

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**  
**ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

**Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství**

**Studijní obor: Zemědělské inženýrství – Fytotechnika**

**Katedra: Speciální produkce rostlinné**

**Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.**

**Diplomová práce**

**Frakcionace bílkovin konopné (*Cannabis sativa* L.) mouky podle  
rozpustnosti**

**Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.**

**Konzultant diplomové práce: Ing. František Lorenc**

**Autor diplomové práce: Bc. Pavel Hofírek**

**České Budějovice, 2017**

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta zemědělská

Akademický rok: 2015/2016

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Pavel HOFÍREK**

Osobní číslo: **Z15459**

Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**

Studijní obor: **Zemědělské inženýrství - Fytotechnika**

Název tématu: **Frakcionace bílkovin konopné (*Cannabis sativa* L.) mouky podle rozpustnosti**

Zadávací katedra: **Katedra speciální produkce rostlinné**

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

Konopí seté (*Cannabis sativa* L.) je stará multifunkční plodina s vysokým potenciálem využití, která je nyní v ČR pěstována zejména na semeno, hlavně pro získání kvalitního za studena lisovaného oleje. Zbytek nažek (semene) po lisování v podobě výlisků obsahuje značné množství bílkovin (25 - 30 %), které mají vysokou nutriční hodnotu a zajímavé funkční vlastnosti. Dostupné literární zdroje (Malomo, Aluko, 2015; Park et al., 2012) uvádějí jako hlavní bílkovinné frakce konopného semene albuminy a globuliny. Za hlavní zásobní bílkovinu je považován globulin edestin, který by měl představovat přes 50 % bílkovin. Majoritní frakcí by proto měly být globuliny. Nicméně informace o podílu jednotlivých frakcí dle rozpustnosti nejsou dostupné a rovněž není nic známo o rozdílech mezi odrůdami.

Předmětem řešení této diplomové práce (DP) proto bude frakcionace bílkovin konopné mouky dvou odrůd konopí setého dle rozpustnosti. Řešení DP bude probíhat formou série laboratorních experimentů, paralelně vedených vzorků, u kterých budou postupně příslušnými rozpouštědly "odmyty" jednotlivé frakce - albuminy vodou, globuliny solným roztokem, prolaminy 70% etanolem a gluteliny roztokem hydroxidu sodného. Podíly získaných frakcí bílkovin budou stanoveny gravimetricky v kombinaci se stanovením obsahu bílkovinného dusíku pomocí elementárního analyzátoru. Frakce bílkovin budou odsoleny, neutralizovány či bude odpařeno rozpouštědlo a následně budou podrobeny elektroforetické analýze (SDS-PAGE) pro zjištění kvalitativních změn v bílkovinném profilu konopné mouky vlivem odlišných vlastností rozpouštědla. Změny budou hodnoceny pomocí speciálního software. Získané výsledky v rámci řešení DP budou statisticky vyhodnoceny a zpracovány do podoby tabulek nebo grafů. DP bude zpracována podle platného sdělení děkana pro vypracování bakalářských a diplomových prací (Opatření děkana ZF JU č. 4/2014, viz web ZFJU).

Rozsah grafických prací: 10 - 15 stran

Rozsah pracovní zprávy: 40 - 50 stran

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

Kim J.-J., Lee M.-Y. (2011): Isolation and characterization of Edestin from Cheungsam hempseed. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 54: 84-88.

Malomo S. A., Aluko R. E. (2015): A comparative study of structural and functional properties of isolated hemp seed (*Cannabis sativa* L.) albumin and globulin fractions. *Food Hydrocolloids*, 43: 743-752.

Park S.-K., Seo J.-B., Lee M.-Y. (2012): Proteomic profilig of hempseed proteins from Cheungsam. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1824: 374-382.

Tang C.-H., Ten Z., Wang X.-S., Yang X.-Q. (2006): Physicochemical and functional properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 8945-8950.

On-line databáze: Web of Science, Scopus aj.

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.

Katedra speciální produkce rostlinné

Konzultant diplomové práce: Ing. František Lorenc

Katedra speciální produkce rostlinné

Datum zadání diplomové práce: 14. března 2016

Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2017



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

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA  
studijní oddělení  
Studentská 1898, 270 06 České Budějovice

L.S.



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

V Českých Budějovicích dne 14. března 2016

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci „Frakcionace bílkovin konopné (*Cannabis sativa* L.)“ jsem vypracoval samostatně pouze s použitím 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 diplomové práce, a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypouštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) 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.

V Českých Budějovicích 5. 5. 2017

.....

## **Poděkování**

Touto cestou bych velice rád poděkoval zejména vedoucímu práce doc. Ing. Janu Bártovi Ph.D. za pomoc v průběhu celé práce, odborné rady, připomínky, poskytnutí studijních a ilustračních materiálů, také za pomoc se statistickým zpracováním výsledků. Dále bych rád poděkoval Ing. Františku Lorencovi za velkou pomoc při práci v laboratoři, odborné rady důležité pro experimentální metody a za vytvoření příjemného pracovního prostředí a dobrou náladu v laboratoři. Rád bych také poděkoval firmě Hemp production s.r.o. Chraštica, konkrétně panu Václavu Říhovi za poskytnutí konopného materiálu.

Také bych rád poděkoval celé své rodině a přátelům za velkou podporu v průběhu celého studia.

## **Abstrakt**

Diplomová práce se zabývá frakcionací bílkovin konopné (*Cannabis sativa* L.) mouky podle rozpustnosti odrůd konopí setého Fedora 17 a Uso 31. U těchto zkoumaných odrůd byl laboratorními technikami a experimentálními metodami stanoven obsah dusíkatých látek, který se pohyboval v rozmezí od 23,6 % (Uso 31) do 31,5 % (Fedora 17), obsah bílkovin, který se pohyboval v rozpětí 100,1 mg.g<sup>-1</sup> v konopné mouce u odrůdy Uso 31 do 130,7 mg.g<sup>-1</sup> v konopné mouce u odrůdy Fedora 17. Frakcionací konopných bílkovin byla jako nejrozšířenější frakce u obou odrůd zjištěna frakce albuminů, jejíž relativní podíl byl 20,5 % bílkovin. Dále byla stanovena bílkovinná spektra. Analýzou SDS-PAGE byly detekovány albuminy v oblasti 7,4 kDa – 53,6 kDa. Ve frakci globulinů byly pomocí SDS-PAGE detekovány bazické podjednotky hlavní zásobní bílkoviny edestinu v oblasti 19–21 kDa, a kyselé podjednotky v oblasti 34 kDa.

**Klíčová slova:** *Cannabis sativa* L., frakce bílkovin, konopná mouka, edestin

## **Abstract**

This diploma thesis deals with fractionation of protein from hemp (*Cannabis sativa* L.) meal according to their solubility of the hemp varieties - Fedora 17 and Uso 31. The content of nitrogenous substances and protein content in the hemp meal of these studied varieties ranged from 23,6 % (Uso 31) to 31,5 % (Fedora 17) and from 100,1 mg.g<sup>-1</sup> (Uso 31) to 130,7 mg.g<sup>-1</sup> respectively. The fractionation of hemp protein (Fedora 17, Uso 31) confirmed that the main hemp protein fraction is an albumin fraction, with its relative abundance - 20,5 % of protein. As a next step, the spectra of hemp proteins were determined. The use SDS-PAGE analysis revealed albumin proteins in area of 7,4 – 53,6 kDa. In the globulin fraction was revealed by SDS-PAGE basic subunits of the major protein edestin in the area 19-21 kDa and acidic subunits in the area 34 kDa.

**Key words:** *Cannabis sativa* L., protein fractions, hemp meal, edestin

# Obsah

Úvod.....	10
2. Literární přehled.....	11
2.1 Konopí seté .....	11
2.1.1 Taxonomické zařazení .....	11
2.1.2 Botanická charakteristika .....	12
2.2 Agrotechnické požadavky konopí setého.....	13
2.2.1 Nároky na prostředí.....	13
2.2.2 Zařazení v osevním postupu .....	14
2.2.3 Příprava půdy .....	14
2.2.4 Setí .....	14
2.2.5 Výživa rostlin.....	15
2.2.6 Ošetřování za vegetace.....	16
2.2.7 Sklizeň konopí setého .....	17
2.3 Látky obsažené v konopí setém .....	18
2.3.1 Konopný stonek .....	18
2.3.2 Obsah kanabinoidů.....	19
2.4 Složení konopného semene.....	20
2.4.1 Bílkoviny.....	20
2.4.2 Tuky .....	21
2.4.3 Sacharidy.....	22
2.4.4 Vitamíny a minerální látky .....	22
2.4.5 Antinutriční látky .....	23
2.5 Bílkoviny.....	24
2.5.1 Funkční vlastnosti bílkovin .....	26
2.5.2 Rostlinné bílkoviny .....	27
2.5.3 Bílkoviny zrn vybraných obilnin .....	27
2.5.4 Bílkoviny zrn vybraných luskovin .....	30
2.5.5 Bílkoviny olejnin .....	30
2.6 Bílkoviny semen konopí setého .....	31
2.6.1 Edestin.....	32
2.6.2 Aminokyselinový profil konopí setého.....	33
2.6.3 Extrakce bílkovin .....	35
2.6.4 Potenciál využití konopné bílkoviny a semen konopí setého .....	35
3. Cíle práce .....	37



4. Materiál a metody .....	38
4.1 Charakteristika konopného materiálu .....	38
4.1.1 Zpracování konopných výlisků .....	38
4.2 Frakcionace konopných bílkovin .....	38
4.3 SDS-polyakrylamidová elektroforéza .....	39
4.4 Stanovení obsahu dusíkatých látek .....	39
4.4.1 Příprava vzorku .....	39
4.4.2 Stanovení obsahu dusíkatých látek v sušině konopné mouky .....	40
4.5 Stanovení sušiny konopné mouky .....	40
4.6. Vyhodnocení dat .....	40
5. Výsledky .....	41
5.1 Sušina konopné mouky (%) .....	41
5.2. Stanovení obsahu dusíkatých látek konopné mouky .....	41
5.3 Stanovení obsahu bílkovin konopné mouky .....	43
5.4 Relativní zastoupení bílkovin a bílkovinných frakcí konopné mouky v dusíkatých látkách hodnocených odrůd konopí .....	44
5.5 Vyhodnocení elektroforetických profilů bílkovinných frakcí konopné mouky .....	46
6. Diskuse .....	50
6.1 Obsah dusíkatých látek zkoumaných odrůd konopí .....	50
6.2 Obsah dusíkatých látek bílkovinných frakcí .....	50
6.3 Obsah bílkovin v jednotlivých odrůdách konopí setého a v jednotlivých bílkovinných frakcích konopné mouky .....	50
6.4 Relativní zastoupení bílkovin v dusíkatých látkách konopné mouky .....	51
6.5 Spektra bílkovin konopné mouky .....	52
7. Závěr .....	54
8. Seznam použité literatury .....	56
9. Přílohy .....	I
Příloha I – Ilustrační fotografie .....	I
Příloha II – podklady pro statistická hodnocení .....	III

## Úvod

Lidstvo zná rostlinu konopí (*Cannabis sativa* L.) jako průmyslovou plodinu a využívá ji již několik tisíciletí. Konopí pochází z centrální Asie a je považováno za jednu z nejstarších pěstovaných druhů rostlin. Rozmach v pěstování a využití této rostliny nastal především v Číně, kde bylo konopí pěstováno kvůli jeho víceúčelovému využití (vlákno, olej, potravinu, lidové léčení). Vlivem člověka se pak konopí rozšířilo do celého světa, kde bylo pěstováno pro nejrůznější účely.

Konopí seté je starou kulturní plodinou i na území České republiky. Největšího rozmachu dosáhlo konopí na našem území v 18. stol. Osevní plochy se po 1. světové válce pohybovaly v Československu kolem 9000 ha. Postupně se však osevní plochy snižovaly a vlivem chybějícího návazného zpracovatelského průmyslu na zpracování konopných vláken pěstování takřka upadlo. V posledních letech však konopí zažívá svou renesanci, jako přírodní, ekologická a recyklovatelná surovina. Využívá se v mnoha průmyslových odvětvích – stavebnictví, papírenství, v oděvním, farmaceutickém, kosmetickém a potravinářském průmyslu.

Konopí seté je také považováno za zdroj nutričně bohatých semen, která mají širokou škálu využití v potravinářství. Olej lisovaný za studena z konopných semen patří mezi nejkvalitnější rostlinné oleje, je charakteristický vysokým obsahem nenasycených mastných kyselin, zejména dokonalým poměrem omega-6 mastné kyseliny linolové (56 %) a omega-3 mastné kyseliny alfa-linolenové (19 %). Další nutričně bohatou složku semen tvoří konopná bílkovina, která patří mezi nejkompletnější a nejvhodnější rostlinnou bílkovinu, obsahuje všechny esenciální aminokyseliny což jí zaručuje velmi dobrý potenciál využití v oblasti výživy.

Dlouho převládala představa o důležitosti konzumace živočišných bílkovin (maso, mléko, mléčné výrobky) abychom měli dostatek esenciálních aminokyselin. V poslední době se však stává moderním trendem vkládat do lidské výživy i bílkoviny rostlinného původu. Správnou skladbou rostlinných bílkovin dodáme tělu plnohodnotný aminokyselinový zdroj, který umožní zásobovat tělo kvalitní bílkovinou. Hlavním zdrojem rostlinných bílkovin v potravě jsou semena rostlin, plody, bulvy, hlízy aj. části rostlin.

Západní svět se začíná opět zajímat o zdravou stravu rostlinného původu, která obsahuje hodně vlákniny a bílkovin. Semena konopí setého jsou dobrým zdrojem jak vlákniny, tak bílkovin.

## 2. Literární přehled

### 2.1 Konopí seté

#### 2.1.1 Taxonomické zařazení

Taxonomické zařazení konopí není snadné. Carl Linné (1707–1778) jenž v roce konopí seté odborně popsal, považoval *Cannabis sativa* L. za jediný druh z rodu. V roce 1785 však francouzský biolog Jean Babtiste de Lamarck zjistil, že kmeny konopí z Indie se liší od běžně pěstovaného konopí v Evropě a pojmenoval tak nový druh *Cannabis indica* Lam. (Hillig, 2005). Posledním dnes uznávaným druhem je *Cannabis ruderalis*, který našel v roce 1924 ruský botanik Dmitrii E. Janischewsky v jihovýchodním Rusku (Miovský a kol., 2008). Anderson (1974, 1980), Emboden (1974) a Schutles et al., (1974) používali morfologické rysy, pomocí nichž vymezili tři druhy konopí, *C. sativa*, *C. indica* a *C. ruderalis* (Piluzza et al., 2013).

V současnosti se uplatňuje taxonomické zařazení dle ITIS (*Integrated Taxonomic Information System*), který uvádí pro čeleď *Cannabaceae* a rod *Cannabis* jeden samostatný druh *Cannabis sativa* L. konopí seté, s dvěma poddruhy *Cannabis sativa* spp. *Indica* konopí indické a *Cannabis sativa* spp. *sativa*, zahrnující i varietu *spontea* konopí rumištní neboli *Cannabis ruderalis* (Gilmore et al., 2007). Lawi-Berger, Kapetanidis a jejich spolupracovníci roku 1983 poskytli chemotaxonomický důkaz pro jeden druh konopí, který ukázal, že skladba a podíl mastných kyselin, jakož i proteiny a enzymy přítomné v konopných semenech ze čtrnácti různých zeměpisných oblastí byly prakticky identické (Raman, 1998). Gilmore et al. (2007) také uvádějí aktuálně přijímaný názor, že konopí je vysoce variabilní, hybridizovaný a panmiktický druh vykazující schopnost se volně křížit. V případě samostatných názvů druhů a poddruhů by měly názvy odrážet jejich vlastnosti a možnost využití.

Jiný způsob členění konopí do geografických skupin (*proles*) na konopí severní (*borealis*), středoruské (*medioruthenica*), jižní (*australis*), a hašišné (*asiatica*) (Miovský a kol., 2008).

Alternativně členit odrůdy konopí v rámci čeledi *Cannabaceae* lze také pomocí tzv. chemotypů. Jednotlivé chemotypy jsou charakterizovány obsahem kanabinoidů v rostlině a určují jejich další vlastnosti. Kanabinoidy s největším obsahem v rostlině jsou kanabidiol (CBD), delta-9-tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC), jeho méně obvyklý

izomer delta-8-tetrahydrocannabinol, všechny kanabinoidy s psychoaktivní aktivitou a kanabigerol (CBG) s kanabichromen (CBC). Vzájemný poměr těchto látek určuje chemotyp dané rostliny konopí. Podle koncentrace a poměru dvou hlavních kannabinolů se určují tři základní chemotypy. Chemotyp I s nízkým poměrem CBD k vysokému obsahu THC, chemotyp II s vyrovnaným poměrem CBD/THC a chemotyp III kde převažuje obsah CBD s velmi nízkými až nulovými hodnotami THC. Chemotypu III odpovídají pěstované odrůdy technického konopí (de Meijer et al., 2003).

### **2.1.2 Botanická charakteristika**

Konopí seté je jednoletá, dvouděložná, krytosemenná rostlina patřící do řádu růžotvaré a čeledi konopovité. Jedná se o dvoudomou nebo jednodomou bylinu, jejíž výška se pohybuje v závislosti na druhu od 80–350 cm výjimečně až 400 cm. Samčí rostliny jsou vyšší a štíhlejší, mají světlejší listy a šedozelený vrchol. Dozrávají o 4 až 6 týdnů dříve než samičí rostliny. Samičí rostliny bývají silnější, více olistěné a tmavší. V normálním porostu je asi 53 % samčích a 47 % samičích rostlin. Jednodomé konopí má květy s odděleným pohlavím, samčí seskupené do lat, samičí jako hrozny ve vrcholové části rostliny (Moudrý a kol., 2011). Dlouholetým výběrovým šlechtěním byly získány jednodomé varianty konopí, jejichž význam v současném produkčním zemědělství převládá. Důvodem je dle Miovského (2008), záruka dostatečného opylení květů s následnou vyrovnanou produkcí semene, rovnoměrné dozrání porostu, snížení agronomických problémů při sklizni, dosažení výnosové a kvalitativní stability semen a vlákna (Amaducci et al., 2015).

Kořen je kulovitý, kolmý a dlouhý s množstvím postranních a vlásečnicových kořínků. Vlasečnicové kořínky posazené po stranách jsou fyziologicky neúčinnější, a tedy nepostradatelné pro výživu a vývoj rostliny (Miovský a kol., 2008). Ve srovnání s jinými rostlinami má konopí v poměru k nadzemní části kořenový systém slabě vyvinutý, i proto existuje přímá souvislost mezi kvalitou půdy poskytující kořenovému systému dostatečný rozvoj a vývojem nadzemních částí rostlin (Moudrý a kol., 2011).

Lodyha je přímá, v horní části větvená, dorůstá průměrně kolem 2 m až 4 m výšky (ale i 6 m), síla stonku se pohybuje od 3 mm do 60 mm (Moudrý a kol., 2011, Miovský a kol., 2008). Stonek je v počátečních fázích růstu měkký a dužnatý, v pozdějších fázích od spodu dřevnatí a uvnitř se tvoří středová dutina, obsahuje 13,5

– 19,5 % vlákna. Podle typu konopí bývá většinou šestihranný nebo čtyřhranný, někdy rýhovaný, přičemž ve spodní části zůstává kulatý. Hrany zesilují směrem k vrcholu. Stonek konopí se v hustých porostech skoro nevětví, v řídkých porostech vytváří větve, někdy i v dolní polovině stonku (Moudrý a kol., 2011)

Listy jsou střídavé, dlanité tří až třináctičetné, mají kopinatý tvar a pilovitý okraj s krátkými až středně dlouhými řapíky (Mioviský a kol., 2008).

