

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

**Nutriční potenciál zrna netradičních genotypů pšenice**  
doktorská disertační práce

Autor: **Ing. Barbora Burešová**

Školitel: **prof. Ing. Jaromír Lachman, CSc.**

Konzultant: **Ing. Matyáš Orsák, Ph.D.**

**Praha 2023**

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že jsem předkládanou disertační práci “Nutriční potenciál zrna netradičních genotypů pšenice“ vypracovala samostatně za využití odborných a vědeckých zdrojů, které jsou v práci citovány a uvedeny v seznamu literatury. Dále prohlašuji, že jsem v souvislosti se sepsáním doktorské disertační práce neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze 1. března 2023

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří přispěli svou měrou k dokončení této práce. Děkuji svému školiteli prof. Ing. Jaromíru Lachmanovi, CSc. za cenné rady, které mi poskytl zejména v oblasti publikační činnosti a hluboce se klaním Ing. Petru Martinkovi, CSc., bez jehož šlechtitelské práce by tento výzkum nebylo možné uskutečnit. Velké díky patří jedinečným lidem z katedry chemie naší krásné univerzity, jež mám tu čest považovat za své přátele. Jmenovitě (s dovolením bez akademických titulů) děkuji především Zorce Kotíkové, která byla a vždy bude mým největším vědeckým vzorem a Luboši Paznochtovi, jenž mi umožnil navázat na svůj výzkum, byl mi nepostradatelnou oporou po celou dobu studia, a především se mnou měl za každých okolností železnou trpělivost. Za mnohé dále děkuji Vladimíru Pivcovi, Petru Šmídovi, nejlepšímu vedoucímu všech dob Matyáši Orsákovi a konečně své nejlepší kamarádce Klárce Podhorecké, bez kterých by na našem pracovišti jistě nevládla tak skvělá atmosféra. V neposlední řadě děkuji velmi své rodině a blízkým za veškerou podporu a trpělivost, kterou se mnou po celou tu dlouhou dobu měli.

# Obsah

1. Úvod.....	5
2. Literární přehled.....	6
2.1. Význam obilovin v lidské dietě.....	6
2.2. Karotenoidy .....	7
2.2.1. Chemická struktura .....	8
2.3. Tokochromanoly.....	9
2.3.1. Chemická struktura .....	10
2.4. Společné biosyntetické kořeny karotenoidů a tokochromanolů.....	11
2.5. Biosyntéza karotenoidů .....	14
2.5.1. Významné degradační produkty karotenoidů.....	16
2.5.2. Akumulace .....	18
2.6. Biosyntéza tokochromanolů .....	18
2.6.1. Akumulace .....	20
2.7. Funkce karotenoidů a tokochromanolů ve fotosyntéze .....	21
2.7.1. Význam karotenoidů .....	22
2.7.1.1. Fotoprotektivní funkce.....	22
2.7.2. Význam tokochromanolů .....	24
2.8. Význam karotenoidů a tokochromanolů pro člověka.....	24
2.8.1. Biologická dostupnost a metabolismus karotenoidů.....	25
2.8.1.1. Prekurzory vitamínu A.....	26
2.8.2. Biologická dostupnost a metabolismus tokochromanolů.....	27
2.8.2.1. Vitamin E.....	28
2.8.3. Antioxidační funkce .....	29
2.8.3.1. Antioxidační působení karotenoidů .....	30
2.8.3.2. Antioxidační působení tokochromanolů .....	31
3. Cíle a hypotézy práce.....	33
4. Publikované práce.....	34
4.1. Phenolic acids in kernels of different coloured-grain wheat genotypes.....	35
4.2. Carotenoid content of extruded and puffed products made of colored-grain wheats	44
4.3. Changes in carotenoids and tocopherols of colored-grain wheat during unleavened bread preparation .....	60
4.4. The Effect of Boiling and in Vitro Digestion on the Carotenoid Content of Colored-grain Wheat.....	72
5. Souhrnná diskuse .....	82

6. Závěr .....	88
7. Seznam literatury .....	91
8. Seznam zkratk .....	103

# 1. Úvod

Rozvoj zdravého stravování vycházejícího z udržitelných zdrojů je jednou z hlavních strategií, jak podpořit globální potravinovou dostupnost, s cílem ochrany veřejného zdraví světové populace, která v posledních dekádách ustavičně roste. V zabezpečení dostatečného množství nutričně hodnotných potravin má význačné postavení zemědělská produkce základních plodin, zejména obilovin, které si ve světové rostlinné výrobě zachovávají trvale dominantní postavení. V reakci na úroveň společenského a ekonomického vývoje, který se odráží v zájmu spotřebitelů o potraviny, jejichž konzumace může přinášet zdravotní benefity, roste snaha rozšířit sortiment o netradiční nové produkty, ale i základní suroviny pro jejich výrobu. S ohledem na skutečnost, že příznivé účinky na zdraví je možné zajistit a intenzifikovat pouze pravidelnou konzumací dostatečného množství potravin s přidanou nutriční hodnotou, představují výrobky z obilovin vhodnou strategii, neboť jsou nedílnou součástí lidské stravy. V této souvislosti zaujímá výsadní postavení pšenice, která výrazně přispívá k naplnění nutričních potřeb lidstva.

Šlechtitelské programy zaměřené na vývoj nových genotypů pšenice se zvýšeným obsahem biologicky aktivních látek v zrna by mohly vedle podpory genetické variability představovat udržitelné řešení pro zajištění světové potravinové bezpečnosti. Kromě základních živin jsou tyto netradiční genotypy bohatým zdrojem přírodních pigmentů (karotenoidů a anthokyanů), ale i dalších fytochemikálií s antioxidačními vlastnostmi (např. fenolických kyselin a tokolů). Karotenoidy a tokoly jsou nejvýznamnějšími lipofilními antioxidanty pšeničných zrn, které hrají důležitou roli ve fyziologii téměř všech živých organismů. U rostlin se podílejí na procesu fotosyntézy a v lidském organismu, kde jejich syntéza neprobíhá, chrání buněčné makromolekuly před oxidačním poškozením, které je významným faktorem patogeneze většiny lidských onemocnění. Tokoly a především  $\alpha$ -tokoferol vykazují aktivitu vitamínu E, který má kromě antioxidační aktivity řadu dalších pozitivních účinků na lidské zdraví. Některé karotenoidy potom slouží jako prekurzory vitamínu A, který je nepostradatelný pro správnou funkci zraku.

Způsoby zpracování obilovin předcházející jejich konzumaci za účelem dosažení požadovaných sensorických vlastností, mohou vést ke změnám chemického složení a nutriční hodnoty výsledných produktů. Pro využití nutričního potenciálu zrna netradičních genotypů pšenice je tedy naprosto zásadní určit charakter a rozsah těchto změn, ke kterým dochází v průběhu technologického zpracování.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Význam obilovin v lidské dietě

Vzhledem k celosvětovým populačním trendům a cílům v oblasti potravinové bezpečnosti stanoveným pro rok 2050 je třeba posílit výrobu vysoce kvalitních potravin způsobem, který je ekologicky a sociálně udržitelný (Ali et al. 2020). S roční produkcí více než 778 milionů tun (Statista, 2023) představuje pšenice setá (*Triticum aestivum* L.) plodinu s potenciálem řešit rostoucí požadavky na globální zásobování potravinami. V současné době je pšenice jednou z nejvýznamnějších základních surovin, která zajišťuje více než 20 % kalorického příjmu světové populace a v podobě různých potravinářských výrobků může sloužit jako bohatý zdroj vitaminů a dalších biologicky aktivních látek, a to nejen pro člověka ale také jako krmivo zvířat (Venske et al. 2019). Spojitost konzumace celozrnných výrobků z obilovin s prevencí řady civilizačních onemocnění, jako je cukrovka, kardiovaskulární choroby a některé typy rakoviny je přičítána převážně vláknině a mikronutrientům obsaženým v hojném množství v obalových vrstvách a klíčku zrna, jejichž společné působení může napomáhat ochraně před oxidačním poškozením buněk tkání, které úzce souvisí s patogenezí řady lidských onemocnění (Guo et al. 2022; Wang et al., 2021; Zhang et al. 2018). Přesto byly s ohledem na obsah zdraví prospěšných fytochemikálií a vitaminů v minulosti, ale i v současnosti, šlechtitelské postupy vedeny jen zřídka, přičemž prioritami pro šlechtění bylo zvyšování výnosového potenciálu, odolnosti vůči biotickým a abiotickým stresovým faktorům a zlepšování parametrů pekařské kvality (Venske et al. 2019; Ziegler et al. 2016). Technologická jakost daná jedinečnou elasticitou lepku, která umožňuje rozmanitější využití pšenice, dobrý nutriční základ a vysoká přizpůsobivost této plodiny podmínkám prostředí, jsou, spolu se zvládnutou pěstební technologií, zajišťující produkci velkého množství dobře skladovatelné suroviny, hlavními důvody, proč se pšenice stala mezi lidmi tak rozšířenou (Venske et al. 2019). Intenzivním šlechtěním vysoce výnosových genotypů prováděným v posledních dvou stoletích však došlo ke stagnaci kvality zrna a poklesu genetické variability. Šlechtitelské úsilí zaměřené na zvyšování obsahu biologicky aktivních látek v zrnu by mohlo výrazně napomoci zachování rozmanitosti, a tak i rozvoji udržitelného zemědělství nebo zvýšení odolnosti rostlin proti stresu a chorobám, což má přirozený dopad na výnos a další agronomické parametry, ale i na samotnou kvalitu plodin (Ali et al. 2020).

V současnosti jsou netradiční genotypy pšenice šlechtěny zejména s cílem posílit syntézu lipofilních pigmentů ze skupiny karotenoidů nebo za účelem introdukce genů determinujících tvorbu a ukládání anthokyanů v zrnu. Podle typu a místa uložení rostlinných pigmentů jsou rozlišovány pšenice se žlutým endospermem, modrým aleuronem, purpurovým perikarpem

nebo jejich kříženci (Martinek 2021a; Martinek & Vyhnánek 2014). Purpurové zbarvení obilek je způsobeno přítomností anthokyanů v oplodí zrna, jejichž syntéza je řízena geny, které byly do genomu pšenice seté vneseny z tetraploidní pšenice *T. turgidum* L. subsp. *abbyssinicum* Vavilov. Linie pšeníc s modrým zrnem jsou charakteristické vysokým obsahem anthokyanů v aleuronové vrstvě, jejichž tvorba je determinována geny přenesenými z příbuzných planých druhů pšenice *T. monococcum* L. spp. *aegilopoides* a pýru *Thynopyrum ponticum* a *Th. Bessarabicum* (Garg et al. 2016). Velmi perspektivní jsou také genotypy s kombinací genů určujících zbarvení, jako je v ČR nově uznaná odrůda AF Zora s tzv. černým zbarvením zrna, které je podmíněno kombinací genů pro modrý aleuron a purpurový perikarp (Martinek 2021b). Žluté zbarvení je řízeno geny silně exprimovanými u jednozrnky, dvouzrnky a pšenice tvrdé, které zodpovídají za intenzivní tvorbu a ukládání karotenoidů v endospermu (Martinek 2021a; Martinek & Vyhnánek 2014). Tyto pigmenty, ale i jiné fytochemikálie hojně obsažené v pšeničných zrnech, jako jsou tokoly a fenolické kyseliny, dodávají této surovině značnou přidanou hodnotu, neboť se vyznačují vysokou antioxidační aktivitou (Lachman et al. 2018; Padhy et al. 2022).

Rostoucí zájem spotřebitelů o potraviny obohacené o funkční složky, jako jsou antioxidanty, vitaminy a vláknina, se projevil i v poptávce po jiných pšeničných druzích, jako je špalda (*T. spelta* L.), jednozrnka (*T. monococcum* L.), dvouzrnka (*T. dicoccum* L.) nebo pšenice tvrdá (*T. durum* Desf.). Tyto druhy však mají ve srovnání s pšenicí setou výrazně nižší výnosy a nemohou jí proto ekonomicky konkurovat. Šlechtění netradičních genotypů pšenice seté se zvýšeným obsahem nutričně hodnotných látek v zrně a jejich využití v potravinářském průmyslu by proto mohlo být vhodnou strategií rozšíření trhu žádaných funkčních potravin (Martinek 2021a; Padhy et al. 2022).

## 2.2. Karotenoidy

Karotenoidy jsou jedny z nejstarších známých molekul, jejichž původní úloha u organismů z říše *Archaeobacteria* spočívala ve zpevnování buněčných membrán a tuto roli zastávají u některých živočichů a hub dodnes. V současné době jsou dobře známy jejich fotosyntetické a fotoprotektivní schopnosti a řada dalších funkcí zejména (nikoli však výhradně) u rostlinných organismů. Vědecký výzkum karotenoidů trvá od první poloviny 19. století, kdy byl termín karoten navržen Heinrichem W. F. Wackenroderem pro označení pigmentu izolovaného z mrkve. V relativně rychlém sledu pak byla barviva získaná z podzimních listů pojmenována jako xanthofyly, z vaječného žloutku byl izolován lutein a z rostliny známé jako černý svlačec (*Toafrmus communis*) poté lykopen. Chemická struktura karotenů a xanthofylů byla popsána



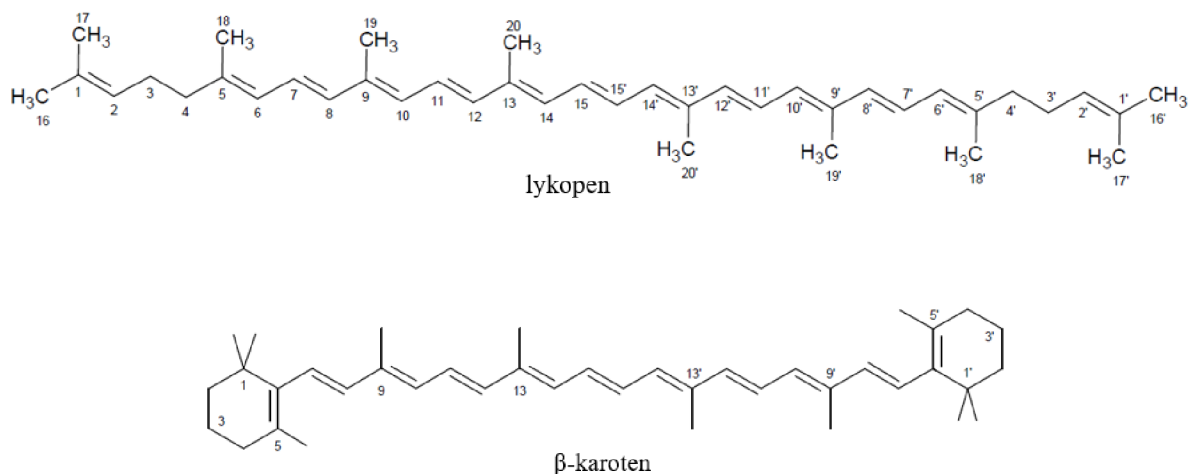
Richardem M. Willstätterem začátkem 20. století, kdy byly tyto látky také poprvé chromatograficky separovány a označeny jako karotenoidy (Zia-Ul-Haq 2021).

Karotenoidy hrají významnou roli ve fyziologii téměř všech živých organismů, jsou zodpovědné za zbarvení květů a plodů, čímž podporují opylení a šíření semen. Tyto látky se také podílejí na zbarvení živočišných struktur, jako jsou např. peří a zobáky některých ptáků, exoskelety měkkýšů a svalovina či kůže ryb. U hub, některých bakterií a dalších nefotosyntetizujících organismů slouží karotenoidy jako ochrana před nadměrným působením slunečního záření, a to jednak na základě svého antioxidačního potenciálu, a také díky schopnosti světlo absorbovat, kterou těmto organismům propůjčují. Karotenoidy rostlin a jiných fotoautotrofních organismů poskytují ochranu světlosběrného aparátu před nadbytkem světla a také se podílejí na samotném procesu fotosyntézy (Zia-Ul-Haq 2021).

Pro člověka mají karotenoidy zásadní význam z pohledu jejich antioxidačních vlastností, díky kterým hrají důležitou roli v prevenci řady degenerativních procesů (Gulcin 2020), a také proto, že představují významný potravní zdroj vitamínu A, jehož syntéza *de novo* v lidském organismu neprobíhá (Blaner 2020).

### 2.2.1. Chemická struktura

Svou chemickou strukturou, jejíž základ je tvořen osmi jednotkami isoprenu, spadají do skupiny tetraterpenoidů ( $C_{40}$ ). Hlavním strukturálním rysem karotenoidů je systém konjugovaných dvojných vazeb, který je obvykle označován jako polyenový řetězec. Uhlíkové atomy základního skeletu jsou číslovány symetricky od konců ke středu molekuly, z jedné strany jednoduše (1–15), z druhé strany s čárkovými indexy (1'–15'). Methylové skupiny jsou číslovány 16–20, resp. 16'–20' (Obrázek 1). Uhlíkový skelet karotenoidů může být buď ryze alifatický, nebo zakončený jedním až dvěma šesti-, případně pětičlennými cykly (Meléndez-Martínez et al. 2019; Riaz et al. 2021).



Obrázek 1. Chemická struktura lykopenu a  $\beta$ -karotenu (vytvořeno v programu ChemSketch).

Doposud identifikované karotenoidy lze klasifikovat do dvou základních skupin na uhlovodíkové karoteny a od nich odvozené kyslíkaté xanthofyly. Na základě struktury lze rozlišit také další netypické podskupiny karotenoidů, jako jsou například některé bakteriální karotenoidy, které obsahují navíc jednu až dvě isoprenové jednotky (dekaprenoxanthin, C<sub>50</sub>), nebo karotenoidy s méně než 40 uhlíkovými atomy. Mezi tyto látky, označované také jako degradované karotenoidy, jsou řazeny tzv. apokarotenoidy, které vznikají oxidačním štěpením karotenoidů (Meléndez-Martínez et al. 2019).

Polyenové uspořádání karotenoidů, zahrnující až 15 konjugovaných dvojných vazeb, zodpovídá za jejich specifické fotochemické vlastnosti, typická absorpční spektra a s tím související barvu vnímanou lidským okem. Cyklizace konjugovaného systému způsobuje posun absorpčního maxima ke kratším vlnovým délkám (tzv. hypsochromní posun). Naopak s vyšším stupněm nenasyčenosti absorpční maximum roste, neboť rostoucí počet konjugovaných dvojných vazeb snižuje energii potřebnou k přechodu elektronů do vyšších energetických stavů, což molekulám umožňuje absorbovat záření o vyšších vlnových délkách (Gulcin 2020). S tím souvisí také intenzita zbarvení dané látky, např. ζ-karoten, který obsahuje sedm konjugovaných dvojných vazeb, má světle žlutou barvu, β-karoten s desíti konjugovanými dvojnými vazbami jasně žlutou a v molekule sytě červeného kanthaxanthinu je těchto vazeb třináct. Acyklické prekurzory karotenoidů fytoen a fytofluen jsou z tohoto pohledu raritou, neboť jsou v důsledku nízkého počtu konjugovaných dvojných vazeb bezbarvé. Dvojně vazby umožňující *cis-trans*-isomerii se přirozeně vyskytují v konfiguraci *all-trans*, která je z termodynamického hlediska mnohem více stabilní. Transformace na konfiguraci *cis*, jejíž výskyt je možný jen u dvojných vazeb nesubstituovaných methylovými skupinami, může být podpořena působením světla nebo tepla (Riaz et al. 2021). Rozdíly ve tvaru jednotlivých geometrických isomerů mohou být důvodem jejich odlišných vlastností. *Cis*-isomery jsou díky svému angulárnímu tvaru ve fyziologickém prostředí méně náchylné k agregaci, což může mít vliv na jejich rozpustnost a biologickou dostupnost (Meléndez-Martínez et al. 2019).

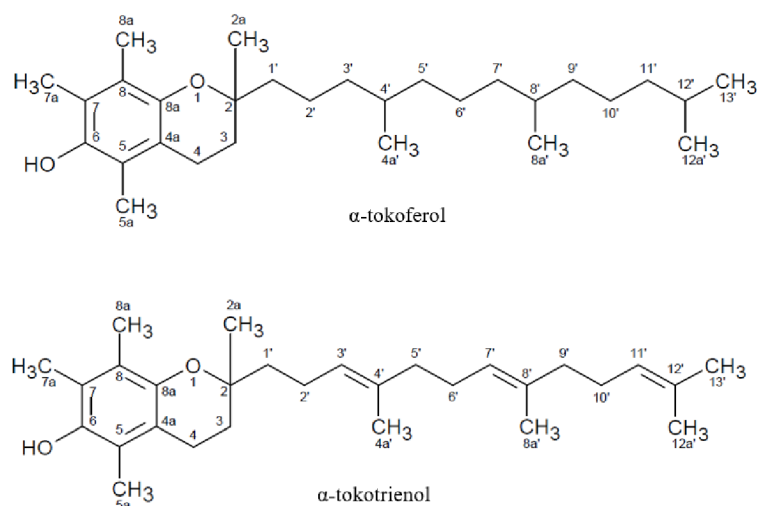
### 2.3. Tokochromanoly

Tokoferoly a tokotrienoly, společně nazývané jako tokochromanoly, zkráceně tokoly, představují skupinu lipofilních látek s amfipatickou povahou, které ve své struktuře obsahují (polární) chromanolvý kruh s navázaným (hydrofobním) isoprenoidním řetězcem (Lachman et al. 2018). Tokoly jsou syntetizovány všemi rostlinnými organismy (a některými kyanobakteriemi) prostřednictvím stejné biosyntetické dráhy (Tiwari & Cummins 2009). Tokochromanoly bývají často společně označovány jako vitamin E. V rostlinných tkáních vykazují aktivitu vitamínu E skutečně všechny formy, avšak v souvislosti s lidským

organismem může být vitamínem nazýván pouze  $\alpha$ -tokoferol, neboť jako jediný ze všech tokolů prokazatelně chrání organismus před onemocněním způsobeným jeho nedostatkem (Azzi 2018).

### 2.3.1. Chemická struktura

Základní strukturu tokoferolů, jež mají boční řetězec plně nasycený, tvoří 2-methyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl) chroman-6-ol, zatímco u tokotrienolů, u nichž se v bočním řetězci vyskytují tři dvojné vazby v pozicích 3', 7' a 11', jde o 2-methyl-2-(4,8,12-trimethyltrideca-3,7,11-trienyl) chroman-6-ol (Tiwari & Cummins 2009). Oba typy tokolů (tokoferoly a tokotrienoly) existují ve čtyřech formách ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - a  $\delta$ -), které se odlišují četností a umístěním methylových skupin substituovaných na aromatický kruh. Z tohoto důvodu nemohou být  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - a  $\delta$ -tokoferoly a tokotrienoly označovány jako isomery. Isomery jsou pouze  $\beta$ - a  $\gamma$ -formy, jež mají chromanolový kruh methylován na dvou atomech uhlíku.  $\alpha$ -Tokochromanoly (Obrázek 2) mají methylové skupiny na třech uhlíkových atomech a  $\delta$ - pouze na jednom. Tokoferoly mají ve svém postranním řetězci tři asymetrické uhlíky (C-2, C-4' a C-8'), přičemž přirozené formy mají na všech těchto chirálních centrech konfiguraci R, v názvu proto mají předponu 2-R, 4'-R, 8'-R-, nebo zkráceně RRR-. Tyto přirozené formy mají silnější biologické účinky než jejich syntetické ekvivalenty, jež jsou racemickou směsí všech osmi možných stereoisomerů (Azzi 2018). Tokotrienoly mají pouze jedno chirální centrum na C-2, ale na rozdíl od tokoferolů mají díky dvojným vazbám ještě dvě místa geometrického isomerismu na C-3' a C-7'. Přirozené tokotrienoly se vyskytují v konfiguraci 2-R, 3'-*trans*, 7'-*trans*- (Bramley et al. 2000).

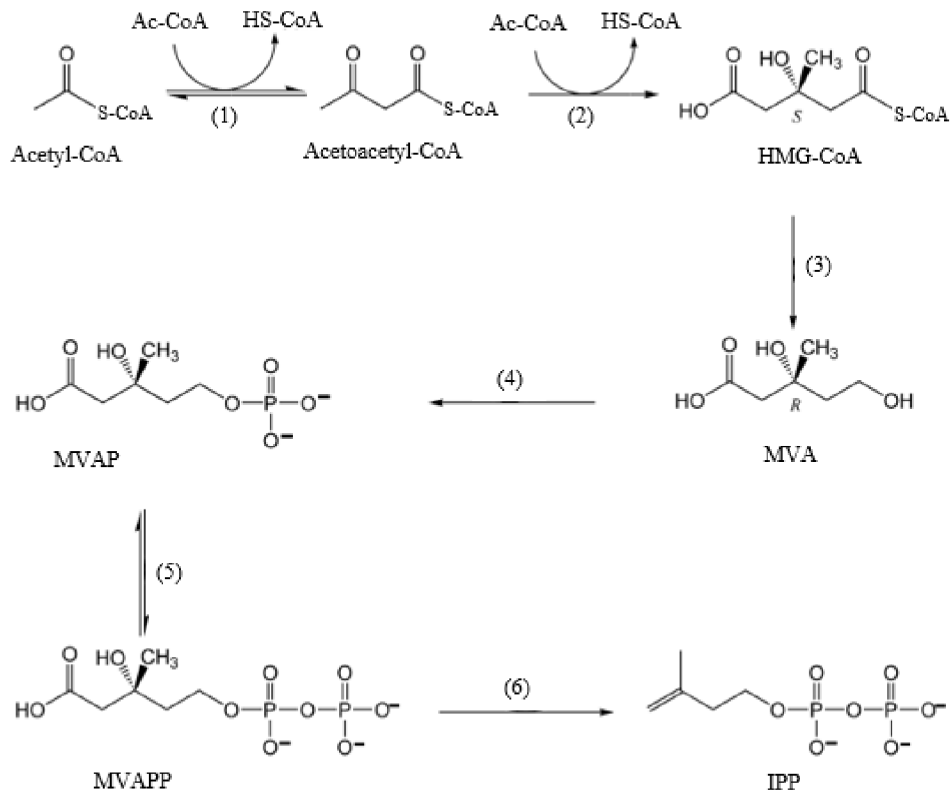


Obrázek 2. Chemická struktura  $\alpha$ -tokoferolu a  $\alpha$ -tokotrienolu (vytvořeno v programu ChemSketch).

## 2.4. Společné biosyntetické kořeny karotenoidů a tokochromanolů

Navzdory strukturní i funkční rozmanitosti jsou biosyntetické kořeny tokochromanolů, karotenoidů a všech ostatních isoprenoidních (terpenoidních) sloučenin relativně jednoduché. Společným základem tvorby jejich uhlíkového skeletu jsou molekuly prenyldifosfátu, které jsou složeny ze dvou pětiuhlíkatých meziproductů, isopentenylidifosfátu (IPP) a jeho isomeru dimethylallyldifosfátu (DMAPP). U rostlin mohou být molekuly IPP (i DMAPP) syntetizovány buď v cytosolu prostřednictvím tzv. mevalonátové dráhy (MVA dráha), nebo v plastidech v průběhu dráhy methylethylerythritol fosfátové (MEP dráha), někdy též nazývané jako nemevalonátová dráha (non-mevalonate pathway) (Styrczewska et al. 2013).

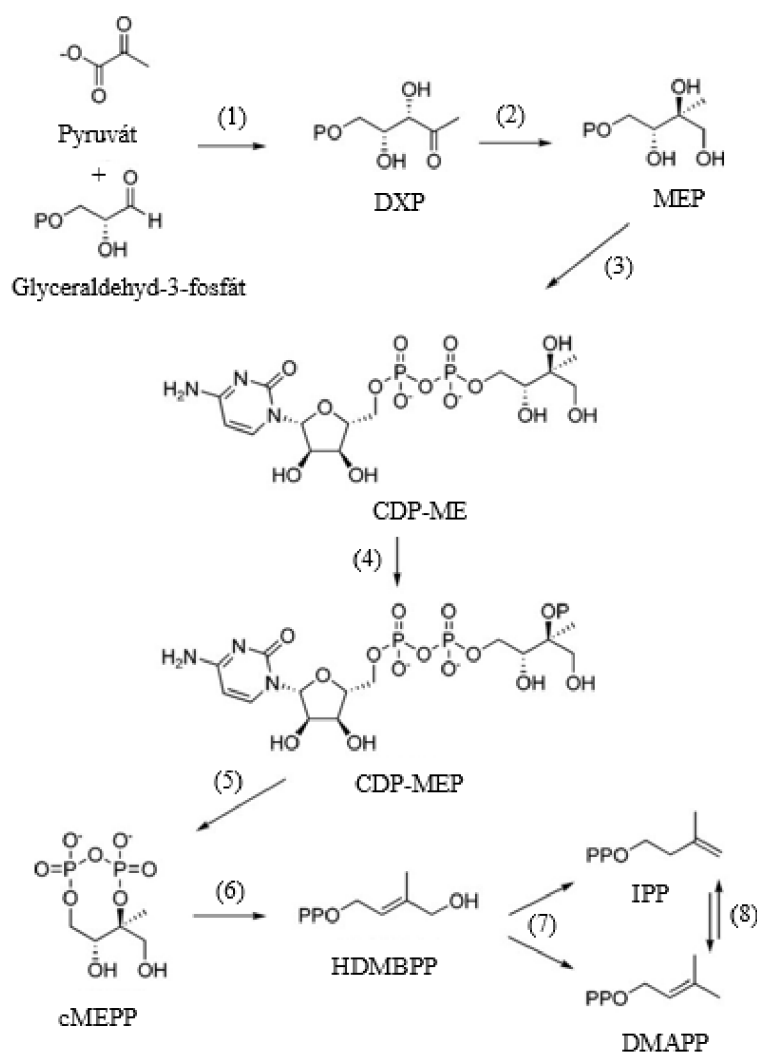
MVA dráha, jejíž název je odvozen od mevalonové kyseliny (MVA), byla považována za jediný zdroj isoprenoidních prekurzorů pro syntézu terpenoidů až do konce 19. století, kdy bylo zjištěno, že rostliny a většina bakterií mohou syntetizovat tyto látky také alternativní MEP dráhou. MVA dráha je však zásadní pro tvorbu isoprenoidních látek u živočichů, kvasinek, hub a organismů z říše *Archaeobacteria*, u nichž se tato dráha vyvinula, a také pro produkci rostlinných sterolů. U rostlinných organismů bylo prokázáno, že kompartmentační oddělení drah MVA a MEP není absolutní a že může docházet k obousměrné výměně jednoho či více neidentifikovaných metabolitů jejich transportem přes plastidové membrány (Eisenreich et al. 2004, Moise et al. 2014). MVA dráha (Obrázek 3) je zahájena postupnou kondenzací tří molekul acetyl-koenzymu A za vzniku 3-hydroxy-methylglutaryl-koenzymu A (HMG-CoA), který je následně redukován na MVA. V průběhu dalších třech kroků zahrnujících fosforylaci a dekarboxylaci je MVA přeměněna na IPP, který může být dále isomerován na DMAPP (Miziorko 2011; Moise et al. 2014). Pro průběh celé dráhy je klíčovým enzymem HMG-CoA reduktasa, jež katalyzuje limitující krok biosyntézy cytosolických terpenoidů, tedy přeměnu HMG-CoA na MVA. Na aktivitu HMG-CoA reduktasy může mít vliv řada environmentálních a fyziologických faktorů, jako je světlo, rostlinné patogeny nebo růstové regulátory. Účinnými inhibitory tohoto enzymu snižujícími hladinu cholesterolu v krvi jsou statiny, hojně využívané k prevenci i léčbě kardiovaskulárních onemocnění (Eisenreich et al. 2004; Miziorko 2011).



**Obrázek 3. Biosyntéza isopentenylidifosfátu (IPP) v mevalonátové dráze.**

Ac-CoA acetyl-koenzym A, HMG-CoA 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A, MVA mevalonová kyselina, MVAP mevalonát-5-fosfát, MVAPP 5-difosfomevalonát; (1) acetoacetyl-CoA thiolasa (EC 2.3.1.9), (2) 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthasa (EC 2.3.3.10), (3) 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reduktasa (NADPH; EC 1.1.1.34), (4) mevalonát kinasa (ATP; EC 2.7.1.36), (5) fosfomevalonát kinasa (ATP; EC 2.7.4.2), (6) 5-difosfomevalonát dekarboxylasa (ATP; EC 4.1.1.33); upraveno dle Miziorko (2011).

Pro syntézu plastidických terpenoidů (včetně rostlinných karotenoidů a tokochromanolů) je zásadní MEP dráha (Obrázek 4), která se zřejmě vyvinula v kyanobakteriích. Geny kódující enzymy nezbytné pro průběh této dráhy byly do jader rostlinných organismů integrovány endosymbiózou fotosyntetizujících kyanobakterií, čímž je vysvětlován i samotný původ plastidů, kde je většina těchto enzymů lokalizována. Pro průběh celé dráhy je klíčový její první krok, ve kterém dochází k tvorbě 1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfátu (DXP) z molekuly pyruvátu a glycerinaldehyd-3-fosfátu. Tato reakce je katalyzována DXP synthasou, jejíž aktivita výrazně ovlivňuje hladinu terpenoidů syntetizovaných v plastidech. DXP je v následné reakci zahrnující intramolekulární přeskupení a redukci přeměněn, za přítomnosti NADPH, na 2-C-methyl-D-erythritol-4-fosfát (MEP). V sérii dalších třech kroků je za účasti cytidintrifosfátu MEP transformován na 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyklodifosfát a tento cyklický meziprodukt je v závěrečném kroku využit pro syntézu IPP, nebo jeho isomeru DMAPP (Moise et al. 2014).



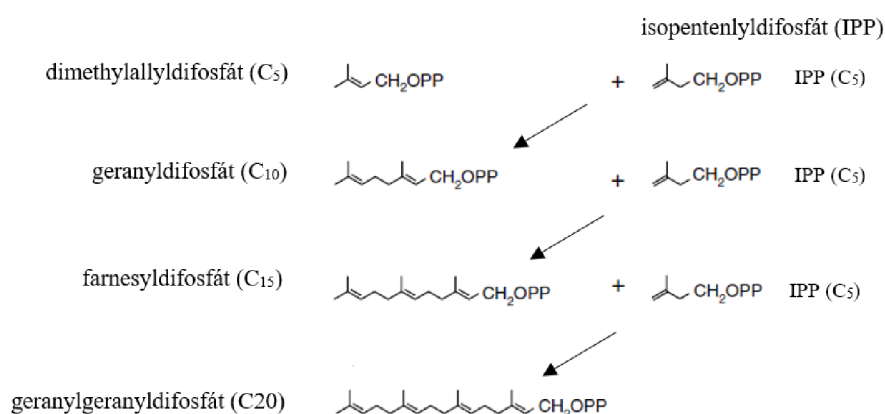
**Obrázek 4. Biosyntéza isopentenyldifosfátu (IPP) a jeho isomeru dimethylallyldifosfátu (DMAPP) v methylethritol fosfátové dráze.**

DXP 1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfát, MEP 2-C-methyl-D-erythritol-4-fosfát, CDP-ME 4-difosfocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol, CDP-MEP 4-difosfocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol-2-fosfát, cMEPP 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyklodifosfát, HDMBPP 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-difosfát; (1) 1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfát synthasa (EC 2.2.1.7), (2) 1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfát-reduktoisomerasa (NADPH; EC 1.1.1.267), (3) 2-C-methyl-D-erythritol-4-fosfát cytidyltransferasa (CTP; EC 2.7.7.60), (4) 4-difosfocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinasa (ATP; EC 2.7.1.148), (5) 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyklodifosfát synthasa (EC 4.6.1.12), (6) 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-difosfát synthasa (EC 1.17.7.3), (7) 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-difosfát reduktasa (NADPH; EC 1.17.7.4), (8) isopentenyldifosfát isomerasa (EC 5.3.3.2); upraveno dle Fox & Poulter (2005).

V rámci biosyntézy terpenoidů pak dochází k adici IPP (C<sub>5</sub>) na jeho isomer DMAPP (C<sub>5</sub>), za vzniku geranyldifosfátu (GDP). Následnou kondenzací GDP (C<sub>10</sub>) s dalšími jednotkami IPP vzniká farnesyldifosfát (FDP, C<sub>15</sub>), geranylgeranyldifosfát (GGDP, C<sub>20</sub>; Obrázek 5) a další složitější molekuly obecně označované jako prenyldifosfáty (C<sub>>10 000</sub>). V rámci těchto elongačních reakcí, katalyzovaných enzymy všeobecně známými jako prenyltransferasy, vznikají sloučeniny, které tvoří lineární základ uhlíkového skeletu širokého spektra terpenoidů. GDP je prekurzorem monoterpenů, FDP seskviterpenů a triterpenů a GGDP slouží k syntéze

20- a 40-uhlíkatých struktur, včetně karotenoidů a isoprenoidního řetězce tokochromanolů (Chang et al. 2021; Styrzewska et al. 2013).

Dlouho se předpokládalo, že tokochromanoly mohou být syntetizovány výhradně fotosyntetizujícími organismy, karotenoidy pak také některými nefotosyntetizujícími bakteriemi a houbami. Schopnost produkovat tyto látky byla ale zjištěna i u jiných nefotosyntetizujících organismů, jako je parazit *Plasmodium falciparum* schopný syntetizovat  $\alpha$ - a  $\gamma$ -tokoferol (Sussmann et al. 2011) nebo u vybraných členovců produkujících karotenoidy (Sun et al. 2020).



Obrázek 5. Schéma biosyntézy vybraných prenyldifosfátů (upraveno dle Ashour et al. 2010).

## 2.5. Biosyntéza karotenoidů

Vlastní biosyntéza karotenoidů (Obrázek 6) probíhá v plastidech a je řízena enzymy kódovanými v buněčném jádře, které jsou po jejich syntéze přesunuty do plastidů, kde podléhají posttranslačním modifikacím. Redukční kondenzací dvou molekul GGDP vzniká první bezbarvý karotenoidní produkt 15-*cis*-fytoen. Tato reakce katalyzovaná fytoen synthasou, je považována za limitující krok syntézy karotenoidů. Následuje postupná dehydrogenace a isomerace 15-*cis*-fytoenu na all-*trans*-lykopen, ke které může docházet dvěma odlišnými způsoby podle typu organismu. U většiny bakterií schopných syntézy karotenoidů je acyklický prototyp karotenů 15-*cis*-fytoen přeměněn na all-*trans*-lykopen přes meziprodukt all-*trans*- $\zeta$ -karoten prostřednictvím jediného enzymu, kterým je bakteriální fytoen desaturasa, katalyzující isomeraci na dvojně vazbě mezi C15 a C15' a čtyři desaturační reakce v pozicích 7, 11, 11' a 7' (Moise et al. 2014).

U rostlin (a kyanobakterií) je tato přeměna řízena prostřednictvím čtyř různých enzymů, konkrétně to jsou fytoen desaturasa (PDS),  $\zeta$ -karoten isomerasa (Z-ISO),  $\zeta$ -karoten desaturasa (ZDS) a karotenoid isomerasa (CRTISO). Působením PDS dochází ke dvoustupňové desaturaci 15-*cis*-fytoenu, při které se počet konjugovaných dvojných vazeb zvyšuje nejdříve ze tří na pět, čímž vzniká 15,9'-di-*cis*-fytofluen a poté na sedm u 9,15,9'-tri-*cis*- $\zeta$ -karotenu. Tento

meziprodukt je následně enzymem Z-ISO přeměněn na 9,9'-di-*cis*-ζ-karoten, nicméně tato reakce může být zprostředkována také působením světla, a proto není aktivita Z-ISO ve tkáních vystavených slunečnímu záření nezbytná (Baranski & Cazzonelli 2016). Ve druhém cyklu dvoustupňové desaturace je centrální nenasycený fragment 9,9'-di-*cis*-ζ-karotenu prodloužen pomocí ZDS nejdříve na devět konjugovaných dvojných vazeb v molekule 7,9,9'-tri-*cis*-neurosporenu a poté na jedenáct u 7,9,9',7'-tetra-*cis*-lykopenu (prolykopenu). Ten je následně isomerován prostřednictvím enzymu CRTISO na all-*trans*-lykopen, systematickým názvem ψ,ψ-karoten (Sun et al. 2020). Stejně jako v případě Z-ISO nebrání nedostatečná aktivita CRTISO ve tkáních vystavených světlu tvorbě all-*trans*-lykopenu, avšak fotoisomerace je v obou případech méně účinná (Baranski & Cazzonelli 2016). V desaturačních sekvencích jsou jako akceptory elektronů využívány oxidované molekuly plastochinonu, které mohou být následně regenerovány činností plastidiální terminální oxidasy nebo přenosem elektronů ve fotosyntetické tkáni, případně také alternativním způsobem prostřednictvím plastochinol-O<sub>2</sub> oxidoreduktasy ve tkáních nefotosyntetických. Narušením biosyntézy plastochinonů v plastidech tak může docházet k omezené desaturaci fytoenu a tím i k omezení biosyntézy karotenoidů (Sandmann 2009).

Další fáze je místem větvení biosyntetické dráhy a spočívá v cyklizaci jednoho nebo obou konců acyklické molekuly lykopenu, kterou zajišťují enzymy ze skupiny lykopen cyklas (LCY). Činností těchto enzymů dochází ke vzniku šestičlenných, tzv. iononových kruhů s jednou dvojnou vazbou a třemi methylovými skupinami, které se liší polohou dvojných vazeb v rámci cyklu (Stange & Flores 2012). LCYB umožňující cyklizaci obou konců lineární struktury lykopenu katalyzuje syntézu β-iononového kruhu. Tvorbou této struktury na jednom konci lykopenu vzniká asymetrický γ-karoten (systematicky β,ψ-karoten) a následnou cyklizací opačného konce řetězce dochází ke vzniku β-karotenu (β,β-karoten). LCYE, jež vede reakci k tvorbě α-iononového cyklu, obvykle modifikuje pouze jeden konec molekuly a přeměny monocyklického karotenu není schopná. Působením LCYE dochází k přeměně lykopenu na δ-karoten (ψ,ε-karoten), jehož zbývající acyklický konec může být činností LCYB cyklizován za vzniku α-karotenu (β,ε-karoten), v jehož struktuře je obsažen jeden α-iononový a na druhém konci β-iononový cyklus. Výjimkou je jediný známý homolog LCYE vyskytující se v salátu, který je schopný cyklizovat oba konce lykopenu a vytvářet tak ε-karoten (ε,ε-karoten). Monocyklické karoteny jsou obvykle okamžitě přeměněny na bicyklické, které se proto v rostlinách vyskytují mnohem častěji, přičemž nejvíce zastoupený je β-karoten (Baranski & Cazzonelli 2016).

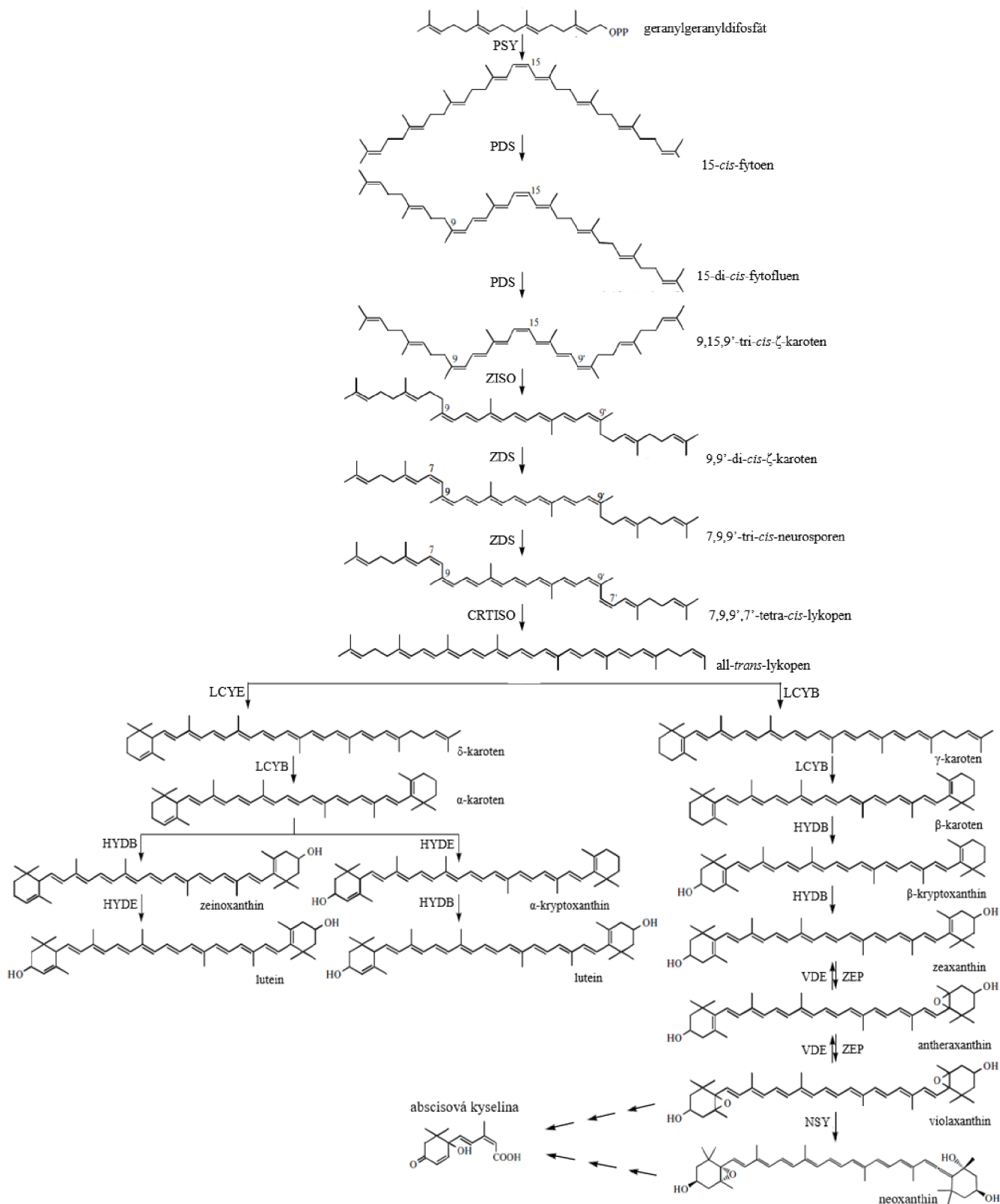
Bicyklické molekuly karotenů pak mohou být modifikovány vytvářením různých funkčních skupin obsahujících kyslík za vzniku strukturně rozmanitého spektra xanthofylů. Postupnou



hydroxylací C3 iononových kruhů  $\beta$ -karotenu dochází nejdříve ke vzniku  $\beta$ -kryptoxanthinu a následně zeaxanthinu a analogickým způsobem vede hydroxylace  $\alpha$ -karotenu nejprve k tvorbě  $\alpha$ -kryptoxanthinu (případně zeinoxanthinu) a poté luteinu. Hydroxylace je jednou z nejčastějších modifikací cyklických struktur karotenů a může být řízena prostřednictvím odlišných enzymatických mechanismů, zahrnujících různé typy hydroxylas a cytochromy P450. Následné epoxidační reakce vedou k tvorbě mnoha různých karotenoidů, z nichž nejběžnější jsou ty, které se účastní xanthofylového cyklu, v jehož průběhu může docházet k reverzibilním přeměnám katalyzovaným zeaxanthin epoxidasou (ZEP) a violaxanthin deepoxidasou (VDE). Epoxidací hydroxylovaných  $\beta$ -cyklů zeaxanthinu prostřednictvím ZEP postupně vzniká antheraxanthin a poté violaxanthin, přičemž tyto reakce mohou být za intenzivního působení světla převráceny činností VDE. Porušením vazby epoxidové skupiny violaxanthinu působením neoxanthin synthasy může vznikat neoxanthin, jehož tvorba představuje poslední krok biosyntetické dráhy karotenoidů (Baranski & Cazzonelli 2016; Lu & Li 2008).

### **2.5.1. Významné degradační produkty karotenoidů**

Koncové produkty biosyntézy karotenoidů mohou být katabolizovány prostřednictvím neenzymatických mechanismů, jako je fotooxidace nebo působením nespecifických enzymů, jako jsou lipoxygenasy a peroxidasy. V důsledku těchto degradačních reakcí dochází ke vzniku apokarotenoidních signálních molekul, které zastávají v rostlinných organismech rozličné funkce, včetně účasti na jaderných procesech. Některé apokarotenoidy mohou vznikat také oxidačním štěpením karotenoidů řízeným enzymy označovanými jako karotenoid štěpící dioxygenasy (CCDs; carotenoid cleavage dioxygenases). Činností CCDs mohou být violaxanthin a neoxanthin štěpeny za vzniku xanthoxinu, přímého prekurzoru abscisové kyseliny (ABA) (Baranski & Cazzonelli 2016; Lu & Li 2008). ABA je fytohormon, který hraje klíčovou roli v řadě procesů souvisejících s růstem rostlin a jejich tolerancí vůči abiotickým stresovým faktorům (Dong et al. 2015). Další významnou skupinou fytohormonů náležící do skupiny apokarotenoidů jsou strigolaktony, které vznikají degradací  $\beta$ -karotenu. Jejich význam spočívá především v regulaci transportu auxinů, v důsledku čehož ovlivňují větvení výhonků, vývoj kořenů, ale i růst dalších částí rostlin nebo klíčení semen (Dvořáková & Vaněk 2015).



**Obrázek 6. Biosyntéza karotenoidů.**

PSY fytoen synthasa (EC 2.5.1.32), PDS fytoen desaturasa (EC 1.3.5.5), Z-ISO ζ-karoten isomerasa (EC 5.2.1.12), ZDS ζ-karoten desaturasa (EC 1.3.5.6), CRTISO karotenoid isomerasa (EC 5.2.1.13), LCYE lykopen ε-cyklasa (EC 5.5.1.18), LCYB lykopen β-cyklasa (EC 5.5.1.19), HYDB β-karoten hydroxylasa (EC 1.14.15.24), HYDE ε-karoten hydroxylasa (EC 1.14.14.158), VDE violaxanthin deepoxidasa (EC 1.23.5.1), ZEP zeaxanthin epoxidasa (EC 1.14.15.21), NSY neoxanthin synthasa (EC 5.3.99.9); upraveno dle Smolikova & Medvedev (2015).

### 2.5.2. Akumulace

Karotenoidy mohou být syntetizovány ve většině rostlinných pletiv téměř ve všech druzích plastidů, s výjimkou bezbarvých proplastidů, přičemž různé typy těchto organel vykazují odlišné schopnosti syntetizovat a uchovávat tyto pigmenty. V chloroplastech je většina karotenoidů lokalizována v thylakoidní membráně ve formě pigment-proteinových komplexů, kde zastávají zásadní úlohu v rámci světlosběrného aparátu obou fotosystémů. Velké množství karotenoidních pigmentů je kumulováno v chromoplastech, které mohou např. při dozrání plodů vznikat z chloroplastů odbouráním chlorofylových pigmentů a jejich nahrazením karotenoidy. Během této přeměny dochází k transportu karotenoidních barviv do lipidových útvarů, označovaných jako plastoglobuly, kde jsou uložena v podobě různých karotenoid-lipoproteinových struktur (globulárních, fibrilárních, tubulárních, membránových, či krystalických), podle jejichž charakteru jsou rozlišovány i jednotlivé typy chromoplastů. Karotenoidy lokalizované v chromoplastech, které oproti karotenoidům uloženým v membránách chloroplastů vykazují mnohem vyšší světelnou stabilitu, se významně podílejí na ochraně lipidových a bílkovinných složek membrán před fotooxidačním poškozením (DellaPenna & Pogson 2006; Sathasivam et al. 2021). Etioplasty rostlin rostoucích v temnu, které se působením světla vyvíjejí v chloroplasty, mají nízkou biosyntetickou aktivitu a obsahují jen velmi nízké hladiny karotenoidů. Oproti tomu elaioplasty specializované na ukládání lipidů, představují příhodné místo pro akumulaci těchto hydrofobních pigmentů. U obilovin, ale i jiných základních plodin, např. brambor, jsou karotenoidy syntetizovány a kumulovány také v amyloplastech, které však postrádají vhodné struktury pro jejich uchování, a proto jsou v nich syntetizované karotenoidy často náchylnější k degradaci (Li & Yuan 2013).

