

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: B4131 Zemědělství

Studijní obor: Trvale udržitelné systémy hospodaření v krajině

Katedra: Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

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

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Příprava koncentrátů konopných bílkovin mechanickým způsobem

Autor bakalářské práce:  
**Hana Němcová**

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

České Budějovice

2019

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Hana NĚMCOVÁ**  
Osobní číslo: **Z16159**  
Studijní program: **B4131 Zemědělství**  
Studijní obor: **Trvale udržitelné systémy hospodaření v krajině**  
Název tématu: **Příprava koncentrátů konopných bílkovin mechanickým způsobem**  
Zadávací katedra: **Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné**

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

Nažky resp. semena konopí setého (*Cannabis sativa* L.) představují zdroj vysoce kvalitního oleje, který je využíván pro lidskou výživu, ale také pro výrobu mastí a dalších léčebných prostředků a také pro technické účely. Převažujícím způsobem získávání oleje je lisování za studena, při kterém vznikají jako vedlejší produkt výlisky (zbytky semen resp. nažek). Tyto výlisky obsahují řadu dalších cenných látek, zejména bílkoviny a vlákninu. Po vhodném rozemletí je lze používat jako mouku, která může být přidávána do různých potravinářských výrobků. Na druhé straně může být tento materiál využíván i pro produkci bílkovinných koncentrátů vhodných pro přímou lidskou výživu či potravinářské aplikace.

Bakalářská práce (BP) bude zaměřena na přípravu koncentrátů konopných bílkovin z výlisků semen na základě mechanických principů - zejména kombinace mletí a prosévání. Řešení BP bude spočívat na přípravě výlisků pomocí lisu, pomletí výlisků na ultraodstředivém nebo planetovém mlýnu a následném prosévání získané mouky na sítích o různé velikosti ok. Touto procedurou dojde k získání několika velikostních frakcí mouky s rozdílným relativním zastoupením oplodí a částí vlastního semene, které mají vyšší obsah bílkovin než má oplodí (slupka). Frakce s nejvyšším zastoupením bílkovin mohou plnit roli bílkovinných koncentrátů pro přímou lidskou výživu. Výhodou je výroba nechemickou cestou a vyšší obsah potravní vlákniny. Řešení bude provedeno na 2-5 odrůdách a v několika opakováních. Bude vyhodnocen hmotnostní výtěžek jednotlivých frakcí a obsah sušiny a vlákniny. Formálně bude práce členěna obvyklým způsobem pro práce experimentálního charakteru (úvod, cíl, literární přehled, materiál a metody, výsledky, diskuze, závěr a seznam použité literatury a zdrojů). Literární přehled BP bude shrnovat dostupné poznatky z vědecké, odborné i firemní literatury (resp. zdrojů) českých a zahraničních autorů. Dosažené výsledky budou statisticky vyhodnoceny a zpracovány do podoby tabulek nebo grafů.

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

Rozsah grafických prací: **5 stran**  
Rozsah pracovní zprávy: **30 - 35 stran**

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Callaway J. C. (2004): Hempseed as a nutritional resource: An overview. Euphytica 140: 65-72.**

**Malomo S. A., Aluko R. E. (2015): 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 and Emerging Technologies 31: 151-159. Stražil Z. (2011): Konopí seté. In: Moudrý J. et al.: Alternativní plodiny. 1. vydání, ProfiPress, Praha, 142 s. (ISBN 978-8086726-40-3)**

**Tošovská M, Buchtová I. (2010): Situační a výhledová zpráva - len a konopí. Ministerstvo zemědělství ČR, Praha, 47 s. (ISBN 978-80-7084-900-7)**

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


Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.**  
Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

Konzultant bakalářské práce: **Ing. Veronika Bártová, Ph.D.**  
Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné


Ostatní konzultanti: **Ing. Josef Švajner**  
Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

Datum zadání bakalářské práce: **28. února 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce: **15. dubna 2019**

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

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**  
studijní oddělení  
Březinská 1088, 370 05 České Budějovice

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

V Českých Budějovicích dne 28. února 2018

### **Prohlášení**

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

Datum:

Podpis:

### **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat vedoucímu své bakalářské práce doc. Ing. Janu Bártovi Ph.D. za odborné vedení a cenné rady. Velké díky patří také Ing. Markétě Jarošové a Ing. Veronice Bártové Ph.D. za praktickou pomoc při provádění laboratorních analýz. Ráda bych poděkovala všem, včetně členů mé rodiny, kteří nějak přispěli, ať již přímo nebo nepřímo, k dokončení této práce.

## ABSTRAKT

Po lisování oleje ze semen konopí setého (*Cannabis sativa* L.) zůstane velké množství zbytkového materiálu, který je bohatý na velmi kvalitní bílkoviny obsahující všechny esenciální aminokyseliny. Tento „odpad“ lze semlít na mouku. V této práci bylo zjišťováno, zda by se suchým prosíváním konopné mouky mohlo v některé velikostní frakci dosáhnout zvýšení koncentrace bílkovin natolik, že by se dala využívat jako bílkovinný koncentrát.

Pokus byl prováděn na pěti odrůdách konopí, z jejichž semen byl olej vylisován za studena. Následně umletá mouka byla rozdělena na tři velikostní frakce. Nejhrubší obsahovala částice větší než 250  $\mu\text{m}$ , prostřední frakce se sestávala z částic menších než 250  $\mu\text{m}$  ale větších než 180  $\mu\text{m}$  a nejjemnější frakci tvořily částice menší než 180  $\mu\text{m}$ . Bílkoviny byly analyzovány různými laboratorními technikami.

Bylo zjištěno, že nejvíce bílkovin bylo zastoupeno v nejjemnější frakci. Jejich koncentrace se zde zvětšila z přibližně 24-27 % na asi 35-40 %.

**Klíčová slova:** *Cannabis*, konopí, proteinový koncentrát

## ABSTRACT

A large amount of residual material, which is rich in high-quality protein containing all essential amino acids, remains after pressing hemp seed oil (*Cannabis sativa* L.). This "waste" can be ground into flour. This thesis examines whether dry sieving of hemp flour could increase the protein concentration in some size fraction to such an extent that it could be used as a protein concentrate.

The experiment was carried out on five varieties of hemp from which was the cold-pressed oil acquired. The ground flour was subsequently divided into three size fractions. The coarsest fraction contained particles larger than 250  $\mu\text{m}$ , the middle fraction consisted of particles smaller than 250  $\mu\text{m}$  but larger than 180  $\mu\text{m}$  and the finest fraction composed of particles smaller than 180  $\mu\text{m}$ . Proteins were analyzed by various laboratory techniques.

Most proteins were found to be in the finest fraction. Their concentration increased here from about 24-27 % to 35-40 %.

**Key words:** *Cannabis*, hemp, protein concentrate

## OBSAH

1.	ÚVOD .....	9
2.	LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	10
2.1	<b>BOTANICKÁ CHARAKTERISTIKA.....</b>	<b>10</b>
2.1.1	POPIS.....	10
2.2	<b>PĚSTOVÁNÍ .....</b>	<b>10</b>
2.3	<b>CHEMICKÉ SLOŽENÍ KONOPNÉHO SEMENE .....</b>	<b>12</b>
2.3.1	OLEJ.....	12
2.3.2	BÍLKOVINY .....	13
2.3.3	SACHARIDY .....	14
2.3.4	MINERÁLNÍ LÁTKY .....	14
2.4	<b>ZÍSKÁVÁNÍ BÍLKOVINNÝCH KONCENTRÁTŮ .....</b>	<b>15</b>
2.4.1	PROSÉVÁNÍ.....	15
2.4.2	IZOELEKTRICKÉ SRÁŽENÍ PROTEINŮ .....	15
2.4.3	MICELIZACE PROTEINŮ .....	17
2.4.4	ENZYMATICKÉ ŠTĚPENÍ VLÁKNINY .....	18
2.5	<b>VLASTNOSTI KONOPNÝCH KONCENTRÁTŮ .....</b>	<b>19</b>
2.6	<b>VYUŽITÍ KONOPNÝCH BÍLKOVINNÝCH PŘÍPRAVKŮ .....</b>	<b>20</b>
2.7	<b>POUŽITÉ METODY .....</b>	<b>21</b>
2.7.1	STANOVENÍ OBSAHU DUSÍKATÝCH LÁTEK .....	21
2.7.2	SDS-PAGE ELEKTROFORÉZA .....	22
2.7.3	KOLORIMETRICKÉ STANOVENÍ OBSAHU BÍLKOVIN .....	23
3.	CÍL.....	24
4.	METODIKA .....	25
4.1	MATERIÁL.....	25
4.2	VÝPOČET HMOTNOSTI TISÍCE SEMEN.....	25
4.3	PŘÍPRAVA VZORKŮ .....	25
4.4	STANOVENÍ VÝTĚŽNOSTI .....	26
4.5	STANOVENÍ SUŠINY .....	26
4.6	STANOVENÍ OBSAHU DUSÍKATÝCH LÁTEK.....	26
4.7	SDS-PAGE ELEKTROFORÉZA PROTEINŮ .....	26
4.7.1	EXTRAKCE PROTEINŮ .....	26

4.7.2	ELEKTROFORÉZA .....	27
<b>4.8</b>	<b>STANOVENÍ OBSAHU BÍLKOVIN POMOCÍ BICINCHONINOVÉ KYSELINY .....</b>	<b>28</b>
4.8.1	EXTRAKCE PROTEINŮ .....	28
4.8.2	KVANTIFIKACE PROTEINŮ .....	28
<b>4.9</b>	<b>VYHODNOCOVÁNÍ VÝSLEDKŮ .....</b>	<b>29</b>
<b>5.</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>30</b>
5.1	HMOTNOST TISÍCE SEMEN .....	30
5.2	VÝNOSOVÉ HODNOTY .....	30
5.3	OBSAH SUŠINY .....	32
5.4	OBSAH DUSÍKATÝCH LÁTEK .....	33
5.5	OBSAH BÍLKOVIN .....	34
5.6	ELEKTROFORÉZA PROTEINŮ .....	35
<b>6.</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>36</b>
6.1	HMOTNOST TISÍCE SEMEN .....	36
6.2	VÝNOSOVÉ HODNOTY .....	36
6.3	OBSAH SUŠINY .....	37
6.4	OBSAH DUSÍKATÝCH LÁTEK .....	37
6.5	OBSAH BÍLKOVIN .....	37
6.6	ELEKTROFORÉZA .....	38
<b>7.</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>39</b>
<b>8.</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>40</b>
<b>9.</b>	<b>PŘÍLOHA.....</b>	<b>46</b>



## 1. ÚVOD

Konopí (*Cannabis sativa* L.), pěstované pro průmyslové účely vzbuzuje velký zájem pěstitelů, protože se jedná o tzv. udržitelnou plodinu (Mamone, 2019). Tato udržitelnost spočívá v jeho příznivém vlivu na půdu, vzduch, vodu a také na živé organismy, což je způsobeno mimo jiné silným a rozvětveným kořenem, který půdu provzdušňuje a brání půdní erozi. Široké listy zase zastíňují, a tudíž i potlačují, plevely, díky čemuž se prakticky nemusí používat herbicidy. Dalším benefitem mohutného olistění je, že zabraňuje vysychání půdy a po opadu listů se do ní vrací značné množství živin (Sladký, 2004; Miovský, 2008). Konopné rostliny rostou poměrně rychle, a proto je možné z nich získat za určitých podmínek obrovské množství biomasy (Jankauskiene, 2017). Velkou výhodou pro pěstování této plodiny je její přizpůsobivost. Přestože je konopí ve své podstatě teplomilná rostlina, přizpůsobí se i extrémně chladným a drsným podmínkám. V Himalájích je pěstováno až do nadmořské výšky 5 000 m a v Rusku až k polárnímu kruhu. Prostředí, ve kterém roste, se samozřejmě odrazí na jeho výnosech. Nejlépe se mu daří tam, kde se daří kukuřici (Sladký, 2004; Miovský, 2008). Naopak jistou nevýhodou související se suším počasím v posledních letech je, že na vláhu je konopí velmi náročné – k vytvoření stejného množství sušiny spotřebuje dvakrát více vody než obilniny. Nejvíce vody spotřebuje v prvním období růstu a když kvete, později snáší i přechodné sucho, ale celkové množství srážek by nemělo být nižší než 500 mm (Stražil, 2011).

Semena konopí mají vysokou nutriční hodnotu bohatou na fytoosteroly,  $\omega$ -3 a  $\omega$ -6 esenciální mastné kyseliny a proteiny (Mamone, 2019). Z konopných semen se primárně získává olej nejlépe lisováním za studena. Jako vedlejší produkt tohoto zpracování jsou pokrutiny, ve kterých je velké množství bílkovin (30-50 %). Tyto „zbytky“ mohou být přeměněny na různé formy práškových proteinových produktů (Malomo, 2015 b).

Konopná semena a výrobky z nich se často vyskytují v certifikovaných biopotravínách, které v posledních letech získaly větší popularitu (Vonapartis, 2015).

## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 BOTANICKÁ CHARAKTERISTIKA

Konopí seté (*Cannabis sativa* L.) je jednoletá rostlina z čeledi konopovité (*Cannabaceae*). Je cizosprašné, konkrétně větrosnubné, a to i na větší vzdálenost. Původně se jednalo pouze o dvoudomou bylinu, ale dlouholetým šlechtěním se získaly i jednodomé varianty, které jsou pro pěstování výhodnější (Sladký, 2004; Stražil, 2011).