Květenství samčích rostlin je uspořádáno v úžlabních latách na dlouhých stopkách vyrůstající z úžlabních listů. Kvítky mají 5 žluto-zelených květních šupinek a 5 tyčinek. Samčí rostliny kvetou 20 až 25 dní, po odkvětu odumírají. Samičí květy mají svrchní dvoupouzdrý semeník s jedním vysunutým vajíčkem a dvěma dlouhými nitkovitými bliznami. Samičí květy jsou rozmístěny v horní části rostliny a tvoří hustě olistěné krátké složité hrozny. Samičí rostliny začínají kvést o 3–10 dní později než samčí (Moudrý a kol., 2011).

Plodem konopí je jednosemenná nažka vejčitého tvaru s malým obsahem endospermu a velkým podkovitě stočeným klíčkem. Velikost semene je závislá na typu a odrůdě konopí. Délka je 2–5 mm, šířka 2–4 mm, HTS se pohybuje od 6–26 gramů. Barva je šedozelená, tmavohnědá až černá s jemným mramorováním (Mioviský a kol., 2008). Semena jednodomých odrůd jsou obvykle menší než u dvoudomých odrůd (Amaducci et al., 2015).

## **2.2 Agrotechnické požadavky konopí setého**

### **2.2.1 Nároky na prostředí**

Konopí lze pěstovat v oblastech s různou zeměpisnou šířkou, neboť je velmi adaptivní na podmínky životního prostředí, lepších výnosů však dosahují odrůdy v oblastech jejich přirozeného vývoje (Amaducci et al., 2015). Konopí je rostlinou krátkého dne, to znamená, že vývojové fáze probíhají rychleji v oblastech s krátkým dnem. Na vytvoření jednotky sušiny potřebuje až dvakrát větší množství vody než obilniny, tudíž by celkové množství srážek nemělo klesnout pod 500 mm zvláště v prvních fázích růstu a v době kvetení vyžaduje konopí dostatek vody (Moudrý a kol., 2011).

Na půdu má konopí značné nároky. Nejvhodnější jsou úrodné, hluboké a dobře zpracovatelné půdy hlinité a písčitohlinité s nízkou hladinou spodní vody, dobře

vyhnojené a bohatě zásobené humusem s neutrální až slabě zásaditou půdní reakcí (Van der Werf, 2002).

### **2.2.2 Zařazení v osevním postupu**

Na zařazení v osevním postupu není konopí náročné. Nejvhodnějšími předplodinami jsou plodiny, které zanechávají půdu čistou, kyprou, dobře zásobenou živinami, zvláště dusíkem. Jsou to okopaniny, kukuřice, luskoviny, jetel, vojtěška a jetelotravní směsky. Konopí se běžně používá jako přerušovač obilních sledů, snáší i pěstování po sobě. Je také dobrou předplodinou pro pšenici, zanechává půdu čistou a v dobrém stavu (Van der Werf, 2002).

### **2.2.3 Příprava půdy**

V podmínkách České republiky je možné pěstovat konopí na vlákno nebo na semeno. V poslední době se také uvažuje o produkci na hmotu pro energetické účely. Podle toho se řídí i způsob pěstování (Moudrý a kol., 2011). Příprava jemného a homogenního setového lůžka je důležitou podmínkou pro vytvoření vyrovnaného porostu s optimálním počtem rostlin (Amaducci et al., 2015), význam pečlivé přípravy půdy vyplývá z biologických a morfologických vlastností rostliny (Moudrý a kol., 2011). Je důležité zabezpečit velké požadavky konopí na vodní, vzdušný a živinný režim v půdě. Na podzim se provádí podmítka, pokud je možnost, dodávají se organická hnojiva a provádí se orba do hloubky 25–30 cm. Jarní příprava půdy je v podstatě stejná jako pro jarní plodiny. Důležité je šetřit půdní vláhou a hlídat zaplevelení pozemku (Moudrý a kol., 2011). Amaducci et al. (2015) upozorňují na zhutnění orniční vrstvy a tvorbu slévavého povrchu vlivem špatné přípravy půdy hlavně ve vlhkých letech. Kořen pak nabývá tvaru L, což negativně ovlivňuje zakořenění rostliny a její špatný příjem vody a absorpci živin. Aplikace fosforečných a draselných hnojiv je prováděna před konečnou přípravou půdy pro setí, přičemž dusík je aplikován současně nebo těsně před setím (Moudrý a kol., 2011).

### **2.2.4 Setí**

Konopí je vhodné sít v druhé polovině dubna nebo začátkem května. Obecně lze říci, že časnější výsevy korespondují s vyšším výnosem vláken i semen. Odrůdy pěstované na vlákno by měly mít dlouhou vegetativní dobu a vyšší obsah vláken. Je

třeba poznamenat, že volba pozdní odrůdy může mít některé nevýhody, vzhledem k tomu, že v Evropě převládá pěstování konopí s dvojitým využitím jak na semeno, tak na vlákna. Při výběru odrůdy je tedy důležitý i výnos semen a obsah oleje (Amaducci et al., 2015). Konopí pěstované na vlákno nebo na hmotu vyséváme do řádků 20–25 cm širokých, konopí pěstované na semeno se doporučuje sít do řádků 40–60 cm širokých. Hloubka setí se pohybuje okolo 3–4 cm, v hluboké půdě můžeme sít hlouběji s výsevkem 50 až 60 kg/ha na vlákno, 45–55 kg/ha na vlákno i semeno a 20–30 kg/ha pouze na semeno (Van der Werf, 2002). Hustota porostu při sklizni by měla být při pěstování na semeno 30–75 rostlin/m<sup>2</sup>, při pěstování na vlákno 150–350 rostlin/m<sup>2</sup> (Amaducci a Gusovius, 2010). Při pěstování konopí na semeno je třeba dbát na to, aby nebyly v okolí porosty s jinými odrůdami a zamezili jsme tak cizímu sprášení. Plodinu je pro zvýšení výnosu možné uměle opylovat v době rozkvětu 1/3 samičích rostlin (Moudrý a kol., 2001).

### **2.2.5 Výživa rostlin**

Na živiny je konopí značně náročné, zejména je vyžaduje ve snadno přístupné formě. Sklízni 10 t/ha stonků a 0,9 t/ha semen dle literatury odejme konopí asi 114 kg N, 86 kg P, 123 kg K a 245 kg Ca. Půda by měla být dobře vyhnojena statkovými a minerálními hnojivy. Čím je odrůda vzrostlejší, tím je náročnější na odběr živin. Na podzim lze aplikovat hnůj a kejdu v dávce 30 t/ha i více. Konopí také dobře reaguje na zelené hnojení (Moudrý a kol., 2011).

Hnojením dusíkem se zabývá velké množství studií, které řeší účinek této živiny na produktivitu biomasy konopí. Experimentální výsledky potvrzují, že hnojení dusíkem by mělo být stanoveno na základě úrodnosti půdy a nejvíce je přijímán v prvním měsíci vegetace (Amaducci et al., 2015). Amaducci et al., (2015) uvádí, že dávku dusíkatých hnojiv nelze jednoznačně určit vzhledem k vysoké plasticitě konopí, nicméně autoři uvádějí dávku dusíku od 0 do 120 kg N/ha. Zvýšení dávky nad 150 kg N/ha výnosy jak semen, tak stonků nezvýšilo. Zvýšené hnojení dusíkem podporuje v porostu vyšší procento samičích rostlin, ale může činit konopí náchylnějším k poléhání a snižovat kvalitu vláken (Amaducci et al., 2015, Song et al., 2012, Finnan a Burke, 2013, Struik et al., 2000, Bouloc et al., 2013).

Draslík spolupůsobí při vývinu stonku a vláken, má spolu s dusíkem největší vliv na výnos stonků a jakost vláken. Nejvyšší spotřeba draslíku rostlinou probíhá ve

fázi počátečního rychlého růstu stonku, aplikuje se jak na podzim, tak při jarní přípravě půdy (Sladký a kol. 2004). Finnan a Burke (2013) uvádějí dávky draslíku pro konopí v rozmezí 140–230 kg/ha dle půdní zásoby, avšak výsledky jejich studie zaměřené na úroveň draselné výživy naznačují, že nároky konopí na draslík mohou být nižší. Moudrý a kol., (2011) udává množství draslíku pro konopí na středních půdách v hodnotě 100 kg/ha.

Dostatek fosforu je nezbytný při pěstování konopí na semeno, na výnos stonků nemá takový vliv. Dávka fosforu na středních půdách činí asi 30 kg/ha (Moudrý a kol. 2001).

Vápnění je zpravidla nutné i na neutrálních půdách, protože spotřeba vápníku pro růst kořenového systému, stonků i semen je vysoká. Vápníme buď na podzim, lepší je aplikace Ca již k předplodině (Sladký a kol., 2004).

#### **2.2.6 Ošetřování za vegetace**

Růst konopí po vzejití probíhá relativně rychle a dobře založený porost tak snižuje možnost výskytu plevelů. Je také známo jeho alelopatické působení na plevele, takže v hustém a vysokém porostu konopí nemají plevele většinou šanci růst (Moudrý a kol., 2011). Konopí je poměrně odolná rostlina vůči chorobám a škůdcům. Pokud se však konopí pěstuje v monokultuře, může se zvýšit riziko napadení fytopatogeny. U konopí mohou být kritické jen takové choroby, které napadají stonky nebo kořeny, jako např. plíseň šedá (*Botrytis cinerea* Pers.), rakovina nebo fuzarióza (*Giberella pulicaris* /Fr./ Sacc.). Nejnebezpečnější chorobou je bílá (sklerociová) hniloba, jejímž původcem je hlízenka obecná (*Sclerotinia sclerotiorum* /Lib./ Masse.). Je vhodné, aby se zabránilo pěstování stejných odrůd konopí po sobě, které jsou citlivé k napadení bílou hnilobou z důvodu zamoření půdy sklérócií (Amaducci et al., 2015). Může docházet také k výskytu chorob přenášené mšicí konopnou (*Phyrodon cannabis* Pass.). Škůdci konopí mohou být také: dřepčík chmelový (*Psylliodes attenuata* Koch.), housenky můry gama (*Autographa gamma* L.) a zavíječ kukuřičný (*Ostrinia nubilalis* Hübn.) (Sladký a kol., 2004).

Konopí může trpět poruchami růstu z důvodu nedostatku živin, tzv. karenční poruchy. Nedostatek dusíku se projeví zakrslým růstem, nedostatečná zásoba draslíku v půdě způsobuje tzv. kaliovou mozaiku konopí, která je doprovázena prodloužením vegetační doby a oddálením kvetení (Moudrý a kol., 2011). Konopí je také velmi



citlivé na výskyt reziduí herbicidů v půdě. Doporučuje se nepěstovat konopí po kukuřici seté, pokud je používán atrazin a simazin (Amaducci et al., 2015).

### **2.2.7 Sklizeň konopí setého**

Účel pěstování konopí setého určuje také technologické nároky na sklizeň výsledného produktu. Jak bylo dříve uvedeno, konopí seté se pěstuje hlavně na semeno nebo pro produkci vlákn, v dalším případě může jít o kombinaci těchto dvou směrů. Bylo vyzkoušeno mnoho různých metod a variant sklizně (Vera, Hanks, 2004).

Konopí na produkci stonků, tedy vlákn, je obecně sklízeno v okamžiku, kdy jsou samčí rostliny v plném květu a zbavují se pylu, nebo po pylovém spadu kdy primární výnos vlákn dosahuje svého maxima (Amaducci et al., 2015). Konopí se nedá sklízet, pro své houževnaté stonky, běžnými sklízecími mechanismy v důsledku namotávání vlákn na pracovní části stroje. Pro průmyslové využití vlákn byly vyvinuty kombinované stroje, které oddělují semeno a stonky spolu s listím vrací na pole k doschnutí. Oddělené vlákno se pak lisuje do kulatých balíků. V Nizozemí se sklízí konopí upravenou sklízecí řezačkou na kukuřici firmy Kemper. Upravená řezačka konopí odřezává stonky a zároveň je pořezává na délku 50–60 cm a odkládá ho na strniště do řádků, který se po třech dnech po dobu 14 dní obrací obracečem. V důsledku pomačkání stébla rychleji zasychají na vlhkost 20 %. Ušchlé řádky se sbírají a lisují do balíků (Moudrý a kol., 2011).

Zavedení pěstování jednodomých odrůd konopí vytvořilo nové možnosti pro využití mechanizované sklizně při pěstování na semeno, vzhledem k stejnoměrnému zrání jednodomých odrůd (Burczyk, Kaniewski, 2005, Amaducci, Gusovius, 2010). Sklizeň nastává v době, kdy semena ve spodní polovině květenství samičích rostlin jsou v plné zralosti a v horní polovině v mléčné zralosti. Semena nejdříve dozrávají v nejnižších větvích a nejpozději na nejvyšších. Nemělo by se sklízet později, neboť semeno při plné zralosti vypadává. Sklizeň by měla probíhat z rána nebo za vyšší vlhkosti, aby se omezilo vypadávání zralých semen. Sklízí se obilní mlátičkou, která umožňuje co nejvyšší nastavení žacího stolu, sečeme těsně pod spodními latami (Moudrý a kol., 2011). Sklizený produkt má obvykle vlhkost 12–20 % (ihned se čistí a dosouší na vlhkost pod 12 % ideálně na 7–8 %, aby nedocházelo k zapaření a zhoršení kvality výsledného produktu (Burczyk, Kaniewski, 2005).

## 2.3 Látky obsažené v konopí setém

*Cannabis sativa* L. je přadná a olejnatá kulturní rostlina. Kromě květů obsahujících látky s nezanedbatelnými léčebnými účinky poskytuje nutričně bohaté olejnaté semeno a stonek obsahující lýková vlákna a dřevnaté pazdeří. V konopí setém bylo objeveno asi 533 látek, z nichž 103 obsahuje pouze tato rostlina. Kvalit těchto surovin využívá člověk nepřetržitě od raného starověku. Po stagnaci a úpadku konopného hospodářství ve 20. století, se konopí jako hospodářská surovina znovu prosazuje (Miovský a kol., 2008). Kubánek (2008) dále poukazuje na obsah 35 sacharidů, 20 jednoduchých kyselin, 18 aminokyselin, všech 8 esenciálních aminokyselin, proteinů, amidů a aminů, alkoholů, vitamínů, uhličitánů, steroidů, alkaloidů a dalších. Konopí seté produkuje i sekundární metabolity ve formě silice, která je tvořena z 85 % terpeny.

### 2.3.1 Konopný stonek

Stonek je zdrojem vlákna (25–34 %) a dřevnatého pazdeří (60–80 %). Primární konopné vlákno obsahuje až 74 % celulózy, sekundární konopné vlákno tzv. koudel přibližně 36 % celulózy a 31 % hemicelulózy (Miovský a kol., 2008). Konopné vlákno dosahuje délky až 4,5 metru oproti 2 cm délky vlákna bavlněného, přičemž je pevnější a trvanlivější. Pěstování konopí je také energeticky šetrnější a ekologičtější v porovnání s bavlníkem, který je pěstován pouze v subtropických oblastech. Produkce bavlny je spojena s významnými environmentálními problémy (Ebskamp, 2002). Soudobé pěstování bavlny se vyznačuje vysokou spotřebou vody a značnými nároky na aplikaci hnojiv a pesticidů (Werf a Turunen, 2008), oproti konopí, které lze s úspěchem pěstovat téměř na celém světě, poskytuje vyšší výnos biomasy na jednotku plochy. Ze skupiny lýkových rostlin má konopí nejjemnější a na omak nejměkčí vlákno, vyznačuje se vysokou pevností v tahu, pružností a odolností vůči teplu (Miovský a kol., 2008).

Konopné pazdeří tvoří přibližně 2/3 konopného stonku, je to dřevnatý materiál, který vyniká svou lehkostí a savostí (dokáže vstřebat až pětinasobek vlastní hmotnosti). Obsahuje 32–38 % celulózy a řadu minerálních látek. Pazdeří je kvalitní energeticky využitelnou biomasou. Pazdeří může být použito jako podestýlka pro hospodářská zvířata, stavební materiál, sadbový substrát nebo jako obnovitelný zdroj energie v různých podobách (Miovský a kol., 2008).

### 2.3.2 Obsah kanabinoidů

Látky kanabinoidní povahy se dělí na 3 základní typy, prvním typem jsou fyto-kanabinoidy pocházející z rostlin konopí, druhým typem endokanabinoidy, které se tvoří v tělech zvířat a lidí, 3 typ zahrnují syntetické kanabinoidy uměle vyráběné v laboratořích (Ali et al., 2012). V konopí se kanabinoidy nachází ve žláznatých listenech obalující plody, v samičích květenstvích a také v konopných plevách (Kubánek, 2008). de Meijer (2003) uvádí, že se kanabinoidní látky nachází v rostlinách konopí hlavně ve formě kyselin, teprve při dozrávání a sušení kyseliny zcela nebo částečně dekarboxylují na neutrální kanabinoidy. Z pěti hlavních dále uvedených kanabinoidů mají všechny velmi silné antibakteriální účinky proti kmenu *Staphylococcus aureus* a dalším grampozitivním bakteriím (Miovský a kol., 2008). Syntéza a vylučování kanabinoidů je ovlivněna především genotypem rostliny, dále teplotou, vlhkostí a dalšími faktory (de Meijer et al., 2003).

Delta-9-trans-tetrahydrokanabinol (THC), častěji nazýván jako tetrahydrokanabinol. THC je hlavní psychoaktivní složkou konopí. V určitém množství se vyskytuje prakticky ve všech odrůdách a kultivarech konopí od stopového množství až po 95 % ze všech obsažených kanabinoidů. Vykazuje analgetické účinky, zvyšuje chuť k jídlu a snižuje pocit nevolnosti (Dupal, 1994).

Kanabidiol (CBD) se vyskytuje téměř ve všech odrůdách konopí, v rozmezí od stopového až do 95 % množství všech kanabinoidů. CBD nemá psychoaktivní účinky, vykazuje však účinky sedativní a antibakteriální (Cherney a Small, 2016).

Kanabinol (CBN) je slabě psychoaktivní, rostlina ho produkuje v malém množství. Působí jako agonista na stejné receptory jako THC, avšak pouze s 10 % účinností (Dupal, 1994).

Kanabichromen (CBC) má silné antibakteriální účinky, napomáhá zmenšování otoků, zmiňuje záněty zažívacího ústrojí. CBC nemá psychoaktivní účinky, proto by mohl mít potenciál využití ve farmaceutickém průmyslu při výrobě léků bez vedlejších nežádoucích účinků, není však příliš prozkoumán (Grotenhermen, 2009).

Kanabigerol (CBG) se vyskytuje v menších koncentracích. Je to nepsychoaktivní kanabinoid s léčebnými účinky. Technické konopí obsahuje obvykle více CBG než ostatní odrůdy (Grotenhermen, 2009).

## 2.4 Složení konopného semene

Semeno konopí obsahuje 25–35 % vysychavého oleje, 20–25 % lehce stravitelných bílkovin, 20–30 % sacharidů převážně ve formě vlákniny, vitamíny. Je také zdrojem důležitých minerálních látek (Galasso et al., 2016). Vysokou výživovou hodnotu semen konopí prokázaly pozitivní zdravotní výhody včetně zmírňování zácpy, snižování hladiny cholesterolu, zlepšení kardiovaskulárního oběhu, snížení krevního tlaku a potlačení kožních onemocnění. Výtažky z konopného semene mají silný antioxidační efekt, zmírňují projevy stárnutí a mají potenciál prokázat zlepšení učení u osob s poruchou soustředění (Yan et al., 2015, Oomah et al., 2002).

**Tab. č. 1: Nutriční hodnota živin v konopném semeni (Callaway, Pate, 2009)**

	<b>Celé semeno</b>	<b>Loupané semeno</b>
<b>Olej (%)</b>	36	44
<b>Bílkoviny (%)</b>	25	33
<b>Sacharidy (%)</b>	28	12
<b>Vlhkost (%)</b>	6,5	5
<b>Popeloviny (%)</b>	5,6	6
<b>Energie (kJ/100 g)</b>	2200	2093
<b>Celková dietní vláknina (%)</b>	28	7
<b>Stravitelná vláknina (%)</b>	6	6
<b>Nestravitelná vláknina (%)</b>	22	1

Odrůda: Finola

### 2.4.1 Bílkoviny

Bílkoviny konopného semene obsahují všech osm esenciálních (pro organismus nezbytných) aminokyselin. Komplex proteinů obsažených v konopných semenech tak dodává lidskému tělu veškeré esenciální aminokyseliny (Miovský a kol., 2008). Konopným bílkovinám se bude podrobně věnovat kapitola 2.6 v této práci.