Úroveň akumulace karotenoidů v zelených pletivech je relativně stabilní, přičemž nejhojněji jsou, v sestupném pořadí, zastoupeny lutein,  $\beta$ -karoten, violaxanthin a neoxanthin. Oproti tomu v nezelených tkáních (květy, plody a semena) obsah karotenoidů značně kolísá a může být výrazně ovlivněn mnoha faktory, jako je vývojové stadium, abiotické a biotické faktory nebo kombinace obou vlivů. V obilných zrnech je zpravidla nejhojněji obsažen lutein a zastoupen bývá také zeaxanthin, antheraxanthin či  $\beta$ -karoten (Sathasivam et al. 2021).

### 2.6. Biosyntéza tokochromanolů

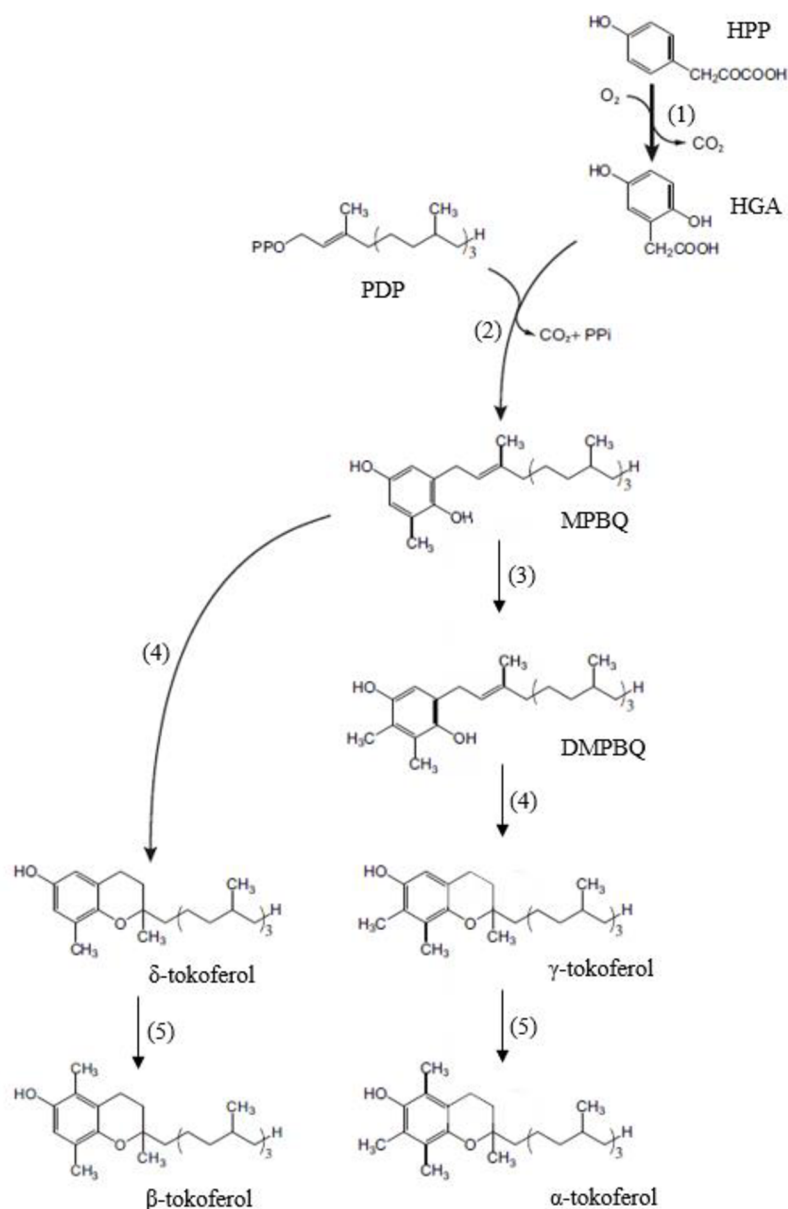
V biosyntetické dráze tokolů (Obrázek 7) je zásadní kondenzace polární chromanolové části, která je odvozena od metabolismu aromatické homogentisové kyseliny (HGA) a prekurzorových molekul lipofilního uhlovodíkového řetězce. Pro syntézu tokotrienolů je tímto prekurzorem GGDP. Pro tvorbu tokoferolů, musí být GGDP nejdříve přeměněn na

fytyldifosfát (PDP) prostřednictvím enzymu GGDP reductasy, jehož působením dochází k redukci tří ze čtyř dvojných vazeb v molekule GGDP za vzniku PDP (DellaPena & Pogson 2006).

Prvním krokem biosyntézy chromanolové části je syntéza *p*-hydroxyfenylpyruvátu (HPP), který může být syntetizován v šikimátové dráze přes meziprodukt prefenát nebo transaminací tyrosinu. Vzniklý HPP je činností enzymu *p*-hydroxyfenylpyruvát dioxygenasy přeměněn na HGA. Jde o složitou, nevratnou enzymatickou reakci, ve které dochází k oxidační dekarboxylaci postranního řetězce, jeho migraci do pozice 2 aromatického cyklu a k hydroxylaci v poloze 1 (Fritsche et al. 2017).

V další fázi dochází působením enzymu homogentisát prenyltransferasy (HPT) nebo homogentisát geranylgeranyltransferasy (HGGT), ke kondenzaci HGA a PDP nebo GGDP, čímž vzniká 2-methyl-6-fytylplastochinol (MPBQ) nebo 2-methyl-6-geranylgeranylplastochinol (MGGBQ). Tento krok je hlavním místem regulace biosyntetické dráhy a aktivita HPT a HGGT je tedy v procesu tvorby tokoferolů a tokotrienolů naprosto klíčová (Muñoz & Munné-Bosch 2019). MPBQ, respektive MGGBQ jsou prvními společnými meziprodukty pro syntézu všech tokoferolů, respektive tokotrienolů (Bramley et al. 2000; DellaPena & Pogson 2006; Fritsche et al. 2017).

Methylací benzenového jádra MPBQ nebo MGGBQ v pozici 3, dochází k formaci 2,3-dimethyl-6-fytyl-1,4-benzochinonu (DMPBQ) nebo 2,3-dimethyl-6-geranylgeranyl-1,4-benzochinonu (DMGGBQ). MPBQ a DMPBQ (nebo MGGBQ a DMGGBQ) jsou substráty pro enzym tokoferolcyklastu, jehož působením vzniká z MPBQ  $\delta$ -tokoferol (z MGGBQ  $\delta$ -tokotrienol), který může být dále přeměněn prostřednictvím enzymu  $\gamma$ -tokoferol methyltransferázy na  $\beta$ -tokoferol (resp.  $\beta$ -tokotrienol). Tytéž enzymy účinkují i v úseku biosyntetické dráhy odvozené od DMPBQ (resp. DMGGBQ), v tomto případě je prvním produktem  $\gamma$ -tokoferol (resp.  $\gamma$ -tokotrienol), ze kterého následně vzniká  $\alpha$ -tokoferol (resp.  $\alpha$ -tokotrienol) (DellaPenna & Pogson, 2006; Fritsche et al. 2017).



**Obrázek 7. Biosyntéza tokoferolů.**

HPP *p*-hydroxyfenylpyruvát, PDP ftyldifosfát, MPBQ 2-methyl-6-fytylplastochinon, DMPBQ 2,3-dimethyl-6-fytyl-1,4-benzochinon; (1) *p*-hydroxyfenylpyruvát dioxygenasa (EC 1.13.11.27), (2) homogentisát prenyltransferasa (EC 2.5.1.115), (3) MPBQ methyltransferasa (EC 2.1.1.295), (4) tokoferol cyklasa (EC 5.5.1.24), tokoferol methyltransferasa (EC 2.1.1.95); upraveno dle Mène-Saffrané & DellaPenna (2010).

### 2.6.1. Akumulace

Primárním místem akumulace tokochromanolů jsou plastidy, kde probíhá i jejich biosyntéza, ale jejich výskyt byl zaznamenán také ve vakuolách a buněčných jádrech listů ječmene, nebo v mitochondriích zelených řas. V obilovinách a jiných semenech mohou být lokalizovány také v jiných extraplastidiálních buněčných kompartmentech, jako jsou lipidová tělíska v buněčném cytosolu, ve kterých je uloženo velké množství zásobních lipidů

a tokochromanoly se zde podílejí na jejich ochraně před oxidačním poškozením (Falk & Munné-Bosch 2010; Mène-Saffrané & DellaPenna 2010).

Přestože jsou rozdíly ve struktuře jednotlivých forem nepatrné, značně ovlivňují jejich biologickou aktivitu a také přítomnost a akumulaci v rostlinách (Muñoz & Munné-Bosch 2019). Tokoferoly se vyskytují ve všech fotosyntetizujících organismech, v listech, semenech, kořenech, plodech i stoncích. Oproti tomu tokotrienoly jsou v rostlinné říši rozšířeny podstatně méně a jsou přítomny pouze v některých skupinách rostlin, a to téměř výhradně v semenech a plodech. Zatímco tokotrienoly jsou v rostlinách obsaženy často ve formě esterů, tokoferoly existují pouze jako volné alkoholy (Combs & McClung 2017). Obsah i zastoupení jednotlivých forem je velmi různorodé, nicméně ve fotosyntetických tkáních je převládající formou  $\alpha$ -tokoferol, zatímco v semenech jednoděložných rostlin jsou často hojněji zastoupeny tokotrienoly. Navzdory převažujícímu zastoupení tokotrienolů je v semenech obecně akumulováno až dvacetkrát více tokoferolů než v listech. V obilných zrnech se tokoferoly vyskytují převážně v klíčku a v perikarpu, zatímco tokotrienoly zejména v aleuronové vrstvě a endospermu (Falk & Munné-Bosch 2010; Mène-Saffrané & DellaPenna 2010).

## **2.7. Funkce karotenoidů a tokochromanolů ve fotosyntéze**

Fotosyntéza, jeden z nejdůležitějších procesů na Zemi, zahrnuje řadu fotochemických reakcí, při kterých dochází k přeměně energie slunečního záření do formy energie chemické (ATP), využitelné autotrofními organismy pro syntézu organických látek. Principem nejběžnější formy fotosyntézy je světlem determinovaný přenos elektronů, pro který je nezbytná činnost světlosběrných pigmentů. Tyto pigmenty jsou u většiny organismů lokalizované v membránových útvech zvaných thylakoidy, které tvoří členitý systém vnitřního prostoru chloroplastů, tzv. stromatu. Ve dvouvrstevné struktuře thylakoidních membrán, sestávající z proteinových a lipidových základních komponent, jsou molekuly pigmentů a proteinů uspořádány do strukturních jednotek označovaných jako fotosystém I a II (FSI a FSII). Fotosystémy jsou tvořeny dvěma hlavními částmi, reakčním centrem a světlosběrným komplexem LHCI a LHCII (z anglického light-harvesting complex), někdy nazývaným jako anténní systém. V komplexech LHCI a LHCII jsou obsaženy molekuly chlorofylů a dalších fotosyntetických pigmentů, které slouží k přenosu energie zachyceného fotonu do reakčního centra daného fotosystému. Nejvýznamnějšími doplňkovými pigmenty, které usměřují energii absorbovaného světla do chlorofylových fragmentů reakčního centra a podněcují tak celý fotochemický proces jsou karotenoidy (nejčastěji  $\beta$ -karoten, lutein a zeaxanthin) a u některých kyanobakterií, sinic a řas také fykobiliny. Pro účinný přenos excitační energie je nezbytná specifická prostorová orientace jednotlivých molekul FSI a FSII,

kteřá je udržována pomocí bílkovinných složek těchto pigment-proteinových komplexů. FSI a FSII se liší pigmentovým složením, a tedy i účinností v jiné spektrální oblasti. V reakčním centru FSII jsou obsaženy speciální molekuly chlorofylu *a*, který je podle vlnové délky svého absorpčního maxima označován jako P680 a díky přítomnosti tohoto pigmentu je FSII jediným známým biologickým systémem, který disponuje schopností oxidovat vodu na molekulární kyslík (fotolýza vody). Součástí FSI, v němž dochází k redukci molekul  $\text{NADP}^+$ , je molekula chlorofylu *a* (P700) o vlnové délce maxima své absorpce 700 nm. S pigment-proteinovými komplexy fotosystémů jsou spojeny molekuly cytochromů a chinonů, které se podílejí na oxidaci vody a redukci  $\text{NADP}^+$  (Blankenship 2021; Zia-Ul-Haq 2021).

### 2.7.1. Význam karotenoidů

Fotosyntetickým aparátem může být účinně využito záření ze spektrální oblasti od 400 do 700 nm, které je označováno jako fotosynteticky aktivní a představuje téměř polovinu (47 %) z celkového záření emitovaného sluncem, které dopadá k zemskému povrchu (Blankenship 2021). Chlorofylové pigmenty absorbují a neúčinněji využívají fotony především z modré (400–450 nm) a červené (670–710 nm) oblasti spektra. Karotenoidy jsou jako pomocné světlosběrné struktury schopné zachytit záření ve spektrální oblasti 400–500 nm, kterou chlorofyly zcela nepokřývají a zvyšují tak rozmanitost absorbovaného záření (Zulfiqar et al. 2021).

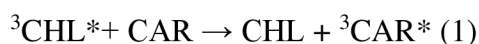
Jako funkční složky FSI a FSII mají karotenoidy i další významné role. Součástí LHCII zelených rostlin jsou dvě molekuly luteinu (lut1 a lut2), jejichž uspořádání ve tvaru „X“ napomáhá udržení prostorové struktury celého komplexu (Blankenship 2021). Přestože je molekulární struktura lut1 a lut2 stejná, jejich fotofyzikální vlastnosti a funkčnost jsou, zřejmě v důsledku konformačních modifikací řízených okolními proteiny, odlišné. Tyto molekuly jsou zodpovědné za přenos energie na chlorofyly a zároveň jsou schopné tuto energii v případě jejího nadbytku zhaset. Lutein tak hraje ústřední roli v řízení absorbované světelné energie a v jejím efektivním rozložení mezi chromofory. Celý tok excitační energie z vyšších do nižších energetických stavů je v podstatě modulován a optimalizován prostřednictvím molekul lut2 (Collini 2019).

#### 2.7.1.1. Fotoprotektivní funkce

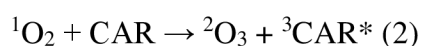
Světlo je nejen základní hnací silou fotosyntézy, ale zároveň i stresovým faktorem, který může vyvolat sekundární destruktivní procesy. Absorpcí fotonu je vyvolána excitace molekuly pigmentu, tedy jeho přechod na vyšší energetickou hladinu. Při nadměrném působení slunečního záření dochází k akumulaci excitační energie ve světlosběrných komplexech (LHCI a LHCII), která může vyvolat přechod molekul chlorofylu do nestabilních tripletových stavů

(<sup>3</sup>CHL\*). Ve snaze vrátit se do základního stavu může <sup>3</sup>CHL\* interagovat s molekulárním kyslíkem a převést ho tak do excitovaného (singletového) stavu (Blankenship 2021; Collini 2019). Na tomto místě je vhodné zdůraznit, že většina biogenních molekul má v základním energeticky nejnižším stavu všechny své elektrony spárovány, jsou tedy ve stavu singletovém. Elektronová konfigurace základního stavu molekulárního atmosférického kyslíku je odlišná, neboť má v nejvyšším antivazebném orbitalu dva nepárové elektrony s paralelními spiny a nachází se tedy ve stavu tripletovém (multiplicita spinu = 3) (Lang et al. 2005). Přebytečná energie absorbovaná chlorofylovými pigmenty zároveň podněcuje přímou redukci atmosférického kyslíku prostřednictvím FSII, což také vede k tvorbě jeho reaktivních forem, jejichž působení je pro fotosyntetický aparát škodlivé (vede např. k peroxidaci lipidů thylakoidních membrán) (Blankenship 2021).

Jako funkční složky fotosystémů se karotenoidy významně podílejí na ochraně před tímto fotooxidačním poškozením, neboť dovedou účinně zhaset energii excitovaného tripletového chlorofylu dříve, než může reagovat s kyslíkem, čímž zamezují vzniku jeho singletového stavu (1). Tuto schopnost vykazují pouze karotenoidy, v jejichž molekule je alespoň 9 konjugovaných dvojných vazeb (Zulfiqar et al. 2021).



Karotenoidy jsou rovněž schopny zhaset singletový kyslík (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) a ostatní kyslíkové radikály, pokud nějakým způsobem dojde k jejich vzniku. Obecným principem zhasení je přenos excitační energie z <sup>1</sup>O<sub>2</sub> na molekulu karotenoidu, čímž kyslík přechází zpět do základního stavu a karotenoid je naopak excitován do stavu tripletového, ze kterého se může navrátit zpět do základního stavu za uvolnění energie ve formě tepla (2). Karotenoid tak může projít více cykly zhasení <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (Zulfiqar et al. 2021).



Schopnost karotenoidů zhaset <sup>1</sup>O<sub>2</sub> se zvyšuje v závislosti na počtu konjugovaných dvojných vazeb, přičemž nejvyšší potenciál mají v tomto ohledu ty, které mají devět a více dvojných vazeb (Zulfiqar et al. 2021).

Proti poškození vyvolanému nadbytkem světla se mohou fotosyntetické organismy bránit také prostřednictvím různých mechanismů, které zahrnují konformační změny pigment-proteinových komplexů a syntézu specifických molekul napomáhajících zpracovat nadbytečnou energii. Základním ochranným mechanismem je fosforylace LHCI a jeho odpojení od FSII, čímž dochází k zabránění přenosu energie do reakčního centra. Elektrony jsou za těchto okolností přenášeny alternativním způsobem, prostřednictvím cyklického elektronového transportu, v jehož důsledku dochází ke zvýšení koncentrace H<sup>+</sup> ve vnitřním



prostoru (lumen) thylakoidů. Okyselení vede k aktivaci enzymu violaxanthin deepoxidasy (VDE) a následnému spuštění xanthofylového cyklu, v rámci kterého je violaxanthin působením VDE přeměněn přes meziprodukt antheraxanthin na zeaxanthin. Zeaxanthin, který vykazuje silné fotoprotektivní vlastnosti, je schopen prostřednictvím disipace energie zabránit poškození reakčního centra (Latowski et al. 2004).

### **2.7.2. Význam tokochromanolů**

Tokochromanoly jsou součástí složitějšího systému protektivních mechanismů, které ve vzájemné souhře chrání světlosběrné tkáně před fotooxidačním poškozením. Obzvláště důležité jsou při intenzivním působení světelného stresu nebo při absenci, či selhání jiných ochranných mechanismů (xanthofylový cyklus nebo jiné antioxidační látky) (Falk & Munné-Bosch 2010). Tokochromanoly, zejména  $\alpha$ -tokoferol, účinně neutralizují molekuly  $^1\text{O}_2$  prostřednictvím dvou různých mechanismů. První z nich (fyzikální), je analogický k mechanismu (2) u karotenoidů. Spočívá v rezonančním přenosu a následném tepelném rozptylu přebytečné energie, přičemž jediná molekula  $\alpha$ -tokoferolu může deaktivovat až 120 molekul  $^1\text{O}_2$ , než je zcela degradována. Druhý způsob (chemický) je založen na přímé reakci vedoucí k porušení/otevření chromanolového cyklu za vzniku tokoferyl chinonů, při které je na neutralizaci jedné molekuly  $^1\text{O}_2$  spotřebována jedna molekula tokoferolu. Chinony mohou být však prostřednictvím NADPH dependentní chinon oxidoreduktasy, za současného působení askorbátu, glutathionu a tokoferol cykly regenerovány na výchozí tokochromanolové molekuly (Muñoz & Munné-Bosch 2019).

Účastí na stabilizaci struktur thylakoidních membrán a na regulaci redoxního stavu v chloroplastech tokochromanoly zásadně přispívají k ochraně fotosystémů před škodlivým působením singletového kyslíku. Některé formy tokochromanolů se také mohou podílet na fyziologických procesech rostlin, jako je klíčení semen, kvetení, stárnutí listů nebo reakce na různé abiotické stresové faktory. Tokoferoly hrají klíčovou roli v regulaci peroxidace lipidů během klíčení a ranného růstu rostlin. Nedostatek tokoferolů může také způsobit omezení transportu a distribuce sacharidů v rostlinách, jejichž nadměrná akumulace pak může vést k poruchám růstu a předčasnému stárnutí, ale také k podpoře tvorby anthokyanů, které mohou částečně kompenzovat nedostatek tokoferolů a chránit rostlinné tkáně před fotooxidací (Falk & Munné-Bosch 2010).

## **2.8. Význam karotenoidů a tokochromanolů pro člověka**

Předpokladem manifestace fyziologického působení karotenoidů a tokolů v organismu je jejich biologická dostupnost, která je určena účinností jejich absorpce z trávicího traktu do krevního oběhu (Bohn et al. 2015; Umbreen et al. 2021).

### 2.8.1. Biologická dostupnost a metabolismus karotenoidů

Z více než 750 různých karotenoidů, které se vyskytují v přírodě, je v lidské stravě obsaženo přibližně 60 druhů. Pouze 20 z nich bylo detekováno v plasmě a tkáních lidského těla, kde nejvíce zastoupené většinou bývají  $\alpha$ - a  $\beta$ -karoten, lykopen, lutein, zeaxanthin a  $\beta$ -kryptoxanthin. Absorpce karotenoidů přijatých potravou začíná v žaludku jejich uvolněním z potravní matrice a emulgací do lipidových kapének. Vstupem žaludeční emulze do dvanáctníku je stimulována sekrece žlučových kyselin, jejichž působením jsou karotenoidy spolu s hydrolyzovanými lipidy inkorporovány (solubilizovány) do micel. Tento proces je výrazně ovlivněn strukturou molekuly karotenoidu, přičemž obecně platí, že polárnější xanthofyly, které jsou v lipidových kapénkách lokalizovány blíže povrchu než karoteny, přechází do micel podstatně snadněji. Díky lepší rozpustnosti ve žlučových kyselinách jsou do micel přednostně zabudovávány *cis*- oproti *trans*-isomerům karotenoidů. Významným faktorem ovlivňujícím vstřebávání karotenoidů je také charakter potravní matrice. Z tekuté nebo tepelně upravené stravy jsou tyto látky uvolňovány rychleji a díky tomu jsou efektivněji zabudovávány do micel. Absorpce karotenoidů může být v závislosti na jejich struktuře také více či méně ovlivněna množstvím a složením v potravě obsažených lipidů. Micelizace lipofilních karotenů je s vyšším obsahem tuků ve stravě usnadněna v daleko větší míře než v případě polárnějších xanthofylů (Bohn et al. 2021; Reboul 2019; Yonekura & Nagao 2007).

V podobě micel jsou karotenoidy buď pasivní difuzí, nebo prostřednictvím specifických transportních systémů absorbovány do enterocytů. Jedním z klíčových přenašečů karotenoidních molekul je transmembránový glykoprotein SR-BI (z anglického scavenger receptor class B type I), který se díky své nízké substrátové specifitě podílí na transportu řady dalších lipofilních látek (Meléndez-Martínez et al. 2019; Reboul 2019; Umbreen et al. 2021). Část karotenoidů může být ze střevních buněk zpětně vyplavena do lumen, což je pravděpodobně jedním z důvodů relativně omezené účinnosti absorpce těchto látek, která ovlivňuje jejich biologickou dostupnost (Reboul 2019). V závislosti na daném typu je do krevního oběhu vstřebáno 5–50 % z celkového množství potravou přijatých karotenoidů (Bohn et al. 2021). Karotenoidy, které nebyly vstřebány přes enterocyty, mohou působit antioxidantně přímo v trávicím traktu a chránit tak střevní epitelové buňky před poškozením způsobeným volnými radikály (Fardet et al. 2008).

V enterocytech je přibližně polovina karotenoidů štěpena na apokarotenoidy a retinoidy a polovina zůstává nezměněna. Karotenoidy i produkty jejich štěpení jsou ve formě esterů zabudovány ve střevních buňkách do chylomikronů a v této podobě vstřebány přes lymfatický systém do krve (Meléndez-Martínez et al. 2019; Reboul 2019). Chylomikronové částice jsou z krve vychytávány v játrech, kde mohou být karotenoidy i produkty jejich štěpení po

hydrolytickém uvolnění uskladněny, degradovány a vyloučeny, nebo opětovně zabudovány do lipoproteinových struktur. Jako součást lipoproteinů, a to především LDL (z anglického low density lipoprotein), jsou karotenoidy transportovány krevní plazmou k cílovým tkáním. Do buněk tkání jsou potom přijímány pomocí enzymatické degradace lipoproteinovou lipázou (Umbreen et al. 2021) za účasti různých transportních molekul jako např. SR-BI, které jsou nezbytné pro buněčnou distribuci těchto lipofilních látek (Toews et al. 2017). V cílových tkáních, kde jsou uloženy zejména v lipidových složkách membrán nebo v tukových kapénkách v cytosolu, karotenoidy značně napomáhají ochraně před oxidačním poškozením nebo mohou být využity pro tvorbu retinoidů (Umbreen et al. 2021).

#### 2.8.1.1. *Prekurzory vitamínu A*

Na speciální struktury vitamínu A mohou být přeměněny pouze karotenoidy s nenasyceným uhlovodíkovým řetězcem o minimální délce 11 uhlíků, které obsahují alespoň jeden nesubstituovaný  $\beta$ -iononový kruh, neboť aktivita vitamínu A je spojena právě s těmito dvěma strukturálními rysy (Blaner 2020). Nejdůležitějším prekurzorem vitamínu A je  $\beta$ -karoten, který je charakteristický přítomností  $\beta$ -iononového cyklu na obou koncích molekuly a teoreticky tak může být rozštěpen na dvě molekuly vitamínu A. Podle současných předpokladů je pro tvorbu 1  $\mu$ g retinolu potřeba přijmout z potravy 12  $\mu$ g  $\beta$ -karotenu. Poloviční provitaminovou aktivitu oproti  $\beta$ -karotenu mají  $\alpha$ - a  $\gamma$ -karoten, protože obsahují  $\beta$ -iononový kruh pouze na jednom konci molekuly, a také  $\beta$ -kryptoxanthin, u kterého je jeden ze dvou  $\beta$ -iononových kruhů hydroxylován (Zia-Ul-Haq 2021).

K přeměně karotenoidních prekurzorů vitamínu A dochází převážně prostřednictvím cytoplazmatického enzymu  $\beta$ ,  $\beta$ -karoten 15, 15'-oxygenasy (BCO1), který katalyzuje jejich centrální rozštěpení na retinaldehyd. K této přeměně může docházet prakticky ve všech tkáních těla, převážně však v enterocytech, kde je BCO1 vysoce koncentrována. Vzniklý retinal je bezprostředně poté retinol dehydrogenasou (RDH) reverzibilně redukován na retinol a esterifikován vyššími mastnými kyselinami. Estery retinolu i karotenoidy nevyužité k přeměně na vitamin A jsou spolu s ostatními potravními lipidy začleněny do chylomikronových částic a v této podobě vstřebány přes lymfatický systém do krevního řečiště a transportovány k cílovým tkáním (Blaner 2020). Střevní absorpce a přeměna provitaminů na retinoidy podléhá regulaci zpětnou vazbou, což při dostatečném množství provitaminových molekul zajišťuje adekvátní tvorbu vitamínu A podle aktuální potřeby organismu (von Lintig 2012).

V běžném moderním použití se termín vitamin A vztahuje souhrnně na retinol a jeho biologicky aktivní metabolity, které vznikají enzymatickou modifikací funkčních skupin nebo

geometrickou isomerací polyenového řetězce této volné alkoholové formy. V lidském organismu může být retinol oxidován činností RDH na aldehydickou formu retinal a ten může být následně v ireversibilní reakci řízené retinal oxidasou přeměněn na retinovou kyselinu. Všechny tyto formy vitamínu A se v organismu vyskytují převážně v konfiguraci *all-trans*, a protože jsou ve vysokých koncentracích toxické, jsou uskladňovány v podobě retinolových esterů ve specializovaných zásobních buňkách jater, ledvin, střev a plic. Tyto estery spolu s volným retinolem tvoří zpravidla více než 95 % veškerého množství vitamínu A v lidském těle. Nízké hladiny retinolu v krevní plazmě mohou být doplňovány jeho hydrolytickým uvolňováním ze zásobních esterových forem a teprve až při dlouhodobém deficitu v příjmu tohoto vitamínu dochází k projevům jeho nedostatku (Blaner 2020).

Vitamin A hraje důležitou roli v celé řadě fyziologických procesů, včetně vidění, imunitní odpovědi, diferenciaci a proliferaci buněk, mezibuněčné komunikace a reprodukce. Molekulární účinky vitamínu A zahrnují dva hlavní biochemické mechanismy, pro jejichž zprostředkování jsou nezbytné jeho metabolity *11-cis*-retinaldehyd a *all-trans*-retinová kyselina. Retinová kyselina je ligandem jaderných receptorů a působí jako velmi silný transkripční regulátor řady genů klíčových pro embryonální vývoj všech obratlovců. Aldehydická forma vitamínu A je nepostradatelná pro správnou funkci zraku a jeho tvorba v organismu začíná isomerací *all-trans*-retinolu na *all-cis*-retinol. Ten je následně oxidován na *11-cis*-retinal, který asociací se specifickými proteiny (opsiny) vytváří vizuální pigmenty (rhodopsiny). Pohlcením světla dopadajícího na oční sítnici dochází k rozštěpení rhodopsinu na opsin a *all-trans*-retinal, který je pro udržování této cyklické reakce zcela nepostradatelný. Ve vyšších koncentracích je retinal obsažen pouze v oční sítnici, v ostatních tkáních je podporována jeho zpětná přeměna na retinol, případně retinovou kyselinu (Blaner 2020; von Lintig 2012).

### **2.8.2. Biologická dostupnost a metabolismus tokochromanolů**

Vzhledem k podobným fyzikálně-chemickým vlastnostem je metabolismus tokochromanolů v gastrointestinálním traktu analogický k procesu, kterému podléhají karotenoidy i jiné lipofilní látky (Combs & McClung 2017). Přítomnost lipidů v lumen střeva a sekrece žlučových kyselin zajišťujících tvorbu micel je nezbytná pro absorpci tokochromanolů do střevních buněk, která je zprostředkována pomocí různých transportních molekul, včetně nespecifického přenašeče SR-BI. Z enterocytů jsou tokochromanoly v podobě chylomikronů transportovány do jater, kde jsou hydrolyticky uvolněny do cytosolu jaterních buněk. Volné tokochromanoly mohou být v játrech následně odbourávány působením  $\omega$ -hydroxyláz a  $\omega$ -oxidáz na polární molekuly odpovídajících karboxyethylhydroxychromanolů,

kteřé jsou konečnými produkty jejich katabolismu, nebo dojde k jejich zabudování do částic VLDL (z anglického very low density lipoprotein). K sekreci tokochromanolů z jater a jejich inkorporaci do plazmatických lipoproteinů dochází prostřednictvím  $\alpha$ -tokoferol transportního proteinu ( $\alpha$ -TTP), který má však k různým formám odlišnou afinitu v závislosti na jejich struktuře. Vazebná afinita  $\alpha$ -TTP je určena uspořádáním fytylového postranního řetězce, přítomností hydroxylové skupiny a stupněm methylace chromanolového kruhu, přičemž klíčová je methylová skupina v poloze C5. Uvedeným kritériím nejlépe odpovídá  $\alpha$ -tokoferol, což je důvodem jeho přednostní distribuce před ostatními formami, které mají k  $\alpha$ -TTP relativně nižší afinitu ( $\alpha$ -tokoferol, 100%;  $\beta$ -tokoferol, 38%;  $\gamma$ -tokoferol, 9%;  $\delta$ -tokoferol, 2%;  $\alpha$ -tokotrienol, 12%). Díky vazbě na  $\alpha$ -TTP jsou molekuly chráněné před hydroxylací (Arai & Kono 2021; Combs & McClung 2017; Schmölz et al. 2016).

V krevní plazmě se  $\alpha$ -tokoferol i ostatní tokochromanoly vyskytují také jako součást LDL a HDL (z anglického high density lipoprotein), mezi kterými jednoduše přechází pomocí transportního proteinu PLTP (z anglického phospholipid transport protein). Prostřednictvím PLTP za současného působení lipoproteinových lipáz dochází také k přenosu  $\alpha$ -tokoferolu z lipoproteinových částic do červených krvinek, v nichž je obsaženo až 25 % jeho celkového množství v krevní plazmě, a také do buněk centrálního nervového systému a tukové tkáně, která je hlavním místem depozice vitamínu E v lidském těle. Transport tokochromanolů do buněk cílových tkání může probíhat také prostou difuzí, nebo pomocí  $\alpha$ -TTP či jiných přenašečů, jako je TAP (z anglického tocopherol associated protein), TBP (tocopherol binding protein) nebo nespecifický SR-BI. (Combs & McClung 2017; Schmölz et al. 2016).

#### 2.8.2.1. *Vitamin E*

Za objevením a následným rozšířením studia vitamínu E stojí výzkum z počátku 20. let 19. století Herberta M. Evanse a Katherine S. Bishopové, kteří v lipidové frakci rostlinného materiálu identifikovali složku nezbytnou pro normální funkci reprodukčního systému potkanů a nazvali ji „faktor X“ (Evans & Bishop 1922). „Faktor X“ označovaný také jako „antisterilní faktor“ byl o dva roky později klasifikován jako vitamin E (Sure 1924). V následujících letech byl vitamin E izolován z oleje pšeničných klíčků a pojmenován  $\alpha$ -tokoferol (z řeckého *tókos* = narození dítěte, *phérein* = plodit a *ol* = alkohol), byla popsána jeho chemická struktura a vyvinuta metoda syntézy této látky. Funkce vitamínu E byla přičítána výhradně jeho antioxidační aktivitě, a to až do roku 1988, kdy byl navržen alternativní molekulární mechanismus spočívající v regulaci aktivity proteinkinasy C (Mahoney & Azzi 1988). Schopnost inhibovat tento enzym je základním principem ochranného působení vitamínu E proti rozvoji zánětu, různým kardiovaskulárním komplikacím nebo proti agregaci krevních

destiček. Vitamin E se dále může podílet na regulaci genové exprese a udržení fyziologických funkcí imunitního systému, jako je např. stimulace fagocytární funkce, která je významná při obraně organismu proti infekčním nemocím. Původně rozpoznáný vliv vitaminu E na plodnost potkanů nebyl u lidí potvrzen, namísto toho byly extrémně nízké hodnoty této látky v lidském organismu spojeny s onemocněním zvaným ataxie s izolovaným nedostatkem vitaminu E (AVED), což je vzácná porucha způsobená mutacemi v genu kódujícím  $\alpha$ -tokoferol transportní protein ( $\alpha$ -TTP), který je potřebný pro distribuci vitaminu E do periferních tkání a jeho retenci. Typickými příznaky tohoto onemocnění jsou zejména poruchy imunitní odpovědi organismu a periferních nervů projevující se znečitlivěním, brněním či bolestí částí končetin, zhoršením koordinace pohybu a degenerativními změnami páteře. AVED je jediné známé onemocnění způsobené nedostatkem vitaminu E, jehož rozvoji lze zabránit suplementací  $\alpha$ -tokoferolu. Schopnost prevence a léčby AVED nebyla u ostatních forem tokolů dosud prokázána, což je důvodem, proč tyto formy nemohou být nazývány jako vitamery ani jako formy vitaminu E (Khadangi & Azzi 2019; Szewczyk et al. 2021).

### **2.8.3. Antioxidační funkce**

V energetickém metabolismu aerobních organismů, při kterém je transport elektronů odebraných substrátům v oxidačně redukčních reakcích využíván k syntéze energie ve formě ATP, jsou kyslíkové radikály přirozenými meziprodukty, neboť kyslík funguje jako finální akceptor elektronů v respiračním řetězci (Gulcin 2020). Volné radikály jsou obecně vysoce reaktivní, nestabilní molekuly, v jejichž elektronovém obalu je nejméně jeden nepárový elektron a které jsou schopny, alespoň krátkodobě, samostatné existence (Pláteník 2009). Ve snaze dosáhnout stability mohou předat, nebo odejmout elektron jiné molekule, ze které tak vzniká nový volný radikál. Vyvolaná řetězová reakce může být ukončena pouze společnou reakcí dvou radikálů. V biologických systémech mohou volné radikály existovat v různých formách, z nichž největší význam mají reaktivní formy kyslíku (ROS; z anglického reactive oxygen species), které ale zároveň mohou způsobit nejzávažnější poškození tkání, tzv. oxidativní poškození (Murray et al. 2012). ROS, mezi které jsou řazeny i některé neradikálové molekuly, jako je např.  $^1\text{O}_2$ , mohou být v organismu vytvářeny v patologických, ale i fyziologických procesech, neboť určitá koncentrace těchto látek je nezbytná pro normální funkci buněčných systémů. ROS jsou součástí primární imunitní obrany fagocytujících buněk proti cizorodým látkám nebo mikroorganismům a podílejí se také na buněčné signalizaci (Gulcin 2020).

Hladina volných radikálů je v organismu regulována činností antioxidačních enzymů, ale také prostřednictvím neenzymatických substrátů s antioxidačními vlastnostmi. Pokud je však

rovnováha oxidačních a antioxidačních činitelů v organismu narušena, může dojít k přetížení antioxidační obrany a propagaci stavu označovaného jako oxidační stres. Za těchto podmínek pak ROS i jiné volné radikály mohou, na základě své chemické reaktivity, způsobit oxidační poškození buněčných makromolekul, které je významným faktorem fyziologického procesu stárnutí a patogeneze většiny lidských onemocnění. Jedním z nejvíce zkoumaných důsledků působení ROS je řetězová oxidace nenasycených mastných kyselin, která vede k tvorbě vysoce reaktivních peroxylových radikálů, jejichž působením dochází ke změně struktury i biologických funkcí napadených molekul, jako např. lipidů buněčných membrán (Murray et al. 2012).

Vymezení termínu „antioxidant“ prochází v souladu s pokrokem vědeckého výzkumu neustálým vývojem. Původní chemický pohled definující antioxidant jako látku, která pokud je přítomna v nízkých koncentracích ve srovnání s oxidovatelným substrátem, výrazně zpomaluje nebo inhibuje oxidaci tohoto substrátu (Halliwell 1990), byl v posledních letech překonán pojetím biologickým, podle kterého jsou antioxidanty látky, které mohou zabránit nebo zpomalit oxidační poškození buněk způsobené fyziologickými oxidanty s výrazně pozitivním redukčním potenciálem, jako jsou ROS a volné radikály (Apak et al. 2016; Pérez-Gálvez et al. 2020).

#### 2.8.3.1. *Antioxidační působení karotenoidů*

Díky své struktuře zahrnující řetězec konjugovaných dvojných vazeb, který je jejich prvním interakčním centrem s ostatními molekulami, jsou karotenoidy významnou součástí antioxidačního obranného systému organismu. Kromě jejich ochranného působení před fotooxidačním poškozením (popsaného v kapitole 2.7.1.1. *Fotoprotektivní funkce*), mohou fungovat jako antioxidanty v každém organismu bez ohledu na to, zda je schopen fotosyntézy. Antioxidační působení karotenoidů zahrnuje různé mechanismy, v závislosti na povaze volného radikálu a strukturním uspořádání karotenoidu. Radikálům s vysokým redoxním potenciálem, jako je např. oxid dusičitý ( $\text{NO}_2^{\bullet}$ ), odevzdá karotenoidní molekula elektron, čímž dochází ke vzniku radikálového kationtu  $[\text{Car}]^{+\bullet}$ . Druhým způsobem, kterým karotenoidy reagují s radikály vznikajícími např. v procesu peroxidace lipidů, je adice radikálu na molekulu pigmentu za vzniku karotenoid-radikálových aduktů  $[\text{Car-RX}]^{\bullet}$ , při které je nepárový elektron účinně delokalizován v polyenové struktuře. Karotenoidy efektivně vychytávají peroxylové radikály zejména v prostředí s nízkou koncentrací kyslíku, jako je tomu ve většině tělesných tkání. Radikálové produkty potom v organismu podstupují pozvolný molekulární rozklad za vzniku neradikálových sloučenin. Radikálové kationty  $[\text{Car}]^{+\bullet}$  navíc mohou být regenerovány do původního stavu prostřednictvím jiných karotenoidních molekul, ale i jiných antioxidantů, jako

je  $\alpha$ -tokoferol nebo askorbová kyselina. Antioxidační působení karotenoidů v lidském organismu má značný význam především v buněčných membránách, plazmatických lipoproteinech, tukové tkáni a v lipofilním prostředí obecně (Pérez-Gálvez et al. 2020). Jedním z karotenoidů s velmi silným antioxidačním potenciálem je lykopen, který je až dvakrát účinnější oproti  $\beta$ -karotenu. Dále je zásadní fyziologická funkce některých xanthofylů, zejména luteinu a zeaxanthinu, které slouží jako světelné filtry v kůži a oční sítnici, kde jsou koncentrovány ve žluté skvrně, chrání zrakový aparát před poškozením ultrafialovým zářením a snižují riziko rozvoje degenerativních onemocnění (Grudzinski et al. 2017).

#### 2.8.3.2. *Antioxidační působení tokochromanolů*

Antioxidační vlastnosti tokochromanolů jsou dány především schopností jejich heterocyklického systému darovat fenolový vodík volným radikálům, která je ovlivněna přítomností methylových skupin substituovaných na chromanolvý kruh v těsné blízkosti hydroxyly. Nejúčinnějšími donory vodíku jsou  $\alpha$ -, následně  $\beta$ - a  $\gamma$ - a konečně  $\delta$ -formy tokochromanolů (Falk & Munné-Bosch 2010). Hlavní princip antioxidačního působení tokoferolů a tokotrienolů spočívá v přerušení radikálové řetězové reakce tzv. zhašením peroxylových radikálů, jejichž reakční rychlost s tokoly je mnohonásobně vyšší než s nenasycenými mastnými kyselinami. Přenosem vodíkového protonu z fenolové skupiny tokochromanolu na peroxylový radikál dochází k tvorbě hydroperoxidu a chromanoxylového radikálu, který je díky delokalizaci nepárového elektronu v benzenovém kruhu stabilnější než původní peroxy. Chromanoxylové radikály, které jsou v případě antioxidačního působení  $\alpha$ -tokoferolu označovány jako  $\alpha$ -tokoferoxylové, mohou být regenerovány prostřednictvím askorbát-glutathionového cyklu, jehož činnost je stimulována nízkou hladinou  $\alpha$ -tokoferolu. Chromanoxylové radikály mohou také reagovat s další molekulou radikálu peroxylového za vzniku neradikálových oxidačních produktů tokochromanolů, nejčastěji chinonů nebo epoxidů, čímž dochází k ukončení radikálové řetězové reakce (Falk & Munné-Bosch 2010; Muñoz & Munné-Bosch 2019).

Díky amfipatické molekulární struktuře se tokochromanoly významně podílejí na stabilizaci biologických membrán, kde chrání lipidové složky před peroxidací. Tokochromanoly jsou v buněčných membránách ukotveny prostřednictvím polyprenylového řetězce, přičemž chromanolvá část se nachází na rozhraní membrány a okolního polárního prostředí. Vzhledem k přítomnosti nenasyceného postranního řetězce jsou molekuly tokotrienolů v buněčných membránách efektivněji distribuovány, což je pravděpodobně příčinou jejich prokazatelně lepších stabilizačních účinků ve srovnání s tokoferoly (Atkinson et al. 2008). Antioxidační působení je podpořeno schopností pohybu molekul tokochromanolů



v membránových strukturách (tzv. flip-flop movement), díky které jsou hydroxylové skupiny poskytující vodíkový proton lépe přístupné a představují účinný prostředek odstraňování peroxylových radikálů (Muñoz & Munné-Bosch 2019). Pro dosažení optimálního účinku je však nutné udržet koncentraci těchto látek ve specifických mezích, neboť jejich nadměrná akumulace může negativně ovlivnit membránovou fluiditu, která je důležitá pro zachování funkčnosti membrán, např. pro buněčnou signalizaci (Falk & Munné-Bosch 2010). Antioxidační účinky tokochromanolů jsou obzvláště účinné v prostředí s vysokou koncentrací kyslíku, čímž mohou efektivně doplňovat působení karotenoidů (Murray et al. 2012). Významné synergické antioxidační účinky tokochromanolů a karotenoidů, pozorované v řadě studií (Le Grandois et al. 2017; Shibasaki-Kitakawa et al. 2004; Schroeder et al. 2006; Wrona et al. 2003; Zhang et al. 2014) lze připisovat různým mechanismům jejich společného působení (Liu et al. 2022).

### 3. Cíle a hypotézy práce

- Cíl 1.** Stanovit zastoupení a obsah nutričně významných látek ze skupiny karotenoidů, tokochromanolů aj., v zrna širokého spektra nově vyšlechtěných genotypů pšenice.
- Cíl 2.** Stanovit změny v obsahu karotenoidů a tokochromanolů vlivem různých technologií potravinářského zpracování a během jejich jednotlivých kroků.
- Cíl 3.** Z běžných metod technologického zpracování pšeničného zrna vybrat optimální z hlediska zachování co možná nejvyššího obsahu karotenoidů a tokochromanolů.
- Hypotéza 1.** Zrno barevných genotypů pšenice obsahuje více nutričně významných látek (karotenoidů, tokochromanolů aj.) ve srovnání s odrůdami tradičně pěstovanými.
- Hypotéza 2.** Tokochromanoly se oproti karotenoidům vyznačují relativně vyšší stabilitou v průběhu technologického zpracování pšeničných zrn.
- Hypotéza 3.** Technologické procesy zpracování pšeničného zrna mají negativní vliv na obsah karotenoidů a tokochromanolů ve výsledných produktech.
- Hypotéza 4.** Vaření je z běžných metod zpracování pšeničného zrna nejšetrnější k obsaženým karotenoidům a tokochromanolům.

## 4. Publikované práce

### 4.1. Phenolic acids in kernels of different coloured-grain wheat genotypes

Paznocht L, Kotíková Z, Burešová B, Lachman J, Martinek P. 2020. Phenolic acids in kernels of different coloured-grain wheat genotypes. *Plant, Soil and Environment* **66**:57-64.

### 4.2. Carotenoid content of extruded and puffed products made of colored-grain wheats

Paznocht L, Burešová B, Kotíková Z, Martinek P. 2021. Carotenoid content of extruded and puffed products made of colored-grain wheats. *Food Chemistry* 340 (127951) DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127951.

### 4.3. Changes in carotenoids and tocopherols of colored-grain wheat during unleavened bread preparation

Burešová B, Paznocht L, Kotíková Z, Giampaglia B, Martinek P, Lachman J. 2021. Changes in carotenoids and tocopherols of colored-grain wheat during unleavened bread preparation. *Journal of Food Composition and Analysis* 103 (104108) DOI: 10.1016/j.jfca.2021.104108.

### 4.4. The Effect of Boiling and in Vitro Digestion on the Carotenoid Content of Colored-grain Wheat

Burešová B, Paznocht L, Jarošová V, Doskočil I, Martinek P. 2023. The Effect of Boiling and in Vitro Digestion on the Carotenoid Content of Colored-grain Wheat. *Journal of Food Composition and Analysis* 115 (105002) DOI: 10.1016/j.jfca.2022.105002.

## **4.1. Phenolic acids in kernels of different coloured-grain wheat genotypes**

<https://doi.org/10.17221/380/2019-PSE>

## Phenolic acids in kernels of different coloured-grain wheat genotypes

LUBOŠ PAZNOCHT<sup>1</sup>, ZORA KOTÍKOVÁ<sup>1</sup>, BARBORA BUREŠOVÁ<sup>1</sup>, JAROMÍR LACHMAN<sup>1\*</sup>,  
PETR MARTINEK<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources,  
Czech University of Life Sciences Prague, Prague, Czech Republic

<sup>2</sup>Agrotest fyto, Ltd., Kroměříž, Czech Republic

\*Corresponding author: [lachman@af.czu.cz](mailto:lachman@af.czu.cz)

**Citation:** Paznocht L., Kotíková Z., Burešová B., Lachman J., Martinek P. (2020): Phenolic acids in kernels of different coloured-grain wheat genotypes. *Plant Soil Environ.*, 66: 57–64.

**Abstract:** The content of free, conjugated and bound phenolic acids in 12 wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes of 4 different grain colours (standard red, yellow endosperm, purple pericarp and blue aleurone) from 2-year field trial was analysed in the present study. Significant increase (8%) in the total phenolic acid content was observed in the dryer year 2017. Five phenolic acids (ferulic, sinapic, *p*-coumaric, vanillic and 4-hydroxybenzoic) and *cis*-isomers of ferulic and sinapic acid were determined by HPLC-DAD (high-performance liquid chromatography with a diode-array detector) in grain samples. The total phenolic acid content of coloured wheat groups varied: blue aleurone > purple pericarp > yellow endosperm > red colour (798 > 702 > 693 > 599 µg/g). The fraction of bound phenolic acids was the major contributor to the total phenolic acid content (91.7%) with ferulic acid predominating (85.2%). Conjugated phenolic acids accounted for 7.9% of the total with sinapic and ferulic acid predominating (47.6% and 19.9%). The composition of individual phenolic acids was similar within these two fractions. The remaining 0.4% was represented by the fraction of free phenolic acids in which the phenolic acid profile varied among the individual coloured groups. Ferulic acid prevailed in red and yellow wheats, vanillic in blue and *p*-coumaric in purple wheats.

**Keywords:** cereal; phenolics; antioxidant; anthocyanins, dietary source

Cereal-based foods are an important source not only of essential nutrients (saccharides, proteins) but also of many other nutritionally valuable substances such as phenolic acids (PAs), carotenoids and anthocyanins (Lachman et al. 2017).

The amount of PAs in different types of cereals is highly variable. The highest content was found in maize > barley > wheat > oat. PAs are predominantly located in the aleurone layer of cereals, where they account for 4 309 µg/g on average (av.), while in the endosperm they are significantly scarcer (122 µg/g on av.). PAs in the wheat kernel are present in three different forms: soluble free, soluble conjugated and insoluble bound PAs. Free PAs (FPAs) usually have

a very small share (0.4–1%) in the total phenolic acid content (TPA) of wheat grains (Martini et al. 2015). Conjugated PAs (CPAs) are esterified to sugars or other low molecular weight components e.g. maleic, quinic or tartaric acid. This fraction represents approximately 13–22% of TPA. Bound PAs (BPAs) are covalently linked to polysaccharides, lignin or other structural components of plant cell walls (Li et al. 2008) and were recognized as the most abundant PAs in cereal kernels, accounting for over 70% of TPA (Fernandez-Orozco et al. 2010).

Throughout their development, plants naturally synthesize PAs in response to various stress factors such as: UV light exposure, insect bite, attack of virus

Supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, Project No. QK1910343, and by the Czech University of Life Sciences Prague, CIGA No. 20182004 and SGS SV 18-02-21120.

or bacteria (Acosta-Estrada et al. 2014, Martini et al. 2015). In the human body, they act as strong antioxidants and their appropriate consumption is linked to prevention of many chronic diseases such as diabetes, cardiovascular diseases or cancer (Verma et al. 2008).

The aim of this study is therefore: (1) to determine the TPA and the distribution of PAs among the individual fractions (FPAs, CPAs, BPAs) in selected genotypes and groups of genotypes according to grain colour, and (2) to determine profiles of individual PAs in groups of wheat with different kernel colour: purple pericarp (Pp), blue aleurone (Ba), yellow endosperm (Ye) and standard red.

## MATERIAL AND METHODS

**Plant material.** In total, 12 wheat genotypes (2 red, 2 Ye, 4 Pp, 4 Ba) were harvested in 2016 and 2017 from the precise field trials at the Agricultural Research Institute (Agrotest Fyto, Ltd.) in Kroměříž, Czech Republic (Table 1). Experimental field parameters: GPS location 49.2851172N; 17.3646269E; 235 m a.s.l.; luvisc chernozem/loamic soils; long-term annual average temperature of 9.2 °C and average precipitations of 576 mm; mean temperature in the vegetation period 2015/16 was 9.8 °C and 8.9 °C in 2016/17; sum of precipitation was 536 mm in 2015/16 and 426 mm in 2016/17. Cultivars were grown on small experimental plots (10 m<sup>2</sup>) using conventional growing technology.

