

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Fakulta zemědělská a technologická

AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE

ING. MARKÉTA JAROŠOVÁ

ČESKÉ BUDĚJOVICE

2024

Autoreferát disertační práce

Doktorand: Ing. Markéta Jarošová
Studijní program: Fytotechnika
Studijní obor: Speciální produkce rostlinná
Název práce: Charakterizace bílkovin, rozpustných slizů a fenolových látek získaných ze semen olejného lnu (*Linum usitatissimum* L.)

Školitel: doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.

Oponenti: Ing. Václav Dvořáček, Ph.D.
VÚRV, Praha

Ing. Prokop Šmirous, Ph.D.
AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o, Šumperk

doc. Ing. Miroslav Jůzl, Ph.D.
AF MENDELU, Brno

Obhajoba disertační práce se koná dne 19.06.2024 v hodin v zasedací a seminární místnosti ZR 01 053, 1. patro, FZT JU v Českých Budějovicích

S disertační prací se lze seznámit na studijním oddělení Fakulty zemědělské a technologické v Českých Budějovicích.

doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.
předseda oborové rady
FZT JU v Českých Budějovicích

SEZNAM IMPAKTOVANÝCH PUBLIKACÍ

- Jarošová, M.**, Roudnický, P., Bárta, J., Zdráhal, Z., Bártová, V., Stupková, A., Lorenc, F., Bjelková, M., Kyselka, J., Jarošová, E., Bedrníček, J., Bohatá, A. (2024). Proteomic Profile of Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) Products as Influenced by Protein Concentration Method and Cultivar. *Foods*, 13(9): 1288.
- Jarošová, M.**, Lorenc, F., Bedrníček, J., Petrášková, E., Bjelková, M., Bártová, V., Jarošová E., Zdráhal, Z., Kyselka, J., Smetana, P., Kadlec, J., Stupková, A. & Bárta, J. (2024). Comparison of Yield Characteristics, Chemical Composition, Lignans Content and Antioxidant Potential of Experimentally Grown Six Linseed (*Linum usitatissimum* L.) Cultivars. *Plant Foods for Human Nutrition*, 79: 159–165.
- Lorenc, F., **Jarošová, M.**, Bedrníček, J., Smetana, P., Bárta, J. (2024). Recent trends in food and dietary applications of flaxseed mucilage: a mini review. *International Journal of Food Science & Technology*, 59(4): 2111-2121.
- Bárta, J., Roudnický, P., **Jarošová, M.**, Zdráhal, Z., Stupková, A., Bártová, V., Krejčová, Z., Kyselka J., Filip V., Říha V., Lorenc F., Bedrníček J., Smetana P. (2024). Proteomic Profiles of Whole Seeds, Hulls, and Dehulled Seeds of Two Industrial Hemp (*Cannabis sativa* L.) Cultivars. *Plants*, 13(1): 111.
- Bedrníček, J., Lorenc, F., **Jarošová, M.**, Bártová, V., Smetana, P., Kadlec, J., Jirotková, D., Kyselka, J., Petrášková, E., Bjelková, M., Konvalina, P., Hoang, T.N., Bárta, J. (2022). Milk Thistle Oilseed Cake Flour Fractions: A Source of Silymarin and Macronutrients for Gluten-Free Bread. *Antioxidants*, 11(10): 2022.
- Dragoun, M., Klausová, K., Šimicová, P., Honzíkova, T., Stejskal, J, Navrátilová, K., Hajšlová, J., Bárta, J., Bártová, V., **Jarošová, M.**, Bjelková, M., Filip, V., Kyselka, J. (2022). Formation of Previously Undescribed Δ^7 -Phytosterol Oxidation Products and Tocopherylquinone Adducts in Pumpkin Seed Oil during Roasting, Screw-Pressing, and Simulated Culinary Processing at Elevated Temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(37): 11689-11703.
- Lorenc, F., **Jarošová, M.**, Bedrníček, J., Smetana, P., Bárta, J. (2022). Structural Characterization and Functional Properties of Flaxseed Hydrocolloids and Their Application. *Foods*, 11(15): 2304.
- Bárta, J., Bártová, V., **Jarošová, M.**, Švajner, J., Smetana, P., Kadlec, J., Filip, V., Kyselka, J., Berčíková, M., Zdráhal, Z., Bjelková, M., Kozak, M. (2021). Oilseed Cake Flour Composition, Functional Properties and Antioxidant Potential as Effects of Sieving and Species Differences. *Foods*, 10(11): 2766.
- Bárta, J., Bártová, V., **Jarošová, M.**, Švajner, J. (2021). Proteins of Oilseed Cakes, Their Isolation and Usage Possibilities. *Chemické Listy*, 115(9): 472-480.
- Bedrníček, J., Paulíčková, I., Lorenc, F., De Moraes, P.P., **Jarošová, M.**, Samková, E., Vrchotová, N., Kadlec, J., Smetana, P. (2021). The Use of a Thermal Process to Produce

Black Garlic: Differences in the Physicochemical and Sensory Characteristics Using Seven Varieties of Fresh Garlic. *Foods*, 10(11): 2703.

Bárta, J., Bártová, V., Šindelková, T., **Jarošová, M.**, Linhartová, Z., Mráz, J., Bedrníček, J., Smetana, P., Samková, E., Paulíčková, I. (2020). Effect of Boiling on Colour, Contents of Betalains and Total Phenolics and on Antioxidant Activity of Colourful Powder Derived from Six Different Beetroot (*Beta vulgaris* L. var. *conditiva*) Cultivars. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 70(4): 377-385.

Bártová, V., Bárta, J., **Jarošová, M.** (2019). Antifungal and antimicrobial proteins and peptides of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103: 5533-5547.

PRÁCE VZNIKLA ZA PODPORY NÁSLEDUJÍCÍCH PROJEKTŮ

- **NAZV QK1910302** (Ministerstvo zemědělství České republiky): Zpracování vedlejších produktů z lisování semen olejnin na nové výrobky s nutričními a zdravotními přínosy
- **GA JU 033/2018/Z** (Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích): Možnosti izolace slizotvorných látek a proteinů z lněného semene (*Linum usitatissimum* L.) a studium jejich vlastností a biologických aktivit
- **GA JU 080/2022/Z** (Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích): Hodnocení zemědělských a potravinářských surovin z pohledu genetické diverzity a obsahu biologicky aktivních látek a stopových prvků
- **GA JU 027/2019/Z** (Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích): Nové přístupy a techniky ve šlechtění, rostlinolékařství a hodnocení kvality rostlinných produktů

SOUHRN

Len setý (*Linum usitatissimum* L.) se řadí mezi nejstarší domestikované plodiny. Jeho pěstování za účelem získávání vláken, oleje či pro lékařské účely bylo rozšířeno již v období starověku. Kromě, dnes již minoritní, produkce vláken využívaných v textilním průmyslu, a současně převažující pěstování pro produkci vysoce kvalitního oleje, se semena lnu v současné době uplatňují, jako funkční potravina spojená s širokými možnostmi aplikací v různých oblastech potravinářství a výživy. Lněná semena obsahují biologicky aktivní komponenty v podobě polynenasycených mastných kyselin tvořící hlavní podíl lněného oleje, dále pak vysoce kvalitní bílkoviny a peptidy, lignany a dietární vlákninu ve formě rozpustných polysacharidů tvořící sliz a nerozpustné lignocelulosity.

Tato disertační práce předkládá výsledky zaměřené na charakterizaci tří významných komponentů lněného semene – bílkovin, polysacharidů a lignanů. Tyto skupiny látek vykazují zajímavé funkční vlastnosti a biologické aktivity, jež mohou být využitelné v širokém spektru potravinářských aplikací nebo lékařství. Práce akcentuje význam a možnosti využití výlisků lněných semen, jež jsou významným zdrojem uvedených komponent. Kromě samotných výsledků je součástí této disertační práce také komplexní literární přehled o dřívějších a současných výzkumných pracích zaměřených na lněné bílkoviny, slizy a lignany. Poznatky získané v rámci této práce mohou být uplatnitelné zejména při novošlechtění olejného lnu, v potravinářském a zpracovatelském průmyslu. Nicméně, vzhledem k významným nutričním aspektům a biologickým aktivitám výše zmíněných složek lze získané poznatky využít rovněž v oblastech samotné výživy a lékařství. Obecně si tato práce klade za cíl rozšíření spektra znalostí dané problematiky a otevřít prostor pro další výzkum.

První část výsledků této disertační práce představují dvě komplexní přehledové publikace. První publikace byla zaměřená na hydrokoloidy lněného semene v podobě lněného slizu představující 4-15 % obsahu lněného semene a bílkoviny tvořící 11-31 % jeho hmotnosti. V tomto přehledovém článku je detailně popsána struktura, metody extrakce, funkční a biologické vlastnosti a možnosti aplikace obou typů hydrokoloidů, zejména pro fortifikaci různých potravin a další potravinářské využití. Na tuto práci navazuje krátký přehledový článek shrnující současné trendy v potravinářských a dietárních aplikacích lněného slizu. První publikace popisuje spíše tradiční využití lněného slizu ve formě obohacování potravin za účelem zvýšení technologické, nutriční či senzorické jakosti potravin, případně poskytnutí zdravotního benefitu. Druhá přehledová publikace se zaměřuje výhradně na možnosti využití lněného slizu v soudobých a inovativních oblastech potravinářského průmyslu a výživy. Lněný sliz lze v rámci moderních aplikací využít například při tvorbě filmů pro ochranu potravin, jako strukturní komponent v oleogelech, kryogelech nebo aerogelech a rovněž také pro modifikaci funkčních vlastností bílkovin v rámci společných komplexů. V rámci výživy je možné uplatnit lněný sliz pro enkapsulaci probiotik nebo biologicky aktivních látek. Lze jej také využít jako prebiotikum pro zvýšení podílu prospěšných probiotických mikroorganismů. Obě přehledové práce v důsledku zdůrazňují významný potenciál bílkovin a slizů lněného semene pro současné i budoucí aplikace různých směrů.

Druhá část této práce představuje provoautorská publikace zaměřená na výzkum vlivu odrůdy a pěstitelských podmínek na výnosové parametry, chemické složení, obsah lignanů a

antioxidační potenciál lněných semen. V rámci této studie byly porovnány uvedené parametry u čtyř českých a dvou nizozemských odrůd lnu setého olejného. Pomocí původně vyvinuté metody kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) byla zjištěna nativní přítomnost secoisolariciresinol diglukosidu a matairesinolu. Jejich obsah pak pozitivně koreloval s celkovým obsahem polyfenolů a antioxidační aktivitou. Meziročně byl zjištěn negativní vliv nedostatku srážek v klíčovém období května a června na výnos semen a obsah secoisolariciresinol diglukosidu, naopak nebyl negativně ovlivněn obsah dusíkatých látek. Nicméně, obsah dusíkatých negativně koreloval s obsahem tuku. Celkově byl tedy pozorován významný vliv odrůdy a ročníku na většinu sledovaných parametrů. Tato zjištění mohou být reflektována jak při vývoji nových odrůd, tak při optimalizaci pěstitelských podmínek lnu setého olejného.

Třetí část práce předkládá dvě recenzované publikace popisující vybrané vlastnosti slizotvorných polysacharidů lněných semen získaných z vybraných odrůd předešlého polního experimentu. V rámci první studie byla stanovena výtěžnost, obsah polyfenolů a antioxidační aktivity získaných slizotvorných frakcí. Nejvyšší výtěžnost byla zaznamenána u odrůdy Agram, nejvyšší antioxidační aktivita a obsah polyfenolů pak u odrůdy Agriol. Byla rovněž zjištěna významná pozitivní korelace obsahu polyfenolů s antioxidační aktivitou. Druhá publikace této části byla zaměřena na studium vybraných funkčních vlastností slizotvorných polysacharidů v podobě rozpustnosti, bobtnavosti, emulgační aktivity a schopnost stabilizovat emulze. Bylo zjištěno, že získané slizy všech odrůd vykazovaly schopnost tvořit stabilizované emulze ve vodě. Nejvyšší emulgační aktivita byla prokázána u odrůdy Raciol. Rozpustnost slizů ve vodě činila u všech odrůd více než 70 %. V případě schopností rozpustnosti a schopnosti stabilizovat emulze byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi odrůdami.