#### 2.1.1 POPIS

Průměrně dosahuje stoněk výšky kolem 2,5 m, ale některé odrůdy mohou v dobrých podmínkách dosahovat výšky až přes 5 m. Je tvořen vysokým obsahem celulózy a ligninu, kvalitními lýkovými vlákny a cenným pazdeřím (Sladký, 2004). Výnosy stonků se pohybují kolem 9 t/ha a výnosy vláken jsou průměrně 1,8 t/ha.

Rostlina má charakteristicky střídavé, dlanité, tři až třináctičetné listy s krátkými stopkami. Celá je pokryta jemným chmýřím a její křovitý kořen sahá průměrně do hloubky 30-40 cm, v hlubokých půdách však až do dvou metrů (Stražil, 2011).

Plodem, který se často označuje jako semeno, je jednosemenná vejčitá nažka s tenkým oplodím (Sladký, 2004; Amaducci et al., 2015). Semena obsahují všechny esenciální aminokyseliny a olej, který je nutričně velmi hodnotný (Kolovrat, 2008). Jejich průměrný výnos činí 0,6 t/ha. Hmotnost tisíce semen (HTS) se pohybuje v hodnotách od 8 do 26 gramů, průměrně však dosahuje hodnoty 20 g (Stražil, 2011).

### 2.2 PĚSTOVÁNÍ

Půda pro pěstování konopí by ideálně měla být úrodná, hlinitá nebo písčitohlinitá, dostatečně hluboká (na hlubokých půdách kořen dosahuje do hloubky dvou metrů) a zpracovatelná, s nízkou spodní vodou a neutrální půdní reakcí (Stražil, 2011).

Při výběru stanoviště je třeba dbát, aby bylo chráněno před větrem, který zvyšuje výpar nejen z půdy, ale i ze samotných rostlin, které pak trpí suchem (Miovský, 2008).

Optimální je, když předplodina konopí zanechá čistou, kyprou půdu, zásobenou živinami, hlavně dusíkem. Mezi nejvhodnější předplodiny patří zejména ty, které jsou organicky velmi hnojené, jako například brambory nebo kukuřice, a rovněž leguminózy. Jelikož však není konopí na předplodinu příliš náročné, zařazuje se běžně mezi dvě obilniny a může se pěstovat i po sobě. Ono samo je velmi dobrou předplodinou, protože po jeho sklizni je půda čistá a v dobrém stavu, k čemuž přispívá rozvětvený kořen, který ji provzdušňuje (Miovský, 2008; Strašil, 2011).

Půda, do které se plánuje zasít konopná semena, by měla být dobře vyhnojená a bohatě zásobená humusem, protože rostliny jsou velmi náročné na živiny. Je možné aplikovat 30 t/ha i více chlévského hnoje nebo kejdy a dobře působí i zelené hnojení. Při podzimní orbě je možné zapravit do větší hloubky i fosforečná a draselná hnojiva. Při nedostatku vápníku se mohou vápenatá hnojiva přidat již k předplodině, nebo také zaorat na podzim. Konopí vápníku odebírá velké množství, a navíc potřebuje neutrální až zásadité pH půdy (Strašil, 2011). V červenci a červnu, kdy odebírá z půdy nejvíce živin, se doporučuje přihnojení dusíkem kolem 100 kg/ha a u konopí na semeno ještě 50 kg/ha draslíku a stejným množstvím fosforu (Sladký, 2004).

Před setím je třeba pomatovat na to, že konopí požaduje velmi dobrý vodní, vzdušný a živinný režim v půdě, a také se nesmí opomenout, že má slabý počáteční vývoj kořenové soustavy a je v této době citlivé na zaplevelení. Proto by měla ihned po sklizni předplodiny následovat podmítka a následně by měl být zaorán chlévský hnůj. Na podzim by se mělo orat co nejdříve do hloubky 25-30 cm a nechat půdu v hrubé brázdě.

Na jaře je dobré, stejně jako u ostatních jarních plodin, provést smykování nebo vláčení, případně obdobné zpracování půdy, a to hned jakmile to počasí dovolí. Díky tomu se půda urovná, zmenší se její plocha, která by měla styk se vzduchem, a tudíž nejsou tak velké ztráty vody. Po této operaci se hlídá, aby se nerozmožilo zaplevelení, a dle potřeby se může ještě kypřit společně se zapravováním minerálních hnojiv. Před setím se kypří pouze do hloubky setí (Strašil, 2011).

Výsevná dávka se liší podle účelu pěstování. Pokud je cílem, aby se sklídilo kvalitní zrno, vysévá se 100 až 200 klíčivých zrn na 1 m<sup>2</sup>, tj. 16 až 32 kg/ha. Při pěstování na vlákno je potřeba, aby byl porost hustší, čímž by rostliny dosahovaly vyššího vzrůstu, a tím i delších vláken. K tomuto účelu se tedy vysévá až

dvojnásobek výsevku na semeno (Sladký, 2004). Doba setí je v druhé polovině dubna až začátkem května. Doporučená šířka řádků u konopí na semeno činí 40-60 cm. Porosty na vlákno jsou hustší, šířka řádků je u nich 20-25 cm, ale může se zúžit i na 12-15 cm. Seje se do hloubky 2-3 cm, a aby semeno brzy vzešlo, je vhodné ho po zasetí uválet (Strašil, 2011).

Ochranné prostředky proti chorobám, škůdcům a plevelům nejsou v podstatě potřeba (Sladký, 2004). Konopí je proti chorobám a škůdcům velmi odolné, a ani nemá sklon k poléhavosti. Listové choroby u konopí navíc nezpůsobují přílišné škody, protože vzhledem k velké listové ploše nejsou pro rostlinu moc nebezpečné. Ohrožují ji jen choroby napadající stonky nebo kořeny, např. plíseň šedá (*Bortyitis cinerea* Pers.). Ze škůdců může škodit například dřepčík chmelový (*Psylliodes attenuata* Koch.) nebo mšice konopná (*Phorodon cannabis* Pass.) (Strašil, 2011). Při zrání ohrožuje výnos semen ozob ptáků a určitým rizikem jsou i neuvědomělí narkomani (Sladký, 2004). Díky rychlému růstu a velkému olistění konopný porost brzy zastíní a potlačí plevele (Miovský, 2008). Také je známo, že dokáže alelopaticky potlačovat okolní rostliny.

Vzhledem k náročnosti na živiny může konopí při jejich nedostatku trpět fyziologickými chorobami. Deficit všech živin nebo jen dusíku způsobuje zakrslý růst, chybějící draslík má za následek tzv. kaliovou mozaiku konopí spolu s prodloužením vegetační doby a oddálením kvetení (Strašil, 2011).

Sklizeň je ovlivněna účelem pěstování. Semena se sklízí pomocí sklízecích mlátiček (John Deere, Claas) nebo upravených sklízecích strojů v době, kdy jsou ve spodní polovině květenství zralá, nad tím ve voskové zralosti a na vrcholku ještě zelená (Bjelková, 2017).

## 2.3 CHEMICKÉ SLOŽENÍ KONOPNÉHO SEMENE

### 2.3.1 OLEJ

Nejhojněji zastoupenou složkou v konopném semeni je olej, kterého tato surovina obsahuje přes 30 % (Callaway, 2004). Konopný olej se skládá převážně z nenasycených mastných kyselin, z nichž dominantními jsou kyselina linolová ( $\omega$ -6) (597 g / kg) a kyselina  $\alpha$ -linolenová ( $\omega$ -3) (170 g / kg) (Vonapartis, 2015). Poměr  $\omega$ -6 mastných kyselin k  $\omega$ -3 mastným kyselinám ( $n_6 : n_3$ ) v konopném oleji je obvykle mezi 2 : 1 a 3 : 1, což je poměr považovaný za příznivý pro lidské zdraví.

Kromě toho jsou v konopném oleji také přítomny biologické metabolity obou zmíněných esenciálních mastných kyselin, kyselina  $\gamma$ -linolenová (18 : 3;  $\omega$ -6) a kyselina stearidonová (18 : 4;  $\omega$ -3).

Díky jedinečnému spektru mastných kyselin a jeho přímému dopadu na následný metabolismus esenciálních mastných kyselin v potravě, při kterém vznikají eikosanoidy, které zahrnují prostaglandiny a další důležité metabolity, může přidávání konopného oleje do stravy přispět ke zlepšení zdraví v širokém spektru akutních a chronických stavů. Esenciální mastné kyseliny si lidský organismus nedokáže sám vytvořit, proto se oleje obsahující vysoké hladiny těchto látek mohou použít k posílení lidského zdraví a vývoje. Konopný olej samozřejmě kromě esenciálních mastných kyselin obsahuje i další polynenasycené mastné kyseliny, které organismus využívá jako fosfolipidy při stavbě buněčných a organelových membrán. Další pozitivní vliv na lidské zdraví mají polynenasycené mastné kyseliny tím, že snižují hladiny LDL cholesterolu (Callaway, 2004).

### 2.3.2 BÍLKOVINY

Dále konopné semeno obsahuje 20–25 % hrubých bílkovin (Vonapartis, 2015). House, Neufeld a Leson (2010) uvádějí, že výlisky po vylisování oleje za studena, ve kterých zbyde ještě asi 10 % oleje, obsahují 30 až 50 % bílkovin. Tito autoři dodávají, že procentuální zastoupení bílkovin v pokrutinách ovlivňuje nejen způsob získávání oleje, ale i jejich následné zpracování, které nejčastěji zahrnuje mletí a následné prosévání nebo provívání, čímž se může obsah bílkovin zvýšit (House, 2010).

Bílkoviny obsažené v konopném semeni jsou snadno stravitelné, protože jsou v největší míře zastoupeny bílkoviny albuminem a globulinem edestinem, které jsou snadno štěpitelné a bohaté na esenciální aminokyseliny, proto je konopné semeno vynikajícím zdrojem lidské výživy (Callaway, 2004; Vonapartis, 2015). Konopná mouka například obsahuje všechny nezbytné aminokyseliny v nutričně dostatečných množstvích pro malé děti (Malomo, 2014). Nicméně to, jakou bude mít tento produkt aminokyselinovou kompozici, může být ovlivněno odrůdou, tzn. genetikou, agronomickými podmínkami a zpracováním (House, 2010). V konopné mouce je limitující aminokyselinou lysin a dalšími nedostatkovými aminokyselinami jsou leucin a tryptofan. Všechny ostatní aminokyseliny jsou zde zastoupeny v dostačujícím množství (House, 2010). Konopný protein je bohatý na

aminokyseliny, které obsahují síru, methionin a cystin, a navíc obsahuje velmi vysoké hladiny argininu a kyseliny glutamové (Callaway, 2004). Arginin je aminokyselina, která pomáhá ke zlepšování kardiovaskulárního zdraví, protože slouží jako prekurzor vazodilatačního činidla, oxidu dusnatého (Malomo, 2015 b).

Dle jedné studie byla stravitelnost bílkovin ve vzorcích celých semen konopí průměrně 85,2 % a ve vzorcích mouky 86,7 %. Tato studie však oddělila olej ze semen lisováním za studena, což nesnižuje stravitelnost proteinu. Při použití lisů pracujících při vysokém tlaku a teplotách by stravitelnost bílkovin ve vzorcích mouky byla nižší. Stravitelnost bílkovin je také ovlivněna obsahem antinutričních látek, které se vyskytují hlavně v obalových vrstvách semene (House, 2010).

### 2.3.3 SACHARIDY

Sacharidů je v konopném semeni 20-30 % (Vonapartis, 2015). Jsou zastoupeny především vlákninou, které je konopné semeno cenným zdrojem. Callaway (2004) uvádí ve své studii procentuální zastoupení sacharidů z celého konopného semene stejné jako procentuální zastoupení celkové vlákniny (27,6 %). Vzorek, který tento autor testoval, obsahoval 5,4 % stravitelné vlákniny a 22,2 % nestravitelné vlákniny (Callaway, 2004). Jiný autor, který sledoval obsah neutrálně detergentní vlákniny (NDF) a acido detergentní vlákniny (ADF), zjistil, že průměrná koncentrace NDF (celulóza, hemicelulóza a lignin) v jím sledovaném vzorku konopného semene činila 35,7 %, přičemž průměrná koncentrace pro ADF (celulóza a lignin) byla 27,8 % (Vonapartis, 2015). Většina frakcí vlákniny (NDF) z celých konopných nažek se nachází v jejich obalových vrstvách. Obsah vlákniny významně ovlivňuje stravitelnost bílkovinné složky konopné nažky. Odstranění oplodí z konopných nažek tudíž vede nárůstu obsahu tuků a bílkovin ve vzorcích o 50 % a k průměrnému zvýšení stravitelnosti bílkovin z 85,2 % na 94,9 % (House, 2010).

### 2.3.4 MINERÁLNÍ LÁTKY

Dle různých studií je obsah popela, což je celkový obsah anorganických složek, v konopném semeni 48–56 g / kg (Callaway, 2004; House, 2010; Vonapartis, 2015)

## 2.4 ZÍSKÁVÁNÍ BÍLKOVINNÝCH KONCENTRÁTŮ

Průmyslovou konopnou mouku získanou namletím výlisků, která běžně obsahuje asi 37 % bílkovin, lze zpracovat na bílkovinné izoláty obsahující až kolem 70 % proteinů. Ty jsou velmi cenným materiálem, protože, jak již bylo zmíněno výše, konopné bílkoviny jsou snadno stravitelné, je v nich zahrnuto nutričně významné množství všech esenciálních aminokyselin, zejména mají vysoký podíl aminokyselin obsahujících síru (methionin a cystein), a také obsahují vysoké množství argininu, který je prekurzorem vazodilatačního činidla, oxidu dusnatého. Složení a funkčnost proteinů v izolátu jsou ovšem silně ovlivněny metodou izolace (Callaway, 2004; Lu, 2010; Malomo, 2015 b).