## 2.4.2 Tuky

Konopný olej je jedním z nejkvalitnějších rostlinných olejů, obsahuje vysoké množství nenasycených mastných kyselin, které jsou nezbytné pro lidský organismus (Tab. 2–3). Tyto esenciální mastné kyseliny si tělo nemůže samo vyrobit a musí být přijaty stravou. Jejich zásadní význam v lidské stravě je znám již od roku 1930 (Callaway, 2002, Callaway, 2004). Nespornou výhodou je vyvážený poměr (3:1) nenasycených mastných kyselin (linolová: linolenová) (Oomah et al., 2002, Cherney, Small, 2016).

**Tab. č. 2: Složení mastných kyselin v konopném semeni (Benhaim, 2001)**

<b>Monokarboxylové nasycené mastné kyseliny (v % z tuku)</b>	
Kyselina máselná C4 <0,1 %	Kyselina myristová C14 <0,1
Kyselina kapronová C6 <0,1 %	Kyselina palmitová C16 <0,1
Kyselina kaprylová C8 <0,1 %	Kyselina stearová C18 <0,1
Kyselina kaprinová C10 <0,1 %	Kyselina arachidová C20 <0,1
Kyselina laurová C12 <0,1 %	
<b>Polyenové nenasycené mastné kyseliny</b>	
Kyselina linolová C18 - 56 %	Kyselina gama-linolenová C18 - 1,09 %
Kyselina alfa-linolenová C18 – 19,4 %	
<b>Trans – formy mastných kyselin</b>	
Kyselina palmitoolejová C18 – 0,1 %	Kyselina olejová C18 – 0,1 %

**Tab. č. 3: Porovnání obsahu mastných kyselin v rostlinných olejích (Callaway, 2004, Miovský a kol., 2008)**

Olej	Obsah EMK	LK (%)	LNK (%)	GLA (%)	Olejová kys. (%)	Stearová kys. (%)	LK:LNK
<b>Konopný</b>	80	50–70	15-25	1-6	10-16	2-3	3:1
<b>Lněný</b>	72	14	58	0	19	4	1:4
<b>Slunečnicový</b>	65	65	<1	0	4	5	71:1

<b>Sójový</b>	63	55	8	0	23	4	8:1
<b>Olivový</b>	8	8	<1	0	76	16	9:1

LK – kyselina linolová, LNK – kyselina alfa-linolenová, GLA – kyselina gama-linolenová

Konopný tuk obsahuje unikátní komplex mastných kyselin. Konopné semeno je jedním z nejlepších rostlinných zdrojů esenciálních mastných kyselin s dokonalým poměrem omega-6 mastné kyseliny linolové (56 %) a omega-3 mastné kyseliny alfa-linolenové (19 %). Zbývající složky oleje tvoří kyselina olejová 8-16 %, palmitová 5-7 %, stearová 1-2 %, gamma linolenová 1-6 %, arachinová a další. Dalšími složkami lipidů konopného oleje jsou fytosteroly a antioxidant  $\gamma$  tokoferol (Miovský a kol., 2008, Callaway, 2002).

### 2.4.3 Sacharidy

Semeno konopí obsahuje sacharidy především ve formě vlákniny. Obsah sacharidů je asi 52,67 % z toho jednoduché cukry tvoří pouze kolem 2,47 % (Callaway, 2004). Vláknina významně zvyšuje výživovou hodnotu semen, podle House et al., (2010) obsahují celá semena konopí 320 g/kg neutrální detergentní vlákniny (celulóza, hemicelulóza a lignin), která ovlivňuje stravitelnost bílkovin.

### 2.4.4 Vitamíny a minerální látky

Kromě kvalitního rostlinného oleje a lehce stravitelných bílkovin obsahují semena konopí také značné množství vitamínů a minerálních látek. Konopné semeno obsahuje vitamíny A, B1, B2, B6, C a E (Tab. 4) (Callaway, 2004). Vitamín E zastupuje v semeni konopí alfa-tokoferol (5mg/100 g) a gama-tokoferol (85mg/100 g). U odrůdy Finola je obsah vitamínu E podstatně vyšší dle Kriese et al., (2004), než u ostatních odrůd konopí.

Z minerálních látek obsahuje konopí nejvíce fosfor, draslík, hořčík, vápník, železo, sodík, mangan a měď (Tab. 4) (Callaway, 2004).

**Tab. č. 4: Obsah vitamínů a minerálních látek v konopném semeni (Callaway, 2004)**

Vitaminy	mg/100 g	Minerální látky	mg/100g
<b>E</b>	90	<b>Fosfor</b>	1160
<b>B1</b>	0,4	<b>Draslík</b>	859
<b>B2</b>	0,1	<b>Hořčík</b>	483
		<b>Vápník</b>	145
		<b>Železo</b>	14
		<b>Sodík</b>	12
		<b>Mangan</b>	7
		<b>zinek</b>	7
		<b>měď</b>	2

#### 2.4.5 Antinutriční látky

Využití konopné mouky ve výživě může být omezeno přítomností antinutričních sloučenin, které snižují stravitelnost a využitelnost živin. Přítomnost taninů, inhibitorů trypsinu, kyseliny fytové a saponinů může snížit dostupnost bílkovin vysrážením nebo inhibicí trávicích enzymů. Tyto látky mohou snížit také absorpci minerálních látek a vitamínů (Russo, 2013).

Russo (2013) popsal u italských a francouzských odrůd obsah jednotlivých antinutričních látek. Obsah kyseliny fytové v konopné mouce byl 6-7 % což je v porovnání se sójou (2 %) velmi vysoká hodnota. Obsah kondenzovaných taninů se pohybovalo v množství od 1,36-2,41 g.kg<sup>-1</sup> odtučněné mouky a výsledky mezi odrůdami se významně nelišily, tato hodnota není tak vysoká, aby snížila chutnost mouky. Rozdíly v aktivitě inhibitorů trypsinu byly u různých odrůd konopí poměrně rozdílné. Nejnižší hodnotu vykazovala italská odrůda Fibranova (10,8 mg.kg<sup>-1</sup>), nejvyšší hodnotu měla francouzská odrůda Ferimon (28,4 mg.kg<sup>-1</sup>). Francouzské odrůdy vykazovaly více než dvojnásobek obsahu kyanogenních glykosidů oproti italským odrůdám (0,23 g.kg<sup>-1</sup> a 0,09 g.kg<sup>-1</sup>). Průměrný obsah saponinů se pohyboval kolem 69,0 mg.kg<sup>-1</sup> v sušině. Obsah saponinů v konopné mouce byl nižší než u sóji a jiných rostlin.

## 2.5 Bílkoviny

Bílkoviny (proteiny) jsou polymery aminokyselin, které vznikly procesem proteosyntézy. Obsahují v molekule 20 aminokyselin vzájemně vázaných peptidovou vazbou do nerozvětvených lineárních řetězců, jsou též známy jako polypeptidy. Každá bílkovina má různé chemické vlastnosti a jedinečnou sekvenci aminokyselin (Alberts et. al., 2002). Bílkoviny jsou podstatou všech známých organismů. Po vodě jsou nejvíce zastoupenou složkou organismů. Proteiny jsou nejen hlavní složkou buněk z hlediska hmotnosti, ale ve všech buňkách také hrají mnoho životně důležitých úloh. Jsou například nezbytné pro tvorbu a správnou funkci svalové hmoty, červených krvinek a dalších tkání a také pro produkci hormonů (Snustad a Simmons, 2009).

Proces proteosyntézy se skládá ze dvou kroků. Prvním krokem je přepis, tzv. transkripce genetického kódu z DNA do mRNA a uskutečňuje se v buněčném jádru. Druhým krokem je překlad, tzv. translace kódu z mRNA do sekvencí aminokyselin v polypeptidových genových produktech. Tvorba bílkovin probíhá v ribozomech (Patthy, 2008). Ribozomy se skládají ze dvou podjednotek, jedné velké a jedné malé. Každá podjednotka obsahuje velké složené molekuly RNA, na kterých se sestavují ribozomové proteiny (Snustad a Simmons, 2009).

Energetická výtěžnost bílkovin je  $17 \text{ kJ.g}^{-1}$  ( $4 \text{ kcal.g}^{-1}$ ), tedy zhruba stejná jako u sacharidů. Podle biologické funkce, kterou vykonávají, se často rozlišují na proteiny:

- Strukturní (stavební složky buněk, tkání živočichů a rostlinných pletiv)
- Katalytické (enzymy, hormony)
- Transportní (umožňují přenos různých sloučenin)
- Pohybové (např. svalové proteiny aktin, myosin, aktomyozin)
- Obranné (protilátky, imunoglobuliny)
- Zásobní (ferritin)
- Senzorické (např. rhodospin)
- Regulační (histony, hormony)
- Výživové (jsou zdrojem esenciálních aminokyselin pro živočichy, hlavním zdrojem dusíku v potravě a hmoty potřebné k výstavbě a obnově živočišných tkání) (Velíšek, Hajšlová, 2009).

Bílkoviny se mohou dělit také podle rozpustnosti na rozpustné a nerozpustné proteiny. Nerozpustnými bílkovinami jsou fibrilární bílkoviny, jako je kolagen, elastin



a keratin (Patthy, 2008). Rostlinné bílkoviny poprvé klasifikoval Osborne (1924) na základě jejich rozpustnosti a extrahovatelnosti v různých rozpouštědlech na čtyři hlavní frakce. Většina rostlinných proteinů patří do těchto čtyřech bílkovinných frakcí, ale obsah bílkovin každé třídy a velikosti jednotlivých molekul se může značně lišit v závislosti na rostlinném zdroji bílkovin. Čtyři hlavní třídy proteinů jsou od té doby známy jako „Osbornovy frakce” jsou to:

- Albuminy (neutrální bílkoviny dobře rozpustné ve vodě)
- Globuliny (slabě kyselé bílkoviny nerozpustné ve vodě, ale rozpustné ve zředěných roztocích solí)
- Prolaminy (bílkoviny nerozpustné ve vodě, ale rozpustné v koncentrovaných vodných roztocích alkoholu např. v 70 % ethanolu)
- Gluteliny (jsou stejně jako prolaminy nerozpustné ve vodě, ale rozpustné ve zředěných roztocích solí, kyselin a zásad, od prolaminů se liší tím, že jsou nerozpustné v ethanolu) (Day, 2013).

Aminokyseliny jsou stavební jednotkou všech bílkovin. V přírodních materiálech bylo prokázáno více než 700 různých aminokyselin. Některé z nich jsou obecně rozšířené, jiné se vyskytují jen v určitých druzích rostlin, živočichů či v jiných organismech. Aminokyseliny vázané v bílkovinách (20 sloučenin) (Camp, Dierckx, 2004) se nazývají proteinogenní nebo kódované, také základní, standardní či primární aminokyseliny (Murray, 2002). Podle významu ve výživě člověka se aminokyseliny dělí na 2 skupiny:

- Esenciální aminokyseliny – (nezbytné), tyto aminokyseliny nemůže daný organismus sám syntetizovat a musí je získávat výhradně z potravy (Valin, Leucin, Isoleucin, Fenylalanin, Tryptofan, Threonin, Methionin, Lysin a Histidin).
- Neesenciální aminokyseliny – (nahraditelné), daný organismus je schopen své vlastní syntézy (Glycin, Alanin, Arginin, Asparágová kyselina, Asparagin, Glutamová kyselina, Glutamin, Tyrosin, Cystein, Serin, Prolin) (Camp, Dierckx, 2004).

Bílkoviny můžeme rozdělit podle jejich původu do dvou skupin na rostlinné a živočišné bílkoviny. Potraviny se značně liší obsahem proteinů, složením jejich aminokyselin a biologickou hodnotou. Obsah bílkovin se pohybuje prakticky v mezích 0-100 % v sušině. Bohatým zdrojem proteinů jsou hlavně potraviny živočišného původu (Velíšek a Hajšlová, 2009). Rostlinné bílkoviny byly vždy součástí lidské

stravy. Ačkoliv jsou rostlinné bílkoviny relativně levné, přímá spotřeba rostlinných bílkovin je stále poměrně omezená. Většina rostlinných bílkovin se používá jako krmivo pro hospodářská zvířata. Z rostlinných produktů jsou dobrým zdrojem proteinů hlavně luštěniny (hrách, fazole, čočka) a olejniny (sója, arašídy, mák, ořechy). Středně vysoký obsah proteinů mají obiloviny a cereální výrobky, nízký obsah proteinů má naopak zelenina, ovoce a okopaniny (Day, 2013).

Strava člověka je velmi pestrá a obsahuje i množství bílkovin z nejrůznějších zdrojů. Určení nutriční hodnoty proteinů tak vychází ze skutečnosti, že organismus není schopen syntetizovat esenciální aminokyseliny, zatímco skladbu ostatních aminokyselin může regulovat téměř podle potřeby. Proto se v proteinech stanovuje složení esenciálních aminokyselin a výsledky se vztahují k obsahu esenciálních aminokyselin přítomných v referenčním proteinu (proteiny vaječného bílku, mateřského mléka), který je v organismu velmi dobře využitelný (Velíšek, Hajšlová, 2009).

K hodnocení se dnes běžně používá dvou různých kritérií, aminokyselinové skóre – AAS (z angl. *Amino Acid Score*) a index esenciálních aminokyselin EAAI (z angl. *Essential Amino Acid Index*). Stravitelnost bílkovin se uvádí v hodnotách PDCAAS (*Protein Digestibility – Corrected Amino Acid Score*), tato hodnota stanovuje využitelnost bílkovin s ohledem na obsah jednotlivých aminokyselin, jejich poměr a biologickou využitelnost. PDCAAS nabývá nejvyšší hodnoty 1, kde nejvyšších hodnot nabývá referenční protein (protein vaječného bílku, mateřského mléka). V posledních letech doporučila organizace spojených národů pro výživu a zemědělství (FAO) přijetí nového bodovacího systému DIAAS (*Digestible Indispensable Amino Acid Score*) ke kvantifikaci dietní kvality bílkovin. DIAAS je založen na relativní stravitelnosti obsahu pouze nepostradatelných aminokyselin (Wolf et. al., 2016). Stanovení nutriční hodnoty je důležité při extrémním způsobu stravování (např. veganství), kdy mohou být přítomny některé esenciální aminokyseliny v nedostatečném množství. Významné je stanovení nutriční hodnoty proteinů v krmných směsích hospodářských zvířat (Velíšek, Hajšlová, 2009).

### **2.5.1 Funkční vlastnosti bílkovin**

Bílkoviny mají řadu důležitých funkcí, mimo jiné také důležité funkční vlastnosti, které hrají úlohu při přípravě a zpracování potravin a přispívají k jejich

senzorickým vlastnostem. Nejdůležitějšími vlastnostmi jsou rozpustnost, emulgační schopnost, pěnicí a šlehačí schopnosti a schopnost tvořit gel (Day, 2013).

### 2.5.2 Rostlinné bílkoviny

Hlavní zdroj rostlinných proteinů v potravě představují u většiny plodin semena rostlin. Jako omezené zdroje mohou sloužit rovněž plody, listy, hlízy, bulvy aj. části rostlin zahrnované pod termín ovoce, zelenina, okopaniny apod. Aminokyselinové složení bílkovin semen je zcela odlišné od bílkovin živočišného původu. Obsahují velké množství asparagové a glutamové kyseliny a jejich amidů. Rostlinné zdroje bílkovin bývají méně hodnotné, protože většina z nich neobsahuje všechny esenciální aminokyseliny např. u některých obilovin je to aminokyselina lysin, u luštěnin methionin. Na druhé straně může vhodná kombinace rostlinných zdrojů vést ke skladbě proteinů, která má vysokou nutriční hodnotu a může sloužit jako plnohodnotná bílkovina, např. pro výživu vegetariánů. Kromě proteinů přijímá organismus z potravin rostlinného původu řadu dalších výživově cenných složek, využitelné polysacharidy, vlákninu, množství vitaminů, minerálních látek aj. (Velíšek, Hajšlová, 2009).

### 2.5.3 Bílkoviny zrn vybraných obilnin

Z rostlinných materiálů jsou nejvýznamnějším zdrojem proteinů pro výživu člověka obiloviny, u nás v první řadě pšenice. Obsah proteinů vnějších (subaleuronových) částí obilného zrna je výrazně vyšší než u vnitřních částí. Proto obsah proteinů v mouce závisí na stupni jejího vymletí a samozřejmě také na druhu, odrůdě rostliny a dalších faktorech. Tmavé celozrnné mouky mají vyšší obsah proteinů než bílé, rozdíl bývá až 4 %.

Prolaminy a gluteliny jsou hlavní zásobní bílkoviny v obilovinách (Day, 2013, Shewry a Halford, 2002). Typické složení proteinů v běžných bílkovinách uvádí tab. 5. (Velíšek, Hajšlová, 2009).

**Tab. č. 5: Proteiny obilovin a jejich složení (Velíšek, Hajšlová, 2009).**

Obilovina	Albuminy %	Globuliny %	Prolaminy %	Gluteliny %
<b>Pšenice</b>	leukosiny 14,7	edestiny 7,0	gliadiny 32,6	gluteniny 45,7
<b>žito</b>	44,4	10,2	sekaliny 20,9	sekaliny 24,5

<b>Ječmen</b>	12,1	8,4	hordeiny 25,0	hordeniny 54,5
<b>Oves</b>	20,2	avenaliny 11,9	gliadiny 14,0	aveniny 53,9
<b>rýže</b>	10,8	9,7	oryziny 2,2	oryzeniny 77,3
<b>kukuřice</b>	4,0	2,8	zeiny 47,9	zeaniny 45,3

Mezi nejvýznamnější bílkoviny pšenice patří ve vodě nerozpustné gliadiny (prolaminy) a gluteliny, které jsou reprezentované řadou příbuzných bílkovin lišících se složením aminokyselin (např. gliadinových bílkovin bývá u každé odrůdy pšenice několik desítek) (Velíšek, 2002) (viz Tab. 5). Globuliny obilovin se nacházejí především v aleuronových vrstvách a embryu a většinou jsou odstraněny při mletí nebo loupání semen (Day, 2013). Pšeničná mouka poskytuje s vodou těsto, jehož základem je kromě škrobu viskoelastická lepivá hmota, složená z vody a hydratovaných gliadinových a glutelinových proteinů zvaná lepek. Pšeničná mouka obvykle obsahuje 7–13 %, ale také až 15 % bílkovin. Limitující aminokyselinou je lysin (Velíšek, Hajšlová, 2009).

Žitné albuminy a globuliny, představující asi 55 % proteinů žita, mají podobné vlastnosti jako albuminy a globuliny pšenice. Asi z 45 % jsou přítomny prolaminy a gluteliny. Žitný lepek se od pšeničného liší obsahem některých aminokyselin a především vlastnostmi. Pšeničný lepek je tažný, žitný se trhá. Limitujícími aminokyselinami je tryptofan a isoleucin (Velíšek, Hajšlová, 2009).

Kukuřičné proteiny tvoří asi z 50 % zein, který patří mezi gliadiny, 20–45 % proteinů tvoří gluteliny. Výrazně nedostatkovými aminokyselinami v kukuřičném lepku jsou lysin a tryptofan. Proteiny rýže tvoří asi z 80 % gluteliny (oryzeniny), gliadiny a další proteiny jsou zde minoritní složkou (Day, 2013).

