

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

**ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

---

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Zemědělské inženýrství – Zpracování produktů

Katedra: Speciální produkce rostlinné

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

## DIPLOMOVÁ PRÁCE



### **Hodnocení efektu pH na rozpustnost a srážení bílkovin z mouky konopí setého (*Cannabis sativa L.*)**

Autor diplomové práce:  
**Bc. Markéta Jarošová**

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

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

České Budějovice, 2017

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Markéta JAROŠOVÁ**  
Osobní číslo: **Z15464**  
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**  
Studijní obor: **Zemědělské inženýrství - Zpracování produktů**  
Název tématu: **Hodnocení efektu pH na rozpustnost a srážení bílkovin z mouky konopí setého (*Cannabis sativa* L.)**  
Zadávací katedra: **Katedra speciální produkce rostlinné**

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

Konopí seté (*Cannabis sativa* L.) je stará multifunkční plodina s vysokým potenciálem využití, která je nyní v ČR pěstována zejména na semeno, hlavně pro získání kvalitního za studena lisovaného oleje. Zbytek nažek (semene) po lisování v podobě výlisků obsahuje značné množství bílkovin (25 - 30 %), které mají vysokou nutriční hodnotu a zajímavé funkční vlastnosti. Ve světě je jako hlavní metoda pro získávání bílkovin z výlisků olejnatých semen používána alkalická extrakce bílkovin (pro zvýšení rozpustnosti bílkovin), následovaná odstředěním a srážením bílkovin v supernatantu (extraktu) vlivem snížení pH (okyselením). Při získávání konopných bílkovin z výlisků jsou často uváděny různé podmínky pro extrakci i srážení. Předmětem řešení této diplomové práce (DP) proto bude optimalizace pH podmínek pro extrakci i následné srážení bílkovin z konopné mouky. Řešení DP bude probíhat formou série laboratorních experimentů, ve kterých bude nejprve optimalizována vhodná hodnota pH pro dosažení co nejvyšší výtěžnosti extrakce, tzn. převedení bílkovin do rozpustné formy. V druhé části bude hledána optimální hodnota pH pro vysrážení co nejvyššího množství bílkovin. Extrahované a vysrážené podíly bílkovin budou stanoveny gravimetricky v kombinaci se stanovením obsahu bílkovinného dusíku pomocí elementárního analyzátoru. Frakce bílkovin extrahované resp. vysrážené za podmínek rozdílného pH budou následně podrobeny elektroforetické analýze (SDS-PAGE) pro zjištění kvalitativních změn v bílkovinném profilu konopné mouky vlivem rozdílných podmínek. Změny budou hodnoceny pomocí speciálního software. Získané výsledky v rámci řešení DP budou statisticky vyhodnoceny a zpracovány do podoby tabulek nebo grafů. DP bude zpracována podle platného sdělení děkana pro vypracování bakalářských a diplomových prací (Opatření děkana ZF JU č. 4/2014, viz web ZFJU).

Rozsah grafických prací: 10 - 15 stran

Rozsah pracovní zprávy: 40 - 50 stran

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

- Kim J.-J., Lee M.-Y. (2011): Isolation and characterization of Edestin from Cheungsam hempseed. Journal of Applied Biological Chemistry, 54: 84-88**  
**Malomo S. A., Aluko R. E. (2015): A comparative study of structural and functional properties of isolated hemp seed (Cannabis sativa L.) albumin and globulin fractions. Food Hydrocolloids, 43: 743-752**  
**Nakai S., Modler H. W. (1996): Food proteins - properties and characterization. Wiley-VCH, New York, 544 p. (ISBN 1-56081-0691-0)**  
**Tang C.-H., Ten Z., Wang X.-S., Yang X.-Q. (2006): Physicochemical and functional properties of hemp (Cannabis sativa L.) protein isolate. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: 8945-8950**  
Vědecké články v databázích WoS a Scopus.

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

Katedra speciální produkce rostlinné


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

Katedra speciální produkce rostlinné


Datum zadání diplomové práce: **14. března 2016**

Termín odevzdání diplomové práce: **30. dubna 2017**

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA  
studijní oddělení  
Studentů 1699, 370 05 České Budějovice

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

L.S.

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

V Českých Budějovicích dne 14. března 2016

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že diplomovou práci na téma „Hodnocení efektu pH na rozpustnost a srážení bílkovin z mouky konopí setého (*Cannabis sativa L.*)“ jsem vypracovala samostatně a použila jsem literaturu a studijní materiály uvedené v seznamu literatury.