K získání konopných výrobků s přidanou hodnotou není konopná mouka využívána zcela ideálně. Nejvyužívanější metoda k izolaci proteinů totiž zahrnuje alkalickou extrakci a izoelektrické srážení, což poškozuje jejich funkčnost, zejména rozpustnost a pěnovost (Lu, 2010; Malomo, 2015 b).

### 2.4.1 PROSÉVÁNÍ

Nejjednodušší způsob, jak získat konopnou mouku s vyšším obsahem bílkovin, je její suché prosévání. Nejhrubší frakce obsahuje převážně oplodí konopné nažky, a tudíž i velké množství vlákniny a minimum bílkovin (asi 10 %). Naproti tomu jemnější částice vznikají spíše z endospermu semene, a jsou proto velmi bohaté na bílkoviny, kterých obsahují přes 40 %. Nevýhodou těchto koncentrátů je, že v nich zůstane většina antinutričních látek, jako jsou inhibitory trypsinu, kyselina fytová, glukosinoláty a kondenzované taniny. Proto je tato technika vhodná pro dosažení zvýšené koncentrace prospěšných látek, čímž by se připravil materiál k následné úpravě, při které by se zneškodnily látky bránící jejich využitelnosti (Pojić, 2014).

### 2.4.2 IZOELEKTRICKÉ SRÁŽENÍ PROTEINŮ

Při této metodě se konopné bílkoviny vyextrahují za alkalických podmínek a následně se vysráží při mírně kyselém pH. Díky tomu se může koncentrace proteinů, tvořených především zásobním proteinem edestinem, zvýšit téměř o 86 % vzhledem k původnímu materiálu. Výhoda této techniky tkví v tom, že chemická činidla v ní používaná jsou levná a postup je relativně jednoduchý, takže se může využívat v již existujících průmyslových zařízeních (Mamone, 2019).

Použití izolovaných rostlinných proteinů touto metodou v potravinářství je ale omezené v důsledku jejich nepříjemné chuti a barvy spojené s koextrahovaným neproteinovým materiálem (např. fenolickými sloučeninami).

Konopná mouka je hojným zdrojem fenolických sloučenin, které se mohou při alkalických podmínkách extrahovat spolu s proteiny, což má za následek vznik tmavě zelené až hnědé barvy proteinových izolátů. Navíc bylo prokázáno, že za alkalických podmínek fenolické sloučeniny podléhají enzymatické i neenzymatické oxidaci za vzniku chinonů, které se pak mohou vázat na protein a přispívat k ještě tmavší barvě izolátů. Tmavnutí podporují i polymerační reakce fenolických látek.

Kromě nežádoucího zbarvení je dalším problémem spojeným s vysokým obsahem fenolů v proteinových izolátech nepříjemná (hořká) chuť a svíravost.

Nízké hodnoty pH při extrakci dále způsobují agregaci edestinu, což má za následek špatnou rozpustnost konopného proteinu. Nerozpustné komplexy vznikají také kvůli vyššímu obsahu kyseliny fytové, která se při pH pod izoelektrickým bodem váže s proteiny. To opět brání jeho využití, navzdory příznivému nutričnímu profilu.

Agregovaná struktura má ale i své výhody, protože umožňuje větší zadržování vody ve vytvořených pórech prostřednictvím kapilárních mechanismů. Kromě toho může částečná denaturace proteinu vést k expozici postranních řetězců polárních aminokyselin, se kterými by mohly interagovat další molekuly vody prostřednictvím vodíkových můstků (Hadnađev, 2018).

Horší funkční vlastnosti proteinových izolátů (např. rozpustnost proteinu, index emulgační aktivity, index stability emulze), které mohou značně omezit jejich aplikaci v potravinářství, je snaha odstranit pomocí dalších úprav. Yin (2008) zkoumal vliv enzymatické hydrolýzy trypsinem na tyto vlastnosti a zjistil, že hydrolýza sice výrazně zlepšila rozpustnost proteinu, ale ještě víc zhoršila ostatní funkční vlastnosti (Yin, 2008).

Jako vhodnější prostředek pro zlepšení funkčních vlastností konopného proteinu se zdá být chemická úprava. Bylo totiž potvrzeno, že acylační (konkrétně acetylační a sukcinylační) zpracování rostlinných proteinů vede ke zvýšení jejich rozpustnosti, schopnosti vázat vodu, kapacity adsorpce tuku a zlepšení emulgačních vlastností. Při acetylaci a sukcinylaci konopného izolátu, použitím anhydridů kyselin octové a jantarové jako acylačních činidel, bylo zjištěno, že rozsah acetylace byl vyšší než rozsah sukcinylace při stejném množství acylačního činidla. Nicméně ani



chemická úprava proteinů nevedla ke zlepšení všech jejich funkčních vlastností v ideálním rozsahu, například modifikace pomocí sukcinylu vedla ke zlepšení jejich rozpustnosti a emulgační aktivity, ale snížila se při ní emulgační stabilita, a acetyl zase zlepšil emulgační aktivitu proteinů v mnohem menším měřítku než sukcinyl (Yin, 2009).

### 2.4.3 MICELIZACE PROTEINŮ

Aby nedocházelo k poškození proteinů již během jejich izolace, lze je extrahovat roztokem soli (NaCl), následně nerozpustný materiál odstředit a ze solného roztoku vysrážet bílkoviny, které se získají dialýzou nebo, po zředění studenou vodou, centrifugací. V solném roztoku se rozpustí hlavně globulinové bílkoviny tvořené téměř výhradně edestinem.

Tato vyšší selektivnost postupu vzhledem k určité proteinové frakci vede ve srovnání s obecnějším postupem izoelektrického srážení k nižší výtěžnosti bílkovinného izolátu. Dle určité studie bylo množství proteinu izolovaného pomocí isoelektrického srážení dvakrát vyšší než množství proteinu extrahovaného roztokem soli. Nicméně obě izolační techniky jsou silně závislé na různých parametrech izolace a na předchozím způsobu získávání mouky (například velké mechanické síly při zpracovávání mohou způsobit interakce mezi proteiny, a tím snížit jejich rozpustnost během izolace), takže jejich srovnávání je velmi obtížné (Hadnašev, 2018).

Výhodou micelizační metody je vyšší kvalita izolátu, která souvisí právě s vyšším obsahem edestinu, který obsahuje všechny esenciální aminokyseliny (Hadnašev, 2018; Mamone, 2019). Izolát vyrobený touto metodou má také trochu vyšší obsah proteinu, než kdyby byl izolován izoelektricky, což může být způsobeno vyloučením většího množství neproteinových částic díky silnější interakci mezi proteiny při micelizaci.

Při srovnání s izoláty získanými izoelektricky jsou izoláty získané micelizací také světlejší a méně zarudlé a zažloutlé. Barevné rozdíly mezi proteinovými izoláty jsou přisuzovány různým extrakčním podmínkám používaným během izolace proteinu z konopné mouky. Mírnější extrakční podmínky použité micelizaci proteinu nepodporují oxidační a polymerační reakce semenných fenolů. Celkový obsah fenolů je navíc při použití této metody o 28 % nižší než při použití

izoelektrického srážení, a to způsobuje nejen přitažlivější zbarvení, ale i méně trpkou chuť.

Pro konopný protein je typická nízká rozpustnost ve srovnání s jinými rostlinnými proteiny, což je způsobeno obzvláště agregací edestinu při pH nižším než 7,0. Protože micelizace nechává proteiny v přirozenějším stavu, mají významně vyšší rozpustnost, zatímco metoda izoelektrického srážení vede ke střední denaturaci proteinu, a tudíž i k hydrofobním interakcím mezi molekulami proteinů a tvorbě nerozpustných agregátů. Příznivý vliv na rozpustnost má také nižší obsah kyseliny fytové.

Jedinou nevýhodou této techniky oproti metodě izoelektrického srážení, je nižší schopnost vázat vodu (Hadnađev, 2018).

#### 2.4.4 ENZYMATICKÉ ŠTĚPENÍ VLÁKNINY

Jinou metodou zvyšování podílu bílkovin v konopné mouce je rozštěpení většiny neproteinových složek a jejich následné odstranění membránovou filtrací, čímž se oproti původnímu obsahu množství bílkovin zdvojnásobí. K rozložení většiny polysacharidů (vlákniny) a fytátů se využívají potravinářské enzymy (karbohydrázy, fytázy). Rozložený materiál s nízkou molekulovou hmotností se vyčleňuje ultrafiltrací nebo diafiltrací. Tímto postupem se tolik neničí bílkoviny jako při alkalické extrakci s izoelektrickým srážením, a zároveň se odstraní vláknina a fytáty, které snižují rozpustnost proteinů. Takto izolovaný protein má dle jedné studie 74% obsah proteinu s vynikajícími funkčními vlastnostmi, zejména rozpustností a stravitelností, ve srovnání s jinými podobnými produkty. Nedochozí zde ani k výrazným změnám v aminokyselinovém složení, kromě mírného poklesu obsahu argininu ve prospěch valinu a leucinu, což lehce snižuje jeho účinnost na zlepšování kardiovaskulárního zdraví. Přesto zůstává poměr lysinu ku argininu nižší než u bílkovinných produktů například ze lnu nebo sóji, a tudíž jeho vliv na zdraví oběhové soustavy není zanedbatelný. Je nutné dodat, že obsahy esenciálních aminokyselin v izolátech získaných touto metodou jsou v porovnání s izoelektrickou metodou vyšší. Lze říci, že se jedná o účinný způsob, jak zajistit vysoký výtěžek bílkovin s minimální konformační denaturací. Navíc lze tento způsob izolace proteinů provádět i průmyslově (Malomo, 2015 b).

## 2.5 VLASTNOSTI KONOPNÝCH KONCENTRÁTŮ

Vlastnosti bílkovinných koncentrátů závisí na tom, z jakých bílkovin se skládají a jaké mají dané bílkoviny vlastnosti. Složení konopného proteinu je jedinečné, hlavní složkou je globulin nazývaný edestin, který tvoří 65 % z konopných bílkovin, a další důležitá bílkovina je albumin, který zde zabírá 33 %. Edestin se skládá ze šesti identických podjednotek, jejichž kyselá a zásaditá část je vždy spojená jednou disulfidovou vazbou (Malomo, 2015 a; Teh, 2016; Mamone, 2019).

Ve srovnání s jinými rostlinnými proteiny (např. sójovým) je ten konopný méně rozpustný, což je způsobeno tvorbou disulfidových vazeb mezi podjednotkami edestinu při kyselém pH (Hadnačev, 2018). Rozpustnost proteinu totiž nastává, když se molekuly odpuzují v důsledku elektrostatických interakcí, které ionizují vnitřní nepolární skupiny proteinu, čímž se začne rozkládat polypeptidový řetězec. Zatímco albumin má minimální rozpustnost při pH 3,0, minimální hodnota rozpustnosti pro globuliny může být pozorována již při pH 5,0.

Na druhou stranu, díky interakcím mezi proteiny se na nich tvoří lepší povrchové membrány, což má za následek vyšší emulgační schopnost. Proto, když při pH 5,0 molekuly globulinu nejvíce interagují, tvoří se v roztoku nejmenší kapičky oleje, což právě charakterizuje lepší emulgační činnost. Celkově se konopné bílkovinné koncentráty vyznačují tím, že tvoří emulzi s malou velikostí částic a vykazují lepší emulgační aktivitu ve srovnání s jinými rostlinnými proteiny (Malomo, 2015 a).

V porovnání s jinými plodinami obsahuje konopné semeno jen velmi nízké množství antinutričních látek, jako jsou například inhibitory trypsinu, díky čemuž je lépe stravitelné a při jeho trávení se uvolňuje významné množství biologicky přístupných aminokyselin.

Mamone (2019) ve své práci uvádí, že při analýze bílkovinných izolátů z konopí nezjistil žádný ze známých alergenů ani před, ani po simulovaném gastrointestinálním trávení. Konopí je považováno za mírný alergen, ale většina hlášených případů možné alergie na konopí souvisela s užíváním této rostliny jako drogy (Mamone, 2019).

## 2.6 VYUŽITÍ KONOPNÝCH BÍLKOVINNÝCH PŘÍPRAVKŮ

Konopné koncentráty lze, díky jejich užitečným vlastnostem, použít jako zlepšující složky v potravinách. Jedná se o vhodný alternativní zdroj funkčních proteinů (Malomo, 2015 a). Velkou výhodou jsou nižší náklady spojené s jejich získáváním ve srovnání s živočišnými bílkovinami, a proto mohou být prostředkem k výrobě levných potravinářských přísad (Malomo, 2014).

Konopné semeno má vysokou nutriční hodnotu, takže by mohlo být využíváno jako cenná složka bezlepkového chleba, který je obvykle chudší na živiny než pšeničný nebo žitný chléb. Přidáním výrobku z konopných pokrutin, ať už se jedná o bílkovinný koncentrát nebo jen o konopnou mouku, se v bezlepkovém pečivu výrazně zvýší obsah proteinů, tuků, minerálních látek a vlákniny (Korus, 2017). Všechny tyto složky jsou nutričně přínosné. Konopné proteiny, tvořené v první řadě edestinem, obsahují všechny esenciální aminokyseliny. Samotný termín „edestin“ pochází z řeckého „dobré k jídlu“ (Mamone, 2019). Konopný olej, který obsahuje 80 % polynenasycených mastných kyselin, je velmi bohatým zdrojem kyseliny linolové a  $\alpha$ -linolenové (Callaway, 2004). Obohacení chleba o vlákninu je považováno ze zdravotního hlediska za prospěšné. Konopná mouka je významným zdrojem zejména nerozpustné dietní vlákniny.