Tématem čtvrté části jsou bílkoviny lněného semene. Tato část předkládá výsledky týkající se charakterizace lněných bílkovin, zkoumá způsoby jejich izolace a zdůrazňuje možnosti jejich využití. První publikace této části představuje původní výzkumnou studii, jež byla zaměřena na charakterizaci proteomických profilů lněných semen vybraných odrůd lnu setého, a to jak celých semen, tak jejich produktů v podobě výlisků, jemné výliskové mouky a bílkovinného koncentrátu. V rámci práce bylo pomocí LC-MS/MS analýzy identifikováno 2560 proteinových skupin, přičemž dominantní skupinu představovaly 11S globuliny, jejichž obsah vzrostl vlivem alkalické solubilizace (extrakce) a isoelektrické precipitace z 41-44 % na hodnotu 72-82 %. Ostatní skupiny bílkovin byly zastoupeny minoritně s převahou skupiny albuminů následovných chitinasami, enzymy důležitými pro metabolismus rostliny, oleosiny a stresovými bílkoviny. Neidentifikované bílkoviny představovaly 26-31 % bílkovinného spektra výlisků a jemné výliskové mouky. Obsah uvedených skupin, mimo globuliny, byl v souhrnu nadpoloviční v případě výlisků a jemné výliskové mouky, přičemž v samotném koncentrátu pak tvořily v průměru méně než čtvrtinu bílkovinného spektra. Forma bílkovinného produktu měla na složení bílkovinného profilu významně vyšší vliv než samotná odrůda lnu. Druhá publikace v podobě komplexního literárního přehledu se zaměřuje na možnosti zpracování výlisků lněných semen na tři typy výrobků s různým zastoupením bílkovin, zahrnující bílkovinné mouky (<65 % bílkovin), bílkovinné koncentráty (65–90 % bílkovin) a bílkovinné izoláty (>90 % bílkovin). Tyto bílkovinné produkty mohou být důležitým zdroje esenciálních aminokyselin a disponují zajímavými funkčními vlastnosti, což

umožňuje jejich použití v různých potravinářských výrobcích za účelem zvýšení nutriční a sensorické hodnoty.

Pátá část práce se soustřeďuje na charakterizaci, funkční vlastnosti a antioxidační potenciál výlisků lněných semen. V první publikaci této části byly sledovány zmíněné parametry se zaměřením na různé velikostní frakce mouk získaných z výlisků lnu a dalších sedmi druhů olejních plodin. Hrubé frakce výliskových mouk obsahující především obalové vrstvy semene vykazovaly vyšší celkový obsah polyfenolů, antioxidační aktivity a lepší funkční vlastnosti v porovnání s jemnou frakcí složenou z komponentů vnitřní části semene. Jiné druhy olejnin vykazovaly shodný či opačný trend, případně nebyl efekt prosévání na funkční vlastnosti nebo biologické aktivity významný. Z pohledu funkčních vlastností předčily lněné výlisky funkční vlastnosti výlisků ostatních olejnin. Obecně lze říct, že prosévání výliskové mouky vykazuje efekt pouze v kombinaci s určitými plodinami. Součástí poslední části disertační práce je certifikovaná metodika, která uživatelům předkládá možnosti zhodnocení výlisků vybraných olejních plodin včetně lnu v podobě frakcí výliskové mouky i bílkovinných produktů. V rámci této metodiky je prostřednictvím příkladů modelových potravin demonstrováno, že díky nutričním, funkčním a biologickým vlastnostem mohou výliskové produkty nalézt uplatnění v potravinářských výrobcích, zejména pak pro zvýšení sensorické kvality a zdravotního potenciálu.

Výsledky této práce dokládají, že bílkoviny, rozpustné slizy i fenolické látky lněných semen či jejich produktů představují významné funkční a biologicky aktivní přírodní látky využitelné v lidské výživě, potravinářství, případně dalších oblastech lidské činnosti a jsou tudíž z pohledu budoucího výzkumu velmi perspektivní.

Klíčová slova: len setý, lněný sliz, bílkoviny, fenolické látky, antioxidační aktivita, funkční vlastnosti

SUMMARY

Flax (*Linum usitatissimum* L.) is one of the oldest domesticated crops. Its cultivation for fibre, oil or medicinal purposes was already widespread in ancient times. Nowadays, the growing of flax for the production of high-quality flaxseed oil prevails compared to fibres. However, using flaxseed as a functional food in the food industry and dietary applications has become more popular recently. Flaxseed contains bioactive components, including polyunsaturated fatty acids representing the major proportion of flaxseed oil, as well as functional proteins and peptides, lignans and dietary fibre in the forms of soluble mucilaginous polysaccharides and insoluble lignocellulose.

This dissertation presents the results focused on characterisation of three significant constituents of flaxseed - proteins, polysaccharides and lignans. These groups of compounds exhibit interesting functional properties and biological activities that may be useful in a wide range of food or medical applications. This work highlights the importance and potential use of flaxseed oil cake, which is an important source of these components. In addition to the results, this thesis also provides a comprehensive literature review of previous and current research on flaxseed proteins, mucilages and lignans. The results of this work can be primarily applied to breeding new oilseed flax cultivars or in the food and processing industries. However, due to the important nutritional aspects and biological activities of the mentioned components, the obtained findings can also be used in dietary applications and medicine. In general, this work aims to expand the spectrum of knowledge on the subject and to open up the scope for further research.

Two review articles represent the first part of the results. The first publication focused on the hydrocolloids of flaxseed in the form of flaxseed mucilage representing 4-15% of the flaxseed content and protein representing 20% of its weight. In this manuscript, the structure, extraction methods, functional and biological properties and possible applications of both types of hydrocolloids for the fortification of various foods or other food applications are described in detail. This manuscript is followed by a short review article summarising current trends in food and dietary applications of flaxseed mucilage. The first publication describes more likely the traditional use of flaxseed mucilage for food fortification to enhance the technological, nutritional or sensory quality of foods or to provide health benefits. The second review paper focuses exclusively on the potential use of flaxseed mucilage in recent and innovative food industry and nutrition areas. In modern applications, flaxseed mucilage can be applied, for instance for preparing films, for food protection, as a structural component in oleogels, cryogels or aerogels, and it may modify the functional properties of proteins within composites. From the point of nutrition, flaxseed mucilage can serve as an encapsulating agent for probiotics or biologically active compounds. Flaxseed mucilage has the characteristics of a prebiotic and may increase the proportion of beneficial probiotic microorganisms. As a result, both review articles highlight the significant potential of flaxseed proteins and flaxseed mucilage for various recent and future applications.

The second part of this thesis represents a first-authorship original manuscript focused on researching the influence of variety and growing conditions on yield parameters, chemical composition, lignan content and antioxidant potential of flaxseeds. The study compared these

parameters in four Czech and two Dutch cultivars of oilseed flax. Using the originally developed liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method, the native presence of secoisolariciresinol diglucoside and matairesinol was detected. Their content was then positively correlated with total polyphenolic content and antioxidant activities. Based on the inter-year comparison, the lack of rainfall in the key periods of May and June was found to have a negative effect on seed yield and secoisolariciresinol diglucoside content, while crude protein content was not negatively affected. On the other hand, crude protein content was negatively correlated with fat content. In general, a significant effect of cultivar and weather on most of the observed parameters was observed. These findings could be reflected in the development of new varieties and in optimising oilseed flax growing conditions.

The third part of the thesis consists of two peer-reviewed publications describing selected properties of mucilaginous polysaccharides of flaxseed obtained from selected cultivars of the field experiment. In the first study, the yield, total polyphenol content and antioxidant activity of the mucilaginous fractions obtained were determined. The highest yield was found in the cultivar Agram, while the highest antioxidant activity and polyphenol content was found in the cultivar Agriol. A significant positive correlation of polyphenol content with antioxidant activity was also found. The second publication of this part focused on the study of selected functional properties of mucilaginous polysaccharides, specifically solubility, swelling capacity, emulsifying activity, and emulsion stabilization ability. It was found that the obtained mucilages of all cultivars showed the ability to form stabilized emulsions in water. The highest emulsifying activity was demonstrated for the cultivar Raciol. The solubility of mucilage in water was more than 70% for all cultivars. Statistically significant differences between varieties were found regarding solubility and the ability to stabilize emulsions.

The topic of the fourth part represents the flaxseed proteins. This part shows the results concerning the characterisation of flaxseed proteins, summarises the possibilities of their isolation, and highlights their possible applications. The first publication of this part represents the original research, which was focused on the characterisation of the proteomic profiles of selected flaxseed cultivars, specifically of the whole seeds and their products in the form of oilseed cakes, fine flaxseed flour and protein concentrate. Within this study, 2560 protein groups were identified by LC-MS/MS analysis, while the dominant group represented 11S globulins. The content of globulins was increased after alkaline extraction and an acidic isoelectric precipitation from 41-44% to 72-82%. The other groups of proteins were minor, while the most important were albumins, followed by oleosins, metabolism-important enzymes and stress proteins. The unidentified proteins represent 26-31% of the protein spectrum of oilseed cake and fine flaxseed flour. The content of the mentioned groups formed together more than half of the proteins in oilseed cake and fine flaxseed flour, but only one quarter of these proteins were present in protein concentrate. The form of flaxseed product had a significantly higher influence on the protein spectrum compared to the cultivar. The second publication focuses on the possibilities of processing flaxseed oil cakes into three types of products with different protein contents, including protein flours (<65% protein), protein concentrates (65-90% protein) and protein isolates (>90% protein). These protein products can be important sources of essential amino acids and possess interesting functional properties, allowing their incorporation in various food products to increase nutritional and sensory value.

The fifth part of the thesis aims at the characterisation, functional properties and antioxidant potential of flaxseed extracts. In the first publication of this part, these parameters were investigated with a focus on different size fractions of flour obtained from oil cakes of flaxseed and seven other oilseed crops. The coarse fractions of the oil cake flour containing primarily the seed coat layers exhibited higher total polyphenol content, antioxidant activity and better functional properties compared to the fine fraction composed of the constituents occurring in the inner part of the seed. Other oilseed species showed the same or opposite trend, or the effect of sieving on functional properties or biological activities was insignificant. Regarding functional properties, flaxseed oil cakes exhibited unambiguously better functional activities than other oilseeds. In general, the sieving of oil cake flour showed an effect only in combination with certain crops. The last part of the dissertation includes a certified methodology that offers users options for evaluating the oil cakes of selected oilseed crops, including flax, in the form of oil cake flour fractions and protein products. Within this methodology, it has been demonstrated via the examples of model foods that, due to their nutritional, functional and biological properties, oilseed cake products may be applicable in food products, especially for improving sensory quality and health potential.

The results of this work prove that the flaxseed proteins, mucilages and phenolic compounds of flaxseed or the derived products represent important functional and bioactive materials usable in human nutrition, the food industry, and other human activities. Therefore, they are very promising from the point of future research.

Key words: flaxseed, flaxseed mucilage, proteins, phenolic substances, antioxidant activity, functional properties

OBSAH

1 ÚVOD	12
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED	13
2.1. Nutriční parametry semen lnu	13
2.1.1 Tuky.....	13
2.1.2 Nerozpustná vláknina	14
2.1.3 Vitamíny, minerály a ostatní látky	14
2.2. Lněný sliz	15
2.2.1 Celkové složení.....	15
2.3. Bílkoviny a peptidy	16
2.3.1 Složení bílkovin lněného semene	17
2.5. Fenolové látky lněného semene	18
2.5.1 Zastoupení fenolových látek ve lněném semenu	18
3 CÍLE A HYPOTÉZY PRÁCE	20
4 PŘEHLED O DOSAŽENÝCH VÝSLEDKÁCH	21
4.1 Literární přehled o složení, struktuře, funkčních vlastnostech a možnostech využití lněných bílkovin a slizů v potravinářství a výživě	21
4.2 Vliv odrůdy a podmínek pěstování na chemické složení, obsah lignanů a antioxidační potenciál semen lnu setého	22
4.3 Výtěžnost, funkční vlastnosti a antioxidační potenciál slizotvorných polysacharidů	24
4.4 Popis bílkovinného profilu lněných semen a možnost přípravy bílkovinných produktů z výliskové mouky	26
4.5 Charakterizace, funkční vlastnosti, antioxidační potenciál lněných výlisků a možnost jejich využití pro fortifikaci potravin	27
5 ZÁVĚR	30
6 SEZNAM LITERATURY	33

1 ÚVOD

Len setý (*Linum usitatissimum* L.) se řadí mezi tradiční zemědělské plodiny. Původní oblast výskytu a pěstování lnu představovalo území mezi východním Středomořím a Indií, přičemž byl hojně pěstován také ve starověkém Egyptě. Dle využití se rozlišuje len přadný, len olejný nebo přechodný typ olejnopřadný. V současnosti se celosvětově, i v České republice, pěstuje především len olejný pro produkci semen. Výměra pěstování olejného lnu celosvětově činila přibližně 2,6 milionů hektarů (2014). V České republice se od roku 2012 do roku 2023 výměry pěstování lnu setého olejného pohybovaly od 1000 do 2000 hektarů. Výnos v tomto období kolísal v rozmezí přibližně 1,2-1,5 t/ha. Semena lnu olejného se využívají přímo v oblasti potravinářství a krmivářství nebo pro lisování oleje určeného pro přímý konzum, v potravinových doplňcích, či jiných potravinářských aplikacích. Lněný olej nachází uplatnění rovněž v chemickém průmyslu, zejména při výrobě barev a laků. Vedlejší produkt ve formě výlisků představuje v současné době ceněné dietetické krmivo. Avšak díky svému nutričnímu složení se nabízí potenciální využití lněných výlisků rovněž v potravinářství a výživě člověka.