**Tab. č. 6: Obsah aminokyselin v obilovinách (v g vztaženo na 16 g dusíku) (Velišek, Hajšlová, 2009).**

Aminokyselina	pšenice	žito	ječmen	oves	rýže	kukuřice
<b>Alanin</b>	3,6	4,3	4,0	4,5	6,0	7,5
<b>Arginin</b>	4,6	4,6	4,7	6,3	8,3	4,2
<b>Asparagin</b>	4,9	7,2	5,7	7,7	10,3	6,3
<b>Cystein</b>	2,5	1,5	2,3	2,7	1,1	1,6
<b>Glutamin</b>	29,9	24,2	23,6	20,9	20,6	18,9
<b>Glycin</b>	3,9	4,3	3,9	4,7	5,0	3,7
<b>Histidin</b>	2,3	2,2	2,1	2,1	2,5	2,7
<b>Isoleucin</b>	3,3	3,5	3,6	3,8	3,8	3,7
<b>Leucin</b>	6,7	6,2	6,7	7,3	8,2	12,5
<b>Lysin</b>	2,9	3,4	3,5	3,7	3,8	2,7
<b>Methionin</b>	1,5	1,5	1,7	1,7	2,3	1,9
<b>Fenylalanin</b>	4,5	4,4	5,1	5,0	5,2	4,9
<b>Prolin</b>	9,9	9,4	10,9	5,2	4,7	8,9
<b>Serin</b>	4,6	4,3	4,0	4,7	5,4	5,0
<b>Threonin</b>	2,9	3,3	3,3	3,3	3,9	3,6
<b>Tryptofan</b>	0,9	1,0	0,9	1,1	0,8	0,7
<b>Tyrosin</b>	3,0	1,9	3,1	3,3	3,5	3,8
<b>Valin</b>	4,4	4,8	5,0	5,1	5,5	4,8
<b>Celkem EAA</b>	32,8	31,6	35,8	37,1	38,5	40,2
<b>Celkem AA</b>	96,5	92,0	94,6	93,3	101,2	97,5
<b>EAAI (%)</b>	68	75	78	79	76	55
<b>AAS (%)</b>	44	46	54	57	57	41
<b>Limitující AA</b>	Lys	Trp, Ile	Lys, Leu	Ile, Lys	Ile, Lys	Lys

EAA = esenciální aminokyselina, AA = aminokyseliny, EAAI = index esenciálních aminokyselin, AAS = aminokyselinové skóre pro limitující aminokyseliny

#### 2.5.4 Bílkoviny zrn vybraných luskovin

Důležitým zdrojem proteinů ve výživě jsou luštěniny. V našich podmínkách jsou nejvýznamnějšími luštěninami hrách, fazole, čočka a sója. Na trhu jsou však k dostání i některé další druhy (např. cizrna, viona, mungo a další) (Velíšek, 2002).

Luštěniny mají vysoký obsah proteinů (24-45 %). Globuliny jsou hlavní zásobní frakcí bílkovin. Koncentrace globulinů v semenech se může v závislosti na druhu a odrůdě luskovin pohybovat v rozmezích od 40-80 % z celkových proteinů. Bílkoviny představují nejvýznamnější složku semen luskovin. Jejich obsah se pohybuje v rozmezí 200-400 g.kg<sup>-1</sup> hmotnosti semen. Nedostatkové bývají většinou sирné aminokyseliny. Proteiny hrachu, fazolí a dalších luštěnin reprezentují většinou tři hlavní frakce. Hrách obsahuje asi 50 % přítomných proteinů ve formě albuminu (legumin) a globulinu (vicilin) (Day, 2013).

#### 2.5.5 Bílkoviny olejnin

Významným zdrojem bílkovin jsou rovněž olejnin, které obsahují 20-35 % proteinů. Většinu proteinového podílu tvoří albuminy a globuliny (až 50 %) (Day, 2013). V našich podmínkách se uplatňuje především řepka ozimá, méně slunečnice roční a některé další plodiny. Ve světě jsou významnými zejména sója a arašidy (Velíšek, Hajšlová, 2009).

**Tab. č. 7: Obsah aminokyselin v luštěninách a olejninách (v g vztaženo na 16 g dusíku) (Velíšek, Hajšlová, 2009).**

Aminokyselina	hrách	čočka	fazol	sója	slunečnice
Alanin	4,1	4,3	4,2	4,3	4,2
Arginin	9,5	8,7	5,7	7,2	8,0
Asparagin	11,0	11,6	12,0	11,7	9,3
Cystein	1,1	0,9	0,8	1,3	1,5
Glutamin	16,1	16,6	14,8	18,7	21,8
Glycin	4,0	4,2	3,8	4,2	5,4
Histidin	2,3	2,7	2,8	2,5	2,3
Isoleucin	4,3	4,3	4,2	4,5	4,3

<b>Leucin</b>	6,8	7,6	7,6	7,8	6,4
<b>Lysin</b>	7,5	7,2	7,2	6,4	3,6
<b>Methionin</b>	0,9	0,8	1,1	1,3	1,9
<b>Fenylalanin</b>	4,6	5,2	5,2	4,9	4,4
<b>Prolin</b>	3,9	4,3	3,6	5,5	4,5
<b>Serin</b>	4,3	5,3	5,6	5,1	4,3
<b>Threonin</b>	4,1	4,0	4,0	3,9	3,7
<b>Tryptofan</b>	1,4	1,5	1,4	1,3	1,4
<b>Tyrosin</b>	2,7	3,3	2,5	3,1	1,9
<b>Valin</b>	4,7	5,0	4,6	4,8	5,2
<b>Celkem EAA</b>	38,2	39,8	38,6	39,3	34,1
<b>Celkem AA</b>	93,4	97,4	90,9	98,5	93,9
<b>EAAI (%)</b>	50	41	47	62	93
<b>AAS (%)</b>	37	31	34	47	56
<b>Limitující AA</b>	Trp, sirné	Val, sirné	Trp, sirné	sirné	Trp, Lys

EAA = esenciální aminokyselina, AA = aminokyseliny, EAAI = index esenciálních aminokyselin, AAS = aminokyselinové skóre pro limitující aminokyseliny

## 2.6 Bílkoviny semen konopí setého

Konopí seté se stává významnou plodinou pro jeho nutričně bohatá semena, která obsahují značné množství vysoce kvalitních bílkovin (Callaway, 2004, Russo, Reggiani, 2015). Semena konopí setého obsahují kompletní protein, což znamená že jsou v nich obsaženy všechny esenciální aminokyseliny v nutričně významných množstvích, má také velmi dobré funkční a bioaktivní vlastnosti (Apostol et al., 2015, Tang et al., 2006).

Bílkoviny semen konopí představují jeden z nejkompletnějších a nejvhodnějších komplexů rostlinných bílkovin pro výživu člověka (House et al., 2010, Tang et al., 2006). Obsah bílkovin je nejvyšší v oloupaném semenu (House et al., 2010), odstraněním slupky se tak zlepší stravitelnost a vlastní hodnota bílkovin. Dle Callaway (2004) je z procentického obsahu živin zastoupeno 33,5 % bílkovin

v oloupaném a 24,8 % v celém semeni (Callaway, 2004). Obsah hrubé bílkoviny v semenu je dle House et al., (2010) 200-250 g.kg<sup>-1</sup>. Vonapartis et al., (2015) uvádí obsah hrubé bílkoviny u deseti odrůd konopí, přičemž odrůda Finola obsahovala nejvíce hrubé bílkoviny – 280 g/kg, naopak odrůda Anka obsahovala nejmenší množství – 238 g/kg.

Míra stravitelnosti celého konopného semene je 84,1-86,2 %, pro mouku z konopných semen 90,7-97,5 %, pro loupaná semena je to hodnota 83,5-92,1 %. Procento PDCAAS (aminokyselinové skóre vztažené na stravitelnost proteinů) bylo u celých semen 49-53 %, pro konopnou mouku 46-51 % a pro oloupaná semena 63-66 %. (House et al., 2010).

Hlavními zásobními bílkovinami jsou albuminy a globuliny. Albuminy, které jsou také obsaženy ve vaječném bílku a lidské krvi tvoří podle dostupných informací asi jednu třetinu bílkovin konopných semen a podporují správnou funkci ledvin a jater, dvě třetiny (60-80 %) bílkovin pak tvoří další důležitá globulární bílkovina edestin (Callaway, 2002, Malomo, Aluko, 2015, Gallaso et al., 2016).

Nedávná studie zaměřená na obsah bílkovin, aminokyselinový profil a obsah antinutričních látek v semenech konopí tří jednodomých a dvoudomých odrůd (Russo, Reggiani, 2015) ukazuje, že průměrný obsah bílkovin v šesti odrůdách konopí pěstovaných v letech (2011-2012) v Itálii byl 340 g.kg<sup>-1</sup> v sušině. Experiment dokazuje, že na obsah bílkovin mají vliv především klimatické podmínky, konopí vyžaduje během tvorby semen vyšší teploty a mírnější klima. Kromě toho, vysoké teploty při tvorbě semen zvyšují syntézu a ukládání bílkovin. Rozdíly mezi obsahem bílkovin u jednodomých a dvoudomých odrůd nebyl v pokusu pozorován (Russo, Reggiani, 2015).

### **2.6.1 Edestin**

Edestin je předmětem zkoumání již velmi dlouhou dobu. Osborne (1892) popsal několik krystalických globulinů z různých rostlinných semen mimo jiné i u semen konopí. Svedberg a Stamm (1929) poprvé publikovali molekulovou hmotnost edestinu (212 kDa), Raikos et. al., (2015) uvádí molekulovou hmotnost edestinu kolem 300 kDa, Angelo et al. (1968) prokázali, že se edestin nachází v aleuronových vrstvách semen a Patel et al. (1994) ukázal, že se molekula edestinu skládá ze šesti identických podjednotek, přičemž každá podjednotka může nabývat hodnot isoelektrických bodů v kyselé i bazické oblasti. Podjednotky jsou vzájemně spojeny jednou disulfidovou



vazbou stejně jako hexamer sóji (Tang et al., 2006). Kim a Lee (2011) izolovali edestin z korejské odrůdy konopí Cheungsam. Celkový obsah edestinu v semenech této odrůdy byl 142,9 mg z 1 g konopných semen. Izolovaný edestin vykazoval vyšší antioxidační schopnost.

Edestin je hlavní zásobní bílkovinou konopných semen, je lehce stravitelný a obsahuje všechny esenciální aminokyseliny ve významných množstvích, obsah jednotlivých aminokyselin se v různých studiích liší což bude dáno jednotlivými isoformami edestinu (Kim, Lee, 2011). Stejně jako u sójového proteinu glycinu je i edestin druh leguminu, který se podobá globulinům v krevní plazmě. Srovnání obsahu aminokyselin u edestinu a sójového glycinu ukázaly, že konopný edestin má vyšší hladinu methioninu a nižší úroveň lysinu, zatímco obsah ostatních aminokyselin je podobný (Docimo et al., 2014). Edestin je v lidském těle metabolizován k biosyntéze imunoglobulinů, hormonů, hemoglobinu a enzymům.

### 2.6.2 Aminokyselinový profil konopí setého

Složení aminokyselin může být ovlivněno genotypovou variabilitou, agrotechnickými podmínkami např. úrodností půdy, hnojením apod., ale také posklizňovou úpravou semen, která může ovlivnit biologickou hodnotu semen (Russo, Reggiani, 2015). Kromě dvou hlavních zásobních bílkovin, především edestinu jsou konopná semena bohatá na sírné aminokyseliny methionin a cystein. Vysokého obsahu dosahují také arginin a kyselina glutamová (Callaway, 2004).

**Tab. č. 8: Obsah esenciálních a neesenciálních aminokyselin v konopném semenu v g/100 g (Callaway, 2004)**

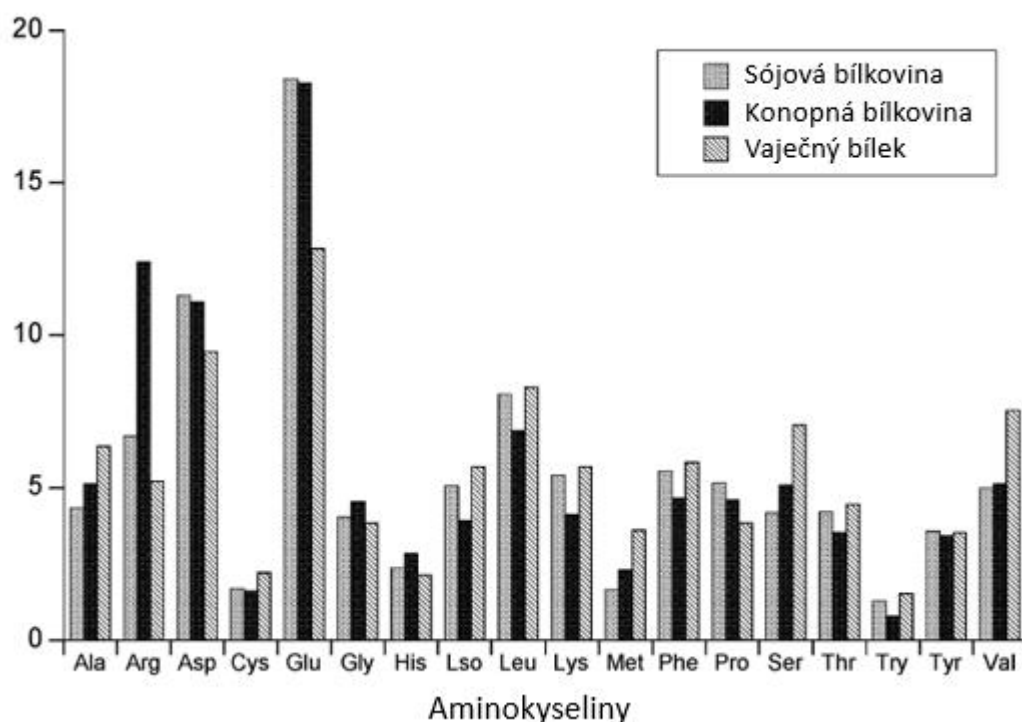
<b>Esenciální aminokyseliny</b>	<b>Obsah</b>	<b>Neesenciální aminokyseliny</b>	<b>Obsah</b>
<b>Histidin</b>	0,71	<b>Alanin</b>	1,28
<b>Isoleucin</b>	0,98	<b>Arginin</b>	3,10
<b>Leucin</b>	1,72	<b>Asparágová kys.</b>	2,78
<b>Lysin</b>	1,03	<b>Cystein</b>	0,41
<b>Methionin</b>	0,58	<b>Glutamová kys.</b>	4,57
<b>Fenylalanin</b>	1,17	<b>Glycin</b>	1,14

<b>Threonin</b>	0,88	<b>Prolin</b>	1,15
<b>Tryptofan</b>	0,20	<b>Serin</b>	1,27
<b>Valin</b>	1,28	<b>Tyrosin</b>	0,86

Studie prováděná House et al., (2010) zaměřená na hodnocení kvality bílkovin a stravitelnosti konopných produktů ukázala, že limitující aminokyselinou byl u všech třiceti testovaných vzorků konopných bílkovin lysin. V závislosti na druhu testovaných vzorků semen, konopné mouky, oloupaných semen je druhou, respektive třetí limitující aminokyselinou leucin nebo tryptofan.

Dle House et al., (2010) poskytuje aminokyselinové skóre pouze jedno měřítko kvality bílkovin. Pro lepší posouzení kvality bílkovin by se měla stanovit i jejich stravitelnost a využití v těle.

**Graf č. 1: Srovnání obsahu aminokyselin v bílkovině konopného semene (odrůda Finola), sóji a vaječné bílkovině v g/100 g bílkoviny (Callaway, 2004)**



Graf č. 1 ukazuje přímé srovnání konopné a sójové bílkoviny v porovnání s vaječným bílkem. Z tabulky vyplývá, že je konopný protein srovnatelný s hodnotami zjištěnými u jiných vysoce kvalitních bílkovinných zdrojů (Callaway, 2004).

### **2.6.3 Extrakce bílkovin**

Zvýšené využití konopných semen v průmyslových odvětvích vedlo k nárůstu produkce konopných výlisků bohatých na bílkoviny, jako vedlejšího produktu zejména při lisování oleje ze semen konopí. Bylo prokázáno, že konopné výlisky mohou být využity pro výrobu různých proteinových a peptidových koncentrátů či izolátů. Nicméně současné proteinové produkty z konopí mají méně než 70 % bílkovin a obsahují vysoké množství vlákniny a kyseliny fytové, které snižují využitelnost bílkovin v organismu (Malomo, Aluko, 2015).

Extrakce proteinu z mouky může být ovlivněna mnoha faktory, jako je hrubost namleté mouky, předchozí tepelná zátěž, typ rozpouštědla, doba a teplota extrakce, iontová síla, přičemž klíčovým kritériem je pH extrakčního roztoku (Malomo et al., 2014). Stávající rostlinné proteinové izoláty se obecně připravují alkalickou extrakcí, po které následuje izoelektrická precipitace. Při tomto postupu se nejprve konopná mouka rozpustí v alkalickém roztoku a následně dojde k vysrážení proteinu v kyselém prostředí (izoelektrický bod proteinu) (Liu et al., 2013). Izoelektrický bod pro bílkoviny konopí je v rozmezí pH 4,0-5,0 (Malomo, 2015). Tento postup má však negativní účinky na funkční vlastnosti proteinů, především na rozpustnost a pěnové vlastnosti proteinového izolátu (Malomo, Aluko, 2015). Příklad patentované extrakce konopných bílkovin popisuje (Davis, 2013).

Jednou z cest, jak zlepšit funkční vlastnosti proteinů popisuje ve své práci Malomo a Aluko (2015) využitím membránové ultrafiltrace, která může zmírnit negativní následky stávajících extrakčních postupů. Pomocí membránové ultrafiltrace jsou odstraněny nebílkovinné materiály a výsledný izolát prokazuje lepší funkční vlastnosti s minimální denaturací bílkovin.

### **2.6.4 Potenciál využití konopné bílkoviny a semen konopí setého**

Vzhledem k nutriční kvalitě konopných semen (viz. výše) a jejich zajímavým sensorickým vlastnostem, například příjemné chuti a vůni, mohou být semena konopí a konopná mouka snadno začleněny jako potravinový doplněk do jídelníčku. Díky jejich nutričním výhodám se již na trhu vytvořila značná poptávka po této surovině (Apostol et al., 2015, Pojić et al., 2015).

Apostol et al., (2015) prováděli studii se směsí mouky z odtučněných konopných semen a pšeničné mouky. Z výsledků je patrné, že částečně odtučněná

semena konopí můžeme považovat jako zdroj funkčních potravin. Přídavek konopné mouky změnil celkový profil nenasycených mastných kyselin a vzrostl obsah minerálních látek a vlákniny s úměrně se zvyšujícím obsahem mouky z konopných semen. Po provedení pekařského testu bylo pozorováno, že nejlepších smyslových a fyzikálně-chemických výsledků dosáhly mouky s 5 % a 10 % přídavkem konopné mouky. Větší přídavek konopné mouky (15 a 20 %) způsobil pokles vlhkosti a celkového objemu chleba, u těchto chlebů vzrostla také kyselost. Z výsledků lze vyvodit že přidáním 5 a 10 % konopné mouky lze zlepšit nutriční jakost chleba při zachování technologických parametrů, přidáním většího množství konopné mouky by se musela zlepšit technologie pečení, která by zlepšila pórovitost a pružnost výsledného chleba.

Semena konopí setého zejména jejich aminokyseliny a peptidy by mohly být potencionálně využity při léčbě a prevenci chronických onemocnění např. hypertenze, která postihuje 15-20 % dospělých a téměř 50-60 % všech starších lidí (Girgih et al., 2011, 2014, Malomo et al., 2015). Konopné semeno jako vedlejší produkt získaný při komerčním využití konopných vláken našlo využití v různých odvětvích od kosmetiky, terapeutického využití, jako funkční potravina a součást potravinových doplňků (Girgih et al., 2011).

Konopné pokrutiny mohou být využity při výkrmu hospodářských zvířat např. kuřecích brojlerů v ekologickém zemědělství pro zlepšení obsahu aminokyselin v krmné dávce, zlepšení chutnosti a zdravotního stavu (Eriksson, Wall, 2012).