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

Datum 3. května 2017 v Českých Budějovicích

.....

Bc. Markéta Jarošová

**Poděkování:**

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří pomohli k dokončení této práce. Předně děkuji vedoucímu mé diplomové práce doc. Ing. Janu Bártovi, Ph.D. za odborné vedení, rady a připomínky. Dále bych chtěla poděkovat konzultantovi Ing. Františku Lorencovi za pomoc a trpělivost při laboratorních stanoveních a za starosti s tím spojené. Velký dík patří také všem v mém nejbližším okolí.

**Abstrakt:**

V této diplomové práci byl zkoumán vliv pH na rozpustnost a srážení proteinů z mouky konopí setého (*Cannabis sativa L.*). Zkoumané rozmezí pH bylo od 3 do 11. Jako materiál byly vybrány jednodomé odrůdy konopí USO 31 a Fedora 17. Po extrakci proteinů byl laboratorními technikami stanoven obsah dusíkatých látek, který byl nejvyšší při pH 11. Analýzou SDS-PAGE byla detekována proteinová spektra, kde především v zásaditém prostředí převažovala globulinová frakce nad albuminovou. Dalším krokem bylo isoelektrické srážení extrahovaných proteinů u variant s vysokým zastoupením dusíkatých látek. Obsah dusíkatých látek u získaného proteinového izolátu se pohyboval od 56,3 do 92,9 %. Z výsledků práce vyplývá, že nejvíce proteinů obsahovala odrůda Fedora 17, extrahovaná při zásaditém pH 11 a isoelektricky srážená na hodnotu pH 5 a 6.

**Klíčová slova:** konopný protein, dusíkaté látky, pH, extrakce, srážení

**Abstract:**

In this thesis was examined the influence of pH on solubility and precipitation of proteins extracted from the flour of the *Cannabis sativa L.* plant. For this experiment was chosen the pH in the range of 3 to 11. Monoecious breeds of cannabis USO 31 and Fedora 17 were chosen for this purpose. Laboratory methods were applied after the protein extraction, in order to define the content of nitrate substances which was the highest at pH 11. Protein spectrums were detected by the SDS-PAGE analysis where especially in an alkaline environment, globuline fraction was present at a greater amount than was the albuminum one. The next step was the isoelectric precipitation of extracted proteins within the variances containing high values of nitrate substances. The content of the nitrate substances in the protein extract was spanning between 56,3 % to 92,9 %. Based on the results of the experiment, is is feasible to conclude that Fedora 17, which was extracted at the alkaline pH 11 and isoelectrically precipitate to pH value 5 and 6, contained the highest amount of protein.

**Key words:** Hemp protein, nitrogenous substances, pH, extraction, precipitation

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE</b> .....	<b>11</b>
<b>3. LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>12</b>
3.1 Botanická charakteristika .....	12
3.1.1 Konopné semeno .....	13
3.2 Složení konopného semene .....	14
3.2.1 Konopný olej .....	15
3.2.2. Sacharidy .....	16
3.2.3 Konopné proteiny .....	16
3.3 Proteiny .....	17
3.3.1 Vlastnosti proteinů .....	19
3.4 Proteiny konopí .....	22
3.4.1 Globulin .....	24
3.4.2 Albumin .....	24
3.4.3 Konopný proteinový izolát.....	25
<b>4. MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>26</b>
4.1 Popis vybraných odrůd konopí .....	26
4.2 Příprava materiálu .....	26
4.3 Laboratorní metody .....	27
4.3.1 Stanovení obsahu sušiny .....	27
4.3.2 Extrakce proteinů .....	27
4.3.3 Stanovení proteinů bicinchoninovou metodou.....	28
4.3.4 SDS-PAGE.....	29
4.3.5 Stanovení obsahu dusíku .....	31
4.3.6 Srážení proteinů .....	32
4.3.7 SDS-PAGE precipitátu .....	32
4.3.8 Stanovení obsahu dusíku precipitátu.....	33
4.3.9 Gravimetrické stanovení výtěžnosti extrahovaných a vysrážených proteinů .....	33
4.4 Vyhodnocení výsledků.....	33

