



Fakulta zemědělská  
a technologická  
Faculty of Agriculture  
and Technology

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

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

Katedra rostlinné výroby

**Diplomová práce**

Hodnocení stability konopných bílkovinných mouk

Autorka práce: Hana Němcová  
Vedoucí práce: doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.  
Konzultant práce: Ing. Markéta Jarošová

České Budějovice  
2022

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne .....

.....

Podpis

## ABSTRAKT

Práce se zabývala sledováním možností skladování konopných bílkovinných koncentrátů získaných mechanickým prosíváním namletých výlisků z nažek konopí setého (*Cannabis sativa L.*). Na základě dříve objevených poznatků v bakalářské práci byly pro tento účel zhotoveny dvě velikostní frakce konopné mouky – bílkovinná s částicemi menšími než 180  $\mu\text{m}$  a vlákninová s částicemi většími než 180  $\mu\text{m}$ . Ty byly následně skladovány po dobu osmi měsíců za různých podmínek. U těchto skladovaných vzorků a u vzorků před založením skladovacího pokusu byly hodnoceny tyto parametry: obsah tuku, titrační kyselost, antioxidační aktivita a obsah polyfenolů.

Bylo zjištěno, že na sledované parametry má vždy statisticky významně vliv frakce mouky. Kromě antioxidační aktivity má na všechny parametry statisticky významně vliv také varianta skladování.

Z analýz vyplynulo, že ke skladování se méně hodí frakce s částicemi menšími než 180  $\mu\text{m}$  než frakce s částicemi většími než 180  $\mu\text{m}$ , protože frakce s částicemi menšími než 180  $\mu\text{m}$  je vzhledem k většímu zastoupení tuku náchylnější ke žluknutí, vykazuje nižší antioxidační aktivitu, obsahuje méně polyfenolů a více vlhne.

Lépe při skladování vycházely vzorky skladované ve vakuu a z nich měly lepší výsledky vzorky skladované při 5 °C. Méně se u nich rozkládal tuk, měly nižší kyselost a vyšší antioxidační aktivitu. U těchto vzorků však byla pozorována vlhkost nad 9 %, což by mohlo vést k vyššímu mikrobiálnímu zatížení.

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

## ABSTRACT

The aim of this diploma thesis is to explore the possibility of storage of hemp protein concentrates extracted by mechanical sifting of milled hemp (*Cannabis sativa*) seed cake. On the ground of previously acquired scientific knowledge two size fractions of hemp flour were prepared – protein flour containing particles lower than 180  $\mu\text{m}$  and fibre flour containing particles larger than 180  $\mu\text{m}$ . The two types of flours were subsequently stored for the period of eight months in different conditions. On the stored samples and on the samples before the attempted experience were evaluated following parameters: dry matter, fat content, titratable acidity, antioxidant activity and polyphenol content.

The diploma thesis found out the evaluated parameters are statistically significantly affected by the flour's fraction. The type of storage has statistically significant effect on all the parameters, except of the antioxidant activity.

The analysis showed that the storage is less suitable for fraction containing less than 180  $\mu\text{m}$  because the fraction containing particles less than 180  $\mu\text{m}$  is more likely to go rancid given to the larger fat content, shows lower antioxidant activity, contains less polyphenols and tends to become moister.

Better outcomes were showed by samples stored in vacuum, of which samples stored at a temperature of 5 °C showed even better results. These samples revealed lower fat dissociation, lower acidity and higher antioxidant activity. However, 9 % moisture that could lead to higher microbial strain was observed.

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

**Poděkování:**

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

## OBSAH

1.	ÚVOD .....	9
2.	LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	10
2.1	CHEMICKÉ SLOŽENÍ KONOPNÉHO SEMENE.....	10
2.1.1	OLEJ .....	10
2.1.2	BÍLKOVINY .....	11
2.1.3	SACHARIDY .....	12
2.1.4	MINERÁLNÍ LÁTKY .....	12
2.1.5	TOKOFEROLY.....	12
2.1.6	FENOLICKÉ SLOUČENINY .....	13
2.1.7	FYTOSTEROLY .....	14
2.1.8	THC .....	14
2.2	OXIDAČNÍ STABILITA.....	15
2.2.1	PRINCIP OXIDACE LIPIDŮ .....	15
2.2.2	OXIDACE KONOPNÉHO OLEJE.....	16
2.2.3	OVLIVNĚNÍ OXIDAČNÍ STABILITY .....	17
2.3	SKLADOVÁNÍ.....	19
2.3.1	VLHKOST.....	19
2.3.2	OBALOVÝ MATERIÁL .....	21
2.4	MIKROBIOLOGICKÁ KONTAMINACE.....	22
3.	CÍL .....	26
4.	METODIKA .....	27
4.1	MATERIÁL .....	27
4.2	PŘÍPRAVA VZORKŮ A VARIANTY POKUSU.....	27
4.2.1	Podmínky skladování .....	27
4.2.2	Sledované parametry .....	28
4.3	STANOVENÍ SUŠINY .....	28

4.4	STANOVENÍ OBSAHU TUKU.....	28
4.4.1	Princip.....	28
4.4.2	Postup .....	28
4.5	STANOVENÍ TITRAČNÍ KYSELOSTI.....	29
4.5.1	Princip.....	29
4.5.2	Postup .....	29
4.5.3	Výpočet.....	29
4.6	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY METODOU VYUŽÍVAJÍCÍ DPPH .....	30
4.6.1	Princip.....	30
4.6.2	Postup .....	31
4.7	STANOVENÍ OBSAHU POLYFENOLŮ .....	32
4.7.1	Princip.....	32
4.7.2	Postup .....	34
4.8	VYHODNOCOVÁNÍ VÝSLEDKŮ.....	34
5.	VÝSLEDKY .....	35
5.1	VÝTĚŽEK FRAKČÍ.....	35
5.2	SKLADOVÁNÍ.....	35
5.3	OBSAH SUŠINY .....	35
5.4	OBSAH TUKU .....	36
5.5	TITRAČNÍ KYSELOST .....	37
5.6	ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA.....	38
5.7	OBSAH POLYFENOLŮ .....	39
6.	DISKUSE.....	41
6.1	VÝTĚŽEK FRAKČÍ.....	41
6.2	SKLADOVÁNÍ.....	41
6.3	OBSAH SUŠINY .....	42

6.4	OBSAH TUKU .....	42
6.5	TITRAČNÍ KYSELOST .....	43
6.6	ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA.....	44
6.7	OBSAH POLYFENOLŮ .....	44
7.	ZÁVĚR .....	45
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	46
9.	PŘÍLOHA .....	50



## 1. ÚVOD

Z důvodu vyššího výskytu zdravotních potíží spojených se stravou, vzrostla poptávka spotřebitelů po alternativních funkčních potravinách. Funkční potraviny nabyly význam jako preventivní a ochranné prostředky proti různým zdravotním problémům, jako je obezita, onemocnění srdce a cév, cukrovka atd. Z výživového hlediska jsou potraviny obohacené o semena zdrojem funkčních složek, jako jsou antioxidanty, tokoferoly, karotenoidy, fenoly, vláknina a bílkoviny (Ertaş & Aslan 2015).

Semena konopí setého (*Cannabis sativa L.*) mají vysokou nutriční hodnotu, bohatou na fytosteroly,  $\omega$ -3 a  $\omega$ -6 esenciální mastné kyseliny a proteiny (Mamone, 2019). Zdravotní benefity přináší zejména řada bioaktivních látek, jako jsou flavony, polyfenoly, albuminové a edestinové proteiny, na které jsou semena konopí bohatá. Díky svým fenolickým sloučeninám jsou konopná semena účinná při prevenci onemocnění, jako je rakovina, neurodegenerativní onemocnění, gastrointestinální poruchy a další (Ertaş & Aslan 2015).

Konkrétně obsahují 20–25 % bílkovin, 20–30 % sacharidů, 25–35% oleje, 10-15% nerozpustné vlákniny a bohatou škálu minerálů, zejména fosforu, draslíku, hořčíku, síry a vápníku, a také železo a zinek, který je důležitým enzymovým kofaktorem pro metabolismus mastných kyselin v lidském těle. Dále se v nich nachází hojné množství vitamínů A, C a E a beta-karotenu (Anwar et al. 2006).

Z konopných semen se primárně získává olej, a to nejlépe lisováním za studena. Jako vedlejší produkt tohoto zpracování jsou pokrutiny, ve kterých je velké množství bílkovin (asi 30–50 %). Tyto „zbytky“ mohou být namlety na mouku a zpracovány na různé formy práškových proteinových produktů (Malomo, 2015).

Konopná mouka tak umožňuje výrobu produktů s vysokou nutriční hodnotou pro výživu člověka (Ertaş & Aslan 2015). Konopná semena a výrobky z nich se proto často vyskytují v certifikovaných biopotravinách, které v posledních letech také získaly větší popularitu (Vonapartis, 2015).

Kvalita jídla je zaměřena na přirozené složení a rovnováhu mezi živinami (Rehman et al. 2017). Trvanlivost potravin, tedy i konopných bílkovinných mouk, proto závisí především na jejich chemickém složení a také na prostředí skladování, a právě na to se zaměřuje tato práce, která navazuje na předešlý výzkum v bakalářské práci zabývající se možnostmi získávání bílkovinných koncentrátů z nažek konopí setého.

## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 CHEMICKÉ SLOŽENÍ KONOPNÉHO SEMENE

Celá konopná semena obsahují 25–35 % oleje a 20–25 % hrubých bílkovin (Callaway 2004). Významný je i obsah vlákniny, minerálů (mangan, draslík, železo, zinek a hořčík) a vitamínů (A, B1, B2, B3, B6, C a E). (Ertaş & Aslan 2015)

#### 2.1.1 OLEJ

Nejvíce zastoupenou složkou v konopném semeni je olej, kterého tato surovina obsahuje přes 30 % (Callaway, 2004). Profil mastných kyselin je velmi důležitým kritériem pro hodnocení plodin olejnatých semen, protože více než jakýkoli jiný parametr charakterizuje vhodnost oleje pro určitá použití, a také určuje jeho trvanlivost (Matthäus & Brühl 2008).

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 kromě esenciálních mastných kyselin obsahuje i další polynenasycené mastné kyseliny, které organismus využívá jako fosfolipidy při stavbě buněčných a organelových membrán. Další příznivý vliv na lidské zdraví mají polynenasycené mastné kyseliny tím, že snižují hladiny LDL cholesterolu (Callaway, 2004). Také byly pozorovány pozitivní účinky kyseliny  $\gamma$ -linolenové u pacientů s revmatoidní artritidou a atopickou dermatitidou (Matthäus & Brühl 2008).

Na druhou stranu je třeba vzít v úvahu, že kyselina linolová je vysoce náchylná k oxidaci, což vede ke zvýšené tvorbě oxidovaného LDL-cholesterolu odpovědného za rozvoj arteriosklerózy. Zvýšená náchylnost polynenasycených mastných kyselin

k oxidaci vede k absorpci oxidovaného LDL makrofágy, které se usazují v tepnách jako pěnové buňky. To je základ právě pro zmíněnou arteriosklerózu. Oxidační produkty z polynenasycených mastných kyselin navíc hrají důležitou roli v procesech stárnutí a vývoji nádorů (Matthäus & Brühl 2008). Zjistit, jaké by bylo nejvhodnější skladování, aby k oxidaci nedocházelo, je tedy velmi cenné (Matthäus & Brühl 2008).

### 2.1.2 BÍLKOVINY

Konopné semeno obsahuje 20–25 % hrubých bílkovin (Vonapartis, 2015). House, Neufeld a Leson (2010) uvádějí, že výlisky po vylisování oleje za studena, ve kterých zbude 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.

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, pěstitelskými podmínkami a zpracováním (House, 2010). V konopné mouce je limitující aminokyselinou lysin a dalšími nedostatkovými aminokyselinami jsou leucin a tryptofan. Všechny ostatní aminokyseliny jsou 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).

Dle House (2010) 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.

### 2.1.3 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 obsahoval 5,4 % stravitelné vlákniny a 22,2 % nestravitelné vlákniny. Vonapartis (2015), 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 %.

Většina frakcí vlákniny (NDF) z celých konopných semen se nachází v obalových vrstvách semen. Obsah vlákniny významně ovlivňuje stravitelnost bílkovinné složky konopné nažky. Odstranění obalových vrstev z konopných semen tudíž vede k nárůstu obsahu tuků a bílkovin ve vzorcích o 50 % a k průměrnému zvýšení stravitelnosti bílkovin z 85,2 % na 94,9 % (House, 2010).

### 2.1.4 MINERÁLNÍ LÁTKY

Významný je i obsah minerálů (mangan, draslík, železo, zinek a hořčík) a vitamínů (A, B1, B2, B3, B6, C a E) (Ertaş & Aslan 2015).

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).

### 2.1.5 TOKOFEROLY

Množství a složení tokoferolů a tokotrienolů v oleji je důležitým znakem olejnatých semen. V konopném oleji zjistili Matthäus et al. velké rozpětí obsahu celkových tokoferolů. V roce 2000 naměřili jejich množství mezi 41 až 102 mg / 100 g semen (průměrně 77 mg / 100 g), a v roce 2001 mezi 66 a 111 mg / 100 g (průměrně 80 mg / 100 g). Nebyly zde zjištěny žádné tokotrienoly. Nicméně tokotrienoly jsou méně účinné při inhibici autooxidace než tokoferoly. Podobné výsledky popsali i Oomah et al. (2002) v celkovém množství 79,7 mg / 100 g. Převažujícím tokoferolem v konopném oleji je  $\gamma$ -tokoferol, jehož zastoupení představuje přibližně 85 % z celkového množství tokoferolů. Množství ostatních tokoferolů je nízké, přibližně 5 % pro  $\alpha$ - a  $\delta$ -tokoferol a méně než 1 % pro  $\delta$ -tokoferol a plastochromanol-8. Oomah

et al. (2002) také zjistili poměr mezi tokoferoly v oleji z konopných semen 5: 2: 90: 3 pro  $\alpha$ - :  $\beta$ - :  $\gamma$ - :  $\delta$ -tokoferoly.

