



Fakulta zemědělská
a technologická
Faculty of Agriculture
and Technology

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Fakulta zemědělská a technologická

Katedra:

Rostlinné výroby

Studijní program:

Fytotechnika

Studijní obor:

Speciální produkce rostlinná

Téma disertační práce:

**Charakterizace bílkovin, rozpustných slizů a fenolových látek
získaných ze semen olejného lnu (*Linum usitatissimum* L.)**

Autor:

Ing. Markéta Jarošová

Školitel:

doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.

2024

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně podle pokynu vedoucího práce a za použití uvedené literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své disertační práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich webových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací *Theses.cz* provozovanou *Národním registrem vysokých kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů*.

.....

Ing. Markéta Jarošová

V Českých Budějovicích dne

Dedikace

Výsledky uvedené v rámci této disertační práce byly získány za finanční podpory grantů:

- **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

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. Ing. Janu Bártovi, Ph.D. za příležitost věnovat se plodině, jako je len setý olejní, dále za odborné vedení, připomínky během mého studia a pomoc při zpracování této práce. Také bych chtěla poděkovat doc. Ing. Veronice Bártové, Ph.D., za podporu a cenné rady. Největší poděkování patří mému příteli, který mi byl vždy oporou, neustále nápomocen a nedovolil mi vzdát se před dokončením této práce. A v neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině, která mě vždy podporovala po celou dobu mého studia.

Seznam použitých zkratk

ABTS – 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát); chemikálie, název chemické metody

ACE – angiotensin converting enzyme: angiotensin-konvertující enzym

ALA – alpha-linoleic acid: alfa-linolenová kyselina; název mastné kyseliny

BCB – β -carotene bleaching assay: metoda odbarvování β -karotenu; název chemické metody

CLPs – cyclolinopeptides: cyklolinopeptidy

DPPH – 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl; chemikálie, název chemické metody

EKA – ekvivalent kyseliny askorbové; jednotka vyjádření antioxidační aktivity

EKG – ekvivalent kyseliny gallové; jednotka vyjádření celkového obsahu polyfenolů

FG – flaxseed gum: lněný sliz

FP – flaxseed proteins: bílkoviny lněného semene

GC-MS – liquid chromatography – mass spectrometry: plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií; název analytické a separační metody

HPLC – high performance liquid chromatography: vysokoúčinná kapalinová chromatografie; název analytické a separační metody

HSCCC – high-speed countercurrent chromatography: protiproudá chromatografie; název analytické a separační metody

HTS – hmotnost tisíce semen;

LARI – lariciresinol; lignan

LC-MS/MS – liquid chromatography – tandem mass spectrometry: kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií; název analytické a separační metody

MATA – matairesinol; lignan

MKS – milion klíčivých semen

PGs – protein groups: proteinové skupiny

PINO – pinoresinol; lignan

SDG – secoisolariciresinol diglucoside: secoisolariciresinol diglukosid; lignan

SDS-PAGE – dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis: elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného, biochemická separační metoda

SECO – secoisolariciresinol; lignan

SPE – solid phase extraction: extrakce na pevné fázi; název extrakční metody

TAC – total antioxidant activity: celkový antioxidační aktivita; název chemické metody

TE – ekvivalent troloxu; jednotka vyjádření celkové antioxidační aktivity

TPC – total polyphenol content: celkový obsah polyfenolů; název chemické – metody

TROLOX – 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid; název chemické látky (analog vitamínu E)

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 sensorické 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 lnění 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 bílkovinami. 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 olejných 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 olejin 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 olejin. 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 | 17 |
| 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED | 19 |
| 2.1 Pěstování lnu setého olejného | 19 |
| 2.1.1 Taxonomie a rozmnožování..... | 19 |
| 2.1.2 Šlechtitelské směry | 21 |
| 2.1.3 Biologická charakteristika..... | 22 |
| 2.1.4 Agroekologické požadavky na pěstování lnu setého | 26 |
| 2.1.5 Založení porostu..... | 28 |
| 2.1.6 Integrovaná ochrana..... | 29 |
| 2.2. Nutriční parametry semen lnu | 31 |
| 2.2.1 Tuhy | 32 |
| 2.2.2 Nerozpustná vlákna..... | 33 |
| 2.2.3 Vitamíny, minerály a ostatní látky | 34 |
| 2.3. Lněný sliz | 35 |
| 2.3.1 Celkové složení | 35 |
| 2.3.2 Sacharidové složení slizotvorné frakce..... | 37 |
| 2.3.3 Možnosti extrakce lněného slizu..... | 38 |
| 2.3.4 Funkční vlastnosti lněného slizu | 41 |
| 2.3.5 Biologické aktivity lněného slizu..... | 43 |
| 2.3.6 Uplatnění lněného slizu v praktických aplikacích | 45 |
| 2.4. Bílkoviny a peptidy | 47 |
| 2.4.1 Složení bílkovin lněného semene..... | 47 |
| 2.4.2 Možnosti izolace bílkovin a peptidů lněného semene..... | 49 |
| 2.4.3 Funkční vlastnosti bílkovin lněného semene | 52 |
| 2.4.4 Biologické aktivity bílkovin a peptidů lněného semene | 53 |
| 2.4.5 Uplatnění lněných bílkovin v praktických aplikacích..... | 54 |
| 2.5. Fenolové látky lněného semene | 56 |
| 2.5.1 Zastoupení fenolových látek ve lněném semenu | 56 |
| 2.5.2 Možnosti izolace a analýzy fenolových látek lněného semene..... | 60 |
| 2.5.3 Biologické aktivity fenolových látek lněného semene..... | 64 |
| 3 CÍLE A HYPOTÉZY PRÁCE | 67 |
| 4 PŘEHLED O DOSAŽENÝCH VÝSLEDKÁCH | 69 |
| 4.1 Literární přehled o složení, struktuře, funkčních vlastnostech a možnostech využití lněných bílkovin a slizů v potravinářství a výživě | 69 |

| | |
|--|------------|
| 4.2 Vliv odrůdy a podmínek pěstování na chemické složení, obsah lignanů a antioxidační potenciál semen lnu setého | 109 |
| 4.3 Výtěžnost, funkční vlastnosti a antioxidační potenciál slizotvorných polysacharidů | 121 |
| 4.4 Popis bílkovinného profilu lněných semen a možnost přípravy bílkovinných produktů z výliskové mouky | 148 |
| 4.5 Charakterizace, funkční vlastnosti, antioxidační potenciál lněných výlisků a možnost jejich využití pro fortifikaci potravin..... | 170 |
| 5 ZÁVĚR | 227 |
| 6 SEZNAM LITERATURY | 231 |
| 7 SEZNAM TABULEK A OBRÁZKŮ | 248 |
| 8 PROHLÁŠENÍ AUTORŮ | 250 |
| 9 SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ..... | 250 |

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 doplncích, 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.

Semena lnu setého olejného se řadí mezi funkční potraviny prospěšně ovlivňující zdraví. 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 zušlechtěných potravinářských výrobků.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Pěstování lnu setého olejného

2.1.1 Taxonomie a rozmnožování

Len setý (*Linum usitatissimum* L.) představuje nejstarší olejnou a přadnou plodinu. Je součástí tzv. „neolitického balíčku“, tedy plodin pocházejících z Blízkého východu z období, přibližně, před 10 000 lety. Len představoval hlavní zdroj oleje a vláknů od pravěku až do počátku dvacátého století a stále zůstává hospodářsky významnou plodinou. Proto je důležité porozumět historii domestikace, a i v současnosti zkoumat genetický zdroj lnu pro další využití. Proces domestikace lnu však není dosud zcela objasněný. V zásadě existují dva morfotypy pěstovaného lnu, které jsou široce označovány jako „olejné odrůdy“ a „přadné odrůdy“. Olejnaté odrůdy bývají kratší rostliny s velkými semeny, které obsahují 40 % oleje, zatímco přadné odrůdy jsou vyšší, řidčeji větvené rostliny s menším počtem semen menší velikosti (Allaby et al., 2005).

Archeologické záznamy nedokazují přesně, které ze dvou uvedených využití bylo primární příčinou domestikace lnu. Předpokládá se však, že využití lnu pro produkci oleje i vláknů bylo na srovnatelné úrovni (Diederichsen a Hammer, 1995). Kultivovaná forma lnu (*L. usitatissimum* L.) je samosprašná diploidní rostlina s karyotypem $2n = 30$. Morfologické (Diederichsen a Hammer 1995), genetické a molekulární (Fu et al., 2002) důkazy naznačují, že divokým předkem dnešního, kulturního lnu je len světlý (*L. angustifolium* Huds.), s nímž je současný len interfertilní.

Kultivovaný len má dlouhé vzpřímené stonky ve srovnání s divokými formami, a tobolky, které samovolně nepukají. Na rozdíl od mnoha divokých předků plodin na Blízkém východě má len velmi široký biogeografický rozsah zahrnující západní Evropu a Středomoří, severní Afriku, západní a jižní Asii a oblasti Kavkazu. Kultivovaný len má mnoho geografických center genetické diverzity, včetně středoasijských, západoasijských, středomořských a habešských oblastí a také evropsko-sibiřský region (Diederichsen a Hammer 1995).

Dle taxonomického zařazení (Tab. 1) je *Linum usitatissimum* jedním z téměř 230 druhů čeledi *Linaceae*, která zahrnuje asi 14 rodů. Len je jednoletá bylina, přičemž rod

Linum zahrnuje téměř dvě třetiny všech druhů čeledi *Linaceae* (CABI, 2018). Navzdory této pozoruhodné rozmanitosti je len jediným, užitkově pěstovaným, druhem v této rodině.

Tab. 1: Taxonomické zařazení lnu setého (převzato a upraveno podle Qayyum et al., 2023)

| | | |
|----------|-------------------|-------------------------------|
| Říše | Rostliny | <i>Plantae</i> |
| Podříše | Cévnaté rostliny | <i>Tracheobionta</i> |
| Oddělení | Krytosemenné | <i>Magnoliophyta</i> |
| Třída | Vyšší dvouděložné | <i>Rosopsida</i> |
| Řád | Malpígiotvaré | <i>Malpighiales</i> |
| Čeď | Lnovité | <i>Linaceae</i> |
| Rod | Len | <i>Linum</i> |
| Druh | Len setý | <i>Linum usitatissimum</i> L. |

Kultivovaná forma lnu (*L. usitatissimum*) je samosprašná diploidní rostlina s karyotypem $2n = 30$ (Zajac et al., 2012). Morfologické, genetické a molekulární (Fu et al. 2002) důkazy naznačují, že divokým předkem pěstovaného lnu je len světlý úzkolistý (*L. angustifolium* Huds.). Díky stejnému počtu chromozomů lze len kulturní a divoký vzájemně křížit, čímž vznikají plodné hybridy, které jsou cennými rekombinanty zvyšující variabilitu v druhových znacích (Zajac et al., 2012). Celkem bylo ve lnu identifikováno 44 genů související s morfologií rostliny. 20 genů ovlivňuje barvu částí květenství, 4 geny ovlivňují barvu semen, 5 genů ovlivňuje jiné morfologické znaky, 2 geny ovlivňují samčí sterilitu, 2 geny ovlivňují kvalitu oleje a 11 genů ovlivňuje odolnost vůči chorobám (Muir & Westcott, 2003).

Domestikace lnu úzkolistého probíhala v několika centrech, a v různých obdobích, po celém světě. Přeměna divokého lnu úzkolistého na kultivovaný druh, len obecný, byla možná díky systematické a dlouhodobé selekci probíhající již od neolitu, v jejímž důsledku došlo k eliminaci samovolného pukání tobolek a zvýšení hmotnosti semen (Zajac et al., 2012). Len setý je jednoletá plodina, divoké formy mohou být dvouleté nebo víceleté a jsou převážně samosprašné (Pavelek et al., 2012). Opylení u lnu probíhá v době otevřených květů v ranních hodinách při slunečném počasí a nižší relativní vzdušné vlhkosti. Při větší oblačnosti a dešti dochází k opylení později v dopoledních hodinách. K oplození dochází v následujících, přibližně třech hodinách. Při slunečném počasí blizny krátce po otevření květu zasychají a nejsou schopné přijmout další pyl. K cizosprašení dochází buď přímým dotykem čerstvě otevřených květů, nebo přenosem pylu hmyzem, například včelami či trásněnkami. Bylo zjištěno,

že podíl křížového opylení se u lnu pohybuje v rozmezí 0,15-0,87 %, v některých případech se zvyšuje až na 1,33-1,75 % (Zelentsov et al., 2018). Izolační vzdálenost mezi porosty lnu musí být, dle vyhlášky č. 129/2012 Sb. pro osivo, u předstupňů (SE) a základního rozmnožovacího materiálu (E) 200 m, u certifikovaného osiva (C) 100 m. Len se množí semeny, která mají dobrou klíčivost po dobu asi 5 let od sklizně, poté klíčivost klesá, přičemž po 10 letech klíčí pouze přibližně 10 % semen, podle stavu semen při sklizni a způsobu uskladnění (Šmirous et al., 2015).

2.1.2 Šlechtitelské směry

Současné trendy, šlechtitelské cíle a metody šlechtění lnu byly popsány v monografii Handbook of Natural Fibers (Pavelek et al., 2012). V této publikaci jsou uvedeny aktuální metody šlechtění lnu se specifickým zaměřením na jeho využití v potravinářském průmyslu, pro bioprodukty a v lékařství, kde je kladen důraz na zvýšení jeho nutriční hodnoty k zajištění jeho přínosných vlastností v souvislosti s lidským zdravím. Lněné semeno je velmi významné s ohledem na obsah esenciálních nenasycených mastných kyselin ve lněném oleji, bílkovin, rozpustné vlákniny a fenolových látek, zejména lignanů (Tab. 2). Pozornost je věnována rovněž přítomnosti a obsahu antinutričních látek, především kyanogenních glykosidů (Pavelek et al., 2012).

Tab. 2: Vybrané charakteristiky odrůdových typů lnu (upraveno podle Šmirous et al., 2015; Thompson & Cunnane, 2003; Středa & Bjelková, 2007)

| obsah MK | zaměření | využití | šlechtění |
|---------------------------------------|-----------|--|--|
| klasická skladba (50-60 % ALA) | technické | fermeže, laky, linoleum, krátké vlákno, koudel | vysoký výnos oleje, vysoký výnos semene |
| klasická skladba (50-60 % ALA) | konzumní | celá semena, olej, výlisky (mouka) | vysoký výnos semene, nízký obsah antinutričních látek |
| Snížený obsah ALA (25-35 %) | konzumní | celá semena, olej, výlisky (mouka) | vysoký výnos semene, nízký obsah antinutričních látek |
| snížený obsah ALA (pod 5 %) | konzumní | celá semena, olej, výlisky (mouka) | vysoký obsah oleje a kyseliny olejové, vysoký výnos semene |

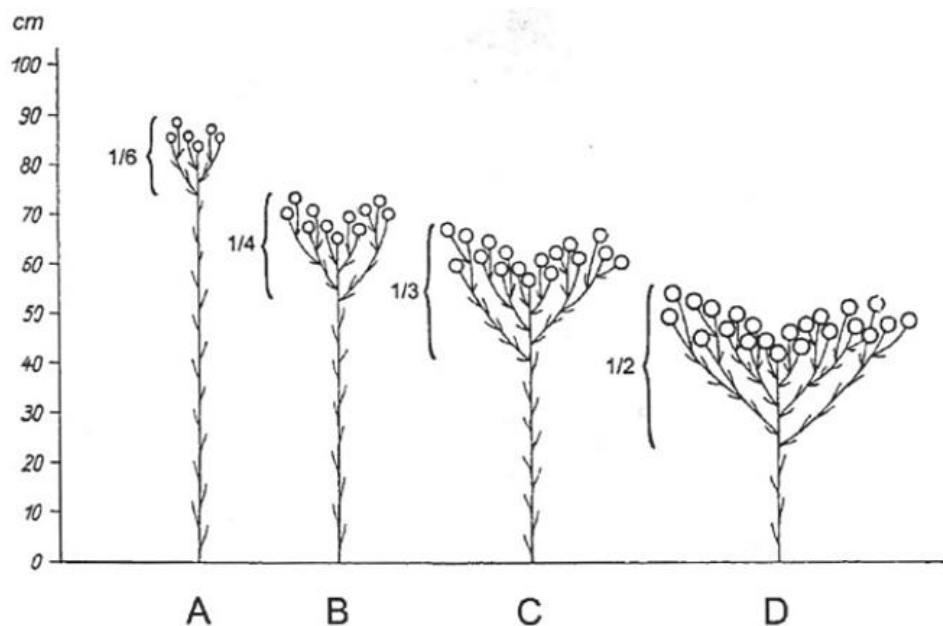
MK = mastná kyselina; ALA = kyselina alfa-linolenová

Šlechtitelské strategie a biotechnologické přístupy jsou zaměřeny na zvýšení genetické variability s následným výběrem vhodných fenotypů s požadovanou kombinací znaků následované eliminací nežádoucí genetické variability, tak aby byly splněny podmínky odlišnosti, uniformity a stability u nově vytvořených odrůd. Souběžně s metodami tradičního šlechtění (vnitro nebo mezirodová hybridizace, rodokmenová selekce, hromadné šlechtění) se stále častěji uplatňují biotechnologické postupy vedoucí ke stabilizaci genotypů procesem homozygotizace – haploidizace, produkce dvojitých haploidů nebo zvýšení genetické variability genotypů pomocí jiných metod genového inženýrství vedoucích k vývoji geneticky modifikovaného lnu (Pavelek et al., 2012).

Dalšími důležitými vlastnostmi u všech typů lnu je odolnost k poléhání a odolnost k chorobám, jež na našem území způsobeno především patogeny *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini*, *Colletotrichum lini*, *Alternaria linicola*, *Phoma exigua* var. *linicola* a *Septoria linicola* (Šmirous et al., 2015).

2.1.3 Biologická charakteristika

Len setý je jednoletá plodina mírného podnebí. Vlivem šlechtění se rozdělila na poddruhy: len setý přadný (*Linum usitatissimum* L.) a len setý olejný (*Linum usitatissimum* L. var. *humile*) (Vaculík & Šmirous, 2017). Len olejný je kratšího vzrůstu s mnoha sekundárními větvemi ve srovnání se lnem přadným (Obr. 1). Vegetační doba se pohybuje mezi 90 a 150 dny (Muir & Westcott, 2003; Marambe & Wanasundara, 2017). Stražil (2011) uvádí délku vegetační doby mezi 150 až 170 dny. Len setý má kulový kořen s postranními kořínky. Hlavní výhon je vzpřímený a na bázi stonku se bočně větví. Při poranění hlavního výhonu u mladé rostliny, dojde k vyvinutí několika sekundárních výhonů. Výška rostliny se pohybuje od 20 do 150 cm, podle genotypu. Len olejný má sekundární větve od středu stonku, zatímco len přadný se větví pouze v horní čtvrtině stonku. Na stonku jsou střídavě přisedlé trojžilné listy. Menší listy jsou čárkovité a větší čárkovitě kopinaté. Šířka listů se pohybuje od 3 do 13 mm a délka od 15 do 55 mm. Během zrání rostliny listy žloutnou a opadávají (Muir & Westcott, 2003).

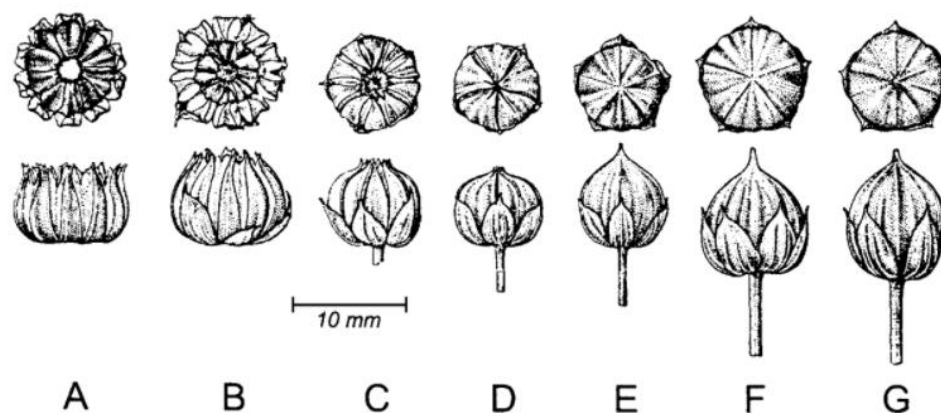


Obr. 1: Rozsahy technické délky stonku lnu (převzato a upraveno podle Tork et al., 2019)

A = typický prádny len, B a C = olejnoprádny len, D = olejný len

Len vytváří vrcholičnaté květenství. Květ lnu má pět kališních a pět korunních lístků vejčitého tvaru. Barva korunních lístků je převážně v odstínech modré, ale vyskytují se genotypy v barvě bílé, růžové a fialové (Cullis, 2011). Korunní lístky jsou žilkované. Květy se otevírají brzy ráno a v poledne většina korunních lístků opadá. Květ se skládá z 5 prašníků a pěti tyčinek, které jsou spojeny na jejich bazálním okraji. Prašníky mají odstín modré nebo žluté barvy (Muir & Westcott, 2003). Len setý je vysoce samosprašný druh díky “lepkavému pylu”, který je zřídka přenášen hmyzem. Pyl je životaschopný pouze několik hodin, od okamžiku dehiscence prašníku přibližně do doby, než korunní lístky seschnou, což obvykle trvá 4 až 7 hodin (Lay & Dybing, 1989).

Z pěti plodolistů vzniká kulatý plod ve formě tobolky (obr. 2), která je široká 6-9 mm. Každý plodolist je rozdělen přepážkou. Jeden plodolist může mít dvě semena oddělená nízkou přepážkou, která se nazývá “falešná přepážka”, jejíž okraj může být chlupatý nebo hladký, v závislosti na odrůdě. Maximální počet semen v tobolce je deset, obvyklý počet je však 6-8 semen. V závislosti na genotypu jsou zralé tobolky zcela uzavřené (len setý olejný) nebo se mírně otevírají podél přepážek (len setý prádny) (Muir & Westcott, 2003; Growing Flax, 2022).



Obr. 2: Stupně samovolného otevírání ve zralých tobolkách lnu setého (převzato a upraveno podle Muir & Westcott, 2003)

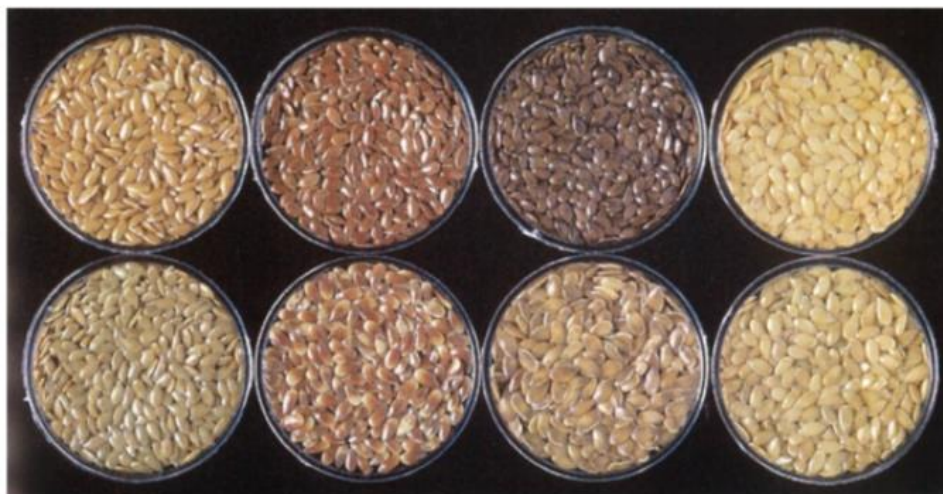
A a B = dehiscentní; C a D = mírně dehiscentní; E, F a G = indehiscentní

Lněná semena jsou plochá, oválná a na jednom konci špičatá (Obr. 3). Hmotnost tisíce semen (HTS) se pohybuje od 5 do 7 g v závislosti na odrůdě a podmínkách pěstování. Semena různých odrůd se liší barvou, která může být hnědá (světle až tmavě) nebo žlutá (Obr. 4) (Growing Flax, 2022). Barva semen je dána množstvím taninových pigmentů v pigmentových buňkách obalu semene. Hnědá semena obsahují více taninů oproti žlutým semenům, u nichž jsou samotné pigmentové buňky přítomné v omezené míře (Marambe & Wanasundara, 2017).



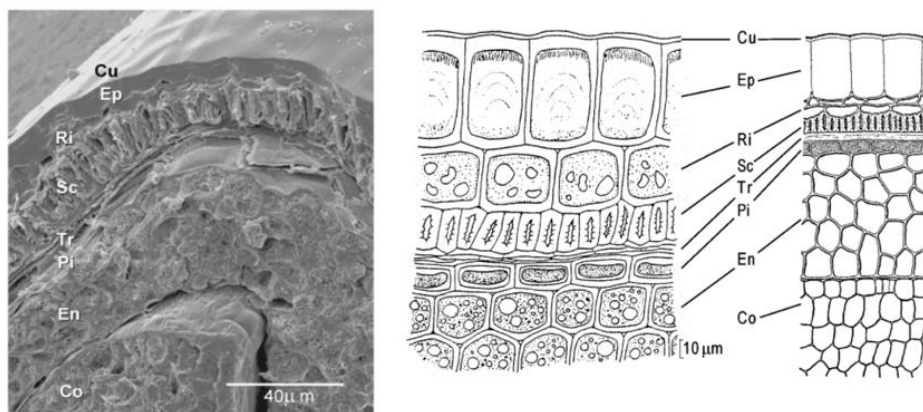
Obr. 3: Morfologie plodu lnu setého (převzato a upraveno podle Gray, 2010)

A = tobolka; B = podélný řez tobolkou; C = podélný řez semenem



Obr. 4: Variabilita zbarvení semen u lnu setého (převzato a upraveno podle Tork et al., 2019)

Semeno se skládá z obalu semene, embrya, endospermu a zásobních látek ve formě sacharidů, bílkovin a tuku (Obr. 5). Vnější vrstva pláště je silná, zvlněná, lesklá a označuje se “testa”, zatímco vnitřní vrstvá je tenká a nazývá se “tegmen”. Povrch semene pokrývají epidermální buňky, pod kterými je 1 až 5 vrstev buněk parenchymu. Jedná se o prstencové buňky, jejichž tvar je převážně kulatý při pohledu v periklinálním řezu (rovnoběžně s povrchem semen). Prstencové buňky parenchymu mohou obsahovat tmavé látky podobné taninu a chlorofyl, který přispívá k barvě semen. Epidermis a prstencové buňky pocházejí z vnější vrstvy obalu semene. Pod prstencovými buňkami parenchymu se nachází jedna vrstva sklerenchymu, který je bezbarvý či žlutý a tvoří jednobuněčnou vrstvu o tloušťce 15-25 μm . Další dvě buněčné vrstvy jsou složeny z tzv. transversálních buněk, které mají nepravidelnou orientaci. Tyto buňky u hnědosemenných odrůd obsahují pigmenty žlutohnědé barvy. Další vrstvou buněk je endosperm obsahující olej a bílkoviny. Olej je uložen v oleosomech (tuková tělíčka, oil body). Oleosomy jsou chráněny membránou složenou z fosfolipidů (0,9 %) a bílkovin (1,34 %). Endosperm obklopuje embryo (zárodek), které má dva velké kotyledony (děložní lístky). Kotyledony jsou obvykle bílé nebo nažloutlé barvy a obsahují také olej a cyklolinopeptidy (Zuk et al., 2015; Muir & Westcott, 2003; Gui et al., 2012a; Fabre et al., 2015a).



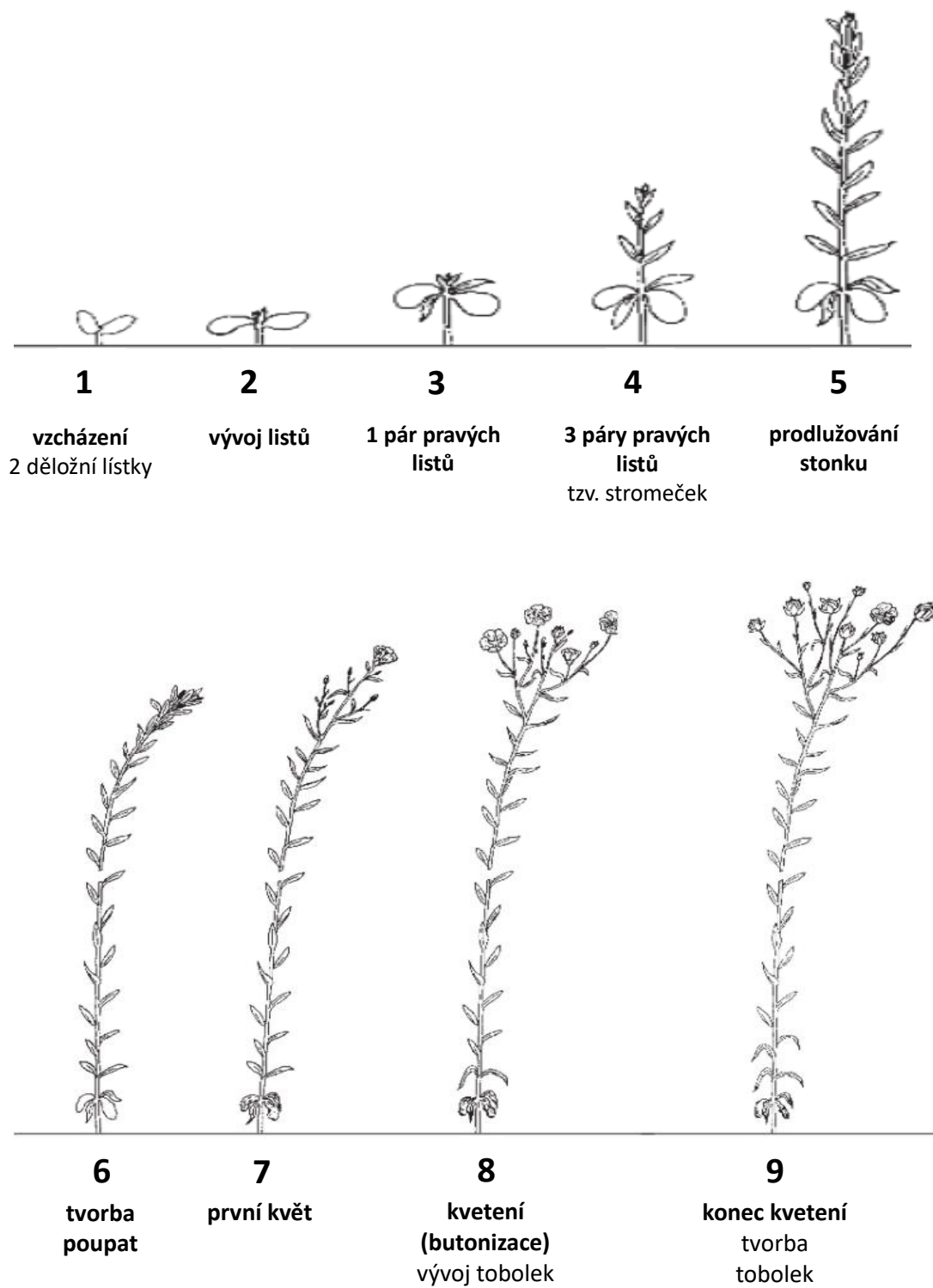
Obr. 5: Průřez lněným semenem (převzato a upraveno podle Muir & Westcott, 2003)

Cu = kutikula (obal semene); Ep = epidermis; Ri = kruhové buňky; Sc = sklerenchym; Tr = transverzální buňky; Pi = pigmentové buňky; En = endosperm; Co = kotyledon

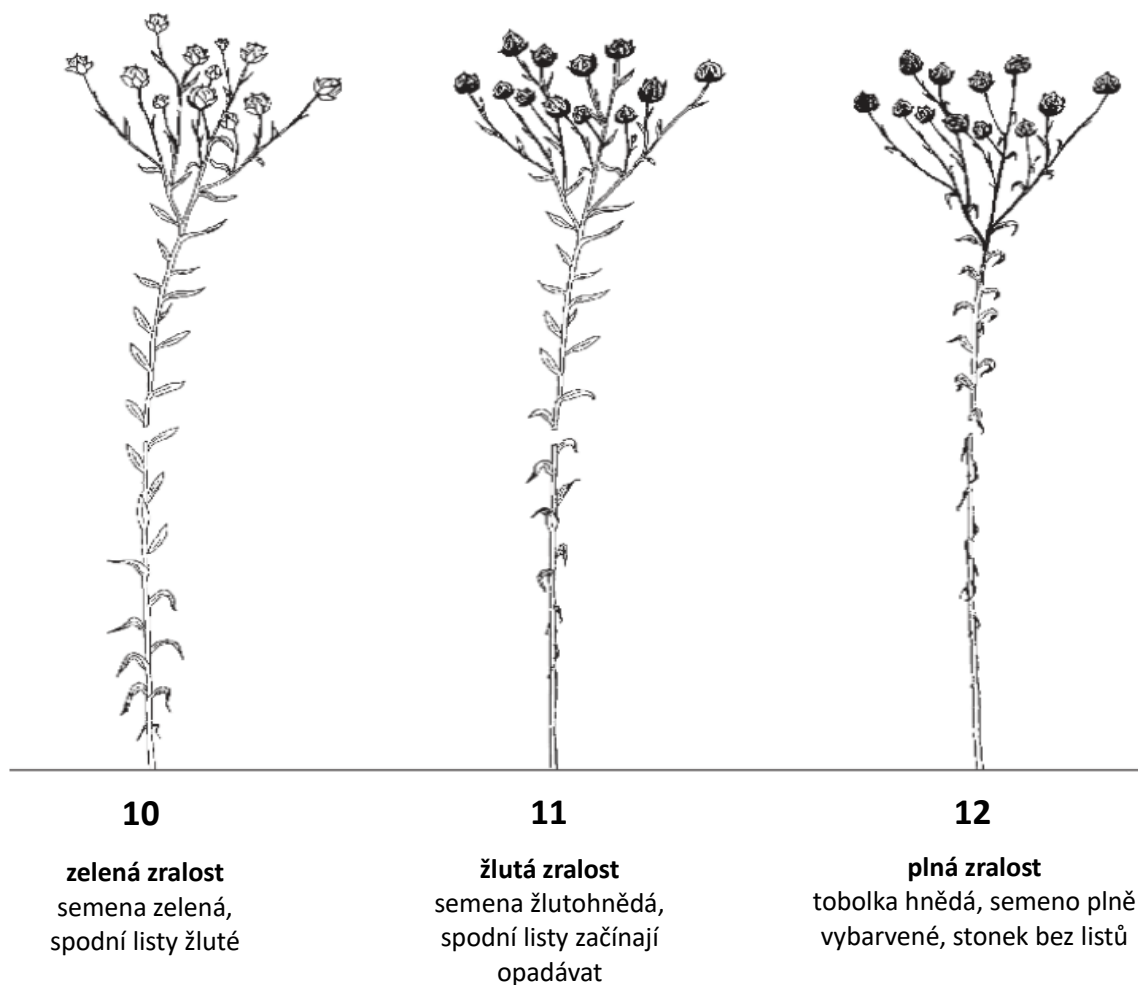
Epidermální buňky produkují sliz složený z polysacharidů, polypeptidů a glykoproteinů, který se ukládá v extracelulárním prostoru, těsně pod buněčnou stěnou směřující k vnější straně semene. Během zrání semene se epidermální buňky zmenšují. Ve vodném prostředí se buněčné stěny natahují do fáze, než dojde k prasknutí kutikuly. Sliz poté absorbuje vodu a opouští epidermální buňky (Muir & Westcott, 2003).

2.1.4 Agroekologické požadavky na pěstování lnu setého

Vhodná jsou stanoviště s lehkými propustnými, hlinitopísčnými až hlinitými půdami o pH 5,5-7, s nadmořskou výškou 200 až 450 m, s nižšími srážkami ve druhé polovině vegetace (od konce kvetení do fáze zrání) a bez vytrvalých plevelů. Se zvyšující se nadmořskou výškou a nižší průměrnou teplotou vzduchu (tepelná konstanta 1700 °C) se prodlužují růstové fáze, od konce rychlého růstu do dozrávání, až o 15 dnů (Šmirous et al., 2010). Růstové fáze lnu setého jsou vizualizovány na obrázcích 6a a 6b. Len setý potřebuje dostatek srážek zejména ve fázi stromečku a rychlého růstu, tedy 30-60 dnů po zasetí (Bjelková et al., 2017). Po odkvětu není nadbytek srážek přínosný, jelikož způsobuje prodlužování doby zrání a také dochází k polehání porostu (Strašil, 2011). Při dostatečné kontrole plevelů patří mezi hlavní faktory ovlivňující výnos: sucho, nadměrná vlhkost půdy, hustota rostlin a tepelný stres (Diederichsen a Ulrich, 2009).



Obr. 6a: Růstové fáze olejného lnu (převzato a upraveno podle Growing Flax, 2022, Šmirous et al., 2015)



Obr. 6b: Růstové fáze olejného lnu (převzato a upraveno podle Growing Flax, 2022, Šmirous et al., 2015)

Výzkumy provedené v Kanadě ukázaly, že předplodina a pořadí plodin mají významný vliv na výnos lnu. Len dosahuje špatných výsledků po řepce a hořčici ve srovnání s obilninami. Negativní vliv řepky je způsoben negativním dopadem na půdní arbuskulární mykorhizu, fytotoxické sloučeniny uvolňované z posklizňových zbytků, spotřeba živin a půdní vlhkosti (Flax Council of Canada, 2018).

2.1.5 Založení porostu

Základem pro založení porostu je výběr zdravého, nejlépe certifikovaného osiva, které je možné ochránit mořením proti chorobám přenosných osivem (antraknóza lnu, alternariová skvrnitost a kořenová hniloba lnu) (Vaculík & Šmirous, 2017). Osivo musí splňovat kritérium čistoty o hodnotě 99 % a 85% klíčivost, dle vyhlášky č. 129/2012 Sb. o uvádění oběhu osiva a sadby (Šmirous et al., 2015).

Len vyžaduje pozemek bez vytrvalých plevelů a pro maximální vzcházení dobře připravené, pevné a vlhké set'ové lůžko (Flax Council of Canada, 2018). Zpracování půdy pro založení porostu lnu je shodné s předset'ovou přípravou obilnin. Podzimní příprava půdy zahrnuje podmítku a orbu do hloubky 18-20 cm (len je citlivý na priorání podorniční vrstvy). Při zaorání slámy z předplodiny je důležité ke slámě před orbou aplikovat dusík v dávce 30 kg dusíku na hektar. Při podzimní orbě je vhodné realizovat hnojení fosforem a draslíkem. Jarní příprava zahrnuje kroky: smykování, rozmetání hnojiv a mělké kypření půdy do hloubky 5-6 cm, aby byla dodržena hloubka setí do 2 až 3 cm (Vaculík & Šmirous, 2017). Len olejný není náročný na přímé hnojení minerálními hnojivy, ale vyžaduje přístupné živiny v raných fázích po vzejití. Pro výnos 0,7-2 t/ha semene odebere len z půdy 80-105 kg N, 43-50 kg P₂O₅, 90-110 kg K₂O, 50-63 kg CaO, 15-20 kg MgO. Hnojení hnojem a vápníkem se nedoporučuje přímo, ale v rámci osevního sledu (Šmirous et al., 2010; Šmirous et al., 2015). Flax Council of Canada (2018) uvádí, že některé oblasti doporučují nepřidávat k semenům lnu žádné hnojivo.

Včasný výsev přináší větší a spolehlivější výnosy (Flax Council of Canada, 2018). V podmínkách České republiky vyséváme nejlépe v první polovině dubna, čímž je zajištěno využití zimní vláhy. Výsevek v milionech klíčivých semen (MKS) se stanovuje podle parametrů osiva a pěstitelské oblasti ve vztahu k nadmořské výšce, úhrnu srážek a úrodnosti půdy (Vaculík & Šmirous, 2017). Optimální výsevní norma je 8,5-10 MKS.ha⁻¹ pro sušší oblasti do 350 m.n.m. na lehčích půdách a při úhrnu srážek 350-400 mm za vegetační období. Při zvyšující se nadmořské výšce a množství srážek se snižuje výsevek na 7,5 až 8,5 MKS.ha⁻¹. Len se vysévá do řádků o meziřádkové vzdálenosti 100 až 125 mm do hloubky 2-3 cm (Šmirous et al., 2015).

2.1.6 Integrovaná ochrana

Choroby, škůdci a plevelé lnu je možné eliminovat správným dodržением agrotechnických požadavků a výběrem osiva. Většina pěstovaných odrůd vykazuje střední odolnost vůči chorobám a přímá fungicidní ochrana se neprovádí (Šmirous et al., 2010). Základem ochrany je vhodný výběr pozemku, zařazení v osevním postupu, předset'ová příprava půdy a použití zdravého, nejlépe mořeného, osiva (Prokinová & Kazda, 2001).

S nárůstem ploch olejného lnu je spojen zvýšený výskyt chorob. Mezi nejvýznamnějším původce chorob patří: *Alternaria linicola* (alternáriová skvrnitost), *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* (fusariové vadnutí a hnědnutí stonků lnu), *Septoria linicola* (septoriová stonková páskovitost lnu), *Melampsora lini* (rez lnová), *Phoma exigua* var. *linicola* (kořenová hniloba) a *Botrytis cinerea* (plíseň šedá). Základem ochrany je vhodný výběr pozemku, zařazení v osevním postupu, předseťová příprava půdy, použití zdravého, nejlépe mořeného osiva (Prokinová & Kazda, 2001; Growing Flax, 2022).

Len může být v průběhu růstu, i ve fázi zralosti, napaden hmyzími škůdci. Důležitá je proto pravidelná kontrola porostu (Growing Flax, 2022). Mezi nejzávažnější škůdce lnu patří dřepčící, konkrétně dřepčík lnový (*Longitarsus parvulus*) a dřepčík pryšcový (*Aphthona euphorbiae*). Larvy dřepčíků vyžírají kořeny a dospělci ožírají děložní listy a vegetační vrcholy. Dalším významným škůdcem je třásněnka lnová (*Thrips linarius*), jejíž dospělci a nymfy sají na nejmladších pletivech rostlin, vegetačních vrcholech, v paždí mladých listů a tvořících se květech a tobolkách. Napadené rostliny se deformují, vegetační vrcholy mohou zasychat a dochází k nadměrnému větvení. Mezi možné škůdce se řadí také larvy kovaříků – drátovci (*Elateridae* sp.), kteří mohou poškozovat rostlinu žírem kořenů. Na lnu se mohou rovněž vyskytovat klopušky (*Miridae*), které škodí sáním na listech a vrcholových částech rostlin (Prokinová & Kazda, 2001; Šmirous et al., 2015).

Zaplevelení porostu lnu olejného způsobuje přímé kvantitativní škody spočívající ve sníženém výnosu semene a snížením čistoty, ale také přispívá k rozvoji chorob lnu a zhoršuje podmínky pro mechanizovanou sklizeň. Plevelé konkurují lnu v příjmu živin, vláhy z půdy a zastiňují porost. Mezi nejrozšířenější plevelé patří jednoleté dvouděložné plevelé různého druhového zastoupení, podle podmínek stanoviště (Vaculík & Šmirous, 2017). Mezi jednoleté dvouděložné plevelé patří například merlíky, rdesna, svízel, heřmánkovité plevelé a řepka olejka z výdrolu. Mezi nejčastější jednoleté jednoděložné plevelé se řadí oves hluchý a ježatka kuří noha. Vytrvalé plevelé představuje zejména pýr plazivý a pcháč rolní (Šmirous et al, 2015). Kromě kvalitní přípravy půdy, a omezení vytrvalých plevelů v předplodině, je nutné také regulovat výskyt dvouděložných plevelů nejčastěji prostřednictvím aplikace postemergentních herbicidů v růstové fázi stromečku (výška lnu 4-15 cm). K regulaci jednoděložných plevelů se používají povolené graminicidy. Při aplikaci herbicidy

nesmí být len vyšší než 20 cm, je tedy nutné jí provádět před fází butonizace (Šmirous et al., 2010).

Sklizeň obvykle probíhá od poloviny srpna do poloviny září, ačkoli je sklizeň do značné míry ovlivněna klimatickými podmínkami a počasím. Semeno lnu je připravené ke sklizni, když tobolek lnu tzv. „chrastí“. Pokud je len sklizen příliš brzy a stonky jsou stále zelené, dochází k potížím při sekání žací lištou sklízecí mlátičky. Nejčastěji dochází k zanášení rotujících částí sklízecích strojů, jež je způsobeno vláknitými a pružnými stonky nezralého lnu. Termín sklizně lze urychlit desikací, jež usnadňuje sklizeň vysušením plodiny (Gilbertson, 1990). Porosty bývají desikovány přípravky s pozvolným účinkem na konci fáze rané žluté zralosti (např. přípravek Reglone), nejpozději však na začátku žluté zralosti většiny tobolek. Účinky desikace se dostavují během 5 až 14 dnů, tobolek během této doby dozrají do plné zralosti, stonek zaschne (zhnědne) a je vhodný pro sečení (Šmirous et al., 2015).

Sklizeň probíhá jednorázově pomocí sklízecích mlátiček. Tento způsob sklizně umožňuje sklidit nadzemní část rostlin včetně separace a předčištění semen. Ostatní části rostlin zůstávají uloženy v řádku nebo jsou rozdrčeny pomocí drtiče, integrovaného ve sklízecí mlátičce. Pro dosažení správné sklizně je důležité správné seřízení sklízecí mlátičky, zejména mláticího bubnu, aby nedocházelo k poškozování a drčení semen (Šmirous et al., 2015).

Sklizené semeno často obsahuje příměsi různě vlhkých částí stonku a plevelů, proto musí být co nejdříve (nejpozději do 5 hodin) dopraveno na roštovou sušárnu nebo jiné zařízení s aktivním provzdušňováním. Sklizené semeno není vhodné ukládat ani přechodně na betonové plochy, kde dochází k rychlému zapaření a znehodnocení. Před skladováním se semeno lnu čistí a dosouší na hodnotu vlhkosti nepřesahující 9 % (Šmirous et al., 2010).

2.2. 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. 3), 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). Vláknina, 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.

Tato hlavní kapitola shrnuje informace o tucích, nerozpustné vláknině a mikronutrientech zastoupených ve lněném semenu. Vzhledem k tématu disertační práce jsou pak samostatné kapitoly literárního přehledu věnovány rozpustné vláknině (slizotvorná polysacharidová frakce), bílkovinám a fenolovým látkám lněného semene, a to zejména z pohledu jejich chemického složení, funkčních vlastností, biologických aktivit a možností jejich izolace.

Tab. 3: 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 vláknina | 28-29 |
| <i>z toho rozpustná vláknina</i> | 6-12 |
| <i>z toho nerozpustná vláknina</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 |

2.2.1 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 4. 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 alternativou 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. 4: 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 |

2.2.2 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 celulosa, hemicelulosa a lignin (Rubilar et al., 2010). Vláknina obecně, jako transientní 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.

2.2.3 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 benefitních 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).

2.3. 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.

V této hlavní kapitole je stručným způsobem popsáno celkové i monosacharidové složení, možnosti jejich extrakce, funkční vlastnosti, biologické aktivity a příklady praktického uplatnění FG. Detailnější charakterizace FG, včetně možností inovativních aplikací tohoto hydrokoloidu, je náplní dvou přehledových publikací v rámci výsledkové části této disertační práce (kapitola 4.1).

2.3.1 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. 5). 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 popsaným 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. 5: 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 |

2.3.2 Sacharidové složení slizotvorné frakce

Dominantní částí lněného slizu je heteropolysacharid skládající se z různých monosacharidů (Tab. 6) tvořící dva typy polysacharidů – neutrální a kyselý. Dále obsahuje sacharidy a deriváty sacharidů, jež nejsou uváděny jako součást neutrálních ani kyselých polysacharidů FG (Safdar et al. 2019). Neutrální polysacharid má formu arabinoxylanu a kyselý polysacharid rhamnogalakturonanu. Arabinoxylan, tvořící 75 % obsahu FG, zahrnuje sacharidy L-arabinosu, D-xylosu a D-galaktosu; zbývající část zastoupená rhamnoglukosou se skládá z L-rhamnosy, L-fukosy, L-galaktosy a D-galakturonové kyseliny (Devi & Bhatia, 2019).

Kaushik et al. (2017) uvádí 85% obsah neutrálního polysacharidu, přičemž kyselý polysacharid tvoří pouze 15 % obsahu sacharidů FG. Nicméně, v rámci uvedeného výzkumu bylo rovněž zjištěno, že při teplotě extrakce 70 °C a vyšší se zvyšoval podíl kyselého polysacharidu, jenž při teplotě extrakce 90 °C činil 17,5 %. FG je pak tvořený monosacharidy rhamnosou, fukosou a glukosou, nikoli však galatosou a galakturonovou kyselinou, jako je tomu uvedeno u předchozího zdroje. V rámci uvedeného výzkumu je (Kaushik et al., 2017) je neobvyklá absence kyseliny galakturonové, jež je považována dle jiných studií za klíčovou součást kyselého polysacharidu. Novější zdroje uvádí 7-36 % obsah galakturonové kyseliny v rámci sacharidů FG (Safdar et al. 2019; Hadad & Goli, 2018), starší literatura pak 21-25 % (Cui & Mazza, 1996), respektive 23 % (Qian et al., 2012). Sacharidy a deriváty sacharidů, jež nejsou uváděny jako součást neutrální ani kyselého polysacharidové složky FG jsou zastoupeny manosou, ribosou, glukuronovou kyselinou a glukosaminem a jejich abundance je výrazně minoritní (Tab. 6).

Tab. 6: Výskyt a relativní zastoupení monosacharidů v rámci sacharidové složky lněného slizu (převzato a upraveno dle studií: Safdar et al., 2019; Kaushik et al., 2017; Qian et al., 2012; Cui & Mazza, 1996)

| typ polysacharidu | monosacharid | relativní zastoupení jednotlivých monosacharidů [%] | | | |
|---------------------------------|--------------|---|-----------------------------|-------------|--------------------------|
| | | Safdar et al. | Kaushik et al. ^c | Qian et al. | Cui & Mazza ^d |
| Neutrální | arabinosa | 8,3 | 25,4-28,0 | 9,8 | 6,9-10,7 |
| Neutrální | xylosa | 13,5 | 42,9-47,6 | 29,7 | 16,1-29,5 |
| neutrální(+kyselý) ^a | galaktosa | 18,7 | 13,0-14,0 | 17,2 | 15,8-21,6 |
| neutrální/kyselý ^b | glukosa | 20,0 | 2,3-3,1 | 2,1 | 1,7-6,2 |
| Kyselý | rhamnosa | 23,9 | 7,0-8,2 | 12,7 | 16,7-20,4 |
| Kyselý | fukosa | 8,0 | 2,9-3,8 | 5,4 | 4,0-5,3 |
| Kyselý | galakturonát | 6,8 | ND | 23,0 | 21,0-25,1 |
| n. | manosa | 0,4 | NS | NS | ND |
| n. | ribosa | 0,2 | NS | NS | NS |
| n. | glukuronát | 0,03 | NS | NS | NS |
| n. | glukosamin | 0,2 | NS | NS | NS |

n. = u daného monosacharidu není zjištěna nebo popisována příslušnost k neutrálnímu ani kyselému polysacharidu FG

NS = nebyla stanovována přítomnost a kvantita daného monosacharidu

ND = nebyla zjištěna přítomnost daného monosacharidu (bylo stanováno)

^a = u zdroje Safdar et al. (2019) popisována D-galaktosa jako součást neutrálního polysacharidu a L-galaktosa jako součást kyselého polysacharidu, u Kaushik et al. (2017) popisována samotná pouze jako součást neutrálního polysacharidu, u zdroje Qian et al (2012) je galaktosa zařazena jako součást neutrální i kyselého frakce lněného slizu, u zdroje Cui & Mazza (1996) není galaktosa řazena ani k jednomu typu polysacharidů

^b = u zdroje Kaushik et al. (2017) popisována glukosa jako součást kyselého polysacharidu, u zdroje Qian et al (2012) je glukosa zařazena jako součást neutrální frakce, u ostatních zdrojů není uvedena příslušnost k typu polysacharidu

^c = extrakce lněného slizu probíhala při teplotách 30, 50, 70 a 90 °C, rozmezí je určeno nejnižší a nejvyšší hodnotou obsahu danou podmínkami extrakce

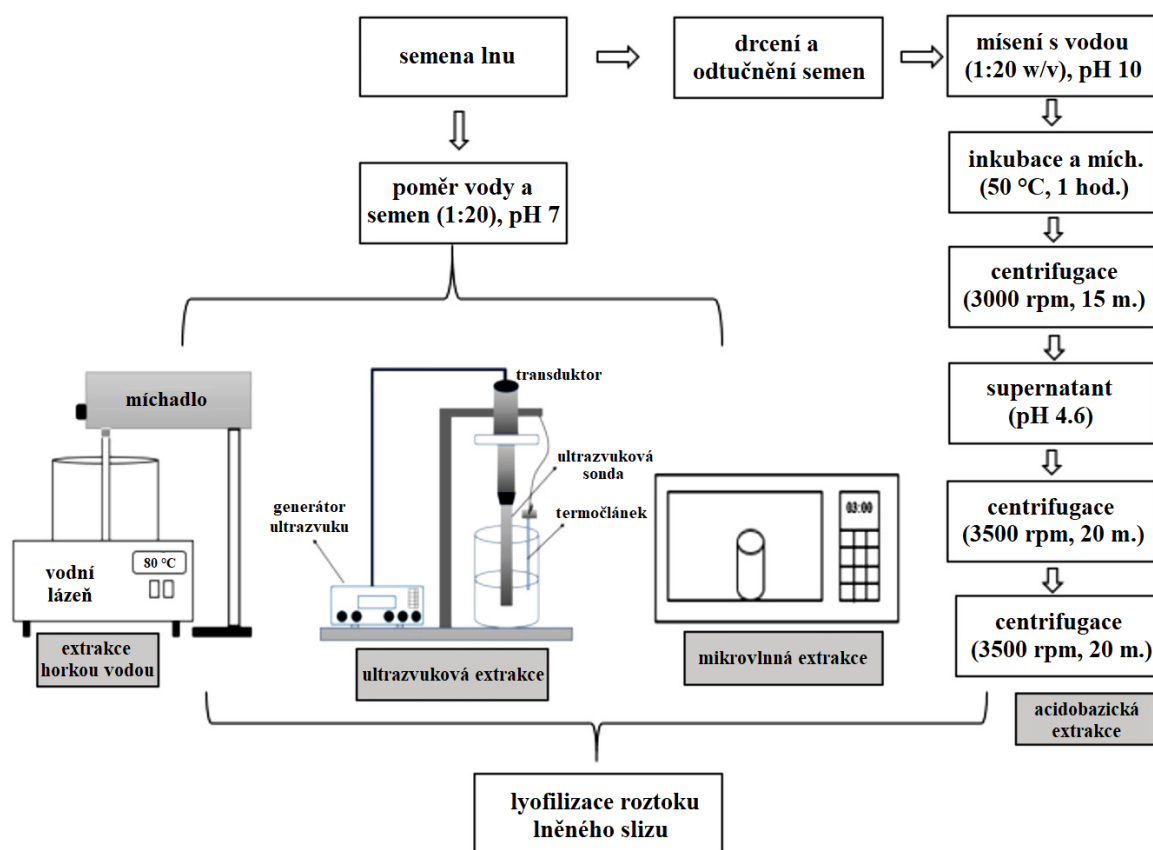
^d = pro studii byly použity tři odrůdy – Norman, Omega a Foster; rozmezí je určeno nejnižší a nejvyšší hodnotou obsahu sacharidu v závislosti na odrůdě

2.3.3 Možnosti extrakce lněného slizu

V souvislosti s velmi intenzivně studovaným tématem lněného slizu jsou popisovány různé přístupy a podmínky využívající se pro jeho extrakci. Metoda extrakce a její parametry určují výtěžek, čistotu, složení, biologické a funkční vlastnosti FG. Například, samotná teplota extrakce, jež byla v předchozí kapitole zmíněna jako významný faktor ovlivňující chemické složení, je oním faktorem určující funkční a biologické vlastnosti získaného FG. Výběr metody extrakce FG a její parametry jsou bez pochyby klíčové faktory pro získání FG s optimálními parametry podle následného využití.

K extrakci slizotvorné frakce je možné použít celá semena (Kaushik et al, 2017), obaly semen (Qian et al., 2012) nebo upravené výlisky po lisování oleje (Droźłowska

et al., 2020). Safdar et al. (2020) uvádí čtyři možné způsoby extrakce FG, konkrétně extrakci v horké vodě, dále pak ultrazvukovou extrakci, mikrovlnnou extrakci a acidobazickou extrakci (Obr. 7). Nejvyšší relativní výtěžek FG byl získán pomocí extrakce horkou vodou (8,69 %), druhý nejvyšší byl dosažen ultrazvukovou extrakcí (7,84 %) následovaný mikrovlnnou extrakcí (7,01 %) a nejmenší byl zaznamenán v případě použití acidobazické extrakce. Pozorovány byly také rozdíly v antioxidačních aktivitách v závislosti na použité extrakci. Nejlepší schopnost zhaset radikály ABTS a DPPH a odbarvování β -karotenu vykazoval FG získaný pomocí ultrazvukové extrakce, následovaný slizy extrahovanými horkovodní extrakcí, mikrovlnnou a acidobazickou extrakcí. Přestože je pro nejvyšší výtěžek slizu vhodné preferovat jednoduchý způsob horkovodní extrakce, nejvyšší čistotu vykazoval sliz získaný pomocí ultrazvukové extrakce (Safdar et al. 2020).



Obr. 7: Návrh způsobů extrakce lněného slizu ze semen lnů setého (převzato a upraveno podle Safdar et al., 2020)

Fabre et al. (2015b) porovnávali tři metody extrakce FG prováděné při 50 °C, konkrétně vodní extrakci s magnetickým mícháním, mikrovlnnou extrakci a ultrazvukovou extrakci. Z hlediska výtěžku slizu byla mikrovlnná extrakce méně

účinná než vodní extrakce s magnetickým mícháním. Nejúčinnější byla ultrazvuková extrakce s maximálně 6,8% výtěžkem FG po 30 minutách extrakce. Pomocí ultrazvuku došlo k získání FG s nižší vnitřní viskozitou (6,2 dl/g) oproti slizu získanému pomocí vodní extrakce (12,5 dl/g). Oproti vodní extrakci došlo také pomocí ultrazvuku ke snížení hmotnosti největšího polysacharidu FG z hodnoty 1.5×10^6 Da na hodnotu 0.5×10^6 Da. Ultrazvuková metoda nebyla vyhodnocena jako vhodný způsob extrakce FG určeného pro následnou komplexaci s bílkoviny. V rámci výzkumu prováděného Li et al. (2021) byla pomocí ultrazvuku připravována směs kukuřičného proteinu pro přípravu komplexního materiálu v podobě Pickeringovi emulze. Tento materiál vykazoval nízkou stabilitu a separaci uvedených složek v krátkém čase. I v tomto případě se tedy ultrazvuková metoda ukázala, bez předchozí úpravy složek, jako nevhodná pro přípravu těchto komplexních materiálů (Li et al., 2021). Výhodou ultrazvukové extrakce může být však významná redukce antinutričních látek, například taninů a kyanogenních glykosidů v extrahovaném slizu (Akhtar et al., 2019).

Mikrovlnná extrakce představuje oproti metodám vodní a ultrazvukové extrakce metodu, jež může významnějším způsobem měnit strukturu a funkční vlastnosti získaného FG. Tento způsob extrakce může způsobovat síťování polysacharidů a následně jejich degradaci. Na základě výzkumu Yu et al. (2022) bylo zjištěno, že funkční vlastnosti FG extrahovaného pomocí mikrovlnného záření v podobě reologických a viskoelastických vlastností se v průběhu působení mikrovlnného záření od 1. do 5. minuty nejprve zlepšují, postupně však v rámci tohoto intervalu dochází k jejich zhoršení.

Moczowska et al. (2019) využila pro získání FG z lněných semen enzymatickou extrakci pomocí α -amylasy, enzymaticko-ultrazvukovou extrakci při 20 °C a 50 °C, a alkalickou extrakci. Nejvyššího výtěžku FG (přibližně 17,7 %) bylo dosaženo pomocí enzymaticko-ultrazvukové extrakce. Samotný obsah sacharidové složky FG pak činil v rámci nejúčinnější extrakce 68,9 %. Nejvyšší obsah bílkovin byl zjištěn v rámci FG izolovaného pomocí alkalické extrakce. Získané slizy a z nich vytvořené emulze však vykazovaly relativně nízkou viskozitu.

Po samotné vodní extrakci je často prováděna precipitace slizu pomocí ethanolu pro zakoncentrování polysacharidů (Qian et al., 2012) a pro odstranění kyanogenních glykosidů (Kaewmanee et al., 2014). V případě FG extrahovaných při vyšší teplotě vodní extrakce byl pozorován vyšší výskyt bílkovin a hnědnutí FG. Tento jev může

ovlivnit vlastnosti polysacharidů FG, proto je vhodné FG pro některé následné aplikace extrahovat při nižší teplotě (Qian et al., 2012). Cui et al. (1994b) uvádí optimální podmínky vodní extrakce FG pro zajištění vysokého výtěžku a kvality obsažených proteinů, které činí: poměr vody a semen lnu – 13:1; teplota – 85-95 °C; hodnota pH – 6,5-7,0; délka extrakce – 3 hodiny.

2.3.4 Funkční vlastnosti lněného slizu

Funkční vlastnosti FG jsou určeny jeho fyzikálními vlastnostmi a chemickým složením, které může být poměrně variabilní. Spektrum a koncentrace obsažených látek, zejména zastoupení monosacharidů, do značné míry ovlivňuje celou řadu funkčních vlastností FG.

FG, jako rozpustná vláknina, má značnou schopnost vázat vodu dosahující hodnoty 1600-3000 %, neboli 16-30 g vody / 1 g FG (Kajla et al., 2015). Drozłowska et al. (2020) uvádí, že schopnost FG vázat olej je přibližně 1 g oleje / 1 g FG. FG se obecně vyznačuje vysokou viskozitou, která může být srovnatelná s viskozitou akátové gummy a vyšší guarové a tamarindové gummy (Chang et al, 2017). Vyšší zastoupení neutrálního polysacharidu (arabinoxylanů), jež mají vyšší molekulovou hmotnost, zvyšuje také viskozitu FG. Naopak, se stoupající abundancí kyselých polysacharidů o nižší molekulové hmotnosti, se viskozita snižuje. Viskozitu a tekutost slizu ovlivňuje také hodnota pH. Nejnižší viskozita se projevuje při hodnotě pH 2, se stoupající hodnotou pH roste také viskozita, až do hodnoty pH 8, kdy je viskozita 3x vyšší oproti FG o hodnotě pH 2. Při hodnotě pH vyšší než 8 ovšem viskozita opět klesá (Biliaderis & Izydorczyk, 2006). Poměrem polysacharidů jsou ovlivněny, také související reologické vlastnosti slizu, který může mít při vyšším zastoupení neutrálních polysacharidů formu gelu. Při vysokých koncentracích kyselých polysacharidů získává sliz spíše podobu viskoelastické kapaliny (Cui & Mazza, 2002; Cui et al., 1994a).

FG je možné využít v potravinářských produktech také jako zahušťovadlo a stabilizátor. Stabilita emulze, v závislosti na hodnotě pH, pozitivně koreluje s viskozitou, která je nejvyšší při hodnotě pH 6. FG je srovnatelný, či lepší emulgátor než Tween 80, arabská guma a tragantová guma. Koncentrace FG o hodnotě 0,5-1,5 % je vhodná pro stabilizaci emulzí vody a oleje (Biliaderis & Izydorczyk, 2006). Zvýšení stability bylo zjištěno také u emulze s 10% obsahem olivového oleje, přičemž

tato emulze vykazovala také lepší reologické vlastnosti (Sun et al., 2019). FG může být využit také jako stabilizátor jogurtů. Kromě toho podporuje růst mikroorganismů startovací mléčné kultury (Basiri et al., 2018). FG vykazuje lepší stabilitu pěny ve srovnání s arabskou a xanthanovou gumou (Wang et al. 2010a). Významné funkční vlastnosti FG mohou být ovlivněny teplotou extrakce. Bylo zjištěno, že s rostoucí teplotou klesá viskozita a elasticita slizu (Vieira et al., 2019). Hu et al. (2020) v rámci svého výzkumu potvrdili, že FG extrahovaný při teplotě extrakce 98 °C měl nižší viskozitu, avšak stabilita FG v roztoku byla lepší. FG vykazoval lepší pěnivost a emulgační vlastnosti oproti FG extrahovaném při 70 °C. V rozporu s uvedenými jevy jsou poznatky publikované v rámci studie od Kaushik et al. (2017), kteří naopak uvádí zhoršení emulgační aktivity a vaznosti vody u slizů extrahovaných při vyšších teplotách. Naopak, u slizů extrahovaných při vyšší teplotě se projevila lepší vaznost tuků. V této studii je nicméně zdůrazněno, že emulgační aktivita je ovlivněná obsahem a složením proteinové frakce FG.

Pomocí pokročilých mikroskopických a spektroskopických metod byly pozorovány mikrostrukturní odlišnosti ve struktuře FG extrahovaných ze šesti čínských a mongolských odrůd lnu (Ren et al., 2021). Variabilita ve struktuře byla zjištěna také mezi sedmi italskými odrůdami lnu. Kromě struktury se projevíly rovněž rozdíly mezi odrůdami ve složení, chemicko-fyzikálních a funkčních vlastnostech (Kaewmanee et al., 2014). Rozdílné odrůdy, respektive typy odrůd, mohou vykazovat různou teplotní stabilitu. Hellebois et al. (2021) zmiňuje vyšší teplotní stabilitu slizů extrahovaných ze žlutosemenné odrůdy lnu v porovnání s hnědosemennou odrůdou. Slizotvorné frakce žlutosemenné odrůdy vykazovaly také vyšší molekulovou hmotnost ($1,15-1,34 \times 10^6$ Da), vyšší viskozitu, viskoelastické a zahušťovací vlastnosti. Na základě uvedených výzkumů lze tedy předpokládat, že lněné slizy lišící se strukturou budou vykazovat rovněž odlišnosti ve svých funkčních vlastnostech. Proto také samotné odrůdy vykazující různou strukturu FG danou svým fenotypem odrůdy mohou do jisté míry předurčovat následné využití FG. Navíc, funkční vlastnosti FG v podobě viskoelastivity, schopnost tvorby gelu a emulgační aktivity mohou být rozdílně ovlivněny přítomností fenolových látek, zejména lignanů a fenolových kyselin. Bylo zjištěno, že v případě jejich odstranění dochází ke zlepšení reologických a emulgačních vlastností (Yu et al., 2022).

Úpravy FG po extrakci, například v podobě sušení rovněž ovlivňuje vybrané funkční vlastnosti, zejména emulgační aktivitu, pěnivost a želírovací schopnost (Wang

et al., 2010a). Z uvedených výzkumů je patrné, že kromě daného genotypu, určující chemické složení a strukturu FG, ovlivňují funkční vlastnosti FG také do značné míry podmínky extrakce, zejména pak teplota extrakce. Vhodnou volbou extrakční metody a jejich parametrů lze tedy do určité míry potenciálně zajistit optimální parametry funkčních vlastností FG dle jeho následného použití.

2.3.5 Biologické aktivity lněného slizu

FG, jako ostatní typy rozpustné vlákniny, tvoří ve spojení s vodou viskózní až gelovitý materiál (Guo et al., 2021). Stejně jako nerozpustná vláknina, také lněný sliz zvyšuje hmotnost potravy ve střevě a stolici. (Kajla et al., 2015). FG v této podobě působí na zažívání různými způsoby. Jeho konzumace ovlivňuje absorpci živin v zažívacím traktu, což se projevuje zejména při vstřebávání tuků a cukrů. V rámci jedné konkrétní studie bylo zjištěno, že tuky a cukry byly v případě konzumace FG vylučovány jako součást stolice ve větší míře, než když FG nebyl přijímán. Konzumací FG dochází rovněž k déle trvajícím pocitům sytosti, jež je doprovázený prodlouženou inhibicí enzymu ghrelinu, jakožto signálního trávicího peptidu stimulujícího pocit hladu (Kristensen et al., 2012). V souvislosti s omezeným vstřebáváním tuků a energie bylo v rámci klinických pokusů na zvířatech potvrzeno snížení tělesné váhy, tělesného tuku a celkového obsahu triglyceridů u subjektů přijímajících FG. Navíc bylo zjištěno, že uvedené jevy pravděpodobně souvisí s regulací střevní mikroflóry ovlivněné konzumací FG. Konkrétně byla prokázána inhibice bakterií rodu *Clostridium* z kmenu Firmicutes a naopak mírné zvýšení podílů bakterií z kmenů Bacteroidetes, doprovázené výrazným zvýšením abundance bakterií kmenu Proteobacteria (Luo et al., 2018)

FG, kromě funkčních vlastností, vykazuje rovněž významné biologické aktivity. Antioxidační potenciál FG byl potvrzen v rámci řady studií (Safdar et al., 2019; Safdar et al., 2020; Vieira et al., 2019; Bouaziz et al., 2016; Yang et al., 2020). Pro stanovení antioxidačních aktivit byly využívány zejména metody založené na zhášení radikálů DPPH a ABTS, stanovení celkové antioxidační aktivity (TAC, *Total antioxidant activity*), stanovení celkového obsahu polyfenolů (TPC, *Total polyphenol content*) a metoda odbarvování β -karotenu (BCB, *β -carotene bleaching assay*). Safdar et al. (2019) pozorovali v rámci své studie zvyšování antioxidační aktivity v závislosti na rostoucí koncentraci FG ve vodném roztoku, přičemž nejvyšší antioxidační aktivita

byla zjištěna při nejvyšší měřené koncentraci (30 %) FG, jež činí v rámci celkové antioxidační aktivity (TAC) 588 ± 3.56 (μg ekvivalentu troloxu/ml lněného slizu). Zhášecí aktivity pak dosahovaly hodnoty 98 % vůči radikálu DPPH a 72 % v případě ABTS. Bouaziz et al. (2016) již dříve sledovali antioxidační aktivitu FG extrahovaného ze slupek lněného semene, avšak v rámci metody TAC uvádí v porovnání s polysacharidy extrahovaných z jiných zdrojů (pistáciová a houbová šťáva, mandlová guma) nižší antioxidační potenciál FG. Yang et al. (2019) porovnávali antioxidační aktivity celkového FG a lněných oligosacharidů získaných z FG pomocí enzymatické degradace. Získaná směs oligosacharidů FG vykazovala, při použití metod zhášení DPPH, ABTS a hydroxylového radikálu, vyšší antioxidační aktivity v porovnání s původním FG. FG obsahuje rovněž fenolové kyseliny, které mohou do značné míry ovlivňovat antioxidační potenciál FG (Tab. 5). Vieira et al. (2019) v rámci jejich výzkumu zjistili, že antioxidační aktivity FG jsou závislé na obsahu fenolových látek. Zjistili přítomnost řady fenolových kyselin – kyseliny kávové, *p*-kumarové s epikatechinem, ellagové, skořicové a vanilové. Tak jako v případě ostatních komponentů FG bylo zjištěno, že obsah fenolových kyselin a související antioxidační aktivity jsou ovlivněny teplotou extrakce FG (Tab. 7). S rostoucí teplotou extrakce docházelo ke zvyšování antioxidační aktivity i celkového obsahu polyfenolů. Obsah kyseliny kávové a *p*-kumarové + katechinu s rostoucí teplotou mírně klesal a obsah kyseliny skořicové zůstával téměř neměnný. Obsah ellagové kyseliny se naopak výrazně zvyšoval. Vanilová kyselina pak byla detekována pouze ve FG extrahovaném při teplotě 60 °C. Při této teplotě byl obsah vanilové kyseliny spolu s ellagovou kyselinou srovnatelný s obsahem kávové kyseliny a znatelně vyšší oproti zbývajícím fenolovým kyselinám. Uvedené fenolové kyseliny FG a další fenolové kyseliny obsažené ve lněném semeni (kapitola 2.5.1) vykazují kromě antioxidačních vlastností další zajímavé biologické aktivity, které jsou podrobněji popsány v kapitole 2.5.3.

Tab. 7: Antioxidační aktivity lněného slizu extrahovaného při různých teplotách a zastoupení fenolových látek (převzato a upraveno z práce Vieira et al., 2019)

| teplota extrakce | 25 °C | 40 °C | 60 °C |
|--|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| antioxidační aktivita (% RSA) | 4,39 ± 1,52 ^c | 12,27 ± 2,87 ^b | 29,64 ± 2,39 ^a |
| TPC (mg EKA/100 g FG) | 12,37 ± 0,59 ^b | 13,01 ± 0,20 ^b | 18,60 ± 0,08 ^a |
| Obsah fenolových látek (mg/l) | | | |
| kávová kyselina | 6,58 ± 0,06 ^a | 6,39 ± 0,02 ^b | 6,06 ± 0,11 ^c |
| <i>p</i> -kumarová kyselina + epikatechin* | 1,60 ± 0,14 ^a | 1,43 ± 0,00 ^b | 1,43 ± 0,00 ^b |
| ellagová kyselina | 1,18 ± 0,54 ^a | 1,05 ± 0,07 ^a | 3,14 ± 0,46 ^b |
| skořicová kyselina | 2,28 ± 0,02 ^a | 2,26 ± 0,01 ^a | 2,27 ± 0,01 ^a |
| vanilová kyselina | ND | ND | 5,42 ± 0,00 |

RSA = míra zhášení radikálu (relativně)

TPC = celkový obsah polyfenolů

EKA = ekvivalent kyseliny gallové

ND = nebylo detekováno

* = *p*-kumarová kyselina a epikatechin byly kvantifikovány společně

^{a-c} = různá písmena v rámci jednoho řádku značí statisticky odlišné vzorky na 5 % hladině významnosti

2.3.6 Uplatnění lněného slizu v praktických aplikacích

Veškeré funkční a biologické vlastnosti, uvedené v kapitole 2.3.3, předurčují využití lněného slizu zejména v potravinářství a nabízejí potenciál využití také v lékařství či jiných oblastech lidské činnosti. FG je látka bez chuťové charakteristiky, což je důležitý atribut pro jeho využití v potravinářství (Kaewmanee et al., 2014). FG lze použít jako náhrada běžně používaných zahušťovadel, emulgátorů, stabilizátorů nápojů a podobných aplikací. Může sloužit jako náhrada vaječných bílků v pekařských výrobcích a zmrzlinách. FG ovlivňuje pekařské vlastnosti pečiva jako je například lepivost, reologie a proces pečení. Kromě toho také zlepšuje texturu, která je jemnější, činí chléb déle měkký a oddaluje tvrdnutí v průběhu skladování, což je pravděpodobně způsobeno přítomností arabinoxylanové frakce. FG pozitivně ovlivňuje chování lepku v těstě, v důsledku čehož je pozorován lepší nárůst objemu v průběhu kynutí i pečení (Biliaderis & Izydorczyk, 2006). Zlepšuje také senzoričnou přijatelnost čerstvě upečeného bezlepkového chleba (Korus et al., 2015).

Díky viskozitě a schopnosti stabilizovat emulze lze využít FG v salátových dresincích pro zvýšení viskozity a zabránění flokulace a koalescence obsaženého oleje (Stewart & Mazza, 2000). Díky emulgační aktivitě je možné využít FG také jako součást nápojů, kde může potlačovat krémoatění, a naopak zvyšovat viskozitu ovocných či zeleninových šťáv, přičemž tento jev byl pozorován v případě

nefiltrované mrkvové šťávy (Qin et al., 2005). FG byl úspěšně využit v rámci sprejového sušení k enkapsulaci probiotických laktobakterií umožňující ochranu těchto mikroorganismů v prostředí zažívacího traktu (Bustamante et al., 2017). Přídavkem FG k myofibrilárnímu proteinu vepřového masa došlo ke zvýšení vaznosti masa, čímž se nabízí využití FG při výrobě masných výrobků (Sun et al., 2011). Potenciál využití FG v masných výrobcích dokládá také zvyšování vaznosti vody a tuků, texturu a barvy uzeniny v kombinaci s karagenanem a gelanovou gumou, vlivem přídatku FG. Samotný FG pak zlepšuje stabilitu emulze, tuhost a pružnost uzeniny (Zhou et al., 2010).

Kromě možností uplatnění samotného FG je studován také jeho potenciál v oblasti interakcí s bílkovinami a možnosti tvorby komplexů těchto dvou komponentů. Heterogenní komplexy tohoto typu mohou vykazovat kombinaci, nejenom funkčních, vlastností obou složek samostatně, ale také vlastnosti určené právě jejich interakcí. Mohou se pak uplatnit zejména v potravinářství, lékařství nebo farmaceutickém a kosmetickém průmyslu (Liu et al., 2018). V rámci jednoho z výzkumů zaměřeného na interakce lněný sliz-protein byla pozorována tvorba elektrostatických koacervátů tvořených syrovátkovou bílkovinou a FG. Tyto biopolymery se vyznačovaly vysokou viskozitou a viskoelasticitou, což předurčuje jejich využití jako složku modifikující texturu potravinářských produktů (Liu et al., 2017).

FG je možné využívat i v nepotravinářských aplikacích, například tiskárenském, textilním, tabákovém a papírenském průmyslu (Biliaderis & Izydorczyk, 2006). V imobilizované formě lze FG využít pro výrobu gelových částic umožňující ekologickou adsorpci olejů z odpadních vod, přičemž adsorpční vlastnosti těchto částic překonaly účinek aktivního uhlí (Long et al., 2012). Uplatnění může nalézt také v těžebním průmyslu, byla například prokázána schopnost FG při flotační separaci fluoritu od kalcitu (Wang et al., 2021). Společně s nanokrystaly celulosy může FG tvořit nanokompozitní materiály, respektive biopolymery využitelné pro výrobu bioplastů (Prado et al., 2018).

Biologické vlastnosti FG, zejména v souvislosti s jeho povahou rozpustné vlákniny, předurčují jeho využití v léčbě diabetu, ischemické choroby srdeční, snížení cholesterolu, prevence proti kolorektálnímu karcinomu a rozvoje obezity (Thakur et al., 2009).

2.4. Bílkoviny a peptidy

Bílkoviny lněného semene (FP, *flaxseed proteins*) představují přibližně pětinu celkového obsahu lněného semene. 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.

Tato kapitola se zaměřuje na stručné shrnutí chemického složení, možností izolace a purifikace, funkčních vlastností, biologických aktivit a možnostmi praktického a potenciálního využití bílkovin a peptidů lněného semene. Detailnější charakterizace lněných bílkovin a peptidů v rámci zmíněných charakteristik je, stejně jako v případě FG, součástí výsledkové části této práce (kapitola 4.1) v podobě komplexní přehledové publikace.

2.4.1 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). Data uvedená v tabulce 8 naznačují, že v rámci obsahu aminokyselin se příliš neprojevuje variabilita mezi odrůdami.

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).

Tab. 8: Aminokyselinové složení semen tří odrůd a jednoho poddruhu lnu setého (převzato a upraveno podle Oomah & Mazza, 1993*; Morris, 2007*, Giacomino et al., 2013**)

| AMK | g / 100 g bílkoviny | | | |
|--------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------------|
| | <i>Foster</i> (žlutý)* | <i>Omega</i> (žlutý)* | <i>NorLin</i> (hnědý)* | var. <i>panambi</i> (hnědý)** |
| Alanin | 4,7 | 4,5 | 4,4 | 3,8 |
| Arginin | 10,0 | 9,4 | 9,2 | 9,4 |
| Aspartát | 10,0 | 9,7 | 9,3 | 9,9 |
| Cystein | 1,8 | 1,1 | 1,1 | 1,0 |
| Glutamát | 20,0 | 19,7 | 19,6 | 19,5 |
| Glycin | 5,9 | 5,8 | 5,8 | 5,9 |
| histidin ^E | 2,1 | 2,3 | 2,2 | 2,4 |
| isoleucin ^E | 4,1 | 4,0 | 4,0 | 3,9 |
| leucin ^E | 6,0 | 5,9 | 5,8 | 5,7 |
| lysin ^E | 4,0 | 3,9 | 4,0 | 3,8 |
| methionin ^E | 1,4 | 1,4 | 1,5 | 1,7 |
| fenylalanin ^E | 4,8 | 4,7 | 4,6 | 4,8 |
| Prolin | 3,8 | 3,5 | 3,5 | 3,7 |
| Serin | 4,7 | 4,6 | 4,5 | 5,0 |
| threonin ^E | 3,8 | 3,7 | 3,6 | 4,1 |
| tryptofan ^E | NZ | NZ | 1,8 | 1,5 |
| Tyrosin | 2,4 | 2,3 | 2,3 | 2,3 |
| valin ^E | 5,1 | 4,7 | 4,6 | 4,8 |

AMK = aminokyselina, ^E = esenciální aminokyselina, NS = nebylo stanovováno

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 denaturaci 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).

2.4.2 Možnosti izolace bílkovin a peptidů lněného semene

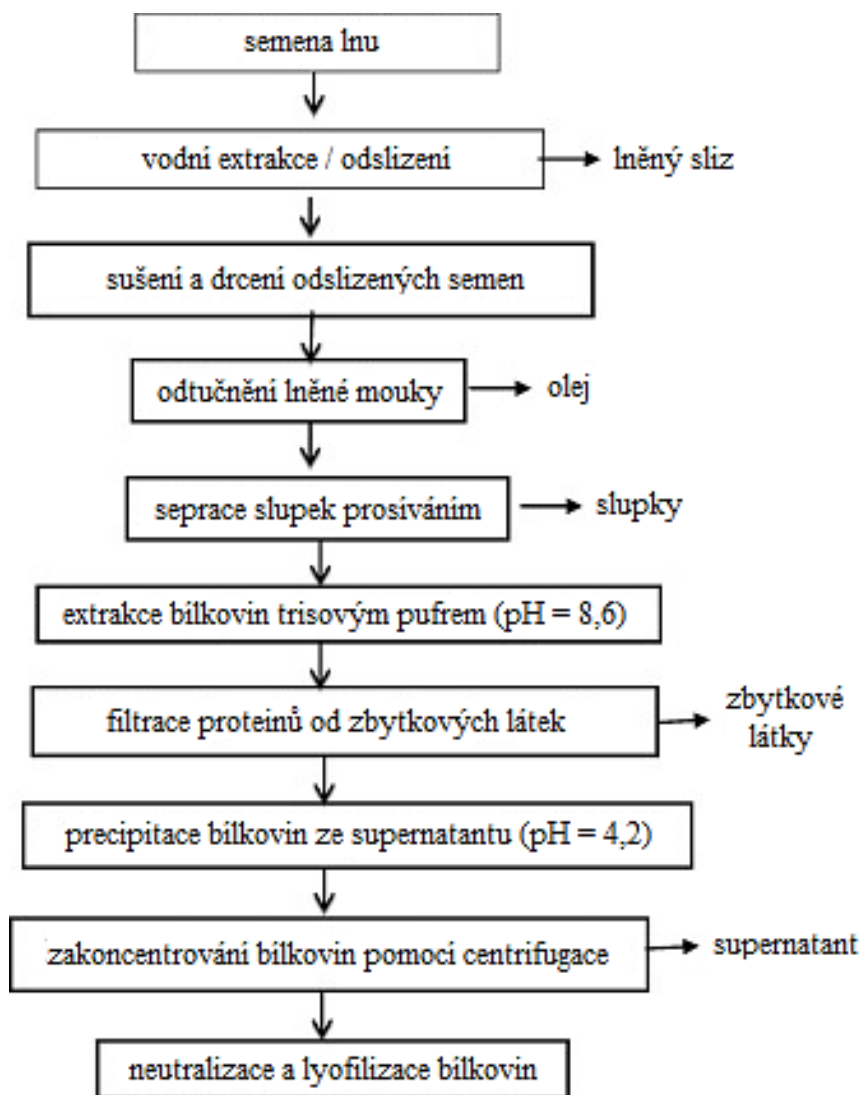
Původní metoda pro izolování FP se prováděla pomocí vysolování s následným odstraněním soli dialýzou. Tímto způsobem bylo možno získat 44 % FP ze semenné mouky zbavené slupek (Smith et al., 1946). S optimalizací metod se postupně začal zvyšovat výtěžek izolovaných bílkovin. Ponecháním lněných semen v 1% roztoku 1

M HCl po dobu 16 hodin a následným, dodatečným promýváním semen v tomto roztoku bylo možné dostáhnout 56% výtěžku bílkovin z odslizené a odtučněné lněné mouky (Oomah & Mazza, 1993). Oomah et al. (1994) ve svém výzkumu optimalizovali podmínky izolace pro maximalizaci výtěžku bílkovin lněného semene. Použity byly různé hodnoty pH rozpouštědla, poměr rozpouštědla a lněné mouky nebo koncentrace soli. Na základě výsledků bylo možné vyvodit, že hodnota pH rozpouštědla nemá jednoznačný významný vliv na rozpustnost a izolaci proteinů lněného slizu. Místo toho se ukázal jako podstatný faktor iontová síla a také poměr mouky a rozpouštědla. Nejvyšší množství extrahovaných proteinů (97 %) bylo dosaženo při použití 10 l pufru (0,8 M NaCl; pH 8,0) na 1 kg semen. Kaushik et al. (2016a) použili pro přípravu proteinového izolátu z mouky lněných semen kombinaci extrakce pomocí 0,1 M trisového pufru (pH 8.6) v poměru 13:1 ke lněným semenům. Následovala kyselá precipitace za využití 0,1 M HCl. Před samotnou izolací bílkovin byl ze semen lnu odstraněn sliz pomocí vodní extrakce, následně byla získána mouka, jež byla dále odtučněna a pomocí sít byly odstraněny obaly semen (Obr. 8).

FP tedy mohou být z odtučněné mouky separovány také pomocí isoelektrické precipitace. Sosulski & Bakal (1969) použili pro isoelektrickou precipitaci úpravu pH na hodnotu 4,5. Pomocí tohoto postupu nebylo možné z odtučněné mouky vysrážet velké množství bílkovin. Nicméně, dle jedné z následujících studií se už alkalického extraktu o hodnotě pH 10 podařilo vysrážet 77 % bílkovin při hodnotě pH 4,1 (Dev et al., 1986). Dev & Quensel (1988) použili isoelektrickou precipitaci pro extrakci bílkovinných izolátů s různými obsahy lněného slizu. Nejprve byly extrahovány bílkoviny společně se slizy v alkalickém prostředí. Následně byly bílkoviny se slizy komplexací koprecipitovány při kyselém pH. Výtěžek FP v případě této studie dosahoval 56-86 %. Lan et al. (2020) použili pro extrakci lněných bílkovin z předem odtučněných a odslizených semen/výlisků alkalizaci na hodnotu pH 8,5 pomocí 1 M NaOH. Posléze byla upravena pH hodnota získaného supernatantu na hodnotu isoelektrických bodů obsažených bílkovin, čímž došlo k jejich vysrážení. Následně byly vysrážené bílkoviny zakoncentrovány a neutralizovány opět pomocí hydroxidu na hodnotu pH 7,0.

