jednotlivých anthokyanů (% původního obsahu anthokyanů).....	72
Graf 4 Změna obsahu anthokyanů při vaření (% původního obsahu anthokyanů).....	75
Graf 5 Procentuální změny obsahu jednotlivých monoglykosidů .....	76
Graf 6 Změna obsahu anthokyanů při extruzi (% původního obsahu anthokyanů).....	86
Graf 7 Procentuální změny obsahu jednotlivých monoglykosidů .....	87
Graf 8 Změna obsahu anthokyanů při pufování (% původního obsahu anthokyanů).....	92
Graf 9 Procentuální degradace jednotlivých monoglykosidů .....	93

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Flavan (vlevo) a flavyliový kationt (vpravo) .....	4
Obr. 2 Flavyliový kation s označením substitučních pozic .....	4
Obr. 3 Nejběžnější anthokyany .....	5
Obr. 4 Kyanidin-3-glukosid.....	5
Obr. 5 Přeměny struktur anthokyanů.....	7
Obr. 6 Biosyntéza anthokyanidinů .....	11
Obr. 7 Vznik dalších forem anthokyanidinů methylací původních produktů .....	12

## SEZNAM AUTORSKÝCH PUBLIKACÍ

### Publikace s IF

**Eliášová M**, Kotíková Z, Lachman J, Orsák M, Martinek P. 2020. Influence of baking on anthocyanin content in coloured-grain wheat bread. *Plant, Soil and Environment* **66**:381-386.

Šulc M, **Eliášová M**, Kotíková Z, Lachman J. 2017. Validation of a UHPLC-ESI-MS/MS method for anthocyanidin quantification in potato tubers. *Czech Journal of Food Sciences* **35**:223-228.

Zrcková M, Capouchová I, **Eliášová M**, Paznocht L, Pazderů K, Dvořák P, Konvalina P, Orsák M, Štěrbá Z. 2018. The effect of genotype, weather conditions and cropping system on antioxidant activity and content of selected antioxidant compounds in wheat with coloured grain. *Plant Soil and Environment* **64**:530-538.

Zrcková M, Capouchová I, Paznocht L, **Eliášová M**, Dvořák P, Konvalina P, Janovská D, Orsák M, Bečková L. 2019. Variation of the total content of polyphenols and phenolic acids in einkorn, emmer, spelt and common wheat grain as a function of genotype, wheat species and crop year. *Plant Soil and Environment* **65**:260-266.

Capouchová I, Burešová B, Paznocht L, **Eliášová M**, Pazderů K, Konvalinka P, Satranský M, Dvořáček V. 2020. Antioxidant activity and content of selected antioxidant compounds in grain of different oat cultivars. *Plant Soil and Environment* **66**:327-333.

### Publikace bez IF

**Eliášová M**, Paznocht L. 2017. Total phenolic content and antioxidant activity of tritordeum wheat and barley. *Agronomy Research* **15**:1287-1294.

# PŘÍLOHA

Obsahy anthokyanů v genotypech pšenice seté (UHPLC-MS metoda)

genotyp	typ	obsah anthokyanů v mg/kg sušiny								suma
		K-3-G	K-3-R	D-3-G	D-3-R	Po-3-G	Pt-3-G	M-3-G	Pl-3-G	
AF Jumiko	Pp	0,046 ± 0,003	-	-	-	0,257 ± 0,013	0,008 ± 0,001	-	-	<b>0,311 ± 0,010</b>
Purple	Pp	0,270 ± 0,031	0,029 ± 0,002	-	-	0,277 ± 0,003	0,009 ± 0,003	-	0,017 ± 0,003	<b>0,602 ± 0,040</b>
Karkulka	Pp	0,157 ± 0,012	-	-	-	0,758 ± 0,028	0,010 ± 0,003	-	-	<b>0,925 ± 0,036</b>
RU 687-12	Pp	0,395 ± 0,016	0,027 ± 0,011	-	-	0,404 ± 0,013	0,041 ± 0,005	-	0,167 ± 0,008	<b>1,034 ± 0,019</b>
ANK-28B	Pp	0,631 ± 0,080	-	-	-	0,512 ± 0,003	-	-	-	<b>1,143 ± 0,078</b>
Purple Feed	Pp	0,479 ± 0,021	0,131 ± 0,012	-	-	0,466 ± 0,048	0,013 ± 0,007	-	0,055 ± 0,005	<b>1,144 ± 0,025</b>
Konini	Pp	0,735 ± 0,050	0,174 ± 0,004	-	-	0,838 ± 0,034	0,006 ± 0,004	-	-	<b>1,752 ± 0,059</b>
ANK-28A	Pp	1,648 ± 0,099	0,237 ± 0,008	-	-	1,454 ± 0,110	-	-	-	<b>3,340 ± 0,151</b>
AF Oxana	Ba	0,961 ± 0,114	4,561 ± 0,339	3,759 ± 0,273	9,408 ± 0,578	-	0,030 ± 0,021	-	-	<b>18,76 ± 1,270</b>
Skorpion	Ba	1,905 ± 0,229	6,714 ± 0,612	4,791 ± 0,437	11,13 ± 0,728	-	0,141 ± 0,075	-	-	<b>24,68 ± 2,037</b>
H 90-15-2	Ba	6,135 ± 0,185	14,52 ± 0,091	9,896 ± 0,460	19,34 ± 0,140	-	0,665 ± 0,028	-	-	<b>50,56 ± 0,661</b>
V1 131-15	Ba	3,034 ± 0,152	6,671 ± 0,244	14,93 ± 0,189	25,02 ± 0,395	-	0,753 ± 0,018	0,241 ± 0,103	-	<b>50,64 ± 0,867</b>
Tschermaks B. S.	Ba	6,962 ± 0,444	12,98 ± 0,705	14,53 ± 0,656	23,53 ± 1,136	-	0,580 ± 0,077	-	-	<b>58,59 ± 2,936</b>
EF02-54/9	Ba	6,467 ± 0,120	12,72 ± 0,457	16,19 ± 0,571	27,23 ± 0,623	-	0,863 ± 0,025	-	-	<b>63,47 ± 1,705</b>