Tokoferoly působí jako přírodní antioxidanty proti oxidačnímu poškození oleje, ale také jako vitamin E v lidské výživě. Mohou snižovat riziko kardiovaskulárních onemocnění, rakoviny a makulární degenerace související s věkem. Přirozeně se vyskytují již zmíněné čtyři různé deriváty tokoferolů a tokotrienolů ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -) Antioxidační aktivita se zvyšuje u tokoferolů a tokotrienolů od  $\alpha$  k  $\delta$ , zatímco biologická aktivita je opačná než antioxidační aktivita (Sies & Murphy 1991; Pongracz et al. 1995; Oomah et al. 2002; Matthäus et al. 2006). Rafinací oleje se však obsah tokoferolů snižuje (Anwar et al. 2006).

Zajímavé je, že byly zjištěny významné pozitivní korelace mezi čtyřmi mastnými kyselinami a  $\alpha$ -tokoferolem, dvěma mastnými kyselinami a  $\beta$ -tokoferolem, osmi mastnými kyselinami a  $\gamma$ -tokoferolem, devíti mastnými kyselinami a plastochromanolem-8 a čtyřmi mastnými kyselinami a  $\delta$ -tokoferolem. Dále  $\beta$ -tokoferol,  $\gamma$ -tokoferol, celkový tokoferol a plastochromanol-8 dle stejného výzkumu v konopných semenech pozitivně korelovaly s nasycenými mastnými kyselinami. Mononenasyčené mastné kyseliny korelovaly s plastochromanolem-8, zatímco polynenasycené mastné kyseliny korelovaly s  $\gamma$ -tokoferolem, celkovým tokoferolem a rovněž s plastochromanolem-8. Mezi  $\beta$ -tokoferolem a kyselinou myristovou však byl významný negativní vztah (Kriese et al. 2004).

### 2.1.6 FENOLICKÉ SLOUČENINY

Fenolické sloučeniny jsou sekundární metabolity pocházející z rostlin, které mají vlastní antioxidační aktivitu (Balasundram et al. 2006). Jedná se o hydrofilní antioxidanty a řadí se mezi ně např. kvercetin, kyselina chlorogenová a kyselina gallová. Všechny tyto fenolické antioxidanty jsou považovány za účinné modulátory redoxní homeostázy antioxidační obrany ke snížení nitrobuněčného oxidačního stresu v těle a prevenci nemocí způsobených produkty oxidace lipidů (Zhang et al. 2015). Tyto fenolické sloučeniny také vykazují velké množství fyziologických aktivit, jako jsou kardioprotektivní a protizánětlivé účinky (Balasundram et al. 2006). Bylo zjištěno, že flavonoidy, které se právě řadí mezi fenoly, mají antioxidační, anti-alergenní a antiproliferační vlastnosti (Middleton et al. 2000).

Přírodní fenolické antioxidanty se běžně používají jako potravinářské přísady k ochraně potravin před oxidací (Schmidt & Pokorný 2005). Zhang et al. (2015)

zjistili, že u jimi sledovaných antioxidantů vykazovala většina přírodních antioxidantů vyšší redukční sílu a lépe vychytávala aktivitu volných radikálů DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl), zatímco syntetické antioxidanty měly lepší účinek při inhibici oxidace lipidů v olejové emulzi. Ve zmíněné studii měl kvercetin nejvyšší redukční sílu a patřil mezi neúčinnější látky zachycující volné radikály DPPH (Zhang et al. 2015).

Yu et al. (2005) analyzovali různé oleje lisované za studena a stanovili, že celková koncentrace fenolů v konopném oleji lisovaném za studena, vyjádřená jako ekvivalent kyseliny gallové, je 44,0 mg / 100 g. Teh and Birch (2013) zase uvedli obsah fenolových kyselin konopného oleje, vyjádřených jako ekvivalent kyseliny gallové, celkem 188,23 mg / 100 g (Yu et al. 2005; Teh & Birch 2013).

### **2.1.7 FYTOSTEROLY**

Tuky jsou obvykle doprovázeny třídou složek nazývaných fytosteroly, o nichž je známo, že snižují LDL-cholesterol v krvi. Konopný olej obsahuje mezi 3,6 a 6,7 g fytosterolů / kg oleje, přičemž hlavní složkou je  $\beta$ -sitosterol, jehož obsah odpovídá přibližně 70 % celkového obsahu fytosterolů. Dalšími fytosteroly s určitým významem jsou kampesterol, D5-avenasterol a stigmasterol. Narozdíl od jiných olejů s vysokým obsahem kyseliny linolové, jako je světlicový nebo slunečnicový olej, konopný olej neobsahuje velká množství D7-fytosterolů, jako jsou D7-kampesterol, D7-stigmasterol a D7-avenasterol. Tyto fytosteroly tvoří pouze asi 2 % z jejich celkového množství (Matthäus & Brühl 2008).

### **2.1.8 THC**

Konopí je rostlina známá produkcí delta-9-tetrahydrocannabinolu (THC), což je pryskyřice produkovaná primárně ve vrcholcích kvetoucích samičích rostlin. Jedná se o psychoaktivní látku, a tudíž mohou vznikat obavy ohledně konzumace konopných produktů.

Konopné odrůdy pěstované na vlákna nebo semena a povolené pro zemědělské pěstování v Evropské unii a Kanadě musí mít dle legislativy obsah THC nižší než 0,2 % (měřeno v horní třetině rostliny). V Německu odhadl Federální institut pro hodnocení rizik prozatímní tolerovatelný příjem THC 1–2 mg / kg / den, což by znamenalo možnou přípustnou hladinu THC v konopném oleji 5000 mg / kg. Hladinu THC výrazně snižuje nejen využití kultivarů s jeho nízkým obsahem, ale

také důkladné čištění semen. Obecně by tedy pro konopný olej THC nemělo být problémem (Matthäus & Brühl 2008). Vzhledem k jeho mizivému obsahu v konopných produktech určených ke konzumaci je logické, že na chemické pochody během skladování nemá žádný vliv.

## **2.2 OXIDAČNÍ STABILITA**

Konopná mouka, která se namele ze zbytků nažek po vylisování oleje za studena, obsahuje ještě asi 10 % oleje (House et al. 2010). Ten je velmi náchylný ke žluknutí a jeho stav je tedy důležitým kritériem pro celkové hodnocení konopné mouky.

### **2.2.1 PRINCIP OXIDACE LIPIDŮ**

Při oxidaci dochází k reakcím uhlovodíkového řetězce, které jsou společné volným mastným kyselinám a jejich esterům. V potravinách může probíhat několik typů oxidačních reakcí lipidů, jako je autooxidace vzdušným kyslíkem, oxidace hydroperoxydy či peroxidem vodíku, oxidace singletovým kyslíkem, oxidace katalyzovaná enzymy atd. Nejběžnějším typem oxidace při podmínkách skladování a zpracování potravin je autooxidace. Při běžných teplotních podmínkách se vzdušným kyslíkem oxidují jen nenasyčené mastné kyseliny. Pokud se teplota produktu zvýší na úroveň odpovídající pečení, smažení a pražení, dochází také k autooxidaci nasycených mastných kyselin (Velíšek & Hajšlová 2009).

Oxidace lipidů je obvykle indukována reaktivními volnými radikály a kyslíkovými formami. Poté může nadbytek volných radikálů a kyslíku narušit homeostázu lipidového metabolismu a urychlit tak oxidaci lipidů v těle (Lobo et al. 2010).

U autooxidace se jedná o radikálovou řetězovou reakci, která probíhá ve třech stupních. Prvním z nich je iniciační reakce, při které vzniká volný vodíkový radikál a volný radikál mastné kyseliny. Homolyticky se zde štěpí kovalentní vazby uhlíkového řetězce. Energie potřebná ke štěpení může pocházet z tepelné energie či nějakého typu záření; popřípadě může být štěpení iniciováno reakcí s jiným volným radikálem.

Druhým stupněm je stupeň propagační, který se vyznačuje reakcí vzniklého volného radikálu mastné kyseliny s molekulou kyslíku. Tím vznikne peroxylový (čili peroxidový) radikál, který odštěpí atom vodíku z další molekuly nenasyčené mastné kyseliny. Tak vznikne hydroperoxid a další volný radikál mastné kyseliny.

Poslední fází je terminace. Dochází při ní k spojení dvou radikálů, čímž vzniká neradikálový poměrně stabilní produkt (Velíšek & Hajšlová 2009).

Ve výsledku při oxidaci vzniká celá řada oxidovaných produktů, které mají škodlivé účinky na tkáňové buňky. Mohou způsobovat buněčný zánět, iniciovat rozvoj aterosklerózy, degenerativních poruch nebo jiných chronických onemocnění (Zhang et al. 2015).

### **2.2.2 OXIDACE KONOPNÉHO OLEJE**

Kvůli složení mastných kyselin s vysokým množstvím polynenasycených mastných kyselin je konopný olej velmi citlivý na oxidační poškození během skladování, ale také během tepelné přípravy jídla. Konopný olej tedy není vhodný k přípravě jídla, pokud je po delší dobu vystaven vyšším teplotám. Panenský konopný olej vykazuje významně kratší oxidační stabilitu při 120 ° C ve srovnání s panenskými oleji řepkovými nebo olivovými. Zatímco panenský řepkový olej a olivový olej mají oxidační stabilitu přibližně 4, respektive 6 hodin, panenský konopný olej se výrazně oxidačně znehodnocuje již po méně než 1 hodině. Je důležité, aby byl olej spotřebován během krátké doby po otevření lahve, protože během skladování probíhají oxidační reakce velmi rychle (Matthäus & Brühl 2008). Logicky lze tedy usoudit, že olej obsažený v konopné mouce bude také oxidovatelný velmi rychle a intenzivně.

Při oxidaci závisí tvorba peroxidu právě na složení mastných kyselin v oleji. Zatímco řepkový olej, který má vysoký obsah mononenasycené kyseliny olejové, vykazuje mírný nárůst obsahu peroxidu během skladování; u slunečnicového oleje byl tento nárůst výraznější, a ještě mnohem více se projevil u oleje z konopných semen, který se skládá až z přibližně 80 % polynenasycených mastných kyselin linolové a  $\alpha$ -linolenové. V důsledku výskytu těchto oxidačně citlivých mastných kyselin je stabilita konopného oleje během skladování nízká ve srovnání se stabilitou panenského řepkového nebo slunečnicového oleje. Projevuje se to zápachem, který připomíná linoleum nebo tmel. Panenský konopný olej skladovaný déle než 2 měsíce v otevřených lahvích by už neměl být používán k lidské spotřebě. Nicméně ve srovnání se samostatným olejem nejsou konopná semena během skladování tolik náchylná k oxidačnímu žluknutí, protože obalové vrstvy nažky lipidy dostatečně ochrání. Chlorofyl, který se hojně vyskytuje v konopném oleji zvyšuje náchylnost k oxidaci, protože působí jako fotosenzibilizátor. Proto musí být panenský konopný olej skladován ve tmě a musí být zajištěna opatření na ochranu oleje před světlem.



Nedostatečnou ochranu panenského oleje lze snadno zjistit změnou ze zelené barvy oleje na žlutou (Matthäus & Brühl 2008).

### 2.2.3 OVLIVNĚNÍ OXIDAČNÍ STABILITY

Žluknutí jedlých olejů a produktů s jejich obsahem v důsledku oxidace lipidů je vážným problémem potravinářského průmyslu. (Gao & Birch 2016). Stabilita tuků závisí na několika aspektech, především na kompozici jejich mastných kyselin a na přítomnosti antioxidačních látek, jako jsou tokoferoly a různé pigmenty (Abuzaytoun & Shahidi 2006).

Mastné kyseliny ovlivňují stabilitu olejů například svým stupněm nenasycenosti a svým polohovým umístěním v triacylglycerolu. Kromě toho je oxidační rychlost triacylglycerolů ovlivněna délkou uhlíkového řetězce těchto jejich základních složek. Svou roli v antioxidační stabilitě hraje také počet molů polynenasycených mastných kyselin v molekulární struktuře triacylglycerolů, kde polynenasycené mastné kyseliny jsou méně stabilní vůči oxidaci, pokud jsou umístěny na krajních uhlících glycerolu oproti tomu, jsou-li navázány na prostředním uhlíku glycerolu (Endo et al. 1997; Gao & Birch 2016). Například při hodnocení oxidační stability chemicky syntetizovaných triacylglycerolů bylo zjištěno, že lipid obsahující dvě molekuly kyseliny linolové a jednu molekulu kyseliny linolenové je stabilnější, pokud je kyselina  $\alpha$ -linolenová navázána na prostředním uhlíku a krajní uhlíky glycerolu jsou obsazeny kyselinou linolovou, ve které se nachází méně dvojných vazeb (Miyashita et al. 1990). Zmíněné dvě polynenasycené mastné kyseliny (kyselina linolová (18 : 2 n-6) a kyselina  $\alpha$ -linolenová (18 : 3 n-3)) jsou hlavními mastnými kyselinami v konopném oleji, jak již bylo zmíněno v kapitole o chemickém složení nažek konopí (Da Porto et al. 2012). Anwar et al. ve své studii uvádí, že konopné oleje obsahují hladiny kyseliny linolové dokonce 56,50 - 60,50 %, dále kyseliny linolenové 16,85–20,00 %, olejové 10,17–14,03 % a nízké hladiny kyseliny palmitové, stearové a  $\gamma$ -linolenové (Anwar et al. 2006).

