

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta

Studijní program: B4131 Zemědělství
Studijní obor: Zemědělské biotechnologie
Katedra: Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné
Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Bakalářská práce

**HODNOCENÍ ZMĚN OBSAHU VYBRANÝCH
BIOAKTIVNÍCH LÁTEK V SEMENECH LNU
SETÉHO (*Linum usitatissimum* L.) BĚHEM
KLÍČENÍ**

Vedoucí bakalářské práce: doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.
Konzultant bakalářské práce: Ing. Markéta Jarošová
Autor bakalářské práce: Kateřina Hašková

České Budějovice, 2019

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Zemědělská fakulta

Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kateřina HAŠKOVÁ**
Osobní číslo: **Z16000**
Studijní program: **B4131 Zemědělství**
Studijní obor: **Zemědělské biotechnologie - Rostlinné**
Název tématu: **Hodnocení změn obsahu vybraných bioaktivních látek v
semenech lnu setého (*Linum usitatissimum* L.) během klíčení**
Zadávající katedra: **Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Semeno lnu obsahuje řadu cenných látek. Kromě kvalitního oleje s vysokým obsahem lino-
lenové mastné kyseliny, obsahuje semeno nutričně hodnotné bílkoviny a komplex rostlinných
slizů. Semeno lnu je známo vysokým obsahem lignanů a ostatních polyfenolů. To zvyšuje anti-
oxidační potenciál semene. Díky obsahu uvedených cenných látek je lněné semeno řazeno mezi
funkční potraviny. Úroveň látek vykazujících antioxidační aktivitu může být ještě zvýšena bě-
hem klíčení, kdy probíhá nejen syntéza vitamínů, polyfenolů a dalších organických látek, ale
dochází i ke štěpení zásobních bílkovin pomocí proteas. Proteolytické aktivity zvyšují obsah
peptidů, z nichž může být řazena mezi bioaktivní peptidy, např. peptidy s antioxidační ak-
tivitou. Naklíčená semena lnu lze i s výhonky usušit a vyrobit z nich mouku obohacenou o
řadu cenných látek. Bakalářská práce (BP) bude řešena prostřednictvím experimentu s klí-
čením lněných semen v řízených podmínkách. Semena vybrané odrůdy olejného lnu budou
namočena ve vodě a dále ponechána klíčit ve fytotronu za definovaných podmínek. Klíčení
bude probíhat ve dvou variantách - ve tmě a za přítomnosti střídání podmínek světla a tmy v
režimu 12/12 h. V intervalu dvou dnů po dobu 10 dnů budou odebrány alikvóty, které budou
zamrazeny. Po vysušení vzorků na lyofilizátoru a rozemletí na mouku budou stanoveny násle-
dující parametry: obsah N látek resp. obsah bílkovin, bude hodnocen bílkovinný profil pomocí
techniky SDS-PAGE a úroveň jeho hydrolýzy, obsah celkových polyfenolů, obsah chlorofylu
(resp. hodnocení barevnosti) a hodnocení antioxidační aktivity.

Formálně bude práce členěna obvyklým způsobem pro práce experimentálního charakteru
(úvod, cíl, literární přehled, materiál a metody, výsledky, diskuze, závěr a seznam použité
literatury a zdrojů). Literární přehled BP bude shrnovat dostupné poznatky z vědecké, od-
borné i firemní literatury (resp. zdrojů) českých a zahraničních autorů. Dosažené výsledky
budou statisticky vyhodnoceny a zpracovány do podoby tabulek nebo grafů.

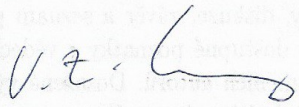
BP bude zpracována podle platného sdělení děkana pro vypracování bakalářských a diploma-
vých prací (Opatření děkana ZF JU č. 4/2014, viz web ZFJU).

Rozsah grafických prací: 5 stran
Rozsah pracovní zprávy: 25 - 30 stran
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

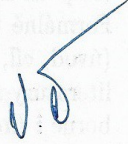
Seznam odborné literatury:

- Bekhit A. E.-D. A., Shavandi A., Jodjaja T. et al. (2018): Flaxseed: Composition, detoxification, utilization, and opportunities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 13: 129-152.
Shim Y. Y., Gui B., Arnison P. G. et al. (2014): Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) bioactive compounds and peptide nomenclature: A review. *Trends in Food Science and Technology* 38: 5-20.
Wang H., Qiu C., Abbasi A. M., Chen G., You L., Li T., Fu X., Wang Y., Guo X., Liu R. H. (2015): Effect of germination on vitamin C, phenolic compounds and antioxidant activity in flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *International Journal of Food Science and Technology* 50: 2509-2712.

Vedoucí bakalářské práce: doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.
Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné
Konzultant bakalářské práce: Ing. Markéta Jarošová
Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné
Datum zadání bakalářské práce: 28. února 2018
Termín odevzdání bakalářské práce: 15. dubna 2019


prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentůvé 1888, 370 05 České Budějovice


prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 28. února 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci „Hodnocení změn obsahu vybraných bioaktivních látek v semenech lnu setého (*Linum usitatissimum* L.) během klíčení“ jsem zpracovala samostatně pouze s využitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu 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 vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Datum 15. 4. 2019 v Českých Budějovicích

Podpis

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu bakalářské práce doc. Ing. Janu Bártovi, Ph. D. za odborné rady a připomínky, doporučení vhodných studijních materiálů a pomoc jak v laboratoři, tak při statistickém vyhodnocení výsledků. Dále patří mé díky Ing. Markétě Jarošové za obětavou a neúnavnou pomoc a trpělivost při laboratorních stanoveních a sdílení jejích cenných zkušeností. Velký dík patří i mé rodině a přátelům za podporu.

Abstrakt

Tato práce se zabývá určením vlivu klíčení na obsah některých bioaktivních látek lněného semene (*Linum usitatissimum* L.). Použita byla odrůda Libra, která byla nakličována po deset dní ve dvou variantách: ve tmě a při plném osvětlení 24 h denně. Vzorky byly odebrány 2., 4., 6., 8. a 10. den.

Zjišťován byl obsah sušiny, tuku, celkových dusíkatých látek, bílkovin, bílkovinné spektrum, obsah chlorofylu, celkových polyfenolických látek a antioxidační aktivita. Sušina v průběhu klíčení klesala, stejně tak obsah lipidů, bez ohledu na světelné podmínky. Obsah dusíkatých látek se během klíčení příliš neměnil. Zaznamenán byl nárůst bílkovin v závislosti na délce klíčení a osvětlení. Analýza bílkovinných spekter potvrdila probíhající hydrolýzu bílkovin. Obsah chlorofylu se klíčením zvyšoval pouze u semen klíčených na světle. Klíčením se zvýšil i obsah celkových polyfenolů a antioxidační aktivita. U posledních dvou jmenovaných bylo pozorováno zhruba dvojnásobné navýšení v obsazích po odtučnění.

Klíčová slova: len setý, *Linum usitatissimum*, semeno, klíčení, bioaktivní látky, dusíkaté látky, bílkoviny, chlorofyly, polyfenolické látky, antioxidační aktivita

Abstract

This thesis focus on analysing effect of germination on some groups of bioactive compounds in flaxseed. We used flaxseed variety named Libra. Its germination was 10 days long, done in two different conditions: in the dark and fully illuminated for 24 hours daily. Samples were taken on 2nd, 4th, 6th, 8th and 10th day.

Following analyses were performed: determination of dry matter content, lipid content, content of nitrogenous compounds, content of proteins and protein spectrum, chlorophyll content, content of total polyphenolic compounds and antioxidant activity.

Content of dry mater was proved to decrease during germination as well as lipid content regardless of light conditions. Amount of nitrogenous compounds stayed relatively unchanged during germination. Whereas amount of proteins increased depending on duration of germination and light conditions. Hydrolysis of proteins during germination was proved by protein spectrum analysis. Content of chlorophyll increased in light-germinated seeds only. Increasing effect of germination on total polyphenolic compounds content and antioxidant activity was proven as well. Moreover aproximately two-fold rise of values was reported after defatting of samples.

Key words: flaxseed, *Linum usitatissimum*, germination, bioactive compounds, nitrogenous compounds, protein, chlorophyll, polyphenolic compounds, antioxidant activity

Obsah

1 Úvod.....	8
2 Literární přehled.....	9
2.1 Lněné semeno.....	9
2.1.1 Popis	9
2.1.2 Chemické složení	9
2.2 Klíčení semen.....	10
2.3 Bioaktivní látky.....	11
3 Cíl práce.....	12
4 Materiál a metody.....	13
4.1 Výchozí materiál.....	13
4.2 Příprava materiálů.....	13
4.2.1 Naklíčení.....	13
4.2.2 Lyofilizace a homogenizace vzorku.....	13
4.2.3 Extrakce hrubého tuku.....	14
4.3 Laboratorní metody.....	14
4.3.1 Stanovení obsahu sušiny a tuku.....	14
4.3.2 Stanovení dusíku a dusíkatých látek.....	14
4.3.3 Extrakce bílkovin pro kvantifikační analýzu bicinchoninovou metodou.....	15
4.3.4 Stanovení bílkovin bicinchoninovou metodou.....	15
4.3.5 Extrakce bílkovin pro SDS-PAGE.....	16
4.3.6 SDS-PAGE.....	16
4.3.7 Stanovení chlorofylu.....	17
4.3.8 Stanovení polyfenolických látek.....	18
4.3.9 Stanovení antioxidační aktivity.....	18
4.3.10 Vyhodnocení výsledků.....	19
5 Výsledky.....	20
5.1.1 Stanovení obsahu sušiny a tuku.....	20
5.1.2 Stanovení dusíkatých látek.....	21
5.1.3 Stanovení bílkovin bicinchoninovou metodou.....	22
5.1.4 SDS-PAGE.....	24
5.1.5 Stanovení chlorofylu.....	27
5.1.6 Stanovení polyfenolických látek.....	29
5.1.7 Stanovení antioxidační aktivity.....	31
6 Diskuze.....	33
6.1.1 Obsah sušiny, vlhkosti a tuku.....	33
6.1.2 Obsah dusíkatých látek a bílkovin.....	33
6.1.3 Bílkovinné spektrum.....	33
6.1.4 Obsah chlorofylu.....	33
6.1.5 Obsah polyfenolických látek.....	34
6.1.6 Antioxidační aktivita.....	34
7 Závěr.....	35
8 Použitá literatura.....	36
9 Přílohy.....	40

1 Úvod

Len je jednou z nejstarších pěstovaných plodin. Nejdříve (před zhruba 5-6 tisíci lety) byl pravděpodobně pěstován v severní Africe a Přední asii podle nálezů nákresů a maleb zobrazujících tuto rostlinu. V Evropě se jeho pěstování rozmohlo před 3500 lety. (Šimon, 1964)

V České republice má pěstování lnu dlouhou historii. Dříve byl pěstován především len přadný, z jehož vláknitých stonků se získávala příze pro tkaní kvalitních textilií. Olej byl využíván pro výrobu fermeží, barev, mýdel a tmelů. Produkce lnu prudce klesla až po druhé světové válce, kdy se na trh dostaly nové druhy textilií s nižší výrobní cenou a snažším zpracováním.

Přestože se jedná o mnohostrannou technickou plodinu využitelnou i v papírnictví, stavebnictví či automobilovém průmyslu, je dnešní produkce zaměřena téměř výhradně na potravinářské a olejně odrůdy. To vedlo dokonce až k vyšlechtění odrůd se změněným poměrem mastných kyselin a tím i nižší vysychavostí oleje.

Nelze však popřít, že konzumace lněných semen či jejich složek má příznivý vliv na organismy. Dle publikovaných studií konzumace lněného oleje chrání před kardiovaskulárními chorobami, snižuje LDL cholesterol a inhibuje prozánětlivé mediátory. Obsažené lignany, potažmo fytoestrogenní látky, snižují riziko vzniku nádorů ovlivňovaných hormony, napomáhají při překonávání symptomů menopauzy a dobrý vliv mají i na zdravotní stav kostí. Lněný sliz zmírňuje diabetes, neboť napomáhá udržovat hladinu glukózy v krvi, také funguje jako prevence rakoviny konečníku a střev. Mimo to byl prokázán jeho vliv na snižování případů obezity. Aminokyselinová skladba lněného proteinu zase napovídá možný vliv na imunitní systém. (Oomah, 2001)

2 Literární přehled

2.1 Lněné semeno

2.1.1 Popis

Plodem lnu setého (*Linum usitatissimum* L.) je pětipouzdrá tobolka. Každé pouzdro je rozděleno septem, které může být ořasené či hladké, čímž vzniká v prostoru tobolky 10 přihrádek, přičemž v každé může být maximálně jedno semeno. Tobolka může tudíž obsahovat nejvýše 10 semen, obvyklý počet je však 5-6 semen.

Semena mohou být u různých typů (olejný, přadný, olejnopřadný) a odrůd lnu mírně odlišná, obzvláště velikostí, váhou či barvou. Obvykle jsou dlouhá 4-6 mm, vejčitého tvaru, zploštělá, na průřezu oboustranně vypouklá, lesklá a zabarvená od hnědé až po žlutě okrovou (Diviš, 2010; Špaldon, 1986). HTS se nejčastěji pohybuje okolo 5 ± 1 g, ačkoli obzvláště u olejních odrůd jsou udávány i vyšší hodnoty (Daun, 2003).

Anatomicky se semeno skládá z pětivrstevného osemení (testy), endospermu a embrya, jež lze dále rozebrat na dvě dělohy (coletydony), zárodečný kořínek (radix) a vzrostný vrchol. (Diviš, 2010)

2.1.2 Chemické složení

Lněné semeno obsahuje průměrně 4-8 % vlhkosti, 30-40 % tuku, 20-35 % dietní vlákniny, 20-30 % proteinů a 3-4 % popelovin. Jejich rozložení v rámci semene není rovnoměrné. (Coskuner, 2007)

Lipidické složky jsou v semeni zastoupeny acylglyceroly (a to hlavně triacylglyceroly), mastnými kyselinami, sterolestery, glykolipidy a fosfolipidy. Pro semeno představují hlavní zdroj energie pro klíčení. Ze 75 % jsou uloženy v dělohách, 22% se nachází v obalových částech semene a 4 % v embryu (Daun, 2003). Obsaženy jsou ve formě drobných tukových kapének o průměru cca 1,3 μ m. Kapénky v obalovém proteinu, oleosinu, jež zaujímá 1,3 % z nich, jsou z většiny tvořeny neutrálními lipidy (98 %), malým množstvím fosfolipidů (0,9 %) a mastnými kyselinami (0,1 %) (Tzen, 1993).

Nejvíce zastoupenou mastnou kyselinou je vícenenasycená kyselina α -lipoová, která může tvořit až 50 % ze všech mastných kyselin. Dále je obsažena i vícenenasycená kyselina linolenová (14 %), mononenasycená kyselina olejová (18 %) a nasycené mastné kyseliny palmitová (5 %) a stearová (3 %). (Daun, 2003)

V nepolární lipidické fázi jsou navíc rozpuštěny vitamíny skupiny E, tokoferoly a tokotrienoly, dále steroly, konkrétně stigmasterol, campesterol a δ -5-avenasterol, a v neposlední řadě také pigmenty, jako například carotenoid lutein či, v omezené míře, chlorofyly. (Daun, 2003)

Proteiny jsou z převážné většiny uloženy v dělohách a tvoří hlavní zdroj dusíku pro klíčení. Mimo ně je v semeni obsažen i neproteinový dusík ve formě vitamínů, sinapinu, cholinu a kyanogenních glykosidů. Kvůli tomu je hodnota obsahu hrubého proteinu (20-30 %) mírně nadhodnocena a odhaduje se, že proteiny tvoří ve skutečnosti jen okolo 18 % semene. (Daun, 2003)

Bílkoviny lze rozdělit na dvě frakce: vysokomolekulární a nízkomolekulární. Vysokomolekulární frakce tvoří linin a zaujímá 64-66 %. Jedná se o protein

globulární struktury, 11-12 S, s molekulovou hmotností 252-298 kDa. Skládá se z pěti podjednotek o velikosti 14,4, 24,6, 30, 35,3 a 50,9 kDa. Nízkomolekulární frakci je colinin, albuminový protein, 2 S s jediným řetězcem o velikosti 16-17 kDa zaujímající 42 %. (Marcone, 1998)

Lněné proteiny jsou bohaté na arginin, kyselinu glutamovou, leucin a asparagin. Naopak limitujícími aminokyselinami jsou methionin, cystein a lysin. Největší environmentální vliv byl pozorován na obsah argininu, kyseliny glutamové, methioninu, serinu a tyrosinu. (Marcone, 1998; Daun, 2000)

Sacharidy obsažené ve lnu jsou koncentrovány hlavně v obalových částech. Převážnou většinu tvoří dietní vláknina. Stravitelné sacharidy, tj. jednoduché cukry a škrob tvoří jen 1-2 %. Dietní vlákninu lze rozdělit na rozpustnou a nerozpustnou. Nerozpustná část je tvořena celulórou a ligninem. Rozpustná vláknina je obsažena ve formě slizu ve vnější vrstvě slupky semene (Daun, 2000). Tento sliz tvoří až čtvrtinu všech obsažených sacharidů, tzn. 7-10 % z celého semene. Skládá se ze dvou polysacharidů, více zastoupen je neutrální, zbytek tvoří kyselý. Chemické složení těchto polysacharidů je značně proměnlivé. Povětšinou se skládá z L-galaktózy, D-xyulózy, L-arabinozy, L-ramózy, kyseliny D-galakturonové a D-glukózy. (Bekhit, 2018)

Dalšími obsaženými látkami jsou **minerály**. Nejvíce draslík a fosfor, významné je i množství železa, zinku a manganu. Za zmínku stojí také obsah kadmia, které může být potenciálně toxické kvůli svému kumulativnímu charakteru. Lněná semena obsahují také **vitamíny** skupiny B a vitamín C. (Daun, 2000)

Mezi významné minoritní látky patří i **fenolické sloučeniny**. Patří mezi ně fenolické kyseliny a flavonoidy. Obsaženy jsou v nelipidické fázi v množství 0,8 – 1,3/100 g. V semeni se nachází též lignany, komplexní difenolické látky, jež mají jako základ 2,3-dibenzylbutan. Nejvíce zastoupený je sekoizolariciresinol diglukóza (SDG) (Bekhit, 2018). Další lignany, které lze nalézt ve lněném semeni jsou izolariciresinol, pinoresinol a matairesinol (Daun, 2000).