Téměř polovinu obsahu semen tvoří mastné kyseliny, v menší míře jsou zastoupeny bílkoviny a vláknina představující společně druhou polovinu hmotnosti lněných semen. Ostatní látky jsou v celém semeni zastoupeny minoritně. Vysoká nutriční hodnota lněných semen je určena především zvýšeným obsahem nenasycených mastných kyselin s významným množstvím alfa-linolenové kyseliny (ALA, *alpha-linolenic acid*), a to především u klasických odrůd. Rozpustná vláknina je zastoupena polysacharidy tvořící sliz a nachází se ve slizniční vrstvě osemení. Lněný sliz je zastoupen zejména sacharidy, přesto se jedná o komplexní rostlinný materiál, který díky svému složení vykazuje zajímavé funkční a biologické vlastnosti. Podstatnou součástí lněného semene jsou bílkoviny tvořené komplexem proteinových frakcí, přičemž majoritní frakce představují vysokomolekulární globuliny a v menší míře poté nízkomolekulární albuminy a další skupiny bílkovin. Kromě výše uvedených složek obsahují semena lnu významné množství fenolových látek, zejména lignanů. Lignany jsou obsaženy v semenech plodin bohatých na vlákninu, například dýni, sezamu, obilninách, luštěninách, avšak jejich obsah v semenech lnu je oproti uvedeným zdrojům mnohonásobně (75-800x) vyšší.

V souvislosti s vysokým obsahem polysacharidů, hodnotných bílkovin a širokého spektra fenolových látek byly prokázány významné biologické aktivity a funkční vlastnosti lněných semen. Dosud však nebyla ve větší míře studována odrůdová variabilita v obsahu, funkčních vlastnostech a biologických aktivitách obsažených komponentů. Rovněž nejsou dostatečně popsány rozdíly v abundanci a skladbě bílkovin mezi odrůdami lnu setého. Hlavním cílem této disertační práce byla realizace tříletého polního pokusu. Byl získán původní experimentální materiál v podobě semen šesti odrůd lnu setého, u nichž byly stanoveny výnosové parametry, analýza základního chemického složení, kvantifikace obsažených lignanů a stanovení antioxidačního potenciálu. Na základě zjištěných výsledků bylo provedeno meziodrůdové a meziročníkové srovnání všech zmíněných parametrů. Bylo sledováno základní chemické složení, zejména pak obsah a spektrum bílkovin ve výliscích lněných semen. Byl také zjišťován výtěžek, funkční vlastnosti a antioxidační aktivity samotného lněného slizu. Na základě vývoje modelových potravin byl sledován potenciál praktického využití výlisků lněných semen pro výrobu zušlechťených potravinářských výrobků.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Nutriční parametry semen lnu

Semena lnu se řadí mezi potraviny vyznačující se vysokou nutriční hodnotou a pozitivním vlivem na lidské zdraví. Tyto vlastnosti jsou ovlivněny jak celkovým chemickým složením lněného semene (Tab. 1), tak i výživovými hodnotami a biologickými aktivitami jednotlivých komponentů a jednotlivých látek. Z hlediska výživové hodnoty je přínosný zejména vysoký obsah nenasycených mastných kyselin ve lněném oleji (Bloedon & Szapary, 2004). Bílkoviny lněného semene vykazují vysokou hodnotu díky obsahu esenciálních aminokyselin (Kaur et al., 2017). Vlákna, jež je hojně zastoupena jak ve formě nerozpustné, a v menší míře rozpustné, rovněž dotváří vysokou nutriční hodnotu (Singh et al., 2011). Vysokou hodnotu lněných semen dotváří také významné biologické aktivity látek, například alfa-linolenové mastné kyseliny, lignanů a další fenolových látky, ale také slizotvorných polysacharidů (Goyal et al., 2014), případně dalších látek obsažených ve lněném semenu. Lněná semena tedy představují perspektivní funkční potravinu.

Tab. 1: Chemické složení semene lnu (převzato a upraveno podle Morris, 2007; Kajla et al., 2015)

Složka	Množství [g] na 100 g čerstvých semen
Vlhkost	6,5-7,7
Tuky	37-41
celková vlákna	28-29
<i>z toho rozpustná vlákna</i>	6-12
<i>z toho nerozpustná vlákna</i>	17-23
Bílkoviny	20-20,3
Popeloviny	2,4-3,4
cukry a škroby	1,0
ostatní látky (např. vitamíny, fenolové látky)	nízká až stopová množství

2.1.1 Tuky

Jak již bylo uvedeno v úvodu této práce, vysoká výživová hodnota lněného semene je dána z velké části skladbou mastných kyselin lněného oleje, jež je uvedena v tabulce 2. Nasycené mastné kyseliny jsou zastoupeny palmitovou a stearovou kyselinou, společně však představují pouze přibližně 7-13 % celkového podílu mastných kyselin. Zbývající část podílu tvoří nenasycené mastné kyseliny, zejména ALA zaujímá u klasických odrůd téměř 40-60 % celkového obsahu tuků. V menší míře se pak ve lněném oleji vyskytují také linolová a olejová mastná kyselina (Goyal et al., 2014). V souvislosti s vysokým obsahem ALA, která představuje jednu ze tří omega 3 nenasycených mastných kyselin, představuje lněný olej vhodnou rostlinou alternativu k živočišným zdrojům těchto mastných kyselin, jež jsou obsaženy zejména v mořských rybách. Konzumace zdrojů bohatých na ALA představuje významný zdroj prevence proti různým kardiovaskulárním onemocněním (Rodriguez-Leyva, 2010; Parikh et al., 2018). Z hlediska vstřebávání a zdravotního potenciálu tuků lněného semene je důležitá forma užívání lněných produktů. Zatímco lněný olej představuje ideální, a mletá semena

uspokojivou formu příjmu ALA u člověka, při užívání celých semen nedochází k dostatečnému vstřebání ALA, což bylo potvrzeno nízkým a nevýznamným nárůstem této aminokyseliny v krevní plazmě testovaných osob (Austria et al., 2014). Na základě uvedených informací lze vyvozovat, že lněný olej je cenným zdrojem nenasycených mastných kyselin, zejména ALA. Nicméně je nutné zohlednit formu, ve které je lněné semeno konzumováno, pro optimální vstřebávání těchto i dalších prospěšných látek.

Tab. 2: Profil hlavních mastných kyselin ve lněném oleji (převzato a upraveno podle Goyal et al., 2014)

Mastná kyselina	Relativní zastoupení ve lněném oleji [%]
palmitová (C16:0)	4,9-8,0
stearová (C18:0)	2,2-4,6
olejová (C18:1) (ω -9)	13,4-19,4
linolová (C18:2) (ω -6)	12,3-17,4
alfa-linolenová (C18:3) (ω -3)	39,9-60,4

2.1.2 Nerozpustná vláknina

Nerozpustná vláknina představuje 60-80% podíl celkové vlákniny, zbývající část je zastoupena rozpustnou vlákninou, která je tvořena slizotvornou frakcí semene neboli lněným slizem (Singh et al., 2011). Nerozpustnou vlákninu tvoří především celulóza, hemicelulóza a lignin (Rubilar et al., 2010). Vláknina obecně, jako transienční a nestravitelná složka potravy, ovlivňuje lidské zažívání. Nerozpustná vláknina lněného semene zvětšuje objem potravy díky své schopnosti vázat vodu a zkracuje dobu, po kterou se potrava vyskytuje ve střevě, čímž může působit jako objemové laxativum (Hanif Palla & Gilani, 2015). Příjem nerozpustné vlákniny lněného semene usnadňuje léčbu některých zažívacích obtíží nebo onemocnění, jako je například zácpa, divertikulární choroba nebo syndrom dráždivého tračníku (Kajla et al., 2015). Vlivem urychleného vyloučení nestrávené potravy, k čemuž konzumace vlákniny přispívá, rovněž napomáhá v oblasti prevence vzniku nádorových onemocnění zažívacího traktu. Klinické studie prokázaly, že společně s rozpustnou vlákninou, zlepšovala nerozpustná vláknina lněného semene glykemický profil studovaných osob (Dahl et al., 2005). Rozpustná i nerozpustná vláknina lněného semene, případně kombinace jejich funkčních parametrů přináší řadu pozitivních efektů na lidské zdraví, zejména v oblasti zažívání, což významně zvyšuje potenciál lněného semene jako funkční potraviny.

2.1.3 Vitamíny, minerály a ostatní látky

Lněné semeno je poměrně cenným zdrojem mikronutrientů. Významný je obsah některých minerálních látek, především draslíku (560–920 mg/100 g semene), dále pak fosforu (650 mg/100 g), hořčíku (350–431 mg/100 g) a vápníku (236–250 mg/100 g). Přínosné je naopak nižší zastoupení sodíku (27 mg/100 g). Přestože obsah vitamínů je celkově spíše nižší, lněné semeno je poměrně dobrým zdrojem vitamínu E. Vitamín E je obsažen ve formách α -tokoferolu, β -tokoferolu, avšak nejvíce v podobě γ -tokoferolu, jehož obsah činí 39,5 mg/100 g

semene. γ -tokoferol se vyznačuje řadou benefičních biologických aktivit, jedná se o významný antioxidant, snižuje krevní tlak a působí preventivně proti Alzheimerově chorobě (Kajla et al., 2015). Významné je rovněž množství vitamínu B3 (niacin) (Dzuvor et al., 2018). Lněné semeno obsahuje kyselinu fytovou, jejíž obsah může být významně ovlivněn odrůdou lnu a interakcí odrůdy s ročníkem a lokalitou pěstování (Oomah et al., 1996). Kyselina fytová je organická látka bohatá na fosfor se silnými chelatačními schopnostmi, která může pozitivně ovlivňovat lidské zdraví ve formách antioxidačního působení, snižování krevního tlaku nebo kancerostatickými účinky (Oatway et al. 2007). V souvislosti s chelatačními vlastnostmi kyseliny fytové je zmiňováno její antinutriční působení z důvodu reakce s některými minerály (zinek, vápník, železo) vedoucí k jejich deficienci v organismu (Bekhit et al., 2018). Kromě kyseliny fytové byl také zjištěn výskyt některých látek, u nichž je také diskutováno jejich antinutriční působení s možným negativním dopadem na zdraví člověka a zvířat. Jedná se zejména o inhibitory proteas, kyanogenní glykosidy, dipeptid linatin a kadmium. Tyto látky mohou rovněž omezovat dostupnost nebo vstřebávání živin. Nicméně, u kyseliny fytové, ani ostatních uvedených látek, nebylo dosud v rámci klinických studií prokázáno antinutriční působení vedoucí k omezení dostupnosti či vstřebávání esenciálních živin, případně zdravotních komplikací, v souvislosti s konzumací lněných semen. V případě jejich konzumace v obvyklém množství by tedy mělo být riziko toxicity a související zdravotní komplikace, způsobené uvedenými antinutrienty, zanedbatelné (Shim et al., 2014; Dzuvor et al., 2018).

2.2. Lněný sliz

Slizotvorná frakce, respektive lněný sliz (FG, *flaxseed gum*) představuje rozpustnou vlákninu lněného semene. Vyskytuje se zejména v obalových vrstvách lněného semene a tvoří přibližně jednu třetinu až čtvrtinu celkové vlákniny. Jedná se o polymerní materiál, jehož majoritní část představuje komplex různých monosacharidů, jedná se tedy o heteropolysacharid (Safdar et al., 2019). FG je snadno extrahovatelný z mouky lněného semene, slupek nebo celých semen (Liu et al., 2018). Díky svým nutričním a funkčním charakteristikám, snadné dostupnosti a souvisejícími možnostmi využití je problematika lněného slizu v současnosti intenzivně studovaným tématem. V oblasti materiálů rostlinné původu představuje jeden z klíčových aspektů zvyšující zájem o lněné semeno a jeho potenciální uplatnění v budoucnosti.

2.2.1 Celkové složení

FG je obsažen zejména ve vnější vrstvě obalu semene a představuje přibližně 3,5-15 % hmoty semene (Roulard et al., 2016; Safdar et al., 2019; Hu et al., 2020). Tato výrazná variabilita v abundanci FG, respektive jeho výtěžku, závisí na odrůdě, způsobu a oblasti pěstování lnu, skladovacích podmínkách a podmínkách extrakce (Roulard et al., 2016; Hu et al., 2020).

FG je složený ze sacharidů, bílkovin, popelovin, tuků a vody. Poměrné zastoupení uvedených složek a jednotlivých látek je, stejně jako celkové složení lněného semene, velice variabilní (Tab. 2). Je ovlivněno obdobnými faktory, jež určují samotnou abundanci FG, s důrazem na podmínky extrakce. Majoritní část FG vždy tvoří sacharidy. Safdar et al (2019) uvádí jejich 89% zastoupení ve lněném slizu. Kaushik et al. (2017) stanovili 80-90% obsah

v závislosti na teplotě extrakce, kdy se zvyšující teplotou klesá zastoupení sacharidů, ale naopak stoupá obsah bílkovin. Hadad & Goli (2018) zjistili pouze 68% obsah sacharidů a podobný obsah (71 %) zjistil také Roulard et al. (2016). V souvislosti s popsáním zastoupením sacharidů v rámci uvedených výzkumů je nutné zdůraznit použití různých metod extrakce a odlišných typů výchozího materiálu. Z tohoto důvodu nelze přesně odhadnout vliv jednotlivých faktorů extrakce na obsah sacharidů. Nicméně, na základě výzkumu prováděné autory Kaushik et al. (2017) byl zjištěn trend ve formě nárůstů obsahu kyselých monosacharidů a bílkovin vůči neutrálním monosacharidům se vzrůstající teplotou extrakce FG v rozmezí 30-90 °C. Safdar et al. (2019) uvádí průměrnou molekulovou hmotnost slizu 1,322 kDa. V rámci následného výzkumu byla však zjištěna variabilita molekulové hmotnosti v závislosti na použité metodě extrakce, přičemž bylo zjištěno, že typ extrakce nemění spektrum monosacharidů, nicméně dochází k odlišnému rozpadu struktury FG, což ovlivňuje molekulovou hmotnost získaného slizu (Safdar et al. 2020).