<b>5. VÝSLEDKY .....</b>	<b>34</b>
5.1 Obsah sušiny a dusíkatých látek v mouce.....	34
5.2 Extrakce konopných proteinů .....	34
5.2.1 Stanovení obsahu proteinů a dusíkatých látek v sušině extraktu .....	34
5.2.2 Elektroforetická analýza proteinových profilů po extrakci.....	42
5.3 Vysrážený konopný protein .....	48
5.3.1 Obsah dusíkatých látek .....	48
5.3.2 Elektroforetické analýza proteinových profilů po vysrážení .....	53
<b>6. DISKUZE.....</b>	<b>56</b>
6.1 Obsah dusíkatých látek v extraktu z konopné mouky.....	56
6.2 Spektra extrahovaných proteinů.....	56
6.3 Obsah dusíkatých látek v proteinovém izolátu .....	57
6.4 Spektra vysrážených proteinů .....	58
<b>7. ZÁVĚR.....</b>	<b>59</b>
<b>8. POUŽITÁ LITERATURA.....</b>	<b>61</b>
<b>9. PŘÍLOHY .....</b>	<b>68</b>



# 1. ÚVOD

Konopí (*Cannabis*) se řadí mezi nejstarší rostliny, pěstované od počátku zemědělství, pocházející ze střední Asie. Do Evropy na území jižního Ruska ji přinesli v 7. století př. n. l. z Asie Skytové (Amaducci *et al.*, 2015). Na našem území dosáhlo pěstování konopí největšího rozmachu v 18. století (Gabrielová, 2007). Od počátku 20. století se plochy postupně snižovaly z důvodu nahrazení levnějším bavlněným vláknem. Ve světě se konopí pěstovalo a využívalo bez omezení do 30. let 19. století. V roce 1937 v USA prosadila průmyslová lobby zákon, ve kterém se stalo konopí plodinou zakázanou (Stražil, 2006). Na území dnešní České republiky se konopí pěstovalo do roku 1956 (Šnobl, 2004). V 90. letech 20. století zaznamenává konopí období „renesance“. Mnoho států začalo rostlinu pěstovat za účelem výzkumu a k ověření využití konopí v průmyslu (Klvaňová and Ruman, 2008). Po ustanovení nařízení komise č. 1592/2000 vydané Evropskou unií se snížil limit obsahu tetrahydrocannabinolu v rostlině technického konopí na 0,2 % z původních 0,3 % (Kotyza, 2012).

V minulosti byla tato „multifunkční“ rostlina hojně pěstována jako přadná, pro léčivé účinky a pro olej. V současnosti nachází uplatnění především jako potravina a průmyslový materiál. Konopné semeno obsahuje více než 30 % oleje a 25 % proteinů, se značným množstvím vlákniny, vitamínů a minerálních látek. V oleji převládají z 80 % polynenasycené mastné kyseliny, zahrnující zejména linolovou a alfa-linolenovou kyselinu. Konopný olej patří mezi funkční potraviny (Callaway, 2004).

V konopném semeni se nachází kvalitní proteiny (globuliny a albuminy), které obsahují všechny esenciální aminokyseliny v příznivém poměru, a jsou snadno stravitelné (Geiwitz, 2001).

Kvalitní vlákno je využitelné v textilním, papírenském a automobilovém průmyslu a rovněž ve stavebnictví. Dalším produktem je pazdeří, které vzniká jako vedlejší produkt při zpracování vlákna a své uplatnění nachází především v energetickém průmyslu nebo jako stelivo pro zvířata (Gabrielová, 2007).

Konopí je možné pěstovat v oblastech s různou zeměpisnou šířkou, neboť má schopnost se velmi dobře přizpůsobit. Na vytvoření jednotky sušiny potřebuje dvakrát více vody než obilniny. Vyšší nároky má na půdu, pro dosažení nejvyšších výnosových prvků by měla být půda úrodná s nízkou spodní vodou, dobře vyhnojená a bohatě zásobená humusem. Pro očekávané nižší výnosy lze konopí taktéž pěstovat na horších půdách v chladnějších oblastech. Na zařazení do osevního postupu není náročné. Nejvhodnější jsou předplodiny, které zanechávají půdu čistou, kyprou, dobře zásobenou živinami (okopaniny, kukuřice, luskoviny, jetel, vojtěška). Snáší i pěstování po sobě. Konopí zanechává půdu čistou a v dobrém stavu a je vhodnou předplodinou pro náročné zemědělské plodiny (Honzík, 2012; Stražil, 2006).