The forecrop was winter rape; fertilisation 3 times with LAV 27 (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> and finely ground limestone) 100 kg/ha (27 kg total N/ha); morphoregulator Spatial Plus with active ingredients (AI) chlormequat chloride and ethephon, 1.5 L/ha once; herbicides Cougar Forte (AI diflufenican and flufenacet) 0.54 L/ha; Glean XP (AI chlorsulfuron) 6 g/ha; Nurelle D (AI chlorpyrifos and cypermethrin) 0.6 L/ha once and fungicides Topsin (AI thiophanate-methyl) 0.7 L/ha and Impulse (AI spiroxamine) 0.6 L/ha twice. After harvest, samples were stored in paper bags in the dark at 20 °C for 2 months before being analysed.

**Chemicals.** *Trans*-ferulic acid (FeA, 98%), *trans*-sinapic acid (SiA, ≥ 98%), *trans*-*p*-coumaric acid (*p*-CoA, ≥ 98%), vanillic acid (VaA, ≥ 97%), 4-hydroxybenzoic acid (4-HBA, 99%) and acetic acid (ACS reagent, ≥ 99.7%) were obtained from Sigma Aldrich, Germany. Acetonitrile (HPLC grade), methanol (GR grade), ethyl acetate (GR grade) and NaOH (GR grade) were purchased from Lachner s.r.o., Czech Republic. HPLC grade water was prepared using the Simplicity UV (Merck Millipore, Germany).

**Sample preparation.** Wheat grain samples were ground in an IKA analytical mill (Janke & Kunkel Co., Germany). For extraction and chromatographic separation, a method published by Martini et al. (2015) was used, with some modifications.

**Isolation and analysis of FPAs.** 1 g of a finely ground sample was placed into a plastic falcon tube

Table 1. Description of wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes

Cultivar	Growth type <sup>b</sup>	Country of origin <sup>c</sup>	Cultivar status <sup>d</sup>	Grain colour	Pedigree	Gene symbol
Bohemia	W	CZ	RC	Red	(540i-92 × 6192a-92) × (540i-92 × Kontrast)	R genes (R1–R3)
Annie	W	CZ	RC	Red	Meritto × CH11.12772 × Eurofit	R genes (R1–R3)
Citrus	W	DE	RC	Ye	(Sunnan × Monopol) × Stamm GI 912	Psy1; Psy2
Bona Vita	W	SK	RC	Ye	(SO-690 × Arida) × Arida	Psy1; Psy2
AF Jumiko	W	CZ	RC	Pp	ANK-28A × Meritto	Pp1; Pp2
PS Karkulka	W	SK	RC	Pp	ANK-28A × PS 11	Pp1; Pp2
Konini	S	NZ	RC	Pp	(Fortuna × Arawa) × (Kopara × Purple Hilgendorf)	Pp genes
Purple	S	CD	RG	Pp	unknown	Pp1; Pp3 (Pp3a)
V1 131–15	W	CZ	BL	Ba + Ye	(RU-440 × V1-702) × (Citrus × Bona Dea)	Ba2; + ?
Skorpion	W	CZ	RC	Ba	line B5 × Versailles	Ba2
UC 66049	S	US	GR	Ba	HS 152-2 × Sonora 64	Ba1
TBS <sup>a</sup>	S	AT	RG	Ba	from the heritage of Erich von Tschermak	Ba2

<sup>a</sup>Tschermaks Blaukörniger Sommerweizen; <sup>b</sup>W – winter, S – spring; <sup>c</sup>CZ – Czech Republic, DE – Germany, SK – Slovakia, NZ – New Zealand, CD – Canada, US – United States of America, AT – Austria; <sup>d</sup>RC – released cultivar, RG – research germplasm, BL – breeding line, GR – genetic resource

<https://doi.org/10.17221/380/2019-PSE>

with 10 mL of methanol/water (80:20; v/v). The sample was subsequently vortexed for 30 s, sonicated for 10 min in an ultrasonic bath and finally centrifuged at 3 214 rcf for 10 min. Supernatant was transferred into 25 mL volumetric flask and the sediment was re-extracted with 10 mL of the extraction solution. Both supernatants were combined and the volume was adjusted to 25 mL. The obtained extract was used for FPAs and CPAs analysis. For FPAs analysis the extract was directly filtered through a syringe filter (PVDF, 0.45 µm) into an amber HPLC vial.

**Isolation and analysis of CPAs.** 10 mL of the methanol/water (80:20; v/v) extract from the previous step was mixed with 10 mL of NaOH (2 mol/L) and the obtained mixture was shaken for 1 h at 20 °C in the dark. Afterwards, 5 mL of HCl (4 mol/L) was added to adjust the pH value to 1–2. 2 mL of hydrolysate was transferred into glass vial and 2 mL of ethyl acetate was added. The mixture was shaken for 15 min and then centrifuged for 2 min at 2 057 rcf for separation of an aqueous and organic phase. Organic phase was transferred to another glass vial and the aqueous residuum was re-extracted with 2 mL of ethyl acetate. Combined organic phases were evaporated to dryness under nitrogen (40 °C), reconstituted with 1 mL of 80% methanol and filtered through a syringe filter (PVDF; 0.45 µm) into an amber HPLC vial.

**Isolation and analysis of BPAs.** The solid residuum after FPAs and CPAs extraction was dried to a constant weight. 14 mL of NaOH (2 mol/L) was added into a plastic falcon tube with 0.25 g of dry material. The samples were vortexed for 30 s and sonicated for 10 min. The mixture was shaken for 1 h at 20 °C. Afterwards, 7 mL of HCl (4 mol/L) was added to adjust the pH value to 1–2, followed by centrifugation (3 214 rcf; 4 °C; 15 min). 2 mL of supernatant was extracted twice using 2 mL of ethyl acetate. Further steps were identical with the CPA sample preparation.

**HPLC-DAD analysis.** The analyses were performed by an Ultimate 3000 HPLC system (Thermo Fisher Scientific, USA) coupled with a diode array detector. The analytes were separated using the gradient elution on an Omnispher C18 column (250 × 4.6 mm; particle size 5 µm; Agilent, Inc., USA). The operating conditions were: flow rate 0.8 mL/min; column temperature 25 °C; autosampler temperature 10 °C; injection volume 10 µL; detection wavelengths  $\lambda_1 = 280$  nm and  $\lambda_2 = 325$  nm. The mobile phase A: water + 0.1% acetic acid, mobile phase B: acetonitrile + 0.1%

acetic acid. The multi-step gradient (in terms of eluent B): at time 0–5 min, 10%; at 7 min, 20%; at 25 min, 30%; at 28–30 min, 75%; at 32–36 min, 10%.

**Identification and quantification.** The analytes were identified based on the retention time and UV-Vis absorption spectra. The peak area and external calibration (8 different levels spanning 0.02–20 µg/mL per analyte) were used for *trans*-forms of PAs (*t*-PAs) quantitation. Detection limits (LOD) of FeA, *p*-CoA, SiA, 4-HBA, VaA (0.025; 0.02; 0.02; 0.05; 0.05 µg/mL, respectively) were calculated using the formula  $3.3 \times (\sigma/S)$ , where S is the mean of the slopes and  $\sigma$  is the standard deviation of the intercepts obtained from five (three-point) calibration curves around the limit of detection (Q2B CH, 1996).

Standards for quantification of *cis*-forms of PAs (*c*-PAs) were prepared from the corresponding *t*-PAs solutions. 4 mL of methanolic stock solution (20 µg/mL) of each *t*-PA was placed into glass vial and exposed to UV radiation ( $\lambda = 365$  nm). Approximately 56% of *t*-PAs was isomerised to *c*-PAs after 30 min of exposure to UV light. The exact concentration of each *c*-PA standard solution was calculated based on a decrease in the chromatographic peak areas of corresponding *t*-PAs. The alternative six-point calibration curves for *cis*-ferulic (*c*-FeA) and *cis*-sinapic acid (*c*-SiA) were constructed from the obtained solution of *c*-PAs in the range 0.05–10 µg/mL.

All analyses were performed in triplicates, and the concentrations of individual PAs and TPA were expressed in µg/g DW (dry weight) of sample.

**Statistical analysis.** Data were processed employing Chromeleon (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA) and Excel (Microsoft, USA). Statistical evaluation was performed in the Statistica software using a simple sorting method at a significance level of  $\alpha = 0.05$ . The Tukey's test was used for detailed evaluation.

## RESULTS AND DISCUSSION

Cereal grains were analysed for their PA contents and profiles. 5 PAs were detected across the investigated wheat samples (Figure 1). The PAs identified were: FeA, SiA, *p*-CoA, VaA and 4-HBA, and also *c*-FeA and *c*-SiA.

**TPA.** TPA was established as the sum of the individual fractions (FPAs, CPAs and BPAs) and ranged from 567 to 868 µg/g. The av. TPA for all analysed genotypes was 715 µg/g (Table 2). The wheats with blue aleurone showed exceptionally high TPA: cv. Skorpcion had the highest TPA (868 µg/g), along

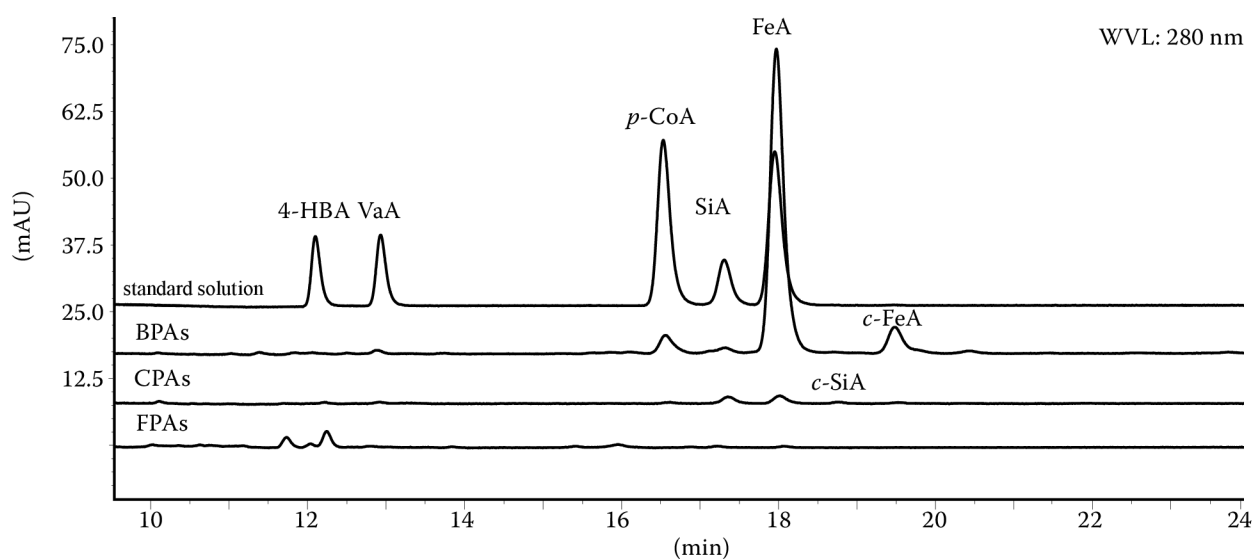


Figure 1. Chromatogram of phenolic acids in blue aleurone (Ba) wheat breeding line V1 131–15 (RU-440 × V1-702) × (Citrus × Bona Dea), 2016, (HPLC-DAD;  $\lambda = 280$  nm); BPAs – bound phenolic acids; CPAs – conjugated phenolic acids; FPAs – free phenolic acids; 4-HBA – 4-hydroxybenzoic acid; VaA – vanillic acid; *p*-CoA – *trans-p*-coumaric acid; SiA – *trans*-sinapic acid; FeA – *trans*-ferulic acid; *c*-FeA – *cis*-ferulic; *c*-SiA – *cis*-sinapic acid

with cv. TBS and V1 131–15 (852; 837  $\mu\text{g/g}$ , respectively); the only exception was cv. UC 66049 with the third lowest TPA (637  $\mu\text{g/g}$ ). On the contrary, the lowest TPA was found in cultivars with standard red colour: Annie and Bohemia (567; 632  $\mu\text{g/g}$ , respectively).

The TPA found in red wheats is nearly 10% higher compared to the results of Zuchowski et al. (2011) who measured 547  $\mu\text{g/g}$ . Other authors (Li et al. 2008, Guo and Beta 2013) reported higher values (654; 676  $\mu\text{g/g}$ ). Red wheats analysed by Fernandez-Orozco

Table 2. Free phenolic acids (FPAs), conjugated phenolic acids (CPAs), bound phenolic acids (BPAs) and total phenolic acid content (TPA) (av. contents  $\pm$  standard deviation and the contribution of individual phenolic acid (PA) fractions to TPA)

Cultivar	FPAs	CPAs	BPAs	TPA	FPAs	CPAs	BPAs
	$(\mu\text{g/g DW})$				$(\% \text{ of total})$		
Bohemia	0.95 $\pm$ 0.03 <sup>h</sup>	71.1 $\pm$ 0.42 <sup>b</sup>	560 $\pm$ 36.0 <sup>ef</sup>	632 $\pm$ 36.3 <sup>e</sup>	0.2	11.3	88.6
Annie	0.63 $\pm$ 0.09 <sup>h</sup>	43.7 $\pm$ 1.20 <sup>fg</sup>	522 $\pm$ 16.2 <sup>f</sup>	567 $\pm$ 14.9 <sup>f</sup>	0.1	7.7	92.2
Citrus	2.51 $\pm$ 0.16 <sup>ef</sup>	59.8 $\pm$ 1.89 <sup>d</sup>	673 $\pm$ 52.8 <sup>b</sup>	735 $\pm$ 52.4 <sup>b</sup>	0.3	8.1	91.5
Bona Vita	2.26 $\pm$ 0.19 <sup>fg</sup>	64.5 $\pm$ 3.61 <sup>c</sup>	584 $\pm$ 30.7 <sup>de</sup>	650 $\pm$ 27.3 <sup>de</sup>	0.3	9.9	89.7
AF Jumiko	3.05 $\pm$ 0.20 <sup>de</sup>	55.6 $\pm$ 1.98 <sup>e</sup>	663 $\pm$ 6.28 <sup>b</sup>	722 $\pm$ 7.70 <sup>bc</sup>	0.4	7.7	91.9
PS Karkulka	1.79 $\pm$ 0.25 <sup>g</sup>	42.7 $\pm$ 2.40 <sup>gh</sup>	627 $\pm$ 17.4 <sup>bcd</sup>	671 $\pm$ 19.5 <sup>cde</sup>	0.3	6.4	93.4
Konini	1.11 $\pm$ 0.04 <sup>h</sup>	53.4 $\pm$ 4.75 <sup>e</sup>	642 $\pm$ 33.1 <sup>bc</sup>	697 $\pm$ 28.3 <sup>bcd</sup>	0.2	7.7	92.2
Purple	0.63 $\pm$ 0.12 <sup>h</sup>	56.8 $\pm$ 1.56 <sup>de</sup>	660 $\pm$ 9.16 <sup>b</sup>	717 $\pm$ 10.5 <sup>bc</sup>	0.1	7.9	92.0
V1 131–15	3.33 $\pm$ 0.11 <sup>cd</sup>	67.9 $\pm$ 1.85 <sup>bc</sup>	766 $\pm$ 47.7 <sup>a</sup>	837 $\pm$ 46.1 <sup>a</sup>	0.4	8.1	91.5
Skorpion	5.60 $\pm$ 0.69 <sup>b</sup>	44.7 $\pm$ 0.19 <sup>f</sup>	817 $\pm$ 27.5 <sup>a</sup>	868 $\pm$ 27.1 <sup>a</sup>	0.6	5.2	94.2
UC 66049	3.72 $\pm$ 0.16 <sup>c</sup>	38.3 $\pm$ 1.09 <sup>h</sup>	595 $\pm$ 54.6 <sup>cde</sup>	637 $\pm$ 55.4 <sup>e</sup>	0.6	6.0	93.4
TBS	6.59 $\pm$ 1.05 <sup>a</sup>	78.7 $\pm$ 1.49 <sup>a</sup>	766 $\pm$ 26.1 <sup>a</sup>	852 $\pm$ 27.3 <sup>a</sup>	0.8	9.2	90.0
Mean	2.68 $\pm$ 1.91	56.4 $\pm$ 12.6	656 $\pm$ 89.3	715 $\pm$ 94.7	0.4	7.9	91.7

TBS – Tschermaks Blaukörniger Sommerweizen; DW – dry weight; Different letters above the columns indicate significant difference between the analysed wheat varieties at  $P \leq 0.05$



<https://doi.org/10.17221/380/2019-PSE>

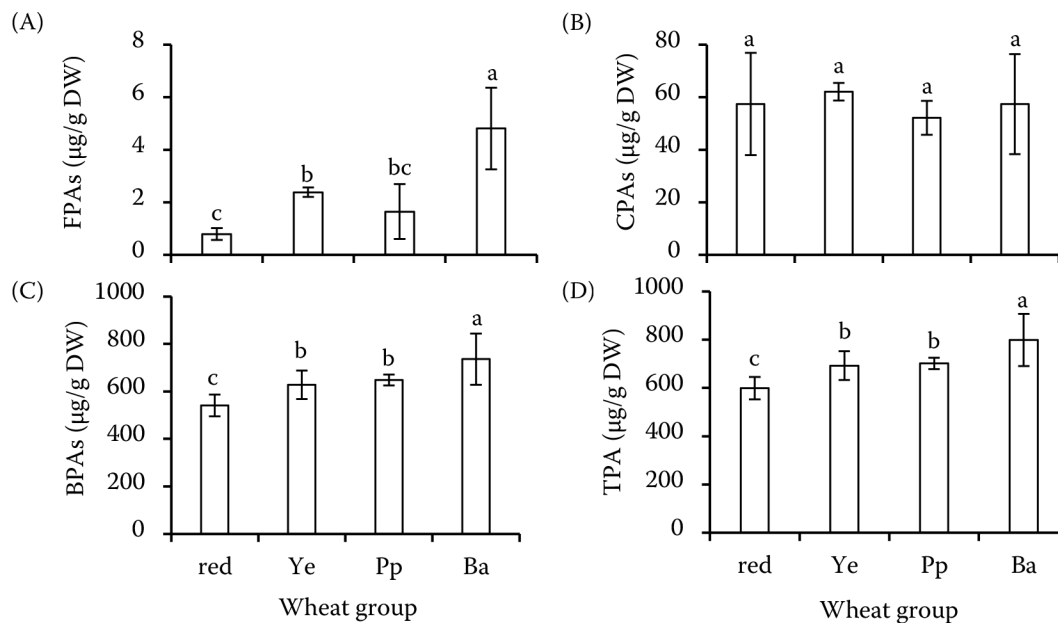


Figure 2. Comparison of total free phenolic acids (FPAs), conjugated phenolic acids (CPAs), bound phenolic acids (BPAs) and total phenolic acid (TPA) among coloured-grain wheat groups; red – standard red; Ye – yellow endosperm; Pp – purple pericarp; Ba – blue aleurone; DW – dry weight. <sup>a,b,c</sup>Different letters above the columns indicate significant difference between the four coloured-grain wheat groups at  $P \leq 0.05$

et al. (2010) attained significantly higher values (20–50%), as their TPA ranged from 728 to 900 µg/g.

Among the groups of wheats according to the grain colour, the highest TPA was determined in wheats with Ba (798 µg/g). Lower TPA was measured in genotypes with Pp and Ye (701; 692 µg/g). Standard red wheats showed the lowest TPA of all investigated genotypes (599 µg/g) (Figure 2D). Contrary to our results, Li et al. (2005) found higher values of PAs in Pp compared to Ba wheats (929 vs. 706 equivalent of FeA).

Coloured-grain wheats are able to synthesize and store anthocyanins in the outer layers of grain (Lachman et al. 2017). Their biosynthesis derives from the phenylpropanoid pathway, the common means of synthesis of a wide range of natural phytochemicals like PAs, flavonoids and others (Robbins 2003). Therefore, it is assumed that high concentration of anthocyanins and PAs in coloured wheat grains could be the result of increased activity of the phenylpropanoid biosynthetic pathway.

Studies by other authors confirm an increased PA content in coloured wheat cultivars. Ma et al. (2016) reported 20% higher TPA in Pp wheats (1 008 µg/g) compared to the conventional wheats analysed in their study. Besides, it is 30% more in comparison with the results of Pp wheats measured in the present study. On the other hand, Guo and Beta's (2013)

study provides slightly lower values of the TPA in Pp wheats (689 µg/g).

Other results that indicate a higher TPA in coloured wheats are not directly comparable to our values because they come from analyses of individual parts of the grain: bran (Li et al. 2005), pericarp, aleurone and endosperm (Ndolo et al. 2013), or the values of PAs are expressed as a FeA equivalent (Li et al. 2005). Ndolo et al. (2013) determined the TPA in the Pp wheats pericarp to be 20% higher in comparison to unpigmented wheat kernels (3 815 vs. 3 194 µg/g). In compliance with the results of Li et al. (2005), coloured wheat groups may be classified according to the TPA in bran in descending order as follows: Pp > Ba > black > white wheats (3 084 > 2 842 > 2 824 > 1 984 µg/g, respectively). As the consumers' demand for wholegrain bakery products has grown significantly in recent years, it is important to identify the content of PAs not only in bran but in the entire grain, which is why our study analysed wholegrain flour.

A significant impact of the crop year (weather conditions) on the TPA was found. The TPA was 8% higher in the drier year 2017, which is in accordance with the results of Zrcková et al. (2019) who reported a 14% increase of the TPA due to the drought.

**Total PA profile.** The individual groups of coloured-grain wheats differed significantly in their

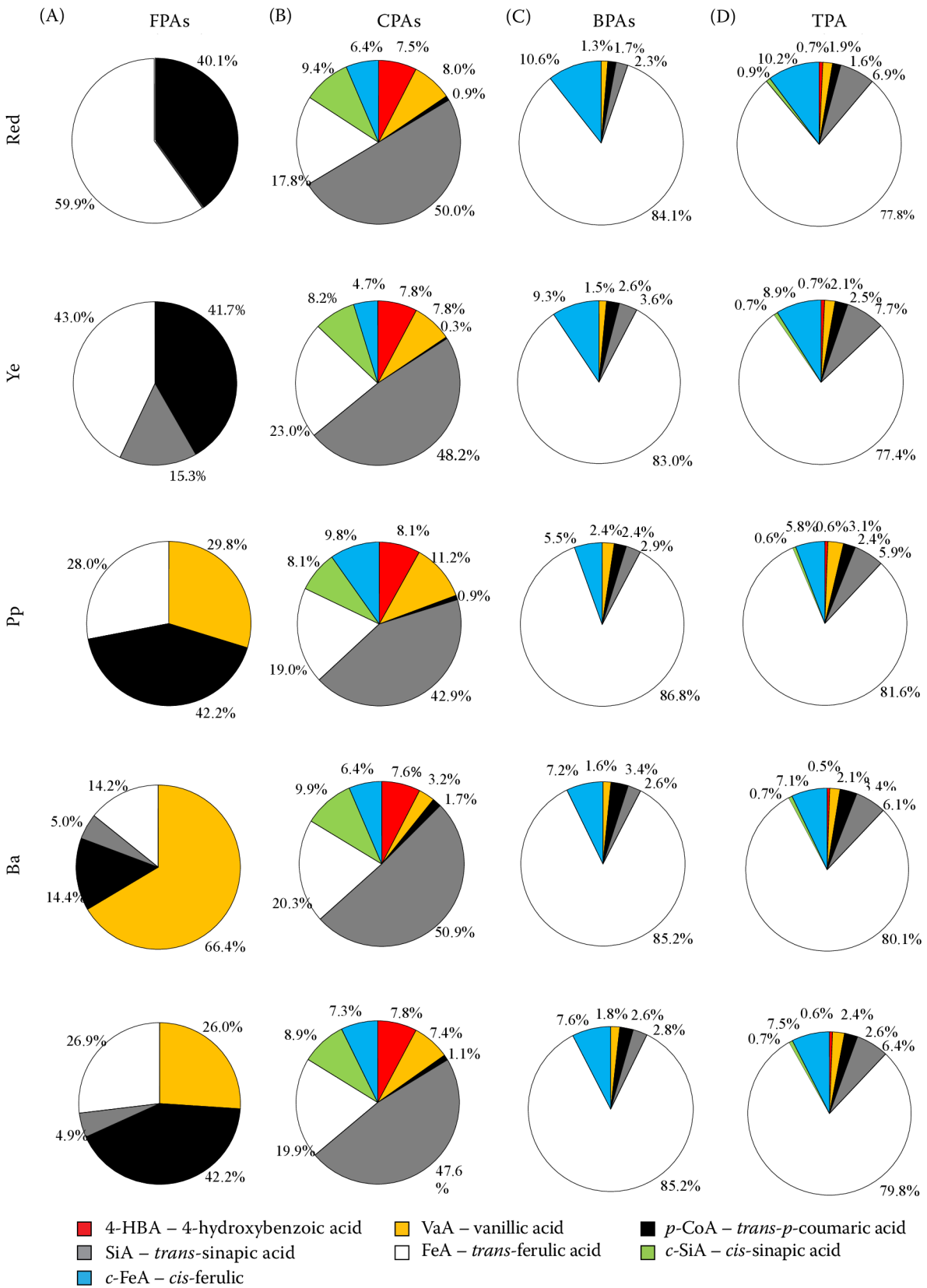


Figure 3. Phenolic acid profiles of individual coloured-grain wheat groups (the last line pie charts express av. free phenolic acids (FPAs), conjugated phenolic acids (CPAs), bound phenolic acids (BPAs) and total phenolic acid (TPA) of all analysed wheat samples). red – standard red; Ye – yellow endosperm; Pp – purple pericarp; Ba – blue aleurone

<https://doi.org/10.17221/380/2019-PSE>

TPA, but the share of individual PAs in TPA was very similar across all groups (Figure 3D). FeA was predominant among all PAs (79.8%), followed by *c*-FeA and SiA (7.5%; 6.4%). The results of various studies on PAs in wheat grains are consistent about the dominant presence of FeA (Zuchowski et al. 2011, Brandolini et al. 2013, Ndolo and Beta 2014). Other identified PAs, *p*-CoA, VaA, *c*-SiA and 4-HBA, formed only a minimal percentage (2.6, 2.4, 0.7, 0.6%) of TPA. A similar profile but without the distinction of *c*-FeA/FeA and *c*-SiA/SiA was also found by Zuchowski et al. (2011). The dominant FeA (87.1%) was accompanied by SiA, *p*-CoA, VaA and 4-HBA (5.7, 2.9, 2.4, 1.9%).

**Individual PA fractions.** Three different fractions of PAs (FPAs, CPAs, BPAs) had a share on the TPA in wheat grains. BPAs represented the majority of the TPA (91.7%); the share of CPAs was considerably lower (7.9%) and FPAs constituted a fairly small proportion of the TPA (0.4%). The contents of the individual PA fractions measured in the analysed wheat genotypes, with their percentage of the TPA are shown in Table 2. Our results (BPAs, CPAs, FPAs) correspond to the values reported by Martini et al. (2015) (86.1, 13.5, 0.4%, respectively). Slightly higher share of CPAs is reported by Li et al. (2008) (77, 22, 1%, respectively).

The largest amounts of FPAs were found in Ba wheats (4.81 µg/g), less in Ye and Pp wheats (2.39, 1.65 µg/g, respectively). Red wheat grains contained the lowest amount of FPAs (0.79 µg/g) (Figure 2A).

No statistically significant differences were found in the CPA content among the coloured-grain wheat groups: Ye, Ba, red, Pp (62.1, 57.4, 57.4, 52.1 µg/g, respectively; Figure 2B).

The individual groups of coloured-grain wheats differed significantly in BPA content. Listed in descending order of the measured values: Ba > Pp > Ye > red (736 > 648 > 628 > 541 µg/g, respectively; Figure 2C).

**FPA profile.** Four different PAs were identified in the FPA fraction. Listed in descending order according to their average value: *p*-CoA, FeA, VaA and SiA (42.2, 26.9, 26.0, 4.9%, respectively; Figure 3A). Free FeA prevailed in red (59.9%) and Ye wheats (43.0%). *p*-CoA (42.2%) formed the major proportion in the Pp grain, and VaA was predominant in Ba wheats (66.4%). However, the FPA spectrum across the individual genotypes showed considerable variability. Martini et al. (2015) reported that the most frequently occurring FPAs in durum wheat were VaA and FeA

(34.1, 34.0%, respectively), accompanied by SiA, 4-HBA and *p*-CoA (15.9, 9.2, 6.8%, respectively). Li et al. (2008) found a similar share of FeA (31.7%) in non-coloured wheat.

**CPA profile.** The CPA profile is depicted in Figure 3B. Almost half (47.6%) of the total CPA content consisted of SiA. Highly represented was also FeA (19.9%), followed by *c*-SiA, 4-HBA, VaA and *c*-FeA, which were present in very similar quantities (8.9, 7.8, 7.4, 7.3%, respectively). Only a tiny share of the CPAs was represented by *p*-CoA (1.1%). Martini et al. (2015) published similar results for durum wheat, SiA, FeA and VaA represented 64.2, 20.9 and 7.6%, respectively, followed by 4-HBA, syringic and *p*-CoA (3.5, 2.1, 1.6%, respectively). Findings by Fernandez-Orozco et al. (2010) also confirmed the dominant position of SiA and FeA averaging 47.6% and 20.7% of the total CPA content, respectively. The data measured by Li et al. (2008) differed significantly both in terms of the species and in terms of the representation of the identified PAs. They reported that the most prominent CPA was 2,4-dihydroxybenzoic acid (33.7%), followed by SiA (23.7%) and FeA (18.1%). Substantially less represented were VaA, syringaldehyde and 4-HBA (8.8, 6.9, 3.7%, respectively).

**BPA profile.** The BPA profile of all studied coloured-grain wheat groups was very similar (Figure 3C). FeA, representing 85.2% on av., prevailed in this fraction. Zhang et al. (2012) found a slightly lower share of FeA (70.7%). On the contrary, higher percentage of FeA (89.7%) was reported by Martini et al. (2015) and 94.9% by Brandolini et al. (2013) who further disclosed *p*-CoA (3.3%) and other acids (4-HBA, VaA, syringic), all representing less than 1% of the total BPA content. According to our results, FeA in the BPA fraction was accompanied by *c*-FeA (7.6%). Other acids were present in substantially lower amounts: SiA, *p*-CoA, VaA (2.8, 2.6, 1.8%, respectively). Martini et al. (2015) found a relatively similar representation of these three acids (7.2, 2.2, 0.7%). Zhang et al. (2012) identified also caffeic (11.3%) and chlorogenic acid (3.8%) in the BPA fraction.

In conclusion, less traditional, pigmented cereal grains including purple- and blue-grained wheat cultivars are now being investigated primarily for anthocyanins and are presumed to provide health benefits. It is apparent from our results that Ba wheats contain relatively large amounts of phenolic acids as compared to other groups of coloured-grain wheats. The newly-bred cultivar V1 131–15 is worth special attention because its aleurone layer contains a lot of anthocyanins and phenolic acids,

<https://doi.org/10.17221/380/2019-PSE>

and an unusually high concentration of carotenoids (as previously published by Paznocht et al. 2018) can be found in the endosperm. Wheats with blue aleurone and purple pericarp are, according to our results, a potentially significant dietary source of these nutritionally valuable substances and could be a suitable alternative to traditionally used cultivars in future.

## REFERENCES

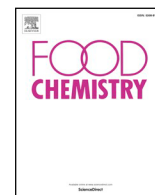
- Acosta-Estrada B.A., Gutiérrez-Urbe J.A., Serna-Saldívar S.O. (2014): Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152: 46–55.
- Brandolini A., Castoldi P., Plizzari L., Hidalgo A. (2013): Phenolic acids composition, total polyphenols content and antioxidant activity of *Triticum monococcum*, *Triticum turgidum* and *Triticum aestivum*: A two-years evaluation. *Journal of Cereal Science*, 58: 123–131.
- Fernandez-Orozco R., Li L., Harflett C., Shewry P.R., Ward J.L. (2010): Effects of environment and genotype on phenolic acids in wheat in the HEALTHGRAIN diversity screen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 9341–9352.
- Guo W.W., Beta T. (2013): Phenolic acid composition and antioxidant potential of insoluble and soluble dietary fibre extracts derived from select whole-grain cereals. *Food Research International*, 51: 518–525.
- 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.
- Li L., Shewry P.R., Ward J.L. (2008): Phenolic acids in wheat varieties in the HEALTHGRAIN diversity screen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 9732–9739.
- Li W., Shan F., Sun S., Corke H., Beta T. (2005): Free radical scavenging properties and phenolic content of Chinese black-grained wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 8533–8536.
- Ma D., Li Y., Zhang J., Wang C., Qin H., Ding H., Xie Y., Guo T. (2016): Accumulation of phenolic compounds and expression profiles of phenolic acid biosynthesis-related genes in developing grains of white, purple, and red wheat. *Frontiers in Plant Science*, 7: 528.
- Martini D., Taddei F., Ciccoritti R., Pasquini M., Nicoletti I., Corradini D., D'Egidio M.G. (2015): Variation of total antioxidant activity and of phenolic acid, total phenolics and yellow coloured pigments in durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) as a function of genotype, crop year and growing area. *Journal of Cereal Science*, 65: 175–185.
- Ndolo V.U., Beta T. (2014): Comparative studies on composition and distribution of phenolic acids in cereal grain botanical fractions. *Cereal Chemistry*, 91: 522–530.
- Ndolo V.U., Beta T., Fulcher R.G. (2013): Ferulic acid fluorescence intensity profiles and concentration measured by HPLC in pigmented and non-pigmented cereals. *Food Research International*, 52: 109–118.
- Paznocht L., Kotíková Z., Šulc M., Lachman J., Orsák M., Eliášová M., Martinek P. (2018): Free and esterified carotenoids in pigmented wheat, tritordeum and barley grains. *Food Chemistry*, 240: 670–678.
- Q2B CH (1996): Validation of Analytical Procedures: Methodology. Geneva, Office of Medical Products and Tobacco, Center for Drug Evaluation and Research.
- Robbins R.J. (2003): Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 2866–2887.
- Verma B., Hucl P., Chibbar R.N. (2008): Phenolic content and antioxidant properties of bran in 51 wheat cultivars. *Cereal Chemistry*, 85: 544–549.
- Zhang Y., Wang L., Yao Y., Yan J., He Z.H. (2012): Phenolic acid profiles of Chinese wheat cultivars. *Journal of Cereal Science*, 56: 629–635.
- 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.
- Zuchowski J., Jonczyk K., Pecio L., Oleszek W. (2011): Phenolic acid concentrations in organically and conventionally cultivated spring and winter wheat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91: 1089–1095.

Received: July 7, 2019

Accepted: January 21, 2020

Published online: February 10, 2020

## **4.2. Carotenoid content of extruded and puffed products made of colored-grain wheats**



## Carotenoid content of extruded and puffed products made of colored-grain wheats

Luboš Paznocht<sup>a</sup>, Barbora Burešová<sup>a,\*</sup>, Zora Kotíková<sup>a</sup>, Petr Martinek<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Chemistry, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, 165 00 Prague-Suchdol, Czech Republic

<sup>b</sup> Agrotrest Fyto, Ltd., Havlíčkova 2787/121, 767 01 Kroměříž, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Chemical compounds:

α-Carotene (PubChem CID: 4369188)  
β-Carotene (PubChem CID: 5280489)  
Antheraxanthin (PubChem CID: 5281223)  
Lutein (PubChem CID: 5281243)  
Zeaxanthin (PubChem CID: 5280899)

#### Keywords:

Carotenoid esters  
Cereal-based food  
Human nutrition  
Lutein  
Xanthophylls

### ABSTRACT

Wheat is a relevant source not only of essential macronutrients but also of many other health-promoting phytochemicals (carotenoids, anthocyanins, tocopherols, phenolic acids, etc.). Colored-grain wheats were used for extrusion and kernel puffing. The total content of carotenoids (sum of lutein, zeaxanthin, antheraxanthin, α- and β-carotene, and xanthophyll esters) decreased significantly due to extrusion (to 25.7%) and puffing (to 31.6%), compared to the content in the raw material. Zeaxanthin was shown to be the most stable among all detected carotenoids (30.8 and 48.7% was preserved). The results of the performed analyses have not confirmed greater stability of xanthophyll esters against higher temperatures (decrease to 29.5 and 22.1%). Both technologies induced *E*-to *Z*-isomerization of all-*E*-lutein and puffing also of all-*E*-zeaxanthin. Higher concentrations of 13-*Z*- and 9-*Z*-zeaxanthin were identified in puffed grains (2× and 37× on average). To preserve more carotenoids, it is appropriate to look for a more suitable food processing technology.

### 1. Introduction

Wheat is a major contributor to global food security. Worldwide production in the 2018/2019 season achieved more than 731 million tons, and about two thirds of this amount was used for human consumption (Statista, 2020). This is consistent with an average global consumption of around 66 kg/capita/year (FAO, 2018). In addition to the classic red wheats, which are mostly used in the food industry, so-called colored-grain wheats have also been the subject of various breeding programs in recent years. Compared to traditional wheat, these varieties are characterized by a higher content of carotenoids in the endosperm of the grain (yellow endosperm, Ye), and some of them have gained a completely new ability to synthesize and store anthocyanin pigments in the outer layers of wheat kernels, e.g. in pericarp (purple pericarp, Pp), aleurone layer (blue aleurone, Ba) or both (so-called black grain, Pp + Ba) (Lachman, Martinek, Kotíková, Orsák, & Šulc, 2017). A breeding line combining Ye and Ba wheats which was temporarily designated as V1 131–15 is also known (Paznocht, Kotíková, Burešová, Lachman, & Martinek, 2020).

Anthocyanins and carotenoids act as strong antioxidants in the human body (Lachman et al., 2017) and additionally, carotenoids serve as precursors for vitamin A synthesis and/or are essential for the normal

function of the eye's retina (Kotíková, Šulc, Lachman, Pivec, Orsák, & Hamouz, 2016). Lutein and zeaxanthin are predominant in wheat grains, followed by α- and β-carotene and antheraxanthin. Some wheat cultivars are also able to synthesize xanthophyll esters such as lutein or zeaxanthin mono- and diesters (Paznocht et al., 2018; Mattera, Hornero-Méndez, & Atienza, 2017). Esterification of xanthophylls enables the accumulation of larger amounts of these pigments in grain (Atienza, Ballesteros, Martín, & Hornero-Méndez, 2007), and according to the findings of some authors, it improves carotenoid resistance to high temperatures even during food processing (Ahmad, Asenstorfer, Soriano, & Mares, 2013; Mattera et al., 2017).

The consumption of wheat (cereals), unlike other sources of carotenoids (such as fruits or vegetables that can be eaten raw), is conditioned by the use of a certain culinary treatment, to improve sensory or nutritional quality (digestibility of starch, etc.). However, in terms of micronutrients (carotenoids, anthocyanins, tocopherols, etc.), these technologies pose a significant risk of degradation, as they involve different levels of thermal processing and direct exposure to atmospheric oxygen or oxidative enzymes, which are activated by increasing the water content of the material (Leenhardt et al., 2006). During processing, there is not only direct but also indirect oxidative degradation of carotenoids occurring. The indirect degradation is induced by the

\* Corresponding author.

E-mail address: [buresovab@af.czu.cz](mailto:buresovab@af.czu.cz) (B. Burešová).

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127951>

Received 1 July 2020; Received in revised form 25 August 2020; Accepted 25 August 2020

Available online 31 August 2020

0308-8146/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

oxidation of unsaturated fatty acids which is caused by the action of naturally occurring enzymes (e.g. lipoxygenases), and the accrued radicals (the reaction intermediates) are then responsible for carotenoid oxidative degradation (Hidalgo, Brandolini, & Pompei, 2010; Fratianni, Di Crisco, Mignogna, & Panfili, 2012). Even this indirect effect should be taken into account when assessing the potential health benefits of cereal-based products. In order to enrich the assortment of cereal-based foods of high nutritional quality, it is necessary to find such a technological processing method which would both affect the final content of micronutrients to a minimal extent and achieve the required sensory quality of the product.

Extrusion is widely used for the processing of starchy materials (potato, corn, or wheat flour) in the production of snack foods or using low temperatures (around 50 °C) for the production of pasta (Waramboi, Gidley, & Sopade, 2013; Hidalgo, Scuppa, & Brandolini, 2016; Cueto, Farroni, Schoenlechner, Schleining, & Buera, 2017). Puffing is used to treat whole grains of rice, rye, barley, wheat (Cattaneo, Hidalgo, Masotti, Stuknyte, Brandolini, & De Novi, 2015; Hidalgo et al., 2016) and other cereals like millet or amaranth (Piłat, Ogródowska, & Zadernowski, 2016).

Most of the studies are interested in the impact of these methods on protein and starch structure and/or digestibility, but to the best of our knowledge there is little information about the degree of degradation of carotenoids due to the extrusion and puffing of wheat kernels, especially of colored-grain wheats. Therefore, the objective of this study was (1) to clarify the influence of the mentioned food industry technologies (extrusion and puffing) with regard to carotenoid degradation, and (2) to compare them to one another. The acquired knowledge will be used to find the most favorable technological processing method, which would maximize the utilization of the nutritional potential of colored-grain cereals. It is presupposed that wheat puffing and extrusion are more carotenoid-sparing technologies, compared to baking, and that esterified carotenoids are more resistant to high temperatures than the free forms.

## 2. Material and methods

### 2.1. Plant material

A total of ten colored-grain wheat varieties and breeding materials were grown in 2016/2017 at the Agricultural Research Institute in Kroměříž, Czech Republic (49.2851172N, 17.3646269E). The experimental field is located 235 m above sea level, has Luvic Chernozem (Loamic) soil, an average annual temperature 9.2 °C, mild winters, and annual precipitation averaging 576 mm. The plants were grown on experimental plots (10 m<sup>2</sup>) using conventional growing technology. All technology processing operations and consequent analyses were performed within 10 months after the harvest. The main characteristics of the selected wheat genotypes are listed in Table 1.

**Table 1**  
Description of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes.

Variety	Growth type	Country of origin (1)	Variety status	Grain color
Bohemia	Winter	CZE	Released variety	Red (standard)
Annie	Winter	CZE	Released variety	Red (standard)
Citrus	Winter	DEU	Released variety	Ye
Bona Vita	Winter	SVK	Released variety	Ye
AF Jumiko	Winter	CZE	Released variety	Pp
Konini	Spring	NZL	Released variety	Pp
ANK-28A	Spring	RUS	Genetic resource	Pp
RU 687-12	Spring	CZE	Genetic resource	Pp
UC 66049	Spring	USA	Genetic resource	Ba
Skorpion	Winter	CZE	Released variety	Ba

(1) CZE Czech Republic, DEU Germany, SVK Slovakia, NZL New Zealand, USA United States of America, RUS Russian Federation.

### 2.2. Technologies used

Twenty kg of the grain of each analyzed genotype was processed by both of the performed technologies (extrusion and puffing). Five hundred g of processed products (extruded products and puffed grains) was collected, cooled to ambient temperature, and stored for a short time in silver-coated polyethylene bags in a freezer (−18 °C) for further analysis. The collected 500 g was homogenized and subsequently, 2 g was weighed and used for the analysis.

#### 2.2.1. Extrusion

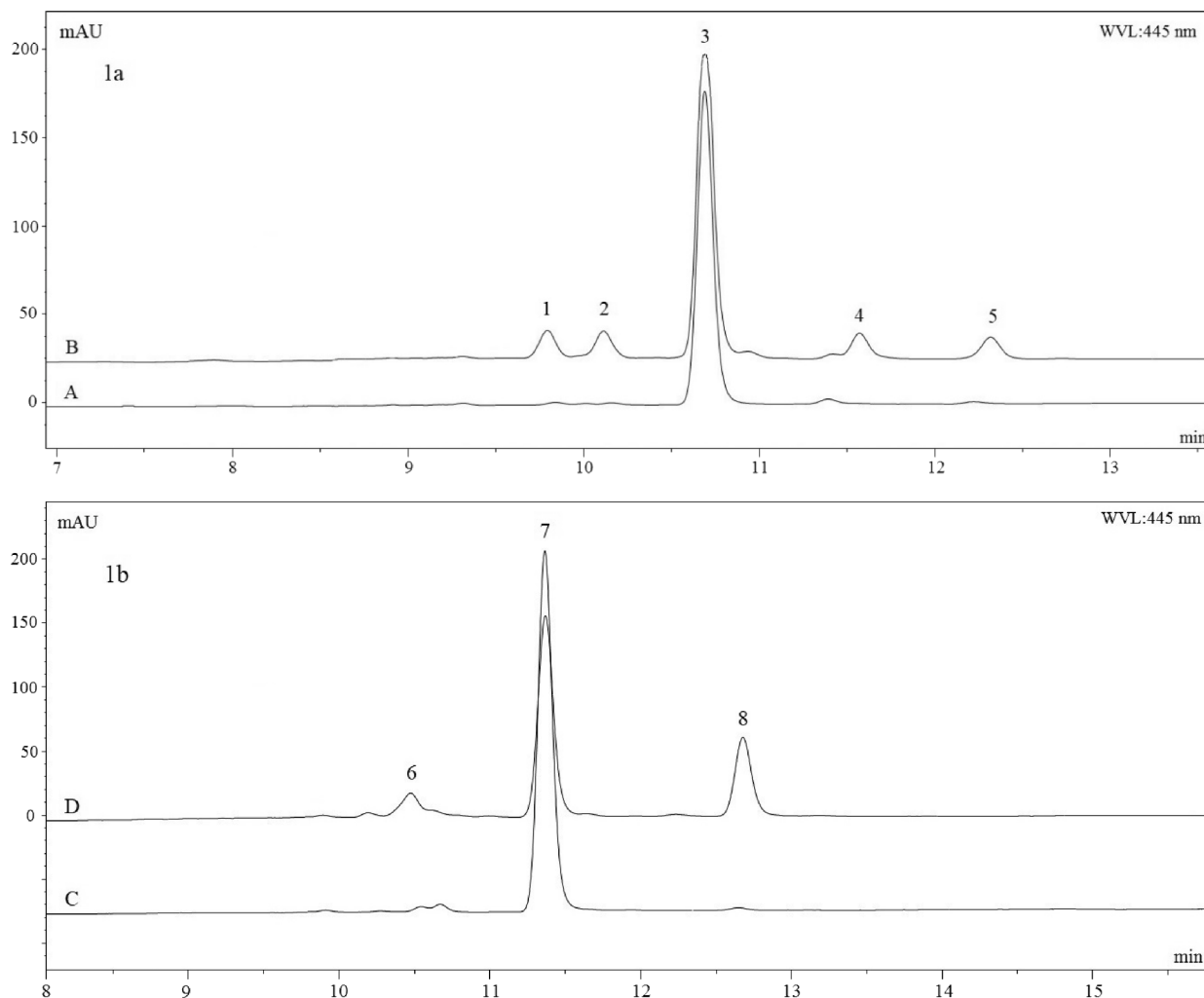
Extrusion was provided by a local Czech company. In brief: the grain was ground on a hammer mill (VM 4, Taurus, s.r.o., Chrudim, Czechia) to a particle size below 2 mm (< 10 mesh). The humidity of the scrap was adjusted to 20% and the scrap, thus treated, was extruded on the extruder (30-C-640-DC, Schaaf Technologie GmbH, Bad Camberg, Germany) after a short rest (10 min). The extrusion process parameters were as follows: screw speed 200 rpm, temperature profile was set to 130 °C for all three zones, die diameter 6 mm.

#### 2.2.2. Puffing

Puffing was provided by a local Czech company. In brief: the grain was moistened to 17.5% and left to stand for 24 h at room temperature. Puffing was performed at 270–280 °C for 6 s.

### 2.3. Sample preparation and chromatographic analysis of carotenoids

Determination of dry weight (DW), sample extraction, and chromatographic separation, as well as identification and quantification of carotenoids, were described in detail in a previous study by Paznocht, Kotíková, Orsák, Lachman, and Martinek (2019). The exact concentration of carotenoid stock solutions was determined spectrophotometrically (Spectronic Helios  $\gamma$ ; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) using the following extinction coefficients (EC, L/g/cm): antheraxanthin in ethanol (235;  $\lambda_{\max}$  = 446 nm; Thrane et al., 2015), lutein in ethanol (255;  $\lambda_{\max}$  = 445 nm; Britton, 1996), zeaxanthin in acetone (234;  $\lambda_{\max}$  = 452 nm; Britton, 1996),  $\beta$ -carotene in hexane (259.2;  $\lambda_{\max}$  = 453 nm; Scott, 2001) and  $\alpha$ -carotene in hexane (271;  $\lambda_{\max}$  = 445 nm; Scott, 2001). In addition, two Z-isomers of zeaxanthin were identified, which were confirmed by the photoisomerization of their all-E-isomer standard solution by iodine as described by Kotíková et al. (2016). Chromatograms in Fig. 1 represent differences of lutein (1a) and zeaxanthin (1b) standard solution before and after photoisomerization. Particular Z-forms were identified by exploring their absorption spectra (Aman, Biehl, Carle, Conrad, Beifuss, & Schieber, 2005; Paznocht et al., 2018). The absorption spectra of all carotenoids identified in wheat grains are shown in Supplement 1. All analyses were performed in triplicate for each genotype.



**Fig. 1.** Chromatogram of lutein (1a) and zeaxanthin (1b) standard solution before and after photoisomerization by iodine. A and C – before isomerization; B and D – after isomerization, 1 – 13-Z-Lutein, 2 – 13'-Z-Lutein, 3 – All-E-Lutein, 4 – 9-Z-Lutein, 5 – 9'-Z-Lutein, 6 – 13-Z-Zeaxanthin, 7 – All-E-Zeaxanthin, 8 – 9-Z-Zeaxanthin.

#### 2.4. Statistical analysis

The data were processed by Chromeleon (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA) and Excel (Microsoft, Redmond, WA). Statistical evaluation was performed using STATISTICA software (ver. 12; StatSoft, Inc., Tulsa, OK). The differences in the content of carotenoids between the raw material and the final product were assessed using two-sample *t*-test ( $p \leq 0.05$ ). The effects of variety, technological processes, and their interaction on the relative share of preserved carotenoids were evaluated by factorial ANOVA ( $p \leq 0.05$ ). Tukey's Post Hoc HSD test was used for detailed statistical evaluation.

### 3. Results and discussion

Extrusion and puffing of whole cereal kernels were chosen based on the results of a previous bun-making experiment, in which the stage of kneading and dough rising preceding baking itself was recognized to have the most detrimental effect on contained carotenoids (Paznocht et al., 2019). Since extrusion and puffing do not include any similar stages (kneading, dough rising), the time of the action of oxidative enzymes is minimized. Extrusion consists in pushing the homogenized material (wholemeal flour, semolina, etc.) through the extruder in a controlled high temperature sequence (Šárka, Čopíková, & Smrčková, 2013; Dehghan-Shoar, Hardacre, & Brennan, 2010). Conversely, the

starting raw material for puffing is the whole cereal grain, which limits the action of atmospheric oxygen throughout this processing technology (Cattaneo et al., 2015).