UC 66049	Ba	4,803 ± 0,099	12,98 ± 0,485	16,06 ± 0,583	32,22 ± 1,170	-	0,543 ± 0,014	-	-	<b>66,61 ± 2,283</b>
Aoi Yu	Ba	4,466 ± 0,341	12,55 ± 0,330	15,12 ± 0,109	35,60 ± 1,032	-	0,720 ± 0,052	-	-	<b>68,45 ± 1,652</b>
Xiao Yian	Ba	9,338 ± 1,037	14,24 ± 1,376	21,58 ± 1,745	25,97 ± 2,067	-	0,985 ± 0,052	-	-	<b>72,12 ± 3,258</b>
V1 133-15	Ba	5,808 ± 0,224	9,428 ± 0,091	25,59 ± 0,366	33,12 ± 0,583	-	1,598 ± 0,050	0,276 ± 0,050	-	<b>75,82 ± 1,037</b>
V1-208-17	Ba+Pp	0,070 ± 0,004	-	-	-	0,045 ± 0,025	-	-	-	<b>0,115 ± 0,020</b>
V1-122-17	Ba+Pp	0,130 ± 0,023	-	-	-	0,174 ± 0,045	-	-	-	<b>0,304 ± 0,030</b>
V1-143-17	Ba+Pp	1,884 ± 0,408	4,999 ± 0,404	5,845 ± 0,821	5,601 ± 0,699	0,160 ± 0,047	0,126 ± 0,027	-	-	<b>18,62 ± 1,785</b>
V1-142-17	Ba+Pp	1,911 ± 0,229	4,869 ± 0,238	6,056 ± 0,106	5,611 ± 0,199	0,277 ± 0,018	0,205 ± 0,018	-	-	<b>18,93 ± 0,564</b>
V1-129-17	Ba+Pp	1,570 ± 0,256	4,177 ± 0,348	8,331 ± 0,542	6,442 ± 0,795	0,268 ± 0,062	0,330 ± 0,021	-	-	<b>21,12 ± 1,567</b>
V1-130-17	Ba+Pp	1,675 ± 0,179	3,982 ± 0,221	8,743 ± 0,465	6,370 ± 0,527	0,318 ± 0,035	0,291 ± 0,026	-	-	<b>21,38 ± 1,127</b>
V1-145-17	Ba+Pp	1,899 ± 0,122	6,241 ± 0,684	6,543 ± 0,537	6,300 ± 0,567	0,248 ± 0,061	0,217 ± 0,019	-	-	<b>21,45 ± 1,547</b>
V1-144-17	Ba+Pp	2,052 ± 0,088	5,410 ± 0,332	6,911 ± 0,504	6,927 ± 0,464	0,230 ± 0,041	0,205 ± 0,049	-	-	<b>21,74 ± 1,145</b>
V2-11a-17	Ba+Pp	1,926 ± 0,085	4,558 ± 0,073	12,50 ± 0,605	8,779 ± 0,336	0,317 ± 0,022	0,417 ± 0,009	-	-	<b>28,49 ± 0,715</b>
V2-15a-17	Ba+Pp	2,672 ± 0,240	5,856 ± 0,259	14,49 ± 0,628	11,19 ± 0,628	0,568 ± 0,030	0,480 ± 0,071	-	-	<b>35,26 ± 1,311</b>
V1-118-17	Ba+Pp	2,859 ± 0,196	5,998 ± 0,171	16,05 ± 0,215	10,52 ± 0,279	0,391 ± 0,033	0,604 ± 0,039	-	-	<b>36,43 ± 0,537</b>
AF Zora	Ba+Pp	2,991 ± 0,204	5,676 ± 0,451	17,59 ± 1,225	11,30 ± 1,030	0,575 ± 0,049	0,566 ± 0,064	-	-	<b>38,69 ± 2,225</b>