Vliv struktury triacylglycerolů na oxidační stabilitu rostlinných olejů však není vždy konzistentní (Endo et al. 1997).

Vedle struktury triacylglycerolů a jejich mastných kyselin, mají na stabilitu oleje, který zbyl v mouce, vliv i další faktory. Jedná se především o obsah přírodních antioxidantů. Kromě lipidů se totiž jedlé oleje skládají z takzvané nezmýdelnitelné hmoty, která v nich tvoří asi 5 %. Tyto vedlejší složky jsou přirozeně se vyskytující

sloučeniny s antioxidačními vlastnostmi, které pomáhají chránit oleje před oxidačním poškozením, a proto hrají důležitou roli v jejich oxidační stabilitě. Podstatnými složkami rostlinných olejů jsou hlavně fosfolipidy, fenolové sloučeniny, pigmenty, steroly a volné mastné kyseliny, stejně jako monoacylglyceroly a diacylglyceroly. V každém oleji může být přítomno několik tříd těchto složek, které intenzivně přispívají k jeho oxidační stabilitě (Abuzaytoun & Shahidi 2006). Konopná semena obsahují mnoho přírodních antioxidantů, jako jsou fenolové sloučeniny, fytosteroly a tokoferoly (Esmaeilzadeh Kenari & Dehghan 2020).

Antioxidační sloučeniny jsou schopné významně potlačit, zpozdit nebo zabránit škodlivým oxidačním procesům, způsobeným hlavně reaktivními formami kyslíku (Christodouleas et al. 2015). Některé antioxidanty získané z rostlinných extraktů mohou být používány v potravinářském průmyslu ke zvýšení trvanlivosti potravin (Schwarz et al. 2001).

Přírozně se vyskytujícími sloučeninami s antioxidační aktivitou jsou již zmíněné tokoferoly (Kriese et al., 2004). Profil tokoferolu konopných semen obecně zahrnuje různé izomery  $\alpha$ -tokoferolu,  $\beta$ -tokoferolu,  $\gamma$ -tokoferolu a  $\delta$ -tokoferolu (Kriese et al., 2004; Callaway, 2004). Dominantním antioxidantem v konopných semenech byl dle jedné víceleté studie sledující 51 genotypů konopí  $\gamma$ -tokoferol. Dalším hojně zastoupeným tokoferolem zde byl  $\alpha$ -tokoferol, dále  $\delta$ -tokoferol a  $\beta$ -tokoferol. Autor uváděl průměrný obsah  $\gamma$ -tokoferolu 21,68 / 100 g semen,  $\alpha$ -tokoferolu 1,82 / 100 g semen,  $\delta$ -tokoferolu 1,20 / 100 g semen a  $\beta$ -tokoferolu 0,16 mg / 100 g semen. Celkový obsah tokoferolu se ve zmíněné studii pohyboval od 14,33 mg / 100 g semen do 34,03 mg / 100 g semen (Kriese et al. 2004). Tokoferoly se v této práci zabývá samostatná kapitola.

Dalšími významnými sloučeninami s antioxidační aktivitou jsou fenoly, kterými se také zabývá samostatná kapitola této práce.

Vonapartis et al. své pojednání o výskytu antioxidantů v konopných semenech shrnuli tím, že jejich výsledky poukazují na vysoký obsah antioxidantů v tomto produktu (Vonapartis et al. 2015). Dokonce i relativně vysoké množství tokoferolů, sestávající se hlavně z antioxidačně aktivního  $\gamma$ -tokoferolu, však vzhledem ke specifickému zastoupení mastných kyselin v konopném oleji nevede k jeho vysoké stabilitě při skladování. Již po krátké době skladování není olej vhodný k lidské konzumaci (Matthäus & Brühl 2008).

Antioxidanty nejen ovlivňují a určují trvanlivost, nutriční hodnotu a kvalitu potravinářských výrobků, ale jejich koncentrace ve vzorcích potravin lze také použít jako indikátor původu a čerstvosti (Christodouleas et al. 2015)

Většina potravinářských výrobků prochází určitým stupněm zpracování, než se dostane ke spotřebitelům. Výsledkem je, že proteinové izoláty, i v případě, že jsou získávány pouze mechanickým způsobem, jsou běžně podrobovány dalším úpravám při následné výrobě potravin, včetně acidifikace a zahřívání. Zahřívání je spojeno se strukturálními změnami na molekulární úrovni v globulárních proteinech. Tyto konformační změny zahrnují rozvinutí nativní terciární struktury, expozici hydrofobních skupin a následnou agregaci denaturovaných molekul (Raikos et al. 2015). Povaha proteinových agregátů vytvořených během tepelného zpracování závisí na koncentraci proteinu, pH a podmínkách zahřívání (Nicolai & Durand 2013). Elektrostatické a hydrofobní interakce nebo disulfidové můstky mezi tepelně denaturovanými molekulami mohou vést k tvorbě agregátů, které by mohly ovlivnit stravitelnost proteinů. Kromě toho mohou být po trávení v zažívacím traktu člověka generovány peptidy s různými strukturálními charakteristikami, jako je velikost molekul, hydrofobicita a složení aminokyselin, což by právě mohlo ovlivnit antioxidační aktivitu (Delgado et al. 2015). Řízení tepelně indukovaných změn proteinových struktur může být tedy zásadní pro vývoj produktů se zlepšenými nutričními, popřípadě i funkčními vlastnostmi (Raikos et al. 2015).

Pro odhad antioxidačních vlastností přírodních produktů bylo vyvinuto mnoho metod, které lze rozdělit do dvou hlavních kategorií. Jedná se o metody založené na hodnocení aktivity vychytávání volných radikálů ve vzorcích a o metody založené na hodnocení redukční aktivity přírodních vzorků (tj. stanovení železité redukční či antioxidační síly a stanovení měďnaté antioxidační kapacity) (Christodouleas et al. 2015).

## **2.3 SKLADOVÁNÍ**

### **2.3.1 VLHKOST**

Hygroskopická povaha mouky obecně silně ovlivňuje její kvalitu, technologické vlastnosti a také fyzikální vlastnosti. Obsah vlhkosti v mouce je významný z hlediska trvanlivosti a stability při skladování (Rehman et al. 2017).

Existují studie pozorující skladování podobných produktů, jako jsou konopné bílkovinné mouky. Například Raleng et al. (2014) sledovali moučku s vysokým

obsahem bílkovin z odtučněných sezamových semen. Vzorke zhotovili tak, že odstranili olej ze sezamových semínek a ze vzniklých výlisků vyrobili sezamovou mouku tím, že po různých předúpravách a sušení materiál namleli. Tito autoři zjistili, že během skladování došlo ve všech vzorcích k významnému ( $p < 0,5$ ) zvýšení obsahu vlhkosti. Rychlost nárůstu vlhkosti byla významnější za podmínek běžného skladování spíše než při chladírenských teplotách a lišila se podle typu použitého obalového materiálu. Nárůst vlhkosti u vzorků zabalených do obalového materiálu z nízkohustotního polyethylenu (LDPE) byl nejvýraznější a zvýšil se z 3,9 % na 6,20 % při skladování při podmínkách okolního prostředí a na 5,33 % při chladírenských podmínkách. Dalším obalovým materiálem ve zmíněné studii byla hliníková fólie, ve které vlhkost vzorků vzrostla na 4,50 % při podmínkách okolního prostředí a na 4,42 % při chlazení. Všechny zmíněné údaje byly měřeny po 75 dnech skladování. Autoři této studie také uvádějí, že všechny úrovně vlhkosti jsou však v rámci norem, protože obsah vlhkosti by měl být nižší než 9 %. V souladu s tím lze všechny vzorky uchovávat minimálně dva měsíce. Sezamovou mouku zabalenou v hliníkové fólii lze uchovávat více než 75 dní při obou sledovaných podmínkách skladování. Kolísání obsahu vlhkosti v těchto výrobcích může přímo souviset s rychlostí přenosu vodní páry v obalových materiálech. Obaly z hliníkové fólie uchovávané v chladu byly nejúčinnější a nejméně propustné pro vlhkost. To bylo způsobeno především skutečností, že hliníková fólie má ve vlhkém prostředí nízkou rychlost přenosu vodní páry (Raleng et al. 2014).

Jiná studie se zabývala moukou ze směsi pšeničné mouky a mouk z různých luštěnin. Stabilita této mouky byla skladováním silně ovlivněna. Obsah vlhkosti se opět během skladování zvýšil, protože mouka absorbuje vlhkost z okolí kvůli své hygroskopické povaze. Snižil se obsah bílkovin, tuků a vlákniny. Snížení množství bílkovin je způsobeno právě absorpcí vlhkosti z okolí, což urychlilo proteolytickou aktivitu enzymů. Enzymy jsou odpovědné za degradaci bílkovin během skladování. Bylo zde pozorováno postupné snižování obsahu tuku, což může být způsobeno rozvojem žluknutí. Zhoršení kvality tuku během skladování může být zase způsobeno aktivací lipázového enzymu, který by mohl štěpit tuk na volné mastné kyseliny a glycerol. Zodpovědné za to mohou být faktory, jako je neustále zmiňovaná vlhkost, dále světlo a teplo. Kyselost se zvýšila, protože vyšší aktivita lipázy, která vede ke žluknutí, způsobuje pokles obsahu tuku, který úzce souvisí se zvýšením obsahu volných mastných kyselin, jejichž výskyt logicky zvyšuje kyselost vzorku. Zvýšení

hodnoty peroxidového čísla v této studii bylo způsobeno rozvojem žluknutí (Rehman et al. 2017).

Nevýhodou konopné mouky je, že její hygroskopicitata je ještě větší než u obilných mouk. Ve studii zabývající se vzorky pšeničné mouky, do kterých bylo přidáno 10, 15 a 20 % konopné mouky, se uvádí, že přijímání vlhkosti vzrůstalo se stoupajícím zastoupením přidané konopné mouky do pšeničné. Absorpční kapacita pro vlhkost výsledné moučné směsi se zvýšila o 3 % u mouky s deseti procenty konopné mouky, o 6 % v mouce z patnácti procent konopné a o 13 % s jejím dvaceti procentním zastoupením, ve srovnání s kontrolou (Sokolova & Iorgacheva 2020). Koresponduje to i s výzkumem předcházejícím této práci, kde bylo navíc na základě vážkové analýzy zjištěno, že vlhkost konopné mouky je nejvyšší u vzorků obsahujících nejvíce bílkovin. Konkrétně byl pozorován nejnižší obsah sušiny u frakce konopné mouky s částicemi menšími než 180  $\mu\text{m}$ , která obsahuje nejvíce bílkovin. Kromě toho, že je tento materiál tvořen menšími částicemi, a tudíž má větší plochu, kterou může absorbovat vzdušnou vlhkost, i samotné bílkoviny způsobují větší hydrataci vodou. Nicméně zde měly všechny vzorky přijatelnou vlhkost pod 8 % (Němcová 2019).

### **2.3.2 OBALOVÝ MATERIÁL**

Neopomenutelný vliv na kvalitu skladování má i obalový materiál. Balení je prostředek zajišťující správné podmínky prostředí pro potraviny během skladování a výběr materiálů pro obal závisí mimo jiné na povaze produktu, podmínkách skladování a manipulaci (teplota, vlhkost, riziko fyzického poškození). Obal může významně ovlivnit nejen chemické, funkční, mikrobiologické a senzorické vlastnosti mouky, ale také její trvanlivost (Daramola et al. 2010).

Důležitým parametrem obalového materiálu je jeho propustnost pro vlhkost. Vyplývá to zřetelně z předchozích odstavců zdůrazňujících hygroskopickou povahu suchých materiálů jako je mouka. Hygroskopicitata je u bílkovinných mouk navíc zintenzivněna právě vysokým zastoupením bílkovin. Obecně mají dobrou bariéru proti vlhkosti polyethylenové fólie (Ukpabi et al. 2012).

Beigh et al. (2010), kteří se ve svém výzkumu zabývali skladováním jednoho speciálního druhu mouky, zjistili, že na obsah vlhkosti měl statisticky velmi významný vliv obalový materiál a doba skladování, a významná byla i jejich interakce. Počáteční obsah vlhkosti zde byl 9,68 %. Ten po 180 dnech skladování významně ( $p < 0,05$ ) vzrostl na 10,20 % v obalu z vysokohustotního polyethylenu (HDPE) a na 10,35 %

v sáčcích z nízkohustotního polyetylenového materiálu (LDPE). Menší přírůstek vlhkosti u mouky balené v HDPE sáčcích byl pravděpodobně způsoben jeho více nepropustnou povahou pro vlhkost a vodní páry, než je tomu u LDPE (Beigh et al. 2019).

Vzorky balené do polyethylenu o vysoké hustotě poskytly nejdelší odhadovanou trvanlivost i u dalších druhů mouky a tento obalový materiál je ke skladování mouky považován za nejlepší (Daramola et al. 2010).

V již jednou zmíněné studii porovnávající skladování mouky v hliníkových fóliích a LDPE byly fyzikálně-chemické vlastnosti vzorků mouky balených do hliníkové fólie a skladovaných v chladu nejlepší z hlediska obsahu vlhkosti, bílkovin, tuku, vlákniny, popela, barvy a pH, zatímco vzorky mouky balené do LDPE a skladované za podmínek okolního prostředí vykazovaly lepší výsledky z hlediska rozpustnosti ve vodě, indexu bobtnavosti, obsahu kyseliny šťavelové, barvy a viskozity (Raleng et al. 2014).