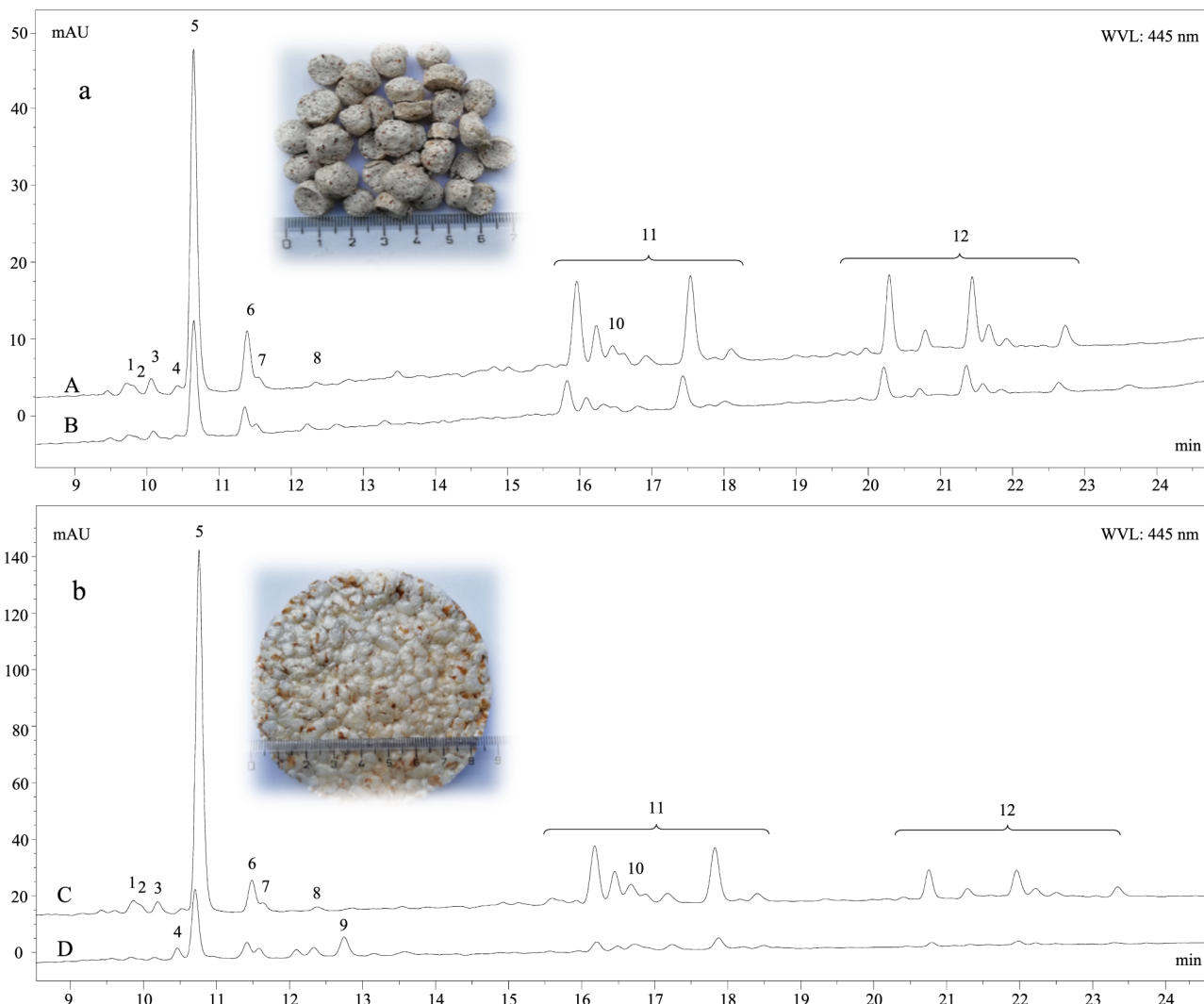
A total of ten wheat genotypes of different grain color were used for extrusion and puffing experiments, namely two red, which were used as a control, two with yellow endosperm, four with purple pericarp, and two with blue aleurone. A complete list of genotypes, including a brief specification, is given in Table 1.

Chromatogram in Fig. 2a represents differences between wholemeal flour and extrudate made of wheat Konini (Pp). An illustrative chromatogram of the Bona Vita variety (Ye) showing differences between raw grain and puffed grain is shown in Fig. 2b.

#### 3.1. The effect of extrusion on the TCC

Due to extrusion, there was an average decrease in the total carotenoid content (TCC) to 25.7% of the initial value (i.v.) (from 1.988 to 0.512  $\mu\text{g/g}$  in the final product) as shown in Table 2. From a more detailed view of the individual analyzed genotypes (Fig. 3, Supplement 3b), extrusion induced a decrease in TCC, which ranged from 37.7% (Bohemia; from 1.222 to 0.460  $\mu\text{g/g}$ ) to 20.3% (Citrus; from 4.155 to 0.839  $\mu\text{g/g}$ ). Fig. 3 further illustrates that a great relative decrease in the TCC (to 23.4%) was also observed in another wheat genotype with Ye Bona Vita (from 5.015 to 1.171  $\mu\text{g/g}$ ). In general, Ye genotypes are





**Fig. 2.** Chromatogram from HPLC-DAD carotenoid analysis of extruded flour (2a, wheat Konini, Pp) and puffed grain (2b, wheat Bona Vita, Ye). A – Wholemeal flour, B – Extrudate, C – Whole grain, D – Puffed grain, 1 – 13-Z-Lutein, 2 – Antheraxanthin, 3 – 13'-Z-Lutein, 4 – 13-Z-Zeaxanthin, 5 – All-E-Lutein, 6 – All-E-Zeaxanthin, 7 – 9-Z-Lutein, 8 – 9'-Z-Lutein, 9 – 9-Z-Zeaxanthin, 10 –  $\beta$ -Carotene, 11 – Xanthophyll monoesters, 12 – Xanthophyll diesters.

characterized by higher levels of carotenoids compared to bread wheats. Thus, despite significant losses during technological processing, the highest amount of carotenoids was preserved in the final products of genotypes with Ye compared to other samples such as Annie, ANK 28A or UC 66,049 (0.308; 0.250 and 0.208  $\mu\text{g/g}$ ). Detailed results of all analyzed genotypes are shown in [Supplement 2a](#).

The rate of degradation inflicted by extrusion is comparable to the previously published results of the bakery experiment (decrease to 27.4% of i.v.) performed with the same wheat genotypes ([Paznocht et al., 2019](#)). A significantly lower decrease in the TCC (to 77.4% of i.v.) during extrusion was observed by [Ortiz, Ponrajan, Bonnet, Rocheford, and Ferruzzi \(2018\)](#) when optimizing corn flour extrusion conditions. These authors, who performed extrusion with different temperature settings in the three zones of the extruder (120, 140 and 160  $^{\circ}\text{C}$ ) reported that the TCC retention of the final product ranged from 65.1 to 94.3% depending on the maize flour moisture (25, 30 and 35%) and screw speed (150, 225 and 300 rpm). A lower degradation rate was also noted by [Waramboi et al. \(2013\)](#), who reported a decrease in the TCC due to the extrusion of sweet potato flour to 61.4% of the initial content in the raw material.

A significant decrease in the TCC (to 21.9%) also occurred in the extrusion production of emmer semolina pasta (from 1.69 to 0.37  $\mu\text{g/}$

g), which was studied by [Fares, Codianni, Nigro, Platani, Scazzino, and Pellegrini \(2008\)](#). Similarly, [Hidalgo et al. \(2010\)](#) recorded an average TCC decline to 22% of i.v. for a bread wheat as a result of the whole pasta making process, while for the other types of wheat the decrease in the TCC was much more moderate: durum wheat semolina to 43% of i.v. and einkorn to 73% of i.v., accounting for about 0.2; 1 and 5  $\mu\text{g/g}$  in the final pasta product. Of the individual technological steps carried out during the extrusion production of pasta, the dough preparation contributes the most to the degradation of carotenoids since the moisture of the mixture increases and the homogenization leads to incorporation of atmospheric oxygen, thus activating lipoxygenase enzymes ([Hidalgo et al., 2010; Fratianni et al., 2012; Chiremba, Pozniak, & Fu, 2015](#)). Lipoxygenase activity in flours of various wheat genotypes has previously been reported by [Hidalgo and Brandolini \(2012\)](#). During the production of egg pasta from durum wheat semolina, [Fratianni et al. \(2012\)](#) recorded a decrease in the TCC to less than half (48.9%) of i.v. in the mixture of starting materials (semolina and eggs) during the mixing of the dough (approximately 18 min). A much lower decrease in the TCC (to 74.1% of i.v.) due to the same technological step was found by [Chiremba et al. \(2015\)](#) when using durum wheat. [Hidalgo et al. \(2010\)](#) further reported that the subsequent extrusion itself caused a decrease in the TCC of *T. aestivum* to 25% of the TCC in dough. A considerably

**Table 2**  
Changes in carotenoid contents as a result of technological processing.

	Whole-meal flour [µg/g DW]	Final product [µg/ g DW]	Raw grain [µg/g DW]	Final product [µg/ g DW]	% of original value	13-Z-Z- Lutein	9-Z-Lutein	9'-Z-Lutein	All-E- Zeaxanthin	13-Z- Zeaxanthin	9-Z-Zeaxanthin	α-Carotene	β-Carotene	Carotenoid esters	Total lutein	Total carotenoids
Extrusion	0.024a	0.002b	0.018a	0.001b		0.043a	0.036a	0.021a	0.164a	0.022a	0.003	0.009a	0.063a	0.313a	1.389a	1.988a
						0.015b	0.022b	0.015a	0.051b	0.003b	n.d.	0.002a	0.013b	0.092b	0.349b	0.512b
	<b>6.83</b>	<b>41.5</b>	<b>0.033a</b>	<b>0.004b</b>		<b>34.1</b>	<b>60.6</b>	<b>74.1</b>	<b>30.8</b>	<b>13.8</b>	<b>0.00</b>	<b>27.6</b>	<b>20.5</b>	<b>29.5</b>	<b>25.1</b>	<b>25.7</b>
Puffing	0.018a	0.002b	0.018a	0.001b		0.030a	0.030a	0.012a	0.144a	0.018a	0.002a	n.d.	0.043a	0.316a	1.015a	1.556a
						0.006b	0.024a	0.024b	0.070b	0.034b	0.090b	n.d.	0.010b	0.070b	0.218b	0.492b
						<b>19.7</b>	<b>80.0</b>	<b>198</b>	<b>48.7</b>	<b>193</b>	<b>3754</b>	<b>-</b>	<b>23.0</b>	<b>22.1</b>	<b>21.5</b>	<b>31.6</b>
	<b>3.94</b>	<b>14.1</b>														

n.d. – not detectable; values in columns marked with different letters are statistically different at  $p \leq 0.05$

reduced impact of extrusion itself (a decrease in the TCC by 1.7–4%) was observed by Chiremba et al. (2015) and Fratianni et al. (2012) who stated that this step alone did not result in a statistically significant diminution in the TCC of pasta. Published data on the percentage loss of carotenoids vary, mainly depending on the type of wheat used and the resting time of the moistened mixture, since all mentioned authors performed extrusion in a vacuum, at low temperatures and with a material moisture of around 30%.

Substantially higher extrusion temperatures were used in other experiments, so the degradation of carotenoids reached higher values. By far the most significant loss of carotenoids (lycopene) was reported by Dehghan-Shoar et al. (2010), who performed extrusion of cereal flour enriched with tomato paste or tomato skin. In the extruded mixtures of maize, rice, and wheat with tomato paste, the lycopene content decreased to 2.7; 2.9 and 1.8% respectively of the original amount added to the cereal matrix. The degree of carotenoid degradation caused by extrusion is affected by the screw speed and the moisture content of the input material (Waramboi et al., 2013; Ortiz et al., 2018). The largest amount of carotenoids was retained at 40% humidity (compared to 30 and 35% humidity) and with a screw speed of 225 rpm (Waramboi et al., 2013). Waramboi et al. (2013) further acknowledge that at low initial material moisture content the intensity of carotenoid (β-carotene) isomerization may increase during extrusion. The effect of using a different temperature, in increments of several tens of degrees Celsius (140; 160 and 180 °C), on the TCC has not been shown to be statistically significant (Dehghan-Shoar et al., 2010). Dehghan-Shoar et al. (2010) emphasize the influence of the chemical composition of the grain (starting extrusion material). From the results of the extrusion experiment of maize, rice, and wheat (different protein/saccharide ratio of the input material) with added lycopene, they hypothesize that a higher starch content may have a protective effect on lycopene.

A relatively low moisture content of the starting material (20%) and a high temperature (130 °C in all zones of the extruder) were chosen in our experiment, as this is the only way to achieve the expansion (sudden evaporation of water) needed to achieve the desired quality (solid foam structure) of breakfast cereals (Šárka et al., 2013), which is shown in Fig. 2a. The extrusion was carried out immediately after the moisture treatment, thus limiting the action of the eventually activated oxidative enzymes as much as possible, so the measured changes can be attributed to the effect of the extrusion itself and not to the additional steps of the technological process. The abovementioned factors (low humidity, high temperature, and high protein matrix) would, based on the previous findings (Dehghan-Shoar et al., 2010; Waramboi et al., 2013; Ortiz et al., 2018), explain the significant degradation and isomerization of carotenoids observed in our experiment.

### 3.2. The effect of puffing on the TCC

Puffing resulted in a decrease in the TCC of more than two thirds (precisely, a decrease to 31.6%; from 1.556 to 0.492 µg/g), which, however, compared to extrusion, represents a lower but statistically relevant decrease in the TCC as summarized in Table 2.

Puffing, as a more carotenoid-sparing technology, caused the TCC to drop to 54.2% (ANK 28A) up to 26.5% (Konini), as is shown in Fig. 3. Similarly to extrusion, Ye wheats' carotenoids in particular were very sensitive to puffing (Supplement 3b, 3c, 3d). By puffing the grains of the varieties Citrus and Bona Vita (TCC 3.613 and 4.058 µg/g), a degradation of the TCC to 30.5 and 28.5% of i.v. was induced, thus the final products contained a total of 1.103 and 1.135 µg/g. However, despite the extensive degradation, 2–5 times more carotenoids were retained in these samples (Ye) compared to other genotypes such as Pp AF Jumiko and Ba UC 66049 (0.459 and 0.181 µg/g). More detailed results are shown in Supplement 2b.

In einkorn, which is characterized by a naturally high carotenoid content in the grain, the average loss of carotenoids to 43.7% of i.v. due to puffing was demonstrated by Hidalgo et al. (2016). Thus the final

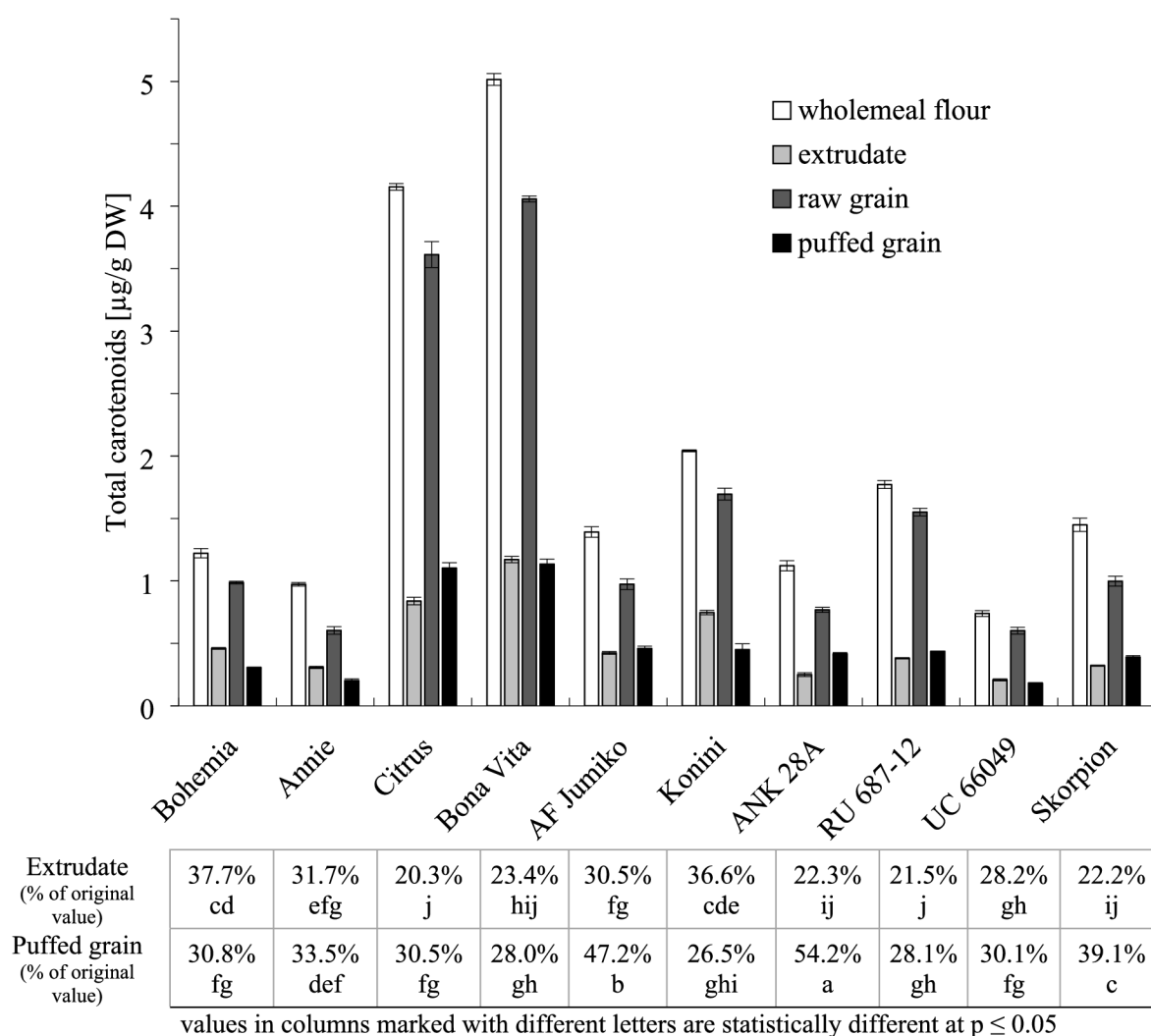


Fig. 3. Decrease in the TCC of the individual genotypes due to the technological processing.

product contained an average of 2.485  $\mu\text{g/g}$ , which is even more than twice the amount of our Ye wheat products (1.119  $\mu\text{g/g}$ ). Considering the results of einkorn, Hidalgo et al. (2016) observed a similar rate of carotenoid degradation (to 45.4% of i.v.) in traditional bread wheat. The percentages of the remaining carotenoids recorded by Hidalgo et al. (2016) are surprisingly high compared to our values, considering that in their experiment the grain was exposed to temperatures in the range of 360–390 °C for 3–5 min, while in our experiment the grain was exposed to a lower temperature (270–280 °C) for a substantially shorter period of time (6 s).

### 3.3. The effect of interaction between processing technology and genotype on the TCC

A higher percentage decrease in the TCC was observed in the vast majority of analyzed genotypes due to extrusion, compared to puffing. The only exceptions were the varieties Bohemia (37.7 vs. 30.8% of i.v.) and Konini (36.6 vs. 26.5%), as shown in the graphical output of the statistical evaluation by factorial ANOVA (Supplement 3b). The divergent responses to the compared technologies were evident particularly for Pp genotypes AF Jumiko and ANK 28A, and Ba variety Skorpion. When processing these wheats for utilization in the food industry,

puffing can be clearly recommended with regard to maintaining the maximum amount of carotenoids contained. The output 3c and 3d in Supplement 3, in which the average degradation of carotenoids caused by both performed technologies is evaluated, indicates that Ye wheats are characterized by generally the highest degree of degradation compared to other color groups, while the degradation of red and some of Pp wheats is generally the lowest.

### 3.4. Changes of the individual carotenoids induced by extrusion and puffing

The effect of both technologies used on the content of the individual carotenoids of all analyzed wheat genotypes is captured in Supplement 2 (2a Extrusion, 2b Puffing). The total content of lutein (TLC), the predominant of wheat carotenoids (about 70% of TCC), decreased on average to 25.1 and 21.5% of i.v. due to extrusion and puffing. A similar degradation rate was observed for the esterified forms of carotenoids, as only 29.5 and 22.1% of the esters was preserved. An analogous finding (a decline to 21.7%) was obtained by the analysis of carotenoids in the bakery experiment of Paznocht et al. (2019). The results of our analyses did not confirm the higher resistance of carotenoid esters to high temperatures during processing (as shown by chromatograms in Fig. 2), as reported by some previous studies (Ahmad et al., 2013; Mattera

et al., 2017). The least stable carotenoid was antheraxanthin (extrusion caused it to drop to 6.38% and puffing to 3.94%). Thus, only a small amount of this carotenoid (on average 0.002 and 0.001  $\mu\text{g/g}$  respectively) was measured in the final products. Conversely, zeaxanthin, the content of which decreased to 30.8% due to extrusion and only to 48.7% as a result of puffing, appeared to be surprisingly stable.

To our knowledge, the effect of wheat grain puffing on the content of individual carotenoids has only been examined by Hidalgo et al. (2016), who reported a decrease in lutein content to 21.1% on average. More resistant appeared to be zeaxanthin, which, similarly to our experiment, showed an average decline to 47.7% and  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene, the content of which fell only to an average of 79.2%. Hidalgo et al. (2016) further observed an increase in  $\beta$ -cryptoxanthin content in einkorn to more than 10 times the original value (from 0.09 to 0.92  $\mu\text{g/g}$  on average). This phenomenon was attributed to the isomerization and hydroxylation of carotenoids at high temperatures. Hidalgo et al. (2016) presupposed that the observed degradation of carotenoids due to puffing (360–390 °C for 3–5 min) is almost exclusively caused by high temperature.

Chiremba et al. (2015) reported an average decrease in TLC during pasta production to 67.2% (dough preparation, extrusion), while an average of 7.7% of lutein was decomposed directly by extrusion. The effect of extrusion on individual carotenoids in other materials (e.g. in corn flour or in combination with other additives) has been discussed in more detail, for example, by Ortiz et al. (2018), Ortak, Caltinoglu, Sensoy, Karakaya, and Mert (2017), and Cueto et al. (2017). Ortiz et al. (2018) observed an average decline of lutein content in extruded maize to 71.2%. Very similar results were also obtained by Ortak et al. (2017), who combined maize with carrots in their experiment and reported that the lutein content was reduced to 71.8% of i.v. due to extrusion at 130 °C (from 2.66 to 1.91  $\mu\text{g/g}$ ) and to 51.9% of i.v. at 160 °C (to 1.38  $\mu\text{g/g}$ ). Cueto et al. (2017) noted a greater decrease in lutein and zeaxanthin to 30 and 45% respectively, using extrusion for corn flake production. This was probably caused by processing a mixture with significantly lower humidity (14%), as the extrusion was operated at a similar temperature (in the individual zones of the extruder it increased from 50 °C to the final 150 °C). To increase the nutritional value of extruded products, Cueto et al. (2017) investigated the effect of maize semolina enrichment with chia seeds (known as a good dietary source of many antioxidants). However, the positive impact was not confirmed by the results, as a serious carotenoid degradation, caused by the abundance of oxidation-prone polyunsaturated fatty acids in chia seeds, was measured. Thus, only about 25% of both lutein and zeaxanthin was retained in the final product.

According to Ortiz et al. (2018), the retention of other carotenoids occurring in maize ( $\beta$ -carotene,  $\beta$ -cryptoxanthin, and zeaxanthin) reached only slightly different values: (73.0; 70.6 and 68.4% respectively). Considering the stability of  $\beta$ -carotene, Waramboi et al. (2013) also attained very positive results (61.2% of i.v.) during the extrusion of sweet potato flour.

Both technological processes operated in this experiment resulted in numerous isomerization changes of lutein and zeaxanthin (as is apparent from Fig. 2), which were previously observed to be induced also by cooking (Kao, Chiu, Tsou, & Chiang, 2012), baking (Hidalgo et al., 2010), canning (Updike & Schwartz, 2003), drying (Chiremba et al., 2015), or for  $\beta$ -carotene by extrusion (Basto et al., 2016). Compared to other monitored carotenoids, a significantly lower diminution (to 41.5; 34.1; 60.6 and 74.1%) of the identified Z-isomers of lutein (13-Z; 13'-Z; 9-Z and 9'-Z) was caused by extrusion. Even more pronounced isomerization of lutein was induced by puffing, with 9-Z-lutein only falling to 80.0% of i.v. and, conversely, 9'-Z-lutein content almost doubling (from 0.012 to 0.024  $\mu\text{g/g}$ ). Chiremba et al. (2015) also observed an increase in the content of 13-Z- a 9-Z-lutein during the extrusion production of pasta by an average of 13.9%. According to the authors, the increase was mainly due to high temperatures during the drying of pasta (85 °C). Possible isomerization processes caused by technological

treatment are also indicated by the results of Fratianni et al. (2012), who recorded a slight constant increase in 13-Z-retinol content (from 0.037 to 0.089  $\mu\text{g/g}$ ) during the entire extrusion process of egg pasta production.

The Z-isomers of zeaxanthin (13-Z-zeaxanthin and 9-Z-zeaxanthin), present in low concentrations in the starting material, were affected differently by extrusion and puffing. The content of 13-Z-zeaxanthin, the major of the two identified Z-isomers, decreased by extrusion from an average of 0.022 to 0.003  $\mu\text{g/g}$ , corresponding to only 13.8%. The less represented 9-Z-zeaxanthin (0.003  $\mu\text{g/g}$  on average) was completely annihilated by the extrusion. By contrast, the 13-Z-zeaxanthin content increased by 193% due to puffing (from 0.018 to 0.034  $\mu\text{g/g}$ ) and the 9-Z-zeaxanthin reached even more than 37 times the original value, specifically 0.090  $\mu\text{g/g}$  compared to the initial 0.002  $\mu\text{g/g}$ . This could be due to the much higher temperature during puffing in comparison with extrusion (280 and 130 °C respectively).

#### 4. Conclusion

The extrusion and puffing of wheat grain for application in the food industry cause a considerable reduction of carotenoid content. Based on the presented results, it can be noted that puffing (TCC 31.6% of i.v.) is a slightly more carotenoid-sparing process compared to extrusion (TCC 25.7% of i.v.) and to the previously examined baking of buns (27.4% of i.v.). However, colored-grain wheats are also a potentially great alimentary source of other health enhancing compounds such as anthocyanins (Lachman et al., 2017), tocopherols (Lachman et al., 2018) and phenolic acids (Paznocht et al., 2020). In the interest of the production of nutritionally high-quality foodstuffs, the question remains to what extent these technologies affect other nutritionally important substances contained in newly bred wheat genotypes.

#### CRediT authorship contribution statement

**Luboš Paznocht:** Conceptualization, Resources, Investigation, Writing - original draft, Visualization. **Barbora Burešová:** Formal analysis, Writing - original draft, Visualization. **Zora Kotíková:** Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Data curation, Visualization. **Petr Martinek:** Resources, Funding acquisition.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgments

This work was supported by the project NAZV No. QK1910343 of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, and by the Czech University of Life Sciences Prague, SGS SV 20-7-21120.

We would like to thank Jessica Kendall Hankiewicz for her thorough proofreading of this article.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127951>.

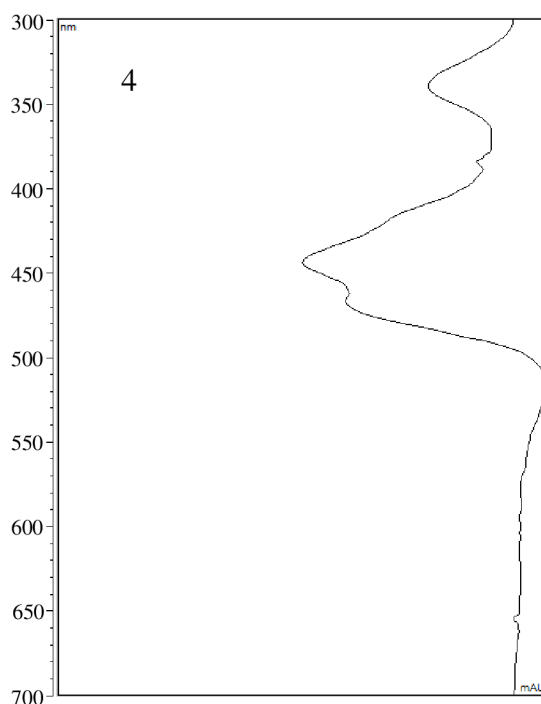
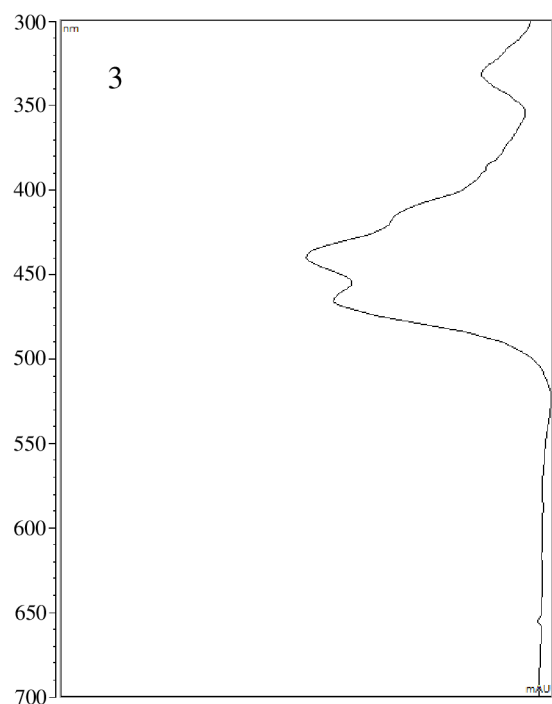
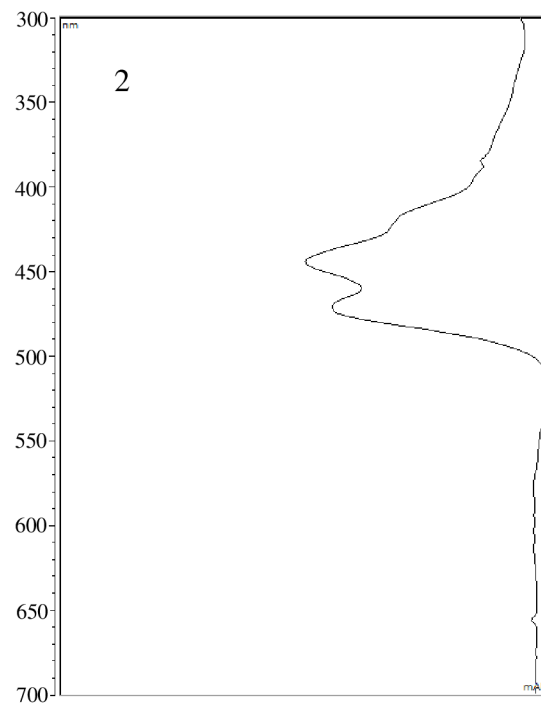
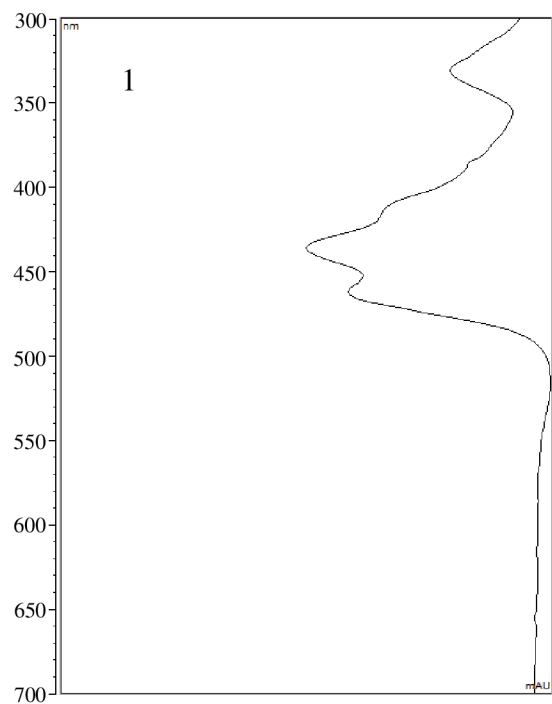
#### References

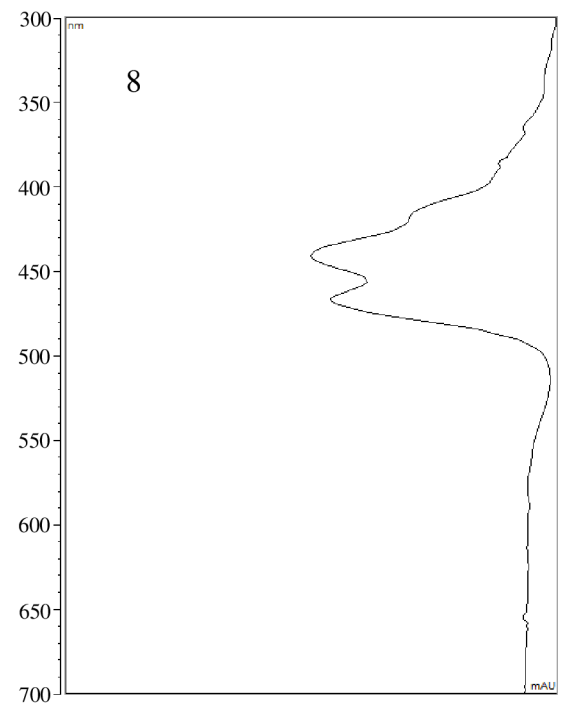
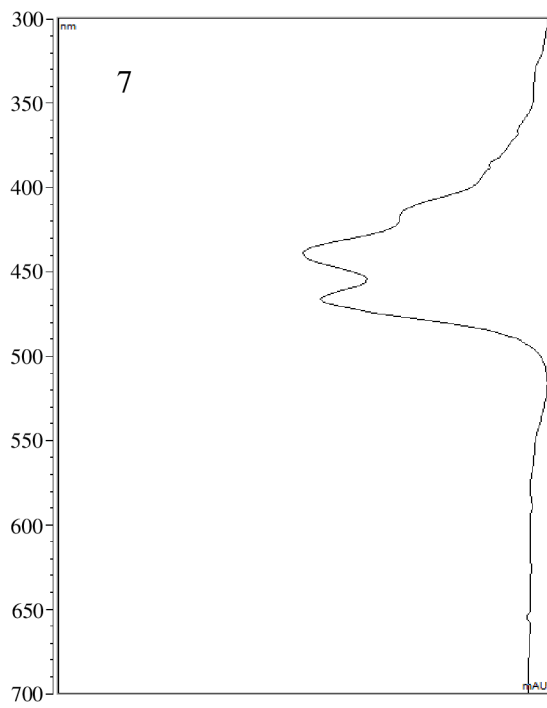
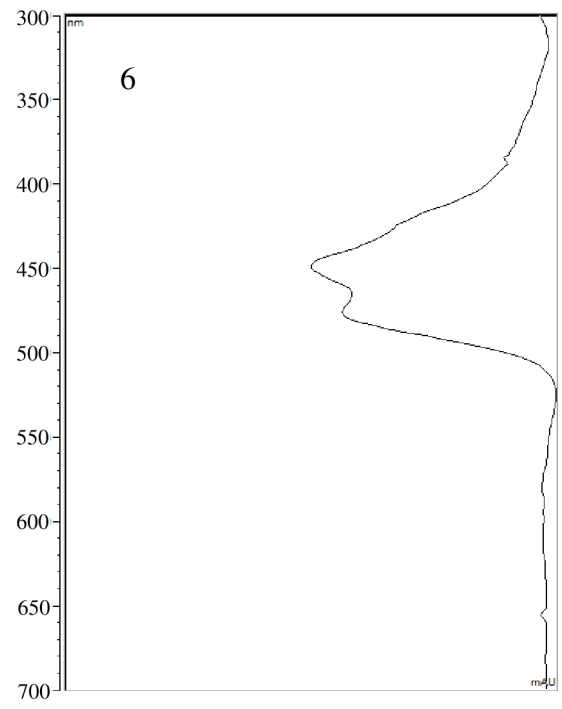
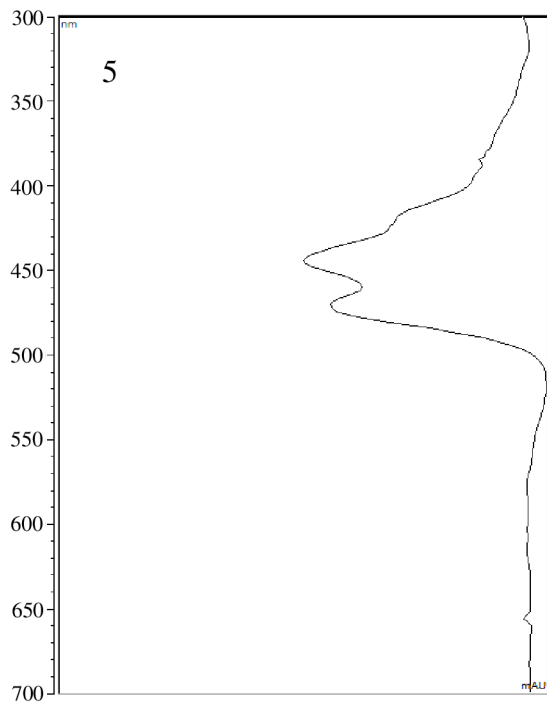
- Ahmad, F. T., Asenstorfer, R. E., Soriano, I. R., & Mares, D. J. (2013). Effect of temperature on lutein esterification and lutein stability in wheat grain. *Journal of Cereal Science*, 58, 408–413.
- Aman, R., Biehl, J., Carle, R., Conrad, J., Beifuss, U., & Schieber, A. (2005). Application of HPLC coupled with DAD, APcI-MS and NMR to the analysis of lutein and zeaxanthin

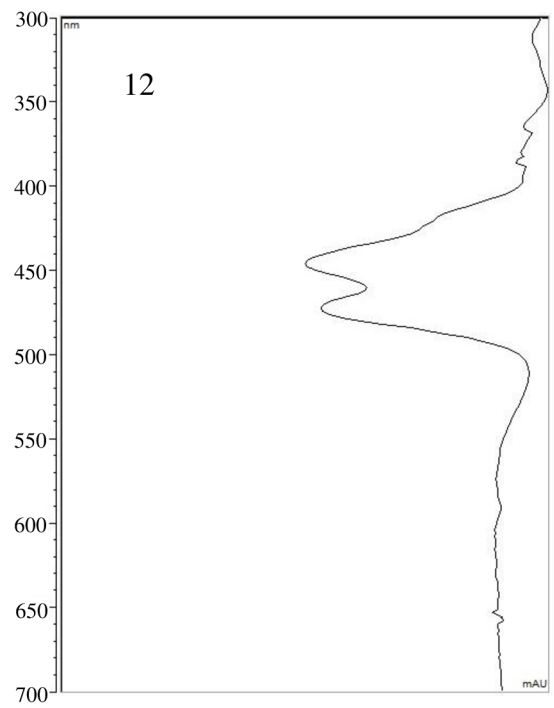
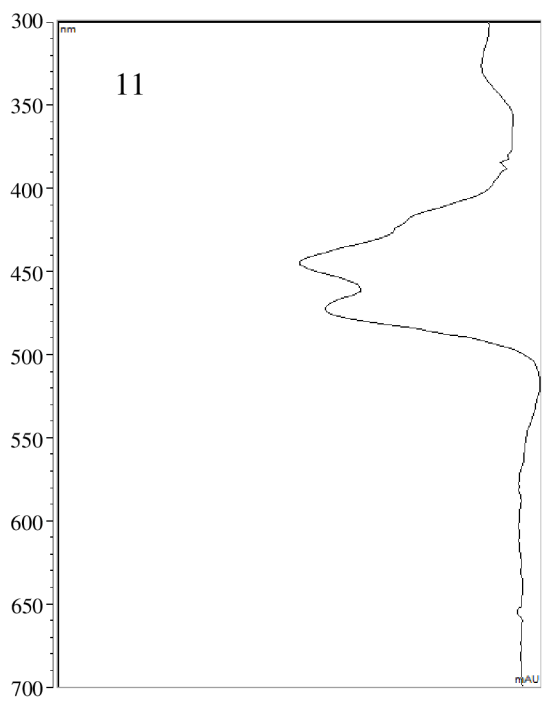
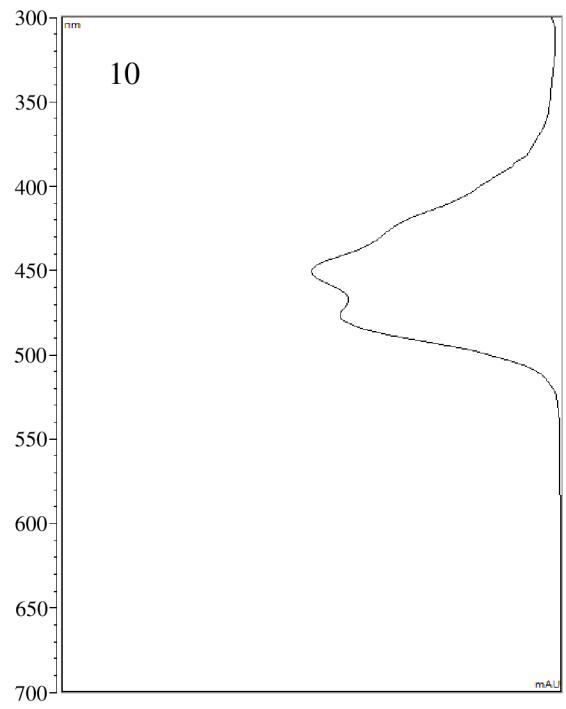
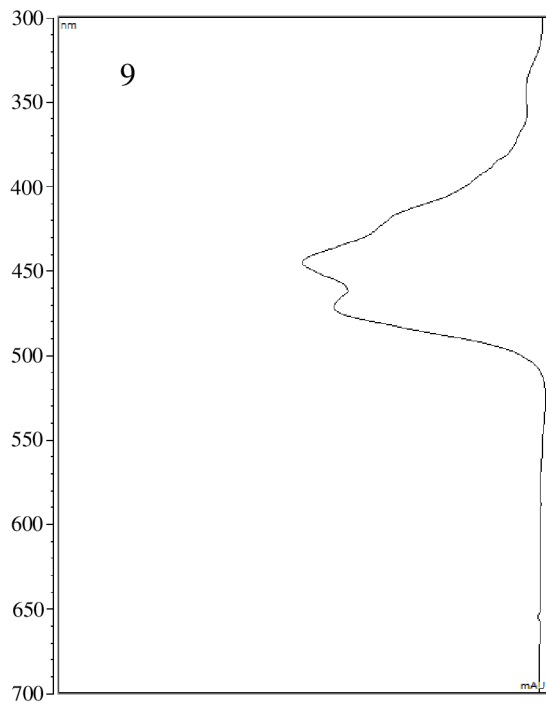
- stereoisomers in thermally processed vegetables. *Food Chemistry*, 92, 753–763.
- Atienza, S. G., Ballesteros, J., Martín, A., & Hornero-Méndez, D. (2007). Genetic Variability of Carotenoid Concentration and Degree of Esterification among Tritordeum ( $\times$  Tritordeum Ascherson et Graebner) and Durum Wheat Accessions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4244–4251.
- Basto, G. J., Carvalho, C. W. P., Soares, A. G., Costa, H. T. G. B., Chávez, D. W. H., Godoy, R. L. D., & Pacheco, S. (2016). Physicochemical properties and carotenoid content of extruded and non-extruded corn and peach palm (*Bactris gasipaes*, Kunth). *LWT – Food Science and Technology*, 69, 312–318.
- Britton, G. (1996). Carotenoids. In G. A. F. Hendry, & J. D. Houghton (Eds.). *Natural food colorants* (pp. 197–243). Boston, MA: Springer.
- Cattaneo, S., Hidalgo, A., Masotti, F., Stuknyte, M., Brandolini, A., & De Novi, I. (2015). Heat damage and in vitro starch digestibility of puffed wheat kernels. *Food Chemistry*, 188, 286–293.
- Chiremba, C., Pozniak, C. J., & Fu, B. X. (2015). Changes in Semolina Yellow Pigment Content and Carotenoid Composition During Pasta Processing. *Cereal Chemistry*, 92(6), 551–556.
- Cueto, M., Farroni, A., Schoenlechner, R., Schleining, G., & Buera, P. (2017). Carotenoid and color changes in traditionally flaked and extruded products. *Food Chemistry*, 229, 640–645.
- Dehghan-Shoar, Z., Hardacre, A. K., & Brennan, C. S. (2010). The physico-chemical characteristics of extruded snacks enriched with tomato lycopene. *Food Chemistry*, 123, 1117–1122.
- FAO, Food and Agriculture Organization (2018). *Food Outlook Biannual Report on Global Food Markets*. Rome, Italy: United Nations, Food and Agriculture Organization. Available from <http://www.fao.org/3/CA0239EN/ca0239en.pdf> (accessed 05/04/2020).
- Fares, C., Codianni, P., Nigro, F., Platani, C., Scazzina, F., & Pellegrini, N. (2008). Processing and cooking effects on chemical, nutritional and functional properties of pasta obtained from selected emmer genotypes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 2435–2444.
- Fратиanni, A., Di Crisco, T., Mignogna, R., & Panfili, G. (2012). Carotenoids, tocopherols and retinols evolution during egg pasta – making processes. *Food Chemistry*, 131(2), 590–595.
- Hidalgo, A., & Brandolini, A. (2012). Lipoygenase activity in wholemeal flours from *Triticum monococcum*, *Triticum turgidum* and *Triticum aestivum*. *Food Chemistry*, 131(4), 1499–1503.
- Hidalgo, A., Scuppa, S., & Brandolini, A. (2016). Technological quality and chemical composition of puffed grains from einkorn (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum*) and bread wheat (*Triticum aestivum* L. subsp. *aestivum*). *LWT – Food Science and Technology*, 68, 541–548.
- Hidalgo, A., Brandolini, A., & Pompei, C. (2010). Carotenoids evolution during pasta, bread and water biscuit preparation from wheat flours. *Food Chemistry*, 121(3), 746–751.
- Kao, F. J., Chiu, Y. S., Tsou, M. J., & Chiang, W. D. (2012). Effects of Chinese domestic cooking methods on the carotenoid composition of vegetables in Taiwan. *LWT – Food Science and Technology*, 46, 485–492.
- Kotíková, Z., Šulc, M., Lachman, J., Pivec, V., Orsák, M., & Hamouz, K. (2016). Carotenoid profile and retention in yellow-, purple- and red-fleshed potatoes after thermal processing. *Food Chemistry*, 197, 992–1001.
- Lachman, J., Hejtmánková, A., Orsák, M., Popov, M., & Martinek, P. (2018). Tocotrienols and tocopherols in colored-grain wheat, tritordeum and barley. *Food Chemistry*, 240, 725–735.
- 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.
- Leenhardt, F., Lyan, B., Rock, E., Boussard, A., Potus, J., Chanliaud, E., & Remesy, C. (2006). Wheat lipoygenase activity induces greater loss of carotenoids than vitamin E during breadmaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5), 1710–1715.
- Mattera, M. G., Hornero-Méndez, D., & Atienza, S. G. (2017). Lutein ester profile in wheat and tritordeum can be modulated by temperature: Evidences for regioselectivity and fatty acid preferential of enzymes encoded by genes on chromosomes 7D and 7Hc. *Food Chemistry*, 219, 199–206.
- Ortak, M., Caltinoglu, C., Sensoy, I., Karakaya, S., & Mert, B. (2017). Changes in functional properties and in vitro bioaccessibilities of  $\beta$ -carotene and lutein after extrusion processing. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 54, 3543–3551.
- Ortiz, D., Ponrajan, A., Bonnet, J. P., Rocheford, T., & Ferruzzi, M. G. (2018). Carotenoid Stability during Dry Milling, Storage, and Extrusion Processing of Biofortified Maize Genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(18), 4683–4691.
- Paznocht, L., Kotíková, Z., Burešová, B., Lachman, J., & Martinek, P. (2020). Phenolic acids in kernels of different coloured-grain wheat genotypes. *Plant, Soil and Environment*, 66, 57–64.
- Paznocht, L., Kotíková, Z., Orsák, M., Lachman, J., & Martinek, P. (2019). Carotenoid changes of colored-grain wheat flours during bun-making. *Food Chemistry*, 277, 725–734.
- Paznocht, L., Kotíková, Z., Šulc, M., Lachman, J., Orsák, M., Eliášová, M., & Martinek, P. (2018). Free and esterified carotenoids in pigmented wheat, tritordeum and barley grains. *Food Chemistry*, 240, 670–678.
- Piřat, B., Ogrodowska, D., & Zadernowski, R. (2016). Nutrient Content of Puffed Proso Millet (*Panicum miliaceum* L.) and Amaranth (*Amaranthus cruentus* L.) Grains. *Czech Journal of Food Science*, 34(4), 362–369.
- Šárka, E., Čopíková, J., & Smrčková, P. (2013). Extrusion process in cereal and confectionery technologies. *Listy cukrovarnické a řepařské*, 129(11), 350–354.
- Scott, K. J. (2001). Detection and Measurement of Carotenoids by UV/VIS Spectrophotometry. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, F2.2.1–F2.2.10.
- Statista – The statistic Portal (2020). <https://www.statista.com/statistics/267268/production-of-wheat-worldwide-since-1990/> (accessed 05/04/2020).
- Thrane, J. E., Kyle, M., Striabel, M., Haande, S., Grung, M., Rohrlack, T., & Andersen, T. (2015). Spectrophotometric analysis of pigments: A Critical Assessment of a High-Throughput Method for Analysis of Algal Pigment Mixtures by Spectral Deconvolution. *PLoS ONE*, 10(9), Article e0137645.
- Updike, A. A., & Schwartz, S. J. (2003). Thermal processing of vegetables increases cis isomers of lutein and zeaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(21), 6184–6190.
- Waramboi, J. G., Gidley, M. J., & Sopade, M. A. (2013). Carotenoid contents of extruded and non-extruded sweetpotato flours from Papua New Guinea and Australia. *Food Chemistry*, 141, 1740–1746.