## 2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem práce bylo:

- Vyhodnocení optimálních hodnot pH pro dosažení nejvyšší extrakce (rozpuštěného podílu) bílkovin z konopné mouky.
- Vyhodnocení optimální hodnoty pH pro následné vysrážení nejvyššího množství bílkovin, získaných předchozí extrakcí.
- Separace extrahovaných a vyrážených bílkovin pomocí SDS-PAGE elektroforézy a zjištění kvalitativních změn v bílkovinném profilu konopné mouky vlivem rozdílných podmínek.

## 3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 3.1 Botanická charakteristika

Konopí je jednoletá, původně dvoudomá cizosprašná rostlina (vyšlechtěny jsou i jednodomé samosprašné odrůdy technického konopí), patřící do čeledi konopovité (*Cannabaceae*). Charakteristický je pro ni kulovitý kořen dorůstající do hloubky 30 – 40 cm (na hlubokých půdách až do hloubky 2 m) a sytě zelené tři až třináctičetné listy s pilovitými okraji. Lodyha je přímá, na spodu kulatá a v horní části čtyřhranná. Samčí květenství je uspořádáno v úžlabních latách, vyrůstajících z úžlabí listů. Kvetou 20 - 25 dnů a poté odumírají. Samičí květenství je rozloženo v horní části v několika vrstvách, které tvoří hustě olistěné krátké hrozny. Kvetou o 3 až 10 dní později než samčí (Ruman, 2014). Plodem je jednosemenná vejčitá, šedo-zelená nažka s jemným mramorováním. HTS (hmotnost tisíce semen) se pohybuje mezi 10 – 29 g (Valíček, 2003). Rozlišují se tři základní druhy: konopí seté, indické a rumištní (Obr. 1).

#### **Konopí seté (*Cannabis sativa*)**

Jde o nejrozšířenější druh, pěstovaný pro hospodářské využití. Je pěstováno pro vlákno a semena bohatá na vitamíny a olej. Z konopí setého jsou vyšlechtěny odrůdy s minimálním obsahem THC, které se využívají pro průmyslové technické účely (Ruman, 2014). Obsah psychotropního tetrahydrocannabinolu (THC) musí podle nařízení komise (č. 1592/2000) vydané Evropskou unií být pod 0,2 % (Kotyza, 2012). Významný je obsah cannabidiolu (CBD), který nemá psychoaktivní účinky, např. odrůdy Carmagnola, Bialobrzieskie mají obsah CBD 2 – 3 % (Bryndová, 2015).

#### **Konopí indické (*Cannabis indica Lam*)**

Pěstuje se pro omamné látky obsažené v zelených částech rostliny (Šnobl, 2004). Pryskyřice samičího květenství má vysoký obsah THC, který se pohybuje od 8 do 12 %. Obsah CBD je na úkor THC nízký v rozmezí 0 – 1,5 % (Bryndová, 2015). Díky vysokému množství cannabinoidů je vhodné pro medicínské účely (Ruman, 2014).

## Konopí rumištní (*Cannabis ruderalis*)

Roste jako plevelná rostlina v ruských tundrách a tajgách. Z cannabinoidů převládá CBD. Využívá se při šlechtění hybridů, které jsou považovány za samokvetoucí odrůdy (Ruman, 2014).

**Obr. 1:** Základní druhy konopí odlišující se svým habitem



<http://cultivaweed.blogspot>



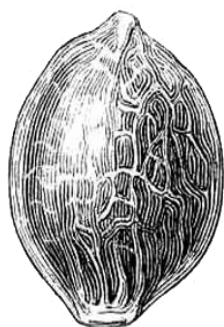
<https://www.slideshare.net/Marekedi/vstavba-z-konopnho-betonu>

### 3.1.1 Konopné semeno

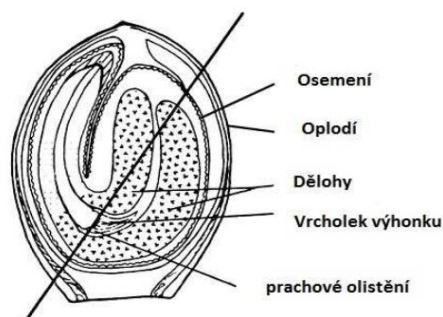
Plod konopí se běžně označuje jako semeno, botanicky je definovaný jako achene (jednoduchý suchý plod). Semeno je vejčitého tvaru, jehož měkké jádro chrání tvrdší vláknenná slupka tzv. perikarp viz obr. 2 (Amaducci *et al.*, 2015). Semeno je dlouhé 2 - 5 mm, široké 2 - 4 mm a jeho tloušťka je 2,3 - 2,8 mm. Barva semene je šedozeleňá s jemným mramorováním (Šnobl, 2004).