Kromě pozitivních nutričních látek jsou ve lněném semeni i **látky antinutriční**. Kyseliny fytoová sloužící jako zdroj fosforu je nezbytná pro vyklíčení semene. Má ovšem velmi silné chelatační účinky na monovalentní a divalentní kationty (jako např. K, Mg, Fe, Zn) ale i proteiny a škrob. Může tak způsobovat deficienci zinku. Deficienci vitamínu B₆ způsobuje polární antivitamin linatin, obsažený hlavně v dělohách. Nalézt lze i malé množství inhibitoru trypsinu. Rizikový je i obsah kyanogenních glykosidů, které po rozštěpení trávicím aparátem uvolňují toxický HCN, případně degradují na thiokyanáty. Ve lněných semenech se můžeme setkat s diglykosidy linustatinem a neolinustatinem a monoglykosidy linamarinem a lotaustralinem, přičemž více jsou zastupeny diglykosidy. Obsah kyanogenních glykosidů klesá se stoupající zralostí semene. (Daun, 2000; Bekhit 2018)

2.2 Klíčení semen

Klíčení semen lze rozdělit do tří hlavních fází: fáze bobtnání, fáze reaktivace metabolismu a fáze prorůstání radixu.

Během fáze bobtnání přijme semeno co možná nejvíce vody, neboť na vodě je následně závislá hydrolyza živin a jejich transport. Systém je zhruba následující: absorpce vody stimuluje embryo k produkci fytohormonů, jež indukují aktivaci či syntézu nových hydrolytických enzymů. Tyto enzymy působí v endospermu, kde jsou

uloženy hlavní rezervy živin v podobě proteinů a škrobů. Jejich hydrolýzou vznikne velké množství energie, kterou je třeba klíčícímu semeni dodat na anabolické procesy před nastartováním respirace. Do té doby je semeno odkázáno na anaerobní respiraci dehydrogenázami. (Ali a Elozeiri, 2017)

Hydrolýzou proteinů vznikají aminokyseliny, které jsou semenem dále využité pro další syntézy. Hydrolýzou lipidů, uložených ve formě triacylglycerolů v oleosomech, vznikají mastné kyseliny, jež jsou dále odbourávány β -oxidací v peroxisomech. Svůj význam má v metabolismu lipidů i glyoxátový cyklus, schopný převádět lipidy na glukózu. Fosfor potřebný pro růst semenáčku je získán z kyseliny fytoové, hojně zastoupené v semeni, po hydrolýze fytázou. (Ali a Elozeiri, 2017)

Velký význam v klíčení semene hrají fytohormony. V brzkých fázích klíčení dojde k poklesu hladiny kyseliny jasmonové a salicylové, naopak se zvedne hladina auxinů, jež plní funkci prostředníka mezi kyselinou gibberelovou, kyselinou abcisovou a ethylenem. Kyselina abcisová a gibberelová přitom řídí procesy dormance a klíčení semene tím, že kyselina gibberelová podporuje tvorbu enzymů hydrolyzujících endosperm, zatímco kyselina abcisová inhibuje příjem vody a tím omezuje růst embrya. (Ali a Elozeiri, 2017)

Klíčící semeno je citlivé k biotickým stresovým faktorům, např. vůči zasolení, nedostatku vody, vysokým teplotám, těžkým kovům atd. Obranné mechanismy klíčícího semene jsou řízeny kyselinou abcisovou, salicylovou, jasmonovou a ethylenem. (Ali a Elozeiri, 2017)

2.3 Bioaktivní látky

Bioaktivní látky lze popsat jako chemikálie, v tomto případě rostlinného původu, schopné ovlivnit metabolické procesy. Jedná se o extrémně heterogenní skupinu s širokou škálou možných účinků, od látek smrtících, až po látky přispívající ke zlepšení zdraví. Organismus ovlivňují na principu antioxidační aktivity, indukce či inhibice enzymů, inhibicí receptorových aktivit a indukci či inhibicí genové exprese. V mnoha případech rozhoduje o tom, zda bude účinek na organismus pozitivní či negativní pouhé dávkování. (Correia., 2012)

V rostlinách vznikají jako sekundární metabolity vedlejšími metabolickými drahami a obvykle nejsou nezbytně nutné k přežití, poskytují však jisté výhody, např. chrání před volnými radikály, lákají opylovače a roznašeče semen, odrazují býložravce a hmyz apod. (Bernhoft, 2010)

Mezi hlavní třídy bioaktivních látek patří glykosidy (srdeční, kyanogenní, glukosinoláty, saponiny a antrachinonové), flavonoidy a proanthokyanidiny, taniny, terpenoidy (mono-, seskvi-, di-) a fenylypropanoidy, pryskyřice, lignany, alkaloidy (tropanové, pyrolizidinové, izochinolinové, methylxaninové), pseudoalkaloidy, furokumariny a naftodiantrony, proteiny a aminy. (Bernhoft, 2010)

Ve lněném semeni se můžeme setkat s mnoha zdraví prospěšnými látkami. Známa jsou například pro obsah více nenasycených mastných kyselin (linolenové a linoové). Významné jsou i látky rozpuštěné v tucích – tokoferoly, karotenoidy, chlorofyly, sterol-estery, volné mastné kyseliny a bioaktivní peptidy. Velký potenciál má i rozpustná vláknina v podobě slizu. Z bioaktivních látek jsou dále zastoupeny fenolické látky a lignany. Kromě pozitivních látek jsou ale obsaženy i látky jako kyanogenní glykosidy, kyselina fytoová, inhibitor trypsinu, linatin, kadmium a cyklolinopeptidy. (Mishra, 2013, Shim, 2014)

3 Cíl práce

Tato bakalářská práce se zabývá zkoumáním vlivu klíčení, na světle a ve tmě, na obsah vybraných bioaktivních látek lněných semen (*Linum usitatissimum* L.). Jako zájmové látky byly určeny proteiny, chlorofyl, polyfenolické a antioxidační látky. Ke splnění cíle bylo provedeno:

- naklíčení lněných semen vybrané odrůdy a provedení odběrů vzorků v různých fázích klíčení
- vysušení vzorků lyofilizací a homogenizace sušiny mletím
- odtučnění části získaných vzorků
- laboratorní stanovení
 - obsahu dusíkatých látek
 - obsahu bílkovin
 - bílkovinného profilu a jeho hydrolyzy pomocí techniky SDS-PAGE
 - obsahu chlorofylu
 - obsahu celkových polyfenolů
 - antioxidační aktivity
- statistické vyhodnocení získaných dat, hodnocení výsledků

4 Materiál a metody

4.1 Výchozí materiál

Jako výchozí materiál pro vypracování této práce byla určena semena lnu setého (*Linum usitatissimum* L.) z čeledi lnovité (*Linaceae*). Konkrétně byla vybrána nizozemská odrůda Libra, registrovaná v roce 2012, jelikož měla během našeho zkušebního klíčení nejlepší klíčivost (98 %) a zároveň nejmenší bakteriální a plísňovou kontaminaci v porovnání s jinými testovanými odrůdami.

Jedná se o středně ranou olejnou odrůdu. Rostliny dorůstají průměrně 56 cm. Plně vyvinuté květy mají bleděmodrou barvu. Semena v tobolkách jsou hnědá. Deklarovaná hmotnost tisíce semen je 6,17 g. Obsah tuku v semenech má činit 46,3 %. Skladba mastných kyselin je nezměněna, tzn. s vysokým obsahem kyseliny alfa-linolenové a nízkým obsahem kyseliny linolové (55,5 a 16,7 %). Obsažena je též kyselina olejová (16,3 %). Hlavní předností odrůdy je vysoký výnos, v případě semene 2,11 t/ha a následný výnos oleje 0,86 t/ha. Výhodné je i vysoké jódové číslo o hodnotě 185 (Zehnálek, 2018).

4.2 Příprava materiálů

4.2.1 Naklíčení

Lněná semena byla navážena po 5 g a umístěna do sítěk z neměkčených PVC kroužků, gázy a gumiček. Takto byla máčena po dobu 1 h v destilované vodě. Poté byla přemístěna na rošt ze skelných vláken umístěný v plastovém klíčidle. Jak síťka, tak rošt a klíčidlo byly předem spařeny horkou vodou a vysterilizovány ethanolem. Do spodní části klíčidla pod rošt, byla doplněna destilovaná voda, tak aby se hladina nedotýkala klíčících semen. Na klíčidlo byla umístěna bariéra zamezující přílišný odpar (potravinářská folie). Poté bylo klíčidlo umístěno do fytotronu Versatile environmental test chamber MLR-352H-PE (Panasonic, Japonsko).

Základní podmínky klíčení byly definovány na 25 °C a relativní vzdušnou vlhkost 80 %. Vzorky byly nakličovány ve dvou variantách, na světle a ve tmě. Světelný parametr pro osvětlovanou část vzorků byl nastaven na 5 LS, což odpovídá intenzitě osvětlení mírně nad 20000 lx. Semena byla zalévána dvakrát denně (po 10 a 14 h).

Vzorky byly odebírány ve čtyřech opakováních, každý druhý den po dobu 10 dní, tj v den 0, 2, 4, 6, 8 a 10. (příloha 1, 2) Odebrané vrorky byly uzavřeny do plastové nádoby a zamrazeny při -20 °C.

4.2.2 Lyofilizace a homogenizace vzorku

Podstatou lyofilizace je sublimace a desorpce zmražené vody ze vzorku. K sublimaci ledu na páru dochází při teplotách a tlacích pod trojným bodem (tj. 0 °C a 0,611 mBa), přičemž vzniklá pára je znovu převedena do tuhého stavu mimo vzorek na kondenzátoru. Klasický lyofilizační cyklus obsahuje tři kroky: zmražení vzorku, primární sušení, při němž je odstaněna většina volné vody ze vzorku, a sekundární sušení, jež desorbuje zbytek vody. (Nireesha, 2013)

Tato metoda byla zvolena pro svou šetnost, zvláště s ohledem na potřebu udržet vzorky v co nejlepším stavu pro další analýzy. Nízkými teplotami při nichž proces sušení

probíhá je totiž aktivita enzymů výrazně omezena, nedochází k denaturaci bílkovin a možná oxidace vzdušným kyslíkem je omezena, stejně jako riziko mikrobiální kontaminace. (Káš, 2005)

Po odebrání všech alikvót a jejich důkladném promražení byly tedy vzorky lyofilizovány v lyofilizátoru Alpha 1-4 LSC (Martin Christ, Německo) při tlaku pod 0,520 mBa, teplotě -50 °C po dobu 72 h. Dále byly po stanovení sušiny mlety na planetárním mlýnku Pulverisette 6 (Fritsch, Německo) ocelovými kuličkami po dobu 1 min při 600 ot/min.

4.2.3 Extrakce hrubého tuku

Extrakce hrubého tuku byla provedena semiautomatizovanou Soxhletovou extrakcí. Metoda je založena na promývání zkoumaného vzorku v nepolárním rozpouštědle (nejčasteji petroletherem, hexanem či diethylem). Extrakce probíhá díky mírně vyšším tlakům za teplot přesahujících bod varu rozpouštědla, což podstatně urychluje kinetiku reakce. (Komarek, 2004)

Vzorky byly naváženy a zataveny po 1 g do filtračních sáčků (od každého opakování dva). Dále byly vysušeny v sušárně Universal oven UN 75 (Memmert, Německo) při 100 °C po dobu 3 h. Poté byly přemístěny do exikátoru, kde setrvaly až do úplného vychladnutí. Po odstranění veškeré přebytečné vlhkosti byly vzorky vloženy do extraktoru ANKOM^{XT10} Extractor (ANKOM Technology, USA). Zde byly promývány 30 min petroletherem při 90 °C. Po provedení extrakce byly vzorky opět sušeny při 100 °C 30 min a poté ponechány zchladnout v exikátoru. Nakonec byly vzorky znovu zváženy a z rozdílu hmotnosti byl nepřímo odečten obsah hrubého tuku ve vzorcích.

4.3 Laboratorní metody

4.3.1 Stanovení obsahu sušiny a tuku

Stanovení obsahu sušiny ve vzorku bylo provedeno gravimetricky. Vzorky byly váženy v čerstvém stavu po odebrání naklíčeného materiálu a poté znovu ihned po lyofilizaci vzorků. Z rozdílu hmotností bylo vypočteno procento sušiny a vlhkosti po naklíčení.

Gravimetricky byl též určen obsah tuku, vážením vzorku před a po extrakci, vždy řádně vysušeného.

4.3.2 Stanovení dusíku a dusíkatých látek

Ke stanovení obsahu dusíku (neboli hrubého proteinu ve vzorku) byl použit analyzátor rapid N cube (Elementar, Německo) pracující na principu Dumasovy metody při níž jsou vzorky spalovány při cca 900 °C v kyslíkové atmosféře. Spálením je vzorek přeměněn na plyny (O₂, CO₂, H₂O, N₂ a NO_x). Zachycené plyny jsou nesené přes kolony, kde jsou N₂ a NO_x odděleny od směsi. NO_x jsou dále redukovány na molekulární dusík, který poté putuje ve směsi s hnacím plynem (CO₂) do detektoru termální vodivosti, kde je proměřován. Hodnoty jsou nakonec zpracovány počítačem a automaticky přepočítány na obsah dusíku a dusíkatých látek ve vzorku. (Mihaljev, 2015)

K analýze bylo použito odtučněných vzorků. Navažovány byly po 25 mg do cínové folie. Od každého experimentálního opakování byly připraveny dvě peletky.

4.3.3 Extrakce bílkovin pro kvantifikační analýzu bicinchoninovou metodou

Metodou BCA byly analyzovány jak původní vzorky s obsahem tuku, tak i jejich odtučněné variaty. Od každého opakování bylo naváženo dvakrát 25 mg do 2 ml centrifugačních mikrozkuvek (Eppendorf, Německo). Poté byl přidán 1 ml extrakčního roztoku (0,065 M Tris-HCl, pH 6,8, 2 % (w/v) SDS). Po promíchání byly extrahovány při 4 °C po dobu 4 h, přičemž každou hodinu byly vzorky znovu promíchány. Supernatant byl po uplynutí doby extrakce oddělen centrifugací na centrifuze ROTINA 420 R (Hettich, Německo) při 4 °C a 4500 ot./min, přičemž doba centrifugace byla 15 min. Poté byl přepipetován do nových centrifugačních mikrozkuvek. Extrakty byly do doby finální analýzy zamrazeny.