## **2.4 MIKROBIOLOGICKÁ KONTAMINACE**

Dříve než se semena dají konzumovat jako potraviny, projdou procesy pěstování, sklizně, sušení, přípravy a uvádění na trh (včetně skladování) vše za přirozených podmínek, a proto se v nich často vyskytuje mikrobiologická kontaminace a infekce. Všechny jejich produkty mohou být kontaminovány mikromycetami, a to ve všech fázích výrobního řetězce (Al-Defiery & Merjan 2015).

Mikroskopické houby jsou v přírodě hojně přítomné a pro růst jim stačí jen nepatrná vlhkost oproti jiným patogenním organismům. Mezi různými mikroorganismy se v mouce nejčastěji vyskytují právě mikromycety. Nižším obsahem vlhkosti však i u nich dochází ke zpomalenému dýchání a celkové aktivitě (Rehman et al. 2017).

Podle Al-Defiery & Merjan (2015), kteří se zabývali kontaminací mikromycetami nebo jejich sporami v pšeničné mouce byly nejhojněji zastoupené rody: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Mucor*, *Rhizoctonia*, *Trichoderma*, *Rhizopus*, *Nigrospora*, *Bipolaris*, *Macrophomina* (řazeno sestupně). Korelační analýza zde odhalila pozitivní korelaci mezi obsahem vlhkosti a přítomnými houbami. V tomto případě byly vzorky skladovány po dobu tří měsíců a při dvou různých teplotách (5 °C a 30 °C). Výsledky ukázaly, že skladování při teplotě 5 °C snižuje nejen populaci mikromycet, ale i počet jejich druhů na pšeničné

mouce. Nejdůležitějšími faktory při skladování jsou teplota a druh mouky. Pro každý druh mikromycet existuje optimální teplotní rozsah pro růst a ne všechny, které se nacházejí v mouce, jí napadnou až při skladování. Proto je důležité zabránit jejich rozvoji snížením teploty a obsahu vlhkosti (Al-Defiery & Merjan 2015).

Mikrobiologická kontaminace se může během doby skladování vyvíjet, rozšiřovat. Ve studii, při které byla pozorována pšeničná mouka během šesti měsíců skladování, a při které bylo odebráno pět vzorků v třicetidenních intervalech na hodnocení mykobioty, bylo poukázáno na to, že ve všech 35 analyzovaných vzorcích bylo detekováno mnoho mykotoxinů, jako jsou aflatoxiny, ochratoxin A, zearalenon, deoxinivalenol a fumonisin FB2. Prevence mykotoxinů je velmi důležitá, protože jakmile se vyvinou, stanou se stabilními při teplotě prostředí a velmi odolnými vůči tepelným změnám (Birck et al. 2006).

Aby byla zachována kvalita a bezpečnost mouky a jejích produktů a zabráněno kontaminaci, je nutné prozkoumat přítomnost mikromycet a jejich produktů v mouce a identifikovat izolované druhy a definovat efekt skladování mouky na přítomnost jejich forem (Al-Defiery & Merjan 2015).

Zvyšující se obsah vlhkosti může mít za následek nárůst mikroskopických hub. Úroveň vodní aktivity v potravinách má praktický význam, protože řídí nástup jejich rozvoje a závažnost jejich následků. Běžně se pozoruje, že potraviny, u nichž je pravděpodobné, že se rychle zkaží v důsledku biologických a chemických změn, jsou obvykle potraviny s vysokým obsahem vody (Abdullah et al. 2000). Bylo ověřeno, že existuje korelace mezi rozsahem růstu mikromycet a vlhkostí ve vzorcích pšeničné mouky. Houby, stejně jako všechny živé organismy, vyžadují základní faktory pro život, mezi které patří i voda.

Vývoj mikrobiologické kontaminace během skladování lze kontrolovat, ale také mu lze zabránit zajištěním dostatečného vysušení materiálu při příjmu do skladovacích prostor. Další ochranu lze zajistit zabráněním vývoje teplotních a vlhkostních gradientů pomocí ochlazování nebo provzdušňování zrna. Ochrana před napadením hmyzem je také velmi důležitá pro zabránění napadení mikromycetami a jejich rozvoje v uskladněných zrnech (Al-Defiery & Merjan 2015).

Znečištění mikromycetami je také důležité hlídat s ohledem na možnou produkci mykotoxinů, a to u značného počtu jejich druhů (Hussein 2001). Bylo zjištěno, že mikroskopické houby nejen způsobují znehodnocení, ale někdy, pokud existují příznivé podmínky prostředí, dochází právě k produkci toxinů. Výskyt těchto

toxínů v potravinářských výrobcích je ovlivňován faktory prostředí během období před sklizní, sklizně a také po sklizni, tedy i při skladování. Proto jsou skladovací podmínky, doba skladování a skladovací materiály klíčovými faktory, které přispívají ke stabilitě mouky (Rehman et al. 2017).

Jedním z největších problémů, které ovlivňují producenty konopí, jsou mykotoxiny přítomné v konopných produktech. Mykotoxiny v konopí mohou pocházet z půdy, atmosféry a manipulace. Vysoká hladina mykotoxinů v konopných výrobcích může být pro spotřebitele zdraví nebezpečná a může ovlivnit snížení kvality a trvanlivosti produktů. I konopná mouka, která je bohatá na zdravé tuky, hořčík, vlákninu a bílkoviny, může být kontaminována zdraví nebezpečnými mikroorganismy a s tím spojenými aflatoxiny (Vujčić & Mašić 2021).

Aflatoxiny jsou přírodní mykotoxiny, které se vyskytují hlavně v oblastech s vlhkým podnebím (Vujčić & Mašić 2021). Bylo pozorováno, že čím delší je doba skladování, tím vyšší je koncentrace produkovaného aflatoxinu. Kromě toho, pokud jsou tyto potravinářské výrobky uchovávány po dlouhou dobu, je třeba zabránit skladování ve vlhkém prostředí. Tyto materiály musí být umístěny v suchém prostředí (s velmi nízkou relativní vlhkostí), aby se omezila tendence růstu aflatoxigenních mikromycet, které by mohly po dlouhé době skladování produkovat mykotoxiny (Al-Defiery & Merjan 2015).

Jednou z metod úspěšné eliminace aflatoxinů je ošetření gama zářením. Při hodnocení vlivu gama záření na obsah aflatoxinů v konopné mouce, na její mikrobiologické vlastnosti (celkový počet mikroorganismů, mykromycet a potenciálně patogenních bakterií) a na její nutriční hodnoty bylo zjištěno, že dávka 4 kGy je dostatečná k eliminaci aflatoxinů pod přijatelnou hodnotu. Ozařovací dávka 8 kGy je dostatečná k eliminaci celkového počtu mikroorganismů a mykromycet. Ošetření 3 kGy zvládne odstranit všechny bakterie. Nakonec bylo prokázáno, že záření gama neovlivňuje nutriční hodnotu produktu. Gama záření je tedy účinná metoda konzervace potravin, která zaručuje dekontaminaci potravin a ochranu živin (Vujčić & Mašić 2021). Nejčastějšími kmeny aflatoxinů nacházejícími se v potravinách jsou aflatoxiny B1, B2, G1 a G2. Typ B1 je nejtoxičtější a může způsobit vážná onemocnění, jako jsou nádory, autoimunitní reakce, onemocnění jater a dokonce smrt (Kanapitsas et al. 2015). Ozařování je i dle dalších autorů jednou z nejúčinnějších metod konzervace potravin. Zaručuje dekontaminaci potravin a ochranu živin



(Fernandes et al. 2016). Nejčastěji používanými zdroji záření pro ozařování potravin jsou kobalt-60 a cesium-137 (Vujčić & Mašić 2021).

Rozvoj mykromycet také velmi záleží na obalovém materiálu, což vyplývá i z toho, že mikrobiální zatížení silně pozitivně koreluje s vlhkostí, přičemž vlhkost, jak již bylo zmíněno, úzce závisí na obalovém materiálu. Dle výzkumu Daramola et al. měly vzorky v nezakrytém polyvinylchloridovém obalu nejvyšší mikrobiální zátěž, zatímco nejnižší mikrobiální zátěž byla pozorována u polyethylenového filmu s vysokou hustotou. Mikrobiální zátěž mouky během doby skladování rostla právě se zvyšujícím se obsahem vlhkosti (Daramola et al. 2010).

### 3. CÍL

Kromě zpracování literárního přehledu z odborné literatury bylo cílem této diplomové práce:

1) Rozdělit pomocí prosívání konopnou mouku na dvě velikostní frakce (s částicemi menšími než 180  $\mu\text{m}$  a částicemi většími než 180  $\mu\text{m}$ ). Jemnější mouku lze při tom považovat za bílkovinný koncentrát a v hrubší mouce převažuje její vlákninová část.

2) Založit skladovací pokus původní mouky a dvou získaných frakcí za různých skladovacích podmínek a při různém balení.

3) Pomocí různých laboratorních analýz zjistit antioxidační stabilitu těchto konopných produktů v závislosti na obsahu zbytkového tuku.

4) Určit nevhodnější variantu skladování.

## 4. METODIKA

### 4.1 MATERIÁL

Praktická část této diplomové práce se zabývala moukou z konopí setého (*Cannabis sativa* L.) dodanou českou společností HEMP PRODUCTION s.r.o. Mouka pocházela z konopných nažek odrůdy USO 31, ze kterých byl za studena vylisován olej.

Jedná se o komerčně dostupný produkt, který byl ale dále frakcionován na základě velikosti částic. Sledována byla frakce bílkovinná s částicemi menšími než 180  $\mu\text{m}$  a frakce obsahující převážně vlákninu s částicemi většími než 180  $\mu\text{m}$ .

USO 31 je odrůda technického konopí s vysokým obsahem kanabidiolu (CBD), kterou lze legálně pěstovat v České republice i ve všech zemích Evropské unie. Obsah THC je u těchto certifikovaných odrůd do 0,2 %. Tato odrůda je vhodná jak pro produkci nažek, tak k zpracování vláken a celé biomasy (Anon. 2021).

### 4.2 PŘÍPRAVA VZORKŮ A VARIANTY POKUSU

Konopná mouka z celých semen zbavených oleje lisováním za studena byla prosíváním přes síto s velikostí ok 180  $\mu\text{m}$  rozdělena na dvě velikostní frakce (s částicemi menšími než 180  $\mu\text{m}$  a většími než 180  $\mu\text{m}$ ).

Během této přípravy vzorků k dalším analýzám byl gravimetricky zjišťován výtěžek zmíněných frakcí konopné mouky. Vážková analýza byla provedena v šesti opakování.

Jednotlivé frakce i původní mouka byly osm měsíců skladovány za různých podmínek, vedle toho byly hodnoceny i totožné vzorky před zahájením skladování.

#### 4.2.1 Podmínky skladování

Pro skladování bylo pro každou variantu odváženo 12 g vzorku. Vzorky byly skladovány v papírových sáčcích a ve vakuu.

Skladované vzorky byly zabaleny do papírových sáčků o velikosti 90 mm x 140 mm a pro vakuové balení byly použity speciální vakuové sáčky ze směsi polyamidu a polyethylenu, které byly z jedné strany vroubkované o tloušťce 380  $\mu\text{m}$  a z druhé strany hladké o tloušťce 90  $\mu\text{m}$ .

Vzorky z každé varianty balení byly uloženy v různých teplotních podmínkách, a to při laboratorní teplotě (20 °C) a v chladícím boxu (5 °C).

Každá varianta měla 3 opakování.

Vzorky připravené na skladování jsou zobrazené na obrázku č. 1 v příloze.

#### **4.2.2 Sledované parametry**

U jednotlivých frakcí mouky před a po skladování byly hodnoceny tyto parametry: obsah sušiny, obsah tuku, titrační kyselost, antioxidační aktivita a obsah polyfenolů.

### **4.3 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.

### **4.4 STANOVENÍ OBSAHU TUKU**

#### **4.4.1 Princip**

Tuk se stanovuje pomocí promývání vzorku rozpouštědlem, jako je například petrolether. Rozpouštědlo se následně nechá z extrahovaného tuku odpařit, a po úplném vysušení zbylého vzorku nebo vyextrahovaného tuku se gravimetricky zjistí obsah tuku.

Metoda extrakce dle Soxhleta je nejlepší metodou používanou k získání velkého množství výtěžků s malým množstvím rozpouštědel a dokonale vyextrahovanými vzorky (Boni et al. 2018).

#### **4.4.2 Postup**

Zbytkový obsah tuku byl zjištěn pomocí semiautomatizované Soxhletovy extrakce. K této analýze byl použit 1 g vzorku, který byl zataven do filtračního sáčku a vysušen v sušárně Universal oven UN75 (Memmert, Německo) při 100 °C 3 h. Vzorky se pak nechaly vychladnout v exikátoru. Vzápětí byla provedena extrakce tuku v extraktoru ANKOM<sub>XT10</sub> Extractor (ANKOM Technology, USA) pomocí promývání petroletherem po dobu třiceti minut při 90 °C. Vyextrahované vzorky se opět nechaly vysušit po dobu 30 min. při 100 °C a vychladnout v exikátoru. Na závěr byly odtučněné vzorky zváženy, čímž se po odečtení zjistil obsah tuku.

## 4.5 STANOVENÍ TITRAČNÍ KYSELOSTI

### 4.5.1 Princip

Kyselost mouky je způsobena hydrogenfosforečnany, dihydrogenfosforečnany, mastnými kyselinami a rozpustnými organickými kyselinami. Její hodnota stoupá se vzrůstajícím stupněm vymletí, se stářím mouky, s vlhkostí a teplotou při skladování. Mírný růst kyselosti při dozrávání mouky skladované za správných podmínek má příznivý vliv na jakost lepku.