Kromě srážecích technik je možné k extrakci FP využít také pufrů, zejména fosfátové. Vassel & Nesbitt v roce 1945 poprvé izolovali globuliny FP právě pomocí pufrů. Odtučněná mouka byla extrahována pomocí 0,2 M fosfátového pufru (pH 7,2)

ve směsi s ethylen glykolem (1:4). Glykolový extrakt byl poté alkalizován na hodnotu pH. Poté byl pomocí dioxanu precipitován, a následně odseparován centrifugací, FG. Následně byl zředěný extrakt okyselen na hodnotu pH 4,5 pro precipitaci bílkovin. Youle a Huang (1981) izolovali pomocí 35 mM fosfátového pufru v 1 M NaCl bílkovinou frakci v poměru 42 % albuminů a 58 % globulinů.



Obr. 8: Návrh přípravy bílkovinného izolátu ze semen lnu (převzato a upraveno podle Kaushik et al., 2016a)

Metody izolace FP pomocí pufrů je možné kombinovat také s chromatografickou purifikací či separací. Dev & Sienkiewicz (1987) extrahovali FG z odtučněné mouky pomocí 0,66 M fosfátového pufru dle Sørensen (pH 7,6) v 1 M NaCl. Izolovaný FP byl následně separován pomocí chromatografické kolony Sephadex G-200, přičemž jako eluční pufr byl použit právě fosfátový pufr dle Sørensen. Pomocí této separace

bylo možné rozdělit FP do tří samostatných frakcí. Madhusudhan & Singh (1983) využili pro izolaci metodu vysolení využitím 1M NaCl, následně použili gelovou permeační chromatografii pomocí kolony s mediem Sepharose 6B, čímž rozdělili FP do tří frakcí. Pro separaci použili rovněž iontově výměnou chromatografii, konkrétně kolonu s aniontovým měničem DEAE – Sephadex, díky níž se podařilo rozdělit FP do čtyř frakcí. Kromě uvedených, standardních, metod izolace FP může být pro izolaci FP použita také metoda využívající precipitaci hexametafosfátem (Wanasundara & Shahidi, 1996).

Peptidy lněného semena je možné izolovat z lněné mouky i samotného lněného oleje. Aladedunye et al. (2013) izolovali cyklolinopeptidy (CLPs, *cyclolinopeptides*) pomocí precipitace methanolem a následné ultrazvukové sonikace. Peptidy byly v získané matici identifikovány a analyzovány pomocí HPLC-MS. Gui et al. (2012b) izolovali CLPs z acetonového extraktu lněných semen, přičemž k separaci CLPs z extraktu polárních látek použili extrakci na pevné fázi s využitím SPE kolonek se silikagelem. Peptidy byly následně eluovány pomocí 100 % ethylacetátu a 10 % methanolu v dichlormethanu. Tímto způsobem byly získány dvě peptidové frakce, které byly analyzovány pomocí HPLC. Peptidy ve formě bílkovinných hydrolyzátů bývají nejčastěji získávány enzymovou hydrolyzou FP pomocí purifikovaných proteas v podobě komerčních produktů, případně lze využít fermentující či proteolytické mikroorganismy. Udenigwe et al. (2009) použili pro štěpení FP tyto proteasy: alkalasu, thermolysin, trypsin, pepsin, papain, pankreatin a ficain. Hydrolyza proběhla použitím hodnot pH optimálních pro jednotlivé enzymy při teplotě 40 °C (pankreatin) a 37 °C (ostatní proteasy) po dobu 4 hodin. V případě štěpení alkalasou byl použit složitější postup. Logarušić et al (2020) použil kromě alkalasy pro získání hydrolyzátů komerční enzymy Neutrase[®] a Protamex[®]. Mezi další využitelné proteasy, kromě uvedených, lze využít také enzymy chymotrypsin, Thermoase[®] a elastasu, případně vybrané kombinace všech zmíněných proteas (Wu et al., 2019).

2.4.3 Funkční vlastnosti bílkovin lněného semene

Podobně jako lněný sliz, také lněné bílkoviny poskytují zajímavé funkční vlastnosti využitelné zejména v potravinářství. Rozdílné složení a vybrané charakteristiky globulinových a albuminových FP ovlivňují právě funkční vlastnosti, jak obou frakcí samostatně, tak i celkového FP. Hydrofilní a hydrofobní povaha obou

bílkovin rovněž ovlivňuje funkční vlastnosti FP. Bílkoviny globulinové frakce, jež jsou špatně rozpustné ve vodě, vykazují vyšší kapacitu pěnivosti, rozpustné bílkoviny albuminu naopak poskytují lepší emulgační aktivitu (Nwachukwu & Aluko, 2018). Samotné FP a jeho izoláty jsou z důvodu převažující přítomnosti globulinů hůře rozpustné oproti bílkovinám získaným z jiných olejních rostlin. Avšak, na rozdíl od izolátů syrovátkových, kaseinových a sójových bílkovin, izoláty FP vykazují lepší teplotní stabilitu. Kromě toho lze FP použít pro stabilizaci emulzí při nízké hodnotě pH. Díky tomu se nedegradované emulze s obsahem FP v silně kyselém prostředí, například v lidském zažívacím traktu, lépe vstřebávají. Vaznost vody a absorpce tuků je v případě FP srovnatelná s izoláty uvedených rostlinných bílkovin (Kaushik et al., 2016a).

FP ve spojení s lněným slizem umožňují posílení některých funkčních vlastností. Koncentrát FP s vysokým obsahem lněného slizu je lépe rozpustný ve vodě než samotný FP, dále pak poskytuje lepší vaznost vody, emulgační vlastnosti, pěnivost oproti samotnému bílkovinnému koncentrátu nebo lněnému slizu. Nicméně, vaznost tuků a stabilita pěny je oproti jmenovaným složkám nižší. Emulgační aktivity a viskozita kombinace FP a FG jsou opět vyšší oproti izolátu lněných bílkovin (Dev & Quensel, 1988). FP vykazuje, kromě podobného nutričního profilu, také srovnatelné funkční vlastnosti jako bílkoviny sóji, zejména povrchové napětí, emulgační aktivity a vaznost vody. Nízkou rozpustnost FP ve vodě lze zvýšit pomocí tepelného ošetření, avšak na úkor snížení vaznosti tuků, pěnivosti a emulgačních aktivit (Oomah & Mazza et al., 1993).

2.4.4 Biologické aktivity bílkovin a peptidů lněného semene

Zatímco původní bílkoviny lněného semene poskytují významné funkční vlastnosti, hydrolyzované FP nebo přirozeně se vyskytující peptidy lněného semene mohou poskytovat řadu biologických aktivit. Významné jsou zejména antioxidační a antibakteriální aktivity, snižování krevního tlaku, a byl u nich také pozorován antidiabetický účinek. Hydrolyzáty bílkovin odtučněné lněné mouky mají schopnost inhibice angiotensin konvertujícího enzymu (ACE, *angiotensin converting enzyme*), přičemž bylo zjištěno, že menší peptidy jsou v inhibici enzymu ACE účinnější než větší peptidy. Také byla prokázána schopnost peptidů inhibovat enzym renin, jehož zvýšená produkce způsobuje vysoký krevní tlak. Udenigwe et al. (2009) popsal

antioxidační aktivity hydrolyzátů FP štěpených sedmi různými proteasami. Peptidy vzniklé štěpením papainem s molekulovou hmotností menší než 1 kDa vykazovaly nejvyšší antioxidační aktivitu v rámci tří použitých metod pro stanovení antioxidačních aktivit. Na základě uvedených výsledků lze naznačovat, že různé typy proteas mohou vytvářet rozdílné peptidy s různě silnými biologickými aktivitami. Silva et al. (2017) uvádí, že přítomnost hydrofobních aminokyselin (glycin, fenylalanin, tryptofan, cystein a alanin) může přispívat k vysoké antioxidační aktivitě peptidů FP. Podobně, jako v případě inhibice ACE, antioxidační aktivita se více projevuje u nízkomolekulárních peptidů, u nichž byla prokázána vyšší zhášecí aktivita vůči radikálu ABTS, oproti peptidům s vyšší molekulovou hmotností. U nízkomolekulárních peptidových štěpů byla dokonce zjištěna vyšší zhášecí aktivita než u vitamínů C a D nebo beta-hydroxykyselin (Hwang et al., 2016).

Semena lnu, zejména pak část děložního lístku, obsahují CLPs (Gui et al., 2012a), u nichž byla popsána imunosupresivní, antimalarická aktivita a inhibice hromadění cholátu v játrech (Wu et al., 2019). Byla rovněž zjištěna antioxidační aktivita CLPs, přičemž tyto peptidy zlepšují oxidační stabilitu lněného oleje (Sharav et al., 2014). Kromě antihypertenzních, antioxidačních a ostatních aktivit bylo u lněných peptidů či samotných bílkovin zjištěno antidiabetické působení (Doyen et al., 2014), antibakteriální působení <1 kDa nízkomolekulárních peptidů vůči bakterii *Pseudomonas aeruginosa* (Hwang et al., 2016), antifungální působení bílkovinného extraktu proti houbám *Penicillium* sp., *Fusarium graminearum*, *Aspergillus flavus* a *Penicillium chrysogenum* (Xu et al., 2007; Xu. et al., 2008), protizánětlivé aktivity hydrolyzátů FG (Udenigwe et al., 2009), potenciální protinádorové působení bílkovin z důvodu vysokého obsahu cysteinu a methioninu (Oomah, 2001), antitrombotické aktivity lněného peptidu hirudinu (Tolkachev & Zhuchenko, 2004) a preventivní působení bílkovinných hydrolyzátů proti neurodegenerativním onemocněním (Omoni & Aluko, 2006).

2.4.5 Uplatnění lněných bílkovin v praktických aplikacích

Bílkoviny lněného semene jsou snadno extrahovatelné z odtučněných a odsližených semen nebo jejich výlisků. Bílkovinné lněné mouky mohou být dále koncentrovány pomocí ověřených postupů do podoby koncentrátů a izolátů. Jsou také poměrně dobře rozpustné ve vodě (~60% rozpustnost při pH 7) (Martínez-Flores et al.,

2006) a mohou být tedy použitelné pro fortifikaci nebo přípravu proteinových nápojů. Schopnost FP tvořit stabilní pěnu může být využitelná pro tvorbu šlehaných cukrářských výrobků (Peng et al., 2022). Díky této schopnosti představuje FP účinnou alternativu například k vaječnému žloutku nebo želatině. FP vykazují relativně vysokou tepelnou stabilitu (Kaushik et al., 2016a), díky čemuž je možné jejich použití v tepelně ošetřených potravinách bez významnější změny sensorických parametrů těchto potravin. Díky významné schopnosti vázat vodu a tuky může použití FP v pekařských výrobcích vést ke snížení jejich tvrdosti a u masných výrobků ke zvýšení šťavnatosti (Rabetafika et al., 2011). Přídavek samotných FP může zlepšovat sensorickou kvalitu (barvu, vůni, chuť) obohacených potravin (Lan et al., 2020). Jak bylo naznačeno v kapitole 2.3.6, FP má schopnost efektivně komplexovat s polysacharidy za tvorby polymerních materiálů v podobě bioobalů a biofilmů. Fyzická bariéra společně s fungistatickou aktivitou FP, a případným přídavkem dalších antimikrobiálních látek, umožňuje delší udržení požadované mikrobiologické a sensorické kvality ošetřeného produktu (Manthey et al., 2008; Xu et al., 2007; Xu et al., 2008). Komplexy FP-polysacharid lze rovněž využít k enkapsulaci probiotik (Łopusiewicz et al., 2021). Komplexací FM a FG do formy polymerního materiálu vede k synergickému působení v podobě posílení funkčních vlastností využitelných pro modifikaci textury potravinářských produktů. Schopnost zvyšovat viskozitu, emulgační aktivitu, a jejich kapacitu stabilizovat emulze, lze uplatnit například v masných emulzích, zmrzlínách a omáčkách (Dev & Quensel, 1989). Spojení těchto hydrokoloidů může být také použito k tvorbě komplexních koacervátů využitelných pro enkapsulaci olejů a zvýšení jejich oxidační stability (Kaushik et al., 2016b).

Hydrolyzované bílkoviny a přirozeně se vyskytující peptidy lněných semen se vyznačují řadou biologických aktivit, jež byly popsány v předchozí kapitole. Oproti samotným bílkovinám vykazují peptidy či bílkovinné hydrolyzáty vyšší antimikrobiální aktivitu. Díky tomu mohou být potenciálně využitelné jako biologicky aktivní složky bioobalů nebo filmů zvyšující trvanlivost ošetřených potravin. Hydrolyzáty lněných bílkovin mohou být společně se sacharidem xylózou a aminokyselinou cysteinem tepelně ošetřeny za vzniku chuťově výrazných produktů Maillardovi reakce. Tyto produkty se podle svojí velikosti mohou použít pro zvýraznění a stabilizaci chutí různých potravin nebo pro poskytnutí masového aroma a příchuti (Wei et al., 2019). Na základě biologických aktivit, spočívající u hydrolyzátů v antimikrobiální, antihypertenzním a antidiabetických účincích, a u CLPs také

imunosupresivních a antimalarických účinků (kapitola 2.4.4), mohou být obě formy peptidů lněných semen potenciálně využitelné, v závislosti na konkrétních biologických aktivitách, jako účinné látky v léčivých přípravcích. Bílkoviny, jejich hydrolyzáty a přirozeně se vyskytující peptidy lněných semen díky svým vlastnostem poukazují na potenciální použitelnost v potravinářství, výživě i farmaceutickém průmyslu.

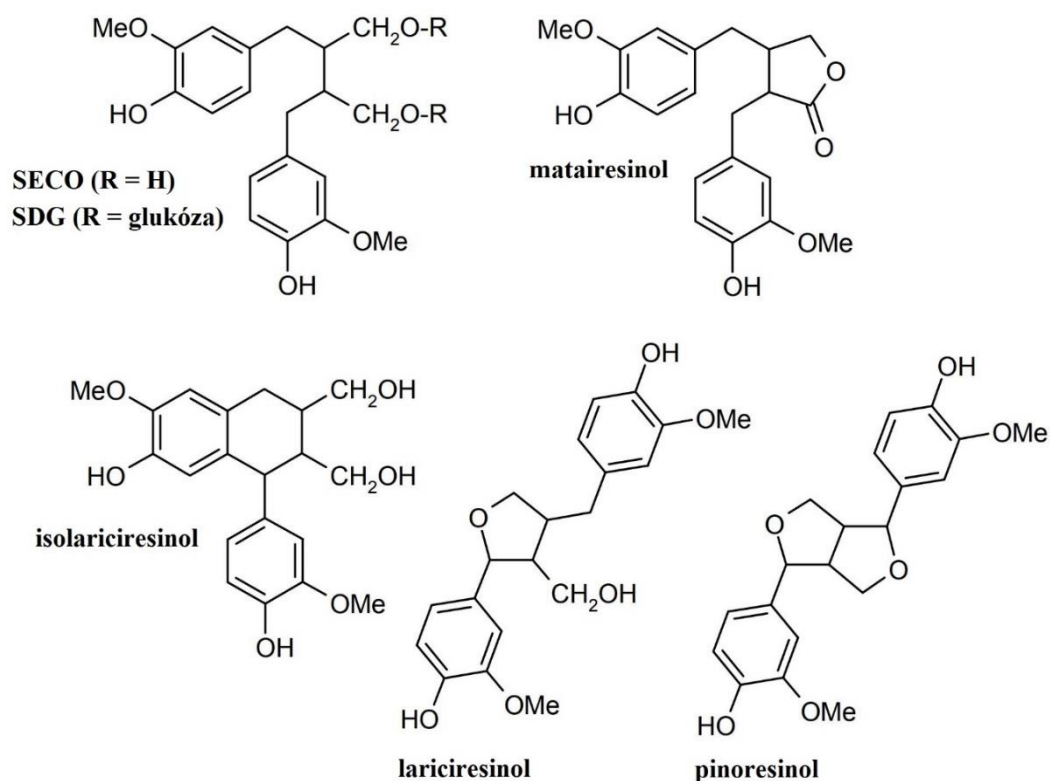
2.5. Fenolové látky lněného semene

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 zrny 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).



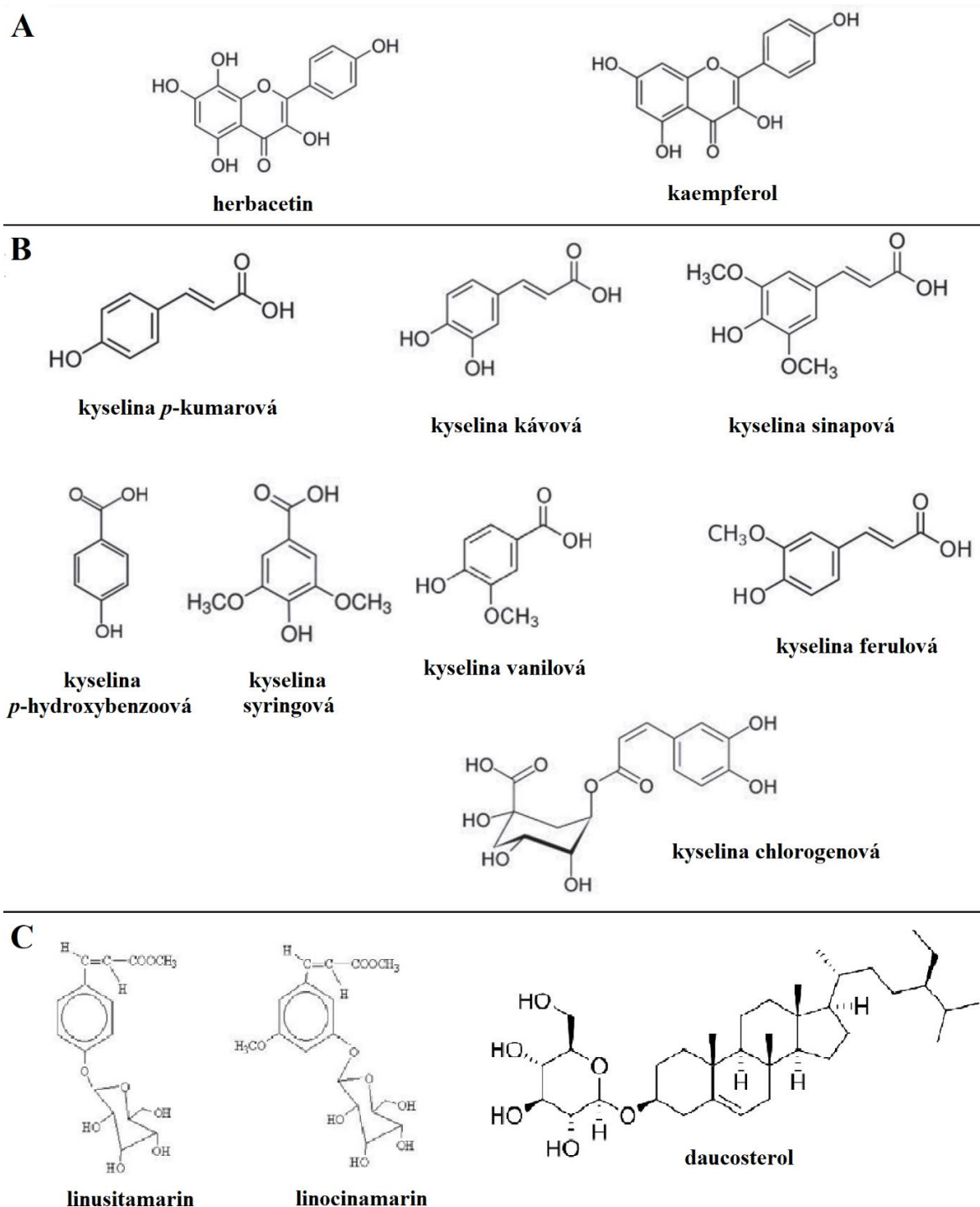
Obr. 9: Struktura lignanů obsažených ve lněném semenu (převzato a upraveno podle Johnsson, 2004)

SECO (R = H) = secoisolariciresinol, SDG (R = glukóza) = secoisolariciresinol diglukosid

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 přadném lnu. Obsah MATA byl výrazně nižší oproti glykosidům SECO, přičemž obsah byl naopak vyšší v případě přadného 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 ojediněle a je tedy diskutabilní.

Lněné semeno obsahuje kromě lignanů také fenolové kyseliny patřící mezi deriváty kyseliny benzoové a kyseliny skořicové (Obr. 10). Byl zjištěný 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.



Obr. 10: Struktura flavonoidů (A), fenolových kyselin (B) a fenypropanoid glukosidů (C) obsažených ve lněném semenu (převzato a upraveno podle Herchi et al., 2014; Kasote, 2014)

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 lignanové 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 fenylypropanoid glykosidy a taniny. Fenylypropanoid 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 fenylypropanoid 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.

2.5.2 Možnosti izolace a analýzy fenolových látek lněného semene

Lignany a ostatní fenolové látky jsou bohatě zastoupeny v obalových vrstvách semene lnu (Hao & Beta, 2012). Společně s vlákninou a bílkovinami lněného semene lze tyto látky nalézt a izolovat například z výlisků semen. Podmínky extrakce fenolových látek lněných semen závisí na jejich molekulární struktuře. Méně polární látky lze extrahovat pomocí hexanu, zatímco ty více polární v podobě SDG mohou být extrahovány pomocí vody, methanolu nebo ethanolu (Sainvitu et al., 2011). Kromě prosté extrakce pomocí rozpouštědel mohou být využity rovněž další způsoby izolace fenolových látek, mezi něž patří například extrakce za vysokého tlaku, ultrazvuková extrakce nebo mikrovlnná extrakce.

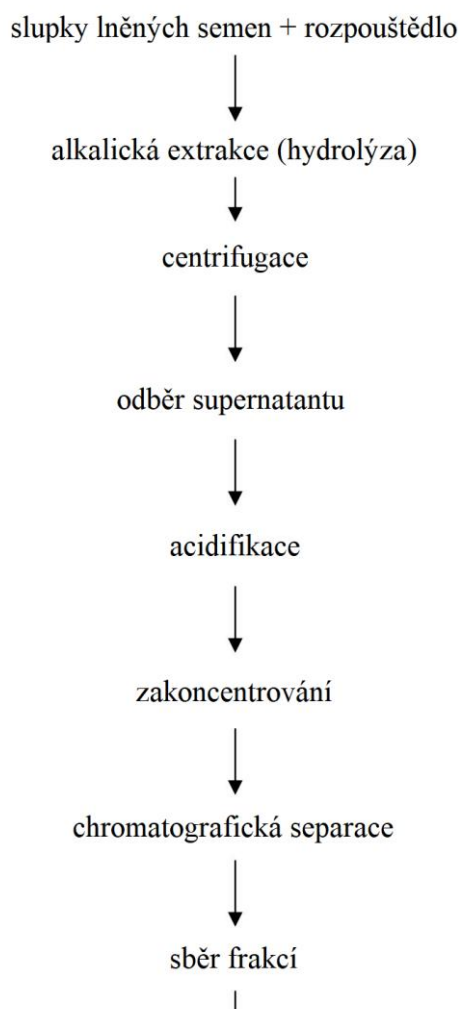
Univerzálním způsobem extrakce lněných fenolů je extrakce pomocí rozpouštědel za použití vhodných fyzikálních podmínek pro zvýšení účinnosti. Hao & Beta (2012) prováděli extrakci více polárních fenolových látek vodní extrakcí s přidávkem hydroxidu vápenatého ve vodní lázni za stálého míchání po dobu 4 hodin při 70 °C. Tímto způsobem bylo možné izolovat SDG, glukosidy kyseliny *p*-kumarové, kávové a ferulové a deriváty kyseliny ferulové, identifikován byl rovněž glukosid

herbacetinu. Zhang et al. (2007) prováděli optimalizaci ethanol-vodní extrakce lněných lignanů. Optimálních výsledků extrakce bylo dosaženo použitím 70 % roztoku ethanolu, při délce extrakce 28 hodin a 40 °C, kdy výtěžek lignanů z odtučněné mouky lněných semen činil přibližně 9,0 % (w/w, lignany/odtučněná mouka). Mezi další způsoby kapalinové extrakce patří extrakce subkritickou vodou, přičemž při vysoké teplotě (190 °C) a pH (9) v extrakční cele bylo možné tímto způsobem velmi efektivně, se 100% výtěžkem, izolovat SDG (Ho et al, 2008). Kanmaz (2013) využil pro extrakci fenolových látek lněného semene metodu extrakce subkritickou vodou, přičemž nejlepších výsledků pro účinnou a rychlou izolaci stanovovaných fenolových látek (SDG, celkové polyfenoly, celkové flavonoidy) bylo dosaženo za podmínek působení subkritické vody při teplotě 180 °C po dobu 15 minut.

Často využívaným způsobem extrakce lignanů a ostatních fenolových látek je také mikrovlnná extrakce. Beejmohun et al. (2007) pomocí tohoto způsobu extrahovali SDG a glukosidy *p*-kumarové a ferulové kyseliny. Oproti konvenční metodě extrakce pomocí 70% methanolu bez použití mikrovln poskytl mikrovlnná extrakce s použitím stejného rozpouštědla větší výtěžnost při menší spotřebě methanolu. Kromě extrakce uvedených fenolových látek byla mikrovlnná extrakce použita také pro izolaci herbacetin diglukosidu s výtěžností 5,76 mg/g sušiny výliskové mouky. Pro extrakci byl materiál rozpuštěn v 70 % roztoku methanolu s obsahem 100 mM NaOH ve výsledném roztoku. Tato suspenze byla vystavena po dobu 6 minut mikrovlnnému záření o energii 150 W. Použitá metoda byla rovněž efektivnější než běžně používané metody při vyšší úspoře času (Fliniaux et al., 2014). Zhang & Xu (2007) v souvislosti s jimi použitou mikrovlnou extrakcí zmiňují v porovnání s běžnou extrakcí ethanolem za stálého míchání nebo pomocí Soxhletovy extrakce rovněž lepší výtěžnost, úsporu času i energie. Nemes & Orsat (2012) optimalizovali metodu mikrovlnné extrakce pro izolaci lignanů lněných, sezamových, chia semen a mandlí. Metody mikrovlnné extrakce jsou tedy obecně využitelné pro extrakci lignanů z rostlinného materiálu.

Ultrazvuková extrakce je jedním z méně rozšířených způsobů izolace fenolových látek, respektive lignanů. Corbin et al. (2015) popsali jako první možnost extrakce lignanů a ostatních fenolových látek lněného semene tímto způsobem. Pomocí této metody bylo možné extrahovat fenolové látky, zejména SDG, s vyšší účinností oproti standardní metodě využívající alkalickou hydrolyzu, a metodami využívající mikrovlnnou a enzymatickou extrakci. Vlivem působení ultrazvuku docházelo pravděpodobně k účinnější degradaci polysacharidů slizové vrstvy semene

a v důsledku toho ke snížení vazby fenolových látek na tyto polysacharidy. Tan et al. (2015) použili pro purifikaci SDG dvoukrokovou extrakci, přičemž v prvním kroku byla využita ultrazvuková extrakce s využitím iontové kapaliny a v druhém kroku



Obr. 11: Obecné schéma postupu extrakce, purifikace a kvantifikace secoisolariciresinol diglucosidu (převzato a upraveno podle Hosseinian & Beta, 2009)

vodná extrakce dvou fází rovněž s využitím iontové kapaliny. Tyto, spíše ojedinělé, metody extrakce vykazovaly poměrně vysokou účinnost.

Jedním ze způsobů uvolnění SECO z lignanových polymerů a SDG může být bakteriální transformace (biotransformace). V rámci *in vitro* experimentů bylo zjištěno, že vybrané bakterie rodu *Bifidobacterium* jsou za určitých podmínek schopné hydrolyzovat SDG za vzniku SECO a monoglukosidu (Roncaglia et al., 2011). Později bylo v podmínkách *in vitro* zjištěno, že lze z odtučněné mouky lněných semen, jež byla součástí kultivačního media, úspěšně uvolnit a purifikovat SECO prostřednictvím biotransformace, využitím fakultativně anaerobní bakterie rodu *Bacteroides* (Li et al., 2012). Využitím bakterií lidské střevní mikroflóry byla potvrzena transformace nativních lignanů

odtučněné lněné mouky nejprve do formy SECO (meziprodukt) a posléze jeho přeměna na savčí lignan enterodiol (Wang et al., 2010b).

Po dané extrakci mohou být fenolové látky dále separovány, například pomocí kapalinové chromatografie. Amarowicz et al. (1994) po extrakci pomocí ethanolu a následně butanolu separovali fenolové látky ze lněných semen pomocí kolon využívající různé typy stacionárních fází, konkrétně Sephadex LH-20, silikagel a RP-8. Tímto postupem bylo možné získat frakce obsahující různé fenolové látky, zejména lignany. Chromatografickou separaci pomocí vysokoúčinné kapalinové

chromatografie (HPLC) je možné taky použít pro purifikaci a analýzu oligomerů SDG a jejich hydrolyzátů, přičemž obecné schéma je popsáno v rámci obrázku 11. Li et al. (2008) využili pro extrakci SDG oligomerů z odtučněných semen 70% vodný roztok methanolu a pro zvýšení účinnosti byla použita sonikace. Následovala alkalická a kyselá hydrolyza oligomerů SDG pro kompletní uvolnění samotných molekul SDG a jiných glykosidů. Pro purifikaci SDG oligomerů, samotných molekul SDG a ostatních glykosidů lignanů byl použit systém HPLC s kolonou se stacionární fází C18 a flash chromatografie s kolonou obsahující silikagel (purifikace oligomerů SDG). Preparativní chromatografie na tenké vrstvě (TLC) byla použita pro purifikaci samotného SDG, secoisolariciresinol monoglukosidu a anhydrosecoisolariciresinolu. Obdobné metody pro extrakci oligomerů, či samotného SDG, případně ostatních lignanů a jejich glukosidů, jejich purifikaci a kvantifikaci, jsou v současnosti běžně využívány a popsány mnoha autory (Johnsson et al., 2000; Muir et al., 2000; Strandås et al., 2008; Yuan et al., 2008; Popova et al., 2009). HPLC systémy v těchto případech často využívají fotodiodové detektory a jsou spojené s hmotnostními spektrometry. Ve spojení s HPLC lze použít rovněž elektrochemický detektor (Marconi et al., 2014).

Lignany lněného semene je možné rovněž charakterizovat pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Tímto způsobem bylo možné identifikovat SECO, isolariciresinol, MATA, PINO nebo méně běžný lignan divanillyltetrahydrofuran. Výhodou tohoto způsobu je možnost kvantifikace lignanů lněného semene pomocí GC-MS přímo v hrubém extraktu, čili bez nutnosti předchozí purifikace lignanů pomocí preparativní HPLC (Meagher et al., 1999). Metody stanovení lignanů lněného semene pomocí HPLC-MS mohou být doplněny identifikací nových derivátů fenolových a stanovení jejich struktury pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR, *nuclear magnetic resonance*). Johnsson et al. (2002) využitím kombinace LC-MS s NMR byli schopni identifikovat glukosylované deriváty *p*-kumarové kyseliny a ferulové kyseliny. Degenhardt et al. (2002) pomocí vysokorychlostní protiproudé chromatografie (HSCCC, *high-speed countercurrent chromatography*) purifikovali SDG, přičemž identita SDG byla ověřena pomocí HPLC v kombinaci s NMR.

2.5.3 Biologické aktivity fenolových látek lněného semene

Fenolové látky jsou obecně nejvíce zastoupenými sekundárními metabolity rostlin (Ayad & Akkal, 2019). Jejich biosyntéza a působení je součástí obranných mechanismů rostlin proti biotickému a abiotickému stresu (Chowdary et al., 2021). Lněné semeno obsahuje řadu významných zástupců hlavních kategorií rostlinných fenolových látek, které se vyznačují zajímavými biologickými aktivitami. Akl et al. (2020) popisují významné biologické aktivity extraktu fenolových látek z lněného semene. Mezi biologické aktivity patří zejména: antioxidační aktivity, antimikrobiální aktivity a kancerostatická aktivita vůči různým typům nádorových buněk. Biologické aktivity jednotlivých skupin fenolových látek lněného semene jsou popsány v následujících odstavcích.

Lignany jsou patrně nejvýznamnější a nejvíce studovanou skupinou fenolových látek lněného semene. Molekuly lignanů se jako součást rostlinného materiálu vyskytují ve formě polymerů, avšak v této formě nemohou být člověkem využitelné. V případě lnu nejsou samotné molekuly SDG, jakožto převažujícího lignanu, stravitelné v rámci trávicího traktu savců a pro jejich utilizaci je nutná dekompozice polymeru a přeměna SDG. V prvním kroku dochází k rozrušení esterových vazeb a uvolnění SDG z polymerů, následně je deglykosylován do formy aglykonu – secoisolariciresinolu. SECO je následně metabolizován do forem jednoduchých savčích, biologicky aktivních, lignanů enterodiolu a enterolaktonu, které jsou lépe stravitelné v porovnání se samotným SDG (Yang et al., 2021). Kyselka et al. (2017) popisují významné antimikrobiální aktivity anhydrosecoisolariciresinolu, který v rámci *in vitro* antimikrobiálních testů inhiboval růst významných mikrobiálních patogenů, zejména *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Candida albicans*. Lignany lněného semene, zejména SDG, se vyznačují svojí antioxidační aktivitou v podobě zhášení hydroxylových radikálů (Prasad, 1997). Biotransformované lignany v podobě enterolaktonu a enterodiolu mohou mít vyšší antioxidační aktivitu než samotné SDG (Kitts et al., 1999). Lignany mohou působit jako analogy hormonu estrogenu, případně anti-estrogenu, dle produkce tohoto hormonu v lidském těle (Touré & Xueming, 2010). Bylo zjištěno, že extrakty lignanů získané ze semen lnu snižují koncentraci cholesterolu a glukózy v krevní plazmě hypercholesterolemických pacientů (Zhang et al., 2008). Popisován je také preventivní účinek lněných lignanů proti některým nádorovým onemocněním, například karcinomům prsou, prostaty,

tlustého střeva a karcinomům kůže (Touré & Xueming, 2010). Velalopoulou et al. (2015) pozorovali radioprotektivní účinky SDG, kdy buňky plicní tkáně ošetřené pomocí SDG byly schopné v rámci experimentů odolávat gama záření. Imran et al. (2015) popisují v souvislosti se jmenovanými aktivitami SDG, včetně protizánětlivých a neuroprotektivních aktivit, jeho preventivní působení proti rozvoji nejrůznějších chorob a souvisejících důsledků v podobě nádorových a kardiovaskulárních onemocnění, ateroskleróze, diabetu, poruch reprodukce, vylučovací soustavy a krvetvorby, imunodeficienci, rozvoji stresových stavů, chorob kostí či ledvin a jaterním nekrózám. Díky hypertenzivním vlastnostem může SDG představovat také alternativní substanci k lékům typu ACE inhibitorů při léčbě vysokého krevního tlaku (Prasad, 2013).

Fenolové kyseliny jsou další skupinou fenolových látek lněného semene, jež se vyznačují významnými biologickými aktivitami. Více fenolových kyselin obsahuje samotná slizotvorná frakce lněného semene (kapitola 2.3.3). Vanilová kyselina je významnou fenolovou látkou řady léčivých rostlin (Sytar et al., 2018). Je rovněž spojená s antikarcinogenními, protizánětlivými a antiapoptickými účinky. Díky svým sensorickým vlastnostem se vanilová kyselina uplatňuje také v potravinářství, kde je součástí aditiv a aromat (Gitzinger et al., 2011; Vinothiya & Ashokkumar, 2017). Ellagová kyselina vykazuje antimutagení, antikarcinogenní a protizánětlivé účinky (Feng et al., 2009). U kávové kyseliny bylo prokázáno antikarcinogenní působení (Prasad et al., 2011), navíc zpomaluje rozvoj neurodegenerativních onemocnění jako je například Alzheimerova choroba (Akomolafea et al., 2017). Skořicová kyselina a její deriváty se vyznačují řadou účinků, mezi něž patří antikarcinogenní, antimikrobiální, antidiabetické, antiepileptické, antidepressivní, neuroprotektivní, analgující, protizánětlivé a sedativní aktivity (Oishi et al., 2017). Kyselina ferulová rovněž poskytuje řadou biologických aktivit. Kromě zmíněných antioxidačních, antimikrobiálních, antialergických, antitrombotických, antikarcinogenních a protizánětlivých aktivit bylo zjištěno také hepatoprotektivní působení této fenolové kyseliny (Kim & Park, 2019). Sinapová kyselina vykazuje antioxidační, antimikrobiální, protizánětlivou a antikarcinogenní aktivitu (Nićiforović & Abramovič, 2013). Kyselka et al. (2017) prokázali antimikrobiální působení kyseliny *p*-kumarové a kyseliny kávové proti patogenům *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* a *Aspergillus brasiliensis*. Antioxidační, antikarcinogenní, antimikrobiální, protizánětlivé, a další aktivity

související například s léčbou kardiovaskulárních a civilizačních chorob byly objeveny rovněž v případě *p*-kumarové kyseliny a jejích konjugátů (Pei et al., 2015). Stejně, nebo podobné biologické aktivity pak vykazuje také epikatechin (Prakash et al, 2019).

Flavonoidy jsou ve lněném semenu zastoupeny zejména ve formě C-glykosidů a O-glykosidů. C-glykosidy flavonoidy vykazují antioxidační aktivity, antidiabetické aktivity, protizánětlivé, hepatoprotektivní a další aktivity (Courts & Williamson, 2015). V případě O-glykosilovaných flavonoidů jsou popsány zvýšené antivirální, antistresové, antiobezitní, antialergické a některé další aktivity (Xiao, 2017). Glykosylované flavonoidy jsou pravděpodobně pomocí střevní mikroflory transformovány do formy aglykonů, které jsou lépe vstřebatelné. Samotné flavonoidy pak kromě vyšších antioxidačních aktivit, oproti jejich glykosylovaným derivátům, vykazují biologické aktivity, které jsou často s aktivitami jejich glykosidů shodné. Jedná se zejména o antibakteriální, antivirální, protizánětlivé, antialergické a antihypertenzní aktivity. Konkrétním zdravotním přínosem flavonoidů je inhibice peroxidace lipidů, agregace trombocytů a permeability kapilár (Peirotén et al, 2020; Oomah & Mazza, 2000). Součástí lněných semen je také herbacetin diglukosid. Jak glukosidy herbacetinu, tak i samotný aglykon, se podobně jako ostatní flavonoidy vyznačuje antioxidačními, protizánětlivými, antidiabetickými a protinádorovými vlastnostmi, zejména proti karcinomům tlustého střeva a kůže (Wei et al., 2021). Veermani et al. (2018) navíc popisují jeho antihypertenzivní, antibakteriální a antiobezitní aktivity a potenciální kancerostatickou aktivitu proti karcinomům prsu.

Rostlinné fenylypropanoid glukosidy a taniny jsou, jak již bylo uvedeno, minoritní skupiny fenolových látek lněného semene. Fenylypropanoid glukosidy disponují podobnými biologickými aktivitami jako lignany, fenolové kyseliny a flavonoidy. Byla u nich popsána antifungální, antivirální, antihypertenzní, protinádorová a imunomodulační působení. Tyto aktivity jsou spojené do značné míry s jejich antioxidačními vlastnostmi (López-Munguía et al., 2011). Taniny se vyznačují celou řadou biologických aktivit, přičemž mezi ty nejvýznamnější se řadí antioxidační, protizánětlivé, antidiabetické, kardioprotektivní, antibakteriální a antivirální aktivity (Fraga-Corral et al., 2021).

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 vyliscích 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 výliskovou mouku různých charakteristik, včetně možností jejího použití pro zušlechťení 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 VÝSLEDČÍCH

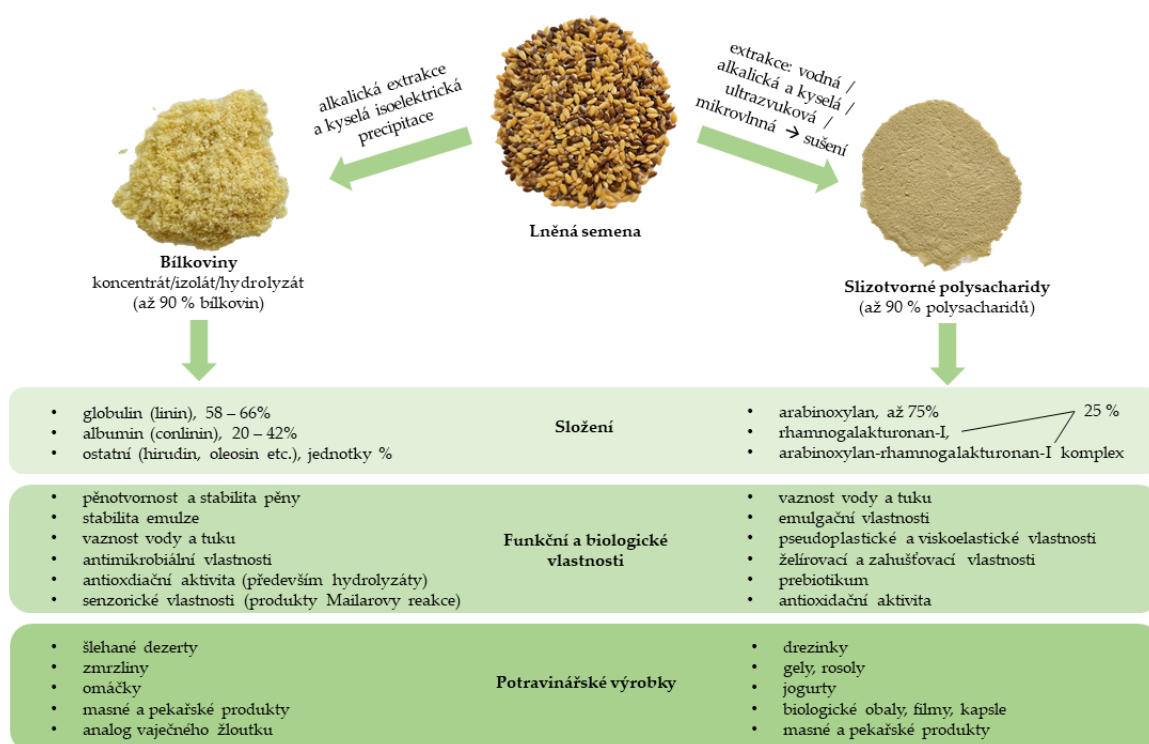
4.1 Literární přehled o složení, struktuře, funkčních vlastnostech a možnostech využití lněných bílkovin a slizů v potravinářství a výživě

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 (Obr. 12).

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 gummy. 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 polymer 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.



Obr. 12: Schématické vyjádření možností extrakce bílkovin a slizů lněných semen, jejich funkčních vlastností a příklady využití v potravinářských výrobcích (Převzato a upraveno podle Lorenc et al., 2022)

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, jež jsou popsány na obrázku 12. 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.

Kompletní informace a zdroje vztahující se k dané problematice a výše uvedenému shrnutí jsou uvedeny v publikaci:

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.

Review

Structural Characterization and Functional Properties of Flaxseed Hydrocolloids and Their Application

František Lorenc ^{1,*}, Markéta Jarošová ², Jan Bedrníček ¹, Pavel Smetana ¹ and Jan Bárta ²

¹ Department of Food Biotechnologies and Agricultural Products' Quality, Faculty of Agriculture and Technology, University of South Bohemia in České Budějovice, Studentská 1668, 370 05 Ceske Budejovice, Czech Republic; bedrnicek@fzt.jcu.cz (J.B.); smetana@fzt.jcu.cz (P.S.)

² Department of Plant Production, Faculty of Agriculture and Technology, University of South Bohemia in České Budějovice, Na Sádkách 1780, 370 05 Ceske Budejovice, Czech Republic; jarošovam@fzt.jcu.cz (M.J.); barta@fzt.jcu.cz (J.B.)

* Correspondence: lorencf@fzt.jcu.cz

Abstract: Flaxseed is an excellent source of valuable nutrients and is also considered a functional food. There are two types of hydrocolloids in flaxseed: flaxseed gum and proteins. Flaxseed gum exhibits emulsifying and foaming activities or can be used as a thickening and gelling agent. Due to its form of soluble fiber, flaxseed gum is related to many health benefits. Flaxseed proteins have various functional properties based on their physicochemical properties. While albumins possess the emulsion-forming ability, globulins better serve as foaming agents. Flaxseed proteins may also serve as a source of functional peptides with interesting biological and health-related activities. Functional properties and health-related benefits predetermine the application of these hydrocolloids, mainly in the food industry or medicine. Although these properties of flaxseed hydrocolloids have been recently and extensively studied, they are still not widely used on the industrial scale compared to other popular plant gums and proteins. The aim of this review was to present, discuss and highlight the recent discoveries in the structural characteristics and functional and biological properties of these versatile hydrocolloids with respect to factors affecting their characteristics and offer new insights into their potential applications as comparable alternatives to the other natural hydrocolloids or as the sources of novel functional products.

Keywords: *Linum usitatissimum* L.; flaxseed; food hydrocolloids; flaxseed proteins; flaxseed gum; functional properties; health benefits



Citation: Lorenc, F.; Jarošová, M.; Bedrníček, J.; Smetana, P.; Bárta, J. Structural Characterization and Functional Properties of Flaxseed Hydrocolloids and Their Application. *Foods* **2022**, *11*, 2304. <https://doi.org/10.3390/foods11152304>

Academic Editor: Moshe Rosenberg

Received: 29 June 2022

Accepted: 29 July 2022

Published: 2 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Flax (*Linum usitatissimum* L.) is a traditional crop grown to produce oilseeds or fiber. Flaxseed has been mainly used for oil production, whereas the remaining by-products in the form of defatted flaxseed meal (FM) or oil cake are usually fed to animals [1,2]. Edible flaxseed products include whole, ground, or crushed flaxseed, extracted oil, or gum [3]. Dietary flaxseed has recently been used in the human diet due to its nutritional value, determined mainly by the high-quality oil and proteins followed by the high content of insoluble and soluble dietary fiber [1]. Together with the high content of phytoestrogens in the form of lignans, these compounds of flaxseed are related to many health benefits [4]. Flaxseed fulfills the parameters of functional food due to its significant content of polysaccharides and proteins with a broad spectrum of functional properties [3]. However, for maximizing the potential of flaxseed in the human diet, its form appears to be a crucial factor. Compared to whole or crushed seeds, a better bioavailability of lignans from ground flaxseed has been reported [5], suggesting the influence of its form on the bioavailability of other involved bioactive compounds. Flaxseed is composed of 37–41% fat, 28–29% total dietary fiber, 20% protein, 6.5–7.7% moisture, and 2.4–3.4% ash [3,6]. Flaxseed oil has a

balanced ratio of unsaturated fatty acids, mainly α -linolenic acid representing approximately 40–60% of flaxseed oil content (by traditional flax cultivars), followed by the oleic and linoleic acids [1]. Dietary fiber consists of soluble and insoluble fiber, whereas the prevailing fraction (60–80% of total fiber) represents insoluble fiber [7] composed of lignin, hemicellulose, and cellulose [8]. Regarding its chemical composition, flaxseed is a rich source of substances possessing hydrocolloidal properties.

Hydrocolloids are colloidal substances with an affinity for water, represented mainly by polysaccharides and proteins. Hydrocolloids produce viscous solutions, pseudo-gels, or gels in water and can be used to thicken and stabilize formulations. As an ingredient in foods, they influence viscosity and texture [9]. Most commercially important hydrocolloids are of natural origin. Plant sources of hydrocolloids, including popular gums and vegetable proteins, are extracted from trees (cellulose), tree gum exudates (gum arabic, gum karaya, gum ghatti, gum tragacanth), plants (starch, pectin, cellulose), seeds (guar gum, locust bean gum, tara gum, tamarind gum and soybean, pea and wheat proteins) or tubers (konjac mannan). The important hydrocolloids can also be found in red seaweeds (agar, carrageenan) and brown seaweeds (alginate). Lots of natural hydrocolloids have a microbial origin (xanthan gum, curdlan, dextran, gellan gum, cellulose) and animal origin (gelatin, caseinate, whey protein, egg white protein, chitosan) [10]. The natural gums may serve in foods mainly as stabilizers, thickening, gelling, and encapsulating agents [11]. Vegetable protein isolates can be used as foaming, emulsifying and gelling agents. Some of these proteins can also be characterized by their high water- and fat-holding capacity and dough formation [12]. Beyond that, novel functional products possessing enhanced functional properties can be obtained by processing the raw hydrocolloids, for instance, by enzymatic hydrolysis. Hydrolysis of proteins can lead to the production of functional peptides. Protein hydrolysates from rice [13] or rice bran [14] possess better functional, especially emulsifying, properties compared to native proteins. Hydrolysis of egg yolk improves its heat resistance and emulsifying properties [15]. Soy protein hydrolysates can show higher solubility, oil-holding, and foaming capacity than the original soy protein isolate [16]. Partially hydrolyzed guar gum shows improved rheological and pasting characteristics [17]. Oligosaccharides produced by enzymatic hydrolysis of guar gum [18,19], basil seed gum [20], and glucomannan gum [21] can be used as prebiotics. As a unique property, it was reported that new substances obtained by acid and enzymatic hydrolysis of ι -carrageenan might induce significant retardation of recrystallization in the sucrose solution [22]. Apart from food applications, hydrolysates of hydrocolloids often have various specific and direct effects on molecular mechanisms of human physiology [23]. Flaxseed represents a source of two further significant natural hydrocolloids—flaxseed gum (FG) and flaxseed proteins (FPs). The specific attributes of FG and FPs determine their functional properties, potentially usable in various applications, especially in the food industry and health-related applications.

FG is a heteropolysaccharide composed of neutral and acidic monosaccharides. Its presence is concentrated in the seed coat [24]; thus, it can be easily extracted by water from whole seeds, meals, or hulls of flaxseed [25]. Although hydrocolloids are mostly not appropriate emulsifiers [9], FG is a suitable additive for stabilizing water-oil emulsions. Its emulsifying activities are comparable to or better than commonly used emulsifiers [26]. Other functional properties of flaxseed gum are represented by its water- and oil-binding capacity [3,27], thickening, stabilizing [25], and gelling activities [28]. Due to its form of dietary fiber and presence of phenolic compounds, FG possesses antioxidants [24,29–31], anti-obesity [32], anti-cholesterol, and anti-diabetic activities [33].

FPs form approximately 20% of flaxseed weight [34]. The high quality of FPs is determined by the increased presence of essential amino acids, and their spectrum is comparable to the spectrum of soy protein [3]. The functional properties of FPs depend on their physicochemical characteristics. Flaxseed protein isolate (FPI) can be used as a foaming agent and emulsifier [35]. The mixtures of FG and FPs act better as an emulsifier, foaming, and water-binding agent than solely FG and FPI [36]. FPs can serve as a source

for producing functional peptides with various biological activities related to health benefits, e.g., antioxidant and antimicrobial properties, anti-diabetic activities, or they act as angiotensin-converting enzyme inhibitors [37].

In this review, we aim to describe the chemical structures of flaxseed polysaccharides and proteins; present and discuss the functional properties of both types of hydrocolloids with respect to factors affecting their characteristics; summarize their recent application, and suggest their potential for future applications, especially in the food industry.

2. Flaxseed Gum

FG, also known as flaxseed mucilage, is present in the outer layer of the seed coat [38], and its content in the whole seed ranges between 3.5–15.0% [24,39,40], depending on the flax variety and the planting area [41]. The extraction method and its parameters determine the yield [39], purity, and properties of FG. For instance, the temperature of extraction is an essential factor affecting the chemical composition [29,41], functional properties [29,40,41] and biological activities [29]. Functional properties of FG can also be determined by the processing after extraction, for instance, by drying [42]. Thus, the applied extraction method and further processing are the key factors for obtaining FG with the optimal properties according to subsequent use.

2.1. Methods of Extraction

Polysaccharides are easily extractable from flaxseed; it is possible to obtain them from whole seeds [41], seed hulls [43], or oilseed cake [27]. Safdar et al. [30] used four methods for the extraction of FG from whole flaxseeds with differences in the relative yield of FG from flaxseeds: hot water extraction (9.0%), ultrasound-assisted extraction (7.8%), microwave-assisted extraction (7.0%) and alkaline–acidic extraction (6.4%). For the highest yield of FG, hot water extraction is preferable, whereas, for maximal purity, it is most suitable the ultrasound-assisted extraction method. Cui et al. [44] suggested the optimal condition of aqueous extraction with respect to yield, apparent viscosity, and protein content of the final gum extract. These conditions were a temperature of 85–90 °C, a pH 6.5–7.0 and a water:seed ratio of 13. Subsequently, Kaushik et al. [41] reported that the yield, purity of carbohydrates, and protein content could be significantly affected by the extraction temperature within the aqueous extraction. They observed the increasing yield of FG from 2.1 to 8.4% with increased extraction temperature from 30 to 90 °C. They have also suggested that the longer extraction time increases the yield of FG. Fabre et al. [45] reported ultrasound-assisted extraction as the most effective method with a 6.8% relative yield, followed by hot-water extraction (6.5%) and microwave-assisted extraction (2.1%). Except for the methods and conditions of extraction, the yield of FG can vary with the type of flax cultivar, crop age, and climate [46]. Since the extraction method or its conditions, such as temperature or length of extraction within the aqueous extraction, increase the yield of extracted FG or can change the chemical composition, as it is discussed in Section 2.2, too harsh conditions can cause the degradation of FG and formation of artifacts [46]. These changes could probably lead to the deterioration of the functional properties of FG and limit its potential applications. Thus, the effort to maximize FG yield should not be the only criteria for extracting FG.

2.2. Chemical Composition and Structure

FG composition depends on genotype, production practices, environment, and storage conditions [40]. The potential yield of FG is also determined, apart from the extraction conditions, by the cultivar of flax. The chemical composition of FG is shown in Table 1. FG is composed mainly of polysaccharides, up to 90% of relative content. Kaushik et al. [41] reported 80–90% saccharides content in FG, depending on the extraction temperature. Other studies present lower values for saccharides within FG, reaching only 68% [47] or 71% [39]. The minor part of FG represents proteins, lipids, ashes [24,41], and other compounds, such as phenolic acids [29]. However, within several studies describing the chemical composition

of FG, the different values reported for saccharides, proteins, and ashes determine the wide range of their relative content in FG (Table 1). The content of lipids is low compared to other constituents. The relative content of saccharides and proteins depends on the temperature of extraction, whereas increasing the extraction temperature from 50 °C to 90 °C reduces the polysaccharides yield (90.3% → 80.0%) but increases the content of proteins (4.7% → 15.1%) in FG. Conversely, there were not reported significant changes in the content of ashes and fats induced by the changes in the extraction temperature [41].

FG has a highly branched polymeric structure [48]. Polysaccharidic complexity is determined by the presence of polysaccharidic fractions with various molecular weights (MW) composed of monosaccharides. According to the literature, the presence and abundance of monosaccharides can be quite variable, as shown in Table 2, and significantly affect the properties of FG. This diversity can be determined by various factors, such as the temperature of aqueous extraction [41] and flax cultivar [49]. There was described the presence of the neutral (arabinoxylan-rich—MW up to 5500 kDa), acidic (rhamnogalacturonan-I rich—MW < 500 kDa) and composite arabinoxylan-rhamnogalacturonan I-rich (1700 < MW < 700 kDa) fractions [50]. Warr et al. [51] suggest that the neutral fraction accounts for about 75% of flaxseed polysaccharides, and the remaining acidic fraction makes up about 25%. Hellebois et al. [50] reported broad MW distribution with the dispersity index (D) ranging from 2.11 to 3.82, whereas this parameter was not dependent on the extraction method or genotype of flax. They identified four polysaccharide populations corresponding to 4513 (<3%), 1627 (31–48%), 701 (22–43%) and 231 (19–35%) kDa. Qian et al. [43] assessed the MW of polysaccharides within FG composed of high MW arabinoxylans (1470 kDa) and rhamnogalacturonans with a higher MW fraction (1510 kDa) and lower MW fraction (341 kDa). Safdar et al. [24] reported the average MW of FG as 1322 kDa with a polydispersity ratio of 1.6 for Mw/Mn and 2.4 for Mn/Mz.

Table 1. Chemical composition of flaxseed gum powder. Presented as the ranges of values reported in the literature (on wet matter basis).

| Constituent | Content [g/100 g] | References |
|-------------|-------------------|------------------|
| Proteins | 1.5–22.1 | [24,39,41,47,52] |
| Ashes | 0.6–11.2 | [24,39,41,47] |
| Saccharides | 67.7–90.4 | [24,41] |
| Fats | 0.3–2.1 | [24,41,47] |
| Moisture | 3.4–5.5 | [24,41,47] |

A neutral polysaccharide is an arabinoxylan consisting of L-arabinose, D-xylose, and D-galactose [24]. Warrand et al. [53] described the structure of neutral polysaccharides as the 1,4-linked β -D-xylans substituted by D-arabinose or terminal L-fucose, D-xylose, or D-galactose, whereas they vary in galactose and fucose residues within their side chains. β -1,4-linked xylose backbones of arabinoxylans of FG are unsubstituted or substituted at O-2 and/or O-3 positions by 1-3 sugar residues [54]. Kaushik et al. [41] presented arabinose and xylose as the major monosaccharides of arabinoxylan, having a ratio ranging from 0.6 to 0.7, which did not vary with the extraction temperature. They have suggested that this ratio is responsible for a moderately branched structure of FG.

The acidic polysaccharide is represented by rhamnogalacturonan containing L-rhamnose, L-fucose, L-galactose, and D-galacturonic acid [24]. Qian et al. [43] described the structure of the acidic polysaccharide fraction of FG composed of a backbone consisting of rhamnogalacturonan-I interrupted by the small amount of homorhamnan or homogalacturonan. They also reported a high amount of monogalactosyl branches 3-linked to half of the 1,2-linked rhamnosyl residues. Another study reported that rhamnogalacturonan blocks could be monosubstituted at the O-3 position of rhamnose by side chains of terminal galactose or fucose, occasionally by neutral monosaccharides. The rhamnose/galacturonic acid content was similar since their calculated ratio was 1.22 to 0.85. A branching degree was estimated at 0.33 to 0.65 [55]. Authors also suggested that the variability of acidic

fractions of FG is not related to the rhamnogalacturonan-I backbone but rather by the type and degree of substitutions. A significant contribution to the relative abundance of acidic polysaccharides also determines the presence of galacturonic acid. There was reported only a minor content of galacturonic acids, approximately 7% [24]. However, other studies describe higher values, such as 23% [56], respectively 21–25% [49]. One of the former studies has described a high galacturonic acid content (approx. 40%), making it even the most abundant monosaccharidic constituent [57].

Table 2. Monosaccharide composition of flaxseed gum.

| Monosaccharide | Relative Monosaccharide Compositions [%] | | | |
|-------------------|--|----------------------------------|------------------|---------------------------------|
| | Safdar et al. [24] | Kaushik et al. ^a [41] | Qian et al. [56] | Cui and Mazza ^b [49] |
| Arabinose | 8.3 | 25.4–28.0 | 9.8 | 6.9–10.7 |
| Xylose | 13.5 | 42.9–47.6 | 29.7 | 16.1–29.5 |
| Galactose | 18.7 | 13.0–14.0 | 17.2 | 15.8–21.6 |
| Glucose | 20.0 | 2.3–3.1 | 2.1 | 1.7–6.2 |
| Rhamnose | 23.9 | 7.0–8.2 | 12.7 | 16.7–20.4 |
| Fucose | 8.0 | 2.9–3.8 | 5.4 | 4.0–5.3 |
| Galacturonic acid | 6.8 | ND | 23.0 | 21.0–25.1 |
| Mannose | 0.4 | NR | NR | ND |
| Ribose | 0.2 | NR | NR | NR |
| Glucuronic acid | 0.03 | NR | NR | NR |
| Glucosamine | 0.2 | NR | NR | NR |

NR: not reported; ND: not detected; ^a: extraction of flaxseed gum was performed at 30, 50, 70 and 90 °C, the range of the values is determined by the lowest and the highest values obtained within the extraction by different temperatures; ^b: for the study were used three flax cultivars—NorMan, Omega and Foster, the range of the values is determined by the lowest and the highest value obtained within single cultivars.

The extraction conditions may affect the ratio between the types of monosaccharides in obtained FG. Kaushik et al. [41] reported decreased ratio of neutral:acidic monosaccharides from 6.7:1 to 5.7:1 as the extraction temperature was increased from 30 to 90 °C. Troshchynska et al. [58] found that the FG of brown seed cultivars Libra Bio and Recital were more acidic (pH 5.4–5.5) compared to the yellow-seeded cultivars Amon and Raciol (pH 5.8–6.1). However, Cui and Mazza [49] reported the lower content of acidic monosaccharides (rhamnose, fucose, galactose, and galacturonic acid) and, conversely, higher content of neutral xylose within brown-seed cultivar NorMan compared to yellow-seeded cultivars Omega and Foster. Thus, the relation between cultivar type and monosaccharidic composition of FG remains unexplained.

The extraction method significantly affects the yield of polysaccharides and proteins extracted from FG. Higher content of proteins and browning in color was observed within FG extracted at higher temperatures [56]. Moczowska et al. [52] assessed 22% of protein and only 42% of polysaccharides content extracted by the alkaline method, whereas using the enzymatic-assisted method with ultrasound allowed for the extraction of 8% of protein and 69% of polysaccharides from FG. Furthermore, microstructural differences of FG extracted from six Chinese and Mongolian flax varieties were described [59]. Differences in the structures were also found between seven Italian flax cultivars. They also differed in chemical, physicochemical, and functional properties [46]. According to the studies, it is evident that the extraction conditions have a crucial role in the monosaccharide composition of FG, mainly determined by the ratio of neutral to acidic polysaccharides in FG. This ratio then significantly determines the physicochemical properties of FG, e.g., viscosity, and thus, also other functional properties [26].

2.3. Functional Properties

As reported in the previous chapter, the spectrum, and concentration of FG constituents, especially the carbohydrate composition, strongly affect its functional properties and potential applications that may be quite broad, as shown in Table 3. As a soluble fiber,

FG has a significant ability to bind water, reaching values of 16–30 g water/1 g FG [3]. FG is also responsible for the high-water holding capacity of flaxseed flour, reaching approximately 4.15 g of water/1 g of flaxseed flour [60]. The ability of FG to bind oil is approximately 1 g oil/1 g FG [27]. FG is generally characterized by high viscosity (rheological properties or parameters such as viscosity, shear-thinning, and Newtonian flow, as the physical characteristics, are in this review involved within functional properties of FG due to their influence on the functioning of FG within certain applications) comparable to acacia gum and higher than guar and tamarind gums [61]. A higher proportion of neutral polysaccharides (arabinoxylans), which have a higher MW, increases viscosity and exhibits the shear-thinning flow behavior of FG. Conversely, as the abundance of lower MW acid polysaccharides increases, the viscosity decreases, and Newtonian flow behavior is exhibited. Viscosity and fluidity are also affected by the pH of FG. The lowest viscosity of FG appears at pH 2. With increasing pH, the viscosity increases up to pH 8, when the viscosity is 3-times higher than FG with pH 2. However, at a pH higher than 8, the viscosity decreases again. Different varieties exhibited wide variations in viscoelastic properties of extracted FG. At the same concentration in solution (1 to 3%), it may have a form of viscoelastic fluid or a real gel [26]. The ratio of polysaccharides also affects the related rheological properties of FG, which may form a weak gel with a higher proportion of neutral polysaccharides. At high concentrations of acidic polysaccharides, FG appears as a viscoelastic fluid [62]. The addition of FG at the concentration of 0.08% to carrageenan gel within a fixed 1% concentration of polysaccharides in the solution decreased the syneresis from 11.0% to 6.6% of FG/carrageenan gel and increased the viscosity [63]. In their research, Hu et al. [40] reported that FG extracted at a temperature of 70 °C had a higher viscosity compared to FG extracted at 98 °C (96.7 vs. 78.8 mPa·s) on the first day after extraction but lower viscosity than 98 °C (70.1 vs. 71.9 mPa·s) after storage at 4 °C for eight days. FG extracted at 98 °C had a better foaming capacity (~135 vs. ~127%) and foam stability (~88 vs. ~79%) on the first day after the extraction, but after eight days of storage, these parameters stayed comparable for both FG (foaming capacity: ~132–133%, foam stability: ~86–87%). Emulsion capacity (~43–46%) and stability (~98–100%) were comparable for both types of FGs after the first day after extraction but decreased for FG extracted at 70 °C and stayed quite constant for FG extracted at 98 °C after storage for eight days. These observations indicate changes in the functional properties of FG extracted at different temperatures by hot water extraction.

The relation between emulsion stability and pH value was observed, where the highest stability of the emulsion, in the form of model salad dressing, was observed at pH 6. FG is a comparable or better emulsifier than Tween 80, gum arabic, and gum tragacanth. An FG concentration ranging from 0.5–1.5% is suitable for stabilizing water-oil emulsions [26]. High creaming stability (creaming volume: 100%) within emulsion containing 10% olive oil (*w/w*) was observed for the emulsion with a high content of FG (0.4%–0.5% *w/w*), as well as better rheological properties of the emulsion with same addition of FG [64]. FG shows similar or even better foam stability (~41%, 1.0 *w/w*) than gum arabic and xanthan gum (15–27%, 0.5 *w/w*) [42]. Significant functional properties of FG can be affected by the extraction temperature. It has been found that the viscosity and elasticity of FG decrease with increasing temperature and is also affected by the pH values of the FG solution [29]. Fabre et al. [45] reported that ultrasound-assisted extraction decreases the intrinsic viscosity of FG extracted by hot water from 12.5 dL/g to 6.2 dL/g, and the MW of the largest polysaccharides decreased from 1500 kDa to 500 kDa. Another study reported that FG extracted at 30 °C exhibited a water absorption capacity of 25.9 g/g, comparable to that of guar gum (22 g/g). However, there was observed a deterioration in emulsifying activity (emulsion activity index: ~150→~60 m^2/g , 70→90 °C) and water absorption capacity (down to ~12 g/g, 90 °C) within FG extracted at higher temperatures. This study also stated that emulsifying activity can be affected by the content and composition of proteins in FG. Apart from that, FG extracted at higher temperatures exhibited an insignificantly increased fat absorption capacity [41].

The microstructure of FG also affects its functional properties and may vary between flax varieties [46,59]. Temperature stability is one of the properties determined by variety or its type. FG extracted from a yellow flaxseed cultivar showed higher temperature stability than FG extracted from brown flaxseeds. FG of yellow flaxseed also showed higher MW (1150–1340 kDa), higher intrinsic viscosity (6.63–5.13 dL/g), as well as viscoelastic and thickening properties [50]. The functional properties such as viscoelasticity, gelling ability, and emulsifying activity can also be influenced by phenolic compounds, especially lignans and phenolic acids, and their migration within FG. An improvement in rheological and emulsifying properties was observed when the phenolic compounds were removed, which may be caused by changes in the spatial conformation of the protein or disruption of noncovalent interactions between phenolic compounds and polysaccharide chains [65]. Unfortunately, the natural structure of FG could have inherent problems associated with its use, including uncontrolled hydration rates, solubility dependent on pH, thickening, a drop in viscosity in storage, and probable microbial contamination. Thus, the authors report that the original structure of FG can be modified by crosslinking or esterification to obtain the desired and defined properties [25].

Based on the reported findings, it is evident that the genotype and extraction conditions, determining the chemical composition and structure of FG, significantly influence the functional properties of FG, and they are crucial to obtaining FG with the desired properties. Further processing of FG, such as drying (by spray, freeze, vacuum, or oven) or ethanol precipitation, also affects some functional properties of FG, such as emulsifying activity, foaming, and gelling ability [42].

2.4. Biological and Physiological Activities

In addition to the functional properties, FG also shows several biological activities. FG possesses strong antioxidant activity, which has been confirmed in several studies [24,29–31,66]. The antioxidant activity of FG is significantly affected by the presence of some phenolic compounds easily extractable with FG, such as caffeic acid, *p*-coumaric acid, epicatechin, ellagic, cinnamic, and vanillic acids. Similarly, like the polysaccharides and proteins of FG, it was found that the content and composition of phenolic acids and related antioxidant activities are affected by the extraction temperature. With increasing extraction temperature (25 → 40 → 60 °C), the scavenging activity against DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical (4.4 → 12.3 → 29.6% radical scavenging activity) and the total content of polyphenols (12.4 → 13.0 → 18.6 mg GAE/100 g) increased. However, the content of caffeic acid (6.6 → 6.4 → 6.1 mg/L) and *p*-coumaric acid quantified together with epicatechin (1.6 → 1.4 → 1.4 mg/L) decreased slightly with increasing temperature, whereas the cinnamic acid content remained unchanged (2.3 mg/L) at all temperatures in FG solution. On the other hand, the ellagic acid content increased significantly at 60 °C (1.2 → 1.1 → 3.1 mg/L), and vanillic acid was detected only in FG extracted at 60 °C (5.4 mg/L) and was nearly comparable to the content of caffeic acid [29]. Although flaxseed contains high amounts of lignans (as mentioned in Section 1), it remains a question whether these compounds are extracted together with FG and how much they participate in the antioxidant activity of FG.

Safdar et al. [24] report a high antioxidant potential of FG and a rise in antioxidant activity due to increasing FG concentration in an aqueous solution. The highest antioxidant activity was found at the highest measured concentration (30%) of FG expressed as total antioxidant activity [55], reaching the values of approx. 588 µg Trolox/1 mL FG. The scavenging activities reached 98% against the radical DPPH and 72% against ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid). Bouaziz et al. [31] previously assessed the antioxidant properties of FG extracted from flaxseed. They reported higher scavenging activity against DPPH (expressed as the half inhibition concentration = IC₅₀) for FG (IC₅₀ = 2.5 mg/mL) compared to the antioxidant activity of polysaccharides of guara fruits (IC₅₀ = 10.8 mg/mL), prickly pear peels (IC₅₀ = 10.8 mg/mL) and almond juice processing by-products (IC₅₀ = 2.87 mg/mL) but was lower than for polysaccha-

rides of garlic straw ($IC_{50} = 0.74$ mg/mL) and pistachio juice processing by-products ($IC_{50} = 1.61$ mg/mL). Yang et al. [66] compared the antioxidant activities of total FG and flax oligosaccharides extracted from FG by enzymatic degradation. The purified mixture of oligosaccharides from FG exhibited better antioxidant activities, expressed by scavenging of DPPH, ABTS and hydroxyl radicals, compared to native FG. FG can also potentially contribute to antimicrobial and antioxidant properties of FG-containing coatings and films, whose applications are described in Section 2.5.

Similarly, like other types of soluble fiber, FG forms a viscous or gel-like material when dissolved in water [67]. FG affects digestion in more ways. It increases food weight in the gastrointestinal tract and feces [3]. It presumably interacts with fats and sugars in the intestine and inhibits their absorption. This hypothesis is supported because fats and sugars are excreted as part of the feces when FG is consumed to a greater extent than in the case of subjects that do not ingest FG [68]. Consumption of FG also causes the prolonged feeling of satiety, accompanied by more extended inhibition of the enzyme ghrelin—a signal digestive peptide that stimulates hunger [68]. Reductions in body weight and body fat, respectively, and total triglycerides, have been confirmed in animal clinical trials due to reduced fat and energy absorption within animal subjects. This phenomenon has probably been related to the regulation of intestinal microflora as an effect of FG consumption. In particular, the inhibition of *Clostridium* bacteria from the phylum of Firmicutes was observed. Conversely, they report a slightly increased presence of bacteria from the phylum Bacteroidetes and a strong increase in the occurrence of strains from the phylum Proteobacteria [32].

2.5. Potential Applications

FG is a substance without taste properties, which is an essential property for its use in the food industry [46]. However, it was reported that adding FG may improve the sensory characteristics (appearance, structure and porosity, crumb color, smell, and taste) of freshly baked gluten-free bread when 1.8% or 2.4% of starch is substituted by flaxseed gum [69]. FG can replace commonly applied thickeners, emulsifiers, beverage stabilizers, and similar applications. Its presence in bread affects the baking properties, such as stickiness, rheology of dough, and baking process. In addition, it improves the texture, which is softer, makes the bread soft for longer and delays hardening during storage, probably caused by the presence of the arabinoxylan fraction. It has been suggested that 0.5% of FG (flour basis) could replace 0.1% xanthan or guar gums. FG positively affects the gluten behavior in the dough since an increase in volume was observed during leavening and baking. In bakery products and ice cream, FG can also substitute egg whites [26].

The complex viscosity of salad dressing may increase with the rising concentration of FG from 0.13 Pa·s (0% FG) to 6.61 Pa·s (0.75% FG) to finally 37.2 Pa·s (1.5% FG) and prevent flocculation and coalescence of the contained oil. The most stable emulsion was observed after the addition of 0.75% (*w/w*) of FG and 2.5% (*w/w*) of salt at pH 4 [70]. As an emulsifier, FG can also be used as a part of beverages. It can suppress creaming and increase the viscosity of fruit or vegetable juices since this phenomenon has been observed in the case of unfiltered carrot juice. At the same time, adding 0.5 g/kg of FG was most effective for stabilizing the cloudy carrot juice [71]. FG effectively improves texture characteristics and reduces the syneresis of stirred yogurt containing 0.6 g of FG per 100 mL of yogurt (14.3 → 0.1 mL). It also supports the optimal growth of starter microorganisms [72]. The 0.1, 0.2, or 0.3% concentration of FG in the heat-induced gel increased the water-holding capacity by 7.0%, 15.5%, and 25.8%, respectively, thus offering the use of FG within meat products [73]. FG, up to a content of 12%, in a mixture of carrageenan and gellan gum improved the sausage texture and color of the sausage. FG enhanced the hardness, springiness, and emulsion stability of the product [74]. In addition to the possibilities of using FG itself, it also has potential in interactions with proteins, and the possibility of applications of the complexes of these components is also studied. These heterogeneous mixtures may exhibit a combination of not only functional properties of the two components separately but also properties determined by their interaction.

A study focused on flax–protein interactions observed the formation of electrostatic coacervates consisting of whey protein and FG. These biopolymers were characterized by high viscosity and viscoelasticity, predetermining their use as a texture modifying component of food products. The maximum coacervate formation and viscosity were assessed when the mixture of whey protein isolate/flaxseed gum was prepared in water at pH 3.8, constant biopolymers concentration of 0.05% (*w/w*), and their ratio of 2:1 (*w/w*) [75]. Coacervates of FG and FPs were used as coating materials to encapsulate unstable or volatile compounds. Kaushik et al. [76] used FG and FPI crosslinked with glutaraldehyde to encapsulate flaxseed oil with three core (oil)-to-wall ratios (1:2, 1:3, and 1:4) to preserve its oxidative stability. The highest microencapsulation efficiency (87%) was observed at the spray-dried microcapsules with a surface oil of 2.8% at a core-to-wall ratio of 1:4 and an oil load of 20%. Pham et al. [77] enriched FPs-FG complex coacervates, encapsulating flaxseed oil, with flaxseed polyphenols and hydroxytyrosol to enhance the efficiency of this material against oxidation of flaxseed oil which was better than for ordinary FGI/FPI complex coacervates. The optimal protein-to-gum ratio was 6.00. The microcapsules with the lowest surface oil (1%, *w/w*) and highest microencapsulation efficiency (95.4%) were produced using (FPI-hydroxytyrosol)/FG complex coacervates. FG and rice bran protein coacervates were also successfully used to encapsulate vanillin to improve its thermostability and shelf-life. The optimum ratio and total concentration of rice bran protein and FG, for the maximum strength of the complex coacervate, were 9:1 and 0.4, respectively [78].

Lai et al. [79] reported the protective capacity of FG towards *Lactobacillus rhamnosus* during co-extrusion microencapsulation, where the optimized parameters for microencapsulation of the bacterium were 1.0 mL/min core flow rate, 0.4% (*w/v*) chitosan coating and 0.4% (*w/v*) FG. The prebiotic effect of FG improved the survivability of *L. rhamnosus* in the gastrointestinal tract. They also reported the partial digestion of FG during gastrointestinal transit and the promoted growth of the *L. rhamnosus* [80]. FG had successfully protected *L. rhamnosus* from the harsh environment when it was microencapsulated in hawthorn berry tea, where the minimum requirement of 10^6 – 10^7 CFU/mL of probiotic cells was assessed to exert therapeutic health effects [81]. There was a determined high resistance of FG against hydrolysis by acid (1.5%) and pancreatin (2.6%) and a 98% prebiotic score, which is higher than commercial prebiotics including inulin, fructooligosaccharides, and isomaltoligosaccharides. The optimal concentration of FG in cultivation media, promoting the best *in vitro* growth of *L. rhamnosus* for 36 h, was 0.8%. Due to the prebiotic capacity of flaxseed mucilage and its symbiotic relationship with a probiotic bacterium, authors have also suggested the potential incorporation of optimized *L. rhamnosus* microbeads for developing other functional foods [80].

FG has been successfully used as a functional agent in edible coatings or films, protecting plant or food products against microbial spoilage and oxidative deterioration, thus preserving their sensory characteristics and safety. FG-based coatings preserved the sensory attributes, especially color, of cheese [82] and inhibited the invasion of foreign microorganisms (*Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*) [83]. As a part of edible coatings, FG can be used to prolong shelf-life and preserve the microbiological quality and sensory parameters of fresh fruits. The coatings containing 0.6% of FG and 500/800 ppm of essential lemongrass oil had promising effects on the sensory attributes and other overall quality parameters of ready-to-eat pomegranate arils [84]. Coating of FG with chitosan applied on pieces of fresh cantaloupe preserved sensory characteristics and increased the consumers' acceptance of the fresh-cut fruit, stored at 4 °C for 12–15 days [85]. FG combined with other polysaccharides (chitosan, pullulan, nopal, and aloe mucilages), used for a coating of fresh-cut pineapple pieces, improved the quality and prolonged the shelf-life of the fruit for 6 days compared to control samples [86]. FG was also used as a constituent of coating for yacon as the carrier of the probiotic bacteria *Lactobacillus casei*, preserving the number of viable cells throughout the storage at 8 log CFU g⁻¹ [87].

Apart from the food industry, there is potential to use these mixtures in the medicine, pharmaceutical, and cosmetic industries [25]. The biological properties of FG may have a

positive influence on human health, predetermining its use in the treatment of diabetes, cholesterol reduction [33], the development of obesity [32], and it can have a role in the management of hyperglycemia [88]. FG also has potential for non-food and non-health applications, such as in the printing, textile, tobacco, and paper industries [26]. In immobilized form, FG can be used to produce gel particles enabling ecological adsorption of oils from wastewater, while the adsorption properties of these particles overcome the effect of activated carbon [89]. It can also be used in the mining industry. The ability of FG in the flotation of fluorite from calcite has been demonstrated [90]. Together with cellulose nanocrystals, FG may form nanocomposite materials or biopolymers that can be used to produce bioplastics [91].

As reported in many studies, FG possesses similar properties to other plant gums, so they can successfully substitute in various food products. However, FG protein coacervates may become highly functional agents that can potentially replace commercial gums in the future. Further research should also be focused on the potential application of FG related to their unique biological properties, such as the development of new types of functional coatings to protect not only sensitive foods but also various natural products and preserve their native properties. FG may become an active constituent of encapsulating material which would serve for the transportation and protection of probiotics or drugs and other bioactive compounds within the human gastrointestinal tract to the intestines avoiding the harsh condition of the stomach. Like the other plant gums, especially gum guar, FG can be processed by hydrolysis or other treatment to produce functional and health-beneficial oligosaccharides usable in food products or pharmaceuticals. Thus, there are many directions and possibilities for future research related to FG within the food and pharmaceutical industry.

Table 3. Functional properties of flaxseed gum and its potential applications in food products.

| Functional Properties | Potential Application and Effects/Types of Food Products | References |
|---|--|------------------|
| Viscosity | Increase viscosity of food products or beverages; affects rheological properties / fruit and vegetable juices, salad dressings, bakery products | [26,40,61,70,71] |
| Shear thinning and gelling properties | Increase viscosity or gelling properties of food products / gelled food products | [62,63,67] |
| Water holding and oil binding capacities | Texture improvement; increase in the water-holding capacity of meat products; improvement of appearance, structure and porosity of bread / meat and bakery products | [3,27,41,60,69] |
| Emulsifying activity and emulsion stability | Improvement of firmness and elasticity; stabilization of oil and water emulsions; egg white substitution / sausages, bakery products, ice creams | [26,64,74] |
| Stabilizing and thickening properties | Improvement of creaming stability; foaming stability; decrease in a syneresis rate; affects pasting, dough rheology and baking procedure / plant oil, stirred yogurts, bread or other bakery products | [26,42,63,64,72] |
| Thermal stability | Functional agent in heat-processed food products / thermal-treated food products | [50] |
| Coating properties | Coating of plant or food products leading to prolonged shelf-life of food products due to inhibition of microbial spoilage and preserving the sensory characteristics; encapsulation of unstable compounds protecting them against oxidative deterioration / fruits, cheese, oils, volatile compounds and other plant or food products | [76–78,82–87] |
| Prebiotic capacity | Promotion of survivability and growth of <i>Lactobacillus rhamnosus</i> in gastrointestinal tract / fruit tea, other functional food products | [79–81] |
| Sensory-affecting properties | Improvement of the sensory properties / bakery or other food products | [46,69] |

3. Flaxseed Proteins and Peptides

FPs possess a high nutritional quality mainly determined by the amino acid composition and is comparable to the quality of soy protein [3]. In addition to the high

nutritional value, flaxseed proteins and peptides provide interesting functional properties and biological activities.

3.1. Methods of Extraction and Purification

Most of the methods applicable for extracting FPs were developed in the mid- and late-20th century. Nevertheless, the methods are currently still modified to achieve the highest possible yield, purity, and functionality of proteins, if needed. One of the original methods for extraction of FPs was performed via the salting-out procedure followed by dialysis. However, the yield of proteins extracted by this method was only 44% of proteins contained in flour from dehulled flaxseed [92]. Later, soaking of flaxseeds in 1% HCl for 16 h, followed by washing in 1% HCl and water, allowed the extraction of 56% of proteins from demucilaged and defatted flaxseed flour [34]. Alkaline extraction can be used to prepare a supernatant with dissolved FP, followed by the isoelectric precipitation of certain protein fractions. Sosulski and Bakal [93] precipitated 77% of FPs from alkaline extract (pH 10) by isoelectric precipitation at pH 4.5. This process allowed us to obtain FPI containing 92% of proteins, respectively 61% in flaxseed protein concentrate (FPC) [94]. Nwachukwu and Aluko [35] isolated flaxseed albumin and globulin from FM using NaCl for 1 h at room temperature. Perreault et al. [95] extracted FPs at pH 5.0 and used cellulase to hydrolyze the fibers. For extraction, another original extraction method can be used using buffer systems, mainly phosphate buffer, combined with alkaline or acidic precipitation [96,97]. After extraction by phosphate buffer, FPs can be separated into three fractions by size exclusion column Sephadex [98] or Sepharose [34]. After salting-out precipitation, it has been possible to separate FPs into three fractions [99]. It was also reported the separation of FPs into four fractions by anion exchange column DEAD-Sephadex [99]. Kaushik et al. [100] used Tris buffer (pH 8.6) followed by acidic precipitation at pH 4.2 to extract protein from defatted FM. FPs can also be isolated using hexametaphosphate [101]. The alkaline extraction at pH 8.0–9.5 followed by the acidic precipitation at pH 3.8–4.2 seems to be a very effective procedure for obtaining FPI and FPC from demucilaged and defatted FM with previously reported yields ranging from 51.1% to 93.7% [102]. The higher pH values up to 11.0 can be potentially used to increase the yield of FPs. However, Ye et al. [102] suggest using the preferred pH values, pH 7.0–9.0 instead of 8.5–11.0, due to the undesirable modification of proteins and the unpredictable reactions at extreme alkaline conditions, which may consequently negatively affect functional properties.

FPs can serve as a source of bioactive peptides in the form of FPs hydrolysates which are produced mainly by proteolysis using non-commercial or commercial proteases, such as Alcalase[®], thermolysin, trypsin, pepsin, papain, pancreatin, and ficin [103]; Neutrase[®], Protamex[®] [104]; chymotrypsin, thermoase, elastase, and carboxypeptidase A/B or the combination of listed enzymes [37].

3.2. Structural Characteristics

Flaxseed proteins ($N \times 6.25$) represent about 20% of the flaxseed weight [3,6]. Nevertheless, the protein content observed in some Canadian cultivars can reach above 36% ($N \times 6.5$) [34]. Morris [6] reported a relatively significant difference in protein ($N \times 6.25$) content between brown-seeded (22.3 g/100 g seed) and yellow-seeded (29.2 g/100 g seed) varieties. The nitrogen content can be affected by applying a nitrogen fertilizer during growth, and it can also affect the oil content [34].

FPs have a balanced ratio of amino acids. The most abundant one is glutamic acid (20% *w/w*), followed at a distance by aspartic acid, arginine, and leucine (Table 4) since the high contents of these amino acids are comparable to the amino acid profile of soybean seeds [34]. Conversely, the content of the essential amino acid lysine is limiting [7]. The amino acid content values presented in Table 4 indicate only minor variability of amino acid content between different cultivars. Moreover, the assessed content of amino acids within FPs remains stable after the heat processing of seeds, for example, in extruded products from FM [105].

Globulin (linin) and albumin (conlinin) represent the prevailing fractions of FP. In the flaxseeds, there are also other minor proteins, e.g., hirudine, oleosin, prolamin, and glutelin [106]. However, the four latest mentioned proteins are minor in flaxseed and thus are not discussed in this review. Former studies report a different content of dominant globulins ranging from 58% [34] to 66% [107] of protein content. Nwachukwu and Aluko [35] described differences in amino acid composition between the globulin and albumin fractions. Flaxseed globulin is a rich source of sulfur-containing amino acids (methionine, cysteine) and branched-chain amino acids (valine, leucine, and isoleucine). The presence of other amino acids is lower but in balance [37]. Globulin contains primarily hydrophobic amino acids, while the albumin fraction is represented more by hydrophilic amino acids.

Table 4. Amino acid composition of flaxseed from three cultivars and one subspecies.

| Amino Acid | Content (g/100 g Protein) | | | |
|----------------------------|---------------------------|-------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| | <i>NorLin</i> (Brown) [6] | <i>subsp. panambi</i> (Brown) [105] | <i>Omega</i> (Yellow) [6] | <i>Foster</i> (Yellow) [34] |
| Alanine | 4.4 | 3.8 | 4.5 | 4.7 |
| Arginine | 9.2 | 9.4 | 9.4 | 10.0 |
| Aspartic acid | 9.3 | 9.9 | 9.7 | 10.0 |
| Cysteine | 1.1 | 1.0 | 1.1 | 1.8 |
| Glutamic acid | 19.6 | 19.5 | 19.7 | 20.0 |
| Glycine | 5.8 | 5.9 | 5.8 | 5.9 |
| Histidine ^E | 2.2 | 2.4 | 2.3 | 2.1 |
| Isoleucine ^E | 4.0 | 3.9 | 4.0 | 4.1 |
| Leucine ^E | 5.8 | 5.7 | 5.9 | 6.0 |
| Lysine ^E | 4.0 | 3.8 | 3.9 | 4.0 |
| Methionine ^E | 1.5 | 1.7 | 1.4 | 1.4 |
| Phenylalanine ^E | 4.6 | 4.8 | 4.7 | 4.8 |
| Proline | 3.5 | 3.7 | 3.5 | 3.8 |
| Serine | 4.5 | 5.0 | 4.6 | 4.7 |
| Threonine ^E | 3.6 | 4.1 | 3.7 | 3.8 |
| Tryptophan ^E | 1.8 | 1.5 | NR | NR |
| Tyrosine | 2.3 | 2.3 | 2.3 | 2.4 |
| Valine ^E | 4.6 | 4.8 | 4.7 | 5.1 |

^E: essential amino acid; NR: not reported.