Podíl bílkovinného koncentráту může také zlepšovat pekařské vlastnosti těsta. Korus (2017) při sledování reologických vlastností těsta s přídavkem konopné mouky a konopného koncentráту zjistil, že nahrazení 10 % škrobu konopným proteinovým koncentrátem způsobilo oslabení těsta. Avšak 20% náhrada měla za následek přesně opačný efekt – vedla k posílení těsta. To může být způsobeno zvýšenou absorpcí vody proteinem. Přidání konopné mouky do těsta nemělo, dle již zmiňované studie, tak významné vlivy na reologické moduly, jaké byly pozorovány při přidání proteinového koncentrátu. Přídavek konopné mouky některé vlastnosti těsta zhoršil, jiné zůstaly srovnatelné kontrolou (těsto bez konopných přísad).

Nahrazení části škrobu v receptuře chleba koncentrátem konopných bílkovin nebo konopnou moukou vede k významnému zvětšení objemu chleba, což je způsobeno především schopností těsta udržet porézní strukturu tvořenou oxidem uhličitým vznikajícím během fermentace. Tuto schopnost podporuje obzvláště přítomnost bílkovin, které zpočátku absorbují vodu a bobtnají, a při vysokých teplotách denaturují. Zvětšený objem chleba je tedy více zřejmý u vzorků s přídavkem bílkovinného koncentrátu než u vzorků s konopnou moukou. Na druhou stranu při

pečení chleba s přidanou konopnou moukou dochází k nižšímu odpařování vody, a tudíž k nižším ztrátám.

Dalšími vlastnostmi chleba s konopnou příměsí je zvýšená poréznost skývy, zlepšené sensorické hodnoty, zejména barva a chuť, a pomalejší „stárnutí“ tzn. tvrdnutí (Korus, 2017).

## 2.7 POUŽITÉ METODY

### 2.7.1 STANOVENÍ OBSAHU DUSÍKATÝCH LÁTEK

Stanovit obsah dusíku ve vzorku lze několika způsoby. Mezinárodní referenční metodou je metoda dle Kjeldahla, přestože Dumasova metoda byla objevena o více jak padesát let dříve. V současnosti je Dumasova metoda na vzestupu a začala nazpět nahrazovat Kjeldahlovu metodu, což nastalo díky zlepšování technologií analyzátorů dusíku při suchém spalování (Jung, 2003; Serrano, 2013).

Výhodou Kjeldahlovy metody je její vysoká přesnost, například v jedné studii, která porovnávala obě již zmíněné metody, byla u vzorků mléka zjištěna při Dumasově metodě standardní odchylka 0,082, zatímco u Kjeldahlovy metody je u vzorků mléka s typickým obsahem bílkovin kolem 3,3 g / l standardní odchylka menší než 0,020 (Saint-Denis, 2004). Nicméně má tato metoda i řadu nevýhod, hlavně to, že je spojena s použitím korozivních a toxických chemikálií, které se navíc po splnění svého účelu stávají odpadem. Zejména pro průmyslové aplikace je velkou nevýhodou její časová náročnost (trvá mnoho hodin). A to, že se skládá z několika kroků, poskytuje mnoho příležitostí k chybám (Saint-Denis, 2004; Jung, 2003). Hlavními přednostmi Dumasovy metody je tedy to, že je rychlejší (trvá méně než čtyři minuty), ekonomičtější, šetrnější k životnímu prostředí a bezpečnější než metoda dle Kjeldahla (Serrano, 2013; Elementar, 2019).

Kjeldahlova metoda je založena na převedení všech forem dusíku na amoniak a následném stanovení jeho obsahu. Jelikož je některé sloučeniny dusíku velmi obtížné, možná i nemožné, převést na amoniak, dosahuje tato metoda nízkých výtěžků dusíku z anorganických sloučenin, jako jsou dusičnany a dusitany. Důsledkem toho bývají hodnoty získané pomocí Dumasovy metody mírně vyšší než hodnoty zjištěné Kjeldahlovou metodou. Z toho lze vyvodit, že Dumasova metoda

poskytuje spolehlivější výsledky obsahu dusíku než Kjeldahlova (Jung, 2003; Serrano, 2013).

Princip Dumasovy metody spočívá v přeměně všech forem dusíku ve vzorku na oxidy dusíku a plynný dusík spalováním v atmosféře kyslíku při teplotě 800-1000 °C. Všechny vzniklé plyny vzniklé spalováním ( $O_2$ ,  $CO_2$ ,  $H_2O$ ,  $N_2$  a  $NO_x$ ) se shromažďují a procházejí přes několik sorpčních kolon, kde se zachytí všechny plyny, kromě dusíku a jeho oxidů. Ty jsou nesené na měďnatý katalyzátor, kde se oxidy dusíku redukují na plynný dusík ( $N_2$ ). Hodnoty obsahu dusíku jsou následně měřeny tepelně-vodivostním detektorem. Zjištěná koncentrace dusíku ve vzorku se přepočte na obsah dusíkatých látek (NL) pomocí převodního faktoru, který je obecně pro potraviny 6,25 (Jung, 2003; Saint-Denis, 2004; "Dumasova metoda", 2012).

### 2.7.2 SDS-PAGE ELEKTROFORÉZA

Obecně je elektroforéza separační technika založená na diferenciálním transportu elektricky nabitých částic. Separace je primárně založena na rozdílech v hustotě elektrického náboje separovaných částic, která je spojena s jejich velikostí, protože velikost částic je ovlivněna tloušťkou elektrické dvojvrstvy (Janča, 2000).

K separaci proteinů s relativní molekulovou hmotností větší než 10 kDa se používá elektroforéza na polyakrylamidovém gelu probíhající v prostředí dodecyl sulfátu sodného (SDS-PAGE). Menší proteiny se touto metodou zjišťují obtížně v důsledku nízké schopnosti vazby na dodecyl sulfát sodný (SDS), a tak se k jejich zjištění používají jiné gely nebo jiné podmínky elektroforézy (např. Tricin-SDS-PAGE) (He, 2011).

V metodě SDS-PAGE slouží dodecyl sulfát sodný jako anionický detergent, který působí na proteinový vzorek při jeho přípravě a v gelovém systému i při vlastní separaci (Bárta, 2010).

Když se SDS přidá ke vzorku, proteiny tvoří aniontové micely s konstantním záporným nábojem na jednotku hmotnosti. Naruší se terciární a sekundární struktury a polypeptidy se rozloží. Aby se toho dosáhlo úplně, musí být disulfidové vazby mezi cysteiny štěpeny redukčním činidlem, jako je třeba 2-merkaptoethanol (BME) nebo dithiotreitol (Friedman, 2009).

Během elektroforézy migrují všechny vzniklé SDS-peptidové komplexy v polyakrylamidovém gelu o vhodné porozitě směrem ke kladné elektrodě. Jejich elektroforetická mobilita závisí právě na molekulární hmotnosti. Vztah mezi relativní

mobilitou proteinu a jeho molekulovou hmotností je hyperbolický, ale z praktického hlediska se běžně převádí do lineární podoby. Ze směsi proteinů o známé molekulové hmotnosti, tzv. markerů, lze tudíž sestavit kalibrační křivku pro stanovení molekulových hmotností i u neznámých proteinů (Friedman, 2009; Bárta, 2010).

Detekce proteinových pruhů na gelu se provádí barvením roztokem barvy Coomassie Blue. Tím se ale obarví i pozadí gelů, a proto je nutné nechat je odbarvit. Následuje dehydratace a sušení gelů a vyhodnocení získaných dat pomocí obrazové analýzy a speciálního software. Jedná se o časově velmi náročnou metodu, která ve většině případů trvá i několik dnů (Bárta, 2010).

### 2.7.3 KOLORIMETRICKÉ STANOVENÍ OBSAHU BÍLKOVIN

Celkový obsah proteinů se stanovuje pomocí bicinchoninové kyseliny. Tato metoda je založená na redukcí  $\text{Cu}^{2+}$  na  $\text{Cu}^+$  pomocí proteinu v alkalickém prostředí (tzv. biuretová reakce) a následně velmi citlivé a selektivní spektrofotometrické detekci  $\text{Cu}^+$  za použití činidla obsahujícího bicinchoninovou kyselinu (BCA). BCA reaguje s měďnými ionty za vzniku chelátu obsahujícího dvě molekuly BCA a jeden měďný ion. Tento ve vodě rozpustný komplex má intenzivní fialovou barvu s maximem absorpance při 562 nm, která je téměř lineární se zvyšujícími se koncentracemi proteinu, pokud jsou tyto koncentrace v rozmezí od 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  do 2000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Fialová barva se ve vzorku neustále vyvíjí, nicméně po inkubaci je rychlost vyvíjení barvy dostatečně pomalá, aby bylo možné společně analyzovat velké množství vzorků.

Koncentrace neznámých proteinů se stanovuje z grafu závislosti absorpance na koncentraci, který se vytvoří z hodnot naměřených u standardních proteinových roztoků. Jako standardy se mohou použít například bovinní sérový albumin (BSA) nebo třeba bovinní gama globulin (BGG). Výběr standardu závisí typu testovaných bílkovin (Thermo Scientific, 2013; Yalamati, 2015).

### 3. CÍL

Kromě zhotovení literárního přehledu z odborné literatury bylo cílem této bakalářské práce:

1) připravit mechanickým způsobem několik typů konopných mouk o různé koncentraci bílkovin z výlisků konopných nažek, namletím na mouku a rozdělením na velikostní frakce,

2) vyhodnotit výtěžek pokrutin, oleje a jednotlivých velikostních frakcí mouky, a také obsah sušiny,

3) pomocí různých laboratorních analýz zjistit procentické zastoupení bílkovin v mouce i jejích frakcích a určit, která frakce by mohla plnit roli bílkovinných koncentrátů.



## 4. METODIKA

### 4.1 MATERIÁL

Ve své práci jsem se zabývala pěti odrůdami konopí setého (*Cannabis sativa* L.) dodanými českou společností HEMP PRODUCTION s.r.o.

Byly to: dvoudomá Finola a jednodomé Fedora 17, Futura 75, Tygra a USO 31 (Grabowska, 2009; Kabašta, 2014; Ihempfarms, 2017). Nejranější z nich byla Finola, která se řadí mezi středně rané odrůdy konopí, ostatní odrůdy byly středně pozdní, jak vyplývá z tab. č. 1, která popisuje vlastnosti těchto odrůd.

Tab. č. 1: Vlastnosti hodnocených odrůd

Odrůda	Finola	Fedora 17	Futura 75	Tygra	USO 31
Doba vegetace [dny]	100-120	130	140	140	125
Výška [cm]	150	200-250	250-350	281	200-250
HTS [g]	12-15	16-18	16-18	14	16-18
Obsah THC [%]	0,10-0,15	<0,12	<0,12	0,046	<0,06

HTS = hmotnost tisíce semen, THC = tetrahydrocannabinol (Upraveno z: Callaway, 2004; Grabowska, 2009; Callaway, 2013; Kabašta, 2014; Ihempfarms, 2017; Agrolitpa, 2019)

### 4.2 VÝPOČET HMOTNOSTI TISÍCE SEMEN

Ze všech odrůd bylo po třech opakováních napočítáno 500 nažek, které byly následně zváženy, navážená hodnota vynásobena dvěma a od každé odrůdy udělán průměr.

### 4.3 PŘÍPRAVA VZORKŮ

Ze všech odrůd bylo po třech opakováních analyticky naváženo kolem sto gramů nažek, ze kterých byl vylisován olej. Z výlisků byla umleta mouka na ultraodstředivém mlýnu ZM 100 (Schoeller instruments, Německo), která byla následně sušena při 40 °C 24 hodin. Poté byla vysušená mouka prosívána na tři

velikostní frakce – na částice větší než 0,250 mm, menší než 0,250 a zároveň větší než 180 mm a nejjemnější frakci tvořily částice menší než 0,180 mm.

Během této přípravy vzorků k dalším analýzám byl zjišťován výnos jednotlivých materiálů z konopného semene.

#### 4.4 STANOVENÍ VÝTĚŽNOSTI

Zvážením pokrutin, které vznikly po vylisování leje, byla gravimetricky určena výtěžnost tohoto materiálu. Po umletí mouky byly rovněž vázkovou analýzou zjištěny ztráty při mletí. Všechny frakce prosáté mouky byly opět váženy a bylo vypočítáno jejich procentické zastoupení v mouce.

#### 4.5 STANOVENÍ SUŠINY

Do váženek bylo s analytickou přesností naváženo po dvou opakování kolem 2 g vzorků hodnocených vzorků. Po tříhodinovém sušení při 150 °C v sušárně UN 75 (Memmert, Německo) byl zjištěn rozdíl hmotnosti a z něj byl vypočítán obsah sušiny.