Jedná se o jeden z nejdůležitějších ukazatelů pekařské kvality mouky (Simion et al. 2020).

Titrační kyselost odpovídá celkové koncentraci titrovatelných kyselin ve vzorku. Národní a mezinárodní standardy pro stanovení titrační kyselosti jsou založeny na technikách acidobazické titrace (Berezin 1995).

Obvykle se titrační kyselost mouky stanovuje tak, že se za stálého míchání přidá k 10 g vzorku mouky 100 cm<sup>3</sup> destilované vody a za občasného míchání se nechá třicet minut louhovat. Po přidání barviva fenolftaleinu se pak směs titruje odměrným roztokem NaOH ( $c=0,1 \text{ mol / dm}^3$ ) do bodu ekvivalence, který se projeví růžovým zbarvením. Vzhledem k tmavé barvě konopné mouky nebylo možné při tomto postupu přesně rozpoznat bod ekvivalence, a to ani po mnohonásobném ředění. Metodiku pro stanovení titrační kyselosti mouky z konopných výlisků bylo tedy nutné modifikovat.

### 4.5.2 Postup

Do 50ml centrifugační zkumavky se navážil 1 g vzorku mouky, ke kterému se přidalo 40 ml destilované vody. Směs se promíchala a nechala 20 minut extrahovat. Poté byla centrifugována 5 min, při 4500 RPM. Supernatant byl následně převeden do titrační baňky a doplněn 60 ml destilované vody. Po přidání asi tří kapek fenolftaleinu se titrovalo odměrným roztokem NaOH o koncentraci  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  do růžového zbarvení, které před světlým pozadím vydrželo 1 minutu.

### 4.5.3 Výpočet

Kyselost mouky v mmol / kg byla vypočtena dle následujícího vzorce:

$$x = c_{\text{NaOH}} * f_{\text{NaOH}} * V_{\text{NaOH}} * 1000 / m$$

kde

x = kyselost mouky

$c_{\text{NaOH}}$  = koncentrace odměrného roztoku NaOH

$f_{\text{NaOH}}$  = korekční faktor odměrného roztoku NaOH

m = navážka vzorku

a vypočtená hodnota byla dále přepočítána na sušinu.

## 4.6 STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY METODOU VYUŽÍVAJÍCÍ DPPH

### 4.6.1 Princip

Při metodě používající DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl) se hodnotí eliminace syntetických radikálů. Metoda spočívá v hodnocení schopnosti vzorku vychytávat volné syntetické stabilní radikály difenylpikrylhydrazylu - DPPH (Paulová et al. 2004). 1,1 Difenyl-2-pikryl-hydrazyl je stabilní volný radikál, který má nepárový valenční elektron na jednom atomu dusíkového můstku (Eklund et al. 2005).

Jedná se o jednu ze základních metodik pro posouzení antioxidační aktivity čistých látek i různých směsných vzorků. Při reakci testované látky se stabilním radikálem dochází k redukci radikálu za vzniku DPPH-H (difenylpikrylhydrazin) (Paulová et al. 2004). Tento typ testu je možné provést několika různými metodikami, což však vede k odchýlkám ve výsledcích různých laboratoří (Sharma & Bhat 2009). Podle několika studií je vhodným rozpouštědlem pro stanovení DPPH methanol (Ayres, 1949; Ozcelik et al., 2003). Rozpouštědlem je značně ovlivněn rozsah inhibice (Sharma & Bhat 2009).

Stanovení DPPH je rychlá a spolehlivá metoda pro určení schopnosti antioxidantů zachytávat volné radikály. Měří se změna barvy od tmavě fialové, která je u slepého vzorku, po světle žlutou při redukování DPPH antioxidačním prostředkem (Aree & Jongrungruangchok 2018).

Reakce je nejčastěji sledována spektrofotometricky. Pokles absorbance při prostupu světla o vlnové délce 517 nm se měří buď po uplynutí určitého konstantního času, nebo se pracuje v kinetickém režimu (Paulová et al. 2004). Absorbance DPPH značně závisí na světle, kyslíku a pH reakční směsi. Všechny operace musí být prováděny v temném nebo tlumeném světle (Ozcelik et al. 2003).

Test lze provádět i na mikrotitračních destičkách. U směsných vzorků se radikálová aktivita někdy vyjadřuje v ekvivalentech askorbové kyseliny nebo v jednotkách standardu Troloxu. (Paulová et al. 2004).

#### 4.6.2 Postup

1. Příprava zásobního roztoku volného radikálu DPPH:

0,025 g radikálu DPPH se ve 100ml odměrné baňce rozpustí v metanolu, který se doplní po rysku. Vzniklý roztok je o koncentraci  $c = 0,000634 \text{ mol / l}$  a je nutné jej uchovávat ve tmě při chladničkové teplotě.

2. Příprava kalibračních roztoků standardu TROLOXu:

0,0501 g TROLOXu se rozpustí ve 100ml odměrné baňce ve 100% metanolu doplněném po rysku.

Z roztoku se pipetuje kalibrační řada dle tabulky č. 1.

Tab. č. 1: Objemy pro pipetování kalibrační řady

TROLOX / $\mu\text{l}$	Metanol / $\mu\text{l}$	Výsledná koncentrace / $\text{mmol / l}$
0	500	0
25	475	0,1
50	450	0,2
75	425	0,3
100	400	0,4
150	350	0,6
200	300	0,8
250	250	1,0
300	200	1,2
350	150	1,4
400	100	1,6
450	50	1,8
500	0	2,0

3. Příprava pracovního roztoku DPPH:

Těsně před začátkem měření se odebere 10 ml zásobního roztoku DPPH a ve 100ml odměrné baňce doplní po rysku metanolem ( $c = 0,0000634 \text{ mol/l}$ ).

4. Příprava vzorku:

Konopné mouky se v centrifugačních mikrozskumavkách naředí destilovanou vodou na koncentraci 10 mg / ml a po centrifugaci se dále pracuje se supernatantem.

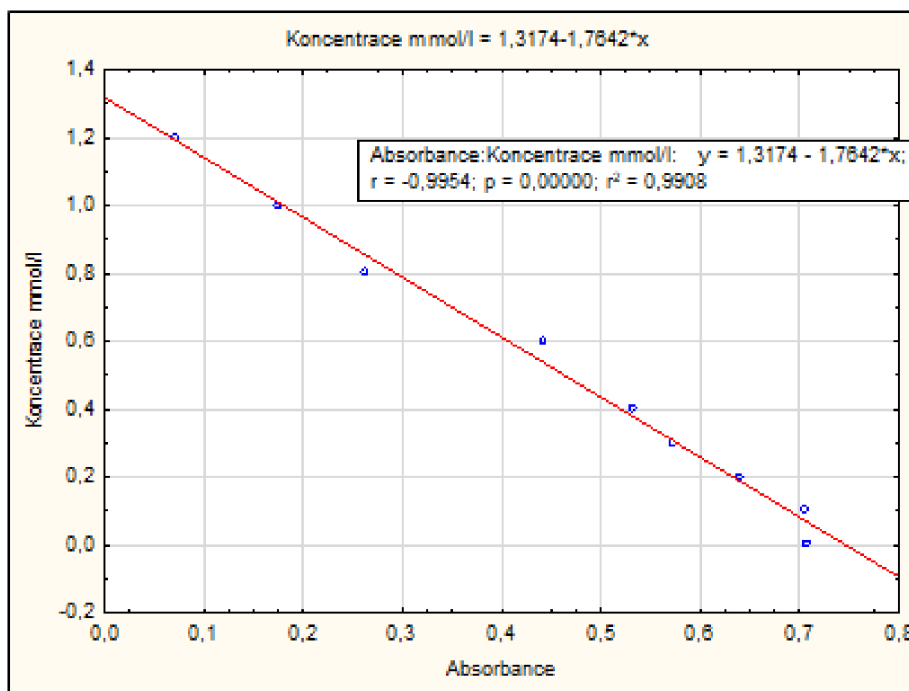
## 5. Měření absorbance:

Okamžitě poté, co se připraví pracovní roztok DPPH, se změří jeho absorbance, a to při vlnové délce 515 nm. Do 1ml kyvet se dá vždy 0,975 ml pracovního roztoku volného radikálu a 0,025 ml kalibračního roztoku pro celou kalibrační řadu. Absorbance kalibračních roztoků se pro určení celkového úbytku absorbance měří se stejnou vlnovou délkou až po třiceti minutách, čímž se zjistí celková antioxidační aktivita. Stejným způsobem se změří absorbance i u vzorků - 0,975 ml pracovního roztoku volného radikálu DPPH se v kyvetách smíchá s 0,025 ml supernatantu.

## 6. Kalibrační řada:

Graf č. 1 ukazuje lineární závislost absorbance na koncentraci standardu TROLOXu.

Graf č. 1: Kalibrační křivka standardu



## 7. Výpočet:

Antioxidační kapacita vzorků ve srovnání se standardem TROLOXem, takzvaný trolox ekvivalent (TE), se vypočítá pomocí rovnice získané z kalibrační křivky:  $y = 1,3074 - 1,7642x$ .

## 4.7 STANOVENÍ OBSAHU POLYFENOLŮ

### 4.7.1 Princip

Měření celkové antioxidační kapacity lze obecně rozdělit do dvou skupin: testy založené na přenosu elektronů a na přenosu atomů vodíku. Testy založené na



molekulární spektroskopii na bázi přenosu elektronů měří kapacitu antioxidantu za současné redukce oxidantu, při čemž se mění absorbance. Mezi tyto metody se řadí i metoda stanovení celkových polyfenolů Folin-Ciocalteuovým činidlem.

Metoda s Folin-Ciocalteuovým činidlem byla původně vyvinuta pro analýzu proteinů s využitím aktivity činidla vůči zbytku proteinu tyrosinu (obsahujícího fenolovou skupinu). Mnohem později byl tento test rozšířen na analýzu celkových fenolů ve víně. Tato metoda má určité výhody oproti některým jiným testům pro zjištění celkové antioxidační kapacity v tom, že je jednoduchá, rychlá, stálá a nevyžaduje specializované vybavení. Její nevýhodou je ale to, že redukční činidla, jako je kyselina askorbová nebo určité aminokyseliny, mohou interferovat s analýzou, a tak nadhodnocovat obsah fenolických sloučenin.

Popisovaná metoda je v zásadě založena na oxidaci fenolových sloučenin v alkalickém (uhličitanovém) roztoku pomocí molybdowolframového heteropolyaniontového (Folin-Ciocalteuova) činidla, čímž se získá barevný produkt s maximem absorbance při 765 nm. Protože však většina fenolických sloučenin je při pracovním pH (pH ~ 10) v disociované formě, mohou být Folin-Ciocalteuovým činidlem snadněji oxidovány, což následně může opět vést k nadhodnocené hodnotě antioxidační kapacity. Molybdenové centrum v komplexním činidle je redukováno z  $\text{Mo}^{(VI)}$  na  $\text{Mo}^{(V)}$  pomocí elektronu darovaného antioxidantem za vzniku modrého zbarvení.

Chromofor Folin-Ciocalteuova činidla - molybdowolframový heteropolyanion - nemá afinitu k organickým rozpouštědlům kvůli svému čtyřnásobnému zápornému náboji, který vede k silným ion-dipólovým interakcím s molekulami vody v rozpouštědle. Jakmile se tedy anion vytvoří, nelze jej snadno extrahovat do organických rozpouštědel. Konvenční Folin-Ciocalteuový test se tedy provádí hlavně ve vodné fázi a ve své nemodifikované formě je nepoužitelný na lipofilní antioxidanty. K hodnocení lipofilních antioxidantů byla tedy metoda modifikována pomocí isobutanolového média. Modifikace byla provedena použitím Folin-Ciocalteuova činidla zředěného isobutanolem a poskytnutím alkalického média s vodným NaOH tak, že organická i vodná fáze, nezbytné pro lipofilní i hydrofilní antioxidanty, byly dodávány současně. V této modifikované metodě byla reakční doba zkrácena na 20 minut, a navíc byla zjednodušena původní směs činidel (Berker et al. 2013).

#### **4.7.2 Postup**

Nejprve byly vzorky konopné mouky extrahovány. Extrakce byla provedena tak, že byla mouka navážena do mikrocentrifugačních zkumavek v množství  $50 \pm 1$  mg a extrahována za stálého třepání po dobu 24 hod. v 1 ml osmdesátiprocentního vodného roztoku methanolu. Po extrakci následovala centrifugace při 10 000 rpm po dobu 15 min. při 20 °C. Následně byl odebrán supernatant s extraktem.

Při měření bylo 20  $\mu$ l vzorku naředěno 1980  $\mu$ l destilované vody a promícháno. K naředěnému vzorku bylo přidáno 100  $\mu$ l Folin-Cicalteauva roztoku a 300  $\mu$ l karbonátu sodného. Výsledná reakce byla promíchána a inkubována při pokojové teplotě po dobu 2 h. Po inkubaci byl vzorek spektrofotometricky měřen proti slepému vzorku. Absorbance byla měřena při vlnové délce 765 nm. Jako standard byla použita kyselina gallová, byla vytvořena kalibrační křivka a zjištěna rovnice pro výpočet obsahu polyfenolů. Jako slepý vzorek byl použit 80% vodný roztok methanolu. Výsledek byl vyjádřen jako ekvivalent gallové kyseliny (v g / kg sušiny).

#### **4.8 VYHODNOCOVÁNÍ VÝSLEDKŮ**

Zjištěné výsledky byly vyhodnoceny dvoufaktorovou analýzou rozptylu metodou ANOVA v programu Statistica 12. Ke srovnávání byl využit Fisherův LSD test.