Flaxseed globulins belong to groups 11S or 12S seed storage globulins formed by high MW (252–298 kDa) proteins [37] composed of multiple 10–50 kDa polypeptide chains [35]. Formerly, Marcone et al. [108] assessed the total MW of linin by native-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) for 535 kDa. Madhusudhan and Singh [107] determined the secondary structure of flaxseed globulin using the circular dichroism method. It contains 3% of the α -helix structure and 17% of β -structure, indicating its relatively disordered structure. Linin was separated by SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-PAGE) into five subunits of different MW connected by disulfide bridges (11, 18, 29, 42 and 61 kDa). Six subunits (55, 54, 50, 45, 43, and 41 kDa) were identified by urea-PAGE. The 55, 54 and 50 kDa subunits were then separated via denaturation by 2-mercaptoethanol into one 20 kDa basic subunit and 40 kDa acidic subunit. Marcone et al. [108] identified the major subunit after purification by gel-filtration chromatography with a size of 320 kDa. SDS-PAGE revealed five globulin subunits of sizes 14, 25, 30, 35, and 51 kDa. In a more recent study, a large 365 kDa fraction was isolated from defatted and dehulled flaxseed from the cultivar *NorMan* by anion exchange chromatography, where 20, 23, and 31 kDa subunits were detected by SDS-PAGE [109]. Krause et al. [110] identified the subunits with a similar MW, specifically the protein bands of 21, 36, and 54 kDa belonging to 7S globulin.

Flaxseed albumin (conlinin) belongs to the group of 2S albumins and represents 20–42% of the total flaxseed proteins [34,97]. Madhusudhan and Singh [111] isolated conlinin from FM and reported its structure in a single polypeptide chain with an MW of

16–18 kDa. Nwachukwu and Aluko [35] reported a lower MW (10 kDa) of conlinin. The primary structure of conlinin contains 168 or 169 amino acids [37]. It has a more ordered structure than globulin, consisting of 26% α -helix type structure and 32% β -structure, and its amino acid composition shows a higher content of lysine, arginine, cysteine, and glutamate [111]. Liu et al. [112] describe conlinin as the major protein associated with FG and emphasize its essential role in the functional properties of FG.

3.3. Functional Properties

Similarly, like FG, FPs also provide interesting functional properties applicable mainly in the food industry, as presented in Table 5. The variances in the structure and physico-chemical properties of flaxseed albumin and globulin induce different functional properties of each protein fraction. One of these properties is a different affinity of albumins and globulins for water. The proteins of the globulin fraction, which are poorly soluble in water, show a higher foaming capacity. On the other side, hydrophilic albumin provides better emulsion-forming ability [35]. The functional properties of FPC are also affected by their production methods. The alkaline and enzymatic extraction are suitable for the FPC applied in emulsion-based foods. On the other hand, enzymatic-solvent extraction is more applicable for producing a good source of protein for a food system [113].

FPs and their isolates are less soluble than proteins present in the seeds of other oilseed crops due to the significant content of globulins. FPI can exhibit relatively high thermal stability and higher emulsion activity index (375.51 m²/g), stability index (179.5 h), and zeta potential (−67.4 mV) than whey and soy protein isolate, sodium caseinate and gelatin. Water binding capacity (~4.0 g/g) was higher than for whey protein isolate, sodium caseinate, and gelatin and was comparable to soy protein isolate. The fat binding capacity (~2.7 g/g) was higher than in the case of soy protein isolate and gelatin and comparable to whey protein isolate and sodium caseinate. FPs can also stabilize emulsions at a low pH [100]. As a result, emulsions containing FPs are more stable and better absorbable in a strongly acidic environment such as the human gastrointestinal tract [100]. Martínez-Flores et al. [114] obtained FPC from defatted and dehulled flaxseed after solubilization at pH 11 and precipitation at pH 4.8, containing 66% of protein. This concentrate had the high absorption capacities of oil (1 g/g) and water (2.54 g/g). The functional properties of FPC were affected by pH, whereas its highest emulsifying capacity (84.8%), emulsifying activity (88.4%), and foam stability (83.3%) were observed at a pH of 6.

Like a similar nutritional profile, FPI with various content of mucilage also has comparable functional properties to soy proteins, particularly surface tension, emulsifying activities (50–98% compared to 57% for soy proteins), and water absorption capacity (3.0–6.1 g/g compared to 4.9 g/g for soy proteins). The lower solubility of FPs in water can be increased by heat treatment but at the expense of reduced fat-binding capacity or foaming and emulsifying activities [34]. Waszkowiak and Mikołajczak [115] observed the changes in the spectrum of FPs fraction during the roasting of flaxseeds between 160 and 200 °C. They report an increase of 17 and 19 kDa and a decrease of 13 kDa protein fractions. Since the 13 kDa proteins have been previously reported as crucial for the functional and biological properties within flaxseed, the authors discuss the possible changes of these properties by roasted flaxseeds compared to untreated seeds. Wei et al. [116] hydrolyzed FPs by commercial proteases Alcalase[®] and Flavourzyme[®] to prepare peptides of various MW. These hydrolysates can be processed with xylose and L-cysteine by heat treatment to produce Maillard reaction products of different flavor characteristics. Peptides with MW above 1000 Da generated products improve the mouthfulness and flavor stability in umami soup. The products of low MW peptides (128–1000 Da) had a meat-like flavor along with bitterness and umami taste. Further analyses performed by these authors confirmed the presence of volatile, sulfur- and nitrogen-containing compounds in the Maillard reaction products of low-molecular peptides (<1000 Da). These compounds can lead to a meaty aroma of the obtained products [117].

Table 5. Functional properties of flaxseed proteins (including protein hydrolysates) and their potential applications in food products.

| Functional Properties | Potential Application and Effects/Types of Food Products | References |
|---|---|------------------|
| Solubility | Fortification of beverages/protein drinks | [110,114] |
| Foaming activity and stability | Texture improvement of aerated products; egg white substitution/whipped desserts or other similar products | [35,114,118,119] |
| Emulsifying activity, capacity and emulsion stability | Texture improvement; stabilisation of products; oil dispersion; egg yolk substitution/ (meat) emulsions, ice creams, sauces | [35,114,118,119] |
| Thermal stability | Functional agent in heat-processed food products/ thermal-treated food products | [100] |
| Water holding and oil binding capacities | Improvement of texture, softness and juiciness/meat products, bakery products | [34,100,118,119] |
| Interactions with (poly)saccharides | Synergically with carbohydrates increase in viscosity and viscoelasticity; water-binding capacity; improvement of emulsion stability, foaming capacity, foam stability; texture improvement; coating of food products for improvement of quality attributes and shelf-life; transport of the encapsulated probiotics into human intestine/ meat emulsions, sauces, ice creams, gelled food products, food supplements | [36,75,120–124] |
| Fungistatic activity | Prolonged shelf-life of food products/short shelf-life food products | [125–127] |
| Sensory characteristics (proteins and thermal-treated protein hydrolysates) | Improvement of sensory properties of food products (color, aroma, flavour)/various food products | [94,116,117] |

3.4. Biological and Physiological Activities

FPI may have 68% in vitro digestibility, similar to flaxseed, lacking mucilage and oil. Thus, removing these constituents and thermal treatment enhanced flaxseed protein digestibility [128]. While native FPs possess various functional properties, valuable biological activities are provided mainly by hydrolyzed FPs or naturally occurring flaxseed peptides. However, crude FPs extracts may also have valuable biological activities. Due to fungistatic activities, FPs are promising ingredients for food preservation against fungal spoilage. It was observed that the >50% antifungal activity of protein extract (concentration in test media = 0.47%) against fungi *Penicillium* sp., *Fusarium graminearum*, *Aspergillus flavus*, and $\geq 40\%$ activity against *Penicillium chrysogenum* [126,127]. Oomah [129] also suggests a preventive effect of FPs against certain forms of colon cancer due to the high cysteine and methionine content in FPs, which can potentially increase antioxidant levels in the body and stabilize DNA during cell division. FPs are abundant in glutamine and arginine, which are essential in preventing and treating heart diseases and supporting the immune system [1].

The single protein hydrolysate fractions and peptide mixtures of flaxseed protein hydrolysates have the antihypertensive potential via angiotensin-converting enzyme inhibition [103,130]. The ability of these hydrolysates to inhibit the enzyme renin has also been demonstrated [103]. Udenigwe et al. [131] described the scavenging activities of three radicals for two fractions of hydrolyzed FPs prepared using seven proteases, whereas the biological activities of these peptide fractions depended on the catalytic specificity of the proteases, as well as the MW of peptides. Silva et al. [132] reported that hydrophobic amino acids, specifically glycine, phenylalanine, tryptophan, cysteine, and alanine contained within FPs, can contribute to the high antioxidant activity of derived peptides. Furthermore, these authors report the higher antioxidant potential, expressed by higher scavenging activity against ABTS radical of fractions containing predominantly low MW peptides compared to the fractions comprised of larger peptides. Hwang et al. [133] suggested that low-molecular hydrolyzed peptides can exhibit higher scavenging activity expressed by the lower IC₅₀ value (10.63 µg/mL) of the 1–3 kDa fraction compared to the other fractions or standard compounds, such as vitamin C (13.89 µg/mL), vitamin E (71.43 µg/mL), β-hydroxy acid (31.25 µg/mL). They also reported the antibacterial activity of <1 kDa peptide fraction against *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* that increased linearly according to the concentration of peptides (20, 40, and 60 µg/mL) in the sample. The roasting of FM led to the formation of Maillard reaction products due to the interactions of contained proteins

with polysaccharides. The roasting of FM from three cultivars of flax slightly increased the antiradical capacity assessed by ORAC_FL Assay and expressed as μmol of Trolox equivalents (TE) per gram of defatted FM at 200 °C (avg. 68.1 μmol TE/1 g FM) compared to the FM treated at 180 °C (avg. 61.5 μmol TE/1 g FM). However, its antiradical activity is still much lower than FM treated at 160 °C (avg. 78.0 μmol TE/1 g FM) or untreated FM (avg. 122.5 μmol TE/1 g FM) [115].

In addition to antihypertensive, antioxidant, and other activities, hydrolysates of FPs have been shown to have anti-diabetic activity [134]. Further properties of flaxseed protein-derived peptides are represented by anti-inflammatory activities [131] and preventive effects against neurodegenerative disorders [135,136].

Flaxseed also contains cyclolinopeptides (CLPs), naturally occurring mainly in cotyledon [137]. The immunosuppressive and antimalarial activities of these peptides were described, as well as their ability to inhibit cholate accumulation in the liver [37]. The antioxidant activity of CLPs has also been reported, where improvement in the oxidative stability of flaxseed oil via CLPs was observed [138]. There were also observed antithrombotic activities of the other naturally occurring low MW protein hirudin [139] and antifungal activity of pathogenesis-related protein linusitin [140].

3.5. Potential Applications

Vegetable proteins in the forms of meals, concentrate, and isolates are well suitable for their properties in food products or other applications [12]. A protein-rich FM can partly substitute 10–20% of wheat flour in dough without a loss of texture and swelling reduction during baking. However, dough processing can be negatively affected due to the presence of flaxseed polysaccharides in flaxseed flour [106]. The substitution of wheat flour with ground flaxseed in bread (concentration: 15, 25, and 30%) and muffins (concentration: 33, 50, and 66%) affected the color of the products with the increasing concentration of flaxseed in dough during the Maillard reaction. These bakery products may also exhibit pleasant nutty flavors [141]. In cereals or other extruded products, FM can increase the viscoelastic properties due to the formation of crosslinks within the network between FPs and starch [142].

Flaxseed protein-based ingredients can increase the shelf-life of food products. Semolina blended with 15% (*w/w*) FG within refrigerated pasta exhibited prolonged shelf-life (from two weeks up to five weeks) due to its fungistatic effect on the growth of molds [125]. This effect can be explained by the previously described antifungal activities of FPs, which may allow for the use of FPs as a preservative in various food products [126]. FPs are also applicable in protein-based edible coatings. The FP-based coating, containing 3 and 5% (*w/v*) FPI, covering whole guavas, improved the quality attributes compared to control samples, e.g., retardation of oxidative browning, prevention of loss of polyphenol content (53% for 5% FP-based coated sample vs. 71% for non-coated sample, after 16 days of storage) and ascorbic acid (38% for 5% FP-based coated sample vs. 44% for non-coated sample, after 16 days of storage) and suppression of microbial spoilage. The retardation of these processes enhanced the shelf-life of fruit by up to 16 days [123]. The FP-based coating containing a 15% concentration of proteins and 9% of the raspberry press cake, enriched with ellagic acid formulation, can improve the color and functionality of foods and be an example of a new generation of functional foods/nutraceuticals [143]. Wang et al. [144] reported the applications of FPC containing FG as a functional agent within the food industry, mainly in meat products or ice creams. In ice creams, FPC and FPI at levels of 0.5 or 1.0% can substitute gelatin. It was observed that both components had a comparable melting time [121]. FPC and FPI, added to the meat emulsion in the content of 2.0% to 3.6% depending on their protein content, showed reduced water, fat, and total cooking loss (15.7–25.6 vs. 31.0%) and firmness (520–737 vs. 1111 kPa) in cooked meat emulsion. They also increased the viscosity, emulsifying activity, and emulsion stability in fish sauce [121]. FP-derived hydrolysates produced from the modified flaxseed flour exhibited a good oxidative-stable, functional, and nutritional ingredient in fortified spreads when they rep-

resented approximately 41% of the content of the spread. The total flavonoids and other phenolic content were significantly higher than the other spreadable products [145]. FPI and FPC also exhibit neutral to positive flavours improving their potential usage in the food industry [94]. Consumers' acceptance of products containing FPs of the appropriate amount, reported in several studies, is a crucial finding allowing for the potential use of FPs in food products [146,147].

FPs share similar nutritional and functional properties with soy protein. However, concerning the fact that the commercial production of FPC is very limited and FPI are even unavailable compared to isolates and concentrates of soy, it is not expectable that FPs will replace the soy, or other popular vegetable proteins from pea and wheat, as the nutrient or functional agent in the food products, especially on the industrial scale. However, we find that FPs might have a great potential within specialized food- and health-related applications, for instance, in the food coatings for their antioxidant and antimicrobial properties or as the functional constituent of polysaccharide–protein coacervates. Furthermore, the high potential might have the hydrolyzed products of FPs in the forms of bioactive peptides and the products of the Maillard reaction. Apart from the properties and potential applications of these products reported in this review, we suppose that further approaches in processing FPs to obtain similar or new types of products and suggestions for their use remain to be discovered.

4. Practical Comparison of FG and FPs with other Commonly Used Hydrocolloids

Although this paper primarily focuses on flaxseed hydrocolloids, we find it useful to briefly describe the flaxseed hydrocolloids in the context of other widely used and popular hydrocolloids. One of the most suitable matrices to compare different hydrocolloid properties in a real food matrix is yogurt since hydrocolloids are commonly added to this type of food product [148], and its viscosity is a very important quality parameter [149]. Because viscosity is one of the most important rheological properties of hydrocolloids, we chose it to compare different hydrocolloids added to yogurt. Thus, Table 6 summarizes the effects of different hydrocolloids addition on the apparent viscosity of yogurt and offers a direct comparison of FG and FPs with other hydrocolloids.

Table 6. Comparison of flaxseed gum and protein with other hydrocolloids as affecting apparent viscosity of yogurt.

| Hydrocolloid Added to Yogurt | Description of Yogurt | Amount Added (%) | Increase/Decrease in Apparent Viscosity Compared to Control (Pa·s) | Reference |
|---------------------------------|---|---|--|-----------|
| Demucilaged flaxseeds (protein) | The authors did not specify fat and protein content in the yogurt | 3.0% | Viscosity ↑ from ca. 1.95 to 2.5 | [150] |
| Flaxseed gum/mucilage | Semi-fat (1.5%) yogurt | 0.10, 0.15 and 0.20% | Viscosity ↑ from ca. 2.45 * to 2.90, 3.05 and 3.15, respectively | [151] |
| κ-Carrageenan | Pot-set yogurt containing 0.1% fat and 3.9% protein | 0.01, 0.04, 0.08% | viscosity ↑ from 0.71 * to 0.87, 1.21 and 3.54, respectively | [152] |
| Starch (modified) * | Pot-set yogurt containing 0.1% fat and 3.9% protein | 0.5, 1.0, 1.5% | Change of viscosity from 0.71 * to 0.56, 0.72 and 0.82, respectively, however it was not significant | [152] |
| Xanthan gum | Pot-set yogurt containing 0.1% fat and 3.9% protein | 0.005, 0.01, 0.015% | Viscosity ↑ from 0.71 * to 1.50, 2.79 and 4.35, respectively | [152] |
| Pectin | Skim yogurt with 0.1% fat | 0.20, 0.25, 0.30% | Viscosity ↑ from 0.16 * to 0.38, 0.51 and 0.57, respectively | [153] |
| Inulin | Skim yogurt with 0.1% fat | 7, 8, 9% | Viscosity did not differ (0.16 for all samples) | [153] |
| Whey protein | Five commercially available whey protein concentrates were compared to skim milk powder * used for yogurt preparation | All yogurts were standardized to 4.5% protein | Viscosity ↓ from 1.10 * to 0.38–84 | [154] |

Table 6. Cont.

| Hydrocolloid Added to Yogurt | Description of Yogurt | Amount Added (%) | Increase/Decrease in Apparent Viscosity Compared to Control (Pa·s) | Reference |
|------------------------------|--|---|--|-----------|
| Bovine gelatine (140 bloom) | Pot-set yogurt containing 0.1% fat and 3.9% protein | 0.5, 1.0, 1.5% | Viscosity ↓ from 0.71 * to 0.29, 0.31 and 0.21, respectively | [152] |
| Sodium caseinate | Commercially available sodium caseinate compared to skim milk powder * used for yogurt preparation | All yogurts were standardized to 4.5% protein | Viscosity ↑ from ca. 0.9 * to 2 | [155] |
| Soy protein hydrolysates | The authors did not specify fat and protein content in the yogurt | 0.1, 0.2, 0.3% | Viscosity changed from ca. 2.11 * to 1.90, 1.99 and 2.2 respectively | [156] |

↑: increase; ↓: decrease; *: value assigned with an asterisk belongs to control group; ‡: hydroxypropyl starch phosphate derived from waxy maize.

The viscosity of yogurt increased after the addition of hydrocolloids in most of the cases, except for bovine gelatin and whey protein, where viscosity was lower compared to control. However, it must be pointed out that different amounts of hydrocolloids were added to yogurt samples within compared studies. If we consider the added amount of hydrocolloid and increment of viscosity, then xanthan gum would have the best ratio of the amount per unit of increment. In this context, FG would be roughly comparable, for example, with pectin. On the other hand, FPs in the form of demucilaged flaxseeds [150] caused only approximately a 25% increase in viscosity; however, 3% of FPs were added. The authors of the study mention that the properties of the material were also affected by the presence of fiber. It is the limitation of the study, and unfortunately, there is no available literature regarding the use of FPs in yogurt. In general, it is very hard to compare the results because not all authors use a unified methodology and the same type of yogurt to describe hydrocolloid properties. However, the table shows a trend that might be generalized. Although viscosity is not the only significant hydrocolloid property, comparing a wider spectrum of parameters of other hydrocolloids with FG and FPs would be beyond the scope of the manuscript.

5. Conclusions

As a popular functional food, flaxseed contains constituents with significant biological and physiological activities. Apart from the fatty acids and lignans, flaxseed polysaccharides and proteins are promising sources of these properties. Regarding the specific applications, FG can increase the viscosity of juices, salad dressings, and bakery products. High water and oil binding capacities of FG and FPs can be applied to improve the texture of meat and bakery products, whereas emulsifying properties of both hydrocolloids improve the firmness and elasticity of these products, as well as the stability of oil and water emulsions. As a stabilizing and thickening agent, FG may improve creaming and foaming stabilities, decrease the syneresis rate of yogurts and ice creams, and positively affects the pasting and dough rheology of bakery products. As the foaming agent, FPs can substitute white eggs, for instance, in vegan aerated and whipped products. Along with health-related antioxidant and antimicrobial activities of FG, FPs, and derived peptides, they can be used as potent food preservatives or bioactive components of the food coatings, usable to preserve the microbiological quality and sensory parameters of short shelf-life foods and processed products. Protective and growth-promoting capacities towards some probiotics allow the potential application of FG as a prebiotic. FG can also be potentially useful in treating gastrointestinal and cardiovascular diseases. FG shares most functional properties on a comparable scale with other plant gums, such as guar, arabic, tragacanth guar gums, and carrageenan. Thus, it is possible to substitute them effectively in most food products, where these gums serve as important additives. Compared to some of the other plant gums, FG is easily extractable by water from the whole seeds of flax, which

can be potentially more accessible compared to sources of gums produced from saps or algae. Apart from the comparable functioning, the beneficial biological properties allow FG to outclass other gums due to its wider applicability and the extra effects related to these properties in the various products. Flaxseed peptides, naturally occurring or as the products of hydrolyzed FPs, may have health-promoting properties and can be potentially used to treat cardiovascular-related problems, microbial infections, cancer, and as preventive agents against neurodegenerative disorders predetermining their potential use as novel pharmaceuticals. Some low-molecular peptides, in the form of the Maillard reaction products produced by processing of FPs hydrolysates, exhibit a distinct aroma and taste. Thus they could be used as flavoring agents in food products.

Based on the information summarized in this review, flaxseed is a very complex and heterogeneous matrix. Various inner and outer factors determine the composition, yield, and properties of flaxseed polysaccharides and proteins. Thus, to preserve the properties and maximize the potential of flaxseed hydrocolloids, the suitable cultivars as the source of flaxseed and the optimal method for the extraction and processing of FG and FPs need to be selected according to the purpose of their use. FP/FG-based agents, ingredients, and other products, mainly in the food industry or medicine. Although many studies related to FG and FPs have already been published, there has not been any significant development and application of these flaxseed-based products within industrial practices. This fact may be caused by many factors such as the unavailability of the sources of flaxseed due to various limitations in flax growing, the unavailability of industrial technologies for obtaining and processing FG and FPs, or the novelty of the related research. As one of the major issues related to the limited use of flaxseed-based products, we find the fact that flaxseed by-products obtained after oil production are mostly fed by animals instead of using them to fortify the food products or being processed for the extraction of gums and proteins. From our point of view, a need to increase the awareness and popularity in the eyes of the public and stakeholders is crucial, and it is our suggested approach for increasing the use of flaxseed hydrocolloids on an industrial scale for all relevant applications. However, further studies related to the use of flaxseed hydrocolloids within food products, as well as health-related and non-food applications, are still highly needed to be performed.

Author Contributions: Conceptualization, F.L.; methodology and curation, F.L., M.J., J.B. (Jan Bedrníček), P.S. and J.B. (Jan Bárta); writing—original draft preparation, F.L., M.J., J.B. (Jan Bedrníček), P.S. and J.B. (Jan Bárta); writing—review and editing, F.L., M.J., J.B. (Jan Bedrníček), P.S. and J.B. (Jan Bárta); supervision, F.L. and J.B. (Jan Bárta). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by (1) Ministry of Agriculture of the Czech Republic, grant number QK1910302 and (2) University of South Bohemia in České Budějovice, grant number GAJU033/2018/Z.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors would like to thank Justin Calvin Schaefer for the proofreading of the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Goyal, A.; Sharma, V.; Upadhyay, N.; Gill, S.; Sihag, M. Flax and flaxseed oil: An ancient medicine & modern functional food. *J. Food Sci. Technol.* **2014**, *51*, 1633–1653. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Oomah, B.D. Flaxseed by-products. In *Food Wastes and By-Products: Nutraceutical and Health Potential*; Campos-Vega, R., Oomah, B.D., Vergara-Castaneda, H.A., Eds.; John Wiley & Sons Ltd.: Hoboken, NJ, USA, 2020; pp. 267–289.
3. Kajla, P.; Sharma, A.; Sood, D.R. Flaxseed—A potential functional food source. *J. Food Sci. Technol.* **2015**, *52*, 1857–1871. [[CrossRef](#)]
4. Parikh, M.; Maddaford, T.G.; Austria, J.A.; Aliani, M.; Netticadan, T.; Pierce, G.N. Dietary flaxseed as a strategy for improving human health. *Nutrients* **2019**, *11*, 1171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. Kuijsten, A.; Arts, I.C.W.; van't Veer, P.; Hollman, P.C.H. The relative bioavailability of enterolignans in humans is enhanced by milling and crushing of flaxseed. *J. Nutr.* **2005**, *135*, 2812–2816. [[CrossRef](#)]
6. Morris, D.H. *Flax: A Health and Nutrition Primer*; Flax Council of Canada: Winnipeg, MB, Canada, 2007; p. 140.
7. Singh, K.K.; Mridula, D.; Rehal, J.; Barnwal, P. Flaxseed: A potential source of food, feed and fiber. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2011**, *51*, 210–222. [[CrossRef](#)]
8. Rubilar, M.; Gutiérrez, C.; Verdugo, M.; Shene, C.; Sineiro, J. Flaxseed as a source of functional ingredients. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* **2010**, *10*, 373–377. [[CrossRef](#)]
9. Wüstenberg, T. General overview of food hydrocolloids. In *Cellulose and Cellulose Derivatives in the Food Industry*; Wüstenberg, T., Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2014; pp. 1–68.
10. Williams, P.A.; Phillips, G.O. 1—Introduction to food hydrocolloids. In *Handbook of Hydrocolloids*, 2nd ed.; Phillips, G.O., Williams, P.A., Eds.; Woodhead Publishing: Cambridge, UK, 2009; pp. 1–22.
11. Izydorczyk, M.; Cui, S.; Wang, Q. Polysaccharide gums: Structures, functional properties, and applications. In *Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties and Applications*, 1st ed.; Cui, S.W., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2005; p. 46.
12. González-Pérez, S.; Arellano, J.B. 15—Vegetable protein isolates. In *Handbook of Hydrocolloids*, 2nd ed.; Phillips, G.O., Williams, P.A., Eds.; Woodhead Publishing: Cambridge, UK, 2009; pp. 383–419.
13. Xu, X.; Liu, W.; Liu, C.; Luo, L.; Chen, J.; Luo, S.; McClements, D.J.; Wu, L. Effect of limited enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of rice glutelin. *Food Hydrocoll.* **2016**, *61*, 251–260. [[CrossRef](#)]
14. Zang, X.; Yue, C.; Wang, Y.; Shao, M.; Yu, G. Effect of limited enzymatic hydrolysis on the structure and emulsifying properties of rice bran protein. *J. Cereal Sci.* **2019**, *85*, 168–174. [[CrossRef](#)]
15. Gao, Y.; Li, J.; Chang, C.; Wang, C.; Yang, Y.; Su, Y. Effect of enzymatic hydrolysis on heat stability and emulsifying properties of egg yolk. *Food Hydrocoll.* **2019**, *97*, 105224. [[CrossRef](#)]
16. Liu, R.; Wang, L.; Liu, Y.; Wu, T.; Zhang, M. Fabricating soy protein hydrolysate/xanthan gum as fat replacer in ice cream by combined enzymatic and heat-shearing treatment. *Food Hydrocoll.* **2018**, *81*, 39–47. [[CrossRef](#)]
17. Mudgil, D.; Barak, S.; Khatkar, B.S. Effect of partially hydrolyzed guar gum on pasting, thermo-mechanical and rheological properties of wheat dough. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *93*, 131–135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Mudgil, D.; Barak, S.; Patel, A.; Shah, N. Partially hydrolyzed guar gum as a potential prebiotic source. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *112*, 207–210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Mary, P.R.; Prashanth, K.V.H.; Vasu, P.; Kapoor, M. Structural diversity and prebiotic potential of short chain β -manno-oligosaccharides generated from guar gum by endo- β -mannanase (ManB-1601). *Carbohydr. Res.* **2019**, *486*, 107822. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Wongputtisin, P.; Khanongnuch, C. Prebiotic properties of crude oligosaccharide prepared from enzymatic hydrolysis of basil seed gum. *Food Sci. Biotechnol.* **2015**, *24*, 1767–1773. [[CrossRef](#)]
21. Jian, H.-L.; Zhu, L.-W.; Zhang, W.-M.; Sun, D.-F.; Jiang, J.-X. Enzymatic production and characterization of manno-oligosaccharides from *Gleditsia sinensis* galactomannan gum. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *55*, 282–288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Kot, A.; Kamińska-Dwórznicza, A.; Antczak, A.; Jakubczyk, E.; Matwijczuk, A. Effect of ι -carrageenan and its acidic and enzymatic hydrolysates on ice crystal structure changes in model sucrose solution. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2022**, *643*, 128744. [[CrossRef](#)]
23. Yemencioglu, A.; Farris, S.; Turkyilmaz, M.; Gulec, S. A review of current and future food applications of natural hydrocolloids. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2020**, *55*, 1389–1406. [[CrossRef](#)]
24. Safdar, B.; Pang, Z.; Liu, X.; Jatoi, M.A.; Mehmood, A.; Rashid, M.T.; Ali, N.; Naveed, M. Flaxseed gum: Extraction, bioactive composition, structural characterization, and its potential antioxidant activity. *J. Food Biochem.* **2019**, *43*, e13014. [[CrossRef](#)]
25. Liu, J.; Shim, Y.Y.; Tse, T.J.; Wang, Y.; Reaney, M.J.T. Flaxseed gum a versatile natural hydrocolloid for food and non-food applications. *Trends Food Sci. Technol.* **2018**, *75*, 146–157. [[CrossRef](#)]
26. Biliaderis, C.G.; Izydorczyk, M.S. *Functional Food Carbohydrates*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2006; p. 588.
27. Drozłowska, E.; Bartkowiak, A.; Lopusiewicz, E. Characterization of flaxseed oil bimodal emulsions prepared with flaxseed oil cake extract applied as a natural emulsifying agent. *Polymers* **2020**, *12*, 2207. [[CrossRef](#)]
28. Jiang, Y.; Reddy, C.K.; Huang, K.; Chen, L.; Xu, B. Hydrocolloidal properties of flaxseed gum/konjac glucomannan compound gel. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *133*, 1156–1163. [[CrossRef](#)]
29. Vieira, J.M.; Mantovani, R.A.; Raposo, M.F.J.; Coimbra, M.A.; Vicente, A.A.; Cunha, R.L. Effect of extraction temperature on rheological behavior and antioxidant capacity of flaxseed gum. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *213*, 217–227. [[CrossRef](#)]
30. Safdar, B.; Zhihua, P.; Xinqi, L.; Jatoi, M.A.; Rashid, M.T. Influence of different extraction techniques on recovery, purity, antioxidant activities, and microstructure of flaxseed gum. *J. Food Sci.* **2020**, *85*, 3168–3182. [[CrossRef](#)]
31. Bouaziz, F.; Koubaa, M.; Barba, F.J.; Roohinejad, S.; Chaabouni, S.E. Antioxidant properties of water-soluble gum from flaxseed hulls. *Antioxidants* **2016**, *5*, 26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Luo, J.; Li, Y.; Mai, Y.; Gao, L.; Ou, S.; Wang, Y.; Liu, L.; Peng, X. Flaxseed gum reduces body weight by regulating gut microbiota. *J. Funct. Foods* **2018**, *47*, 136–142. [[CrossRef](#)]
33. Thakur, G.; Mitra, A.; Pal, K.; Rousseau, D. Effect of flaxseed gum on reduction of blood glucose and cholesterol in type 2 diabetic patients. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2009**, *60*, 126–136. [[CrossRef](#)]
34. Oomah, B.D.; Mazza, G. Flaxseed proteins—A review. *Food Chem.* **1993**, *48*, 109–114. [[CrossRef](#)]

35. Nwachukwu, I.D.; Aluko, R.E. Physicochemical and emulsification properties of flaxseed (*Linum usitatissimum*) albumin and globulin fractions. *Food Chem.* **2018**, *255*, 216–225. [CrossRef] [PubMed]
36. Dev, D.K.; Quensel, E. Preparation and functional properties of linseed protein products containing differing levels of mucilage. *J. Food Sci.* **1988**, *53*, 1834–1837. [CrossRef]
37. Wu, S.; Wang, X.; Qi, W.; Guo, Q. Bioactive protein/peptides of flaxseed: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **2019**, *92*, 184–193. [CrossRef]
38. Cui, S. *Polysaccharide Gums from Agricultural Products: Processing, Structures and Functionality*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2000; p. 284.
39. Roulard, R.; Petit, E.; Mesnard, F.; Rhazi, L. Molecular investigations of flaxseed mucilage polysaccharides. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *86*, 840–847. [CrossRef] [PubMed]
40. Hu, Y.; Shim, Y.Y.; Reaney, M.J.T. Flaxseed gum solution functional properties. *Foods* **2020**, *9*, 681. [CrossRef]
41. Kaushik, P.; Dowling, K.; Adhikari, R.; Barrow, C.J.; Adhikari, B. Effect of extraction temperature on composition, structure and functional properties of flaxseed gum. *Food Chem.* **2017**, *215*, 333–340. [CrossRef]
42. Wang, Y.; Li, D.; Wang, L.-J.; Li, S.-J.; Adhikari, B. Effects of drying methods on the functional properties of flaxseed gum powders. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *81*, 128–133. [CrossRef]
43. Qian, K.-Y.; Cui, S.W.; Nikiforuk, J.; Goff, H.D. Structural elucidation of rhamnogalacturonans from flaxseed hulls. *Carbohydr. Res.* **2012**, *362*, 47–55. [CrossRef]
44. Cui, W.; Mazza, G.; Oomah, B.D.; Biliaderis, C.G. Optimization of an Aqueous Extraction Process for Flaxseed Gum by Response Surface Methodology. *LWT—Food Sci. Technol.* **1994**, *27*, 363–369. [CrossRef]
45. Fabre, J.-F.; Lacroux, E.; Valentin, R.; Mouloungui, Z. Ultrasonication as a highly efficient method of flaxseed mucilage extraction. *Ind. Crops Prod.* **2015**, *65*, 354–360. [CrossRef]
46. Kaewmanee, T.; Bagnasco, L.; Benjakul, S.; Lanteri, S.; Morelli, C.F.; Speranza, G.; Cosulich, M.E. Characterisation of mucilages extracted from seven Italian cultivars of flax. *Food Chem.* **2014**, *148*, 60–69. [CrossRef]
47. Hadad, S.; Goli, S.A.H. Fabrication and characterization of electrospun nanofibers using flaxseed (*Linum usitatissimum*) mucilage. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *114*, 408–414. [CrossRef]
48. Kamel, R.; Afifi, S.M.; Kassem, I.A.A.; Elkasabgy, N.A.; Farag, M.A. Arabinoxylan and rhamnogalacturonan mucilage: Outgoing and potential trends of pharmaceutical, environmental, and medicinal merits. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *165*, 2550–2564. [CrossRef]
49. Cui, W.; Mazza, G. Physicochemical characteristics of flaxseed gum. *Food Res. Int.* **1996**, *29*, 397–402. [CrossRef]
50. Hellebois, T.; Fortuin, J.; Xu, X.; Shaplov, A.S.; Gaiani, C.; Soukoulis, C. Structure conformation, physicochemical and rheological properties of flaxseed gums extracted under alkaline and acidic conditions. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *192*, 1217–1230. [CrossRef] [PubMed]
51. Warr, J.; Michaud, P.; Picton, L.; Muller, G.; Courtois, B.; Ralainirina, R.; Courtois, J. Large-scale purification of water-soluble polysaccharides from flaxseed mucilage, and isolation of a new anionic polymer. *Chromatographia* **2003**, *58*, 331–335. [CrossRef]
52. Moczowska, M.; Karp, S.; Niu, Y.; Kurek, M.A. Enzymatic, enzymatic-ultrasonic and alkaline extraction of soluble dietary fibre from flaxseed—A physicochemical approach. *Food Hydrocoll.* **2019**, *90*, 105–112. [CrossRef]
53. Warrant, J.; Michaud, P.; Picton, L.; Muller, G.; Courtois, B.; Ralainirina, R.; Courtois, J. Structural investigations of the neutral polysaccharide of *Linum usitatissimum* L. seeds mucilage. *Int. J. Biol. Macromol.* **2005**, *35*, 121–125. [CrossRef]
54. Ding, H.H.; Qian, K.; Goff, H.D.; Wang, Q.; Cui, S.W. Structural and conformational characterization of arabinoxylans from flaxseed mucilage. *Food Chem.* **2018**, *254*, 266–271. [CrossRef]
55. Elboutachfaiti, R.; Delattre, C.; Quéro, A.; Roulard, R.; Duchêne, J.; Mesnard, F.; Petit, E. Fractionation and structural characterization of six purified rhamnogalacturonans type I from flaxseed mucilage. *Food Hydrocoll.* **2017**, *62*, 273–279. [CrossRef]
56. Qian, K.Y.; Cui, S.W.; Wu, Y.; Goff, H.D. Flaxseed gum from flaxseed hulls: Extraction, fractionation, and characterization. *Food Hydrocoll.* **2012**, *28*, 275–283. [CrossRef]
57. Fedeniuk, R.W.; Biliaderis, C.G. Composition and physicochemical properties of linseed (*Linum usitatissimum* L.) mucilage. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 240–247. [CrossRef]
58. Troshchynska, Y.; Bleha, R.; Synytsya, A.; Štětina, J. Chemical composition and rheological properties of seed mucilages of various yellow- and brown-seeded flax (*Linum usitatissimum* L.) cultivars. *Polymers* **2022**, *14*, 2040. [CrossRef]
59. Ren, X.; He, H.; Li, T. Variations in the structural and functional properties of flaxseed gum from six different flaxseed cultivars. *Food Sci. Nutr.* **2021**, *9*, 6131–6138. [CrossRef]
60. Bárta, J.; Bártořová, V.; Jarořová, M.; Švajner, J.; Smetana, P.; Kadlec, J.; Filip, V.; Kyselka, J.; Berčiková, M.; Zdráhal, Z.; et al. Oilseed cake flour composition, functional properties and antioxidant potential as effects of sieving and species differences. *Foods* **2021**, *10*, 2766. [CrossRef]
61. Chang, Y.; Li, Y.; Miao, Q.; Jiang, H.; Gao, X. Rheological properties of six plant-based seed gums. *Am. J. Anal. Chem.* **2017**, *08*, 690–707. [CrossRef]
62. Cui, W.; Mazza, G.; Biliaderis, C.G. Chemical structure, molecular size distributions, and rheological properties of flaxseed gum. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1891–1895. [CrossRef]
63. Chen, H.-H.; Xu, S.-Y.; Wang, Z. Gelation properties of flaxseed gum. *J. Food Eng.* **2006**, *77*, 295–303. [CrossRef]

64. Sun, J.; Liu, W.-y.; Feng, M.-q.; Xu, X.-l.; Zhou, G.-h. Characterization of olive oil emulsions stabilized by flaxseed gum. *J. Food Eng.* **2019**, *247*, 74–79. [[CrossRef](#)]
65. Yu, X.; Huang, S.; Yang, F.; Qin, X.; Nie, C.; Deng, Q.; Huang, F.; Xiang, Q.; Zhu, Y.; Geng, F. Effect of microwave exposure to flaxseed on the composition, structure and techno-functionality of gum polysaccharides. *Food Hydrocoll.* **2022**, *125*, 107447. [[CrossRef](#)]
66. Yang, C.; Hu, C.; Zhang, H.; Chen, W.; Deng, Q.; Tang, H.; Huang, F. Optimization for preparation of oligosaccharides from flaxseed gum and evaluation of antioxidant and antitumor activities in vitro. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *153*, 1107–1116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Guo, Q.; Zhu, X.; Zhen, W.; Li, Z.; Kang, J.; Sun, X.; Wang, S.; Cui, S.W. Rheological properties and stabilizing effects of high-temperature extracted flaxseed gum on oil/water emulsion systems. *Food Hydrocoll.* **2021**, *112*, 106289. [[CrossRef](#)]
68. Kristensen, M.; Jensen, M.G.; Aarestrup, J.; Petersen, K.E.N.; Søndergaard, L.; Mikkelsen, M.S.; Astrup, A. Flaxseed dietary fibers lower cholesterol and increase fecal fat excretion, but magnitude of effect depend on food type. *Nutr. Metab.* **2012**, *9*, 8. [[CrossRef](#)]
69. Korus, J.; Witczak, T.; Ziobro, R.; Juszcak, L. Linseed (*Linum usitatissimum* L.) mucilage as a novel structure forming agent in gluten-free bread. *LWT—Food Sci. Technol.* **2015**, *62*, 257–264. [[CrossRef](#)]
70. Stewart, S.; Mazza, G. Effect of flaxseed gum on quality and stability of a model salad dressing. *J. Food Qual.* **2000**, *23*, 373–390. [[CrossRef](#)]
71. Qin, L.; Xu, S.-y.; Zhang, W.-b. Effect of enzymatic hydrolysis on the yield of cloudy carrot juice and the effects of hydrocolloids on color and cloud stability during ambient storage. *J. Sci. Food Agric.* **2005**, *85*, 505–512. [[CrossRef](#)]
72. Basiri, S.; Haidary, N.; Shekarforoush, S.S.; Niakousari, M. Flaxseed mucilage: A natural stabilizer in stirred yogurt. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *187*, 59–65. [[CrossRef](#)]
73. Sun, J.; Li, X.; Xu, X.; Zhou, G. Influence of various levels of flaxseed gum addition on the water-holding capacities of heat-induced porcine myofibrillar protein. *J. Food Sci.* **2011**, *76*, C472–C478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Zhou, W.W.; Meng, L.; Li, X.; Ma, L.; Dai, R. Effect of the interaction between carrageenan, gellan gum and flaxseed gum on quality attributes of starch-free emulsion-type sausage. *J. Muscle Foods* **2010**, *21*, 255–267. [[CrossRef](#)]
75. Liu, J.; Shim, Y.Y.; Shen, J.; Wang, Y.; Reaney, M.J.T. Whey protein isolate and flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) gum electrostatic coacervates: Turbidity and rheology. *Food Hydrocoll.* **2017**, *64*, 18–27. [[CrossRef](#)]
76. Kaushik, P.; Dowling, K.; McKnight, S.; Barrow, C.J.; Adhikari, B. Microencapsulation of flaxseed oil in flaxseed protein and flaxseed gum complex coacervates. *Food Res. Int.* **2016**, *86*, 1–8. [[CrossRef](#)]
77. Pham, L.B.; Wang, B.; Zisu, B.; Truong, T.; Adhikari, B. Microencapsulation of flaxseed oil using polyphenol-adducted flaxseed protein isolate-flaxseed gum complex coacervates. *Food Hydrocoll.* **2020**, *107*, 105944. [[CrossRef](#)]
78. Hasanvand, E.; Rafe, A. Characterization of flaxseed gum/rice bran protein complex coacervates. *Food Biophys.* **2018**, *13*, 387–395. [[CrossRef](#)]
79. Lai, K.; How, Y.; Pui, L. Microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG with flaxseed mucilage using co-extrusion technique. *J. Microencapsul.* **2021**, *38*, 134–148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Lai, K.; Mohd Ghazali, H.; How, Y.H.; Pui, L.P. Preliminary evaluation of potential prebiotic capacity of selected legumes and seed mucilage on the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Asia-Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* **2021**, *29*, 60–72. [[CrossRef](#)]
81. Lai, K.-W.; How, Y.-H.; Pui, L.-P. Storage stability of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in hawthorn berry tea with flaxseed mucilage. *J. Food Process. Preserv.* **2020**, *44*, e14965. [[CrossRef](#)]
82. Soleimani-Rambod, A.; Zomorodi, S.; Naghizadeh Raeisi, S.; Khosrowshahi Asl, A.; Shahidi, S.-A. The effect of xanthan gum and flaxseed mucilage as edible coatings in cheddar cheese during ripening. *Coatings* **2018**, *8*, 80. [[CrossRef](#)]
83. Lu, Z.; Saldaña, M.D.A.; Jin, Z.; Sun, W.; Gao, P.; Bilige, M.; Sun, W. Layer-by-layer electrostatic self-assembled coatings based on flaxseed gum and chitosan for Mongolian cheese preservation. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2021**, *73*, 102785. [[CrossRef](#)]
84. Yousuf, B.; Srivastava, A.K. Flaxseed gum in combination with lemongrass essential oil as an effective edible coating for ready-to-eat pomegranate arils. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *104*, 1030–1038. [[CrossRef](#)]
85. Treviño-Garza, M.Z.; Correa-Cerón, R.C.; Ortiz-Lechuga, E.G.; Solís-Arévalo, K.K.; Castillo-Hernández, S.L.; Gallardo-Rivera, C.T.; Arévalo Niño, K. Effect of linseed (*Linum usitatissimum*) mucilage and chitosan edible coatings on quality and shelf-life of fresh-cut cantaloupe (*Cucumis melo*). *Coatings* **2019**, *9*, 368. [[CrossRef](#)]
86. Treviño-Garza, M.Z.; García, S.; Heredia, N.; Alanís-Guzmán, M.G.; Arévalo-Niño, K. Layer-by-layer edible coatings based on mucilages, pullulan and chitosan and its effect on quality and preservation of fresh-cut pineapple (*Ananas comosus*). *Postharvest Biol. Technol.* **2017**, *128*, 63–75. [[CrossRef](#)]
87. Rodrigues, F.J.; Cedran, M.F.; Garcia, S. Influence of linseed mucilage incorporated into an alginate-base edible coating containing probiotic bacteria on shelf-life of fresh-cut yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *Food Bioprocess Technol.* **2018**, *11*, 1605–1614. [[CrossRef](#)]
88. Al-Okbi, S.Y. Highlights on functional foods, with special reference to flaxseed. *J. Nat. Fibers* **2005**, *2*, 63–68. [[CrossRef](#)]
89. Long, J.-j.; Zu, Y.-g.; Fu, Y.-j.; Luo, M.; Mu, P.-s.; Zhao, C.-j.; Li, C.-y.; Wang, W.; Li, J. Oil removal from oily water systems using immobilized flaxseed gum gel beads. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 5172–5177. [[CrossRef](#)]
90. Wang, M.; Huang, G.; Zhang, G.; Chen, Y.; Liu, D.; Li, C. Selective flotation separation of fluorite from calcite by application of flaxseed gum as depressant. *Miner. Eng.* **2021**, *168*, 106938. [[CrossRef](#)]
91. Prado, N.S.; Silva, I.S.V.d.; Silva, T.A.L.; Oliveira, W.J.d.; Motta, L.A.d.C.; Pasquini, D.; Otaguro, H. Nanocomposite films based on flaxseed gum and cellulose nanocrystals. *Mater. Res.* **2018**, *21*, e20180134. [[CrossRef](#)]

92. Smith, A.K.; Johnsen, V.L.; Beckel, A.C. Linseed proteins. *Ind. Eng. Chem.* **1946**, *38*, 353–356. [[CrossRef](#)]
93. Sosulski, F.W.; Bakal, A. Isolated proteins from rapeseed, flax and sunflower meals. *Can. Inst. Food Technol. J.* **1969**, *2*, 28–32. [[CrossRef](#)]
94. Lan, Y.; Ohm, J.-B.; Chen, B.; Rao, J. Physicochemical properties and aroma profiles of flaxseed proteins extracted from whole flaxseed and flaxseed meal. *Food Hydrocoll.* **2020**, *104*, 105731. [[CrossRef](#)]
95. Perreault, V.; Hénaux, L.; Bazinet, L.; Doyen, A. Pretreatment of flaxseed protein isolate by high hydrostatic pressure: Impacts on protein structure, enzymatic hydrolysis and final hydrolysate antioxidant capacities. *Food Chem.* **2017**, *221*, 1805–1812. [[CrossRef](#)]
96. Vassel, B.; Nesbitt, L.L. The nitrogenous constituents of flaxseed: II. The isolation of a purified protein fraction. *J. Biol. Chem.* **1945**, *159*, 571–584. [[CrossRef](#)]
97. Youle, R.J.; Huang, A.H.C. Occurrence of low molecular weight and high cysteine containing albumin storage proteins in oilseeds of diverse species. *Am. J. Bot.* **1981**, *68*, 44–48. [[CrossRef](#)]
98. Dev, D.K.; Sienkiewicz, T. Isolation and subunit composition of 11 S globulin of linseed (*Linum usitatissimum* L.). *Food/Nahr.* **1987**, *31*, 767–769. [[CrossRef](#)]
99. Madhusudhan, K.T.; Singh, N. Studies on linseed proteins. *J. Agric. Food Chem.* **1983**, *31*, 959–963. [[CrossRef](#)]
100. Kaushik, P.; Dowling, K.; McKnight, S.; Barrow, C.J.; Wang, B.; Adhikari, B. Preparation, characterization and functional properties of flax seed protein isolate. *Food Chem.* **2016**, *197*, 212–220. [[CrossRef](#)]
101. Wanasundara, P.K.J.P.D.; Shahidi, F. Optimization of hexametaphosphate-assisted extraction of flaxseed proteins using response surface methodology. *J. Food Sci.* **1996**, *61*, 604–607. [[CrossRef](#)]
102. Ye, X.-P.; Xu, M.-F.; Tang, Z.-X.; Chen, H.-J.; Wu, D.-T.; Wang, Z.-Y.; Songzhen, Y.-X.; Hao, J.; Wu, L.-M.; Shi, L.-E. Flaxseed protein: Extraction, functionalities and applications. *Food Sci. Technol.* **2022**, *42*. [[CrossRef](#)]
103. Udenigwe, C.C.; Lin, Y.-S.; Hou, W.-C.; Aluko, R.E. Kinetics of the inhibition of renin and angiotensin I-converting enzyme by flaxseed protein hydrolysate fractions. *J. Funct. Foods* **2009**, *1*, 199–207. [[CrossRef](#)]
104. Logarušić, M.; Radošević, K.; Bis, A.; Panić, M.; Slivac, L.; Gaurina Srček, V. Biological potential of flaxseed protein hydrolysates obtained by different proteases. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2020**, *75*, 518–524. [[CrossRef](#)]
105. Giacomino, S.; Peñás, E.; Ferreyra, V.; Pellegrino, N.; Fournier, M.; Apro, N.; Olivera Carrión, M.; Frias, J. Extruded flaxseed meal enhances the nutritional quality of cereal-based products. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2013**, *68*, 131–136. [[CrossRef](#)]
106. Rabetafika, H.N.; Van Remoortel, V.; Danthine, S.; Paquot, M.; Blecker, C. Flaxseed proteins: Food uses and health benefits. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2011**, *46*, 221–228. [[CrossRef](#)]
107. Madhusudhan, K.T.; Singh, N. Isolation and characterization of the major fraction (12 S) of linseed proteins. *J. Agric. Food Chem.* **1985**, *33*, 673–677. [[CrossRef](#)]
108. Marcone, M.F.; Kakuda, Y.; Yada, R.Y. Salt-soluble seed globulins of various dicotyledonous and monocotyledonous plants—I. Isolation/purification and characterization. *Food Chem.* **1998**, *62*, 27–47. [[CrossRef](#)]
109. Chung, M.W.Y.; Lei, B.; Li-Chan, E.C.Y. Isolation and structural characterization of the major protein fraction from NorMan flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *Food Chem.* **2005**, *90*, 271–279. [[CrossRef](#)]
110. Krause, J.-P.; Schultz, M.; Dudek, S. Effect of extraction conditions on composition, surface activity and rheological properties of protein isolates from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *J. Sci. Food Agric.* **2002**, *82*, 970–976. [[CrossRef](#)]
111. Madhusudhan, K.T.; Singh, N. Isolation and characterization of a small molecular weight protein of linseed meal. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 2507–2509. [[CrossRef](#)]
112. Liu, J.; Shim, Y.Y.; Poth, A.G.; Reaney, M.J.T. Conlinin in flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) gum and its contribution to emulsification properties. *Food Hydrocoll.* **2016**, *52*, 963–971. [[CrossRef](#)]
113. Tirgar, M.; Silcock, P.; Carne, A.; Birch, E.J. Effect of extraction method on functional properties of flaxseed protein concentrates. *Food Chem.* **2017**, *215*, 417–424. [[CrossRef](#)]
114. Martínez-Flores, H.E.; Barrera, E.S.; Garnica-Romo, M.G.; Penagos, C.J.C.; Saavedra, J.P.; Macazaga-Alvarez, R. Functional characteristics of protein flaxseed concentrate obtained applying a response surface methodology. *J. Food Sci.* **2006**, *71*, C495–C498. [[CrossRef](#)]
115. Waszkowiak, K.; Mikolajczak, B. The effect of roasting on the protein profile and antiradical capacity of flaxseed meal. *Foods* **2020**, *9*, 1383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Wei, C.-K.; Thakur, K.; Liu, D.-H.; Zhang, J.-G.; Wei, Z.-J. Enzymatic hydrolysis of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) protein and sensory characterization of Maillard reaction products. *Food Chem.* **2018**, *263*, 186–193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Wei, C.-K.; Ni, Z.-J.; Thakur, K.; Liao, A.-M.; Huang, J.-H.; Wei, Z.-J. Color and flavor of flaxseed protein hydrolysates Maillard reaction products: Effect of cysteine, initial pH, and thermal treatment. *Int. J. Food Prop.* **2019**, *22*, 84–99. [[CrossRef](#)]
118. Mueller, K.; Eisner, P.; Kirchhoff, E. Simplified fractionation process for linseed meal by alkaline extraction—Functional properties of protein and fibre fractions. *J. Food Eng.* **2010**, *99*, 49–54. [[CrossRef](#)]
119. Mueller, K.; Eisner, P.; Yoshie-Stark, Y.; Nakada, R.; Kirchhoff, E. Functional properties and chemical composition of fractionated brown and yellow linseed meal (*Linum usitatissimum* L.). *J. Food Eng.* **2010**, *98*, 453–460. [[CrossRef](#)]
120. Wang, B.; Wang, L.-J.; Li, D.; Bhandari, B.; Wu, W.-F.; Shi, J.; Chen, X.D.; Mao, Z.-H. Effects of potato starch addition and cooling rate on rheological characteristics of flaxseed protein concentrate. *J. Food Eng.* **2009**, *91*, 392–401. [[CrossRef](#)]
121. Dev, D.K.; Quensel, E. Functional properties of linseed protein products containing different levels of mucilage in selected food systems. *J. Food Sci.* **1989**, *54*, 183–186. [[CrossRef](#)]

122. Min, C.; Ma, W.; Kuang, J.; Huang, J.; Xiong, Y.L. Textural properties, microstructure and digestibility of mungbean starch–flaxseed protein composite gels. *Food Hydrocoll.* **2022**, *126*, 107482. [CrossRef]
123. Sharma, M.; Saini, C.S. Efficacy of flaxseed protein-based edible coatings on the quality of whole guava (*Psidium guajava*) during storage. *Food Sci. Appl. Biotechnol.* **2021**, *4*, 93–104. [CrossRef]
124. Bustamante, M.; Oomah, B.D.; Rubilar, M.; Shene, C. Effective *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium infantis* encapsulation with chia seed (*Salvia hispanica* L.) and flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) mucilage and soluble protein by spray drying. *Food Chem.* **2017**, *216*, 97–105. [CrossRef]
125. Manthey, F.A.; Sinha, S.; Wolf-Hall, C.E.; Hall, C.A., III. Effect of flaxseed flour and packaging on shelf life of refrigerated pasta. *J. Food Process. Preserv.* **2008**, *32*, 75–87. [CrossRef]
126. Xu, Y.; Hall, C., III; Wolf-Hall, C. Antifungal activity stability of flaxseed protein extract using response surface methodology. *J. Food Sci.* **2007**, *73*, M9–M14. [CrossRef]
127. Xu, Y.; Hall, C.; Wolf-Hall, C.; Manthey, F. Fungistatic activity of flaxseed in potato dextrose agar and a fresh noodle system. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *121*, 262–267. [CrossRef]
128. Marambe, H.K.; Shand, P.J.; Wanasundara, J.P.D. In vitro digestibility of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) protein: Effect of seed mucilage, oil and thermal processing. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2013**, *48*, 628–635. [CrossRef]
129. Oomah, B.D. Flaxseed as a functional food source. *J. Sci. Food Agric.* **2001**, *81*, 889–894. [CrossRef]
130. Udenigwe, C.C.; Aluko, R.E. Antioxidant and angiotensin converting enzyme-inhibitory properties of a flaxseed protein-derived high Fischer ratio peptide mixture. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 4762–4768. [CrossRef] [PubMed]
131. Udenigwe, C.C.; Lu, Y.-L.; Han, C.-H.; Hou, W.-C.; Aluko, R.E. Flaxseed protein-derived peptide fractions: Antioxidant properties and inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in murine macrophages. *Food Chem.* **2009**, *116*, 277–284. [CrossRef]
132. Silva, F.G.D.e.; Hernández-Ledesma, B.; Amigo, L.; Netto, F.M.; Miralles, B. Identification of peptides released from flaxseed (*Linum usitatissimum*) protein by Alcalase[®] hydrolysis: Antioxidant activity. *LWT—Food Sci. Technol.* **2017**, *76*, 140–146. [CrossRef]
133. Hwang, C.-F.; Chen, Y.-A.; Luo, C.; Chiang, W.-D. Antioxidant and antibacterial activities of peptide fractions from flaxseed protein hydrolysed by protease from *Bacillus altitudinis* HK02. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2016**, *51*, 681–689. [CrossRef]
134. Doyen, A.; Udenigwe, C.C.; Mitchell, P.L.; Marette, A.; Aluko, R.E.; Bazinet, L. Anti-diabetic and antihypertensive activities of two flaxseed protein hydrolysate fractions revealed following their simultaneous separation by electrodialysis with ultrafiltration membranes. *Food Chem.* **2014**, *145*, 66–76. [CrossRef] [PubMed]
135. Omoni, A.O.; Aluko, R.E. Mechanism of the inhibition of calmodulin-dependent neuronal nitric oxide synthase by flaxseed protein hydrolysates. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2006**, *83*, 335–340. [CrossRef]
136. Omoni, A.O.; Aluko, R.E. Effect of cationic flaxseed protein hydrolysate fractions on the *in vitro* structure and activity of calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase. *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, *50*, 958–966. [CrossRef]
137. Gui, B.; Shim, Y.Y.; Reaney, M.J.T. Distribution of cyclolinopeptides in flaxseed fractions and products. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 8580–8589. [CrossRef]
138. Sharav, O.; Shim, Y.Y.; Okinyo-Owiti, D.P.; Sammynaiken, R.; Reaney, M.J.T. Effect of cyclolinopeptides on the oxidative stability of flaxseed oil. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 88–96. [CrossRef]
139. Tolkachev, O.N.; Zhuchenko, A.A. Biologically active substances of flax: Medicinal and nutritional properties (a review). *Pharm. Chem. J.* **2004**, *34*, 360–367. [CrossRef]
140. Anzlovar, S.; Serra, M.D.; Dermastia, M.; Menestrina, G. Membrane permeabilizing activity of pathogenesis-related protein linusitin from flax seed. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1998**, *11*, 610–617. [CrossRef]
141. Lipilina, E.; Ganji, V. Incorporation of ground flaxseed into bakery products and its effect on sensory and nutritional characteristics—A pilot study. *J. Foodserv.* **2009**, *20*, 52–59. [CrossRef]
142. Wu, M.; Li, D.; Wang, L.-J.; Özkan, N.; Mao, Z.-H. Rheological properties of extruded dispersions of flaxseed-maize blend. *J. Food Eng.* **2010**, *98*, 480–491. [CrossRef]
143. Juodeikiene, G.; Zadeike, D.; Trakselyte-Rupsiene, K.; Gasauskaite, K.; Bartkiene, E.; Lele, V.; Viskelis, P.; Bernatoniene, J.; Ivanauskas, L.; Jakstas, V. Functionalisation of flaxseed proteins assisted by ultrasonication to produce coatings enriched with raspberries phytochemicals. *LWT* **2020**, *124*, 109180. [CrossRef]
144. Wang, B.; Li, D.; Wang, L.-J.; Özkan, N. Effect of concentrated flaxseed protein on the stability and rheological properties of soybean oil-in-water emulsions. *J. Food Eng.* **2010**, *96*, 555–561. [CrossRef]
145. Ghosal, S.; Bhattacharyya, D.K.; Bhowal, J. Production, characterization, and storage stability of nutritionally enriched flaxseed-based spread. *J. Food Process. Preserv.* **2022**, *46*, e16574. [CrossRef]
146. Alpaslan, M.; Hayta, M. The effects of flaxseed, soy and corn flours on the textural and sensory properties of a bakery product. *J. Food Qual.* **2006**, *29*, 617–627. [CrossRef]
147. Koca, A.F.; Anil, M. Effect of flaxseed and wheat flour blends on dough rheology and bread quality. *J. Sci. Food Agric.* **2007**, *87*, 1172–1175. [CrossRef]
148. Lunardello, K.A.; Yamashita, F.; de Toledo Benassi, M.; de Rensis, C.M.V.B. The physicochemical characteristics of nonfat set yoghurt containing some hydrocolloids. *Int. J. Dairy Technol.* **2012**, *65*, 260–267. [CrossRef]
149. Akdeniz, V.; Akalin, A.S. New approach for yoghurt and ice cream production: High-intensity ultrasound. *Trends Food Sci. Technol.* **2019**, *86*, 392–398. [CrossRef]

150. Basiri, S.; Tajbakhsh, S.; Shekarforoush, S.S. Fortification of stirred yoghurt with mucilage-free flaxseed and its physicochemical, microbial, textural and sensory properties. *Int. Dairy J.* **2022**, *131*, 105384. [[CrossRef](#)]
151. Delouee Arabshahi, S.; Rahati Ghochani, S.; Mohammadi, A. Effect of flaxseed (*Linum usitatissimum*) mucilage on physicochemical and sensorial properties of semi-fat set yoghurt. *J. Food Biosci. Technol.* **2020**, *10*, 91–100.
152. Nguyen, P.T.M.; Kravchuk, O.; Bhandari, B.; Prakash, S. Effect of different hydrocolloids on texture, rheology, tribology and sensory perception of texture and mouthfeel of low-fat pot-set yoghurt. *Food Hydrocoll.* **2017**, *72*, 90–104. [[CrossRef](#)]
153. Ng, S.B.X.; Nguyen, P.T.M.; Bhandari, B.; Prakash, S. Influence of different functional ingredients on physical properties, rheology, tribology, and oral perceptions of no fat stirred yoghurt. *J. Texture Stud.* **2018**, *49*, 274–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Sodini, I.; Montella, J.; Tong, P.S. Physical properties of yogurt fortified with various commercial whey protein concentrates. *J. Sci. Food Agric.* **2005**, *85*, 853–859. [[CrossRef](#)]
155. Remeuf, F.; Mohammed, S.; Sodini, I.; Tissier, J.P. Preliminary observations on the effects of milk fortification and heating on microstructure and physical properties of stirred yogurt. *Int. Dairy J.* **2003**, *13*, 773–782. [[CrossRef](#)]
156. Hu, Y.; Li, Y.; Liu, X. Soybean peptides promote yoghurt fermentation and quality. *Biotechnol. Lett.* **2020**, *42*, 1927–1937. [[CrossRef](#)]

V první přehledové publikaci v rámci této kapitoly bylo detailně popsáno složení, struktura, metody extrakce, funkční vlastnosti, biologické aktivity a praktické příklady možného použití lněných bílkovin a slizů v potravinách. Ty poukazují na možnost jejich plnohodnotného využití pro zvýšení nutričních parametrů potravin nebo jako funkční aditiva a být tak plnohodnotnou alternativou k běžně využívaným, analogickým produktům. Lněné slizotvorné sacharidy jsou v posledních letech poměrně intenzivně studovány z hlediska méně obvyklých nebo unikátních aplikací v oblastech potravinářství a výživy (Obr. 13).

V oblasti tvorby jedlých bioobalů a filmů může FG plnit úlohu strukturní složky a ochranné bariéry proti oxidativnímu poškození a mikrobiální kontaminaci. V kombinaci s hlavní biologicky aktivní složkou, například chitosanem, pak tyto materiály zvyšují trvanlivost a senzorickou kvalitu potravin. Lněný sliz může být rovněž použit jako strukturní složka při enkapsulaci nebo jako součást komplexních koacervátů, mikroenkapsulaci biologicky aktivních látek a léčiv, nebo probiotických mikroorganismů. Díky poměrně vysoké rezistenci v prostředí kyselého pH zůstávají materiály tvořené FG intaktní v rámci gastrické fáze, čímž mohou zajistit vyšší efektivitu léčivých přípravků nebo doplňků stravy, či viabilitu probiotických mikroorganismů. FG lze využít pro modifikaci bílkovin vedoucí ke zlepšení jejich funkčních vlastností, například zvýšení tvorby a stabilizace emulzí, želírovací schopnosti a vaznosti vody. Díky svým želírovacím a viskoelastickým vlastnostem představuje FG perspektivní materiál pro přípravu pokročilých gelových matic jako jsou například oleogely, kryogely nebo aerogely.

FG vykazuje vlastnosti rozpustné vlákniny, lze jej tedy využít pro úpravu zažívání. Zároveň představuje účinné prebiotikum z hlediska úpravy střevní mikroflóry vedoucí ke zvýšení relativního zastoupení benefitních střevních bakterií v rámci probiotického spektra. Na základě několika výzkumných studií byl zjištěn pozitivní vliv FG na vlastnosti tekutých potravin. Jejich inkorporace v nápojích obsahující syrovátku může mít pozitivní vliv na viskozitu a senzorickou přijatelnost těchto nápojů. Zároveň poskytuje zdravotní benefit díky svým antioxidačním vlastnostem a schopnosti stabilizovat funkční složky v těchto nápojích. Z hlediska přímých zdravotních efektů může FG v kombinaci s modifikovaným škrobem a xanthanovou gumou zajišťovat reologickou synergii těchto složek a indukovat pomalejší vstřebávání glukózy. Kromě toho, díky svým zahušťovacím schopnostem představuje účinnou funkční složku potravin v rámci dysfagické diety.



Obr. 13: Jednoduchý způsob extrakce slizu z celých semen nebo vedlejších produktů lněného semene a možnosti jeho využití v rámci různých potravinářských a dietetických aplikací. (převzato a upraveno podle Lorenc et al., 2024)

Kompletní informace a zdroje vztahující se k dané problematice a výše uvedené anotaci jsou uvedeny v publikaci:

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.

Review

Recent trends in food and dietary applications of flaxseed mucilage: a mini reviewFrantišek Lorenc,^{1*}  Markéta Jarošová,²  Jan Bedrníček,¹  Pavel Smetana¹  & Jan Bárta² 

¹ Department of Food Biotechnologies and Agricultural Products' Quality, Faculty of Agriculture and Technology, University of South Bohemia in České Budějovice, Studentská 1668, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

² Department of Plant Production, Faculty of Agriculture and Technology, University of South Bohemia in České Budějovice, Na Sádkách 1780, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

(Received 7 November 2023; Accepted in revised form 30 January 2024)

Summary Flaxseed mucilage (FM) is a hydrocolloid heteropolysaccharide comprised of a variable ratio of neutral and acidic monosaccharides. It possesses emulsifying, thickening, gelling and water–oil-binding properties. Due to these properties, it is highly applicable in foods as a functional agent to improve their physical and sensory parameters, thus representing an alternative to common plant gums. The most recent research is focused on the potential of FM for food treatments as a functional component. FM is usable in coatings and films. Combining with chitosan, bioactive proteins and peptides, or other compounds improves the quality of food products. FM may serve as a structural agent of novel gel materials, like oleogels, cryogels and aerogels. It can also be utilised within dietary applications to encapsulate living probiotics or bioactive compounds or serve as a prebiotic agent. Complexing of FM with proteins can lead to the improvement of their functional properties. The versatility of FM and unique properties, on the other hand, reveal its potential for further study and predetermine its use in a broad range of food and related applications in the future.

Keywords Complex coacervates, edible films, flaxseed gum, flaxseed mucilage, gut microbiota modification, protein function modification.

Introduction

Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) represents a rich source of valuable nutrients. It contains a high amount of oil, representing 37.1% of flaxseed fresh weight (FW) composed predominantly of polyunsaturated fatty acids (68.3% of total oil content), specifically by alpha-linolenic (54.3%) and linoleic (13.9%) acids (Suri *et al.*, 2020). The major fractions of flaxseed proteins (20% FW) are globulins (linin) comprising 58%–66% of protein content and 20%–42% of albumins (conlinin) (Lorenc *et al.*, 2022). The other functional constituents of flaxseeds are represented by total dietary fibre (24.5% FW) (Kajla *et al.*, 2015), and lignans (9–30 mg g⁻¹ FW) as the prevailing group of phenolic compounds (Khare *et al.*, 2021). Besides their nutritional aspects, these constituents, including the bioactive cyclic peptides, may benefit human health, mainly by reducing the risks associated with diabetes, cancer, heart disease or stroke (Shim *et al.*, 2022). The presence and properties of these compounds predetermine flaxseed as a highly functional food.

Flaxseed mucilage (FM) is a hydrocolloid heteropolysaccharide occurring in the outer layer of the seed. It is easily extractable from whole seeds (Kaushik *et al.*, 2017) (Fig. 1), seed hulls (Qian *et al.*, 2012), or oilseed cake (Drozdowska *et al.*, 2020). The content and ratio of neutral and acidic monosaccharides forming FM affect functional properties and can vary depending on the genotype, environment, production practices, storage conditions (Hu *et al.*, 2020), as well as the conditions used for the extraction of FM (Puligundla & Lim, 2022). In food products, FM has been frequently studied and applied in food products (Fig. 1) for its emulsifying, thickening and as a gelling agent or to stabilise oil/water emulsion systems (Guo *et al.*, 2021). Besides its potential use, which corresponds to other common applications, such as natural gums, related mainly to food fortifications, FM has recently become a subject of studies focused on more specialised food and dietary applications (Table 1).

This review aims to summarise the most recent findings within last few years about the functions, bioactivities, nutritional aspects, and health effects of FM and its valorisation in novel food products. Furthermore, the perspectives for FM in related future research are also proposed.

*Correspondent: E-mail: lorencf@fzt.jcu.cz

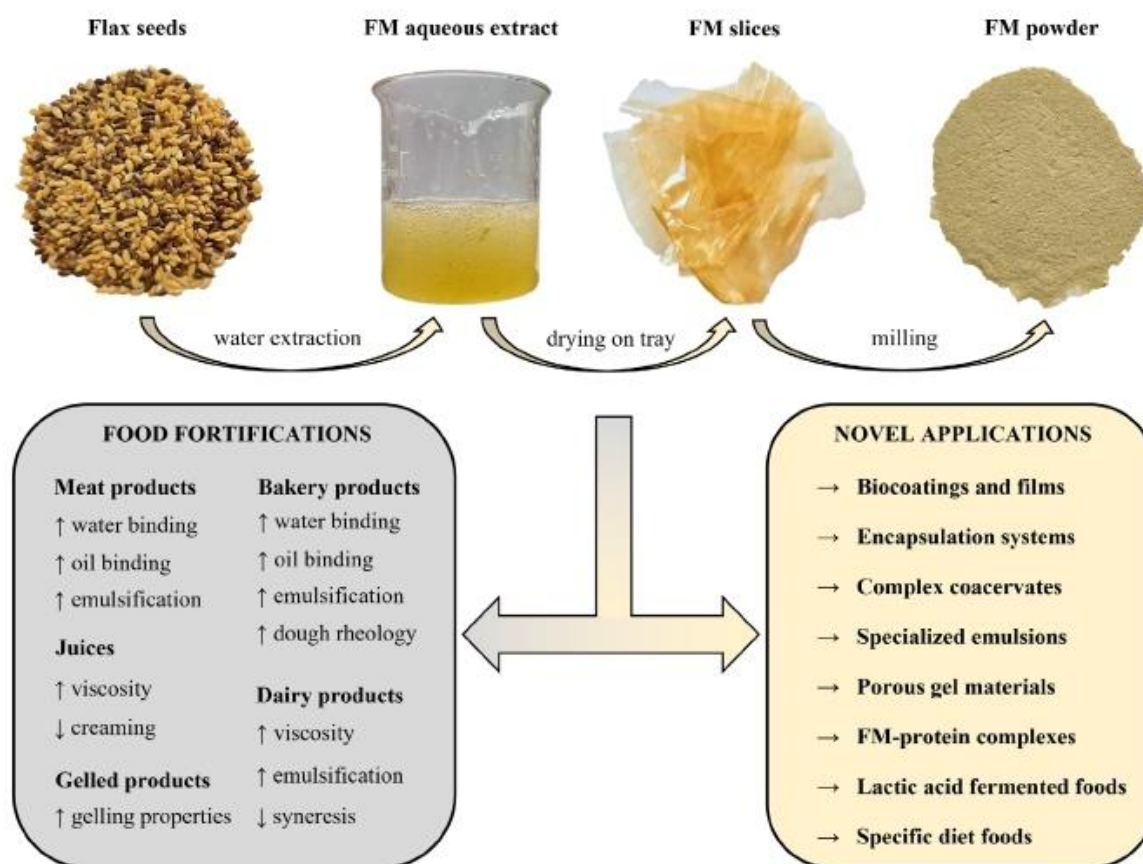


Figure 1 Schematic summary of flaxseed mucilage extraction, its functional properties and its use in traditional and novel food-related applications.

Compositional characteristics

FM is characterised as a water-soluble, highly branched carbohydrate polymer with an average molecular weight of ~1.3 kD, composed of neutral and acidic monosaccharides. As the soluble fraction of dietary fibre, FM represents one-third of total dietary fibre and forms 3.5%–15.0% FW of flaxseed. The prevailing carbohydrates in FM range from 68% to 90% of FM powder in a FW. Also, the content of the remaining constituents may be quite variable. FM powder contains 1.5%–22.1% proteins, 0.6%–11.2% ashes, 0.3%–2.1% oil and 3.4%–5.5% in a FW (Lorenc *et al.*, 2022). The composition of FM is predominantly determined by the content and ratio of two polysaccharidic fractions, which differ in molecular weight and monosaccharide composition. Neutral arabinoxylan-rich polysaccharide comprises L-arabinose, D-xylose, and D-galactose. In contrast,

the acidic rhamnogalacturonan-I-rich polysaccharide consists of L-rhamnose, L-fucose, L-galactose, and D-galacturonic acid (Safdar *et al.*, 2019). The prevailing neutral fraction with higher molecular weight ($1.2 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$) accounts for approximately 75% of FM carbohydrates. In comparison, the remaining acidic fraction with lower molecular weight makes up about 3.75% ($6.5 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$) and 21.5% ($1.7 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$) (Warr *et al.*, 2003). However, the composition and related properties of the obtained FM may depend on several factors. The flaxseed genotype is one of the important aspects since it has been reported that the FM of brown-seeded cultivars has a more acidic character compared to yellow-seeded, which consists more of the neutral polysaccharide (Troshchynska *et al.*, 2022). Consequently, genotype also affects the functional properties of FM. It was found that FM from the yellow flaxseed cultivar may show higher

Table 1 Properties and effects of the functional products containing flaxseed mucilage for novel food-related applications

| Application | Product | Function and effect | Reference |
|---------------------------------------|---|--|---------------------------------|
| Food packaging and encapsulation | Three-layer FM/CS/FM coating containing eugenol and laurel essential oils | Delay protein oxidation and microbial degradation. | Yang <i>et al.</i> (2022) |
| | CS-FM nanofiber composite | Preventing oxidative degradation of oils. | Karami <i>et al.</i> (2021) |
| | CS layer-by-layer electrostatic self-assembled coating | Increase the shelf-life of cheese. | Lu <i>et al.</i> (2021) |
| | FM/CS-based nanoparticles containing peptides | Encapsulation of peptides to protect the peptide functionalities and increase their thermal stabilities. | Zheng <i>et al.</i> (2023) |
| | FM-betel-leaf-based film | Physical, antioxidant and antibacterial barrier for food packaging. | Manzoor <i>et al.</i> (2023) |
| | FM-based films containing allyl isothiocyanate | Decrease of mesophilic, psychrophilic, coliform, and pathogenic bacteria on the meat samples. | Kopuz <i>et al.</i> (2023) |
| | Biodegradable FM/pectin-based film containing titanium oxide | UV-blocking layer and reduction of swelling index. | Akhila <i>et al.</i> (2023) |
| | FM/pea protein coating | Encapsulation of algae oil to prevent the aggregation and creaming of the formed emulsion. | Sun <i>et al.</i> (2022) |
| | FM nanoparticles containing carvacrol | Inhibition of pathogenic bacteria. | Cacciatore <i>et al.</i> (2022) |
| | Acrylic-grafted FM | Delivery system for pH-sensitive quercetin-drug for the more effective treatment of gastrointestinal diseases or cancers. | Kumar <i>et al.</i> (2023) |
| Coacervation and gel formation | MRP/FM-based emulsion containing astaxanthin | Protection of astaxanthin in the gastrointestinal tract for its better bioaccessibility. | Zhang <i>et al.</i> (2021) |
| | FM and polyphenol-adducted flaxseed protein isolate | Microencapsulation of flaxseed oil to prevent its oxidation. | Pham <i>et al.</i> (2020) |
| | FM and polyphenol-adducted flaxseed protein isolate | Microencapsulation of flaxseed oil, deliver it to the gastric phase, and improve its bioavailability. | Pham <i>et al.</i> (2021) |
| | Rice bran protein/FM coacervates | Encapsulation of vanillin/ β -cyclodextrin inclusion, increasing the vanillin thermostability and shelf life. | Hasanvand & Rafe (2019) |
| | Oleogel based on FM and candelilla wax | FM improved the plasticity of oleogels for food applications. | Su <i>et al.</i> (2022) |
| | FM-containing oleogel | FM improved the semi-solid properties, thermal resistance, and structural recovery of oleogels. | Jiang <i>et al.</i> (2022) |
| | FM-based ultra-lightweight aerogel | Supporting material and carrier for bioactive compounds or drugs. | Abdelmonem <i>et al.</i> (2022) |
| Modification of protein functionality | FM-based cryogel | FM provided techno-functional properties, allowing the incorporation of bioactive compounds or probiotics. | Hellebois <i>et al.</i> (2024) |
| | Pea protein modified by FM | Improved physical and emulsifying properties of protein. | (Yang <i>et al.</i> , 2023) |
| | FM/whey protein isolate | Stabilisation of gel-in-water double emulsion preventing the phases separation. | (Zhu <i>et al.</i> , 2022) |
| | Catechin-treated myofibrillar protein enriched by FM | FM strengthened the weakened gelling properties along with improved holding capacity and rheological properties. | Jia <i>et al.</i> , (2022) |
| Prebiotic function | FM containing whey protein-based cryo-hydrogel | FM improved the homogeneity and interconnectivity of the whey protein strands in derived cryo-hydrogels. | Hellebois <i>et al.</i> (2022) |
| | Kefir containing FM | Promoting the proliferation and viability of probiotics in cold-stored kefir. | (Alhssan <i>et al.</i> , 2023) |
| | High-fat diet fortified by FM | An increased proportion of beneficial probiotics in mice allowed better control of the aspects of metabolic syndrome, induced by a high-fat diet, like a fat accumulation, glucose, and triglyceride levels. | Yang <i>et al.</i> (2020) |
| | Breakfast buns enriched by FM | Modification of gut microbiota of post-menopausal women leading to anti-diabetic effects. | (Brahe <i>et al.</i> , 2015) |

Table 1 (Continued)

| Application | Product | Function and effect | Reference |
|----------------------------------|---|--|----------------------------------|
| Functional agent in liquid foods | High-fat diet fortified by FM | Reduction of body weight and total triglyceride of obese rats via changes of gut microbiota spectrum. | (Luo <i>et al.</i> , 2018) |
| | FM-based liquid foods | Suppress the swallowing problems of oropharyngeal dysphagia patients. Rheological synergism and slower glucose release upon digestion. | (Vieira <i>et al.</i> , 2021) |
| | FM-containing fermented/non-fermented whey drinks | Increase of viscosity and consumer acceptance. Improvement of antioxidant and nutritional profile. | Lopusiewicz <i>et al.</i> (2022) |
| | Powdered drink enriched by FM | Improvement of pro-health properties and structure of drink. | |
| | Soy protein drink containing FM | Increase of viscosity and protein particle size. | (Pang <i>et al.</i> , 2023) |

temperature stability, intrinsic viscosity and thickening properties compared to FM extracted from the brown-seeded cultivar (Hellebois *et al.*, 2021). Along with the cultivar selection, the method and parameters of the extraction may also crucially influence the yield and character of FM.

Extraction process

A number of studies described various approaches that are usable for the effective extraction of FM. According to one of a recent study, the most effective method from the point of the FM yield appears to be a hot water extraction (9.0% after 120 min and 100 °C), followed by ultrasound-assisted (7.8% after 30 min), microwave-assisted (7.0% after 15 min), and acid-alkaline extractions (6.4% after 90 min) (Safdar *et al.*, 2020). On the other hand, another study reported ultrasound-assisted extraction as the most effective, followed by hot water (6.5%) and microwave-assisted (2.1) extractions (Fabre *et al.*, 2015). Furthermore, the selected extraction method significantly impacts the overall composition of FM. It was assessed that the alkaline method for extraction obtained FM with only 42% polysaccharides and 22% protein content, whereas FM extracted by the enzymatic-ultrasonic procedure contained 69% polysaccharides and 8% protein (Moczkowska *et al.*, 2019). One of the most recent research studies compared the effects of hot water and ultrasound-assisted extraction on the yield and rheological properties of FM. The higher yield was achieved by ultrasound-assisted extraction (9.2%) compared to hot water extraction (7.2%). On the other hand, the ultrasound-assisted method changed the original structure of FM and reduced its viscosity and elasticity, which led to more fluidic behaviour of FM solution (Ren *et al.*, 2023).

The certain conditions of the selected method can determine the efficiency of FM extractions. The extraction temperature is the most critical factor for FM yield and chemical composition. The higher temperature and longer extraction increased the yield within hot water extraction. On the other hand, higher

temperatures decreased the content of total carbohydrates and neutral monosaccharides within FM and increased the presence of acidic monosaccharides and denatured proteins (Kaushik *et al.*, 2017). The other factors of FM extraction affecting its yield, apparent viscosity and protein content are pH and water:seed ratio (Cui *et al.*, 1994; Puligundla & Lim, 2022). Besides the FM yield and composition, the temperature may affect its functional properties and biological activities. It was shown that functional properties may change during storage. For instance, FM extracted at 98 °C exhibited better foaming capacity and foam stability on the first day of extraction compared to FM extracted at 70 °C, but after eight days, these parameters were similar for both variants of FM. This example indicates different changes in the functional properties of FM extracted at different temperatures (Hu *et al.*, 2020). Beyond the extraction process, following processing of FM, like spray, freeze, vacuum or oven drying along with ethanol precipitation, may affect its functional properties, especially gelling and foaming abilities or emulsifying activity (Wang *et al.*, 2010).

As reported, various methods and their parameters affects the composition of obtained FM, which is further reflected in its functional properties. Therefore, factors such as cultivar selection extraction procedure and further processing should be considered to ensure consistent physicochemical and functional properties for the desired application of FM. On the other hand, target selection of named factors may complicate obtaining FM exhibiting universal properties applicable for all relevant food or dietary applications.

Functional and bioactive properties

FM has been extensively studied for its potential use in food applications. It has a wide scale of functional properties such as shear thinning and gelling properties, water holding and oil binding capacities, thickening, emulsifying and emulsion-stabilising properties. Therefore, the effective use of FM as a functional

agent or additive in bakery, meat, dairy and gelled products (Fig. 1) has been described in many studies (Lorenc *et al.*, 2022). FM can alternate with or replace other plant gums as a food additive. For example, it shares a similar functionality with guar gum, which is determined by the high water-binding capacity and ability to form thermo-reversible gels with desired rheological properties (Cakmak *et al.*, 2023). In a direct comparison, FM may outclass some other plant gums in certain functional features. However, research studies that compare the functional properties of FM with other gums intra-experimentally are quite scarce. As an example, FM provides similar stability of emulsion (40% at 0.5% gum content) compared to gum Arabic (41%) but much higher than other widely used gums like pectin (30%), guar (12%), locust bean (2%) xanthan (8%) or carrageenan (4%) (Huang *et al.*, 2001). Another study described that cupcakes fortified by flaxseed sprouts powder containing flaxseed polysaccharides may improve specific volume, porosity or lower hardness and chewiness of cupcakes more than xanthan gum (Cakmak *et al.*, 2021). FM and its solutions exhibit high viscosity, which is higher than the viscosity of guar and tamarind gums and comparable to acacia gum (Chang *et al.*, 2017). As a practical example of the utilisation of FM viscosity, in one of the studies, authors added FM to potato gluten-free bread and observed an increase in viscoelasticity. Moreover, bread fortified by FM complemented by propylene glycol alginate and hydroxyethyl cellulose exhibit improved softness (Chen *et al.*, 2023).

The viscosity of FM is determined by its composition. A higher abundance of neutral arabinoxylans increases the viscosity and causes the shear-thinning behaviour of FM. Oppositely, a higher proportion of rhamnogalacturonans decrease the viscosity and FM exhibits Newtonian flow behaviour. This phenomenon shows that the pH of FM also affects the viscosity and fluidity. The lowest viscosity of FM appears at pH 2, while the viscosity of FM having pH 8 is three times more viscous. Therefore, the FM extracted from different cultivars may exhibit different viscoelastic properties. As a result, FM may form a real gel or viscoelastic fluid at the same concentration in solution (Biliaderis & Izydorczyk, 2006). This phenomenon was also observed later by Qian *et al.* (2012) who fractionated FM into a neutral fraction and an acidic fraction, followed by protein removal from these fractions. Non-fractionated FM had the highest intrinsic viscosity, followed by a neutral fraction, which exhibited pseudoplastic flow behaviour and an acidic fraction, which showed Newtonian flow behaviour. Since these scientific studies regarding compositional variability and their effects on FM properties are slightly outdated, this topic leaves space for relevant future research.

Nowadays, the application of FM in the food industry is rare due to the low availability of source feedstock, missing industrial-scale technologies for FM extraction and small awareness about FM and its properties. For the natural origin of FM, issues limiting its applicability can appear, including uncontrolled hydration rates, pH-dependent solubility, decrease of viscosity during storage or potential microbial contamination. However, these effects can be reduced by using appropriate extraction conditions or modifying the original structure of FM by crosslinking or esterification (Liu *et al.*, 2018).