Sklizené neloupané semeno, které je nestejně zralé, se následně čistí na sítích a dosouší do 24 hodin po sklizni na vlhkost pod 9 %, aby nedocházelo k zapaření a rozvoji plísní. Jinak ztrácí sklizené semeno na kvalitě (Moudrý *et al.*, 2011; Honzík, 2007). Loupaná semínka nejsou chráněna tuhou slupkou a jsou náchylná na oxidaci tuků neboli žluknutí. Vzhledem k tomu je nutné skladování v chladu a temnu (Anonym 1, 2017).

**Obr. 2:** Konopné semeno



[http://hempedification.blogspot.cz/2016\\_02\\_01\\_arhive.html](http://hempedification.blogspot.cz/2016_02_01_arhive.html)



Podélný řez

<http://www.internationalhempassociation.org/jiha/jiha4107.html>

### 3.2 Složení konopného semene

Konopná semena jsou tvořena vláknitou slupkou a olejnatou dužinou. Obsahují 25 – 30 % vysychavého oleje, 20 – 25 % proteinů a 10 – 15 % sacharidů především ve formě vlákniny. Mezi další složky patří esenciální mastné kyseliny, vitamíny A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, C a E, fytyl, lecitin a kyselina cannabidiolová se silným baktericidním účinkem. Semeno je také důležitým zdrojem minerálních látek: Ca, Na, P, Mg, Fe, Mn, Zn, a Si viz tab. 1 (Miovský *et al.*, 2008; Klvaňová and Ruman, 2008).

**Tab. 1:** Obsah vitamínů a minerálních látek v konopném semenu v porovnání se semenem lnu a máku v mg/100 g semen (Upraveno podle: Callaway, 2004; Stránská and Andělová, 2011; Vyhláška č.225/2008 Sb.; Food Composition Databases Show Foods, 2017)

Vitamin / minerální látka	Konopné semeno	Lněné semínko	Makové semeno	DDD
Vitamin E	90	0,31	1,77	12
Thiamin (B1)	0,4	1,644	0,854	1,1
Riboflavin (B2)	0,1	0,161	0,1	1,4
Fosfor	1160	642	870	700
Draslík	859	813	719	2000
Hořčík	483	392	347	375
Vápník	145	255	1438	800
Železo	14	5,73	9,76	14
Sodík	12	30	26	550
Mangan	7	2,482	6,707	2
Zinek	7	0,6	7,9	10
Měď	2	1,220	1,627	1

DDD = doporučená denní dávka [mg/100 g]

Konopná semínka jsou vhodná pro každodenní konzumaci jako součást vyvážené stravy (Ruman, 2014). Jsou bohatým zdrojem polynenasycených mastných kyselin (zejména linolové a  $\alpha$ -linolenové) a proteinů, které obsahují všechny esenciální aminokyseliny v nutričně dostatečném množství podle FAO/WHO (FAO – organizace pro výživu a zemědělství; WHO – Světová zdravotnická organizace); (Girgih *et al.*, 2010). Řadí se tak mezi nejvýživnější potraviny rostlinného původu. Konopné semeno vyniká příjemnou oříškovou chutí. Při přípravě pokrmů by teplota neměla přesáhnout 40 °C, jinak dochází ke ztrátě výživných látek, proto se používá převážně ve studené kuchyni nebo až při dochucování teplých jídel. (Ruman, 2014).

**Tab. 2:** Nutriční obsah živin v konopném semeni a mouce (upraveno podle Callaway, 2004)

	<b>Celé semeno</b>	<b>Konopná mouka</b>
<b>Olej [%]</b>	35,5	11,1
<b>Proteiny [%]</b>	24,8	33,5
<b>Sacharidy [%]</b>	27,6	42,6
<b>Vlhkost [%]</b>	6,5	5,6
<b>Popeloviny [%]</b>	5,6	7,2
<b>Energie (kJ/100 g)</b>	2200	1700
<b>Celková vláknina [%]</b>	27,6	42,6
<b>Stravitelná vláknina [%]</b>	5,4	16,4