Grafy byly vytvořeny v programu Microsoft Excel.

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 VÝTĚŽEK FRAKČÍ

Pomocí mechanického prosívání přes síto s velikostí ok 180  $\mu\text{m}$  bylo získáno průměrně  $64,51 \pm 1,85 \%$  frakce s částicemi menšími než 180  $\mu\text{m}$  a  $33,91 \pm 1,86 \%$  frakce s částicemi většími než 180  $\mu\text{m}$ . Celkové ztráty během prosívání činily  $1,58 \pm 0,26 \%$ .

### 5.2 SKLADOVÁNÍ

Po osmiměsíčním skladování byly vzorky, které byly zabalené v papírových sáčcích a skladované při 5 °C, napadeny mikromycetami, a proto nemohly být dále hodnoceny (obrázek 2 v příloze).

U všech vzorků skladovaných v papírových sáčcích došlo během skladování k nasátí tuku do obalu. Jak je zřetelné z obrázku číslo 3 v příloze, nejnáchylnější k tomu byla nejjemnější frakce (s částicemi menšími než 180  $\mu\text{m}$ ), u které byl obal znatelně mastnější než u frakce s částicemi většími než 180  $\mu\text{m}$  nebo u nefrakcionované mouky.

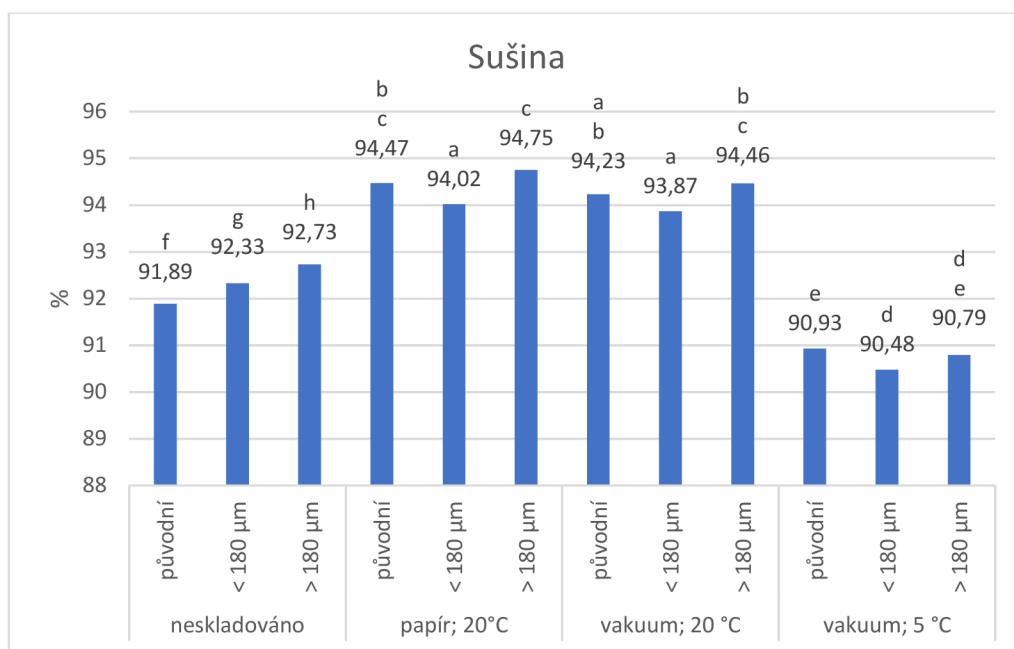
### 5.3 OBSAH SUŠINY

Nejnižší sušina se nacházela ve frakci s částicemi menšími než 180  $\mu\text{m}$  (92,67 %). Původní mouka měla sušinu 92,88 % a nejhrubší měla sušinu největší (93,18 %). Hladina významnosti byla u sušiny v závislosti na frakci  $p = 0,000035$ .

Varianta skladování byla pro tento parametr ještě významnější ( $p = 0,000000$ ). Nejnižší sušina byla zjištěna u vzorků vakuově zabalených a skladovaných při 5 °C. Neskladované vzorky měly sušinu průměrně 92,32 %, vzorky vakuově zabalené a skladované při 20 °C 94,19 % a vzorky skladované v papírovém obalu při 20 °C 94,41 %.

Statisticky významný vliv na obsah sušiny měly i frakce a varianta skladování ve vzájemném vztahu ( $p = 0,006886$ ). Výsledky jsou shrnuty v grafu č. 2.

Graf č. 2: Obsah sušiny v %



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

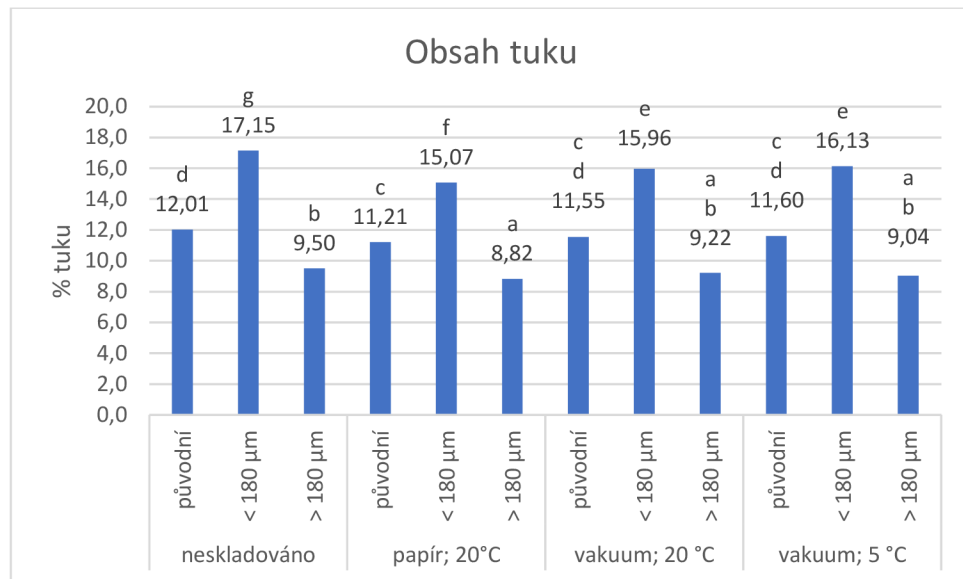
#### 5.4 OBSAH TUKU

Na obsah tuku měla statisticky významně vliv frakce mouky ( $p = 0,000000$ ). Nejnižší obsah měla nejhrubší frakce. Průměrně v ní bylo 9,14 % tuku. V nejjemnější frakci bylo logicky tuku nejvíce (průměrně 16,08 %). V nefrakcionované mouce bylo průměrně 11,59 % tuku.

Tento parametr také statisticky průkazně ovlivňovala varianta skladování ( $p = 0,000002$ ). Nejméně tuku se zachovalo u vzorků skladovaných v papírovém obalu při 20 °C (11,70 %). Vakuově zabalené vzorky uchovávané při 20 °C obsahovaly 12,14 % tuku. Ve vakuově zabalených vzorcích uchovávaných při 5 °C zůstalo 12,25 % tuku. Původní neskladované vzorky měly tuku 12,89 %.

Frakce mouky v závislosti na variantě skladování měly dohromady na obsah tuku vliv s hladinou významnosti  $p = 0,027476$ . Konkrétní zastoupení tuku v mouce s jednotlivými parametry je přehledně shrnuto v grafu č. 3.

Graf č. 3: Obsah tuku v %



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

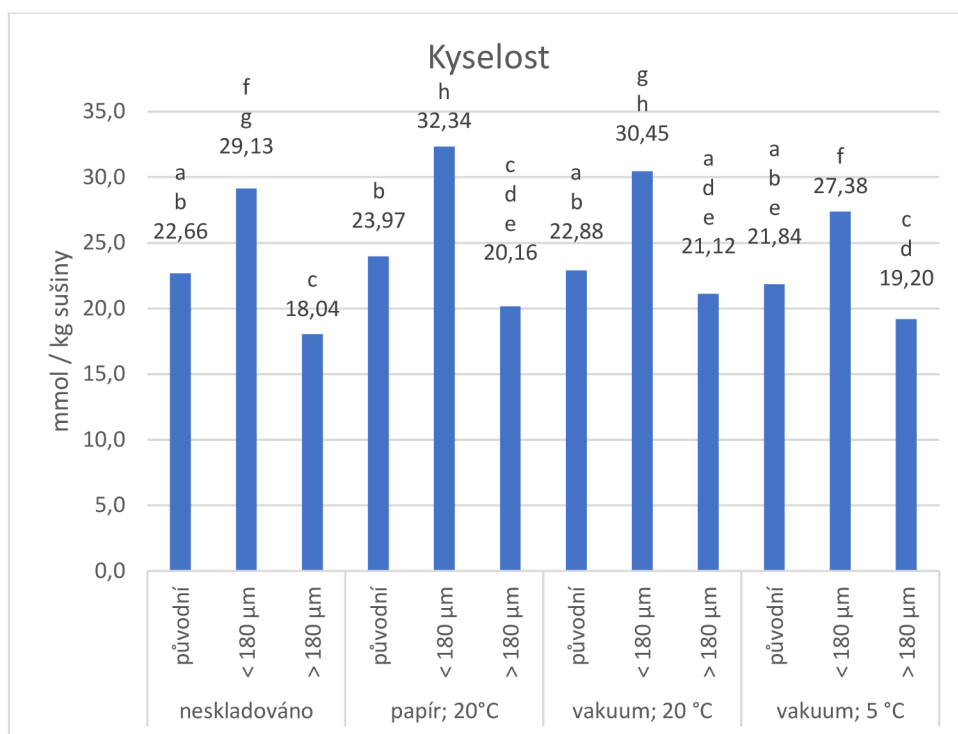
## 5.5 TITRAČNÍ KYSELOST

Frakce mouky ovlivnila její kyselost s hladinou významnosti  $p = 0,000000$ . Nejkyselejší byla mouka s nejmenšími částicemi (29,83 mmol / kg sušiny). Původní mouka měla titrační kyselost 22,84 mmol / kg sušiny a nejhrubší frakce 1,63 mmol / kg sušiny.

Pro kyselost byla také statisticky významná varianta skladování ( $p = 0,000580$ ). Nejvíce kyselé byly vzorky skladované při 20 °C v papírových sáčcích (25,49 mmol / kg sušiny), následovaly skladované při 20 °C ve vakuu (24,82 mmol / kg sušiny), dále neskladované (23,28 mmol / kg sušiny) a nejméně kyselé vyšly mouky skladované ve vakuu při 5 °C.

Všechny hodnoty titrační kyselosti jsou zprůměrovány v grafu číslo 4.

Graf č. 4: Titrační kyselost v mmol / kg sušiny



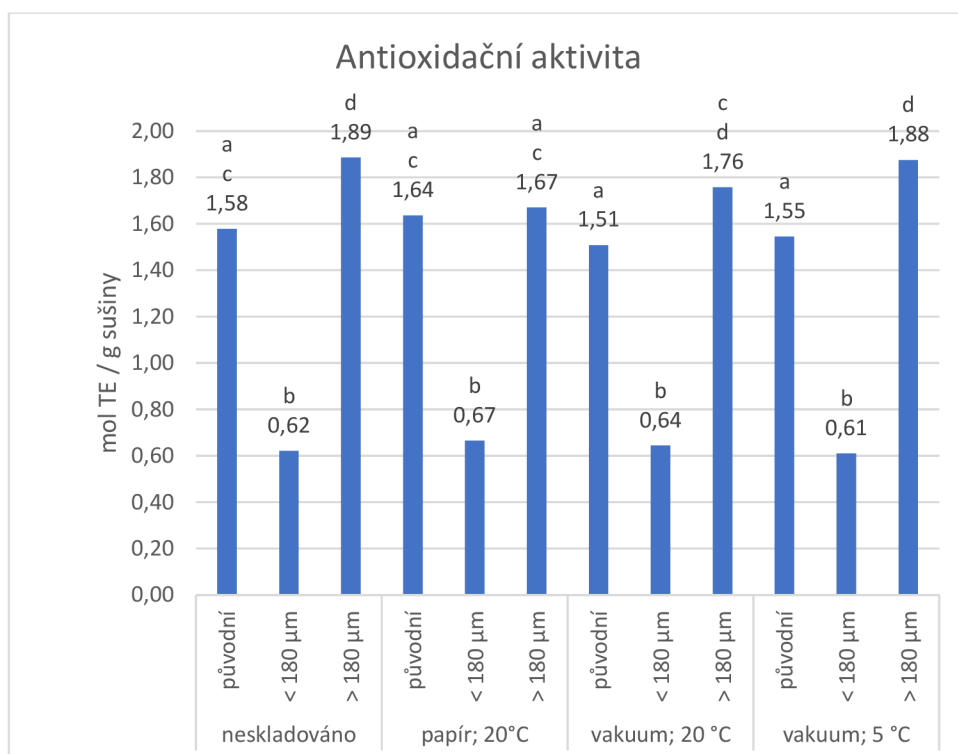
Odlišná písmena nad sloupci v grafu indikují průkazný rozdíl na hladině významnosti  $p < 0,05$  (Fisherův LSD test) (zdroj: vlastní zpracování).

## 5.6 ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA

Frakce mouky ovlivňovala antioxidační aktivitu statisticky velmi významně. Hladina významnosti  $p$  zde byla 0,000000. U původního složení mouky bylo zjištěno 1,57 mol TE / g sušiny vzorku. Frakce bílkovinná vykazovala antioxidační aktivitu 0,64 mol TE / g sušiny vzorku a frakce vlákninová 1,80 mol TE / g sušiny vzorku.