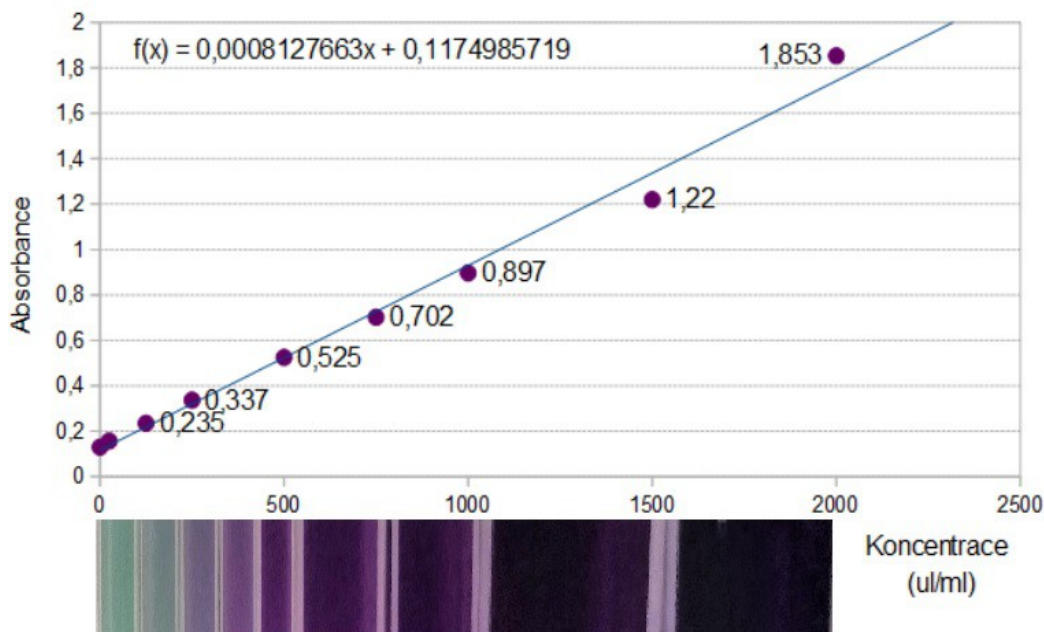
4.3.4 Stanovení bílkovin bicinchoninovou metodou

Použitá metoda je pojmenována po kyselině bicinchonivé (BCA), které je použito ke kolorimetrické detekci a kvantifikaci proteinu. K barevné změně dochází v důsledku chelace dvou molekul BCA jedním iontem Cu^{1+} , jež vzniká během biuretické reakce redukcí Cu^{2+} proteinem v alkalickém prostředí. Tato metoda je tolerantní k detergentům. Výsledný produkt má fialovou barvu s vysokou absorbcí při vlnové délce 562 nm lineárně se zvyšující úměrně ke koncentraci proteinu od 20 do 2000 $\mu\text{l/ml}$. (Smith, 1985)

Stanovení bylo provedeno kitem PierceTM BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA).

Před analýzou byly extrakty kvůli vysoké koncentraci proteinu desetkrát naředěny. Standardem byl bovinní sérový albumin. Jednotlivé ředění pro sestavení kalibrační křivky (graf 1) byla namíchána dle návodu kitu. K naředění bylo použito extrakčního roztoku po BCA. Pracovní roztok byl připraven z 50 dílů reagentu A a jednoho dílu reagentu B. V reagentu A je obsažen uhličitan sodný, hydrogenuhličitan sodný, kyselina bicinchoninová a vinan sodný v 0,1 M roztoku hydroxidu sodného. Reagent B je 4% síran měďnatý.

Do kyvet pak bylo napipetováno 100 μl naředěného extraktu a 2 ml pracovního roztoku. Promíchaná směs byla inkubována při 37 °C 30 min. Po vychladnutí byla proměřena absorbance na spektrofotometru Spectronic BioMate 5 UV-Vis (Thermo electron corporation, USA) při vlnové délce 562 nm. Obsah celkových bílkovin ve vzorku byl dopočítán pomocí hodnot absorbance z rovnice lineární regrese kalibrační křivky.



Graf 1: Kalibrační křivka pro stanovení bílkovin bicinhoninovou metodou. Barevná škála pod grafem je znázorněním změn barevného komplexu reakce v závislosti na množství přítomného proteinu.

4.3.5 Extrakce bílkovin pro SDS-PAGE

Analyzovány byly všechny vzorky s obsahem tuku a dále každé první opakování vzorků odtučněných. Na extrakci bylo naváženo 25 mg do 2 ml centrifugačních mikrozkušavek (Eppendorf, Německo). Přidáván byl 1 ml extrakčního činidla (0,065 M Tris-HCl, pH 6,8, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) 2-merkптоethanol). Po promíchání byly vzorky ponechány extrahovat při 4 °C po dobu 4 h a každou hodinu byly znovu promíchány. Dále extrakce probíhala jako při extrakci bílkovin pro bicinhoninovou metodu (viz kap. 4.3.3).

4.3.6 SDS-PAGE

Metoda SDS-PAGE je jednou z velmi často používaných elektroforetických metod, jejichž základem je pohyb nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Zkratka metody je anglického původu a znamená sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. Nosičem je tedy gel vzniklý polymerací akrylamidu a N, N'-metylenbisakrylamidu. Jelikož metoda využívá diskontinuálního pufrčního systému, jsou přítomny dva typy gelu (zaostřovací a separační) o rozdílné poréznosti a pH. Přídavek dodecylsulfátu sodného (SDS) pak vede za prvé k denaturaci bílkovin, a za druhé k tvorbě komplexů s nimi, čímž získají rovnoměrný elektrický náboj. Separace touto metodou tudíž závisí pouze na velikosti molekul. (Prosser, 1989; Káš, 2005)

Realizace proběhla na diskontinuální deskové denaturační elektroforéze SE 600 (Hofer, USA) na polyakrylamidovém gelu.

Složení gelů bylo následující:

Komponenta:	Separáčn1 10% gel:	Zaostřovací 3,75% gel:
Redestilovaná voda	21 ml	12,15 ml
AC/BIS	13,3 ml	2,5 ml
Pufř A	5 ml	
Pufř B		5 ml
SDS (10% roztok)	400 μ l	200 μ l
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ (15% roztok)	200 μ l	150 μ l
TEMED	20 μ l	20 μ l

Pufř A o pH 8,8 je vyráběn z 36,3 g Tris, 48 ml 1M HCl na 100 ml, pufř B o pH 6,8 z 6 g Tris, 48 ml 1M HCl na 100 ml.

Vzorky byly před nanesením pětkrát naředěny kvůli vysoké koncentraci proteinu v extraktu. Do každého vzorku (o objemu 100 μ l) bylo přidáno 25 μ l nanášecího pufřu (s 2-merkapt ethanolom), poté byly umístěny na 3 min do termobloku vyhřátého na 99 $^{\circ}$ C. Po vychladnutí byly vzorky naneseny na gel společně s ladderem Blue Protein ladder 5 – 245 kDa (Central European Biosystems, ČR).

Připravené gely byly umístěné do elektroforetické vany s elektrodovým pufřem o pH 8,3 obsahujícím 0,025 M Tris, 0,192 M glycin s 0,1 % SDS. Separace byla spuštěna při proudu 40 mA a napětí 150 V, po 30 min při teplotě 4 $^{\circ}$ C, pak bylo napětí navýšeno na 200 V až do ukončení separace, tj po dobu dalších 4 h. Použit byl zdroj PS 300B (Hoeffer, USA).

Po ukončení separace byly gely vyjmuty, opláchnuty a přes noc barveny roztokem s 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma Co.) a směsí methanolu, ledové kyseliny octové a destilované vody v poměru 5:1:4. Poté bylo pozadí odbarvováno směsí ethanolu, kyseliny octové a destilované vody v poměru 2,5:1:6,5. Odbarvovací roztok byl třikrát vyměněn. Po odbarvení pozadí byly gely fixovány ve fixačním roztoku ze 45 % ethanolu, 3 % glycerolu a destilované vody. Následovalo sušení v celofánu na skle při laboratorní teplotě po několik dní. Gely byly naskenovány v Gel doc XR+ (Bio-Rad, USA) a vyhodnoceny.

4.3.7 Stanovení chlorofylu

Chlorofyly patří mezi přírodní cyklická pyrrolová barviva. Základem jejich chemické struktury je protoporfyrin s koordinačně vázaným Mg²⁺. Na tento základ se váže dlouhý hydrofobní fytolový řetězec. Změnou v chemické struktuře je odlišeno několik typů chlorofylu. Ve vyšších rostlinách se vyskytuje chlorofyl a, obsahující methylovou skupinu, a chlorofyl b s formylovou skupinou. Jejich poměr je přibližně 3:1. (Kalač, 2001, Ralajakšmi, 2015)

Chlorofyly pohlcují světlo v červené (630-670 nm) a modrofialové (>460 nm) oblasti viditelného spektra. Určování chlorofylů může být tedy provedeno spektrofotometricky v UV-VIS spektru. K tomuto účelu je vhodné využít maxima v červené oblasti, neboť maximum v modrofialové oblasti se překrývá s absorbním

maximem karotenoidů, které mohou být vyextrahovány spolu v chlorofyly. (Aminot, 2000)

Stanovení chlorofylu bylo provedeno pouze u neodtučněných vzorků. Na extrakci bylo naváženo 40 mg od každého opakování do 2 ml centrifugačních mikrozkuvek (Eppendorf, Německo). K tomu bylo postupně přidáno 1,6 ml 80% acetonu (640 μ l v prvotní extrakci a poté třikrát 320 μ l v promyvech). Pokaždém přidání extrakčního činidla byl vzorek důkladně promíchán, poté byl supernatant oddělen na centrifuze ROTINA 420 R (Hettich, Německo) během 5 min při 8 000 ot./min. Po oddělení byl přepipetován do nové centrifugační mikrozkuvky. Případné tukové kapénky byly roztřepány na vortexu. Po dokončení extrakce (příloha 5) proběhlo měření absorbance na spektrofotometru Spectronic BioMate 5 UV-Vis (Thermo electron corporation, USA) při vlnových délkách 645 a 663 nm proti blanku (aceton). Tyto hodnoty byly následně dosaženy do Arnonových rovnic: celkový chlorofyl = $20,2(A_{645}) + 8,02(A_{663})$, chlorofyl a = $12,7(A_{663}) - 2,69(A_{645})$, chlorofyl b = $22,9(A_{645}) - 4,68(A_{663})$.

4.3.8 Stanovení polyfenolických látek

Pro stanovení celkových polyfenolických látek bylo použito Folin-Ciocalteuovy metody (FCM). Folin-Ciocalteuův roztok je směsí kyseliny fosforečnowolframové ($H_3PW_{12}O_{40}$) a fosforečnomolybdenové ($H_3PMo_{12}O_{40}$), jež tvoří s polyfenoly modře zbarvené komplexy. Intenzita zbarvení také odpovídá množství přítomných polyfenolů, což umožňuje využití této metody detekce ke spektrofotometrickému kvantifikačnímu určení polyfenolů ve vzorku. (Lamuela-Raventós, 2018)

Analyzovány byly jak neodtučněné, tak odtučněné vzorky. Pro extrakci bylo naváženo 50 mg vzorku od každého opakování do 2 ml centrifugačních mikrozkuvek (Eppendorf, Německo). Extrakčním činidlem byl 80% ethanol přidávaný v množství 1 ml na vzorek. Po důkladném promíchání na vortexu byly vzorky ponechány extrahovat 24 h. Během extrakce byly několikrát promíchány. Následovalo oddělení supernatantu na centrifuze ROTINA 420 R (Hettich, Německo) při 8 000 ot./min a 20 °C po dobu 15 min.

Jako standard byla použita kyselina gallová. Pro vlastní stanovení bylo do 1 ml kyvety napipetováno 10 μ l extraktu a 990 μ l destilované vody, po promíchání pak bylo přidáno 50 μ l Folin-Ciocalteuova roztoku a 150 μ l 20% uhličitanu sodného. Reakce se poté vyvíjela při 20 °C po 2 h, následně byla měřena absorbance při vlnové délce 765 nm na spektrofotometru Spectronic BioMate 5 UV-Vis (Thermo electron corporation, USA). Získané hodnoty byly využity pro výpočet celkových polyfenolů (μ g/ml) dle vzorce $TPP = (1197,8967 * A_{765}) - 31,5042$. Výsledky byly nakonec vyjádřeny jako ekvivalet gallové kyseliny v mg/g sušiny.

4.3.9 Stanovení antioxidační aktivity

Ke stanovení byla zvolena ABTS radikálová kationtová dekolizační zkouška. Základem je vytvoření ABTS (kyselina 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonová) radikálových kationtů oxidací (v našem případě pomocí Mn_2O). Tyto radikály mají přirozeně modrou barvu měřitelnou při vlnové délce 734 nm. V přítomnosti antioxidantů jsou však radikály redukovány a jejich zbarvení se vytrácí, přičemž slábnutí barevné intenzity je úměrné množství

antioxidačních látek ve vzorku, což umožňuje spektrofotometrické vyhodnocení zkoušky. (Re, 1999; Cano, 2018)

Analyzovány byly odtučněné i neodtučněné vzorky. Extrahovány byly stejným způsobem jako pro stanovení polyfenolických látek (viz kap. 4.3.8).

Nejprve byl připraven radikál ABTS z 54,8 mg ABTS, 1g MnO₂ a 20 ml redestilované vody. Po 20 min míchání byl roztok zfiltrován přes 5 µm filtr a byl k němu postupně přidáván pufr PBS, připravený z 5 mM KH₂PO₄ a 5 mM Na₂HPO₄ o pH 7,4, až bylo dosaženo absorbance 0,8 (± 0,02) při vlnové délce 764 nm. Takto připravený roztok byl dále přidáván v objemu 1 ml ke 100 µl extraktu ze vzorku, promíchán, a po 1 min měřen proti blanku (100 µl vody a 1 ml radikálu) na spektrofotometru Spectronic BioMate 5 UV-Vis (Thermo electron corporation, USA) při vlnové délce 734 nm. Ze zjištěných hodnot je vypočítána koncentrace antioxidačních látek v mg/ml dle vzorce $C_A = [51,4839 - (68,3952 * A_{734})] * 2$. Výsledná hodnota je nakonec vyjádřena jako ekvivalent kyseliny askorbové v mg/g sušiny.

4.3.10 ***Vyhodnocení výsledků***

Získaná data byla statisticky vyhodnocena v programu STATISTICA 12 (StatSoft, USA).

K analýze byl vybrán test ANOVA (Analysis of variance) s hladinou významnosti $\alpha < 0,05$. Principiálně spočívá v porovnávání odlišností průměrů sledované závislé proměnné uvnitř skupin a mezi nimi, přičemž nulová hypotéza předpokládá, že se od sebe hodnoty neliší. Pokud se prokáže, že je neplatná, provádí se testy mnohonásobných porovnáání, aby bylo zjištěno, které hodnoty se od sebe odlišují. K tomu byl použit Fischerův LSD test porovnáání všech dvojic, který byl upřednostněn před Tukeyovým HSD testem kvůli vyšší citlivosti. (Lepšl, 1996, Hendl, 2006) Vyjádření Fischerova LSD testu v grafech bylo provedeno tak, že ke každé skupině bylo přiřazeno písmeno (**a** pro nejvyšší hodnoty). Je-li tedy u vzorku připsáno více písmen, nebyla zjištěna průkazná rozdílnost mezi ním a dalšími vzorky označenými stejným písmenem.

Grafy byly vypracovány v programu OpenOffice.org Calc (Sun Microsystems, USA). Digitalizované gely byly vyhodnoceny v programu Image-Lab verze 6.0.1 (Bio-Rad, USA)

5 Výsledky

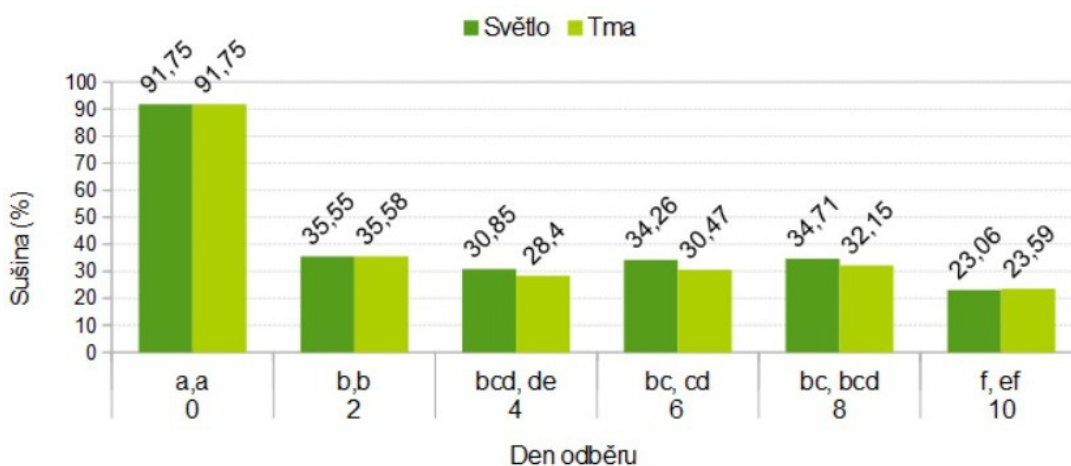
5.1.1 Stanovení obsahu sušiny a tuku

Analýzou rozptylu bylo prokázáno, že doba po kterou jsou semena ponechána klíčit má vliv na obsah sušiny. (tab. 1) V jednotlivých odběrech (bez ohledu na světelné podmínky) se její obsah pohybuje mezi 23,32 až 35,56 %, přičemž nebyl pozorován žádný výraznější trend. Nápadně vysoké hodnoty vzorků odebraných před započítáním klíčení (91,75 %) jsou způsobeny tím že, narozdíl od klíčených odběrů, nebyla semena nabobtnaná (tudíž chyběla váha přijaté vody v základu pro výpočet procenta sušiny). Závislost obsahu sušiny na době klíčení je znázorněn v grafu 2.