### Supplement 1 Absorption spectra of all identified carotenoids (retention time)

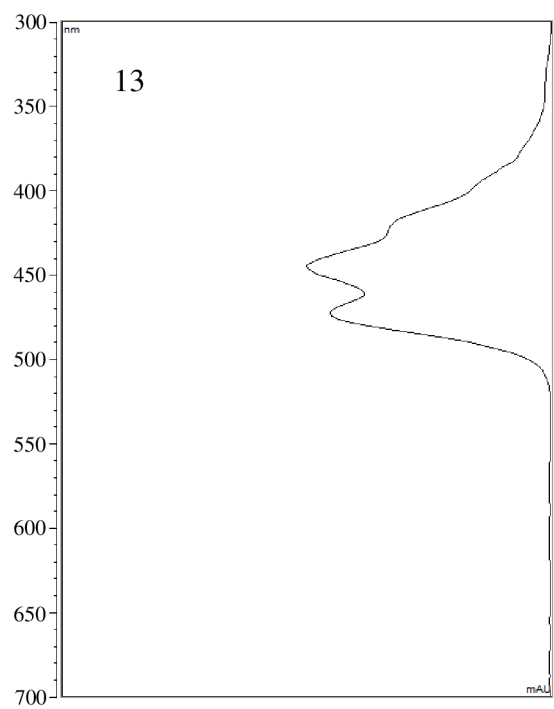
1 – 13-*Z*-Lutein (9.8 min), 2 – Antheraxanthin (9.9 min), 3 – 13'-*Z*-Lutein (10.1 min), 4 – 13-*Z*-Zeaxanthin (10.5 min), 5 – All-*E*-Lutein (10.6 min), 6 – All-*E*-Zeaxanthin (11.4 min), 7 – 9-*Z*-Lutein (11.6 min), 8 – 9'-*Z*-Lutein (12.3 min), 9 – 9-*Z*-Zeaxanthin (12.7 min), 10 –  $\beta$ -Carotene (16.5 min), 11 – Xanthophyll monoester (16.0 min), 12 – Xanthophyll diester (20.3 min), 13 –  $\alpha$ -Carotene (15.4 min, not shown in chromatogram)











## Supplement 2

Changes in carotenoid contents (an average  $\pm$  standard deviation;  $\mu\text{g/g}$  DW) of the individual genotypes as a result of extrusion (2a) and puffing (2b)

### 2a Extrusion

		Antheraxanthin	All- <i>E</i> -Lutein	13- <i>Z</i> -Lutein	13'- <i>Z</i> -Lutein	9- <i>Z</i> -Lutein	9'- <i>Z</i> -Lutein	All- <i>E</i> -Zeaxanthin	13- <i>Z</i> -Zeaxanthin	9- <i>Z</i> -Zeaxanthin	$\alpha$ -Carotene	$\beta$ -Carotene	Carotenoid esters	Total lutein	Total carotenoids
Bohemia	Wholemeal flour	0.033 $\pm$ 0.002	0.904 $\pm$ 0.029	0.044 $\pm$ 0.002	0.037 $\pm$ 0.003	0.025 $\pm$ 0.003	0.020 $\pm$ 0.001	0.114 $\pm$ 0.007	0.018 $\pm$ 0.001	n.d.	n.d.	0.027 $\pm$ 0.006	n.d.	1.030 $\pm$ 0.026	1.222 $\pm$ 0.037
	Extrudate	0.007 $\pm$ 0.001	0.327 $\pm$ 0.004	0.020 $\pm$ 0.001	0.017 $\pm$ 0.001	0.028 $\pm$ 0.002	0.020 $\pm$ 0.002	0.043 $\pm$ 0.003	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.410 $\pm$ 0.007	0.460 $\pm$ 0.007
Annie	Wholemeal flour	0.007 $\pm$ 0.001	0.516 $\pm$ 0.012	0.018 $\pm$ 0.000	0.017 $\pm$ 0.002	0.015 $\pm$ 0.002	0.010 $\pm$ 0.001	0.099 $\pm$ 0.005	0.013 $\pm$ 0.002	n.d.	n.d.	0.030 $\pm$ 0.001	0.249 $\pm$ 0.005	0.576 $\pm$ 0.011	0.973 $\pm$ 0.015
	Extrudate	n.d.	0.145 $\pm$ 0.001	0.008 $\pm$ 0.000	0.007 $\pm$ 0.000	0.012 $\pm$ 0.000	0.007 $\pm$ 0.001	0.031 $\pm$ 0.002	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.096 $\pm$ 0.009	0.181 $\pm$ 0.001	0.308 $\pm$ 0.009
Citrus	Wholemeal flour	0.042 $\pm$ 0.005	3.335 $\pm$ 0.024	0.153 $\pm$ 0.006	0.111 $\pm$ 0.001	0.088 $\pm$ 0.005	0.050 $\pm$ 0.003	0.213 $\pm$ 0.006	0.047 $\pm$ 0.002	0.012 $\pm$ 0.000	0.017 $\pm$ 0.001	0.088 $\pm$ 0.002	n.d.	3.736 $\pm$ 0.021	4.155 $\pm$ 0.027
	Extrudate	0.009 $\pm$ 0.001	0.596 $\pm$ 0.020	0.034 $\pm$ 0.003	0.028 $\pm$ 0.000	0.043 $\pm$ 0.002	0.030 $\pm$ 0.001	0.061 $\pm$ 0.003	0.013 $\pm$ 0.000	n.d.	n.d.	0.024 $\pm$ 0.003	n.d.	0.732 $\pm$ 0.020	0.839 $\pm$ 0.030
Bona Vita	Wholemeal flour	0.040 $\pm$ 0.000	2.897 $\pm$ 0.027	0.107 $\pm$ 0.012	0.093 $\pm$ 0.005	0.084 $\pm$ 0.011	0.048 $\pm$ 0.005	0.272 $\pm$ 0.012	0.050 $\pm$ 0.002	0.022 $\pm$ 0.000	0.073 $\pm$ 0.008	0.246 $\pm$ 0.020	1.084 $\pm$ 0.027	3.228 $\pm$ 0.002	5.015 $\pm$ 0.047
	Extrudate	n.d.	0.569 $\pm$ 0.005	0.060 $\pm$ 0.003	0.040 $\pm$ 0.002	0.043 $\pm$ 0.001	0.030 $\pm$ 0.001	0.072 $\pm$ 0.001	0.018 $\pm$ 0.001	n.d.	0.019 $\pm$ 0.000	0.064 $\pm$ 0.003	0.258 $\pm$ 0.007	0.741 $\pm$ 0.005	1.171 $\pm$ 0.025
AF Jumiko	Wholemeal flour	0.021 $\pm$ 0.003	1.066 $\pm$ 0.036	0.043 $\pm$ 0.002	0.036 $\pm$ 0.001	0.034 $\pm$ 0.003	0.021 $\pm$ 0.002	0.154 $\pm$ 0.004	n.d.	n.d.	n.d.	0.019 $\pm$ 0.001	n.d.	1.199 $\pm$ 0.036	1.392 $\pm$ 0.042
	Extrudate	n.d.	0.310 $\pm$ 0.006	0.018 $\pm$ 0.001	0.012 $\pm$ 0.001	0.024 $\pm$ 0.002	0.017 $\pm$ 0.002	0.043 $\pm$ 0.001	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.382 $\pm$ 0.010	0.424 $\pm$ 0.011
Konini	Wholemeal flour	0.012 $\pm$ 0.001	0.610 $\pm$ 0.004	0.018 $\pm$ 0.003	0.027 $\pm$ 0.002	0.026 $\pm$ 0.005	0.008 $\pm$ 0.002	0.175 $\pm$ 0.004	0.022 $\pm$ 0.002	n.d.	n.d.	0.085 $\pm$ 0.001	1.059 $\pm$ 0.016	0.690 $\pm$ 0.004	2.042 $\pm$ 0.008
	Extrudate	n.d.	0.196 $\pm$ 0.006	0.009 $\pm$ 0.001	0.008 $\pm$ 0.001	0.019 $\pm$ 0.003	0.012 $\pm$ 0.001	0.076 $\pm$ 0.004	n.d.	n.d.	n.d.	0.027 $\pm$ 0.006	0.399 $\pm$ 0.009	0.245 $\pm$ 0.008	0.747 $\pm$ 0.018
ANK 28A	Wholemeal flour	0.024 $\pm$ 0.003	0.635 $\pm$ 0.023	0.022 $\pm$ 0.003	0.022 $\pm$ 0.001	0.021 $\pm$ 0.004	0.012 $\pm$ 0.001	0.191 $\pm$ 0.006	0.017 $\pm$ 0.003	n.d.	n.d.	0.028 $\pm$ 0.009	0.149 $\pm$ 0.012	0.712 $\pm$ 0.018	1.122 $\pm$ 0.041
	Extrudate	n.d.	0.138 $\pm$ 0.007	0.011 $\pm$ 0.001	0.007 $\pm$ 0.001	0.009 $\pm$ 0.002	0.007 $\pm$ 0.001	0.044 $\pm$ 0.002	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.033 $\pm$ 0.004	0.173 $\pm$ 0.010	0.250 $\pm$ 0.015
RU 687-12	Wholemeal flour	0.019 $\pm$ 0.003	1.143 $\pm$ 0.029	0.035 $\pm$ 0.002	0.038 $\pm$ 0.002	0.031 $\pm$ 0.005	0.017 $\pm$ 0.003	0.132 $\pm$ 0.006	0.020 $\pm$ 0.004	n.d.	n.d.	0.061 $\pm$ 0.002	0.276 $\pm$ 0.005	1.264 $\pm$ 0.023	1.772 $\pm$ 0.032
	Extrudate	n.d.	0.212 $\pm$ 0.001	0.017 $\pm$ 0.001	0.012 $\pm$ 0.000	0.016 $\pm$ 0.001	0.011 $\pm$ 0.001	0.043 $\pm$ 0.003	n.d.	n.d.	n.d.	0.015 $\pm$ 0.001	0.055 $\pm$ 0.003	0.267 $\pm$ 0.002	0.381 $\pm$ 0.005
UC 66049	Wholemeal flour	0.023 $\pm$ 0.001	0.384 $\pm$ 0.022	0.017 $\pm$ 0.002	0.015 $\pm$ 0.002	0.010 $\pm$ 0.001	0.007 $\pm$ 0.001	0.140 $\pm$ 0.007	0.018 $\pm$ 0.003	n.d.	n.d.	0.016 $\pm$ 0.001	0.110 $\pm$ 0.003	0.433 $\pm$ 0.023	0.739 $\pm$ 0.023
	Extrudate	n.d.	0.099 $\pm$ 0.002	0.012 $\pm$ 0.002	0.006 $\pm$ 0.001	0.007 $\pm$ 0.002	0.007 $\pm$ 0.001	0.045 $\pm$ 0.001	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.033 $\pm$ 0.006	0.130 $\pm$ 0.003	0.208 $\pm$ 0.008
Skorpion	Wholemeal flour	0.022 $\pm$ 0.001	0.927 $\pm$ 0.033	0.029 $\pm$ 0.003	0.030 $\pm$ 0.002	0.022 $\pm$ 0.001	0.014 $\pm$ 0.001	0.151 $\pm$ 0.006	0.019 $\pm$ 0.003	n.d.	n.d.	0.034 $\pm$ 0.002	0.200 $\pm$ 0.010	1.023 $\pm$ 0.034	1.449 $\pm$ 0.053
	Extrudate	n.d.	0.180 $\pm$ 0.003	0.012 $\pm$ 0.001	0.009 $\pm$ 0.002	0.015 $\pm$ 0.004	0.011 $\pm$ 0.001	0.047 $\pm$ 0.001	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.048 $\pm$ 0.011	0.227 $\pm$ 0.010	0.322 $\pm$ 0.004
Average of all analyzed varieties	Wholemeal flour	0.024 $\pm$ 0.011	1.242 $\pm$ 1.022	0.049 $\pm$ 0.045	0.043 $\pm$ 0.033	0.036 $\pm$ 0.027	0.021 $\pm$ 0.016	0.164 $\pm$ 0.051	0.022 $\pm$ 0.015	0.003 $\pm$ 0.008	0.009 $\pm$ 0.023	0.063 $\pm$ 0.069	0.313 $\pm$ 0.413	1.389 $\pm$ 1.141	1.988 $\pm$ 1.433
	Extrudate	0.002 $\pm$ 0.004	0.277 $\pm$ 0.176	0.020 $\pm$ 0.016	0.015 $\pm$ 0.011	0.022 $\pm$ 0.013	0.015 $\pm$ 0.009	0.051 $\pm$ 0.014	0.003 $\pm$ 0.007	-	0.002 $\pm$ 0.006	0.013 $\pm$ 0.021	0.092 $\pm$ 0.132	0.349 $\pm$ 0.222	0.512 $\pm$ 0.310
Decrease to [%] (related to 100% in wholemeal flour)		<b>6.83</b>	<b>22.3</b>	<b>41.5</b>	<b>34.1</b>	<b>60.6</b>	<b>74.1</b>	<b>30.8</b>	<b>13.8</b>	<b>0.00</b>	<b>21.3</b>	<b>20.5</b>	<b>29.5</b>	<b>25.1</b>	<b>25.7</b>

n.d. – not detectable

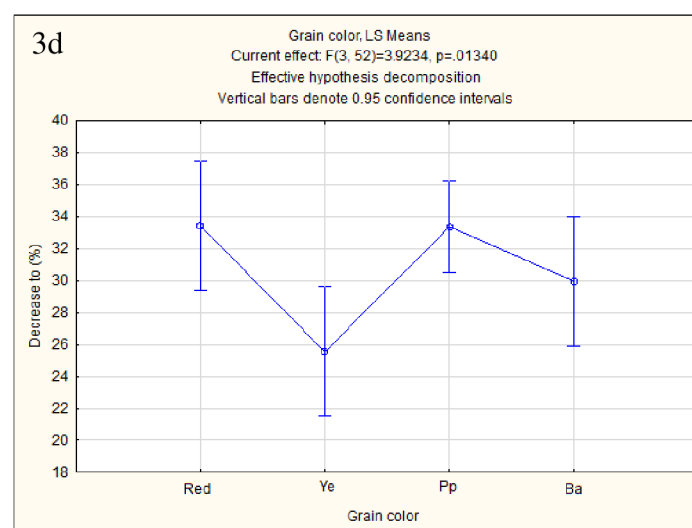
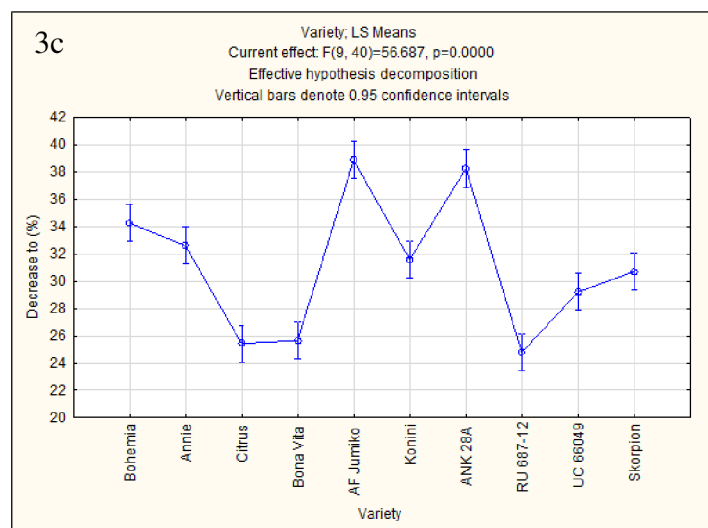
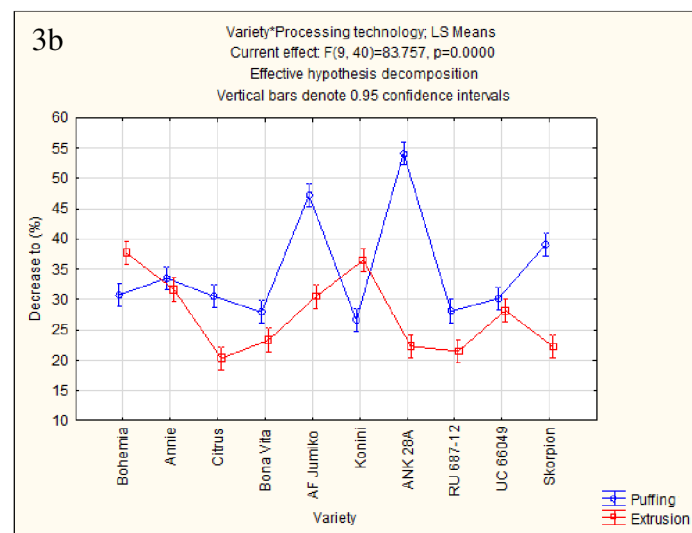
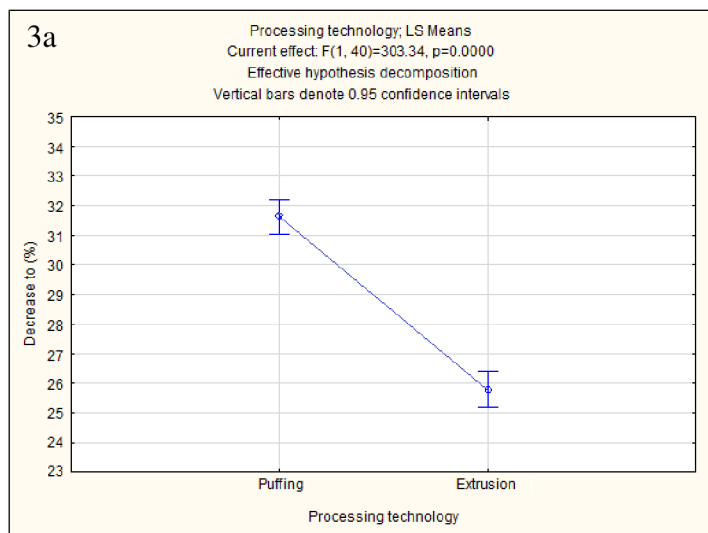
## 2b Puffing

		Antheraxanthin	All-E-Lutein	13-Z-Lutein	13'-Z-Lutein	9-Z-Lutein	9'-Z-Lutein	All-E-Zeaxanthin	13-Z-Zeaxanthin	9-Z-Zeaxanthin	$\alpha$ -Carotene	$\beta$ -Carotene	Carotenoid esters	Total lutein	Total carotenoids
Bohemia	Raw grain	0.021±0.002	0.768±0.007	0.029±0.001	0.023±0.001	0.015±0.001	0.013±0.001	0.100±0.002	0.018±0.003	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.830±0.012	0.987±0.011
	Puffed grain	n.d.	0.127±0.005	n.d.	0.007±0.001	0.021±0.001	0.018±0.000	0.048±0.001	0.023±0.002	0.061±0.001	n.d.	n.d.	n.d.	0.172±0.004	0.305±0.006
Annie	Raw grain	n.d.	0.356±0.016	0.010±0.001	0.011±0.002	0.007±0.001	0.006±0.001	0.080±0.005	n.d.	n.d.	n.d.	0.009±0.002	0.124±0.009	0.391±0.019	0.604±0.030
	Puffed grain	n.d.	0.060±0.005	n.d.	n.d.	0.010±0.001	0.009±0.001	0.038±0.002	0.013±0.001	0.031±0.002	n.d.	n.d.	0.042±0.008	0.079±0.006	0.202±0.014
Citrus	Raw grain	0.033±0.003	2.917±0.079	0.113±0.007	0.094±0.002	0.079±0.007	0.041±0.001	0.203±0.010	0.046±0.006	0.013±0.001	n.d.	0.074±0.005	n.d.	3.203±0.088	3.613±0.104
	Puffed grain	0.004±0.001	0.434±0.014	0.027±0.003	0.020±0.001	0.069±0.003	0.079±0.007	0.110±0.004	0.099±0.003	0.236±0.017	n.d.	0.026±0.003	n.d.	0.628±0.019	1.103±0.043
Bona Vita	Raw grain	0.027±0.004	1.777±0.018	0.053±0.001	0.052±0.000	0.040±0.005	0.018±0.004	0.249±0.003	0.036±0.002	0.014±0.002	n.d.	0.205±0.008	1.588±0.021	1.911±0.014	4.058±0.024
	Puffed grain	0.004±0.000	0.319±0.016	0.013±0.002	0.012±0.001	0.044±0.002	0.046±0.002	0.109±0.003	0.071±0.004	0.150±0.005	n.d.	0.063±0.004	0.304±0.027	0.434±0.014	1.135±0.040
AF Jumiko	Raw grain	0.016±0.003	0.729±0.028	0.030±0.004	0.024±0.002	0.020±0.004	0.011±0.001	0.131±0.006	n.d.	n.d.	n.d.	0.011±0.003	n.d.	0.815±0.035	0.974±0.043
	Puffed grain	n.d.	0.198±0.011	0.007±0.001	0.006±0.001	0.031±0.004	0.031±0.004	0.070±0.004	0.032±0.003	0.084±0.003	n.d.	n.d.	n.d.	0.273±0.010	0.459±0.019
Konini	Raw grain	0.007±0.002	0.468±0.020	0.013±0.002	0.017±0.001	0.016±0.002	0.006±0.001	0.134±0.007	0.016±0.002	n.d.	n.d.	0.063±0.004	0.956±0.020	0.509±0.021	1.695±0.047
	Puffed grain	n.d.	0.086±0.011	n.d.	0.007±0.001	0.013±0.002	0.010±0.002	0.057±0.007	0.017±0.003	0.055±0.009	n.d.	0.020±0.007	0.185±0.020	0.116±0.012	0.450±0.047
ANK 28A	Raw grain	0.017±0.003	0.418±0.013	0.012±0.000	0.014±0.001	0.010±0.000	n.d.	0.162±0.002	0.012±0.001	n.d.	n.d.	0.014±0.002	0.110±0.007	0.447±0.008	0.769±0.020
	Puffed grain	n.d.	0.120±0.002	n.d.	0.006±0.001	0.019±0.000	0.014±0.001	0.084±0.002	0.029±0.005	0.082±0.003	n.d.	n.d.	0.061±0.003	0.160±0.002	0.416±0.010
RU 687-12	Raw grain	0.014±0.001	0.841±0.016	0.025±0.003	0.029±0.001	0.020±0.000	0.012±0.002	0.130±0.003	0.020±0.002	n.d.	n.d.	0.056±0.002	0.404±0.016	0.915±0.020	1.551±0.030
	Puffed grain	n.d.	0.142±0.001	n.d.	n.d.	0.021±0.002	0.025±0.003	0.064±0.002	0.027±0.001	0.071±0.001	n.d.	n.d.	0.087±0.003	0.187±0.004	0.436±0.001
UC 66049	Raw grain	0.032±0.001	0.250±0.004	n.d.	0.008±0.001	0.073±0.008	n.d.	0.110±0.004	0.016±0.001	n.d.	n.d.	0.008±0.002	0.105±0.015	0.323±0.013	0.602±0.027
	Puffed grain	n.d.	0.046±0.001	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.053±0.002	0.016±0.001	0.045±0.002	n.d.	n.d.	0.022±0.002	0.046±0.001	0.181±0.005
Skorpion	Raw grain	0.012±0.001	0.578±0.029	0.020±0.002	0.019±0.002	0.012±0.001	0.009±0.002	0.117±0.007	0.015±0.001	n.d.	n.d.	0.027±0.002	0.189±0.016	0.629±0.032	0.998±0.040
	Puffed grain	n.d.	0.110±0.001	n.d.	0.007±0.001	0.018±0.001	0.014±0.001	0.069±0.001	0.025±0.001	0.082±0.003	n.d.	n.d.	0.065±0.008	0.149±0.001	0.390±0.012
Average of all analyzed varieties	Raw grain	0.018±0.010	0.913±0.783	0.030±0.031	0.030±0.025	0.030±0.025	0.012±0.011	0.144±0.049	0.018±0.014	0.002±0.005	-	0.043±0.059	0.316±0.507	1.015±0.853	1.556±1.183
	Puffed grain	0.001±0.002	0.160±0.117	0.004±0.009	0.006±0.006	0.024±0.018	0.024±0.022	0.070±0.023	0.034±0.028	0.090±0.058	-	0.010±0.020	0.070±0.096	0.218±0.171	0.492±0.324
Decrease to [%] (related to 100% in raw grain)		<b>3.94</b>	<b>17.5</b>	<b>14.1</b>	<b>19.7</b>	<b>80.0</b>	<b>198</b>	<b>48.7</b>	<b>193</b>	<b>3753</b>	<b>-</b>	<b>23.0</b>	<b>22.1</b>	<b>21.5</b>	<b>31.6</b>

n.d. – not detectable

### Supplement 3

Statistical evaluation of carotenoid losses by factorial ANOVA ( $p \leq 0.05$ ); Factors: Processing technology (3a), Variety  $\times$  Processing technology (3b), Variety (3c), Grain color (3d)



### **4.3.Changes in carotenoids and tocols of colored-grain wheat during unleavened bread preparation**



## Original Research Article

# Changes in carotenoids and tocols of colored-grain wheat during unleavened bread preparation

Barbora Burešová<sup>a,\*</sup>, Luboš Paznocht<sup>a</sup>, Zora Kotíková<sup>a</sup>, Beatrice Giampaglia<sup>a</sup>, Petr Martinek<sup>b</sup>, Jaromír Lachman<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Chemistry, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, 165 00, Prague, Suchbát, Czech Republic

<sup>b</sup> Agrotest Fyto, Ltd., Havlíčkova 2787/121, 767 01, Kroměříž, Czech Republic



## ARTICLE INFO

## Keywords:

Lipophilic antioxidants  
Baking  
Yellow endosperm  
Purple pericarp  
Blue aleurone  
HPLC

## ABSTRACT

The content of carotenoids and tocols in the individual steps of technological processing was determined using HPLC-DAD and HPLC-FLD. The dough preparation resulted in a more pronounced loss of the investigated antioxidants (51.5 and 33.0%) compared to baking (22.5 and 9.1%). Carotenoids appear to be markedly less stable than tocols, as only 26.0% compared to 57.9% of the initial flour content was preserved in the final product, accounting for 0.81 and 29.4 µg/g. In the dough preparation phase, a strong correlation ( $R = 0.693$ ,  $p \leq 0.001$ ) was noted between the tocol content in the flour and the share of retained carotenoids in the dough, indicating a protective effect of tocols on carotenoids. In total, a similar overall retention of carotenoids, as in the leavened bun preparation (27.4%), was found, since the differences in shape of the final product turn out to cause increased carotenoid losses due to high baking temperatures in flatbread.

## 1. Introduction

Cereals are one of the world's most important commodities, especially for their use in the food and feed industries, with wheat, particularly *Triticum aestivum*, taking the leading position on the European continent. Wheat kernels represent a potentially valuable commodity for human consumption thanks to their diverse spectrum of health-promoting phytochemicals, the most important of which are lipophilic carotenoids and tocols (Lachman et al., 2018) and hydrophilic phenolic acids (Paznocht et al., 2020). The constant breeding of new genotypes that are resistant to diseases, pests, and abiotic stressors, and/or that have added nutritional value, is essential for successful agricultural production. In recent decades, so-called colored-grain wheats, the grain of which differs from the grain of traditional (red) hexaploid varieties, for example by increased carotenoid content (yellow endosperm - Ye, i. e. Bona Vita), or a completely new ability to synthesize and store anthocyanins in pericarp (purple pericarp - Pp; i. e. AF Jumiko), or in the aleurone layer (blue aleurone - Ba; i. e. AF Oxana), have been bred (Martinek et al., 2018, 2019). In recent years, genotypes with combinations of colors inherited from different colored-grain wheats have also been cross-bred, such as the "black" (Ba + Pp) AF Zora variety newly

recognized in the Czech Republic. The elevated carotenoid content characteristic for ancient wheats (*T. monococcum* L., *T. dicoccum* Schöbl.) genetically conditioned by *Psy* genes has been reintroduced to modern hexaploid Ye genotypes, whereas the high anthocyanin content of Pp and Ba wheats is determined by *Pp* genes originating from tetraploid wheat (*T. turgidum* L. subsp. *abyssinicum* Vavilov) and *Ba* genes transferred from *Thinopyrum ponticum* and *T. boeoticum* (Lachman et al., 2017).

Due to the increasing awareness of consumers that the consumption of whole grain products is associated with the prevention of lifestyle-related, non-communicable diseases (Zamaratskaia et al., 2021), there is room available for the utilization of pigmented wheat genotypes, which could be commercialized for novel nutrient-dense food production (Gupta et al., 2021). Colored-grain wheat products could significantly contribute to maintaining the proper health of consumers, since compounds that are abundant in their kernels (i. e. carotenoids, tocols, and anthocyanins) have been shown to act as antioxidants, as well as to help in the prevention of several diseases such as cancer, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases (Jomova and Valko, 2013; Tiwari and Cummins, 2009; Garg et al., 2016). The processing methods that usually precede the consumption of cereals in order to achieve the desired sensory properties can change the chemical composition and

\* Corresponding author.

E-mail address: [buresovab@af.czu.cz](mailto:buresovab@af.czu.cz) (B. Burešová).

<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104108>

Received 7 June 2021; Received in revised form 27 July 2021; Accepted 30 July 2021

Available online 2 August 2021

0889-1575/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

nutritional value of the resulting products (Elišová et al., 2020; Narwal et al., 2020; Šárka et al., 2013). The conformity of carotenoids and tocopherols at the molecular level and the mechanism of their radical scavenging action may result in their stability being limited by similar factors, particularly by direct as well as enzyme-catalyzed oxidation and temperature (Leenhardt et al., 2006).

This study follows a previous bun-making experiment (Paznocht et al., 2019), in which it was found that the degradation of carotenoids is, of all the technological steps performed during bun-making, to the greatest extent related to the kneading and leavening stage of the dough.

Therefore, the objective of this study was to (1) evaluate the effect of the technological steps performed during the preparation of unleavened bread on the content of carotenoids and tocopherols, and to (2) investigate the possible relation between the processing-induced changes of these lipophilic compounds. The knowledge acquired will be used in our continuous efforts to find a suitable grain processing technology that would ensure the preservation of the highest possible content of nutritionally important substances in the final products and thus maximize the use of the nutritional potential of colored-grain wheat genotypes. It is presupposed that shortening the kneading time of the dough and the absence of the leavening phase have a beneficial effect on the preservation of the investigated antioxidants and that there is a relation in the way carotenoids and tocopherols degrade during processing.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material

A total of eleven colored-grain wheat genotypes, namely two of a standard red grain color (used as a control) and three representatives from each of the following analyzed color groups: yellow endosperm, purple pericarp, and blue aleurone, were grown in 2017/2018 at the Agricultural Research Institute in Kroměříž, Czech Republic (49.2851172 N, 17.3646269E). The experimental field parameters were identical to those published in the previous study (Paznocht et al., 2021). All technology processing operations and consequent analyses were performed within ten months after the harvest. The main characteristics of the selected wheat genotypes are listed in Table 1.

### 2.2. Technological steps of the unleavened bread preparation

#### 2.2.1. Wholemeal flour milling

The grains were cleaned on a Labofix (C.W. Brabender® Instruments, South Hackensack, NJ), sieved through a 2 mm sieve, and the remaining impurities were manually removed. The grain was ground on a YM1 Wet Wheat Grinding Machine Y-10 (Yucebas Machine Analytical Equipment Industry, Izmir, Turkey) into three fractions: coarse bran (> 50 mesh), fine bran (50–35 mesh) and flour (< 35 mesh). Wholemeal flour was

**Table 1**

Description of wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes.

Genotype	Growth type	Country of origin (2)	Genotype status	Grain color (3)
Bohemia	Winter	CZE	Released variety	Red
Julie	Winter	CZE	Released variety	Red
Skorpion	Winter	CZE	Released variety	Ba
T.B.S. (1)	Spring	AUT	Breeding line	Ba
AF Oxana	Winter	CZE	Released variety	Ba
Konini	Spring	NZL	Released variety	Pp
AF Jumiko	Winter	CZE	Released variety	Pp
ANK-28B	Spring	RUS	Research germplasm	Pp
Bona Vita	Winter	SVK	Released variety	Ye
Citrus	Winter	DEU	Released variety	Ye
KM 109-17	Winter	CZE	Breeding line	Ye

(1) T.B.S. Tscherma's Blaukörniger Sommerweizen; (2) CZE Czech Republic, AUT Austria, NZL New Zealand, RUS Russian Federation, SVK Slovakia, DEU Germany; (3) Ba Blue aleurone, Pp Purple pericarp, Ye Yellow endosperm.

prepared by mixing all of these fractions.

#### 2.2.2. Preparation of dough and baking

250 g of wholemeal flour, 2 g of salt, and 150 mL of water (22 °C) were used for the dough preparation. After 6 min of kneading, the dough was divided into 4 equal parts, from which flatbreads with a defined height of 4 mm were formed. Two of them were frozen immediately and the other two were baked at 220 °C for 6 min in a forced-air oven (Venticell 111, BMT Medical Technology, Brno, Czech Republic). The frozen samples of dough and the baked bread were subsequently freeze-dried (Lyovac GT2, Steris, Hürth, Germany) in the dark for 120 h and, thus modified, were subjected to chemical analyses.

### 2.3. Sample preparation and chromatographic analysis of carotenoids

Extraction and chromatographic separation, as well as identification and quantification of carotenoids, were described in detail in the previous study (Paznocht et al., 2019).

### 2.4. Sample preparation and chromatographic analysis of tocopherols

#### 2.4.1. Chemicals

Tocotrienol and Tocopherol Mixed Solution Standard was obtained from ChromaDex (Irvine, CA, USA). Methanol (HPLC grade), ethanol, hexane, ethyl acetate, sodium chloride, potassium hydroxide, and pyrogallol (all GR grade) were purchased from Lachner (Neratovice, Czech Republic). Adjusted deionized ultra-pure water was prepared using Simplicity UV (Merck Millipore, Darmstadt, Germany).

#### 2.4.2. Sample extraction

Samples were prepared according to the method published by Gutierrez-Gonzalez et al. (2013) with some modifications. In brief, approximately 0.5 g of homogenized sample was combined with 0.5 mL of 10 mol/L aqueous KOH, 0.5 mL of 95% ethanol, 0.5 mL of 0.15 mol/L aqueous NaCl, and 1.25 mL of 0.48 mol/L ethanolic pyrogallol in a 50-mL plastic screw-capped Falcon tube and incubated at 80 °C for 30 min in a shaking water bath (VWR International, Leuven, Belgium), vortexing every 10 min (Basic 3, IKA Werke, Staufen, Germany). After cooling the sample to an ambient temperature in an ice bath, 3.75 mL of 0.15 mol/L aqueous NaCl was added, and the resulting mixture was extracted twice with 6.5 mL of hexane/ethyl acetate (9:1, v/v), while supported by vortexing and shaking (15 min, GFL 3006, Burgwedel, Germany). The separation of immiscible phases was facilitated by 5 min of centrifugation (3186 rcf, Eppendorf, Hamburg, Germany). Subsequently, the organic phase was transferred into a 20-mL glass test tube and evaporated to dryness under a nitrogen stream. The dry residue was reconstituted with 1 mL of methanol and filtered through a syringe filter (PVDF, 0.45 µm) into a HPLC vial.

#### 2.4.3. Chromatographic separation, identification, and quantification

The analyses were performed using an Ultimate 3000 HPLC system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) with a quaternary pump, column heater, autosampler, and fluorescence detector. The analytes were separated by isocratic elution on a Develosil® RP-AQUEOUS C30 analytical column (250 × 4.6 mm, particle size = 5 µm) by Phenomenex (Torrance, CA, USA). The mobile phase consisted of H<sub>2</sub>O:methanol (3:97, v/v). The operating conditions were as follows: flow rate 1.0 mL/min; column temperature 30 °C; autosampler temperature 10 °C; injection volume 10 µL; time of analysis 35 min. Conditions of detection: excitation wavelength λ = 292 nm, emission wavelength λ = 330 nm. Limits of detection (signal/noise = 3) expressed in µg/g for individual tocopherols were as follows: β-tocotrienol (β-T3) 0.02; α-tocotrienol (α-T3) 0.05; δ-tocopherol (δ-T) 0.03; β-tocopherol (β-T) 0.04; and α-tocopherol (α-T) 0.09. Tocopherols were identified by comparing retention times with those of analytical standards. The quantification was based on peak area. Peaks were integrated and compared to tocopherol standards

(concentration range 0.05–50 µg/mL).

### 2.5. Dry matter

Determination of dry matter (DM) was performed by drying the wholemeal flour at 105 °C to a constant weight in the Venticell 111 forced-air oven.

### 2.6. Statistical analysis

All analyses were performed in triplicate for each genotype, and all values reported in the present study are the average of these three replicates expressed in the DM. The data were processed by Chromeleon (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and Excel (Microsoft, Redmond, WA). Statistical evaluation was performed using STATISTICA software (StatSoft, Tulsa, OK). The effect of genotype on the carotenoid and tocol retention was evaluated by one-way ANOVA ( $p < 0.05$ ) and Tukey's Post Hoc HSD test was used for detailed evaluation. The differences in the content of carotenoids and tocols between individual technological steps according to grain color were assessed using Kruskal-Wallis's test. Correlation between the tocol content in the flour and the carotenoid retention in the dough, as well as between the relative share of carotenoids and tocols preserved in the dough, was tested by means of the Pearson's correlation coefficient, using regular 2D scatterplot as a graphical output.

## 3. Results and discussion

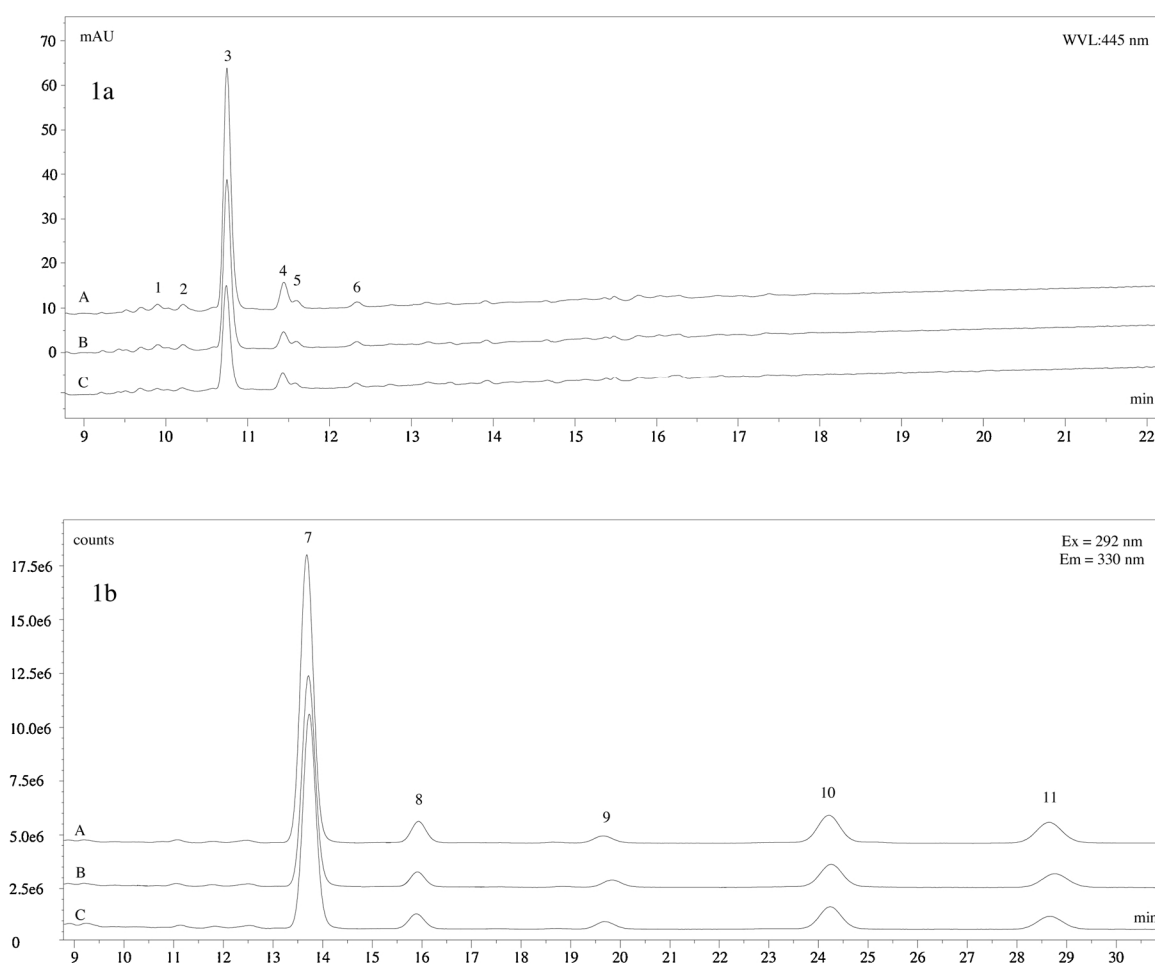
A total of eleven wheat genotypes of different grain color were used for the unleavened bread preparation. The total carotenoid content (TCC; sum of all lutein isomers, zeaxanthin and xanthophyll esters) and total tocol content (TTC; sum of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, and  $\delta$ - both tocopherols and tocotrienols) were determined in wholemeal flour, dough, and baked bread. An illustrative chromatogram of carotenoid and tocol analysis of the genotype AF Jumiko (Pp) depicting the differences between flour, dough, and baked bread is shown in Fig. 1a and b. The retention of the monitored groups of analytes during processing was determined depending on the genotype (TCC in Fig. 2; TTC in Fig. 3) and grain color (Table 2).

Detailed results of the degradation of individual carotenoids and tocols caused by the particular steps of the unleavened bread preparation are given in Supplements 1 and 2.

### 3.1. Carotenoids and tocols in flour

#### 3.1.1. Carotenoids

The average TCC in the flour of all the analyzed genotypes was 3.12 µg/g and ranged from 1.21 µg/g (ANK-28B) to 8.29 µg/g (KM 109-17), see Supplement 1. Of all the analyzed colored-grain groups, the highest TCC was observed in wheats with yellow endosperm and the lowest in conventional red wheats (6.88 and 1.61 µg/g; Table 2). The group of wheats with Ye showed a broad oscillation of the TCC, with variation of a minimum of 5.56 µg/g (Bona Vita) to a maximum of 8.29 µg/g (KM



**Fig. 1.** Chromatograms of AF Jumiko wheat variety from HPLC-DAD carotenoid (1a) and HPLC-FLD tocol (1b) analysis showing differences between flour (A), dough (B), and bread (C) 1 – 13-Z-Lutein, 2 – 13'-Z-Lutein, 3 – All-E-Lutein, 4 – All-E-Zeaxanthin, 5 – 9-Z-Lutein, 6 – 9'-Z-Lutein, 7 –  $\beta$ -tocotrienol, 8 –  $\alpha$ -tocotrienol, 9 –  $\delta$ -tocopherol, 10 –  $\beta$ -tocopherol, 11 –  $\alpha$ -tocopherol.



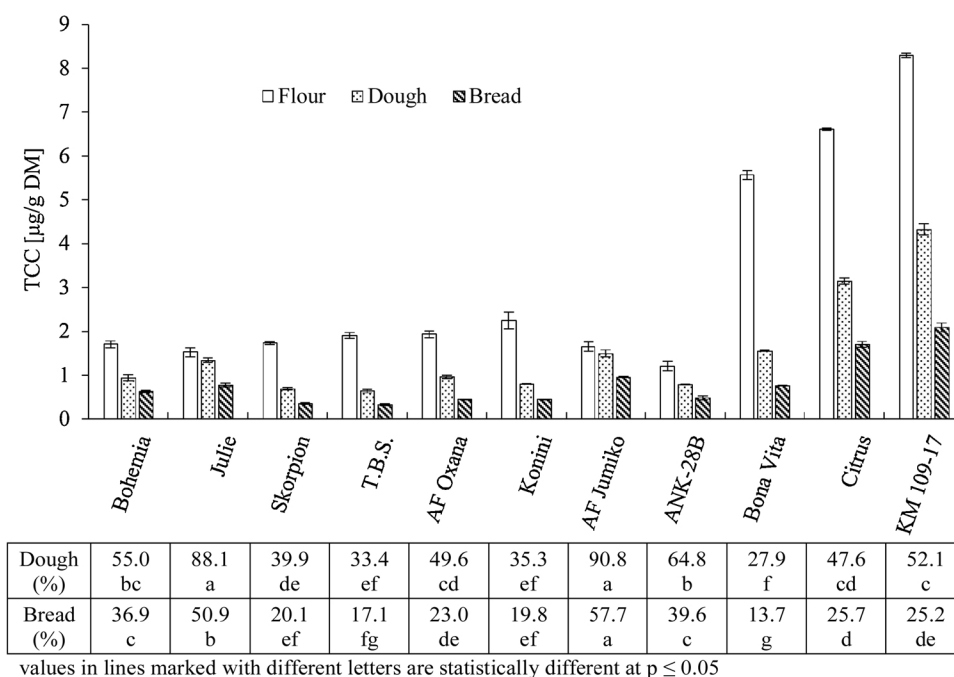


Fig. 2. Retention of the total carotenoid content (TCC) of the individual genotypes during the technological processing.

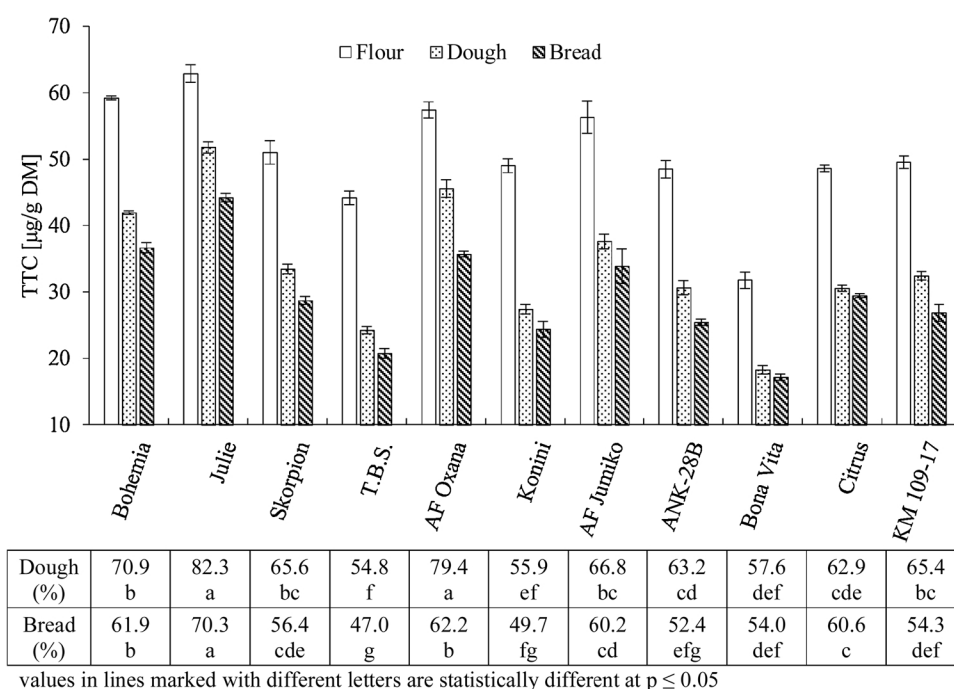


Fig. 3. Retention of the total tocol content (TTC) of the individual genotypes during the technological processing.

109-17). Ba and Pp genotypes showed a higher average TCC (1.85 and 1.70  $\mu\text{g/g}$ ) than traditional red varieties (1.61  $\mu\text{g/g}$ ), but this difference was not statistically significant (data not shown). Comparing the latter two groups, the range of TCC values of the individual representatives was wider in wheats with Pp, in which the minimum was 1.21  $\mu\text{g/g}$  (ANK-28B) and the maximum was 2.24  $\mu\text{g/g}$  (Konini), while Ba wheats ranged from 1.73  $\mu\text{g/g}$  (Skorpion) to 1.93  $\mu\text{g/g}$  (AF Oxana).

In addition to the Ye wheats, a significantly elevated TCC was found in the flour of the purple wheat Konini, which is in accordance with the observations of Paznocht et al. (2019), who, although they observed lower overall values, also reported that, compared to other wheat

genotypes, wheats with Ye and Konini had a relatively increased TCC in the flour. The average TCC of wheats with Pp measured in this study is lower than the values recorded by Ndolo and Beta (2013) (2.62  $\mu\text{g/g}$ ) or Ficco et al. (2016), who even reported comparable results for wholemeal flour made from purple and yellow durum wheat (7.38 and 7.68  $\mu\text{g/g}$ ). However, similarly to our findings, Ndolo and Beta (2013) observed a higher TCC in wheats with Pp compared to red ones (2.62 vs. 2.56  $\mu\text{g/g}$ ), which is in accordance with results published by Paznocht et al. (2018), who also compared pigmented and standard wheats and observed a slightly higher TCC in Pp, but a lower one in Ba genotypes compared to red (3.60 and 2.41 vs. 3.56  $\mu\text{g/g}$ ). Our TCC results for common red

**Table 2**

Carotenoid and tocol content of individual colored-grain wheat groups (an average  $\pm$  standard deviation;  $\mu\text{g/g}$ ) in wheat flour, dough, and bread and their retention (%) relative to the initial value of the flour.

Grain color (number of genotypes)	Technological step	Total carotenoids	Retention	Total tocols	Retention
Red (standard) (n = 2)	Flour	1.61 $\pm$ 0.13a	100	61.1 $\pm$ 2.20a	100
	Dough	1.14 $\pm$ 0.23ab	70.7	46.9 $\pm$ 5.40b	76.8
	Bread	0.70 $\pm$ 0.09b	43.5	40.4 $\pm$ 4.19b	66.2
Blue aleurone (n = 3)	Flour	1.85 $\pm$ 0.11a	100	50.9 $\pm$ 5.86a	100
	Dough	0.76 $\pm$ 0.15b	41.0	34.4 $\pm$ 9.32b	67.7
	Bread	0.37 $\pm$ 0.06c	20.1	28.4 $\pm$ 6.49b	55.9
Purple pericarp (n = 3)	Flour	1.70 $\pm$ 0.47a	100	51.3 $\pm$ 4.06a	100
	Dough	1.02 $\pm$ 0.36ab	60.2	31.9 $\pm$ 4.59b	62.2
	Bread	0.63 $\pm$ 0.25b	36.8	27.9 $\pm$ 4.73b	54.4
Yellow endosperm (n = 3)	Flour	6.82 $\pm$ 1.19a	100	43.3 $\pm$ 8.71a	100
	Dough	3.01 $\pm$ 1.21b	44.1	27.1 $\pm$ 6.67b	62.6
	Bread	1.52 $\pm$ 0.59b	22.2	24.5 $\pm$ 5.66b	56.6
Average of all color groups	Flour	3.12 $\pm$ 2.39a	100	50.8 $\pm$ 8.25a	100
	Dough	1.51 $\pm$ 1.14b	48.5	34.0 $\pm$ 9.41b	67.0
	Bread	0.81 $\pm$ 0.56c	26.0	29.4 $\pm$ 7.57b	57.9

values in columns marked with different letters are statistically different at  $p \leq 0.05$ .

wheats differ slightly from those mentioned by authors like Hidalgo and Brandolini (2008); Lachman et al. (2013), and Leenhardt et al. (2006), who noted lower values (1.36; 1.24; and 1.01  $\mu\text{g/g}$ , resp.). In contrast, Paznocht et al. (2018) reported more than twice as high a TCC in red variety Bohemia.

Consistently with other literature data (Fratianni et al., 2012; Giordano et al., 2017; Hidalgo et al., 2010; Okarter et al., 2010; Paznocht et al., 2019), the most abundant carotenoid in all of the analyzed genotypes was lutein, accompanied by its Z-isomers, accounting for more than three quarters of the TCC on average. The composition of individual carotenoids listed in descending order according to their average values are as follows: lutein (2.21  $\mu\text{g/g}$ ; 70.8%) > xanthophyll esters (0.76  $\mu\text{g/g}$ ; 24.3%) > zeaxanthin (0.19  $\mu\text{g/g}$ ; 6.2%) > lutein Z-isomers (0.17  $\mu\text{g/g}$ ; 5.3%), see Supplement 1. Although the individual genotypes differed in the content of individual carotenoids and TCC, the carotenoid profiles were very similar.

### 3.1.2. Tocols

The TTC in the flour of all genotypes averaged 50.8  $\mu\text{g/g}$ , with the largest amount measured in red variety Julie (62.9  $\mu\text{g/g}$ ) and the lowest in Bona Vita (31.8  $\mu\text{g/g}$ ), see Supplement 2. Regarding the analyzed colored groups (Table 2), the highest TTC was characteristic for standard red varieties (61.1  $\mu\text{g/g}$ ). A lower TTC was observed in wheats with Pp and Ba (51.3 and 50.9  $\mu\text{g/g}$ ) and the lowest in genotypes with Ye (43.3  $\mu\text{g/g}$ ). The latter color group was also the one to have the greatest variations among the individual representatives, with a minimum in the flour made of Bona Vita and a maximum in KM 109-17 (49.5  $\mu\text{g/g}$ ).

Our results fell within the mean literature range (37.2–57.7  $\mu\text{g/g}$ ) of tocol content in wheat (Giambanelli et al., 2013; Hidalgo et al., 2009; Lampi et al., 2010), although significant variations among genotypes were observed. A much lower TTC was observed by Okarter et al. (2010) in soft red winter wheat (15.8  $\mu\text{g/g}$ ) and by Fratianni et al. (2012) in semolina (28.9  $\mu\text{g/g}$ ). Lachman et al. (2018) also measured a lower overall tocol content in pigmented wheats (34.5  $\mu\text{g/g}$  on average), but in accordance with our findings, they observed comparable TTC values among blue- and purple-grained groups of genotypes (28.7 and 28.5  $\mu\text{g/g}$ ) and also reported that of all colored groups, the lowest TTC was in genotypes with Ye (20.2  $\mu\text{g/g}$ ). Considerable variations may be caused not only by the environmental conditions of the growing season, but also by genetic factors, which both have a strong impact on the total tocol content (Lampi et al., 2010).

Five of the eight forms of tocols were detected, namely, in a decreasing order according to the average share on the TTC:  $\beta$ -T3 (28.1  $\mu\text{g/g}$ ; 55.4%) >  $\alpha$ -T (11.9  $\mu\text{g/g}$ ; 23.4%) >  $\beta$ -T (6.22  $\mu\text{g/g}$ ; 12.3%) >  $\alpha$ -T3

(4.91  $\mu\text{g/g}$ ; 9.7%) >  $\delta$ -T (1.06  $\mu\text{g/g}$ ; 2.1%). Significant oscillation of the  $\beta$ -T3 content (ranging from 8.16 to 42.4  $\mu\text{g/g}$ ) among all examined genotypes was observed. Tocotrienols accounted for an average of more than 60% of the TTC, mainly due to the high  $\beta$ -T3 content. The predominance of  $\beta$ -T3 in wheat (48.3; 53.9; and 69.1%) was also reported by Hidalgo et al. (2009); Lampi et al. (2010), and Fratianni et al. (2012). An exception was the variety Bona Vita, which was the only one of all the analyzed genotypes to have a higher percentage of  $\alpha$ -T than  $\beta$ -T3 (40.2 vs. 25.7%). A large share (31.3%) of  $\alpha$ -T, the one of all eight tocols to possess the greatest biological activity and thus best satisfy the criteria to be called a vitamin E (Azzi, 2018; Tiwari and Cummins, 2009), was also found in Konini, accounting for 15.4  $\mu\text{g/g}$ , which is the most of all the genotypes examined.