Průměrný obsah zbývajících složek FG, tzn. popelovin, bílkovin a tuků není významný v porovnání s obsahem sacharidů. Safdar et al. (2019) uvádí pouze 7,1% obsah souboru těchto látek ve FG. Kaushik et al. (2017) uvádí zastoupení nesacharidových látek přibližně od 5,5 % do 17 % v závislosti na teplotě extrakce, přičemž jak již bylo zmíněno, proměnlivý je zejména obsah bílkovin, a naopak obsah popelovin (~ 0,7 %) a tuků (~ 0,6 %) zůstal v závislosti na teplotě téměř neměnný. Hadad & Goli (2018) uvádí v průměru významně vyšší obsah popelovin (11,2 %) a mírně vyšší obsah tuků (2,1 %), obsah bílkovin činil 13,3 %. Safdar et al. (2019) zjistili v průměru 5,3% zastoupení popelovin a pouze 1,5% zastoupení bílkovin a 0,3% obsah tuků. Roulard et al. (2016) stanovil hodnotu obsahu popelovin na 6 % a 19,3 % obsah bílkovin. Kromě uvedených složek byla zjištěna rovněž přítomnost fenolových kyselin ve FG (Vieira et al., 2019).

Tab. 2: Chemické složení lněného slizu a sacharidové frakce (převzato a upraveno dle Roulard et al, 2016; Kaushik et al., 2017; Hadad & Goli, 2018 a Safdar et al. 2019)

Složka	Rozpětí relativního obsahu složek lněného slizu [%]
Bílkoviny	1,5-19,3
Popeloviny	0,6-11,2
Sacharidy	67,7-90,4
Tuky	0,3-2,1
Vlhkost	3,4-5,5
ostatní látky (např. vitamíny, fenolové látky)	nízká až stopová množství

2.3. Bílkoviny a peptidy

Bílkoviny lněného semene (FP, *flaxseed proteins*) představují přibližně pětinu celkového obsahu lněného semne. Vysoká nutriční kvalita FP, určená zejména zastoupením aminokyselin, je srovnatelná s kvalitou sójové bílkoviny (Kajla et al, 2015). Kromě nutriční hodnoty poskytují FP zajímavé funkční vlastnosti a biologické aktivity. Lněné peptidy vykazují rovněž biologické aktivity.

2.3.1 Složení bílkovin lněného semene

Lněné semeno obsahuje přibližně 11-31 % dusíkatých látek, u kanadských odrůd se však jejich obsah může pohybovat okolo 36 %. Obsah dusíkatých látek může být už v průběhu růstu ovlivněn aplikací dusíkatého hnojiva, a kromě dusíkatých látek může hnojení dusíkem ovlivnit také obsah tuku (Oomah & Mazza et al., 1993). Morris (2007) uvádí poměrně výrazný rozdíl v celkovém obsahu dusíkatých látek mezi hnědosemennými (22,3 g / 100 g semene) a žlutosemennými (29,2 g / 100 g semene) odrůdami, zatímco obsah tuků zůstává velmi podobný (hnědosemenné: 44,4 g / 100 g, žlutosemenné: 43,6 g / 100 g). FP má vyvážený poměr aminokyselin. Nejvíce zastoupené aminokyseliny byly v případě všech odrůd glutamát, aspartát, arginin a leucin (tabulka 8), přičemž právě vysoký obsah těchto aminokyselin tvoří spektrum srovnatelné s profilem aminokyselin u bílkovin semen sóji (Oomah & Mazza, 1993). Limitující je naopak obsah esenciální aminokyseliny lysinu (Singh et al., 2011).

Bylo navíc zjištěno, že obsah aminokyselin v rámci FP zůstává stabilní i v případě tepelné úpravy semen a odvozených produktů, například při zpracování extruzí (Giacomino et al., 2013). Nwachukwu & Aluko (2018) popsali rozdíly v aminokyselinovém složení mezi globulinovou a albuminovou frakcí, kdy globulinové bílkoviny obsahují spíše hydrofobní aminokyseliny, naopak albuminy jsou tvořené hydrofilními aminokyselinami.

Hlavní bílkovinou frakci lněných semen představuje globulin (linin), jehož zastoupení činí až 58 % obsahu FP, v menší míře (až 42 % FP) je pak obsažen albumin (conlinin) (Oomah & Mazza et al., 1993). Madhusdhan & Singh (1985a) uvádí mírně vyšší zastoupení globulinu, jež tvoří 66% podíl bílkovin. Samotná globulinová frakce je bohatým zdrojem sirných aminokyselin (methionin, cystein) a větvených aminokyselin (valin, leucin a isoleucin). Zastoupení ostatních aminokyselin je v rovnováze (Wu et al., 2019).

Globuliny lněného semene patří do skupin 11-12 S zásobních globulinů a jsou zastoupeny vysokomolekulárními bílkovinami o velikosti 252-298 kDa (Wu et al., 2019), jež se skládají z více polypeptidů o velikosti 10-50 kDa (Nwachukwu & Aluko, 2018). Madhusudhan & Singh (1985a) provedli pomocí metody cirkulárního dichroismu stanovení prostorového uspořádání lněného globulinu, přičemž zjistili 3% podíl α -šroubovicové struktury a 17% podíl β -struktury, což značí spíše neuspořádanou podobu lněného globulinu. Bílkoviny byly izolovány z odtučněné lněné mouky a separovány pomocí SDS-PAGE (denaturační elektroforéza na polyakrylamidovém gelu), pomocí níž bylo identifikováno pět podjednotek s odlišnými molekulovými hmotnostmi (11, 18, 29, 42 a 61 kDa) spojenými do jedné bílkoviny pomocí disulfidických můstků. Využitím metody urea-PAGE bylo identifikováno šest podjednotek (55, 54, 50, 45, 43, a 41 kDa). Při denuraci 2-merkptoethanolem byly poté 55, 54 a 50 kDa podjednotky dále rozděleny na jednu bazickou podjednotku o velikosti 20 kDa a kyselou podjednotku s molekulovou hmotností 40 kDa. K podobným výsledkům dospěli také Marcone et al. (1998), kteří identifikovali pět podjednotek globulinu o velikostech 14, 25, 30, 35 a 51 kDa. Později byla pomocí aniontově výměnné chromatografie izolována hlavní frakce o velikosti 365 kDa, u které byly prostřednictvím denaturující SDS-PAGE detekovány podjednotky o velikosti 20, 23 a 31 kDa (Chung et al., 2005). Kromě podjednotek se stejnou, či téměř totožnou, molekulovou hmotností, jež jsou popsány v rámci výše uvedených zdrojů,

byly rovněž pomocí SDS-PAGE vizualizovány pruhy bílkovin o velikostech 21, 36 a 54 kDa příslušející k 7S globulinu (Krause et al., 2002).

Lněný albumin (conlinin) patří do skupiny 2S albuminů a ve srovnání s globulinem je ve lněném semenu zastoupen v menší míře. Madhusudhan & Singh (1985b) izolovali lněný albumin z lněné mouky, přičemž jeho struktura byla tvořena jedním polypeptidovým řetězcem s molekulovou hmotností 16-18 kDa. Nwachukwu & Aluko (2018) uvádí molekulovou hmotnost polypeptidového řetězce pouze 10 kDa. Primární struktura conlininu je tvořena 168 či 169 aminokyselinami (Wu et al., 2019). Lněné albuminy mají více uspořádanou strukturu tvořenou z 26 % α -šroubovicovým typem struktury a 32 % β -struktury. Jejich aminokyselinové složení vykazuje bohatší zastoupení lysinu, argininu, cysteinu a glutamátu (Madhusudhan & Singh, 1985b). Conlinin byl identifikován jako majoritní bílkovina lněného slizu, přičemž jeho zastoupení může ovlivňovat funkční vlastnosti FG (Liu et al., 2016).

2.5. Fenolové látky lněného semene

Lněné semeno obsahuje široké spektrum biologicky aktivních látek, přičemž některé byly zmíněny již v předchozích kapitolách. Jednou z nejvýznamnějších skupin biologicky aktivních látek lněného semene jsou fenolové (tj. fenolické) látky, které se vyznačují především svými antioxidačními vlastnostmi. Nicméně díky své struktuře a vlastnostem poskytují celou řadu dalších, často souvisejících, biologických aktivit. Tyto látky proto patří mezi klíčové komponenty určující vysokou hodnotu a zdravotní prospěšnost lněného semene.

2.5.1 Zastoupení fenolových látek ve lněném semenu

V rámci lněného semene bylo zjištěno 5 skupin fenolových látek. Jedná se o lignany, fenolové kyseliny, flavonoidy, fenylypropanoidy včetně jejich glykosidů a taniny (Kasote, 2013). Uvedené skupiny představují základní kategorie rostlinných fenolových látek (Pandey & Rizvi, 2009).

Lněná semena jsou zdaleka nejvýznamnějším, dosud popsaným, zdrojem lignanů. Obsahují přibližně 75-800x více lignanů v porovnání se zrnny obilnin, luštěninami, ovocem a zeleninou (Kajla et al., 2015). Lignany lněného semene jsou zastoupeny šesti látkami, jež se více či méně odlišují svojí strukturou (Obr. 9). Jednotlivé látky jsou součástí lignanové makromolekuly, v jejíž struktuře jsou spojeny pomocí vazby v podobě hydroxymethyl glutarové kyseliny (Struijs et al., 2007). Dominantním, přirozeně se vyskytujícím, lignanem lněného semene je glykosid secoisolariciresinolu (SECO), tedy secoisolariciresinol diglukosid (SDG). V nižších množstvích je pak obsažen matairesinol (MATA) (Krajčová et al., 2009).

Beejmohun et al. (2007) publikovali výsledky obsahu SDG v různých typech vzorků získaných z lněného semene a porovnali ho s obsahem SDG, extrahovaných z různých materiálů získaných z lněného semene, zjištěným v rámci jiných studií. Bylo popsáno, že lněné semeno obsahuje 7,0 mg SDG v 1 g celého lněného semene, odtučněné lněné výlisky semen obsahovaly 11,7-25,9 mg/g, odtučněná mletá semena 6,5-11,8 mg/g, drcená semena 14,0 mg/g. V rámci uvedené studie, bylo zjištěno, že samotné výlisky semen lnu obsahují, po mikrovlnné extrakci, celkem 16,3 mg/g SDG. Hao & Beta (2012) zjistili poměrně značné rozpětí v

zastoupení SDG v obalových vrstvách semene lnu dvou kanadských odrůd a jedné belgické odrůdy v celkovém zastoupení 16,4–33,9 mg/g. Fuentealba et al. (2015) uvádí obsah SDG ve čtyřech odrůdách lnu (dvě chilské a dvě kanadské odrůdy) v rozmezí 6,0–10,9 mg/g v celých semenech a 10,8–17,9 mg/g v odtučněné mouce, z čehož vyplývá poměrně velký rozptyl obsahu SDG v závislosti na odrůdě. Lockwood (2009) pak zmiňuje mírně nižší obsah SDG v semenu lnu, který činí 3,7 mg/g. Obsah matairesinolu ve lněném semenu je oproti SDG mnohem nižší a činí 10 µg/g (Sicilia et al., 2003). Krajčová et al. (2009) uvádí rozdíly v zastoupení glykosidů SECO a MATA v závislosti na typu lnu a hnojení. Obsah glykosidů SECO se pohyboval v rozmezí 2,3–7,0 mg/g v případě olejného lnu a 1,6–3,1 mg/g v přádném lnu. Obsah MATA byl výrazně nižší oproti glykosidům SECO, přičemž obsah byl naopak vyšší v případě přádného lnu 7–27 µg/g oproti olejnému lnu 3–9 µg/g. Ostatní lignany, konkrétně pinoresinol (PINO), lariciresinol (LARI) a solariciresinol mohou být dle studie Meagher et al. (1999) rovněž obsaženy ve lněných semenech, nicméně jejich přítomnost je zmiňována velice ojedinele a je tedy diskutabilní.

Lněné semeno obsahuje kromě liganů také fenolové kyseliny patřící mezi deriváty kyseliny benzoové a kyseliny skořicové. Byl zjištěn také obsah kyseliny chlorogenové a kyseliny gentisové (Herchi et al., 2014). Kajla et al. (2015) popsali hlavní fenolové kyseliny včetně jejich obsahu v odtučněné mouce. Nejvíce zastoupená je ferulová kyselina s koncentrací 10,9 mg/g následovaná chlorogenovou (7,5 mg/g) a gallovou (2,8 mg/g) kyselinou. Jako minoritní uvádí glukosidy kyselin p-kumarové a hydroxyskořicové a také kyselinu 4-hydroxybenzoovou. Naopak, Hao & Beta, 2012 zjistili významný obsah glukosidů p-kumarové kyseliny v obalu semene lnu v množství 35,7–49,2 mg/g a několikanásobně nižší obsah glukosidů ferulové kyseliny (5,1–15,2 mg/g). Oomah et al. (1995) uvádí obsah celkových fenolových kyselin v celém semeni v rozmezí 8–10 mg/g. Esterifikované kyseliny představují 5 mg/g, respektive 48–66 %, celkového obsahu fenolových kyselin. Etherifikované fenolové kyseliny jsou obsaženy v množství 3–5 mg/g.