As mentioned previously, FM has a form of soluble dietary fibre that may significantly impact the functioning of the human body. Dietary fibres can improve parameters related to health, such as blood cholesterol levels, lipid profiles and insulin sensitivity. They can also prevent chronic diseases, including obesity, diabetes, and colon cancer (Moczowska *et al.*, 2019). An interesting finding reported by Kuang *et al.* (2020) indicates that FM and insoluble fibre in flaxseed meal supplementation was responsible for body weight reduction in obese and overweight subjects. Authors have also suggested that the high content of FM in flaxseed meal may increase defecation, absorb water, increase intestinal volume, improve constipation, and thus lead to lost weight. It was also reported that FM presumably interacts with fat and sugars in the intestine, limiting their absorption. The authors observed the fats and sugars in the faeces of the subjects who ingested FM compared to those who did not (Kristensen *et al.*, 2012). FM was reported as an effective natural antioxidant, confirmed by several antioxidant assays, that may be capable of replacing synthetic antioxidants serving as food additives (Safdar *et al.*, 2020). In the comprehensive study related to antioxidant activity of FM, Vieira *et al.* (2019) identified the presence of caffeic acid, p-coumaric acid, and epicatechin, followed by ellagic, cinnamic and vanillic acids. They also found that increasing the extraction temperature (25 → 60 °C) raises the average content of total phenolic compounds and antioxidant capacity. Although FM seems to have clear antioxidant potential, food applications of stand-alone FM used primarily to increase the content of phenolic compounds have not yet been reported. However, it has been shown to induce accompanying beneficial effects in FM-enriched food products, as reported, for instance, in the paper from Bochnak-Niedźwiecka *et al.* (2022), where FM was used primarily for the stabilisation of beverages and its antioxidant and antiproliferative properties were also proven. The biological properties of FM ensemble a complex of features usable in food or health-related domains. Since the bioactivities of FM remain the popular subject of research studies, we can presume that they determine a beneficial complex of features usable in food or health-related domains.

Food and nutritional applications

Modifications of protein functions

Proteins and plant gums often share the same functional features, such as emulsifying or gelling properties, so the protein-gum mixtures may represent even stronger emulsifiers than standalone hydrocolloids or increase gelling properties. Several studies have reported showing the potential of FM as the modifier of protein functions. For example, Yang *et al.* (2023) used FM to modify pea protein followed by ultrasonic treatment where the results showed significantly improved physical and emulsifying properties of pea protein. In another research reported by Zhu *et al.* (2022) was applied FM / whey protein isolate (WPI) complex to stabilise gel-in-oil-water double emulsion. The double emulsion fabricated with 0.8 wt% FM and 0.5 wt% FM/WPI showed the highest stability and prevented the phase separation or oil-off phenomenon for 28 days. FM can also modify meat proteins. Myofibrillar emulsions and gels are often treated by phenolics, e.g., catechin, to inhibit their oxidation. However, catechin is responsible for the deterioration of the gel network of these products whereas the application of FM improved the weakened gelling properties of catechin-treated myofibrillar protein and enhanced gelled strength of derived products along with increased holding capacity and dynamic rheological properties (Jia *et al.*, 2022). One of the studies has suggested the applicability of FM in protein-rich hydrogel-based food systems as a stabilising, structuring and texturing agent. Moreover, the presence of FM at a concentration ≥ 0.75 wt% improved the homogeneity and interconnectivity of the whey protein strands in WPI-based cryo-hydrogels. Furthermore, the concentration of FM above 1 wt% may be suitable for constructing the gels with stabilising, structuring and texturing benefits for complex food matrices (Hellebois *et al.*, 2022). On the other hand, observed that the presence of proteins in FM may lead to deterioration of its properties, such as dull colour of gum solution, low dissolution rate in cold water and low storage stability (Liu *et al.*, 2018). Since these effects can limit the utilisation of FM, more studies related to interactions with proteins should be performed.

Complex coacervates and gels

Complex coacervation is a favourable microencapsulation technique highly usable in the pharmaceutical, agriculture and food industries. The interactions of oppositely charged polyelectrolytes in an aqueous solution are characteristic of the coacervation process (Timilsena *et al.*, 2019). FM was used together with polyphenol-adducted flaxseed protein isolate to

prepare effective complex coacervates usable for micro-encapsulation of flaxseed oil, thus showing a perspective of FM and other flaxseed components as an encapsulation shell material for oxygen-sensitive oils and other compounds (Pham *et al.*, 2020). Follow-up research showed that this type of complex coacervate remained intact in the gastric phase and delivered the flaxseed oil to the intestinal phase, thus positively affecting its bioavailability (Pham *et al.*, 2021). FM may also be used in the coacervate complexes to encapsulate flavourings. Encapsulation of vanillin/ β -cyclodextrin inclusion in rice bran protein/FM coacervates increased the vanillin thermostability and shelf life. Furthermore, prepared microcapsules can be used in dairy and bakery products (Hasanvand & Rafe, 2019). Besides coacervates, it has been reported studies dealing with use of FM within gel materials. FM was successfully applied to decrease the brittleness of oleogels based on candelilla wax showing the potential of FM to improve the plasticity of oleogels for food applications (Su *et al.*, 2022). Within another research study, FM promoted the semi-solid property of oleogels and possessed thermal resistance and structural recovery ability. The authors also suggest a better synergic effect with hydroxypropyl-methylcellulose to derive aqueous foams, cryogels and oleogels (Jiang *et al.*, 2022). It has been reported that FM might be employed to prepare ultra-lightweight organic or organic-inorganic hybrid bio-based aerogel. These aerogels can be used as a carrier of bioactive compounds and drugs or as a supporting material, a stimuli-responsive material, a reactor, or an oil absorber (Abdelmonem *et al.*, 2022). FM may prospectively provide beneficial techno-functional properties in cryogels (e.g., thermal stability and decrease of water disintegration rates) that are usable to incorporate bioactive compounds or probiotic living microorganisms (Hellebois *et al.*, 2024). Based on the reported studies, FM-containing coacervates and gels could be very useful as the stable carrier of drugs, bioactive compounds or living microorganisms so may become a perspective ingredient in the pharmaceutical industry and nutritional applications in the future.

Edible films and coatings

Edible films and coatings represent eco-friendly and functional food packaging alternatives and are made from food-grade biopolymers, including polysaccharides, proteins, and lipids derived from plants, animals, marine life sources or food processing by-products. Additionally, these materials are also usable to encapsulate bioactive agents (Kumar *et al.*, 2022). Up to now, many research studies have been published on the possible application of FM within edible films and coatings. For instance, applying composite coatings

based on FM and chitosan (CS) may represent an effective way to protect food products. According to one of the recent research study, it was shown that a three-layer FM/CS/FM coating containing eugenol and laurel essential had the long-term antibacterial and antioxidant properties thus delayed protein oxidation and microbial degradation (Yang *et al.*, 2022). Another study was focused on the effects of CS-FM nanofiber encapsulation composite that exhibit good antimicrobial and antioxidant properties. As the authors suggest, these nanofibres can encapsulate *Ziziphora clinopodioides* and sesame oils or other various food-packaging applications (Karami *et al.*, 2021). FM combined with chitosan also was applied to prepare a layer-by-layer electrostatic self-assembled coating exhibiting antibacterial activity and thus prolonging the shelf life of Mongolian cheese. CS-FM products may also serve as a carrier of peptides (Lu *et al.*, 2021). Polysaccharide-based nanoparticles developed by the complexation of FM and CS were used by Zheng *et al.* (2023) to encapsulate bioactive bighead carp peptide. These peptide-containing nanoparticles showed good thermal stability, provided good protective effect on peptide functionalities, and allowed its controlled release.

Beyond chitosan, FM can also be combined with other bioactive agents. For instance, betel leaf extract incorporated within FM-based film exhibits good barrier ability, antioxidant and antibacterial properties, allowing its use for food packaging (Manzoor *et al.*, 2023). The authors of one of the latest research study extracted FM from cold-pressed flaxseed oil by-products and created FM-based films that incorporated allyl isothiocyanate in free and nanoemulsion forms. Integrating allyl isothiocyanate improved the thermal and barrier properties of the film increasing the tensile strength. These films decreased the number of mesophilic, psychrophilic and coliform bacteria compared to untreated meat samples. Moreover, strong antimicrobial effects against pathogenic bacteria like *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* were observed (Kopuz *et al.*, 2023). Another study focused on preparing biodegradable film based on FM and pectin impregnated with calcium chloride and titanium dioxide usable for food packaging. This film may represent a UV-blocking layer with moisture resistance due to titanium dioxide giving white colouring improving the UV-blocking property while crosslinking with calcium chloride reduced the swelling index (Akhila *et al.*, 2023). FM may increase the stability of emulsions. This phenomenon was verified by preparing pea protein/FM coating to encapsulate algae oil droplets, leading to the improved resistance of the formed emulsion to aggregation and creaming (Sun *et al.*, 2022). The affinity and coating ability of FM with proteins may serve to develop a plant-based encapsulating and delivery system used to incorporate polyunsaturated fatty acids into vegetarian or vegan foods.

FM has also been described as an effective agent for encapsulating and delivering bioactive compounds in foods. Carvacol encapsulated into FM nanoparticles exhibited a bactericidal effect against *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes*, thus representing a promising strategy for food preservation (Cacciatore *et al.*, 2022). According to one of the latest studies, modified FM may be usable as a potent carrier for aimed drug delivery. Acrylic-grafted FM was successfully used as a pH-sensitive quercetin drug delivery system. Resistance of FM-quercetin delivery system to digestive fluids combined with cytotoxicity against colorectal cancer cell lines suggests a potential use of FM-based drug carriers for the targeted treatment of gastrointestinal cancers or other diseases (Kumar *et al.*, 2023). Non-specified Maillard reaction products of whey proteins and FM may stabilise the astaxanthin-loaded emulsion gel and significantly improve the bioaccessibility of astaxanthin. Therefore, this study also supports the potential of FM-protein conjugates for producing Maillard reaction products usable in effective delivery systems for lipids (Zhang *et al.*, 2021).

Although there is less awareness of FM than other polysaccharides like cellulose or starch, FM may represent an innovative component applicable within bioprotective materials. Combined with chitosan or other bioactive compounds allows for the creation of multifunctional composites or alternative bio-based packaging materials usable to preserve the quality and extend the shelf life of various foods.

Beneficial changes of gut microbiota composition

Prebiotics represent the substrates that are selectively utilised by host microorganisms conferring a health benefit (Salminen *et al.*, 2021). Several studies have confirmed the prebiotic function of FM complemented by the potential to change gut microbiota composition leading to positive health effects. For instance, Alhssan *et al.* (2023) observed the improvement in the viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in cold-stored kefir, suggesting FM's role as a prebiotic. Another study described an increased proportion of *Akkermansia* and *Bifidobacterium* within a high-fat diet supplemented by FM in mice. The flaxseed polysaccharide treatments controlled the aspects of metabolic syndrome induced by a high-fat diet, such as fat accumulation, glucose and triglyceride levels. Since improving lipid metabolism disorder, authors suggest that FM can be used as a prebiotic for preventing metabolic syndrome by modulation of gut microbiota (Yang *et al.*, 2020). Important findings were published in the work of Brahe *et al.* (2015), where authors reported that the intake of breakfast buns enriched by FM over 6 weeks by obese postmenopausal women led to the FM may change gut microbiota composition and

exhibit anti-diabetic effects via inhibition of α serum C-peptide, more effective insulin release and improved insulin sensitivity. Metagenome analysis confirmed changes in the abundance of thirty-three gut microbiota species, including a decrease in the relative abundance of eight *Faecalibacterium* species. Regulation of gut microbiota by FM may also induce an anti-obesity effect. In another relevant study, it was observed that the consumption of FM by obese rats lowered their body weight, body fats and total triglyceride. These effects could be attributed by decreasing Firmicutes/Bacteroidetes ratio and altering specific bacteria, such as the genus *Clostridium* (Luo *et al.*, 2018). As these studies have shown, for the ability to regulate gut microbiota leading to significant health-beneficial effects, FM may offer great potential in functional foods or prebiotic products. However, these studies are often challenging since they require meta-omics approaches combined with clinical trials causing a long way to the practical application of FM in this field.

Bio-functional and health-promoting agent in liquid foods

The functional properties and edibility of FM allow its direct application in foods, especially functional beverages. As a thickener and viscosity-modifying agent, FM may be used in polysaccharide-based products to circumvent swallowing problems by oropharyngeal dysphagia patients. Moreover, FM combined with modified starch and/or xanthan gum in liquid foods can lead to rheological synergism and may induce slower glucose release upon digestion (Vieira *et al.*, 2021). Adding FM to fermented/non-fermented whey drinks enhanced bacteria survivability, improved viscosity, and preserved consumer acceptance. Also, the antioxidant activity and free amino acids level was increased, improving the nutritional profile of the beverage (Łopusiewicz *et al.*, 2022). Another study suggested FM as a valuable functional additive improving the pro-health properties and structure of powdered drinks. They reported that FM stabilised the beverages after rehydration and represented a source of bioaccessible polyphenolic antioxidant and anticancer components (Bochnak-Niedźwiecka *et al.*, 2022). Moreover, it was also shown that addition of FM to soy protein drinks may increase its viscosity and protein particle size (Pang *et al.*, 2023). Therefore, as the viscosity-modifying agent, and for its dietary aspects, FM can be used as a valuable component of functional beverages.

Conclusions and future perspective

As reported in many studies of past decades, FM has a broad spectrum of functional properties and thus has been mainly considered as a versatile food fortifier for a long time. However, most recent scientific articles rather

focus on the unique attributes of FM and their utilizations in various food applications and special diet. The high affinity of FM to proteins allows for the modification or improvement of protein functions applicable in new protein-based products and foods. Other studies report on a promising use of FM within coacervates, films and coatings or as a structural component of novel gel materials. The biological activity of FM is determined mainly by antioxidant activity and provides a prebiotic function or other health-related benefits. Since the effects of certain genotypes and extraction variants on FM functioning are often known, further attention should be focused on developing and optimising approaches for incorporating FM in composites and food products for the highest efficiency or new functions. Also, for now, the limited availability of flaxseed sources generally slows its wider application. In contrast to some popular gums, which are often obtainable only from woody plants (e.g., locust bean, gum arabic, tragacanth or karaya gums) or their extraction and processing is complicated, the production of FM can be, in most cases a more economically viable way to obtain natural polysaccharides due to the factors represented by the sustainability of flaxseed production, simple extraction of FM and possible utilisation of flaxseed by- or waste- products, as the sources of FM. Hence, increasing awareness about the potential of FM is the key factor in its intensive use. Nevertheless, FM represents a promising biopolymer for food-related applications in the future, not only as an alternative to other plant gums but also as a specialised functional and bioactive agent.

Acknowledgments

This research was funded by (1) Ministry of Agriculture of the Czech Republic, grant number QK1910302 and (2) University of South Bohemia in České Budějovice, grant number GAJU033/2018/Z. Open access publishing facilitated by Jihočeská Univerzita v Českých Budejovicích, as part of the Wiley - CzechE-Lib agreement.

Author contributions

František Lorenc: Conceptualization; methodology; data curation; writing – original draft; writing – review and editing; supervision. **Markéta Jarošová:** Data curation; methodology; writing – review and editing; writing – original draft. **Jan Bedrníček:** Methodology; data curation; writing – original draft; writing – review and editing. **Pavel Smetana:** Data curation; methodology; writing – original draft; writing – review and editing. **Jan Bárta:** Supervision; methodology; data curation; writing – original draft; writing – review and editing.

Conflict of interest statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval

Ethics approval was not required for this research.

Data availability statement

No data have been used in the preparation of this paper.

References

- Abdelmonem, A.M., Zámbo, D., Rusch, P., Schlosser, A., Klepzig, L.F. & Bigall, N.C. (2022). Versatile route for multifunctional aerogels including flaxseed mucilage and nanocrystals. *Macromolecular Rapid Communications*, **43**, 2100794.
- This work deals with flaxseed-inspired organic-inorganic hybrid aerogels. This type of aerogel possessed ultra-low density, suggesting the possibility of using FM-based biopolymer to prepare low-cost and biocompatible functional, lightweight materials with a wide range of possible applications as drug or nutrient carriers, for oil absorption and other functions.
- Akhila, K., Ramakanth, D., Rao, L.L. & Gaikwad, K.K. (2023). UV-blocking biodegradable film based on flaxseed mucilage/pectin impregnated with titanium dioxide and calcium chloride for food packaging applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, **239**, 124335.
- Alhssan, E., Ercan, S.S. & Bozkurt, H. (2023). Effect of flaxseed mucilage and gum arabic on probiotic survival and quality of kefir during cold storage. *Food*, **12**, 662.
- Biliaderis, C.G. & Izidorczyk, M.S. (2006). *Functional Food Carbohydrates*. Pp. 588. Boca Raton, USA: CRC Press.
- Bochnak-Niedźwiecka, J., Szymanowska, U. & Świeca, M. (2022). The protein-rich powdered beverages stabilized with flax seeds gum - antioxidant and antiproliferative properties of the potentially bioaccessible fraction. *Applied Sciences*, **12**, 7159.
- Brahe, L.K., Le Chatelier, E., Prifti, E. *et al.* (2015). Dietary modulation of the gut microbiota - a randomised controlled trial in obese postmenopausal women. *The British Journal of Nutrition*, **114**, 406–417.
- Cacciatore, F.A., Maders, C., Alexandre, B., Barreto Pinilla, C.M., Brandelli, A. & da Silva Malheiros, P. (2022). Carvacrol encapsulation into nanoparticles produced from chia and flaxseed mucilage: characterization, stability and antimicrobial activity against salmonella and listeria monocytogenes. *Food Microbiology*, **108**, 104116.
- Cakmak, H., Ilyasoglu-Buyukkesteli, H., Sogut, E., Ozyurt, V.H., Gumus-Bonacina, C.E. & Simsek, S. (2023). A review on recent advances of plant mucilages and their applications in food industry: extraction, functional properties and health benefits. *Food Hydrocoll Health*, **3**, 100131.
- Cakmak, H., Mama, M. & Yilmaz, S.M. (2021). Determination of the effects of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) sprouts powder on the gluten-free cupcake quality. *Journal of Food Processing & Preservation*, **45**, e15435.
- Chang, Y., Li, Y., Miao, Q., Jiang, H. & Gao, X. (2017). Rheological properties of six plant-based seed gums. *American Journal of Analytical Chemistry*, **8**, 690–707.
- Chen, X., Gao, J., Cao, G. *et al.* (2023). The properties of potato gluten-free doughs: comparative and combined effects of propylene glycol alginate and hydroxypropyl methyl cellulose or flaxseed gum. *International Journal of Food Engineering*, **19**, 61–71.
- Cui, W., Mazza, G., Oomah, B.D. & Biliaderis, C.G. (1994). Optimization of an aqueous extraction process for flaxseed gum by response surface methodology. *LWT*, **27**, 363–369.
- Drozłowska, E., Bartkowiak, A. & Lopusiewicz, L. (2020). Characterization of flaxseed oil bimodal emulsions prepared with flaxseed oil cake extract applied as a natural emulsifying agent. *Polymers*, **12**, 2207.
- Fabre, J.-F., Lacroix, E., Valentin, R. & Mouloungui, Z. (2015). Ultrasonication as a highly efficient method of flaxseed mucilage extraction. *Industrial Crops and Products*, **65**, 354–360.
- Guo, Q., Zhu, X., Zhen, W. *et al.* (2021). Rheological properties and stabilizing effects of high-temperature extracted flaxseed gum on oil/water emulsion systems. *Food Hydrocolloids*, **112**, 106289.
- Hasanvand, E. & Rafe, A. (2019). Development of vanillin/ β -cyclodextrin inclusion microcapsules using flax seed gum-rice bran protein complex coacervates. *International Journal of Biological Macromolecules*, **131**, 60–66.
- Hellebois, T., Addiego, F., Gaiani, C., Shaplov, A.S. & Soukoulis, C. (2024). Unravelling the functionality of anionic and non-ionic plant seed gums on milk protein cryogels conveying Lactiaceibacillus rhamnosus GG. *Carbohydrate Polymers*, **323**, 121376.
- Hellebois, T., Fortuin, J., Xu, X., Shaplov, A.S., Gaiani, C. & Soukoulis, C. (2021). Structure conformation, physicochemical and rheological properties of flaxseed gums extracted under alkaline and acidic conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, **192**, 1217–1230.
- Hellebois, T., Gaiani, C., Cambier, S., Noo, A. & Soukoulis, C. (2022). Exploration of the co-structuring and stabilising role of flaxseed gum in whey protein isolate based cryo-hydrogels. *Carbohydrate Polymers*, **289**, 119424.
- Hu, Y., Shim, Y.Y. & Reaney, M.J.T. (2020). Flaxseed gum solution functional properties. *Food*, **9**, 681.
- Huang, X., Kakuda, Y. & Cui, W. (2001). Hydrocolloids in emulsions: particle size distribution and interfacial activity. *Food Hydrocolloids*, **15**, 533–542.
- Jia, N., Lin, S., Zhang, F., Zheng, D. & Liu, D. (2022). Improved effect of flaxseed gum on the weakened gelling properties of myofibrillar protein induced by catechin. *Food Chemistry*, **372**, 131136.
- Jiang, Q., Li, P., Ji, M. *et al.* (2022). Synergetic effects of water-soluble polysaccharides for intensifying performances of oleogels fabricated by oil-absorbing cryogels. *Food Chemistry*, **372**, 131357.
- Kajla, P., Sharma, A. & Sood, D.R. (2015). Flaxseed—a potential functional food source. *Journal of Food Science and Technology*, **52**, 1857–1871.
- Karami, N., Kamkar, A., Shahbazi, Y. & Misaghi, A. (2021). Electrospinning of double-layer chitosan-flaxseed mucilage nanofibers for sustained release of Ziziphora clinopodioides essential oil and sesame oil. *LWT*, **140**, 110812.
- 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.
- Khare, B., Sangwan, V. & Rani, V. (2021). Influence of sprouting on proximate composition, dietary fiber, nutrient availability, antinutrient, and antioxidant activity of flaxseed varieties. *Journal of Food Processing & Preservation*, **45**, e15344.
- Kopuz, S., Akman, P.K., Tekin-Cakmak, Z.H. & Karasu, S. (2023). Development and characterization of antimicrobial films from gums obtained from cold-pressed flaxseed oil by-product. *Polymer Bulletin*, **81**, 1767–1787.
- Kristensen, M., Jensen, M.G., Aarestrup, J. *et al.* (2012). Flaxseed dietary fibers lower cholesterol and increase fecal fat excretion, but magnitude of effect depend on food type. *Nutrition and Metabolism*, **9**, 8.
- Kuang, X., Kong, Y., Hu, X. *et al.* (2020). Defatted flaxseed flour improves weight loss and lipid profile in overweight and obese

- adults: a randomized controlled trial. *Food & Function*, **11**, 8237–8247.
- Kumar, B., Panday, S.K. & Kumar, P. (2023). Synthesis of pH-sensitive nanocarrier-based acrylic acid-grafted-flaxseed gum for quercetin delivery for anti-cancer application. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, **30**, 100370.
- Kumar, L., Ramakanth, D., Akhila, K. & Gaikwad, K.K. (2022). Edible films and coatings for food packaging applications: a review. *Environmental Chemistry Letters*, **20**, 875–900.
- 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 and Technology*, **75**, 146–157.
- Lopusiewicz, L., Dmytrów, I., Mituniewicz-Malek, A. et al. (2022). Natural gum from flaxseed by-product as a potential stabilizing and thickening agent for acid whey fermented beverages. *Applied Sciences*, **12**, 10281.
- Lorenc, F., Jarošová, M., Bedrníček, J., Smetana, P. & Bárta, J. (2022). Structural characterization and functional properties of flaxseed hydrocolloids and their application. *Food*, **11**, 2304.
- Lu, Z., Saldaña, M.D.A., Jin, Z. et al. (2021). Layer-by-layer electrostatic self-assembled coatings based on flaxseed gum and chitosan for Mongolian cheese preservation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **73**, 102785.
- Luo, J., Li, Y., Mai, Y. et al. (2018). Flaxseed gum reduces body weight by regulating gut microbiota. *Journal of Functional Foods*, **47**, 136–142.
- This research comprises the clinical study confirming that flaxseed consumption lower body weights, body fats and total triglyceride of rats. This effects is probably derived by regulating gut microbiota, leading to appetite suppression.
- Manzoor, A., Ahmad, S. & Yousuf, B. (2023). Development and characterization of edible films based on flaxseed gum incorporated with Piper betle extract. *International Journal of Biological Macromolecules*, **245**, 125562.
- Moczkowska, M., Karp, S., Niu, Y. & Kurek, M.A. (2019). Enzymatic, enzymatic-ultrasonic and alkaline extraction of soluble dietary fibre from flaxseed—a physicochemical approach. *Food Hydrocolloids*, **90**, 105–112.
- Pang, Z., Tong, F., Jiang, S., Chen, C. & Liu, X. (2023). Particle characteristics and tribo-rheological properties of soy protein isolate (SPI) dispersions: effect of heating and incorporation of flaxseed gum. *International Journal of Biological Macromolecules*, **232**, 123455.
- Pham, L.B., Wang, B., Zisu, B., Truong, T. & Adhikari, B. (2020). Microencapsulation of flaxseed oil using polyphenol-adsorbed flaxseed protein isolate-flaxseed gum complex coacervates. *Food Hydrocolloids*, **107**, 105944.
- Pham, L.B., Wang, B., Zisu, B., Truong, T. & Adhikari, B. (2021). In-vitro digestion of flaxseed oil encapsulated in phenolic compound adsorbed flaxseed protein isolate-flaxseed gum complex coacervates. *Food Hydrocolloids*, **112**, 106325.
- Puligundla, P. & Lim, S. (2022). A review of extraction techniques and food applications of flaxseed mucilage. *Food*, **11**, 1677.
- Qian, K.Y., Cui, S.W., Wu, Y. & Goff, H.D. (2012). Flaxseed gum from flaxseed hulls: extraction, fractionation, and characterization. *Food Hydrocolloids*, **28**, 275–283.
- Ren, X., Meng, X., Zhang, Z., Du, H., Li, T. & Wang, N. (2023). Effects of ultrasound-assisted extraction on structure and rheological properties of flaxseed gum. *Gels*, **9**, 318.
- Safdar, B., Pang, Z., Liu, X. et al. (2019). Flaxseed gum: extraction, bioactive composition, structural characterization, and its potential antioxidant activity. *Journal of Food Biochemistry*, **43**, e13014.
- Safdar, B., Zhihua, P., Xinqi, L., Jatoi, M.A. & Rashid, M.T. (2020). Influence of different extraction techniques on recovery, purity, antioxidant activities, and microstructure of flaxseed gum. *Journal of Food Science*, **85**, 3168–3182.
- Salminen, S., Collado, M.C., Endo, A. et al. (2021). The international scientific association of probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, **18**, 649–667.
- Shim, Y.Y., Kim, J.H., Cho, J.Y. & Reaney, M.J.T. (2022). Health benefits of flaxseed and its peptides (linusorbs). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–20. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2119363>
- Su, C., Li, Y., Zhu, J. et al. (2022). Effect of flaxseed gum on the brittleness of oleogels based on candelilla wax. *RSC Advances*, **12**, 30734–30741.
- Sun, M., Li, X., McClements, D.J. et al. (2022). Reducing off-flavors in plant-based omega-3 oil emulsions using interfacial engineering: coating algae oil droplets with pea protein/flaxseed gum. *Food Hydrocolloids*, **122**, 107069.
- Suri, K., Singh, B., Kaur, A., Yadav, M.P. & Singh, N. (2020). Influence of microwave roasting on chemical composition, oxidative stability and fatty acid composition of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) oil. *Food Chemistry*, **326**, 126974.
- Timilsena, Y.P., Akanbi, T.O., Khalid, N., Adhikari, B. & Barrow, C.J. (2019). Complex coacervation: principles, mechanisms and applications in microencapsulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, **121**, 1276–1286.
- Troshchynska, Y., Bleha, R., Synytsya, A. & Štětina, J. (2022). Chemical composition and rheological properties of seed mucilages of various yellow- and brown-seeded flax (*Linum usitatissimum* L.) cultivars. *Polymers*, **14**, 2040.
- Vieira, J.M., Andrade, C.C.P., Santos, T.P. et al. (2021). Flaxseed gum-biopolymers interactions driving rheological behaviour of oropharyngeal dysphagia-oriented products. *Food Hydrocolloids*, **111**, 106257.
- This article reports the potential use of FM as a thickener and viscosity-modifying agent in polysaccharide-based liquid food suitable for oropharyngeal dysphagia patients suffering from circumventing swallowing problems. Authors also observed improved rheological synergism inducing slower glucose release upon digestion in drinks comprised of FM, starch and xanthan gum.
- 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.
- This study describes the effects of extraction temperature on the composition and rheological properties of FM. Moreover, it brings valuable findings about the effects of the extraction temperatures on the presence and abundance of phenolic compounds and related antioxidant capacity confirming the crucial influence of extraction conditions on the functional and biological properties of FM.
- Wang, Y., Li, D., Wang, L.-J., Li, S.-J. & Adhikari, B. (2010). Effects of drying methods on the functional properties of flaxseed gum powders. *Carbohydrate Polymers*, **81**, 128–133.
- Warr, J., Michaud, P., Picton, L. et al. (2003). Large-scale purification of water-soluble polysaccharides from flaxseed mucilage, and isolation of a new anionic polymer. *Chromatographia*, **58**, 331–335.
- Yang, C., Xu, Z., Deng, Q., Huang, Q., Wang, X. & Huang, F. (2020). Beneficial effects of flaxseed polysaccharides on metabolic syndrome via gut microbiota in high-fat diet fed mice. *Food Research International*, **131**, 108994.
- Yang, H., Li, Q., Xu, Z. et al. (2022). Preparation of three-layer flaxseed gum/chitosan/flaxseed gum composite coatings with sustained-release properties and their excellent protective effect on myofibril protein of rainbow trout. *International Journal of Biological Macromolecules*, **194**, 510–520.
- Yang, J., Huang, F., Huang, Q. et al. (2023). Physical and emulsifying properties of pea protein: influence of combined physical modification by flaxseed gum and ultrasonic treatment. *Food Science and Human Wellness*, **12**, 431–441.

Zhang, Z., Chen, W., Zhou, X. *et al.* (2021). Astaxanthin-loaded emulsion gels stabilized by Maillard reaction products of whey protein and flaxseed gum: physicochemical characterization and in vitro digestibility. *Food Research International*, **144**, 110321. Within this research was studied the stabilising effect of incorporation of Maillard reaction products of FM and whey protein on the astaxanthin-loaded emulsion gels. Emulsion treated by these products improved the bioaccessibility of contained astaxanthin. This study also reports the positive effect of ultrasound treatment on Maillard reaction products.

Zheng, C., Chen, M., Chen, Y. *et al.* (2023). Preparation of polysaccharide-based nanoparticles by chitosan and flaxseed gum polyelectrolyte complexation as carriers for bighead carp (*Aristichthys nobilis*) peptide delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, **249**, 126121.

Zhu, Q., Wei, W., Zhang, L. *et al.* (2022). Fabrication and characterization of gel-in-oil-water (G/O/W) double emulsion stabilized by flaxseed gum/whey protein isolate complexes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **650**, 129566.

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

V předchozích kapitolách této práce byl zdůrazňován vysoký podíl nutričně hodnotných a biologicky aktivních složek, jež se ve lněném semenu vyskytují. 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 (Obr. 14) 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 zhášení 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.



Obr. 14: Fotografický záznam polního experimentu zachycující vývoj rostlin lnu setého (zleva doprava) v rámci jejich vegetačního období (květen-srpen)

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 vykázaly velké rozpětí hodnot u většiny zkoumaných parametrů (Tab. 9 a Tab. 10), 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.

Tab. 9: Rozmezí hodnot výnosových parametrů a základního chemického složení semen šesti odrůd lnu setého získaných v rámci tříletého pěstitelského experimentu

| výnos (t/ha) | HTS (g) | tuky (% č.h.) | dusíkaté l. (% č.h.) | popeloviny (% č.h.) | sacharidy (% č.h.) | Voda (% č.h.) |
|-----------------|------------|------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|------------------|
| 1,3-3,7 | 5,3-7,0 | 34,2-40,7 | 15,8-21,5 | 3,3-3,8 | 32,0-35,6 | 6,7-5,9 |

HTS = hmotnost tisíce semen, č.h. = čerstvá hmota, dusíkaté l. = dusíkaté látky

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. 10). 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 zjištěno, 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. 10: 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.

Kompletní informace a zdroje vztahující se k dané problematice a výše uvedené anotaci jsou uvedeny v publikaci:

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.



Comparison of Yield Characteristics, Chemical Composition, Lignans Content and Antioxidant Potential of Experimentally Grown Six Linseed (*Linum usitatissimum* L.) Cultivars

Markéta Jarošová¹ · František Lorenc² · Jan Bedrníček² · Eva Petrášková² · Marie Bjelková³ · Veronika Bártová¹ · Eva Jarošová¹ · Zbyněk Zdráhal⁴ · Jan Kyselka⁵ · Pavel Smetana² · Jaromír Kadlec² · Adéla Stupková¹ · Jan Bárta¹

Accepted: 23 December 2023 / Published online: 18 January 2024
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2024

Abstract

Linseed represents a rich source of nutritional, functional and health-beneficial compounds. Nevertheless, the chemical composition and content of bioactive compounds may be quite variable and potentially affected by various factors, including genotype and the environment. In this study, the proximate chemical composition, lignans content and antioxidant potential of six experimentally grown linseed cultivars were assessed and compared. A diagonal cultivation trial in the University of South Bohemia Experimental Station in České Budějovice, Czech Republic, was established in three subsequent growing seasons (2018, 2019 and 2020). The results showed that the cultivar and growing conditions influenced most studied parameters. The lack of precipitation in May and June 2019 negatively affected the seed yield and the level of secoisolariciresinol diglucoside but did not decrease the crude protein content, which was negatively related to the oil content. The newly developed method for lignans analysis allowed the identification and quantification of secoisolariciresinol diglucoside and matairesinol. Their content correlated positively with the total polyphenol content and antioxidant assays (DPPH and ABTS radical scavenging activity), indicating the significant contribution to the biofunctional properties of linseed. On the other hand, we did not detect minor linseed lignans, pinoresinol and lariciresinol. The results of this study showed the importance of cultivar and growing conditions factors on the linseed chemical composition and the lignans content, determining its nutritional and medicinal properties.

Keywords *Linum usitatissimum* L. · Flaxseed · Linseed · Chemical composition · Lignans · Secoisolariciresinol diglucoside

Markéta Jarošová and František Lorenc contributed equally to this work.

✉ František Lorenc
lorencf@fzt.jcu.cz

¹ Department of Plant Production, Faculty of Agriculture and Technology, University of South Bohemia in České Budějovice, Na Sádkách 1780, České Budějovice 370 05, Czech Republic

² Department of Food Biotechnologies and Agricultural Products' Quality, Faculty of Agriculture and Technology, University of South Bohemia in České Budějovice, Studentská, České Budějovice 1668, 370 05, Czech Republic

³ Department of Legumes and Technical Crops, Agritec Plant Research, Ltd. Zemědělská 2520, Šumperk 787 01, Czech Republic

⁴ Mendel Centre of Plant Genomics and Proteomics, Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno 625 00, Czech Republic

⁵ Department of Dairy, Fat and Cosmetics, Faculty of Food and Biochemical Technology Prague, University of Chemistry and Technology, Technická 5, Prague 166 28, Czech Republic

Introduction

The flax (*Linum usitatissimum* L.) is a traditional and one of the oldest crops grown by humans since ancient times as a fibre or oilseed crop. A seed of oilseed flax (linseed) is composed of fat (37–41%), total dietary fibre (28–29%), protein (20%), moisture (6.5–7.7%), and ash (2.4–3.4%) [1]. Some of its constituents represent valuable nutrients and bioactive compounds. The high nutrient profile of linseed is determined mainly by high-quality oil with a balanced ratio of omega-3 and omega-6 essential fatty acids [2], proteins with an amino acid profile similar to soybean protein [3] and the high content of soluble and insoluble fibres [4]. The beneficial linseed bioactive compounds are represented by polyunsaturated fatty acids, lignans, proteins, cyclic peptides and dietary fibres [5]. These compounds may benefit human health, especially by reducing risks associated with heart disease, cancer, diabetes or stroke [6].

The linseed contains three different types of phenolic compounds – phenolic acids, flavonoids and prevailing lignans [2]. Lignans are macromolecular diphenolic compounds formed by oxidative coupling of two cinnamyl alcohol or cinnamic acid residues, linked by β carbon by their side chains [7]. In linseed, they occur in the form of oligomeric complexes composed by a framework of secoisolariciresinol diglucoside (SDG) interconnected through 3-hydroxy-3-methyl glutaric acid and complexed with *p*-coumaric and ferulic acids into lignan macromolecular structure [8]. According to the literature, SDG is a significantly predominant lignan in linseed with a relative abundance of 95% and is formed by glycosylation of secoisolariciresinol (SECO). The minor lignans are represented by matairesinol (MATA), lariciresinol (LARI) and pinoresinol (PINO) [9]. Compared to the SDG and SECO, literature describing the presence of minor lignans is slightly outdated [10, 11]. Moreover, there is no evidence for the distribution of these compounds among different linseed cultivars in relation to agroecological conditions. Linseed lignans exhibit a wide scale of biological activities (e.g., antioxidant, anticancer, antimicrobial, anticholesterol, antidiabetic, anti-inflammatory, estrogenic or antiestrogenic and antidepressant properties) [12]. They are also precursors for gut microbiota-derived mammalian phytoestrogens enterolignans (enterodiols and enterolactone), possessing mainly anti-inflammatory and apoptotic activities [13]. The content of lignans in linseed is extraordinary and ranges between 9 and 30 mg per gram of seed, which is 95–800 times over other plant sources, followed by sesame seeds and rye bran [14]. SDG content can vary according to the genotype of linseed and environment, while the effect of cultivar is appointed to be more significant in the relevant studies [15–17]. Garros et al. [16] reported that the antioxidant activities of linseed

significantly correlated with the content of SDG and other phenolic compounds. Besides genotype, specific environmental conditions may also affect the lignan content. In a recent study, Zare et al. [18] observed that moisture stress was responsible for an increased lignan content in brown-seeded cultivars.

Along with lignans, also other parameters of linseed may be affected by various factors. The seed yield and the protein content can vary due to the environment rather than genotype, whereas the environment is responsible for the higher variance of the oil content [19]. Zhang et al. [15] found that oil and fatty acid composition is determined by genotype, environment, and their combination. Yield characteristics of flax can be affected by production practices. Rossi et al. [20] have recently suggested that milder and wetter conditions may be more favourable for linseed cultivation and lead to a higher seed yield and oil content. Yield characteristics were also reported to be significantly influenced by high temperature and soil type [21].

Since the genotype and environmental effects on the linseed properties have been studied, complex works focusing on all these relationships in a wider context are scarce, because most of the studies mentioned above focused only on certain aspects of linseed quality. In this study, we determine and compare the effects of the cultivar and weather on the yield characteristics, proximate chemical composition, antioxidant potential and especially lignans content (namely SDG, SECO, LARI, PINO and MATA) of six different linseed cultivars. Furthermore, the relationships between the studied parameters were also evaluated.

Materials and Methods

The Materials and Methods section is presented in Supplementary material 1.

Results and Discussion

Cultivation Conditions and Yield Characteristics

The soil of the cultivation trial site has been characterized as a brown, acidic (pH 6.1 in 2018, 5.0 in 2019, 5.7 in 2020), loamy sand Cambisol. The agrochemical soil analyses showed a moderate content of nutrients, which varied between the cultivation seasons (Table S3). Based on the meteorological data shown in Fig. S1, the weather conditions were characterized by a similarity of temperature within studied years and its normal development during the growing seasons (April → August) with the seasonal temperature sums: 89.1 °C in 2018, 84.3 °C in 2019 and 77.1 °C

in 2020. On the other hand, the substantial differences in the precipitation conditions between growing seasons (precipitation sums: 302.2 mm in 2018, 191.1 mm in 2019 and 428 mm in 2020) were obvious and possibly affected the chemical composition of linseeds, as discussed subsequently in the manuscript.

Our results showed the differences in the average seed yield (2.91 t/ha in 2018, 1.42 t/ha in 2019 and 2.47 t/ha in 2020), whereas the significantly lower yield in 2019 was observed by all cultivars (Table 1). The low seed yield could have been affected by the relative drought in that year, especially in May and June, representing the vegetative and flowering periods of flax. Anastasiu et al. [22] described May and June as a critical period for the moisture need and uptake crucial for linseed development and the subsequent high seed yield in the moderate climate. A negative effect of water shortage in the spring season on the seed yield was also confirmed in a more recent study [23]. Oppositely, the higher precipitation sum in 2020 was potentially responsible for the lower seed yield compared to 2018. The significant effect of the environmental conditions and agronomic practices was also reported in the recent study by Rossi et al. [20]. The authors also found that abiotic stress in the form of low rainfall and high temperature negatively affects the seed yield, whereas these findings also correspond with the older study performed by Casa et al. [21]. In our research, differences between cultivars in seed yield were only observed between selected cultivars in 2018 and 2020, whereas in the year 2019 they were not significant. This finding is partly coherent with the results reported by Saastamoinen et al. [19], who states there were no significant differences in yield between ten linseed cultivars. As shown in Table 1, the thousand-seed weights ranged from 5.3 to 7.0, which seemed to be affected more by the cultivar than by the seed yield since we observed the differences between cultivars in every growing year, and oppositely, the inter-year variability within three cultivars was insignificant. Correspondingly, the enormous differences in thousand-seed weights of 16 cultivars ranging from 3.5 to 11.5 g were reported by Diedrichsen et al. [24]. The significant differences in

thousand-seed weight between ten genotypes were also found by Kaya et al. [25].

Both yield parameters were positively correlated. The beneficial effect of thousand-seed weight on seed yield was also observed by Rossi et al. [20]. Accordingly, brown-seeded cultivars (Agram, Libra, Flanders) exhibited a higher yield and thousand-seed weight than yellow-seeded cultivars (Amon, Agriol, Raciol), indicating a potential positive relation of colour and yield parameters. However, more cultivars should be involved for a more trustable comparison of yield and other parameters assessed within this study related to linseed colour. The obtained results confirmed the significant impact of the environment and genotype on the linseed yield characteristics. While the seed yield seemed to be mainly affected by the weather, the thousand-seed weight parameter depended rather on genotype. Therefore, cultivar selection, as the influenceable factor, may represent an important aspect of yield optimization.

Proximate Chemical Composition

The proximate compositions of linseeds of each cultivar obtained in three growing years are presented in Table 2. The reported data show particular differences in oil and crude protein content among cultivars or years. On the other side, no differences between studied cultivars or growing seasons in the ash and carbohydrates content were observed.

The interesting phenomenon was observed within the crude protein content ranging from 15.8 to 21.5% in fresh weight (FW), where significantly lower values were observed at four cultivars (two cultivars had insignificantly lower content) in the season 2018, compared to years 2019 and 2020, exhibiting deviated precipitation in a critical period of linseed growth. This finding may potentially show the positive effect of a seasonal precipitation shortage or surplus on the crude protein content. The oil content ranged from 34.2 to 40.7% in FW, which is slightly less than the oil content of six Chinese cultivars (36.7 to 41.9% FW) reported by Zhang et al. [26]. Saastamoinen et al. [19] stated the differences between oilseed cultivars in oil, ranging from 42.5 to 48.8% in dry matter (DM) and protein content

Table 1 Yield and thousand-seed weight of different linseed cultivars cultivated in three subsequent growing seasons

| Parameter | Year | Linseed cultivar | | | | | |
|--------------------------|------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| | | Amon | Agram | Agriol | Raciol | Libra | Flanders |
| Seed yield (t/ha)* | 2018 | 2.48 ± 0.10 ^{Ca} | 2.69 ± 0.20 ^{BCa} | 2.83 ± 0.20 ^{Bca} | 2.82 ± 0.23 ^{Bca} | 3.66 ± 0.30 ^{Aa} | 2.97 ± 0.08 ^{Ba} |
| | 2019 | 1.41 ± 0.08 ^b | 1.46 ± 0.14 ^c | 1.43 ± 0.12 ^c | 1.43 ± 0.21 ^b | 1.44 ± 0.07 ^c | 1.34 ± 0.08 ^b |
| | 2020 | 2.34 ± 0.27 ^{Ba} | 2.14 ± 0.07 ^{Bb} | 2.36 ± 0.12 ^{Bb} | 2.74 ± 0.23 ^{Aa} | 2.83 ± 0.17 ^{Ab} | 2.38 ± 0.02 ^{Aba} |
| Thousand-seed weight (g) | 2018 | 5.49 ± 0.13 ^D | 7.00 ± 0.08 ^{Aa} | 6.08 ± 0.09 ^{BC} | 5.83 ± 0.02 ^{CD} | 6.67 ± 0.10 ^{Ab} | 6.04 ± 0.07 ^{Cda} |
| | 2019 | 5.33 ± 0.27 ^B | 6.39 ± 0.19 ^{Ab} | 5.61 ± 0.52 ^B | 5.50 ± 0.17 ^B | 5.75 ± 0.29 ^{Bb} | 5.50 ± 0.17 ^{Bb} |
| | 2020 | 5.90 ± 0.08 ^C | 6.89 ± 0.12 ^{Aa} | 6.29 ± 0.09 ^{BC} | 6.09 ± 0.10 ^C | 6.64 ± 0.11 ^{Ab} | 6.22 ± 0.14 ^{Bca} |

*Seed yield is standardized to 8% moisture content; ^{A–D} values with different superscripts (cultivars) within a row differ significantly ($p < 0.05$); ^{a–c} values with different superscripts (years) within a column differ significantly ($p < 0.05$); $n = 5$

Table 2 Proximate chemical composition of different linseed cultivars cultivated in three subsequent growing seasons

| Component (% in FW) | Year | Linseed cultivar | | | | | |
|---------------------|------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| | | Amon | Agram | Agriol | Raciol | Libra | Flanders |
| Fat | 2018 | 37.54 ± 1.33 ^B | 39.02 ± 0.70 ^{AB} | 37.71 ± 0.82 ^B | 38.26 ± 0.22 ^{Ahu} | 40.71 ± 1.94 ^A | 38.67 ± 2.04 ^{AB} |
| | 2019 | 36.03 ± 1.11 ^{AB} | 36.71 ± 0.41 ^{AB} | 36.03 ± 0.51 ^{AB} | 34.18 ± 0.68 ^{Bb} | 37.43 ± 0.57 ^A | 34.86 ± 1.40 ^{AB} |
| | 2020 | 36.37 ± 0.83 | 36.99 ± 0.81 | 36.91 ± 0.54 | 35.53 ± 1.75 th | 37.41 ± 1.86 | 35.57 ± 1.30 |
| Crude protein | 2018 | 17.77 ± 1.18 ^b | 16.89 ± 1.91 ^b | 18.14 ± 0.59 | 17.18 ± 1.06 ^b | 17.66 ± 1.02 ^b | 15.81 ± 1.08 ^b |
| | 2019 | 19.83 ± 0.59 th | 20.53 ± 1.36 ^a | 19.87 ± 1.48 | 21.01 ± 0.62 ^a | 20.61 ± 0.92 ^a | 20.39 ± 1.32 ^a |
| | 2020 | 21.25 ± 0.33 ^a | 20.93 ± 0.59 ^a | 20.29 ± 0.49 | 21.47 ± 0.79 ^a | 21.25 ± 1.00 ^a | 20.24 ± 0.76 ^a |
| Ash | 2018 | 3.48 ± 0.06 | 3.38 ± 0.04 | 3.41 ± 0.12 | 3.50 ± 0.10 | 3.41 ± 0.10 | 3.45 ± 0.13 |
| | 2019 | 3.34 ± 0.05 | 3.38 ± 0.14 | 3.31 ± 0.06 | 3.40 ± 0.07 | 3.51 ± 0.04 | 3.44 ± 0.17 |
| | 2020 | 3.59 ± 0.07 | 3.50 ± 0.04 | 3.61 ± 0.12 | 3.75 ± 0.05 | 3.67 ± 0.06 | 3.64 ± 0.09 |
| Moisture | 2018 | 6.27 ± 0.14 ^{AB} | 6.69 ± 0.24 ^A | 6.53 ± 0.07 ^{Aa} | 6.33 ± 0.05 ^{AB} | 5.98 ± 0.10 ^B | 6.48 ± 0.21 ^{Aa} |
| | 2019 | 6.01 ± 0.05 | 6.32 ± 0.09 | 5.99 ± 0.07 ^b | 6.08 ± 0.17 | 5.88 ± 0.12 | 6.21 ± 0.15 ^a |
| | 2020 | 5.75 ± 0.13 ^B | 6.47 ± 0.71 ^A | 5.55 ± 0.05 ^{Bb} | 5.87 ± 0.19 ^B | 5.76 ± 0.20 ^B | 5.59 ± 0.20 ^{Bb} |
| Carbohydrates* | 2018 | 34.94 ± 1.15 | 34.03 ± 2.02 | 34.21 ± 0.55 | 34.73 ± 0.87 | 32.23 ± 2.50 | 35.59 ± 1.33 |
| | 2019 | 34.79 ± 1.29 | 33.07 ± 1.36 | 34.80 ± 1.56 | 35.32 ± 1.21 | 32.58 ± 0.71 | 35.10 ± 1.93 |
| | 2020 | 33.04 ± 0.80 | 32.11 ± 1.32 | 33.64 ± 0.69 | 33.39 ± 2.63 | 31.92 ± 0.94 | 34.97 ± 2.02 |

FW: fresh weight; *calculated value (100 - % fat - % crude protein - % moisture - % ash); ^{A–B} values with different superscripts (cultivars) within a row differ significantly ($p < 0.05$); ^{a–h} values with different superscripts (years) within a column differ significantly ($p < 0.05$); $n = 5$

(19.4–25.2% DM). Unlike the study reporting no significant differences in oil content (37.1–39.2% DM) between six cultivars Čeh et al. [23], we found differences between some cultivars in 2018 and 2019. The cultivar Libra exhibited the highest content (38.5% FW on average) within three years. In our research, we observed that the oil content was determined by the genotype and the environment but not by their combination. The possible significant effect of the genotype on the oil content may be determined by the linseed colour since the oil content of brown-seeded cultivars was significantly higher compared to yellow-seeded cultivars. Related to the lack of precipitation in 2019, we found that the oil content in the linseed grown in that season was the lowest by all cultivars except Libra. This finding corresponds to the study by Anastasiu et al. [22] since they also observed the lowest oil content in six linseed cultivars (from seven cultivars in total) grown in Romania during only one year (from nine years in total), exhibiting extreme drought in May and June.

We observed a negative correlation between oil and crude protein content, whereas both parameters depended on the year (Table S3). This relationship was confirmed by several studies [19, 27, 28] and indicated that a higher amount of oil usually leads to a lower protein content and vice versa.

Analysis of Lignans, Total Phenolic Content and Antioxidant Activities

The original method combining HPLC separation and triple quadrupole MS/MS in dynamic MRM mode was newly developed and validated for a target analysis of linseed lignans (Supplementary material 1). Table 3 shows the content

of lignans presented in linseed samples after alkaline and acidic hydrolysis. SDG and MATA were detected and quantified, but LARI and PINO were determined neither after alkaline nor after acidic hydrolysis (they were below LOD). The content of SECO is also not reported even though we have detected it after the acidic hydrolysis. The reason for this decision represents the fact that SECO transforms into anhydroSECO to some extent under acidic conditions [8], leading to underestimation of results. In addition, reporting a glycosylated form of SECO (SDG) is more suitable since it is a natural form of SECO in linseed. We found the content of SDG with a quite variable range (4.9–12.2 mg/g DM) and it was affected by the year only in four cultivars, while two cultivars were unaffected (Table 3). Moreover, these two Dutch cultivars (Libra and Flanders) exhibit significantly lower SDG content than the remaining Czech cultivars. Compared to SDG, MATA was detected in the samples at a much lower level (1.6 to 3.8 µg/g DM) and only after acidic hydrolysis, which indicates it occurs in glycosylated form only. Nevertheless, the specific natural form of MATA (namely, the position and number of sugar moieties) in the linseed matrix remains unknown.

Saastamoinen et al. [19] observed the influence of the different cultivation sites during four cultivation seasons and of the genotypes (ten cultivars) on the SDG content (3.6–7.6 mg/g DM). Zhang et al. [15] indicated that the differences among six linseed cultivars affect the SDG content (4.7–7.3 mg/g FW) more than cultivation of linseeds in different environments (eight growing sites and two seasons). Also, the level of other lignans (SECO and MATA) can be determined by the cultivar and growing site. However, it is hard to compare the results of MATA with the literature

Table 3 Content of lignans, total polyphenol content and antioxidant activity (DPPH and ABTS) in different linseed cultivars cultivated in three subsequent growing seasons

| Chemical composition | Year | Linseed cultivar | | | | | |
|----------------------|------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | | Amon | Agram | Agriol | Raciol | Libra | Flanders |
| SDG (mg/g DM) | 2018 | 12.24 ± 1.49 ^{Aa} | 11.09 ± 1.57 ^{Aa} | 9.85 ± 0.55 ^{Aba} | 11.32 ± 0.20 ^{Aa} | 7.36 ± 0.87 ^B | 7.30 ± 0.51 ^B |
| | 2019 | 7.79 ± 0.62 ^b | 7.25 ± 1.20 ^b | 5.64 ± 0.33 ^b | 6.39 ± 0.32 ^b | 4.88 ± 0.81 | 5.20 ± 0.74 |
| | 2020 | 9.92 ± 1.92 ^{Abab} | 10.25 ± 1.23 ^{Abab} | 7.68 ± 2.34 ^{Bcab} | 11.27 ± 0.90 ^{Aa} | 7.28 ± 1.87 ^{BC} | 6.36 ± 0.50 ^C |
| MATA (µg/g DM) | 2018 | 2.84 ± 0.51 ^{AB} | 2.69 ± 0.41 ^{AB} | 2.78 ± 0.23 ^{AB} | 3.41 ± 0.44 ^A | 2.14 ± 0.57 ^{AB} | 1.58 ± 0.05 ^B |
| | 2019 | 2.54 ± 0.72 ^{AB} | 3.79 ± 0.57 ^A | 2.34 ± 0.67 ^B | 3.18 ± 0.58 ^{AB} | 1.81 ± 0.31 ^B | 2.12 ± 0.69 ^B |
| | 2020 | 2.61 ± 0.16 | 2.72 ± 0.50 | 2.51 ± 0.62 | 2.81 ± 0.30 | 1.99 ± 0.15 | 1.57 ± 0.09 |
| TPC (mg GAE/g DM) | 2018 | 1.90 ± 0.08 ^{AB} | 2.15 ± 0.14 ^A | 1.40 ± 0.21 ^B | 1.96 ± 0.15 ^A | 1.43 ± 0.08 ^B | 1.44 ± 0.08 ^B |
| | 2019 | 1.83 ± 0.06 ^A | 1.79 ± 0.15 ^A | 1.48 ± 0.39 ^{AB} | 1.46 ± 0.09 ^{AB} | 1.12 ± 0.02 ^B | 1.20 ± 0.13 ^B |
| | 2020 | 1.73 ± 0.17 ^B | 2.53 ± 0.27 ^A | 1.58 ± 0.45 ^B | 1.90 ± 0.16 ^B | 1.37 ± 0.19 ^C | 1.33 ± 0.15 ^C |
| DPPH (mg TE/g DM) | 2018 | 5.75 ± 0.33 ^{AB} | 6.14 ± 0.47 ^A | 5.25 ± 0.37 ^B | 5.68 ± 0.22 ^{AB} | 4.94 ± 0.39 ^B | 5.15 ± 0.14 ^B |
| | 2019 | 4.98 ± 0.35 ^{AB} | 5.66 ± 0.50 ^A | 4.68 ± 0.51 ^B | 4.90 ± 0.22 ^{AB} | 4.60 ± 0.29 ^B | 4.78 ± 0.25 ^B |
| | 2020 | 5.26 ± 0.17 ^B | 6.36 ± 0.20 ^A | 4.99 ± 0.22 ^B | 5.57 ± 0.29 ^{AB} | 4.89 ± 0.26 ^B | 4.80 ± 0.24 ^B |
| ABTS (mg TE/g DM) | 2018 | 7.14 ± 0.36 ^{Aa} | 7.11 ± 0.60 ^A | 5.34 ± 0.78 ^{Ca} | 6.42 ± 0.27 ^{Aba} | 5.49 ± 0.31 ^{Bca} | 5.17 ± 0.46 ^C |
| | 2019 | 5.71 ± 0.14 ^{Abb} | 6.38 ± 0.32 ^A | 4.25 ± 0.37 ^{Cb} | 5.12 ± 0.27 ^{Bcb} | 4.24 ± 0.32 ^{Cb} | 4.76 ± 0.19 ^{BC} |
| | 2020 | 6.64 ± 0.75 ^{Abb} | 6.42 ± 0.77 ^A | 4.94 ± 0.32 ^{Bcab} | 6.39 ± 0.70 ^{Aa} | 4.70 ± 0.40 ^{Cab} | 5.74 ± 0.11 ^{AB} |

DM: dry matter; SDG: secoisolariciresinol diglucoside; MATA: matairesinol; TPC: total polyphenol content; GAE: gallic acid equivalent; TE: Trolox equivalent; DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; ABTS: [2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline - 6-sulfonic acid)]; ^{A-C} values with different superscripts (cultivars) within a row differ significantly ($p < 0.05$); ^{a-b} values with different superscripts (years) within a column differ significantly ($p < 0.05$); $n = 5$

because the reports regarding its concentration in linseed are scarce. As far as the authors of this paper are aware, only two papers are comparing the content of MATA in different cultivars. Zimmerman et al. [17] reported a stronger effect of the cultivar (six cultivars) compared to environmental factors (combination of two growing sites and three nitrogen fertilizer doses), which influenced the SECO (2.4–5.7 mg/g DM) and MATA (1.6–7.7 µg/g DM) content, indicating the strong dependency on genetic predisposition. However, the year significantly affected SECO content only in one cultivar. Krajčová et al. [29] compared nine cultivars within one year, and the content of MATA ranged between 3 and 9 µg/g FW in linseed cultivars. There are also other slightly outdated reports on the content of MATA in linseed. For instance, Mazur et al. [30] reported 10.87 µg/g FW, Thompson et al. [31] 1.53 µg/g FW, Milder et al. [32] found 5.53 µg/g FW, whereas Kraushofer & Sontag [33] measured seven samples where MATA content ranged from 7 to 28.5 µg/g FW. However, none of these authors specified the attributes of linseed samples (cultivar, year of harvest, location of growing). Since the SDG, MATA and SECO (when performing acidic hydrolysis) were expected to be quantified according to the scientific literature, the potential detectability of LARI and PINO was rather hypothetical since they don't represent the final products of lignans biosynthesis in linseed [34].

SDG content was positively correlated with seed yield. However, this relation may be quite variable and should be verified by further studies dealing with more linseed cultivars grown under various environmental conditions.

Besides that, the SDG level was also related to MATA. The content of lignans was positively correlated with total phenolic content (TPC), DPPH, and ABTS radical scavenging activities. Correspondingly, all the antioxidant-related assays were related to each other (Table S3). These relations are coherent with results reported by Garros et al. [16]. They observed in five cultivars the significant positive correlation of SDG, caffeic acid glucoside and *p*-coumaric acid glucoside contents with ferric reducing antioxidant power (FRAP) in the range 217.4–355.8 µM of Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), oxygen radical absorbance capacity (ORAC, 270.0–375.8 µM TEAC), and iron chelating antioxidants assays (7.2–14.7 µM of fixed iron). The positive relation between SDG (15.9–21.3 mg/g) and SECO (1.9–3.2 mg/g) with ABTS antioxidant assay (14.2–36.1 mmol TE/g), as well as TPC (109.9–246.9 mg GAE/100 g) with ABTS, DPPH (32.6–46.2 mg TE/100 g) and FRAP (0.6 to 1.1 mg TE/g), observed within defatted linseed meal (DFM) of 32 cultivars grown within three years and six different growing sites, was also reported by Deng et al. [35]. Based on our results and the findings stated in the two previously mentioned research studies, the high content of lignans is probably one of the major factors positively contributing to the antioxidant potential of linseed.

Conclusions

This study proved certain impacts of different genotypes and growing conditions on the seed yield, chemical composition, and antioxidant potential of linseeds. The variability in precipitation led to substantial effects on the seed yield and SDG content, especially the drought in the critical period of plant development, causing their drastic decrease. The crude protein content was negatively related to oil content but not decreased by precipitation stress. The content of SDG and MATA differed between cultivars and positively correlated with TPC and antioxidant assays. Nonetheless, PINO and LARI were not detected in any studied cultivars. To sum up, the results presented in this study point out that cultivar selection combined with suitable growing conditions may greatly influence nutritional value and bioactive compounds content in linseed. Therefore, it is expected that new findings about linseed composition and its response to environmental factors will be further reflected in specialized breeding and optimized growing to obtain food with desirable properties.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s11130-023-01136-9>.

Author Contributions MJ and FL contributed to investigation, manuscript conceptualization and design, writing – review and editing, writing – original draft; MJ contributed further to methodology, growing, field trials, investigation, sample preparation; JB (Jan Bedrníček), EP, MB, EJ, VB, ZZ, JK, PS, JK, AS, JB (Jan Bárta) contributed to sample preparation, analysis and interpretation of data, writing – original draft, JB (Jan Bárta) contributed to supervising, project administration, funding acquisition. All authors read and approved the final manuscript.

Funding This research was funded by (1) Ministry of Agriculture of the Czech Republic, grant number QK1910302 and (2) University of South Bohemia in České Budějovice, grant number GAJU033/2018/Z.

Data Availability No datasets were generated or analysed during the current study.

Declarations

Ethical Approval Not applicable.

Competing Interests The authors declare no competing interests.

References

- Lorenc F, Jarošová M, Bedrníček J et al (2022) Structural characterization and functional properties of flaxseed hydrocolloids and their application. *Foods* 11:2304. <https://doi.org/10.3390/foods11152304>
- Kajla P, Sharma A, Sood DR (2015) Flaxseed—a potential functional food source. *J Food Sci Technol* 52:1857–1871. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1293-y>
- Oomah BD (2020) Flaxseed by-products. In: Campos-Vega R, Oomah BD, Vergara-Castaneda HA (eds) *Food Wastes and By-products: Nutraceutical and Health potential*, 1st edn. John Wiley & Sons Ltd., New Jersey, pp 267–289. <https://doi.org/10.1002/9781119534167.ch9>
- Goyal A, Sharma V, Upadhyay N et al (2014) Flax and flaxseed oil: an ancient medicine & modern functional food. *J Food Sci Technol* 51:1633–1653. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1247-9>
- Parikh M, Netticadan T, Pierce GN (2018) Flaxseed: its bioactive components and their cardiovascular benefits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 314:H146–H159. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00400.2017>
- Shim YY, Kim JH, Cho JY, Reaney MJT (2022) Health benefits of flaxseed and its peptides (linosorbs). *Crit Rev Food Sci Nutr* 1–20. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2119363>
- Yamaguchi KKL, Pereira LFR, Lamarão CV et al (2015) Amazon acai: Chemistry and biological activities: a review. *Food Chem*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.055>. 179:137–51
- Yuan J-P, Li X, Xu S-P et al (2008) Hydrolysis kinetics of secoisolariciresinol diglucoside oligomers from flaxseed. *J Agric Food Chem* 56:10041–10047. <https://doi.org/10.1021/jf8020656>
- Chhillar H, Chopra P, Ashfaq MA (2021) Lignans from linseed (*Linum usitatissimum* L.) and its allied species: retrospect, introspect and prospect. *Crit Rev Food Sci Nutr* 61:2719–2741. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1784840>
- Meagher LP, Beecher GR, Flanagan VP, Li BW (1999) Isolation and characterization of the lignans, isolariciresinol and pinoresinol, in flaxseed meal. *J Agric Food Chem* 47:3173–3180. <https://doi.org/10.1021/jf981359y>
- Herchi W, Sakouhi F, Arráez-Román D et al (2011) Changes in the content of phenolic compounds in flaxseed oil during development. *J Am Oil Chem Soc* 88:1135–1142. <https://doi.org/10.1007/s11746-011-1783-2>
- Sangiorgio P, Errico S, Verardi A et al (2023) Bioactive lignans from flaxseed: biological properties and patented recovery technologies. *Nutraceuticals* 3:58–74. <https://doi.org/10.3390/nutraceuticals3010005>
- Senizza A, Rocchetti G, Mosele JI et al (2020) Lignans and gut microbiota: an interplay revealing potential health implications. *Molecules* 25:5709. <https://doi.org/10.3390/molecules25235709>
- De Silva SF, Alcorn J (2019) Flaxseed lignans as important dietary polyphenols for cancer prevention and treatment: chemistry, pharmacokinetics, and molecular targets. *Pharmaceuticals* 12:68. <https://doi.org/10.3390/ph12020068>
- Zhang J, Xie Y, Miao C et al (2022) Secoisolariciresinol diglycoside (SDG) lignan content of oil flax: genotypic and environmental variations and association with other traits. *Oil crop sci* 7:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.oesci.2022.02.004>
- Garros L, Drouet S, Corbin C et al (2018) Insight into the influence of cultivar type, cultivation year, and site on the lignans and related phenolic profiles, and the health-promoting antioxidant potential of flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds. *Molecules* 23:2636. <https://doi.org/10.3390/molecules23102636>
- Zimmermann R, Bauermann U, Morales F (2006) Effects of growing site and nitrogen fertilization on biomass production and lignan content of linseed (*Linum usitatissimum* L.). *J Sci Food Agric* 86:415–419. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2364>
- Zare S, Mirlolhi A, Sabzalian MR et al (2023) Water stress and seed color interacting to impact seed and oil yield, protein, mucilage, and secoisolariciresinol diglucoside content in cultivated flax (*Linum usitatissimum* L.). *Plants* 12:1632. <https://doi.org/10.3390/plants12081632>

19. Saastamoinen M, Pihlava J-M, Euroala M et al (2013) Yield, SDG Lignan, cadmium, lead, oil and protein contents of linseed (*Linum usitatissimum* L.) cultivated in trials and at different farm conditions in the south-western part of Finland. *Agric Food Sci* 22:296–306. <https://doi.org/10.23986/afsci.7355>
20. Rossi A, Clemente C, Tavarini S, Angelini LG (2023) Variety and sowing date affect seed yield and chemical composition of linseed grown under organic production system in a semiarid Mediterranean environment. *Agron* 13:45. <https://doi.org/10.3390/agronomy13010045>
21. Casa R, Russell G, Lo Cascio B, Rossini F (1999) Environmental effects on linseed (*Linum usitatissimum* L.) yield and growth of flax at different stand densities. *Eur J Agron* 11:267–278. [https://doi.org/10.1016/S1161-0301\(99\)00037-4](https://doi.org/10.1016/S1161-0301(99)00037-4)
22. Anastasiu A-E, Chira N-A, Banu I et al (2016) Oil productivity of seven Romanian linseed varieties as affected by weather conditions. *Ind Crops Prod* 86:219–230. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.051>
23. Čeh B, Štraus S, Hladnik A, Kušar A (2020) Impact of linseed variety, location and production year on seed yield, oil content and its composition. *Agron* 10:1770. <https://doi.org/10.3390/agronomy10111770>
24. Diederichsen A, Raney JP, Duguid SD (2006) Variation of mucilage in flax seed and its relationship with other seed characters. *Crop Sci* 46:365–371. <https://doi.org/10.2135/cropsci2005.0146>
25. Kaya M, Day S, Çilkili Y, Arslan N (2012) Classification of some linseed (*Linum usitatissimum* L.) genotypes for salinity tolerance using germination seedling growth, and ion content. *Chil J Agric Res* 72:27–32. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392012000100005>
26. Zhang J, Xie Y, Dang Z et al (2016) Oil content and fatty acid components of oilseed flax under different environments in China. *Agron J* 108:365–372. <https://doi.org/10.2134/agronj2015.0224>
27. Tavarini S, Angelini L, Casadei N et al (2016) Agronomical evaluation and chemical characterization of *Linum usitatissimum* L. as oilseed crop for bio-based products in two environments of Central and Northern Italy. *Ital J Agron* 11:122. <https://doi.org/10.4081/ija.2016.735>
28. Bhatti RS, Cherdkiatgumchai P (1990) Compositional analysis of laboratory-prepared and commercial samples of linseed meal and of hull isolated from flax. *J Am Oil Chem Soc* 67:79–84. <https://doi.org/10.1007/BF02540631>
29. Krajeva A, Schulzova V, Hajslova J, Bjelkova M (2009) Lignans in flaxseed. *Czech J Food Sci* 27:S252–S5. <https://doi.org/10.17221/1062-CJFS>
30. Mazur W, Fotsis T, Wähälä K et al (1996) Isotope dilution gas chromatographic–mass spectrometric method for the determination of isoflavonoids, coumestrol, and lignans in food samples. *Anal Biochem* 233:169–180. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0025>
31. Thompson LU, Boucher BA, Liu Z et al (2006) Phytoestrogen content of foods consumed in Canada, including isoflavones, lignans, and coumestrol. *Nutr Cancer* 54:184–201. https://doi.org/10.1207/s15327914nc5402_5
32. Milder IEJ, Arts ICW, Putte, Bvd et al (2007) Lignan contents of Dutch plant foods: a database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol. *Br J Nutr* 93:393–402. <https://doi.org/10.1079/BJN20051371>
33. Kraushofer T, Sontag G (2002) Determination of matairesinol in flax seed by HPLC with coulometric electrode array detection. *J Chromatogr B* 777. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(01\)00577-3](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(01)00577-3). :61–6
34. Kezimana P, Dmitriev AA, Kudryavtseva AV et al (2018) Secoisolariciresinol diglucoside of flaxseed and its metabolites: biosynthesis and potential for nutraceuticals. *Front Genet* 9. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00641>
35. Deng Q, Yu X, Ma F et al (2017) Comparative analysis of the *in-vitro* antioxidant activity and bioactive compounds of flaxseed in China according to variety and geographical origin. *Int J Food Prop* 20:S2708–S22. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1402029>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

Terms and Conditions

Springer Nature journal content, brought to you courtesy of Springer Nature Customer Service Center GmbH ("Springer Nature").

Springer Nature supports a reasonable amount of sharing of research papers by authors, subscribers and authorised users ("Users"), for small-scale personal, non-commercial use provided that all copyright, trade and service marks and other proprietary notices are maintained. By accessing, sharing, receiving or otherwise using the Springer Nature journal content you agree to these terms of use ("Terms"). For these purposes, Springer Nature considers academic use (by researchers and students) to be non-commercial.

These Terms are supplementary and will apply in addition to any applicable website terms and conditions, a relevant site licence or a personal subscription. These Terms will prevail over any conflict or ambiguity with regards to the relevant terms, a site licence or a personal subscription (to the extent of the conflict or ambiguity only). For Creative Commons-licensed articles, the terms of the Creative Commons license used will apply.

We collect and use personal data to provide access to the Springer Nature journal content. We may also use these personal data internally within ResearchGate and Springer Nature and as agreed share it, in an anonymised way, for purposes of tracking, analysis and reporting. We will not otherwise disclose your personal data outside the ResearchGate or the Springer Nature group of companies unless we have your permission as detailed in the Privacy Policy.

While Users may use the Springer Nature journal content for small scale, personal non-commercial use, it is important to note that Users may not:

1. use such content for the purpose of providing other users with access on a regular or large scale basis or as a means to circumvent access control;
2. use such content where to do so would be considered a criminal or statutory offence in any jurisdiction, or gives rise to civil liability, or is otherwise unlawful;
3. falsely or misleadingly imply or suggest endorsement, approval, sponsorship, or association unless explicitly agreed to by Springer Nature in writing;
4. use bots or other automated methods to access the content or redirect messages
5. override any security feature or exclusionary protocol; or
6. share the content in order to create substitute for Springer Nature products or services or a systematic database of Springer Nature journal content.

In line with the restriction against commercial use, Springer Nature does not permit the creation of a product or service that creates revenue, royalties, rent or income from our content or its inclusion as part of a paid for service or for other commercial gain. Springer Nature journal content cannot be used for inter-library loans and librarians may not upload Springer Nature journal content on a large scale into their, or any other, institutional repository.

These terms of use are reviewed regularly and may be amended at any time. Springer Nature is not obligated to publish any information or content on this website and may remove it or features or functionality at our sole discretion, at any time with or without notice. Springer Nature may revoke this licence to you at any time and remove access to any copies of the Springer Nature journal content which have been saved.

To the fullest extent permitted by law, Springer Nature makes no warranties, representations or guarantees to Users, either express or implied with respect to the Springer nature journal content and all parties disclaim and waive any implied warranties or warranties imposed by law, including merchantability or fitness for any particular purpose.

Please note that these rights do not automatically extend to content, data or other material published by Springer Nature that may be licensed from third parties.

If you would like to use or distribute our Springer Nature journal content to a wider audience or on a regular basis or in any other manner not expressly permitted by these Terms, please contact Springer Nature at

onlineservice@springernature.com

1 **Comparison of Yield Characteristics, Chemical Composition, Lignans Content and**
2 **Antioxidant Potential of Experimentally Grown Six Linseed (*Linum usitatissimum* L.)**
3 **Cultivars**

4 Markéta Jarošová^{1,*}, František Lorenc^{2,†,*}, Jan Bedrníček², Eva Petrášková², Marie Bjelková³,
5 Veronika Bártová¹, Eva Jarošová¹, Zbyněk Zdráhal⁴, Jan Kyselka⁵, Pavel Smetana², Jaromír Kadlec²,
6 Adéla Stupková¹ & Jan Bárta¹

7 ¹ Department of Plant Production, Faculty of Agriculture and Technology, University of South
8 Bohemia in České Budějovice, Na Sádkách 1780, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

9 ² Department of Food Biotechnologies and Agricultural Products' Quality, Faculty of Agriculture and
10 Technology, University of South Bohemia in České Budějovice, Studentská 1668, 370 05 České
11 Budějovice, Czech Republic

12 ³ Department of Legumes and Technical Crops, Agritec Plant Research, Ltd. Zemědělská 2520, 787
13 01 Šumperk, Czech Republic

14 ⁴ Mendel Centre of Plant Genomics and Proteomics, Central European Institute of Technology,
15 Masaryk University, 625 00 Brno, Czech Republic

16 ⁵ Department of Dairy, Fat and Cosmetics, Faculty of Food and Biochemical Technology Prague,
17 University of Chemistry and Technology, Technická 5, 166 28 Prague, Czech Republic

18 * Corresponding author. *E-mail address:* lorencf@fzt.jcu.cz, Department of Food Biotechnologies and
19 Agricultural Products' Quality, Faculty of Agriculture and Technology, University of South Bohemia
20 in České Budějovice, Studentská 1668, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

21

22 [†] Markéta Jarošová and František Lorenc contributed equally to this work.

23

24

25 **Materials and Methods**

26 **Cultivation trial and plant material**

27 In this experiment, three yellow-seeded cultivars - Agriol, Amon and Raciol (owner: Agritec
28 Plant Research s.r.o., Šumperk, Czech Republic) and three brown-seeded linseed cultivars -
29 Agram (owner: Agritec Plant Research s.r.o., Czech Republic), Flanders and Libra (owner:
30 Limagrain Advanta Nederland, Lelystad, Netherlands). The cultivars Amon, Agram, Raciol and
31 Flanders belong to the medium maturity group. Libra represent the mid-early cultivar, and
32 Agriol possesses the late maturity. The selected cultivars are characterized by different alpha-
33 linolenic acid (ALA) content. Libra and Flanders belong to the cultivars with high content of
34 ALA, Agram and Raciol have the middle ALA content, followed by Amon and Agriol with a
35 low level of ALA.

36 The named cultivars were sown to produce experimental material. The seeding rate was 8
37 million germinating seeds per hectare. A diagonal cultivation trial (Table S1) for linseed
38 production was established at the Experimental Field Station of the University of South
39 Bohemia in České Budějovice, Czech Republic (48° 58' 29.2" N 14° 26' 52.0" E, elevation
40 approximately 380 m above sea level), during three subsequent seasons in 2018 (April 9), 2019
41 (April 11) and 2020 (April 7). Five plots, representing five biological replicates, were sown for
42 each variety and each year and one analytical replication was conducted from each plot for all
43 analyses (see below), thus $n = 5 \times 1$. During all three seasons, meteorological data was collected
44 using a meteorological station situated on the experimental field, whereas the data related to the
45 precipitation and temperature in the growing season (January → August) are visualized in Fig.
46 S1. Agrochemical soil analyses (Table S2) were performed by laboratory AGRO-LA, spol. s
47 r.o. (Jindřichův Hradec, Czech Republic) to eventually suggest or optimize the fertilizing
48 schedule before each growing season. During the vegetation, the plants at the height of 10 to
49 15 cm were treated with registered post-emergent herbicide GLEA 75 WG containing the

50 chlorsulfuron in a dose of 15 g/ha, in the third pair of true leaves growth stage (May 11, 2018;
51 May 24, 2019; and May 18, 2020). The linseeds were harvested (August 21, 2018; August 26,
52 201; and August 27, 2020) by Wintersteiger Nursery Master Elite small plot research combine
53 harvester. Linseeds were then pre-cleaned from impurities, including moisture-increasing
54 contaminants, and dried by cold air. Till the analyses, seeds were stored in the dark in paper
55 bags inside polypropylene bags at 4 °C and at relative humidity of 42%. The yield
56 characteristics were expressed as the seed yield (t/ha) standardized to 8% moisture content and
57 the thousand-seed weight (g).

58

59 **Proximate Composition Analyses**

60 The samples were analysed for water content by gravimetric method. Subsequently, analyses
61 for crude fat content using the Soxhlet method, crude protein content ($N \times 6.25$) and ash content
62 were performed. All the proximate analyses were determined according to Bárta et al. (2021).

63 The moisture of the samples (2 g) was determined as the difference in the weight of fresh seeds
64 and seeds dried at 105 °C for 3 h in a drying oven (Universal oven UF110, Memmert GmbH +
65 Co. KG, Buechenbach, Germany).

66 The crude fat content was assessed by the Soxhlet extraction method on the automatic extraction
67 system ANKOM XT10 Extractor (ANKOM Technology, Macedon, NY, USA). The fat content
68 was determined as the weight difference before and after the extraction.

69 The crude protein content was determined via the modified Dumas method using the rapid N
70 exceed® nitrogen and protein analyser (Elementar Analysen Systeme, Langenselbold,
71 Germany). The values for crude protein content were assessed by multiplying the measured
72 nitrogen content by a factor of 6.25.

73 The ash content of linseeds was measured as the total amount of inorganic residues remaining
74 after the high heat incineration of milled seeds at 550 °C for 5 h in a muffle furnace (muffle
75 furnace LE 09/11, LAC s.r.o., Židlochovice, Czech Republic).

76 The content of carbohydrates was determined as the remaining residue of the total dry matter
77 (DM) after subtracting the sum of fat, protein and ash.

78

79 **Total Phenolic Content**

80 Whole seeds were milled using the knife mill Grindomix GM200 (Retsch, Haan, Germany) at
81 10,000 rpm for 60 s. The milled samples for total phenolic content (TPC) were extracted by
82 80% aqueous solution of ethanol at the ratio 1:20 (sample:solvent) for 24 h at room temperature
83 (RT). Consequently, the samples were extracted in an ultrasonic bath and centrifuged at 4500
84 rpm for 10 min. The supernatant was collected and stored in 2 ml microcentrifuge tubes in a
85 freezer.

86 TPC was determined by the modified Folin–Ciocâlțeu method according to Lachman et al. [1].
87 To prepare the reaction, 10 µL of extract was mixed with 990 µl deionised H₂O, and 50 µL of
88 Folin-Ciocalteu's phenol reagent was added consequently. Until 8 min after mixing with the
89 reagent, 150 µl of 20% sodium carbonate was added, and the samples were then incubated at
90 RT for 120 min. The absorbance was measured at $\lambda = 765$ nm using BioMate 5 UV-Vis
91 Spectrophotometer (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA). A standard
92 calibration curve was assessed using gallic acid at the concentration from 0 to 2000 µg/ml. TPC
93 was expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram of dry weight of seeds (mg
94 GAE/g DW). The final mixed reagent without sample content was used as a blank.

95

96

97

98 **Antioxidant Activity**

99 The antioxidant activity was determined by modified DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)
100 and ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) methods
101 according to Šulc et al. [2] . For the antioxidant activity assessment, the samples were prepared
102 by the same procedure as for the TPC assay.

103 The stock solution stable free radical DPPH was prepared by dissolving 25 mg of radical in 100
104 mL of methanol. The working solution was prepared by diluting the stock solution with pure
105 methanol to achieve an absorbance of $0,800 \pm 0,01$ ($\lambda = 515$ nm) using BioMate 5 UV-Vis
106 Spectrophotometer (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA).. To the 975 μ l of
107 DPPH working solution was added 25 μ l of sample. The absorbance of samples was determined
108 at $\lambda = 515$ nm after 30 min incubation at RT.

109 The working solution for the ABTS assay was prepared by dissolving 54.8 mg ABTS reagent
110 and 1.0 g MnO_2 in 20 mL of deionized water. The filtered solution (PTFE 0.25 μ m) was diluted
111 in 5 mM phosphate buffer to an absorbance of $0.800 \pm 0,01$ ($\lambda = 734$ nm) using BioMate 5 UV-
112 Vis Spectrophotometer (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA). 100 μ L of sample
113 extract was added to 1 mL of the radical solution. The absorbance of samples was determined
114 at $\lambda = 734$ nm after 1 min incubation at RT.

115 Trolox was used as the calibrant for the DPPH and ABTS assays, and a calibration curve was
116 prepared at the concentration from 0 to 2000 μ g/ml. Thus, the results of DPPH and ABTS
117 assays were expressed as Trolox equivalent antioxidant capacity in mg TE/g DW.

118

119 **Sample Extraction for Lignans Analysis**

120 Optimised extraction of lignans was as follows: approximately 10 g of a ground sample was
121 defatted three times in hexane. Methanol (70%) in volume of 10mL was added to 0.1 g of
122 defatted sample weighed in 15 mL centrifuge tubes. The mixture was extracted in an ultrasound

123 bath (40 kHz) for two hours and was gently shaken every 15 minutes. After that, the sample was
124 centrifuged for 30 minutes at 4000 rpm and the supernatant was collected. To precipitate the
125 coextracted proteins and polysaccharides, the samples were stored at -18°C for one week. The
126 precipitate was then removed by filtrating the sample through a PTFE (0.45µm porosity)
127 syringe filter.

128

129 **HPLC-MS/MS Analysis of Lignans**

130 The analysis of lignans was focused on the quantification of secoisolariciresinol diglucoside
131 (SDG), secoisolariciresinol (SECO), lariciresinol (LARI), pinoresinol (PINO) and matairesinol
132 (MATA) by HPLC-MS/MS approach. Commonly used methods for the detection of lignans
133 (mainly SECO or SDG) are based on liquid chromatography (HPLC) with a wide variety of
134 detectors, e.g. ultraviolet or diode array and electrochemical detectors [4]. Their sensitivity and
135 specificity might not be suitable for detecting minor lignans present in linseed in a very low
136 amount. On the other hand, HPLC coupled with mass spectrometry (MS) ensures low detection
137 limits along with high specificity. These HPLC-MS methods were successfully applied for the
138 analysis of lignans in linseed [5, 6]. Several methods of gas chromatography (GC) were also
139 developed. However, their disadvantage compared to HPLC is that the lignans must be
140 derivatised before injection [4], making them more time and money consuming.

141 Firstly, the lignans were extracted from the matrix as mentioned above. To release SDG from
142 the SDG oligomer macromolecule, the sample extract (300 µL) was hydrolysed with 300 µL of
143 40mM NaOH (in methanol). Alkaline hydrolysis was carried out at 50°C for one hour. The
144 hydrolysed sample was properly diluted and analysed using high-performance liquid
145 chromatograph coupled with a mass spectrometer (HPLC-MS).

146 Due to the reason that alkaline hydrolysis released only SDG, we conducted acidic hydrolysis
147 using HCl to search for other above-mentioned lignans. Thus, 200 μ L of alkaline hydrolysed
148 sample was mixed with 200 μ L of 2M HCl. The hydrolysis took one hour at 95°C. The sample
149 was then diluted and analysed using the HPLC-MS instrument.

150 Either alkaline or acidic hydrolysed samples were analysed using Agilent 1260 Infinity II Prime
151 coupled with triple quadrupole mass spectrometer Agilent 6420 equipped with an electrospray
152 ionisation source. To avoid contamination of the ion source of the mass spectrometer (see
153 below) with NaOH or HCl (or NaCl), two dead volumes of the column were diverted to waste.
154 The settings of HPLC and ion source for the analysis of lignans are presented in Table S4. The
155 lignans were quantified using Multiple Reaction Monitoring mode, and the detailed parameters
156 are shown in Table S5 together with limits of detection, limits of quantification, calibration
157 curve linear range and regression coefficients and intra- and interday precision. The
158 quantification was achieved using standard reference compounds of lignans purchased from
159 Merck (Praha, Czech Republic) with a purity of at least 95%. The lignans were dissolved in
160 methanol with a concentration of 1 mg/mL to make a stock solution. The dissolved amount was
161 adjusted concerning the purity of the standard. The stock solutions were stored at -20 °C until
162 they were used to prepare the calibration curve.

163 **Statistical Analysis**

164 The data values presented in the manuscript are expressed as mean \pm standard deviation. The
165 obtained results were statistically processed by Statistica 14 software (Tibco, Palo Alto, CA,
166 USA) and evaluated using two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's HSD
167 post hoc test to find out the differences between groups. The relation between different quality
168 traits of linseed cultivars or linseed was analysed using Pearson correlation coefficient.
169 Differences between all tested data were considered significant at $p < 0.05$ (significance level
170 of $\alpha = 0.05$).

171 **References**

- 172 1. Bárta J, Bártová V, Jarošová M et al (2021) Oilseed cake flour composition, functional
173 properties and antioxidant potential as effects of sieving and species differences. *Foods*
174 10:2766.
- 175 2. Lachman J, Hamouz K, Čepel J et al (2006) The effect of selected factors on polyphenol
176 content and antioxidant activity in potato tubers. *Chem Listy* 100:522-27.
- 177 3. Šulc M, Lachman J, Hamouz K, Orsák M et al (2007) Selection and evaluation of methods
178 for determination of antioxidant activity of purple- and red-fleshed potato varieties. *Chem Listy*
179 101:584-91.
- 180 4. Herchi W, Arráez-Román D, Trabelsi H et al (2014) Phenolic compounds in flaxseed: a
181 review of their properties and analytical methods. An overview of the last decade. *J Oleo Sci*
182 63:7-14. <https://doi.org/10.5650/jos.ess13135>
- 183 5. Milder IEJ, Arts ICW, Putte Bvd et al (2007) Lignan contents of Dutch plant foods: a
184 database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol. *Br J Nutr*
185 93:393-402. <https://doi.org/10.1079/BJN20051371>
- 186 6. Milder IEJ, Arts ICW, Putte Bvd et al (2007) Lignan contents of Dutch plant foods: a
187 database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol. *Br J Nutr*
188 93:393-402. <https://doi.org/10.1079/BJN20051371>
- 189 7. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for
190 Human Use (2022). ICH Q2(R2) guideline: Validation of Analytical Procedures.