#### 4.6 STANOVENÍ OBSAHU DUSÍKATÝCH LÁTEK

Na analytických vahách bylo do cínových fólií přesně naváženo po dvou opakování kolem 25 mg ze všech vzorků včetně jednotlivých opakování z odrůd a každá navážka byla těsně zabalena. Analýza byla prováděna pomocí analyzátoru rapid N cube (Elementar, Germany). Jako standard pro stanovení denního faktoru byla použita kyselina asparagová, která byla navážena do cínových fólií po 25 mg ve čtyřech opakování. Po stanovení denního faktoru byla provedena vlastní analýza vzorků, přičemž před každou odrůdou byla jako kontrola analyzována kyselina asparagová.

Hodnoty obsahu dusíku byly pomocí přepočtového faktoru 6,25 automaticky převáděny na obsah dusíkatých látek (NL).

#### 4.7 SDS-PAGE ELEKTROFORÉZA PROTEINŮ

##### 4.7.1 EXTRAKCE PROTEINŮ

Do centrifugačních mikrozumavek bylo s analytickou přesností naváženo kolem 50 mg vzorku konopné mouky, do které byl přidán 1 ml extrakčního pufru (0,0625M Tris-HCl; pH=6,8; 5 % BME; 2 % SDS). Před extrakcí, která trvala

3 hodiny v ledu při 4 °C, a během ní byly vzorky promíchány. Po ukončení extrakce byly vzorky 15 minut centrifugovány při 4 °C. Poté byl čirý supernatant z každého vzorku odpipetován (800 µl) do nové mikrozkušavky. Vzorky byly uchovávány v mrazícím boxu.

#### 4.7.2 ELEKTROFORÉZA

Separace probíhala na diskontinuálním denaturačním PAGE systému, který se skládal ze 4% zaostřovacího gelu (pH=6,8; +SDS) a 10% separačního gelu (pH=10; +SDS). Jamky zaostřovacího gelu byly naplněné elektrodoým Tris-glycinovým-SDS pufrem. Metoda SDS-PAGE byla uskutečněna na systému vertikální elektroforézy SE 600 (Hoeffer, USA).

Před elektroforézou byl supernatant zředěn destilovanou vodou v poměru 1:1 a 100 µl tohoto roztoku bylo smícháno s 25 µl nanášecího pufu. Následovalo zahřívání vzorků na teplotu 99 °C po dobu 3 minut. Po zchlazení byly nanášeny do jamek v zaostřovacím gelu v množství 10 µl. Do první jamky byl vždy nanesen hmotnostní marker Blue Protein ladder 5–245 kDa (Central European Biosystems, ČR). Gely se vzorky byly vloženy do vertikální elektroforetické vany s elektrolytem (0,192 M glycin, 0,025 M Tris, 0,1 % SDS). Elektroforéza probíhala prvních 30 minut při napětí 150 V a následně 4-6 hodin při napětí 200 V. Aby bylo chlazení účinnější byla sestava v průběhu separace proteinů umístěna v chladničce.

Po skončení elektroforézy byly vyjmuté gely opláchnuty destilovanou vodou a nechány do druhého dne (tj. min. 14 hodin) namočené v roztoku složeného z methanolu, kyseliny octové a destilované vody v poměru 5:1:4 s 0,1 % barviva Coomassie Brilliant Blue R-250. Tím došlo k obarvení separovaných proteinů. Aby se barvicí roztok vymyl z pórů gelů, nechaly se odbarvovat v roztoku methanolu, kyseliny octové a destilované vody v poměru 2,5:1:6,5 při aktivním třepání o velmi nízké intenzitě na třepačce.

Odbarvené gely byly skenovány pomocí fotodokumentačního zařízení Gel Doc XR+ (Bio-Rad, USA) a digitalizovaný záznam byl vyhodnocen pomocí software Image Lab (Bio-Rad, USA).

## 4.8 STANOVENÍ OBSAHU BÍLKOVIN POMOCÍ BICINCHONINOVÉ KYSELINY

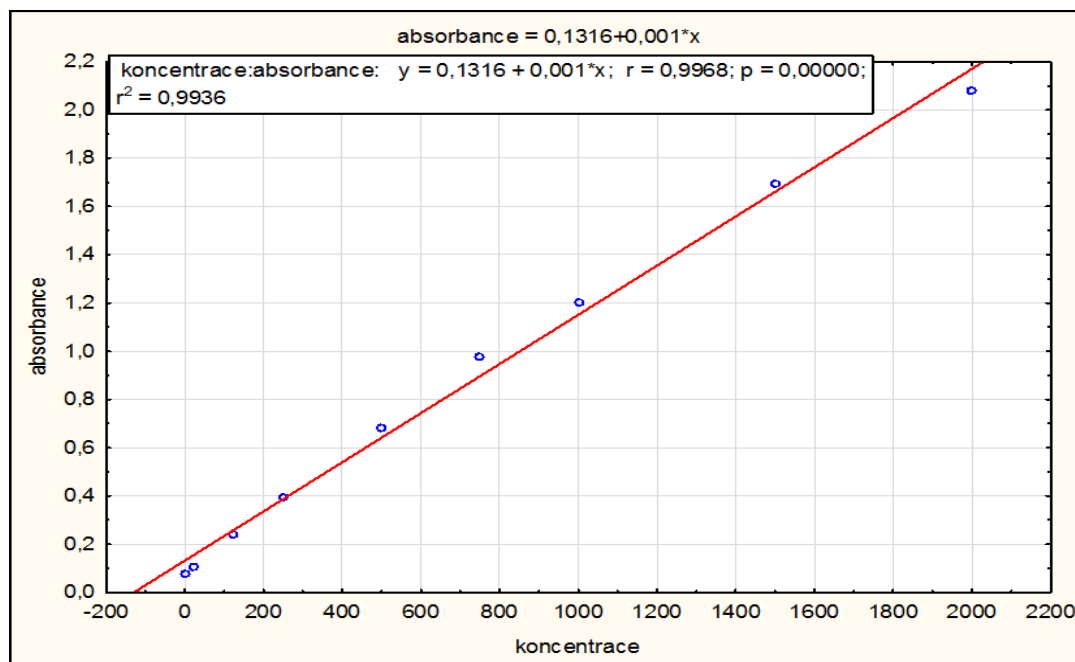
### 4.8.1 EXTRAKCE PROTEINŮ

Extrakce proteinů na bicinchoninovou metodu probíhala obdobně jako jejich extrakce na elektroforézu. Rozdíl byl pouze ve složení extrakčního pufru, který v tomto případě neobsahoval merkaptoethanol. Do centrifugačních mikrozkuvek s 50 mg vzorku konopné mouky byl přidán 1 ml extrakčního pufru (0,0625M Tris-HCl + 2% SDS). Před extrakcí, která trvala 3 hodiny v ledu při 4 °C, a během ní byly vzorky promíchány. Po ukončení extrakce byly vzorky 15 minut centrifugovány při 4 °C. Čirý supernatant byl odpipetován ve množství 800 µl do nové mikrozkuvky. Vzorky byly uchovávány v mrazícím boxu.

### 4.8.2 KVANTIFIKACE PROTEINŮ

Ke kvantifikaci celkových proteinů metodou BCA byl použit kit Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Kalibrační řada (obr. č. 1) byla sestavena z různých koncentrací standardu, kterým byl bovinní sérový albumin (BSA).

Obr. č. 1: Kalibrační křivka



(Autor: Veronika Bártová)

Nejprve se připravil pracovní roztok tím, že se smíchalo 50 dílů reagentu A s 1 dílem reagentu B. Reagent A se skládá z uhličitanu sodného, hydrogenuhličitanu sodného, kyseliny bicinchoninové a vinanu sodného v 0,1M roztoku hydroxidu sodného. Reagent B je 4% roztok síranu mědnatého.

Kvůli vysoké koncentraci bílkovin bylo nutno vzorky zředit destilovanou vodou. První a druhé frakce byly zředěny 900 $\mu$ l destilované vody na 100  $\mu$ l supernatantu. Pro třetí frakce bylo toto ředění nedostačující, a tak byly zředěny 950  $\mu$ l destilované vody na 50  $\mu$ l supernatantu.

Dále bylo odpipetováno po 100  $\mu$ l ze zředěných vzorků do kyvet a do každého přidáno 2000  $\mu$ l pracovního roztoku. Kyvety byly zavíčovány, důkladně promíchány a dány inkubovat při teplotě 37 °C po dobu 30 minut.

Absorbance byla měřena na přístroji xMark<sup>TM</sup> Microplate Absorbance Spectrophotometer (Bio-Rad, USA), na kterém byla nastavena vlnová délka 562 nm.

#### 4.9 VYHODNOCOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Zjištěné výsledky byly vyhodnoceny dvoufaktorovou a třífaktorovou analýzou metodou ANOVA v programu Statistica. Ke srovnávání byl využit Fisherův LSD test.

Grafy byly vytvořeny v programu Microsoft Excel.

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 HMOTNOST TISÍCE SEMEN

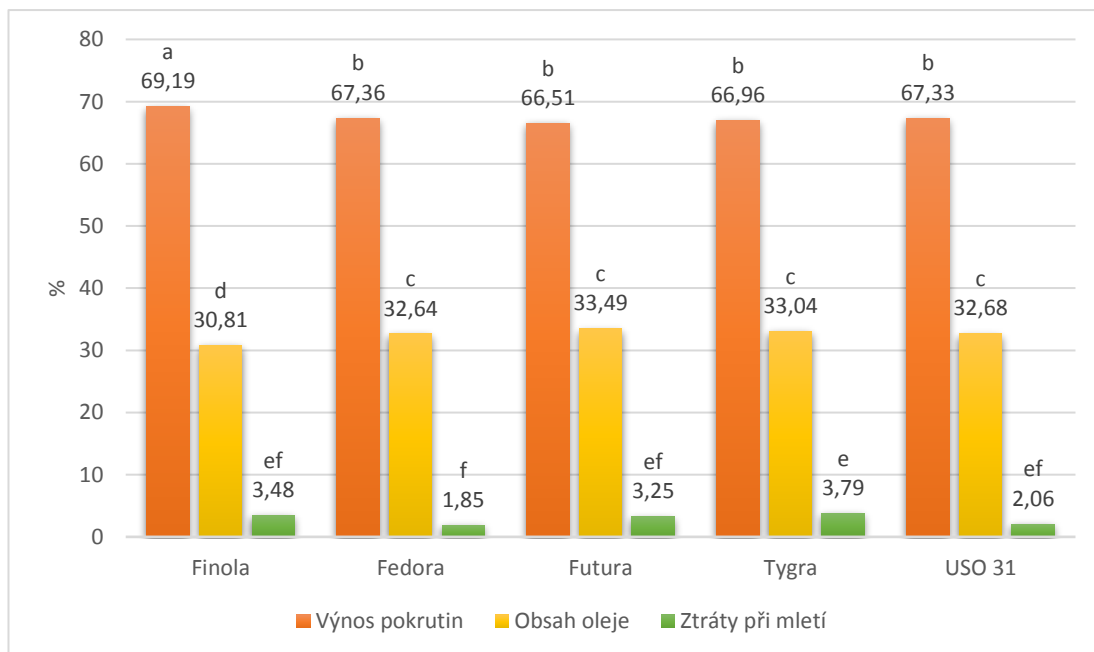
Hmotnost nažek vyšla nejméně u odrůdy Finola, kde činila na tisíc kusů 11,74 g. Následovala odrůda Futura 75, která měla HTS 14, 57 g, a Tygra, u níž byla HTS 15,25 g. Téměř shodná HTS vyšla u odrůd Fedora 17 (HTS=16,24 g) a USO 31 (HTS=16,42g).

### 5.2 VÝNOSOVÉ HODNOTY

Průměrné relativní výnosy pokrutin ze sledovaných odrůd po dvojitém lisování 100 g nažek jsou uvedeny na obrázku č 2. Z těchto údajů byly vypočítány průměrné obsahy tuku, které jsou také obsaženy v následujícím grafu. Ve všech odrůdách nebyl zjištěn pomocí Fisherova LSD testu ( $p < 0,05$ ) průkazný rozdíl ve množství oleje kromě odrůdy Finola, která měla vyšší výnos pokrutin, a tudíž se vymykala nižším obsahem tuku.

Při následném mletí na mouku došlo průměrně k 2,88% ztrátám, což lze detailněji vidět opět z obr. č. 2. celkový výnos mouky činil u odrůdy Finola 66,78 %, Fedora 17 66,11 %, Futura 75 64,35 %, Tygra 64,42 % a USO 31 65,94 %.