Varianta skladování neměla na schopnost reakce vzorku s volnými radikály žádný prokazatelný vliv. Všechny skladované vzorky vykazovaly antioxidační aktivitu 1,3 mol TE / g sušiny vzorku. Neskladované čerstvé mouky měly tuto hodnotu nepatrně vyšší, 1,4 mol TE / g sušiny. Konkrétní hodnoty antioxidační aktivity frakcí v závislosti na skladování jsou uvedeny v grafu číslo 5.

Graf č. 5: Antioxidační aktivita v mol TE / g sušiny



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

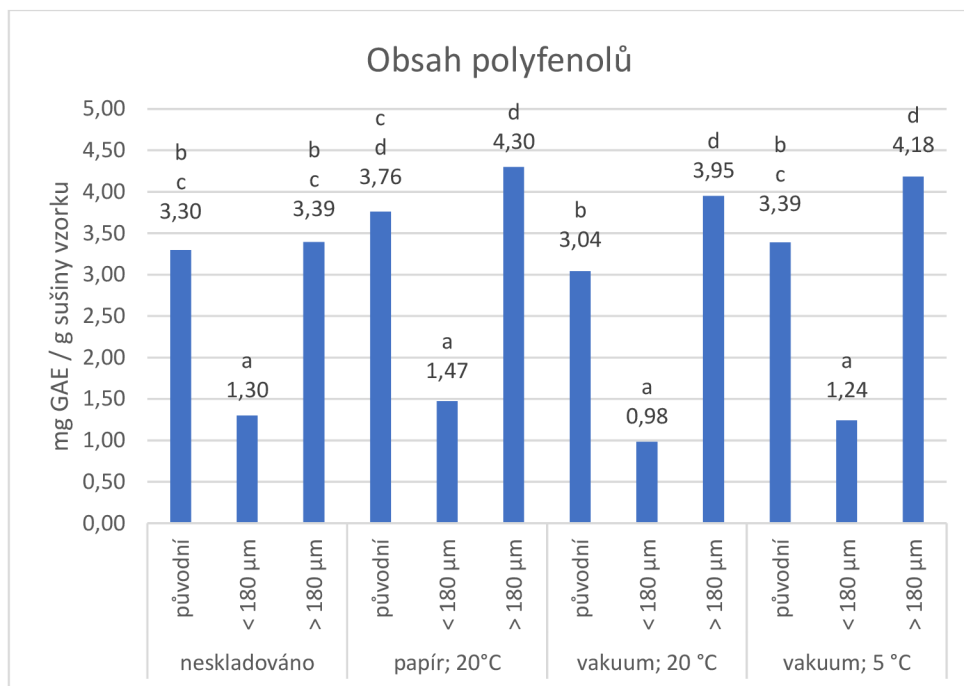
## 5.7 OBSAH POLYFENOLŮ

Obsah polyfenolů statisticky významně závisel na variantě skladování s hladinou významnosti  $p = 0,006291$ . Nejvíce jich bylo zjištěno u vzorků skladovaných při 20 °C v papírových sáčcích, kde jejich hodnota činila průměrně 3,18 mg GAE / g sušiny vzorku. Při sestupném řazení následovaly vzorky skladované při 5 °C ve vakuu, kde bylo průměrně 2,94 mg GAE / g sušiny vzorku, dále vzorky neskladované s hodnotou polyfenolů 2,66 mg GAE / g sušiny vzorku a nejnižší obsah polyfenolů byl zjištěn u varianty skladování při 20 °C ve vakuu, kde polyfenoly po zaokrouhlení čítaly také 2,66 mg GAE/g sušiny vzorku.

Tento parametr také statisticky velmi významně ovlivňovala frakce mouky, kde byla hladina významnosti  $p$  dokonce 0,000000. Největší zastoupení polyfenolů vykazovala frakce s částicemi většími než 180 µm (3,96 mg GAE / g sušiny vzorku). U původní mouky činilo množství polyfenolů 3,37 mg GAE / g sušiny vzorku a nejméně jich bylo ve frakci s částicemi menšími 180 µm (1,25 mg GAE / g sušiny vzorku).

V závislosti na sebe však varianta skladování a velikostní frakce mouky nevykazovaly statisticky významný vliv na obsah polyfenolů. Konkrétní hodnoty u jednotlivých variant lze vyčíst v grafu č. 6.

Graf č. 6: Obsah polyfenolů v mg GAE / g sušiny



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



## **6. DISKUSE**

### **6.1 VÝTĚŽEK FRAKCI**

Výtěžek jemné a hrubé frakce příznivě korespondoval s bakalářskou prací, která předcházela tomuto sledování (Němcová 2019) a ve které byla mouka z pěti odrůd konopí prosévána přes síta o velikosti ok 250  $\mu\text{m}$  a 180  $\mu\text{m}$ . Stejně jako nyní byl i tehdy největší zisk frakce s částicemi menšími než 180  $\mu\text{m}$ . Důvodem může být skutečnost, že tato frakce vzniká především z vnitřních částí semene, kterých má konopná nažka více než oplodí, z něhož vzniká podstatná část nejhrubší frakce. Při předešlém výzkumu zabírala v mouce průměrně ze všech odrůd nejhrubší frakce 33,50 %, frakce od 180  $\mu\text{m}$  do 250  $\mu\text{m}$  8,16 % a nejjemnější frakce tvořila 58,33 % mouky.

### **6.2 SKLADOVÁNÍ**

To, že po osmiměsíčním skladování u vzorků zabalených v papírových sáčcích a skladovaných při 5 °C došlo k rozvoji mykromycet, není nijak překvapující, protože kontaminace mykotoxiny, které poukazují na přítomnost těchto hub, jsou dokonce jedním z největších problémů, které ovlivňují producenty konopí (Vujčić & Mašić 2021). Konopné produkty mohou být kontaminovány mykromycetami ve všech fázích výrobního řetězce (Al-Defiery & Merjan 2015). Mykromycety jsou v přírodě hojně přítomné a pro růst jim stačí jen nepatrná vlhkost oproti jiným patogenním organismům (Rehman et al. 2017), proto byly nejspíš napadeny právě vzorky skladované v chladícím boxu, kde je větší vlhkost oproti vlhkosti vzduchu v laboratoři. Tím, že byly zabalené v papírových sáčcích, které příliš neomezují výměnu plynů, měly mykromycety také dostatečný přístup ke kyslíku, který pro svůj rozvoj potřebují. To je důvod, proč vzorky balené vakuově zplesnivět nemohly.

Al-Defiery & Merjan (2015) uvádějí, že ochranu před mikroskopickými houbami lze zajistit zabráněním vývoje teplotních a vlhkostních gradientů. Jelikož chladicí box byl používán k uchování řady jiných vzorků, je velice pravděpodobné, že v něm také docházelo ke kolísání teploty. Pro účely této práce však nestálé skladovací prostředí v chladícím boxu nebylo nijak na škodu, protože cílem této práce bylo zjistit optimální skladování konopné mouky i v domácnostech a skladování v chladícím boxu simulovalo uchování konopné mouky v lednici, ve které při běžném používání také dochází k různým výkyvům podmínek.

### 6.3 OBSAH SUŠINY

Mouky mají obecně hygroskopickou povahu, protože se jedná o suchý materiál, který snadno přijme vzdušnou vlhkost. Nejvíce přijmuly vlhkost vzorky s nejmenšími částicemi, a naopak vzorky nejhrubší zůstaly nejsušší, protože materiál tvořen menšími částicemi má větší plochu, kterou může absorbovat vzdušnou vlhkost. Navíc je v jemnější frakci více bílkovin, které způsobují větší hydrataci vodou. To samé bylo zjištěno i v předešlé práci (Němcová 2019), kde také sušina rostla s rostoucí velikostí částic.

Raleng et al. (2014), kteří sledovali sezamovou mouku s vysokým obsahem bílkovin, zjistili, že během skladování došlo ve všech vzorcích k statisticky významnému zvýšení obsahu vlhkosti. Rychlost nárůstu vlhkosti byla významnější za podmínek běžného skladování spíše než při chladírenských teplotách a lišila se podle typu použitého obalového materiálu. V této práci bylo naopak zjištěno, že u konopné bílkovinné mouky při chladírenských teplotách dochází k nejvyššímu nárůstu vlhkosti, protože nejnižší sušina byla zjištěna u vzorků vakuově zabalených a skladovaných při 5 °C. Značný nárůst vlhkosti navíc vysvětluje, proč vzorky skladované v papírových obalech za těchto skladovacích podmínek zplsnivěly. Dá se totiž předpokládat, že přes papír se ke vzorkům dostala vlhkost ještě snáz. Nejspíš to bude způsobeno tím, že spíše než teplota ovlivňuje sušinu vlhkost prostředí, která bývá v lednicích a chladících boxech vyšší. U vzorků skladovaných při laboratorní teplotě sušina naopak vzrostla, což by se dalo vysvětlit nižší vlhkostí vzduchu, která žel nebyla při tomto pokusu sledována, a vyšší teplota také přispívá k odpařování vody ze vzorku.

V kontrolních neskladovaných vzorcích byla přijatelná vlhkost pod 8 % (průměrně 7,68 %). Souhlasí to i s předešlou bakalářskou prací (Němcová 2019). Bylo ale zjištěno, že po skladování překročila vlhkost u vzorků skladovaných ve vakuu při 5 °C 9 % (průměrně 9,27 %), což je již kvůli hrozícímu mikrobiálnímu rozvoji na hraně přijatelnosti. Z toho, že při stejných podmínkách vzorky balené v papíru zplsnivěly, vyplývá, že takové uchovávání mouky opravdu není vhodné.

### 6.4 OBSAH TUKU

House et al. (2010) uvádí, že po vylisování oleje z konopných nažek za studena, obsahují výlisky, tedy i z nich namletá mouka, ještě asi 10 % oleje. V této práci byl zjištěn obsah oleje vyšší, konkrétně bylo v nefrakcionované mouce 12,25 % tuku, což může být způsobeno kvalitou lisování a tučností semen.

To, že v této práci mělo skladování mouky na obsah tuku průkazný vliv, je v souladu s dalšími výzkumy. Protože konopný olej má takové zastoupení mastných kyselin, které je velmi náchylné k oxidaci, při skladování rychle žlukne, a tedy ho ubývá. Rehman et al. (2017), zabývající se moukou ze směsi pšeničné mouky a mouk z různých luštěnin, zjistili, že při skladování tohoto materiálu docházelo k postupnému snižování obsahu tuku, a odůvodňovali to právě tím, že by to mohlo být způsobeno rozvojem žluknutí. Nejrychleji se tuk rozkládal při 20 °C v papírových sáčcích, protože se k němu mohl lehko dostat vzdušný kyslík a vyšší teplota navíc urychlovala chemickou reakci. Pomalejší rozklad probíhal při 20 °C u vakuově zabalených vzorků, protože měla reakce omezený přístup ke kyslíku, a nejvíce tuku u skladovaných vzorků zbylo při skladování v chladu ve vakuovém balení, kde byla reakce omezena nedostatkem kyslíku i nízkou teplotou.

Ve velikostní frakci pod 180 µm byl zjištěn vyšší podíl tuku, a to 16,08 %. Z toho vyplývá, že tukové částice jsou dostatečně malé, ale protože ve frakci nad 180 µm bylo nalezeno ještě 9,14 % tuku, lze usoudit, že jeho zastoupení ve frakcích nebylo ovlivněno jen jeho velikostí, ale také tím, na jakých jiných látkách byl navázán.

Nejvyšší obsah tuku u frakce pod 180 µm je důvodem, proč u ní došlo více k jeho nasátí během skladování do papírového obalu než u nefracionované mouky nebo hrubé frakce. Dalším důvodem vstřebání tuku do obalu je, že menší částice ve vzorku zapříčiňují jeho větší reakční povrch. Nutno poznamenat, že tím došlo ke ztrátám tuku, jehož množství nemohlo být následně změřeno.

## 6.5 TITRAČNÍ KYSELOST

Kyselost významně korelovala s obsahem tuku. Ve frakci, kde bylo nejméně tuku byla nejmenší kyselost a naopak. Je to tím, že při rozkladu tuku se uvolňují mastné kyseliny. U frakcí s vyšším zastoupením tuku se tedy mají mastné kyseliny z čeho uvolňovat.

Při porovnávání kyselosti a obsahu tuku s ohledem na variantu skladování byla opačná tendence než u frakcí. Nejvíce kyselé byly vzorky skladované při 20 °C v papírových sáčcích, což znamená ty nejméně tučné. V tomto případě byl totiž menší obsah tuku zapříčiněn jeho intenzivnějším rozložením, tedy větším množstvím uvolněných mastných kyselin.

Souhlasí to i se studií Rehman et al. (2017), kde se uvádí, že během jejich skladovacího pokusu se kyselost zvýšila kvůli nárůstu obsahu volných mastných kyselin z důvodu žluknutí.

## 6.6 ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA

Vyšší antioxidační aktivita u frakce s větším obsahem vlákniny je zcela očekávatelná, protože vláknina je stabilnější než bílkoviny, které zastupují převážnou část v jemnější frakci. Navíc byl v jemnější frakci zjištěn vyšší obsah oleje, který je u konopí značně nestabilní. Výsledky porovnávání frakcí s vysokou statistickou průkazností tedy potvrdily předpoklady.

Varianta skladování sice neměla na antioxidační aktivitu statisticky významný vliv, ale z průměrů skladovaných a čerstvých vzorků byla patrná vyšší antioxidační aktivita u čerstvých vzorků. To koresponduje i s jinými pracemi. Například Vonapartis et al. (2015) poukazuje na vysoký obsah antioxidantů v konopných semenech, ale vzhledem ke specifickému zastoupení mastných kyselin jsou podle Matthäuse & Brühla (2008) produkty s konopným olejem při skladování značně nestabilní a již po krátké době skladování nejsou vhodné k lidské konzumaci.