### 3. Cíle práce

Cíle diplomové práce byly dle zadání rozděleny do 4 okruhů:

1. Úprava získaného rostlinného materiálu
2. Příprava lyofilizované sušiny a extrakce bílkovin pro jednotlivé analýzy
3. Provedení laboratorních analýz
  - frakcionace konopných bílkovin dle rozpustnosti
  - stanovení obsahu dusíkatých látek (%) a obsahu bílkovin (%)
  - analýza konopných bílkovin vybraných odrůd konopí s využitím elektroforetické analýzy SDS-PAGE
4. Statistické vyhodnocení dat, hodnocení a porovnání výsledků

## **4. Materiál a metody**

### **4.1 Charakteristika konopného materiálu**

Výchozím materiálem pro laboratorní experimenty byly zbytky nažek (semen) po lisování konopného oleje za studena v podobě výlisků získané z firmy Hemp production s.r.o. Zkoumanými odrůdami konopí byly ukrajinská jednodomá odrůda Uso 31, udržovatel registrován v Nizozemí a francouzská jednodomá hybridní odrůda Fedora 17.

#### **4.1.1 Zpracování konopných výlisků**

Získané konopné výlisky byly nejprve ručně homogenizovány na menší frakci pomocí porcelánové třecí misky s tloučkem. Následně byly umlety na vysokorychlostním ultra odstředivém mlýnu ZM 100 (Schoeller instruments, Německo). Velikost síta byla 1 mm, síto bylo vloženo proti směru otáčení rotoru. Mletí probíhalo v malých dávkách, aby se předešlo tepelnému namáhání konopné mouky a možné denaturaci bílkovin. Konopná mouka byla převedena do uzavíratelných zip sáčků a skladována v lednici.

### **4.2 Frakcionace konopných bílkovin**

Frakcionace bílkovin byla provedena na principu Osbornovy metody dle modifikovaného postupu uvedeného v práci Martinez-Villalueva et al. (2008) postupným „odmýváním“ jednotlivých frakcí bílkovin extrakčními činidly, čímž vzniklo 5 frakcí: 1. frakce albuminů a ve vodě rozpustných nebílkovinných látek, 2. frakce globulinů rozpustných v 5 % roztoku  $K_2SO_4$ , 3. frakce prolaminů rozpustných v 70 % ethanolu, 4. frakce glutelinů rozpustných v 0,03 M NaOH, 5. frakce byla tvořena nerozpustným zbytkem.

Materiálem pro frakcionaci byl 1 g namleté konopné mouky, navážen do 15 ml centrifugačních zkumavek se známou hmotností vždy ve čtyřech opakováních pro každou frakci bílkovin. K naváženému množství konopné mouky bylo přidáno 10 ml extrakčního činidla. Extrakce provedená pomocí jednotlivých extrakčních činidel ( $dH_2O$ , 5 % roztok  $K_2SO_4$ , 70 % ethanol, 0,03 M NaOH) trvala 1 hodinu na ledu při 4°C. Během extrakce bylo nutné směs několikrát protřepat. Po uplynutí doby extrakce byla provedena centrifugace při 4 °C po dobu 10 min. při 4500 rpm pomocí centrifugy

Rotina 420R, (Hettich, Německo). Supernatant byl odebrán do označených centrifugačních dóz. Následovaly dva promývací kroky, k centrifugovanému peletu bylo přidáno 7 ml extrakčního činidla, pelet byl s činidlem důkladně promísen a byla provedena centrifugace (4 °C, 10 min, 4500 rpm). Získaný supernatant z prvního promývacího kroku byl přidán ke stávajícímu supernatantu. Mezi jednotlivými činidly (dH<sub>2</sub>O, 5 % K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 70 % ethanol, 0,03 M NaOH) byly zařazeny promývací kroky s využitím dH<sub>2</sub>O.

### **4.3 SDS-polyakrylamidová elektroforéza**

Denaturující proteinová elektroforéza (SDS-PAGE – *Sodium dodecyl sulfate protein acrylamide gel electrophoresis*) je metoda, která se používá k separaci proteinů podle molekulové hmotnosti (kDa), na základě jejich migrace v gelu od záporného ke kladnému pólu.

Supernatanty byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. Použita byla desková vertikální elektroforéza (SE 600, Hoefer, USA) s diskontinuálním uspořádáním matrice. Vzorky byly separovány na 12 % separačním gelu a na 3,75 % zaostřovacím gelu. K připraveným vzorkům supernatantu jednotlivých frakcí o objemu 40 µl v centrifugačních zkumavkách (Eppendorf 2,0 ml) bylo přidáno 10 µl nanášecího pufru pro jednotlivé frakce bílkovin. Po zahřátí vzorků (100 °C, 3 min) byly vzorky pipetovány do jednotlivých jamek v množství 10 µl pro frakce albuminů, globulinů a glutelinů (dH<sub>2</sub>O, 5 % K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,03 M NaOH), 20 µl pro frakci prolaminů (70 % ethanol). Detekce bílkovin na gelu byla provedena pomocí roztoku obsahujícího barvivo Coomassie Brilliant Blue R-250 a následným odbarvením gelu (cca 4 hodiny) odbarvovacím roztokem (65 % H<sub>2</sub>O, 25 % ethanolu, 10 % kyseliny octové ledové). Pro vyhodnocení gelů bylo použito fotodokumentační zařízení Gel Doc XR+ a software Image Lab (Bio-Rad, USA).

### **4.4 Stanovení obsahu dusíkatých látek**

#### **4.4.1 Příprava vzorku**

Centrifugované pelety získané po postupném paralelním odmýváním jednotlivých frakcí v 15 ml centrifugačních zkumavkách byly zamrazeny a lyofilizovány. Lyofilizace neboli vakuové vymrazování, je metoda sušení vlhkých materiálů, které nesnesou vyšší teploty. Princip metody je založen na odstranění vody

vakuovou sublimací ledu.

Centrifugační zkumavky byly zavíčkované filtračním papírem a utěsněny gumičkou. Následně byly vloženy do lyofilizátoru ALPHA 1-4 LSC, (Martin Christ, Německo). Lyofilizace probíhala při teplotě  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  a hodnotě vakua 0,520 mbar po dobu cca 72 hodin. Po ukončení lyofilizace byly pelety v centrifugačních zkumavkách zváženy, gravimetricky vyhodnoceny, rozmělněny a homogenizovány skleněnou tyčinkou pro následnou analýzu.

#### **4.4.2 Stanovení obsahu dusíkatých látek v sušině konopné mouky**

Kvantitativní stanovení dusíku proběhlo pomocí modifikované Dumasovy metody. Principem metody je spalování vzorku za přítomnosti kyslíku v komoře při vysoké teplotě (nad  $900\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Dusíkaté sloučeniny jsou v uvedených podmínkách redukovány na  $\text{N}_2$  a  $\text{NO}_x$ . Tok nosného plynu ( $\text{CO}_2$ ) přenáší plynné produkty spalování do redukční trubice kde se oxidy dusíku kvantitativně převedou při styku s wolframem na molekulární dusík. Z homogenizovaných peletů a výchozí konopné mouky bylo naváženo 25 mg vzorku, vždy ve dvou opakováních. Vzorky byly analyzovány modifikovanou Dumasovou metodou pomocí analyzátoru dusíku Rapid N Cube, (Elementar, Německo). Po provedení analýzy byl obsah celkového dusíku přepočten dle koeficientu  $\text{N} \cdot 6,25$  na obsah dusíkatých látek ve vzorku.

#### **4.5 Stanovení sušiny konopné mouky**

Sušina konopné mouky odrůd Uso 31 a Fedora 17 byla stanovena gravimetrickou metodou. Do váženek o známé hmotnosti bylo naváženo 5 g konopné mouky ve třech opakováních pro jednotlivé odrůdy. Vzorky byly vysušeny v sušárně Universal Oven UN75, (Mettler, Německo) při  $110\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu dvou hodin, zchlazeny v exsikátoru a zváženy.

#### **4.6. Vyhodnocení dat**

Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí software STATISTICA (StatSoft USA). Používané analýzy byly test ANOVA – Analysis of Variance (na hladině významnosti  $p < 0,05$ ), Fisher LSD test. Výsledky SDS-PAGE byly vyhodnoceny v programu Image-Lab, verze 5.2.1 (Bio-Rad/USA). Program Image-Lab pracuje na základě fotometrických metod měřením intenzity pixelů.



## 5. Výsledky

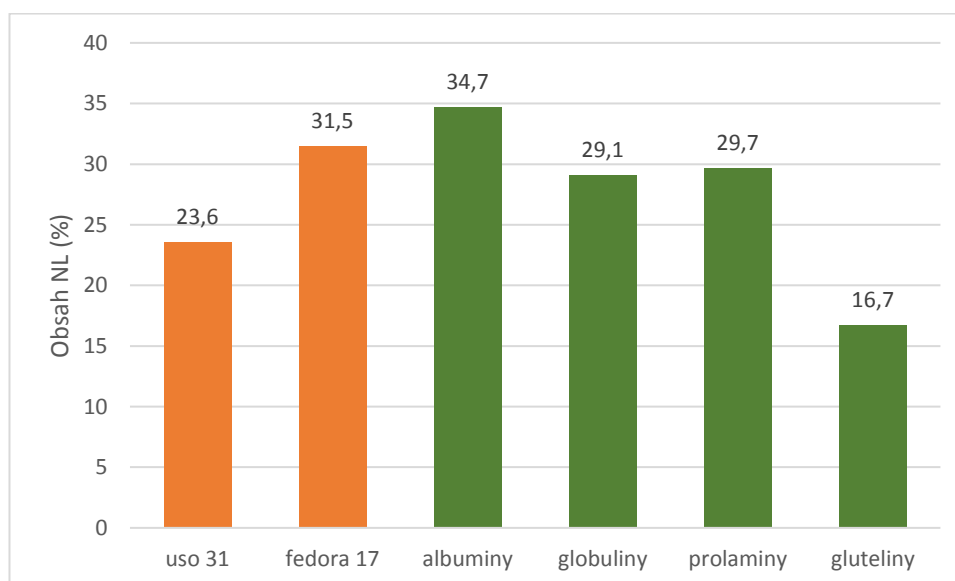
### 5.1 Sušina konopné mouky (%)

Průměrná sušina konopné mouky odrůdy Uso 31 byla 92,38 %, u odrůdy Fedora 17 byla 94,21 %.

### 5.2. Stanovení obsahu dusíkatých látek konopné mouky

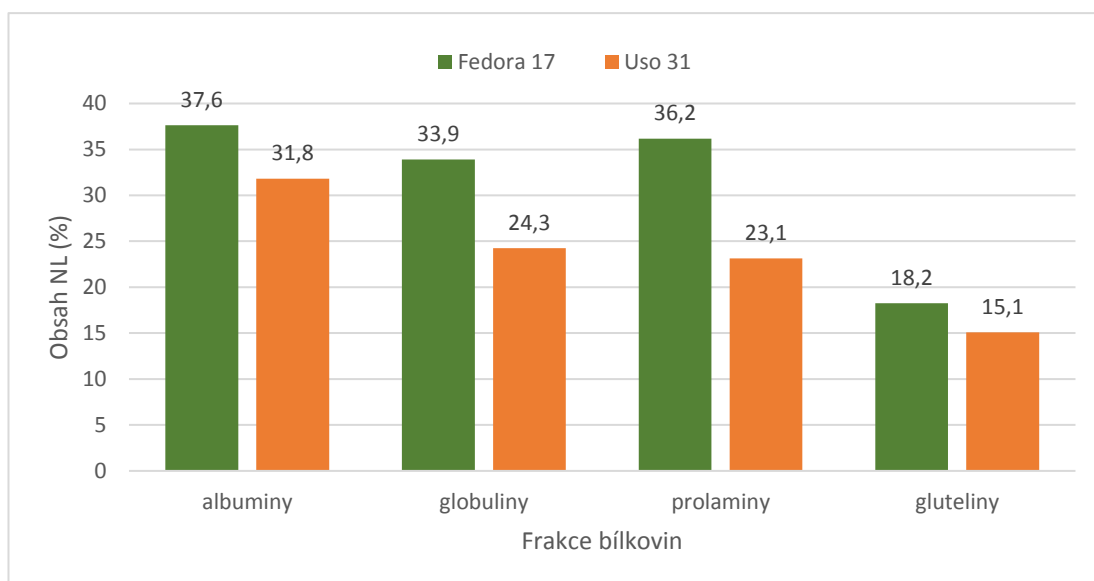
Obsah dusíkatých látek (Nx6,25) byl u jednotlivých odrůd konopí průměrně 23,6 % (Uso 31) - 31,5 % (Fedora 17). Bílkovinná frakce albuminů obsahovala nejvíce dusíkatých látek (NL) u obou odrůd, v průměru 34,7 % naopak nejméně NL bylo zastoupeno ve frakci glutelinů 16,6 % (graf č. 2).

**Graf č. 2: Porovnání obsahu dusíkatých látek (Nx6,25) odrůd a jednotlivých frakcí (průměry ze všech dat)**



Nejvyšší obsah dusíkatých látek byl zjištěn u odrůdy Fedora 17 v albuminové frakci, který činil 37,6 %, nejmenší obsah byl zjištěn u frakce glutelinů odrůdy Uso 31, který činil 15,1 %. Z grafu č. 3 je patrné, že odrůda Fedora 17 obsahovala více NL ve všech jednotlivých frakcích než odrůda Uso 31.

**Graf č. 3: Porovnání obsahu dusíkatých látek (Nx6,25) jednotlivých frakcí bílkovin konopné mouky u zkoumaných odrůd konopí setého**



**Tab. č. 9: Statistické hodnocení dusíkatých látek (Nx6,25) jednotlivých frakcí bílkovin u hodnocených odrůd konopí setého**

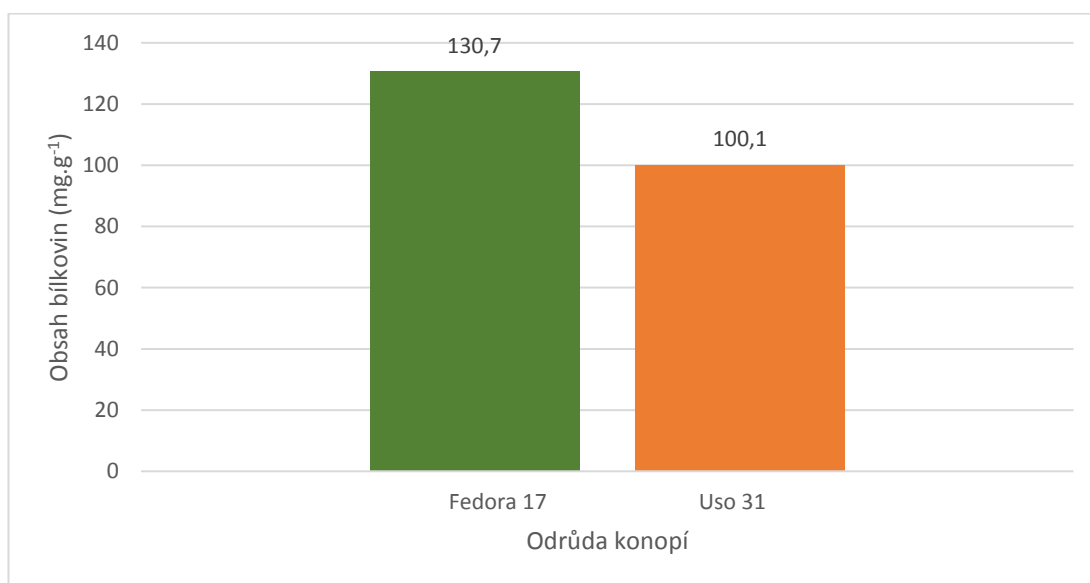
Frakce	Obsah dusíkatých látek (Nx6,25) jednotlivých frakcí	
	Uso 31	Fedora 17
<b>Albuminy</b>	31,8 c	37,6 a
<b>Globuliny</b>	24,3 d	33,9 bc
<b>Prolaminy</b>	23,1 d	36,2 ab
<b>gluteliny</b>	15,1 f	18,2 e

Písmena u jednotlivých frakcí indikují průkazný rozdíl mezi frakcemi na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . U frakcí globulinů a prolaminů odrůdy Fedora 17 (dvě písmena) nebyl dokázán průkazný rozdíl mezi jednotlivými frakcemi (Fisher LSD test).

### 5.3 Stanovení obsahu bílkovin konopné mouky

Obsah bílkovin v  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  konopné mouky byl u odrůdy Fedora 17 v průměru 130,7 mg, u odrůdy Uso 31 byl 100,1 mg. Z výsledků je patrný rozdíl obsahu bílkovin mezi oběma odrůdami (graf č. 4).

**Graf č. 4: Obsah bílkovin u odrůd Fedora 17 a Uso 31 ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  konopné mouky)**



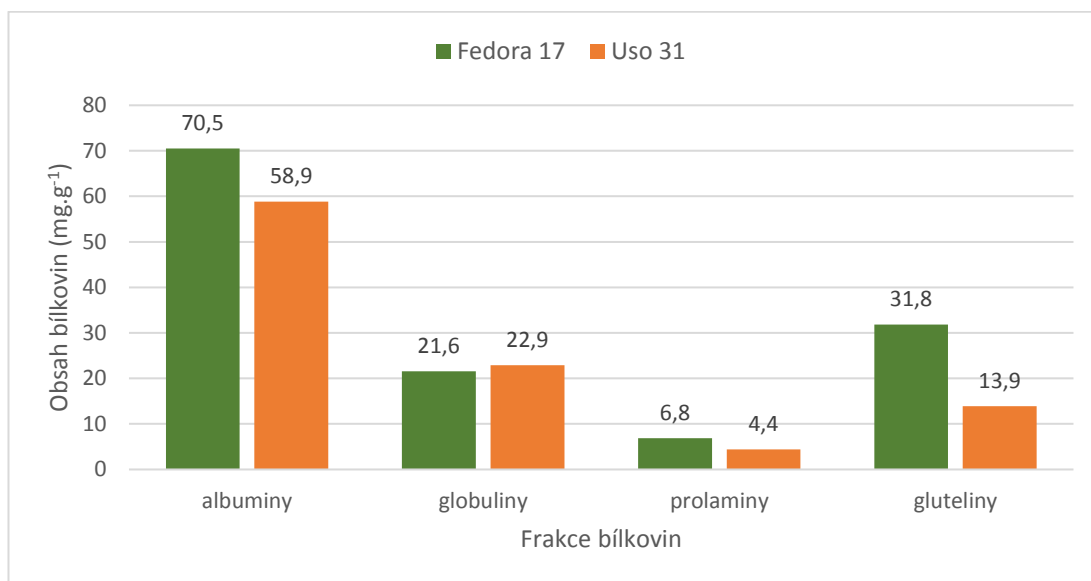
Hmotnostní zastoupení jednotlivých frakcí bílkovin znázorňuje graf č. 5. Z grafu je patrné, že nejvyšší obsah bílkovin měla u obou odrůd konopí frakce albuminů (rozpustná ve vodě). U odrůdy Fedora 17 byla hmotnost albuminů průměrně  $70,5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  konopné mouky, u odrůdy Uso 31 byla hmotnost  $58,9 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  konopné mouky.

Hmotnost globulinů – bílkovin rozpustných v 5 % roztoku  $\text{K}_2\text{SO}_4$  byla druhou nejvíce zastoupenou frakcí, kde se obsah bílkovin v konopné mouce pohyboval od  $21,6 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  u odrůdy Fedora 17 do  $22,9 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  u odrůdy Uso 31.

Zastoupení bílkovin frakce prolaminů (rozpustné v 70 % ethanolu) bylo minoritní, u žádné odrůdy nepřesáhla hranici  $10 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  konopné mouky.

Hmotnost glutelinů – bílkovin rozpustných v 0,03 M NaOH se mezi odrůdami značně lišil. U odrůdy Fedora 17 byl obsah glutelinů  $31,8 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  konopné mouky, zatímco u odrůdy Uso 31 pouze  $13,9 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  konopné mouky.