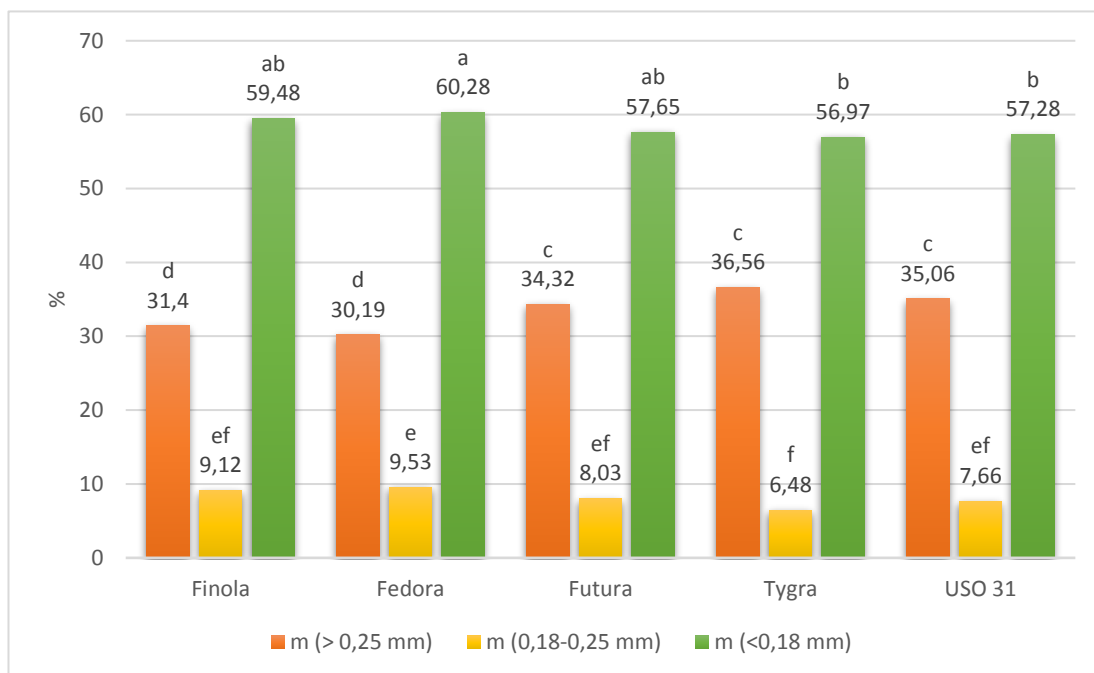
Obr. č. 2: Výnosové údaje konopného semene



Odlíšná písmena nad sloupci v grafu indikují průkazný rozdíl na hladině významnosti  $p < 0,05$  (Fisherův LSD test) (zdroj: vlastní zpracování).

Procentické zastoupení jednotlivých frakcí v mouce bylo ve všech odrůdách podobné, jak je vidět na obrázku č. 3. Průměrně ze všech odrůd zabírala v mouce nejhrubší frakce 33,50 %, frakce od 180 µm do 250 µm 8,16 % a nejjemnější frakce tvořila 58,33 % mouky.

Obr. č. 3: Relativní zastoupení frakcí v moukách



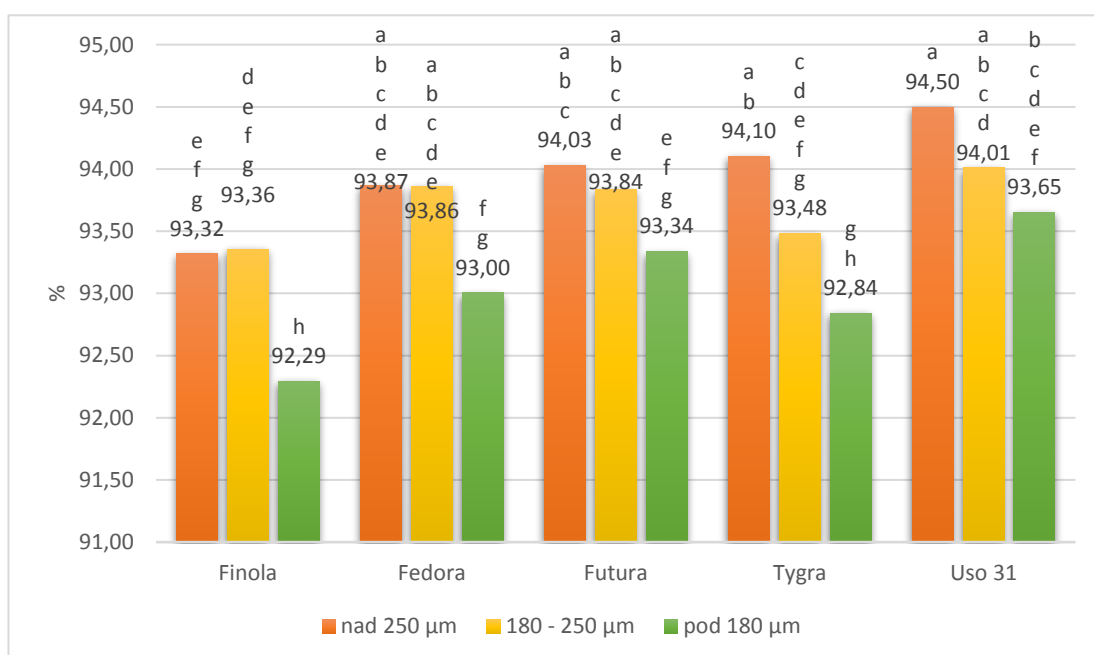
Odlíšná písmena nad sloupci v grafu indikují průkazný rozdíl na hladině významnosti  $p < 0,05$  (Fisherův LSD test) (zdroj: vlastní zpracování).

### 5.3 OBSAH SUŠINY

Nejnižší obsah sušiny měla odrůda Finola (92,99 %), dále Tygra (93,56 %), Fedora 17 (93,58 %), Futura 75 (93,74 %) a nejvíce sušiny obsahovala odrůda USO 31 (93,96 %).

Z obrázku č. 4 lze detailněji vidět, že obsah sušiny se lišil i v jednotlivých frakcích, kdy nejméně sušiny obsahovala vždy nejjemnější frakce (průměrně 93,02 %). Frakce od 180 µm do 250 µm obsahovala sušiny průměrně 93,71 % a nejhrubší frakce jí měla v průměru nejvíce, tzn. 93,92 %.

Obr. č. 4: Obsah sušiny



Odlišná písmena nad sloupci v grafu indikují průkazný rozdíl na hladině významnosti  $p < 0,05$  (Fisherův LSD test) (zdroj: vlastní zpracování).

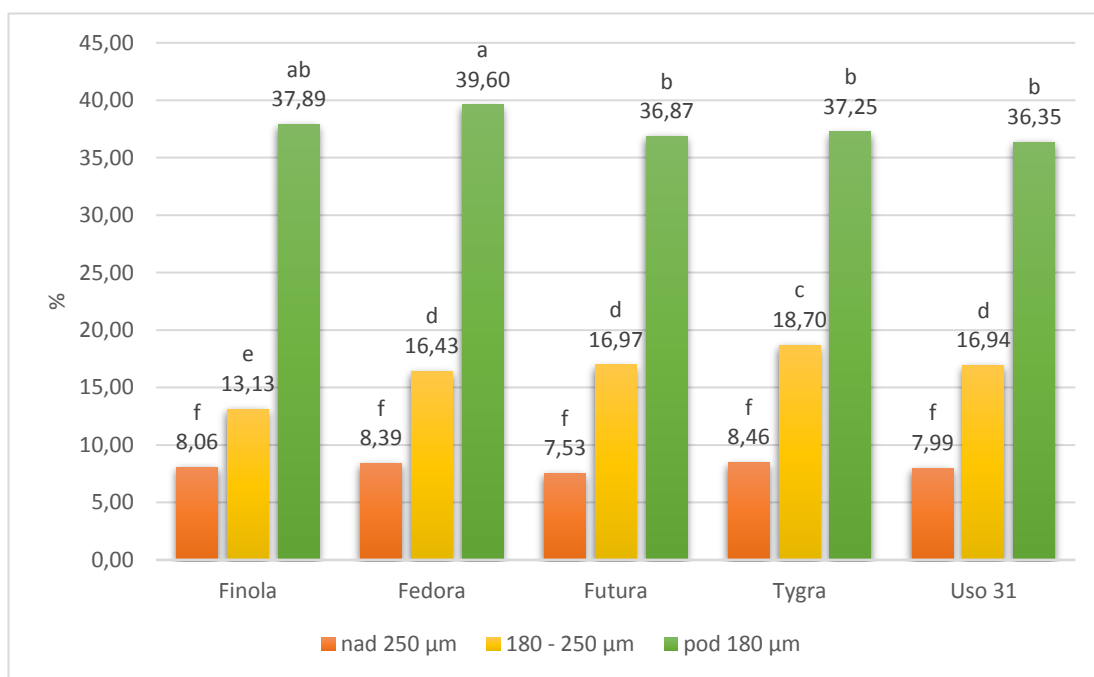


## 5.4 OBSAH DUSÍKATÝCH LÁTEK

Z obrázku č. 5 je jasně patrný velmi výrazný rozdíl v obsahu dusíkatých látek (NL) mezi frakcemi, který se zvyšoval se zmenšováním částic v mouce. Průměrně ze všech odrůd bylo ve frakci mouky nad 250  $\mu\text{m}$  8,09 % NL, při částicích velkých 180–250  $\mu\text{m}$  bylo NL 16,43 % a v nejjemnější mouce s velikostí částic pod 180  $\mu\text{m}$  se nacházelo 37,59 % NL.

Konkrétní výsledky uvádí příloha v tabulce č. 2.

Obr. č. 5: Relativní obsah NL



Odlišná písmena nad sloupci v grafu indikují průkazný rozdíl na hladině významnosti  $p < 0,05$  (Fisherův LSD test) (zdroj: vlastní zpracování).

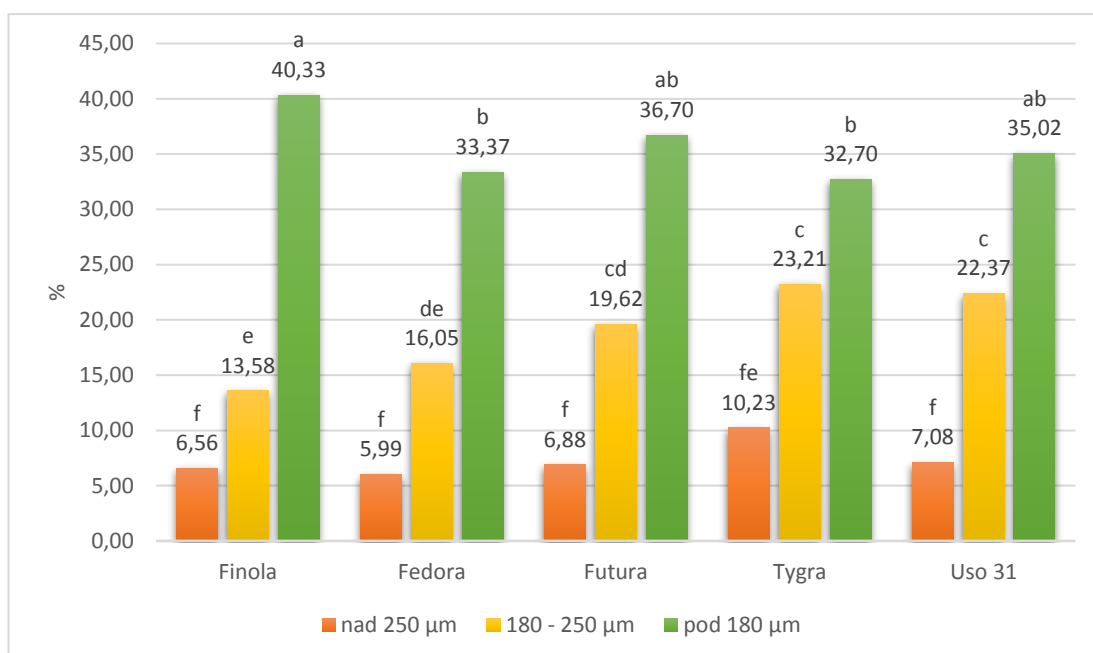
## 5.5 OBSAH BÍLKOVIN

Při kvantifikaci proteinů metodou BCA bylo zjištěno, že celkové zastoupení bílkovin v mouce není mezi odrůdami konopí výrazně rozdílné. Ze zkoumaných odrůd obsahovala v mouce nejméně bílkovin odrůda Fedora 17 (23,45 %), následovaly odrůdy Tygra (23,87 %), USO 31 (24,26 %), Futura 75 (25,10 %) a nejhojněji bílkovin bylo zanalyzováno v mouce odrůdy Finola (27,29 %).

Mezi velikostními frakcemi byly rozdíly podstatně větší. Průměrné relativní zastoupení bílkovin v nejhrubší frakci bylo 7,35 %, v prostřední frakci 18,97 % a v nejjemnější frakci 35,62 %. Názorně to ukazuje obr. č. 7.

Všechny vyšlé hodnoty jsou uvedeny v příloze v tabulce č. 3.