191

192

193 **Table S1** Design of small-plot cultivation trials for growing seasons 2018, 2019 and 2020

| | | | | | | | |
|-------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----|
| 2 m | 1.25 m | 1.25 m | 1.25 m | 1.25 m | 1.25 m | 1.25 m | 2 m |
| 0.5 m | | | | | | | |
| 8 m | AGRAM 1 | LIBRA 1 | AMON 1 | AGRIOL 1 | RACIOL 1 | FLAND. 1 | 8 m |
| 0.5 m | | | | | | | |
| 8 m | FLAND. 2 | AGRAM 2 | LIBRA 2 | AMON 2 | AGRIOL 2 | RACIOL 2 | 8 m |
| 0.5 m | | | | | | | |
| 8 m | RACIOL 3 | FLAND. 3 | AGRAM 3 | LIBRA 3 | AMON 3 | AGRIOL 3 | 8 m |
| 0.5 m | | | | | | | |
| 8 m | AGRIOL 4 | RACIOL 4 | FLAND. 4 | AGRAM 4 | LIBRA 4 | AMON 4 | 8 m |
| 0.5 m | | | | | | | |
| 8 m | AMON 5 | AGRIOL 5 | RACIOL 5 | FLAND. 5 | AGRAM 5 | LIBRA 5 | 8 m |
| 0.5 m | | | | | | | |
| 2 m | 1.25 m | 1.25 m | 1.25 m | 1.25 m | 1.25 m | 1.25 m | 2 m |

194 The bold text represents the names of the studied linseed cultivars; the shortcut „FLAND.” features for cultivar
 195 Flanders

196

197



198

199 **Fig. S1** Meteorological data of growing seasons 2018, 2019 and 2020. Each bar represents the
 200 average temperature in a single month of a single year. Each line represents the temperature
 201 development in a certain year during the growing season. The abbreviation „p.“ features for
 202 precipitation and „t.“ for temperature.

203

204

205

206

207

208

209

210

211

212 **Table S2** Results of agrochemical soil analyses for growing seasons 2018, 2019 and 2020

| Element / Parameter | Content in soil dry matter (mg/kg) | | |
|-------------------------|------------------------------------|------|------|
| | 2018 | 2019 | 2020 |
| Phosphorus | 134 | 142 | 162 |
| Magnesium | 102 | 83 | 74 |
| Potassium | 194 | 106 | 126 |
| Calcium | 1020 | 912 | 962 |
| Dry matter | 86.4 | 90.6 | 84.7 |
| pH (CaCl ₂) | 6.1 | 5.0 | 5.7 |

213

214

215

216

217

218

219

220

221

222

223

224

225

226

227 **Table S3** Correlation analysis of studied parameters in linseed cultivars cultivated in three
 228 subsequent growing seasons

| | SY | TSW | Fat | CP | Ash | Moist. | Carb. | SDG | MATA | TPC | DPPH | ABTS |
|--------|----|--------|--------|---------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| SY | | 0.544* | 0.729* | -0.395 | 0.351 | 0.092 | -0.239 | 0.506* | -0.168 | 0.128 | 0.266 | 0.306 |
| TSW | | | 0.536* | -0.080 | 0.223 | 0.171 | -0.633 | 0.236 | -0.034 | 0.367 | 0.482* | 0.268 |
| Fat | | | | -0.692* | -0.156 | 0.348 | -0.340 | 0.297 | -0.127 | 0.138 | 0.273 | 0.195 |
| CP | | | | | 0.538* | -0.576 | -0.371 | -0.156 | 0.101 | -0.015 | -0.153 | -0.132 |
| Ash | | | | | | -0.577* | -0.346 | 0.211 | -0.227 | -0.022 | 0.002 | 0.091 |
| Moist. | | | | | | | 0.218 | 0.391 | 0.353 | 0.436 | 0.628* | 0.376 |
| Carb. | | | | | | | | -0.061 | -0.013 | -0.170 | -0.175 | -0.253 |
| SDG | | | | | | | | | 0.488* | 0.757* | 0.814* | 0.845* |
| MATA | | | | | | | | | | 0.550* | 0.556* | 0.525* |
| TPC | | | | | | | | | | | 0.915* | 0.781* |
| DPPH | | | | | | | | | | | | 0.834* |
| ABTS | | | | | | | | | | | | |

229 SY: seed yield; TSW: thousand-seed weight; CP: crude protein; Moist.: moisture; Carb.: carbohydrates;
 230 SDG: secoisolariciresinol diglucoside; MATA: matairesinol; TPC: total polyphenol content; DPPH: 2,2-diphenyl-
 231 1-picrylhydrazyl; ABTS: [2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline -6-sulfonic acid)]; $n = 30$; *correlation
 232 coefficients with asterisk are statistically significant ($p < 0.05$)

233

234

235

236

237

238

239

240

241

242

243

244 **Table S4** Settings of HPLC-MS for the analysis of lignans in linseed samples

245

| | HPLC: | Parameter |
|-----|--|---|
| 246 | Column | Chromshell C18 Plus, 2.6 μ m, 150 \times 2.1mm |
| 247 | Mobile phase | A: 5% Methanol + 0.5% HCOOH |
| 248 | | B: 100% Methanol |
| 249 | Gradient | 0 – 14 min: from 25 to 70% B 14 – 17 min: 70 % B 17 – 25 min: from 70 to 25% B |
| 250 | | column equilibration for 5 min |
| 251 | Mobile phase flow | 0.25 ml/min |
| 252 | Column temperature | 35°C |
| 253 | Injection volume | 5 μ l |
| 254 | UV -VIS detection | 288 nm (scan 190 – 950 nm) |
| 255 | Mass spectrometer: | Parameter |
| 256 | Ionisation | electrospray, negative mode |
| 257 | Drying gas temperature (N ₂) | 350°C |
| 258 | Gas flow in nebuliser (N ₂) | 10 L/min |
| 259 | Gas pressure in nebuliser (N ₂) | 50 psi |
| | Capillary Voltage | 5000V |

260 **Table S5** Settings of multiple reaction monitoring, calibration curve correlation coefficients and ranges, intra- and inter-day precision and limits
 261 of detection (LOD), limits of quantification (LOQ) of lignans in linseed.

| Compound | Transition (<i>m/z</i>) | Fragmentor (V) | Collision energy (eV) | Cell accelerator voltage (V) | Calibration curve linear range (ng/mL) | Calibration curve R ² | Precision (% Intra- day [‡]) | RSD (% Inter- day [‡]) | LOQ [†] (ng/mL) | LOD [†] (ng/mL) |
|----------|------------------------------|----------------|--------------------------|------------------------------------|--|-------------------------------------|--|--|-----------------------------|-----------------------------|
| SDG | 685.2 → 523.2 | 216 | 28 | 0 | 0.488 – 2000 | 0.999 | 16.67 | 19.36 | 0.335 | 0.100 |
| | 685.2 → 59.2* | 216 | 80 | 0 | | | 0.28 | 7.43 | | |
| SECO | 361.2 → 165.1 | 144 | 28 | 0 | 1.953 – 2000 | 0.999 | 3.14 | 7.90 | 1.119 | 0.336 |
| | 361.2 → 121.0* | 144 | 40 | 0 | | | 0.28 | 4.11 | | |
| LARI | 359.1 → 329.1 | 104 | 12 | 2 | 1.953 – 2000 | 0.999 | 4.29 | 7.27 | 0.510 | 0.153 |
| | 359.1 → 192.4* | 104 | 20 | 2 | | | 1.06 | 5.57 | | |
| PINO | 357.1 → 136.0 | 116 | 44 | 2 | 31.3 - 500 | 0.997 | 1.05 | 2.51 | 10.389 | 3.117 |
| | 357.1 → 151.1* | 116 | 8 | 2 | | | 0.45 | 6.76 | | |
| MATA | 357.1 → 83.0 | 108 | 24 | 0 | 0.488 – 500 | 0.998 | 7.44 | 13.52 | 0.438 | 0.131 |
| | 357.1 → 137.1* | 108 | 20 | 0 | | | 0.59 | 3.44 | | |

262 †LODs and LOQs were calculated according to this formula: $LOD \text{ or } LOQ = \frac{k \cdot \sigma}{S}$, where k is 3.3 or 10 for LOD or LOQ, respectively; σ is the baseline noise of the blank
 263 solution chromatogram and S is the slope of the calibration curve; *: transition with asterisk is quantification transition; †: transition without asterisk was used for quantification;
 264 RSD: relative standard deviation; SDG: secoisolariciresinol diglucoside; SECO: secoisolariciresinol; LARI: lariciresinol; PINO: pinoresinol; MATA: mataresinol;
 265 ‡Calibration curve solutions were analysed in triplicate for three consecutive days to determine intra- (*n* = 3) and inter-day (*n* = 9) precision; †intra- and inter-day precision is
 266 reported as relative standard deviation at the lowest (upper value) and the highest (lower value) calibration curve point. The determination of validation parameters was based
 267 on the ICH Q2(R2) guideline [7].

4.3 Výtěžnost, funkční vlastnosti a antioxidační potenciál slizotvorných polysacharidů

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.

Kompletní informace a zdroje vztahující se k dané problematice a výše uvedené anotaci jsou uvedeny v publikaci:

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.

Slizotvorné frakce v semenech olejného lnu a jejich antioxidační aktivita

Mucilage fractions in flaxseed and their antioxidant activities

Jarošová M., Bárta J., Bártová V.

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta

Abstrakt

Tato práce byla zaměřena na studium vlastností rozpustných slizotvorných látek semen lnu setého

ve vodném prostředí. Jako výchozí materiál bylo vybráno 6 odrůd lnu. Zahřnuty byly odrůdy klasické i s pozměněným obsahem α -linolenové kyseliny. Nejvyšší výtěžnost slizotvorné frakce byla zaznamenána u odrůdy Agram (5,1 g/100 g lněného semene), u této odrůdy byl však zaznamenán nejnižší obsah polyfenolů a antioxidační aktivity. Nejméně slizotvorných látek tvořila odrůda Libra (2,37 g/100 g lněného semen). Výrazně vyšší obsah polyfenolů a antioxidační aktivity, v porovnání s ostatními odrůdami, byl zaznamenán u odrůdy Agriol. U souboru studovaných odrůd byla zjištěna pozitivní korelace mezi obsahem polyfenolů a antioxidační aktivitou.

Klíčová slova: len olejný, slizotvorné frakce, antioxidační aktivita, polyfenoly

Abstract

The paper is aimed on the study of properties of the water-soluble flaxseed mucilage fractions. As the source material was chosen 6 cultivars of flaxseed. Classical cultivars and cultivars with changed content of α -Linolenic acid were included into the group. In this group were comprised. The highest content of mucilage fraction was found in the cultivar Agram (5.1 g/100 g Flaxseed). On the other side, the lowest content of polyphenol and antioxidant activity was measured within the cultivar. Lowest mucilage fraction content was found for the cultivar Libra (2,37 g/100 g Flaxseed). Significantly highest content of total polyphenols and antioxidant activity were found for the cultivar Agriol. The positive correlation was found between polyphenols content and antioxidant activity within the studied group of cultivars.

Keywords: flaxseed, mucilage fractions, antioxidant activity, polyphenols

Úvod

Lněné semeno (*Linum usitatissimum* L.) patří mezi funkční potraviny prospěšně ovlivňující zdraví. V současnosti se šlechtění olejného lnu ubírá podle požadavků zpracovatelského průmyslu směrem ke genotypům s pozměněným obsahem mastných kyselin a to: nízkolinolenové (méně než 3 % alfa-linolenové kyseliny) a odrůdy se středním obsahem kyseliny olejové (25 – 40 %). Šlechtění se také zaměřuje na vlastnosti zvyšující užitek užitkovost olejného lnu, tedy na vyšší obsah lignanů (přírodní antioxidanty) a nízký obsah kyanogenních glykosidů (Pavelek *et al.*, 2012; Šmirous *et al.*, 2015). Vysoká nutriční hodnota je dána zejména významným obsahem α -linolenové kyseliny, bílkovinami a je nejbohatším zdrojem rostlinných lignanů. Lněné semeno je tvořeno z 41 % mastnými kyselinami, bílkovinami (20 %) a z 28 % vlákninou (Kaushik *et al.*, 2016). Rozpustná vláknina (9-10 %) neboli polysacharidy tvořící sliz se nachází ve slizniční vrstvě osemení. Tyto slizotvorné látky jsou snadno extrahovatelné ve vodě, přičemž jejich výtěžnost se pohybuje v rozmezí od 3,5 do 10,2 % z celkové hmotnosti semene. Jejich obsah závisí na fenotypu rostliny. Výtěžnost slizotvorných látek ovlivňují velkou měrou podmínky extrakce. Lněný sliz je heterogenní směsí složenou z jedné neutrální arabinoxylanové frakce tvořící 75 % a dvou kyselých frakcí, u nichž byla potvrzena antioxidační aktivita (Roulard *et al.*, 2016; Bouaziz *et al.*, 2016). Sliz vykazuje vysokou schopnost zadržovat vodu, což umožňuje jeho využití jako přírodního hydrokoloidu. Díky schopnosti bobtnat ve vodném prostředí a zvyšovat tepelnou stabilitu, je

možné využití těchto schopností v potravinářství jako zahušťovadlo a nahradit jím běžně využívané stabilizátory, jako je např. arabská guma (Ziolkowska, 2011; Qian *et al.*, 2012). Mezi další funkční vlastnosti komplexu slizotvorných látek patří schopnost tvořit gel, emulze a tvorba pěny. Tyto vlastnosti zvyšují potenciál pro jejich využití jako aditiv v potravinářských produktech (Liu *et al.*, 2016). Mezi další významné látky obsažené v lněném semeni jsou také lignany, které představují jednu ze skupin polyfenolů (Imran *et al.*, 2015). Obsah lignanů v semenech lnu je vyšší než 1330 mg/100g semene a hlavním zástupcem je secoisolariciresinol diglukosid (SDG), (Liu *et al.*, 2018).

Cílem této práce bylo porovnání rozdílů v extrakci rozpustné slizotvorné frakce z lněného semene u šesti odrůd při 50°C v destilované vodě. Dále byly porovnány obsahy celkových polyfenolů v lněném slizu a stanovena antioxidační aktivita pomocí metody využívající radikály ABTS a DPPH.

Materiál a metody

Pro extrakci lněného slizu ve vodném prostředí při 50°C byly vybrány čtyři odrůdy žlutosemenné (Agram, Amon, Agriol, Raciol) a dvě hnědosemenné (Libra, Flanders), mezi nimiž jsou odrůdy klasické, tak s pozměněným obsahem α -linolenové kyseliny. Všechny vzorky semen lnu olejného byly dodány ze společnosti Agritec Šumperk. Extrakce slizotvorné frakce byla provedena vodou za teploty 50°C ve vodní lázni. K 100 g vzorku semene bylo přidáno 1000 ml destilované vody a po dobu tří hodin byla směs inkubována ve vodní lázni za teploty 50°C, poté byl roztok oddělen od semen. Získaný sliz byl vysušen za teploty 50°C v sušárně a následně rozemlet na jemný prášek na planetovém mlýnu Pulverisette 6 (FRITSCH, Německo).

Pro stanovení celkových polyfenolů a antioxidační aktivity bylo navažováno 50 mg sušiny lněného slizu a provedena extrakce v 1 ml 80% vodného roztoku etanolu po dobu 24 hodin (6x byly vzorky promíchány na vortexu). Vzorky byly centrifugovány (20°C, 15 min, 10000 rpm). Supernatant s obsahem extrahovaných polysacharidů byl použit pro následující analýzy. Metoda stanovení celkových polyfenolů Folin-Ciocalteauovým činidlem byla upravena podle Lachmana (Lachman *et al.*, 2006). Výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalenty gallové kyseliny v mg (EGK – ekvivalent gallové kyseliny) na 1 g sušiny slizu.

Stanovení antioxidační aktivity metodou s radikálem DPPH (1,1-difenyl-2-pikrylhydrazylem; 25 mg rozpuštěno v 1 l methanolu). Úbytek absorbance byl měřen při vlnové délce 515 nm po 30 minutách po smíchání 25 μ l vzorku a 975 μ l radikálu DPPH (blank methanol).

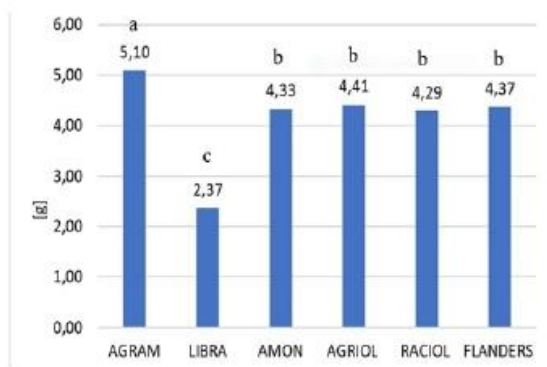
Antioxidační aktivita pomocí radikálu ABTS (2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát)), byla prováděna dle postupu uvedeného v práci Šulc *et al.* (2007). Výsledky metod ABTS a DPPH byly vyjádřeny jako ekvivalenty askorbové kyseliny v mg (EAK – ekvivalent askorbové kyseliny) v přepočtu na 1 g sušiny vzorku. Průměrné hodnoty byly stanoveny ze 6 paralelních stanovení. Získaná data byla statisticky vyhodnocena pomocí programu STATISTICA CZ, verze 12 (StatSoft, Inc.). Pro zjištění a porovnání rozdílů mezi skupinami dat a jejich závislostmi byla použita metoda jednocestné analýzy variance (ANOVA) využívající testu homogenity rozptylů (F-test), test středních hodnot pomocí Fisherova LSD testu. Pro zjištění korelací a úměr mezi jednotlivými parametry byla použita korelační analýza.

Výsledky a diskuze

Dosažené výsledky výtěžnosti slizotvorné frakce při extrakční teplotě 50°C ve vodném prostředí jsou uvedeny v grafu 1. Statisticky bylo prokázáno jednocestnou ANOVOU, že výtěžnost slizotvorných frakcí se u odrůd mezi sebou liší na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ ($df = 12$; $F = 39,505$; $p = 0,0000$). Nejvyšší výtěžnost a sušinu (Tab. 1) měla odrůda Agram a

nejmenší odrůda Libra. Výtěžek slizotvorné frakce je významně ovlivněn odrůdou a klimatickými podmínkami (Kaushik *et al.*, 2017)

Graf 1: Výtěžnost slizotvorné frakce v sušině získané extrakcí při 50°C (g/100 g lněného semene)



Tab. 1: obsah sušiny v slizotvorné frakci po extrakci

| odrůda | sušina slizotvorné frakce [%] |
|----------|-------------------------------|
| AGRAM | 0,71 |
| LIBRA | 0,29 |
| AMON | 0,57 |
| AGRIOL | 0,61 |
| RACIOL | 0,56 |
| FLANDERS | 0,57 |

Pozn.: Neshodná písmena indikují statisticky průkazný rozdíl na hladině významnosti $p < 0,05$.

Zjištěný celkový obsah polyfenolů (TPP) u jednotlivých odrůd (Tab. 2) představoval u odrůdy Agriol (6,74 mg TPP/g sušiny slizu) několikanásobně vyšší hodnoty v porovnání s ostatními odrůdami u kterých se obsah TPP pohyboval v rozmezí od 0,46 do 3,53 mg EGK/g sušiny slizu. Antioxidační aktivita byla prokázána u všech odrůd zhášením kyslíkovým radikálů ABTS a DPPH (Tab. 2). V rámci provedeného statistického srovnání byly prokázány pozitivní korelační vztahy mezi obsahem polyfenolů a antioxidační aktivitou s radikálem ABTS $r = 0,9404$

($p < 0,05$) a antioxidační aktivitou s radikálem DPPH $r = 0,9223$ ($p < 0,05$).

Lze tedy potvrdit, že antioxidační aktivita je přímo úměrná celkovému obsahu polyfenolů.

Tab. 2: Antioxidační aktivita slizotvorných frakcí a obsah celkových polyfenolů u vybraných odrůd lnu olejného

| | ABTS | | DPPH | | TTP | |
|----------|-----------------------|--|-----------------------|--|-----------------------|--|
| | mg EAK/g sušiny slizu | relativní porovnání s odrůdou Flanders [%] | mg EAK/g sušiny slizu | relativní porovnání s odrůdou Flanders [%] | mg EGK/g sušiny slizu | relativní porovnání s odrůdou Flanders [%] |
| AGRAM | 1,71 e | 69,51 | 0,30 e | 66,67 | 0,46 d | 39,32 |
| LIBRA | 4,40 c | 178,86 | 1,16 b | 257,78 | 2,70 d | 230,77 |
| AMON | 5,49 b | 223,17 | 1,19 b | 264,44 | 3,53 b | 301,71 |
| AGRIOL | 8,68 a | 352,85 | 2,31 a | 513,33 | 6,74 a | 576,07 |
| RACIOL | 4,65 c | 189,02 | 0,84 c | 186,67 | 2,46 c | 210,26 |
| FLANDERS | 2,46 d | 100,00 | 0,45 d | 100,00 | 1,17 d | 100,00 |

Pozn.: TPP – celkový obsah polyfenolů, EAK – ekvivalent askorbové kyseliny, EGK – ekvivalent gallové kyseliny; Odrůda Flanders patří mezi standardní odrůdy s nezměněným složením mastných kyselin; Neshodná písmena u hodnot ve sloupcích indikují statisticky průkazný rozdíl na hladině významnosti $p < 0,01$.

Liu a kolektiv uvádí, že genotyp má velký vliv na obsah slizotvorných látek (Liu *et al.*, 2018). Na základě výsledků uvedených v této práci vyplývá, že odrůda má také vliv na antioxidační aktivitu a obsah polyfenolů. Díky svému složení se lněný sliz stává zajímavějším komponentem nejen pro své funkční vlastnosti, ale také pro jeho zdravotní přínos.

Závěr

Pomocí výše uvedených metod byly zjištěny meziodrůdové rozdíly v extrakci slizotvorných frakcí a obsahu polyfenolů a antioxidační aktivity. Mezi obsahem celkových polyfenolů a antioxidační aktivitou byla prokázána pozitivní korelace. Celkový obsah polyfenolů a antioxidační kapacita, byla nejvyšší u nízko-linolenové odrůdy Agriol a nejnižší u odrůdy Agram se středním obsahem linolenové kyseliny. Výtěžnost slizotvorné frakce se u vybraných odrůd pohybovala v rozmezí od 2,37 – 5,1g/100g lněných semen. Lněný sliz je svými vlastnostmi velmi zajímavý a perspektivní materiál pro potravinářský průmysl.

Použitá literatura

- Bouaziz, F., M. Koubaa, F. Barba, S. Roohinejad a S. Chaabouni., 2016: Antioxidant Properties of Water-Soluble Gum from Flaxseed Hulls. *Antioxidants — Open Access Journal*. 5(3), 1-10.
- Imran, M., N. Ahmad, F. M. Anjum, M. K. Khan, Z. Mushtaq, M. Nadeem a S. Hussain., 2015: Potential protective properties of flax lignan secoisolariciresinol diglucoside. *Nutrition Journal*. 2015,14(1).
- Kaushik, P., K. Dowling, R. Adhikari, C. J. Barrow a B. Adhikari., 2017: Effect of extraction temperature on composition, structure and functional properties of flaxseed gum. *Food Chemistry*. 333-340.
- Kushik, P., K. Dowling, R. Adhikari, C. J. Barrow a B. Adhikari., 2016: Effect of extraction temperature on composition, structure and functional properties of flaxseed gum. *Food Chemistry*. 333-340.
- Lachman J., Hamouz K., Čepl J., Pivec V., Šulc M., Dvořák P. (2006): Vliv vybraných faktorů na obsah polyfenolů a antioxidační aktivitu hlíz brambor. *Chemické Listy* 100: 522-527
- Liu, J., Y. Y. Shim, T. J. Tse, Y. Wang a M. J.T. Reaney., 2018: Flaxseed gum a versatile natural hydrocolloid for food and non-food applications. *Trends in Food Science & Technology*. 75, 146-157.
- Liu, J., Y.Y. Shim, J. Shen, Y. Wang, S. Ghosh a M. J. T. Reaney., 2016: Variation of composition and functional properties of gum from six Canadian flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) cultivars. *International Journal of Food Science and Technology*. 2016, (51), 2313-2326.
- Pavelek M., E. Tejklová, M. Bjelková., 2012: Nové směry ve šlechtění olejného lnu. *Úroda* 12/2012, 31-36.
- Qian, K.Y., S.W. Cui, Y. Wu a H.D. Goff., 2012: Flaxseed gum from flaxseed hulls: Extraction, fractionation, and characterization. *Food Hydrocolloids*. 28(2), 275-283.
- Roulard, R., E. Petit, F. Mesnard a L. Rhazi., 2016: Molecular investigations of flaxseed mucilage polysaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*. 840-847.
- Šmírouš P., M. Bjelková, J. Souček, 2015: Metodická příručka pro pěstování olejného lnu. Agritec Plant Research s.r.o, 14-16.
- Šulc M., Lachman J., Hamouz K., Orsák M., Dvořák P., Horáčková V., 2007: Výběr a zhodnocení vhodných metod pro stanovení anti-oxidační aktivity fialových a červených odrůd brambor. *Chemické Listy* 101: 584-591.
- Ziolkovska, A., 2011: Laws of flaxseed mucilage extraction. *Food Hydrocolloids*. (26), 197-204.

Dedikace

Práce vznikla v rámci řešení výzkumného projektu GAJU 033/2018/Z a 112/2016/Z.

Kontaktní adresa:

Ing. Markéta Jarošová, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská, Na Sádkách 1780, 370 05 České Budějovice, email: jarosm08@zf.jcu.cz

Funkční vlastnosti lněného slizu a možnosti jejich uplatnění, zejména v oblastech potravinářství a specializované výživy, jsou v posledních letech častým předmětem mnoha odborných studií. Velkou část soudobých poznatků z této oblasti shrnují dvě přehledové práce, jež jsou v rámci této disertační práce součástí kapitoly 4.1. 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 (Obr. 15) 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.



Obr. 15: Slizotvorné polysacharidy lněného semene získané pomocí horkovodní extrakce

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.

Kompletní informace a zdroje vztahující se k dané problematice a výše uvedené anotaci jsou uvedeny v publikaci:

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

FUNKČNÍ VLASTNOSTI SLIZOTVORNÉ FRAKCE Z LNĚNÉHO SEMENE

Functional properties of the mucilage fraction from flaxseed

Jarošová M.¹, Bárta J.¹, Bártová V.¹, Bjelková M.²

¹ Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta

² Agritec Plant Research, s.r.o. Šumperk

Abstrakt

Tato práce byla zaměřena na studium funkčních vlastností rozpustných slizotvorných látek semen lnu olejného ve vodném prostředí. Jako výchozí materiál bylo vybráno šest odrůd lnu. Zahrnuty byly odrůdy klasické i s pozměněným obsahem α -linolenové kyseliny. Byla zjišťována emulgační aktivita a stabilita, která byla nejvyšší u odrůdy Raciol. Značné rozdíly mezi odrůdami byly prokázány u parametru rozpustnost, kterou měla nejvyšší odrůda Agriol (80 %).

Klíčová slova: lněný sliz, emulgační aktivita, bobtnavost, rozpustnost

Abstract

This study was focused on the topic of functional properties of soluble flaxseed mucilage in the water environment. Six cultivars of flax were selected as the source material. There were involved the common cultivars as well as the cultivars with changed content of α -Linolenic acid. It was studied the emulsifying activity and stability which was highest by the cultivar Raciol. The significant differences between cultivars were found within the solubility parameter, which has the highest variety Agriol (80 %).

Keywords: flaxseed mucilage, emulsifying activity, swelling power, solubility

Úvod

Lněný sliz je směs přírodních polysacharidů a proteinu získatelná z lněného semene (Liu et al., 2016). Látky tvořící sliz se nachází v druhé vrstvě osemení. Slizotvorné látky jsou snadno extrahovatelné ve vodě. Při hydrataci buňky obsahující sliz bobtnají a slizotvorné látky se dostávají na povrch semene. Výťažnost slizu se pohybuje v rozmezí od 3,5 do 10,2 % z celkové hmotnosti semene, přičemž jeho obsah závisí na fenotypu rostliny. Výťažnost slizotvorných látek ovlivňují velkou měrou podmínky extrakce. Lněný sliz je heterogenní směsí složenou z 50–80 % sacharidy, 4–20 % bílkovinami a 2 % popelovinami. Lněný sliz se skládá ze dvou polysacharidových složek, neutrální a kyselá. Neutrální frakce je zastoupena: L- arabinózou, D- xylózou, D- galaktózou, kyselá frakce obsahuje L-ramnózu, L-fukózu, L-galaktózu a kyselinu D-galakturonovou. (Roulard et al., 2016; Bouaziz et al., 2016, Kaewmanee et al., 2014).

Lněný sliz je hydrokoloid s dobrou schopností zadržovat vodu, díky značné bobtnavosti a vysoké viskozitě, ve vodném prostředí. Funkčně se lněný sliz podobá arabské gumě. Má vynikající reologické vlastnosti, včetně zahušťování, emulgace a gelovatění (Chen et al., 2005). Použití lněného slizu s jinými hydrokoloidy má řadu výhod, například zvýšení tepelné stability nebo pevnosti gelu (Kaur et al., 2018). Ve srovnání s nerozpustnými vlákninami se rozpustná vláknina snáze přidává do nápojů a mléčných výrobků (Chen et al., 2005). Behikt a kolektiv (2018) uvádí, že roztok lněného slizu může být lyofilizován, nebo sušen rozprašováním, za vniku prášku. Lněný sliz může být prospěšný při léčbě cukrovky a kardiovaskulárních chorob, prevenci rakoviny tlustého střeva a snižování obezity, přičemž nejvíce se diskutuje jeho potenciální využití jako potravinářské gummy (Singer et al., 2011).

Cílem této práce bylo zjistit, zdali se prokáže odrůdová variabilita lnu v rámci vybraných funkčních parametrů lněného slizu, zejména emulgační aktivity a stability, rozpustnosti, bobtnavosti.

Materiál a metody

Pro extrakci lněného slizu ve vodném prostředí při 50 °C byly vybrány tři odrůdy žltosemenné (Amon, Agriol, Raciol) a tři hnědosemenné (Agram, Libra, Flanders). Odrůdy Agram a Raciol mají střední obsah kyseliny α -linolenové (ALA), odrůdy Libra a Flanders mají vysoký obsah ALA a naopak odrůdy Amon a Agriol mají nízký obsah ALA. Všechny vzorky semen lnu olejného byly získány od společnosti „AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o.“. Extrakce lněného slizu probíhala v deonizované vodě za teploty 50 °C. K 100 g vzorku semene bylo přidáno 1000 ml deonizované vody a po dobu tří hodin byla směs inkubována ve vodní lázni za teploty 50 °C, poté byl roztok oddělen od semen. Získaný sliz byl vysušen za teploty 50 °C v sušárně a následně rozemlet na jemný prášek na planetovém mlýnu Pulverisette 6 (FRITSCH, Německo).

Gravimetricky byla stanovena **rozpustnost** a **bobtnavost** podle metodiky Kaewmanee a kol. (2014). Do 5 ml centrifugační zkumavky bylo naváženo 25 mg slizu, který byl dispergován ve 2 ml deonizované vody po dobu 10 minut třepáním. Poté byly vzorky centrifugovány (4500 rpm, 20 °C, 15 min). Supernatant byl převeden do centrifugačních mikrozkuvek a lyofilizován. Pelet i lyofilizovaný supernatant byly zváženy. Rozpustnost a bobtnavost byly spočítány podle následujících vzorců:

$$\text{Rozpustnost (\%)} = (M_s / M_0) * 100$$

M_0 = hmotnost vzorku v g

$$\text{Bobtnavost (g vody/g sušiny slizu)} = M_{sw} / (M_0 - M_s)$$

M_s = hmotnost lyofilizovaného supernatantu v g

M_{sw} = hmotnost peletu v g

Index emulgační aktivity (EAI) a **emulgační stability (ESI)** byly stanoveny podle metodiky Djurardi (2020) a Kaewmanee (2014). Do 50 ml centrifugačních tub bylo odváženo 45 mg slizu, který byl smíchán s 15 ml deonizované vody. Poté bylo přidáno 5 ml řepkového oleje. Tato směs byla míchána po dobu 2 minut při 18 000 otáček/min homogenizátorem ULTRA TURRAX IKA T 18 basic (USA). Mezitím byly připraveny kyvety s roztokem 0,1 % SDS o objemu 2 000 μ l. Následně bylo do připravených kyvet s roztokem SDS odebráno 10 μ l suspenze která se vytvořila pod vrstvou emulze. Po promíchání byla měřena absorbance při vlnové délce 500 nm na spektrofotometru BioMate 5 (Thermo Scientific Electron, UK). Index emulgační schopnosti (EAI) byl stanoven ve třech opakováních. Pro stanovení emulgační stability bylo odebráno opět 10 μ l ze dna centrifugační zkumavky a postup měření byl stejný jako u EAI. Pro výpočet byly použity vzorce:

$$T = (2,303 * A * DF) / I$$

T = turbidita

T_0 = po emulgaci v čase 0

T_{30} = po 30 minutách

A = absorbance vzorku při 500 nm

DF = ředící faktor (200)

I = délka kyvety (0,01 m)

Φ = objemová frakce oleje v dispergované fázi

$$\text{EAI (m}^2\text{/g sušeného slizu)} = (2 * T_0) / (\Phi * C)$$

$$\text{ESI (\%)} = T_{30} / T_0$$

Před statistickým šetřením dat pomocí analýzy variance (ANOVA) byla ověřena homogenita rozptylů jednotlivých statistických souborů využitím kombinovaného Cochran C, Hartley, Bartlettova testu. Byla také ověřena normalita rozdělení dat pomocí Shapiro-Wilkova testu. Celkové statistické hodnocení vybraných parametrů bylo provedeno prostřednictvím

jednocestné analýzy variance a srovnání jednotlivých odrůd pomocí post-hoc Tukeyho HSD testu pro stejně velké výběry. V případě rozdílně velkých skupin byla použita varianta Tukeyho testu pro různě velké výběry. Pro srovnání parametru EAI mezi odrůdami byl z důvodu narušení předpokladů normálního rozdělení dat a homogenity rozptylů použit neparametrický, jednocestný Kruskal–Wallisův test a jeho varianta pro mnohonásobné porovnání mezi jednotlivými odrůdami. Pro statistické hodnocení výsledků parametru ESI, uváděné v relativních hodnotách, byla výsledná data upravena pomocí arcsinové transformace. Statistické hodnocení bylo prováděno na hladině významnosti $\alpha = 0.05$ pomocí programu Statistica v10.0.

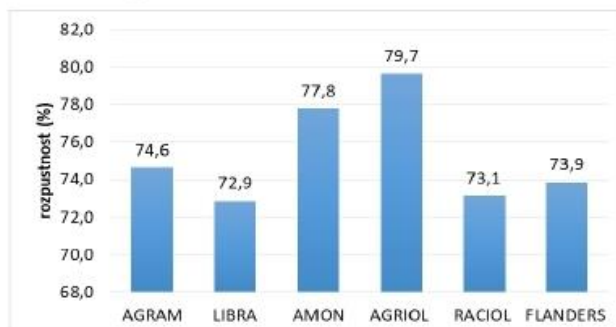
Výsledky a diskuze

Hodnoty stanovených funkčních parametrů jako je rozpustnost a bobtnavost jsou na grafech 1 a 2.

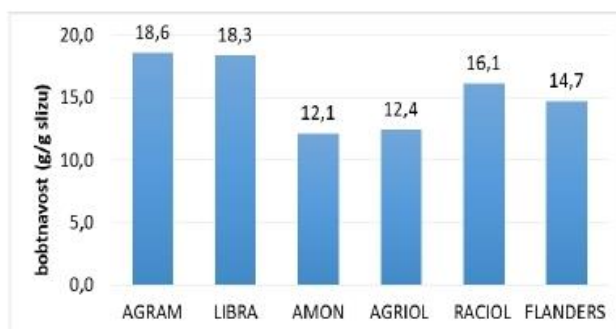
Statisticky významné rozdíly byly potvrzeny v parametrech rozpustnosti ($F_{5,10} = 4,580$, $p = 0,020$), nejvyšší rozdíl byl zjištěn mezi odrůdami Agriol a Libra ($p = 0,028$).

V případě bobtnavosti nebyly zjištěny průkazné rozdíly ($F_{5,10} = 3,291$, $p = 0,051$), přestože byl výsledek blízký významné odlišnosti. Ve srovnání s výsledky italských odrůd (Kaewmanee et al., 2014) byla rozpustnost v případě našich odrůd téměř dvakrát vyšší (graf 2). Vyšší rozpustnost lze přisoudit postupu získání lněného slizu, kdy nebyl použit ethanol. Nejvyšší rozpustnost byla zjištěna u odrůdy Agriol (80 %), naopak nejvyšší schopnost bobtnat po přidání vody měla odrůda Agram (18,6 g/g suš. slizu).

Graf 1: Rozpustnost lněného slizu

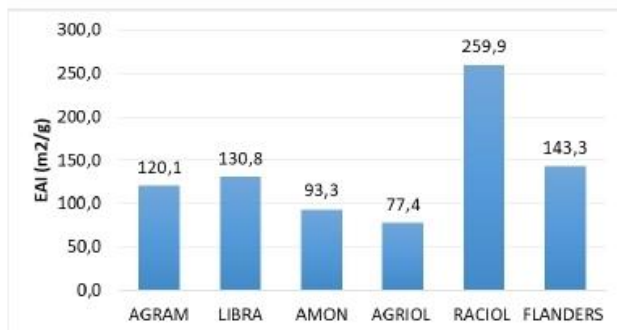


Graf 2: Bobtnavost lněného slizu

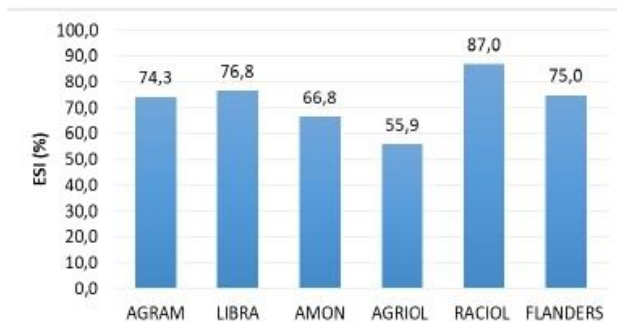


Výsledky EAI a ESI jsou uvedeny na grafech 3 a 4. Index emulgační aktivity se při použití neparametrického testu statisticky významně mezi odrůdami nelišil ($H_5 = 9,889$, $p = 0,078$), přestože hodnota p byla blízká $\alpha = 0,05$. Nebyly zaznamenány významné rozdíly mezi jednotlivými odrůdami, přičemž nejvyšší rozdíl byl zjištěn mezi odrůdami Raciol a Agriol ($p = 0,070$). Byly zjištěny rozdíly v indexu stability emulze (ESI) mezi odrůdami ($F_{5,12} = 3,760$, $p = 0,028$), konkrétně byl zaznamenán významný rozdíl mezi odrůdami Raciol a Agriol ($p = 0,014$). Kaewmanee a kol. (2014) ve své práci uvádí u italských odrůd lnu olejného hodnoty EAI od 300 do 900 m^2 / g slizu, naopak Wang a kol. (2010) uvádí nižší hodnoty pohybující se kolem 50-70 m^2 / g slizu bez ohledu na odrůdu lnu. V naší studii prokázala nejvyšší EAI odrůda Raciol (260 m^2 / g slizu) a nejnižší naopak odrůda Agriol. Emulgační stabilita stanovená po 30 minutách byla vyšší než 70 %, kromě odrůdy Amon a Agriol.

Graf 3: Index emulgační aktivity – EAI u lněného slizu



Graf 4: Index emulgační stability – ESI u lněného slizu



Závěr

Provedené analýzy prokázaly u všech odrůd schopnost lněného slizu tvořit stabilizované emulze oleje ve vodě. Nejvyšší emulgační aktivitu měla odrůda Raciol, u které byla po 30 minutách stanovena i nejvyšší stabilita emulze. Všechny odrůdy prokázaly rozpustnost ve vodě nad 70 %. U parametru bobtnavost nebyl průkazný rozdíl mezi odrůdami. Lněný sliz je pro své funkční vlastnosti velmi zajímavý a perspektivní materiál v oblasti potravinářského průmyslu,

zejména díky schopnostem vázat vodu a tvořit gel. Významné jsou také jeho zdravotní přínosy jako vlákniny.

Použitá literatura

- Behikt, A. E.-D. A., A. Shavandi, T. Jodjaja, et al. Flaxseed: Composition, detoxification, utilization, and opportunities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2018, 13, 129-152.
- Chen, H.-H., S.-Y. Xu a Z. Wang. Gelation properties of flaxseed gum. *Journal of Food Engineering*. 2006, 77(2), 295-303.
- Djuardi, A. U. P., N. D. Yuliana, M. Ogawa, T. Akazawa a M. T. Suhartono. Emulsifying properties and antioxidant activity of soy protein isolate conjugated with tea polyphenol extracts. *Journal of Food Science and Technology*. 2020, 57(10), 3591-3600.
- F.A.W. Singer, F.S. Taha, S.S. Mohammad, A. Gibriel, M. El-Nawaway, Preparation of mucilage/protein products from flaxseed, *Am. J. Food Technol.* 6 (2011) 260–278.
- Kaewmanee, T., L. Bagnasco, S. Benjakul, S. Lanteri, C. F. Morelli, G. Speranza a M. E. Cosulich. Characterisation of mucilages extracted from seven Italian cultivars of flax. *Food Chemistry*. 2014, 148, 60-69.
- Kaur, M., R. Kaur a S. Punia. Characterization of mucilages extracted from different flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) cultivars: A heteropolysaccharide with desirable functional and rheological properties. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018, 117, 919-927.
- Liu, Jun, Youn Young Shim, Aaron G. Poth a Martin J.T. Reaney. Conlinin in flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) gum and its contribution to emulsification properties. *Food Hydrocolloids* [online]. 2016, 52, 963-971.
- Wang Y., D. Li, L.-J. Wang, S.-J. Li, B. Adhikari. Effects of drying methods on the functional properties of flaxseed gum powders, *Carbohydrate Polymers*, 81 (2010), 128-133.
- Ziolkovska, A., 2011: Laws of flaxseed mucilage extraction. *Food Hydrocolloids*. (26), 197-204.

Dedikace

Příspěvek vznikl v rámci řešení výzkumného projektu GAJU 033/2018/Z a MZe NAZV QK1910302.

Kontaktní adresa:

Ing. Markéta Jarošová
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta – katedra genetiky a speciální produkce rostlinné
Na Sádkách 1780
370 05 České Budějovice
email: jarosm08@zf.jcu.cz

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

Bílkoviny lněného semene představují přibližně jednu pětinu hmotnosti čerstvých semen. Převážná část odborné literatury zmiňuje shodně právě tuto hodnotu bez ohledu na genotyp nebo podmínky pěstování, což naznačuje poměrně konzervativní obsah bílkovin v semenech lnu. V rámci studie zaměřené na polní experiment byl obsah dusíkatých látek rovněž konzervativní z pohledu genotypu, nikoli však v závislosti na ročníku, přičemž nejvyšší rozdíl v obsahu dusíkatých látek mezi třemi ročníky byl zaznamenán u odrůdy Flanders (15,8-20,4 % čerstvé hmoty) (kapitola 4.2).

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 → isoelektrickou precipitaci → neutralizaci pH → 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 použita 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, kyselé podjednotky 11S globulinu a proteinová frakce o velikosti 48 kDa. Výsledky analýz chemického složení (Tab. 11) 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 koncentráту. 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. 11: 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.

Kompletní informace a zdroje vztahující se k dané problematice a výše uvedené anotaci jsou uvedeny v publikaci:

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.

Article

Proteomic Profile of Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) Products as Influenced by Protein Concentration Method and Cultivar

Markéta Jarošová ¹ , Pavel Roudnický ² , Jan Bárta ^{1,*} , Zbyněk Zdráhal ² , Veronika Bártová ¹, Adéla Stupková ¹ , František Lorenc ³, Marie Bjelková ⁴ , Jan Kyselka ⁵ , Eva Jarošová ¹, Jan Bedrníček ³  and Andrea Bohatá ¹

- ¹ Department of Plant Production, Faculty of Agriculture and Technology, University of South Bohemia, Na Sádkách 1780, 370 05 České Budějovice, Czech Republic; jarošovam@fzt.jcu.cz (M.J.); vbartova@fzt.jcu.cz (V.B.); stupkova@fzt.jcu.cz (A.S.); jaroze02@fzt.jcu.cz (E.J.); bohata@fzt.jcu.cz (A.B.)
 - ² Mendel Centre of Plant Genomics and Proteomics, Central European Institute of Technology, Masaryk University, Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Czech Republic; pavel.roudnický@ceitec.muni.cz (P.R.); zbynek.zdrahal@ceitec.muni.cz (Z.Z.)
 - ³ Department of Food Biotechnology and Agricultural Products Quality, Faculty of Agriculture and Technology, University of South Bohemia, Studentská 1668, 370 05 České Budějovice, Czech Republic; lorenc@fzt.jcu.cz (F.L.); bedrnicek@fzt.jcu.cz (J.B.)
 - ⁴ Department of Legumes and Technical Crops, Agritec Plant Research Ltd., Zemědělská 2520/16, 787 01 Šumperk, Czech Republic; bjelkova@agritec.cz
 - ⁵ Department of Dairy, Fat and Cosmetics, University of Chemistry and Technology, Technická 5, 166 28 Prague, Czech Republic; jan.kyselka@vscht.cz
- * Correspondence: barta@fzt.jcu.cz



Citation: Jarošová, M.; Roudnický, P.; Bárta, J.; Zdráhal, Z.; Bártová, V.; Stupková, A.; Lorenc, F.; Bjelková, M.; Kyselka, J.; Jarošová, E.; et al. Proteomic Profile of Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) Products as Influenced by Protein Concentration Method and Cultivar. *Foods* 2024, 13, 1288. <https://doi.org/10.3390/foods13091288>

Academic Editors: Antonella Pasqualore and Jaroslava Rutkowska

Received: 10 March 2024

Revised: 15 April 2024

Accepted: 17 April 2024

Published: 23 April 2024



Copyright © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The research is focused on the quantitative evaluation of the flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) proteome at the level of seed cake (SC), fine flour—sieved a fraction below 250 µm (FF)—and protein concentrate (PC). The evaluation was performed on three oilseed flax cultivars (Agriol, Raciol, and Libra) with different levels of α-linolenic acid content using LC-MS/MS (shotgun proteomics) analysis, which was finalized by database searching using the NCBI protein database for *Linum usitatissimum* and related species. A total of 2560 protein groups (PGs) were identified, and their relative abundance was calculated. A set of 33 quantitatively most significant PGs was selected for further characterization. The selected PGs were divided into four classes—seed storage proteins (11S globulins and conlins), oleosins, defense- and stress-related proteins, and other major proteins (mainly including enzymes). Seed storage proteins were found to be the most abundant proteins. Specifically, 11S globulins accounted for 41–44% of SC proteins, 40–46% of FF proteins, and 72–84% of PC proteins, depending on the cultivar. Conlins (2S albumins) were the most abundant in FF, ranging from 10 to 13% (depending on cultivar). The second most important class from the point of relative abundance was oleosins, which were represented in SC and FF in the range of 2.1–3.8%, but only 0.36–1.20% in PC. Surprisingly, a relatively high abundance of chitinase was found in flax products as a protein related to defence and stress reactions.

Keywords: flaxseed; cultivar; flour; protein concentrates; proteomic profile; 11S globulin

1. Introduction

Flaxseeds (*Linum usitatissimum* L.) have been used as human food or animal feed since historical times [1]. Flaxseed contains 30–46% oil, 18–30% protein, 20–35% fibre (about 10% is soluble fibre), 3–4% ash, and 4–8% moisture [1–5]. Minor constituents include cyanogenic glycosides, phytic acid, polyphenols, linatine, lignans (phytoestrogens), cyclolinopeptides, vitamins, selenium, and cadmium or trypsin inhibitors [2]. Due to their unique composition, flax seeds are classified as a functional food often referred to as a superfood [6,7]. Flaxseed oil is rich in essential polyunsaturated fatty acids, with n-3 alpha-linolenic acid (ALA; C18:3) 47–55% and n-6 linoleic acid (C18:2) represented by ≈15% in the oil of traditional

cultivars [8]. Flaxseed oil with predominance of n-3 linolenic acid is not only used for human consumption but also, due to its drying properties, in industrial applications such as production of paints and varnishes, linoleum, oleo-chemicals, etc. [1,4,9,10]. The iodine value, which indicates the unsaturation level of the oils, is as high as 205 g I₂/g oil [11]. There are few vegetable oil plants that provide oil with a similar level of iodine value, e.g., Dragon's head oil (*Lallemantia iberica*) [12].

After mechanical extraction of the oil by pressing, flaxseed cake is a valuable material not only for farm animal feed, but also for the production of flaxseed flour, water-soluble fibre and protein concentrates [5,13–16], which, due to their functional properties, can be applied in a number of food applications in the production of quality foods that provide considerable health benefits to consumers [7,16]. High-protein flaxseed products can be used to enrich food products with nutritionally valuable components, improving their properties, including consistency, taste, and aroma. Flaxseed flours can be used in bakery products (bread, cookies, bars, biscuits, etc.), in pasta, but also, for example, in salad dressings or meat products [7]. Flaxseed protein flours have great potential in producing gluten-free products [17]. On the other hand, the food processing of flaxseeds and flaxseed products (e.g., roasting) can lead to several positive and negative changes, which also affect the protein and should be further monitored [18].

Flaxseed proteins in the form of concentrates or isolates are most commonly produced from defatted flaxseed meal stripped of water-soluble mucilage (which complicates protein concentration). First, alkaline solubilisation of the proteins is performed and then the proteins are precipitated by isoelectric precipitation [5,14,15]. The disadvantage of this most widely used method can be the varying extent of denaturation of flaxseed proteins (decreasing their solubility and functional properties), which can be caused by a high pH value (over 9) during the solubilisation step and may be improved by optimising the process conditions or partially hydrolysing the obtained proteins, which also yields valuable biologically active peptides [19–21], or by using an alternative method of protein concentration, e.g., protein extraction using ionic strength or membrane techniques [3,15].

Flaxseed protein is rich in glutamic and aspartic acid (including their amides) and the basic amino acid arginine. The total content of essential amino acids is 34%; leucine and lysine are the limiting amino acids in flaxseed protein, especially in children's diets [4,22]. Flaxseed proteins are divided into globulins (linin), which account for up to 80% of flaxseed proteins, and albumins (conlinin), which represent a minor component compared to globulins. Diverse information is given on the structure of linin or 11S protein. While Madhusudhan and Singh [23] present flaxseed major protein as a 12S protein with 5 non-identical subunits with a total molecular weight (MW) of 294 kDa, later papers describe an acidic (MW = 30.0–35.2 kDa) and basic (MW = 24.6 kDa) subunit in 11S flaxseed globulin [24] or present it as a protein with a total MW of 365 kDa, which, after separation on SDS-PAGE under reducing conditions, separates into bands with MWs of 20, 23, and 31 kDa [25]. Barvkar et al. [1], in their unique study of the proteomic profile of flaxseed, report 11S globulin (with the names legumin, glutenin type A or cupin) as the major protein. The second major protein group is the 1.6–2S albumin referred to as conlinin, which is composed of a single polypeptide chain of MW 16–18 kDa. Other important flaxseed proteins are reported to be the 7S storage protein, oleosins, late embryogenesis abundant (LEA) proteins and a number of metabolically important enzymes [1,26]. The importance of flaxseed proteins, especially 11S globulins and 2S albumins, in relation to food applications, human nutrition and medical applications has been sufficiently discussed in recent works [6,15,26–28].

Information on the flaxseed proteome is scarce, e.g., the work of Barvkar et al. [1], which deals with the evaluation of changes in the flaxseed proteome during its development, or the study of Klubicová et al. [29], which deals with changes in the flaxseed proteome in response to cultivation in the Chernobyl region under phytoremediation.

The evaluation of protein profiles of flaxseed products with different protein contents (seed cake, flour, protein concentrate), using a proteomic approach has not yet been

performed or is not available. Similarly, information on the cultivar differences of these flaxseed products is not available. For these reasons, the results presented in this article can be considered to be new. The knowledge of the protein profile is not only important from a nutritional and technological point of view, but it is also important to better understand the physiology of mature seed, the influence genotype and method of processing on proteome (protein composition), and it enables more efficient verification of the addition of flaxseed products in food products or for monitoring the presence of potentially risky proteins.

The objectives of the present work were (a) to describe the protein profiles of flaxseed products using shotgun proteomics at the level of quantitative estimation (determination of relative abundance) of identified protein groups, (b) to evaluate the effects of the protein concentration approach used (sieving versus alkaline solubilisation/isoelectric precipitation) and the cultivar effect on the changes in the relative abundance of food-relevant flaxseed proteins such as 11S globulins, 2S albumins (conlinin), and oleosins.

2. Materials and Methods

2.1. Flaxseeds

Flaxseeds of three cultivars of oilseed flax (*Linum usitatissimum* L.) were grown at the experimental station of the Faculty of Agriculture and Technology of the University of South Bohemia in České Budějovice (GPS 48.9742 N, 14.4477 E; 380 m above sea level). These cultivars were Agriol (cultivar number LNU25748), yellow seed colour, low ALA content (Agritec Plant Research, Ltd., Šumperk, Czech Republic); Raciol (cultivar number LNU11435), yellow seed colour, medium ALA content (Agritec Plant Research, Ltd., Šumperk, Czech Republic); and Libra (cultivar number LNU19160), brown seed colour, high ALA content (Limagrain Nederland B.V., Rilland, The Netherlands). Flaxseed cultivars used were grown in 2020. The sowing of the crop took place on 7 April 2020. The soil was satisfactorily supplied with the main nutrients, and no nitrogen in mineral fertilisers was applied. The crop was treated against weeds with the herbicide Glean 75 WG (chlorsulfuron) at a 15 g/ha dose. The seeds were harvested on 27 August 2020 using Wintersteiger Nursery Master Elite small plot research combine harvester (Wintersteiger Seedmech, GmbH, Ried im Innkreis, Austria). After harvesting, the flaxseeds were cleaned of impurities, including moisture-increasing contaminants. Until analyses were carried out, seeds were stored in the dark in paper bags inside polypropylene bags at 4 °C and 42% relative humidity.

2.2. Preparation of Flaxseed Cake, Flour, and Protein Concentrate

Preparation of analysed flaxseed products is shown schematically in Figure 1. The seeds were de-mucified by water soaking in two steps. In the first step, 200 g of seeds was mixed with 800 mL of water preheated to 50 °C. The mucilage was extracted for 1 h and removed from the mixture. In the second step, the seeds were soaked in 600 mL of water for 1 h at 50 °C, while the second step was performed twice in total. Subsequently, the wet seeds were dried on a sieve for 2 days at 50 °C. Afterwards, the seeds were subjected to oil pressing using a Yoda YD-ZY-02A domestic press (Yoda, Jinjiang, China) using the “flaxseed” program. The obtained cake was subjected to repeated pressing. Subsequently, the defatted cake was ground using a Grindomix GM 200 knife mill (Retsch, Haan, Germany) at 10,000 rpm for 1 min to obtain seed cake (SC). The flour was further sieved on a stainless-steel sieve (Preciselect, Tišnov-Malhostovice, Czech Republic) with a mesh size of 250 µm to produce fine flaxseed flour (FF). FF was used as a starting material for the preparation of protein concentrate (PC) through alkaline solubilisation followed by isoelectric precipitation (AE/IEP). Protein solubilization (extraction) was carried out as follows: deionized water was added to FF in a centrifuge plastic tube at a ratio of 1:10 (*w/v*), the mixture was mixed properly and then the reaction was adjusted to pH 8.5 using 1M NaOH, the total extraction was carried out at room temperature for 2 h with continuous control and pH adjustment. Subsequently, centrifugation was performed at RPM 4500 for 10 min and at RT on a Rotina 420 R centrifuge (Hettich, Tuttlingen, Germany). The proteins

in the obtained supernatant were then subjected to precipitation by decreasing the pH to a value of 4.5 using 2M HCl. After centrifugation (under the same conditions as above), the obtained pellets were dissolved in deionized water, the pH was adjusted to 7.0 using 1M NaOH, the sample was frozen ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) and then freeze-dried using an Alpha 1-4 LSC lyophilizer (Martin Christ, Osterode am Harz, Germany) at a pressure of 0.520 mBar, and a temperature of $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 72 h. The obtained lyophilizate was homogenized to a powder representing the protein concentrate (PC).

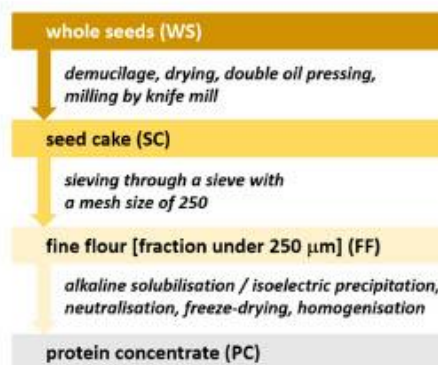


Figure 1. Preparation of analysed flaxseed products from whole seeds.

2.3. Proximate Composition Analysis

All the proximate analyses were determined according to Bárta et al. [30]. Moisture was determined gravimetrically by drying the samples in an oven to constant weight at $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 3 h. The protein content was determined by the modified Dumas combustion method using a rapid N cube (N/Protein analysis) instrument (Elementar Analysen System, Langenselbold, Germany). The protein content was calculated as the nitrogen content multiplied by a factor of 6.25. The fat content was measured using the Soxhlet extraction method using an ANKOM XT 10 Extractor (ANKOM Technology, Macedon, NY, USA) according to the manufacturer's manual. Petroleum ether was used as an extraction reagent. The fat content was calculated from the weight differences of the sample before and after extraction. The ash content was measured as the total amount of inorganic residues remaining after the high heat incineration of analysed samples at $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 h in a muffle furnace (muffle furnace LE 09/11, LAC s.r.o., Židlochovice, Czech Republic). The content of carbohydrates was determined as the remaining residue of the total fresh matter (FM) after subtracting the sum of moisture, protein, fat, and ash. Each sample was analysed in triplicate for all analyses.

2.4. One-Dimensional Electrophoresis (SDS-PAGE)

The flaxseed product samples were extracted with SDS extraction buffer [0.065 M Tris-HCl, pH 6.8; 2% (w/v) SDS; 5% (v/v) 2-sulphanylethanol] in a ratio of 1:10 (w/v) at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 4 h. Cooled dual vertical slab units SE 600 (Hofer Scientific Instruments, Holliston, MA, USA) were used for protein separation. Protein samples were separated with a discontinuous gel system (4% stacking and 11% resolving gel) in reduction conditions (modified according to Laemmli [31] and Bárta et al. [32]). Each research variant was analysed in triplicate. Protein detection was performed using Coomassie Brilliant Blue R-250.

2.5. LC-MS/MS Analysis and Proteomic Data Processing

Flaxseed product samples were processed in triplicate in a similar way as hemp samples in Bárta et al. [32]. Proteins from flaxseed product samples were isolated using SDT buffer (4% SDS, 0.1M DTT, 0.1M Tris/HCl, pH 7.6) in an Eppendorf ThermoMixer C (120 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 750 rpm). Subsequently, samples were centrifuged (15 min, $20,000\times g$).

Then, the supernatants (containing ca 100 µg of total protein) were processed using filter-aided sample preparation (FASP) as described elsewhere [33] using 0.5 µg of trypsin (sequencing grade; Promega). Resulting peptides were analysed using LC-MS/MS.

Obtained peptide mixtures were analysed using LC-MS/MS using the UltiMate 3000 RSLCnano system coupled to Orbitrap Exploris 480 mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Tryptic digests were online concentrated and desalted on trapping column (Acclaim PepMap 100 C18, dimensions 300 µm ID, 5 mm long, 5 µm particles, Thermo Fisher Scientific, heated to 40 °C). Trapping column with peptides was washed with 0.1% FA; the peptides were eluted in backflush mode (350 nL·min⁻¹) from the trapping column. Gradient elution (90 min, flow rate 250 nL·min⁻¹, 3–37% of mobile phase B; mobile phase A: 0.1% FA in water; mobile phase B: 0.1% FA in 80% ACN) was applied for separation on an analytical column (EASY-Spray column, 75 µm ID, 500 mm long, 2 µm particles, Thermo Fisher Scientific, heated to 50 °C).

A data-independent acquisition mode (DIA) was selected for data acquisition. The *m/z* range of 350–1400 at a resolution of 60,000 (at *m/z* 200) and maximum injection time of 55 ms was used for the survey scan. The *m/z* range of 200–2000 at 30,000 resolution (maximum injection time 55 ms, 27% relative fragmentation energy) was selected for HCD MS/MS spectra collection. Overlapping windows scheme in *m/z* range from 400 to 1000 were used as isolation window placements.

DIA-NN software (version 1.8.1) [34] was employed for the processing of acquired DIA data. The library free mode was used for searches against modified cRAP database (based on <http://www.thegpm.org/crap/> (accessed on 22 November 2018); 111 sequences in total) and whole *Linum* genus database ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ipg/?term=lxid4005\[Organism:exp\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ipg/?term=lxid4005[Organism:exp]) (accessed on 30 September 2023, number of protein sequences: 125,854). Carbamidomethylation as fixed modification, with no optional modification and trypsin/P enzyme with 1 allowed missed cleavage and peptide length 7–30, were set for preparation of the library. The false discovery rate (FDR) control was set to 1% FDR. The initial test searches were performed to set MS1 and MS2 accuracies and scan window parameters (median value from all samples ascertained parameter values). MBR was switched on.

The main report file generated using the DIA-NN was further processed using the software container environment (https://github.com/OmicsWorkflows/KNIME_docker_vnc (accessed on 4 October 2023)), version 4.6.3a. The processing workflow is available upon request. Briefly, it covered (a) removal of low-quality precursors and contaminant protein groups, (b) estimation of intensity-based absolute quantities (iBAQ values) using DIA-TPA [35] algorithm using normalized precursor intensities, (c) relative iBAQ (riBAQ) values calculation for individual protein groups within individual sample replicates. DIA-TPA algorithm implementation calculated iBAQ (and following riBAQ) values for all protein groups having at least one proteotypic peptide and/or protein groups without any proteotypic peptide, but where all proteins of the given protein group were reported only together.

The description of the identified protein groups presented in the results section of the article (Section 3.2) was based on information available in the NCBI or UniProt KB databases.

2.6. Statistical Analysis

Obtained data were analysed using software Statistica 12 (StatSoft Power Solutions Inc., Palo Alto, CA, USA). Two-way ANOVA (analyses of variance) and the variance components method was used for data evaluation. The means were compared using the Tukey HSD test. Differences between the variants were considered significant at $p < 0.05$ unless stated otherwise.

3. Results and Discussion

3.1. Proximate Composition of Flaxseed Products

The proximate chemical composition of the analysed flaxseeds (WS) and the flax products derived from them is given in Table 1. The individual processing steps from seed to flaxseed protein concentrate (WS, SC, FF, PC), as shown in Figure 1, lead to a gradual relative increase in the average protein content, from 18% (WS), over 30% (SC), and 36% (FF) to 70% or more (PC) of the three oilseed flax cultivars evaluated. The differences between the cultivars are noticeable, but the trend and the ratio of the gradual increase are similar for all the cultivars evaluated. The WS fat content of all three cultivars has decreased from the original 38–40% to below 10% in SC due to cold pressing (up to 50 °C). During sieving SC using a sieve with a mesh size of 250 µm, a fractionation effect occurred resulting in increased protein and fat content but less carbohydrates in flaxseed flour (FF), compared to the original SC.

The production of oil, flour, or protein from flaxseed is more difficult than for other oilseeds because of water-soluble mucilages (gums), which complicate processing, especially ‘wet’ processing. The presence of these mucilages and unsophisticated isolation methods have been the main reasons that have hindered the wider dissemination of flax protein [25,36]. Various methods have been tried to remove (or reduce) the mucilage content in flaxseeds, including the use of degradative enzymes and extraction using water at different temperatures [14,37]. Kaushik et al. [14] tested the effect of temperature during water extraction of the mucilage, prior to the actual processing of the seed. The authors concluded that water extraction at 60 °C can yield flaxseed protein isolate with purity of over 90%. Sieving is also important in changing the proportions of the content of the moulded fibre. The finer fractions of the flour (under a sieve with a size of about 250 µm) have a higher protein (and possibly fat) content and a lower carbohydrate (especially fibre) content, as sieving removes a greater proportion of the coarse fragments that represent the surface layers of the seed or hull [30].

Table 1. Proximate composition of whole flaxseeds (WS) and derived flaxseed products—seed cake (SC), fine flour (FF), and protein concentrate (PC).

| Component | Cultivar | WS | SC | FF | PC |
|----------------------|----------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Protein (% FM) | Agriol | 18.02 ± 0.58 Ad | 30.19 ± 1.24 Ac | 35.81 ± 0.50 Ab | 78.34 ± 0.52 Aa |
| | Raciol | 17.06 ± 0.66 Ad | 29.27 ± 0.59 Ac | 33.87 ± 0.89 Ab | 70.09 ± 1.63 Ba |
| | Libra | 17.84 ± 1.04 Ad | 30.42 ± 1.04 Ac | 36.02 ± 0.22 Ab | 70.87 ± 1.28 Ba |
| Fat (% FM) | Agriol | 37.76 ± 0.61 Ba | 8.53 ± 0.47 Ac | 10.94 ± 0.04 Ab | 2.41 ± 0.77 Bd |
| | Raciol | 38.24 ± 0.08 Ba | 9.46 ± 0.16 Ac | 12.04 ± 1.09 Ab | 2.42 ± 0.36 Bd |
| | Libra | 40.76 ± 0.54 Aa | 9.22 ± 1.20 Ac | 12.21 ± 1.22 Ab | 5.04 ± 1.27 Ad |
| Carbohydrates (% FM) | Agriol | 34.27 ± 0.47 Ac | 47.28 ± 1.23 Aa | 38.75 ± 0.66 Ab | 9.78 ± 0.54 Cd |
| | Raciol | 34.86 ± 0.67 Ac | 48.01 ± 0.31 Aa | 39.68 ± 0.70 Ab | 19.41 ± 2.15 Ad |
| | Libra | 31.90 ± 1.69 Ac | 46.29 ± 0.91 Aa | 36.87 ± 0.82 Ab | 15.99 ± 0.32 Bd |
| Ash (% FM) | Agriol | 3.43 ± 0.12 Ac | 5.36 ± 0.12 Bb | 6.28 ± 0.03 Ba | 2.71 ± 0.12 Ad |
| | Raciol | 3.52 ± 0.09 Ac | 5.27 ± 0.08 Bb | 6.28 ± 0.02 Ba | 2.72 ± 0.08 Ad |
| | Libra | 3.52 ± 0.09 Ac | 5.78 ± 0.13 Ab | 7.01 ± 0.04 Aa | 2.82 ± 0.15 Ad |
| Moisture (% FM) | Agriol | 6.52 ± 0.04 Ab | 8.63 ± 0.24 Aa | 8.22 ± 0.21 Aa | 6.76 ± 0.86 Ab |
| | Raciol | 6.32 ± 0.05 Ab | 7.99 ± 0.32 Aa | 8.12 ± 0.13 Aa | 5.36 ± 1.03 Bb |
| | Libra | 5.98 ± 0.08 Ab | 8.29 ± 0.14 Aa | 7.89 ± 0.24 Aa | 5.27 ± 0.15 Bb |

Note: FM—fresh matter; different capital letters in the columns for individual component values indicate a statistically significant cultivar difference at $p < 0.05$ (Tukey HSD test); different lower-case letters for the component values in the rows indicate a statistically significant difference between the flaxseed products of the respective cultivar at $p < 0.05$ (Tukey HSD test).

3.2. Description of Main Identified Protein Groups in Flaxseed Products

The protein profiles of flaxseed products derived from seeds after oil pressing of the three cultivars separated using SDS-PAGE are shown in Figure 2.

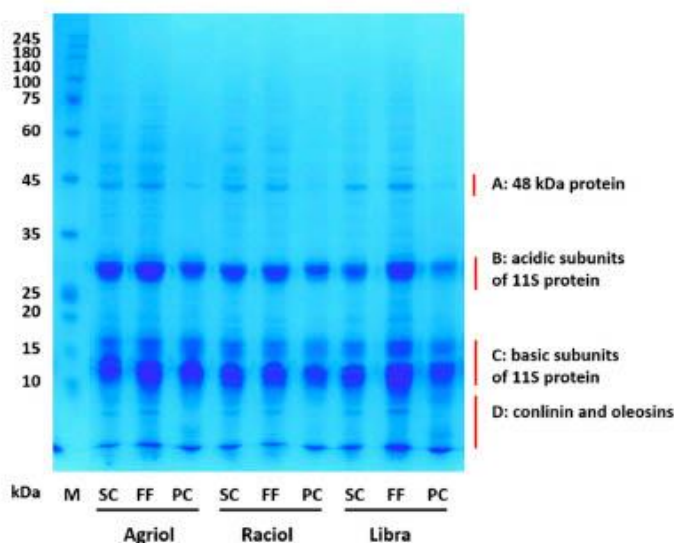


Figure 2. 1D SDS-PAGE profiles of flaxseed products (seed cake—SC, fine flour—FF, protein concentrate—PC) from three oilseed flax cultivars (Agriol, Raciol, Libra). Note: M—molecular mass standard (RotiMark Tricolor [8271.1], Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany).

A typical electrophoretic profile of oilseed proteins separated under denaturing and reducing conditions [27,30] is evident in all samples and it agrees with reported studies dealing with flaxseed proteins [1,5,25,38,39]. The proteins can be divided into four MW regions: the protein with an MW of 48 kD (region A), the acidic subunits of the 11S globulin monomer (region B), the basic subunits of the 11S globulin monomer (region C), and the region of 2S albumin conlinin and oleosins (region D). There are minor differences between the seed protein profiles of the evaluated cultivars. The PC profiles of all three cultivars are slightly simpler with a predominance of protein bands in the regions of the acidic and basic subunits of the 11S protein monomer (globulin). This suggests that the chosen alkaline solubilisation (extraction) procedure at pH 8.5 and the subsequent precipitation of the extracted proteins caused by decreasing the pH to 4.5 leads to a higher relative abundance of 11S globulins (discussed more in Section 3.3). However, this suggestion can be taken with some reserve because the absolute amount of protein in the samples loaded on the electrophoretic gel differed.

After LC-MS/MS analysis of the peptide mixtures of the samples, the obtained data were subjected to qualitative and quantitative evaluation using available databases of primary protein sequences. Considering the unavailability of reference proteome for flax, the NCBI database (LINUM taxonomy) was primarily used, with the help of which 2560 protein groups (PGs) were identified (see Supplementary Table S1). For the assessment of relative abundance (determined from measured intensities, riBAQ values), the set of 2560 identified PGs was assumed to be 100%. For detailed evaluation, a set of 33 PGs with high relative abundance in the total protein profile (PGs above 0.5%) or belonging to important flaxseed proteins was selected. The PGs items in this set were divided into four classes (Table 2) into seed storage proteins, oleosins, proteins associated with defence and stress, and other selected important proteins.

Table 2. Description of selected protein groups found by proteomic processing of flaxseed products.

| Accession | Name of Protein Groups | Description from UniProt KB/(Available Information from NCBI) |
|--|---|--|
| Seed storage proteins | | |
| CAI0558954.1 | unnamed protein product; LINTE | (cupin 11S legumin N/11S legumin seed storage globulin/ N-terminal cupin) |
| CAI0432378.1 | unnamed protein product; LINTE | (11S globulin-like/11S globulin seed storage protein) |
| CAI0558846.1 | unnamed protein product; LINTE | (cupin_RmlC-like protein) |
| CAI0434421.1 | unnamed protein product; LINTE | (cupin_RmlC-like protein) 11S globulin |
| CAI0418748.1 | unnamed protein product; LINTE | (cupin_RmlC-like protein) |
| CAC94011.1 | conlinin; LINUS | 2S seed storage albumins family; nutrient reservoir activity |
| CAC94010.1 | conlinin; LINUS | 2S seed storage albumins family; nutrient reservoir activity |
| Oleosins | | |
| ABB01617.1 | oleosin low molecular weight isoform; LINUS | oleosin family; membrane; monolayer-surrounded lipid storage body |
| ABB01620.1 | oleosin low molecular weight isoform, partial; LINUS | oleosin family; membrane; monolayer-surrounded lipid storage body |
| ABB01616.1 | oleosin high molecular weight isoform; LINUS | oleosin family; membrane; monolayer-surrounded lipid storage body |
| ABB01624.1 | oleosin high molecular weight isoform; LINUS | oleosin family; membrane; monolayer-surrounded lipid storage body |
| ABB01618.1 | oleosin low molecular weight isoform; LINUS | oleosin family; membrane; monolayer-surrounded lipid storage body |
| ABB01619.1 | oleosin low molecular weight isoform, partial; LINUS | oleosin family; membrane; monolayer-surrounded lipid storage body |
| Defence and stress-related proteins | | |
| WMZ41542.1 | chitinase; LINUS | (chitinase; involved in somatic embryogenesis in flax) |
| AAW31878.1 | chitinase, partial; LINUS | chitinase activity; chitin binding; cell wall macromolecule catabolic process; defense response |
| AMY26620.1 | late embryogenesis abundant (lea) group 1-embryo development; LINUS | LEA type 1 family; embryo development ending in seed dormancy |
| AVY09180.1 | Sequence 3353 from patent US 9878004; UNKNOWN | (17.3 kDa class I heat shock protein) |
| CAI0408810.1 | unnamed protein product; LINTE | (luminal-binding protein 5; heat shock 70 kDa protein) |
| IDWM_A | Chain A, <i>Linum usitatissimum</i> trypsin inhibitor; LINUS | (Serine proteinase inhibitor class) |
| Other selected important proteins | | |
| AVY09175.1 | Sequence 3348 from patent US 9878004; UNKNOWN | (11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase) |
| CAI0407981.1 | unnamed protein product; LINTE | (glucose and ribitol dehydrogenase/NADPH-dependent aldehyde reductase 1) |
| CAF22093.1 | glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, partial; LINUS | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase family; oxidoreductase |
| BAL41455.1 | fructose-bisphosphate aldolase 1, partial; LINGR | class I fructose-bisphosphate aldolase family; |
| P48417.1 | Allene oxide synthase, chloroplastic; LINUS | fructose-bisphosphate aldolase activity; glycolytic process allene oxide synthase; activity; fatty acid biosynthetic process |
| ABM64783.1 | cell wall glycosidase, partial; LINUS | hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds; carbohydrate metabolic process |
| CAI0384355.1 | unnamed protein product; LINTE | (copper/zinc superoxide dismutase) |
| CAI0431450.1 | unnamed protein product; LINTE | (manganese superoxide dismutase) |
| CAI0412769.1 | unnamed protein product; LINTE | (linoleate 13S-lipoxygenase 2-1, chloroplastic; Lipoxygenase) |
| AVY09204.1 | Sequence 3377 from patent US 9878004; UNKNOWN | (hypothetical protein DKX38_015183; malate dehydrogenase) |
| CAI0440995.1 | unnamed protein product; LINTE | (putative mitochondrial malate dehydrogenase; malate dehydrogenase, mitochondrial) |
| CAI0411675.1 | unnamed protein product; LINTE | (elongation factor 1-alpha; translation elongation factor) |
| AGN56421.1 | non-specific lipid transfer protein 1; LINUS | lipid binding; lipid transport; plant LTP family |
| CAI0414382.1 | unnamed protein product; LINTE | (thaumatin like protein) |

Note: LINUS—*Linum usitatissimum*; LINTE—*Linum tenue*; LINGR—*Linum grandiflorum*; UNKNOWN.

3.2.1. Seed Storage Proteins

The seed storage proteins (SSPs) in flaxseed are mainly classified as 11S (12S) globulins and 2S albumins [3,16,25,27]. The globulin fraction is often referred as linin [3]; however, PGs are not listed under this name in the NCBI and UniProt KB databases. In addition to 11S globulins, we were able to find five items in the set of identified PGs (Table 2). In terms

of relative abundance, the most significant items are CAI0558954.1, CAI0432378.1, and CAI0558846.1, which are designated as “cupin 11S legumins” or “11S globulin/legumin seed storage proteins” or “11S globulin-like proteins”.

According to other authors [3,25,28], these are polymeric proteins with MW \approx 300 kDa. The PGs we have found have primary polypeptide sequences of 367–536 amino acids in length, from which two sub-polypeptide chains, an acidic and a basic one, are cut during post-translational processing, similarly to proteins of other oilseeds [40], which then give rise to the final monomer by their association via a disulfide bond. Due to their high relative abundance, 11S globulins have a major impact on the amino acid composition of flaxseed proteins. The nutritional quality of flaxseed proteins is close to that of soya and canola proteins. Their essential amino acid index is reported at 69, whereas values of 79 and 75 are reported for soya and canola proteins, respectively. The significantly represented amino acids of flaxseed proteins include arginine, aspartic, and glutamic acids (including their amides) [3]. Flaxseed protein has a lysine to arginine ratio of about 0.25 and, therefore, has less lipidemic and atherogenic effects than, for example, soya protein (0.71), milk caseinate (2.15), or whey protein (5.38), so it is referred to as a “better” protein for the health of cardiac patients [14].

A second important part of flax SSPs are the 2S albumins, commonly referred to as conlinins [1,26,41]. In the set of identified proteins, two PGs (CAC94011.1, CAC94010.1) were found with the name conlinin and the described activity of the storage protein (Table 2). According to the accession number and the assigned GI number, these items are identical to the two proteins found by Liu et al. [41] in their work. These authors studied conlinin for its involvement in the emulsification activity of the flaxseed soluble gum (FSG) fraction, to which conlinins were co-transferred during the hot water isolation of FSG. The conlinins were found to be significantly involved in increasing the emulsification activity and stability of the emulsions formed. These are proteins that have been described in databases based on the cDNA sequence of two conlinin genes, *cnl1* and *cnl2* [42]. Earlier work [23] describes conlinins as proteins with a sedimentation coefficient of 1.6S and a MW of 15–18 kDa, while Liu et al. [41] found a MW by 2D-PAGE of around 11 kDa; however, the UniProt KB database lists a predicted MW of 19.063 kDa (169 amino-acids) for Q8LPD4 (CAC94011.1) and a predicted MW of 19.012 kDa (168 amino-acids) for Q8LPD3 (CAC94010.1).

Diverse physiological functions are generally reported for seminal 2S albumins. Souza [43] in his work states that they are not only proteins with a storage function as a source of indispensable amino acids (especially cysteine), but due to their alpha-helical structure and positively charged amino acid residues, they are often characterized by antimicrobial and antifungal activity. The more significant use of 2S albumins in food and biotechnological applications is hampered by their relatively high allergenicity [44]. Additionally, flaxseed polypeptides with MW from 20 to 38 kDa (or more), e.g., malate dehydrogenase, are suspected of allergenicity, too [3]. Allergies to flaxseed are rarely reported. However, Bueno-Díaz et al. [6] described recently the allergy of five patients to flaxseed and 2S albumin was the main allergen, and 11S globulin was a potential allergen.

In addition to 11S globulins and 2S albumins, other proteins of similar function have been reported in flaxseed. For example, Barvkar et al. [1] described glutelins, a 48 kDa proteins, and 7S globulins in flaxseeds. Globulins 7S were detected in seeds of other oilseed crops including hemp [32]. No proteins of this type were found in our study.

3.2.2. Oleosins

Oleosins (OLs) are proteins with MW ranging from 15 to 26 kDa [45,46] that participate in the structure of oil bodies (oleosomes). In oilseeds, oleosomes are mainly localized in the cotyledon's cells, where they form structures with diameters between 0.2 and 2 μ m [47]. Oleosomes are composed of a monolayer membrane of phospholipids reinforced not only by OLs but also by other types of proteins such as caleosins or steroleosins [47–49]. Typically, the oleosome isolated from oil bodies contains about 94–98% neutral lipids, 0.6–2% phospholipids and 0.6% protein [49].

The OLs are among the most quantitatively important proteins in oilseeds. We found a total of six oleosin PGs, whose relative abundance in the seed extracts of the three cultivars evaluated ranged from 2.12 to 2.86% in analysed flaxseed products. Four PGs were the “oleosin low molecular weight isoforms” (MW in the range 14.991–16.039 kDa) and two the “oleosin high molecular weight isoforms” (MW 18.643 kDa or 18.712 kDa). OLs relative abundance in flaxseeds is lower compared to hempseeds (8%) based on the results of the recent study by Bárta et al. [32].

3.2.3. Defence- and Stress-Related Proteins

Within the PGs significantly related to flaxseed defence and its response to stress, we detected the enzyme chitinase, late embryogenesis abundant protein, heat shock proteins, and trypsin inhibitor. We observed a surprisingly high relative abundance of chitinase (represented by two PGs WMZ41542.1 and AAW31878.1) ranging from 6 to 10% in the flaxseed protein pool. Klubicová et al. [29] also found chitinase in mature flaxseeds harvested from remediated plots in the Chernobyl region, but at a significantly lower abundance of 0.3% (calculated as a percentage of spot volume in the evaluation of the information obtained on the gel after two-dimensional electrophoresis).

Among the proteins associated with the stress responses of the maturing seed, a PG with the designation “Late embryogenesis abundant (LEA) group 1—embryo development” (AMY26620.1) can be included. LEA proteins have been found in various organisms, including plants. In seed tissues, they act as protein and membrane protectors against drought stress and water deprivation [50].

The PG with the designation “Sequence 3353 from patent US 9878004” (accession number AVY09180.1) was found to be a quantitatively significant item (relative abundance of about 0.9%). Polypeptide of this PG consists of 158 amino acids, and the predicted MW is 17.99 kDa. The function of this PG in flaxseeds is unclear; however, a detailed search of the NCBI and UniProt KB databases revealed a high degree of sequence similarity (around 80%) to small heat shock protein (SHSP) type proteins. SHSPs are found in both prokaryotic and eukaryotic cells and are among the chaperones, and are generally part of the quality control mechanism of cellular proteins with a line of defence function against conditions that threaten the cellular proteome [51]. In plant seeds, the action of SHSPs is not only related to protection against heat stress. The expression of SHSPs in seeds occurs during the ripening process, leading to their accumulation in dry seeds, but their presence disappears after seed germination [52].

A significant finding is the presence of an item (1DWM_A) that forms part of a trypsin inhibitor. On the one hand, protease inhibitors are part of the natural defence of plants against harmful agents, which can be used biotechnologically or in plant protection [2,53], on the other hand, they can have adverse effects on human digestion and utilization of consumed proteins [54].

3.2.4. Other Selected Important Proteins

Among other proteins significant in their relative abundance are enzymes metabolically relevant to mature seed physiology, e.g., glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, fructose-bisphosphate aldolase and malate dehydrogenase, whose presence in flaxseeds is also confirmed in the work of Barvkar et al. [1]. Among the significant PGs found in the flax products we analysed is AVY09175.1, which is probably related to hydroxysteroid dehydrogenase activity and oleosome (oil body) membrane proteins [55]. PGs with significant relative abundance in flax seeds also include allene oxide synthase (P48417.1) with a relative abundance of about 0.6%, which is likely involved in fatty acid biosynthesis, and translational elongation factor (CAI0411675.1) with a relative abundance of about 1%.

3.3. Influence of Cultivar and Concentration Method on Relative Abundance of Main Protein Groups

The relative abundance of individual proteins contained in flaxseed products can be influenced by several factors. Our study evaluated the influence of protein concentration methods producing different flaxseed products (FF and PC) in combination with the influence of cultivars. In terms of evaluating the influence of the concentration method factor, two methods used were chosen as examples of dry and wet processes to increase the protein concentration in products [16,30,56]. The dry process is represented by sieving milled SC through a sieve with a mesh size of 250 μm , while the wet process is represented by the AE/IEP combination. The 250 μm mesh size sieve was chosen, as in our work of Bárta et al. [30], based on our previous experience when we tested sieves with mesh sizes ranging from 180 to 710 μm . The 250 μm mesh sieve provided the best result regarding the protein concentration effect and practical advantages (the sieve did not clog). Analysis of the data set of selected PGs revealed that for 30 PGs out of 33 in total, the concentration method factor had a significantly greater influence than the cultivar factor.

The estimation of the relative abundance of the PGs for the flaxseed products derived from the three cultivars is given in Table 3. From the results, it is evident that SSPs have the highest relative abundance in the flaxseed protein pool. The PGs (especially items CAI0558954.1, CAI0432378.1, CAI0558846.1; CAI0434421.1), which represent 11S globulin or linin, respectively, occupy a relative representation in SC for all three cultivars in the range of 41–44%. Most authors report higher values, e.g., Bekhit et al. [4] report a relative representation of 64–66% for 11S globulin, while another study [7] reports a relative abundance of 70–85% for globulins. The difference may be explained by the fact that in most papers the abundance of globulins is reported as the abundance of the protein fraction soluble in salt solution, which may also contain other proteins. On the other hand, the 7S protein fraction, which is assigned to globulins [1], was not found in our samples.

The wet process of protein concentration using AE/IEP led to a significant increase in the relative abundance of 11S proteins in PC samples (Table 3, Figure 3). This method increased the representation of 11S globulins from a level of 40–46% to a level of 72–84% for the materials of all three cultivars. The effect of cultivar on the concentration of 11S globulins was less significant for the most represented items and was estimated by statistical analysis (variance component) to be 3–11%, while the effect of the concentration method was in the range of 79–95%. The effect of sieving the SC on the concentration of 11S globulins was ambiguous depending on the cultivar (see Figure 3). Alkaline solubilisation (extraction) allows the transition of water-insoluble globulins to the soluble state due to the prevailing isoelectric point (pI) values of globulin proteins. The pI values for 11S flaxseed globulins are reported to be around pH 4.5 [14]. Considering the known fact that proteins are insoluble in environments equal to or close to their pI, alkaline extraction in the pH range of 7.5–9.0 (12.0) allows sufficient “distance” of proteins from their pI value and conversion to a soluble state [56,57]. Increasing the concentration of the alkaline medium, and thus higher pH during extraction, generally increases the yield of proteins [57,58], but also increases the risk of protein damage—denaturation, protein hydrolysis, amino acid racemization, and loss of essential amino acids, including the formation of lysinoalanine with nephrotoxic activity [58,59]. The low residual fat content of the original flour or its defatting with organic solvent is also important, as pH adjustment through hydroxides leads to soap formation when reacting with fat.

The fraction of conlinins (2S albumin) was found in the SC of the evaluated cultivars at the level of 7–9% (Table 3), which is lower than have been reported by other authors. Often, the albumin fraction is reported at 15–30% [5,15]. As can be seen from Figure 3, for conlinins, mechanical sieving (increase from the original 7–9% to 10–13%) has a higher concentration effect than AE/IEP (decrease to 7.5–11%). Sieving resulted in an increase in relative abundance for two cultivars (Agriol, Libra), but AE/IEP resulted in a very low abundance of OLs in PC for the class OLs.