Nebylo však prokázáno, že by klíčení na světle či ve tmě ovlivňovalo procento zastoupení sušiny ve vzorku, ačkoli je znatelný mírně rostoucí rozdíl v obsahu sušiny mezi semeny nakličovanými na světle a ve tmě s každým dalším odběrem, až na poslední. Průměrná sušina semen klíčených na světle je 37,14 %, u semen klíčených ve tmě 35,65 %.

Tab. 1: ANOVA - Vyhodnocení vlivu délky klíčení a světelných podmínek na obsah sušiny.

Efekt interakce	Suma čtverců	Stupeň volnosti	Průměrný čtverec	F test	p
Absolutní člen	69191,9	1	69191,9	5713,19	0,000000
Odběr	14196,48	5	2839,3	234,44	0,000000
Světelné podmínky	19,32	1	19,32	1,6	0,215711
Odběr*Světelné podmínky	29,67	5	5,93	0,49	0,781183
Chyba	387,55	32	12,11		

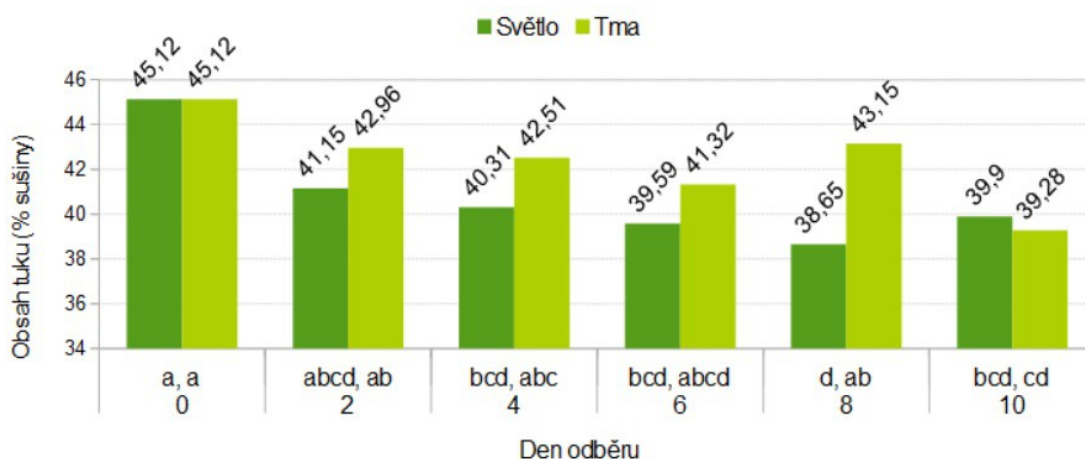


Graf 2: Vliv délky klíčení na obsah sušiny ve vzorcích klíčených na světle a ve tmě. Písmena pod grafem jsou vyjádřením Fischerova testu.

Na obsah tuku ve vzorku má statisticky průkazný vliv pouze doba nakličování, nikoli světelné podmínky, i když jejich průkaznost je jen lehce nad hranicí významnosti. (tab. 2) Průměrné hodnoty obsahu tuku v odběrech jsou v rozmezí 39,59 – 45,12 %, přičemž hodnoty během klíčení průběžně klesaly, přestože od 6. dne klíčení už nebyly rozdíly tak markantní. (graf 3) Zjištěný obsah tuku neklíčeného vzorku (45,12 %) je mírně nižší než je udávaný průměr odrůdy (viz 4.1).

Tab. 2: ANOVA - Vyhodnocení vlivu délky klíčení a světelných podmínek na obsah tuku v sušině.

Efekt interakce	Suma čtverců	Stupeň volnosti	Průměrný čtverec	F test	p
Absolutní člen	71158,48	1	71158,48	11133,22	0,000000
Odběr	93,25	5	18,65	2,92	0,027911
Světelné podmínky	26,5	1	26,5	4,15	0,050084
Odběr*Světelné podmínky	29,73	5	5,95	0,93	0,474448
Chyba	204,53	32	6,39		



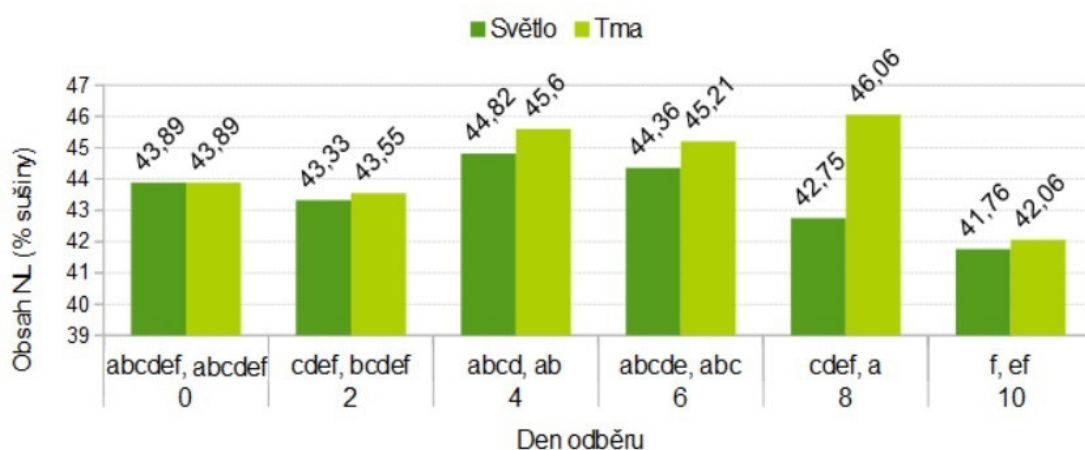
Graf 3: Vliv délky klíčení na obsah tuku v sušině. Písmena pod grafem jsou vyjádřením Fischerova testu.

5.1.2 Stanovení dusíkatých látek

Obsah dusíkatých látek byl zkoumán pouze u vzorků bez obsahu tuku, automatickým přepočítáním ze zjištěného obsahu dusíku programem na analyzátoru rapid N cube (Elementar, Německo) dle vzorce $NL = N \cdot 6,25$. Metodou ANOVA byl prokázán vliv délky klíčení, nikoli však intenzity světla. (tab. 3) Průměrná hodnota obsahu NL ve vzorcích klíčených za světla je 43,45 %, ve vzorcích klíčených ve tmě 44,55 % a průměry v jednotlivých odběrech (z obou světelných variant) jsou v rozpětí 41,89 – 45,21 % a zdánlivě nahodilém uspořádání. (graf 4)

Tab. 3: ANOVA - Vyhodnocení vlivu délky klíčení a světelných podmínek na obsah NL v sušině bez tuku.

Efekt interakce	Suma čtverců	Stupeň volnosti	Průměrný čtverec	F test	p
Absolutní člen	77588,95	1	77588,95	31480,89	0,000000
Odběr	50,46	5	10,09	4,09	0,005710
Světelné podmínky	8,32	1	8,32	3,38	0,075699
Odběr*Světelné podmínky	13,85	5	2,77	1,12	0,368187
Chyba	76,4	31	2,46		



Graf 4: Vliv délky klíčení a světelných podmínek na obsah NL v sušině bez tuku. Písmena pod grafem jsou vyjádřením Fischerova testu.

5.1.3 Stanovení bílkovin bicinchoninovou metodou

Stanovení bílkovin bylo prováděno jak pro vzorky s obsahem tuku, tak i bez.

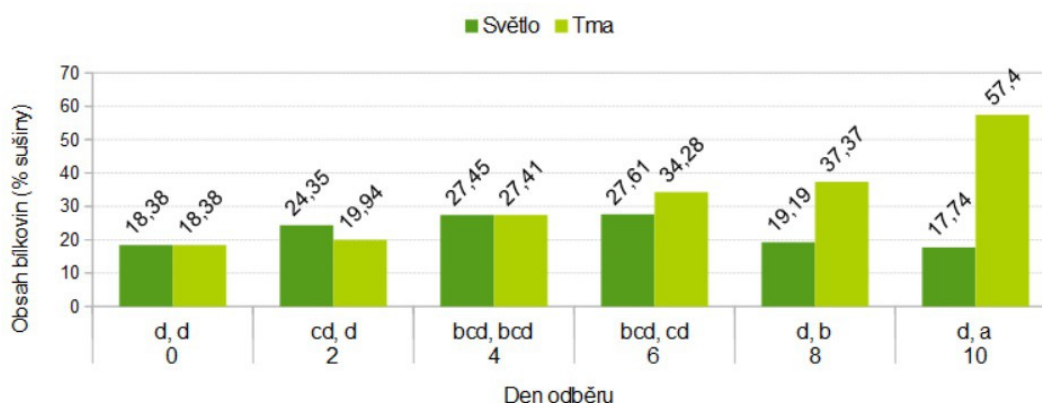
U vzorků s obsahem tuku byl prokázán metodou ANOVA vliv jak odběru tak i intenzity světla (i ve vzájemné kombinaci). (tab. 4) Průměry hodnot odběrů (bez ohledu na světelnou variantu) jsou od 18,38 – 37,57 %. Průměrné hodnoty vzorků klíčených za světla jsou 22,83 % a za tmy 33,74 %, z čehož plyne, že varianty klíčené ve tmě obsahují více bílkovin. Vývoj hodnot byl následující: u varianty klíčené na světle až do 6. dne stoupaly, poté ale došlo k poklesu, zatímco obsah variant klíčených ve tmě stoupal po celou dobu. (graf 5)

U vzorků bez obsahu tuku se nepodařilo prokázat, že by délka klíčení či světelné podmínky měly vliv na obsah bílkovin ve vzorku. (tab. č. 5) Průměrné obsahy bílkovin v jednotlivých odběrech pohybovaly od 37,06 % do 40,70 % bez zjevného uspořádání. Průměr hodnot všech vzorků klíčených na světle je 37,14 %, vzorků klíčených ve tmě 40,65 %. Vývoj hodnot ze působení obou faktorů je znázorněn grafem 6.

Srovnání obsahu NL a bílkovin v sušině s i bez tuku po přepočtu na společný procentuální základ je znázorněno grafem 7.

Tab. 4: ANOVA - Vyhodnocení vlivu délky klíčení a světla na obsah bílkovin v sušině.

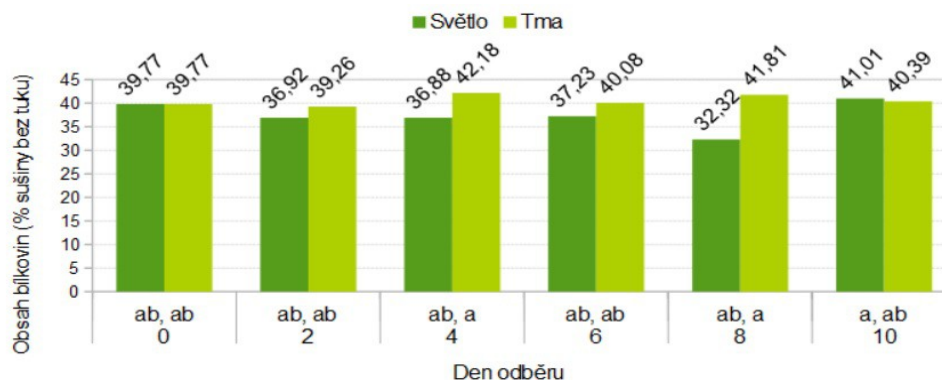
Efekt interakce	Suma čtverců	Stupeň volnosti	Průměrný čtverec	F test	p
Absolutní člen	31022,7	1	31022,7	518,23	0,000000
Odběr	1446,05	5	289,21	4,83	0,002107
Světelné podmínky	1030,22	1	1030,22	17,21	0,000230
Odběr*Světelné podmínky	2622,99	5	524,6	8,76	0,000026
Chyba	1915,61	32	59,86		



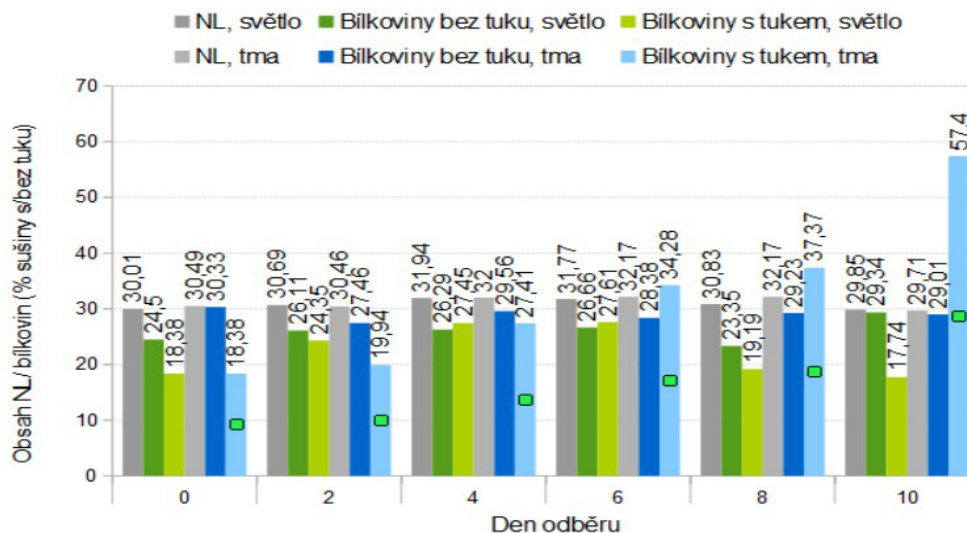
Graf 5: Vliv délky klíčení a světla na obsah bílkovin v sušině s tukem. Písmena pod grafem jsou vyjádřením Fischerova testu.

Tab. 5: ANOVA - Vliv délky klíčení a světla na obsah bílkovin v sušině bez tuku.

Efekt interakce	Suma čtverců	Stupeň volnosti	Průměrný čtverec	F test	p
Absolutní člen	62476,14	1	62476,14	2071,6	0,000000
Odběr	64,77	5	12,95	0,43	0,824611
Světelné podmínky	107	1	107	3,55	0,068736
Odběr*Světelné podmínky	127,82	5	25,56	0,85	0,526378
Chyba	965,07	32	30,16		



Graf 6: Vliv délky klíčení a světla na obsah bílkovin v sušině bez tuku. Písmena pod grafem jsou vyjádřením Fischerova testu.

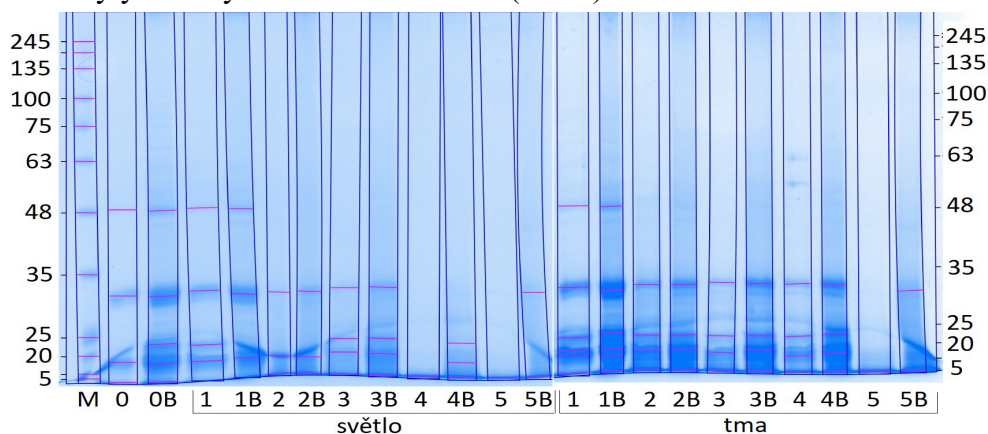


Graf 7: Srovnání obsahu NL a bílkovin extrahovaných ze sušiny s tukem a bez tuku.