Další skupinou fenolových látek lněného semene jsou flavonoidy. Jejich obsah je oproti liganům a fenolovým kyselinám značně nižší a činí přibližně 350–710 µg/g, přičemž hlavními flavonoidy jsou flavonové C- a O-glykosidy. Kromě těchto látek je ve lněném semenu obsažen také herbacetin diglukosid (Herchi et al., 2014). Struijs et al. (2007) popisuje přítomnost herbacetin diglukosidu jako součást liganové makromolekuly vyskytující se v obalu lněného semene, v níž je inkorporovaný, stejně jako SDG, pomocí hydroxymethyl glutarové kyseliny.

Mezi méně popisované, fenolové látky lněného semene patří fenylylpropanoid glykosidy a taniny. Fenylylpropanoid glykosidy jsou fenolové látky, které mají na postranní řetězec vázané aromatické jádro. Zástupci této skupiny jsou linusitamarin, linocinamarin a daucosterol (Luyengi et al., 1993). Dosud však nejsou popsány obsahy fenylylpropanoid glykosidů ve lněném semenu, proto se předpokládá spíše jejich stopové zastoupení. Taniny se nachází ve vnější vrstvě obalu semene a jejich množství, spektrum a stupeň polymerizace jsou faktory, které jsou do velké míry zodpovědné za barvu lněného semene (Troshchynska et al, 2019). Kasote et al. (2011) izolovali ze semen lnu dva typy taninu: hydrolyzovatelný tanin a prototanin (pseudotanin). Wanasundara & Shahidi (1994) uvádí zastoupení kondenzovaných taninů v semenech a mouce celých semenech lnu v rozptylu přibližně 0,7–1,3 mg/g po extrakci pomocí systémů rozpouštědel složených z methanolu, ethanolu, hexanu, amoniaku a vody.

3 CÍLE A HYPOTÉZY PRÁCE

Širším cílem disertační práce byla komplexní charakterizace bílkovin, rozpustných slizů a fenolových látek obsažených v semenech lnu setého olejného a vylisčích semen získaných po lisování oleje. Dílčí cíle práce jsou prezentovány v následujících bodech:

- Sestavení proteomického profilu celých semen, vyliskové mouky a odvozených produktů se zvýšeným obsahem bílkovin.
- Kvalitativní a kvantitativní analýza lignanů, stanovení chemického složení a antioxidačního potenciálu semen vybraných odrůd lnu získaných v rámci řízeného polního experimentu.
- Stanovení funkčních vlastností a antioxidačního potenciálu slizotvorných frakcí semen vybraných odrůd lnu setého olejného.
- Optimalizace postupů a metod zpracování semen olejného lnu pro získání vylisků a jejich následné použití v rámci zušlechtěných potravinářských výrobků.
- Sestavení přehledu o fyzikálně-chemických charakteristikách, funkčních vlastnostech a biologických aktivitách lněných bílkovin a slizotvorných polysacharidů, včetně jejich stávajícího a potenciálního použití v rámci potravinářských a dietárních aplikací.

Na základě vytyčených dílčích cílů disertační práce byly stanoveny hypotézy:

- Proteomický profil lněného semene vykazuje odlišnosti v závislosti na odrůdě, nebo koncentraci bílkovin v produktech vyrobených z vyliskové mouky.
- Odrůda olejného lnu, podmínky pěstování, či kombinace těchto faktorů významně ovlivňuje chemické složení, obsah lignanů a antioxidační potenciál semen lnu.
- Funkční a antioxidační vlastnosti slizotvorných polysacharidů jsou determinovány odrůdou a podmínkami pěstování lnu.
- Využitím optimalizovaných metod zpracování semen olejného lnu lze získat vyliskovou mouku různých charakteristik, včetně možností jejího použití pro zušlechtění potravinářských výrobků.
- Bílkoviny a slizotvorné polysacharidy mohou být díky svým vlastnostem uplatnitelné pro tradiční i inovativní potravinářské aplikace a dietární účely.

4 PŘEHLED O DOSAŽENÝCH VÝSLEDKÁCH

4.1 Literární přehled o složení, struktuře, funkčních vlastnostech a možnostech využití lněných bílkovin a slizů v potravinářství a výživě

Lorenc, F., Jarošová, M., Bedrníček, J., Smetana, P., Bárta, J. (2022). Structural Characterization and Functional Properties of Flaxseed Hydrocolloids and Their Application. *Foods*, 11(15): 2304.

Lněné semeno patří mezi nutričně bohatou potravinu obsahující v čerstvé hmotě 37-41 % tuku, 28-29 % celkové vlákniny, 20 % bílkovin, 6,5-7,7 % vody a 2,4-3,4 % popelovin. Kromě celého semene je možné pro přímý konzum, potravinářské či dietární zpracování, využít také drcené semeno, lisovaný či extrahovaný olej, výlisky, slupky či zpracované produkty lněných bílkovin v podobě výliskové mouky, bílkovinného koncentrátu nebo izolátu. Z lněných semen je možné získávat také dietární vlákninu v podobě rozpustných slizotvorných polysacharidů. Právě lněné bílkoviny a rozpustné polysacharidy patří mezi významné, široce využitelné hydrokoloidy.

Bílkoviny lněných semen mají vyvážený poměr aminokyselin s převažujícím zastoupením kyseliny glutamové, následovaným kyselinou asparagovou, argininu a leucinu. Svým aminokyselinovým složením jsou lněné bílkoviny srovnatelné s bílkovinami sóji. Majoritní část bílkovinného spektra (58-66 %) tvoří zásobní bílkoviny ze skupiny 11S a 12S globulinů (linin) o velikosti 252–298 kDa, jež jsou složeny z více 10-50 kDa polypeptidových řetězců. Globuliny mají neuspořádanou strukturu tvořenou z 3 % α -šroubovicí a 17 % β -strukturou. 2S albuminy jsou druhou nejvíce zastoupenou skupinou reprezentující 20-42 % celkového spektra bílkovin lněného semene. Jsou složeny z jednořetězcového polypeptidového řetězce o velikosti 16-18 kDa obsahující 168 nebo 169 aminokyselin. Na rozdíl od globulinů mají více uspořádanou strukturu obsahující 26 % α -šroubovicových a 32 % β -struktur. V současné době se pro izolaci bílkovin z lněných semen nejčastěji využívá efektivní kombinace alkalické extrakce (pH 8,0-9,5) a isoelektrické precipitace (pH 3,8-4,2). Mezi další využitelné metody izolace a purifikace patří extrakce pomocí pufrů a chromatografické postupy. Bílkovinné hydrolyzáty jsou následně získávány enzymatickou hydrolyzou pomocí komerčních nebo nekomerčních proteas.

Lněný sliz je heteropolysacharid nacházející se ve vnější obalové vrstvě semen. Jeho relativní zastoupení ve lněných semenech se na rozdíl od bílkovin pohybuje v širokém rozmezí 3,5-15 % a závisí na odrůdě i podmínkách pěstování. Má charakter přírodní rostlinné gumy. Jeho složení, struktura a vlastnosti jsou tedy srovnatelné s ostatními přírodními gumami, mezi něž se řadí arabská, guarová nebo xanthanová guma. Lněný sliz je složený ze dvou polysacharidových frakcí – neutrální (arabinoxylan) a kyselá (rhamnogalakturonan). Arabinoxylan se skládá z D-arabiny, D-xylozy a D-galaktosy, přičemž strukturně je definován jako polymery xylozy spojené β 1,4 vazbou, jež jsou nebo nejsou na O-2 či O-3 pozicích nahrazeny rezidui ostatních monosacharidů. Rhamnogalakturonan je složen z L-rhamnosy, D-galakturonové kyseliny, L-fukosy a L-galaktosy. Jeho struktura je definována jako polymerní struktura rhamnogalakturonanu-I s možnou přítomností homorhamnanu nebo

homogalakturonanu. Bloky rhamnogalakturonanu mohou být také monosubstituovány na pozici O-3 galaktosou, fukosou nebo některými neutrálními monosacharidy. Podíly jednotlivých monosacharidů v extrahovaném slizu v rámci obou polysacharidů pak mohou být značně variabilní v závislosti na genotypu lnu a podmínkách extrakce.

Sliz je možné extrahovat z celých semen lnu, jejich slupek nebo výlisků pomocí čtyř základních přístupů, které jsou založené na vodní, ultrazvukové, mikrovlnné nebo acidobazické extrakci. Zvolená metoda a podmínky extrakce lněného slizu, zejména teplota v případě vodní extrakce, má zásadní vliv na jeho výtěžek, čistotu a složení, respektive také na zastoupení samotných monosacharidů. Jejich abundance pak určuje poměr neutrálního a kyselého polysacharidu, jež determinuje jeho funkční vlastnosti. Z tohoto důvodu je proto vhodné volit podmínky extrakce dle následného využití získaného slizu.

Oba typy hydrokoloidů se vyznačují širokým spektrem funkčních vlastností a antioxidační aktivitou. Funkční vlastnosti poskytují široké možnosti jejich využití jako funkčních aditiv při fortifikaci potravin a pro další potravinářské aplikace. Antioxidační aktivity a další biologické vlastnosti, lněného slizu a bílkovinných hydrolyzátů obsahující biologicky aktivní peptidy pak mohou být využitelné v oblastech výživy a lékařství, přičemž konkrétní případy jsou uvedeny v související publikaci.

4.2 Vliv odrůdy a podmínek pěstování na chemické složení, obsah lignanů a antioxidační potenciál semen lnu setého

Jarošová, M., Lorenc, F., Bedrníček, J., Petrášková, E., Bjelková, M., Bártová, V., Jarošová E., Zdráhal, Z., Kyselka, J., Smetana, P., Kadlec, J., Stupková, A. & Bárta, J. (2024). Comparison of Yield Characteristics, Chemical Composition, Lignans Content and Antioxidant Potential of Experimentally Grown Six Linseed (*Linum usitatissimum* L.) Cultivars. *Plant Foods for Human Nutrition*, 79: 159–165.

Velká část souvisejících výzkumných studií uvádí, že výnosové parametry, obsah tuku, dusíkatých látek nebo lignanů jsou významně ovlivněny odrůdou a podmínkami pěstování, zejména pak lokalitou a počasím. Žádná z nich však nepopisuje vliv zmíněných faktorů na všechny uvedené parametry a nehodnotí jejich vzájemné vztahy. Z tohoto důvodu bylo v rámci disertační práce řešeno toto téma na komplexní úrovni. Cílem této části disertační práce bylo popsat vliv odrůdy a ročníku na základní chemické složení, obsah jednotlivých lignanů a antioxidační potenciál semen lnu setého. Bylo rovněž zjišťováno, jakým způsobem se tyto parametry vzájemně ovlivňují.

Pro dosažení uvedených cílů byl na experimentálním pozemku Fakulty zemědělské a technologické Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích založen v letech 2018, 2019 a 2020 maloparcelkový pokus s využitím tří hnědosemenných (Agram, Libra, Flanders) a tří žlutosemenných (Amon, Agriol, Raciol) odrůd lnu setého olejného. Z toho dvě odrůdy byly původu nizozemského (Libra a Flanders) a zbývající českého. Na základě výsledků agrochemického zkoušení zemědělských půd byl zjištěn vyhovující stav zásobení půdy živinami, proto nebyl pozemek přihnojován. Porost byl pouze ošetřen post-emergentním herbicidem GLEAN 75 WG. V průběhu tří vegetačních sezón byla shromažďována

meteorologická data v podobě denních úhrnů teplot a srážek. Semena lnu byla ve fázi plné zralosti sklizena pomocí maloparcelkové sklízecí mlátičky a následně vhodně skladována. U sklizených semen všech odrůd byl stanoven výnos na plochu a hmotnost tisíce semen. Semena byla dále pomocí ověřených metod analyzována pro zjištění obsahu celkových tuků, dusíkatých látek, popelovin a vody. Obsah sacharidů byl stanoven dopočtem. Pro zjištění TPC v semenech lnu byla použita metoda využívající Folin-Ciocalteuova činidla, výsledek byl vyjádřen jako ekvivalent kyseliny gallové (EKG) v mg. Antioxidační aktivity byly stanoveny pomocí metod zhašení radikálů ABTS a DPPH a vyjádřeny jako ekvivalent kyseliny askorbové (EKA) v mg. Kvantitativní analýza všech potenciálně se vyskytujících, nativních lignanů lněného semene (SDG, MATA, LARI a PINO) byla provedena pomocí původně vyvinuté metody využívající kombinace separace na vysokoúčinném kapalinovém chromatografu a detekce pomocí hmotnostní spektrometrie.

Pomocí této metody bylo možné velmi přesně stanovit abundanci zmíněných lignanů. Všechna data byla statisticky vyhodnocena pomocí metod analýzy variance, post-hoc testu a korelační analýzy.