Table 3. Relative abundance of selected protein groups in flaxseed products (seed cake—SC, fine flour—FF; protein concentrate—PC) of three oilseed flax cultivars expressed in relative % (mean ± std. deviation).

| Accession | Protein Name | Agriol | | | Raciol | | | Libra | | |
|--|---|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | SC | FF | PC | SC | FF | PC | SC | FF | PC |
| Seed storage proteins | | | | | | | | | | |
| CAI0558954.1 | unnamed protein product; LINTE | 29.13 c ± 1.30 | 30.44 c ± 0.32 | 53.37 a ± 0.45 | 31.09 bc ± 6.62 | 29.37 c ± 0.43 | 51.71 a ± 1.63 | 26.34 c ± 1.10 | 23.34 c ± 0.28 | 28.83 b ± 4.24 |
| CAI0432378.1 | unnamed protein product; LINTE | 7.12 cd ± 0.14 | 8.06 cd ± 0.70 | 16.08 ab ± 0.83 | 6.39 d ± 0.77 | 7.94 cd ± 0.44 | 14.57 b ± 0.30 | 8.19 cd ± 0.93 | 8.89 c ± 0.19 | 16.88 a ± 0.95 |
| CAI0558846.1 | unnamed protein product; LINTE | 6.69 b ± 0.15 | 6.42 b ± 0.29 | 11.86 a ± 0.55 | 5.21 b ± 0.43 | 5.69 b ± 0.26 | 10.91 a ± 0.28 | 6.37 b ± 0.68 | 6.30 b ± 0.10 | 13.23 a ± 0.20 |
| CAI0434421.1 | unnamed protein product; LINTE | 0.82 bc ± 0.02 | 0.97 bc ± 0.05 | 2.44 a ± 0.10 | 0.65 c ± 0.15 | 0.92 bc ± 0.02 | 2.41 a ± 0.09 | 0.68 c ± 0.03 | 1.06 b ± 0.07 | 2.59 a ± 0.29 |
| CAI0418748.1 | unnamed protein product; LINTE | 0.01 a ± 0.01 | 0.21 a ± 0.02 | 0.27 a ± 0.01 | 0.17 a ± 0.02 | 0.19 a ± 0.03 | 0.17 a ± 0.15 | 0.23 a ± 0.01 | 0.13 a ± 0.11 | 0.20 a ± 0.21 |
| CAC94011.1 | conlinin; LINUS | 7.01 ab ± 1.09 | 9.62 ab ± 1.13 | 7.43 ab ± 1.41 | 5.90 b ± 1.29 | 9.01 ab ± 1.55 | 8.56 ab ± 0.93 | 7.72 ab ± 2.31 | 11.32 a ± 1.01 | 9.72 ab ± 2.51 |
| CAC94010.1 | conlinin; LINUS | 0.24 c ± 0.07 | 0.58 bc ± 0.30 | 0.26 c ± 0.04 | 0.43 c ± 0.16 | 0.31 c ± 0.16 | 0.46 c ± 0.27 | 1.35 ab ± 0.60 | 2.05 a ± 0.25 | 1.46 a ± 0.28 |
| Oleosins | | | | | | | | | | |
| ABB01617.1 | oleosin low molecular weight isoform; LINUS | 0.12 b ± 0.00 | 0.24 ab ± 0.23 | 0.03 b ± 0.02 | 0.23 ab ± 0.15 | 0.15 ab ± 0.01 | 0.05 b ± 0.03 | 0.17 ab ± 0.02 | 0.51 a ± 0.29 | 0.11 b ± 0.07 |
| ABB01620.1 | oleosin low molecular weight isoform, partial; LINUS | 0.17 a ± 0.01 | 0.29 a ± 0.20 | 0.03 a ± 0.01 | 0.30 a ± 0.12 | 0.17 a ± 0.01 | 0.06 a ± 0.03 | 0.26 a ± 0.11 | 0.38 a ± 0.26 | 0.12 a ± 0.07 |
| ABB01616.1 | oleosin high molecular weight isoform; LINUS | 0.98 b ± 0.60 | 1.11 ab ± 0.46 | 0.12 c ± 0.03 | 1.77 a ± 0.11 | 0.60 bc ± 0.01 | 0.16 c ± 0.03 | 0.95 b ± 0.19 | 1.09 ab ± 0.11 | 0.41 bc ± 0.10 |
| ABB01624.1 | oleosin high molecular weight isoform; LINUS | 0.64 abc ± 0.45 | 0.73 abc ± 0.55 | 0.14 c ± 0.01 | 0.18 c ± 0.01 | 1.11 ab ± 0.16 | 0.19 c ± 0.02 | 1.17 ab ± 0.25 | 1.39 a ± 0.32 | 0.44 bc ± 0.18 |
| ABB01618.1 | oleosin low molecular weight isoform; LINUS | 0.14 d ± 0.003 | 0.18 bc ± 0.01 | 0.03 f ± 0.01 | 0.15 cd ± 0.01 | 0.19 b ± 0.01 | 0.04 ef ± 0.01 | 0.17 bc ± 0.01 | 0.22 a ± 0.01 | 0.06 e ± 0.004 |
| ABB01619.1 | oleosin low molecular weight isoform, partial; LINUS | 0.07 ab ± 0.01 | 0.13 ab ± 0.09 | 0.01 b ± 0.005 | 0.14 ab ± 0.05 | 0.09 ab ± 0.01 | 0.02 a ± 0.01 | 0.14 ab ± 0.06 | 0.19 a ± 0.12 | 0.06 ab ± 0.04 |
| Defence and stress-related proteins | | | | | | | | | | |
| WMZ41542.1 | chitinase; LINUS | 9.38 a ± 0.15 | 7.63 b ± 0.06 | 1.28 e ± 0.05 | 10.39 e ± 0.58 | 9.94 a ± 0.25 | 3.14 d ± 0.59 | 6.18 c ± 0.56 | 5.25 c ± 0.12 | 3.21 d ± 0.31 |
| AAW31878.1 | chitinase, partial; LINUS | 0.06 b ± 0.01 | 0.02 de ± 0.002 | 0.004 e ± 0.00004 | 0.10 a ± 0.0004 | 0.05 c ± 0.0003 | 0.01 e ± 0.002 | 0.07 b ± 0.01 | 0.03 d ± 0.003 | 0.01 e ± 0.0003 |
| AMY26620.1 | late embryogenesis abundant (lea) group 1-embryo development; LINUS | 0.39 a ± 0.03 | 0.22 bc ± 0.01 | 0.01 d ± 0.003 | 0.38 a ± 0.07 | 0.16 c ± 0.03 | 0.03 d ± 0.005 | 0.32 ab ± 0.10 | 0.21 bc ± 0.02 | 0.02 d ± 0.01 |
| AVY09180.1 | Sequence 3353 from patent US 9/878004; UNKNOWN | 0.86 a ± 0.01 | 0.91 a ± 0.05 | 0.29 c ± 0.01 | 0.89 a ± 0.08 | 0.95 a ± 0.04 | 0.35 bc ± 0.05 | 0.85 a ± 0.03 | 0.96 a ± 0.02 | 0.45 b ± 0.06 |
| CAI0408810.1 | unnamed protein product; LINTE Chain A, Linum | 0.46 a ± 0.01 | 0.22 c ± 0.01 | 0.04 d ± 0.01 | 0.35 b ± 0.03 | 0.20 c ± 0.01 | 0.04 d ± 0.004 | 0.38 b ± 0.03 | 0.18 c ± 0.003 | 0.06 d ± 0.01 |
| IDWM_A | usitatissimum trypsin inhibitor; LINUS | 1.28 a ± 0.21 | 0.60 bc ± 0.07 | 0.21 cd ± 0.01 | 1.12 a ± 0.29 | 0.62 b ± 0.09 | 0.19 d ± 0.04 | 0.97 ab ± 0.16 | 0.69 b ± 0.05 | 0.21 cd ± 0.05 |
| Other selected important proteins | | | | | | | | | | |
| AVY09175.1 | Sequence 3348 from patent US 9/878004; UNKNOWN | 1.32 b ± 0.04 | 1.32 b ± 0.04 | 0.24 d ± 0.05 | 1.29 b ± 0.11 | 1.25 b ± 0.03 | 0.22 d ± 0.02 | 1.37 ab ± 0.05 | 1.48 a ± 0.01 | 0.55 c ± 0.04 |
| CAI0407981.1 | unnamed protein product; LINTE glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, partial; LINUS | 0.88 c ± 0.02 | 0.85 c ± 0.01 | 0.25 e ± 0.08 | 0.97 bc ± 0.11 | 0.94 bc ± 0.05 | 0.29 e ± 0.04 | 1.11 ab ± 0.07 | 1.18 a ± 0.12 | 0.57 d ± 0.05 |
| CAF22093.1 | fructose-bisphosphate aldolase 1, partial; LINGR | 0.38 ab ± 0.03 | 0.34 b ± 0.003 | 0.05 c ± 0.02 | 0.36 b ± 0.03 | 0.35 b ± 0.02 | 0.05 c ± 0.004 | 0.43 a ± 0.02 | 0.39 ab ± 0.01 | 0.10 c ± 0.02 |
| BAL41455.1 | Allene oxide synthase, chloroplastic; LINUS | 0.33 b ± 0.02 | 0.33 b ± 0.01 | 0.06 c ± 0.01 | 0.33 b ± 0.02 | 0.32 b ± 0.02 | 0.08 c ± 0.005 | 0.39 a ± 0.03 | 0.40 a ± 0.01 | 0.10 c ± 0.02 |
| F48417.1 | cell wall glycosidase, partial; LINUS | 0.67 b ± 0.03 | 0.58 cd ± 0.01 | 0.02 e ± 0.01 | 0.58 cd ± 0.05 | 0.56 d ± 0.02 | 0.02 e ± 0.004 | 0.66 bc ± 0.04 | 0.75 a ± 0.03 | 0.07 e ± 0.01 |
| ABM64783.1 | unnamed protein product; LINTE | 0.04 bc ± 0.003 | 0.04 cd ± 0.003 | 0.03 d ± 0.004 | 0.05 b ± 0.01 | 0.06 a ± 0.002 | 0.04 c ± 0.001 | 0.01 e ± 0.0004 | 0.01 e ± 0.001 | 0.01 e ± 0.001 |
| CAI0384355.1 | unnamed protein product; LINTE | 0.04 a ± 0.002 | 0.03 bc ± 0.002 | 0.01 d ± 0.002 | 0.04 a ± 0.01 | 0.03 c ± 0.001 | 0.01 d ± 0.001 | 0.04 a ± 0.003 | 0.04 ab ± 0.002 | 0.01 d ± 0.002 |
| CAI0431450.1 | unnamed protein product; LINTE | 0.10 ab ± 0.002 | 0.09 b ± 0.002 | 0.02 d ± 0.004 | 0.09 ab ± 0.012 | 0.09 b ± 0.003 | 0.03 d ± 0.003 | 0.11 a ± 0.006 | 0.11 a ± 0.003 | 0.06 c ± 0.005 |
| CAI0412769.1 | unnamed protein product; LINTE | 0.06 ab ± 0.005 | 0.05 b ± 0.003 | 0.003 c ± 0.001 | 0.07 a ± 0.012 | 0.06 ab ± 0.003 | 0.004 c ± 0.002 | 0.05 b ± 0.003 | 0.06 ab ± 0.004 | 0.01 c ± 0.003 |
| AVY09204.1 | Sequence 3377 from patent US 9/878004; UNKNOWN | 0.08 b ± 0.004 | 0.08 b ± 0.003 | 0.01 d ± 0.002 | 0.08 b ± 0.009 | 0.07 b ± 0.002 | 0.01 d ± 0.001 | 0.09 a ± 0.003 | 0.09 ab ± 0.003 | 0.03 c ± 0.001 |

Table 3. Cont.

| Accession | Protein Name | Agriol | | | Raciol | | | Libra | | |
|--------------|--|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| | | SC | FF | PC | SC | FF | PC | SC | FF | PC |
| CAI0440995.1 | unnamed protein product; LINTE | 0.12 ab ± 0.007 | 0.10 b ± 0.006 | 0.01 c ± 0.003 | 0.11 ab ± 0.012 | 0.10 b ± 0.007 | 0.01 c ± 0.002 | 0.13 a ± 0.009 | 0.11 ab ± 0.010 | 0.02 c ± 0.002 |
| CAI0411675.1 | unnamed protein product; LINTE | 1.01 ab ± 0.09 | 1.10 a ± 0.03 | 0.11 c ± 0.03 | 0.95 b ± 0.05 | 1.06 ab ± 0.04 | 0.10 c ± 0.01 | 1.09 a ± 0.05 | 1.12 a ± 0.04 | 0.22 c ± 0.02 |
| AGN56421.1 | non-specific lipid transfer protein 1; LINUS | 0.54 a ± 0.03 | 0.49 ab ± 0.01 | 0.05 d ± 0.003 | 0.47 abc ± 0.03 | 0.43 bc ± 0.04 | 0.06 d ± 0.01 | 0.49 abc ± 0.05 | 0.42 c ± 0.02 | 0.05 d ± 0.01 |
| CAI0414382.1 | unnamed protein product; LINTE | 0.26 a ± 0.02 | 0.25 ab ± 0.07 | 0.03 c ± 0.002 | 0.32 a ± 0.06 | 0.21 ab ± 0.03 | 0.04 c ± 0.01 | 0.24 ab ± 0.03 | 0.30 a ± 0.07 | 0.13 bc ± 0.04 |

Note: Different lower-case letters in rows indicate the statistically significant difference at $p < 0.05$ (Tukey HSD test).

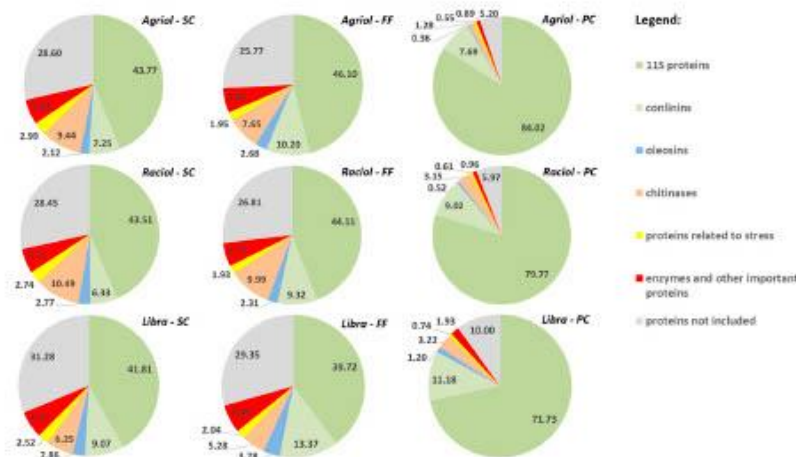


Figure 3. Relative proportions of protein classes depending on the flaxseed product (seed cake—SC, fine flour—FF, protein concentrate—PC) and cultivar.

In the case of chitinase (item WMZ41542.1) and most other PGs of the defence- and stress-related proteins class (items AMY26620.1, CAI0408810.1, 1DWM_A), sieving and AE/IEP leads to a decrease in their abundance in FF and PC. This may be explained by the fact that proteins related to defence and stress reactions are present in higher concentrations in the seed coat and other surface layers of the seed tissues, where they are “closer” to factors attacking or affecting the seed. Sieving with a 250 µm mesh size sieve leads to the separation of coarser particles from the FF. These particles are generated during milling from the surface layers of the seed coat.

For other selected important proteins (mainly quantitatively important enzymes), no significant difference in their relative abundance in SC and FF was found, but a significant decrease in their abundance in PC was observed. Thus, these types of proteins may be found in higher concentrations in the residual flour after the solubilisation phase of the AE/IEP procedure (in the pellet after centrifugation of the extraction mixture) and this material may be an interesting source for their recovery and possible use in biotechnological processes.

From the point of view of food, nutritional and medical applications of flaxseed proteins, the major fractions of proteins such as 11S globulins, 2S albumins and oleosins, are particularly important. From the results presented above, it is evident that mechanical sieving leads to an increase in the relative abundance of 2S albumins in the product. On the contrary, the AE/IEP method significantly increases the relative abundance of 11S globulins, so that the obtained PC can have up to twice higher abundance than SC or FF. This is important information when practical use of their functional properties is required. Kaushik et al. [14] reported that flaxseed protein isolate (also obtained using the AE/IEP method) excels in water binding, has a stabilizing effect on emulsions formed

with sunflower oil and, as discussed in Section 3.2, it may be a “better” protein for cardiac patients due to its low lysine to arginine ratio (only 0.25). Flaxseed protein concentrate may be a good source of bioactive peptides having antibacterial, antioxidant, and antidiabetic effects as well as an angiotensin-converting enzyme inhibition effect due to the amino acid sequence of 11S globulin [15]. Merker et al. [28] highlighted the potential of flaxseed proteins including 11S globulins to produce peptides with an anticarcinogenic effect.

As already mentioned, the effect of cultivar on the different abundances of the PGs evaluated in flaxseed products was lower than the effect of the concentration method. However, for PCs, significant differences were found between cultivars in the relative abundance of 11S globulins. While the high ALA cultivar Libra had a relative abundance of 11S globulins (in total) of 71.73%, the low ALA cultivar Agriol had a relative abundance of 84.02%. These findings suggest that cultivar selection may significantly influence the representation of these proteins in PC, but this idea needs to be further developed in follow-up research by obtaining data from a larger set of cultivars.

4. Conclusions

A total of 2560 protein groups were found within the evaluated flaxseed products (seed cake, fine flour, protein concentrate) prepared from the three oilseed flax cultivars despite the incomplete sequence information for *Linum usitatissimum*. Subsequently, incomplete annotations made creating a functional description rather difficult for most of the identified protein groups.

The only 33 protein groups that were selected for detailed description were identified to have a relative abundance within the protein pool of 69–95%. The conditions combining alkaline solubilisation (at pH 8.5) and subsequent isoelectric precipitation of the proteins (at pH 4.5) significantly increased the relative abundance of 11S globulin-type proteins (from 41–44% to 72–84%) in the resulting protein concentrate, which have high potential for food applications due to their properties and amino acid composition.

Mechanical sieving of milled cake increased the relative amount of 2S albumin in the fine flour (up to the value of 9–13%, depending on the cultivar). Another important protein class, oleosins, was more present in seed cake or fine flour, depending on the cultivar, ranging from 2–4%. Both protein classes (2S albumin and oleosins) have been shown to decrease their abundance in protein concentrate compared to 11S globulins. A surprising and interesting finding is the high relative abundance of chitinase (up to 10% in seed cake and fine flour, respectively), which is part of the plant defence system against microorganisms. The majority of the other protein groups evaluated were enzymes (e.g., glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, fructose-bisphosphate aldolase, or allene oxide synthase), which crossed over to protein concentrate in only a small proportion.

The effect of cultivar on the relative abundance of the proteins evaluated is not negligible, but compared to the method of the protein concentration is significantly lower for the vast majority of identified protein groups. The low ALA cultivar Agriol had the highest relative abundance of 11S globulins (84%), whereas the high ALA cultivar Libra had the lowest relative abundance of 11S globulins (almost 72%). The selection of a suitable cultivar could be an important factor to obtain a protein concentrate with the highest abundance of 11S globulins.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/foods13091288/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, M.J. and J.B. (Jan Bárta); formal analysis, M.J., P.R., J.B. (Jan Bárta), Z.Z., V.B., A.S., F.L., M.B., J.K., E.J., J.B. (Jan Bedrníček) and A.B.; funding acquisition, J.B. (Jan Bárta), Z.Z., V.B., M.B. and J.K.; investigation, M.J., P.R., J.B. (Jan Bárta), Z.Z., V.B., A.S., F.L., M.B., J.K., E.J., J.B. (Jan Bedrníček) and A.B.; methodology, M.J., P.R., J.B. (Jan Bárta) and Z.Z.; project administration, J.B. (Jan Bárta) and V.B.; resources, M.B.; supervision, J.B. (Jan Bárta) and Z.Z.; writing—original draft, M.J., P.R., J.B. (Jan Bárta), Z.Z., V.B. and F.L.; writing—review and editing, M.J., P.R., J.B. (Jan Bárta), Z.Z., V.B. and F.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by the research project QK1910302 of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic and by the project GAJU 080/2022/Z of the Grant Agency of the University of South Bohemia. We acknowledge CEITEC Proteomics Core Facility of CIISB, Instruct-CZ Centre, supported by MEYS CR (LM2023042, e-INFRA CZ (ID:90254)).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Materials, further inquiries can be directed to the corresponding author.

Conflicts of Interest: Author Marie Bjelková is employed by Agritec Plant Research Ltd. She was involved in the preparation of the experiment by selecting the cultivars of oilseed flax, supplying the seeds, preparing the cultivation technology for the experimental flax cultivars, and commenting obtained results for manuscript preparation. Agritec Plant Research did not contribute funds to the project and the preparation of the manuscript. The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

- Barvkar, V.T.; Pardeshi, V.C.; Kale, S.M.; Kadoo, N.Y.; Giri, A.P.; Gupta, V.S. Proteome Profiling of Flax (*Linum usitatissimum*) Seed: Characterization of Functional Metabolic Pathways Operating during Seed Development. *J. Proteome Res.* **2012**, *11*, 6264–6276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Shim, Y.Y.; Gui, B.; Arnison, P.G.; Wang, Y.; Reaney, M.J.T. Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) Bioactive Compounds and Peptide Nomenclature: A Review. *Trends Food Sci. Technol.* **2014**, *38*, 5–20. [[CrossRef](#)]
- Marambe, H.K.; Wanasundara, J.P.D. Protein from Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). In *Sustainable Protein Sources*; Nadathur, S.R., Wanasundara, J.P.D., Scanlin, L., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2017; Chapter 8; pp. 133–144.
- Bekhit, A.E.-D.A.; Shavandi, A.; Jodjaja, T.; Birch, J.; Teh, S.; Ahmed, I.A.M.; Al-Juhaimi, F.A.; Saeedi, P.; Bekhit, A.A. Flaxseed: Composition, Detoxification, Utilization, and Opportunities. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2018**, *13*, 129–152. [[CrossRef](#)]
- Lan, Y.; Ohm, J.-B.; Chen, B.; Rao, J. Physicochemical Properties and Aroma Profiles of Flaxseed Proteins Extracted from Whole Flaxseed and Flaxseed Meal. *Food Hydrocoll.* **2020**, *104*, 105731. [[CrossRef](#)]
- Bueno-Díaz, C.; Biserni, C.; Martín-Pedraza, L.; de las Heras, M.; Blanco, C.; Vázquez-Cortés, S.; Fernández-Rivas, M.; Ba-tanero, E.; Cuesta-Herranz, J.; Villalba, M. Association Between the Seed Storage Proteins 2S Albumin and 11S Globulin and Severe Allergic Reaction after Flaxseed Intake. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* **2022**, *32*, 375–382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mueed, A.; Shibli, S.; Korma, S.A.; Madjirebaye, P.; Esatbeyoglu, T.; Deng, Z. Flaxseed Bioactive Compounds: Chemical Composition, Functional Properties, Food Applications and Health Benefits-Related Gut Microbes. *Foods* **2022**, *11*, 3307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Čeh, B.; Štraus, S.; Hladnik, A.; Kušar, A. Impact of Linseed Variety, Location and Production Year on Seed Yield, Oil Content and Its Composition. *Agronomy* **2020**, *10*, 1770. [[CrossRef](#)]
- Nykter, M.; Kymäläinen, H.-R.; Gates, F. Quality Characteristics of Edible Linseed Oil. *Agric. Food Sci.* **2006**, *15*, 402–413. [[CrossRef](#)]
- Rabetafika, H.N.; Van Remoortel, V.; Danthine, S.; Paquot, M.; Blecker, C. Flaxseed Proteins: Food Uses and Health Benefits. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2011**, *46*, 221–228. [[CrossRef](#)]
- Anastasiu, A.-E.; Chira, N.-A.; Banu, I.; Ionescu, N.; Stan, R.; Rosca, S.-I. Oil productivity of seven Romanian linseed varieties as affected by weather conditions. *Ind. Crop. Prod.* **2016**, *86*, 219–230. [[CrossRef](#)]
- Komartin, R.S.; Stroescu, M.; Chira, N.; Stan, R.; Stoica-Guzun, A. Optimization of oil extraction from *Lallemantia iberica* seeds using ultrasound-assisted extraction. *J. Food Meas. Charact.* **2021**, *15*, 2010–2020. [[CrossRef](#)]
- Gutiérrez, C.; Rubilar, M.; Jara, C.; Verdugo, M.; Sireiro, J.; Shene, C. Flaxseed and Flaxseed Cake as a Source of Compounds for Food Industry. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* **2010**, *10*, 454–463. [[CrossRef](#)]
- Kaushik, P.; Dowling, K.; McKnight, S.; Barrow, C.J.; Wang, B.; Adhikari, B. Preparation, Characterization and Functional Properties of Flax Seed Protein Isolate. *Food Chem.* **2016**, *197 Pt A*, 212–220. [[CrossRef](#)]
- Wu, S.; Wang, X.; Qi, W.; Guo, Q. Bioactive Protein/Peptides of Flaxseed: A Review. *Trends Food Sci. Technol.* **2019**, *92*, 184–193. [[CrossRef](#)]
- Bárta, J.; Bártová, V.; Jarošová, M.; Švajner, J. Proteins of Oilseed Cakes, Their Isolation and Usage Possibilities. *Chem. Listy* **2021**, *115*, 472–480. (In Czech)
- Maghaydah, S.; Alkahlout, A.; Abughoush, M.; Al Khalaleh, N.I.; Olaimat, A.N.; Al-Holy, M.A.; Ajo, R.; Choudhury, I.; Hayajneh, W. Novel Gluten-Free Cinnamon Rolls by Substituting Wheat Flour with Resistant Starch, Lupine and Flaxseed Flour. *Foods* **2022**, *11*, 1022. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Waszkowiak, K.; Mikołajczak, B. The Effect of Roasting on the Protein Profile and Antiradical Capacity of Flaxseed Meal. *Foods* **2020**, *9*, 1383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

19. Perreault, V.; Hénaux, L.; Bazinet, L.; Doyen, A. Pretreatment of flaxseed protein isolate by high hydrostatic pressure: Impacts on Protein Structure, Enzymatic Hydrolysis and Final Hydrolysate Antioxidant Capacities. *Food Chem.* **2017**, *221*, 1805–1812. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Logarušić, M.; Radošević, K.; Bis, A.; Parić, M.; Slivac, I.; Srček, V.G. Biological Potential of Flaxseed Protein Hydrolysates Obtained by Different Proteases. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2020**, *75*, 518–524. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Ye, X.-P.; Xu, M.-F.; Tang, Z.-X.; Chen, H.-J.; Wu, D.-T.; Wang, Z.-Y.; Songzhen, Y.-X.; Hao, J.; Wu, L.-M.; Shi, L.-E. Flaxseed Protein: Extraction, Functionalities and Applications. *Food Sci. Technol.* **2022**, *42*, e22021. [[CrossRef](#)]
22. Qin, X.; Li, L.; Yu, X.; Deng, Q.; Xiang, Q.; Zhu, Y. Comparative Composition Structure and Selected Techno-Functional Elucidation of Flaxseed Protein Fractions. *Foods* **2022**, *11*, 1820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Madhusudhan, K.T.; Singh, N. Isolation and Characterization of a Small Molecular Weight Protein of Linseed Meal. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 2507–2509. [[CrossRef](#)]
24. Marcone, M.F.; Kakuda, Y.; Yada, R.Y. Salt-soluble Seed Globulins of Various Dicotyledonous and Monocotyledonous Plants—I. Isolation/Purification and Characterization. *Food Chem.* **1998**, *62*, 27–47. [[CrossRef](#)]
25. Chung, M.W.Y.; Lei, B.; Li-Chan, E.C.Y. Isolation and Structural Characterization of the Major Protein Fraction from NorMan Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *Food Chem.* **2005**, *90*, 271–279. [[CrossRef](#)]
26. Lojenc, F.; Jarošová, M.; Bedrníček, J.; Smetana, P.; Bárta, J. Structural Characterization and Functional Properties of Flaxseed Hydrocolloids and Their Application. *Foods* **2022**, *11*, 2304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. KołECKA-Majchrzak, K.; Sumara, A.; Fornal, E.; Montowska, M. Proteomic Analysis of Oilseed Cake: A Comparative Study of Species-Specific Proteins and Peptides Extracted from Ten Seed Species. *J. Sci. Food Agric.* **2021**, *101*, 297–306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Merkher, Y.; Kontareva, E.; Alexandrova, A.; Javaraiah, R.; Pustovalova, M.; Leonov, S. Anti-Cancer Properties of Flaxseed Proteome. *Proteomes* **2023**, *11*, 37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Klubicová, K.; Berčák, M.; Danchenko, M.; Skultety, L.; Rashydov, N.M.; Berezina, V.V.; Miernyk, J.A.; Hajdich, M. Agricultural Recovery of a Formerly Radioactive Area: I. Establishment of High-resolution Quantitative Protein Map of Mature Flax Seeds Harvested from the Remediated Chernobyl Area. *Phytochemistry* **2011**, *72*, 1308–1315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Bárta, J.; BártoVá, V.; Jarošová, M.; Švajner, J.; Smetana, P.; Kadlec, J.; Filip, V.; Kyselka, J.; Berčiková, M.; Zdráhal, Z.; et al. Oilseed Cake Flour Composition, Functional Properties and Antioxidant Potential as Effects of Sieving and Species Differences. *Foods* **2021**, *10*, 2766. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Laemmli, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Bárta, J.; Roudnický, P.; Jarošová, M.; Zdráhal, Z.; Stupková, A.; BártoVá, V.; Krejčová, Z.; Kyselka, J.; Filip, V.; Říha, V.; et al. Proteomic Profiles of Whole Seeds, Hulls, and Dehulled Seeds of Two Industrial Hemp (*Cannabis sativa* L.) Cultivars. *Plants* **2024**, *13*, 111. [[CrossRef](#)]
33. Wiśniewski, J.R.; Zougman, A.; Nagaraj, N.; Mann, M. Universal Sample Preparation Method for Proteome Analysis. *Nat. Methods* **2009**, *6*, 359–362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Demichev, V.; Messner, C.B.; Vernardis, S.I.; Lilley, K.S.; Ralser, M. DIA-NN: Neural Networks and Interference Correction Enable Deep Proteome Coverage in High Throughput. *Nat. Methods* **2020**, *17*, 41–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. He, B.; Shi, J.; Wang, X.; Jiang, H.; Zhu, J.H. Label-free Absolute Protein Quantification with Data-independent Acquisition. *J. Proteom.* **2019**, *200*, 51–59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Oomah, B.D.; Mazza, G. Flaxseed Proteins—A Review. *Food Chem.* **1993**, *48*, 109–114. [[CrossRef](#)]
37. Wanasundara, P.K.J.P.D.; Shahidi, F. Removal of Flaxseed Mucilage by Chemical and Enzymatic Treatments. *Food Chem.* **1997**, *59*, 47–55. [[CrossRef](#)]
38. Waszkowiak, K.; Mikołajczak, B.; Kmiecik, D. Changes in Oxidative Stability and Protein Profile of Flaxseeds Resulting from Thermal Pre-treatment. *J. Sci. Food Agric.* **2018**, *98*, 5459–5469. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Waszkowiak, K.; Mikołajczak, B.; Polanowska, K.; Wieruszewski, M.; Siejak, P.; Smulek, W.; Jarzębski, M. Protein Fractions from Flaxseed: The Effect of Subsequent Extractions on Composition and Antioxidant Capacity. *Antioxidants* **2023**, *12*, 675. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Shewry, P.R. Seed proteins. In *Seed Technology and its Biological Basis*; Black, M., Bewley, J.D., Eds.; Sheffield Academic Press Ltd.: Sheffield, UK; CRC Press LLC: Boca Raton, FL, USA, 2000; pp. 42–84.
41. Liu, J.; Shim, Y.Y.; Poth, A.G.; Rearey, M.J.T. Conlinin in Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) Gum and Its Contribution to Emulsification Properties. *Food Hydrocoll.* **2016**, *52*, 963–971. [[CrossRef](#)]
42. Truksa, M.; MacKerzie, S.L.; Qiu, X. Molecular Analysis of Flax 2S Storage Protein Conlinin and Seed Specific Activity of Its Promoter. *Plant Physiol. Biochem.* **2003**, *41*, 141–147. [[CrossRef](#)]
43. Souza, P.F.N. The forgotten 2S albumin proteins: Importance, Structure, and Biotechnological Application in Agriculture and Human Health. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *164*, 4638–4649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Moreno, E.J.; Clemente, A. 2S Albumin Storage Proteins: What Makes them Food Allergens? *Open Biochem. J.* **2008**, *2*, 16–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Bhatla, S.C.; Kaushik, V.; Yadav, M.K. Use of Oil bodies and Oleosins in Recombinant Protein Production and Other Biotechnological Applications. *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28*, 293–300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

46. Liu, C.; Wang, R.; He, S.; Cheng, C.; Ma, Y. The Stability and Gastro-intestinal Digestion of Curcumin Emulsion Stabilized with Soybean Oil Bodies. *LWT* **2020**, *131*, 109663. [[CrossRef](#)]
47. Nikiforidis, C.V. Structure and Functions of Oleosomes (Oil Bodies). *Adv. Colloid Interface Sci.* **2019**, *274*, 102039. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Acevedo-Fari, A.; Dave, A.; Singh, H. Nature-Assembled Structures for Delivery of Bioactive Compounds and Their Potential in Functional Foods. *Front. Chem.* **2020**, *8*, 564021. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Kara, H.H.; Araiza-Calahorra, A.; Rigby, N.M.; Sarkar, A. Flaxseed Oleosomes: Responsiveness to Physicochemical Stresses, Tribological Shear and Storage. *Food Chem.* **2024**, *431*, 137160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Li, Z.; Chi, H.; Liu, C.; Zhang, T.; Han, L.; Li, L.; Pei, X.; Long, Y. Genome-Wide Identification and Functional Characterization of LEA Genes during Seed Development Process in Linseed Flax (*Linum usitatissimum* L.). *BMC Plant Biol.* **2021**, *21*, 193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Carra, S.; Alberti, S.; Benesch, J.L.P.; Boelens, W.; Buchner, J.; Carver, J.A.; Cecconi, C.; Ecroyd, H.; Gusev, N.; Hightower, L.E.; et al. Small Heat Shock Proteins: Multifaceted Proteins with Important Implications for Life. *Cell Stress Chaperon.* **2019**, *24*, 295–308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Waters, E.R.; Vierling, E. Plant Small Heat Shock Proteins—Evolutionary and Functional Diversity. *New Phytol.* **2020**, *227*, 24–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Clemente, M.; Corigliano, M.G.; Pariani, S.A.; Sánchez-López, E.F.; Sander, V.A.; Ramos-Duarte, V.A. Plant Serine Protease Inhibitors: Biotechnology Application in Agriculture and Molecular Farming. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Anaya, K.; Cruz, A.C.B.; Cunha, D.C.S.; Monteiro, S.M.N.; dos Santos, E.A. Growth Impairment Caused by Raw Linseed Consumption: Can Trypsin Inhibitors Be Harmful for Health? *Plant Foods Hum. Nutr.* **2015**, *70*, 338–343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Shao, Q.; Liu, X.; Su, T.; Ma, C.; Wang, P. New Insights Into the Role of Seed Oil Body Proteins in Metabolism and Plant Development. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 1568. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Contreras del Mar, M.; Lama-Muñoz, A.; Gutiérrez-Pérez, J.M.; Espinola, F.; Moya, M.; Castro, E. Protein Extraction from Agri-food Residues for Integration in Biorefinery: Potential Techniques and Current Status. *Bioresour. Technol.* **2019**, *280*, 459–477. [[CrossRef](#)]
57. Rodrigues, I.M.; Coelho, J.F.J.; Graça, M.; Carvalho, V.S. Isolation and Valorisation of Vegetable Proteins from Oilseed Plants: Methods, Limitations and Potential. *J. Food Eng.* **2012**, *109*, 337–346. [[CrossRef](#)]
58. Hadidi, M.; Aghababaei, F.; McClements, D.J. Enhanced Alkaline Extraction Techniques for Isolating and Modifying Plant-Based Proteins. *Food Hydrocoll.* **2023**, *145*, 109132. [[CrossRef](#)]
59. Hou, E.; Ding, W.; Qu, W.; Oladejo, A.O.; Xiong, F.; Zhang, W.; He, R.; Ma, H. Alkali Solution Extraction of Rice Residue Protein Isolates: Influence of Alkali Concentration on Protein Functional, Structural Properties and Lysinoalanine Formation. *Food Chem.* **2017**, *218*, 207–215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

V předchozí publikaci tohoto bloku byly charakterizovány bílkoviny ve výliscích semen lnu a z nich získaných produktů. Proséváním původní výliskové mouky na sítu s velikostí otvorů 250 μm lze získat jemnou výliskovou mouku s koncentrovanějším obsahem bílkovin v porovnání se samotnými výlisky. Tyto produkty se vyznačují obsahem bílkovin menším než 65 %, u výlisků lněných semen tento obsah činí 29-30 % a u jemné mouky 34-36 %. Princip prosévání je jedním ze způsobů koncentrování bílkovin v rámci tzv. suchého procesu. Kromě prosévání zahrnuje tento postup také separaci částic v proudu vzduchu, gravitační separaci nebo elektrostatickou separaci. Efektivnějším způsobem koncentrování bílkovin je nicméně tzv. mokřý proces. Jeho principem je alkalická nebo solná solubilizace ve vodném prostředí nebo solném roztoku, následovaná isoelektrickým srážením nebo membránovými procesy. Mokrou cestou lze získat bílkovinný koncentrát s obsahem bílkovin 65-90 %. V rámci předchozí studie kolísal obsah bílkovin tohoto typu produktu v případě lněných semen v rozmezí 70-78 %. Vhodnou optimalizací nebo kombinací uvedených, či analogických, metod je možné vytvořit koncentrovaný izolát obsahující typicky více než 90 % bílkovin. Uvedenými postupy lze získat bílkovinné produkty také z výlisků semen a plodů dalších rostlin, využívaných pro produkci konzumního oleje, např. konopí, ostropestřce, řepky, slunečnice, sóji a tykve. Nicméně, komplikaci při produkci koncentrátů a izolátů bílkovin ze semen lnu či jejich výlisků představuje přítomnost slizotvorných polysacharidů a jejich problematické odstraňování.

Zmíněné produkty bohaté na bílkoviny vykazují funkční vlastnosti v podobě schopností vázat vodu a tuk, vytvářet stabilní gely a pěny, vyznačují se rovněž emulgační aktivitou a viskoelastickými vlastnostmi. Enzymová hydrolýza bílkovinných koncentrátů a izolátů může vést v částečném provedení ke zlepšení funkčních vlastností, v případě kompletní hydrolýzy pak k produkci peptidů vyznačujících se antioxidačními, antimikrobiálními, protizánětlivými, antihypertenzními nebo antipyretickými vlastnostmi. Bílkovinné produkty získané ze semen a plodů významných olejných plodin lze využít jako suroviny pro výrobu různých skupin potravinářských výrobků, zejména cereálních, masných a mléčných či speciálních výrobků a ochucovadel. Konkrétním možností valorizace výlisků lněného semene a odvozených bílkovinných produktů se podrobněji věnuje následující kapitola 4.5.

Bílkoviny výlisků semen a plodů olejních rostlin lze díky svojí kvalitě, funkčním vlastnostem a dostupnosti považovat za částečnou nebo plnohodnotnou alternativu k bílkovinám živočišného původu. S ohledem na ekonomické a ekologické aspekty a požadavky společnosti na zdraví životní styl lze očekávat zvyšující se nároky na konzumaci rostlinných bílkovin a možnosti jejich získávání z vedlejších produktů při zpracování rostlin.

Kompletní informace a zdroje vztahující se k dané problematice a výše uvedené anotaci jsou uvedeny v publikaci:

Bárta, J., Bártová, V., **Jarošová, M.**, Švajner, J. (2021). Proteins of Oilseed Cakes, Their Isolation and Usage Possibilities. *Chemické Listy*, 115(9): 472-480.

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

Předchozí kapitola disertační práce byla zaměřená na možnosti koncentrace bílkovin lněných semen a výlisků, přičemž v ní byly zmíněny funkční vlastnosti a možnosti využití těchto bílkovinných produktů pro obohacování potravin. Poslední část disertační práce na tu předchozí navazuje, nicméně se komplexněji zaměřuje na konkrétní možné aplikace lněných, v širším měřítku pak také ostatních olejných plodin, výlisků a jejich velikostních frakcí.

Jak bylo uvedeno v předchozích dvou 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 homogenátem 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, světlíce barvířské (*Carthamus tinctorius* L.), brukve řepky olejky (*Brassica napus* L.) a slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.).

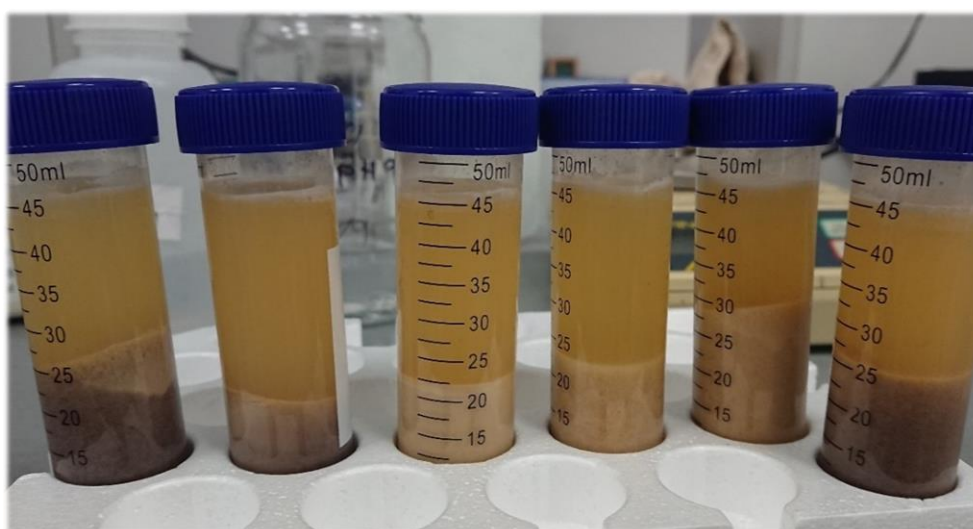
Výlisky byly získány lisováním semen za studena využitím poloprofesionálního hydraulického lisu při teplotě nižší než 50 °C. Příprava výliskové mouky byla provedena z výlisků dle ověřeného postupu (Obr. 16). Velikostní frakce byly získány prosíváním celkové výliskové mouky pomocí sít s velikostí otvorů 250 µm. Vzorky výliskové mouky (Obr. 17) 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.



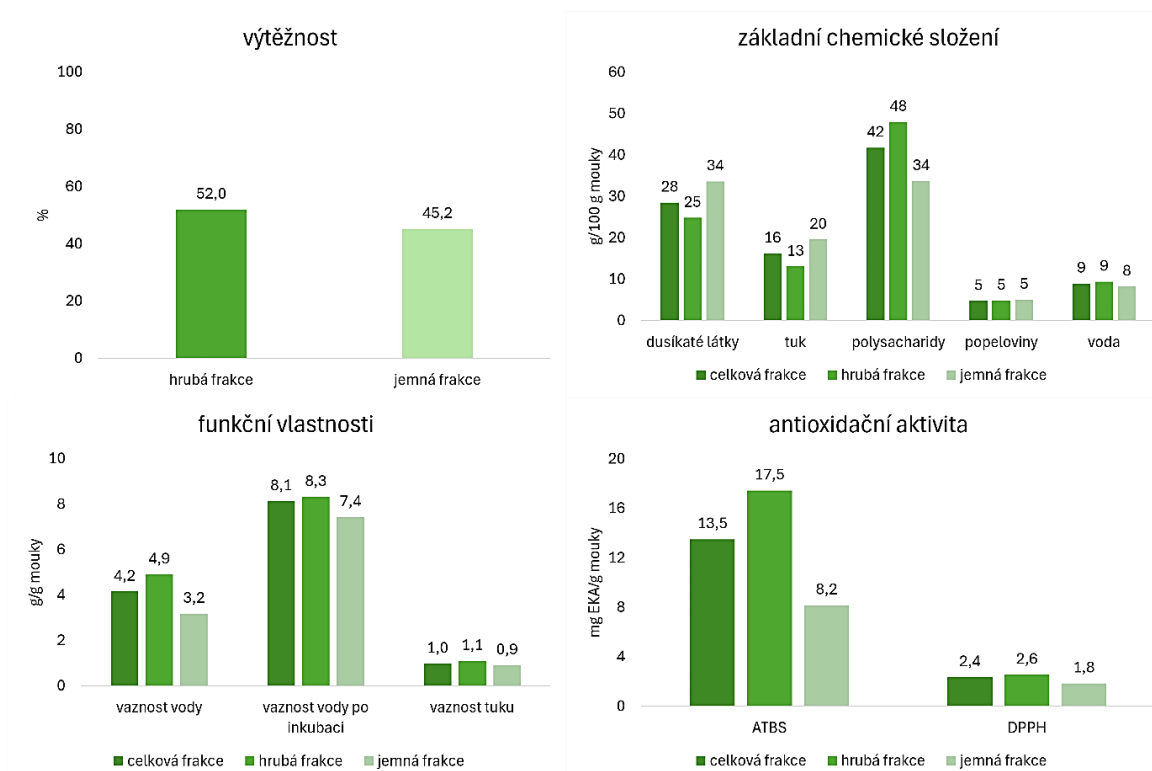
Obr. 16: Obecný postup zpracování výlisků olejných semen a vliv prosévání na vybrané vlastnosti hrubé a jemné frakce výliskové mouky lnu setého (převzato a upraveno podle Bárta et al., 2021)

obsah sach. = obsah sacharidů



Obr. 17: Vzoroký výliskové mouky a jejích produktů v průběhu analýzy rozpustnosti

Na základě získaných výsledků byly v případě lnu prokázány relativně velké rozdíly v obsahu dusíkatých látek, tuků a polysacharidů mezi analyzovanými vzorky (Obr 18). 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 vylisková 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 vylisková 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 jemné 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 vyliskových mouk byla u všech plodin ovlivněna proséváním. Konkrétně byla jemná mouka, s výjimkou máku, vždy světlejší v porovnání s celkovou a hrubou moukou.



Obr. 18: Výtěžnost hrubé a jemné frakce vyliskové mouky; základní chemické složení, funkční vlastnosti a antioxidační aktivity celkové, hrubé a jemné frakce vyliskové mouky (převzato a upraveno podle Bárta et al., 2021)

EKA = ekvivalent kyseliny askorbové, ABTS = antioxidační aktivity vyjádřená zhášením radikálu ABTS, DPPH = antioxidační aktivity vyjádřená zhášením radikálu DPPH, inkubace vyjadřuje tepelné ošetření směsi výliskové mouky a vody při 100 C°

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 olejnin 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.

Kompletní informace a zdroje vztahující se k dané problematice a výše uvedené anotaci jsou uvedeny v publikaci:

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.

Article

Oilseed Cake Flour Composition, Functional Properties and Antioxidant Potential as Effects of Sieving and Species Differences

Jan Bárta ¹, Veronika Bártová ^{1,*}, Markéta Jarošová ¹, Josef Švajner ¹, Pavel Smetana ², Jaromír Kadlec ², Vladimír Filip ³, Jan Kyselka ³, Markéta Berčíková ³, Zbyněk Zdráhal ⁴, Marie Bjelková ⁵ and Marcin Kozak ⁶

- ¹ Department of Plant Production, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, 370 05 České Budějovice, Czech Republic; barta@zf.jcu.cz (J.B.); jarosm08@zf.jcu.cz (M.J.); svajn00@zf.jcu.cz (J.Š.)
 - ² Department of Food Biotechnology and Agricultural Products Quality, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, 370 05 České Budějovice, Czech Republic; smetana@zf.jcu.cz (P.S.); kadlec@zf.jcu.cz (J.K.)
 - ³ Department of Dairy, Fat and Cosmetics, University of Chemistry and Technology, 166 28 Prague, Czech Republic; Vladimír.Filip@vscht.cz (V.F.); Jan.Kyselka@vscht.cz (J.K.); Marketa.Bercikova@vscht.cz (M.B.)
 - ⁴ Mendel Centre of Plant Genomics and Proteomics, Central European Institute of Technology, Masaryk University, 625 00 Brno, Czech Republic; zdrahal@sci.muni.cz
 - ⁵ Department of Legumes and Technical Crops, Agritec Plant Research, Ltd., 787 01 Šumperk, Czech Republic; bjelkova@agritec.cz
 - ⁶ Institute of Agroecology and Plant Production, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, 50-363 Wrocław, Poland; marcin.kozak@upwr.edu.pl
- * Correspondence: vbartova@zf.jcu.cz; Tel.: +420-387772922



Citation: Bárta, J.; Bártová, V.; Jarošová, M.; Švajner, J.; Smetana, P.; Kadlec, J.; Filip, V.; Kyselka, J.; Berčíková, M.; Zdráhal, Z.; et al. Oilseed Cake Flour Composition, Functional Properties and Antioxidant Potential as Effects of Sieving and Species Differences. *Foods* **2021**, *10*, 2766. <https://doi.org/10.3390/foods10112766>

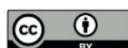
Academic Editor: Alessandra Bendini

Received: 5 October 2021

Accepted: 3 November 2021

Published: 11 November 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Oilseed cakes are produced as a by-product of oil pressing and are mostly used as feed. Their use for human consumption is due to the functional properties and benefits for human health. Herein, oilseed cake flours of eight species (flax, hemp, milk thistle, poppy, pumpkin, rapeseed, safflower, sunflower) were sieved into fractions above (A250) and below (B250) 250 µm. The chemical composition, SDS-PAGE profiles, colour, functional properties and antioxidant activities of these flours were evaluated. The B250 fractions were evaluated as being protein and ash rich, reaching crude protein and ash content ranging from 31.78% (milk thistle) to 57.47% (pumpkin) and from 5.0% (flax) to 11.19% (poppy), respectively. A high content of carbohydrates was found in the flours of hemp, milk thistle and safflower with a significant increase for the A250 fraction, with a subsequent relation to a high water holding capacity (WHC) for the A250 fraction (flax, poppy, pumpkin and sunflower). The A250 milk thistle flour was found to have the richest in polyphenols content (TPC) (40.89 mg GAE/g), with the highest antioxidant activity using an ABTS•+ assay (101.95 mg AAE/g). The A250 fraction for all the species exhibited lower lightness than the B250 fraction. The obtained results indicate that sieving oilseed flour with the aim to prepare flours with specific functional characteristics and composition is efficient only in combination with a particular species.

Keywords: oilseed cake flour; protein; antioxidant activity; hemp; flax; milk thistle; poppy; sunflower; rapeseed

1. Introduction

Oilseed species are an important group of crop plants whose oil is edible and suitable for human consumption. Only a few species are significant in the total world trade out of about 40 different oil seeds [1]. The major oilseed producing areas are in the temperate zones. America and Europe together account for more than 60% of the world production. *Brassica* species are the second-largest oilseed crop after soybean in the world production, surpassing peanut, sunflower and cottonseed during the last two decades [2]. Minor

oilseed crops that are cultivated in Central Europe include flax, hemp, milk thistle, poppy, pumpkin or safflower.

As a by-product of oil pressing, oilseed cakes are produced, which are mostly used as feed for farm animals because they contain significant amounts of protein and other valuable substances [3–5]. However, the increasing human population induces demand for more rational use of food processing by-products [5,6]. The compositions of oilseeds differ according to individual species or cultivars. In general, oilseeds and the produced oilseed cakes represent functional food ingredients, as they are rich in oleochemicals, phytochemicals with antioxidant activity, proteins, ash, fibre, carbohydrates, vitamins and minerals [6]. Oilseed cakes can serve as substrates for the production of bioactive compounds (proteins, dietary fibre, antioxidants) with beneficial characteristics for health that can be used in foods, cosmetics, textile and pharmaceutical industries. Moreover, they can also be used as substrates for the production of enzymes, antibiotics or mushrooms [5].

Predominantly, oilseed cakes and subsequently oilseed cake flour are valuable sources of gluten-free proteins [7] that are suitable alternatives for replacing animal or other plant sources of protein since they are easily digestible, non-toxic and nutritionally sufficient [7–9]. Cold press cakes of sunflower, flaxseed, pumpkin or hemp contain 19.9–44.9, 14.4–41.9, 29.4–53.9 and 23.5–33.6% crude proteins, respectively [5,7,9]. The pressed cakes could be transformed into flour, protein concentrates and protein isolates with protein contents of <65, 65–90 and >90%, respectively, as well as hydrolysates [6]. The obtained oilseed cake products with high protein content display high water-holding and fat absorption capacities, emulsifying and foaming activities and stability [7,10]. Protein concentrates and isolates are more suitable than oilseed cake flour for fortifying food products with plant proteins, but “wet” technology (including aqueous extraction, chemical use, drying) is needed to produce them, where these are technically and economically more demanding processes. The protein content of flour can be increased by separating the protein-rich fraction of fine particles from the fraction of coarser particles using dry methods. Sieving, which is one of the dry methods, can be used as a technically and economically inexpensive solution [11–13].

The use of oilseed cakes and flours for the fortification of various types of food products is already well described [9,14–16]. Knowledge of functional properties and composition is key to finding the optimal use, but this information is often very fragmented and the data presented are often limited to the evaluation of an individual species. For this reason, the aim of the present work was to assess the impact of sieving on the content and composition of nutritionally and biologically valuable components and selected functional properties in the oilseed cake flours of the eight selected oilseed crops, namely, flax (*Linum usitatissimum* L.), hemp (*Cannabis sativa* L.), milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.), poppy (*Papaver somniferum* L.), pumpkin (*Cucurbita pepo* L. var. *oleifera*), rapeseed (*Brassica napus* L.), safflower (*Carthamus tinctorius* L.) and sunflower (*Helianthus annuus* L.). This work brings new information regarding the composition, functional properties and potential usability of various fraction sizes of the oilseed cake flours in relationship to the species.

2. Materials and Methods

2.1. Industrial Processing of Oilseeds, Milling of Oilseed Cake and Preparation of Flour Fractions

Industrial moistening and screw pressing of oilseeds, namely, flax (*Linum usitatissimum* L.), hemp (*Cannabis sativa* L.), milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.), poppy (*Papaver somniferum* L.), rapeseed (*Brassica napus* L.), safflower (*Carthamus tinctorius* L.) and sunflower (*Helianthus annuus* L.) were done using direct saturated steam injection at 95 °C with a cold screw pressing operated at a temperature below 50 °C. The industrial processing of pumpkin seeds (*Cucurbita pepo* L. var. *oleifera*) consisted of milling, moistening at 70 °C, roasting (130 °C, 30 min) and cold pressing using a hydraulic press that was operated at a temperature below 50 °C. Cold oilseed cakes of eight oilseed species were vacuum packed

and kindly donated by AGRO-EL Ltd. (Znojmo, Czech Republic) for further determination of the functional properties.

The oilseed cakes were milled using the knife mill Grindomix GM200 (Retsch, Haan, Germany) under 10,000 rpm for 1 min and subsequently separated by sieving into size fractions (laboratory sieve system Retsch SATURN, Retsch, Germany). Finally, three size fractions of the oilseed cake flour were obtained: whole oilseed cake flour (WF) and oilseed cake flour fractions above 250 μm (A250) and below 250 μm (B250). The yields of the sieving fractions is given in Table 1. The contents of the dry matter, nitrogen components (crude protein), lipids (crude fat), carbohydrates, ash and moisture were determined in each of the flour fractions. Moreover, the obtained fractions were analysed for their SDS-PAGE protein profiles, water solubility, water and fat holding capacity, total phenolic content, antioxidant activity and colour profiles. All analyses were performed in triplicate.

Table 1. Yields of the sieving fractions.

| Oil Cake | Yield (%) | |
|--------------|-----------|-------|
| | A250 | B250 |
| Flax | 51.95 | 45.15 |
| Hemp | 61.99 | 35.20 |
| Milk thistle | 50.01 | 49.06 |
| Poppy | 41.41 | 56.50 |
| Pumpkin | 38.04 | 59.79 |
| Rapeseed | 49.57 | 48.00 |
| Safflower | 68.45 | 30.64 |
| Sunflower | 56.53 | 41.51 |

2.2. Proximate Composition

The ground and homogenised samples were analysed for water content using the gravimetric method (AOAC 925.10), crude protein content ($\text{N} \times 6.25$) using the Dumas method, crude fat content using the Soxhlet method (AOAC 935.38) and ash content (AOAC 923.03) [17].

The moisture of the samples (2 g) was determined via drying them to a constant weight in a drying oven (Mettler oven U110, Mettler GmbH + Co. KG, Buechenbach, Germany), which was maintained at 105 °C for 3 h.

The crude protein content was determined via the modified combustion method according to the Dumas method using the rapid N elementary analyser (Rapid N exceed, Elementar Analysen Systeme, Langenselbold, Germany). Each sample was analysed in triplicate and the crude protein (protein nitrogen) was calculated as nitrogen content multiplied by a factor of 6.25.

The crude fat content was measured via the Soxhlet extraction method with petroleum ether using an automatic extraction system ANKOM XT 10 Extractor (ANKOM Technology, Macedon, NY, USA) according to the producer's manual. Crude fat values were calculated from the weight difference before and after extraction.

The ash content was measured as the total amount of inorganic residues remaining after the organic matter incineration by heating oilcake samples in a muffle furnace (muffle furnace LE 09/11, LAC s.r.o., Židlochovice, Czech Republic) at 550 °C for 5 h.

The carbohydrates content was calculated as the remainder up to 100% of the sample dry matter (DM) after subtraction of the sum of all determined other component contents.

2.3. Water Solubility and Water Holding Capacity

Water solubility (WS) and water holding capacity (WHC) of the oilseed cake fractions were determined by mixing 300 mg of flour dry matter (DM) with 5 mL of deionised water. The tubes with the mixture were allowed to stand at room temperature for 30 min under continuous shaking. The samples were centrifuged (15 min, 3600 $\times g$, 20 °C) (ROTINA 420/420R, Hettich Instruments, Beverly, MA, USA). The supernatant was discarded and

tubes with pellet were weighed, freeze-dried ($-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $<0.420\text{ mbar}$, 48 h) (ALPHA 1–4 LSD, Martin Christ, Osterode am Harz, Germany) and weighed again. The solubility and water holding capacity were computed from the obtained weight data according to the following formulas (Equations (1)–(3)):

$$\text{WS (\%)} = 100 \times (\text{ms} - \text{mlp})/\text{ms} \quad (1)$$

$$\text{WHC (g/g)} = (\text{mwp} - \text{mlp})/\text{ms} \quad (2)$$

$$\text{WHCnon-soluble part (g/g)} = (\text{mwp} - \text{mlp})/\text{mlp} \quad (3)$$

where WS is the water solubility of sample DM (%), ms is the weight of the sample (g), mlp is the weight of the freeze-dried pellet (g), WHC is the water-holding capacity of the samples (g of water per g DM), mwp is the weight of the wet pellet (g) and WHCnon-soluble part is the water-holding capacity of the DM of oilseed cake flour's non-soluble part (g of water per g of non-soluble part DM).

The values of WS and WHC after boiling were determined using the same analytical procedure as described for the unprocessed samples. The solubility (Equation (4)) and water holding capacity were computed from the obtained weight data:

$$\text{WHCnon-soluble part after boiling (g/g)} = (\text{mwpab} - \text{mlpab})/\text{mlpab} \quad (4)$$

where WHCnon-soluble part after boiling is the water-holding capacity of the non-soluble part of flour after boiling (g of water per g of non-soluble part DM), mwpab is the weight of the wet pellet after boiling (g) and mlpab is the weight of the freeze-dried pellet after boiling (g).

2.4. Fat-Holding Capacity

The fat-holding capacity (FHC) was determined similarly to the WHC with some differences: 5 mL rapeseed oil was used instead of water. The supernatant (oil phase) was discarded after centrifugation and the tubes with the pellet were weighed. The FHC values were computed from the weight of the fatted pellet (Equation (5)):

$$\text{FHC (g/g)} = (\text{mfs} - \text{ms})/\text{ms} \quad (5)$$

where FHC is fat-holding capacity (g of oil per g of DM), mfs is the weight of the fatted pellet (g) and ms is the weight of the sample (g).

2.5. Colour Analysis

The colours of the oilseed cake flour samples were measured using a ColorEye® XTH colourimeter (X-Rite, Grand Rapids, MI, USA), which is based on the CIE (Commission Internationale de l'Eclairage) system and provides L^* , a^* and b^* parameters (L^* : lightness, 0%—black, 100%—white; a^* : red—green; b^* : yellow—blue). The analyses were performed in triplicate.

2.6. Total Phenolic Content

The total phenolic content (TPC) was determined spectrophotometrically using Folin-Ciocalteu's reagent after the previous extraction of phenolics using 80% ethanol with a solid-to-solvent ratio of 1:20. The extraction was performed over 24 h at room temperature and the mixture was then centrifuged ($3600 \times g$, 10 min), filtered and subsequently refrigerated at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. The extracts were analysed according to Lachman et al. [18] with some modifications. Briefly, 20 μL of extract and 1980 μL of distilled water were mixed with 100 μL of Folin-Ciocalteu's phenol reagent, followed by the addition of 300 μL of 20% (w/v) sodium carbonate. The absorbance was read at $\lambda = 750\text{ nm}$ (BioMate 5 spectrophotometer, Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA) after 2 h. Gallic acid was used for calibration. All measurements were repeated three times and the results were expressed as milligrams of gallic acid equivalent (GAE) per gram of sample fresh matter (FM).

2.7. Antioxidant Activity

The oilseed fraction extracts for the determination of antioxidant activity were prepared as described for TPC (Section 2.6). Antioxidant activity was measured using the ABTS and DPPH methods according to Sulc et al. [19] with modifications. Ascorbic acid was used for the calibration. All measurements were repeated three times and the results were expressed as milligrams of ascorbic acid equivalent (AAE) per gram of sample FM.

Radical scavenging activity with the ABTS•+ method: ABTS•+ radical was produced by dissolving 54.8 mg 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) and 1.0 g MnO₂ in 20 mL of ultrapure water. The filtered solution (PTFE 0.25 µm) was diluted in 5 mM phosphate buffer to an absorbance of 0.800 ± 0.01 at λ = 734 nm. The absorbance of the reaction mixture was measured at λ = 734 nm 1 min after the addition of 100 µL of sample extract to 1 mL of the radical solution.

Radical scavenging activity with the DPPH• method: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical in an amount of 0.025 g was dissolved in 100 mL of methanol to obtain a stock solution. The reaction mixture was prepared from 975 µL of 10% (v/v) DPPH• stock solution and 25 µL of the analysed extract. The absorbance of the reaction mixture was measured at 515 nm after incubation at room temperature for 30 min.

2.8. Electrophoretic Analysis of Oilseed Cake Protein Profiles

Oilseed cake flour samples were extracted at 4 °C for 4 h using an SDS extraction buffer (0.065 M Tris-HCl, pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) 2-sulphanylethanol). Protein separation was carried out in duplicate using cooled dual vertical slab units SE 600 (Hoefer Inc., Holliston, MA, USA) with a discontinuous gel system (4% stacking and 12% resolving gel) in reduction conditions [20]. Protein detection was performed by using Coomassie Brilliant Blue R-250.

2.9. Statistics

The program Statistica 12 (StatSoft Power Solutions Inc., Palo Alto, CA, USA) was used for the data analysis. Data were subjected to analyses of variance using the two-way ANOVA method and the means were compared using the Fisher test. Differences between the variants were considered significant at $p < 0.05$ unless stated otherwise.

3. Results and Discussion

3.1. Proximate Analysis of Oilseed Cake Flours

The approximate compositions of all variants that were derived from the oil cake flours are given in Table 2. The contents of crude proteins, crude fat, ash, carbohydrates and moisture were evaluated using two-way ANOVA (Fisher's LSD test). Significant differences were found for most of the variants. The crude protein content in the whole oilseed cake flour (WF) ranged widely from 14.21% (safflower) to 59.12% (pumpkin) of the FW. Except for pumpkin, the sieving process increased the crude protein content. The size fractions with finer particles (B250) reached a higher proportion of crude protein and these differences were statistically significant in most cases. The crude protein level of the fine fractions ranged from 31.78% (milk thistle) to 57.47% (pumpkin). The highest differences between the A250 and B250 fractions were observed for species hemp, safflower, milk thistle and sunflower. Insignificant differences between the size fractions were found for poppy and pumpkin. The significant increase in crude protein content in several species (hemp, milk thistle, safflower and sunflower) in the B250 fraction resulted from the different structures of their seeds, including the pericarp. In agreement with our results, Zając et al. [9] and Lan et al. [21] reported an average crude protein content ranging from 24 to 28% for non-dehulled hemp seeds and Shen et al. [18] determined 32.7 and 41.8% of crude protein content for non-dehulled and dehulled hempseed flour, respectively. Similarly, from the data of Murru and Calvo [13], sunflower seed hulls made up to 30% of the seed weight and have poor nutritional properties due to their minimal content of protein and lipids. Sunflower hull contains only 3% protein and 61% fibre, while fully

dehulled sunflower meal contained up to 63% protein and only 9% fibre, as presented by Murru, Calvo [13].

Table 2. Composition analysis of oil cake flours from eight selected oil crops.

| Oilseed Cake | Crude Protein (%) | Crude Fat (%) | Carbohydrates (%) | Ash (%) | Moisture (%) |
|--------------|-------------------|----------------|-------------------|----------------|-----------------|
| Flax | | | | | |
| WF | 28.46 ± 0.44 hi | 16.16 ± 0.11 b | 41.74 ± 0.37 j | 4.73 ± 0.03 o | 8.92 ± 0.10 b |
| A250 | 24.81 ± 0.60 j | 13.03 ± 0.26 d | 47.97 ± 0.29 gh | 4.80 ± 0.01 o | 9.38 ± 0.10 a |
| B250 | 33.58 ± 0.47 f | 19.56 ± 0.10 a | 33.65 ± 0.44 m | 5.00 ± 0.04 n | 8.21 ± 0.15 cde |
| Hemp | | | | | |
| WF | 28.25 ± 0.42 hi | 8.61 ± 0.24 i | 50.23 ± 0.66 f | 5.34 ± 0.02 m | 7.56 ± 0.33 fg |
| A250 | 18.83 ± 2.42 l | 6.30 ± 0.14 m | 62.19 ± 2.31 d | 4.22 ± 0.08 p | 8.46 ± 0.09 c |
| B250 | 45.69 ± 0.44 c | 10.24 ± 0.11 g | 27.84 ± 0.41 o | 7.65 ± 0.04 g | 8.58 ± 0.12 bc |
| Milk thistle | | | | | |
| WF | 22.56 ± 0.36 k | 4.84 ± 0.23 o | 63.73 ± 0.23 d | 5.78 ± 0.03 jk | 3.09 ± 0.66 l |
| A250 | 10.75 ± 1.20 n | 2.27 ± 0.44 p | 78.17 ± 1.36 a | 3.61 ± 0.03 q | 5.20 ± 0.05 k |
| B250 | 31.78 ± 1.61 g | 5.46 ± 0.21 n | 49.49 ± 1.74 fg | 8.11 ± 0.04 f | 5.16 ± 0.50 k |
| Poppy | | | | | |
| WF | 34.75 ± 0.44 ef | 10.49 ± 0.13 g | 36.03 ± 0.43 kl | 10.90 ± 0.01 b | 7.84 ± 0.15 ef |
| A250 | 34.66 ± 0.36 ef | 9.75 ± 0.05 h | 37.32 ± 0.23 k | 10.94 ± 0.09 b | 7.33 ± 0.09 gh |
| B250 | 35.42 ± 0.49 e | 11.25 ± 0.23 f | 34.62 ± 0.67 lm | 11.19 ± 0.02 a | 7.52 ± 0.03 fg |
| Pumpkin | | | | | |
| WF | 59.12 ± 0.47 a | 12.36 ± 0.26 e | 14.39 ± 0.67 p | 9.14 ± 0.06 d | 4.99 ± 0.14 k |
| A250 | 60.38 ± 0.31 a | 8.95 ± 0.06 i | 14.67 ± 0.39 p | 9.42 ± 0.11 c | 6.58 ± 0.18 i |
| B250 | 57.47 ± 0.46 b | 13.65 ± 0.05 c | 14.06 ± 0.65 p | 8.94 ± 0.03 e | 5.88 ± 0.31 j |
| Rapeseed | | | | | |
| WF | 29.84 ± 1.50 h | 12.52 ± 0.19 e | 43.84 ± 1.67 i | 5.73 ± 0.12 k | 8.08 ± 0.14 de |
| A250 | 24.96 ± 0.54 j | 8.82 ± 0.42 i | 52.30 ± 0.76 e | 5.49 ± 0.08 l | 8.43 ± 0.09 cd |
| B250 | 33.52 ± 0.18 f | 15.89 ± 0.13 b | 37.42 ± 0.35 k | 5.90 ± 0.02 ij | 7.27 ± 0.28 gh |
| Safflower | | | | | |
| WF | 14.21 ± 1.20 m | 8.00 ± 0.16 j | 69.30 ± 0.92 c | 2.51 ± 0.31 r | 5.98 ± 0.03 j |
| A250 | 8.38 ± 1.97 o | 7.17 ± 0.15 k | 75.19 ± 2.10 b | 2.07 ± 0.03 s | 7.20 ± 0.03 gh |
| B250 | 34.29 ± 1.06 ef | 6.75 ± 0.09 l | 46.72 ± 0.86 h | 5.11 ± 0.04 n | 13 ± 0.12 h |
| Sunflower | | | | | |
| WF | 34.41 ± 0.51 ef | 12.47 ± 0.07 e | 40.52 ± 0.77 j | 5.99 ± 0.01 i | 6.60 ± 0.34 i |
| A250 | 27.87 ± 1.60 i | 11.12 ± 0.64 f | 48.38 ± 1.44 gh | 5.25 ± 0.08 m | 7.37 ± 0.05 gh |
| B250 | 41.66 ± 0.22 d | 12.20 ± 0.01 e | 31.49 ± 0.27 n | 7.42 ± 0.04 h | 7.24 ± 0.06 gh |

WF—whole oilseed cake flour; A250—oilseed cake flour fraction above 250 µm; B250—oilseed cake flour fraction below 250 µm. Different letters in the columns indicate a statistically significant difference at $p < 0.05$ (Fisher's LSD test).

The effect of size fractionation on crude protein content was limited for other species (flax, poppy, pumpkin or rapeseed), which can be given in connection with the absence of pericarp. This conclusion is well documented regarding carbohydrates content and their distribution between the size fractions for individual species. Carbohydrates contents, including fibre, were significantly lower in the group of flax, poppy, pumpkin and rapeseed and differences in carbohydrates content between the A250 and B250 fractions were more pronounced in the group of oilseed species with a pericarp. The lowest content of carbohydrates (approximately 14% for all size fractions) and the highest content of protein (ranged from 57.7 to 60.4%) was observed for pumpkin. The usual level of crude protein content in pumpkin seeds range from 20 to 40% [22–24]. Nikolić et al. [23] reported a protein level of about 30–40% in hull-less pumpkin seeds with a natural content of oil and milled cake flour obtained from hull-less pumpkin seeds consisting of concentrated proteins (55–65%). The results of Nikolić et al. [25] and Kreft et al. [26] are in agreement with our results. Such a product with a high protein content could be usable in food applications for enhancing food products' nutritive value [23,25].

In contrast, we found a high content of carbohydrates in the flour of hemp, milk thistle and safflower, with a significant increase for the A250 fraction. Differences in carbohydrates content were minimal and statistically insignificant for the flours of poppy and pumpkin.

Dietary fibres are considered to be one of the major ingredients that are used to develop products with a functional purpose [9,27] and oilseed cake products with increasing content of this component can be added to new health benefit products.

Residual crude fat content in the WF fraction varied from 4.84% (milk thistle) to 16.16% (flax) of the FW. The amount of residual fat increased with decreasing flour particle size. The observed differences for the WF and A250 fractions were statistically significant, except for sunflower. The second exception was safflower flour, with the highest content of residual fat in the WP fraction and the lowest level in the B250 fraction. The highest differences in fat content between the A250 and B250 fractions were determined for flax and rapeseed. A high content of residual fat in the B250 fraction appears to be problematic due to the application of this protein-rich source. On the one hand, the increased fat content of flax flour can be used as a substitute for animal fat sources (e.g., butter), thereby increasing the health, environmental and economic benefits of such products. On the other hand, it is necessary to take into account the instability of flax fat components and the possible link to flour technological quality. Bochkarev et al. [28] proposed a 25% proportion of fat in oilseed cakes as the maximum level, as the higher fat content in the flour leads to faster oxidation, and at the same time, the mixing possibility with other components becomes worse. The instability of the fat component is also typical for hemp seed oil with a high content of polyunsaturated fatty acids (PUFA) [29]. However, the PUFA have several health benefits for the consumers and the potential for enhancing the n3/n6 acids ratio in food products [9].

The tested oilseed cake flours also differed regarding the ash content. The species with a pericarp (hemp, milk thistle, safflower, sunflower) exhibited higher differences in ash content between individual size fractions. The lowest contents were determined in the A250 size fraction, and the highest level was found in the B250 fraction. This phenomenon was also observed for poppy and rapeseed flours; however, the differences between the fractions were minimal in comparison with the seed-coated species. Ash content in pumpkin flour was specific in comparison with other species. The lowest content of ash (8.94% FM) was examined in the B250 fraction, while 9.14 and 9.42% FM were found in the WF and A250 fractions, respectively. The ash content in the protein-rich fraction (B250) ranged among the species from 5.0% (flax) to 11.19% FM (poppy). For wheat flour [30], the technical quality of high-ash flour is lower because it is characterised by a darker colour and greater activity of proteolytic and amylolytic enzymes. However, in the case of oilseed cake flours, the results are unclear. The determined ash content in the analysed flours was in accordance with the results of other authors. Bochkarev et al. [28] reported ash content in ranges of 4.8–5.0 and 5.0–5.6% FM for flax and milk thistle flour, respectively. Similarly, the high content of ash in poppy flour was in agreement with Yilmaz and Emir [31], who specified that the high ash level in poppy was caused by the K, P, Mg and Ca contents. This represents an additional potential in increasing the health and nutritional benefits of oilseed cake flours and their products.

3.2. Electrophoretic Characteristics of Oilseed Cake Flour Proteins

The SDS-PAGE profiles of oilseed cakes within individual size fractions are shown in Figure 1. Electrophoretic bands covering the apparent 5–100 kDa range were found for all analysed samples, with visible protein pattern variability between individual species and size fractions. The increase in protein pattern intensities between the A250 and B250 fractions were evident, especially for hemp, milk thistle and safflower. These observations correlated with the data that were related to the change in crude protein content between the A250 and B250 size fractions that were obtained for individual species (Table 2). The flax SDS-PAGE profile was typical for this species, creating four main areas of protein bands that occurred approximately between 50 and 10 kDa. The detected protein zones were therefore identical to those reported by other authors [14,32]. The protein band of about 50 kDa that was found in all size fractions of flaxseed flour could be described as one of five subunits of globulin linin. The 11–12S polypeptide subunits of this protein have

molecular weights of 14.4, 24.6, 30.0, 35.3 and 50.9 kDa [14] and bands with these molecular weights were found in the flax seed SDS-PAGE profiles, as can be seen in Figure 1. Subunit alpha shows more significant variability in the B250 fraction, where three protein bands of the alpha subunit were visible.

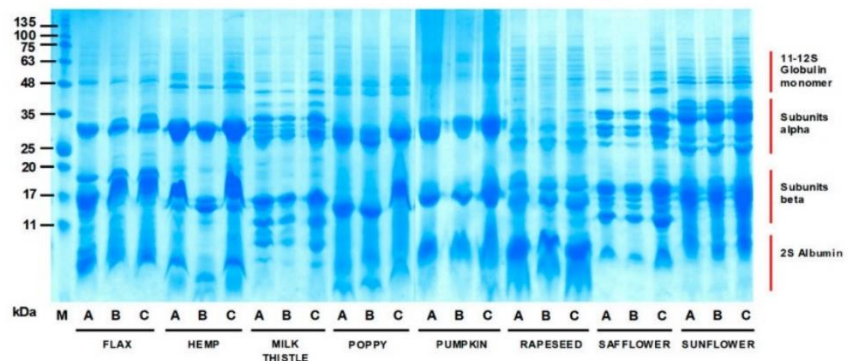


Figure 1. SDS-PAGE protein profiles of the oilseed cake flours under reducing conditions: M—molecular weight marker in kDa; A—whole oil cake flour; B—flour fraction above the 250 µm size; C—flour fraction below the 250 µm size.

The protein profiles that were detected within other species could be similarly characterised into the globulin and albumin protein groups with various manifestations. Globular edestin, which is the main storage protein of hemp as the hexamer protein, was visible in all hemp variants in the form of acidic and basic subunits that were detectable in the zones of 34 and 20 kDa (designated as the “subunits alpha and beta” zones). This was in agreement with Kotecka-Majchrzak et al. [14]. The difference between the hemp A250 and B250 fractions was clear in the SDS-PAGE profiles, particularly in the beta subunits. Similar differences between the A250 and B250 fractions were visible for milk thistle. Li et al. [33] determined that milk thistle albumin and globulin (molecular mass range of 16–112 kDa) were the dominant protein fractions. This information is largely in agreement with our SDS-PAGE profile. The protein bands of milk thistle were found in the range from ~10 to 110 kDa and the bands predominantly cumulated in the zone of subunits alpha and beta. These major protein bands probably belong to albumin and globulin fractions, as reported by Li et al. [33].

Similar SDS-PAGE profiles to those for milk thistle were detected for safflower, sunflower and partly similar for rapeseed. The protein profiles ranged from ~10 to 100 kDa, where a high number of individual protein bands cumulated in the area of subunits alpha and beta. The safflower profiles also showed a different intensity of protein bands in these major areas, with a higher intensity for the B250 fraction. Zones of cruciferin (area of subunits alpha and beta) and napin (area of 2S albumin) were found in the rapeseed SDS-PAGE profiles. Cruciferin, oleosin and napin are the main storage proteins of rapeseed, with high potential for use in functional foods and food substitutes production [14,34]. The sunflower SDS-PAGE profiles did not show differences between the flour size fractions. The 11S helianthinin and 2S albumin, which were reported previously for this species [35], are clearly visible in the zones of subunits alpha, beta (helianthinin) and 2S albumin (albumin fraction).

The poppy and pumpkin SDS-PAGE profiles were similar to the hemp and flax samples. A somewhat higher intensity of protein bands was found in the B250 fraction. Bučko et al. [36] determined 12S globulin cucurbitin (six subunits of 54 kDa) and 2S albumin (12.5 kDa) to be major proteins of pumpkin, together forming 59% of the total protein. However, we also found significant protein bands in the zone of subunits alpha and beta, with values of molecular weight of 30–36 and 15–19 kDa, respectively. These

data correspond with the conclusions of Hara et al. [37], who presented pumpkin globulin separation into two subunits (α and β), corresponding to weights of 63 and 56 kDa, respectively. Via the reduction of disulphide bonds, the two subunits were each separated into two polypeptide chains with molecular weights of around 36 and 22 kDa.

3.3. Functional Characteristics of Oilseed Cake Flours

Table 3 shows the functional properties of oilseed cake flours in a relation to their species origins and particle size distributions after flour sieving. The ANOVA analysis showed the significant effect of the species and flour size fractionation on the observed parameters: water solubility (WS), water-holding capacity (WHC), water holding capacity after boiling (WHC after boiling) and fat-holding capacity (FHC). The values of WS were increased for all evaluated variants with increasing fineness of the flour. The highest WS values were thus achieved for the B250 fraction for all evaluated species. In contrast, the A250 fraction had a decrease in solubility compared with the B250 fraction and for milk thistle, rapeseed, sunflower and the WF fraction (with statistical significance). The highest value of WS (33.12%) was found for the B250 rapeseed flour, with the other two fractions of this species also achieving a high solubility when compared to the other species. The B250 fraction was characterised as a protein-rich fraction that had a rapeseed protein content of 33.52% FM, which may explain the high solubility. The rapeseed storage proteins consisted of approximately 50% cruciferin (known as 11S globulin) and 20–40% of the albumin napin fraction (2S albumin), which is very soluble in water [38,39]. The presence of these proteins was also confirmed in our samples using SDS-PAGE analysis (Figure 1). The WS value was thus species-specific, given by the level and structure of the globulin and albumin protein fraction and the content of minerals and soluble carbohydrates.

Similarly, the dominant albumin protein fraction was described in milk thistle [30] and the increase in solubility of the B250 fraction in this species can be linked to this fact. The solubility of flax was the second highest and achieved 26.68%. In contrast, the B250 fraction of hemp and safflower flours showed the lowest solubility, achieving 18.98 and 17.30%, respectively. The albumin fraction constituted about 25% of hempseed storage protein, while the globulin fraction (edestin) represented up to 80% [40] and the albumin fraction exhibited significantly higher solubility than the globulin one [41]. Malomo et al. [42] observed that the hemp protein fraction solubility gradually increased with increasing pH. This suggests a reduction in protein solubility during protein isoelectric precipitation via protein complexation. The protein-rich fraction that was obtained by sieving with a more native state of protein fraction was more appropriate from this perspective.

The water-holding capacity values ranged within the evaluated set from 1.44 g/g FW (safflower, A250 fraction) to 4.90 g/g FW (flax, A250 fraction). Low WHC values (<2.00 g/g) were found for hemp, pumpkin and safflower. The second group with WHC values between 2.19 and 3.3 g/g FM consisted of milk thistle, rapeseed and sunflower. The highest WHC was observed for all size fractions of flax flour, ranging from 3.17 g/g FM (B250 fraction) to 4.15 g/g FM (A250 fraction). This was probably related to the content of flaxseed gum, which is a constituent of dietary fibre present in the flaxseed hull [43]. This flaxseed component has a function of a food hydrocolloid and significantly increases the WHC of foods, which is important for both the yield and texture of related products [44]. The obtained values of the WHC that correspond with the carbohydrates content are presented in Table 2. The WF and A250 fractions contained significantly higher amounts of carbohydrates in comparison with the protein-rich B250 fraction. Similarly, the lowest WHC was obtained for the B250 fraction. The WF and A250 fractions with high WHC can therefore be used as a component of products where water binding is an important functional indicator. Water holding affects the texture, juiciness, taste of food formulations and, in particular, the shelf-life of bakery products [45]. Boiling oilseed flours increased their WHC, except for poppy flour; however, the trend of WHC that was observed for the unboiled variants also manifested itself in the boiled variants. The values of WHC below 2 g/g FM of the sample were observed for boiled flours of hemp, pumpkin

and safflower. Medium WHC values were found for milk thistle, poppy, rapeseed and sunflower. Very high values of WHC were observed for all the variants of flaxseed flour, which were again the highest for the A250 fraction and lowest for the B250 fraction. These results also confirmed the finding that partial hydrolysis (enzymatic or heat treatment) can improve WHC that was reported previously [46].

Table 3. Selected functional properties of oil cake flours.

| Oil Cake | WS (%) | WHC (g/g of Flour) | WHC after Boiling (g/g of Flour) | FHC (g/g of Flour) |
|--------------|-------------------|--------------------|----------------------------------|--------------------|
| Flax | | | | |
| WF | 21.84 ± 2.49 d | 4.15 ± 0.24 b | 8.12 ± 0.15 a | 0.97 ± 0.01 c |
| A250 | 22.26 ± 0.92 cd | 4.90 ± 0.03 a | 8.32 ± 0.06 a | 1.09 ± 0.04 a |
| B250 | 26.68 ± 1.26 b | 3.17 ± 0.29 cd | 7.42 ± 0.37 b | 0.91 ± 0.01 d |
| Hemp | | | | |
| WF | 15.36 ± 0.52 jkl | 1.67 ± 0.04 kl | 1.91 ± 0.15 hij | 0.77 ± 0.03 jk |
| A250 | 13.08 ± 0.23 lm | 1.61 ± 0.06 lmn | 1.70 ± 0.01 jkl | 0.82 ± 0.01 hi |
| B250 | 18.98 ± 1.66 efgh | 1.83 ± 0.08 k | 1.98 ± 0.05 hi | 0.83 ± 0.01 hi |
| Milk thistle | | | | |
| WF | 15.95 ± 0.68 ijk | 2.73 ± 0.09 f | 2.99 ± 0.16 d | 0.83 ± 0.01 hi |
| A250 | 12.89 ± 0.31 m | 2.19 ± 0.09 j | 2.58 ± 0.18 ef | 0.85 ± 0.00 gh |
| B250 | 20.60 ± 1.58 def | 3.33 ± 0.09 c | 3.18 ± 0.20 cd | 0.90 ± 0.02 de |
| Poppy | | | | |
| WF | 21.13 ± 0.71 de | 2.67 ± 0.09 fg | 2.35 ± 0.02 fg | 0.91 ± 0.01 d |
| A250 | 19.34 ± 0.41 efgh | 3.07 ± 0.08 de | 2.55 ± 0.09 ef | 0.99 ± 0.03 bc |
| B250 | 20.87 ± 0.47 def | 2.55 ± 0.17 ghi | 2.16 ± 0.14 gh | 1.01 ± 0.01 b |
| Pumpkin | | | | |
| WF | 19.91 ± 1.37 defg | 1.45 ± 0.06 mn | 1.65 ± 0.06 kl | 0.65 ± 0.01 m |
| A250 | 18.11 ± 4.96 ghi | 1.60 ± 0.13 lmn | 1.84 ± 0.06 ijk | 0.65 ± 0.01 m |
| B250 | 19.10 ± 0.13 efgh | 1.46 ± 0.06 mn | 1.55 ± 0.06 l | 0.71 ± 0.03 l |
| Rapeseed | | | | |
| WF | 25.08 ± 1.59 b | 2.42 ± 0.19 hi | 3.10 ± 0.15 cd | 0.90 ± 0.01 de |
| A250 | 20.62 ± 0.64 def | 2.37 ± 0.05 ij | 3.33 ± 0.34 c | 0.86 ± 0.07 efgh |
| B250 | 33.12 ± 0.35 a | 2.42 ± 0.02 hi | 2.40 ± 0.28 fg | 0.89 ± 0.02 def |
| Safflower | | | | |
| WF | 13.56 ± 0.54 klm | 1.56 ± 0.04 lmn | 1.95 ± 0.07 hij | 0.74 ± 0.01 kl |
| A250 | 12.31 ± 1.78 m | 1.44 ± 0.03 n | 1.88 ± 0.08 ijk | 0.79 ± 0.01 ij |
| B250 | 17.30 ± 0.58 hij | 1.63 ± 0.04 lm | 1.89 ± 0.06 ijk | 0.85 ± 0.02 fgh |
| Sunflower | | | | |
| WF | 22.31 ± 1.67 cd | 2.66 ± 0.07 fg | 2.67 ± 0.07 e | 0.86 ± 0.00 efgh |
| A250 | 18.54 ± 0.28 fgh | 2.96 ± 0.05 e | 2.99 ± 0.22 d | 1.03 ± 0.03 b |
| B250 | 24.63 ± 0.96 bc | 2.58 ± 0.04 fgh | 2.49 ± 0.04 ef | 0.88 ± 0.03 defg |

A250—oilseed cake flour fraction above 250 µm; B250—oilseed cake flour fraction below 250 µm; WF—whole oilseed cake flour; WS—water solubility; WHC—water-holding capacity; FHC—fat-holding capacity. Different letters in columns indicate a statistically significant difference at $p < 0.05$ (Fisher's LSD test).