### 3.2. Retention of carotenoids and tocols in dough

#### 3.2.1. Carotenoids

Dough kneading caused an average TCC decrease to 48.5% of the initial value (i.v.) of the flour. A remarkably high proportion of the TCC was retained in the dough of standard red genotypes (70.7%), with a significantly lower decrease observed in Julie compared to Bohemia (to 88.1 vs. 55.0%; Fig. 2). On the contrary, the greatest degradation occurred in blue- and yellow-grained wheats, in which only 41.0 and 44.1% of the TCC was preserved (Table 2). The most equable values of the preserved TCC were found among the individual genotypes of Ba wheats, whereas considerable oscillations were observed in group of wheats with Ye (decrease to 52.1–27.9%). Highly varying losses were recorded among the individual representatives of the group of wheats with Pp (Supplement 1). The most significant drop in these occurred in Konini (to 35.3%), which was characterized by the highest initial TCC of all the Pp genotypes and had a considerable share of xanthophyll esters, disproving speculation about the higher stability of xanthophyll esters compared to their free forms (Mellado-Ortega and Hornero-Méndez, 2017). An exceptionally high TCC was retained in AF Jumiko (90.8%), which is almost 34% more than was recorded in this variety during the preparation of leavened dough by Paznocht et al. (2019). Furthermore, these authors observed a lower retention of carotenoids in the dough of all genotypes used both in their and in the present experiment; for example, in Citrus and Bohemia the TCC decreased by more than 20% compared to the results of the current study. The initial assumption of a lower carotenoid degradation rate in the production of unleavened dough was supported by the finding that our average TCC retention was 10–15% higher than observed by Paznocht et al. (2019) and Leenhardt et al. (2006) during the preparation of leavened dough. Our results are

comparable to the values published by Fratianni et al. (2012) and Hidalgo et al. (2010), who determined a drop of total carotenoids to 48.9 and 46.0% in the dough used for pasta production. The latter authors noted a significantly lower decrease in the TCC during bread and biscuit preparation (to 74 and 77%), in which the dough was kneaded for half the time than in our study (3 vs. 6 min). However, it is unlikely that a mere shortening of the kneading time would be an effective way to reduce carotenoid degradation, since Chiremba et al. (2015) observed a decline of total carotenoids to 74.1% after 100 s of kneading.

Of all the analyzed genotypes, the largest decrease was observed in Ye variety Bona Vita (to 27.9%), which was also specific in having the lowest initial total tocol content. As for the color groups, both of which had the most significant TCC losses in the dough (Ba and Ye wheats), they also had the lowest initial TTC in the flour. In contrast, the standard red genotypes, in which the largest share of the TCC was retained, showed the highest TTC in the flour (Table 2). As indicated by the results, a high TTC in flour could have a beneficial effect on the amount of carotenoids retained after dough preparation. Our hypothesis was supported by the results of a correlation analysis, which showed a significant positive relation ( $R = 0.693$ ,  $p < 0.001$ ) of the TCC percentage retained in the dough and the initial TTC of the flour (Fig. 4). It is in accordance with findings that carotenoid radical cations formed during the oxidative degradation (as carotenoids act as electron donors rather than electron acceptors) may be efficiently reduced by tocopherols and tocotrienols, but also by other compounds like isoflavonoids, which leads to the regeneration of carotenoids (Han et al., 2010; Mortensen and Skibsted, 1997; Schroeder et al., 2006).

### 3.2.2. Tocols

An average of 67.0% of the TTC from the i.v. of the flour was preserved in the dough. The largest portion of TTC was retained in red wheats (76.8%), which was mainly on account of the minimal losses occurring in Julie (decrease to 82.3%). No statistically significant differences (not shown) in the retained TTC were found between the other analyzed color groups (Ba 67.7%; Ye 62.6%; Pp 62.2%; Table 2). The only exception to all of the representatives of these color groups was AF Oxana, in which a remarkably low decrease (to 79.4%) was observed (Fig. 3). The percentage of the preserved amount of total tocopherols in the dough published by other authors varies depending on the applied dough preparation method, and also on the plant material used. Hidalgo and Brandolini (2010) reported a decrease to 59.9% with a shorter mixing time (3 min) during biscuit preparation (*T. aestivum*). A higher TTC retention (72.3%) was observed by Fratianni et al. (2012) in durum wheat, although the duration of mixing was several-fold longer (18

min). A significantly lower TTC decrease (to 86%) was found by Leenhardt et al. (2006) in bread wheat, despite a relatively long dough preparation time (16 min). Therefore, as with carotenoids, it seems unlikely that simply reducing the kneading period would ensure a higher percentage of tocopherols being retained in the dough.

The average tocol degradation percentage after kneading was lower compared to carotenoids, which is consistent with the findings of Leenhardt et al. (2006) (12 vs. 66%) and Fratianni et al. (2012) (27.7 vs. 48.9%). Although tocopherols seem to be more resilient to degradation caused during dough preparation, a positive relation ( $R = 0.605$ ,  $p < 0.001$ ) between the percentage of total carotenoids and tocopherols retained in the dough was revealed by the correlation analysis (Supplement 3), suggesting that the degradation of both groups of analytes depends, to a certain extent, on the same factors. Since water and oxygen are incorporated into the material during kneading, the oxidation of polyunsaturated fatty acids, catalyzed by lipoxygenases in particular, is likely promoted at this stage (Eyoum et al., 2003). This reaction leads to the formation of hydroperoxides, which induce the oxidative degradation of carotenoids and tocopherols. Therefore, enzyme-controlled and direct oxidation are the major factors causing the degradation of these lipophilic antioxidants during the dough preparation (Hidalgo and Brandolini, 2010; Leenhardt et al., 2006).

### 3.3. Retention of carotenoids and tocopherols in baked flatbread

#### 3.3.1. Carotenoids

The exposure to a high temperature during bread baking caused the further degradation of carotenoids by 22.5% on average. Minor differences in TCC loss were found between the analyzed color groups: red > Pp > Ba > Ye (decrease by 27.2 > 23.4 > 21.9 > 20.9%; Table 2). However, regarding the individual genotypes, substantial variations were observed, with the greatest decline occurring in Julie (by 37.2%) and conversely the lowest in Bona Vita and Konini (by 14.2 and 15.5%; Supplement 1).

Lower average TCC losses caused by baking (11%) recorded in the previous bun-making experiment (Paznocht et al., 2019), could be explained by the different shape of the bakery product. Leavened buns baked at 240 °C for 14 min had a smaller surface area at almost the same weight per unit, thus the heat transfer into the center of the product was relatively slow, while during the baking of unleavened bread, high temperatures were reached much faster throughout the entire product (Chang, 2006). In this perspective, it is more appropriate to compare the TCC loss values determined during baking in the present study to the results published by Lu et al. (2015) and Hidalgo et al. (2010), who reported a drop of 21.1% and 29.0% in bread crust.

In terms of carotenoid retention in the final product, the TCC decreased to 26.0% (0.81 µg/g) on average. The highest share of the initial content in the flour was preserved in standard red varieties (43.5%), while the lowest amount was retained in wheats with Ba and Ye (20.1 and 22.2%), as presented in Table 2. Considerable TCC was maintained in the bread made from wheats with Pp (36.8%), especially in AF Jumiko, in which the largest amount of total carotenoids (57.7%) of all analyzed genotypes was preserved (Fig. 2). However, the average retention of the TCC in Pp wheats was reduced by a vast decline in Konini (to 19.8%). Notwithstanding the significant decline, wheat genotypes with Ye showed the highest TCC (1.52 µg/g), exceeding more than twice the TCC retained in red and Pp wheats (0.70 and 0.63 µg/g) and even more than four times the value of Ba wheats (0.37 µg/g).

An appreciably lower TCC decrease (to 45%) due to bread-making was found by Hidalgo et al. (2010) in bread crust. Conversely, Leenhardt et al. (2006) measured 0.1 µg/g of total carotenoids in common wheat bread, representing 8% of the initial content of the flour. Comparable TCC retention (27.4%) observed in the previous bun-making experiment indicates that the relatively large amount of carotenoids preserved in dough due to the absence of the leavening phase was unfortunately reduced during baking, since presumably due mainly to the

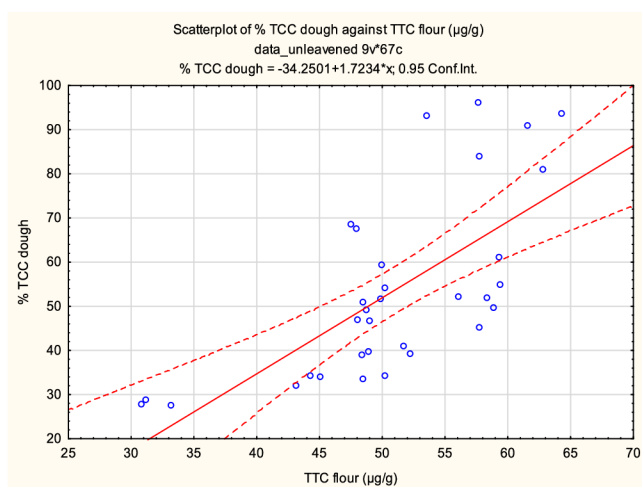


Fig. 4. Correlation between the amount of tocopherols (TTC, µg/g) in the flour and the share of carotenoids (TCC, %) retained in the dough ( $R = 0.693$ ,  $p < 0.001$ ).

different shape of the product, high baking temperatures seem to have a more detrimental effect on carotenoids in the case of thin, unleavened flatbread compared to flakey, leavened buns.

### 3.3.2. Tocols

The average TTC loss promoted by baking (9.1%), supported the finding of the higher thermostability of tocopherols compared to carotenoids (Hidalgo and Brandolini, 2010; Leenhardt et al., 2006). As with carotenoids, the color groups did not differ significantly (not shown) in the TTC decrease induced in response to high temperatures: Ba > red > Pp > Ye (by 11.8 > 10.6 > 7.8 > 6.0%; Table 2), but the divergences between the genotypes were more pronounced, with the maximal decrease recorded in AF Oxana (by 17.2%) and the minimal in Citrus (by 2.3%; Supplement 2).

Considering the whole bread-making process, an average TTC decrease to 57.9% (29.4 µg/g) was recorded, with the largest share retained in bread prepared from Julie flour (70.3%) and the smallest in that of T.B.S. (47.0%). Moderate differences in the share of preserved tocopherols were found within the individual color groups: red > Ye > Ba > Pp (66.2 > 56.6 > 55.9 > 54.4%). However, in terms of the absolute values, the largest amount of tocopherols was retained in standard red genotypes (40.4 µg/g), which is about 40–60% more than in Ba, Pp, and Ye wheats (28.4; 27.9; and 24.5 µg/g).

A lower retention of total tocopherols in wheat bread (45.2%) baked at 220 °C for 25 min was reported by Alvarez-Jubete et al. (2009). The TTC retention recognized in the present study was similar to the results published by Leenhardt et al. (2006), who also observed inferior losses of tocopherols, compared to carotenoids (51.8 vs. 91.9%), in wheat (*T. aestivum*) bread.

## 4. Conclusion

Comparing the critical steps of technological processing in unleavened bread production, baking resulted in a substantially lower reduction of the monitored groups of lipophilic antioxidants than dough kneading. In the phase of dough preparation, in which these compounds are degraded mainly by direct oxidation and the action of oxidative enzymes, a remarkable protective role of tocopherols in relation to carotenoids was demonstrated. It was observed that the greater the initial content of tocopherols in the flour, the higher percentage of carotenoids was retained at the end of the dough kneading phase. The degradation of carotenoids may be considerably reduced by the shortening of the kneading time, as well as by the shortening of or complete absence of the leavening phase in the bakery products' manufacturing. However, due to the product characteristics, the subsequent exposure to high baking temperatures is likely to have a more detrimental effect on the carotenoids saved by such a practice during the unleavened bread preparation. Therefore, in terms of preserving the highest possible carotenoid content in bakery products, it would be desirable to propose hygienically and economically acceptable technological measures to reduce the activity of oxidative enzymes from the very inception of the production process and/or select genotypes with an elevated content of both carotenoids and tocopherols. The extensive variation of carotenoids and tocopherols in the grain of colored wheats examined in the present study indicates an opportunity to develop new genotypes with a unique, health-promoting grain composition in future breeding programs that would be resilient to the given factors present in various food processing technologies.

### CRedit authorship contribution statement

**Barbora Burešová:** Conceptualization, Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization. **Luboš Paznocht:** Conceptualization, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization. **Zora Kotíková:** Methodology, Validation, Formal analysis, Data curation, Writing - review & editing. **Beatrice Giampaglia:** Formal analysis. **Petr Martinek:** Resources, Funding acquisition.

**Jaromír Lachman:** Writing - review & editing.

### Declaration of Competing Interest

The authors report no declarations of interest.

### Acknowledgements

This work was supported by the project NAZV No. QK1910343 of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, and by the Czech University of Life Sciences Prague, SGS SV 20-7-21120.

We would like to thank Jessica Kendall Hankiewicz for her conscientious proofreading of this article.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104108>.

### References

- Alvarez-Jubete, L., Holse, M., Hansen, Å., Arendt, E.K., Gallagher, E., 2009. Impact of baking on vitamin E content of pseudocereals amaranth, quinoa, and buckwheat. *Cereal Chem.* 86 (5), 511–515.
- Azzi, A., 2018. Many tocopherols, one vitamin E. *Mol. Aspects Med.* 61, 92–103.
- Chang, M.-H., 2006. Baking. In: Hui, Y.H. (Ed.), *Bakery Products. Science and Technology*. Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp. 273–298.
- Chiremba, C., Pozniak, C.J., Fu, B.X., 2015. Changes in semolina yellow pigment content and carotenoid composition during pasta processing. *Cereal Chem.* 92 (6), 551–556.
- Elišová, M., Kotíková, Z., Lachman, J., Orsák, M., Martinek, P., 2020. Influence of baking on anthocyanin content in coloured-grain wheat bread. *Plant Soil Environ.* 66, 381–386.
- Eyoum, A., Celhay, F., Neron, S., El Amrani, F., Poiffait, A., Potus, J., Beret, J.L., Nicolas, J., 2003. Biochemical factors of importance in the oxygen consumption of unyeasted wheat flours during dough mixing. *Recent Advances in Enzymes in Grain Processing. Faculty of Agricultural and Applied Biological Sciences, Leuven, Belgium*, pp. 303–309.
- Ficco, D.B.M., De Simone, V., De Leonardi, A.M., Giovanniello, V., Del Nobile, M.A., Padalino, L., Lecce, L., Borrelli, G.M., De Vita, P., 2016. Use of purple durum wheat to produce naturally functional fresh and dry pasta. *Food Chem.* 205, 187–195.
- Fratianni, A., Di Criscio, T., Mignogna, R., Panfilì, G., 2012. Carotenoids, tocopherols and retinols evolution during egg pasta-making processes. *Food Chem.* 131 (2), 590–595.
- Garg, M., Chawla, M., Chunduri, V., Kumar, R., Sharma, S., Sharma, N.K., Kaur, N., Kumar, A., Munday, J.K., Saini, M.K., Singh, S.P., 2016. Transfer of grain colors to elite wheat cultivars and their characterization. *J. Cereal Sci.* 71, 138–144.
- Giambanelli, E., Ferioli, F., Koçaoğlu, B., Jorjadze, M., Alexieva, I., Darbinyan, N., D'Antuono, L.F., 2013. A comparative study of bioactive compounds in primitive wheat populations from Italy, Turkey, Georgia, Bulgaria and Armenia. *J. Sci. Food Agric.* 93 (14), 3490–3501.
- Giordano, D., Locatelli, M., Travaglia, F., Bordiga, M., Reyneri, A., Coisson, J.D., Blandino, M., 2017. Bioactive compound and antioxidant activity distribution in roller-milled and pearled fractions of conventional and pigmented wheat varieties. *Food Chem.* 233, 483–491.
- Gupta, R., Meghwal, M., Prabhakar, P.K., 2021. Bioactive compounds of pigmented wheat (*Triticum aestivum*): potential benefits in human health. *Trends Food Sci. Technol.* 110, 240–252.
- Gutierrez-Gonzalez, J.J., Wise, M.L., Garvin, D.F., 2013. A developmental profile of tocopherol accumulation in oat seeds. *J. Cereal Sci.* 57, 79–83.
- Han, R.M., Chen, C.H., Tian, Y.X., Zhang, J.P., Skibsted, L.H., 2010. Fast regeneration of carotenoids from radical cations by isoflavonoid dianions: importance of the carotenoid keto group for electron transfer. *J. Phys. Chem. A* 114 (1), 126–132.
- Hidalgo, A., Brandolini, A., 2008. Kinetics of carotenoids degradation during the storage of Einkorn (*Triticum monococcum* L. ssp. *monococcum*) and bread wheat (*Triticum aestivum* L. ssp. *aestivum*) flours. *J. Agric. Food Chem.* 56 (23), 11300–11305.
- Hidalgo, A., Brandolini, A., 2010. Tocopherols stability during bread, water biscuit and pasta processing from wheat flours. *J. Cereal Sci.* 52 (2), 254–259.
- Hidalgo, A., Brandolini, A., Pompei, C., 2009. Kinetics of tocopherols degradation during the storage of einkorn (*Triticum monococcum* L. ssp. *monococcum*) and bread wheat (*Triticum aestivum* L. ssp. *aestivum*) flours. *Food Chem.* 116 (4), 821–827.
- Hidalgo, A., Brandolini, A., Pompei, C., 2010. Carotenoids evolution during pasta, bread and water biscuit preparation from wheat flours. *Food Chem.* 121 (3), 746–751.
- Jomova, K., Valko, M., 2013. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. *Eur. J. Med. Chem.* 70, 102–110.
- Lachman, J., Hejtmánková, K., Kotíková, Z., 2013. Tocopherols and carotenoids of einkorn, emmer and spring wheat varieties: selection for breeding and production. *J. Cereal Sci.* 57 (2), 207–214.
- Lachman, J., Martinek, P., Kotíková, Z., Orsák, M., Sulc, M., 2017. Genetics and chemistry of pigments in wheat grain—a review. *J. Cereal Sci.* 74, 145–154.

- Lachman, J., Hejtmánková, A., Orsák, M., Popov, M., Martinek, P., 2018. Tocotrienols and tocopherols in colored-grain wheat, tritordeum and barley. *Food Chem.* 240, 725–735.
- Lampi, A.M., Nurmi, T., Piironen, V., 2010. Effects of the environment and genotype on tocopherols and tocotrienols in wheat in the HEALTHGRAIN diversity screen. *J. Agric. Food Chem.* 58 (17), 9306–9313.
- Leenhardt, F., Lyan, B., Rock, E., Boussard, A., Potus, J., Chanliaud, E., Remesy, C., 2006. Wheat lipooxygenase activity induces greater loss of carotenoids than vitamin E during breadmaking. *J. Agric. Food Chem.* 54 (5), 1710–1715.
- Lu, Y., Fuerst, E.P., Lv, J., Morris, C.F., Yu, L., Fletcher, A., Kiszonas, A.M., Yu, L., Luthria, D., 2015. Phytochemical profile and antiproliferative activity of dough and bread fractions made from refined and whole wheat flours. *Cereal Chem.* 92 (3), 271–277.
- Martinek, P., Chytrá, H., Mikulcová, J., Vyhnanek, T., Bobková, L., Koval, S.F., 2018. AF Jumiko - odrůda ozimé pšenice s purpurovým perikarpem (AF Jumiko - variety of winter wheat with purple pericarp). Technical Report. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/327629902>.
- Martinek, P., Chytrá, H., Mikulcová, J., Vyhnanek, T., Škorpík, M., 2019. AF Oxana - odrůda ozimé pšenice s modrým aleuronem (AF Oxana - variety of winter wheat with blue aleurone). Technical Report. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/335233930>.
- Mellado-Ortega, E., Hornero-Méndez, D., 2017. Effect of long-term storage on the free and esterified carotenoids in durum wheat (*Triticum turgidum* conv. *durum*) and tritordeum ( $\times$  *Tritordeum* Ascherson et Graebner) grains. *Food Res. Int.* 99, 877–890.
- Mortensen, A., Skibsted, L.H., 1997. Relative stability of carotenoid radical cations and homologue tocopheroxyl radicals. A real time kinetic study of antioxidant hierarchy. *FEBS Lett.* 417 (3), 261–266.
- Narwal, S., Gupta, O.P., Pandey, V., Kumar, D., Ram, S., 2020. Effect of storage and processing conditions on nutrient composition of wheat and barley. In: Gupta, O.P., Pandey, V., Narwal, S., Sharma, P., Ram, S., Singh, G.P. (Eds.), *Wheat and Barley Grain Biofortification*. Woodhead Publishing, Cambridge, pp. 229–256.
- Ndolo, V.U., Beta, T., 2013. Distribution of carotenoids in endosperm, germ, and aleurone fractions of cereal grain kernels. *Food Chem.* 139 (1–4), 663–671.
- Okarter, N., Liu, C.S., Sorrells, M.E., Liu, R.H., 2010. Phytochemical content and antioxidant activity of six diverse varieties of whole wheat. *Food Chem.* 119 (1), 249–257.
- Paznocht, L., Kotíková, Z., Šulc, M., Lachman, J., Orsák, M., Eliášová, M., Martinek, P., 2018. Free and esterified carotenoids in pigmented wheat, tritordeum and barley grains. *Food Chem.* 240, 670–678.
- Paznocht, L., Kotíková, Z., Orsák, M., Lachman, J., Martinek, P., 2019. Carotenoid changes of colored-grain wheat flours during bun-making. *Food Chem.* 277, 725–734.
- Paznocht, L., Kotíková, Z., Burešová, B., Lachman, J., Martinek, P., 2020. Phenolic acids in kernels of different coloured-grain wheat genotypes. *Plant Soil Environ.* 66 (2), 57–64.
- Paznocht, L., Burešová, B., Kotíková, Z., Martinek, P., 2021. Carotenoid content of extruded and puffed products made of colored-grain wheats. *Food Chem.* 340, 127951.
- Šárka, E., Čopíková, J., Smrčková, P., 2013. Extrusion process in cereal and confectionery technologies. *Listy cukrovarnické a řepárské* 129 (11), 350–354.
- Schroeder, M.T., Becker, E.M., Skibsted, L.H., 2006. Molecular mechanism of antioxidant synergism of tocotrienols and carotenoids in palm oil. *J. Agric. Food Chem.* 54 (9), 3445–3453.
- Tiwari, U., Cummins, E., 2009. Nutritional importance and effect of processing on tococls in cereals. *Trends Food Sci. Technol.* 20 (11–12), 511–520.
- Zamaratskaia, G., Gerhardt, K., Wendin, K., 2021. Biochemical characteristics and potential applications of ancient cereals-an underexploited opportunity for sustainable production and consumption. *Trends Food Sci. Technol.* 107, 114–123.

## Supplement 1

Content of carotenoids (an average  $\pm$  standard deviation;  $\mu\text{g/g DM}$ ) in wheat flour, dough, and bread and their retention (%) relative to the initial value of the flour

Genotype	Technological step	Lutein	Zeaxanthin	Lutein Z-isomers	Xanthophyll esters	TCC	Retention
Bohemia	Flour	1.46 $\pm$ 0.06	0.13 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.00	n.d.	<b>1.70 <math>\pm</math> 0.07</b>	<b>100</b>
	Dough	0.68 $\pm$ 0.03	0.11 $\pm$ 0.00	0.15 $\pm$ 0.11	n.d.	<b>0.94 <math>\pm</math> 0.07</b>	<b>55.0</b>
	Bread	0.36 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.00	n.d.	<b>0.63 <math>\pm</math> 0.02</b>	<b>36.9</b>
Julie	Flour	0.93 $\pm$ 0.06	0.17 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.00	0.36 $\pm$ 0.04	<b>1.52 <math>\pm</math> 0.10</b>	<b>100</b>
	Dough	0.52 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.02	0.56 $\pm$ 0.04	<b>1.34 <math>\pm</math> 0.05</b>	<b>88.1</b>
	Bread	0.28 $\pm$ 0.02	0.14 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.01	0.25 $\pm$ 0.01	<b>0.77 <math>\pm</math> 0.05</b>	<b>50.9</b>
Skorpion	Flour	1.12 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.00	0.08 $\pm$ 0.00	0.37 $\pm$ 0.02	<b>1.73 <math>\pm</math> 0.03</b>	<b>100</b>
	Dough	0.24 $\pm$ 0.00	0.08 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.01	0.36 $\pm$ 0.02	<b>0.69 <math>\pm</math> 0.03</b>	<b>39.9</b>
	Bread	0.14 $\pm$ 0.00	0.08 $\pm$ 0.01	n.d.	0.134 $\pm$ 0.01	<b>0.35 <math>\pm</math> 0.01</b>	<b>20.1</b>
T.B.S.	Flour	0.80 $\pm$ 0.02	0.10 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.01	0.83 $\pm$ 0.04	<b>1.90 <math>\pm</math> 0.07</b>	<b>100</b>
	Dough	0.19 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.01	n.d.	0.36 $\pm$ 0.03	<b>0.64 <math>\pm</math> 0.04</b>	<b>33.4</b>
	Bread	0.11 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.00	n.d.	0.14 $\pm$ 0.02	<b>0.33 <math>\pm</math> 0.02</b>	<b>17.1</b>
AF Oxana	Flour	1.58 $\pm$ 0.08	0.23 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.01	n.d.	<b>1.93 <math>\pm</math> 0.08</b>	<b>100</b>
	Dough	0.63 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.00	0.22 $\pm$ 0.02	n.d.	<b>0.96 <math>\pm</math> 0.05</b>	<b>49.6</b>
	Bread	0.23 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.00	0.10 $\pm$ 0.01	n.d.	<b>0.44 <math>\pm</math> 0.00</b>	<b>23.0</b>
Konini	Flour	0.80 $\pm$ 0.06	0.17 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.01	1.21 $\pm$ 0.12	<b>2.24 <math>\pm</math> 0.19</b>	<b>100</b>
	Dough	0.20 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.00	n.d.	0.51 $\pm$ 0.00	<b>0.79 <math>\pm</math> 0.01</b>	<b>35.3</b>
	Bread	0.13 $\pm$ 0.00	0.08 $\pm$ 0.00	n.d.	0.24 $\pm$ 0.01	<b>0.45 <math>\pm</math> 0.01</b>	<b>19.8</b>
AF Jumiko	Flour	1.38 $\pm$ 0.09	0.17 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.01	n.d.	<b>1.65 <math>\pm</math> 0.11</b>	<b>100</b>
	Dough	1.05 $\pm$ 0.06	0.11 $\pm$ 0.01	0.34 $\pm$ 0.03	n.d.	<b>1.50 <math>\pm</math> 0.08</b>	<b>90.8</b>
	Bread	0.59 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.01	0.27 $\pm$ 0.01	n.d.	<b>0.95 <math>\pm</math> 0.02</b>	<b>57.7</b>
ANK-28B	Flour	0.69 $\pm$ 0.05	0.20 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.00	0.30 $\pm$ 0.05	<b>1.21 <math>\pm</math> 0.11</b>	<b>100</b>
	Dough	0.32 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.35 $\pm$ 0.00	<b>0.78 <math>\pm</math> 0.01</b>	<b>64.8</b>
	Bread	0.20 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.01	n.d.	0.20 $\pm$ 0.03	<b>0.48 <math>\pm</math> 0.05</b>	<b>39.6</b>
Bona Vita	Flour	2.69 $\pm$ 0.04	0.17 $\pm$ 0.02	0.20 $\pm$ 0.04	2.51 $\pm$ 0.12	<b>5.56 <math>\pm</math> 0.10</b>	<b>100</b>
	Dough	0.48 $\pm$ 0.00	0.06 $\pm$ 0.00	0.04 $\pm$ 0.00	0.97 $\pm$ 0.00	<b>1.55 <math>\pm</math> 0.01</b>	<b>27.9</b>
	Bread	0.24 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.44 $\pm$ 0.02	<b>0.76 <math>\pm</math> 0.02</b>	<b>13.7</b>
Citrus	Flour	5.61 $\pm$ 0.08	0.26 $\pm$ 0.02	0.51 $\pm$ 0.07	0.24 $\pm$ 0.03	<b>6.61 <math>\pm</math> 0.02</b>	<b>100</b>
	Dough	2.19 $\pm$ 0.05	0.12 $\pm$ 0.01	0.61 $\pm$ 0.02	0.23 $\pm$ 0.00	<b>3.15 <math>\pm</math> 0.07</b>	<b>47.6</b>
	Bread	1.00 $\pm$ 0.04	0.12 $\pm$ 0.00	0.44 $\pm$ 0.03	0.15 $\pm$ 0.01	<b>1.70 <math>\pm</math> 0.07</b>	<b>25.7</b>
KM 109-17	Flour	7.26 $\pm$ 0.07	0.29 $\pm$ 0.01	0.49 $\pm$ 0.06	0.26 $\pm$ 0.01	<b>8.29 <math>\pm</math> 0.05</b>	<b>100</b>
	Dough	3.22 $\pm$ 0.05	0.14 $\pm$ 0.00	0.73 $\pm$ 0.08	0.24 $\pm$ 0.00	<b>4.32 <math>\pm</math> 0.13</b>	<b>52.1</b>
	Bread	1.30 $\pm$ 0.07	0.14 $\pm$ 0.01	0.48 $\pm$ 0.03	0.16 $\pm$ 0.01	<b>2.09 <math>\pm</math> 0.10</b>	<b>25.2</b>
Average of all analyzed genotypes	Flour	2.21 $\pm$ 2.12	0.19 $\pm$ 0.05	0.17 $\pm$ 0.17	0.76 $\pm$ 0.75	<b>3.12 <math>\pm</math> 2.39</b>	<b>100</b>
	Dough	0.88 $\pm$ 0.93	0.10 $\pm$ 0.02	0.25 $\pm$ 0.25	0.45 $\pm$ 0.23	<b>1.51 <math>\pm</math> 1.14</b>	<b>48.5</b>
	Bread	0.42 $\pm$ 0.38	0.10 $\pm$ 0.03	0.24 $\pm$ 0.17	0.21 $\pm$ 0.10	<b>0.81 <math>\pm</math> 0.56</b>	<b>26.0</b>

n.d. – not detectable

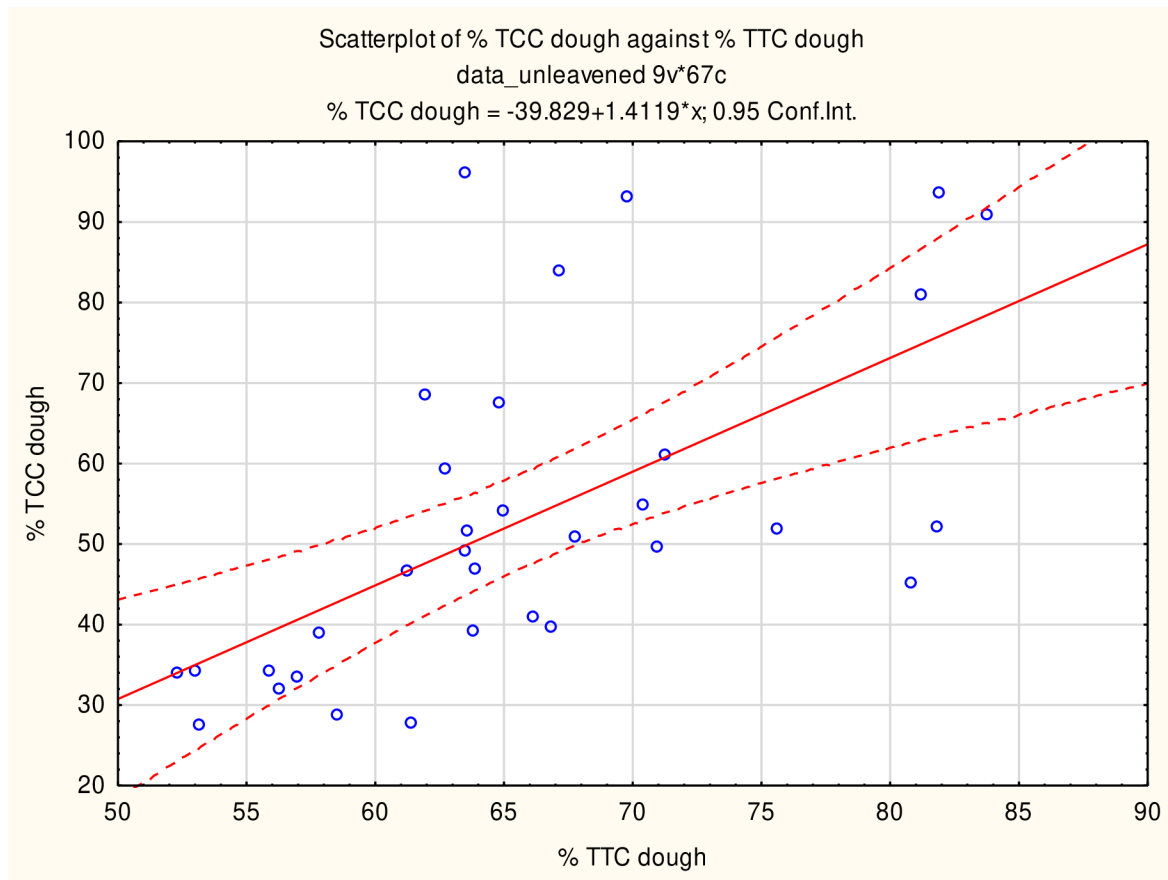
## Supplement 2

Content of tocols (an average  $\pm$  standard deviation;  $\mu\text{g/g DM}$ ) in wheat flour, dough, and bread and their retention (%) relative to the initial value of the flour

Genotype	Technological step	$\beta$ -T3	$\alpha$ -T3	$\delta$ -T	$\beta$ -T	$\alpha$ -T	TTC	Retention
Bohemia	Flour	32.2 $\pm$ 0.90	5.14 $\pm$ 0.15	1.47 $\pm$ 0.08	6.81 $\pm$ 0.55	13.6 $\pm$ 0.79	<b>59.2 <math>\pm</math> 0.27</b>	<b>100</b>
	Dough	24.0 $\pm$ 0.26	3.43 $\pm$ 0.12	1.09 $\pm$ 0.03	5.28 $\pm$ 0.05	8.20 $\pm$ 0.07	<b>42.0 <math>\pm</math> 0.26</b>	<b>70.9</b>
	Bread	22.8 $\pm$ 1.05	3.20 $\pm$ 0.05	0.93 $\pm$ 0.02	4.86 $\pm$ 0.15	4.86 $\pm$ 0.15	<b>36.6 <math>\pm</math> 0.79</b>	<b>61.9</b>
Julie	Flour	42.4 $\pm$ 0.49	4.09 $\pm$ 0.22	1.08 $\pm$ 0.14	5.11 $\pm$ 0.32	10.2 $\pm$ 0.66	<b>62.9 <math>\pm</math> 1.33</b>	<b>100</b>
	Dough	34.4 $\pm$ 0.46	3.32 $\pm$ 0.13	0.84 $\pm$ 0.09	4.38 $\pm$ 0.26	8.84 $\pm$ 0.50	<b>51.8 <math>\pm</math> 0.84</b>	<b>82.3</b>
	Bread	32.1 $\pm$ 0.44	3.18 $\pm$ 0.14	0.71 $\pm$ 0.08	4.12 $\pm$ 0.01	4.12 $\pm$ 0.02	<b>44.2 <math>\pm</math> 0.61</b>	<b>70.3</b>
Skorpion	Flour	25.2 $\pm$ 0.49	5.97 $\pm$ 0.67	0.74 $\pm$ 0.14	6.50 $\pm$ 0.34	12.6 $\pm$ 0.63	<b>51.0 <math>\pm</math> 1.76</b>	<b>100</b>
	Dough	18.3 $\pm$ 0.34	3.09 $\pm$ 0.06	0.62 $\pm$ 0.09	4.24 $\pm$ 0.16	7.21 $\pm$ 0.22	<b>33.4 <math>\pm</math> 0.74</b>	<b>65.6</b>
	Bread	17.0 $\pm$ 0.22	3.04 $\pm$ 0.09	0.51 $\pm$ 0.03	4.08 $\pm$ 0.17	4.08 $\pm$ 0.17	<b>28.8 <math>\pm</math> 0.59</b>	<b>56.4</b>
T.B.S.	Flour	19.9 $\pm$ 0.50	4.44 $\pm$ 0.10	0.86 $\pm$ 0.10	6.56 $\pm$ 0.11	12.4 $\pm$ 0.42	<b>44.2 <math>\pm</math> 0.98</b>	<b>100</b>
	Dough	12.4 $\pm$ 0.08	2.11 $\pm$ 0.05	0.72 $\pm$ 0.04	3.45 $\pm$ 0.17	5.58 $\pm$ 0.25	<b>24.2 <math>\pm</math> 0.58</b>	<b>54.8</b>
	Bread	11.5 $\pm$ 0.45	1.82 $\pm$ 0.03	0.67 $\pm$ 0.04	3.37 $\pm$ 0.22	3.37 $\pm$ 0.22	<b>20.8 <math>\pm</math> 0.70</b>	<b>47.0</b>
AF Oxana	Flour	30.9 $\pm$ 0.36	4.77 $\pm$ 0.16	0.92 $\pm$ 0.09	8.36 $\pm$ 0.56	12.5 $\pm$ 0.44	<b>57.4 <math>\pm</math> 1.20</b>	<b>100</b>
	Dough	26.4 $\pm$ 0.54	3.36 $\pm$ 0.03	0.77 $\pm$ 0.02	6.29 $\pm$ 0.19	8.83 $\pm$ 0.57	<b>45.6 <math>\pm</math> 1.31</b>	<b>79.4</b>
	Bread	22.1 $\pm$ 0.13	3.28 $\pm$ 0.02	0.67 $\pm$ 0.02	4.82 $\pm$ 0.19	4.82 $\pm$ 0.18	<b>35.7 <math>\pm</math> 0.44</b>	<b>62.2</b>
Konini	Flour	21.8 $\pm$ 0.83	4.60 $\pm$ 0.12	1.12 $\pm$ 0.06	6.17 $\pm$ 0.08	15.4 $\pm$ 0.10	<b>49.0 <math>\pm</math> 1.03</b>	<b>100</b>
	Dough	12.0 $\pm$ 0.18	2.60 $\pm$ 0.01	0.93 $\pm$ 0.02	4.08 $\pm$ 0.16	7.82 $\pm$ 0.37	<b>27.4 <math>\pm</math> 0.70</b>	<b>55.9</b>
	Bread	12.9 $\pm$ 0.70	2.46 $\pm$ 0.12	0.91 $\pm$ 0.04	4.05 $\pm$ 0.15	4.05 $\pm$ 0.15	<b>24.4 <math>\pm</math> 1.16</b>	<b>49.7</b>
AF Jumiko	Flour	35.5 $\pm$ 2.08	6.23 $\pm$ 0.09	1.13 $\pm$ 0.17	4.61 $\pm$ 0.24	8.92 $\pm$ 0.18	<b>56.3 <math>\pm</math> 2.42</b>	<b>100</b>
	Dough	23.3 $\pm$ 0.55	3.76 $\pm$ 0.21	0.85 $\pm$ 0.02	3.69 $\pm$ 0.06	6.04 $\pm$ 0.31	<b>37.6 <math>\pm</math> 1.11</b>	<b>66.8</b>
	Bread	22.4 $\pm$ 2.19	3.63 $\pm$ 0.25	0.83 $\pm$ 0.04	3.51 $\pm$ 0.08	3.51 $\pm$ 0.08	<b>33.9 <math>\pm</math> 2.58</b>	<b>60.2</b>
ANK-28B	Flour	29.9 $\pm$ 1.05	4.41 $\pm$ 0.24	0.88 $\pm$ 0.11	4.80 $\pm$ 0.47	8.50 $\pm$ 0.24	<b>48.5 <math>\pm</math> 1.32</b>	<b>100</b>
	Dough	19.2 $\pm$ 0.48	2.45 $\pm$ 0.05	0.67 $\pm$ 0.02	3.30 $\pm$ 0.17	5.08 $\pm$ 0.35	<b>30.7 <math>\pm</math> 1.03</b>	<b>63.2</b>
	Bread	17.0 $\pm$ 0.17	2.40 $\pm$ 0.09	0.55 $\pm$ 0.04	2.76 $\pm$ 0.19	2.76 $\pm$ 0.19	<b>25.4 <math>\pm</math> 0.48</b>	<b>52.4</b>
Bona Vita	Flour	8.16 $\pm$ 0.16	3.75 $\pm$ 0.10	0.66 $\pm$ 0.05	6.41 $\pm$ 0.41	12.8 $\pm$ 0.90	<b>31.8 <math>\pm</math> 1.26</b>	<b>100</b>
	Dough	4.32 $\pm$ 0.15	2.41 $\pm$ 0.11	0.49 $\pm$ 0.05	3.81 $\pm$ 0.11	7.25 $\pm$ 0.28	<b>18.3 <math>\pm</math> 0.65</b>	<b>57.6</b>
	Bread	3.89 $\pm$ 0.24	2.37 $\pm$ 0.16	0.43 $\pm$ 0.06	3.50 $\pm$ 0.13	6.98 $\pm$ 0.26	<b>17.2 <math>\pm</math> 0.50</b>	<b>54.0</b>
Citrus	Flour	22.3 $\pm$ 0.10	5.77 $\pm$ 0.28	1.40 $\pm$ 0.03	6.51 $\pm$ 0.16	12.7 $\pm$ 0.43	<b>48.6 <math>\pm</math> 0.50</b>	<b>100</b>
	Dough	12.6 $\pm$ 0.22	3.37 $\pm$ 0.06	0.80 $\pm$ 0.04	5.10 $\pm$ 0.19	8.74 $\pm$ 0.20	<b>30.6 <math>\pm</math> 0.49</b>	<b>62.9</b>
	Bread	12.2 $\pm$ 0.13	3.32 $\pm$ 0.04	0.77 $\pm$ 0.04	4.76 $\pm$ 0.13	8.42 $\pm$ 0.14	<b>29.5 <math>\pm</math> 0.32</b>	<b>60.6</b>
KM 109-17	Flour	25.3 $\pm$ 0.56	4.83 $\pm$ 0.09	1.40 $\pm$ 0.03	6.63 $\pm$ 0.62	11.4 $\pm$ 0.86	<b>49.5 <math>\pm</math> 0.92</b>	<b>100</b>
	Dough	15.5 $\pm$ 0.29	2.95 $\pm$ 0.09	0.92 $\pm$ 0.07	5.42 $\pm$ 0.06	7.60 $\pm$ 0.12	<b>32.4 <math>\pm</math> 0.61</b>	<b>65.4</b>
	Bread	12.3 $\pm$ 0.68	2.40 $\pm$ 0.17	0.82 $\pm$ 0.02	4.37 $\pm$ 0.36	6.97 $\pm$ 0.25	<b>26.9 <math>\pm</math> 1.30</b>	<b>54.3</b>
Average of all analyzed genotypes	Flour	28.1 $\pm$ 8.95	4.91 $\pm$ 0.80	1.06 $\pm$ 0.28	6.22 $\pm$ 1.08	11.9 $\pm$ 2.02	<b>50.8 <math>\pm</math> 8.25</b>	<b>100</b>
	Dough	18.4 $\pm$ 8.06	2.99 $\pm$ 0.51	0.79 $\pm$ 0.17	4.46 $\pm$ 0.92	7.38 $\pm$ 1.31	<b>34.0 <math>\pm</math> 9.41</b>	<b>67.0</b>
	Bread	16.9 $\pm$ 7.40	2.83 $\pm$ 0.55	0.71 $\pm$ 0.16	4.02 $\pm$ 0.67	4.90 $\pm$ 1.73	<b>29.4 <math>\pm</math> 7.57</b>	<b>57.9</b>

### Supplement 3

Correlation between the share of total carotenoids and tocols retained in the dough (R = 0.605, p < 0.001)





#### **4.4. The Effect of Boiling and in Vitro Digestion on the Carotenoid Content of Colored-grain Wheat**



# The Effect of Boiling and *in Vitro* Digestion on the Carotenoid Content of Colored-grain Wheat

Barbora Burešová<sup>a,\*</sup>, Luboš Paznocht<sup>a</sup>, Veronika Jarošová<sup>b</sup>, Ivo Doskočil<sup>c</sup>, Petr Martinek<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Department of Chemistry, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, 165 00 Prague-Suchdol, Czech Republic

<sup>b</sup> Department of Food Science, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, 165 00 Prague-Suchdol, Czech Republic

<sup>c</sup> Department of Microbiology, Nutrition and Dietetics, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, 165 00 Prague-Suchdol, Czech Republic

<sup>d</sup> Agrotest Fyto, Ltd., Havlíčkova 2787/121, 767 01 Kroměříž, Czech Republic

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Carotenoid thermostability  
Cereal-based food  
HPLC-DAD  
Human nutrition  
Lutein  
Xanthophylls

## ABSTRACT

The boiling of colored-grain wheat kernels resulted in a more pronounced loss of total carotenoids compared to *in vitro* digestion (27.3% vs. 12.1%). After both boiling and digestion, the highest carotenoid content was preserved in Citrus and Bona Vita wheats with yellow endosperm (2.34 and 1.88 µg/g), which is more than six times the content retained in the digested material of red and blue varieties. Esterified carotenoids exhibited subaverage heat-resistance, as their content dropped to 58.0% after boiling, while decreasing only slightly due to digestion (to 53.4%). The stability of free zeaxanthin, lutein, and β-carotene differed significantly throughout boiling (92.3% > 72.3% > 27.1%) and subsequent digestion (68.3% > 60.1% > β-carotene was reduced completely). Exposure to high temperatures and other factors in play during digestion (i.e. acidic environment) resulted in lutein *E/Z* isomerization, mainly reflected by an increase in 9- and 9'-Z-lutein content to 111% and 225%.

## 1. Introduction

Wheat is one of the leading crops for global food security, not least because of its suitable characteristics for storage and thus for ensuring food reserves. In many European countries it is indisputably the most intensively cultivated cereal, used mainly for milling into flour and for the subsequent manufacturing of baked goods and pasta products or malt; moreover, it is used as a feed raw material, and to a lesser extent for ethanol or starch production (Narwal et al., 2020). In addition to the traditional so-called red-grain varieties, wheat genotypes with unusually colored kernels, possessing a unique new ability to synthesize and store anthocyanins in the outer layers of the grain and/or with a substantially higher carotenoid content in the endosperm, have been bred in recent years (Lachman et al., 2017). In the Czech Republic the latest of these unconventional varieties is AF Zora, registered in 2021, with a black grain color given by the combination of genes for blue aleurone (Ba) and purple pericarp (Pp). In previous years, other varieties with unusual

grain colors caused by an increased anthocyanin content were registered, namely AF Oxana (Ba) in 2019 and AF Jumiko (Pp) in 2018 (VUKROM, 2021). Varieties rich in yellow carotenoid pigments, such as Bona Vita and Citrus, were registered earlier in Slovakia and Germany (Fučíková and Nováček, 2014; ÚKZÚZ, 2018). Continuous breeding efforts in the field of colored-grain wheat aim to enhance public health by implementing new varieties in the food industry, enabling the smart and cost-effective production of nutrient-dense foods, the consumption of which could contribute to the prevention of many degenerative diseases, since carotenoids and anthocyanins generally act as antioxidants in the human body (Kotíková et al., 2016).

However, commonly used methods of wheat grain processing - the baking of leavened (Paznocht et al., 2019; Eliášová et al., 2020) and unleavened bread (Burešová et al., 2021), puffing and extrusion (Paznocht et al., 2021), and pasta production (Hidalgo et al., 2010; Oduro-Obeng et al., 2021) - cause various degradation rates of valuable phytochemicals. It has been found that the most relevant factors causing

**Abbreviations:** Ba, blue aleurone; i.v., initial value; Pp, purple pericarp; SGF, simulated gastric fluid; SIF, simulated intestinal fluid; SSF, simulated salivary fluid; TCC, total carotenoid content; Ye, yellow endosperm.

\* Corresponding author.

E-mail address: [buresovab@af.czu.cz](mailto:buresovab@af.czu.cz) (B. Burešová).

<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.105002>

Received 9 June 2022; Received in revised form 7 September 2022; Accepted 25 October 2022

Available online 28 October 2022

0889-1575/© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

the degradation of carotenoids are direct oxidation (after mechanical disturbance of the grain and its exposure to oxygen), enzymatic oxidation (occurring mainly when the flour is mixed with water, thus activating oxidative enzymes), and exposure to high temperatures (baking, extrusion, puffing). Moreover, the feedstock in many of these technologies is grain which has been deprived of its outer layers, so the final product is depleted of a significant share of antioxidants as well as fiber components, essential for the proper course of the digestive process, during which further variations in phytochemical content may also occur (Gill et al., 2021; Hidalgo et al., 2018). For the full exploitation of the nutritional potential of the new, non-traditional wheat genotypes, it is crucial to examine and recommend a suitable processing technology, one in which the whole grain is used and that is gentle to the contained substances with antioxidant potential. The required criteria are complied with in the boiling process, during which whole, mechanically intact grain is used and the temperatures to which the material is exposed usually does not exceed 100°C. The effect of boiling on the carotenoid content has to date been investigated in food commodities for which this culinary treatment is widely used, such as potatoes (Kotíková et al., 2016), sweet potatoes (Kourouma et al., 2019), other various vegetables (Kao et al., 2012), and among cereals, rice (Melini et al., 2019), maize (Zhang et al., 2020), and millet (Shen et al., 2015). However, to the best of our knowledge, no publication has addressed the fate of carotenoids during the boiling of whole wheat grains, and certainly not the colored ones.

Therefore the objective of the present study was (1) to investigate the effect of boiling on the content and profile of carotenoids in wheat kernels, and (2) to determine the amount of carotenoids preserved after the simulated digestion process. The resulting findings will be beneficial for the ongoing efforts to find a suitable method for the technological processing of grains, the use of which would lead to a minimal degradation of carotenoids, and thus the final products would represent a relevant source of these health-promoting substances for consumers.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material

A total of ten colored-grain wheat genotypes were grown in 2018/2019 at the Agricultural Research Institute in Kroměříž, Czech Republic (49.2851172N, 17.3646269E). The experimental field parameters were identical to those published in the previous study (Paznocht et al., 2021). All processing operations and consequent analyses were performed within ten months after the harvest. The main characteristics of the selected wheat genotypes are listed in Table 1.

### 2.2. Chemicals

KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, NaCl, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>, NaOH, HCl, acetone, ethanol, hexane (all GR grade), and methanol

(HPLC grade) were purchased from Lachner Ltd., Neratovice, Czech Republic. Lutein and zeaxanthin standards (UV, ≥ 95%, ≥ 98%) were obtained from Extrasynthese, Genay, France. β-Carotene standard (HPLC, ≥ 95%), butylated hydroxytoluene (BHT, ≥ 99% FG), and *tert*-butyl methyl ether (HPLC grade) were purchased from Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO. Ultra-pure HPLC water was prepared using Simplicity UV (Merck Millipore, KGaA, Darmstadt, Germany). Enzymes used: α-amylase derived from a genetically modified strain of *Bacillus licheniformis* (17,400 U/mL; EC 3.2.1.1; ANKOM Technology FAA, Macedon, NY), pepsin, from porcine gastric mucosa (601 U/mg; EC 3.4.23.1), and pancreatin according to the manufacturer containing trypsin, amylase, lipase, ribonuclease, and protease originating from porcine pancreas (800 U/mg; EC 232-468-9) both purchased from Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO.

### 2.3. Sample preparation

#### 2.3.1. Boiling

Fifty g of raw grain was weighed into a 250-mL beaker and after adding 100 mL of water, the beakers were covered with laboratory watch glasses and boiled for 30 min with periodic stirring every 5 min with a glass rod. Following boiling, excess water was strained off and the samples were transferred into plastic bags after cooling. Half of each sample was used for the simulated digestion process and half was immediately frozen at -18°C for 24 h and then freeze-dried (Lyovac GT2, Steris, Hürth, Germany) to a constant weight in the dark.

#### 2.3.2. Digestive process

The simulated digestion comprising the oral, gastric, and small intestinal phases was performed in a standardized static *in vitro* model previously published by Minekus et al. (2014), with slight modifications. The simulated salivary fluid (SSF), simulated gastric fluid (SGF), and simulated intestinal fluid (SIF) were prepared according to Supplement 1 and warmed to 37°C prior to the experiment.

For the simulation of the oral phase, 5 g of the sample was homogenized and mixed with 5 mL of SSF. The α-amylase originating from a genetically modified strain of *Bacillus licheniformis* was added to achieve 75 U/mL, and the CaCl<sub>2</sub> was added to attain 0.75 mmol/L in the final mixture. The sample was thoroughly mixed and incubated for 2 min in a shaking water bath (37°C, 100 rpm).

For the gastric phase, the oral bolus was mixed with 10 mL of SGF. Porcine pepsin and CaCl<sub>2</sub> were added to achieve 500 U/mL and 0.075 mmol/L, respectively, in the final mixture, the pH of which was subsequently reduced to 3.0 using 1 mol/L HCl. The incubation took place in a shaking water bath (2 h, 37°C, 100 rpm).