5.1.4 SDS-PAGE

U obou variant klíčení bylo pozorovatelné rozdělení do 4 hlavních bílkovinných frakcí. (příloha 3, 4) První frakce má molekulární hmotnost kolem 48,5 kDa, druhá se vyskytuje v rozmezí od 26,5-32,0 kDa, třetí zhruba mezi 9-21 kDa a poslední, čtvrtá, obsahuje zbylé fragmenty o velikost < 5-7 kDa.

Ve vzorcích klíčených na světle se proteiny první frakce vyskytovaly pouze do druhého dne klíčení, v následujících odběrech se již nenacházely v podstatném množství. Druhá bílkovinná frakce byla po šestém dnu klíčení pozorovatelná jen v malých množstvích a s obtížemi či nebyla identifikovatelná vůbec. Stejně tak u třetí frakce došlo po šestém dni klíčení k poklesu množství. V místech s vyšší koncentrací proteinů a dále od okrajů je pozorovatelná separace více pruhů druhé a třetí frakce. Semena klíčená ve tmě měla viditelné proteiny první frakce v části případů až do čtvrtého dne klíčení. Naopak proteiny druhé frakce nebyly zaznamenány ani v malém množství po osmém dni klíčení, což ale může být způsobeno horší čitelností gelu v této oblasti. Druhá a třetí frakce má tendenci se separovat do více pruhů. Bílkovinné spektrum odtučněných vzorků a vzorků s tukem se nijak výrazně nelišilo a to ať už byly klíčené na světle či ve tmě. (obr. 1)



Obr. 1: Srovnání spekter bílkovinných profilů naklíčených semen lnu s tukem a bez tuku. (0-5 = číslo odběru, B = bez tuku)

Tab. 6: Odhad relativního zastoupení frakcí bílkovinného profilu semen klíčených na světle. (0-5 = číslo odběru, S = klíčené na světle, I-IV = experimentální opakování)

Varianta	Molekulová hmotnost (kDa)				Relativní zastoupení pruhů (%)			
	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3	Fr. 4	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3	Fr. 4
0I	48,5	26,8-28,6	13,2	5	4,5	37,3	37,2	21,1
0II	48,2	17,8-29,8	13,7	5	2,9	45,7	39,7	11,6
1SI	48,4	26,8-28,7	14,5	5	4,4	26,7	45,2	23,7
1SII	48,4	26,8-28,9	13,6-15,5	5	2,8	20,6	50,1	26,6
1SIII	48,6	30,7	12,9-18,5	5	3,5	30,4	52,2	13,8
1SIV	49	31,5	12,6-18,4	5	3,5	29,6	54,7	12,2
2SI		28,9	12,7-17,1	5,8		4,5	32,5	63,1
2SII		28,7	13,9-17,4	6,2		7,6	43,4	49
2SIII		28,9-32,0	12,9-18,6	5		7,1	41,7	49,4
2SIV	50,3	29,3-32,0	13,1-18,6	5	4,1	24,8	39,4	31,7
3SI		29	14,4-17,7	7,2		6,8	38,1	55,1
3SII		29	17,1-18,1	7,2		7,8	36,3	55,8
3SIII		28,8	18,9	5		4,4	2,1	93,6
3SIV		28,9-31,5	18,9	5,6		14,8	2,1	83,1
4SI			18,1	6,2			6,9	64,4
4SII			17,7	5			14,6	85,4
4SIII		27,8		5		4,9		95,1
4SIV		28,7-30,5	12,7-18,6	5		3,3	1,9	72,8
5SI			17,1	5			11,9	88,1
5SII			12,9	5			57,6	42,4
5SIII		28,1-30,1		5		10,3		89,6
5SIV		28,6		5		1		99

Tab. 7: Odhad relativního zastoupení frakcí bikovinného profilu semn klíčených ve tmě. (0-5 = číslo odběru, T = klíčeno ve tmě, I-IV = experimentální opakování)

Varianta	Molekulová hmotnost (kDa)				Relativní zastoupení pruhů (%)			
	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3	Fr. 4	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3	Fr. 4
0I	48,6	26,9-28,6	8,2	5	3,7	33,6	39,1	23,6
0II	47,5	29,5	14,1	5	5,1	49,6	31,3	14,1
1TI	48,5	26,6-28,5	11,3	5	3	25,9	45,8	25,3
1TII	48,3	26,5-28,5	9,6-13,6	5	2,9	22,8	49,9	24,5
1TIII	48	30,7	15,9-19,1	5	3,7	34	49	13,2
1TIV	48	31,2	15,1-20,3	5	5,9	42,6	42,7	8,8
2TI		28,8	9,2-14,5	5,8		8,5	55,1	36,3
2TII		28,2	9,9-15,2	6,2		14,3	54,1	31,6
2TIII	48,3	31,6	15,1-20,5	5	5,6	41,1	43,6	9,7
2TIV	48,5	32,1	15,3-20,8	5	4,3	27,1	52,4	16,2
3TI		28	9-14,8	7,2		6,8	52,3	40,9
3TII		28,2	9,4-15,9	7,2		10	54,7	35,4
3TIII		30,8-32,3	15,7-21,1	5		38,2	35,4	26,5
3TIV		31,1-32,6	15,7-21,2	5,6		26,3	53,1	20,6
4TI		28,1	8,6-13,6	6,2		8,8	54,4	36,8
4TII			11,3	5			26,5	73,5
4TIII		32,5	15,9-21,3	5		29,2	27,6	43,2
4TIV		31	14,7-21,4	5		13,4	26,5	30,1
5TI			9,4	5			31,7	68,3
5TII			7	5			43,8	56,2
5TIII			15,3-21,2	5			30,8	69,2
5TIV			17,9	5			3,6	96,4

5.1.5 Stanovení chlorofylu

Na obsah chlorofylu byly analyzovány pouze vzorky s obsahem tuku.

Vliv délky klíčení i světelných podmínek na obsah chlorofylu se potvrdil jako statisticky průkazný. A to nejen pro celkový obsah chlorofylu, ale i pro dílčí obsahy chlorofylu *a* a chlorofylu *b*. (tab. 6, 7, 8)

Pro celkový chlorofyl se průměrné obsahy pohybují mezi 0,241 a 0,894 mg/g sušiny, přičemž hodnoty od prvního dne klíčení až do desátého stoupají. Překvapivě je obsah chlorofylu v nenaklíčeném vzorku (0,637 mg/g sušiny) vyšší než obsahy v klíčených semenech až do 4. dne. (graf 8). Obzvláště znatelný rozdíl je též mezi průměrnými hodnotami obsahu chlorofylu vzorků klíčených na světle, 1,069 mg/g sušiny, a ve tmě 0,120 mg/g sušiny.

Vývoj chlorofylu *a* je velmi podobný. Průměrné hodnoty odběrů jsou od 0,119 do 0,512 mg/g sušiny. Hodnota nultého odběru (0,254 mg/g sušiny) opět převyšuje obsahy chlorofylu *a* během prvních čtyř dnů klíčení. Průměrný obsah chlorofylu *a* vzorků klíčených na světle je 0,603 mg/g sušiny a ve tmě 0,086 mg/g sušiny.

Obsah chlorofylu *b* se mezi odběry průměrně lišil od 0,121 do 0,383 mg/g sušiny. Nultý odběr měl vyšší obsah chlorofylu *b* (0,383 mg/g sušiny než všechny odběry naklíčovaných semen. Semena klíčená na světle měla obsah průměrně 0,467 mg/g sušiny, zatímco semena klíčená ve tmě jen 0,033 mg/g sušiny.

Srovnání obsahů chlorofylu *a* a *b* v rámci celkového je v grafech 9 a 10.

Tab. 8: ANOVA - Vyhodnocení vlivu délky klíčení a světelných podmínek na obsah celkového chlorofylu.

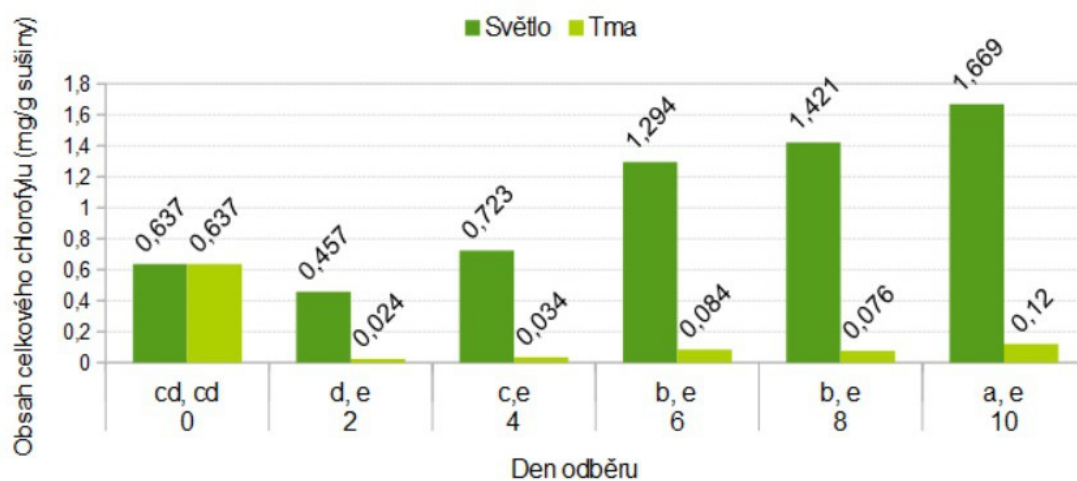
Efekt interakce	Suma čtverců	Stupeň volnosti	Průměrný čtverec	F test	p
Absolutní člen	14,710900	1	14,710900	785,3826	0,000000
Odběr	2,364290	5	0,472860	25,2448	0,000000
Světelné podmínky	7,797590	1	7,797590	416,2959	0,000000
Odběr*Světelné podmínky	2,738230	5	0,547650	29,2376	0,000000
Chyba	0,599390	32	0,018730		

Tab. 9: ANOVA - Vyhodnocení vlivu délky klíčení a světelných podmínek na obsah chlorofylu *a*.

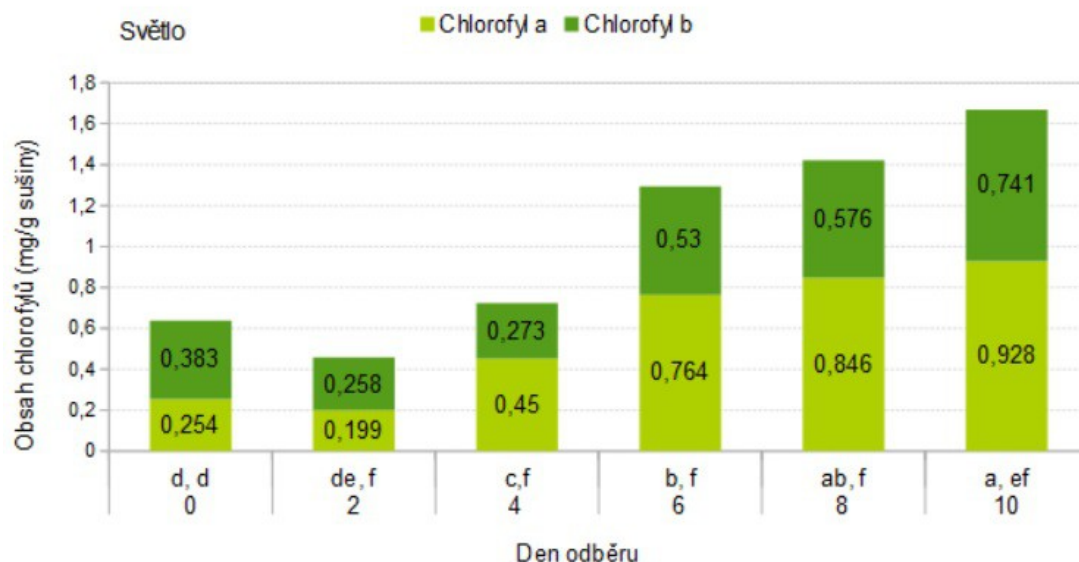
Efekt interakce	Suma čtverců	Stupeň volnosti	Průměrný čtverec	F test	p
Absolutní člen	4,667735	1	4,667735	889,9700	0,000000
Odběr	0,882029	5	0,176406	33,6343	0,000000
Světelné podmínky	2,305476	1	2,305476	439,5717	0,000000
Odběr*Světelné podmínky	0,941781	5	0,188356	35,9128	0,000000
Chyba	0,167834	32	0,005245		

Tab. 10: ANOVA - Vyhodnocení vlivu délky klíčení a světelných podmínek na obsah chlorofylu **b**.

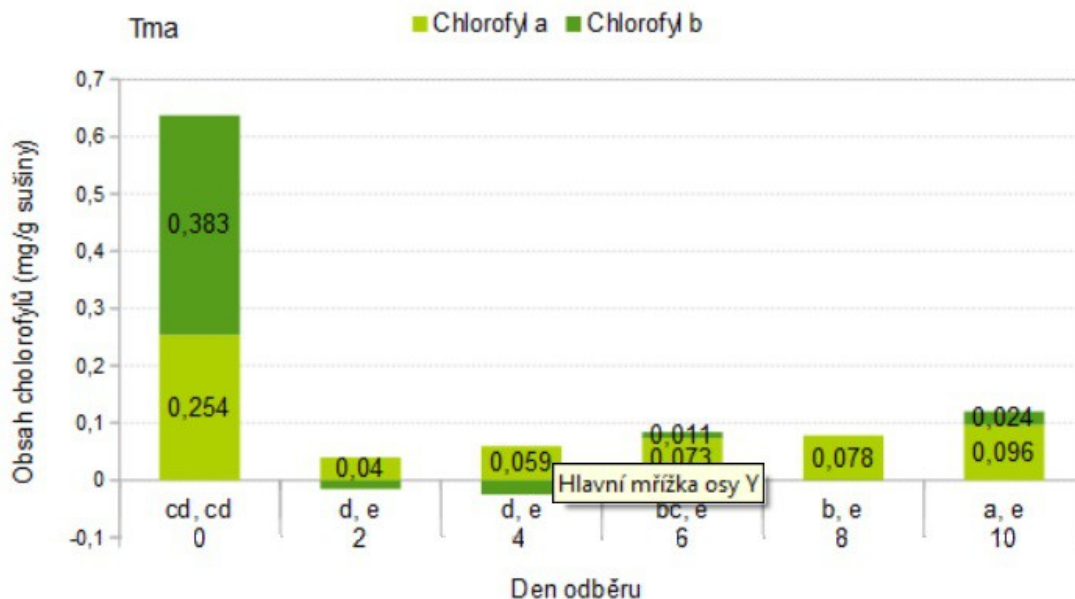
Efekt interakce	Suma čtverců	Stupeň volnosti	Průměrný čtverec	F test	p
Absolutní člen	2,809358	1	2,809358	311,4520	0,000000
Odběr	0,484204	5	0,096841	10,7360	0,000004
Světelné podmínky	1,625304	1	1,625304	180,1850	0,000000
Odběr*Světelné podmínky	0,491918	5	0,098384	10,9070	0,000003
Chyba	0,288646	32	0,009020		



Graf 8: Vliv délky klíčení a světelných podmínek na obsah celkového chlorofylu. Písmena pod grafem jsou vyjádřením Fischerova testu.



Graf 9: Podíl chlorofylů **a** a **b** v semenech klíčených za světla. Písmena pod grafem jsou vyjádřením Fischerova testu.



Graf 10: Podíl chlorofylů *a* a *b* v semenech klíčených ve tmě. Písmena pod grafem jsou vyjádřením Fischerova testu.

5.1.6 Stanovení polyfenolických látek

Stanovení celkových polyfenolických látek bylo provedeno jak na vzorcích s tukem, tak i na jejich odtučněné variantě. V obou případech se podařilo prokázat vliv délky klíčení na obsah polyfenolických látek, ne však vliv světelných podmínek. (tab. č. 9 a 10).

Varianta s tukem dosahovala při klíčení na světle průměrně 0,174 mg/g sušiny a ve tmě 0,178 mg/g sušiny. U odtučněné části vzorků byly naměřeny průměrné hodnoty 0,511 mg/g sušiny bez tuku za světla a 0,561 mg/g sušiny bez tuku za tmy.