Výsledky analýz vykazovaly velké rozpětí hodnot u většiny zkoumaných parametrů přičemž byl potvrzen statisticky významný vliv odrůdy, ročníků, případně kombinace obou faktorů, na většinu sledovaných parametrů. Zatímco vývoj teplot v průběhu vegetační sezóny byl po dobu všech tří let srovnatelný, byly zaznamenány rozdíly v úhrnu srážek v kritických růstových fázích lnu. Nejvíce se projevil nedostatek srážek v květnu a červnu roku 2019, který významným způsobem negativně ovlivnil výnos semen a obsah SDG. Kromě odrůdy Flanders, byl v roce 2019 zaznamenán také nižší obsah tuku u zbývajících odrůd. Naopak, obsah dusíkatých látek v roce 2019 byl v průměru srovnatelný s rokem 2020, přičemž významně nižší byl v roce 2018. Protichůdnému trendu v obsahu tuků a dusíkatých látek odpovídá také zjištěná vzájemná negativní korelace, která byla již dříve popsána v rámci odborných studií jiných autorů. Bez ohledu na konkrétní odrůdu byl zjištěn také statisticky významně vyšší obsah tuku u studovaného souboru hnědosemenných odrůd v porovnání se žlutosemennými odrůdami. Hnědosemenné odrůdy rovněž vykazovaly vyšší výnosové parametry oproti žlutosemenným, přičemž hodnoty HTS byly vyšší signifikantně. Naopak, vyšší obsah dusíkatých látek byl zjištěn u žlutosemenných odrůd.

Z celkových čtyř nativních lignanů byly identifikovány pouze SDG a MATA. MATA byl však v porovnání s majoritním SDG přítomný pouze ve stopovém množství (Tab. 3). Obsah obou lignanů pozitivně koreloval s antioxidačními aktivitami, i celkovým obsahem polyfenolů, čímž byl prokázán významný podíl lignanů na biologické aktivitě semen lnu. Byl zjištěn významně vyšší obsah SDG a MATA u souboru žlutosemenných odrůd v porovnání s hnědosemennými. Zajímavé bylo rovněž zjištění, že obsah SDG, MATA, celkových polyfenolů i antioxidační aktivity v případě obou metod, byly statisticky významně vyšší u souboru českých odrůd v porovnání s odrůdami nizozemskými. Pro spolehlivější posouzení rozdílů v obsahu lignanů, případně souvisejících biologických aktivit, v závislosti na původu a barvě semen odrůd, nebo šlechtitelských cílů, by bylo vhodné použít širší výběr odrůd obou variant barev semen a různých proveniencí.

Tab.3: Rozmezí hodnot obsahu celkových polyfenolů, antioxidačních aktivit a lignanů v semenech šesti odrůd lnu setého získaných v rámci tříletého pěstitelského experimentu

SDG (mg/g s.)	MATA (μg/g s.)	TPC (mg EKG/ g s.)	DPPH (mg TE/g DM)	ABTS (mg TE/g DM)
4,9-12,2	1,6-3,4	1,1-2,5	4,6-6,4	4,2-7,1

SDG = secoisolariciresinol diglukosid, MATA = matairesinol, s. = sušina, EKG = ekvivalent kyseliny gallové, TE = ekvivalent troloxu

Výsledky této studie potvrdily značný význam odrůdy a srážkových podmínek pěstování na chemické složení, obsah lignanů a související antioxidační potenciál. V širším kontextu tak lze vyvozovat, že tyto faktory mohou ovlivňovat nutriční hodnotu a zdravotní potenciál semen lnu. Konkrétní poznatky získané v rámci této studie mohou být reflektovány v cíleném šlechtění a při optimalizaci podmínek pěstování pro zajištění požadované kvality semen lnu setého olejného.

4.3 Výtěžnost, funkční vlastnosti a antioxidační potenciál slizotvorných polysacharidů

Jarošová, M., Bárta, J., Bártová, V. (2018) Slizotvorné frakce v semenech olejného lnu a jejich antioxidační aktivita. *Vědecká příloha časopisu Úroda*, 66(12): 435-438.

Jarošová, M., Bárta, J., Bártová, V., Bjelková, M. (2020). Funkční vlastnosti slizotvorné frakce z lněného semene. *Vědecká příloha časopisu Úroda*, 68(12): 537-541

Slizotvorné polysacharidy lněného semene tvoří přibližně jednu třetinu dietární vlákniny. Jak bylo zmíněno v předchozích kapitolách, jejich přítomnost ve lněných semenech může být poměrně variabilní a závisí z velké části na fenotypu zdrojové rostliny. Podmínky extrakce pak ovlivňují nejenom složení lněného slizu, a související funkční vlastnosti a antioxidační potenciál, ale také samotnou výtěžnost slizu. Cílem první publikace této výsledkové části představovalo stanovení výtěžnosti, obsah polyfenolů a antioxidační aktivita slizů izolovaných ze semen šesti odrůd. Všechna data byla statisticky vyhodnocena pomocí metod analýzy variance, post-hoc testu a korelační analýzy.

V rámci experimentu byl lněný sliz semen šesti odrůd (Amon, Agriol, Raciol, Agram, Libra, Flanders) extrahován ve vodném prostředí po dobu 3 hodin při 50 °C v poměru 1:10 (semena:voda). Sliz byl následně vysušen a homogenizován do formy prášku. Pro zjištění antioxidačního potenciálu byl stanoven obsah celkových polyfenolů pomocí Folin-Ciocalteuova činidla a antioxidační aktivita, použitím spektrofotometrických metod založených na principu zhášení radikálů ABTS a DPPH.

Výtěžnost slizu přepočítaná na sušinu se mezi odrůdami statisticky významně lišila. Nejvyšší výtěžnost byla zjištěna u odrůdy Agram a nejmenší u odrůdy Libra. Odrůdová variabilita ve výtěžnosti byla prokázána i v rámci jiných relevantních studií. Naopak, sliz

získaný ze semen odrůdy Agram vykázal nejnižší celkový obsah polyfenolů a antioxidační aktivitu v případě obou metod (TPC: 0,5 mg EKG/g; ABTS: 1,7 mg EKA/g; DPPH: 0,3 mg EKA/g). Nejvyšší hodnoty těchto parametrů byly naopak zjištěny u odrůdy Agriol (TPC: 6,7; ABTS: 8,7; DPPH: 2,3). Rozdíl v obsahu celkových polyfenolů a antioxidační aktivity byl mezi odrůdami signifikantní a byla u nich rovněž prokázána vzájemná, statisticky významná pozitivní korelace.

Na základě získaných výsledků lze vyvozovat, že odrůda má zásadní podíl na výtěžnosti slizu a jeho antioxidačním potenciálu, který nemusí být v případě vybraných odrůd bezvýznamný. Tato zjištění mohou představovat cennou informaci pro šlechtitele, jež mohou cíleným šlechtěním odrůd lnu ovlivňovat nejenom potenciální výtěžnost a funkční vlastnosti slizotvorné frakce, ale také její biologickou aktivitu.

Funkční vlastnosti lněného slizu a možnosti jejich uplatnění, zejména v oblastech potravinářství a specializované výživy, jsou v posledních letech častým předmětem mnoha odborných studií. Ačkoli bylo zjištěno, že chemické složení lněného slizu a funkční vlastnosti jsou ovlivněny genotypem i podmínkami extrakce, většina prací sleduje pouze faktory extrakce slizu a jeho modifikace na uvedené parametry. Vliv genotypu, respektive odrůdy, na funkční vlastnosti tak zůstává spíše ojedinělým tématem výzkumu. Cílem publikace bylo studium rozpustnosti, bobtnavosti, emulgační aktivity a schopnosti stabilizovat emulze u slizů šesti odrůd lnu setého.

V rámci experimentu byl lněný sliz semen šesti (Amon, Agriol, Raciol, Agram, Libra, Flanders) odrůd extrahován ve vodném prostředí po dobu 3 hodin při 50 °C v poměru 1:10 (semena:voda). Sliz byl následně vysušen a homogenizován do formy prášku. Rozpustnost a bobtnavost slizu byla stanovena gravimetricky podle příslušné metodiky. Indexy emulgační aktivity a emulgační stability byly spočítány dle příslušných vzorců na základě stanovení turbidity emulze typu „olej ve vodě“, vzniklé působením lněného slizu. Data byla statisticky vyhodnocena pomocí parametrických (jednocestná analýza variance a Tukeyho HSD test) a neparametrických (Kruskal-Wallisův a odpovídající post-hoc test pro mnohonásobné porovnání) testů.

Rozpustnost slizů dosahovala u všech odrůd více než 70 % a v rozmezí hodnot 72,9-79,7 % byly rozdíly v rozpustnosti slizů mezi odrůdami statisticky významné. Naopak, u parametru bobtnavosti významná odlišnost zjištěna nebyla, ačkoli rozdíl mezi nejnižší hodnotou 12,1 g vody/g slizu (Amon) a nejvyšší hodnotou 18,6 g vody/g slizu (Agram) byl poměrně výrazný. Index emulgační aktivity byl u odrůdy Raciol výrazně vyšší (259,9 m²/g slizu) než u zbývajících odrůd (77,4-143,3 m²/g slizu). Slizy všech odrůd měly schopnost tvořit stabilní emulze ve vodě. Index emulgační stability byl mezi odrůdami statisticky významný, přičemž se pohyboval v rozmezí 55,9 % (Agriol) a 87,0 % (Raciol). Ze šesti studovaných odrůd prokázala odrůda Raciol nejlepší schopnost tvořit stabilní emulze.

Tato studie prokázala významné rozdíly mezi odrůdami v parametrech rozpustnosti a schopnosti stabilizovat emulze. Ačkoli bobtnavost a emulgační aktivita se významně mezi slizy studovaných odrůd nelišily, rozdíly byly znatelné. Na příkladu odrůdy Raciol, jež ve schopnosti tvořit stabilizované emulze převyšovala ostatní odrůdy, je nejvíce patrný vliv samotné odrůdy

na vybrané funkční vlastnosti extrahovaného slizu. Z tohoto důvodu může být odrůda zohledňována jako důležitý faktor pro získání lněného slizu o požadovaných vlastnostech.

4.4 Popis bílkovinného profilu lněných semen a možnost přípravy bílkovinných produktů z výliskové mouky

Jarošová, M., Roudnický, P., Bárta, J., Zdráhal, Z., Bártová, V., Stupková, A., Lorenc, F., Bjelková, M., Kyselka, J., Jarošová, E., Bedrníček, J., Bohatá, A. (2024). Proteomic Profile of Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) Products as Influenced by Protein Concentration Method and Cultivar. *Foods*, 13(9): 1288.

Bílkoviny lněného semene představují přibližně jednu pětinu hmotnosti čerstvých semen. Celkové spektrum bílkovin lněného semene je zastoupeno až 80% obsahem zásobních 11S (365 kDa) a 12S (294 kDa) globulinů, zbývající část je tvořena zejména 1,6-2S albuminy o velikosti 16-18 kDa a dalšími skupinami bílkovin, zejména 7S zásobními bílkoviny, oleosiny, bílkoviny pozdní embryogeneze a důležitými enzymy spojenými s metabolismem. Detailnější informace o proteomu lněných semen a související studie jsou však poměrně vzácné. Cílem publikace „Proteomic profile of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) products as influenced of protein concentration method and cultivar“ bylo zejména rozšíření poznatků a variability proteomu lněných semen v rámci tří modelových odrůd lnu setého a jejich produktů na úrovni výlisků, jemné výliskové mouky a bílkovinného koncentrátu.

Jako výchozí materiál byla použita semena dvou českých odrůd (Agriol, Raciol) a jedné nizozemské odrůdy (Libra). Semena byla nejprve odslizena máčením a odtučněna lisováním, čímž byly připraveny lněné výlisky. Výlisky byly poté pomlety na výliskovou mouku, jež byla následně proseta pomocí 250 μm síta do podoby jemné mouky obsahující především látky vnitřní části semen (zbytkové tuky a bílkoviny). Proséváním byly tyto látky odděleny od zbývajících složek obalu semen, především nerozpustné vlákniny (lignocelulosa) a reziduální rozpustné vlákniny (slizotvorné polysacharidy). Z jemné mouky byl následně připraven pomocí postupných kroků, zahrnující alkalickou extrakci \rightarrow isoelektrickou precipitaci \rightarrow neutralizaci pH \rightarrow lyofilizaci, připraven bílkovinný koncentrát. Pomocí ověřených postupů bylo stanoveno základní chemické složení semen a získaných produktů. Následně byla použita jednodemnzionální elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) pro separaci bílkovin na základě velikosti jejich podjednotek, čímž byl získán základní bílkovinný profil jednotlivých vzorků. Detailní sestavení bílkovinného spektra bylo provedeno pomocí LC-MS/MS analýzy a proteomického zpracování získaných dat. Pro statistické hodnocení byla použit metoda dvoucestné analýzy variance a Tukeyho HSD test.