Very similar values were found within the evaluated variants for fat-holding capacity. The lowest FHC values were obtained for pumpkin flour variants with values ranging between 0.65 g/g FM (WF and A250 fractions) and 0.71 g/g FM (B250 fraction). Higher FHC values were obtained for flax, ranging from 1.09 g/g FM (A250 fraction) to 0.91 g/g FM (B250 fraction). As for the WHC, the presence of flax gums seemed to be related to the fat-binding ability. The values of flax FHC corresponded with the carbohydrates content. Comparable high values of FHC were also recorded for poppy and sunflower, while the lowest FHC values were recorded for WF in the majority of the species, except for flax and rapeseed. However, it is necessary to notice that the differences in the FHC between the size fractions were minimal and, in many cases, not statistically significant (hemp, pumpkin, rapeseed, sunflower).

3.4. Total Polyphenols Content and Antioxidant Activities of Oilseed Cake Flours

The total polyphenols content and values of antioxidant activities (ABTS radical cation-based and DPPH radical) are presented in Table 4. The results indicated significantly different contents of phenolic components in the flours of the analysed oilseed species but also highly different distributions between the size fractions, which were dependent on the individual species. Species with low TPCs (≤ 3 mg GAE/g FM) were hemp, poppy and pumpkin; species with medium TPCs (approximately between 3 and 18 mg GAE/g FM) were flax, rapeseed, safflower and sunflower. Similarly, size fractionation divided the oilseed species into two groups according to the TPC. The first one was composed of flax, hemp and milk thistle, where the highest TPC was found for the A250 fraction (the differences were not statistically significant for hemp samples), while the second one consisted of poppy, pumpkin, rapeseed, safflower and sunflower. These results indicated different distributions of the TPC or other antioxidant components in seeds of individual oilseed species.

Table 4. Total phenolics contents and antioxidant activities of oilseed cake flours.

| Oilseed Cake | Total Phenolics Content (mg GAE/g) | Antioxidant Activity ABTS•+ (mg AAE/g) | Antioxidant Activity DPPH• (mg AAE/g) |
|--------------|------------------------------------|--|---------------------------------------|
| Flax | | | |
| WF | 6.13 ± 0.59 hi | 13.50 ± 1.15 f | 2.35 ± 0.03 f |
| A250 | 7.42 ± 0.41 fg | 17.45 ± 0.34 e | 2.55 ± 0.03 f |
| B250 | 3.59 ± 0.28 j | 8.16 ± 0.25 gij | 1.84 ± 0.01 g |
| Hemp | | | |
| WF | 2.72 ± 0.13 jk | 7.70 ± 0.51 ijk | 1.66 ± 0.04 g |
| A250 | 2.99 ± 0.33 jk | 9.36 ± 0.53 gi | 1.96 ± 0.03 g |
| B250 | 2.61 ± 0.37 jkl | 8.34 ± 0.43 gij | 1.25 ± 0.06 h |
| Milk thistle | | | |
| WF | 30.44 ± 0.42 b | 86.42 ± 6.43 b | 11.36 ± 0.56 b |
| A250 | 40.89 ± 1.60 a | 101.95 ± 4.14 a | 11.37 ± 0.43 b |
| B250 | 17.68 ± 1.20 c | 55.71 ± 1.42 c | 9.63 ± 0.65 c |
| Poppy | | | |
| WF | 2.84 ± 0.36 jk | 3.02 ± 0.07 l | 0.89 ± 0.01 i |
| A250 | 2.39 ± 0.12 klm | 3.66 ± 0.21 l | 0.90 ± 0.00 I |
| B250 | 3.02 ± 0.34 jk | 3.61 ± 0.24 l | 0.87 ± 0.03 i |
| Pumpkin | | | |
| WF | 1.45 ± 0.11 m | 4.34 ± 0.19 kl | 0.92 ± 0.02 hi |
| A250 | 1.41 ± 0.12 m | 5.20 ± 0.13 jkl | 0.90 ± 0.05 i |
| B250 | 1.52 ± 0.18 lm | 6.19 ± 0.31 ijkl | 0.90 ± 0.04 i |
| Rapeseed | | | |
| WF | 8.47 ± 0.56 f | 17.42 ± 0.47 e | 9.33 ± 0.08 c |
| A250 | 6.97 ± 0.23 gh | 11.56 ± 1.22 fg | 7.74 ± 0.13 d |
| B250 | 10.51 ± 1.03 e | 20.51 ± 1.66 e | 11.05 ± 0.09 b |
| Safflower | | | |
| WF | 6.79 ± 0.47 gh | 19.95 ± 0.15 e | 3.07 ± 0.02 e |
| A250 | 5.49 ± 0.29 i | 17.59 ± 0.59 e | 2.90 ± 0.13 e |
| B250 | 11.99 ± 1.15 d | 33.82 ± 1.13 d | 3.07 ± 0.04 e |
| Sunflower | | | |
| WF | 17.21 ± 0.89 c | 17.67 ± 6.51 e | 15.37 ± 0.11 a |
| A250 | 12.93 ± 0.40 d | 18.85 ± 2.47 e | 15.29 ± 0.17 a |
| B250 | 17.65 ± 1.19 c | 31.03 ± 1.26 d | 15.49 ± 0.09 a |

A250—oilseed cake flour fraction above 250 μ m; B250—oilseed cake flour fraction below 250 μ m; GAE—gallic acid equivalent; AAE—ascorbic acid equivalent. Different letters in columns indicate a statistically significant difference at $p < 0.05$ (Fisher's LSD test).

The highest TPC was found in the flour of milk thistle, which ranged between 17.68 mg GAE/g FM (B250 fraction) and 40.89 mg GAE/g FM (A250 fraction). The key component of milk thistle polyphenols are bioactive flavonolignans, which are referred to as silymarin or the silymarin complex [47,48]. Silymarin is accumulated mostly in the seed coat [49]. Simi-

larly, flax seed polyphenols, namely, the lignans, occur in the seed coat compartments [50]. This explains the detection of the highest TPC in the A250 flour fraction in both species. On the other hand, the binding of polyphenolic components on protein fraction during its isolation and extraction process was described for sunflower [51] and rapeseed [52]. Moreover, the majority of the sunflower polyphenols is contained in the nucleus, while only a small amount is found in the packaging structures [53]. These facts explain the higher TPC in the fraction with a lower grain size.

A similar trend as for TPC was also found for antioxidant activity of the analysed flour samples within the individual evaluated variants (Table 4). Using the ABTS•+, the lowest levels of antioxidant activity were recorded for poppy samples, ranging from 3.02 mg AAE/g FM (WF) to 3.66 mg AAE/g FM (A250). Low values of antioxidant activity were observed also for pumpkin and hemp flours. The highest antioxidant activity that was found using the ABTS•+ was observed for milk thistle flour. High antioxidant activities were examined within all size fractions of this species; however, the A250 fraction had the highest activity, which reached 101.95 mg AAE/g flour. The antioxidant activity of milk thistle seeds was previously given in correlation with bioactive flavonolignans (silymarin complex) [48,54]. Moreover, our data suggested the accumulation of antioxidants in the surface structure of milk thistle seeds. These findings represent a significant shift in the possibility of using milk thistle flour, and especially the A250 fraction. The mentioned fraction, despite its significantly lower protein content, is usable as a source of substances with antioxidant and protective potential. Increasing of antioxidant potential of food products by adding whole seed flour of milk thistle was previously described [55,56]. Using milk thistle A250 flour can enhance the antioxidant potential of milk thistle flour even more. Its application in composite flours with flax, hemp or pumpkin could increase their antioxidant activity; it can also be used in products that need to be protected against oxidation (e.g., meat products). The milk thistle A250 fraction with the above-mentioned characteristics can also be used for the production of functional foods for specific human diets, as these products can also offer chemoprotective and hepatoprotective effects [51]. The significantly higher antioxidant activity of the A250 flax fraction (17.45 mg AAE/g flour) in comparison with other flax flour size fractions also gives this fraction interesting potential for exploitation. Flax and hemp flours are often prone to oxidation due to their higher content of unsaturated fatty acids [57,58]. This issue can be solved using flax flour defatting or adding components with a higher antioxidant potential, e.g., A250 fraction flax flour.

Protein-rich B250 fractions with high antioxidant activities of 20.51, 33.82 and 31.03 mg AAE/g flour were found for rapeseed, safflower and sunflower, respectively. The antioxidant activities of these fractions fit with the observed TPC values.

The data of antioxidant activities that were obtained using the DPPH• radical method approximately followed the trend of antioxidant activity that was determined with the ABTS radical; however, a decrease in measured values was observed. The lower sensitivity of the antioxidant assay using the DPPH radical is typical and was published previously [59,60]. The lower sensitivity of the DPPH lipid peroxide radical scavenging assay is also obvious from the lower level of the statistically significant differences between size fractions, as well as between species, e.g., statistically significant differences between all evaluated size fractions were found only for rapeseed flour. The highest antioxidant activity using the DPPH• radical was found for the A250 fraction of milk thistle, reaching 11.37 mg AAE/g, and no significant difference was found between the A250 and B250 fractions. Similarly, high antioxidant activity against DPPH• was found for rapeseed and sunflower B250 fractions, reaching 11.05 and 15.49 mg AAE/g flour, respectively. In agreement with the results of ABTS•+, DPPH• antioxidant activities were also at very low levels for poppy and pumpkin (under 1 mg AAE/g flour). Antioxidant activities on medium values using the DPPH• radical (between 1 and 4 mg AAE/g) were found for hemp, flax and safflower.

Interesting in this case may be the comparison of the content of polyphenols and the antioxidant activity of the oilseeds with other known sources of antioxidants. Wine, for example, is considered to be an important donor of polyphenols with a high value of antioxidant capacity. The TPCs and antioxidant activity that was obtained by using DPPH• in grape seeds were 546 mg/g DM and 1.0 AAE mg/mL, respectively [61]. In contrast, low TPC and antioxidant activity (DPPH•) were observed in potato tubers, reaching averages of only 3.8 mg GAE/g DM and 0.25 mg AAE/g DM. Here, however, it is necessary to take the high consumption into account [62].

3.5. Colour Characteristics of Oilseed Cake Flours

The concentration of biologically active components alongside the antioxidant activities (e.g., phenolic substances or some pigments) is often connected with the colour characteristics. However, there has been some disagreement about the relationship between the total phenolic content and antioxidant activity. Liu et al. [63] found that wheat grain colour does not appear to be a factor that is related to the antioxidant parameters. On the other side, colour is a key factor that influences customer selection [64] and the usability of alternative flours in the food industry. The colour parameters (CIE L*, a* and b* coordinates) of oilseed flour samples are given in Figure 2. The species and fractions of oilseed flours had significant effects on the colour scores i.e., the L* (lightness/darkness), a* (redness/greenness) and b* (yellowness/blueness). The lightness/darkness observed in the oilseed flour samples differed from the darkest with an L* value of 51.9 (hemp flour) to the lightest with an L* value of 63.0 (milk thistle). The L* parameters were significantly affected by the size fractionation in all the evaluated species. The A250 fraction for all the species exhibited lower lightness in comparison with the B250 fraction. The L* value of the A250 and B250 fractions ranged between 41.85 (poppy) and 56.36 (flax) and between 51.88 (poppy) and 68.0 (rapeseed), respectively. The oilseed flour fractionation can thus contribute to colour optimisation when a darker colour of products may ultimately lower the consumer's acceptability [65].

The greenish colour (−a*) was found only for whole seed flour of rapeseed and a very low a* value was found for sunflower. The size fractionation also significantly affected the a* and b* colour parameters. The greenish tones (−a*) did not appear in any sample of either A250 or B250 size fraction. However, a very low a* value was found for rapeseed and sunflower in both the size fractions. The highest value of reddish tones in the A250 fraction was found for flax flour (a = 6.06) and for poppy in the B250 fraction (a = 5.40). The fractionation had a significant effect on yellowness, with the exception of sunflower. In general, with the increasing fineness of the flour, the lightness and yellowness increased. This dependence was very distinct in rapeseed, with the yellow values a* being 8.46 and 26.81 for the A250 and B250 fractions, respectively. Within the B250 fraction, rapeseed flour also showed the most yellow colour compared with the other species.

The lowest value of the b* parameter was found in the B250 fraction of sunflower. Flour of this species showed yellow and red intensities within the B250 group, as well as in the A250 fraction, with minimal differences between the size fractions.

The obtained results indicated that sieving oilseed flour with the aim to improve the functional and visual properties was efficient only in combination with a particular species. The significant effect of supplemented oilseed flour on colour scores was previously described, e.g., flaxseed flour addition significantly decreases the lightness and increased the redness [64]; green and yellow tones are typical for pumpkin seed flour [25]; defatted sunflower flour is significantly darker with higher redness and blueness values [66] and hemp flour addition significantly decreases the lightness, redness and yellowness of bread crust [65].

























| Oilseed species | Whole seed flour (WF) | Fraction above 250 µm (A250) | Fraction below 250 µm (B250) |
|-----------------|---|---|--|
| Flax |  L* = 62.43 ± 0.59 cde a* = 5.12 ± 0.15 b b* = 18.93 ± 0.98 de |  L* = 56.36 ± 0.28 g a* = 6.06 ± 0.08 a b* = 17.31 ± 0.31 ef |  L* = 66.88 ± 0.95 ab a* = 4.41 ± 0.16 c b* = 19.99 ± 0.54 cd |
| Hemp |  L* = 51.92 ± 0.37 i a* = 2.27 ± 0.09 g b* = 14.28 ± 0.31 g |  L* = 42.89 ± 0.30 k a* = 2.29 ± 0.13 g b* = 7.21 ± 0.87 l |  L* = 58.22 ± 0.08 fg a* = 2.43 ± 0.04 g b* = 17.10 ± 0.17 f |
| Milk thistle |  L* = 63.00 ± 0.71 cd a* = 3.27 ± 0.03 b b* = 12.16 ± 0.23 ijk |  L* = 52.50 ± 1.07 i a* = 5.30 ± 0.29 b b* = 11.77 ± 0.88 ijk |  L* = 64.47 ± 0.44 bc a* = 2.60 ± 0.07 fg b* = 12.44 ± 0.24 hij |
| Poppy |  L* = 55.73 ± 0.31 g a* = 3.50 ± 0.07 d b* = 7.03 ± 0.07 l |  L* = 41.85 ± 1.12 k a* = 3.24 ± 0.03 def b* = 4.99 ± 0.10 m |  L* = 51.88 ± 0.51 i a* = 5.40 ± 0.13 b b* = 10.58 ± 0.35 k |
| Pumpkin |  L* = 57.02 ± 1.03 g a* = 3.67 ± 0.22 b b* = 21.02 ± 0.65 c |  L* = 46.99 ± 0.84 j a* = 5.14 ± 0.66 b b* = 13.24 ± 0.80 ghi |  L* = 61.03 ± 0.18 def a* = 3.56 ± 0.27 d b* = 23.74 ± 0.32 b |
| Rapeseed |  L* = 60.05 ± 2.05 ef a* = -0.01 ± 0.18 i b* = 19.15 ± 1.46 d |  L* = 46.16 ± 1.27 j a* = 0.75 ± 0.12 h b* = 8.46 ± 0.34 l |  L* = 68.00 ± 0.82 a a* = 0.52 ± 0.13 hi b* = 26.81 ± 0.58 a |
| Safflower |  L* = 61.55 ± 0.97 de a* = 2.63 ± 0.26 efg b* = 13.13 ± 0.51 ghi |  L* = 52.66 ± 1.89 i a* = 2.67 ± 0.33 efg b* = 11.26 ± 0.60 jk |  L* = 65.96 ± 0.72 ab a* = 2.46 ± 0.07 g b* = 14.20 ± 0.22 gh |
| Sunflower |  L* = 55.82 ± 1.15 g a* = 0.78 ± 0.09 h b* = 7.39 ± 0.40 l |  L* = 51.10 ± 0.81 a* = 1.01 ± 0.03 h b* = 6.96 ± 0.07 l |  L* = 58.51 ± 0.13 fg a* = 0.75 ± 0.04 h b* = 7.70 ± 0.22 l |

Figure 2. Colour characteristics of oilseed cake flours: CIE parameters: L*, lightness; a*, red—green; b*, yellow—blue; different letters indicate a statistically significant difference at $p < 0.05$ (Fisher's LSD test).

4. Conclusions

This study produced complex information about the composition, functional and antioxidant properties of oilseed cakes of eight oilseed species (flax, hemp, milk thistle, poppy, pumpkin, rapeseed, safflower and sunflower) in three size flour fractions: whole oilseed cake flour, flour size fraction above 250 µm (A250) and below 250 µm (B250). Such complex data has not been published before.

In conclusion, the content characteristics were significantly influenced both by the oilseed species and by the size fraction of the flour samples. The highest content of proteins, as the key component from a nutritional and functional perspective, was found in pumpkin flour with an equal level in all three fractions. With the exception of pumpkin and poppy, the B250 fraction could be described as being the richest in protein, where sieving is a way of increasing the protein content. Antioxidant activity was affected by both the species and the fraction. Flax, hemp and milk thistle species exhibited significantly higher polyphenols content and antioxidant activity in the A250 fraction, while for safflower and sunflower, these properties were the highest in the B250 fraction. In all the tested species, the fractionation significantly influenced the lightness of the flour samples. The lightness was improved by the sieving: the finer the flour, the lighter the colour. Yet even regarding the colour, species specificities emerged.

The obtained data confirmed the potential of mechanical sieving for some of the tested oilseed species to produce flours with specific characteristics, e.g., flour rich in protein or flour rich in antioxidants that are usable in various applications.

Author Contributions: Conceptualisation, J.B.; performed the research work, analysis and data interpretation, J.B., J.K. (Jan Kyselka), M.J., J.K. (Jaromír Kadlec), M.B. (Marie Bjelková), M.B. (Markéta Berčíková), V.B., J.Š., P.S. and Z.Z.; writing—original draft preparation, V.B. and J.B.; writing—review and editing, J.B., V.B. and M.K.; project administration and funding acquisition, J.B., V.F., M.B. (Marie Bjelková) and Z.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (Project No. NAZV QK 1910302).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Conflicts of Interest: All authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

- Sharma, S.; Gupta, S.K.; Mondal, K. Production and trade of major world oil crops. In *Technological Innovations in Major World Oil Crops*; Gupta, S.K., Ed.; Springer: New York, NY, USA, 2012; Volume 1, pp. 1–15.
- OECD-FAO. Oilseeds and oilseed products. In *OECD-FAO Agricultural Outlook 2019–2028*; OECD Publishing: Paris, France, 2019.
- Parry, J.; Su, L.; Moore, J.; Cheng, Z.; Luther, M.; Rao, J.; Wang, J.Y.; Yu, L. Chemical compositions, antioxidant capacities, and antiproliferative activities of selected fruit seed flours. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 3773–3778. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Parry, J.; Cheng, Z.; Moore, J.; Yu, L.L. Fatty acid composition, antioxidant properties, and antiproliferative capacity of selected cold-pressed seed flours. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2008**, *85*, 457–464. [[CrossRef](#)]
- Ancuța, P.; Sonia, A. Oil press-cakes and meals valorization through circular economy approaches. *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 7432. [[CrossRef](#)]
- Gupta, A.; Sharma, A.; Pathak, R.; Kumar, A.; Sharma, S. Solid state fermentation of non-edible oil seed cakes for production of proteases and cellulases and degradation of anti-nutritional factors. *J. Food Biotechnol. Res.* **2018**, *1*, 3–8.
- Teh, S.S.; Bekhit, A.E. Utilization of oilseed cakes for human nutrition and health benefits. In *Agricultural Biomass Based Potential Materials*; Hakeem, K.R., Jawaid, M., Alothman, O.Y., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2015; pp. 191–229.
- Mattila, P.; Mäkinen, S.; Euroola, M.; Jalava, T.; Pihlavan, J.-M.; Hellström, J.; Pihlanto, A. Nutritional value of commercial protein-rich plant products. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2018**, *73*, 108–115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zajac, M.; Guzik, P.; Kulawik, P.; Tkaczewska, J.; Florkiewicz, A.; Migdal, W. The quality of pork loaves with the addition of hemp seeds, de-hulled hemp seeds, hemp protein and hemp flour. *LWT-Food Sci. Technol.* **2019**, *105*, 190–199. [[CrossRef](#)]
- Elsorady, M.E. Characterization and functional properties of proteins isolated from flaxseed cake and sesame cake. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **2020**, *12*, 77–83. [[CrossRef](#)]
- Pojić, M.; Hadnađev, T.D.; Hadnađev, M.; Rakita, S.; Brlek, T. Bread supplementation with hemp seed cake: A by-product of hemp oil processing. *J. Food Qual.* **2015**, *38*, 431–440. [[CrossRef](#)]
- Mejicanos, G.A.; Rogiewicz, A.; Nyachoti, C.M.; Slominski, B.A. Fractionation of canola meal using sieving technology. *Can. J. Anim. Sci.* **2017**, *97*, 613–621. [[CrossRef](#)]
- Murru, M.; Calvo, C.L. Sunflower protein enrichment. Methods and potential applications. *OCL-Oilseeds Fats Crop. Lipids* **2020**, *27*, 17. [[CrossRef](#)]
- Kotecka-Majchrzak, K.; Sumara, A.; Fornal, E.; Montowska, M. Oilseed proteins—properties and application as a food ingredient. *Trends Food Sci. Technol.* **2020**, *106*, 160–170. [[CrossRef](#)]
- Sanmartin, C.; Taglieri, I.; Venturi, F.; Macaluso, M.; Zinnai, A.; Tavarini, S.; Botto, A.; Serra, A.; Conte, G.; Flamini, G.; et al. Flaxseed Cake as a Tool for the Improvement of Nutraceutical and Sensorial Features of Sourdough Bread. *Foods* **2020**, *9*, 204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- De Lamo, B.; Gómez, M. Bread Enrichment with Oilseeds. A Review. *Foods* **2018**, *7*, 191. [[CrossRef](#)]
- American Association of Cereal Chemists. *AOAC Approved Methods of the AAAC*, 10th ed.; American Association of Cereal Chemists: St. Paul, MN, USA, 2006.
- Lachman, J.; Hamouz, K.; Čepl, J.; Pivec, V.; Šulc, M.; Dvořák, P. The effect of selected factors on polyphenol content and antioxidant activity in potato tubers. *Chem. Listy* **2006**, *100*, 522–527.
- Šulc, M.; Lachman, J.; Hamouz, K.; Orsák, M.; Dvořák, P.; Horáčková, V. Selection and evaluation of methods for determination of antioxidant activity of purple- and red-fleshed potato varieties. *Chem. Listy* **2007**, *101*, 584–591.
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685. [[CrossRef](#)]

21. Lan, Y.; Zha, F.; Peckrul, A.; Hanson, B.; Johnson, B.; Rao, J.; Chen, B. Genotype x environmental effects on yielding ability and seed chemical composition of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) varieties grown in North Dakota, USA. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2019**, *96*, 1417–1425. [[CrossRef](#)]
22. Shen, P.; Gao, Z.; Xu, M.; Ohm, J.B.; Rao, J.; Chen, B. The impact of hempseed dehulling on chemical composition, structure properties and aromatic profile of hemp protein isolate. *Food Hydrocoll.* **2020**, *106*, 105889. [[CrossRef](#)]
23. Dotto, J.M.; Chacha, J.S. The potential of pumpkin seeds as a functional food ingredient: A review. *Sci. Afr.* **2020**, *10*, e00575. [[CrossRef](#)]
24. Amin, A.Z.; Islam, T.; Uddin, M.R.; Uddin, M.J.; Rahman, M.M.; Satter, M.A. Comparative study on nutrient contents in the different parts of indigenous and hybrid varieties of pumpkin (*Cucurbita maxima* Linn.). *Heliyon* **2019**, *5*, e02462. [[CrossRef](#)]
25. Nikolić, I.; Dokić, L.; Rakić, D.; Tomović, V.; Maravić, N.; Vidosavljević, S.; Šereš, Z.; Šoronja-Simović, D. The role of two types of continuous phases based on cellulose during textural, color, and sensory characterization of novel food spread with pumpkin seed flour. *J. Food Process. Preserv.* **2018**, *42*, e13684. [[CrossRef](#)]
26. Kreft, I.; Stibilj, V.; Trkov, Z. Iodine and selenium contents in pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) oil and oil-cake. *Eur. Food Res. Technol.* **2002**, *215*, 279–281. [[CrossRef](#)]
27. Korus, J.; Witczak, M.; Ziobro, R.; Juszcak, L. Hemp (*Cannabis sativa* subsp. *sativa*) flour and protein preparation as natural nutrients and structure forming agents in starch based gluten-free bread. *LWT-Food Sci. Technol.* **2017**, *84*, 143–150. [[CrossRef](#)]
28. Bochkarev, B.; Egorova, E.; Poznyakovkiy, V. Reasons for the ways of using oilcakes in food industry. *Foods Raw Mater.* **2016**, *4*, 4–12. [[CrossRef](#)]
29. Vonapartis, E.; Aubin, M.P.; Seguin, P.; Mustafa, A.F.; Charron, J.B. Seed composition of ten industrial hemp cultivars approved for production in Canada. *J. Food Compos. Anal.* **2015**, *39*, 8–12. [[CrossRef](#)]
30. Bucella, B.; Molnár, D.; Harasztos, A.H.; Tömösközi, S. Comparison of the rheological and end-product properties of an industrial aleurone-rich wheat flour, whole grain wheat and rye flour. *J. Cereal Sci.* **2016**, *69*, 40–48. [[CrossRef](#)]
31. Yilmaz, E.; Emir, D.D. Compositional and functional characterisation of poppy seed (*Papaver somniferum* L.) press cake meals. *Qual. Assur. Saf. Crops Foods* **2017**, *9*, 141–151. [[CrossRef](#)]
32. Bekhit, A.E.-D.A.; Shavandi, A.; Jodjaja, T.; Birch, J.; Teh, S.; Ahmed, I.A.M.; Al-Juhaimi, F.Y.; Saeedi, P.; Bekhit, A.A. Flaxseed: Composition, detoxification, utilization, and opportunities. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2018**, *13*, 129–152. [[CrossRef](#)]
33. Li, F.; Wu, X.Y.; Zhao, T.; Li, F.; Zhao, J.L.; Yang, L.Q. Extraction, physicochemical, and functional properties of proteins from milk thistle *Silybum marianum* L. gaernt seeds. *Int. J. Food Prop.* **2013**, *16*, 1750–1763. [[CrossRef](#)]
34. Guo, X.F.; Tian, S.; Small, D.M. Generation of meat-like flavourings from enzymatic hydrolysates of proteins from *Brassica* spp. *Food Chem.* **2010**, *119*, 167–172. [[CrossRef](#)]
35. Žilić, S.; Barać, M.; Pešić, M.; Crevar, M.; Stanojević, S.; Nišavić, A.; Saratlić, G.; Tolimir, M. Characterization of sunflower seed and kernel proteins. *Helia* **2010**, *33*, 103–114. [[CrossRef](#)]
36. Bučko, S.; Katona, J.; Popović, L.; Petrović, L.; Milinković, J. Influence of enzymatic hydrolysis on solubility, interfacial and emulsifying properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein isolate. *Food Hydrocoll.* **2016**, *60*, 271–278. [[CrossRef](#)]
37. Hara, I.; Wada, K.; Wakabayashi, S.; Matsubara, H. Pumpkin (*Cucurbita* sp.) seed globulin I. Purification, characterization, and subunit structure. *Plant Cell Physiol.* **1976**, *17*, 799–814. [[CrossRef](#)]
38. Wanasundara, J.P.D.; McIntosh, T.C.; Perera, S.P.; Withana-Gamage, T.S. Canola/rapeseed protein-functionality and nutrition. *OCL-Oilseeds Fats Crop. Lipids* **2016**, *23*, D407. [[CrossRef](#)]
39. Kasprzak, M.M.; Houdijk, J.G.M.; Liddell, S.; Davis, K.; Olukosi, O.A.; Kightley, S.; White, G.A.; Wiseman, J. Rapeseed napin and cruciferin are readily digested by poultry. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2017**, *101*, 658–666. [[CrossRef](#)]
40. Wang, Q.; Xiong, Y.L. Processing, nutrition, and functionality of hempseed protein: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2019**, *18*, 936–952. [[CrossRef](#)]
41. Malomo, S.A.; Aluko, R.E. A comparative study of the structural and functional properties of isolated hemp seed (*Cannabis sativa* L.) albumin and globulin fractions. *Food Hydrocoll.* **2015**, *43*, 43–752. [[CrossRef](#)]
42. Malomo, S.A.; He, R.; Aluko, R.E. Structural and functional properties of hemp seed protein products. *J. Food Sci.* **2014**, *79*, C1512–C1521. [[CrossRef](#)]
43. Hu, Y.; Shim, Y.Y.; Reaney, M.J.T. Flaxseed gum solution functional properties. *Foods* **2020**, *9*, 681. [[CrossRef](#)]
44. Sun, J.; Li, X.; Xu, X.; Zhou, G. Influence of various levels of flaxseed gum addition on the water-holding capacities of heat-induced porcine myofibrillar protein. *J. Food Sci.* **2011**, *76*, C472–C478. [[CrossRef](#)]
45. Nguyen, D.; Mounir, S.; Allaf, K. Functional properties of water holding capacity, oil holding capacity, wettability, and sedimentation of swell-dried soybean powder. *Sch. J. Eng. Tech.* **2015**, *3*, 402–412.
46. Dzuovor, C.K.O.; Taylor, J.T.; Acquah, C.; Pan, S.; Agyei, D. Bioprocessing of functional ingredients from flaxseed. *Molecules* **2018**, *23*, 2444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Martinelli, T.; Potenza, E.; Moschella, A.; Zaccheria, F.; Benedettelli, S.; Andrzejewska, J. Phenotypic evaluation of milk thistle germplasm collection: Fruit morphology and chemical composition. *Crop Sci.* **2016**, *56*, 1–13. [[CrossRef](#)]
48. Viktorova, J.; Stranska-Zachariasova, M.; Fenclova, M.; Vitek, L.; Hajslova, J.; Kren, V.; Ruml, T. Complex evaluation of antioxidant capacity of milk thistle dietary supplements. *Antioxidants* **2019**, *8*, 317. [[CrossRef](#)]
49. Cappelletti, E.M.; Caniato, R. Silymarin localization in the fruit and seed of *Silybum marianum* L. Gaertn. *Herb. Hung.* **1984**, *23*, 53–66.

50. Venglat, P.; Xiang, D.; Qiu, S.; Stone, S.L.; Tibiche, C.; Cram, D.; Alting-Mees, M.; Nowak, J.; Cloutier, S.; Deyholos, M.; et al. Gene expression analysis of flax seed development. *BMC Plant Biol.* **2011**, *11*, 74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Pickardt, C.; Weisz, G.M.; Eisner, P.; Kammerer, D.R.; Neidhart, S.; Carle, R. Processing of low polyphenol protein isolates from residues of sunflower seed oil production. *Procedia Food Sci.* **2011**, *1*, 1417–1424. [[CrossRef](#)]
52. Xu, L.; Diosady, L.L. Removal of phenolic compounds in the production of high-quality canola protein isolates. *Food Res. Int.* **2002**, *35*, 23–30. [[CrossRef](#)]
53. Romani, A.; Pinelli, P.; Moschini, V.; Heimler, D. Seeds and oil polyphenol content of sunflower (*Helianthus annuus* L.) grown with different agricultural management. *Adv. Hortic. Sci.* **2017**, *31*, 85–88.
54. Serçe, A.; Toptancı, Ç.B.; Tanrikut, S.E.; Altaş, S.; Kizil, G.; Kizil, S.; Kizil, M. Assessment of the antioxidant activity of *Silybum marianum* seed extract and its protective effect against DNA oxidation, protein damage and lipid peroxidation. *Food Technol. Biotechnol.* **2016**, *54*, 455–461. [[CrossRef](#)]
55. Bortiková, V.; Kolarič, L.; Šimko, P. Application of milk thistle (*Silybum marianum*) in functional biscuits formulation. *Acta Chim. Slovaca* **2019**, *12*, 192–199. [[CrossRef](#)]
56. Apostol, L.; Lorga, S.; Moşoiu, C.; Racovita, R.C.; Niculae, O. The effects of partially defatted milk thistle (*Silybum marianum*) seed flour on wheat flour. *J. Int. Sci. Publ. Agric. Food.* **2017**, *5*, 74–84.
57. Schorno, A.L.; Manthey, F.A.; Hall, C.A. Effect of particle size and sample size on lipid stability of milled flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *J. Food Process. Preserv.* **2010**, *34*, 167–179. [[CrossRef](#)]
58. Uluata, S.; Özdemir, N. Antioxidant activities and oxidative stabilities of some unconventional oilseeds. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2011**, *89*, 551–559. [[CrossRef](#)]
59. Martysiak-Zurowska, D.; Wenta, W. A comparison of ABTS and DPPH methods for assessing the total antioxidant capacity of human milk. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* **2012**, *11*, 83–89. [[PubMed](#)]
60. Okoh, S.O.; Asekun, O.T.; Familoni, O.B.; Afolayan, A.J. Antioxidant and free radical scavenging Ccapacity of seed and shell essential oils extracted from *Abrus precatorius* (L). *Antioxidants* **2014**, *3*, 278–287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Lachman, J.; Sulc, M.; Faitová, K.; Pivec, V. Major factors influencing antioxidant contents and antioxidant activity in grapes and wines. *Int. J. Wine Res.* **2009**, *1*, 101–121. [[CrossRef](#)]
62. Šulc, M.; Lachman, J.; Hamouz, K.; Dvořák, P. Impact of Phenolic Content on Antioxidant Activity in Yellow and Purple-fleshed Potatoes Grown in the Czech Republic. *Biol. Agric. Hortic.* **2008**, *26*, 45–54. [[CrossRef](#)]
63. Liu, Q.; Qiu, Y.; Beta, T. Comparison of antioxidant activities of different colored wheat grains and analysis of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 9235–9241. [[CrossRef](#)]
64. Kaur, P.; Waghmare, R.; Kumar, V.; Rasane, P.; Kaur, S.; Gat, Y. Recent advances in utilization of flaxseed as potential source for value addition. *OCL-Oilseeds Fats Crop. Lipids* **2018**, *25*, A304. [[CrossRef](#)]
65. Foschia, M.; Peressini, D.; Sensidoni, A.; Brennan, C.S. The effects of dietary fibre addition on the quality of common cereal products. *J. Cereal Sci.* **2013**, *58*, 216–227. [[CrossRef](#)]
66. Grasso, S.; Omoarukhe, E.; Wen, X.; Papoutsis, K.; Methven, L. The use of upcycled defatted sunflower seed flour as a functional ingredient in biscuits. *Foods* **2019**, *8*, 305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Posledním výsledkem této práce jsou vybrané kapitoly certifikované metodiky, která představuje stěžejní výstup výzkumného projektu NAZV QK1910302 – „Zpracování vedlejších produktů z lisování semen olejnin na nové výrobky s nutričními a zdravotními přínosy“. Cílem této metodiky bylo shrnutí poznatků o optimalizaci postupů lisování oleje vybraných druhů minoritních olejnin (len setý olejní, konopí seté, ostropestřec mariánský a tykev olejná) a následné zužitkování výlisků, výliskové mouky, jejích frakcí a koncentrátů bílkovin pro přípravu plnohodnotných pekárenských a masných výrobků.

První vybraná kapitola se zaměřuje na využití vedlejších produktů vznikajících při získávání oleje na produkci mouk a bílkovinných koncentrátů. Lisováním olejnatých semen vznikají výlisky a extrakcí oleje pomocí organického rozpouštědla vznikají extrahované šroty. Lněné výlisky nebo extrahované šroty obsahují 25-35 % bílkovin. Bílkovinné produkty je možné získat suchou či mokrou cestou. Získávání bílkovinných mouk z lněných výlisků mokrou cestou je obtížnější kvůli obsahu rozpustných slizů, které se nacházejí v osemeni a přecházejí do vodného roztoku. Řešením je odstranění osemeni nebo extrakce rozpustných slizů před lisováním semen. Kapitola detailně popisuje proces výroby bílkovinného koncentráту a izolátu z lněných výlisků. Důležitým aspektem je správné balení a skladování bílkovinných mouk, jelikož bílkovinné koncentráty obsahují významný podíl zbytkového tuku. Vhodným způsobem je vakuové balení.

Druhá vybraná kapitola metodiky se soustřeďuje na praktické možnosti využití produktů v potravinářských aplikacích. V souvislosti s produkty s lněnými semeny uvádí vhodnost využití lněné výliskové mouky v rámci pekařských výrobků, extrudovaných výrobků a tekutých potravin a dochucovadel. V případě experimentálně vytvořené modelové potraviny ve formě pšenično-žitného chleba s přídavkem 5 % lněné výliskové mouky nebylo prokázáno významné zhoršení technologických a senzorických parametrů, přičemž v souvislosti s přítomností antioxidantů lze předpokládat zvýšení celkového obsahu polyfenolů a antioxidačního potenciálu. Druhý pekařský pokus, který byl zaměřený na přípravu pšeničných bulek, potvrdil zvýšení obsahu polyfenolů a antioxidační aktivity varianty s přídavkem lněné výliskové mouky.

Na příkladech modelových potravin bylo možné pozorovat zvýšení jejich nutriční a senzorické kvality vlivem přídavku výliskových produktů. Metodika tak může poskytnout praktické informace nejenom pro potřeby koncových uživatelů

z potravinářského průmyslu, ale také pro zájemce z řad výrobců zdravé výživy, nutričních specialistů, lékařů nebo studentů.

Kompletní informace a zdroje vztahující se k dané problematice a výše uvedené anotaci jsou uvedeny ve vybraných kapitolách publikace:

Jihočeská univerzita V Českých Budějovicích, Agritec Plant Research S.R.O., CZ Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, HEMP PRODUCTION CZ, s.r.o., Masarykova univerzita. Optimalizované postupy a metody zpracování semen vybraných minoritních olejnin na olej a zušlechtěné výrobky z výlisků. Bárta, J., Bártová, V., Bjelková, M., Bedrníček, J., Berčíková, M., Filip, V., Jarošová, E., **Jarošová, M.**, Kadlec, J., Krejčová, Z., Kyselka, J., Lorenc, F., Pešek, E., Roudnický, P., Říha, R., Říha, V., Smetana, P., Stupková, A., Švajner, J., Uhlířová, L., Zdráhal, Z. ISBN 978-80-7394-955-6. 2022.



Optimalizované postupy a metody zpracování semen vybraných minoritních olejnin na olej a zušlechtěné výrobky z výlisků

CERTIFIKOVANÁ METODIKA



Jan Bárta a kolektiv

České Budějovice | 2022

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Fakulta zemědělská a technologická

ve spolupráci v rámci řešení výzkumného projektu MZe č. QK 1910302 s:

Agritec Plant Research, s.r.o.

HEMP PRODUCTION CZ, s.r.o.

Masarykova univerzita, Středoevropský technologický institut

Vysoká škola chemicko-technologická, Fakulta potravinářské a biochemické
technologie

Optimalizované postupy a metody zpracování semen vybraných minoritních olejnin na olej a zušlechtěné výrobky z výlisků

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Jan Bárta a kol.

© Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Fakulta zemědělská a technologická
2022

ISBN 978-80-7394-955-6

ISBN 978-80-7394-955-6



Autorský kolektiv (v abecedním pořadí):

doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D. (FZT JU) – vedoucí autorského kolektivu
doc. Ing. Veronika Bártová, Ph.D. (FZT JU)
Ing. Marie Bjelková, Ph.D. (Agritec)
Ing. Jan Bedrníček, Ph.D. (FZT JU)
Ing. Markéta Berčíková, Ph.D. (FPBT VŠCHT)
prof. Ing. Vladimír Filip, CSc. (FPBT VŠCHT)
Ing. Eva Jarošová (FZT JU)
Ing. Markéta Jarošová (FZT JU)
Dr. Ing. Jaromír Kadlec (FZT JU)
Zlatuše Krejčová (HEMP PRODUCTION CZ, s.r.o.)
doc. Ing. Jan Kyselka, Ph.D. (FPBT VŠCHT)
Ing. František Lorenc, Ph.D. (FZT JU)
Ing. Erik Pešek (FPBT VŠCHT)
Mgr. Pavel Roudnický, Ph.D. (CEITEC MUNI)
Radek Říha (HEMP PRODUCTION CZ, s.r.o.)
Václav Říha (HEMP PRODUCTION CZ, s.r.o.)
doc. Ing. Pavel Smetana, Ph.D. (FZT JU)
Ing. Adéla Stupková, Ph.D. (FZT JU)
Ing. Josef Švajner (FZT JU)
Bc. Lenka Uhlířová (FZT JU)
prof. Ing. Zbyněk Zdráhal, Ph.D. (CEITEC MUNI)

Obsah:

| | |
|---|----|
| CÍL METODIKY | 6 |
| VLASTNÍ POPIS | 7 |
| 1. Úvod | 7 |
| 2. Minoritní olejniny | 8 |
| 2.1. Charakteristika vybraných minoritních olejin a jejich semen | 8 |
| 2.2. Vliv odrůdy a ostatních pěstitelských faktorů na obsah oleje a bílkovin v semenech vybraných minoritních olejin | 13 |
| 2.3. Požadavky na kvalitu semen vybraných minoritních olejin | 21 |
| 3. Lisování a hodnocení kvality získaných olejů | 22 |
| 3.1. Skladování a úprava semen před lisováním | 24 |
| 3.2. Specifické odlišnosti při lisování semen lnu setého, konopí setého, tykve olejné a ostropestřce mariánského | 27 |
| 3.3. Možnosti ovlivnění oxidační stability surových rostlinných olejů | 34 |
| 3.4. Balení a skladování vylisovaných olejů | 41 |
| 4. Výlisky olejin a jejich zpracování na mouky a bílkovinné koncentráty | 43 |
| 4.1. Bílkoviny semen olejin | 43 |
| 4.2. Suchá a mokrá cesta zpracování semen na produkty s vyšším obsahem bílkovin.. | 45 |
| 4.3. Zpracování výlisků olejin pomocí mletí a prosévání na bílkovinné mouky (koncentráty) | 48 |
| 4.4. Technologické postupy zpracování semen minoritních olejin na bílkovinné produkty | 60 |
| 4.5. Balení a skladování výlisků, výliskových mouk a koncentrátů | 65 |
| 5. Možnosti využití výliskových bílkovinných produktů v potravinářských aplikacích | 67 |
| 5.1. Příklady pekařských a pečivářských výrobků | 68 |
| 5.2. Výrobek z mělněného masa | 80 |
| 6. Závěr | 83 |
| SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“ | 84 |
| POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY | 84 |
| EKONOMICKÉ ASPEKTY | 84 |
| SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY | 86 |
| SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE | 91 |
| JMÉNA Oponentů A NÁZVY JEJICH ORGANIZACÍ | 93 |
| DEDIKACE | 93 |

CÍL METODIKY

Cílem metodiky je poskytnout uživatelům optimalizované postupy a metody pro získávání oleje ze semen vybraných druhů olejnin (len setý olejný, konopí seté, ostropestřec mariánský, tykev olejná) lisováním za studena a pro následné zpracování získaných výlisků na výliskové mouky a jejich frakce s rozdílným obsahem bílkovin, tuku a ostatních nutričně cenných komponent. Součástí uvedených postupů jsou i modelové příklady využití výliskových produktů pro přípravu pekařských, pečivářských a masných výrobků, čímž dostává uživatel reálný přehled o možnostech komplexní valorizace olejnatých semen.

VLASTNÍ POPIS METODIKY

1. Úvod

Olejniny jsou obecně rostliny, které obsahují v některé části svého těla (obvykle v semenech) významné množství oleje, které se vyplatí získávat jak z pohledu množství, tak z pohledu kvalitativních vlastností a na ně navazující uplatnění. Pěstování olejin je na vzestupu, protože o ně celosvětově roste zájem. Hlavním důvodem je nárůst lidské populace a potřeba zajistit dostatek kvalitních potravin a surovin pro jejich výrobu. Dalším důvodem je využití rostlinných olejů v nepotravinářské a energetické oblasti.

V České republice zaznamenaly olejniny po roce 1990 výrazný nárůst pěstitelských ploch (téměř čtyřikrát), a to zejména kvůli nárůstu pěstování ozimé řepky olejky. Růst pěstitelských ploch řepky olejky není náhodný. Semena dnešních odrůd řepky obsahují velmi kvalitní olej, který je výborný pro lidskou výživu jako zdroj esenciálních polynenasycených mastných kyselin – k. linolové (n-6) a k. α -linolenové (n-3), navíc v potřebném poměru zhruba 2–3 : 1. Surový řepkový olej je v podmínkách ČR získáván z řepkových semen po sledu předúprav (mletí, kondicionace apod.) pomocí kombinace lisování (předlis) a následné extrakce zbylé části pomocí technického hexanu. Řepkový olej má dobrou oxidační stabilitu a je dobře skladovatelný. Je využitelný nejen ve studené kuchyni, ale také při vaření (pečení, smažení), pro výrobu potravinářských výrobků a dále v nepotravinářských aplikacích včetně výroby methyl-esterů mastných kyselin (bionafty). ČR patří v EU k nejvýznamnějším pěstitelům řepky. Svou roli v tomto ohledu sehrává skutečnost, že čeští zemědělci již delší dobu rutinně ovládají pěstitelskou technologii ozimé řepky a že výkupní ceny řepkového semene jsou dlouhodobě výhodné. Kromě řepky náleží k významným olejinám ČR v současné době sója, slunečnice a mák (viz tab. 1).

Tabulka 1: Sklizňové plochy a výnosy majoritních a vybraných minoritních olejin (šedé tónování) v ČR v roce 2020

| olejina | plocha pěstování v ČR [ha] | průměrný výnos semen [t/ha] |
|-------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Řepka olejka ¹ | 368 214 | 3,38 |
| Sója luštinatá ¹ | 14 145 | 2,33 |
| Slunečnice roční ¹ | 11 274 | 2,58 |
| Len setý olejný ¹ | 1 287 | 1,23 |
| Konopí seté ² | 413 | 0,68 |
| Ostropestřec mariánský ³ | 2 000 | 0,40 |
| Tykev olejná ⁴ | <500 | <0,50 |

Zdroje údajů: ¹Šindelková (2021); ²Veřejná databáze ČSÚ, dostupné on-line: <https://vdb.czso.cz> (30.11.2022); ³Kozderová V. (2021); ⁴odhad Ing. Petr Čibera, AGRO-EL Znojmo (ústní sdělení z roku 2020)

Kromě zmíněných majoritních druhů olejnin, které ovládají většinu z celkové pěstitelské plochy olejnin v ČR a také zajišťují z pohledu lidské výživy a výroby potravin hlavní surovinové zdroje, jsou významné vybrané minoritní (neboli maloobjemově pěstované) olejnin. K nejvýznamnějším z pohledu rozsahu a významu uplatnění patří v ČR len setý olejný, konopí seté, ostropestřec mariánský a tykev olejná. U těchto druhů jsou semena využívána nejen k produkci kvalitních „za studena“ lisovaných olejů cenných pro své specifické vlastnosti a obsah esenciálních mastných kyselin, ale jsou také používána samostatně. Nutričně velmi hodnotou složkou olejnatých semen jsou bílkoviny (patřící převážně mezi albuminy a globuliny), které zůstávají v semenných zbytcích neboli výliscích. V poslední době je snaha pěstitelů a zpracovatelů těchto druhů olejnin o maximální valorizaci sklizených semen ústící v bezodpadovou produkci tržně uplatnitelných produktů jako jsou nejen olej, ale také výliskové mouky a bílkovinné koncentráty. Předkládaná metodika by ráda ke komplexnímu zhodnocování sklizených olejnatých semen přispěla, alespoň malým dílem.

5. Možnosti využití výliskových bílkovinných produktů v potravinářských aplikacích

Výliskové mouky, jejich frakce bohaté na bílkoviny, vlákninu a biologicky aktivní látky i samotné bílkovinné koncentráty či izoláty disponují množstvím funkčních vlastností a mohou tak být využity v řadě potravinářských aplikací či přímo ve výrobcích. Jde o vlastnosti, jako jsou schopnost poutat vodu a tuk, viskoelastické vlastnosti, schopnost vytvářet gely, pěny, emulze apod. Jednotlivé typy výliskových produktů tak mohou být v potravinářských výrobcích využity jako plnidla, prostředky zlepšující strukturu, konzistenci, vlhkost, chuťové a aromatické vlastnosti, ale také jako prostředky, které finální potravinářský výrobek obohacují o danou skupinu nutričně či zdravotně významných složek.

Tabulka 13: Literárně prezentované možnosti využití bílkovinných produktů jako surovin do potravinářských výrobků (Bárta a kol., 2021a)

| Skupina výrobků | KS | LS | OM | ŘO | SL | SR | TO |
|-------------------------------|------|----|----|-----|------|----|----|
| Pekařské výrobky | MKP | M | M | KI | MKI | MK | M |
| Masné výrobky | M | | | KI | MKIT | K | M |
| Mléčné výrobky | P | | M | I | MKI | | M |
| Kojenecká výživa a diety | MKIP | | | | MKI | K | |
| Náhrada vajec | | | | KI | | | H |
| Extrudované výrobky a tyčinky | M | M | | | | K | |
| Dresinky, omáčky, polévky | | M | | IPH | KI | | |
| Nápoje | MI | | | I | K | | |

SL – sója luštinatá, ŘO – řepka olejka, SR – slunečnice roční, LS – len setý, KS – konopí seté, TO – tykev olejná, OM – ostropestřec mariánský; M – mouky, K – bílkovinné koncentráty, I – bílkovinné izoláty, P – bílkoviny příslušného druhu obecně, H – hydrolyzát bílkovin příslušného druhu, T – texturované bílkoviny

KS: Wang and Xiong (2019); LS: Kaur a kol. (2018); OM: Bochkarev a kol. (2016); Jandlova a kol. (2018); ŘO: Wanasundara a kol. (2016); Day (2013); SL: Singh a kol. (2008); Day (2013); SR: Murru, Calvo (2020); Bio Technologies LLC; TO: Bochkarev a kol. (2016); Popovic a kol. (2013)

Jak přehledně ukazuje tabulka 13 využití výliskových produktů s vyšším obsahem bílkovin může být velmi pestré. Jde hlavně o uplatnění v pekařských výrobcích, dále v masných (mělněných) a mléčných produktech a v některých specifických aplikacích jako jsou speciální výživy, extrudované výrobky, využití jako náhrada vajec, příprava dresinků, omáček a nápojů.

V následujícím textu jsou uvedeny příklady uplatnění různých frakcí výliskových mouk v přípravě pekařských, pečivářenském a masném výrobku, které byly vytvořeny v rámci řešení výzkumného projektu QK 1910302.

5.1. Příklady pekařských a pečivářských výrobků

Příprava pšenično-žitného chleba s využitím výliskových mouk minoritních olejnin

Byly připraveny varianty pšenično-žitného chleba se substitucí 10 % směsné pšenično-žitné mouky (1:1) mouku lněnou, konopnou, ostropestřcovou a tykvovou. U lněné mouky byla vyzkoušena také substituce 5 % (vzhledem k specifickým vlastnostem mouky bylo předpokládáno zhoršení senzoričkových vlastností výrobku). Jako použitá alternativní mouka byla ve všech případech zvolena velikostní frakce výliskových mouk 500–710 µm.

V misce byla důkladně smíchána navážená množství mouk, soli a kmínu (variantní složení uvedeno v tabulce 14), následně byl vytvořen důlek a do něj bylo rozdrobeno 20 g droždí, ke

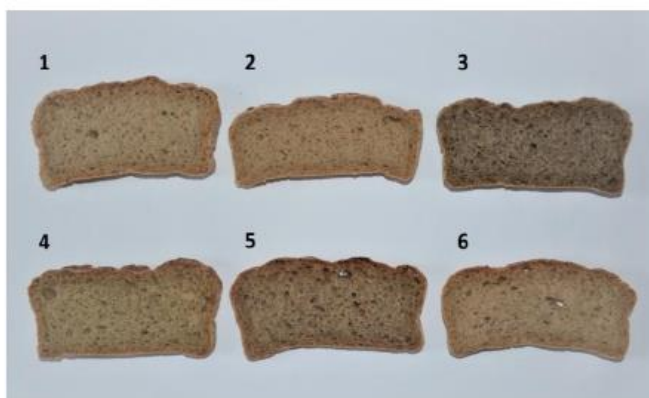
Tabulka 14: Zastoupení surovin pro přípravu těst jednotlivých variant chleba (v g).

| složka | varianta | | | | | |
|-----------------|----------|---------|----------|--------|-------|--------------|
| | kontrola | len 5 % | len 10 % | konopí | tykev | ostropestřec |
| mouka pšeničná | 150 | 142,5 | 135 | 135 | 135 | 135 |
| mouka žitná | 150 | 142,5 | 135 | 135 | 135 | 135 |
| m. alternativní | 0 | 15 | 30 | 30 | 30 | 30 |
| sůl | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| kmín | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| droždí | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| cukr | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| olej | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| ocet | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| voda | 230 | 230 | 230 | 230 | 230 | 230 |

Pozn.: Výliskové mouky představovaly velikostní frakce semenných výlisků olejného lnu, konopí setého, tykve olejné a ostropestřce mariánského v rozpětí 500–700 µm.

kterému byl přidán cukr a 50 g teplé vody (35 °C). Po 20 minutách byl přidán zbytek vody (180 g), olej a ocet a vše bylo důkladně zhomogenizováno s využitím kuchyňského robota Bosch OptiMUM MUM9BX5S61 (funkce hnětení, 10 minut). Vzniklé těsto bylo následně převedeno do formy vymazané tukem a vysypané hrubou moukou. Ve formě kynul chléb 60 minut pod plátěnou utěrkou při teplotě 25°C. Následně byla forma s vykynutým vzorkem chleba vložena do trouby vyhřáté na 230°C. Po uplynutí 10 minut byla teplota snížena na 190 °C a při této teplotě byl chléb dopékán dalších 40 minut (50 minut pečení celkem). Po vyjmutí formy se vzorkem chleba z trouby byl chléb vyklopen z formy a ponechán na roštu, aby vychladl. Postup probíhal u všech vzorků stejně.

Předpoklad zhoršené sensorické kvality chleba s přidavkem lněné mouky se potvrdil, a to zvláště u varianty s jejím vyšším zastoupením. Toto je patrné jak z obr. 56, kde je viditelná struktura jednotlivých variant, ale také z tabulky 15, kde jsou uvedena data sensorického hodnocení produkce. Jednou ze složek lněné mouky jsou tzv. slizy (*water soluble gum*), rozpustná vláknina s vysokou hodnotou vaznosti vody, což významným způsobem ovlivňuje funkční vlastnosti lněné mouky a pravděpodobně je tato komponenta důvodem sníženého objemu produkovaného pečiva. V rámci sensorického hodnocení pečiva, byla varianta s přidavkem lněné mouky negativně hodnocena i z hlediska vzhledu chleba na řezu a objemu pečiva. Snížené zastoupení lněné mouky na 5 % výrazně zlepšilo přijatelnost chleba pro hodnotitele. Přídavek lněné mouky ale neovlivnil chuťové vnímání produktu – obě lněné varianty byly vyhodnoceny jako chuťově srovnatelné s kontrolou. Chuťové odchylky byly zaznamenány u variant s přidanou moukou z konopí a ostropestřce. Při použití konopné



Obr. 56: Pokusné pečení pšenično-žitného chleba s přidavkem mouk připravených z výlisků olejnin (Foto: J. Bárta)

Legenda: 1 – kontrolní varianta (bez přidavku výliskových mouk), 2 – varianta s přidavkem 10 % lněné mouky, 3 – varianta s přidavkem 10 % konopné mouky, 4 – varianta s přidavkem 10 % tykvojové mouky, 5 – varianta s přidavkem 10 % ostropestřcové mouky, 6 – varianta s přidavkem 5 % lněné mouky.

mouky byly hodnotiteli negativně hodnoceny i parametry týkající se barvy kůrky, střídy a celková struktura (soudržnost) produktu. Velmi pozitivně byla hodnotiteli přijata varianta využívající přidavku tykvojové mouky. Naopak chléb s přidavkem mouky z ostropestřce nebyl hodnotiteli přijat kladně a z hlediska celkových preferencí byl vyhodnocen jako nejméně přijatelný, a to zejména z důvodu pocitové "hrubosti" přidané komponenty ostropestřce. Je potřeba doplnit, že přidávaná frakce výliskové mouky 500–710 μm měla hrubší charakter, což patrně ovlivnilo výsledek sensorické analýzy a potvrzuje potřebu hrubší frakce výliskových mouk lépe homogenizovat pomocí finálního mletí (viz obr. 49).

Tabulka 15: Souhrn výsledků senzoričkého hodnocení (vyjádření v bodech 1-9)

| charakteristika | varianta (náhrada 5 nebo 10 % pšenično-žitné mouky výliskovou moukou) | | | | | |
|----------------------|--|-----------|-------------|----------------|---------------|---------------------|
| | kontrola | len 5% | len 10 % | konopí 10 % | tykev 10 % | ostropestř. 10 % |
| vzhled na řezu | 8,5 a | 6,6 b | 5,8 b | 6,5 b | 7,1 ab | 6,6 b |
| barva střídy | 8,7 a | 8,1 ab | 7,0 bc | 5,0 d | 6,1 cd | 6,0 cd |
| barva kůrky | 8,1 a | 7,7 ab | 8,1 a | 6,9 b | 7,6 ab | 8,0 ab |
| vůně - odchylka | 7,4 a | 6,5 a | 6,6 a | 6,1 a | 6,9 a | 6,2 a |
| textura (soudržnost) | 8,2 a | 7,8 ab | 7,9 ab | 6,8 b | 7,4 ab | 6,8 b |
| objem (střídy) | 6,1 a | 4,6 b | 4,0 b | 6,2 a | 5,8 a | 5,9 a |
| vlhkost | 5,4 a | 4,0 b | 4,1 b | 3,9 b | 4,5 ab | 4,5 ab |
| chuť – chyba | 6,1 a | 5,2 abc | 5,9 ab | 4,7 bc | 5,2 abc | 4,4 c |
| celk. přijatelnost | 8,4 a | 6,7 bc | 7,0 ab | 5,4 c | 6,3 bc | 5,6 bc |
| preferance | 2,5 b | 3,8 ab | 3,3 ab | 4,0 a | 3,0 ab | 4,4 a |

Pozn.: zeleně zbarvené hodnoty značí maxima, červeně zbarvené hodnoty minima; rozdílná písmena za hodnotou indikují statisticky průkazný rozdíl mezi variantami v daném parametru na hladině významnosti $P < 0,05$ (Fisher LSD test)

Příprava pšenično-žitného chleba s různými frakcemi výliskové mouky ostropestřce mariánského

Vzhledem k předpokládaným zdravotním benefitům výliskové mouky ostropestřce mariánského bylo na tento pokus s pšenično-žitným chlebem navázáno dvěma testy:

test A se věnoval možnosti stupňované substituce (0, 5, 10, 15 a 20 %) pšenično-žitné směsi ostropestřcovou nesítovanou moukou; **test B** se věnoval substituci pšenično-žitné směsi frakcemi výliskové mouky po prosévání s variabilní zrnitostí (kontrola, nesítovaná výlisková mouka, frakce nad 710 μm , frakce 315–710 μm a frakce pod 315 μm). Všechny varianty ostropestřcové mouky byly před vlastním použitím do těst pomlety na planetovém mlýnu, aby bylo dosaženo jednotné jemné zrnitosti a eliminovaly se případné negativní vjemy hodnotitelů při senzoričké analýze. Postup přípravy pokusných variant chleba a výsledné produkty jsou prezentovány na obrázku 57; receptura pro přípravu výrobků v tabulkách 16 a 17.

A: Příprava těsta



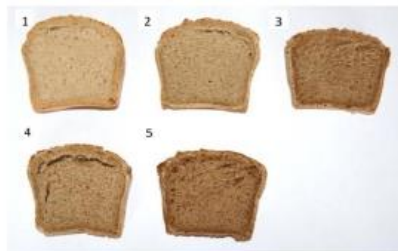
B: Pokusné bochníky - kynutí



C: Pokusné bochníky po upečení

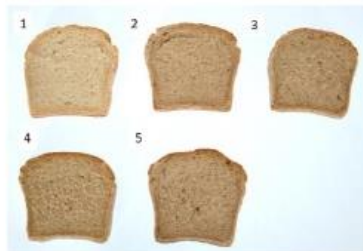


D: Pokus se stupňovanou substitucí



1 – kontrola, 2 – přidavek 5 %, 3 – přidavek 10 %, 4 – přidavek 15 %, 5 – přidavek 20 %

E: Pokus s velikostními frakcemi



1 – kontrola, 2 – mouka nesítovaná, 3 – přidavek frakce >0,71 mm, 4 – přidavek frakce 0,315 – 0,71 mm, 5 – přidavek frakce <0,315 mm

Obr. 57: Příprava pšenično-žitného chleba s přidavkem mouky z výlisků ostropestřce mariánského (Foto: J. Bárta)

Tabulka 16: Recept na přípravu pšenično-žitného chleba – varianta: stupňovaná substituce základní směsi mouky nesítovanou výliskovou moukou ostropestřce mariánského

| <i>složka</i> | <i>kontrola</i> | 5 % | 10 % | 15 % | 20 % |
|---------------------|-----------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| mouka – mix (50:50) | 800 | 760 | 720 | 680 | 640 |
| ostropestřec mouka | 0 | 40 | 80 | 120 | 160 |
| sůl | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 |
| droždí | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 |
| olej | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| ocet | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| voda | 608 | 608 | 608 | 608 | 608 |

Tabulka 17: Recept na přípravu pšenično-žitného chleba – varianta: 10% substituce základní směsi mouky velikostními frakcemi vyliskové mouky ostropestřce mariánského

| <i>složka</i> | <i>kontrola</i> | <i>NS</i> | <i>F>710</i> | <i>F315–710</i> | <i>F<315</i> |
|---------------------|-----------------|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|
| mouka – mix (50:50) | 800 | 720 | 720 | 720 | 720 |
| ostropestřec mouka | 0 | 80 | 80 | 80 | 80 |
| sůl | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 |
| droždí | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 |
| olej | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| ocet | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| voda | 608 | 608 | 608 | 608 | 608 |

Pozn.: NS – nesítovaná vylisková mouka; F>710 – velikostní frakce nad sítím s oky 710 μm , frakce F315–710 – velikostní frakce v intervalu 315 – 710 μm ; F<315 velikostní frakce pod 315 μm .

Tabulka 18: Celková přijatelnost variant pšenično-žitného pro konzumenta dle stupnice (0 – nejnižší hodnocení, 100 – nejlepší hodnocení)

| Test A – stupňovaná substituce nesítovanou vyliskovou moukou | | Test B – substituce 10 % velikostními frakcemi vyliskové mouky | |
|--|----------------------|--|----------------------|
| varianty | celková přijatelnost | varianty | celková přijatelnost |
| kontrola | 67,50 | kontrola | 66,86 |
| přídavek 5 % | 72,56 | nesítovaná mouka | 62,75 |
| přídavek 10 % | 63,62 | frakce >0,71 mm | 60,38 |
| přídavek 15 % | 53,06 | frakce 0,315 – 0,71 mm | 62,13 |
| přídavek 20 % | 45,62 | frakce <0,315 mm | 71,87 |

Získaná data u testu A dokládají snižující se přijatelnost vzorků chleba se zvyšujícím se zastoupením vyliskové mouky ostropestřce, stejně tak bylo vysoké zastoupení vyliskové mouky příčinou výrazných změn barvy a struktury výsledného produktu, jak dokládá obrázek 57d. Jako optimální se tak jeví přídavek vyliskové mouky mezi 5–10 %. Přídavek na úrovni 5 % byl překvapivě hodnotiteli vyhodnocen i jako přijatelnější než kontrolní vzorek.

U testu B byla hodnotiteli vyhodnocena jako nejpřijatelnější varianta s přídavkem jemné frakce (pod 0,315 μm), překonala i samotnou kontrolu (tab. 18). Tato frakce obsahuje vysoký obsah bílkovin (kolem 30 %), má nižší obsah silymarinu než hrubá frakce (nad 710 μm), ale stále výrazně vyšší antioxidační kapacitu v porovnání s přínosy vyliskových mouk z jiných druhů olejnin.

Příprava pšeničných bulek s využitím výliskových mouk minoritních olejnin

Další formou pečiva, u kterého byla testována možnost náhrady části pšeničné mouky výliskovou moukou všech čtyř olejnin, bylo běžné pečivo typu bulek (Uhlířová, 2021). Složení těsta v rámci jednotlivých variant pokusu je uvedeno v tabulce 19. Substituce pšeničné mouky výliskovými moukami byla jednotná u všech variant a činila 5 %. Výsledné produkty jsou prezentovány na obrázku 58. Vyprodukované pečivo bylo hodnoceno z hlediska sensorických vlastností (vzhled, barva kůrky, povrch, barva a vzhled střídky, vůně a chuť) i z pohledu změny obsahu celkových polyfenolů (TPC) a antioxidační aktivity, a tedy případného posunu zdravotního benefitu takto vyrobeného pečiva.

Tabulka 19: Receptura přípravy pečiva s přidavkem výliskových mouk minoritních olejnin

| složení produktu (g) | kontrola | len | ostropěstřec | konopí | tykev |
|----------------------|----------|-----|--------------|--------|-------|
| výlisková mouka | 0 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| mouka pšeničná | 500 | 475 | 475 | 475 | 475 |
| olej | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 |
| cukr | 7,5 | 7,5 | 7,5 | 7,5 | 7,5 |
| sůl | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| koncentrát | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| sušené mléko | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| voda | 300 | 300 | 300 | 300 | 300 |
| droždí | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |

Obr. 58: Pokusné pečení bulek s přidavkem mouk připravených z výlísků olejnin.



Legenda: 1 – kontrolní varianta (bez přidavku výliskových mouk), 2 – varianta s přidavkem lněné mouky, 3 – varianta s přidavkem ostropěstřcové mouky, 4 – varianta s přidavkem konopné mouky, 5 – varianta s přidavkem tykvové mouky (Foto: L. Uhlířová)

U všech vzorků bulek došlo přidavkem výliskové mouky ke změně sensorických vlastností, jak vyjadřuje tabulka 20. S výjimkou hodnoceného parametru chuti bylo u všech ostatních sensorických parametrů zaznamenáno zhoršení vnímaných sensorických vlastností pečiva. U parametru chuti byla velmi pozitivně hodnocena varianta pečiva s přidavkem tykové mouky, což pozitivně koreluje i se zjištěním u vzorků chleba z předchozího pokusu. Tyková mouka disponuje specifickou chutí a vyšší slaností, což dodává produktům výraznější chuť, zároveň ale tato mouka do produktů vnáší typicky zelenou barvu, což může být hodnotiteli vnímáno i negativně. Toto se potvrdilo u parametru vzhledu a barvy střídky, kdy nejlépe byla kromě kontrolní varianty vnímána varianta s přidavkem lnu (použita výlisková mouka žlutosemenné odrůdy), a naopak varianta s přidavkem tykové mouky je v těchto parametrech hodnotiteli vnímána jako nejvíce se lišící od standardu.

Z pohledu případných zdravotních benefitů byla pozornost soustředěna zejména na stanovení obsahu celkových polyfenolů a antioxidační aktivity produktů (viz tabulka 21). Dle předpokladu k významnému navýšení obsahu polyfenolových látek a s tím související antioxidační aktivity došlo u bulek, k jejichž výrobě byla použita výlisková mouka semen

Tabulka 20: Hodnocení sensorických vlastností bulek s přidavkem výliskové mouky

| | kontrola | len | ostropestřec | konopí | tykev |
|-------------------------------|----------|------|--------------|--------|-------|
| ztráta hmotnosti upečením (%) | 11,1 | 12,9 | 11,73 | 12,36 | 11,73 |
| vzhled * | 8,38 | 7,25 | 8,13 | 5,63 | 6,13 |
| kůrka | 8,75 | 8,50 | 7,50 | 5,13 | 6,63 |
| střídka | 9,00 | 9,00 | 7,75 | 6,75 | 5,88 |
| vůně | 9,00 | 9,00 | 8,00 | 7,50 | 7,13 |
| chuť | 5,13 | 4,63 | 4,88 | 5,13 | 8,00 |
| celková přijatelnost | 9,00 | 8,88 | 8,38 | 8,00 | 8,88 |

* hodnocení sensorických ukazatelů (vzhled, kůrka, střídka, vůně a chuť) je uvedeno jako bodové hodnocení od 1 (nejhorší) do 9 (nejlepší).

Tabulka 21: Změny obsahu polyfenolových látek a antioxidační aktivity bulek s přidavkem výliskové mouky

| parametr | kontrola | len | ostropestřec | konopí | tykev |
|--|----------|------|--------------|--------|-------|
| TPC (mg GAE/g suš.) | 0,10 | 0,25 | 1,06 | 0,31 | 0,25 |
| antioxidační aktivita (mg AAE /g suš.) | 0,57 | 0,72 | 1,35 | 0,57 | 0,40 |

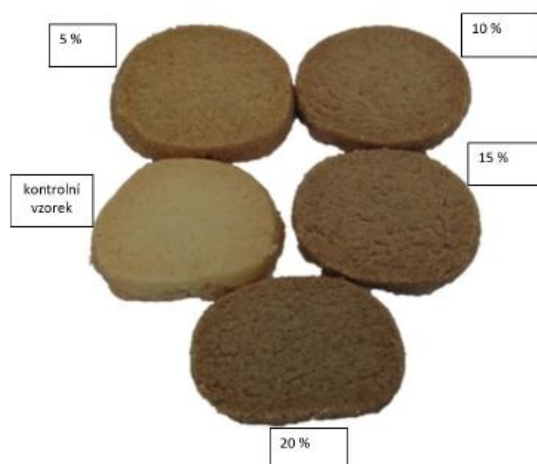
TPC – obsah celkových polyfenolových látek, GAE – ekvivalent gallové kyseliny mg/g suš., AAE – ekvivalent askorbové kyseliny mg/g suš.

ostropestřce mariánského. U této varianty byla antioxidační aktivita na úrovni 1,35 mg ekvivalentů askorbové kyseliny (AAE) mg/g suš., zatímco ostatní varianty se významně nelišily od kontrolní varianty bez výliskové mouky s výjimkou lněné mouky, kde taktéž došlo k mírnému navýšení antioxidační aktivity (0,75 mg AAE/g suš.).

Příprava máslových sušenek s využitím výliskové mouky ostropestřce mariánského

Máslové sušenky představovaly další variantu trvanlivého produktu, kde byla testována možnost využití přídatku výliskové mouky minoritních olejnin. V tomto případě byla pozornost soustředěna na potenciál mouky ostropestřce mariánského vzhledem k významným zdravotním benefitům této suroviny. Vedle kontrolní varianty s 0 % přídatkem zvolené mouky byly testovány varianty s přídatkem 5, 10, 15 a 20 % přídatku mouky ostropestřce mariánského.

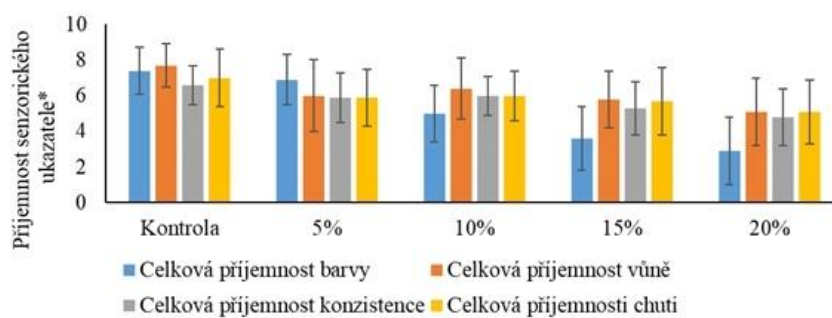
Výsledné produkty jsou uvedeny na obrázku 59 a nutriční parametry získaných výrobků jsou uvedeny v tabulce 22. Z uvedených dat vyplývá, že se stoupajícím podílem náhrady obilných mouk stoupá obsah dusíkatých látek, vlákniny i minerálních látek. Z hlediska sensorického hodnocení produkce (viz obrázek 60) lze konstatovat, sušenky s náhradou mouky z ostropestřce měly tmavší barvu a stejně tak byla přídatkem výliskové mouky ovlivněna i jejich vůně, chuť i textura. Konzumenty byly nejlépe hodnoceny sušenky kontrolní bez přídatku výliskové mouky, přesto i ostatní varianty výrobku byly stále pro konzumenty sensoricky přijatelné. Obecně lze konstatovat, že se zvyšujícím se přídatkem výliskové mouky dochází ke snížení sensorické přijatelnosti výrobku pro konzumenty, a to ve všech hodnocených aspektech (barva, chuť, vůně, textura). Toto zhoršení sensorických vlastností bylo statisticky významné ($p < 0,05$). Nejvýznamnější zhoršení bylo zaznamenáno u příjemnosti barvy, zejména u vzorků, které obsahovaly více než 10 % pokrutin a 10% přídatku výliskové mouky lze tedy chápat jako hraniční. U ostatních hodnocených deskriptorů také docházelo ke zhoršení příjemnosti, nicméně pokles nebyl tak výrazný. Vzorky s 5 % pokrutin byly pro konzumenty sensoricky přijatelné a odchylky oproti kontrolnímu vzorku byly konzumenty vnímány jako minimální. Dále bylo zjištěno, že kontrolní neobohacené vzorky byly oproti vzorkům s výliskovou moukou tvrdší ($p < 0,05$). Nejměkčí byly vzorky s 5 % výliskové mouky, nicméně se zvyšujícím se procentem přídatku mouky tvrdost opět stoupala, nedosáhla ale takové hodnoty jako u kontrolních sušenek. Z hlediska nutričních, sensorický i zdravotních benefitů lze tedy konstatovat, že 5% přídatku výliskové mouky ostropestřce se jeví jako optimální.



Obr 59: Zobrazení jednotlivých variant sušenek se vzestupným podílem mouky z ostropestřce mariánského jako náhrady obilných mouk (v %) (Foto: J. Kadlec)

Tabulka 22: Nutriční hodnoty (g/kg v sušině) u variant sušenek s náhradou obilných mouk výliskovou moukou ostropestřce mariánského

| vzorek (% náhrady) | Původní sušina | Dusíkaté látky | Hrubá vláknina | Tuk | Popel | BNLV |
|-----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------|-------|-------|
| kontrola (0 %) | 964,1 | 64,5 | 3,2 | 281,7 | 3,1 | 647,5 |
| vzorek (5 %) | 961,9 | 73,9 | 6,6 | 283,5 | 4,8 | 631,2 |
| vzorek (10 %) | 963,3 | 74,4 | 8,5 | 283,4 | 6,5 | 627,2 |
| vzorek (15 %) | 964,0 | 74,5 | 12,8 | 285,3 | 8,6 | 618,8 |
| vzorek (20 %) | 963,8 | 82,5 | 13,4 | 286,6 | 10,8 | 606,7 |



Obr. 60: Vyhodnocení senzoričské analýzy (přijemnost ukazatele v bodech) sušenek s přidávkem výliskové mouky ostropestřce mariánského

Nižší tvrdost sušenek s přidavkem mouky z ostropestřce mariánského je pravděpodobně způsobena oslabením lepkové struktury těsta. Mouka z ostropestřce mariánského zvyšuje v těstě obsah vlákniny, což ovlivní vývin lepku a následně texturu hotových sušenek. Do určité míry se v tomto případě může uplatňovat i vliv tuku, kdy adekvátně se stoupajícím podílem mouky z ostropestřce, která vnáší olej s vyšším podílem nenasycených mastných kyselin, se snižoval podíl másla, kde jsou dominantní nasycené mastné kyseliny, což také mohlo přispět k nižší pocitové tvrdosti produktu.

Uplatnění výliskové mouky ostropestřce mariánského s variabilní zrnitostí pro přípravu bezlepkového chleba

Vzhledem k přirozené bezlepkové povaze výliskových mouk olejnin se jeví jako logické pokusit se tyto komponenty inkorporovat do bezlepkových výrobků. Vzhledem k významným zdravotním benefitům byla pro tento účel vybrána výlisková mouka ostropestřce mariánského s variabilitou týkající se velikostní frakcionace této mouky. Výše přidavku mouky byla jednotná, a to 10 %, jak je uvedeno v tab. 23, ale byly zvoleny varianty mouky ostropestřce o různé zrnitosti, a to velikostně od <0,315 μm do >0,71 μm a dále i nesítovaná frakce mouky. Výsledný produkt, bezlepkový chléb v rámci jednotlivých variant pokusu, je prezentován na obr. 61.

Tabulka 23: Receptura kontrolního chleba a chlebů s přidanou ostropestřcovou moukou

| surovina | množství suroviny (%) | |
|----------------------|-----------------------|--|
| | kontrolní chléb | varianta chleba s 10% přidavkem příslušné ostropestřcové mouky |
| čiroková mouka | 23,20 | 20,88 |
| kukuřičná mouka | 11,60 | 10,44 |
| kukuřičný škrob | 5,80 | 5,22 |
| bramborový škrob | 5,80 | 5,22 |
| tapiokový škrob | 5,80 | 5,22 |
| guarová mouka | 0,52 | 0,47 |
| mouka z ostropestřce | 0 | 5,27 |
| slunečnicový olej | 2,32 | 2,32 |
| sůl | 0,81 | 0,81 |
| sušené kvasnice | 0,58 | 0,58 |
| voda | 43,56 | 43,56 |

*10 % bezlepkové směsi mouk bylo nahrazeno různými frakcemi výliskové mouky z ostropestřce mariánského: nesítovaná, hrubá, střední a jemná.

Obr. 61: Produkce bezlepkového chleba s obsahem výliskové mouky ostropestřce mariánského s variabilní zrnitostí (Foto: J. Bedrníček)



kontrola bez přídavku výliskové mouky



výlisková mouka bez sítování (10 %)



výlisková mouka hrubé zrnitosti (10 %)



výlisková mouka střední zrnitosti (10 %)



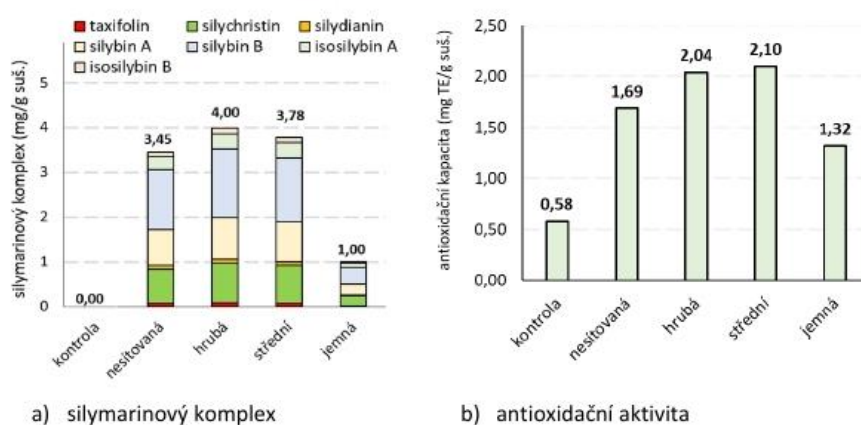
výlisková mouka jemné zrnitosti (10 %)

Přidávky frakcí ostropestřcové mouky do receptury významně změnily chemické složení bezlepkových chlebů. Přídavek frakcí významně zvýšil podíl bílkovin, vlákniny, lipidů, nerozpustné vlákniny a popelovin, naopak bezdusíkaté látky výtahové, které jsou reprezentovány primárně škrobem, se o zhruba 6–8 % snížily. Tyto změny měly za následek i snížení energetické hodnoty chlebů. Z chlebů obohacených o ostropestřcové frakce se vyznačovaly nejvyšším obsahem bílkovin, lipidů i popelovin vzorky s jemnou frakcí. U těch byla naopak zastoupena nerozpustná vláknina v nejnižší míře. Opačný trend byl nalezen u chlebů s hrubou a střední frakcí. Změny v chemickém složení chlebů tedy odpovídaly přímo úměrně chemickému složení samotných frakcí z výliskové mouky.

Kontrolní bezlepková receptura neobsahovala žádné ingredience, které by obsahovaly silymarin, proto v kontrolních chlebech žádný nalezený nebyl, naopak všechny chleby s frakcemi z mouky z ostropestřecových výlisků silymarinový komplex obsahovaly (viz obr. 62a). Nejvyšší obsah silymarinu byl nalezen v chlebech s hrubou frakcí, o něco nižší koncentrace byla nalezena u chlebů se střední frakcí, dále pak u nesítované a nejnižší obsah byl zjištěn u vzorků

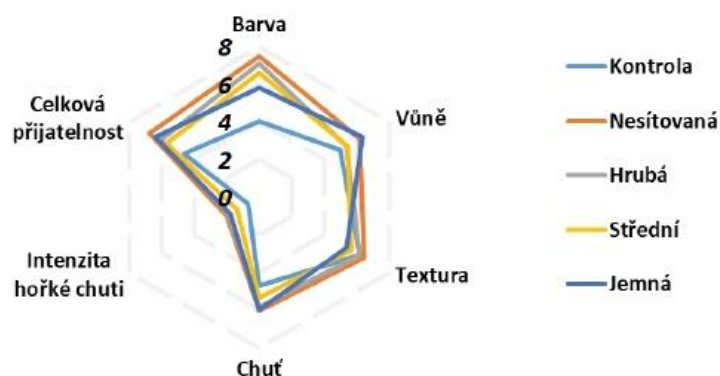
s jemnou frakcí. Pokud by bylo denně konzumováno 200 g chleba obohaceného o tyto frakce (nesítovanou, hrubou, střední a jemnou), pak by příjem silymarinu činil zhruba 436, 504, 480 nebo 126 mg, což jsou, vyjma jemné frakce, porovnatelné dávky s doporučenými denními dávkami, které se pohybují mezi 420 a 600 mg (většinou rozložených do 3 dávek).

Silymarin jako takový je primárně složený silybinem A a B, isosilybinem A a B, taxifolinem, silychristinem a silydianinem. Zastoupení jednotlivých flavonolignanů v silymarinovém komplexu stanoveného v chlebech reflektovalo složení samotných frakcí, které je specifické pro použitou odrůdu ostropestřce, v tomto případě Mirel. Obr. 62a dokládá, že nejdominantnější látkou v silymarinovém komplexu byl silybin B, dále zastoupení jednotlivých látek bylo v tomto pořadí silybin A, silychristin, isosilybin A, isosilybin B, silydianin a taxifolin.



Obr. 62: Obsah silymarinového komplexu a zastoupení jeho složek (a) a antioxidační aktivita (b) vzorků chleba s obsahem a bez obsahu výliskové mouky ostropestřce

S obsahem silymarinu souvisela i antioxidační aktivita, protože je známo, že silymarin vykazuje antioxidační vlastnosti. Antioxidační aktivita byla nejvyšší u vzorků chlebů s hrubou a střední frakcí, dále pak s nesítovanou a jemnou frakcí (obr. 62b). Nejnížší antioxidační aktivita pak byla pochopitelně zjištěna u vzorků kontrolních, které silymarin neobsahovaly. Z toho je zřejmé, že mezi antioxidační aktivitou a obsahem silymarinu existuje velice významná korelační závislost ($r = 0,96$), tudíž antioxidační aktivita je tvořena primárně silymarinovým komplexem.



Obr. 63: Senzorické zhodnocení (pomocí bodové stupnice) kontrolního chleba a chlebů s přidávanými frakcemi výliskové mouky ostropestřce.

U obohacených chlebů byla provedena senzorická analýza panelem 14 hodnotitelů, kteří u všech chlebů hodnotili příjemnost barvy, vůně, textury, chuti, dále intenzitu hořké chuti a celkovou přijatelnost. Z hodnocení vyplynulo, že přidavek frakcí měl pozitivní vliv na příjemnost všech deskriptorů (barva, vůně, chuť a textura) hodnocených chlebů (viz obr. 63). Oproti obohaceným chlebům nebyla u kontrolního vzorku zaznamenána hořká chuť, která je v případě pečiva většinou vnímána negativně. Nicméně intenzita hořké chuti byla natolik nepatrná, že i přes její přítomnost byly hodnocené vzorky lépe hodnocené v ostatních deskriptorech. Hořká chuť může být pravděpodobně způsobena přítomností silymarinového komplexu který, jak již bylo zmíněno, je tvořen flavonolignany, jež spadají do skupiny tzv. polyfenolů. Tyto sloučeniny mohou ve větší koncentraci dávat potravinám (rostlinného) původu nahořklou až natrpklou chuť, zajímavá byla změna barvy střídy i kůry, která byla u obohacených chlebů mnohem tmavší a napovídala by použití například celozrnné mouky. Takový produkt potom může u spotřebitele vyvolávat pocit, že jde o zdravější výrobek a může být pro něj proto více atraktivní.

Výsledky pokusu s přípravou bezlepkového chleba s přidávkem ostropestřcové mouky jsou detailně prezentovány v publikaci Bedrníček a kol. (2022).

5.2. Výrobek z mēlněného masa

Sekaná pečeně s přidávkem výliskových mouk lnu, konopí, ostropestřce a tykve

Jak již bylo vícekrát řečeno, výliskové mouky mají potenciál vnášet při svém využití do potravinářských produktů nové kvalitativní parametry (navýšení obsahu vlákniny, polyfenolových látek, antioxidační aktivity atd.). Z tohoto důvodu byl testován potenciál využití výliskových mouk čtyř hodnocených olejnin pro výrobu masných výrobků, konkrétně

se jednalo o využití vyliskové mouky v produkci sekané pečeně z mēlněného vepřového masa. Ingredience použité pro přípravu vzorků sekané jsou uvedeny v tabulce 24. Pro přípravu variant sekané byly využity vyliskové mouky lněné, konopné, mouky z vylisků ostropestřce a tykve olejné v množství 5 % přídavku (ve vztahu k hmotnosti masa) ve velikostní frakci 500–700 μm. Kontrolním systémem byly varianty sekané pečeně bez obsahu mouky a s obsahem pšeničné mouky. Po upečení byly panelem 26 hodnotitelů hodnoceny parametry: vzhled na řezu, vůně, textura, šťavnatost, chuť a celková přijatelnost pro konzumenta.