**Graf č. 5: Obsah bílkovin jednotlivých frakcí odrůd Fedora 17 a Uso 31 (mg.g<sup>-1</sup> konopné mouky)**



**Tab. č. 10: Statistické hodnocení zastoupení jednotlivých frakcí bílkovin**

Frakce	Hmotností zastoupení jednotlivých frakcí (mg/1 g)	
	Fedora 17	Uso 31
<b>Albuminy</b>	70,5 a	58,9 a
<b>Globuliny</b>	21,6 c	22,9 c
<b>Prolaminy</b>	6,8 e	4,4 f
<b>gluteliny</b>	31,8 b	13,9 d

Písmena uvedená u jednotlivých frakcí bílkovin v (Tab. č. 10) indikují statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými frakcemi bílkovin na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  (Fisher LSD test).

Celková hmotnost získaných bílkovin z konopné mouky byla u odrůdy Fedora 17 průměrně 136,8 g.kg<sup>-1</sup> konopné mouky. Hmotnost bílkovin získaných u odrůdy Uso 31 byla průměrně 99,5 g.kg<sup>-1</sup> konopné mouky.

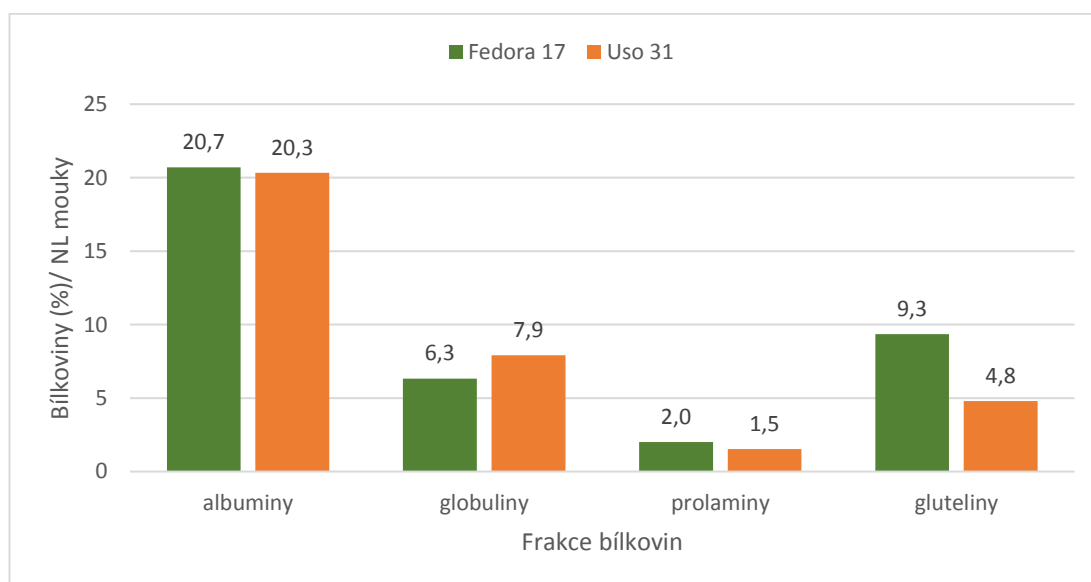
#### **5.4 Relativní zastoupení bílkovin a bílkovinných frakcí konopné mouky v dusíkatých látkách hodnocených odrůd konopí**

Celkové relativní zastoupení bílkovin v dusíkatých látkách u odrůdy Fedora 17 bylo v průměru 35,5 %. Odrůda Uso 31 měla relativní zastoupení bílkovin 34,3 %

z celkových dusíkatých látek.

Nejvíce zastoupenou frakcí bílkovin byla albuminová frakce. U obou hodnocených odrůd byla v průměru zastoupena 20,5 % bílkovin. Druhou nejvíce zastoupenou frakcí byla frakce globulinů zastoupena v průměru 7,1 % bílkovin z celkového obsahu dusíkatých látek. Frakce prolaminů tvořila minoritní frakci bílkovin s relativním zastoupením 1,5 % bílkovin. Frakce glutelinů tvořila 6,7 % bílkovin z celkových dusíkatých látek. Relativní zastoupení bílkovin jednotlivých frakcí odrůdy Fedora 17 a Uso 31 je znázorněno na grafu č. 6.

**Graf č. 6: Relativní zastoupení bílkovinných frakcí odrůd Fedora 17 a Uso 31 (%) z celkového obsahu dusíkatých látek odrůd konopí**



**Tab. č. 11: Statistické hodnocení relativního zastoupení bílkovinných frakcí odrůd Fedora 17 a Uso 31 (%) z celkových dusíkatých látek odrůd konopí**

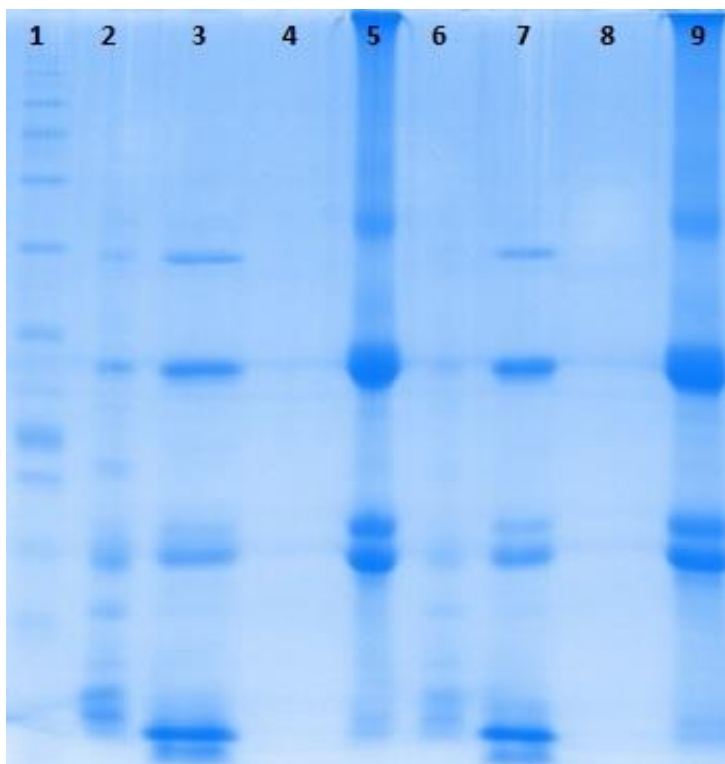
Frakce	Frakce bílkovin (%) / NL konopné mouky (%)	
	Fedora 17	Uso 31
<b>Albuminy</b>	20,7 a	20,3 a
<b>Globuliny</b>	6,3 d	7,9 c
<b>Prolaminy</b>	2,0 f	1,5 f
<b>gluteliny</b>	9,3 b	4,8 e

Písmena uvedená u relativního zastoupení bílkovinných frakcí indikují statistické rozdíly u jednotlivých frakcí bílkovin na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  (Fisher LSD test).

## 5.5 Vyhodnocení elektroforetických profilů bílkovinných frakcí konopné mouky

SDS-PAGE analýzou bylo zaznamenáno 1 (frakce prolaminů/Fedora 17 a Uso 31) až 9 (frakce albuminů/Fedora 17) bílkovinných pruhů. Podle výsledků elektroforézy, lze vyvodit, že zkoumané frakce bílkovin mají stejné nebo podobné proteinové profily (Obr. č. 1).

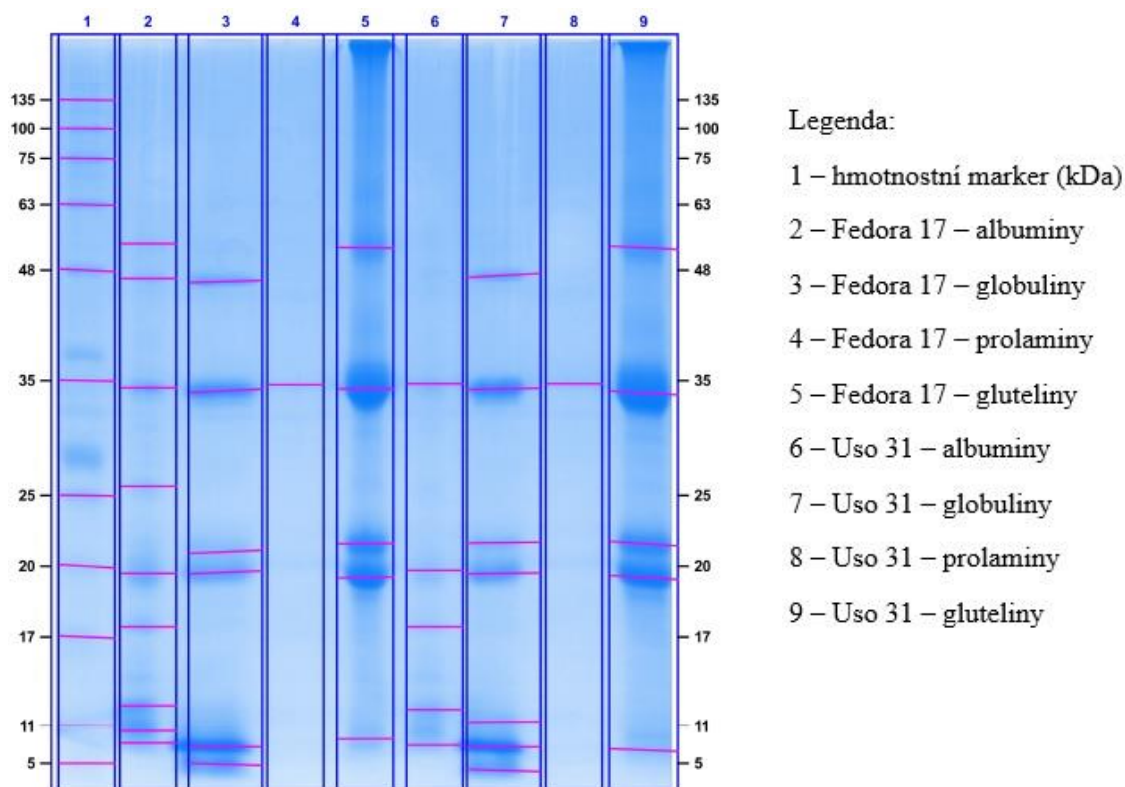
**Obr. č. 1: Profily bílkovin získané po analýze SDS-PAGE (původní gel)**



Legenda:

- 1 – hmotnostní marker (kDa)
- 2 – Fedora 17 – albuminy
- 3 – Fedora 17 – globuliny
- 4 – Fedora 17 – prolamininy
- 5 – Fedora 17 – gluteliny
- 6 – Uso 31 – albuminy
- 7 – Uso 31 – globuliny
- 8 – Uso 31 – prolamininy
- 9 – Uso 31 – gluteliny

**Obr. č. 2: Vyhodnocený gel s profily bílkovin po SDS-PAGE**



Vyhodnoceno pomocí: Image-Lab (verze 5.2.1)

U albuminové frakce byly z výsledků elektroforézy (Obr. č. 2) detekovány největší rozdíly mezi odrůdami. U odrůdy Fedora 17 bylo detekováno více bílkovinných pruhů (9) v rozpětí 7,7 – 53,6 kDa, albuminová frakce odrůdy Uso 31 byla tvořena pouze 5 bílkovinnými pruhy v rozpětí 7,4 – 34,7 kDa.

Globulinová frakce u obou odrůd konopí byla detekována téměř shodnými bílkovinnými pruhy v rozmezí 5,0 – 47,3 kDa. Obr. č. 3 a 4 ukazují relativní mobilitu a intenzitu bílkovinných pruhů globulinové frakce odrůd Fedora 17 a Uso 31.

Frakce prolaminů byla detekována málo výrazným pruhem v oblasti 34 kDa.

Glutelinová frakce byla detekována v rozmezí 8,5 – 52,7 kDa u odrůdy Fedora 17. U odrůdy Uso 31 byla tato frakce detekována v rozmezí 6,6 – 52,7 kDa. Přibližné molekulové hmotnosti jednotlivých frakcí jsou uvedeny v následujících tabulkách (Tab. č. 12 a 13).

**Tab. č. 12: Přibližné molekulové hmotnosti jednotlivých frakcí bílkovin konopí (kDa), získané po SDS-PAGE a jejich relativní zastoupení – Fedora 17**

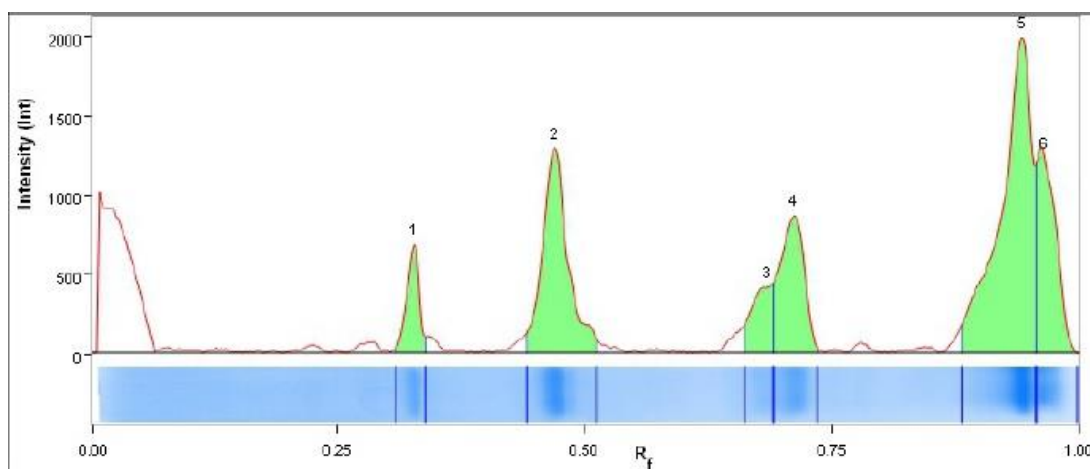
	M (kDa)	Fedora 17 - pořadí vzorků na gelu SDS-PAGE							
		2		3		4		5	
		albuminy (kDa)	Relativní zastoupení %	globuliny (kDa)	Relativní zastoupení %	prolaminy (kDa)	Relativní zastoupení %	gluteliny (kDa)	Relativní zastoupení %
1	135	53,6	2,9	46,5	5,6	34,6	100	52,7	8,9
2	100	46,9	4,3	34,0	20,8			34,2	49,2
3	75	34,3	14,7	20,9	5,9			21,5	10,2
4	63	25,7	5,8	19,7	13,1			19,5	17,4
5	48	19,7	35,9	7,1	39,8			8,5	14,4
6	35	17,4	7,7	5,0	14,7				
7	25	12,2	5,6						
8	20	10,1	12,9						
9	17	7,7	10,1						
10	11								
11	5								

**Tab. č. 13: Přibližné molekulové hmotnosti jednotlivých frakcí bílkovin konopí (kDa), získané po SDS-PAGE a jejich relativní zastoupení – Uso 31**

	M (kDa)	Uso 31 – pořadí vzorků na gelu SDS-PAGE							
		6		7		8		9	
		albuminy (kDa)	Relativní zastoupení %	globuliny (kDa)	Relativní zastoupení %	prolaminy (kDa)	Relativní zastoupení %	gluteliny (kDa)	Relativní zastoupení %
1	135	34,7	22,7	47,3	7,3	34,7	100	52,7	9,6
2	100	19,8	37,4	34,2	40,0			33,8	57,3
3	75	17,4	9,8	21,5	3,1			21,5	10,7
4	63	11,9	13,6	19,7	17,9			19,5	18,0
5	48	7,4	16,5	11,2	3,2			6,6	4,3
6	35			7,1	21,7				
7	25			5,0	6,7				
8	20								
9	17								
10	11								
11	5								

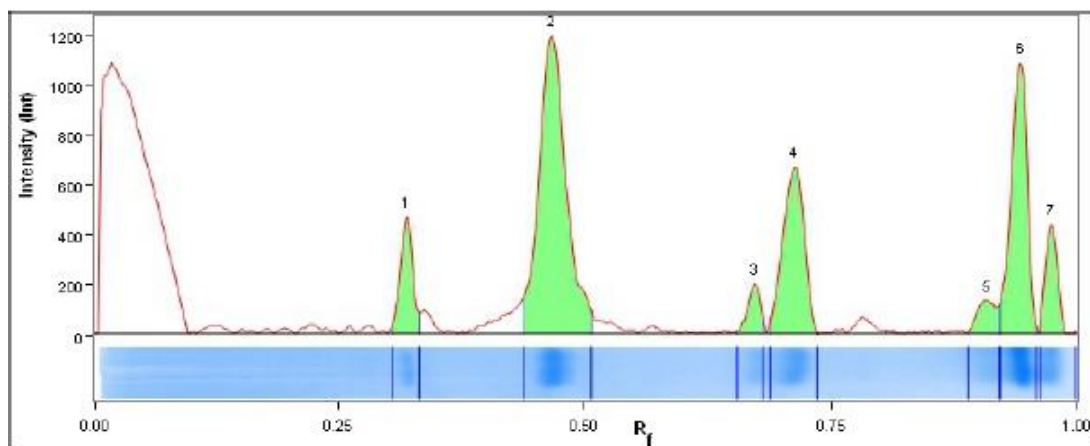


**Obr. č. 3: Vyhodnocený profil globulinové frakce odrůdy Fedora 17 programem Image-Lab verze 5.2.1 (Bio-Rad, USA)**



Int = intenzita, R<sub>f</sub> = relativní mobilita

**Obr. č. 3: Vyhodnocený profil globulinové frakce odrůdy Uso 31 programem Image-Lab verze 5.2.1 (Bio-Rad, USA)**



Int = intenzita, R<sub>f</sub> = relativní mobilita

## **6. Diskuse**

### **6.1 Obsah dusíkatých látek zkoumaných odrůd konopí**

Obsah dusíkatých látek (NL) u vybraných odrůd konopí setého byl u odrůdy Uso 31 23,6 % respektive 31,5 % u odrůdy Fedora 17, což u této odrůdy odpovídá dříve publikovaným výsledkům (Vonapartis et. al., 2015). Odrůda Uso 31 obsahovala v této studii v průměru 23,6 % NL což v porovnání s výsledky House et. al., (2010) kde výlisky semen obsahovaly v průměru 37,9 % NL je o 14,3 % nižší obsah. Rozdílný obsah dusíkatých látek u odrůd Fedora 17 a Uso 31 naznačuje značné odrůdové rozdíly, které mohou být ovlivněny genotypem jednotlivých odrůd. Obsah NL mohou ovlivnit také klimatické a agronomické podmínky při pěstování. Nedostatek informací však nedovoluje vyvodit jednoznačné závěry o dopadu podmínek pěstování na obsah dusíkatých látek. Výsledky naznačují že konopné výlisky jsou nejen dobrým zdrojem bílkovin, ale také dobrým zdrojem NL. Konopné výlisky by mohly najít uplatnění v krmivech pro zvířata, popřípadě by mohly nahradit řepkové a sójové šroty (Russo a Reggiani, 2015).

### **6.2 Obsah dusíkatých látek bílkovinných frakcí**

Obsah NL u jednotlivých frakcí odrůdy Fedora 17 byl poměrně shodný u frakcí albuminů 37,6 %, prolaminů 36,2 % a globulinů 33,9 %. Nejnižší obsah NL vykazovala frakce glutelinů 18,2 %. Odrůda Uso 31 vykazovala podobný charakter obsahu NL nejvíce obsahovaly frakce albuminů, globulinů a prolaminů, respektive 31,8 %, 24,3 %, 23,1 %. Nejnižší obsah NL byl u frakce glutelinů 15,1 %. Z literatury nejsou dostupné informace o obsahu NL u jednotlivých frakcí bílkovin, Obsah dusíkatých látek jednotlivých frakcí může být ovlivněn bílkovinnými NL, které vlivem slabých extrakčních činidel nebyly dostatečně vyextrahovány. Obsah dusíkatých látek bude také ovlivněn výživou, zejména množstvím přístupného půdního dusíku v období dozrávání semen a genotypem odrůdy.