For the intestinal phase, 20 mL of SIF was mixed with the gastric chyme. Pancreatin from the porcine pancreas was added to achieve 100 U/mL in the final mixture (based on the trypsin activity). Bile salts and CaCl<sub>2</sub> were added to achieve a concentration of 10 mmol/L and 0.3 mmol/L, respectively, in the final mixture, and 1 mol/L NaOH was

**Table 1**

Description of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes.

Variety	Growth type	Country of origin <sup>a</sup>	Variety status	Grain color <sup>b</sup>
Bohemia	Winter	CZE	Released variety	Red
Annie	Winter	CZE	Released variety	Red
Citrus	Winter	DEU	Released variety	Ye
Bona Vita	Winter	SVK	Released variety	Ye
AF Jumiko	Winter	CZE	Released variety	Pp
Konini	Spring	NZL	Released variety	Pp
ANK 28A	Spring	RUS	Research germplasm	Pp
RU 687-12	Spring	CZE	Genetic resource	Pp
UC 66049	Spring	USA	Genetic resource	Ba
Skorpion	Winter	CZE	Released variety	Ba

<sup>a</sup> CZE Czech Republic, DEU Germany, SVK Slovak Republic, NZL New Zealand, RUS Russian Federation, USA United States of America.

<sup>b</sup> Ye Yellow endosperm, Pp Purple pericarp, Ba Blue aleurone.

added to adjust the pH to 7.0. The incubation took place in a shaking water bath (2 h, 37°C, 100 rpm). The samples were frozen at -18°C for 24 h after cooling and then freeze-dried to a constant weight in the dark.

#### 2.4. Chromatographic analysis of carotenoids

Determination of dry weight (DW), sample extraction and chromatographic separation, as well as identification and quantification of carotenoids, were described in detail in the previous study (Paznocht et al., 2019). The extraction of carotenoids from digested material was carried out after lyophilization and homogenization directly in the original Falcon tube, in which the samples were subjected to the simulated digestion process.

#### 2.5. Statistical analysis

All analyzes were performed in triplicate for each genotype, and all values reported in the present study are the average of these three replicates expressed in the DW. The data were processed by Chromeleon (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and Excel (Microsoft, Redmond, WA). Statistical evaluation was performed using STATISTICA software (StatSoft, Tulsa, OK). The differences in the total carotenoid content between the raw material, boiled grain, and the digesta were evaluated by one-way ANOVA ( $p \leq 0.05$ ), and the combined effect of the genotype and the individual steps of the preparation process was assessed using factorial ANOVA ( $p \leq 0.05$ ). Tukey's Post Hoc HSD test was used for exact assessment.

### 3. Results and discussion

A total of ten wheat genotypes of different grain color were used for technological processing by boiling and subsequent simulated digestive process. The contents of individual carotenoids and the total carotenoid content (TCC; the sum of all lutein isomers, zeaxanthin,  $\beta$ -carotene, and xanthophyll esters) were determined in both raw and boiled grain, as well as in material obtained as a result of the simulated digestion. An illustrative chromatogram of carotenoid analysis of the genotype Konini (Pp) depicting the differences between all three processing steps mentioned is shown in Fig. 1. The average differences in the content of individual analytes determined for all genotypes in each of the procedure steps are given in Table 2, and the variations in the TCC in the individual steps according to genotype are depicted in Fig. 2.

Detailed results of the changes in the content of individual

carotenoids caused by the particular step of the preparation process are given in Supplement 2.

#### 3.1. Raw grain

The average TCC in raw grain of all the analyzed genotypes was 1.59  $\mu\text{g/g}$  (Table 2) and ranged from 0.60  $\mu\text{g/g}$  (UC 66049) to 3.69  $\mu\text{g/g}$  (Citrus). In addition to Citrus, immense TCC was found in yellow-grain Bona Vita (3.46  $\mu\text{g/g}$ ). Apart from wheats with Ye, some of the genotypes with purple pericarp, namely Konini and AF Jumiko, also showed an elevated TCC (1.88 and 1.29  $\mu\text{g/g}$ ; Supplement 2), which is in accordance with results published by Burešová et al. (2021) and Paznocht et al. (2019), which showed a relatively higher TCC in wheats with Ye (Citrus 6.61 and 2.24  $\mu\text{g/g}$ ; Bona Vita 5.56 and 2.11  $\mu\text{g/g}$ ), as well as in purple wheats Konini (2.24 and 1.53  $\mu\text{g/g}$ ) and AF Jumiko (1.65 and 0.80  $\mu\text{g/g}$ ), compared to the other wheat genotypes examined. The variability in the carotenoid content of the varieties, observed in the respective studies, may be attributed primarily to the different cropping year in which the samples were cultivated, as climatic conditions significantly affect the content of these pigments, as well as of other phytochemicals (Abdel-Aal et al., 2007; Capouchová et al., 2020; Kotíková et al., 2007). Certain differences were observed in the carotenoid profiles of the individual genotypes, but all of them were characterized by the predominance of all-*E*-lutein, the content of which was 0.86  $\mu\text{g/g}$  on average, which corresponds to 53.9% of the TCC. Within the genotypes analyzed, the all-*E*-lutein content ranged from 0.28  $\mu\text{g/g}$  in UC 66049 to 2.70  $\mu\text{g/g}$  in Citrus, representing also the highest share of the TCC (73.2%). All-*E*-lutein, along with zeaxanthin, which are essential for proper retinal cell functioning (Kotíková et al., 2016), were the only two of all the analytes to be detected in all the samples. However, compared to lutein, the content of zeaxanthin was much lower, averaging 0.26  $\mu\text{g/g}$  (16.6% of the TCC) and also varied less, ranging from 0.13  $\mu\text{g/g}$  (Annie) to 0.37  $\mu\text{g/g}$  (Konini). Xanthophyll esters, with an average content of 0.31  $\mu\text{g/g}$  (19.5% of the TCC), were abundant in the Bona Vita and Konini genotypes (1.39 and 0.75  $\mu\text{g/g}$ ), in both of which they accounted for 40.1%, while in others (ANK 28A, UC 66049) their content was relatively low (0.07, 0.09  $\mu\text{g/g}$ ) or they were not detected at all (Bohemia, Citrus, AF Jumiko). In previous years, esterified forms of carotenoids have been the subject of considerable interest, as they were anticipated to be more resistant during technological processing. However, this presumption has not been confirmed by the results of our preceding studies (Burešová et al., 2021; Paznocht et al., 2021), as esterified carotenoids - which in the case of wheat are

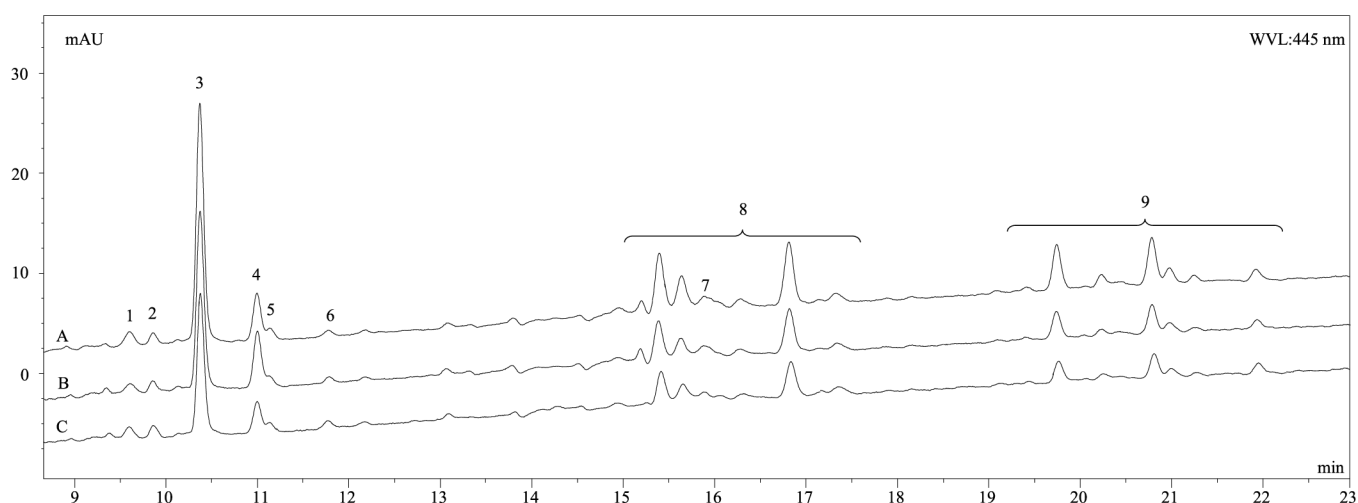


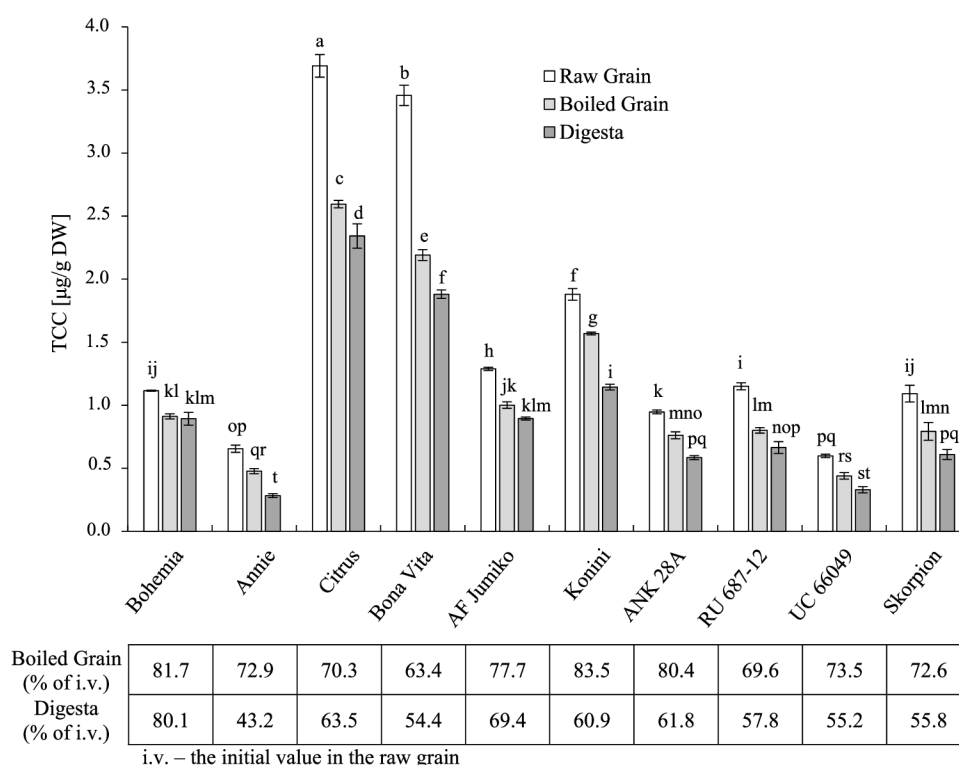
Fig. 1. Chromatogram of Konini wheat variety from HPLC-DAD carotenoid analysis showing differences between raw grain (A), boiled grain (B), and digested material (C). 1 – 13-Z-Lutein, 2 – 13'-Z-Lutein, 3 – All-*E*-Lutein, 4 – All-*E*-Zeaxanthin, 5 – 9-Z-Lutein, 6 – 9'-Z-Lutein, 7 –  $\beta$ -Carotene, 8 – Xanthophyll monoesters, 9 – Xanthophyll diesters.

**Table 2**

Carotenoid contents (an average  $\pm$  standard deviation;  $\mu\text{g/g}$ ) in raw and boiled grain and the digesta; and their retention (%) relative to the initial value in the raw grain.

	Procedure step	All-E-Lutein	13-Z-Lutein	13'-Z-Lutein	9-Z-Lutein	9'-Z-Lutein	Zeaxanthin	$\beta$ -Carotene	Xanthophyll esters	Sum of carotenoids
Average of All Analyzed Genotypes	Raw Grain	0.86 $\pm$ 0.70a	0.06 $\pm$ 0.07a	0.03 $\pm$ 0.05a	0.03 $\pm$ 0.04a	0.01 $\pm$ 0.02a	0.26 $\pm$ 0.07a	0.03 $\pm$ 0.05a	0.31 $\pm$ 0.43a	1.59 $\pm$ 1.07a
	Boiled Grain	0.62 $\pm$ 0.49ab	0.04 $\pm$ 0.05a	0.02 $\pm$ 0.03a	0.03 $\pm$ 0.04a	0.02 $\pm$ 0.03a	0.24 $\pm$ 0.07a	0.01 $\pm$ 0.03b	0.18 $\pm$ 0.22a	1.15 $\pm$ 0.70ab
	Digesta	0.51 $\pm$ 0.44b	0.04 $\pm$ 0.05a	0.02 $\pm$ 0.03a	0.03 $\pm$ 0.04a	0.02 $\pm$ 0.03a	0.18 $\pm$ 0.05b	–	0.17 $\pm$ 0.21a	0.96 $\pm$ 0.65b
% of Initial Value (100 % in Raw Grain)	Boiled Grain	72.3	65.9	55.3	124	166	92.3	27.1	58.0	72.7
	Digesta	60.1	63.2	53.7	111	225	68.3	–	53.4	60.6

Values in columns marked with different letters are statistically different at  $p \leq 0.05$ .



**Fig. 2.** The TCC of the raw material, boiled grain, and the digesta of the individual genotypes examined (bars marked with different letters are statistically different at  $p \leq 0.05$ ).

comprised mainly of lutein esters (Mellado-Ortega and Hornero-Méndez, 2012) - were found to be degraded to a similar extent as in their free forms. As shown in Supplement 2, 13-Z-lutein, 13'-Z-lutein, 9-Z-lutein, 9'-Z-lutein, and  $\beta$ -carotene comprised only a minor portion of the carotenoid profile, which, across the genotypes studied, did not exceed 6.2%, 4.2%, 4.1%, 1.9%, and 5.4%, respectively.

### 3.2. Boiled grain

Boiling caused an average TCC decrease to 1.15  $\mu\text{g/g}$ , accounting for 72.7% of the initial value (i.v.) in raw grain (Table 2). The greatest amount was preserved in the Ye varieties Citrus and Bona Vita (2.60 and 2.19  $\mu\text{g/g}$ ), although they showed relatively high percentage losses (29.7% and 36.6%) compared to other genotypes. A similar phenomenon was observed in previously investigated technologies, in the baking of leavened buns (Paznocht et al., 2019) and unleavened bread (Burešová et al., 2021), and in extrusion and puffing (Paznocht et al., 2021) in which, although a relatively large share of the TCC was degraded in Ye varieties, the amount retained was greater than in all other genotypes due to significantly higher initial contents. The most

resilient to boiling was Pp variety Konini, in which the lowest proportion of the TCC of all genotypes was degraded (16.5%), thus the boiled grains retained a very high carotenoid content (1.57  $\mu\text{g/g}$ ), which is several-fold more compared to leavened buns (0.35  $\mu\text{g/g}$ ), unleavened bread (0.45  $\mu\text{g/g}$ ), puffed grains, and extrudates (0.45 and 0.75  $\mu\text{g/g}$ ). These differences were found not only in the case of Konini, but also when comparing the average TCC values of all the genotypes examined, which were considerably higher after boiling than after the baking of buns (0.29  $\mu\text{g/g}$ ) and bread (0.81  $\mu\text{g/g}$ ), as well as after extrusion and puffing (0.51 and 0.49  $\mu\text{g/g}$ ). Boiling is therefore not only quite a simple treatment to perform, but also very efficient in terms of carotenoid preservation compared to other technologies, which is particularly evident considering the share of carotenoids retained in the final product: buns (24.9%; Paznocht et al., 2019), bread (26.0%; Burešová et al., 2021), extrudates and puffed grains (25.7% and 31.6%; Paznocht et al., 2021). A lower average TCC retention rate (approximately 64%) was observed by Kean et al. (2011) in sorghum porridge. In a rice boiling experiment, Melini et al. (2019) recorded an average decrease in the TCC from 1.90 to 0.93  $\mu\text{g/g}$ , corresponding to 49.1% of the i.v. The rice varieties used for the experiment differed significantly in their TCC in

the starting raw material (0.36–4.60 µg/g) as well as after boiling (0.18–3.16 µg/g), accounting for carotenoid retention in the range of 30.1–68.7%. A considerably high share of preserved carotenoids (expressed as total yellow pigments), ranging from 88.3% to 91.5% in boiled foxtail millet, was reported by Shen et al. (2015), who, however, further noted a more pronounced decrease (to 41.2–70.0%) due to high-pressure cooking (121°C, 321 kPa) using an autoclave. A similar retention rate was recorded by Kourouma et al. (2019) in orange-fleshed sweet potatoes after 15 min of boiling under atmospheric pressure (to 91.9%), but it was reduced remarkably with increasing boiling time (to 59.2% after 45 min). On the contrary, Zhang et al. (2020) observed an increase in TCC after the boiling of maize to 123%, suggesting that the exposure to a high temperature induced cell wall disruption and the subsequent release of carotenoids from the plant matrix, enhancing their extractability. Therefore, the effect of high temperatures on the carotenoids during the cooking of maize is not absolutely conclusive, as these changes may be attributed to the release of carotenoids from various bonds and/or to their simultaneous degradation.

Changes in individual lutein isomers varied, with the major all-*E*-lutein declining to 72.3% of the i.v. in raw grain, which is about three times more than was preserved after the baking of buns (23.6%; Paznocht et al., 2019) and bread (19.0%; Burešová et al., 2021), and after extrusion and puffing (22.3% and 17.5%; Paznocht et al., 2021). Compared to all-*E*-lutein, greater losses were noted for 13'-*Z*-lutein and 13'-*Z*-lutein (decrease to 65.9% and 55.3%), whereas the contents of 9'-*Z*-lutein and 9'-*Z*-lutein even increased to 124% and 166% after boiling (Fig. 1, Table 2). This upward trend in the case of 9'-*Z*-lutein may be attributed especially to the increase observed in Bohemia (from a value < LOQ to 0.04 µg/g) and also in genotypes AF Jumiko and Citrus (to 129% and 115%). While the most pronounced increase in 9'-*Z*-lutein content was found in AF Jumiko (from a value < LOQ to 0.04 µg/g), followed by Citrus and Bona Vita (135% and 128%; Supplement 2). The obtained results indicate pronounced stability and/or isomerization of the latter two *Z*-forms, which is a favorable finding, since Honda et al. (2021) suggested that the *Z*-isomers exhibit greater antioxidant, anti-inflammatory, and anti-atherosclerotic activities compared to the all-*E*-isomers. A higher retention in boiled grains relative to the products of all the above-mentioned technologies was registered for all analytes detected; the only exception was 9'-*Z*-lutein, which showed a more pronounced increase after puffing (to 198%), which could be due to the more extensive isomerization processes induced by the high pressure and temperatures. The carotenoid (*E*- to *Z*-) isomerization, especially of lutein, was previously reported by De Oliveira and Rodriguez-Amaya (2007) during the boiling of corn, as well as by Shen et al. (2015) for foxtail millet, observing that boiling under an elevated pressure (higher than atmospheric) led to a stronger intensity of isomerization processes and a greater degradation rate, which the authors explained by the correlation of physical energy from the increasing pressure with the isomerization of *E*-carotenoids or their disintegration into smaller molecular fragments. Various alterations of lutein in boiled basil leaves were noted by Kao et al. (2012), who reported that the 13'-*Z*-lutein content decreased to 89.2%, whereas the concentration of 13'-*Z*, 9'-*Z*, and 9'-*Z*-lutein increased to 109%, 145%, and 211%, respectively. In contrast, Oduro-Obeng et al. (2021) observed a decrease of 9'-*Z* and 13'-*Z*-lutein (to 61.6% and 72.3%) after boiling pasta, suggesting that this phenomenon is attributable to the degradation of carotenoids into apocarotenoids. However, both studies mentioned above stated an increasing level of (*E*- to *Z*-) isomerization with prolonged boiling time. This finding was supported by the results of Kourouma et al. (2019), who, with increasingly lengthening boiling times (from 15 to 45 min), observed an immense isomerization of β-carotene, reaching more than 3.7–4.6 times the i.v. in raw orange-fleshed sweet potatoes, whereas Kotfková et al. (2016) and Kean et al. (2011) did not observe any carotenoid isomerization during potato and sorghum porridge cooking.

Along with free carotenoids, it has been observed that some wheat genotypes contain esterified forms of carotenoids, which were degraded

to a similar extent as most of the other analytes examined due to boiling (to 58.0%). Although other technological experiments with baking (Paznocht et al., 2019; Burešová et al., 2021), extrusion, and puffing (Paznocht et al., 2021) performed in previous years led to a more extensive degradation (to 20.6%, 28.2%, 22.1%, and 29.5%, resp.), an analogous pattern, not supporting the contention of the higher stability of xanthophyll esters (Fratianni et al., 2021; Mattera et al., 2017; Mellado-Ortega and Hornero-Méndez, 2012), was found.

In the overall evaluation of the diverse set of genotypes analyzed, it can be concluded that the content of none of the analytes of interest was statistically significantly altered by boiling (Table 2). The only exception was β-carotene, the content of which decreased markedly after boiling (to 0.01 µg/g, 27.1%) and was thus the least stable of all the carotenoids detected. In contrast, zeaxanthin showed the greatest apparent resilience to boiling, with the lowest average reduction of its content, to 0.24 µg/g (92.3%). Similar findings were reached by Paznocht et al. (2019), who, after the leavened bun preparation process, observed the most substantial decrease in β-carotene (to 0.004 µg/g, 11.2%) and the lowest in zeaxanthin content (to 0.05 µg/g, 77.6%) of all carotenoid forms. In accordance, Melini et al. (2019) identified three carotenoids in cooked rice that differed in resistance to high temperatures, listed in descending order of percentage retained: zeaxanthin (62.1%) > lutein (47.0%) > β-carotene (7.6%). On the contrary, Shen et al. (2015) reported almost equal retention rates of lutein and zeaxanthin (74.8% and 76.3%) when boiling foxtail millet. Strikingly contrasting alterations were noted by Kean et al. (2011) observing a higher stability of carotenes (63.7–78.3%) compared to xanthophylls (32.5–50.9%) in sorghum porridge, and also by Zhang et al. (2020), who found an increase in lutein, zeaxanthin, and β-carotene content (to 123%, 123%, and 117%, resp.) in boiled maize. It is evident from the aforesaid that the variations in the changes of individual carotenoids may be attributed, inter alia, to the nature of the food matrix and the form in which the carotenoids are present. According to Shen et al. (2015), in cereals with a higher lipid content, such as maize, carotenoids can be dissolved, whereas in carrots, for instance, they occur in crystalline form. These authors further suggested the possibility of a certain protective effect of macromolecular components, such as proteins or fiber, to which carotenoids can be non-covalently bound.

### 3.3. *In vitro* digestion

Homogenized samples of boiled wheat grains were subjected to a simulated three-stage digestion process to determine digestive stability, represented by the percentage loss of carotenoids relative to their content in boiled grain, as well as overall stability, indicated by the share of carotenoids preserved in the digested material throughout the entire process from the raw kernel. The further carotenoid degradation observed (by 12.1%) resulted in an average of 60.6% of the initial TCC in raw grain being preserved in the digesta, accounting for 0.96 µg/g. The amount of carotenoid reduction (following the simulated digestive process) varied considerably within the genotypes studied, the deviating cases being Annie and Bohemia, in which the TCC declined by 29.7% and 1.6% to a final 43.2% and 80.1%, respectively. The extensive degradation rate, combined with the very low TCC of the raw grain, resulted in the digested material of Annie containing the lowest overall TCC (0.28 µg/g). Furthermore, due to the inferior initial TCC of Bohemia, only a moderate TCC (0.89 µg/g) was retained in its digesta, despite the absolute highest digestive and overall stability. On the contrary, the maximum amount of TCC was preserved in the Ye genotypes Citrus and Bona Vita (2.34 and 1.88 µg/g), despite greater relative losses (decrease to 63.5% and 54.4%).

Rodrigues et al. (2017), following the digestion methodology by Minekus et al. (2014), noted a comparable average digestive carotenoid stability, not exceeding 10.0% loss, for most of the foods examined (e.g. mango, carrot, spinach). Kean et al. (2011) reported a decrease of carotenoids by 22.9–61.7% due to digestion of sorghum porridge and, in accordance with our findings, considered carotenoids to be quite stable

during the digestion process, which is noteworthy given their low resistance to acid exposure (Kopec et al., 2017). A more severe average loss of 69.7% caused by the digestion process (according to Minekus et al., 2014), was found by Zhang et al. (2020) for boiled maize. The effect of the digestion process on food carotenoids was investigated in more detail by Petry and Mercadante (2017), who monitored the TCC alterations after the individual stages of *in vitro* simulated digestion of mandarin pulp. No discernible loss of carotenoids was induced by the oral phase, but after the gastric digestion the TCC decreased by 16.0–17.6% and by a further 3.5–6.0% following the duodenal phase. Therefore, lower digestive stability was observed compared to our study, as the initial carotenoid content was reduced by a total of 23%.

The content of all-*E*-lutein was reduced by 12.2%, to an average of 0.51 µg/g (60.1%) during the simulated digestive process. As a result of exposure to all the digestion phases, additional changes in lutein *Z*-isomers occurred. The content of 13-*Z* and 13'-*Z*-lutein further declined, but almost negligibly (by 2.7% and 1.5%), to an average of 0.04 and 0.02 µg/g (to 63.2% and 53.8%). The general trend was deviated by the increase of 13-*Z*-lutein in Konini and 13'-*Z*-lutein in AF Jumiko, in both cases from value < LOQ in boiled grain to 0.04 and 0.03 µg/g (Supplement 2). 9-*Z*-lutein was degraded more extensively after digestion, decreasing its content by 13%, to 0.03 µg/g (111%), whereas the 9'-*Z*-lutein content increased even more (by 59%) to a final 0.02 µg/g (225%; Table 2). The above-mentioned findings may be considered favorable, as some authors (Ferruzzi et al., 2006; Honda et al., 2021; Kean et al., 2011) noted the enhanced utilizability of dietary *Z*-forms of carotenoids compared to their *E*-isomers.

The very low digestive stability of lutein in boiled maize was observed by Zhang et al. (2020), as its content declined by more than 70%. Kopec et al. (2017) reported an average 40% decrease in the lutein content of artificial mixed meals after all simulated digestion phases (gastric, duodenal, and jejunal). In contrast, the substantial digestive stability of lutein was reported by Blanquet-Diot et al. (2009) for various mixtures prepared from real foods containing yellow and red tomatoes (at least 91%), and also by Courraud et al. (2013), who observed up to 100% of lutein content being retained in a carrot juice digestion experiment. Although Petry and Mercadante (2017) conceded the possibility of carotenoid isomerization during *in vitro* simulation of digestion, assuming this process is promoted by an acidic environment (and a high temperature), neither they nor other authors observed its occurrence (Courraud et al., 2013; Honda et al., 2021; Kopec et al., 2017).

Xanthophyll esters showed a high digestive stability, with an average loss of only 4.6%, but due to the severe decrease caused by boiling, their content dropped to 53.4% of the raw grain *i.v.*, corresponding to 0.17 µg/g. Rodrigues et al. (2016) stated that the number of studies in which esterified carotenoids were monitored after simulated *in vitro* digestion is limited, as alkaline hydrolysis is usually included in the sample preparation for carotenoid determination, and therefore only results of free carotenoids are provided. Taking esterified carotenoids into consideration is of particular importance, since the form of carotenoids is one of the crucial factors (along with the amount of fat and fiber present) affecting their ability to incorporate into micelles, which is indispensable for their bioaccessibility, and further bioavailability (Hedren et al., 2002; Kean et al., 2011). Partial hydrolysis of xanthophyll esters may be induced during digestion (e.g. by the cholesterol esterase and by pancreatic lipase activity), thus reducing the hydrophobicity of the molecules: diesters > monoesters > free xanthophylls, which entails an enhanced micelle incorporation capability (Chitchumroonchokchai and Failla, 2006; Petry and Mercadante, 2017; Rodrigues et al., 2016). The contention of the higher bioaccessibility of free xanthophylls compared to their mono- and diesterified forms was supported by the

results of Chitchumroonchokchai and Failla (2006) for zeaxanthin (81% vs. 44% and 11%) and by Rodrigues et al. (2016) for lutein (29% vs. 17% and 18%).

Of all the analytes examined, β-carotene and zeaxanthin exhibited the least resistance to the factors acting during the simulated digestion process. Compared to boiled grain, a significant decrease of 24.0% was observed for zeaxanthin, reducing its content to 0.18 µg/g (68.3%), and β-carotene was completely degraded. An extensive decrease in zeaxanthin content (to 29.8%) was also reported by Zhang et al. (2020) after the digestion of cooked maize; however, they observed markedly contrasting changes in the content of β-carotene, which, since decreasing to 50.0% of the content in the cooked kernel, appeared to be the most stable of all the carotenoids analyzed. The high stability of β-carotene was also indicated by the results of other authors, such as Kopec et al. (2017) and Failla et al. (2009), referring to a decrease in its content by 25% and 20.7% due to the digestion of mixed meals and orange-fleshed sweet potatoes. According to Ferruzzi et al. (2006), no significant difference was observed in β-carotene content before and after the simulated gastric and intestinal digestion phases. The striking stability of β-carotene was found by Courraud et al. (2013) in the carrot juice experiment, as 100% of its content was retained after digestion; nevertheless, the β-carotene content of the standard solution used for the reference dropped by 69% throughout the digestion process. These authors, similarly to Zhang et al. (2020), assumed an improved extraction from the disrupted food matrix and attributed the relevant effect on the digestive stability to the nature of the original matrix, such as the location of carotenoids in the plant cell or the presence of other substances with antioxidant properties (flavonoids, phenolic acids, etc.).

#### 4. Conclusion

Boiling wheat was found to be a suitable carotenoid-sparing method, resulting in a substantially higher share of total carotenoids retained (72.7%) compared to the previously investigated technologies - the baking of buns (24.9%; Paznocht et al., 2019) and unleavened bread (26.0%; Burešová et al., 2021) and extrusion and puffing (25.7% and 31.6%; Paznocht et al., 2021). In the present experiment, lutein isomerization was observed, both as a result of boiling and of the subsequent simulated *in vitro* digestive process, increasing the content of 9- and 9'-*Z*-lutein to a final 111% and 225% of the raw grain's initial content. Although it is indicated by the results that isomerization may already occur at a temperature of around 100°C, the extent of the changes recorded did not reach the level of isomerization induced by short-term exposure to extreme temperatures and pressure, as previously described for lutein and zeaxanthin in puffed kernels. The novel discovery of a culinary treatment that preserves a substantial share of the carotenoid pigments - for the increased content of which new, unique wheat varieties are being bred - was needed to conclude with the consideration of the extent to which their degradation is caused by subsequent digestion. A favorable finding is that throughout the simulated digestive process, a significant amount of carotenoids (60.6%) was preserved, which is exploitable by the organism and/or can exert antioxidant activity directly in the gut and thus help to protect intestinal epithelial cells from free radical damage (Hidalgo et al., 2018; Kopec et al., 2017; Fardet et al., 2008). Regarding wheat as having an important role in global food security, not simply due to its undemanding growing conditions, storability, wide technological processing options, and nutritional composition, colored-grain wheats represent an opportunity to enrich an assortment of food commodities with new ones of considerable benefits for human nutrition and well-being.

## CRedit authorship contribution statement

**Barbora Burešová:** Data curation, Writing – original draft, Writing – review & editing, Visualization. **Luboš Paznocht:** Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft, Visualization. **Veronika Jarošová:** Formal analysis. **Ivo Doskočil:** Funding acquisition. **Petr Martinek:** Resources, Funding acquisition.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Data Availability

Data will be made available on request.

## Acknowledgements

This work was supported by the project NAZV No. QK1910343 of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, and by the METROFOOD-CZ research infrastructure project MEYS Grant no.: LM2018100.

We would like to thank Jessica Kendall Hankiewicz for her conscientious proofreading of this article.

## Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.jfca.2022.105002](https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.105002).

## References

- Abdel-Aal, E.S.M., Young, J.C., Rabalski, I., Hucl, P., Fregeau-Reid, J., 2007. Identification and quantification of seed carotenoids in selected wheat species. *J. Agric. Food Chem.* 55 (3), 787–794.
- Blanquet-Diot, S., Soufi, M., Rambeau, M., Rock, E., Alric, M., 2009. Digestive stability of xanthophylls exceeds that of carotenes as studied in a dynamic in vitro gastrointestinal system. *J. Nutr.* 139 (5), 876–883.
- Burešová, B., Paznocht, L., Kotíková, Z., Giampaglia, B., Martinek, P., Lachman, J., 2021. Changes in carotenoids and tocopherols of colored-grain wheat during unleavened bread preparation. *J. Food Compos. Anal.* 103, 104108.
- Capouchová, I., Burešová, B., Paznocht, L., Eliášová, M., Pazderů, K., Konvalina, P., Satranský, M., Dvořáček, V., 2020. Antioxidant activity and content of selected antioxidant compounds in grain of different oat cultivars. *Plant Soil Environ.* 66 (7), 327–333.
- Chitchumroonchokchai, C., Failla, M.L., 2006. Hydrolysis of zeaxanthin esters by carboxyl ester lipase during digestion facilitates micellarization and uptake of the xanthophyll by Caco-2 human intestinal cells. *J. Nutr.* 136 (3), 588–594.
- Courraud, J., Berger, J., Cristol, J.P., Avallone, S., 2013. Stability and bioaccessibility of different forms of carotenoids and vitamin A during in vitro digestion. *Food Chem.* 136, 871–877.
- De Oliveira, G.P., Rodriguez-Amaya, D.B., 2007. Processed and prepared corn products as sources of lutein and zeaxanthin: compositional variation in the food chain. *J. Food Sci.* 72 (1), S079–S085.
- Eliášová, M., Kotíková, Z., Lachman, J., Orsák, M., Martinek, P., 2020. Influence of baking on anthocyanin content in coloured-grain wheat bread. *Plant Soil Environ.* 66 (8), 381–386.
- Failla, M.L., Thakkar, S.K., Kim, J.Y., 2009. In vitro bioaccessibility of  $\beta$ -carotene in orange fleshed sweet potato (*Ipomoea batatas*, Lam.). *J. Agric. Food Chem.* 57 (22), 10922–10927.
- Fardet, A., Rock, E., Rémésy, C., 2008. Is the in vitro antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected in vivo? *J. Cereal Sci.* 48 (2), 258–276.
- Ferruzzi, M.G., Lumpkin, J.L., Schwartz, S.J., Failla, M., 2006. Digestive stability, micellarization, and uptake of  $\beta$ -carotene isomers by Caco-2 human intestinal cells. *J. Agric. Food Chem.* 54 (7), 2780–2785.
- Fratianni, A., D'Agostino, A., Niro, S., Bufano, A., Bruno, P., Panfilì, G., 2021. Loss or gain of lipophilic bioactive compounds in vegetables after domestic cooking? Effect of steaming and boiling. *Foods* 10, 960.
- Fučíková, E. Nováček, T., 2014. Cíle šlechtění pšenice v Hrubčicích, monitoring a odolnost k plodomorze plevové (*Sitodiplosis mosellana*). In: Šlechtitelský seminář: Pšenice 2014 "Rez nikdy nespí" (pp. 14). Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha, v. v.i.
- Gill, S.K., Rossi, M., Bajka, B., Whelan, K., 2021. Dietary fibre in gastrointestinal health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 18 (2), 101–116.
- Hedrén, E., Diaz, V., Svanberg, U., 2002. Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an in vitro digestion method. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56 (5), 425–430.
- Hidalgo, A., Brandolini, A., Pompei, C., 2010. Carotenoids evolution during pasta, bread and water biscuit preparation from wheat flours. *Food Chem.* 121 (3), 746–751.
- Hidalgo, A., Ferraretto, A., De Noni, I., Bottani, M., Cattaneo, S., Galli, S., Brandolini, A., 2018. Bioactive compounds and antioxidant properties of pseudocereals-enriched water biscuits and their in vitro digestates. *Food Chem.* 240, 799–807.
- Honda, M., Takasu, S., Nakagawa, K., Tsuda, T., 2021. Differences in bioavailability and tissue accumulation efficiency of (all-*E*-) and (*Z*-) carotenoids: a comparative study. *Food Chem.* 361, 130119.
- Kao, F.J., Chiu, Y.S., Tsou, M.J., Chiang, W.D., 2012. Effects of Chinese domestic cooking methods on the carotenoid composition of vegetables in Taiwan. *LWT-Food Sci. Technol.* 46, 485–492.
- Kean, E.G., Bordenave, N., Ejeta, G., Hamaker, B.R., Ferruzzi, M.G., 2011. Carotenoid bioaccessibility from whole grain and decorticated yellow endosperm sorghum porridge. *J. Cereal Sci.* 54 (3), 450–459.
- Kopec, R.E., Gleize, B., Borel, P., Desmarchelier, C., Caris-Veyrat, C., 2017. Are lutein, lycopene, and beta-carotene lost through the digestive process? *Food Funct.* 8 (4), 1494–1503.
- Kotíková, Z., Hejtmánková, A., Lachman, J., Hamouz, K., Trnková, E., Dvořák, P., 2007. Effect of selected factors on total carotenoid content in potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Soil Environ.* 53 (8), 355.
- Kotíková, Z., Šulc, M., Lachman, J., Pivec, V., Orsák, M., Hamouz, K., 2016. Carotenoid profile and retention in yellow-, purple- and red-fleshed potatoes after thermal processing. *Food Chem.* 197, 992–1001.
- Kourouma, V., Mu, T.H., Zhang, M., Sun, H.N., 2019. Effects of cooking process on carotenoids and antioxidant activity of orange-fleshed sweet potato. *LWT - Food Sci. Technol.* 104, 134–141.
- Lachman, J., Martinek, P., Kotíková, Z., Orsák, M., Šulc, M., 2017. Genetics and chemistry of pigments in wheat grain—a review. *J. Cereal Sci.* 74, 145–154.
- Mattera, M.G., Hornero-Méndez, D., Aienza, S.G., 2017. Lutein ester profile in wheat and tritordeum can be modulated by temperature: evidences for regioselectivity and fatty acid preferential of enzymes encoded by genes on chromosomes 7D and 7H<sup>ch</sup>. *Food Chem.* 219, 199–206.
- Melini, V., Panfilì, G., Fratianni, A., Acquistucci, R., 2019. Bioactive compounds in rice on Italian market: pigmented varieties as a source of carotenoids, total phenolic compounds and anthocyanins, before and after cooking. *Food Chem.* 277, 119–127.
- Mellado-Ortega, E., Hornero-Méndez, D., 2012. Isolation and identification of lutein esters, including their regioisomers, in tritordeum ( $\times$  Tritordeum Ascherson et Graebner) grains: evidence for a preferential xanthophyll acyltransferase activity. *Food Chem.* 135 (3), 1344–1352.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohm, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C.N., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W., Brodtkorb, A., 2014. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct.* 5 (6), 1113–1124.
- Narwal, S., Gupta, O.P., Pandey, V., Kumar, D., Ram, S., 2020. Effect of storage and processing conditions on nutrient composition of wheat and barley. In: Gupta, O.P., Pandey, V., Narwal, S., Sharma, P., Ram, S., Singh, G.P. (Eds.), *Wheat and Barley Grain Biofortification*. Woodhead Publishing, Cambridge, pp. 229–256.
- Oduro-Obeng, H., Fu, B.X., Beta, T., 2021. Influence of cooking duration on carotenoids, physical properties and in vitro antioxidant capacity of pasta prepared from three Canadian durum wheat cultivars. *Food Chem.* 363, 130016.
- Paznocht, L., Kotíková, Z., Orsák, M., Lachman, J., Martinek, P., 2019. Carotenoid changes of colored-grain wheat flours during bun-making. *Food Chem.* 277, 725–734.
- Paznocht, L., Burešová, B., Kotíková, Z., Martinek, P., 2021. Carotenoid content of extruded and puffed products made of colored-grain wheats. *Food Chem.* 340, 127951.
- Petry, F.C., Mercadante, A.Z., 2017. Impact of in vitro digestion phases on the stability and bioaccessibility of carotenoids and their esters in mandarin pulps. *Food Funct.* 8 (11), 3951–3963.
- Rodrigues, D.B., Mariutti, L.R., Mercadante, A.Z., 2016. An in vitro digestion method adapted for carotenoids and carotenoid esters: moving forward towards standardization. *Food Funct.* 7 (12), 4992–5001.
- Rodrigues, D.B., Chitchumroonchokchai, C., Mariutti, L.R.B., Mercadante, A.Z., Failla, M.L., 2017. Comparison of two static in vitro digestion methods for screening the bioaccessibility of carotenoids in fruits, vegetables, and animal products. *J. Agric. Food Chem.* 65 (51), 11220–11228.
- Shen, R., Yang, S., Zhao, G., Shen, Q., Diao, X., 2015. Identification of carotenoids in foxtail millet (*Setaria italica*) and the effects of cooking methods on carotenoid content. *J. Cereal Sci.* 61, 86–93.
- ÚKZÚZ, 2018. List of Protected Varieties. Bulletin of the Central Institute for Supervising and Testing in Agriculture, Series: National Plant Variety Office. Czech Gazette for Plant Breeders Rights and National List of Plant Varieties XVII/7, 15 October. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno. [Available online: ([http://eagri.cz/public/web/file/600240/\\_72018.pdf](http://eagri.cz/public/web/file/600240/_72018.pdf))], (Accessed 26 October 2021)].
- VUKROM, 2021. Naše odrůdy. (<https://www.vukrom.cz/cz/nase-odrudy.html>); (Accessed 26 October 2021).
- Zhang, S.H., Ji, J., Zhang, S.Q., Guan, C.F., Wang, G., 2020. Effects of three cooking methods on content changes and absorption efficiencies of carotenoids in maize. *Food Funct.* 11 (1), 944–954.



## Supplement 1

Concentration (mmol/L) of the individual chemicals contained in the simulated solutions

Constituent	SSF	SGF	SIF
KCl	15.1	6.9	6.8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.7	0.9	0.8
NaHCO <sub>3</sub>	13.6	25	85
NaCl	-	47.2	38.4
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.15	0.1	0.33
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.06	0.5	-

SSF Simulated salivary fluid; SGF Simulated gastric fluid; SIF Simulated intestinal fluid

## Supplement 2

### Changes in carotenoid contents of the individual genotypes as a result of boiling and the simulated digestive process

Genotype	Procedure Step	All- <i>E</i> -Lutein	13-Z-Lutein	13'-Z-Lutein	9-Z-Lutein	9'-Z-Lutein	Zeaxanthin	β-Carotene	Xanthophyll Esters
Bohemia	Raw Grain	0.78±0.01	0.04±0.01	0.04±0.00	< LOQ	< LOQ	0.26±0.01	n.d.	n.d.
	Boiled Grain	0.59±0.03	0.04±0.01	< LOQ	0.04±0.00	< LOQ	0.24±0.01	n.d.	n.d.
	Digesta	0.56±0.01	0.05±0.01	< LOQ	0.04±0.00	0.03±0.00	0.22±0.03	n.d.	n.d.
Annie	Raw Grain	0.35±0.02	< LOQ	< LOQ	n.d.	n.d.	0.13±0.04	n.d.	0.18±0.01
	Boiled Grain	0.25±0.01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.11±0.01	n.d.	0.12±0.02
	Digesta	0.09±0.01	< LOQ	< LOQ	< LOQ	n.d.	0.07±0.01	n.d.	0.12±0.01
Citrus	Raw Grain	2.70±0.06	0.23±0.01	0.16±0.01	0.11±0.00	0.07±0.00	0.32±0.01	0.10±0.00	n.d.
	Boiled Grain	1.85±0.02	0.15±0.00	0.09±0.00	0.13±0.00	0.10±0.00	0.29±0.01	< LOQ	n.d.
	Digesta	1.62±0.06	0.06±0.01	0.10±0.01	0.13±0.00	0.10±0.00	0.24±0.01	< LOQ	n.d.
Bona Vita	Raw Grain	1.41±0.02	0.10±0.00	0.07±0.01	0.06±0.01	0.03±0.00	0.27±0.02	0.13±0.00	1.39±0.06
	Boiled Grain	1.11±0.01	0.08±0.00	0.06±0.00	0.06±0.01	0.04±0.00	0.22±0.01	< LOQ	0.61±0.01
	Digesta	0.88±0.00	0.07±0.00	0.05±0.00	0.06±0.00	0.05±0.00	0.17±0.00	< LOQ	0.60±0.05
AF Jumiko	Raw Grain	0.89±0.01	0.07±0.00	0.04±0.00	0.04±0.00	< LOQ	0.26±0.01	n.d.	n.d.
	Boiled Grain	0.64±0.02	0.04±0.00	< LOQ	0.05±0.00	0.04±0.00	0.24±0.01	n.d.	n.d.
	Digesta	0.56±0.01	0.05±0.00	0.03±0.00	0.05±0.00	0.03±0.00	0.17±0.01	n.d.	n.d.
Konini	Raw Grain	0.62±0.02	0.04±0.01	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.37±0.00	0.10±0.00	0.75±0.02
	Boiled Grain	0.56±0.02	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.36±0.01	0.08±0.00	0.57±0.01
	Digesta	0.40±0.02	0.04±0.00	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.24±0.00	< LOQ	0.47±0.01
ANK 28A	Raw Grain	0.50±0.01	0.04±0.00	< LOQ	< LOQ	n.d.	0.34±0.01	n.d.	0.07±0.01
	Boiled Grain	0.35±0.03	0.03±0.00	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.32±0.02	n.d.	0.06±0.01
	Digesta	0.31±0.01	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.21±0.00	n.d.	0.07±0.00
RU 687-12	Raw Grain	0.47±0.01	n.d.	0.04±0.00	0.05±0.00	< LOQ	0.23±0.00	n.d.	0.37±0.03
	Boiled Grain	0.28±0.00	n.d.	0.03±0.00	0.03±0.00	< LOQ	0.20±0.03	n.d.	0.25±0.01
	Digesta	0.27±0.03	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.15±0.01	n.d.	0.24±0.01
UC 66049	Raw Grain	0.28±0.01	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.22±0.01	n.d.	0.09±0.00
	Boiled Grain	0.20±0.01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.21±0.02	n.d.	0.03±0.00
	Digesta	0.15±0.00	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.16±0.02	n.d.	0.02±0.00
Skorpion	Raw Grain	0.56±0.03	0.05±0.00	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.24±0.02	n.d.	0.24±0.02
	Boiled Grain	0.36±0.02	0.04±0.00	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.24±0.06	n.d.	0.16±0.00
	Digesta	0.31±0.02	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.17±0.01	n.d.	0.13±0.01

n.d. – not detectable; < LOQ – below the limit of quantification

## 5. Souhrnná diskuse

V zrně zkoumaných odrůd a šlechtitelských linií pšenice, mezi kterými byly zařazeny genotypy se žlutým endospermem (Ye), purpurovým perikarpem (Pp), modrým aleuronem (Ba) a kontrolní odrůdy se standardní červenou barvou zrna (red), byl stanoven obsah a zastoupení fenolických kyselin (Paznocht et al. 2020), karotenoidů (Paznocht et al. 2021; Burešová et al. 2021; Burešová et al. 2023) a tokolů (Burešová et al. 2021).

V rámci skupin genotypů dle barvy zrna byl prokazatelně nejvyšší celkový obsah fenolických kyselin v sušině zrna (TPA; total phenolic acid content) zaznamenán u pšenice s Ba (798 µg/g) a nižších hodnot dosahovaly pšenice s Pp a Ye (701 a 692 µg/g). Nejnižší TPA naměřený u kontrolních odrůd (599 µg/g) spadal do relativně širokého rozmezí hodnot TPA standardních červených pšenice uváděných jinými autory (547–900 µg/g) (Fernandez Orozco et al. 2010; Guo & Beta 2013; Li et al. 2008; Ma et al. 2016; Zuchowski et al. 2011). Zvýšený TPA u Ba a Pp oproti tradičním odrůdám pšenice, který byl pozorován i v jiných studiích (Liu et al. 2010; Ma et al. 2016; Zrcková et al. 2018) by mohl do značné míry souviset s obsahem anthokyanových barviv. Syntéza těchto pigmentů vychází z fenylpropanoidové dráhy, jejímž centrálním metabolitem je *p*-kumarová kyselina (Vogt 2010), která může sloužit jako prekurzor anthokyanidinů, což bylo zjištěno také u ferulové kyseliny (Shao & Bao 2015), jejíž podíl na TPA pšeničných zrn je zcela dominantní (Brandolini et al. 2013; Fernandez-Orozco et al. 2010; Hernández et al. 2011; Ma et al. 2016; Ndolo & Beta 2014; Yilmaz et al. 2015; Zuchowski et al. 2011). Nestabilní chromofory anthokyanových barviv zpravidla vázané na sacharidovou složku (glukosu, galaktosu aj.) bývají navíc často acylovány fenolickými i jinými organickými kyselinami, jako např. octovou, *p*-kumarovou, ferulovou nebo sinapovou (Jokioja et al. 2021). Lze tedy předpokládat, že vysoký obsah anthokyanů (Eliášová et al. 2020) a fenolických kyselin v Ba a Pp pšenicích by mohl být důsledkem zvýšené aktivity fenylpropanoidové biosyntetické dráhy.

Obsah karotenoidů byl v rámci publikovaných studií stanoven v zrnech (celozrnné mouce) pocházejících ze tří různých sklizňových ročníků (2016/2017, 2017/2018 a 2018/2019). V průměru za všechny sezóny v souladu s výsledky dalších autorů (Giordano et al. 2017; Paznocht et al. 2018; Zrcková et al. 2018) se ze všech barevných skupin podle předpokladů vyznačovaly nejvyšším celkovým obsahem karotenoidů v sušině zrna (TCC; total carotenoid content) pšenice s Ye (4,12 µg/g). Ve srovnání s TCC v zrně standardních červených odrůd (1,15 µg/g) a Ba genotypů (1,22 µg/g) dosahovaly mírně vyšších průměrných hodnot pšenice s Pp (1,45 µg/g). Zvýšený TCC u Pp pšenice oproti tradičním odrůdám (2,62 vs. 2,56 µg/g) pozorovali také Ndolo & Beta (2013) a Ficco et al. (2016) uvádějí dokonce srovnatelné hodnoty

TCC v celozrnné mouce z Pp a Ye pšenice tvrdé (7,38 a 7,68 µg/g). Z pohledu jednotlivých genotypů byl mimořádně vysoký TCC (8,29 µg/g) naměřen u Ye genotypu KM 109-17 ze sklizně 2017/2018 (Burešová et al. 2021). Mimo Ye pšenic byl ve všech sklizňových letech pozorován zvýšený TCC u Pp odrůdy Konini (průměrně 1,97 µg/g).

Procentuální zastoupení jednotlivých karotenoidů bylo napříč všemi barevnými skupinami ve všech zkoumaných sezónách velmi podobné. V souladu s naprostou většinou prací publikovaných k tomuto tématu (Giordano et al. 2017; Hussain et al. 2015; Paznocht et al. 2018; Ziegler et al. 2015) byl majoritním analytem lutein, který představoval průměrně více než 70 % TCC, z toho 8 % tvořily jeho *cis*-isomery. Lutein spolu se zeaxanthinem, které jsou nezbytné pro správnou funkci oční sítnice (Kotíková et al. 2016), byly jedinými dvěma karotenoidy detekovanými ve všech genotypech a sklizňových letech. Ve srovnání s luteinem byl podíl zeaxanthinu na TCC mnohem nižší a průměrně činil 10 %. Dále byly detekovány β-karoten a antheraxanthin, které však představovaly pouze minoritní podíl TCC. U většiny genotypů byly identifikovány také karotenoidy ve formě esterů, vznikající acylací xanthofylů mastnými kyselinami, jež představuje efektivní způsob ochrany před (foto)oxidací, umožňující dlouhodobé skladování pigmentů v rostlinných buňkách (Zia-Ul-Haq 2021). Někteří autoři považují esterifikované karotenoidy oproti volným formám za stabilnější vůči různým faktorům spojeným se zpracováním potravin (Fu et al. 2010; Mattera et al. 2017), na druhou stranu jejich absorpce v trávicím traktu je v důsledku zvýšené liposolubility omezená (Breithaupt et al. 2002).