Elektroforetická analýza detekovala u všech tří produktů přítomnost čtyř bílkovinných frakcí: conlinin + oleosin, bazické podjednotky 11S globulinu, kyselá podjednotky 11S globulinu a proteinová frakce o velikosti 48 kDa. Výsledky analýz chemického složení (Tab. 4) potvrdily nárůst relativního obsahu dusíkatých látek, kdy pomocí postupných kroků došlo k celkovému 4 až 4,5násobnému zakoncentrování dusíkatých látek. Naopak došlo k významnému snížení koncentrace tuku, zejména po lisování oleje a sacharidů při jejich separaci při přípravě bílkovinného koncentrátu. Rozdíly mezi odrůdami byly v případě

jednotlivých konstituentů patrné, nicméně výše zmiňovaný trend ve změnách obsahu tří majoritních složek u jednotlivých produktů byl srovnatelný.

Tab.4: Rozmezí hodnot základních konstituentů v semenech a jeho produktů u tří odrůd (Agriol, Raciol a Libra) lnu setého

	% čerstvé hmoty			
	celá semena	výlisky	jemná mouka	bílkovinný koncentrát
bílkoviny	17,1-18,0	29,3-30,4	33,9-36,0	70,1-78,34
tuk	37,8-40,8	8,5-9,5	10,9-12,2	2,4-5,0
sacharidy	31,9-34,9	46,3-48,0	36,9-39,7	9,78-19,4
popeloviny	3,4-3,5	5,3-5,8	6,3-7,0	2,7-2,8
voda	6,0-6,5	8,0-8,6	7,9-8,2	5,3-6,8

LS-MS/MS analýza potvrdila přítomnost 2560 proteinových skupin (PGs, *protein groups*) v rámci souboru všech hodnocených produktů lněného semene, nicméně ne všechny PGs bylo možné blíže charakterizovat z důvodu chybějících anotací těchto skupin v databázích v rámci taxonu lnu setého. Pouze 33 PGs pak představovalo 69-95 % relativního zastoupení všech bílkovin daných produktů lněného semen. Bylo zjištěno, že kombinací alkalického srážení a kyselá isoelektrické precipitace došlo k zvýšení podílu 11S globulinu z 41-44 % na hodnotu 72-84 %, ukazující významný vliv procesu zakoncentrování bílkovin na obsah globulinů v cílovém produktu. Globuliny tedy představovaly nejvíce abundantní typ bílkovin v rámci všech identifikovaných PGs. Druhou nejvíce abundantní skupinu (9-13 %) pak byla frakce 2S albuminů, jež byla nejvíce zastoupena v jemné výliskové mouce. Překvapivá byla relativně vysoká abundance chitinas ve výliscích a jemné výliskové mouce (5-10 %). Obsah dalších enzymů důležitých pro metabolismus v rámci těchto produktů činil 6%, zastoupení oleosinů 2-4 % a 2-3 % představovaly stresové bílkoviny. Zbývající, poměrně značnou, část bílkovin (26-31 %) v rámci výlisků a jemné mouky pak nebylo možné určit.

Výsledky této práce korespondovaly s předchozími studii z hlediska převažujícího obsahu globulinů. Práce zároveň ukázala na poměrně výraznou přítomnost neidentifikovaných skupin bílkovin a překvapivě vysokou abundanci chitinas. Přestože faktor odrůdy neměl zanedbatelný vliv na relativní zastoupení jednotlivých skupin bílkovin, vliv výsledného produktu, respektive procesu zakoncentrování bílkovin, byl významně vyšší.

4.5 Charakterizace, funkční vlastnosti, antioxidační potenciál lněných výlisků a možnost jejich využití pro fortifikaci potravin

Bárta, J., Bártová, V., **Jarošová, M.**, Švajner, J., Smetana, P., Kadlec, J., Filip, V., Kyselka, J., Berčíková, M., Zdráhal, Z., Bjelková, M., Kozak, M. (2021). Oilseed Cake Flour Composition, Functional Properties and Antioxidant Potential as Effects of Sieving and Species Differences. *Foods*, 10(11): 2766.

Jak bylo uvedeno v předchozích publikacích, prosévání výliskové mouky je možné získat přinejmenším dvě velikostní frakcí. Při použití více sít je možné celkovou výliskovou mouku

či dílčí velikostní frakce dále separovat. Zatímco jemná frakce se obecně vyznačuje zvýšeným obsahem bílkovin, hrubá frakce obsahuje větší částice tvořené především homogénátem semenných slupek, které se vyznačují vysokým zastoupením polyfenolických látek. V rámci prvního výstupu této části, představující původní studii, bylo stanoveno základní chemické složení celkové, jemné a hrubé frakce výliskové mouky, jejich funkčních vlastností, biologické aktivity a barvy u osmi olejných rostlin – lnu setého (*Linum usitatissimum* L.), konopí setého (*Cannabis sativa* L.), ostropestřce mariánského e (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.), máku setého (*Papaver somniferum* L.) (*Cucurbita pepo* L. var. *oleifera*), tykve olejné, světlice barvířské (*Carthamus tinctorius* L.), brukve řepky olejky (*Brassica napus* L.) a slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.).

Výlisky byly získány lisováním semen za studena využitím poloprofesionálního hydraulického lisu při teplotě nižší než 50 °C. Příprava výliskové mouky byla provedena z výlisků dle ověřeného postupu (Obr. 16). Velikostní frakce byly získány prosíváním celkové výliskové mouky pomocí sít s velikostí otvorů 250 µm. Vzorke výliskové mouky byly použity pro zjištění obsahu celkových tuků, dusíkatých látek, popelovin a vody. Obsah sacharidů (vlákniny) byl stanoven dopočtem. Pomocí SDS-PAGE byly vizualizovány bílkovinné profily jednotlivých vzorků mouk. Funkční vlastnosti byly analyzovány dle postupů vycházejících z odborné vědecké literatury. Antioxidační aktivita byla stanovena pomocí spektrofotometrických metod založených na principu zhášení radikálů ABTS a DPPH a celkový obsah polyfenolů pomocí metody s využitím Folin-Ciocalteuova činidla. Barva mouk byla stanovena kolorimetricky. Získané výsledky byly statisticky vyhodnoceny.

Na základě získaných výsledků byly v případě lnu prokázány relativně velké rozdíly v obsahu dusíkatých látek, tuků a polysacharidů mezi analyzovanými vzorky. Oproti ostatním plodinám se len vyznačoval nejnižším obsahem popelovin a nejvyšším obsahem zbytkového tuku. V rámci funkčních vlastností byla zjištěna vyšší rozpustnost u jemné mouky (26,7 %), oproti celkové mouce (21,8 %) a hrubé mouce (22,3 %), přičemž vyšších hodnot dosahovala pouze výlisková mouka ze semen řepky (v průměru 26,3 %). Tepelné ošetření významně zlepšilo vaznost vody (4,1 → 8,0 g/g mouky). V průměru pak lněná výlisková mouka disponovala nejvyššími hodnotami vaznosti vody a tuků a také druhou nejvyšší rozpustností ve vodě. Obsah polyfenolů činil 3,6 mg EKG/g jemné mouky a 6,1 mg EKG/g hrubé mouky, přičemž v hrubé mouce byla zjištěna hodnota 7,4 mg EKG/g hrubé mouky, která byla vyšší pouze u slunečnice a ostropestřce. Rovněž v případě antioxidačních aktivit byly u lnu zjištěny nejvyšší hodnoty u hrubé mouky, čímž se opět potvrdil předpoklad o nejvyšší koncentraci antioxidantů v obalových vrstvách semene. Barva výliskových mouk byla u všech plodin ovlivněna proséváním. Konkrétně byla jemná mouka, s výjimkou máku, vždy světlejší v porovnání s celkovou a hrubou moukou.

Výliskové mouky různých druhů olejnin mohou představovat cenný materiál z hlediska nutriční hodnoty, funkčních vlastností nebo přítomnosti biologicky aktivních látek. Z celkového pohledu byl zjištěn významný vliv plodiny a velikostní frakce na studované parametry. Nicméně, díky studiu materiálu z osmi rozdílných druhů olejnin bylo rovněž zjištěno, že použití metody prosévání za účelem zlepšení uvedených vlastností nemusí přinést u všech studovaných plodin požadovaný efekt. V případě lnu setého byl však efekt prosévání významný. Zatímco jemná mouka vykazovala oproti celkové mouce vyšší obsah bílkovin a lepší rozpustnost, hrubá frakce poskytovala lepší hodnoty ostatních studovaných funkčních

vlastností, vyšší obsah polyfenolů a související antioxidační potenciál. V rámci souboru studovaných olejin vykazovaly výliskové produkty lnu nejvyšších hodnot u všech funkčních parametrů s výjimkou rozpustnosti, kde však dosáhly lepších hodnot pouze výlisky řepky olejky. Na základě těchto zjištění lze poukázat na potenciál využití lněných výlisků, respektive jejich velikostních derivátů, jako nutričně kvalitních a funkčních složek potravinářských výrobků.

5 ZÁVĚR

Disertační práce byla v širším měřítku zaměřena na charakterizaci a studium vybraných vlastností tří významných komponentů lněného semene, konkrétně bílkovin, slizotvorných látek a fenolových látek, především lignanů. Výsledky této práce, jejímž předpokladem bylo splnění navržených cílů a zodpovězení stanovených hypotéz lze shrnout v následujících bodech:

- Na základě syntézy informací vyskytujících se v odborné vědecké literatuře, a jejich podrobné kritické diskuzi, bylo možné poskytnout detailní celkový přehled o fyzikálně-chemických charakteristikách a funkčních vlastnostech lněných bílkovin a slizotvorných polysacharidů. Zároveň byl pozitivně vyhodnocen značný dosavadní i budoucí potenciál v tradičních i inovativních aplikacích v oblastech potravinářství a výživy.
- V rámci komplexní studie kombinující polní experiment a laboratorní analýzy bylo u lněných semen vybraných odrůd stanoveno základní chemické složení, obsah polyfenolů, antioxidační aktivity a byla provedena kvantifikace relevantních lignanů v podobě secoisolariciresinol diglukosidu a matairesinolu. Na základě výsledků byl potvrzen zásadní vliv odrůdy a ročníku (počasí), či jejich kombinace, na většinu uvedených parametrů.
- Byly potvrzeny významné rozdíly mezi vybranými odrůdami lnu v parametrech výtěžnosti slizotvorných polysacharidů, jejich antioxidačních aktivitách a funkčních vlastnostech v podobě rozpustnosti a schopnosti stabilizovat emulze. Znatelné rozdíly byly rovněž pozorovány u parametrů bobtnavosti a emulgační aktivity. Odrůda Raciol významně převyšovala ostatní odrůdy (přibližně 2x) v indexu emulgační aktivity a indexu stability emulze, čímž byl jasně potvrzen vliv odrůdy na stanovované funkční vlastnosti extrahovaného slizu.
- Analýza proteomu celkové vyliskové mouky, jemné vyliskové mouky a bílkovinného koncentrátu identifikovala 2560 proteinových skupin s významně převažujícím zastoupením 11S globulinů, následované 2S albuminy a překvapivě také chitinasami. Ostatní enzymy, oleosiny a stresové bílkoviny představovaly další skupiny identifikovaných proteinů. Necelá třetina spektra bílkovin představovaly neidentifikované skupiny bílkovin. Vliv odrůdy nebyl zanedbatelný, nicméně větší efekt na spektrum bílkovin měl samotný výsledný produkt, respektive proces zakoncentrování bílkovin, a to zejména z pohledu významného relativního nárůstu obsahu globulinů.
- Bylo prokázáno, že mechanickým lisováním semen nebo plodů lze podle druhu dané olejiny získávat vylisky různého chemického složení, funkčního a biologického potenciálu. V případě lnu bylo navíc prokázáno, že lze pomocí prosévání (suchý proces) získávat velikostní frakce vyliskových mouk s odlišným obsahem komponentů, determinující jejich možnosti aplikací. V rámci souboru studovaných olejnin dosahovaly vyliskové produkty lnu nejvyšších hodnot u všech studovaných funkčních parametrů, kromě rozpustnosti, kdy vykázala lepší hodnotu pouze vylisková mouka ze

semen řepky. Tímto byl potvrzen významný potenciál lněných výlisků a odvozených produktů pro použití v potravinářství.

Dosažením výsledků, jež jsou součástí odborných výstupů v podobě metodické publikace, původních výzkumných prací a komplexních přehledových prací, byly splněny hlavní i dílčí cíle této disertační práce. Rovněž byly potvrzeny všechny hypotézy, které si kladly za cíl prokázat významný vliv odrůdy, pěstitelských podmínek, a také přípravy a následné zpracování výliskové mouky, na chemické složení, od něhož se odvíjejí funkční vlastnosti a biologické aktivity získaného materiálu. S pozitivním výsledkem byly také vyhodnoceny možnosti využití produktů lněných semen pro tvorbu zušlechtěných potravinářských výrobků, a rovněž také možnost jejich uplatnění v méně tradičních a inovativních potravinářských či dietárních aplikacích.

Disertační práce v důsledku potvrzuje a zdůrazňuje značnou perspektivu využití lněného semene a jeho produktů v různých oborech týkající se lidské výživy a zdraví, a může zároveň sloužit jako zdroj pro další výzkum v této oblasti.

Výzkumné hypotézy

Níže je uveden přehled jednotlivých hypotéz a souvisejících odpovědí vyjadřující jejich zamítnutí nebo potvrzení.