## 6.7 OBSAH POLYFENOLŮ

Výsledky sledování různých autorů vykazují značně rozdílná množství polyfenolů v konopném oleji. Yu et al. (2005) stanovili, že celková koncentrace fenolů v konopném oleji lisovaném za studena, vyjádřená jako ekvivalent kyseliny gallové, je 44,0 mg / 100 g. Teh and Birch (2013) zase uvedli obsah fenolových kyselin konopného oleje, vyjádřených jako ekvivalent kyseliny gallové, celkem 188,23 mg / 100 g (Yu et al. 2005; Teh & Birch 2013). V tomto výzkumu nebyla stanovována koncentrace polyfenolů přímo v oleji, ale v mouce, a proto vyšla výrazně nižší (průměr ze všech variant vyšel 2,86 mg GAE / g sušiny). Obecně se uvádí, že na polyfenoly jsou konopná semena bohatá (Ertaş & Aslan 2015).

Zhang et al. (2015) uvádí, že polyfenoly, mezi které se řadí např. kvercetin, kyselina chlorogenová a kyselina gallová, jsou hydrofilní antioxidanty. To by vysvětlovalo, proč bylo nejmenší zastoupení polyfenolů ve frakci s částicemi menšími než 180 µm, kde bylo nejvíce tuku, který je naopak hydrofobní. Ve frakci s menším množstvím tuku se naopak vyskytovalo více polyfenolů.

## 7. ZÁVĚR

V rámci řešení diplomové práce byly zjištěny tyto závěry:

1. Největší zisk frakce byl u částic menších než 180  $\mu\text{m}$ .
2. Skladování při 5  $^{\circ}\text{C}$  v papíru není u konopné mouky vhodné, kvůli vysokému nebezpečí rozvoji mykromycet.
3. Nejvíce náchylná k vlhnutí je frakce s nejmenšími částicemi. Více mouka vlhne za chladírenských podmínek než při laboratorní teplotě.
4. Na obsah tuku má statisticky významně vliv frakce mouky i skladování. Nejrychleji dochází ke žluknutí při 20  $^{\circ}\text{C}$  v papírových sáčcích, poté při 20  $^{\circ}\text{C}$  u vakuově zabalených vzorků, a neméně při skladování v chladu ve vakuovém balení.
5. Vzorky s vyšším obsahem tuku jsou náchylnější ke zvyšování kyselost. Při skladování roste intenzita kyselosti s klesajícím obsahem tuku.
6. Vyšší antioxidační aktivita je u frakce s větším obsahem vlákniny. Varianta skladování nemá na antioxidační aktivitu statisticky významný vliv, ale z průměrů skladovaných a čerstvých vzorků je patrná větší antioxidační aktivita u čerstvých vzorků.
7. Nejmenší zastoupení polyfenolů je ve frakci s částicemi menšími než 180  $\mu\text{m}$  a nejvíce jich je ve frakci vlákninové.

Vyplývá z toho, že ke skladování se frakce s částicemi menšími než 180  $\mu\text{m}$  hodí méně než frakce s částicemi většími než 180  $\mu\text{m}$ , protože frakce s částicemi menšími než 180  $\mu\text{m}$  je vzhledem k většímu zastoupení tuku náchylnější ke žluknutí, vykazuje nižší antioxidační aktivitu, obsahuje méně polyfenolů a více vlhne.

Lépe při skladování vycházely vzorky skladované ve vakuu a z nich měly lepší výsledky vzorky skladované při 5  $^{\circ}\text{C}$ . Méně se u nich rozkládal tuk, měly nižší kyselost a vyšší antioxidační aktivitu. U těchto vzorků však byla pozorována vlhkost nad 9 %, což by mohlo vést k vyššímu mikrobiálnímu zatížení.

Optimální by tedy bylo skladovat bílkovinné koncentráty v chladu, vakuově zabalené a hlídat, popřípadě korigovat, vlhkost prostředí (například provzdušňováním).

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abdullah, N., Nawawi, A. & Othman, I., 2000. Fungal spoilage of starch-based foods in relation to its water activity (aw). *Journal of Stored Products Research*, 36(1), pp.47-54.
- Abuzaytoun, R. & Shahidi, F., 2006. Oxidative stability of flax and hemp oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83(10), pp.855-861.
- Al-Defiery, M. & Merjan, A., 2015. Mycoflora of mold contamination in wheatflour and storage wheat flour. *Mesopotamia Environmental Journal*, 1(2), pp.18-25.
- Anwar, F., Latif, S. & Ashraf, M., 2006. Analytical characterization of hemp (*Cannabis sativa*) seed oil from different agro-ecological zones of Pakistan. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83(4), pp.323-329.
- Aree, T. & Jongrungruangchok, S., 2018. Structure–antioxidant activity relationship of  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes with olive tyrosol, hydroxytyrosol and oleuropein: Deep insights from X-ray analysis, DFT calculation and DPPH assay. *Carbohydrate Polymers*, 199(1), pp.661-669.
- Ayres, G.H., 1949. Evaluation of Accuracy in Photometric Analysis. *Analytical Chemistry*, 21(6), pp.652-657.
- Balasundram, N., Sundram, K. & Samman, S., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), pp.191-203.
- Beigh, M.A. et al., 2019. Storage studies of water chestnut flour. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(2).
- Berezin, O., 1995. Alternative methods for titratable acidity determination. *Talanta*, 42(4), pp.507-517.
- Berker, K.I. et al., 2013. Modified Folin–Ciocalteu Antioxidant Capacity Assay for Measuring Lipophilic Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(20), pp.4783-4791.
- Birck, N.M.M., Lorini, I. & Scussel, V.M., 2006. Fungus and mycotoxins in wheat grain at post harvest. *International Working Conference on Stored Product Protection*, 9, pp.198-205.
- Boni, J., Aida, S. & Leila, K., 2018. Lipid Extraction Method From Microalgae *Botryococcus Braunii* As Raw Material To Make Biodiesel With Soxhlet Extraction. *Journal of Physics: Conference Series*, 1095, pp.1-7.
- Callaway, J.C., 2004. Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica*, 140(1-2), pp.65-72.
- Da Porto, C., Decorti, D. & Tubaro, F., 2012. Fatty acid composition and oxidation stability of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil extracted by supercritical carbon dioxide. *Industrial Crops and Products*, 36(1), pp.401-404.

- Daramola, O.A. et al., 2010. Effects of packaging material on the quality of “pupuru” flour during storage. *African Journal of Food Science*, 4(5), pp.258-263.
- Delgado, M.C.O. et al., 2015. Amaranth Peptides from Simulated Gastrointestinal Digestion: Antioxidant Activity Against Reactive Species. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(1), pp.27-34.
- Eklund, P.C. et al., 2005. Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 3(18), pp.3336–3347.
- Endo, Y., Hoshizaki, S. & Fujimoto, K., 1997. Oxidation of synthetic triacylglycerols containing eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids: Effect of oxidation system and triacylglycerol structure. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74(9), pp.1041-1045.
- Ertas, N. & Aslan, M., 2015. Antioxidant and physicochemical properties of cookies containing raw and roasted hemp flour [pdf]. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 19(2), pp.177-184.
- Esmailzadeh Kenari, R. & Dehghan, B., 2020. Optimization of ultrasound-assisted solvent extraction of hemp ( *Cannabis sativa* L.) seed oil using RSM: Evaluation of oxidative stability and physicochemical properties of oil. *Food Science & Nutrition*, 8(9), pp.4976-4986.
- Fernandes, Â. et al., 2016. Gamma and electron-beam irradiation as viable technologies for wild mushrooms conservation: effects on macro- and micro-elements. *European Food Research and Technology*, 242(7), pp.1169-1175.
- Gao, F. & Birch, J., 2016. Oxidative stability, thermal decomposition, and oxidation onset prediction of carrot, flax, hemp, and canola seed oils in relation to oil composition and positional distribution of fatty acids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118(7), pp.1042-1052.
- House, J.D., Neufeld, J. & Leson, G., 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), pp.11801-11807.
- Hussein, H., 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167(2), pp.101-134.
- Christodouleas, D.C. et al., 2015. Modified DPPH and ABTS Assays to Assess the Antioxidant Profile of Untreated Oils. *Food Analytical Methods*, 8(5), pp.1294-1302.
- Kanapitsas, A. et al., 2015. Effect of  $\gamma$ -radiation on the production of aflatoxin B1 by *Aspergillus parasiticus* in raisins (*Vitis vinifera* L.). *Radiation Physics and Chemistry*, 106(1), pp.327-332.
- Korus, J. et al., 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, pp.143-150.
- Kriese, U. et al., 2004. Oil content, tocopherol composition and fatty acid patterns of the seeds of 51 *Cannabis sativa* L. genotypes. *Euphytica*, 137(3), pp.339-351.

- Lobo, V. et al., 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), pp.118-126..
- Matthäus, B. & Brühl, L., 2008. Virgin hemp seed oil: An interesting niche product. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(7), pp.655-661.
- Matthäus, B. et al., 2006. Hempseed Oil—Influence of the Genotype on the Composition in a Two-Year Study. *Journal of Industrial Hemp*, 10(2), pp.45-65.
- Middleton, E., Kandaswami, C. & Theoharides, T., 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 52(4), pp.673-751.
- Miyashita, K. et al., 1990. Autoxidation of polyunsaturated triacylglycerols. III. Synthetic triacylglycerols containing linoleate and linolenate. *Lipids*, 25(1), pp.48-53.
- Němcová, H., 2019. *Příprava koncentrátů konopných bílkovin mechanickým způsobem*. Bakalářská práce. České Budějovice.
- Nicolai, T. & Durand, D., 2013. Controlled food protein aggregation for new functionality. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 18(4), pp.249-256.
- Oomah, B.D. et al., 2002. Characteristics of hemp ( *Cannabis sativa* L.) seed oil. *Food Chemistry*, 76(1), pp.33-43.
- Ozcelik, B., Lee, J.H. & Min, D.B., 2003. Effects of Light, Oxygen, and pH on the Absorbance of 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Journal of Food Science*, 68(2), pp.487-490.
- Paulová, H., Bochořáková, H. & Táborská, E., 2004. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické Listy*, 98(4), p.174 – 179.
- Pongracz, G., Weiser, H. & Matzinger, D., 1995. Tocopherole – Antioxidantien der Natur. *Fett Wissenschaft Technologie/Fat Science Technology*, 97(3), pp.90-104
- Raikos, V., Duthie, G. & Ranawana, V., 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), pp.304-309.
- Raleng, A., Manikantan, M.R. & Mishra, A.A., 2014. Effect of Packaging Materials on Storage Stability of Protein rich flour from deoiled Sesame cake. *International Journal of Advanced Research*, 2(12), pp.248-254.
- Rehman, T. et al., 2017. Effect of nutritional composition on shelf life of cereals-legumes blended flours during storage. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 6(4), pp.1112-1116.
- Sharma, O.P. & Bhat, T.K., 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113(4), pp.1202-1205.
- Schmidt, S. & Pokorný, J., 2005. Potential Application of Oilseeds as Sources of Antioxidants for Food Lipids – a Review. *Czech Journal of Food Sciences*, 23(3), pp.93–102.



- Schwarz, K. et al., 2001. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *European Food Research and Technology*, 212(3), pp.319-328.
- Sies, H. & Murphy, M.E., 1991. Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 8(2), pp.211-224.
- Simion, I.A. et al., 2020. Application of response surface methodology to optimize some fermentation and formulation conditions of wheat dough fortified with malt culms flour. *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati Fascicle VI – Food Technology*, 44(1), pp.84-99.
- Sokolova, N. & Iorgacheva, K., 2020. The potential of flours from solvent-extraction hemp oilcake as an ingredient of low-moisture bakery products. *Food Science and Technology*, 14(3), pp.44-53.
- Teh, S.-S. & Birch, J., 2013. Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed hemp, flax and canola seed oils. *Journal of Food Composition and Analysis*, 30(1), pp.26-31.
- Ukpabi, U.J., Omodamiro, R.M. & Oti, E., 2012. Feasibility of using sealed polyethylene film in prolonged storage of gari. *Advances in Applied Science Research*, 3(3), pp.1239-1243.
- Velišek, J. & Hajšlová, J., 2009. *Chemie potravin Rozš. a přeprac. 3. vyd.*, Tábor: OSSIS.
- Vonapartis, E. et al., 2015. Seed composition of ten industrial hemp cultivars approved for production in Canada. *Journal of Food Composition and Analysis*, 39, pp.8-12.
- Vujčić, I. & Mašić, S., 2021. Preservation of hemp flour using high-energy ionizing radiation: The effect of gamma radiation on aflatoxin inactivation, microbiological properties, and nutritional values. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(4).
- Yu, L.L., Zhou, K.K. & Parry, J., 2005. Antioxidant properties of cold-pressed black caraway, carrot, cranberry, and hemp seed oils. *Food Chemistry*, 91(4), pp.723-729.
- Zhang, Y. et al., 2015. Assessment of the correlations between reducing power, scavenging DPPH activity and anti-lipid-oxidation capability of phenolic antioxidants. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), pp.569-574.

Ostatní zdroje:

- Anon., 2021. Happyseeds. Available at: <https://www.happyseeds.cz/technicke-konopi-uso-31/> [Accessed March 11, 2021].

## 9. PŘÍLOHA



Obr. č. 1: Vzorok pripravene ke skladovani.



Obr. č. 2: Vzorok skladovane pri 5 °C v papirovem obalu.



Obr. č. 3: Vzorok skladovane pri 20 °C v papirovem obalu.