### **6.3 Obsah bílkovin v jednotlivých odrůdách konopí setého a v jednotlivých bílkovinných frakcích konopné mouky**

Obsah bílkovin konopné mouky byl u odrůdy Fedora 17 průměrně 136,8 g.kg<sup>-1</sup>, odrůda Uso 31 obsahovala méně bílkovin 99,5 g.kg<sup>-1</sup> konopné mouky při její

průměrné sušině 93,3 %. Výsledky uváděné v literatuře (Russo a Regiani, 2015) uvádí výtěžek bílkovin v průměru  $340 \text{ g.kg}^{-1}$  v sušině konopné mouky. Pokud porovnáme tento výtěžek bílkovin s výsledky odrůd Fedora 17 a Uso 31 můžeme pozorovat značný rozdíl. Ten může být způsoben různými genotypy odrůd, agrotechnickými a klimatickými podmínkami při pěstování. Větší váhu můžeme přisuzovat rozdílným extrakčním postupům jednotlivých prací, kde musíme zohlednit postup odtučnění semen, jemnost namleté mouky použité při extrakci, sílu extrakčních činidel a dobu extrakce.

Nejvyšší obsah bílkovin byl zaznamenán u frakce albuminů u odrůdy Fedora 17 ( $70,5 \text{ mg.g}^{-1}$  konopné mouky) tak u odrůdy Uso 31 ( $58,9 \text{ mg.g}^{-1}$  konopné mouky). Frakce globulinů, která by měla být tvořena hlavní zásobní bílkovinou edestinem byla zastoupena ve větším množství u odrůdy Uso 31 ( $22,9 \text{ mg.g}^{-1}$  konopné mouky), u odrůdy Fedora 17 byl obsah globulinů ( $21,6 \text{ mg.g}^{-1}$ ). Výsledky se shodují s literárními zdroji (Malomo a Aluko, 2015) že frakce albuminů a globulinů tvoří hlavní zásobní bílkoviny semen konopí. Minoritní frakcí bílkovin je dle výsledků frakce prolaminů. Frakce glutelinů extrahována  $0,03 \text{ M NaOH}$  je velmi diskutabilní, obsah bílkovin v této frakci byl u odrůdy Fedora 17  $31,8 \text{ mg.g}^{-1}$ , u odrůdy Uso 31 pouze  $13,9 \text{ mg.g}^{-1}$ .

Důvodem k zamyšlení může být frakce glutelinů vzhledem k výsledkům SDS-PAGE (kap. 6.5), kde byl pravděpodobně identifikován edestin. Edestin nebyl pravděpodobně zcela vyextrahován v globulinové frakci vlivem dokonalosti pomleté mouky. Chtělo by se tedy zaměřit na interakce mezi jemností namleté mouky a výtěžkem bílkovin. Lze se domnívat, že čím jemněji bude mouka pomleta, tím lépe se budou bílkoviny extrahovat. U jemnějšího mletí bude třeba dávat pozor na tepelné namáhání mouky tak, aby nedocházelo k denaturaci bílkovin při mletí.

#### **6.4 Relativní zastoupení bílkovin v dusíkatých látkách konopné mouky**

Relativní zastoupení bílkovin v dusíkatých látkách (NL) konopné mouky odrůdy Fedora 17 bylo 35,5 %, odrůda Uso 31 obsahovala o něco méně bílkovin 34,3 %. Relativní zastoupení bílkovin v NL konopné mouky okolo 35 % v obou odrůdách je důsledkem toho, že se pravděpodobně nepodařilo těmito extrakčními činidly vyextrahovat bílkoviny, které jsou zastoupeny v oplodí semen asi jednou třetinou z celkových bílkovin konopné mouky.

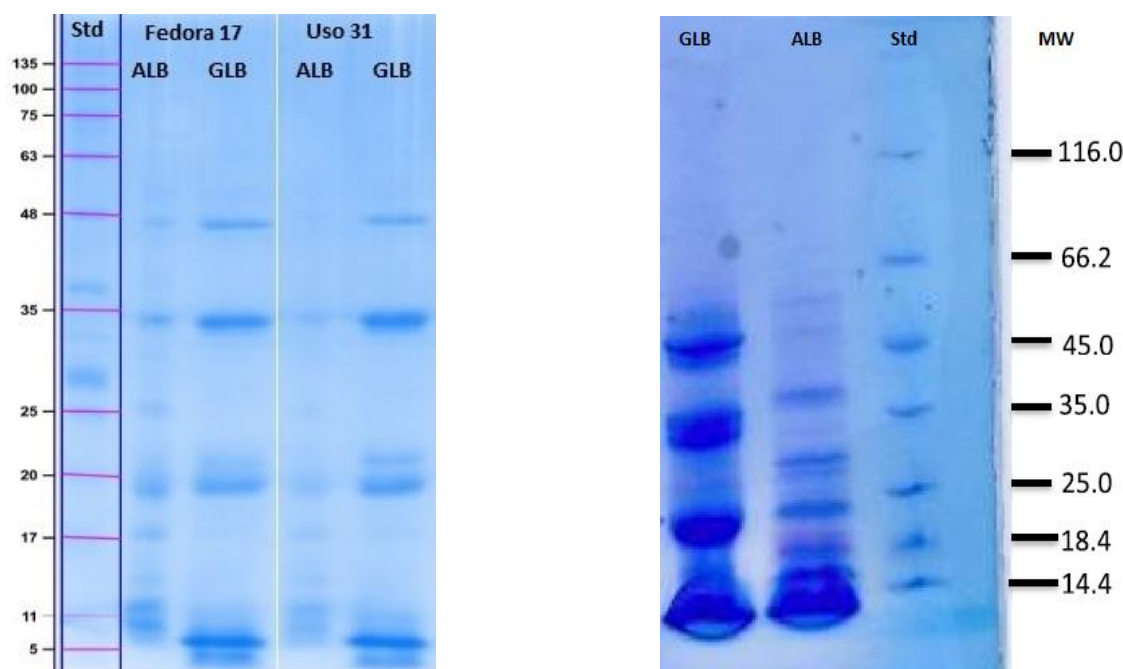
Relativní zastoupení albuminů v NL konopné mouce se u obou odrůd konopí pohybovalo v rozmezí 20 až 21 %, relativní zastoupení druhé zásobní frakce globulinů v NL pomleté mouky byl nepatrně vyšší u odrůdy Uso 31 (7,9 %) u odrůdy Fedora 17 (6,3 %). Zastoupení frakce albuminů v bílkovinách konopí setého okolo 33 % uvádějí ve své studii, obsah druhé zásobní frakce globulinů pak 65 % z celkového obsahu bílkovin. Pokud porovnáme tyto výsledky, tak frakce albuminů a zvláště globulinů, které by měly tvořit hlavní složku bílkovin nedosahuje publikovaných hodnot ve studiích (Angelo et. al., 1968, Docimo et. al., 2014), které uvádí obsah globulinu edestinu okolo 65 %. Důvody nízkého zastoupení globulinů v této práci jsou diskutovány v kapitole 6.3. Minoritní frakce prolaminů byla zastoupena okolo 1,5-2 % z obsahu bílkovin. Frakce glutelinů je, jak bylo dříve uvedeno diskutabilní, relativní podíl této frakce je u odrůdy Fedora 17 9,3 % a u odrůdy Uso 31 4,8 %. Nicméně minoritní zastoupení těchto dvou frakcí by odpovídalo výsledkům prezentovaným ve studii Apostol, Popa a Mustatea (2015), kde větší podíl konopné mouky pro pekařské výrobky zhoršil vlastnosti výsledného těsta, což ukazuje na stopové množství lepkových bílkovin v konopné mouce.

## **6.5 Spektra bílkovin konopné mouky**

Bílkovinné profily po SDS-PAGE albuminové a globulinové frakce jsou uvedeny na obr. č. 2. Odhady molekulové hmotnosti (MW) a relativní obsahy různých podjednotek jsou shrnuty v tab. č. 12 a 13. Bílkovinné pruhy albuminů odrůd Fedora 17 a Uso 31 jsou detekovány relativně slabými pásy od 60 kDa až po pásy o (MW) 10 kDa a níže s rozdílem detekovaného pásu u odrůdy Fedora 17 o hmotnosti asi 53,6 a 46,9 kDa. Tyto peptidy mohou odpovídat albuminu, respektive jeho složkám což by souhlasilo s výsledky Raikos et. al., (2015). Globulinové profily se u odrůd Fedora 17 a Uso 31 téměř shodují a jsou tvořeny pásy o odhadnuté (MW) od 5 do 47,3 kDa. Globuliny by měly být tvořeny hlavní bílkovinou semen edestinem, který je tvořen 6 identickými podjednotkami. Každá podjednotka se pak skládá ze dvou bazických podjednotek (18 kDa a 20 kDa) a jedné kyselé podjednotky (34 kDa) (Wang et. al., 2008, Raikos et. al., 2015, Malomo a Aluko, 2015). SDS-PAGE analýza potvrdila rozdělení globulinové frakce do několika pruhů. Došlo k vizualizaci pruhů o přibližné molekulové hmotnosti 19,7 a 21,5 kDa u odrůdy Uso 31 a 19,7 a 20,9 kDa u odrůdy Fedora 17. Uvedené bílkovinné frakce mohou podle (Docimo et. al., 2014, Malomo a Aluko, 2015) naznačovat přítomnost bazických podjednotek edestinu. V rámci

globulinové frakce došlo také u obou odrůd k oddělení bílkovinného pruhu o molekulové hmotnosti 34 kDa. Podle srovnávaných studií (Wang et. al., 2008, Raikos et. al., 2015) lze usuzovat možnou přítomnost kyselé podjednotky edestinu. Vizualizace pruhů o molekulových hmotnostech 46,5 kDa (Fedora 17) a 47,3 kDa (Uso 31) je možné podle studia autorů Raikos et al. (2015) přisuzovat přítomnosti specifické kyselé podjednotky edestinu, která vzniká v případě nedokonalé redukce disulfidických můstků ve struktuře edestinu. Výsledky prolaminové frakce nejsou průkazné a bylo by třeba je dále ověřit. Frakce glutelinů u obou odrůd pravděpodobně odpovídá bílkovinným podjednotkám edestinu, který nebyl dostatečně extrahován (viz kap. 6.3). S jistotou však nelze tvrdit, že se jedná o edestin a bylo by potřeba toto tvrzení ověřit pomocí technik hmotnostní spektrofotometrie. Pro porovnání výsledků je vložen obr. č. 3 SDS-PAGE analýzy uvedené ve studii (Malomo a Aluko, 2015). Pro upřesnění výsledků analýzy SDS-PAGE, by bylo vhodné podrobit vzorky na gelu hmotnostní spektrometrii.

**Obr. č. 3 Původní gel – Odrůdy Fedora 17 a Uso 31 (vlevo), SDS-PAGE konopných bílkovin (Malomo a Aluko, 2015) (vpravo)**



Legenda: Std – Hmotnostní marker (kDa)

MW – molekulová hmotnost (kDa)

ALB – albuminy

GLB – globuliny

## 7. Závěr

Na základě výsledků získaných v rámci řešení této diplomové práce lze vyvodit následující závěry:

1. Obsah dusíkatých látek (Nx6,25) byl u hodnocených odrůd konopí 23,6 % (Uso 31) a 31,5 % (Fedora 17). Obsah dusíkatých látek jednotlivých frakcí odrůdy Fedora 17 byl v albuminové frakci 37,6 %, v globulinové frakci 33,9 %, v prolaminové frakci 36,1 % a ve frakci glutelinů 18,2 %. Obsah dusíkatých látek u odrůdy Uso 31 byl ve frakci albuminů 31,8 %, ve frakci globulinů 24,3 %, ve frakci prolaminů 23,1 % a ve frakci glutelinů 15,1 %. Rozdíl v obsahu dusíkatých látek mezi odrůdami je způsoben pravděpodobně rozdílným genotypem odrůd a podmínkami pěstování.
2. Obsah bílkovin v mg/1 g konopné mouky byl u odrůdy Fedora 17 v průměru 130,7 mg, u odrůdy Uso 31 byl 100,1 mg. Z výsledků je patrný rozdíl obsahu bílkovin mezi jednotlivými odrůdami, který mohl být způsoben již zmíněnými faktory genotypu a podmínek pěstování. U odrůdy Fedora 17 byla hmotnost albuminů průměrně 70,5 mg.g<sup>-1</sup> konopné mouky, hmotnost globulinů 21,5 mg.g<sup>-1</sup>, hmotnost prolaminů 16,1 mg.g<sup>-1</sup> a hmotnost glutelinů 28,6 mg.g<sup>-1</sup>. Hmotnost jednotlivých frakcí bílkovin u odrůdy Uso 31 byla 58,9 mg.g<sup>-1</sup> u albuminů, 22,9 mg.g<sup>-1</sup> globulinů, 3,7 mg.g<sup>-1</sup> prolaminů a 13,9 mg.g<sup>-1</sup> u glutelinů. Obsah bílkovin byl ovlivněn slabými extrakčními činidly, jemností namleté mouky, metodu lisování oleje, genotypem odrůdy a podmínkami pěstování.
3. Celkové relativní zastoupení bílkovin v dusíkatých látkách u odrůdy Fedora 17 bylo v průměru 35,5 %. Odrůda Uso 31 měla relativní zastoupení bílkovin 34,3 % z celkových dusíkatých látek což potvrzuje dosud známé výsledky dostupné z literatury. Odrůda Fedora 17 obsahovala 20,7 % albuminů, 6,3 % globulinů, 2,0 % prolaminů a 4,8 % glutelinů. Odrůda Uso 31 obsahovala 20,3 % albuminů, 7,9 % globulinů, 1,5 % prolaminů a 4,8 % glutelinů. Nízký podíl globulinové frakce byl ovlivněn jemností namleté mouky a obsahem bílkovin v oplodí semen, které se vlivem extrakčních činidel nepodařilo vyextrahovat.

4. Z výsledků SDS-PAGE elektroforézy lze vyvodit, že jednotlivé frakce bílkovin obou zkoumaných odrůd zahrnují stejné nebo podobné proteinové profily. U frakce globulinů obou odrůd se pravděpodobně podařilo detekovat hlavní zásobní bílkovinu edestin a jeho bazické a kyselé podjednotky v oblasti 19 a 21 kDa a 34 kDa.

K frakcím bílkovin konopné mouky a popisu jednotlivých proteinů by bylo možné použít techniky hmotnostní spektrofotometrie. Pro detailnější elektroforetickou analýzu by kromě SDS-PAGE bylo možné použít i jiné elektroforetické metody, například čipovou nebo 2D elektroforézu. Pro vyšší výtěžky bílkovin jednotlivých frakcí by bylo možno jemněji namlet konopné výlisky a získat více informací o interakcích mezi obsahem bílkovin a jednotlivými odrůdami konopí setého.

## 8. Seznam použité literatury

**ALBERTS, B., A. JOHNSON, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS a P. WALTER.** *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York: Garland Science, 2002. ISBN 08-153-4072-9.

**ALI, Esra M. M., Aisha Z. I. ALMAGBOUL, Salwa M. E. KHOGALI a Umelkheir M. A. GERGEIR.** Antimicrobial Activity of *Cannabis sativa* L. *Chinese Medicine*. 2012, **03**(01), 61-64. DOI: 10.4236/cm.2012.31010. ISSN 2151-1918.

**AMADUCCI, S. a H. J. GUSOVIUS.** Hemp - Cultivation, extraction and procesing.. *Industrial application of natural fibres: structure, properties, and technical applications*. Hoboken, N.J.: Wiley, 2010, 109 - 134. ISBN 9780470695081.

**AMADUCCI, S., D. SCORDIA, F.H. LIU, Q. ZHANG, H. GUO, G. TESTA a S.L. COSENTINO.** Key cultivation techniques for hemp in Europe and China. *Industrial Crops and Products*. 2015, **68**, 2-16. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.06.041. ISSN 09266690.

**ANGELO, A., J.St., Lawrence Y. YATSU a A. M. ALTSCHUL.** Isolation of edestin from aleurone grains of *Cannabis sativa*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1968, **124**, 199-205. DOI: 10.1016/0003-9861(68)90320-2. ISSN 00039861.

**APOSTOL, L., M. POPA a G. MUSTATEA.** *Cannabis sativa* L partially skimmed flour as source of bio-compounds in the bakery industry. *Romanian Biotechnological Letters*. 2015, **20**(No. 5), 10835-10844.

**BENHAIM, P.** *Konopí: zdraví na dosah : holistická kuchařka*. Frýdek-Místek: Alpress, 2001. ISBN 80-721-8605-1.

**BURCZYK, H. a R. KANIEWSKI.** New Technology of Harvesting Hemp Grown for Seed. *Journal of Industrial Hemp*. 2005, **10**(1), 49-60. DOI: 10.1300/J237v10n01\_05. ISSN 1537-7881.

**CALLAWAY, J. C.** Hemp as Food at High Latitudes. *Journal of Industrial Hemp*. 2002, **7**(1), 105-117. DOI: 10.1300/J237v07n01\_09. ISSN 1537-7881.

**CALLAWAY, J. C.** Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica*. 2004, **140**(1-2), 65-72. DOI: 10.1007/s10681-004-4811-6. ISSN 0014-2336.

**CALLAWAY, J. C. a D. W. PATE.** Hempseed Oil. In. **MOREAU, R. A. a A. KAMAL-ELDIN.,** *Gourmet and Health Promoting Specialty Oils*. Urbana, IL: AOCS Press, c2009, s. 185-213. ISBN 978-1-893997-97-4.



**CAMP, J. V. a S. DIERCKX, NOLLET, Leo M. L., ed** Amino Acids. *Handbook of food analysis*. 2. ed., rev. and expanded. New York, NY [u.a.]: Dekker, 2004, s. 83-123. ISBN 0824750365

**DAVIS, R.,** *FUNCTIONAL HEMP PROTEIN EXTRACTION*. 2013. United States of America. CA 2817168. Uděleno 24. 11. 2014. Zapsáno 25. 4. 2013.

**DAY, Li.** Proteins from land plants – Potential resources for human nutrition and food security. *Trends in Food Science*. 2013, 32(1), 25-42. DOI: 10.1016/j.tifs.2013.05.005. ISSN 09242244.

**DE MEIJER, E. P. M., M. BAGATTA, A. CARBONI, P. CRUCITTI, V. M. C. MOLITERNI, P. RANALLI a G. MANDOLINO.** The Inheritance of Chemical Phenotype in *Cannabis sativa* L. *Genetics*. 2003, 163(1), 335 - 346.

**DOCIMO, T., I. CARUSO, E. PONZONI, M. MATTANA a I. GALASSO.** Molecular characterization of edestin gene family in *Cannabis sativa* L. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2014, 84, 142-148. DOI: 10.1016/j.plaphy.2014.09.011. ISSN 09819428.

**DUPAL, L.** Kniha o marihuaně: *Kompilace*. Praha: Maťa, 1994. ISBN 80-901-5905-2.

**EBSKAMP, M. J.M.** Engineering flax and hemp for an alternative to cotton. *Trends in Biotechnology*. 2002, 20(6), 229-230. DOI: 10.1016/S0167-7799(02)01953-4. ISSN 01677799.

**ERIKSSON, M. a H. WALL.** Hemp seed cake in organic broiler diets. *Animal Feed Science and Technology*. 2012, 171(2-4), 205-213. DOI: 10.1016/j.anifeeds.2011.10.007. ISSN 03778401.

**FINNAN, J. a B. BURKE.** Nitrogen fertilization to optimize the greenhouse gas balance of hemp crops grown for biomass. *GCB Bioenergy*. 2013, 5(6), 701-712. DOI: 10.1111/gcbb.12045. ISSN 17571693.

**FINNAN, J. a B. BURKE.** Potassium fertilization of hemp (*Cannabis sativa*). *Industrial Crops and Products*. 2013, 41, 419-422. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.04.055. ISSN 09266690.