Obr. č. 7: Relativní obsah bílkovin

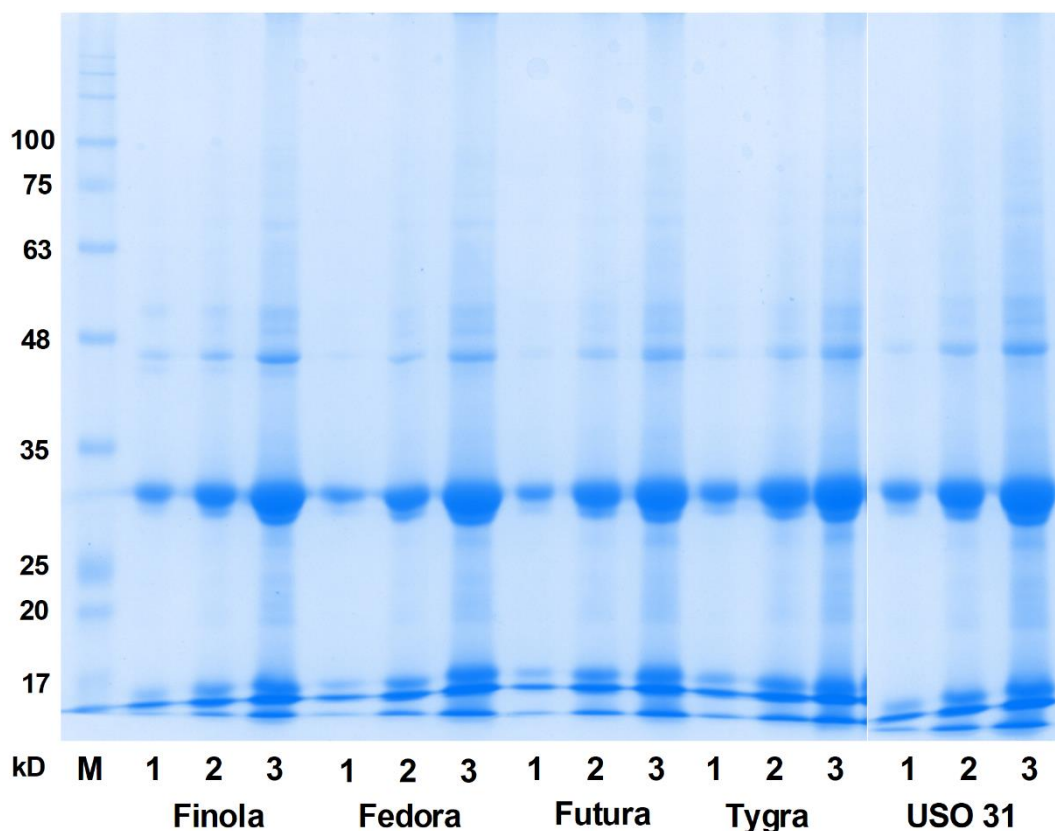


Odlíšná písmena nad sloupci v grafu indikují průkazný rozdíl na hladině významnosti  $p < 0,05$  (Fisherův LSD test) (zdroj: vlastní zpracování).

## 5.6 ELEKTROFORÉZA PROTEINŮ

Obrázek č. 6 je výsledek jednoho opakování elektroforézy. Celkově byly provedeny tři opakování s velmi podobnými výsledky. Je na něm jasně zřetelné, jak obsah bílkovin je tím vyšší, čím je frakce jemnější. Také jsou zde vidět pásy částic s molekulovou hmotností kolem 18 kDa a 20 kDa a pás částic s molekulovou hmotností přibližně 34 kDa. Tyto pásy značí kyselé a zásadité podjednotky edestinu, které byly odděleny pomocí merkaptoethanolu. Zbylé kyselé a zásadité podjednotky, mezi kterými se disulfidové vazby nerozštěpily, identifikuje lehce patrný pás s molekulovou hmotností kolem 52 kDa.

Obr. č. 6: Elektroforetický snímek



M značí hmotnostní marker; číslice 1-3 značí velikostní frakce (autor: Jan Bárta).

## 6. DISKUZE

### 6.1 HMOTNOST TISÍCE SEMEN

Hmotnost tisíce semen vyšla u odrůdy Finola nepatrně nižší (11,74 g), než se obecně uvádí (12-15 g), nicméně jak uvádí Grabowska (2009), velikost semen závisí na tom, ve které zeměpisné šířce se rostlina pěstuje. Dále uvádí, že „v našich zeměpisných šířkách“ se HTS pohybuje v rozmezí od 8,4 do 13,5 g. Protože zmiňovaná studie pochází ze Slovenska, které se vyskytuje přibližně na stejných rovnoběžkách jako Česká republika, lze tento údaj srovnávat i s našimi výsledky. V tom případě mi vyšla tato výnosová hodnota běžná v našem regionu. Nižší HTS, než je uvedena v tab. č. 1, byla navážena ještě u odrůdy Futura 75, u ostatních odrůd se pohybovala většinou na dolní hranici uvedeného rozmezí.

Na základě Fisherova LSD testu bylo zjištěno, že HST úzce souvisí s obsahem oleje. Hladina významnosti pro tato dva parametry vyšla  $p=0,009$ .

### 6.2 VÝNOSOVÉ HODNOTY

Obsah oleje vyšel průměrně 32,53 % z celých semen, což je o trochu více, než se běžně uvádí. Například Callaway (2004) tvrdí, že pro konopné semeno je typický obsah tuku kolem 30 % a House (2010) k podobnému údaji dodává, že většinu lze vylisovat za studena, ale dle tohoto autora zůstane v pokrutinách ještě asi 10 % tuku. Vyšší výnos oleje v této práci vyšel proto, že byl vypočítán odečtem výnosu pokrutin od celkové navážky nažek před lisováním a nebyly započítány ztráty při lisování. Zajímavé je, že v této bakalářské práci vyšel nejnižší obsah oleje u odrůdy Finola, zatímco Vonapartis (2015) uvádí, že ze vzorků, které porovnával on, obsahoval kultivar Finola oleje nejvíce. Samozřejmě porovnával jiné odrůdy, než byly hodnoceny v rámci řešení této bakalářské práce a podíl jednotlivých složek semene navíc závisí na mnoha různých parametrech (např. klimatických a agrotechnických).

Nejmenší zastoupení v mouce měla prostřední frakce. To je pochopitelné, protože obsahuje, na rozdíl od zbylých dvou frakcí, částice s dosti omezeným intervalem velikosti. Naopak nejhojněji bylo nejjemnější mouky, odůvodnila bych to tím, že tato frakce vzniká především z endospermu semene, kterého má nažka více než oplodí, z něhož zase vzniká podstatná část nejhrubší frakce.

### 6.3 OBSAH SUŠINY

Na základě vázkové analýzy bylo zjištěno, že nejnižší obsah sušiny je u nejjemnější frakce a zbylé dvě frakce mají sušinu podobnou. Logicky by to mohlo být způsobeno tím, že pokud je suchý materiál tvořen menšími částicemi, má větší plochu, kterou může absorbovat vzdušnou vlhkost. Jak bylo zmíněno, nejjemnější frakce také obsahuje nejvíce bílkovin, které se více hydratují vodou. Nicméně všechny frakce měly přijatelnou vlhkost pod 8 %.

### 6.4 OBSAH DUSÍKATÝCH LÁTEK

Analýza dusíkatých látek vyšla dle očekávání, protože jejich obsah zároveň poukazuje na obsah bílkovin. Obsah dusíkatých látek prudce stoupal se zmenšováním částic ve velikostních frakcích, to znamená, že i obsah bílkovin rostl se zjemňováním konopné mouky. Je to díky tomu, že tužší vláknité části nažky, obsažené hlavně v oplodí, se nenaselou tak najemno jako třeba právě vnitřní část semene, která obsahuje zejména bílkoviny. Při prosívání se pak nad síty vyselektuje hrubá mouka bohatá na vlákninu a pod oka sít propadne jemnější mouka, ve které se koncentrují bílkoviny. To se shoduje i s tvrzením, které zastává Malomo (2015 b), že konopnou mouku lze prosévat přes několik sít, a získat tak výrobek s vysokým obsahem bílkovin. Dále tento autor uvádí, že proces prosévání opouští materiál s vysokým obsahem vlákniny, který má menší ekonomickou hodnotu než bílkovinný produkt.

### 6.5 OBSAH BÍLKOVIN

Kvantifikace bílkovin pomocí bicinchoninové kyseliny vyšla více méně v souladu s výsledky obsahu dusíkatých látek. Zatímco mezi odrůdami nebyly výkyvy v zastoupení bílkovin příliš vysoké, velikostní frakce byly v tomto parametru rozdílné propastně. Rozdíly výsledků mezi zmiňovanými metodami jsou způsobené tím, že přepočítání zjištěného obsahu dusíku na dusíkaté látky pomocí koeficientu pochopitelně nemůže zaručit přesný výsledek, jedná se spíše o odhad. Stejně tak kolorimetrické stanovení obsahu bílkovin není naprosto spolehlivé. Pro porovnání, v nejhrubší mouce bylo určeno 8,09 % NL a 7,35 % bílkovin, v prostřední frakci zaujímaly NL 16,43 % a bílkoviny 18,97 %, v nejjemnější frakci bylo stanoveno 37,59 % NL a 35,62 % bílkovin.

Průměrně vyšlo zastoupení bílkovin v konopné mouce 24,79 %. House (2010) ve své studii píše, že celé semeno průměrně obsahuje 24 %. Při jeho výzkumu bylo zjištěno v semeni odrůdy Finola 23,0 % bílkovin a po vylisování oleje za studena 30,7 %. Rozdílný obsah bílkovin stanovený při výzkumu k této bakalářské práci potvrzuje, že na složení konopného semene mají vliv geografické a klimatické podmínky a místní agrotechnické faktory.

## 6.6 ELEKTROFORÉZA

Elektroforéza nejen potvrdila značně nerovnoměrné rozložení obsahu bílkovin ve velikostních frakcích, ale také stvrdila, že nejhojněji zastoupenou bílkovinou v konopné mouce je edestin. Ke stejným výsledkům došel i Raikos (2015), který říká, že hexamerová forma edestinu, která má molekulovou hmotnost kolem 300 kDa, se za redukčních podmínek, které jsou zajištěny 2-merkptoethanolem, rozpadne na tři hlavní pásy s přibližnými hodnotami molekulové hmotnosti 34 kDa, 18 a 20 kDa, a dodává, že za neredukujících podmínek by disulfidové vazby mezi kyselými a zásaditými podjednotkami edestinu nebyly narušeny 2-merkptoethanolem a nejzřetelnější proteinový pás na elektroforéze by odpovídal asi 52 kDa.

## 7. ZÁVĚR

Při sledování výnosových hodnot pěti odrůd konopí bylo zjištěno, že obsah výlisků po vylisování oleje koreluje s hmotností semen. To znamená, že při nižším obsahu oleje je i nižší hmotnost tisíce semen.

Také bylo zjištěno, že nejvíce dusíkatých látek, a i bílkovin, je vždy zastoupeno ve velikostní frakci konopné mouky s částicemi menšími než 180  $\mu\text{m}$  a této frakce je navíc největší výtěžek. Při pěstování konopí v našich podmínkách je v nejjemnější frakci průměrný relativní obsah bílkovin 35,62 %. To sice není tolik, kolik se dosahuje jinými metodami, například izoelektrickým srážením bílkovin, ale na druhou stranu vláknina, které je v mechanicky získaném koncentrátu značné množství, je z dietetického hlediska také cenný materiál.

Při elektroforéze byla potvrzena hojná přítomnost globulinu edestinu v konopné bílkovině, který, jak bylo zjištěno z citovaných zdrojů, je velmi přínosný pro lidské zdraví, protože obsahuje všechny esenciální aminokyseliny a je dobře stravitelný.

Celkově lze říci, že nejjemnější frakci konopné mouky lze využít jako bílkovinný koncentrát ke zlepšení potravinářských výrobků, protože má vynikající nutriční vlastnosti a při správném použití může zlepšit i technologické vlastnosti. Předností konopné mouky je, že neobsahuje žádný známý alergen a může být tedy součástí i například bezlepkových výrobků. Navíc jsou s jejím získáváním spojené nižší náklady ve srovnání s živočišnými bílkovinnými produkty.

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

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

BÁRTA, Jan, Verinika BÁRTOVÁ a Vladislav ČURN, 2010. Laboratorní přístroje a postupy: Analýza proteinů pomocí automatické čipové elektroforézy Experion a porovnání s metodou SDS-PAGE. *Chemické listy*. **104**, 33-40.

BJELKOVÁ, Marie, Prokop ŠMIROUS, Miroslava VRBOVÁ a Antonín VACULÍK, 2017. *Komplexní metodika pěstování konopí setého*. 1. Šumperk: AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s. r. o.; Agritec Plant Research. ISBN 978-80-87360-55-2.

CALLAWAY, J. C., 2013. Finola Developmental Morphology. *Finola Developmental Morphology* [online]. Kuopio: Finola, leden 2013[cit. 2019-03-02]. Dostupné z: [http://finola.fi/wp-content/uploads/2017/10/Finola\\_Development\\_2013.pdf](http://finola.fi/wp-content/uploads/2017/10/Finola_Development_2013.pdf)

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

FRIEDMAN, David B., Sjouke HOVING a Reiner WESTERMEIER, 2009. Chapter 30 Isoelectric Focusing and Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Guide to Protein Purification, 2nd Edition*. Elsevier, 2009, **463**(1), 515-540. Methods in Enzymology. DOI: 10.1016/S0076-6879(09)63030-5. ISBN 9780123745361.

GRABOWSKA, Lidia, Michał RĘBARZ a MagDalena CHUDY, 2009. Breeding and cultivation of industrial hemp in Poland. *Herba Polonica*. **55**(3), 328-334. ISSN 0018-0599.



HADNAĐEV, Miroslav, Tamara DAPČEVIĆ-HADNAĐEV, Athina LAZARIDOU, Thomas MOSCHAKIS, Alexandra - M. MICHAELIDOU, Senka POPOVIĆ a Costas G. BILIADERIS, 2018. Hempseed meal protein isolates prepared by different isolation techniques. Part I. physicochemical properties. *Food Hydrocolloids*. **79**, 526-533. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2017.12.015. ISSN 0268005X.

HE, Fanglian, 2011. Laemmli-SDS-PAGE. *BIO-PROTOCOL* [online]. Sunnyvale (USA): Bio-protocol, **1**(11), s. - [cit. 2019-03-13]. DOI: 10.21769/BioProtoc.80. ISSN 2331-8325. Dostupné z: <https://bio-protocol.org/e80>

HOUSE, James D., Jason NEUFELD a Gero LESON, 2010. 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*. **58**(22), 11801-11807. DOI: 10.1021/jf102636b. ISSN 0021-8561.

JANČA, J., 2000. PARTICLE SIZE SEPARATIONS. *Encyclopedia of Separation Science*. Elsevier, 2000, 210-225. DOI: 10.1016/B0-12-226770-2/00111-3. ISBN 9780122267703.