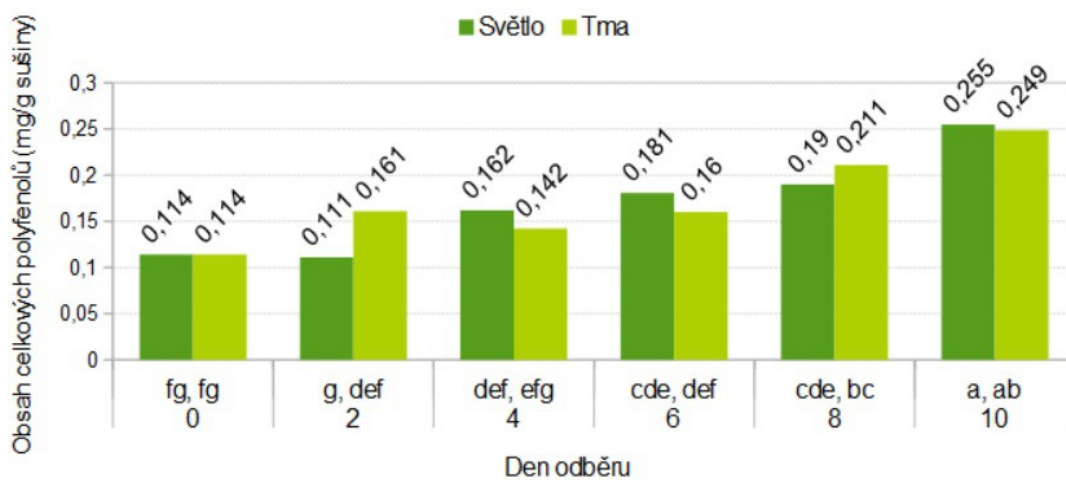
Průměrný obsah polyfenolických látek stoupá u obou variant spolu s délkou klíčení po celou dobu. U vzorků s tukem od 0,114 až po 0,252 mg/g sušiny a u vzorků bez tuku od 0,333 do 0,698 mg/g sušiny bez tuku. Vývoj závislosti na obou faktorech je znázorněn v grafech č. 11 a 12.

Tab. 11: ANOVA - Vyhodnocení vlivu délky klíčení a světelných podmínek na obsah celkových polyfenolických látek v sušině s tukem.

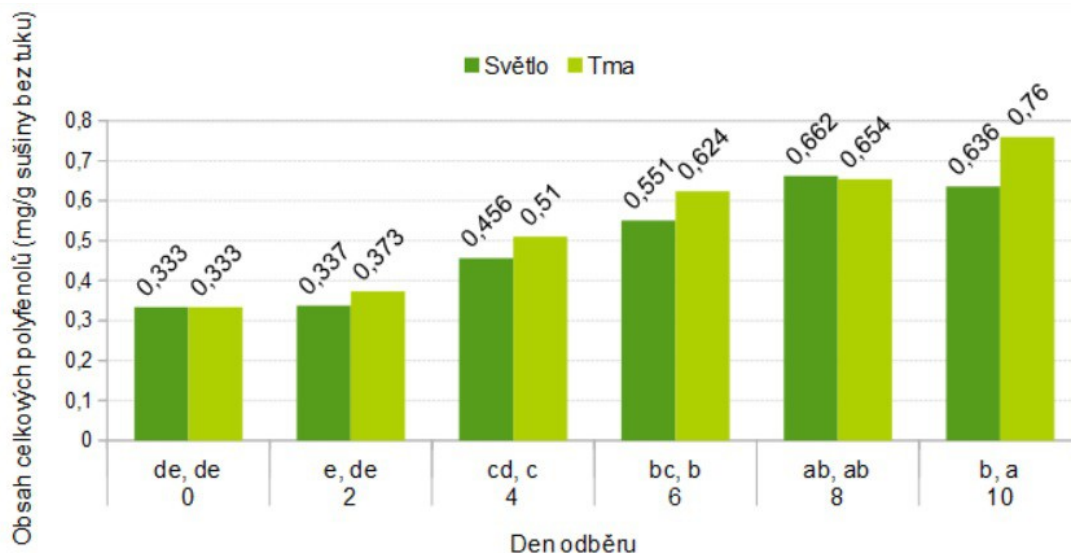
Efekt interakce	Suma čtverců	Stupeň volnosti	Průměrný čtverec	F test	p
Absolutní člen	1,199708	1	1,199708	1311,3690	0,000000
Odběr	0,083766	5	0,016753	18,3120	0,000000
Světelné podmínky	0,000161	1	0,000161	0,1760	0,677588
Odběr*Světelné podmínky	0,007446	5	0,001489	1,6280	0,181011
Chyba	0,029275	32	0,000915		

Tab. 12: ANOVA. Vyhodnocení vlivu délky klíčení a světelných podmínek na obsah celkových polyfenolických látek v sušině bez tuku.

Efekt interakce	Suma čtverců	Stupeň volnosti	Průměrný čtverec	F test	p
Absolutní člen	11,083060	1	11,083060	1818,8960	0,000000
Odběr	0,800370	5	0,160070	26,2710	0,000000
Světelné podmínky	0,022260	1	0,022260	3,6530	0,064953
Odběr*Světelné podmínky	0,021630	5	0,004330	0,7100	0,620415
Chyba	0,194990	32	0,006090		



Graf 11: Vliv délky klíčení a světelných podmínek na obsah celkových polyfenolů v sušině s tukem. Písmena pod grafem jsou vyjádřením Fischerova testu.



Graf 12: Vliv délky klíčení a světelných podmínek na obsah celkových polyfenolů v sušině bez tuku. Písmena pod grafem jsou vyjádřením Fischerova testu.

5.1.7 Stanovení antioxidační aktivity

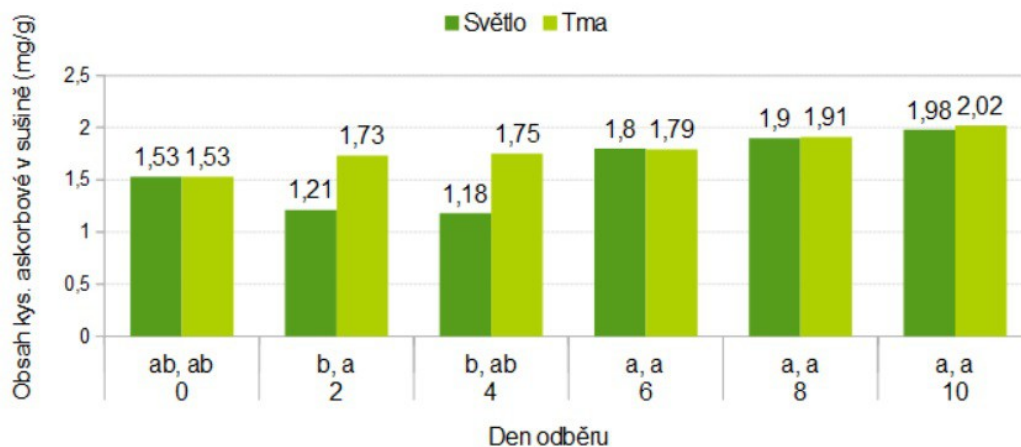
Antioxidační aktivita byla stanovována u vzorků s obsahem tuku i bez. U obou byl prokázán pouze vliv délky klíčení na obsah antioxidačních látek, ačkoli u vzorků s obsahem tuku byl vliv světelných podmínek jen lehce nad hranicí průkaznosti. (tab. č. 13, .14)

Hodnoty obsahu kyseliny askorbové, určené jako ekvivalent antioxidačních látek, u neodtučněných vzorků stoupaly v závislosti na délce klíčení od 1,53 do 2,00 mg/g. (graf č. 13) Průměr obsahů naměřených v semenech klíčených na světle je 1,81 mg/g, u semen klíčených ve tmě 1,60 mg/g.

Odtučněné vzorky měly obsah kyseliny askorbové v rozmezí 5,17 až 7,62 mg/g. Nultý odběr měl vyšší naměřené hodnoty (5,44 mg/g) než odběr první, který byl ze všech nejnižší. (graf. č. 14) Průměrné hodnoty obsahu kyseliny askorbové u odtučněných vzorků semen klíčených na světle je 6,59 mg/g, pro odtučněná semena klíčená ve tmě bylo naměřeno 6,38 mg/g.

Tab. 13: ANOVA - Vyhodnocení vlivu délky klíčení a světelných podmínek na antioxidační aktivitu neodtučněných vzorků.

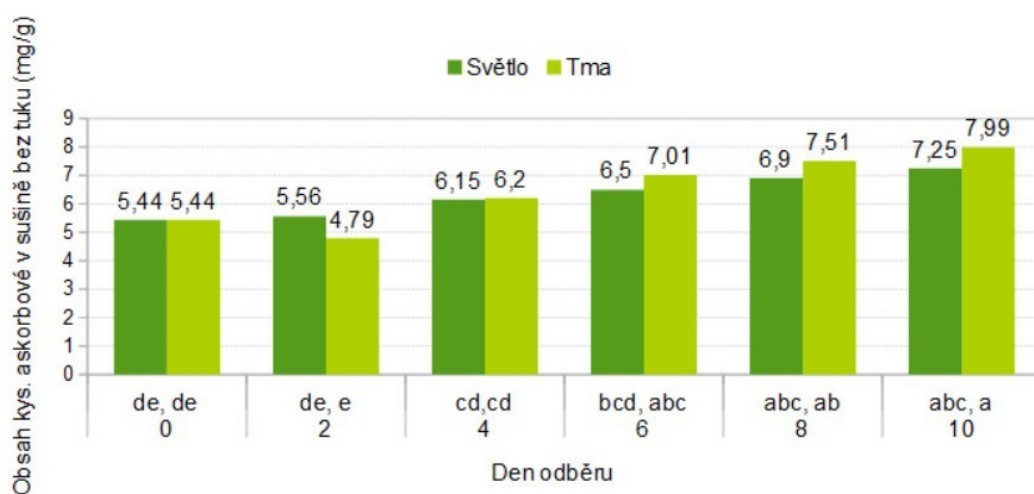
Efekt interakce	Suma čtverců	Stupeň volnosti	Průměrný čtverec	F test	p
Absolutní člen	117,8207	1	117,8207	1315,4810	0,0000
Odběr	2,0804	5	0,4161	4,6460	0,0027
Světelné podmínky	0,3693	1	0,3693	4,1240	0,0507
Odběr*Světelné podmínky	0,7186	5	0,1437	1,6050	0,1871
Chyba	2,8661	32	0,0896		



Graf 13: Vliv délky klíčení a světelných podmínek na obsah antioxidačních látek v neodtučněných vzorcích. Písmena pod grafem jsou vyjádřením Fischerova testu.

Tab. 14: ANOVA - Vyhodnocení vlivu délky klíčení a světelných podmínek na antioxidační aktivitu odtučněných vzorků.

Efekt interakce	Suma čtverců	Stupeň volnosti	Průměrný čtverec	F test	p
Absolutní člen	1682,271	1	1682,271	2795,945	0,000000
Odběr	33,976	5	6,795	11,294	0,000002
Světelné podmínky	0,377	1	0,377	0,626	0,434679
Odběr*Světelné podmínky	3,069	5	0,614	1,020	0,422342
Chyba	19,254	32	0,602		



Graf 14: Vliv délky klíčení a světelných podmínek na obsah antioxidačních látek v odtučněných vzorcích. Písmena pod grafem jsou vyjádřením Fischerova testu.

6 Diskuze

6.1.1 Obsah sušiny, vlhkosti a tuku

V průběhu klíčení došlo ke snížení obsahu sušiny, což bylo očekáváno jako důsledek dekompozice velkých makromolekul, především lipidů a proteinů. Stejný vývoj obsahu sušiny během klíčení lnu byl pozorován i v jiných publikacích (Wanasundara, 1999a). Mezi prvním a posledním odběrem semen klíčených na světle činil pokles 35,13 %. Nepodařilo se prokázat, že by změna intezity světla ovlivňovala významně charakter průběhu změn v obsahu sušiny či její množství v jednotlivých fázích.

Analogicky ke změnám sušiny se během klíčení zvyšovala vlhkost. Zjištěná vlhkost neklíčeného vzorku je 8,25 %, zatímco vlhkost posledního odběru klíčeného ve tmě je 76,41 %. Nárůst vlhkosti byl pozorován i Wangem *et al.* (2015), ačkoli jejich hodnoty získané vlhkosti byly vyšší. To ale může být způsobeno rozdílnými podmínkami klíčení (obzvláště intenzitou zářivky).

Došlo také k redukcí zastoupení lipidů v sušině. Pokles byl plynulý, u semen klíčených na světle ze 45,12 % na 39,90 %, tzn. o 11,58 %. Obdobný průběh byl zjištěn i u semen klíčených ve tmě, ačkoli byl u nich pokles lipidického obsahu výraznější (na 28,46 %). Získané výsledky však ani v jednom případě neměly tak drastický průběh jako bylo hlášeno Wanasundarou *et al.* (1999b).

6.1.2 Obsah dusíkatých látek a bílkovin

Obsah celkových dusíkatých látek se v průběhu klíčení příliš neměnil. U vzorků klíčených na světle se obsah navýšil o 4-5 %, což je ovšem v rozporu s publikacemi Watsunadary *et al.* (1999a) a Seibeie *et al.* (2007), kteří pozorovali mírný pokles v obsahu dusíkatých látek.

Watsunadara *et al.* (1999a) dále zaznamenali navýšení neproteinového dusíku na úkor proteinů. Při mém klíčení však došlo nečekaně k navýšení obsahu proteinů. Na světle klíčená semena sledovala tento trend pouze do 6. dne klíčení, v tento den obsahovala 1,5x více proteinu než před započítím klíčení. U ve tmě klíčených semen se obsah zvyšoval až do 10. dne, kdy byl 3x vyšší než na počátku.

6.1.3 Bílkovinné spektrum

SDS-PAGE analýzou byly odhaleny čtyři hlavní frakce proteinů, jejich velikost je odhadnuta na 48,5 kDa, 32,0-26,5 kDa, 21-9 kDa a 7-5 a méně kDa. S přibývajícím délkou klíčení se dal pozorovat úbytek vyšších frakcí (viz kap. 5.1.4).

Bílkovinným spektrem lnu setého (*Linum usitatissimum* L.) se zabývali i Sammour *et al.* (1994). Kteří použitím techniky SDS-PAGE prokázali přítomnost globulinu jako hlavního proteinu. Jeho podjednotky mají velikost 55, 54,5, 50, 45, 43 a 41 kDa. Globulinové podjednotky rozdělili do dvou skupin, acidické s velikostí 40 a 25 kDa a bazické s velikostí 22 až 18 kDa. Dále našli i albuminové frakce o velikosti 25-11 kDa.

6.1.4 Obsah chlorofylu

Analýza obsahu celkového chlorofylu potvrdila domněnku, že obsah chlorofylu semen klíčených na světle bude stoupat s přibývajícím dobou klíčení,

zatímco u semen klíčených ve tmě bude nárůst nulový či minimální. Konkrétně se obsah celkového chlorofylu semen klíčených na světle během deseti dní klíčení zvýšil 2,62x oproti neklíčenému vzorku. Naopak u semen klíčených ve tmě došlo dokonce k 5,3násobnému poklesu ve srovnání s neklíčeným semenem, nicméně takto drastický pokles proběhl již během prvních dní klíčení a poté obsah nepatrně stoupal.

Během klíčení se také měnil poměr chlorofylu *a* a *b*. Vzorky nakličované na světle měly převahu chlorofylu *b* do druhého dne klíčení v poměru zhruba 4:3, v dalších dnech je již poměr převrácen. V semenech klíčených ve tmě nebyl chlorofyl *b* syntetizován.

Nárůst obsahu chlorofylu během klíčení semen na světle byl pozorován i Schneider da Silvou *et al.* (2018). Jimi naměřené hodnoty však byly několikanásobně vyšší. V odlišnosti získaných výsledků mohou hrát roli rozdílné podmínky při klíčení, čerstvost rostlinného materiálu použitého k extrakci, samotné provedení extrakce a využití rozdílných rovnic výpočtu obsahu chlorofylu.

6.1.5 Obsah polyfenolických látek

Bylo předpokládáno, že obsah polyfenolických látek bude v průběhu klíčení stoupat. Tento předpoklad se ukázal jako pravdivý. Během deseti dní klíčení se obsah polyfenolických látek u semen klíčených ve tmě znásobil 2,18x. V pokusu vedeném Wangem *et al.* (2015) je hlášen 2,67násobný nárůst během osmidenního klíčení. Přičemž mnou zjištěná iniciální hodnota před započítáním klíčení 114 mg ekvivalentu kyseliny galové na 100 g je několikanásobně nižší než hodnota 389,53 mg/100 g, kterou získal Wang *et al.* (2015). Může to být způsobeno odlišnostmi v genotypu testovaných semen, či rozdílnými podmínkami během vývoje mateřských rostlin, nebo podmínkami skladování. Wang *et al.* (2015) dále zaznamenali nejvyšší obsah polyfenolických látek osmý den klíčení (1429,34 mg/100g), zatímco mnou naměřený obsah byl plynule stoupavý až do desátého dne s nejvyšší hodnotou 255 mg/100g. Vliv intenzity světla na množství polyfenolických látek či jejich vývoj během klíčení nebyl prokázán.