**GALASSO, I., R. RUSSO, S. MAPELLI, E. PONZONI, I. M. BRAMBILLA, G. BATTELLI a R. REGGIANI.** Variability in Seed Traits in a Collection of *Cannabis sativa* L. Genotypes. *Frontiers in Plant Science*. 2016, 7, -. DOI: 10.3389/fpls.2016.00688. ISSN 1664-462x.

**GILMORE, S., R. PEAKALL a J. ROBERTSON.** Organelle DNA haplotypes reflect crop-use characteristics and geographic origins of *Cannabis sativa*. *Forensic Science International*. 2007, 172(2-3), 179–190.

**GIRGIH, A. T., CH. C. UDENIGWE a R. E. ALUKO.** In Vitro Antioxidant Properties of Hemp Seed (*Cannabis sativa* L.) Protein Hydrolysate Fractions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2011, **88**(3), 381-389. DOI: 10.1007/s11746-010-1686-7. ISSN 0003-021x.

**GIRGIH, A. T., CH. C. UDENIGWE, H. LI, A. P. ADEBIYI a R. E. ALUKO.** Kinetics of Enzyme Inhibition and Antihypertensive Effects of Hemp Seed (*Cannabis sativa* L.) Protein Hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2011, **88**(11), 1767-1774. DOI: 10.1007/s11746-011-1841-9. ISSN 0003-021x.

**GIRGIH, A. T., R. HE, S. MALOMO, M. OFFENGENDEN, J. WU a R. E. ALUKO.** Structural and functional characterization of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein-derived antioxidant and antihypertensive peptides. *Journal of Functional Foods*. 2014, 6, 384-394. DOI: 10.1016/j.jff.2013.11.005. ISSN 17564646.

**GROTENHERMEN, F.,** Konopí jako lék: praktický rádce k využívání konopí a dronabinolu v medicíně. Olomouc: Fontána, c2009. ISBN 978-807-3365-523.

**HILLIG, K. W.** Genetic evidence for speciation in *Cannabis* (Cannabaceae). *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2005, 52(2), 161-180. DOI: 10.1007/s10722-003-4452-y. ISSN 0925-9864.

**HOUSE, J. D., J. NEUFELD a G. LESON.** Evaluating the Quality of Protein from Hemp Seed ( *Cannabis sativa* L. ) Products Through the use of the Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010, 58(22), 11801-11807. DOI: 10.1021/jf102636b. ISSN 0021-8561.

**CHERNEY, J. a E. SMALL.** Industrial Hemp in North America: Production, Politics and Potential. *Agronomy*. 2016, 6(4), 58-. DOI: 10.3390/agronomy6040058. ISSN 2073-4395.

**KIM, Jum-Ji a Mi-Young LEE.** Isolation and Characterization of Edestin from Cheungsam Hempseed. *Journal of Applied Biological Chemistry*. 2011, **54**(2), 84-88. DOI: 10.3839/jabc.2011.015. ISSN 1976-0442.

**KRIESE, U., E. SCHUMANN, W.E. WEBER, M. BEYER, L. BRÜHL a B. MATTHÄUS.** Oil content, tocopherol composition and fatty acid patterns of the seeds of 51 *Cannabis sativa* L. genotypes. *Euphytica*. 2004, 137(3), 339-351. DOI: 10.1023/B:EUPH.0000040473.23941.76. ISSN 0014-2336.

**KUBÁNEK, V.**, Konopí a mák: (pěstování, výroby, legislativa). Brno: Tribun EU, 2008. Knihovnicka.cz. ISBN 978-80-7399-438-9.

**LIU, F., Z. CHEN, L. WANG a R. WANG.** Effects of protein solubilisation and precipitation pH values on the functional properties of defatted wheat germ protein isolates. *International Journal of Food Science*. 2013, 48(7), 1490-1497. DOI: 10.1111/ijfs.12117. ISSN 09505423.

**MALOMO, S. A.** *Structure-function properties of hemp seed proteins and protein-derived acetylcholinesterase-inhibitory peptides*. Department of Human Nutritional Sciences University of Manitoba Winnipeg, 2015.

**MALOMO, S. A., R. HE a R. E. ALUKO.** Structural and Functional Properties of Hemp Seed Protein Products. *Journal of Food Science*. 2014, 79(8), C1512-C1521. DOI: 10.1111/1750-3841.12537. ISSN 00221147.

**MALOMO, S. A. a R. E. ALUKO.** Conversion of a low protein hemp seed meal into a functional protein concentrate through enzymatic digestion of fibre coupled with membrane ultrafiltration. *Innovative Food Science*. 2015, 31, 151-159. DOI: 10.1016/j.ifset.2015.08.004. ISSN 14668564.

**MALOMO, S. A. a R. E. ALUKO.** A comparative study of the structural and functional properties of isolated hemp seed (*Cannabis sativa* L.) albumin and globulin fractions. *Food Hydrocolloids*. 2015, 43, 743-752. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2014.08.001. ISSN 0268005x.

**MALOMO, S., J. ONUH, A. GIRGIH a R. ALUKO.** Structural and Antihypertensive Properties of Enzymatic Hemp Seed Protein Hydrolysates. *Nutrients*. 2015, 7(9), 7616-7632. DOI: 10.3390/nu7095358. ISSN 2072-6643.

**MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C., P. GULEWICZ, J. FRIAS, K. GULEWICZ a C. VIDAL-VALVERDE.** Assessment of protein fractions of three cultivars of *Pisum sativum* L: effect of germination. *European Food Research and Technology*. 2008, 226(6), 1465-1478. DOI: 10.1007/s00217-007-0678-9. ISSN 1438-2377.

**MIOVSKÝ, M.** Konopí a konopné drogy: adiktologické kompendium. Praha: Grada, 2008. ISBN 978-80-247-0865-2.

**MOUDRÝ, J.** Alternativní plodiny. Praha: Profi Press, 2011. ISBN 978-80-86726-40-3.

**MURRAY, R. K.** Harperova Biochemie. 23. vyd., (4. české vyd.), v H. Jinočany: H, 2002. Lange medical book. ISBN 80-731-9013-3.

**OOMAH, B. D., M. BUSSON, D. V. GODFREY a C.G. DROVER.** Characteristics of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil. *Food Chemistry*. 2002, 76(1), 33-43. DOI: 10.1016/S0308-8146(01)00245-X. ISSN 03088146.

**OSBORNE, T. B.** Crystallized vegetable proteids. *Am. Chem. J.* 1892, 14, 662-689.

**PATEL, S., R. CUDNEY a A. MCPHERSON.** Crystallographic characterization and molecular symmetry of edestin, a legumin from hemp. *Journal of Molecular Biology*. 1994, 235(1), 361-363. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80040-3. ISSN 00222836.

**PATTHY, L.** Protein evolution. 2nd ed. Oxford: Blackwell Science, 2008. ISBN 978-1-4051-5166-5.

**PILUZZA, G., G. DELOGU, A. CABRAS, S. MARCEDDU a S. BULLITTA.** Differentiation between fiber and drug types of hemp (*Cannabis sativa* L.) from a collection of wild and domesticated accessions. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2013, 60(8), 2331-2342. DOI: 10.1007/s10722-013-0001-5. ISSN 0925-9864.

**POJIĆ, M., T. DAPČEVIĆ HADNAĐEV, M. HADNAĐEV, S. RAKITA a T. BRLEK.** Bread Supplementation with Hemp Seed Cake: A By-Product of Hemp Oil Processing. *Journal of Food Quality*. 2015, 38(6), 431-440. DOI: 10.1111/jfq.12159. ISSN 01469428.

**RAIKOS, V., G. DUTHIE a V. RANAWANA.** Denaturation and Oxidative Stability of Hemp Seed (*Cannabis sativa* L.) Protein Isolate as Affected by Heat Treatment. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2015, 70(3), 304-309. DOI: 10.1007/s11130-015-0494-5. ISSN 0921-9668.

**RAMAN, A. a D.T. BROWN** THE CANNABIS PLANT: BOTANY, CULTIVATION AND PROCESSING FOR USE.. *Cannabis: the genus Cannabis*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, c1998, s. 29-55. ISBN 90-570-2291-5

**RUMAN, M. a L. BLÄTTLER KLVAŇOVÁ.** Konopí: staronový přítel člověka. Chvaleč: Konopa, 2008. ISBN 978-80-254-1825-3.

**RUSSO, R.,** Variability in Antinutritional Compounds in Hempseed Meal of Italian and French Varieties. *Plant*. 2013, 1(2), 25-29. DOI: 10.11648/j.plant.20130102.13. ISSN 2331-0669.

**RUSSO, R., a R. REGGIANI.** Evaluation of Protein Concentration, Amino Acid Profile and Antinutritional Compounds in Hempseed Meal from Dioecious and Monoecious Varieties. *American Journal of Plant Sciences*. 2015, 06(01), 14-22. DOI: 10.4236/ajps.2015.61003. ISSN 2158-2742.

- SHEWRY, P. R. a N. G. HALFORD.** Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany*. 2002, 53(370), 947-958. DOI: 10.1093/jexbot/53.370.947. ISSN 14602431.
- SLADKÝ, V.** Konopí, šance pro zemědělství a průmysl. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2004. Zemědělské informace. ISBN 80-727-1145-8.
- SNUSTAD, D. P. a M. J. SIMMONS, RELICHOVÁ, J, ed.** *Genetika*. Brno: Masarykova univerzita, 2009. ISBN 978-802-1048-522.
- SONG, X.-Y., et al.** Preliminary Study of Fertilizing N, P and K on Hemp Stem Yield [J]. *Plant Fiber Sciences in China*, 2012, 3: 005.
- STRIJK, P.C., S. AMADUCCI, M.J. BULLARD, N.C. STUTTERHEIM, G. VENTURI a H.T.H. CROMACK.** Agronomy of fibre hemp (*Cannabis sativa* L.) in Europe. *Industrial Crops and Products*. 2000, 11(2-3), 107-118. DOI: 10.1016/S0926-6690(99)00048-5. ISSN 09266690.
- SVEDBERG, T. a A. J. STAMM.** The molecular weight of edestin. *Journal of the American Chemical Society*. 1929, 51(7), 2170-2185. DOI: 10.1021/ja01382a030. ISSN 0002-7863.
- TANG, CH. H., Z. TEN, X. S. WANG a X. Q. YANG.** Physicochemical and Functional Properties of Hemp ( *Cannabis sativa* L.) Protein Isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, 54(23), 8945-8950. DOI: 10.1021/jf0619176. ISSN 0021-8561.
- VAN DER WERF, H. M. G.** Hemp Production in France. *Journal of Industrial Hemp*. 2002, 7(2), 105-109. DOI: 10.1300/J237v07n02\_12. ISSN 1537-7881.
- VAN DER WERF, H. M.G. a L. TURUNEN.** The environmental impacts of the production of hemp and flax textile yarn. *Industrial Crops and Products*. 2008, 27(1), 1-10. DOI: 10.1016/j.indcrop.2007.05.003. ISSN 09266690.
- VELÍŠEK, J.** Chemie potravin. Vyd. 2. upr. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 80-866-5900-3.
- VELÍŠEK, J. a J. HAJŠLOVÁ.** Chemie potravin. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-15-2.
- VERA, C. L. a A. HANKS.** Hemp Production in Western Canada. *Journal of Industrial Hemp*. 2004, 9(2), 79-86. DOI: 10.1300/J237v09n02\_08. ISSN 1537-7881.
- VONAPARTIS, E., M.-P. AUBIN, P. SEGUIN, A. F. MUSTAFA a J.-B. CHARRON.** Seed composition of ten industrial hemp cultivars approved for production in Canada. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2015, 39, 8-12. DOI: 10.1016/j.jfca.2014.11.004. ISSN 08891575.

**WANG, X.-S., CH.-H. TANG, X.-Q. YANG a W.-R. GAO.** Characterization, amino acid composition and in vitro digestibility of hemp (*Cannabis sativa* L.) proteins. *Food Chemistry*. 2008, **107**(1), 11-18. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.06.064. ISSN 03088146.

**WOLFE, R. R., S. M. RUTHERFURD, I. K. KIM a P. J. MOUGHAN.** Protein quality as determined by the Digestible Indispensable Amino Acid Score: evaluation of factors underlying the calculation. *Nutrition Reviews*. 2016, 74(9), 584-599. DOI: 10.1093/nutrit/nuw022. ISSN 0029-6643.

**YAN, X, J. TANG, C. DOS SANTOS PASSOS, A NURISSO, C. A. SIMÕES-PIRES, M. JI, H. LOU a P. FAN.** Characterization of Lignanamides from Hemp ( *Cannabis sativa* L.) Seed and Their Antioxidant and Acetylcholinesterase Inhibitory Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015, 63(49), 10611-10619. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b05282. ISSN 0021-8

## 9. Přílohy

### Příloha I – Ilustrační fotografie

Obr. č. 1 Výchozí rostlinný materiál – konopné výlisky



Foto: Pavel Hofírek

Obr. č. 2 Konopná mouka po namletí na ultra odstředivém mlýnu ZM 100 (Schoeller instruments, Německo)

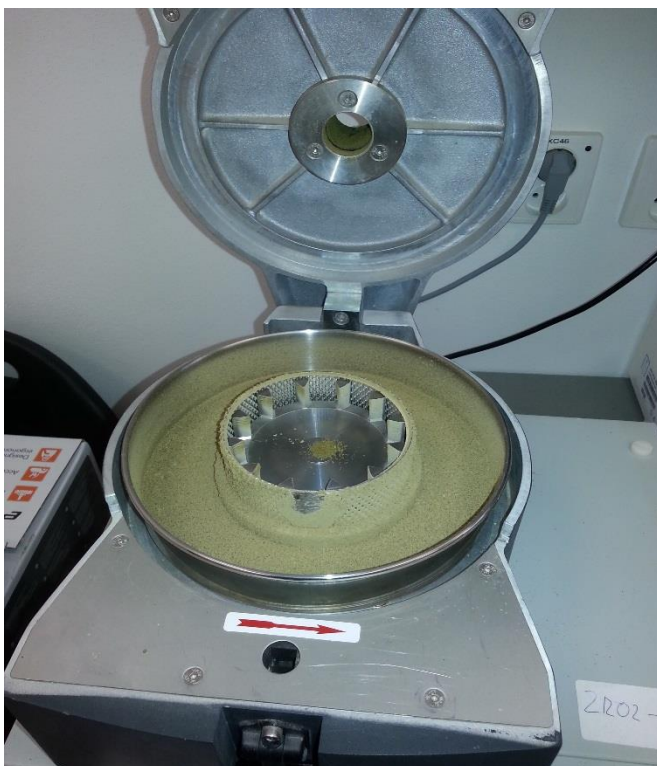


Foto: Pavel Hofírek

Obr. č. 3 Extrakce bílkovin na ledu

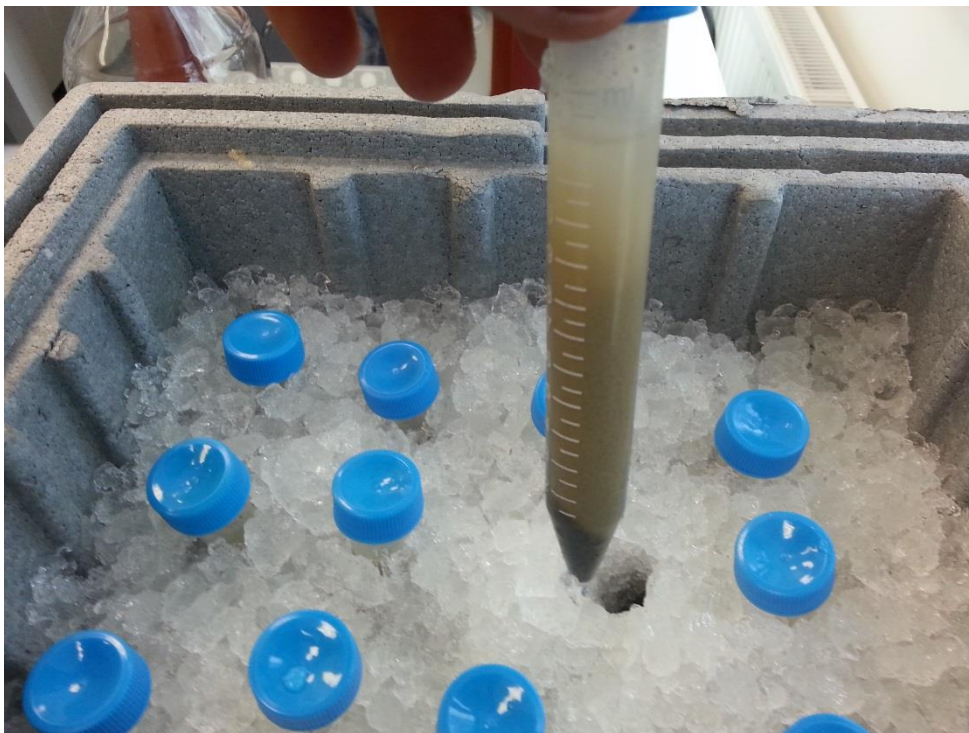


Foto: Pavel Hofirek



## Příloha II – podklady pro statistická hodnocení

Tab. č. 1: Zdrojová tabulka dat pro statistická hodnocení

odrůda	frakce	opakování	průměr NL (%)	úbytek hmotnosti Frakce (g)	výtěžek frakce (mg)	Bílkoviny % k NL mouky
Uso 31	albuminy	1	32,85009956	0,1883	59,88138	20,66658821
Uso 31	albuminy	2	32,6265955	0,1829	58,164123	20,07391808
Uso 31	albuminy	3	29,66034698	0,1826	58,06872	20,04099311
Uso 31	albuminy	4	32,06716442	0,1867	59,372563	20,49098148
Uso 31	globuliny	1	22,48019791	0,0965	23,40192757	8,076600779
Uso 31	globuliny	2	23,66178989	0,0965	23,40192757	8,076600779
Uso 31	globuliny	3	26,15048409	0,0929	22,52890229	7,775297537
Uso 31	globuliny	4	24,71033669	0,0919	22,28639527	7,691602192
Uso 31	prolaminy	1	23,01732445	0,0078	1,80332931	0,622374839
Uso 31	prolaminy	2	23,70728397	0,0163	3,76849586	1,300603829
Uso 31	prolaminy	3	23,86752033	0,0218	5,04007422	1,739457882
Uso 31	prolaminy	4	21,88629723	0,0194	4,48520366	1,547957931
Uso 31	gluteliny	1	15,71748686	0,1022	15,42313902	5,322917792
Uso 31	gluteliny	2	13,74602604	0,0912	13,76311427	4,750001003
Uso 31	gluteliny	3	13,92366743	0,0882	13,31038025	4,593750971
Uso 31	gluteliny	4	16,97735596	0,0869	13,11419551	4,526042624
Fedora 17	albuminy	1	38,48175049	0,19	71,48527579	20,99250149
Fedora 17	albuminy	2	34,97819901	0,1871	70,39418474	20,67208963
Fedora 17	albuminy	3	37,61761475	0,19	71,48527579	20,99250149
Fedora 17	albuminy	4	39,41775322	0,1826	68,70111242	20,1748988
Fedora 17	globuliny	1	32,8226223	0,0706	23,94093995	7,030541774
Fedora 17	globuliny	2	34,66854477	0,0691	23,43227975	6,881167656
Fedora 17	globuliny	3	32,86725998	0,06	20,34640789	5,97496468
Fedora 17	globuliny	4	35,28429222	0,0545	18,4813205	5,427259585
Fedora 17	prolaminy	1	32,61521339	0,0161	5,82553368	1,710737255
Fedora 17	prolaminy	2	32,92303753	0,0217	7,85180627	2,305776302
Fedora 17	prolaminy	3	38,03095055	0,0971	35,13411928	10,31755202
Fedora 17	prolaminy	4	41,1645546	0,0428	15,4865119	4,547798419
Fedora 17	gluteliny	1	18,95745277	0,1878	34,25068624	10,0581214
Fedora 17	gluteliny	2	20,83365154	0,1644	29,98302885	8,804873045
Fedora 17	gluteliny	3	17,07077217	0,1055	19,24093396	5,650329112
Fedora 17	gluteliny	4	16,0895319	0,171	31,18672709	9,15835335