Nejvyšší celkový obsah tokolů (TTC; total tocol content) byl pozorován v zrně tradičních červených odrůd (61,1 µg/g sušiny), a naopak nejnižší výsledky byly zaznamenány u pšenic s Ye (43,3 µg/g). Vzájemně srovnatelných hodnot TTC dosahovaly Pp a Ba genotypy (51,3 a 50,9 µg/g). Podstatně nižší TTC naměřili u netradičně zbarvených pšenic Lachman et al. (2018), kteří však v souladu s našimi výsledky uvádí srovnatelné hodnoty u Pp a Ba genotypů (28,7 a 28,5 µg/g), a také relativně nejnižší TTC u Ye pšenic (20,2 µg/g). Uvedené difference mohou být kromě environmentálních podmínek jednotlivých ročníků, způsobené také genetickými faktory, které výrazně ovlivňují obsah tokolů (Lampi et al. 2010), ale také karotenoidů (Zrcková et al. 2018) a fenolických látek v zrně (Capouchová et al. 2020). Na TTC se z více než 60 % podílely tokotrienoly, a to zejména díky vysokému obsahu β-tokotrienolu (β-T3; 28,1 µg/g, 55 % TTC), jehož majoritní zastoupení v pšenici uvádějí i Hidalgo et al. (2009), Lampi et al. (2010) a Fratianni et al. (2012). Výjimku představovala Ye odrůda Bona Vita, která byla jako jediná ze všech analyzovaných genotypů charakteristická vyšším podílem α-tokoferolu (α-T) oproti β-T3 (40,2 vs. 25,7 %). Vysoký obsah α-T, který má ze všech osmi forem tokolů nejvyšší biologickou aktivitu a jako jediný splňuje kritéria, aby mohl být

v souvislosti s lidským organismem označován jako vitamin E (Azzi 2018), byl zaznamenán u odrůdy Konini (15,4 µg/g), což je nejvíce ze všech analyzovaných genotypů.

Pro stanovení změn obsahu sledovaných obsahových látek zrna vlivem různých technologií potravinářského zpracování byly provedeny experimenty extruze a pufování (Paznocht et al. 2021), přípravy nekynutého pečiva (Burešová et al. 2021) a vaření s následným simulovaným trávicím procesem *in vitro* (Burešová et al. 2023).

V důsledku extruze došlo k průměrnému poklesu TCC o 74 % oproti původní hodnotě (p.h.) v celozrnné mouce, přičemž nejmenší úbytek byl pozorován u klasických červených odrůd (65 %). Navzdory rozsáhlé degradaci pozorované u Ye genotypů (78 %) byl ve finálních extrudovaných produktech z těchto pšeníc zachován největší TCC (1,01 µg/g) ze všech analyzovaných barevných skupin (Pp 0,4 > red 0,38 > Ba 0,27 µg/g). Výrazně nižší míru degradace vlivem extruze zaznamenali Ortiz et al. (2018) u kukuřičné (23 %) a Waramboi et al. (2013) u batátové mouky (39 %). V obou uvedených studiích byl pozorován významný vliv vlhkosti výchozí směsi, kdy nejnižších ztrát bylo dosaženo při nejvyšší vlhkosti. Dalším podstatným faktorem může být chemické složení vstupního materiálu, a to zejména obsah škrobu, který pokud je vyšší v poměru k obsaženým bílkovinám, může vůči karotenoidům vykazovat protektivní efekt, což pozorovali Dehghan-Shoar et al. (2010) během extruze obilné mouky obohacené pastou z rajčatových slupek. Pro dosažení požadované kvality výsledných produktů, byla v našem experimentu zvolena relativně nízká vlhkost výchozí směsi (20 %) a vysoká extruzní teplota (130 °C), což spolu s vysokým obsahem bílkovin ve zpracovávaném materiálu mohlo být důvodem markantnějších ztrát, než které pozorovali výše uvedení autoři. Pufováním došlo k poklesu TCC o 64 %, což ve srovnání s extruzí představuje nižší, přesto však statisticky významný úbytek (Table 2; Paznocht et al. 2021). Podobně jako u extruze byly k degradaci velmi náchylné karotenoidy obsažené v Ye genotypech, jejichž obsah poklesl průměrně o 71 %, ale i přesto finální produkty z těchto pšeníc obsahovaly výrazně vyšší TCC (1,12 µg/g) než ostatní barevné skupiny (Pp 0,44 > Ba 0,29 > red 0,25 µg/g).

Celý proces výroby nekynutého pečiva způsobil stejně jako v případě extruze úbytek TCC o 74 %. Největší podíl p.h. TCC byl zachován u klasických červených odrůd (pokles o 66 %), zatímco k nejvýraznější degradaci došlo u Ba (80 %) a Ye pšeníc (78 %). Přesto byl u skupiny pšeníc s Ye zachován relativně nejvyšší TCC (Ye 1,52 > red 0,70 > Pp 0,62 > Ba 0,37 µg/g). Při srovnání jednotlivých kroků technologického zpracování byl obsah karotenoidů ve finálním výrobku ve větší míře ovlivněn hnětením těsta (pokles o 51 %) než samotným pečením (pokles o 23 %). Míra degradace, ke které došlo během přípravy nekynutého těsta byla dle původních předpokladů nižší (o 10–15 %), než jakou pozorovali Paznocht et al. (2019) a Leenhardt et al. (2006) při přípravě těsta kynutého. Naše výsledky jsou srovnatelné s hodnotami publikovanými

autory Fratianni et al. (2012) a Hidalgo et al. (2010), kteří stanovili pokles celkového obsahu karotenoidů o 51 a 54 % v těstě použitém pro výrobu těstovin. Posledně jmenovaní autoři zaznamenali výrazně nižší pokles TCC při přípravě chleba a sušenek (o 26 a 23 %), při které bylo těsto hněteno poloviční dobu než v naší studii.

Ze všech analyzovaných genotypů došlo k největšímu poklesu TCC u Ye odrůdy Bona Vita (o 72 %), která byla specifická také tím, že měla nejnížší počáteční celkový obsah tokolů. Co se týče barevných skupin, obě, u nichž došlo k nejvýraznějším ztrátám TCC v těstě (Ba a Ye pšenice), měly také nejnížší počáteční TTC v mouce. Naproti tomu standardní červené odrůdy, u kterých byl zachován největší podíl TCC, vykazovaly nejvyšší TTC v mouce (Table 2; Burešová et al. 2021). Tyto výsledky naznačují, že vysoký obsah tokolů v mouce by mohl mít příznivý vliv na množství karotenoidů zachovaných po přípravě těsta. Naše hypotéza byla podpořena výsledky korelační analýzy, která ukázala významnou pozitivní závislost ( $R = 0,693$ ;  $p < 0,001$ ) podílu TCC zachovaného v těstě a počátečního TTC v mouce (Figure 4; Burešová et al. 2021). To je v souladu s poznatkami o protektivním účinku tokoferolů proti oxidační degradaci karotenoidů, který pozorovali i jiní autoři (Kaur et al. 2015; Shibasaki-Kitakawa et al. 2004; Schaub et al. 2017).

Průměrný procentuální úbytek tokolů způsobený hnětením těsta byl ve srovnání s karotenoidy nižší (33 vs. 51 %), což je v souladu s výsledky autorů Leenhardt et al. (2006) (12 vs. 66 %) a Fratianni et al. (2012) (28 vs. 49 %). Ačkoli tokoly vykazovaly v průběhu přípravy těsta větší stabilitu, byl na základě korelační analýzy zjištěn pozitivní vztah ( $R = 0,605$ ;  $p < 0,001$ ) mezi podílem zachovaného TCC a TTC v těstě (Supplement 3; Burešová et al. 2021), což naznačuje, že degradace obou skupin analytů závisí do určité míry na stejných faktorech. Vzhledem k tomu, že během hnětení je do materiálu zapracována voda a kyslík, je v této fázi pravděpodobně podporována zejména oxidace polynenasycených mastných kyselin katalyzovaná enzymy ze skupiny lipoxygenas (Eyoum et al. 2003). Tato reakce vede ke vzniku hydroperoxidů, které vyvolávají oxidační degradaci karotenoidů a tokolů. Enzymy řízená a přímá oxidace jsou tedy hlavními faktory způsobujícími degradaci těchto lipofilních antioxidantů během přípravy těsta (Hidalgo & Brandolini 2010; Leenhardt et al. 2006).

Vysoká teplota při pečení způsobila další degradaci karotenoidů v průměru o 23 %, přičemž mezi analyzovanými barevnými skupinami nebyly zjištěny příliš velké rozdíly: red > Pp > Ba > Ye (pokles o 27 > 23 > 22 > 21 %). Srovnatelný úbytek TCC (o 27 %) byl zjištěn také v předchozím pokusu s výrobou pečiva kynutého (Paznocht et al. 2019). Tyto výsledky naznačují, že relativně velké množství karotenoidů, které bylo uchováno v těstě díky absenci fáze kynutí, během pečení výrazně pokleslo, a to pravděpodobně hlavně kvůli odlišnému tvaru výrobku, kdy vysoké teploty pečení mají zřejmě škodlivější vliv na karotenoidy v případě tenké

nekynuté placky ve srovnání s nadýchanou kynutou houskou. Průměrný pokles TTC, ke kterému došlo v průběhu pečení (o 9 %) podpořil tvrzení o vyšší termostabilitě tokolů oproti karotenoidům (Hidalgo & Brandolini 2010; Leenhardt et al. 2006). Stejně jako u karotenoidů se barevné skupiny v úbytku TTC vyvolaným vysokou teplotou pečení významně nelišily: Ba > red > Pp > Ye (o 12 > 11 > 8 > 6 %). Vzhledem k celému procesu přípravy nekynutého pečiva došlo k průměrnému poklesu TTC na 58 % p.h., přičemž nejvyšší celkový obsah byl zaznamenán ve finálních produktech vyrobených z tradičních odrůd (40,4 µg/g), což je o 40–60 % více než u Ba, Pp a Ye genotypů (28,4; 27,9 a 24,5 µg/g).

Vařením došlo k průměrnému poklesu TCC o 27 % p.h. v zrně (Table 2; Burešová et al. 2023). Analogicky k ostatním zkoumaným technologiím zůstal přes relativně vysoké procentuální ztráty (33 %) nejvyšší TCC zachován v genotypěch s Ye (2,40 µg/g vs. Pp 1,03 > red 0,70 > Ba 0,62 µg/g). Nejodolnější vůči vaření byla Pp odrůda Konini u které byla pozorována nejnižší míra degradace (17 %) ze všech genotypů a vařená zrna si tak zachovala několikanásobně vyšší TCC (1,57 µg/g) ve srovnání s nekynutým pečivem (0,45 µg/g), pufovanými zrny (0,45 µg/g) i extrudáty (0,75 µg/g). Tyto rozdíly byly zjištěny nejen v případě Konini, ale také při porovnání průměrných hodnot TTC všech analyzovaných genotypů, které byly výrazně vyšší po vaření (1,15 µg/g) než po pečení (0,81 µg/g), extruzi (0,51 µg/g) i pufování (0,49 µg/g). Vaření tedy představuje velmi účinnou technologii z hlediska zachování karotenoidů, což je patrné zejména při srovnání zachovaného procentuálního podílu TCC ve finálních výrobcích, kdy v nekynutém pečivu a pufovaných zrnech zůstalo 26 %, v extrudátech 32 % a ve vařených zrnech téměř 73 % p.h.

Změny obsahu jednotlivých identifikovaných isomerů luteinu vyvolané vařením se lišily, přičemž u majoritně zastoupeného *all-trans*-luteinu byl zaznamenán pokles na 72 % p.h. v syrovém zrně, což je asi třikrát více než bylo zachováno po pečení (19 %), extruzi (22 %) a pufování (18 %). Ve srovnání s *all-trans*-luteinem byly větší ztráty pozorovány u 13-*cis*- a 13'-*cis*-luteinu, zatímco obsah 9-*cis*- a 9'-*cis*-luteinu po vaření dokonce vzrostl na 124 a 166 %. Tyto výsledky naznačující výraznou stabilitu nebo isomeraci 9-*cis*- a 9'-*cis*-luteinu jsou příznivé zejména s ohledem na silnější antioxidační účinky *cis*- oproti *trans*-isomerům odpovídajících karotenoidů (Honda et al. 2021). Vyšší retence ve vařených zrnech ve srovnání s produkty ostatních technologií byla zaznamenána u všech detekovaných analytů, s výjimkou 9'-*cis*-luteinu, jehož obsah v důsledku pufování vzrostl až na 198 %, což mohlo být způsobeno rozsáhlejší isomerací vyvolanou vysokým tlakem a teplotami (Shen et al. 2015).

U esterovaných xanthofylů byla v důsledku vaření pozorována podobná míra degradace jako u volných karotenoidů (pokles na 58 %), což bylo zjištěno i v ostatních experimentech, které vedly k ještě rozsáhlejší degradaci karotenoidních esterů (pečením došlo k poklesu

na 28 %, extruzí na 22 % a pufováním na 30 % p.h.). Uvedené výsledky tak nenasvědčují vyšší odolnosti esterovaných karotenoidů vůči vysokým teplotám při zpracování, jak uvádějí některé předchozí studie (Ahmad et al. 2013; Mattera et al. 2017).

Homogenizované vzorky vařených pšeničných zrn byly podrobeny simulovanému třístupňovému procesu trávení, aby bylo možné stanovit stabilitu karotenoidů během trávení, vyjádřenou procentuálním poklesem vzhledem k obsahu ve vařeném zrně a také celkovou stabilitu, určenou podílem karotenoidů zachovaných po celém procesu zpracování zrna, včetně vaření i trávení. Trávením došlo k průměrnému úbytku karotenoidů o 12 %, což vedlo k zachování téměř 61 % p.h. TCC. Podobnou stabilitu karotenoidů v průběhu trávení různých potravinových matric (pokles do 10 %) zaznamenali Rodrigues et al. (2017). Vyšší ztráty v důsledku trávení obilné matrice (23–62 %) pozorovali Kean et al. (2011), nicméně v souladu s našimi poznatky považují karotenoidy za relativně stabilní během trávicího procesu, což je velmi zajímavé vzhledem k jejich uváděné nízké odolnosti vůči působení kyselin (Kopec et al. 2017). Zatímco u většiny isomerů luteinu byl pozorován v důsledku trávení určitý pokles (o 2–13 %), obsah 9'-*cis*-luteinu vzrostl téměř o 60 %, což lze na základě vyšší využitelnosti *cis*-oproti *trans*-isomerům v organismu (Honda et al. 2021) pokládat za příznivé zjištění. Esterované karotenoidy vykazovaly v průběhu trávení vysokou stabilitu s průměrným poklesem o pouhých 5 %, ale v důsledku značného úbytku způsobeného vařením bylo nakonec zachováno pouze 53 % p.h. Ve většině studií zabývajících se stanovením karotenoidů po simulovaném trávení *in vitro* byla v rámci přípravy vzorku prováděna alkalická hydrolýza, a proto jsou uváděny pouze výsledky volných karotenoidů a stanovením esterovaných forem po simulovaném trávicím procesu se zabýval jen omezený počet studií (Hempel et al. 2017; Xavier et al. 2014). Zohlednění esterovaných karotenoidů má nicméně značný význam, neboť molekulární struktura karotenoidů je rozhodujícím faktorem ovlivňujícím solubilizaci do micel, nezbytnou pro jejich využitelnost v organismu. V důsledku hydrolytického štěpení esterovaných karotenoidů trávicími enzymy dochází ke zvýšení polaritě molekul, čímž je výrazně usnadněna inkorporace do micel potřebná pro jejich vstřebávání (Breithaupt et al. 2002; Petry & Mercadante 2017; Rodrigues et al. 2016).



## 6. Závěr

Šlechtění netradičních genotypů pšenice a jejich využití v potravinářském průmyslu by mohlo představovat udržitelné řešení pro zajištění světové potravinové bezpečnosti, neboť pšenice je jednou z nejdůležitějších základních plodin, která výrazně přispívá k saturaci nutričních potřeb lidstva. Přidanou hodnotou těchto netradičních genotypů je zvýšený obsah biologicky aktivních látek v zrna, které mají díky svému antioxidačnímu působení zásadní význam v prevenci patogeneze řady lidských onemocnění.

V rámci disertační práce byla optimalizována a validována analytická HPLC-FLD metoda stanovení jednotlivých forem tokolů z obilné matrice, která byla využita pro analýzu těchto látek v různých genotypech pšenice. Obilky kontrolních červených odrůd a netradičních genotypů pšenice, se žlutým endospermem (Ye), modrým aleuronem (Ba) a purpurovým perikarpem (Pp) byly analyzovány také z hlediska obsahu a zastoupení karotenoidů a fenolických kyselin.

Z výsledků publikovaných studií je patrné, že v obilkách netradičních genotypů je oproti standardním červeným odrůdám významně vyšší obsah fenolických kyselin a karotenoidů (u Ye a některých Pp a Ba genotypů), nikoli však tokolů, jejichž hodnot u klasických odrůd ostatní barevné skupiny nedosahovaly. Větší množství fenolických kyselin zaznamenané u pšenic s Ba a Pp lze přičítat aktivitě fenylypropanoidové dráhy, ze které vychází i syntéza anthokyanových barviv, jejichž zvýšeným obsahem jsou tyto pšenice charakteristické. Vysokým obsahem karotenoidů se oproti standardním odrůdám vyznačovaly především pšenice s Ye a také někteří zástupci pšenic s Pp, zejména Konini. Odrůda Konini byla zajímavá i z pohledu zastoupení tokolů, neboť měla ze všech analyzovaných genotypů nejvyšší obsah  $\alpha$ -tokoferolu, který se vyznačuje nejvyšší biologickou aktivitou ze všech forem tokolů.

Za účelem nalezení optimální metody technologického zpracování pšeničného zrna z hlediska zachování co možná nejvyššího obsahu karotenoidů a tokolů byly vyhodnoceny změny v obsahu těchto látek v průběhu extruze, pufování, přípravy nekynutého pečiva a vaření s následným simulovaným trávicím procesem *in vitro*. Při porovnání kritických kroků výroby nekynutého pečiva došlo během pečení k podstatně nižším ztrátám karotenoidů a tokolů než při hnětení těsta. Ve fázi přípravy těsta, v níž jsou tyto sloučeniny degradovány především přímou oxidací a působením oxidačních enzymů, byl prokázán značný protektivní účinek tokolů ve vztahu ke karotenoidům. Čím vyšší byl počáteční obsah tokolů v mouce, tím vyšší procento karotenoidů bylo na konci fáze hnětení těsta zachováno. Z výsledků je patrné, že tokoly vykazovaly oproti karotenoidům větší stabilitu nejen v průběhu přípravy těsta, ale také při působení vysokých teplot během pečení.

Z pohledu využití nutričního potenciálu zrna netradičních genotypů pšenice je nejvhodnější metodou technologického zpracování vaření, které vedlo k zachování podstatně vyššího podílu celkového obsahu karotenoidů (73 %) ve srovnání s pečením (26 %), extruzí (26 %) a pufováním (32 %). Pozitivní je také zjištění, že ve vařených zrnech podrobených simulovanému trávicímu procesu zůstalo zachováno více než 60 % původního obsahu karotenoidů, které mohou být v organismu dále využity nebo mohou působit antioxidačně přímo v trávicím traktu.

Přestože by vařená pšeničná zrna mohla představovat zajímavou alternativu přílohových potravin, není jejich využití ve spotřebitelské praxi zatím příliš rozšířené. Výsledky disertační práce detailně popisující rozsáhlou variabilitu obsahu fenolických kyselin, karotenoidů a tokolů napříč souborem zkoumaných pšenic dávají možnost dále selektovat vhodné donory a v konečném důsledku vyšlechtit nové genotypy s jedinečným zdravotně prospěšným složením zrna, které by byly odolné vůči faktorům působícím v různých více využívaných zpracovatelských technologiích. Z hlediska maximálního využití nutričního potenciálu netradičních genotypů pšenice by bylo vhodné navrhnout hygienicky a ekonomicky přijatelná technologická opatření ke snížení aktivity oxidačních enzymů již od počátku výrobního procesu nebo vybrat genotypy se zvýšeným obsahem karotenoidů i tokolů či přirozeně nižší aktivitou oxidačních enzymů v zrně. Za tímto účelem je nezbytné pokračovat ve šlechtitelském úsilí, které by kromě zlepšení kvalitativních parametrů zrna mělo být zaměřeno na zvýšení odolnosti rostlin vůči stresu a chorobám a s tím související posílení výnosového potenciálu, neboť tyto agronomické parametry mohou komerční využití nutričně perspektivních netradičních genotypů pšenice v potravinářském průmyslu značně limitovat.

#### Shrnutí cílů a hypotéz:

- Cíl 1.** Stanovit zastoupení a obsah nutričně významných látek ze skupiny karotenoidů, tokochromanolů aj., v zrně širokého spektra nově vyšlechtěných genotypů pšenice.  
Splněno: Paznocht et al. (2020); Paznocht et al. (2021); Burešová et al. (2021); Burešová et al. (2023).
- Cíl 2.** Stanovit změny v obsahu karotenoidů a tokochromanolů vlivem různých technologií potravinářského zpracování a během jejich jednotlivých kroků.  
Splněno: Paznocht et al. (2021); Burešová et al. (2021); Burešová et al. (2023).
- Cíl 3.** Z běžných metod technologického zpracování pšeničného zrna vybrat optimální z hlediska zachování co možná nejvyššího obsahu karotenoidů a tokochromanolů.

Splněno: Paznocht et al. (2021); Burešová et al. (2021); Burešová et al. (2023).

**Hypotéza 1.** Zrno barevných genotypů pšenice obsahuje více nutričně významných látek (karotenoidů, tokochromanolů aj.) ve srovnání s odrůdami tradičně pěstovanými.

Hypotéza byla potvrzena pro fenolické kyseliny u všech barevných skupin (Paznocht et al. 2020) a pro karotenoidy u pšenic s Ye a některých genotypů s Pp a Ba (Paznocht et al. 2021; Burešová et al. 2021; Burešová et al. 2023). Hypotéza byla zamítnuta pro tokochromanoly (Burešová et al. 2021).

**Hypotéza 2.** Tokochromanoly se oproti karotenoidům vyznačují relativně vyšší stabilitou v průběhu technologického zpracování pšeničných zrn.

Hypotéza byla potvrzena (Burešová et al. 2021).

**Hypotéza 3.** Technologické procesy zpracování pšeničného zrna mají negativní vliv na obsah karotenoidů a tokochromanolů ve výsledných produktech.

Hypotéza byla potvrzena (Paznocht et al. 2021; Burešová et al. 2021; Burešová et al. 2023).

**Hypotéza 4.** Vaření je z běžných metod zpracování pšeničného zrna nejšetrnější k obsaženým karotenoidům a tokochromanolům.

Hypotéza byla potvrzena (Paznocht et al. 2021; Burešová et al. 2021; Burešová et al. 2023).

## 7. Seznam literatury

- Ahmad FT, Asenstorfer RE, Soriano IR, Mares DJ. 2013. Effect of temperature on lutein esterification and lutein stability in wheat grain. *Journal of Cereal Science* **58**:408-413.
- Ali N, Rahman IU, Badakshi F, Tariq MJ, Mujeeb-Kazi A. 2020. Ensuring sustainable food security: exploiting alien genetic diversity in wheat breeding for adaptation to emerging stresses. Pages 31-42 in Ozturk M, Gul A, editors. *Climate Change and Food Security with Emphasis on Wheat*. Academic Press, London.
- Apak R, Özyürek M, Güçlü K, Çapanoğlu E. 2016. Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **64**:997-1027.
- Arai H, Kono N. 2021.  $\alpha$ -Tocopherol transfer protein ( $\alpha$ -TTP). *Free Radical Biology and Medicine* **176**:162-175.
- Ashour M, Wink M, Gershenzon J. 2010. Biochemistry of terpenoids: monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes. Pages 258-303 in Wink M, editor. *Annual plant reviews volume 40: biochemistry of plant secondary metabolism*. John Wiley & Sons, Oxford.
- Atkinson J, Epanand RF, Epanand RM. 2008. Tocopherols and tocotrienols in membranes: a critical review. *Free Radical Biology and Medicine* **44**:739-764.
- Azzi A. 2018. Many tocopherols, one vitamin E. *Molecular Aspects of Medicine* **61**:92-103.
- Baranski R, Cazzonelli CI. 2016. Carotenoid biosynthesis and regulation in plants. Pages 159-189 in Kaczor A, Baranska M, editors. *Carotenoids: nutrition, analysis and technology*. John Wiley & Sons, Oxford.
- Blaner WS. 2020. Vitamin A and provitamin A carotenoids. Pages 73-91 in Marriott BP, Birt DF, Stallings VA, Yates AA, editors. *Present Knowledge in Nutrition*. Academic Press, London.
- Blankenship RE. 2021. *Molecular mechanisms of photosynthesis*. John Wiley & Sons, Hoboken.
- Bohn T, Bonet ML, Borel P, Keijer J, Landrier JF, Milisav I, Ribot J, Riso P, Winklhofer-Roob B, Sharoni Y, Corte-Real J, van Helden Y, Loizzo MR, Poljšak B, Porrini M, Roob J, Trebše P, Tundis R, Wawrzyniak A, Rühl R, Dulińska-Litewka J. 2021. Mechanistic aspects of carotenoid health benefits—where are we now?. *Nutrition Research Reviews* **34**:276-302.

- Bohn T, McDougall GJ, Alegría A, Alminger M, Arrigoni E, Aura AM, Brito C, Cilla A, El SN, Karakaya S, Martínez-Cuesta MC, Santos CN. 2015. Mind the gap—deficits in our knowledge of aspects impacting the bioavailability of phytochemicals and their metabolites—a position paper focusing on carotenoids and polyphenols. *Molecular Nutrition & Food Research* **59**:1307-1323.
- Bramley PM, Elmadfa I, Kafatos A, Kelly FJ, Manios Y, Roxborough H, Schuch W, Sheehy PJA, Wagner KH. 2000. Vitamin E: A critical review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**:913-938.
- 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.
- Breithaupt DE, Bamedi A, Wirt U. 2002. Carotenol fatty acid esters: easy substrates for digestive enzymes?. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **132**:721-728.
- Burešová B, Paznocht L, Jarošová V, Doskočil I, Martinek P. 2023. The Effect of Boiling and in Vitro Digestion on the Carotenoid Content of Colored-grain Wheat. *Journal of Food Composition and Analysis* 115 (105002) DOI: 10.1016/j.jfca.2022.105002.
- Burešová B, Paznocht L, Kotíková Z, Giampaglia B, Martinek P, Lachman J. 2021. Changes in carotenoids and tocopherols of colored-grain wheat during unleavened bread preparation. *Journal of Food Composition and Analysis* 103 (104108) DOI: 10.1016/j.jfca.2021.104108.
- Capouchová I, Burešová B, Paznocht L, Eliášová M, Pazderů K, Konvalina 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.
- Collini E. 2019. Carotenoids in photosynthesis: the revenge of the “accessory” pigments. *Chem* **5**:494-495.
- Combs GF, McClung JP. 2017. *The Vitamins. Fundamental Aspects in Nutrition and Health.* Academic Press, London.
- Dehghan-Shoar Z, Hardacre AK, Brennan CS. 2010. The physico-chemical characteristics of extruded snacks enriched with tomato lycopene. *Food Chemistry* **123**:1117–1122.
- DellaPenna D, Pogson BJ. 2006. Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annual Review of Plant Biology* **57**:711-738.

- Dong T, Park Y, Hwang I. 2015. Abscisic acid: biosynthesis, inactivation, homeostasis and signalling. *Essays in Biochemistry* **58**:29-48.
- Dvořáková M, Vaněk T. 2015. Strigolaktony–struktura a funkce v rostlinách. *Chemické listy* **109**:762-769.
- Eisenreich W, Bacher A, Arigoni D, Rohdich F. 2004. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **61**:1401-1426.
- 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.
- Evans HM, Bishop KS. 1922. On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science* **56**:650-651.
- Eyoum A, Celhay F, Neron S, El Amrani F, Poiffait A, Potus J, Beret JL, Nicolas, J. 2003. Biochemical factors of importance in the oxygen consumption of unyeasted wheat flours during dough mixing. Pages 303-309 in Courtin CM, Veraverbeke WS, Delcour JA, editors. *Recent Advances in Enzymes in Grain Processing*. Faculty of Agricultural and Applied Biological Sciences, Leuven.
- Falk J, Munné-Bosch S. 2010. Tocochromanol functions in plants: antioxidation and beyond. *Journal of Experimental Botany* **61**:1549-1566.
- Fardet A, Rock E, Rémésy C. 2008. Is the in vitro antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected in vivo?. *Journal of Cereal Science* **48**:258-276.
- Fernandez-Orozco R, Li L, Harflett C, Shewry PR, Ward JL. 2010. Effects of environment and genotype on phenolic acids in wheat in the HEALTHGRAIN diversity screen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**:9341-9352.
- Ficco DBM, De Simone V, De Leonardis AM, Giovanniello V, Del Nobile MA, Padalino L, Lecce L, Borelli GM, De Vita P. 2016. Use of purple durum wheat to produce naturally functional fresh and dry pasta. *Food Chemistry* **205**:187-195.
- Fox DT, Poulter CD. 2005. Synthesis and evaluation of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphoric acid analogues as alternate substrates for methylerythritol phosphate synthase. *The Journal of Organic Chemistry* **70**:1978-1985.
- Fратиanni A, Di Criscio T, Mignogna R, Panfili G. 2012. Carotenoids, tocopherols and retinols evolution during egg pasta–making processes. *Food Chemistry* **131**:590-595.

- Fritsche S, Wang X, Jung C. 2017. Recent advances in our understanding of tocopherol biosynthesis in plants: an overview of key genes, functions, and breeding of vitamin E improved crops. *Antioxidants* 6 (99) DOI: 10.3390/antiox6040099.
- Fu H, Xie B, Fan G, Ma S, Zhu X, Pan S. 2010. Effect of esterification with fatty acid of  $\beta$ -cryptoxanthin on its thermal stability and antioxidant activity by chemiluminescence method. *Food Chemistry* **122**:602-609.
- 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.
- Giordano D, Locatelli M, Travaglia F, Bordiga M, Reyneri A, Coisson JD, Blandino M. 2017. Bioactive compound and antioxidant activity distribution in roller-milled and pearled fractions of conventional and pigmented wheat varieties. *Food Chemistry* **233**:483-491.
- Grudzinski W, Nierzwicki L, Welc R, Reszczynska E, Luchowski R, Czub J, Gruszecki WI. 2017. Localization and orientation of xanthophylls in a lipid bilayer. *Scientific Reports* **7**:1-10.
- Gulcin İ. 2020. Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of Toxicology* **94**:651-715.
- Guo W, Beta T. 2013. Phenolic acid composition and antioxidant potential of insoluble and soluble dietary fibre extracts derived from select whole-grain cereals. *Food Research International* **51**:518-525.
- Guo H, Wu H, Sajid A, Li Z. 2022. Whole grain cereals: the potential roles of functional components in human health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **62**:8388-8402.
- Halliwell B. 1990. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Research Communications* **9**:1-32.
- Hempel J, Schädle CN, Sprenger J, Heller A, Carle R, Schweiggert RM. 2017. Ultrastructural deposition forms and bioaccessibility of carotenoids and carotenoid esters from goji berries (*Lycium barbarum* L.). *Food Chemistry* **218**:525-533.
- Hernández L, Afonso D, Rodríguez EM, Díaz C. 2011. Phenolic compounds in wheat grain cultivars. *Plant Foods for Human Nutrition* **66**:408-415.

- Hidalgo A, Brandolini A. 2010. Tocols stability during bread, water biscuit and pasta processing from wheat flours. *Journal of Cereal Science* **52**:254-259.
- Hidalgo A, Brandolini A, Pompei C. 2009. Kinetics of tocopherols degradation during the storage of einkorn (*Triticum monococcum* L. ssp. *monococcum*) and breadwheat (*Triticum aestivum* L. ssp. *aestivum*) flours. *Food Chemistry* **116**:821-827.
- Hidalgo A, Brandolini A, Pompei C. 2010. Carotenoids evolution during pasta, bread and water biscuit preparation from wheat flours. *Food Chemistry* **121**:746-751.
- Honda M, Takasu S, Nakagawa K, Tsuda T. 2021. Differences in bioavailability and tissue accumulation efficiency of (all-*E*)- and (Z)-carotenoids: A comparative study. *Food Chemistry* 361 (130119) DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.130119.
- Hussain A, Larsson H, Kuktaite R, Olsson ME, Johansson E. 2015. Carotenoid content in organically produced wheat: Relevance for human nutritional health on consumption. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **12**:14068-14083.
- Chang HY, Cheng TH, Wang AHJ. 2021. Structure, catalysis, and inhibition mechanism of prenyltransferase. *IUBMB Life* **73**:40-63.
- Jokioja J, Yang B, Linderborg KM. 2021. Acylated anthocyanins: A review on their bioavailability and effects on postprandial carbohydrate metabolism and inflammation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **20**:5570-5615.
- Kaur D, Sogi DS, Wani AA. 2015. Oxidative stability of soybean triacylglycerol using carotenoids and  $\gamma$ -tocopherol. *International Journal of Food Properties* **18**:2605-2613.
- Kean EG, Bordenave N, Ejeta G, Hamaker BR, Ferruzzi, MG. 2011. Carotenoid bioaccessibility from whole grain and decorticated yellow endosperm sorghum porridge. *Journal of Cereal Science* **54**:450-459.
- Khadangi F, Azzi A. 2019. Vitamin E—the next 100 years. *IUBMB Life* **71**:411-415.
- Kopec RE, Gleize B, Borel P, Desmarchelier C, Caris-Veyrat C. 2017. Are lutein, lycopene, and  $\beta$ -carotene lost through the digestive process?. *Food & Function* **8**:1494-1503.
- Kotíková Z, Šulc M, Lachman J, Pivec V, Orsák M, Hamouz K. 2016. Carotenoid profile and retention in yellow-, purple- and red-fleshed potatoes after thermal processing. *Food Chemistry* **197**:992-1001.



- Lachman J, Hejtmánková A, Orsák M, Popov M, Martinek P. 2018. Tocotrienols and tocopherols in colored-grain wheat, tritordeum and barley. *Food Chemistry* **240**:725-735.
- Lampi AM, Nurmi T, Piironen V. 2010. Effects of the environment and genotype on tocopherols and tocotrienols in wheat in the HEALTHGRAIN diversity screen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**:9306-9313.
- Lang K, Mosinger J, Wagnerová DM. 2005. Pokroky ve fotochemii singletového kyslíku. *Chemické listy* **99**:211-221.
- Latowski D, Grzyb J, Strzałka K. 2004. The xanthophyll cycle-molecular mechanism and physiological significance. *Acta Physiologiae Plantarum* **26**:197-212.
- Le Grandois J, Guffond D, Hamon E, Marchioni E, Werner D. 2017. Combined microplate-ABTS and HPLC-ABTS analysis of tomato and pepper extracts reveals synergetic and antagonist effects of their lipophilic antioxidative components. *Food Chemistry* **223**:62-71.
- Leenhardt F, Lyan B, Rock E, Boussard A, Potus J, Chanliaud E, Remesy C. 2006. Wheat lipoxygenase activity induces greater loss of carotenoids than vitamin E during breadmaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**:1710-1715.
- Li L, Shewry PR, Ward JL. 2008. Phenolic acids in wheat varieties in the HEALTHGRAIN diversity screen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**:9732-9739.
- Li L, Yuan H. 2013. Chromoplast biogenesis and carotenoid accumulation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **539**:102-109.
- Liu Q, Qiu 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.
- Liu R, Xu Y, Zhang T, Gong M, Liu R, Chang M, Wang X. 2022. Interactions between liposoluble antioxidants: A critical review. *Food Research International* 155 (111104) DOI: 10.1016/j.foodres.2022.111104.
- Lu S, Li L. 2008. Carotenoid metabolism: biosynthesis, regulation, and beyond. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**:778-785.
- Ma D, Li Y, Zhang J, Wang C, Qin H, Ding H, Xie Y, Guo T. 2016. Accumulation of phenolic compounds and expression profiles of phenolic acid biosynthesis-related genes in developing grains of white, purple, and red wheat. *Frontiers in Plant Science* 7 (528) DOI: 10.3389/fpls.2016.00528.

- Mahoney CW, Azzi A. 1988. Vitamin E inhibits protein kinase C activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **154**:694-697.
- Martinek P, Vyhnánek T. 2014. Ozimé obilniny: barevné zrno pšenice jako zdroj antioxidantů. *Úroda* **7**:68-70.
- Martinek P. 2021a. AF ZORA – první evropská odrůda pšenice s černým zrnem. *Obilnářské listy* **29**:82-84.
- Martinek P. 2021b. Odrůdy pšenice s barevným zrnem a jejich nutriční hodnota. *Úroda* **7**:78-80.
- Mattera MG, Hornero-Méndez D, Atienza SG. 2017. Lutein ester profile in wheat and tritordeum can be modulated by temperature: Evidences for regioselectivity and fatty acid preferential of enzymes encoded by genes on chromosomes 7D and 7Hch. *Food Chemistry* **219**:199-206.
- Meléndez-Martínez AJ, Mapelli-Brahm P, Hornero-Méndez D, Vicario IM. 2019. Structures, nomenclature and general chemistry of carotenoids and their esters. Pages 1-50 in Mercadante AZ, editor. *Carotenoid Esters in Foods: Physical, Chemical and Biological Properties*. The Royal Society of Chemistry, Croydon.
- Mène-Saffrané L, DellaPenna D. 2010. Biosynthesis, regulation and functions of tocochromanols in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**:301-309.
- Miziorko HM. 2011. Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **505**:131-143.
- Moise AR, Al-Babili S, Wurtzel ET. 2014. Mechanistic aspects of carotenoid biosynthesis. *Chemical Reviews* **114**:164-193.
- Muñoz P, Munné-Bosch S. 2019. Vitamin E in plants: biosynthesis, transport, and function. *Trends in Plant Science* **24**:1040-1051.
- Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennely PJ, Rodwell VW, Weil PA. 2012. *Harperova ilustrovaná biochemie*. Český Těšín. Galén.
- Ndolo VU, Beta T. 2013. Distribution of carotenoids in endosperm, germ, and aleurone fractions of cereal grain kernels. *Food Chemistry* **139**:663-671.
- Ndolo VU, Beta T. 2014. Comparative studies on composition and distribution of phenolic acids in cereal grain botanical fractions. *Cereal Chemistry* **91**:522-530.

- Ortiz D, Ponrajan A, Bonnet JP, Rocheford T, Ferruzzi MG. 2018. Carotenoid Stability during Dry Milling, Storage, and Extrusion Processing of Biofortified Maize Genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **66**:4683-4691.
- Padhy AK, Kaur P, Singh S, Kashyap L, Sharma A. 2022. Colored wheat and derived products: key to global nutritional security. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (2119366) DOI: 10.1080/10408398.2022.2119366.
- Paznocht L, Burešová B, Kotíková Z, Martinek P. 2021. Carotenoid content of extruded and puffed products made of colored-grain wheats. *Food Chemistry* 340 (127951) DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127951.
- Paznocht L, Kotíková Z, Burešová B, Lachman J, Martinek P. 2020. Phenolic acids in kernels of different coloured-grain wheat genotypes. *Plant, Soil and Environment* **66**:57-64.
- Paznocht L, Kotíková Z, Orsák M, Lachman J, Martinek P. 2019. Carotenoid changes of colored-grain wheat flours during bun-making. *Food Chemistry* **277**:725-734.
- Paznocht L, Kotíková Z, Šulc M, Lachman J, Orsák M, Eliášová M, Martinek P. 2018. Free and esterified carotenoids in pigmented wheat, tritordeum and barley grains. *Food Chemistry* **240**:670-678.
- Pérez-Gálvez A, Viera I, Roca M. 2020. Carotenoids and chlorophylls as antioxidants. *Antioxidants* 9 (505) DOI: 10.3390/antiox9060505.
- Petry FC, Mercadante AZ. 2017. Impact of in vitro digestion phases on the stability and bioaccessibility of carotenoids and their esters in mandarin pulps. *Food & Function* **8**:3951-3963.
- Pláteník J. 2009. Volné radikály, antioxidanty a stárnutí. *Interní medicína pro praxi* **11**:30-33.
- Reboul E. 2019. Mechanisms of carotenoid intestinal absorption: where do we stand?. *Nutrients* 11 (838) DOI: 10.3390/nu11040838.
- Riaz M, Zia-Ul-Haq M, Dou D. 2021. Chemistry of Carotenoids. Pages 43-76 in Zia-Ul-Haq M, Dewanjee S, Riaz M, editors. *Carotenoids: Structure and Function in the Human Body*. Springer, Cham.
- Rodrigues DB, Chitchumroonchokchai C, Mariutti LR, Mercadante AZ, Failla ML. 2017. Comparison of two static in vitro digestion methods for screening the bioaccessibility of carotenoids in fruits, vegetables, and animal products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **65**:11220-11228.

- Rodrigues DB, Mariutti LRB, Mercadante AZ. 2016. An *in vitro* digestion method adapted for carotenoids and carotenoid esters: Moving forward towards standardization. *Food & Function* **7**:4992-5001.
- Sandmann G. 2009. Evolution of carotene desaturation: the complication of a simple pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **483**:169-174.
- Sathasivam R, Radhakrishnan R, Kim JK, Park SU. 2021. An update on biosynthesis and regulation of carotenoids in plants. *South African Journal of Botany* **140**:290-302.
- Shao Y, Bao J. 2015. Polyphenols in whole rice grain: Genetic diversity and health benefits. *Food Chemistry* **180**:86-97.
- Shen R, Yang S, Zhao G, Shen Q, Diao X. 2015. Identification of carotenoids in foxtail millet (*Setaria italica*) and the effects of cooking methods on carotenoid content. *Journal of Cereal Science* **61**:86-93.
- Shibasaki-Kitakawa N, Kato H, Takahashi A, Yonemoto T. 2004. Oxidation kinetics of  $\beta$ -carotene in oleic acid solvent with addition of an antioxidant,  $\alpha$ -tocopherol. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **81**:389-394.
- Schaub P, Wüst F, Koschmieder J, Yu Q, Virk P, Tohme J, Beyer P. 2017. Nonenzymatic  $\beta$ -carotene degradation in provitamin A-biofortified crop plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **65**:6588-6598.
- Schmölz L, Birringer M, Lorkowski S, Wallert M. 2016. Complexity of vitamin E metabolism. *World Journal of Biological Chemistry* **7**:14-43.
- Schroeder MT, Becker EM, Skibsted LH. 2006. Molecular mechanism of antioxidant synergism of tocotrienols and carotenoids in palm oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**:3445-3453.
- Smolikova GN, Medvedev SS. 2015. Seed carotenoids: synthesis, diversity, and functions. *Russian Journal of Plant Physiology* **62**:1-13.
- Stange C, Flores C. 2012. Carotenoids and photosynthesis-regulation of carotenoid biosynthesis by photoreceptors. Pages 77-96 in Najafpour MM, editor. *Advances in Photosynthesis: Fundamental Aspects*. InTech, Rijekia.
- Statista. 2023. Global per capita food use of wheat from 2000 to 2031. Available from <https://www.statista.com/statistics/237890/global-wheat-per-capita-food-use-since-2000/> (accessed January 2023).

- Styrczewska M, Kulma A, Kostyn K, Hasiewicz-Derkacz K, Szopa J. 2013. Flax terpenoid pathway as a source of health promoting compounds. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **13**:353-364.
- Sun T, Tadmor Y, Li L. 2020. Pathways for carotenoid biosynthesis, degradation, and storage. Pages 3-23 in Rodríguez-Concepción M, Welsch R, editors. *Plant and Food Carotenoids*. Humana, New York.
- Sure B. 1924. Dietary requirements for reproduction: II. The existence of a specific vitamin for reproduction. *Journal of Biological Chemistry* **58**:693-709.
- Sussmann RA, Angeli CB, Peres VJ, Kimura EA, Katzin AM. 2011. Intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum* biosynthesize vitamin E. *FEBS Letters* **585**:3985-3991.
- Szewczyk K, Chojnacka A, Górnicka M. 2021. Tocopherols and tocotrienols—bioactive dietary compounds; what is certain, what is doubt?. *International Journal of Molecular Sciences* **22** (6222) DOI: 10.3390/ijms22126222.
- Tiwari U, Cummins E. 2009. Nutritional importance and effect of processing on tocopherols in cereals. *Trends in Food Science & Technology* **20**:511-520.
- Toews DP, Hofmeister NR, Taylor SA. 2017. The evolution and genetics of carotenoid processing in animals. *Trends in Genetics* **33**:171-182.
- Umbreen H, Javid M, Riaz M. 2021. Metabolism of Carotenoids. Pages 421-446 in Zia-Ul-Haq M, Dewanjee S, Riaz M, editors. *Carotenoids: Structure and Function in the Human Body*. Springer, Cham.
- Venske E, Dos Santos RS, Busanello C, Gustafson P, Costa de Oliveira A. 2019. Bread wheat: a role model for plant domestication and breeding. *Hereditas* **156**:1-11.
- Vogt T. 2010. Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant* **3**:2-20.
- von Lintig J. 2012. Provitamin A metabolism and functions in mammalian biology. *The American Journal of Clinical Nutrition* **96**:1234-1244.
- Wang C, Sun Y, Jiang D, Wang C, Liu S. 2021. Risk-Attributable Burden of Ischemic Heart Disease in 137 Low-and Middle-Income Countries From 2000 to 2019. *Journal of the American Heart Association* **10** (e021024) DOI:10.1161/JAHA.121.021024.
- Waramboi JG, Gidley MJ, Sopade MA. 2013. Carotenoid contents of extruded and non-extruded sweetpotato flours from Papua New Guinea and Australia. *Food Chemistry* **141**:1740-1746.

- Wrona M, Korytowski W, Rózanowska M, Sarna T, Truscott TG. 2003. Cooperation of antioxidants in protection against photosensitized oxidation. *Free Radical Biology and Medicine* **35**:1319-1329.
- Xavier AAO, Mercadante AZ, Garrido-Fernandez J, Perez-Galvez A. 2014. Fat content affects bioaccessibility and efficiency of enzymatic hydrolysis of lutein esters added to milk and yogurt. *Food Research International* **65**:171-176.
- 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.
- Yonekura L, Nagao A. 2007. Intestinal absorption of dietary carotenoids. *Molecular Nutrition & Food Research* **51**:107-115.
- Zhang B, Deng Z, Tang Y, Chen P, Liu R, Ramdath DD, Liu Q, Hernandez M & Tsao, R. 2014. Fatty acid, carotenoid and tocopherol compositions of 20 Canadian lentil cultivars and synergistic contribution to antioxidant activities. *Food Chemistry* **161**:296-304.
- Zhang B, Zhao Q, Guo W, Bao W, Wang X. 2018. Association of whole grain intake with all-cause, cardiovascular, and cancer mortality: a systematic review and dose–response meta-analysis from prospective cohort studies. *European Journal of Clinical Nutrition* **72**:57-65.
- Zia-Ul-Haq M. 2021. Historical and introductory aspects of carotenoids. Pages 1-42 in Zia-Ul-Haq M, Dewanjee S, Riaz M, editors. *Carotenoids: Structure and Function in the Human Body*. Springer, Cham.
- Ziegler JU, Schweiggert RM, Würschum T, Longin CFH, Carle R. 2016. Lipophilic antioxidants in wheat (*Triticum* spp.): a target for breeding new varieties for future functional cereal products. *Journal of Functional Foods* **20**:594-605.
- Ziegler JU, Wahl S, Würschum T, Longin CFH, Carle R, Schweiggert RM. 2015. Lutein and lutein esters in whole grain flours made from 75 genotypes of 5 *Triticum* species grown at multiple sites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **63**:5061-5071.
- Zrecková M, Capouchová I, Eliášová M, Paznocht L, Pazderů K, Dvořák P, Konvalina P, Orsák M, Štěřba 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.

Zuchowski J, Jonczyk K, Pecio L, Oleszek W. 2011. Phenolic acid concentrations in organically and conventionally cultivated spring and winter wheat. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **91**:1089-1095.

Zulfiqar S, Sharif S, Saeed M, Tahir A. 2021. Role of carotenoids in photosynthesis. Pages 147-187 in Zia-Ul-Haq M, Dewanjee S, Riaz M, editors. *Carotenoids: Structure and Function in the Human Body*. Springer, Cham.

## 8. Seznam zkratek

ABA	abscisová kyselina
Ac-CoA	acetyl-koenzym A
ATP	adenosintrifosfát
AVED	ataxie s izolovaným nedostatkem vitamínu E
Ba	modrý aleuron
BCO1	$\beta$ , $\beta$ -karoten 15, 15'-oxygenasa
CAR	molekula karotenoidu v základním singletovém stavu
<sup>3</sup> CAR*	molekula karotenoidu v tripletovém stavu
[Car] <sup>+</sup>	radikálový kationt karotenoidu
[Car-RX] <sup>•</sup>	karotenoid-radikálový addukt
CCDs	karotenoid štěpící dioxygenasy
CDP-ME	4-difosfocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol
CDP-MEP	4-difosfocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol-2-fosfát
cMEPP	2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyklodifosfát
CRTISO	karotenoid isomerasa
CTP	cytidintrifosfát
DMAPP	dimethylallyldifosfát
DMGGBQ	2,3-dimethyl-6-geranylgeranyl-1,4-benzochinon
DMPBQ	2,3-dimethyl-6-fytyl-1,4-benzochinon
DXP	1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfát
FDP	farnesyldifosfát
FSI	fotosystém I
FSII	fotosystém II
GDP	geranyldifosfát
GGDP	geranylgeranyldifosfát
HDL	lipoprotein o vysoké hustotě
HDMBPP	1-hydroxy-2-methyl-2-( <i>E</i> )-butenyl-4-difosfát
HGA	homogentisová kyselina
HGGT	homogentisát geranylgeranyltransferasa
HMG-CoA	3-hydroxy-methylglutaryl koenzym A
HPP	<i>p</i> -hydroxyfenylpyruvát
HPT	homogentisát prenyltransferasa
HYDB	$\beta$ -karoten hydroxylasa



HYDE	$\epsilon$ -karoten hydroxylasa
CHL	molekula chlorofylu v základním singletovém stavu
<sup>3</sup> CHL	molekula chlorofylu v tripletovém stavu
IPP	isopentenylidifosfát
LCY	lykopen cyklasa
LCYB	lykopen $\beta$ -cyklasa
LCYE	lykopen $\epsilon$ -cyklasa
LDL	lipoprotein o nízké hustotě
LHCI	světlosběrný komplex I
LHCII	světlosběrný komplex II
MEP	2-C-methyl-D-erythritol-4-fosfát
MEP dráha	methylethritol fosfátová dráha
MGGBQ	2-methyl-6-geranylgeranylplastochoinol
MPBQ	2-methyl-6-fytylplastochoinol
MVA	mevalonová kyselina
MVA dráha	mevalonátová dráha
MVAP	mevalonát-5-fosfát
MVAPP	5-difosfomevalonát
NADP <sup>+</sup>	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NADPH	redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát
NSY	neoxanthin synthasa
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	singletový kyslík
<sup>2</sup> O <sub>3</sub>	tripletový kyslík
PDP	fytyldifosfát
PDS	fytoen desaturasa
PLTP	fosfolipidový transportní protein
Pp	purpurový perikap
PSY	fytoen synthasa
RDH	retinol dehydrogenasa
Red	standardní odrůdy pšenice s červenou barvou zrna
ROS	reaktivní formy kyslíku
SR-BI	transmembránový glykoprotein „scavenger receptor class B type I“
TAP	proteinový přenašeč „tocopherol associated protein“
TBP	proteinový přenašeč „tocopherol binding protein“
TCC	celkový obsah karotenoidů

TPA	celkový obsah fenolických kyselin
TTC	celkový obsah tokolů
$\alpha$ -TTP	$\alpha$ -tokoferol transportní protein
$\alpha$ -T	$\alpha$ -tokoferol
$\beta$ -T3	$\beta$ -tokotrienol
VDE	violaxanthin deepoxidasa
VLDL	lipoprotein o velmi nízké hustotě
Ye	žlutý endosperm
ZDS	$\zeta$ -karoten desaturasa
ZEP	zeaxanthin epoxidasa
Z-ISO	$\zeta$ -karoten isomerasa