Obsah polyfenolických látek po odtučnění byl paradoxně zhruba dvakrát větší než u jejich plnotučných variant. Domnívám se, že je to způsobeno uvolněním vázaných polyfenolů po odmytí nepolárních látek.

6.1.6 Antioxidační aktivita

Bylo očekáváno, že v průběhu klíčení bude narůstat antioxidační aktivita. Wang *et al.* (2015) hlásili ve své publikaci tří- až čtyřnásobný nárůst během osmidenního klíčení. V mých vzorcích se antioxidační aktivita znásobila během deseti dní jen 1,29x pro semena klíčená na světle a 1,32x pro semena klíčená ve tmě. Hodnoty neklíčeného vzorku se přitom u Wang *et al.* a mých vzorků příliš nelišily, 1,87 mg/g a 1,53 mg/g. Statisticky průkazný vliv byl přitom dokázán pouze pro délku klíčení, i když průkaznost vlivu intenzity světla na obsah celkových antioxidačních látek je při hranici hladiny významnosti.

Nejvyšších hodnot dosáhly vzorky až desátý den klíčení při obou variantách klíčení. U semen klíčených na světle přitom klesal obsah antioxidačních látek až do 4. dne klíčení, teprve poté začaly hodnoty stoupat. U semen klíčených ve tmě byl nárůst plynulý od prvního do posledního dne, navíc byly obsahy antioxidačních látek vždy mírně vyšší než u semen klíčených na světle.

Obsah celkových antioxidačních látek v odtučněných vzorcích byl nečekaně průměrně 2,75x vyšší než u plnotučných verzí.

7 Závěr

Ze získaných výsledků lze vyvodit tyto závěry:

- Obsah sušiny během klíčení klesá bez ohledu na světelné podmínky. Analogicky k tomu vzrůstá relativní vlhkost semene. K úbytku sušiny dochází v důsledku rozkladu makromolekul sloužících jako energetické rezervy. Jedná se především o lipidy, jejichž úbytek se během tohoto pokusu pohyboval mezi 11,6 až 12,9 %.
- Změny v celkovém obsahu dusíkatých látek byly poměrně malé, tj o 4-5 %. Dle získaných výsledků došlo ke snížení obsahu neproteinových dusíkatých látek na úkor bílkovin, kterých během klíčení, překvapivě, přibývalo. U vzorků klíčených na světle by nárůst pozorovatelný pouze do 6. dne klíčení, zatímco u semen klíčených ve tmě hodnoty stoupaly po celou dobu. V maximálním stavu byl obsah bílkovin pro na světle klíčená semena 1,5x vyšší než před klíčením, v případě semen klíčených ve tmě bylo navýšení 3násobné.
- V získaném proteinovém spektru jsou rozlišitelné čtyři frakce o velikostech 48,5 kDa, 32-26,5 kDa, 21-9 kDa, 7-5 a méně kDa. Odtučnění nemá na složení spektra žádný výrazný vliv. Platí, že čím déle je vzorek ponechán klíčit tím méně vyšších frakcí bylo přítomno. Lze tedy předpokládat, že došlo k jejich hydrolýze na nižší frakce.
- Naprosto zřejmý je vliv osvětlení na obsah chlorofylu v klíčených rostlinkách. Za přítomnosti světla se obsah celkového chlorofylu znásobil 2,62x, zatímco při klíčení ve tmě došlo dokonce i ke ztrátě chlorofylu vyskytujícího se v semeni před vyklíčením, konečný obsah byl nakonec 5,3x menší. Klíčením se měnil i poměr mezi chlorofylem *a* a *b*. Do druhého dne klíčení převažoval chlorofyl *b* v poměru přibližně 4:3, poté však došlo k převrácení poměrů ve prospěch chlorofylu *a*.
- Naklíčením se zvýšil celkový obsah polyfenolických látek. Vliv intenzity světla na obsah polyfenolických látek nebyl potvrzen. Semena klíčená na světle obsahovala 1,77 x více polyfenolických látek než před naklíčením, zatímco semena klíčená ve tmě znásobila obsah polyfenolických látek 2,18x. Odtučněním rozemletých klíčnicích rostlinek se obsah celkových polyfenolických látek zdvojnásobil. Domnívám se, že by to mohlo být způsobeno uvolněním vázaných polyfenolických látek po odstranění lipidických složek.
- Antioxidační aktivita se procesem klíčení též zvýšila. Pro semena klíčená na světle 1,29x a pro semena klíčená ve tmě 1,32x. Vliv světla na antioxidační aktivitu nebyl dokázán. U odtučněných vzorků byla zjištěna antioxidační aktivita ještě 2,75x vyšší než v plnotučně formě. Tento nárůst pravděpodobně souvisí s obsahem polyfenolických látek ve vzorku.

8 Použitá literatura

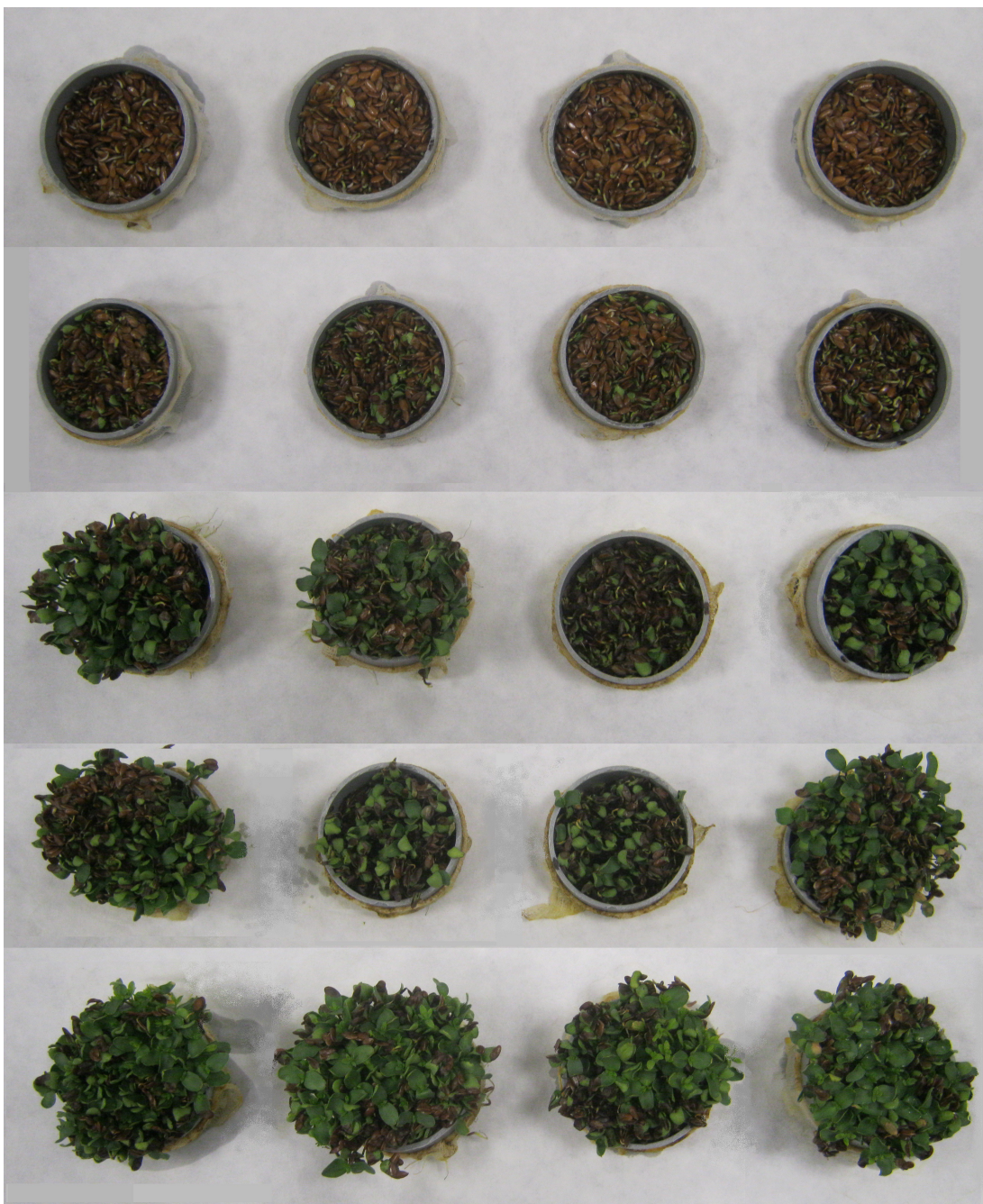
- ALI, A. S. a A. A. ELOZEIRI. 2017. Metabolic Processes During Seed Germination. *Advances in Seed Biology*. InTech. ISBN 978-953-51-3621-7.
- AMINOT, A. a F. REY. 2000. *Standard procedure for the determination of chlorophyll a by spectroscopic methods*. International Council for the Exploration of the Sea. ISSN 0903-2606.
- BEKHITA, A. E.-D. A., A. SHAVANDIB, T. JODJAJAA, *et al.* 2018. Flaxseed: Composition, detoxification, utilization, and opportunities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. **13**: 129-152.
- BERNHOF, A. 2010. A brief review on bioactive compounds in plants. *Bioactive compounds in plants – benefits and risks for man and animals: Proceedings from a symposium held at The Norwegian Academy of Science and Letters, Oslo, 13 – 14 November 2008*. AIT Otta AS. Oslo, s. 12-17. ISBN 978-82-7099-583-7.
- CANO, A. a M. B. ARNAO. 2018. ABTS/TEAC (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)/Trolox®-Equivalent Antioxidant Capacity) radical scavenging mixed-mode assay. *Measurement of antioxidant activity and capacity: recent trends and applications*. 1. Hoboken, NJ, USA: Wiley, s. 117-139. ISBN 9781119135357.
- CORREIA, R. TP., K. C. BORGES, M. F. MEDEIROS a M. I. GENOVESE. 2012. Bioactive compounds and phenolic-linked functionality of powdered tropical fruit residues. *Food Science and Technology International*. **18**(6): 539-547.
- COSKUNER, Y. a E. KARABABA. 2007. Some physical properties of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *Journal of Food Engineering*. **78**: 1067–1073.
- DAUN, J. a R. PRZYBYLSKI. 2000. Environmental effects on the composition of four Canadian flax cultivars. *Proceedings of the 58th flax institute of the United States*. North Dakota: Fargo, : 80-91.
- DAUN, J., T. CHORNICK, V. BARTHET a S. DUGUID. 2003. Structure, composition, and variety development of flaxseed. *Flaxseed in human nutrition*. 2nd ed. Champaign, Ill.: AOCS Press, s. 7-46. ISBN 1893997383.
- DIVIŠ, J. 2010. *Pěstování rostlin: (učební texty pro obor provozní podnikatel a pozemkové úpravy a převody nemovitosti)*. 2., dopl. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta. ISBN 978-80-7394-216-8.
- HENDL, Jan. 2006. *Přehled statistických metod zpracování dat: analýza a metaanalýza dat*. Vyd. 2., opr. Praha: Portál. ISBN 80-736-7123-9.

- KALACĚ, P. 2001. *Organická chemie přírodních látek a kontaminantů*. České Budějovice: Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta. ISBN 80-704-0520-1.
- KÁŠ, J., M. KODÍČEK a O. VALENTOVÁ. 2005. *Laboratorní techniky biochemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. ISBN 80-708-0586-2.
- KOMAREK, R.J., A.J. KOMAREK a B. LAYTON. 2004. Evaluation of the Rapid, High-Temperature Extraction of Feeds, Foods, and Oil seeds by the ANKOM XT20 Fat Analyser to Determine Crude Fat Content. *Oil extraction and analysis: critical issues and comparative studies*. Champaign, Ill.: AOCS Press, s. 39-68. ISBN 9781893997783.
- LAMUELA-RAVENTÓS, R. M., a , eds. 2018. Folin–Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity. *Measurement of antioxidant activity and capacity: recent trends and applications*. 1. Hoboken, NJ, USA: Wiley, s. 107-115. ISBN 9781119135357.
- LEPŠ, Jan. 1996. *Biostatistika*. České Budějovice: Jihočeská univerzita. ISBN 80-704-0154-0.
- MARCONE, M. F., Y. KAKUDA a R. Y. YADA. 1998. Salt-soluble seed globulins of various dicotyledonous and monocotyledonous plants-I. Isolation/purification and characterization. *Food Chemistry*. **62**(1): 27-47.
- MIHALJEV, Ž. A., S. M. JAKŠIĆ, N. B. PRICA, Ž. N. ČUPIĆ a M. M. ŽIVKOV-BALOŠ. 2015. Comparison of the Kjeldahl method, Dumas method and NIR method for total nitrogen determination in meat and meat products. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*. Agroprint, **21**(4): 365-370. ISSN 2069-0053.
- MISHRA, S. 2013. Flaxseed- Bioactive compounds and health significance. *IOSR Journal Of Humanities And Social Science*. **17**(3): 46-50. ISSN 22790845.
- NIREESHA, GR., L. DIVYA, C. SOWMYA, N. VENKATESHAN, M. NIRANJAN BABU a V. LAVAKUMAR. 2013. Lyophilization/Freeze Drying - An Review. *International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences*. **4**(4): 87-98. ISSN 2277 – 2782.
- OOMAH, B Dave. 2001. Flaxseed as a functional food source. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **81**(9): 889-894. ISSN 0022-5142.
- PROSSER, Václav. 1989. *Experimentální metody biofyziky: celostátní vysokoškolská učebnice pro studující matematicko-fyzikálních a přírodovědných fakult oboru 11-66-8 Biofyzika a chemická fyzika*. Praha: Academia. ISBN 80-200-0059-3.
- RAJALAKSHMI, K. a N. BANU. 2015. Extraction and Estimation of Chlorophyll from Medicinal Plants. *International Journal of Science and Research*. **4**(11): 209-212. ISSN 2319-7064.