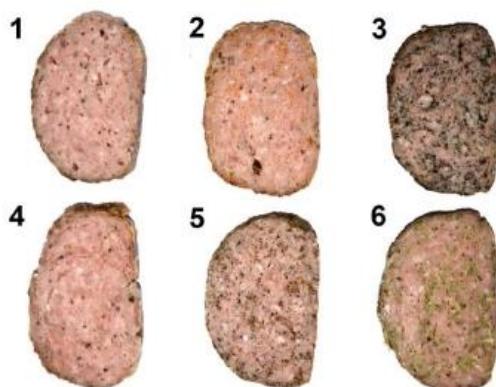
Tabulka 24: Ingredience použité pro přípravu vzorků sekané

| Ingredience | Varianta masového produktu | | | | | |
|-------------------------------|----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | CM | CMP | ML | MK | MO | MT |
| vepřová plec (g) | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 |
| sůl (% HM) | 1,7 | 1,7 | 1,7 | 1,7 | 1,7 | 1,7 |
| voda (% HM) | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| česnek (% HM) | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| pepř černý (% HM) | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| majoránka (% HM) | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| pšeničná mouka hladká (% HM) | - | 5 | - | - | - | - |
| F 0.5-0.7 len (% HM) | - | - | 5 | - | - | - |
| F 0.5-0.7 konopí (% HM) | - | - | - | 5 | - | - |
| F 0.5-0.7 ostropestřec (% HM) | - | - | - | - | 5 | - |
| F 0.5-0.7 tykev (% HM) | - | - | - | - | - | 5 |

Legenda: % HM - % z hmotnosti masa, CM – kontrola mleté masa, CMP – kontrola mleté masa a pšeničná mouka hladká, ML – mleté masa a frakce lněné mouky, MK – mleté masa a frakce konopné mouky, MO – mleté masa a mouka z ostropestřce, MT – mleté masa a mouka z tykve olejné.

Výsledky hodnocení jsou shrnuty v tabulce 25. Vzhled připravených výrobků na řezu je viditelný na obrázku 64. Na základě senzorkého hodnocení panelem hodnotitelů byla jako nejvzhlednější vyhodnocena kombinace masa s hladkou moukou, ale u dalších dvou variant přípravy sekané (varianta bez přídavku plnidla a varianta s přídavkem lněné mouky), nebyl nalezen průkazný rozdíl, a lze je tedy považovat za nadprůměrně vzhledné. Zhoršení vzhledu bylo zaznamenáno u varianty s přídavkem konopné mouky a tykve, což lze přičíst viditelnosti výrazně zbarvených částic na struktuře příčného řezu – v případě konopné mouky se jednalo o tmavé částice ve struktuře sekané, v případě použití tykvové mouky se jednalo o zelené „ostrůvky“ ve struktuře. Tyto nedostatky mohou být zlepšeny dodatečnou homogenizací použité mouky pomocí mletí na planetovém mlýnu (použitá velikostní frakce 500–700 μm má hrubší částicovou strukturu). V textuře jednotlivých variant nebyly nalezeny rozdíly. Co se týče

šťavnatosti, tak zde byly hůře hodnoceny varianty s přidavkem konopné a ostropestřcové mouky, mouky obou olejnin „doplácejí“ na přítomnost tvrdého oplodí, což způsobuje u výrobku při konzumaci pocit suššího sousta. Situaci lze určitě zlepšit již zmíněným dodatečným mletím vybrané frakce na planetovém mlýnu a také změnou použitého masa. Použitá plec je sušší, takže kombinace vepřové plece s vepřovým bokem by měla přinést zlepšení šťavnatosti.



Obr. 64: Příčné řezy jednotlivých variant masného výrobku sekaná (Foto: J. Bárta)

1 – kontrola (pouze maso), 2 – přidavek 5 % lněné mouky, 3 – přidavek 5 % konopné mouky, 4 – přidavek 5 % pšeničné mouky hladké, 5 – přidavek 5 % mouky ostropestřce mariánského, 6 – přidavek 5 % mouky tykve olejné.

Tabulka 25: Výsledky senzoričského hodnocení vzorků sekané s přidavkem výliskových mouk (bodové hodnocení parametrů)

| parametr | CM | CMP | ML | MK | MO | MT |
|--------------------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|
| vzhled na řezu | 6,77 ab | 7,00 a | 6,62 ab | 4,85 cd | 5,65 bc | 4,00 d |
| vůně | 5,35 ab | 6,08 a | 5,31 ab | 4,69 b | 5,69 a | 5,35 ab |
| textura | 6,58 a | 6,35 a | 6,00 a | 6,50 a | 6,50 a | 6,04 a |
| šťavnatost | 3,73 bc | 4,58 a | 4,46 a | 2,88 d | 3,12 cd | 4,38 ab |
| chuť | 4,42 bc | 5,77 a | 5,38 a | 3,50 c | 4,27 bc | 5,72 a |
| celk. přijatelnost | 5,96 a | 7,08 a | 6,35 a | 3,85 b | 4,28 b | 6,20 a |

Legenda: CM – kontrola mleté maso, CMP – kontrola mleté maso a pšeničná mouka hladká, ML – mleté maso a frakce lněné mouky, MK – mleté maso a frakce konopné mouky, MO – mleté maso a mouka z ostropestřce, MT – mleté maso a mouka z tykve olejné.

Rozdílná malá písmena za hodnotami indikují statisticky průkazný rozdíl mezi variantami (v řádku) na hladině významnosti $P < 0,05$ (Fisher LSD test).

V ukazatelích chutí a celková přijatelnost vynikly kromě kontroly s pšeničnou moukou varianty s lněnou a tykвовou moukou. Zajímavé jsou výsledky varianty s použitím mouky ostropestřce, kde navýšení antioxidační aktivity (díky silymarinovému komplexu) přináší zdravotní benefit. Tato varianta produktu byla hodnotiteli vyhodnocena jen jako mírně odlišná od chuti varianty obsahující pouze maso a zároveň chuťově lepší než varianta s konopnou moukou.

Závěrem lze shrnout, že vyliskové mouky je možné využít jako obohacující alternativní komponenty pro různé typy potravinářských produktů. Komplexní sensorické hodnocení výrobku při použití vyliskové mouky olejnin je dáno souhrou konkrétního typu výrobku a vyliskové mouky, která byla použita, ale i použité velikostní frakce a procenta přídavku této komponenty. Z pohledu zdravotních benefitů se varianta různých typů výrobků s přidáním vyliskové mouky ostropestřce mariánského jeví jako velmi perspektivní, neboť oproti ostatním variantám dochází ve finálním výrobku k významnému navýšení obsahu celkových polyfenolových látek a s tím související antioxidační aktivity.

6. Závěr

Minoritní olejnin v podobě olejného lnu, konopí setého, ostropestřce mariánského a tykve olejné jsou důležitou skupinou rostlin, která zcela jistě rozšiřuje variabilitu polních plodin pěstovaných v ČR. Snahou předložené certifikované metodiky bylo nabídnout uživatelům prostřednictvím prezentovaných postupů, metod, výsledků a informací možnost, jak dále zlepšit produkci olejů zmíněných minoritních olejnin a jak zhodnotit vylisky jako vedlejší produkty z lisování do podoby vyliskových mouk, jejich frakcí a koncentrátů bílkovin, které by díky svým nutričním, funkčním a biologickým vlastnostem našly uplatnění při přípravě potravinářských výrobků se zdravotními benefity. Prezentované příklady modelových potravinářských výrobků ukazují, že takovéto uplatnění vyliskových produktů je možné.

SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“

Certifikovaná metodika „Optimalizované postupy a metody zpracování semen vybraných minoritních olejnin na olej a zušlechtněné výrobky z výlisků“ je ve svém komplexním pojetí zpracování vybraných minoritních druhů olejnin (olejný len, konopí seté, ostropestřec mariánský, tykev olejná) zcela nová. Některé dílčí úseky, např. získávání kvalitního oleje ze semen lnu byly v minulosti částečně řešeny, ale v porovnání s rozsahem přinášených postupů a informací předkládanou metodikou se jedná jen o zlomkové části. Drtivá většina tématu předkládané metodiky nebyla u předmětných olejnin v tomto rozsahu dosud řešena.

POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Certifikovaná metodika „Optimalizované postupy a metody zpracování semen vybraných minoritních olejnin na olej a zušlechtněné výrobky z výlisků“ bude uplatněna přes Svaz lnu a konopí, z. s., který sdružuje pěstitele a zpracovatele lnu, konopí a dalších minoritních olejnin v ČR. Metodika bude sloužit členům svazu i ostatním uživatelům jako zdroj informací, postupů a metod pro zefektivnění využití vlastní produkce olejnatých semen v podobě kvalitních olejů, výliskových mouk, jejich frakcí a koncentrátů bílkovin. Se Svazem lnu a konopí uzavřela Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, jako koordinátorské pracoviště řešeného výzkumného projektu č. QK1910302, Smlouvu o uplatnění této certifikované metodiky.

Certifikovaná metodika bude zveřejněna podle pravidel o uplatnění na webových stránkách www.agronavigator.cz, z kterých bude volně dostupná všem dalším potenciálním uživatelům a zájemcům.

Metodiku budou využívat také jednotliví uchazeči projektu č. QK1910302 pro své potřeby. Spolupracující podnik HEMP PRODUCTION CZ, s.r.o. bude postupy a poznatky využívat ve své provozní praxi, všechna tři univerzitní pracoviště ve výuce svých studentů a ostatních vzdělávacích aktivitách. Všechny výzkumné organizace uplatní poznatky zahrnuté v metodice v návazné výzkumné činnosti a poradenství.

EKONOMICKÉ ASPEKTY

Předpokládané přínosy metodiky lze spatřovat v dostupnosti optimalizovaných postupů pro zefektivnění a zkvalitnění produkce olejů vybraných minoritních olejnin u jejich producentů v ČR. Vezmeme-li v úvahu, že se v roce 2020 v ČR vyprodukovalo 1583 t semen lnu a přibližně 280 t nažek konopí, 800 t nažek ostropestřce a 250 t semen tykve olejná, tak pokud by se na lisování olejů použila jen polovina semen (nažek) a z této poloviny by jen polovinu tvořily výlisky, pak by mohly být každoročně vytvořeny výliskové mouky a z nich odvozené produkty v celkovém množství až 715 t. Vezmeme-li v úvahu jako průměrnou cenu výliskové mouky 100 Kč/kg, pak by uvedené množství představovalo potenciální hodnotu 71,5

mil. Kč. Pokud by se povedlo pomocí této metodiky zapojit do potravinářského využití „jen“ 5 % pak by každoroční přínos mohl představovat hodnotu přes 3,5 mil. Kč.

Co se týče ekonomiky produkce přímo u zpracovatele, tak lze odhad ekonomického přínosu dělat jen velmi obtížně, protože neznáme konkrétní zadání. Nicméně pořízení tří hlavních přístrojových komponent pro zpracování semen minoritních olejnin v kategorii malého zpracovatelského podniku (výrobce)/farmáře – šnekový lis s filtrací oleje, nožový mlýn pro dezintegraci semen a získaných výlisků, prosévací (vibrační) stroj s příslušnými sítý – lze pořídit za zhruba 600–750 tis. Kč.

SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- Abenavoli L., Izzo A. A., Milić N., Cicala C., Santini A., Capasso R. (2018): Milk thistle (*Silybum marianum*): A concise overview on its chemistry, pharmacological, and nutraceutical uses in liver diseases. *Phytotherapy Research*, 32: 2202–2213.
- Aladić K., Jokic S., Moslavac T., Tomas S., Vidovic S., Vladić J., Šubarić S. (2014): Cold Pressing and Supercritical CO₂ Extraction of Hemp (*Cannabis sativa*) Seed Oil. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 28: 481 - 490.
- Alonso-Esteban J. I., González-Fernández M. J., Fabrikov D., Torija-Isasa E., de C. Sánchez-Mata M., Guil-Guerrero J. L. (2020): Hemp (*Cannabis sativa* L.) Varieties: Fatty Acid Profiles and Upgrading of γ -Linolenic Acid-Containing Hemp Seed Oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 122: 1900445.
- Bárta J., Bártová V., Jarošová M., Švajner J. (2021a): Bílkoviny výlisků olejnin, jejich izolace a možnosti uplatnění. *Chemické Listy*, 115: 472–480.
- Bárta J., Bártová V., Jarošová M., Švajner J., Smetana P., Kadlec J., Filip V., Kyselka J., Berčíková M., Zdráhal Z., Bjelková M., Kozak M. (2021b): Oilseed Cake Flour Composition, Functional Properties and Antioxidant Potential as Effects of Sieving and Species Differences. *Foods*, 10: 2766.
- Bio Technologies LLC (<http://www.bio-t.pro/>), on-line: 30. 11. 2022
- 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: 2022.
- Bochkarev M. S., Egorova E. Yu., Reznichenko I. Yu., V. M. Poznyakovskiy V. M. (2016): Reasons for the ways of using oilcakes in food industry. *Foods and Raw Materials* 4: 4-12.
- Boško R., Pernica M., Běláková S., Bjelková M., Pluháčková H. (2022): Determination of T-2 and HT-2 Toxins in Seed of Milk Thistle [*Silybum marianum* (L.) Gaertn.] Using Immunoaffinity Column by UPLC-MS/MS. *Toxins*, 14: 258.
- Bučko S., Katona J., Popović L., Vaštag Ž., Petrović L., Vučinić-Vasić M. (2015): Investigation on solubility, interfacial and emulsifying properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein isolate. *LWT - Food Science and Technology*, 64: 609–615.
- Bučko S. D., Katona J. M., Popović L. M., Vaštag Ž. G., Petrović L. B. (2016): Functional properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein isolate and hydrolysate. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 81: 35–46.
- Callaway J. C. (2004): Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica*, 140: 65–72.
- Chéreau D., Videcoq P., Ruffieux C., Pichon L., Motte J.-C., Belaid S., Ventureira J. Lopez M. (2016): Combination of existing and alternative technologies to promote oilseeds and pulses proteins in food applications. *Oilseed & fats Crops and Lipids*, 23: D406.

- Crimaldi M., Faugno S., Sannino M., Ardito L. (2017): Optimization of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) oil mechanical extraction. *Chemical Engineering Transactions*, 58: 373 - 378.
- Day L. (2013): Proteins from land plants – potential resources for human nutrition and food security. *Trends in Food Science and Technology*, 32: 25–42.
- Farinon B, Molinari R, Costantini L, Merendino N. (2020): The seed of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.): Nutritional Quality and Potential Functionality for Human Health and Nutrition. *Nutrients*, 12: 1935.
- Filip V. (2009): Technologie olejů, tuků, detergentů a kosmetiky. V knize: Co byste měli vědět o výrobě potravin? *Technologie potravin* (Kadlec P., Melzoch K., Voldřich M., ed.), kap. 5, str. 295 - 316, KEY Publishing s.r.o., Praha.
- Forsido S. F., Welelaw E., Belachew T., Hensel O. (2021): Effects of storage temperature and packaging material on physico-chemical, microbial and sensory properties and shelf life of extruded composite baby food flour. *Heliyon*, 7: e06821.
- González-Pérez S., Vereijken J. M. (2007): Sunflower proteins: overview of their physicochemical, structural and functional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87: 2173–2191.
- Hadnađev M. S., Dapčević Hadnađev T. R., Pojić M. M., Šarić B. M., Mišan A. Č., Jovanov P. T., Sakač M. B. (2017): Progress in vegetable proteins isolation techniques: a review. *Food and Feed Research*, 44: 11–21.
- Hašková K. (2021): Produkce enzymových hydrolyzátů z bílkovin semen lnu a hodnocení jejich vlastností. Diplomová práce. Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 46 s.
- Jandlova M., Kumbar V., Jarosova A., Pytel R., Nedomova S., Ondrusikova S. (2018): Sensory evaluation of yoghurt with addition of baobab powder, milk thistle flour, cricket flour, chia flour. *PROCEEDINGS OF 25TH INTERNATIONAL PHD STUDENTS CONFERENCE (MENDELNET 2018)*. 285–289.
- Janocha A., Milczarek A., Pietrusiak D. (2021): Impact of Milk Thistle (*Silybum marianum* [L.] Gaertn.) Seeds in Broiler Chicken Diets on Rearing Results, Carcass Composition, and Meat Quality. *Animals*, 11: 1550.
- Javeed A., Ahmed M., Sajid A.R., Sikandar A., Aslam M., Hassan T. U., Samiullah, Nazir Z., Ji M., Li C. (2022): Comparative Assessment of Phytoconstituents, Antioxidant Activity and Chemical Analysis of Different Parts of Milk Thistle *Silybum marianum* L. *Molecules*, 27: 2641.
- Kaur P., Waghmare R., Kumar V., Rasane P., Kaur S., Gat Y. (2018): Recent advances in utilization of flaxseed as potential source for value addition. *Oilseed and fats Crops and Lipids*, 25: A304.
- 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.

- Kaushik P., Dowling K., McKnight S., Barrow C. J., Wang B., Adhikari B. (2016): Preparation, characterization and functional properties of flax seed protein isolate. *Food Chemistry*, 197 (Part A): 212–220.
- Kirnak H, Irik HA, Sipahioglu O, Unlükara A. (2019): Variations in oil, protein, fatty acids and vitamin E contents of pumpkin seeds under deficit irrigation. *Grasas Aceites*, 70: e301.
- Kotecka-Majchrzak K., Sumara A., Fornal E., Montowska M. (2020): Proteomic analysis of oilseed cake: a comparative study of species-specific proteins and peptides extracted from ten seed species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, First published: 06 July 202, <https://doi.org/10.1002/jsfa.10643>.
- Kotecka-Majchrzak K, Sumara A, Fornal E, Montowska M. (2021): Proteomic analysis of oilseed cake: a comparative study of species-specific proteins and peptides extracted from ten seed species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101: 297–306.
- Kozderová V. (2021): Situační a výhledová zpráva – Léčivé, aromatické a kořeninové rostliny. Ministerstvo zemědělství, Praha, 45 s. (ISBN 978-80-7434-595-1)
- Laemmli U. (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680–685.
- Lan Y., Ohm J.-B., Chen B., Rao J. (2020): Physicochemical properties and aroma profiles of flaxseed proteins extracted from whole flaxseed and flaxseed meal. *Food Hydrocolloids*, 104: 105731.
- Li F., Wu X., Zhao T., Li F., Zhao J., Yang L. (2013): Extraction, Physicochemical, and Functional Properties of Proteins From Milk Thistle *Silybum Marianum* L. Gaernt Seeds. *International Journal of Food Properties*, 16: 1750–1763.
- 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.
- Mandal S., Mandal R. K. (2000): Seed storage proteins and approaches for improvement of their nutritional quality by genetic engineering. *Current Science*, 79: 576–589.
- Matthäus B., Brühl L. (2008): Virgin hemp seed oil: an interesting niche product. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110: 655–661.
- Marceddu R., Dinolfo L., Carrubba A., Sarno M., Di Miceli G. (2022): Milk Thistle (*Silybum Marianum* L.) as a Novel Multipurpose Crop for Agriculture in Marginal Environments: A Review. *Agronomy*, 12: 729.
- Murru M., Calvo C. L. (2020): Sunflower protein enrichment. *Methods and potential applications. Oilseeds and fats, Crops and Lipids*, 27: 17.
- Nishinari K., Fang Y., Guo S., Phillips G. O. (2014): Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification. *Food Hydrocolloids*, 39: 301–318.
- Osborne T. B. (1924): *The vegetable proteins*. Longmans Green, London.
- Ozuna C., León-Galván M. F. (2017): Cucurbitaceae Seed Protein Hydrolysates as a Potential Source of Bioactive Peptides with Functional Properties. *BioMed Research International* 2017: Article ID 2121878, 16 pp.

- Parry J., Hao Z., Luther M., Su L., Zhou K., Yu L. (2006): Characterization of cold-pressed onion, parsley, cardamom, mullein, roasted pumpkin, and milk thistle seed oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83: 847–852.
- Pelgrom P. J. M. (2015): Dry fractionation for sustainable production of plant protein concentrates. PhD thesis. Wageningen University, Wageningen, 202 p. (ISBN 978-94-6257-235-5)
- Pokorný J. (2002): Tuky a jiné lipidy. V knize: *Chemie potravin* (Velišek J., ed.), díl 1, kap. 3, str. 107–162. OSSIS, Tábor.
- Popović L., Peričin D., Vaštag Ž., Popović S., Krimer V., Torbica A. (2013): Antioxidative and Functional Properties of Pumpkin Oil Cake Globulin Hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90: 1157–1165.
- Potočník T., Košir I. J. (2017): Influence of roasting temperature of pumpkin seed on PAH and aroma formation. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119: 1500593.
- Raikos V., Konstantinidi V., Duthie G. (2015): Processing and storage effects on the oxidative stability of hemp (*Cannabis sativa* L.) oil-in-water emulsions. *International Journal of Food Science & Technology*, 50. 10.1111/ijfs.12896.
- Renkema, J. M. S. (2001). Formation, structure and rheological properties of soy protein gels. Ph. D. thesis, Wageningen University, The Netherlands, 137 p. (ISBN 90-5808-501-5)
- Rodrigues I. M., Coelho J. F. J., Graca M., Carvalho V. S. (2012): Isolation and valorisation of vegetable proteins from oilseed plants: Methods, limitations and potential. *Journal of Food Engineering*, 109: 337–346.
- Schmidt Š. (2011). Antioxidanty a oxidačné zmeny tukov v potravinách. Bratislava: Nakladateľstvo STU. Edícia monografií. ISBN 978-80-227-3491-2.
- Schmidt Š. (2010): Antioxidanty a oxidačné zmeny tukov v potravinách., kap. 2, str. 4 – 25, Slovenská technická univerzita v Bratislavě, Bratislava 2010.
- Shewry P. R., Napier J. A., Tatham A. S. (1995): Seed Storage Proteins: Structures and Biosynthesis. *The Plant Cell*, 7: 945–956.
- 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: 5–20.
- Singh P., Kumar R., Sabapathy S. N., Bawa A. S. (2008): Functional and edible uses of soy protein products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7: 14–28.
- Stevenson D.G., Eller F.J., Wang L., Jane J.-L., Wang T., Inglett G.E. (2007): Oil and tocopherol content and composition of pumpkin seed oil in 12 cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 4005–4013.
- Stražil Z. (2011a): Len olejnjý (*Linum usitatissimum* L.). V knize: *Alternativní plodiny* (Moudrý J., ed.). Profi Press, Praha, str. 74–75. (ISBN: 978-80-86726-40-3)
- Stražil Z. (2011b): Konopí seté (*Cannabis sativa* L.). V knize: *Alternativní plodiny* (Moudrý J., ed.). Profi Press, Praha, str. 89–93. (ISBN: 978-80-86726-40-3)

- Stražil Z. (2011c): Tykev olejná (*Cucurbita pepo*, var. *oleifera*). V knize: Alternativní plodiny (Moudrý J., ed.). Profi Press, Praha, str. 85–86. (ISBN: 978-80-86726-40-3)
- Šindelková T. (2021): Situační a výhledová zpráva – Olejniny. Ministerstvo zemědělství, Praha, 60 s. (ISBN 978-80-7434-614-9)
- Štolcová M. (2011): Ostropestřec mariánský (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.). V knize: Alternativní plodiny (Moudrý J., ed.). Profi Press, Praha, str. 132–133. (ISBN: 978-80-86726-40-3)
- Tajmohammadi A., Razavi B. M., Hosseinzadeh H. (2018): *Silybum marianum* (milk thistle) and its main constituent, silymarin, as a potential therapeutic plant in metabolic syndrome: A review. *Phytotherapy Research*, 32: 1933–1949.
- Teh S.S., Birch J. (2013): Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed hemp, flax and canola seed oils. *Journal of Food Composition and Analysis*, 30: 26–31.
- Traynham T. L., Myers D. J., Carriquiry, A. L. et al. (2007): Evaluation of Water-Holding Capacity for Wheat–Soy Flour Blends. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84: 151–155.
- Raikos V., Neacsu M., Russell W., Duthie G. (2014): Comparative study of the functional properties of lupin, green pea, fava bean, hemp, and buckwheat flours as affected by pH. *Food Science & Nutrition*, 2: 802–810.
- Uhlířová L. (2021): Příprava běžného pečiva s přidavkem alternativních mouk. Bakalářská práce. Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 61 s.
- Veřejná databáze ČSÚ, dostupné on-line: <https://vdb.czso.cz> (30.11.2022)
- Vonapartis E., Aubin M.-P., Seguin P., Mustafa A. F., Charron J.-B. (2015): Seed composition of ten industrial hemp cultivars approved for production in Canada. *Journal of Food Composition and Analysis* 39: 8–12.
- Von Der Haar D., Müller K., Bader-Mittermaier S., Eisner P. (2014): Rapeseed proteins – Production methods and possible application ranges. *Oilseeds and fats, Crops and Lipids*, 21: D104.
- Vujanovic V., Djilas S., Dimic E., Basic Z., Radocaj O. (2012): The effect of roasting on the chemical composition and oxidative stability of pumpkin oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114: 898–905.
- Wanasundara J. P. D., McIntosh T. C., Perera S. P., Withana-Gamage T. S. (2016): Canola/rapeseed protein functionality and nutrition. *Oilseed and fats Crops and Lipids*, 23: D407.
- Wang, Q. and Xiong, Y.L. (2019), Processing, Nutrition, and Functionality of Hempseed Protein: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18: 936–952.
- Wu S., Wang X., Qi W., Guo Q. (2019): Bioactive protein/peptides of flaxseed: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 92: 184–193.

SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Bárta J., Bártová J., Jarošová M., Jarošová E. (2021): Technologické postupy zvyšující koncentraci bílkovin v produktech odvozených z výlisků olejnin. *Úroda* 12, roč. LXIX, vědecká příloha s. 621-627.
- Bárta J., Bártová V., Jarošová M., Švajner J. (2021): Bílkoviny výlisků olejnin, jejich izolace a možnosti uplatnění. *Chemické Listy*, 115: 472–480.
- 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: 2766.
- Bárta J., Bártová V., Kadlec J., Kyselka J., Filip V., Smetana P., Zdráhal Z., Jarošová M., Bedrníček J., Lorenc F., Jirotková D., Bjelková M., Říha V., Krejčová Z. (2021): Bezlepkový chléb se směsí pro zvýšení obsahu silymarinu.
- Bárta J., Bártová V., Kadlec J., Kyselka J., Filip V., Smetana P., Zdráhal Z., Jarošová M., Bedrníček J., Lorenc F., Jirotková D., Bjelková M., Říha V., Krejčová Z. (2021): Pšenično-žitný chléb se směsí pro zvýšení obsahu silymarinu.
- Bárta J., Bártová V., Kadlec J., Kyselka J., Filip V., Smetana P., Zdráhal Z., Jarošová M., Bedrníček J., Lorenc F., Jirotková D., Bjelková M., Říha V., Krejčová Z. (2021): Masný výrobek (sekaná) se směsí pro zvýšení obsahu silymarinu.
- Bárta J., Bártová V., Kadlec J., Kyselka J., Filip V., Smetana P., Zdráhal Z., Jarošová M., Bedrníček J., Lorenc F., Jirotková D., Bjelková M., Říha V., Krejčová Z. (2021): Máslová sušenka se směsí pro zvýšení obsahu silymarinu.
- Bárta J., Bártová V., Kadlec J., Kyselka J., Filip V., Smetana P., Zdráhal Z., Jarošová M., Bedrníček J., Lorenc F., Jirotková D., Bjelková M., Říha V., Krejčová Z. (2021): Ověřená technologie výroby máslových sušenek se směsí pro zvýšení obsahu silymarinu. (Ověření proběhlo v provozních podmínkách ve společnosti Hemp Production, s.r.o.
- Bárta J., Jarošová M., Bártová V., Švajner J. (2019): Výlisky semen lnu a konopí a jejich zpracování na mouky a bílkovinné koncentráty. *Úroda* 12 (vědecká příloha): 93-100.
- Bárta J., Kadlec J., Bártová V., Smetana P., Jarošová M., Bedrníček J., Lorenc F., Jirotková D., Kyselka J., Filip V., Říha V., Krejčová Z., Zdráhal Z., Bjelková M. (2022): Směs pro zvýšení obsahu silymarinu v pekařských, cukrářských a masných výrobcích, a pekařské a/nebo cukrářské a masné výrobky obsahující tuto směs. Užitný vzor č. 36 388 (U1), zapsáno 6. 10. 2022.
- Bártová V., Bárta J., Jarošová M., Kopecký J. (2019): Antioxidační potenciál mouk připravených z výlisků vybrané skupiny olejnin. *Úroda* 12 (vědecká příloha): 407-412.
- 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: 2022.
- Bjelková M. (2019): Jsou rozdíly v produkci a kvalitativních parametrech odrůd konopí? *Úroda* 67(12): 25-28. ISSN 0139-6013.
- Bjelková M. (2020): Osevní plochy olejného lnu ve světě a v ČR. *Zápisník Len a Konopí 2020*. 3s, 2019 ISBN978-80-87360-63-7.
- Bjelková M. (2020): Přehled a stručná charakteristika odrůd konopí setého ze Společného katalogu odrůd druhů zemědělských plodin EU. *Zápisník Len a Konopí 2020*. 3s, 2019 ISBN978-80-87360-63-7.
- Bjelková M. (2020): Výnosové parametry vybraných odrůd olejných lnů v roce 2019. *Zápisník Len a Konopí 2020*. 3s, 2019 ISBN978-80-87360-63-7.
- Bjelková M. (2021): Vliv ročníku na obsah tuku v semenech odrůd olejného lnu. *Úroda* 12, roč. LXIX, vědecká příloha s. 119-124.
- Boško R., Pernica M., Běláková S., Bjelková M., Pluháčková H. (2022): Determination of T-2 and HT-2 Toxins in Seed of Milk Thistle [*Silybum marianum* (L.) Gaertn.] Using Immunoaffinity Column by UPLC-MS/MS. *Toxins*, 14: 258.
- Dragoun M., Klausová K., Šimicová P., 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: 11689–11703.
- Filip V., Alishevich K., Kyselka J., Pešek E., Berčíková M. (2019): The fate of phytosterols, tocopherols, polyphenols and alfa-linoleic acid after screw pressing of oilseeds under argon atmosphere. 17-th Euro Fed Lipid Congress and Expo, 20-23 October, Sevilla, Spain Poster OXI-017
- Jarošová E., Jarošová M., Kyselka J., Bárta J., Lorenc F., Bártová V., Kobes M. (2021): Hodnocení stability a možnosti ovlivnění přísávkem DL-alfa-tokoferolu u lněného a konopného oleje. *Úroda* 12, roč. LXIX, vědecká příloha s. 653-658.
- Jarošová E., Jarošová M., Kyselka J., Bárta J., Lorenc F., Bártová V., Kobes M. (2021): Hodnocení stability a možnosti ovlivnění přísávkem DL-alfa-tokoferolu u lněného a konopného oleje. *Úroda* 12, roč. LXIX, vědecká příloha s. 653-658.
- Kyselka J., Cihelková K., Lopes-Lutz D., Chudoba J., Váchalová T., Alishevich K., Hrádková I., Berčíková M., Mikolášková M., Filip V. (2020): Mechanism controlling high-temperature degradation of sunflower oil triacylglycerols in the absence of oxygen. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2000228.
- Lorenc F., Jarošová M., Bedrníček J., Smetana P., Bárta J. (2022): Structural Characterization and Functional Properties of Flaxseed Hydrocolloids and Their Application. *Foods*, 11: 2304.

OPONENTI

Odborný oponent:

doc. Ing. Miroslav Jůzl, Ph.D.

Agronomická fakulta

Mendelova univerzita v Brně

Oponent ze státní správy:

MVDr. Ing. Dana Tříška

Odbor potravinářský

Ministerstvo zemědělství

Publikaci bylo Odborem potravinářským Ministerstva zemědělství uděleno osvědčení o uznání metodiky MZE-9135/2023-18122, vydané se souhlasem Odboru precizního zemědělství, výzkumu a vzdělávání MZe.

DEDIKACE

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu č. **QK 1910302** s názvem: **Zpracování vedlejších produktů z lisování semen olejnin na nové výrobky s nutričními a zdravotními přínosy.**

5 ZÁVĚR

Disertační práce byla v širším měřítku zaměřená 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 olejninu 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 vykazala lepší hodnotu pouze vylisková mouka ze semen řepky. Tímto byl potvrzen významný potenciál lněných vylisků 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 vyliskové 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 zušlechtnění 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

- Akhtar, M. N., Mushtaq, Z., Ahmad, N., Khan, M. K., Ahmad, M. H., Hussain, A. I., & Imran, M. (2019). Optimal Ultrasound-Assisted Process Extraction, Characterization, and Functional Product Development from Flaxseed Meal Derived Polysaccharide Gum. *Processes*, 7(4), 189.
- Akl, E. M., Mohamed, S. S., Hashem, A. I., & Taha, F. S. (2020). Biological activities of phenolic compounds extracted from flaxseed meal. *Bulletin of the National Research Centre*, 44(1), 27.
- Akomolafe, S. F., Akinyemi, A. J., Ogunsuyi, O. B., Oyeleye, S. I., Oboh, G., Adeoyo, O. O., & Allismith, Y. R. (2017). Effect of caffeine, caffeic acid and their various combinations on enzymes of cholinergic, monoaminergic and purinergic systems critical to neurodegeneration in rat brain—In vitro. *NeuroToxicology*, 62, 6-13.
- Aladedunye, F., Sosinska, E., & Przybylski, R. (2013). Flaxseed Cyclolinopeptides: Analysis and Storage Stability. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90(3), 419-428.
- Allaby, R. G., Peterson, G. W., Merriwether, D. A., & Fu, Y.-B. (2005). Evidence of the domestication history of flax (*Linum usitatissimum* L.) from genetic diversity of the *sad2* locus. *Theoretical and Applied Genetics*, 112(1), 58-65.
- Amarowicz, R., Wanasundara, P. K. J. P. D., & Shahidi, F. (1994). Chromatographic separation of flaxseed phenolics. *Food / Nahrung*, 38(5), 520-526.
- 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.
- Ayad, R., & Akkal, S. (2019). Chapter 12 - Phytochemistry and biological activities of algerian *Centaurea* and related genera. In R. Atta ur (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 63, pp. 357-414). Elsevier.
- Basiri, S., Haidary, N., Shekarforoush, S. S., & Niakousari, M. (2018). Flaxseed mucilage: A natural stabilizer in stirred yogurt. *Carbohydrate Polymers*, 187, 59-65.
- 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.
- Biliaderis, C. G., & Izydorczyk, M. S. (2006). *Functional Food Carbohydrates*. CRC Press.
- Bloedon, L. T., & Szapary, P. O. (2004). Flaxseed and Cardiovascular Risk. *Nutrition Reviews*, 62(1), 18-27.
- Bouaziz, F., Koubaa, M., Barba, F. J., Roohinejad, S., & Chaabouni, S. E. (2016). Antioxidant Properties of Water-Soluble Gum from Flaxseed Hulls. *Antioxidants*, 5(3), 26.
- Bustamante, M., Oomah, B. D., Rubilar, M., & Shene, C. (2017). Effective *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium infantis* encapsulation with chia seed (*Salvia hispanica* L.) and flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) mucilage and soluble protein by spray drying. *Food Chemistry*, 216, 97-105.
- CABI (Centre for Agriculture and Biosciences International) Crop Protection Compendium. 2018. *Linum usitatissimum* datasheet. Available: <https://www.cabi.org/cpc/datasheet/31053>. [2018, Feb 16,].
- Corbin, C., Fidel, T., Leclerc, E. A., Barakzoy, E., Sagot, N., Falguières, A., Renouard, S., Blondeau, J.-P., Ferroud, C., Doussot, J., Lainé, E., & Hano, C. (2015). Development and validation of an efficient ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 26, 176-185.
- Courts, F. L., & Williamson, G. (2015). The Occurrence, Fate and Biological Activities of C-glycosyl Flavonoids in the Human Diet. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(10), 1352-1367.
- Cui, W., & Mazza, G. (1996). Physicochemical characteristics of flaxseed gum. *Food Research International*, 29(3), 397-402.
- Cui, W., Mazza, G. (2002). Methods for Dehulling of Flaxseed, Producing Flaxseed Kernels and Extracting Lignans and Water-Soluble Fibre from the Hulls. (Canadian Patent CA2167951C).
- Cui, W., Mazza, G., & Biliaderis, C. G. (1994a). Chemical Structure, Molecular Size Distributions, and Rheological Properties of Flaxseed Gum. *Journal of agricultural and food chemistry*, 42(9), 1891-1895.
- Cui, W., Mazza, G., Oomah, B. D., & Biliaderis, C. G. (1994b). Optimization of an Aqueous Extraction Process for Flaxseed Gum by Response Surface Methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 27(4), 363-369.

- Cullis, C. (2011). *Linum*. In C. Kole (Ed.), *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Oilseeds* (pp. 177-189). Springer Berlin Heidelberg.
- Český statistický úřad (2022). Vývoj ploch, hektarových výnosů a sklizní zemědělských plodin, [online, cit. 2022-02-23]. Dostupné z: https://vdb.czso.cz/vdbvo2/faces/cs/index.jsf?page=vystup-objekt&pvo=ZEM02G&f=TABULKA&z=T&skupId=386&katalog=30840&pvo=ZEM02G&evo=v1442_!_ZEM02G-celek_1#w=
- 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.
- Degenhardt, A., Habben, S., & Winterhalter, P. (2002). Isolation of the lignan secoisolariciresinol diglucoside from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 943(2), 299-302.
- Dev, D. K., & Quensel, E. (1988). Preparation and Functional Properties of Linseed Protein Products Containing Differing Levels of Mucilage. *Journal of Food Science*, 53(6), 1834-1837.
- Dev, D. K., & Quensel, E. (1989). Functional properties of linseed protein products containing different levels of mucilage in selected food systems. *Journal of Food Science*, 54(1), 183-186.
- Dev, D. K., & Sienkiewicz, T. (1987). Isolation and subunit composition of 11 S globulin of linseed (*Linum usitatissimum* L.). *Food / Nahrung*, 31(7), 767-769.
- Dev, D. K., Quensel, E., & Hansen, R. (1986). Nitrogen extractability and buffer capacity of defatted linseed (*Linum usitatissimum* L.) flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 37(2), 199-205.
- Devi, R., & Bhatia, M. (2019). Thiol functionalization of flaxseed mucilage: Preparation, characterization and evaluation as mucoadhesive polymer. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 101-106.
- Diederichsen, A., & Hammer, K. (1995). Variation of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L. subsp. *usitatissimum*) and its wild progenitor pale flax (subsp. *angustifolium* (Huds.) Thell.). *Genetic resources and crop evolution*, 42(3), 263-272.
- Diederichsen, A., & Ulrich, A. (2009). Variability in stem fibre content and its association with other characteristics in 1177 flax (*Linum usitatissimum* L.) genebank accessions. *Industrial Crops and Products*, 30(1), 33-39.
- Doyen, A., Udenigwe, C. C., Mitchell, P. L., Marette, A., Aluko, R. E., & Bazinet, L. (2014). Anti-diabetic and antihypertensive activities of two flaxseed protein

- hydrolysate fractions revealed following their simultaneous separation by electro dialysis with ultrafiltration membranes. *Food Chemistry*, 145, 66-76.
- Droźłowska, E., Bartkowiak, A., & Łopusiewicz, Ł. (2020). Characterization of Flaxseed Oil Bimodal Emulsions Prepared with Flaxseed Oil Cake Extract Applied as a Natural Emulsifying Agent. *Polymers*, 12(10), 2207.
- Dzuvor, C. K. O., Taylor, J. T., Acquah, C., Pan, S., & Agyei, D. (2018). Bioprocessing of Functional Ingredients from Flaxseed. *Molecules*, 23(10), 2444.
- Fabre, J.-F., Lacroux, E., Cerny, M., Mouloungui, Z. (2015a). Barriers to the release of flaxseed oil bodies and ways of overcoming them. *OCL*, 22(6) D607.
- Fabre, J.-F., Lacroux, E., Valentin, R., & Mouloungui, Z. (2015b). Ultrasonication as a highly efficient method of flaxseed mucilage extraction. *Industrial Crops and Products*, 65, 354-360.
- Feng, Y., Yang, S.-g., Du, X.-t., Zhang, X., Sun, X.-x., Zhao, M., Sun, G.-y., & Liu, R.-t. (2009). Ellagic acid promotes A β 2 fibrillization and inhibits A β 2-induced neurotoxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 390(4), 1250-1254.
- Flax Council of Canada. 2018. Growing Flax: production, management and diagnostic guide. Winnipeg, Manitoba, Kanada. [online, cit. 2022-02-23]. Dostupné z: <https://flaxcouncil.ca/wp-content/uploads/2015/02/FCOC-growers-guide-v11.pdf>
- Fliniaux, O., Corbin, C., Ramsay, A., Renouard, S., Beejmohun, V., Doussot, J., Falguières, A., Ferroud, C., Lamblin, F., Lainé, E., Roscher, A., Grand, E., Mesnard, F., & Hano, C. (2014). Microwave-Assisted Extraction of Herbacetin Diglucoside from Flax (*Linum usitatissimum* L.) Seed Cakes and Its Quantification using an RP-HPLC-UV System. *Molecules*, 19(3), 3025-3037.
- Fraga-Corral, M., Otero, P., Echave, J., Garcia-Oliveira, P., Carpena, M., Jarboui, A., Nuñez-Estevez, B., Simal-Gandara, J., & Prieto, M. A. (2021). By-Products of Agri-Food Industry as Tannin-Rich Sources: A Review of Tannins' Biological Activities and Their Potential for Valorization. *Foods*, 10(1), 137.
- Fu, Y.-B., Peterson, G., Diederichsen, A., & Richards, K. W. (2002). RAPD analysis of genetic relationships of seven flax species in the genus *Linum* L. *Genetic resources and crop evolution*, 49(3), 253-259.
- 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.
- Gilbertson, H. G. (1990). Linseed (Seed-Flax). *Outlook on Agriculture*, 19(4), 243-249.
- Gitzinger, M., Kemmer, C., Fluri, D. A., Daoud El-Baba, M., Weber, W., & Fussenegger, M. (2011). The food additive vanillic acid controls transgene expression in mammalian cells and mice. *Nucleic Acids Research*, 40(5), e37-e37.
- 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.
- Gray, A. (1887). *The Elements of Botany for Beginners and for Schools*. American Book Company.
- Growing Flax. [online, cit. 2022-02-23]. Dostupné z: <https://www.saskflax.com/growing/growthstages.php>
- Gui, B., Shim, Y. Y., & Reaney, M. J. T. (2012). Distribution of Cyclolinopeptides in Flaxseed Fractions and Products. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(35), 8580-8589.
- Gui, B., Shim, Y. Y., Datla, R. S. S., Covello, P. S., Stone, S. L., & Reaney, M. J. T. (2012). Identification and Quantification of Cyclolinopeptides in Five Flaxseed Cultivars. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(35), 8571-8579.
- Guo, Q., Zhu, X., Zhen, W., Li, Z., Kang, J., Sun, X., Wang, S., & Cui, S. W. (2021). Rheological properties and stabilizing effects of high-temperature extracted flaxseed gum on oil/water emulsion systems. *Food Hydrocolloids*, 112, 106289.
- 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.
- Hellebois, T., Fortuin, J., Xu, X., Shaplov, A. S., Gaiani, C., & Soukoulis, C. (2021). Structure conformation, physicochemical and rheological properties of flaxseed gums extracted under alkaline and acidic conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 192, 1217-1230.

- 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.
- Ho, C. H. L., Cacace, J. E., & Mazza, G. (2008). Mass transfer during pressurized low polarity water extraction of lignans from flaxseed meal. *Journal of Food Engineering*, 89(1), 64-71.
- Hosseinián, S. F., & Beta, T. (2009). Patented Techniques for the Extraction and Isolation of Secoisolariciresinol Diglucoside from Flaxseed. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 1(1), 25-31.
- Hu, Y., Shim, Y. Y., & Reaney, M. J. T. (2020). Flaxseed Gum Solution Functional Properties. *Foods*, 9(5), 681.
- Hwang, C.-F., Chen, Y.-A., Luo, C., & Chiang, W.-D. (2016). Antioxidant and antibacterial activities of peptide fractions from flaxseed protein hydrolysed by protease from *Bacillus altitudinis* HK02. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(3), 681-689.
- Chang, Y., Li, Y., Miao, Q., Jiang, H., & Gao, X. (2017). Rheological Properties of Six Plant-Based Seed Gums. *American Journal of Analytical Chemistry*, 8(11), 690-707.
- Chowdhary, V., Alooparampil, S., Pandya, R. V., & Tank, J. G. (2021). Physiological Function of Phenolic Compounds in Plant Defense System. In *Phenolic Compounds-Chemistry, Synthesis, Diversity, Non-Conventional Industrial, Pharmaceutical and Therapeutic Applications*. IntechOpen.
- 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.
- Imran, M., Ahmad, N., Anjum, F. M., Khan, M. K., Mushtaq, Z., Nadeem, M., & Hussain, S. (2015). Potential protective properties of flax lignan secoisolariciresinol diglucoside. *Nutrition Journal*, 14(1), 71.
- Johnsson, P. (2004). *Phenolic Compounds in Flaxseed Chromatographic and Spectroscopic Analyses of Glucosidic Conjugates* Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala.
- Johnsson, P., Kamal-Eldin, A., Lundgren, L. N., & Åman, P. (2000). HPLC Method for Analysis of Secoisolariciresinol Diglucoside in Flaxseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5216-5219.
- Johnsson, P., Peerlkamp, N., Kamal-Eldin, A., Andersson, R. E., Andersson, R., Lundgren, L. N., & Åman, P. (2002). Polymeric fractions containing phenol glucosides in flaxseed. *Food Chemistry*, 76(2), 207-212.

- Kaewmanee, T., Bagnasco, L., Benjakul, S., Lanteri, S., Morelli, C. F., Speranza, G., & Cosulich, M. E. (2014). Characterisation of mucilages extracted from seven Italian cultivars of flax. *Food Chemistry*, 148, 60-69.
- Kajla, P., Sharma, A., & Sood, D. R. (2015). Flaxseed—a potential functional food source. *Journal of Food Science and Technology*, 52(4), 1857-1871.
- Kanmaz, E. Ö. (2014). Subcritical water extraction of phenolic compounds from flaxseed meal sticks using accelerated solvent extractor (ASE). *European Food Research and Technology*, 238(1), 85-91.
- 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.
- Kaushik, P., Dowling, K., McKnight, S., Barrow, C. J., & Adhikari, B. (2016b). Microencapsulation of flaxseed oil in flaxseed protein and flaxseed gum complex coacervates. *Food Research International*, 86, 1-8.
- Kaushik, P., Dowling, K., McKnight, S., Barrow, C. J., Wang, B., & Adhikari, B. (2016a). Preparation, characterization and functional properties of flax seed protein isolate. *Food Chemistry*, 197, 212-220.
- Kim, J. K., & Park, S. U. (2019). A recent overview on the biological and pharmacological activities of ferulic acid. *EXCLI journal*, 18, 132-138.
- Kitts, D. D., Yuan, Y. V., Wijewickreme, A. N., & Thompson, L. U. (1999). Antioxidant activity of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglycoside and its mammalian lignan metabolites enterodiol and enterolactone. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 202(1), 91-100.
- Korus, J., Witczak, T., Ziobro, R., & Juszczak, L. (2015). Linseed (*Linum usitatissimum* L.) mucilage as a novel structure forming agent in gluten-free bread. *LWT – Food Science and Technology*, 62(1), 257-264.
- 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.

- Kristensen, M., Jensen, M. G., Aarestrup, J., Petersen, K. E. N., Søndergaard, L., Mikkelsen, M. S., & Astrup, A. (2012). Flaxseed dietary fibers lower cholesterol and increase fecal fat excretion, but magnitude of effect depend on food type. *Nutrition & Metabolism*, 9(1), 8.
- Kyselka, J., Rabiej, D., Dragoun, M., Kreps, F., Burčová, Z., Němečková, I., Smolová, J., Bjelková, M., Szydłowska-Czerniak, A., Schmidt, Š., Šarman, L., & Filip, V. (2017). Antioxidant and antimicrobial activity of linseed lignans and phenolic acids. *European Food Research and Technology*, 243(9), 1633-1644.
- Lan, Y., Ohm, J.-B., Chen, B., & Rao, J. (2020). Physicochemical properties and aroma profiles of flaxseed proteins extracted from whole flaxseed and flaxseed meal. *Food Hydrocolloids*, 104, 105731.
- Lay, C.L. and C.D. Dybing. (1989). Linseed. In *Oil Crops of the World*. G. Röbbelen, R.K. Downey, and A. Ashri, Eds. McGraw-Hill, New York, pp. 416–430.
- Li, M.-X., Zhu, H.-Y., Yang, D.-H., Ma, X.-Q., Wang, C.-Z., Cai, S.-Q., Liu, G.-R., Ku, B.-S., & Liu, S.-L. (2012). Production of secoisolariciresinol from defatted flaxseed by bacterial biotransformation. *Journal of Applied Microbiology*, 113(6), 1352-1361.
- Li, X., Yuan, J.-P., Xu, S.-P., Wang, J.-H., & Liu, X. (2008). Separation and determination of secoisolariciresinol diglucoside oligomers and their hydrolysates in the flaxseed extract by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1185(2), 223-232.
- Li, Y., Xu, G., Li, W., Lv, L., & Zhang, Q. (2021). The Role of Ultrasound in the Preparation of Zein Nanoparticles/Flaxseed Gum Complexes for the Stabilization of Pickering Emulsion. *Foods*, 10(9), 1990.
- Liška, M. (2017). *Situační a výhledová zpráva: Olejniny: Praha, Česká republika: Ústav zemědělské ekonomiky a informací.*
- Liu, J., Shim, Y. Y., Poth, A. G., & Reaney, M. J. T. (2016). Conlilin in flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) gum and its contribution to emulsification properties. *Food Hydrocolloids*, 52, 963-971.
- Liu, J., Shim, Y. Y., Shen, J., Wang, Y., & Reaney, M. J. T. (2017). Whey protein isolate and flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) gum electrostatic coacervates: Turbidity and rheology. *Food Hydrocolloids*, 64, 18-27.
- 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.

- Logarušić, M., Radošević, K., Bis, A., Panić, M., Slivac, I., & Gaurina Srček, V. (2020). Biological Potential of Flaxseed Protein Hydrolysates Obtained by Different Proteases. *Plant Foods for Human Nutrition*, 75(4), 518-524.
- Long, J.-j., Zu, Y.-g., Fu, Y.-j., Luo, M., Mu, P.-s., Zhao, C.-j., Li, C.-y., Wang, W., & Li, J. (2012). Oil removal from oily water systems using immobilized flaxseed gum gel beads [10.1039/C2RA20375H]. *RSC Advances*, 2(12), 5172-5177.
- López-Munguía, A., Hernández-Romero, Y., Pedraza-Chaverri, J., Miranda-Molina, A., Regla, I., Martínez, A., & Castillo, E. (2011). Phenylpropanoid Glycoside Analogues: Enzymatic Synthesis, Antioxidant Activity and Theoretical Study of Their Free Radical Scavenger Mechanism. *PLOS ONE*, 6(6), e20115.
- Łopusiewicz, Ł., Bogusławska-Wąs, E., Drozłowska, E., Trocer, P., Dłubała, A., Mazurkiewicz-Zapałowicz, K., & Bartkowiak, A. (2021). The Application of Spray-Dried and Reconstituted Flaxseed Oil Cake Extract as Encapsulating Material and Carrier for Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Materials*, 14(18), 5324.
- Luo, J., Li, Y., Mai, Y., Gao, L., Ou, S., Wang, Y., Liu, L., & Peng, X. (2018). Flaxseed gum reduces body weight by regulating gut microbiota. *Journal of Functional Foods*, 47, 136-142.
- 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. (1983). Studies on linseed proteins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 31(5), 959-963.
- 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.
- Manthey, F. A., Sinha, S., Wolf-Hall, C. E., & Hall III, C. A. (2008). Effect of flaxseed flour and packaging on shelf life of refrigerated pasta. *Journal of Food Processing and Preservation*, 32(1), 75-87.
- Marambe, H. K., & Wanasundara, J. P. D. (2017). Chapter 8 - Protein From Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). In S. R. Nadathur, J. P. D. Wanasundara, & L. Scanlin (Eds.), *Sustainable Protein Sources* (pp. 133-144). Academic Press.
- 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.

- Marconi, O., Calabrò, G., & Perretti, G. (2014). Validation of an Electrochemical Detection–High-Performance Liquid Chromatography Method for Simultaneous Determination of Lignans in Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *Food Analytical Methods*, 7(4), 783-789.
- Martínez-Flores, H. E., Barrera, E. S., Garnica-Romo, M. G., Penagos, C. J. C., Saavedra, J. P., & Macazaga-Alvarez, R. (2006). Functional characteristics of protein flaxseed concentrate obtained applying a response surface methodology. *Journal of Food Science*, 71(8), C495-C498.
- Meagher, L. P., Beecher, G. R., Flanagan, V. P., & Li, B. W. (1999). Isolation and Characterization of the Lignans, Isolariciresinol and Pinosesinol, in Flaxseed Meal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(8), 3173-3180.
- Moczkowska, M., Karp, S., Niu, Y., & Kurek, M. A. (2019). Enzymatic, enzymatic-ultrasonic and alkaline extraction of soluble dietary fibre from flaxseed – A physicochemical approach. *Food Hydrocolloids*, 90, 105-112.
- Morris, D. H. (2007). *Flax: A Health and Nutrition Primer*. Flax Council of Canada.
- Muir, A. D., & Westcott, N. D. (2000). Quantitation of the Lignan Secoisolariciresinol Diglucoside in Baked Goods Containing Flax Seed or Flax Meal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 4048-4052.
- Muir, A. D., & Westcott, N. D. (2003). *Flax: the genus Linum*. Taylor & Francis.
- Nemes, S. M., & Orsat, V. (2012). Evaluation of a Microwave-Assisted Extraction Method for Lignan Quantification in Flaxseed Cultivars and Selected Oil Seeds. *Food Analytical Methods*, 5(3), 551-563.
- Nićiforović, N., & Abramovič, H. (2014). Sinapic Acid and Its Derivatives: Natural Sources and Bioactivity. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(1), 34-51.
- 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.
- Oishi, K., Yamamoto, S., Oike, H., Ohkura, N., & Taniguchi, M. (2017). Cinnamic acid shortens the period of the circadian clock in mice. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 9, 232-237.
- Omoni, A. O., & Aluko, R. E. (2006). Mechanism of the inhibition of calmodulin-dependent neuronal nitric oxide synthase by flaxseed protein hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83(4), 335-340.

- Oomah, B. D. (2001). Flaxseed as a functional food source. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(9), 889-894.
- Oomah, B. D., & Mazza, G. (1993). Flaxseed proteins—a review. *Food Chemistry*, 48(2), 109-114.
- Oomah, B. D., Kenaschuk, E. O., & Mazza, G. (1995). Phenolic Acids in Flaxseed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(8), 2016-2019.
- 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.
- Oomah, B. D., Mazza, G., & Cui, W. (1994). Optimization of protein extraction from flaxseed meal. *Food Research International*, 27(4), 355-361.
- Oomah, B.D. and Mazza, G, Bioactive components of flaxseed: occurrence and health benefits. in: *Phytochemicals and Phytopharmaceuticals*. (eds. F. Shahidi, C.T. Ho.), Champaign: AOCS Press, pp. 105-112, 2000.
- 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.
- Pavelek, M., Tejklová, E., Ondřej, M., & Vrbová, M. (2012). 13 - Developments in fibrous flax breeding and cultivation. In R. M. Kozłowski (Ed.), *Handbook of Natural Fibres* (Vol. 1, pp. 393-468). Woodhead Publishing.
- Pei, K., Ou, J., Huang, J., & Ou, S. (2016). p-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(9), 2952-2962.
- Peirotén, Á., Álvarez, I., & Landete, J. M. (2020). Production of flavonoid and lignan aglycones from flaxseed and soy extracts by *Bifidobacterium* strains. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(5), 2122-2131.
- Peng, D., Ye, J., Jin, W., Yang, J., Geng, F., & Deng, Q. (2022). A review on the utilization of flaxseed protein as interfacial stabilizers for food applications. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 99(9), 723-737.
- Popova, I. E., Hall, C., & Kubátová, A. (2009). Determination of lignans in flaxseed using liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(2), 217-229.

- Prado, N. S., Silva, I. S. V. d., Silva, T. A. L., Oliveira, W. J. d., Motta, L. A. d. C., Pasquini, D., & Otaguro, H. (2018). Nanocomposite films based on flaxseed gum and cellulose nanocrystals. *Materials Research*, 21(6), e20180134.
- Prakash, M., Basavaraj, B. V., & Chidambara Murthy, K. N. (2019). Biological functions of epicatechin: Plant cell to human cell health. *Journal of Functional Foods*, 52, 14-24.
- Prasad, K. (1997). Hydroxyl radical-scavenging property of secoisolariciresinol diglucoside (SDG) isolated from flax-seed. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 168(1), 117-123.
- Prasad, K. (2013). Secoisolariciresinol Diglucoside (SDG) Isolated from Flaxseed, an Alternative to ACE Inhibitors in the Treatment of Hypertension. *International Journal of Angiology*, 22(04), 235-238.
- Prokinová, E., & Kazda, J. (2022). Choroby a škůdci lnu. Úroda. [online, cit. 2022-02-23]. Dostupné z: <https://uroda.cz/choroby-a-skudci-lnu/>
- Qayyum, S., Sultana, A., Heyat, M.B.B., Rahman, K., Akhtar, F., Haq, A.u., Alkhamis, B.A., Alqahtani, M.A., Gahtani, R.M. (2023). Therapeutic Efficacy of a Formulation Prepared with *Linum usitatissimum* L., *Plantago ovata* Forssk., and Honey on Uncomplicated Pelvic Inflammatory Disease Analyzed with Machine Learning Techniques. *Pharmaceutics*, 15, 643.
- Qian, K. Y., Cui, S. W., Wu, Y., & Goff, H. D. (2012). Flaxseed gum from flaxseed hulls: Extraction, fractionation, and characterization. *Food Hydrocolloids*, 28(2), 275-283.
- Qin, L., Xu, S.-y., & Zhang, W.-b. (2005). Effect of enzymatic hydrolysis on the yield of cloudy carrot juice and the effects of hydrocolloids on color and cloud stability during ambient storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(3), 505-512.
- Rabetafika, H. N., Van Remoortel, V., Danthine, S., Paquot, M., & Blecker, C. (2011). Flaxseed proteins: food uses and health benefits. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(2), 221-228.
- Rajendra Prasad, N., Karthikeyan, A., Karthikeyan, S., & Venkata Reddy, B. (2011). Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 349(1), 11-19.
- Ren, X., He, H., & Li, T. (2021). Variations in the structural and functional properties of flaxseed gum from six different flaxseed cultivars. *Food Science & Nutrition*, 9(11), 6131-6138.

- 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.
- Roncaglia, L., Amaretti, A., Raimondi, S., Leonardi, A., & Rossi, M. (2011). Role of bifidobacteria in the activation of the lignan secoisolariciresinol diglucoside. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(1), 159-168.
- 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.
- Safdar, B., Zhihua, P., Xinqi, L., Jatoi, M. A., & Rashid, M. T. (2020). Influence of different extraction techniques on recovery, purity, antioxidant activities, and microstructure of flaxseed gum. *Journal of Food Science*, 85(10), 3168-3182.
- Sainvitu, P., Nott, K., Richard, G., Blecker, C., Jérôme, C., Wathélet, J.-P., Paquot, M., & Deleu, M. (2012). Structure, properties and obtention routes of flaxseed lignan secoisolariciresinol: A review. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 16, 115-124.
- Sharav, O., Shim, Y. Y., Okinyo-Owiti, D. P., Sammynaiken, R., & Reaney, M. J. T. (2014). Effect of Cyclolinopeptides on the Oxidative Stability of Flaxseed Oil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(1), 88-96.
- 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.
- Silva, F. G. D. e., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Netto, F. M., & Miralles, B. (2017). Identification of peptides released from flaxseed (*Linum usitatissimum*) protein by Alcalase® hydrolysis: Antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*, 76, 140-146.
- 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.
- Smith, A. K., Johnsen, V. L., & Beckel, A. C. (1946). Linseed Proteins. *Industrial & Engineering Chemistry*, 38(3), 353-356.

- Sosulski, F. W., & Bakal, A. (1969). Isolated Proteins from Rapeseed, Flax and Sunflower Meals. *Canadian Institute of Food Technology Journal*, 2(1), 28-32.
- Stewart, S., & Mazza, G. (2000). Effect of flaxseed gum on quality and stability of a model salad dressing. *Journal of Food Quality*, 23(4), 373-390.
- Strandås, C., Kamal-Eldin, A., Andersson, R., & Åman, P. (2008). Composition and properties of flaxseed phenolic oligomers. *Food Chemistry*, 110(1), 106-112.
- Stražil, Z. (2011) Len olejní. In: J. Moudrý et al. (Eds.), *Alternativní plodiny* (pp. 74-75). Praha, Česká republika: Profi Press s.r.o.
- 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.
- Středa, T., Bjelková, M. (2007). Yield and quality of Linseed (*Linum usitatissimum* L.) under different planting conditions. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, LV, No. 1, pp. 153–164
- Sun, J., Li, X., Xu, X., & Zhou, G. (2011). Influence of Various Levels of Flaxseed Gum Addition on the Water-Holding Capacities of Heat-Induced Porcine Myofibrillar Protein. *Journal of Food Science*, 76(3), C472-C478.
- Sun, J., Liu, W.-y., Feng, M.-q., Xu, X.-l., & Zhou, G.-h. (2019). Characterization of olive oil emulsions stabilized by flaxseed gum. *Journal of Food Engineering*, 247, 74-79.
- Sytar, O., Hemmerich, I., Zivcak, M., Rauh, C., & Brestic, M. (2018). Comparative analysis of bioactive phenolic compounds composition from 26 medicinal plants. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(4), 631-641.
- Šmirous, P., Baranyk, P., Zelený, V., & Markytán, P. (2010). Len olejní. In P. Baranyk at al. (Eds.), *Olejníny* (pp. 159-170). Praha, Česká republika: Profi Press s.r.o.
- Šmirous, P., Bjelková, M., & Souček, J. (2015). *Metodická příručka pro pěstování olejního lnu*. Šumperk, Česká republika: Grafotyp s.r.o.
- Tan, Z.-J., Wang, C.-Y., Yang, Z.-Z., Yi, Y.-J., Wang, H.-Y., Zhou, W.-L., & Li, F.-F. (2015). Ionic Liquid-Based Ultrasonic-Assisted Extraction of Secoisolariciresinol Diglucoside from Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) with Further Purification by an Aqueous Two-Phase System. *Molecules*, 20(10), 17929-17943.
- Thakur, G., Mitra, A., Pal, K., & Rousseau, D. (2009). Effect of flaxseed gum on reduction of blood glucose and cholesterol in type 2 diabetic patients. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60, 126-136.

- Thompson, L. U., & Cunnane, S. C. (2003). *Flaxseed in Human Nutrition*, Second Edition. Taylor & Francis.
- Tolkachev, O. N., & Zhuchenko, A. A. (2004). Biologically Active Substances of Flax: Medicinal and Nutritional Properties (A Review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 34(7), 360-367.
- Tork, D. G., Anderson, N. O., Wyse, D. L., & Betts, K. J. (2019). Domestication of Perennial Flax Using an Ideotype Approach for Oilseed, Cut Flower, and Garden Performance. *Agronomy*, 9(11), 707.
- Touré, A., & Xueming, X. (2010). Flaxseed Lignans: Source, Biosynthesis, Metabolism, Antioxidant Activity, Bio-Active Components, and Health Benefits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(3), 261-269.
- 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.
- Udenigwe, C. C., Lu, Y.-L., Han, C.-H., Hou, W.-C., & Aluko, R. E. (2009). Flaxseed protein-derived peptide fractions: Antioxidant properties and inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in murine macrophages. *Food Chemistry*, 116(1), 277-284.
- Vaculík, A., & Šmirous, P. (2017). *Zásady pěstování a integrované ochrany olejného lnu v ČR* Agromanual. [online, cit. 2022-02-23]. Dostupné z: <https://www.agromanual.cz/cz/clanky/technologie/zasady-pestovani-a-integrované-ochrany-olejného-lnu-v-cr>
- Vassel, B., & Nesbitt, L. L. (1945). The nitrogenous constituents of flaxseed: II. The isolation of a purified protein fraction. *Journal of Biological Chemistry*, 159(3), 571-584.
- Veeramani, C., Alsaif, M. A., & Al-Numair, K. S. (2018). Herbacetin, a flaxseed flavonoid, ameliorates high percent dietary fat induced insulin resistance and lipid accumulation through the regulation of hepatic lipid metabolizing and lipid-regulating enzymes. *Chemico-Biological Interactions*, 288, 49-56.
- Velalopoulou, A., Tyagi, S., Pietrofesa, R. A., Arguiri, E., & Christofidou-Solomidou, M. (2015). The Flaxseed-Derived Lignan Phenolic Secoisolariciresinol Diglucoside (SDG) Protects Non-Malignant Lung Cells from Radiation Damage. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(1), 7.
- 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.

- Vinothiya, K., & Ashokkumar, N. (2017). Modulatory effect of vanillic acid on antioxidant status in high fat diet-induced changes in diabetic hypertensive rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 87, 640-652.
- Wanasundara, J. P. D., & Shahidi, F. (1994). Alkanol-ammonia-water/hexane extraction of flaxseed. *Food Chemistry*, 49(1), 39-44.
- Wanasundara, P. K. J. P. D., & Shahidi, F. (1996). Optimization of Hexametaphosphate-Assisted Extraction of Flaxseed Proteins Using Response Surface Methodology. *Journal of Food Science*, 61(3), 604-607.
- Wang, C.-Z., Ma, X.-Q., Yang, D.-H., Guo, Z.-R., Liu, G.-R., Zhao, G.-X., Tang, J., Zhang, Y.-N., Ma, M., Cai, S.-Q., Ku, B.-S., & Liu, S.-L. (2010). Production of enterodiol from defatted flaxseeds through biotransformation by human intestinal bacteria. *BMC Microbiology*, 10(1), 115.
- Wang, M., Huang, G., Zhang, G., Chen, Y., Liu, D., & Li, C. (2021). Selective flotation separation of fluorite from calcite by application of flaxseed gum as depressant. *Minerals Engineering*, 168, 106938.
- Wang, Y., Li, D., Wang, L.-J., Li, S.-J., & Adhikari, B. (2010). Effects of drying methods on the functional properties of flaxseed gum powders. *Carbohydrate Polymers*, 81(1), 128-133.
- Wei, C.-K., Thakur, K., Liu, D.-H., Zhang, J.-G., & Wei, Z.-J. (2018). Enzymatic hydrolysis of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) protein and sensory characterization of Maillard reaction products. *Food Chemistry*, 263, 186-193.
- Wei, X., Zhao, Z., Zhong, R., & Tan, X. (2021). A comprehensive review of herbacetin: From chemistry to pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 279, 114356.
- Wu, S., Wang, X., Qi, W., & Guo, Q. (2019). Bioactive protein/peptides of flaxseed: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 92, 184-193.
- Xiao, J. (2017). Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(9), 1874-1905.
- Xu, Y., Hall III, C., & Wolf-Hall, C. (2007). Antifungal Activity Stability of Flaxseed Protein Extract Using Response Surface Methodology. *Journal of Food Science*, 73(1), M9-M14.
- Xu, Y., Hall, C., Wolf-Hall, C., & Manthey, F. (2008). Fungistatic activity of flaxseed in potato dextrose agar and a fresh noodle system. *International Journal of Food Microbiology*, 121(3), 262-267.
- Yang, C., Hu, C., Zhang, H., Chen, W., Deng, Q., Tang, H., & Huang, F. (2020). Optimization for preparation of oligosaccharides from flaxseed gum and

- evaluation of antioxidant and antitumor activities in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*, 153, 1107-1116.
- Yang, X., Guo, Y., Tse, T. J., Purdy, S. K., Mustafa, R., Shen, J., Alcorn, J., & Reaney, M. J. T. (2021). Oral Pharmacokinetics of Enriched Secoisolariciresinol Diglucoside and Its Polymer in Rats. *Journal of Natural Products*, 84(6), 1816-1822.
- Youle, R. J., & Huang, A. H. C. (1981). Occurrence of Low Molecular Weight and High Cysteine Containing Albumin Storage Proteins in Oilseeds of Diverse Species. *American Journal of Botany*, 68(1), 44-48.
- Yu, X., Huang, S., Yang, F., Qin, X., Nie, C., Deng, Q., Huang, F., Xiang, Q., Zhu, Y., & Geng, F. (2022). Effect of microwave exposure to flaxseed on the composition, structure and techno-functionality of gum polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 125, 107447.
- Yuan, J.-P., Li, X., Xu, S.-P., Wang, J.-H., & Liu, X. (2008). Hydrolysis Kinetics of Secoisolariciresinol Diglucoside Oligomers from Flaxseed. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(21), 10041-10047.
- Zajac, T., Andrzej, O., Klimek-Kopyra, A., & Kulig, B. (2012). Biological determinants of plant and crop productivity of flax (*Linum usitatissimum* L.). *Acta Agrobotanica*, 65(4), 3-14.
- Zelentsov, S., Moshnenko, E., Ryabenko, L., & Ovcharova, L. (2018). The types and methods of natural pollination of flax *Linum usitatissimum*. *Oil crops. Scientific and technical Bulletin of VNIIMK*, 1(173): 105-113.
- Zhang, W., & Xu, S. (2007). Microwave-assisted extraction of secoisolariciresinol diglucoside from flaxseed hull. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(8), 1455-1462.
- Zhang, W., Wang, X., Liu, Y., Tian, H., Flickinger, B., Empie, M. W., & Sun, S. Z. (2008). Dietary flaxseed lignan extract lowers plasma cholesterol and glucose concentrations in hypercholesterolaemic subjects. *British Journal of Nutrition*, 99(6), 1301-1309.
- Zhang, Z.-S., Li, D., Wang, L.-J., Ozkan, N., Chen, X. D., Mao, Z.-H., & Yang, H.-Z. (2007). Optimization of ethanol–water extraction of lignans from flaxseed. *Separation and Purification Technology*, 57(1), 17-24.
- Zhou, W. W., Meng, L., Li, X., Ma, L., & Dai, R. (2010). Effect of the interaction between carrageenan, gellan gum and flaxseed gum on quality attributes of starch-free emulsion-type sausage. *Journal of Muscle Foods*, 21(2), 255-267.
- Zuk, M., Richter, D., Matuła, J., & Szopa, J. (2015). Linseed, the multipurpose plant. *Industrial Crops and Products*, 75, 165-177.

7 SEZNAM TABULEK A OBRÁZKŮ

Seznam tabulek

| | |
|--|-----|
| Tab. 1: Taxonomické zařazení lnu setého (převzato a upraveno podle Qayyum et al., 2023) | 20 |
| Tab. 2: Vybrané charakteristiky odrůdových typů lnu (upraveno podle Šmirous et al., 2015; Thompson & Cunnane, 2003; Středa & Bjelková, 2007) | 21 |
| Tab. 3: Chemické složení semene lnu (převzato a upraveno podle Morris, 2007; Kajla et al., 2015) | 32 |
| Tab. 4: Profil hlavních mastných kyselin ve lněném oleji (převzato a upraveno podle Goyal et al., 2014) | 33 |
| Tab. 5: 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) | 37 |
| Tab. 6: Výskyt a relativní zastoupení monosacharidů v rámci sacharidové složky lněného slizu (převzato a upraveno dle studií: Safdar et al., 2019; Kaushik et al., 2017; Qian et al., 2012; Cui & Mazza, 1996) | 38 |
| Tab. 7: Antioxidační aktivity lněného slizu extrahovaného při různých teplotách a zastoupení fenolových látek (převzato a upraveno z práce Vieira et al., 2019)..... | 45 |
| Tab. 8: Aminokyselinové složení semen tří odrůd a jednoho poddruhu lnu setého (převzato a upraveno podle Oomah & Mazza, 1993*; Morris, 2007*, Giacomino et al., 2013**) | 48 |
| Tab. 9: Rozmezí hodnot výnosových parametrů a základního chemického složení semen šesti odrůd lnu setého získaných v rámci tříletého pěstitelského experimentu | 111 |
| Tab. 10: Rozmezí hodnot obsahu celkových polyfenolů, antioxidačních aktivit a lignanů v semenech šesti odrůd lnu setého získaných v rámci tříletého pěstitelského experimentu | 112 |
| Tab. 11: Rozmezí hodnot základních konstituentů v semenech a jeho produktů u tří odrůd (Agriol, Raciol a Libra) lnu setého | 149 |

Seznam obrázků

| | |
|--|----|
| Obr. 1: Rozsahy technické délky stonku lnu (převzato a upraveno podle Tork et al., 2019) | 23 |
| Obr. 2: Stupně samovolného otevírání ve zralých tobolkách lnu setého (převzato a upraveno podle Muir & Westcott, 2003) | 24 |
| Obr. 3: Morfologie plodu lnu setého (převzato a upraveno podle Gray, 2010)..... | 24 |
| Obr. 4: Variabilita zbarvení semen u lnu setého (převzato a upraveno podle Tork et al., 2019)..... | 25 |
| Obr. 5: Průřez lněným semenem (převzato a upraveno podle Muir & Westcott, 2003) | 26 |

| | |
|---|-----|
| Obr. 6a: Růstové fáze olejného lnu (převzato a upraveno podle Growing Flax, 2022, Šmirous et al., 2015) | 27 |
| Obr. 6b: Růstové fáze olejného lnu (převzato a upraveno podle Growing Flax, 2022, Šmirous et al., 2015) | 27 |
| Obr. 7: Návrh způsobů extrakce lněného slizu ze semen lnu setého (převzato a upraveno podle Safdar et al., 2020) | 39 |
| Obr. 8: Návrh přípravy bílkovinného izolátu ze semen lnu (převzato a upraveno podle Kaushik et al., 2016a)..... | 51 |
| Obr. 9: Struktura lignanů obsažených ve lněném semenu (převzato a upraveno podle Johnsson, 2004)..... | 57 |
| Obr. 10: Struktura flavonoidů (A), fenolových kyselin (B) a fenylypropanoid glukosidů (C) obsažených ve lněném semenu (převzato a upraveno podle Herchi et al., 2014; Kasote, 2014) | 59 |
| Obr.11: Obecné schéma postupu extrakce, purifikace a kvantifikace secoisolariciresinol diglukosidu (převzato a upraveno podle Hosseinian & Beta, 2009)..... | 62 |
| Obr. 12: Schématické vyjádření možností extrakce bílkovin a slizů lněných semen, jejich funkčních vlastností a příklady využití v potravinářských výrobcích (Převzato a upraveno podle Lorenc et al., 2022)..... | 70 |
| Obr. 13: Jednoduchý způsob extrakce slizu z celých semen nebo vedlejších produktů lněného semene a možnosti jeho využití v rámci různých potravinářských a dietetických aplikací. (převzato a upraveno podle Lorenc et al., 2024) | 97 |
| Obr. 14: Fotografický záznam polního experimentu zachycující vývoj rostlin lnu setého (zleva doprava) v rámci jejich vegetačního období (květen-srpen)..... | 110 |
| Obr. 15: Slizotvorné polysacharidy lněného semene získané pomocí horkovodní extrakce | 142 |
| Obr. 16: Obecný postup zpracování výlisků olejných semen a vliv prosévání na vybrané vlastnosti hrubé a jemné frakce výliskové mouky lnu setého (převzato a upraveno podle Bárta et al., 2021)..... | 171 |
| Obr. 17: Vzorčky výliskové mouky a jejích produktů v průběhu analýzy rozpustnosti | 171 |
| Obr. 18: Výtěžnost hrubé a jemné frakce výliskové mouky; základní chemické složení, funkční vlastnosti a antioxidační aktivity celkové, hrubé a jemné frakce výliskové mouky (Upraveno podle Bárta et al., 2021)..... | 172 |

8 PROHLÁŠENÍ AUTORŮ

Níže uvedení zástupci autorských kolektivů prohlašují, že se Ing. Markéta Jarošová významnou měrou podílela na publikacích uvedených v této disertační práci.

doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.

Ing. František Lorenc, Ph.D.

Dne 4. dubna 2024 v Českých Budějovicích

9 SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

Publikace v časopise s IF

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. [JIF = 5,2; Q1 (FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY)]

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. [JIF = 4,0; Q1 (PLANT SCIENCES)]

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. [JIF = 3,3; Q2 (FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY)]

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. [JIF = 4,5; Q1 (PLANT SCIENCES)]

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. [JIF = 7,675; Q1 (FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY)]

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. [JIF = 5,895; Q1 (FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY)]
- 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. [JIF = 5,561; Q1 (FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY)]
- 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. [JIF = 4,350; Q2 (FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY)]
- Bárta, J., Bártová, V., **Jarošová, M.**, Švajner, J. (2021). Proteins of Oilseed Cakes, Their Isolation and Usage Possibilities. *Chemické Listy*, 115(9): 472-480. [JIF = 0,381; Q4 (CHEMISTRY, MULTIDISCIPLINARY)]
- 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. [JIF = 4,350; Q2 (FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY)]
- 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. [JIF = 1,986; Q3 (FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY)]
- 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. [JIF = 3,340; Q2 (BIOTECHNOLOGY & APPLIED MICROBIOLOGY)]

Publikace v recenzovaných časopisech

Janoušek Honesová, S., Samková, E., Bárta, J., Janů, T., Hasoňová, L., Moudrá, P., **Jarošová, M.**, Bártová, V. (2023). Využití produktů z lněných semen v mléčných výrobcích: review (The use of flaxseed in dairy products: review). *Mlékařské listy - Zpravodaj*, 201, 34 (6): 12–16.

Jarošová, M., Bárta, J., Bártová, V., Lorenc, F., Kyselka, J., Filip, V., Stupková, A., Smetana, P., Kadlec, J., Bjelková, M. (2022). Hodnocení obsahu dusíkatých látek a bílkovin v semenech vybraných odrůd olejného lnu a konopí setého. *Vědecká příloha časopisu Úroda*, 70(12): 437-444.

Kobes, M., **Jarošová, M.**, Hýbl, M., Mráz, P. (2022). Botanická skladba a produktivita pastevního porostu při různém zatížení a systému pastvy. *Vědecká příloha časopisu Úroda*, 70(12): 295-302.

Stupková, A., Bárta, J., **Jarošová, M.**, Bártová, V., Švajner, J. (2022). Aktivita inhibitorů trypsinu u vybraných odrůd sóji. *Vědecká příloha časopisu Úroda*, 70(12): 471-476.

Kobes, M., **Jarošová, M.** (2021). Vliv dlouhodobého hnojení digestátem na pícninářské charakteristiky trvalého travního porostu a půdní prostředí. *Vědecká příloha časopisu Úroda*, 69(12): 435-440.

Bárta, J., Bártová, V., **Jarošová, M.**, Jarošová, E. (2021). Technologické postupy zvyšující koncentraci bílkovin v produktech odvozených z výlisků olejnin. *Vědecká příloha časopisu Úroda*, 69(12): 621-627.

Jarošová, E., **Jarošová, M.**, Kyselka, J., Bárta, J., Lorenc, F., Bártová, V., Kobes, M. (2021). Hodnocení stability a možnosti ovlivnění přidávkem dl-alfa-tokoferolu u lněného a konopného oleje. *Vědecká příloha časopisu Úroda*, 69(12): 653-658.

- Jarošová, M.**, Bárta, J., Bártová, V., Bjelková, M. (2020). Funkční vlastnosti slizotvorné frakce z lněného semene. *Vědecká příloha časopisu Úroda*, 68(12): 537-541.
- Bárta, J., Bártová, V., **Jarošová, M.**, Jarošová, E., Švajner, J. (2020). Semena olejnin jako významný zdroj bílkovin pro potravinářské aplikace. *Vědecká příloha časopisu Úroda*, 68(12): 512-522.
- Jarošová, M.**, Bárta, J., Bártová, V. (2019). Studium vlastností a biologických aktivit mouky lnu olejného. *Vědecká příloha časopisu Úroda*, 67(12): 437-440.
- Bárta, J., Bártová, V., **Jarošová, M.**, Švajner, J. (2019). Výlisky semen lnu a konopí a jejich zpracování na mouky a bílkovinné koncentráty. *Vědecká příloha časopisu Úroda*, 67(12): 93-100.
- Bártová, V., Bárta, J., **Jarošová, M.**, Kopecký, J. (2019). Antioxidační potenciál mouk připravených z výlisků vybrané skupiny olejnin. *Vědecká příloha časopisu Úroda*, 67(12): 407-412.
- 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.
- Bártová, V., Diviš, J., Bárta, J., **Jarošová, M.**, Švajner, J., Smetana, P., Bedrníček, J., Laknerová, I., Linhartová, Z., Kadlec, J., Mráz, J., Pešek, M., Wintrová, N., Vrchotová, N., Tříška, J. (2018). Pomocné látky v rostlinné výrobě a jejich vliv na antioxidační aktivitu hlíz bramboru. *Vědecká příloha časopisu Úroda*, 66(12): 401-404.
- Bártová, V., Diviš, J., Bárta, J., **Jarošová, M.**, Švajner, J., Smetana, P., Bedrníček, J., Laknerová, I., Linhartová, Z., Kadlec, J., Mráz, J., Pešek, M., Wintrová, N., Vrchotová, N., Tříška, J. (2018). Charakteristika mouky ze salátové řepy (*Beta vulgaris* var. *conditiva*) a její antioxidační aktivita. *Vědecká příloha časopisu Úroda*, 66(12): 397-400.
- Jarošová, M.**, Lorenc, F., Bártová, V., Bárta, J. (2017). Produkce izolátu konopných bílkovin pomocí izoelektrického srážení. *Vědecká příloha časopisu Úroda*, 65(12): 551-554.

Příspěvky na konferencích a ve sbornících

Janoušek Honesová, S., Samková, E., Bárta, J., **Jarošová, M.**, Moudrá, P., Bártová, V. (2023). Senzorická přijatelnost jogurtů s přídavkem lněné mouky: pilotní studie. Konference „Minoritní olejniný – význam, pěstování, využití“. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, s. 79–83. ISBN 978-80-7694-033-8.

Jarošová, M., Bedrníček H., Lorenc F., Petrášková E., Bárta J. (2023). Porovnání výnosu, chemického složení a antioxidačního potenciálu u experimentálně pěstovaných odrůd lnu setého olejného (*Linum usitatissimum* L.). Konference „Minoritní olejniný – význam, pěstování, využití“. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, s. 79–83. ISBN 978-80-7694-033-8.

Jarošová, E., **Jarošová M.**, Lorenc F., Bedrníček J., Smetana P., Říha V., Bárta J. (2023). Vliv přídavku cibulových slupek a slupek z konopného oplodí na oxidační stabilitu konopného oleje. Konference „Hygiena Alimentorum XLIII – Zdravotná bezpečnost a kvalita mléčných a rostlinných komodit – aktuálně problémy a trendy“, s 364–371. ISBN 978-80-8077-787-6.

Jarošová, M., Jarošová, E., Bárta, J., Lorenc, F., Vítková, V., Uhlířová, L. Kvalitativní parametry ovlivněné odrůdou a ročníkem lnu setého olejného a využití lněných výlisků. In: Sborník přednášek, 59. Mezinárodní konference o olejích a tucích: Česká společnost chemická, odborná skupina pro tuky, detergenty a kosmetickou chemii, Praha, Česká republika. ISBN 978-80-88307-10-5.

Jarošová, M., referát na semináři: Lnářský a konopářský rok 2023, pořádaný: Svazem lnu a konopí ČR, z.s. a Agritec Plant Research s.r.o. Téma referátu: Bílkoviny ve lněném semeni, Šumperk, Česká republika.

Jarošová, M., referát na semináři: Lnářský a konopářský rok 2022, pořádaný: Svazem lnu a konopí ČR, z.s. a Agritec Plant Research s.r.o. Téma referátu: Bílkoviny výlisků lnu a konopí, Šumperk, Česká republika.

Aplikované výsledky

Certifikovaná metodika

Jihočeská univerzita V Českých Budějovicích, Agritec Plant Research S.R.O., CZ
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, HEMP PRODUCTION CZ,
s.r.o., Masarykova univerzita. Optimalizované postupy a metody zpracování
semen vybraných minoritních olejnin na olej a zušlechtěné výrobky z výlisků.
Bárta, J., Bártová, V., Bjelková, M., Bedrníček, J., Berčíková, M., Filip, V.,
Jarošová, E., **Jarošová, M.**, Kadlec, J., Krejčová, Z., Kyselka, J., Lorenc, F.,
Pešek, E., Roudnický, P., Říha, R., Říha, V., Smetana, P., Stupková, A., Švajner,
J., Uhlířová, L., Zdráhal, Z. ISBN 978-80-7394-955-6. 2022.

Užitný vzor

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Vysoká škola chemicko-technologická
v Praze, HEMP PRODUCTION CZ, s.r.o., Masarykova univerzita, Agritec Plant
Research s.r.o.. Směs pro zvýšení obsahu silymarinu v pekařských, cukrářských
a masných výrobcích a pekařské a/nebo cukrářské a masné výrobky obsahující
tuto směs. Bárta, J., Kadlec, J., Bártová, V., Smetana, P., **Jarošová, M.**,
Bedrníček, J., Lorenc, F., Jirotková, D., Kyselka, J., Filip, V., Říha, V., Krejčová,
Z., Zdráhal, Z., Bjelková, M. 36388. 06.10.2022.

Jihočeská univerzita V Českých Budějovicích, HEMP PRODUCTION CZ, s.r.o..
Koncentrát bílkovin ze semen konopí setého. Bárta, J., Bártová, V., **Jarošová,
M.**, Stupková, A., Bedrníček, J., Lorenc, F., Smetana, P., Kadlec, J., Říha, V.,
Krejčová, Z. 36820. 20.12.2022.

Ověřená technologie

Bárta, J., Bártová, V., Kadlec, J., Kyselka, J., Filip, V., Smetana, P., Zdráhal, Z., **Jarošová, M.**, Bedrníček, J., Lorenc, F., Jirotková, D., Bjelková, M., Říha, V., Krejčová, Z. (2021). Ověřená technologie výroby máslových sušenek se směsí pro zvýšení obsahu silimarinu.

Funkční vzorek

Bárta, J., Bártová, V., Kadlec, J., Kyselka, J., Filip, V., Smetana, P., Zdráhal, Z., **Jarošová, M.**, Bedrníček, J., Lorenc, F., Jirotková, D., Bjelková, M., Říha, V., Krejčová, Z. (2021). Bezlepkový chléb se směsí pro zvýšení obsahu silimarinu.

Bárta, J., Bártová, V., Kadlec, J., Kyselka, J., Filip, V., Smetana, P., Zdráhal, Z., **Jarošová, M.**, Bedrníček, J., Lorenc, F., Jirotková, D., Bjelková, M., Říha, V., Krejčová, Z. (2021). Pšenično-žitný chléb se směsí pro zvýšení obsahu silimarinu.

Bárta, J., Bártová, V., Kadlec, J., Kyselka, J., Filip, V., Smetana, P., Zdráhal, Z., **Jarošová, M.**, Bedrníček, J., Lorenc, F., Jirotková, D., Bjelková, M., Říha, V., Krejčová, Z. (2021). Masný výrobek (sekaná) se směsí pro zvýšení obsahu silimarinu.

Bárta, J., Bártová, V., Kadlec, J., Kyselka, J., Filip, V., Smetana, P., Zdráhal, Z., **Jarošová, M.**, Bedrníček, J., Lorenc, F., Jirotková, D., Bjelková, M., Říha, V., Krejčová, Z. (2021). Máslová sušenka se směsí pro zvýšení obsahu silimarinu.