Hypotéza 1

Znění hypotézy: Proteomický profil lněného semene vykazuje odlišnosti v závislosti na odrůdě nebo koncentraci bílkovin v produktech vyrobených z výliskové mouky.

Potvrzení/zamítnutí hypotézy: Na základě provedených analýz se **potvrdila** výše uvedená hypotéza. Vliv odrůdy nebyl zanedbatelný, ale větší efekt na spektrum bílkovin měl způsob zakoncentrování bílkovin, a to z pohledu významného relativního nárůstu obsahu globulinů.

Hypotéza 2

Znění hypotézy: Odrůda olejného lnu, podmínky pěstování, či kombinace těchto faktorů významně ovlivňuje chemické složení, obsah lignanů a antioxidační potenciál semen lnu.

Potvrzení/zamítnutí hypotézy: Na základě provedených experimentů se **potvrdila** výše uvedená hypotéza. Odrůda a ročník mají významný vliv na chemické složení, obsah lignanů a antioxidační aktivitu.

Hypotéza 3

Znění hypotézy: Funkční vlastnosti a antioxidační aktivita slizotvorných polysacharidů jsou determinovány odrůdou a podmínkami pěstování lnu.

Potvrzení/zamítnutí hypotézy: Výsledky provedených experimentů **potvrdily** významné rozdíly mezi vybranými odrůdami lnu a ročníkem ve výtěžnosti slizotvorných polysacharidů, antioxidační aktivitě a funkčních vlastnostech.

Hypotéza 4

Znění hypotézy: Využitím optimalizovaných metod zpracování semen olejného lnu lze získat výliskovou mouku různých charakteristik, včetně možností jejího použití pro zušlechtní potravinářských výrobků.

Potvrzení/zamítnutí hypotézy: Výsledky provedených experimentů **potvrdily** výše uvedenou hypotézu. Proséváním původní, nefrakcionované výliskové mouky lze získat dílčí velikostní frakce s odlišným obsahem komponentů, zejména bílkovin, nerozpustné vlákniny a polyfenolických látek, determinující různé možnosti využití prosévaných výliskových mouk.

Hypotéza 5

Znění hypotézy: Bílkoviny a slizotvorné polysacharidy mohou být díky svým vlastnostem uplatnitelné pro tradiční i inovativní potravinářské aplikace a dietární účely.

Potvrzení/zamítnutí hypotézy: Výsledky v podobě dvou komplexních přehledových publikací **potvrdily** značný potenciál bílkovin a slizotvorných polysacharidů v tradičních i inovativních oblastech potravinářských aplikací a výživy. Oba typy hydrokoloidů představují plnohodnotnou alternativu k nejčastěji využívaným rostlinným bílkovinám a gumám. Možné využití lněného slizu v pokročilých potravinářských aplikacích je v současnosti intenzivně studovaným tématem, což dokládá velké množství recentních odborných publikací.

6 SEZNAM LITERATURY

- Austria, J. A., Richard, M. N., Chahine, M. N., Edel, A. L., Malcolmson, L. J., Dupasquier, C. M. C., & Pierce, G. N. (2008). Bioavailability of Alpha-Linolenic Acid in Subjects after Ingestion of Three Different Forms of Flaxseed. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(2), 214-221.
- Beejmohun, V., Fliniaux, O., Grand, É., Lamblin, F., Bensaddek, L., Christen, P., Kovensky, J., Fliniaux, M.-A., & Mesnard, F. (2007). Microwave-assisted extraction of the main phenolic compounds in flaxseed. *Phytochemical Analysis*, 18(4), 275-282.
- Bekhit, A. E.-D. A., Shavandi, A., Jodjaja, T., Birch, J., Teh, S., Mohamed Ahmed, I. A., Al-Juhaimi, F. Y., Saeedi, P., & Bekhit, A. A. (2018). Flaxseed: Composition, detoxification, utilization, and opportunities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 13, 129-152.
- Bloedon, L. T., & Szapary, P. O. (2004). Flaxseed and Cardiovascular Risk. *Nutrition Reviews*, 62(1), 18-27.
- Dahl, W. J., Lockert, E. A., Cammer, A. L., & Whiting, S. J. (2005). Effects of Flax Fiber on Laxation and Glycemic Response in Healthy Volunteers. *Journal of Medicinal Food*, 8(4), 508-511.
- Dzuvor, C. K. O., Taylor, J. T., Acquah, C., Pan, S., & Agyei, D. (2018). Bioprocessing of Functional Ingredients from Flaxseed. *Molecules*, 23(10), 2444.
- Fuentealba, C., Figuerola, F., Estévez, A. M., González-Muñoz, A., & Muñoz, O. (2015). Optimization of secoisolariciresinol diglucoside extraction from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) and isolation by a simple HPLC-UV method. *CyTA – Journal of Food*, 13(2), 273-281.
- Giacomino, S., Peñas, E., Ferreyra, V., Pellegrino, N., Fournier, M., Apro, N., Olivera Carrión, M., & Frias, J. (2013). Extruded Flaxseed Meal Enhances the Nutritional Quality of Cereal-based Products. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68(2), 131-136.
- Goyal, A., Sharma, V., Upadhyay, N., Gill, S., & Sihag, M. (2014). Flax and flaxseed oil: an ancient medicine & modern functional food. *Journal of Food Science and Technology*, 51(9), 1633-1653.
- Hadad, S., & Goli, S. A. H. (2018). Fabrication and characterization of electrospun nanofibers using flaxseed (*Linum usitatissimum*) mucilage. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 408-414.
- Hanif Palla, A., & Gilani, A.-H. (2015). Dual effectiveness of Flaxseed in constipation and diarrhea: Possible mechanism. *Journal of Ethnopharmacology*, 169, 60-68.
- Hao, M., & Beta, T. (2012). Qualitative and quantitative analysis of the major phenolic compounds as antioxidants in barley and flaxseed hulls using HPLC/MS/MS. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(10), 2062-2068.

- Herchi, W., Arráez-Román, D., Trabelsi, H., Bouali, I., Boukhchina, S., Kallel, H., & Fernández-Gutierrez, A. (2014). Phenolic Compounds in Flaxseed: a Review of Their Properties and Analytical Methods. An Overview of the Last Decade. *Journal of Oleo Science*, 63(1), 7-14.
- Hu, Y., Shim, Y. Y., & Reaney, M. J. T. (2020). Flaxseed Gum Solution Functional Properties. *Foods*, 9(5), 681.
- Chung, M. W. Y., Lei, B., & Li-Chan, E. C. Y. (2005). Isolation and structural characterization of the major protein fraction from NorMan flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *Food Chemistry*, 90(1), 271-279.
- Kajla, P., Sharma, A., & Sood, D. R. (2015). Flaxseed—a potential functional food source. *Journal of Food Science and Technology*, 52(4), 1857-1871.
- Kasote, D. M. (2013). Flaxseed phenolics as natural antioxidants. *international food research journal*, 20(1), 27-34.
- Kaur, M., Kaur, R., & Gill, B. S. (2017). Mineral and amino acid contents of different flaxseed cultivars in relation to its selected functional properties. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(2), 500-511.
- Kaushik, P., Dowling, K., Adhikari, R., Barrow, C. J., & Adhikari, B. (2017). Effect of extraction temperature on composition, structure and functional properties of flaxseed gum. *Food Chemistry*, 215, 333-340.
- Krajčová, A., Schulzová, V., Hajšlová, J., & Bjelková, M. (2009). Lignans in Flaxseed. *Czech Journal of Food Sciences*, 27, S252-S255.
- Krause, J.-P., Schultz, M., & Dudek, S. (2002). Effect of extraction conditions on composition, surface activity and rheological properties of protein isolates from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(9), 970-976.
- Liu, J., Shim, Y. Y., Poth, A. G., & Reaney, M. J. T. (2016). Conlinin in flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) gum and its contribution to emulsification properties. *Food Hydrocolloids*, 52, 963-971.
- Liu, J., Shim, Y. Y., Tse, T. J., Wang, Y., & Reaney, M. J. T. (2018). Flaxseed gum a versatile natural hydrocolloid for food and non-food applications. *Trends in Food Science & Technology*, 75, 146-157.
- Lockwood, G. B. (2009). Chapter 32 - The plant nutraceuticals. In W. C. Evans & D. Evans (Eds.), *Trease and Evans' Pharmacognosy (Sixteenth Edition)* (pp. 459-470). W.B. Saunders.
- Luyengi, L., Pezzuto, J. M., Waller, D. P., Beecher, C. W. W., Fong, H. H. S., Che, C.-T., & Bowen, P. E. (1993). Linusitamarin, a New Phenylpropanoid Glucoside from *Linum usitatissimum*. *Journal of Natural Products*, 56(11), 2012-2015.

- Madhusudhan, K. T., & Singh, N. (1985a). Isolation and characterization of the major fraction (12 S) of linseed proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33(4), 673-677.
- Madhusudhan, K. T., & Singh, N. (1985b). Isolation and characterization of a small molecular weight protein of linseed meal. *Phytochemistry*, 24(11), 2507-2509.
- Marcone, M. F., Kakuda, Y., & Yada, R. Y. (1998). Salt-soluble seed globulins of various dicotyledonous and monocotyledonous plants—I. Isolation/purification and characterization. *Food Chemistry*, 62(1), 27-47.
- Meagher, L. P., Beecher, G. R., Flanagan, V. P., & Li, B. W. (1999). Isolation and Characterization of the Lignans, Isolariciresinol and Pinosresinol, in Flaxseed Meal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(8), 3173-3180.
- Morris, D. H. (2007). *Flax: A Health and Nutrition Primer*. Flax Council of Canada.
- Nwachukwu, I. D., & Aluko, R. E. (2018). Physicochemical and emulsification properties of flaxseed (*Linum usitatissimum*) albumin and globulin fractions. *Food Chemistry*, 255, 216-225.
- Oatway, L., Vasanthan, T., & Helm, J. H. (2001). PHYTIC ACID. *Food Reviews International*, 17(4), 419-431.
- Oomah, B. D., & Mazza, G. (1993). Flaxseed proteins—a review. *Food Chemistry*, 48(2), 109-114.
- Oomah, B. D., Kenaschuk, E. O., & Mazza, G. (1996). Phytic Acid Content of Flaxseed As Influenced by Cultivar, Growing Season, and Location. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9), 2663-2666.
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2, 897484.
- Parikh, M., Netticadan, T., & Pierce, G. N. (2018). Flaxseed: its bioactive components and their cardiovascular benefits. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 314(2), H146-H159.
- Rodriguez-Leyva, D., Bassett, C. M. C., McCullough, R., & Pierce, G. N. (2010). The cardiovascular effects of flaxseed and its omega-3 fatty acid, alpha-linolenic acid. *Canadian Journal of Cardiology*, 26(9), 489-496.
- Roulard, R., Petit, E., Mesnard, F., & Rhazi, L. (2016). Molecular investigations of flaxseed mucilage polysaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, 840-847.
- Rubilar, M., Gutiérrez, C., Verdugo, M., Shene, C., & Sineiro, J. (2010). Flaxseed as a source of functional ingredients. *Journal of soil science and plant nutrition*, 10, 373-377.

- Safdar, B., Pang, Z., Liu, X., Jatoi, M. A., Mehmood, A., Rashid, M. T., Ali, N., & Naveed, M. (2019). Flaxseed gum: Extraction, bioactive composition, structural characterization, and its potential antioxidant activity. *Journal of Food Biochemistry*, 43(11), e13014.
- Shim, Y. Y., Gui, B., Arnison, P. G., Wang, Y., & Reaney, M. J. T. (2014). Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) bioactive compounds and peptide nomenclature: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 38(1), 5-20.
- Sicilia, T., Niemeyer, H. B., Honig, D. M., & Metzler, M. (2003). Identification and Stereochemical Characterization of Lignans in Flaxseed and Pumpkin Seeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(5), 1181-1188.
- Singh, K. K., Mridula, D., Rehal, J., & Barnwal, P. (2011). Flaxseed: A Potential Source of Food, Feed and Fiber. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(3), 210-222.
- Struijs, K., Vincken, J.-P., Verhoef, R., van Oostveen-van Casteren, W. H. M., Voragen, A. G. J., & Gruppen, H. (2007). The flavonoid herbacetin diglucoside as a constituent of the lignan macromolecule from flaxseed hulls. *Phytochemistry*, 68(8), 1227-1235.
- Troshchynska, Y., Bleha, R., Kumbarová, L., Sluková, M., Sinica, A., & Štětina, J. (2019). Discrimination of flax cultivars based on visible diffusion reflectance spectra and colour parameters of whole seeds. *Czech Journal of Food Sciences*, 37(3), 199-204.
- Vieira, J. M., Mantovani, R. A., Raposo, M. F. J., Coimbra, M. A., Vicente, A. A., & Cunha, R. L. (2019). Effect of extraction temperature on rheological behavior and antioxidant capacity of flaxseed gum. *Carbohydrate Polymers*, 213, 217-227.
- Wanasundara, J. P. D., & Shahidi, F. (1994). Alkanol-ammonia-water/hexane extraction of flaxseed. *Food Chemistry*, 49(1), 39-44.
- Wu, S., Wang, X., Qi, W., & Guo, Q. (2019). Bioactive protein/peptides of flaxseed: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 92, 184-193.