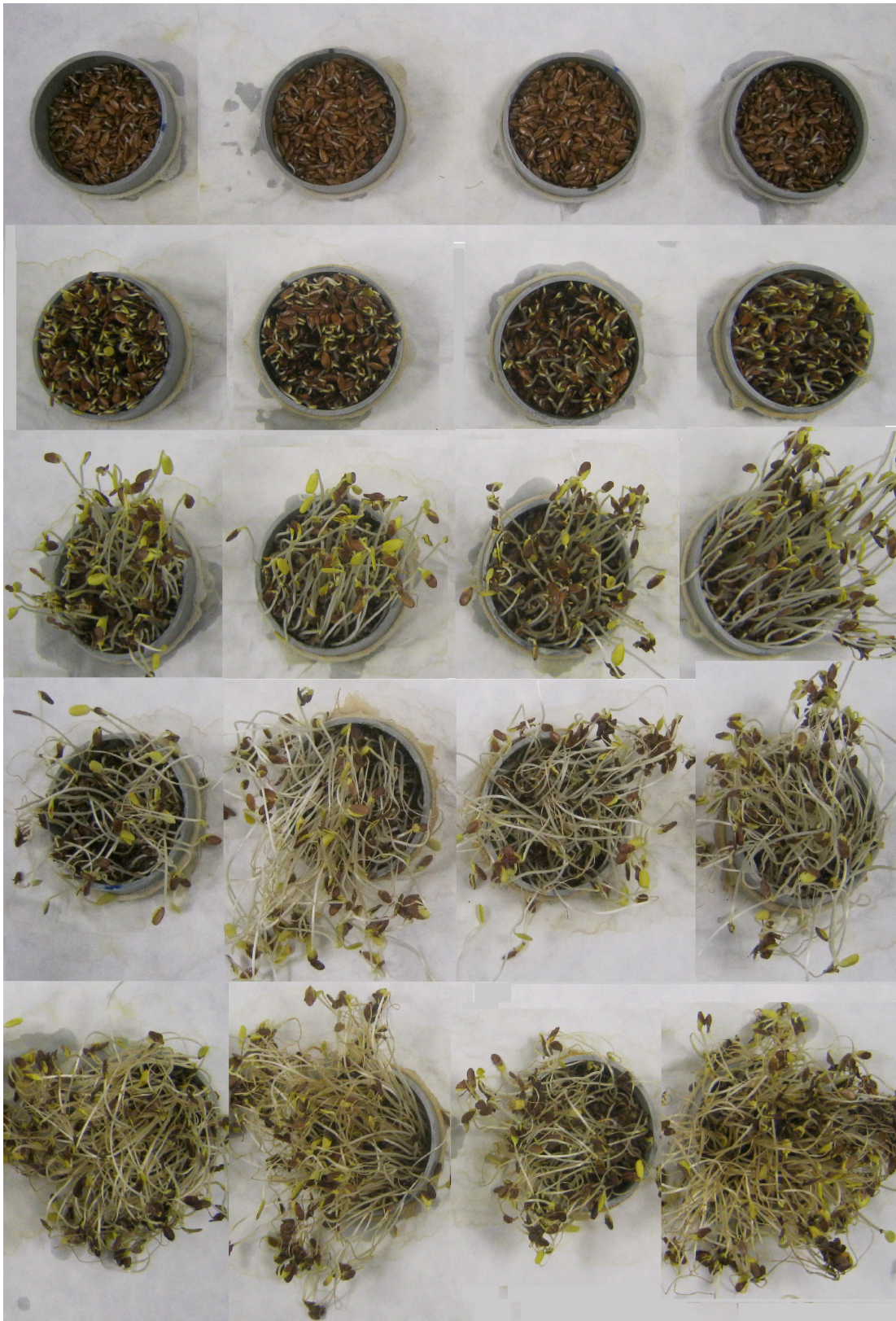
- RE, R., N. PELLEGRINI, A. PROTEGGENTE, A. PANNALA, M. YANG a C. RICE-EVANS. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. **26**: 1231–1237.
- SAMMOUR, R. H., M. N. EL-SHOUBAGY, A. M. ABO-SHADY a A. M. ABASARY. 1994. The seed proteins of linseed (*Linum usitatissimum* L.). *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. **35**(3): 171-177.
- SEBEI, K., A. DEBEZ, W. HERCHI, S. BOUKHCHINA a H. KALLEL. 2007. Germination Kinetics and Seed Reserve Mobilization in Two Flax (*Linum usitatissimum* L.) Cultivars under Moderate Salt Stress. *Journal of Plant Biology*. **50**(4): 447-454.
- SHIM, Youn Young, Bo GUI, Paul G. ARNISON, Yong WANG a Martin J.T. REANEY. 2014. *Flaxseed (Linum usitatissimum L.) bioactive compounds and peptide nomenclature: A review*. **38**(1): 5-20. ISSN 09242244.
- SCHNEIDER DA SILVA, S., F. L. GOULARTE-DUTRA, R. MANICA-BERTO, C. T. BORGES, R. C. ZAMBIAZID, E. HELBIGA a M. R. BONILLA-LEMONS. 2018. Bioactive Compounds Present in Linseed (*Linum Usitatissimum* L.) and Millet (*Panicum Miliaceum* L.) Seeds Under Different Germination Times Reveal Important Sources of Antioxidants for Human Health and Nutrition. *International Journal of Medical Science and Health Research*. **2**(4): 21-34. ISSN 2581-3366.
- SMITH, P. K., R. I. KROHN, G. T. HERMANSON, et al. 1985. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid'. *Analytical Biochemistry*. **150**(1): 76-85.
- ŠIMON, J. 1964. *Rostlinná výroba 2*. 1. Praha: Státní zemědělské nakladatelství.
- ŠPALDON, E. 1986. *Rostlinná výroba*. 1. Praha: Státní zemědělské nakladatelství.
- TZEN, JTC., Yz. CAO, P. LAURENT, C. RATNAYAKE a AHC. HUANG. 1993. Lipids, Proteins, and Structure of Seed Oil Bodies from Diverse Species. *Plant Physiology*. **101**(1): 267-276.
- WANASUNDARA, P.K.J.P.D., F. SHAHIDI a M.E. BROSNAN. 1999a. Changes in flax (*Linum usitatissimum*) seed nitrogenous compounds during germination. *Food Chemistry*. **65**: 289-295.
- WANASUNDARA, P.K.J.P.D., U.N. WANASUNDARA a F. SHAHIDI. 1999b. Changes in Flax (*Linum usitatissimum* L.) Seed Lipids During Germination. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **76**(1): 41-48.
- WANG, H., C. QIU, A. M. ABBASI, et al. 2015. Effect of germination on vitamin C, phenolic compounds and antioxidant activity in flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *International Journal of Food Science Technology*. **50**(12): 2545-2553. ISSN 09505423.

ZEHNÁLEK, P. a P. KRAUS. 2018. *Přehledy odrůd řepky olejky jarní, hořčice bílé, máku setého, lnu olejného a kmínu kořeného 2018*. Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Brno, Národní odrůdový úřad. ISBN 978-80-7401-155-9.

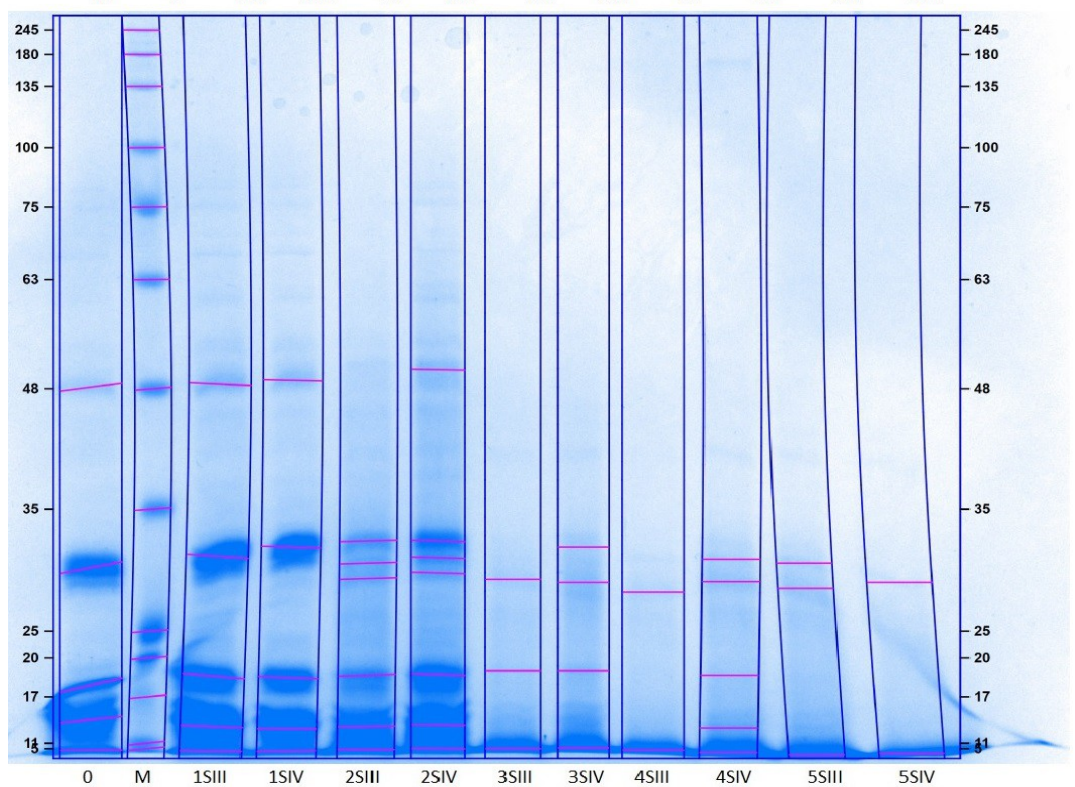
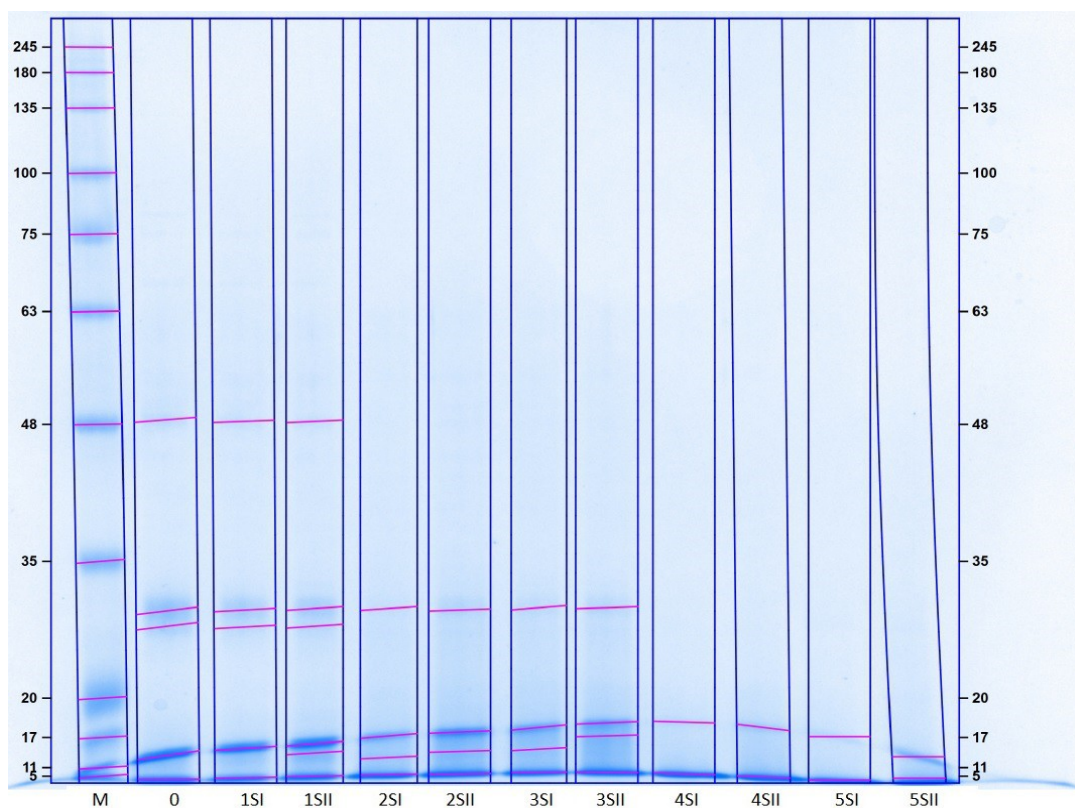
9 Přílohy



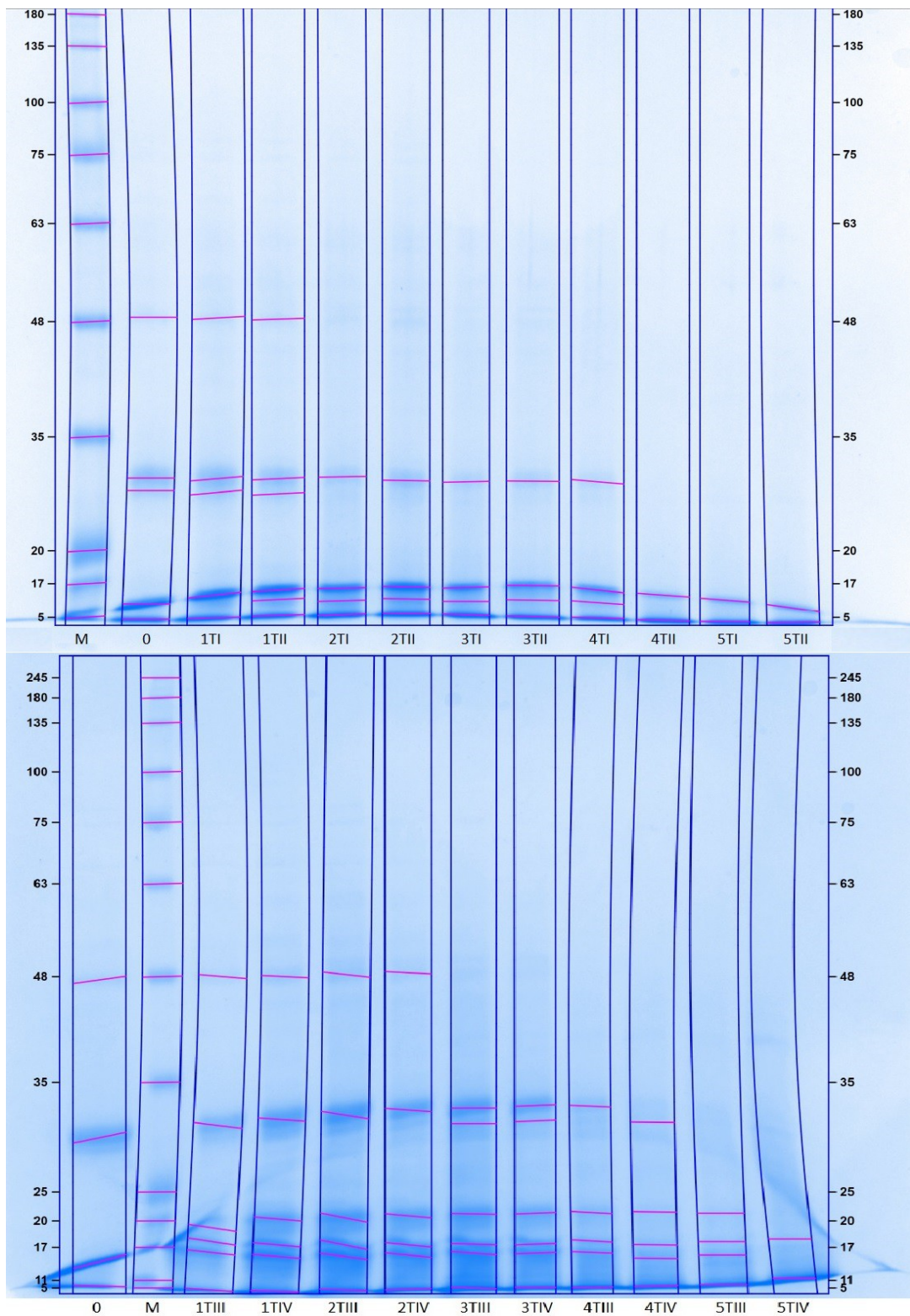
Příloha 1: Klíčení lnu na světle. Odběry jsou seřazeny v řádcích dle délky klíčení (2-10 dni).



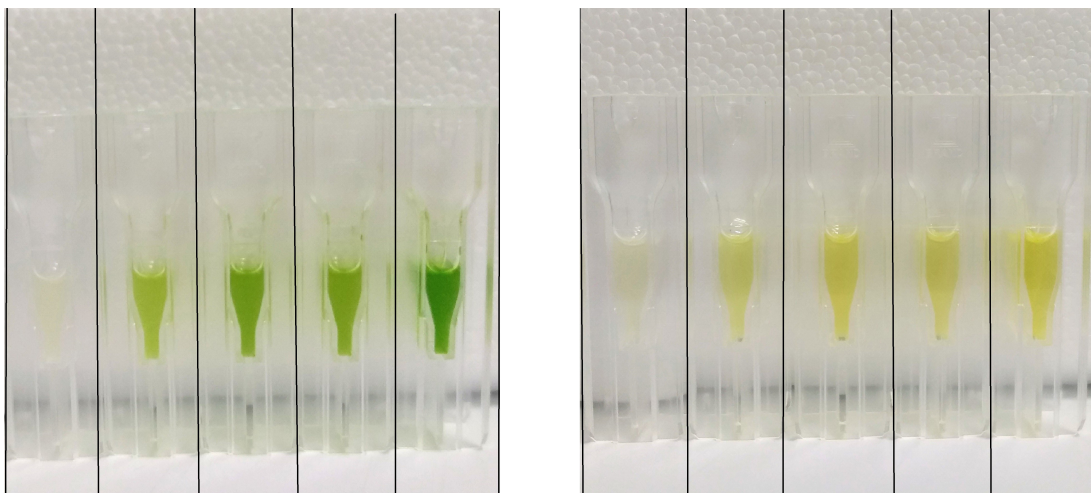
Příloha 2: Klíčení lnu ve tmě. Odběry jsou seřazeny v řádcích dle délky klíčení (2-10 dní).



*Příloha 3: Spektrum bílkovinných profilů lněných semen klíčených ve tmě.
 (0-5 = číslo odběru, S = světlo, I-IV = opakování)
 pozn.: 1 = 2. den klíčení, 2 = 4. den, 3 = 6.den, 4 = 8. den, 5 = 10. den*



*Příloha 4: Spektrum bílkovinných profilů lněných semen klíčených ve tmě.
 (0-5 = číslo odběru, T = tma, I-IV = opakování)
 pozn.: 1 = 2. den klíčení, 2 = 4. den, 3 = 6.den, 4 = 8. den, 5 = 10. den*



Příloha 5: Extrakce chlorofylu. Vlevo extrakty ze semen klíčených na světle, vpravo ze semen klíčených ve tmě. Uspořádány podle délky klíčení (2, 4, 6, 8 a 10 dní) zleva doprava.