JANKAUSKIENE, Zofija, Elvyra GRUZDEVIENE, Semjons IVANOVŠ a Ernestas MAUMEVICIUS, 2017. Screening hemp (*Cannabis sativa* L.) biomass and chemical composition as influenced by seed rate and genotype. *Engineering for Rural Development*. 2017-05-24, **16**, 317-322. DOI: 10.22616/ERDev2017.16.N062. ISSN 1691-5976.

JUNG, S., D. A. RICKERT, N. A. DEAK, E. D. ALDIN, J. RECKNOR, L. A. JOHNSON a P. A. MURPHY, 2003. Comparison of kjeldahl and dumas methods for determining protein contents of soybean products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **80**(12), 1169-1173. DOI: 10.1007/s11746-003-0837-3. ISSN 0003021X.

KABAŠTA, Radoslav, Katarína HRČKOVÁ a Peter MIHALČÍK, 2014. Pestovanie Konopy Siatej Odrody Finola. KOLEKTIV. *Pestovateľské technológie a ich význam*

*pre prax.* 1. Piešťany: Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum, Výskumný ústav rastlinnej výroby, s. 55. ISBN 978-80-89417-55-1.

KOLOVRAT, Oldřich, Petr BARANYK, Marie BJELKOVÁ, Jana DOSTÁLOVÁ, Radoslav KOPRNA, Jaroslav PRUGAR a Helena ZUKALOVÁ, 2008. Olejniny. PRUGAR ET AL, Jaroslav. *Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí.* 1. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský ve spolupráci s komisí jakosti rostlinných produktů ČAZV, s. 179. ISBN 978-80-86576-28-2.

KORUS, Jarosław, Mariusz WITCZAK, Rafał ZIOBRO a Lesław JUSZCZAK, 2017. Hemp (*Cannabis sativa* subsp. *sativa*) flour and protein preparation as natural nutrients and structure forming agents in starch based gluten-free bread. *LWT.* **84**, 143-150. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.05.046. ISSN 00236438.

LU, Rong-Rong, Ping QIAN, Zhen SUN, Xu-Hui ZHOU, Tian-Peng CHEN, Jin-Feng HE, Hua ZHANG a Jianping WU, 2010. Hempseed protein derived antioxidative peptides: Purification, identification and protection from hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells. *Food Chemistry.* **123**(4), 1210-1218. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.05.089. ISSN 03088146.

MALOMO, Sunday A. a Rotimi E. ALUKO, 2015 a. 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 and Emerging Technologies.* **31**, 151-159. DOI: 10.1016/j.ifset.2015.08.004. ISSN 14668564.

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

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

MAMONE, Gianfranco, Gianluca PICARIELLO, Alessia RAMONDO, Maria Adalgisa NICOLAI a Pasquale FERRANTI, 2019. Production, digestibility and allergenicity of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolates. *Food Research International*. **115**, 562-571. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.09.017. ISSN 09639969.

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

POJIĆ, Milica, Aleksandra MIŠAN, Marijana SAKAČ, Tamara DAPČEVIĆ HADNAĐEV, Bojana ŠARIĆ, Ivan MILOVANOVIĆ a Miroslav HADNAĐEV, 2014. Characterization of Byproducts Originating from Hemp Oil Processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **62**(51), 12436-12442. DOI: 10.1021/jf5044426. ISSN 0021-8561.

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

SAINT-DENIS, Thierry a Jacques GOUPY, 2004. Optimization of a nitrogen analyser based on the Dumas method. *Analytica Chimica Acta*. **515**(1), 191-198. DOI: 10.1016/j.aca.2003.10.090. ISSN 00032670.

SERRANO, S., F. RINCÓN a J. GARCÍA-OLMO, 2013. Cereal protein analysis via Dumas method: Standardization of a micro-method using the EuroVector Elemental Analyser. *Journal of Cereal Science*. **58**(1), 31-36. DOI: 10.1016/j.jcs.2013.04.006. ISSN 07335210.

SLADKÝ, Václav, 2004. *Konopí, šance pro zemědělství a průmysl*. 1. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací. Zemědělské informace. ISBN 80-727-1145-8.

STRAŠIL, Zdeněk, 2011. Konopí seté. MOUDRÝ ET AL, Jan. *Alternativní plodiny*. 1. Praha: Profi Press, s. 89-93. ISBN 978-80-86726-40-3.

TEH, Sue-Siang, Alaa El-Din A. BEKHIT, Alan CARNE a John BIRCH, 2016. Antioxidant and ACE-inhibitory activities of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysates produced by the proteases AFP, HT, Pro-G, actinidin and zingibain. *Food Chemistry*. **203**, 199-206. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.02.057. ISSN 03088146.

VONAPARTIS, Eliana, Marie-Pier AUBIN, Philippe SEGUIN, Arif F. MUSTAFA a Jean-Benoit CHARRON, 2015. Seed composition of ten industrial hemp cultivars approved for production in Canada. *Journal of Food Composition and Analysis*. **39**, 8-12. DOI: 10.1016/j.jfca.2014.11.004. ISSN 08891575.

YALAMATI, Padma, 2015. Comparative Analysis of Urinary Total Proteins by Bicinchoninic Acid and Pyrogallol Red Molybdate Methods. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*. **9**(8), BC01 - BC04. DOI: 10.7860/JCDR/2015/13543.6313. ISSN 2249782X.

YIN, Shou-Wei, Chuan-He TANG, Jin-Song CAO, Er-Kun HU, Qi-Biao WEN a Xiao-Quan YANG, 2008. Effects of limited enzymatic hydrolysis with trypsin on the functional properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate. *Food Chemistry*. **106**(3), 1004-1013. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.07.030. ISSN 03088146.

YIN, Shou-Wei, Chuan-He TANG, Qi-Biao WEN a Xiao-Quan YANG, 2009. Functional and structural properties and in vitro digestibility of acylated hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolates. *Food Science & Technology*. **44**(12), 2653-2661. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2009.02098.x. ISSN 09505423.

### **Ostatní zdroje:**

*Agrolitpa: Tygra* [online], 2019. Kerava: UAB "AGROLITPA" [cit. 2019-04-09]. Dostupné z: <http://www.agrolitpa.lt/Product/seeds/oil-seasoning-plants-etc/hemp/TYGRA2/>

*Ihempfarms: EU-Certified Planting Seed* [online], 2017. Veliko Tarnovo: Ihempfarms [cit. 2019-03-02]. Dostupné z: <https://www.ihempfarms.com/Default>

*Dumasova metoda* [online], 2012. Praha: ALS Czech Republic [cit. 2019-03-05]. Dostupné z: [https://www.alsglobal.cz/media-cz/pdf/potraviny/labmail/labmail-1\\_dumasova-metoda\\_2012.pdf](https://www.alsglobal.cz/media-cz/pdf/potraviny/labmail/labmail-1_dumasova-metoda_2012.pdf)

*Elementar: rapid N exceed - Time for a change in protein analysis* [online], 2019. Germany: Elementar Analysensysteme [cit. 2019-02-26]. Dostupné z: <https://www.elementar.de/en/products/nprotein-analysis/rapid-n-exceed.html>

*Thermo Scientific: INSTRUCTIONS - Pierce™ BCA Protein Assay Kit*, 2013. USA.

## 9. PŘÍLOHA

Tab. č. 2: Výsledky Dumasovy instrumentálně modifikované metody (zaokrouhлено)

Odrůda	Obsah N [%]	Obsah NL [%]	Odrůda	Obsah N [%]	Obsah NL [%]
Finola A1a	1,33	8,32	Futura 75 B2b	2,66	16,60
Finola A1b	1,15	7,17	Futura 75 B3a	6,06	37,85
Finola A2a	1,77	11,09	Futura 75 B3b	6,04	37,76
Finola A2b	1,80	11,25	Futura 75 C1a	1,20	7,48
Finola A3a	6,00	37,51	Futura 75 C1b	1,22	7,61
Finola A3b	5,80	36,23	Futura 75 C2a	3,07	19,21
Finola B1a	1,17	7,29	Futura 75 C2b	3,02	18,88
Finola B1b	1,30	8,12	Futura 75 C3a	5,78	36,15
Finola B2a	1,87	11,69	Futura 75 C3b	5,87	36,69
Finola B2b	1,82	11,35	Tygra A1a	1,48	9,24
Finola B3a	6,12	38,25	Tygra A1b	1,27	7,95
Finola B3b	5,96	37,28	Tygra A2a	2,83	17,66
Finola C1a	1,26	7,87	Tygra A2b	2,84	17,78
Finola C1b	1,54	9,59	Tygra A3a	6,00	37,47
Finola C2a	2,70	16,88	Tygra A3b	5,78	36,12
Finola C2b	2,65	16,54	Tygra B1a	1,21	7,58
Finola C3a	6,31	39,43	Tygra B1b	1,22	7,64
Finola C3b	6,19	38,66	Tygra B2a	2,62	16,38
Fedora 17 A1a	1,47	9,19	Tygra B2b	2,43	15,16
Fedora 17 A1b	1,35	8,46	Tygra B3a	6,03	37,67
Fedora 17 A2a	2,34	14,60	Tygra B3b	5,93	37,09
Fedora 17 A2b	2,19	13,72	Tygra C1a	1,47	9,18
Fedora 17 A3a	6,37	39,80	Tygra C1b	1,46	9,16
Fedora 17 A3b	6,14	38,41	Tygra C2a	3,69	23,05
Fedora 17 B1a	1,24	7,74	Tygra C2b	3,55	22,18
Fedora 17 B1b	1,39	8,68	Tygra C3a	5,90	36,90
Fedora 17 B2a	2,78	17,40	Tygra C3b	6,12	38,25
Fedora 17 B2b	2,92	18,22	OSO 31 A1a	1,55	9,68
Fedora 17 B3a	6,45	40,32	OSO 31 A1b	1,39	8,69
Fedora 17 B3b	6,53	40,79	OSO 31 A2a	3,02	18,84
Fedora 17 C1a	1,31	8,22	OSO 31 A2b	2,90	18,16
Fedora 17 C1b	1,29	8,04	OSO 31 A3a	5,88	36,73
Fedora 17 C2a	2,86	17,89	OSO 31 A3b	5,85	36,56
Fedora 17 C2b	2,68	16,75	OSO 31 B1a	1,24	7,73
Fedora 17 C3a	6,27	39,20	OSO 31 B1b	1,17	7,32
Fedora 17 C3b	6,25	39,07	OSO 31 B2a	2,74	17,11
Futura 75 A1a	1,33	8,30	OSO 31 B2b	2,68	16,76
Futura 75 A1b	1,19	7,41	OSO 31 B3a	5,84	36,49
Futura 75 A2a	2,42	15,10	OSO 31 B3b	5,78	36,13

Futura 75 A2b	2,35	14,69	OSO 31 C1a	1,16	7,25
Futura 75 A3a	5,92	36,99	OSO 31 C1b	1,17	7,30
Futura 75 A3b	5,72	35,76	OSO 31 C2a	2,51	15,68
Futura 75 B1a	1,21	7,58	OSO 31 C2b	2,41	15,07
Futura 75 B1b	1,09	6,83	OSO 31 C3a	5,66	35,37
Futura 75 B2a	2,77	17,32	OSO 31 C3b	5,89	36,80

Písmena A, B, C značí opakování; číslice v kódu udávají velikostní frakci (1 značí frakci >250 µm; 2 odpovídá velikosti <250 µm ∧ >150 µm; 3 je frakce <150 µm); písmena a, b, c označují analytické opakování (zdroj: vlastní zpracování).

Tab. č. 3: Výsledky spektrofotometrické kvantifikace bílkovin (zaokrouhleno)

Odrůda	Obsah bílkovin [%]	Odrůda	Obsah bílkovin [%]
Finola A 1	6,16	Futura 75 B 3	35,29
Finola A 2	11,07	Futura 75 C 1	4,84
Finola A 3	40,66	Futura 75 C 2	23,23
Finola B 1	7,90	Futura 75 C 3	32,70
Finola B 2	12,80	Tygra A 1	9,43
Finola B 3	38,98	Tygra A 2	21,86
Finola C 1	5,61	Tygra A 3	29,24
Finola C 2	16,87	Tygra B 1	7,56
Finola C 3	41,35	Tygra B 2	22,09
Fedora 17 A 1	5,26	Tygra B 3	29,48
Fedora 17 A 2	13,86	Tygra C 1	13,70
Fedora 17 A 3	37,74	Tygra C 2	25,70
Fedora 17 B 1	5,46	Tygra C 3	39,38
Fedora 17 B 2	16,91	USO 31 A 1	8,83
Fedora 17 B 3	37,79	USO 31 A 2	26,46
Fedora 17 C 1	7,25	USO 31 A 3	32,91
Fedora 17 C 2	17,39	USO 31 B 1	5,03
Fedora 17 C 3	24,58	USO 31 B 2	20,87
Futura 75 A 1	7,51	USO 31 B 3	32,22
Futura 75 A 2	17,61	USO 31 C 1	7,38
Futura 75 A 3	42,12	USO 31 C 2	19,79
Futura 75 B 1	8,29	USO 31 C 3	39,94
Futura 75 B 2	18,00		

Písmena A, B, C značí opakování; číslice v kódu udávají velikostní frakci (1 značí frakci >250 µm; 2 odpovídá velikosti <250 µm ∧ >150 µm; 3 je frakce <150 µm) (zdroj: vlastní zpracování).