### 3.2.1 Konopný olej

Lisováním jedné tuny semen zbavených zelených okvětních lístků se zpravidla získá 250 litrů oleje oříškové chuti se stopami chlorofylu. Olej obsahuje stopové množství THC a dalších cannabinoidů (Ruman, 2014). Konopný olej je charakteristický vysokým obsahem esenciálních nenasycených mastných kyselin. Obsahuje 50 – 70 % kyseliny linolové (18:2,  $\omega - 6$ ), 15 – 25 % kyseliny  $\alpha$ -linolenové (18:3,  $\omega - 3$ ) a 1 – 4 % kyseliny  $\gamma$ -linolenové (18:3  $\omega - 6$ ) ; (Včeláková and Ruman, 2015). Esenciální mastné kyseliny jsou zastoupeny v poměru 3 : 1 ( $\omega - 6$  :  $\omega - 3$ ). Z uvedeného poměru mastných kyselin je patrné, že konopný olej má optimální nutriční hodnotu (Russo and Reggiani, 2015). Na pokrytí denní dávky kyseliny linolové a linolenové stačí 3 – 4 lžičky oleje (Šmirous, 2013). Od roku 2010 je olej součástí Českého lékopisu (Ruman, 2014). Vystavením slunečnímu záření a vzduchu se proteiny a mastné kyseliny transformují a olej žlukne. Proto by se měl olej skladovat v tmavé skleněné lahvi a v chladu (Klvaňová and Ruman, 2008).

**Tab. 3:** Srovnání relativního obsahu [%] mastných kyselin v konopném oleji s dalšími rostlinnými oleji (upraveno podle Callaway, 2004; Benhaim, 2007, Theuer, 2003)

Olej	Palmitová kyselina	Stearová kyselina	Olejevá kyselina	CLA	ALA	GLA	SDA	PUFA	Poměr CLA: ALA
Konopný	5	2	9	56	22	4	2	84	3 : 1
Lněný	6	3	15	15	61	0	0	76	1 : 4
Slunečnicový <sup>1</sup>	4	4	81	10	<1	0	0	63	10 : 1
Řepkový	4	<1	60	23	13	0	0	36	2 : 1
Sójový	10	4	23	55	8	0	0	63	8 : 1
kukuřičný	12	2	25	60	1	0	0	60	60:1
olivový	15	0	76	8	<1	0	0	8	9 : 1
Olej z pšeničných klíčků	3	17	24	46	5	5	<1	56	10 : 1

ALA =  $\alpha$ -linolenová kyselina, GLA =  $\gamma$ -linolenová kyselina, SDA = stearidonová kyselina, PUFA = polynenasycené mastné kyseliny, CLA = kyselina linolová, 1 = high oleic (odrůdy s vysokým obsahem kyseliny olejové)

### 3.2.2. Sacharidy

Callaway (2004) uvádí, že konopné semínko obsahuje 27,6 % a mouka z výlisků semene 42,6 % sacharidů. Všechny jsou převážně ve formě nerozpustné a rozpustné vlákniny v poměru 4:1. Rozpustná vláknina je účinná při zpomalení vstřebávání glukózy, zpomaluje vyprazdňování žaludku a tím zajišťuje delší pocit sytosti, dále pomáhá snižovat hladinu cholesterolu v krvi. Nerozpustná vláknina zajišťuje správné trávení potravy v těle (Klvaňova and Ruman, 2008; Anonym 2, 2017).

### 3.2.3 Konopné proteiny

Proteiny obsažené v konopném semeni se vyznačují vysokou kvalitou, díky zastoupení všech esenciálních aminokyselin v nutričně významném množství a díky struktuře proteinů, která ovlivňuje stravitelnost a využití v lidském těle. Proteiny v konopném semeni jsou majoritně zastoupeny dvěma globulárními proteiny. Jedná se o albuminovou proteinovou frakci a globulinovou frakci. Majoritní globulinová frakce je zastoupená proteinem edestinem. Má strukturu podobnou plazmatickým proteinům v krevní plazmě, a proto je snadno stravitelný. Navíc je prostý inhibitorů trypsinu (antinutriční látky), které se nachází v sóje (Leson and Russell, 2012).



### 3.3 Proteiny

Proteiny neboli bílkoviny jsou polymery aminokyselin, vzniklé proteosyntézou, které obsahují v molekule více než 100 aminokyselin (Velíšek and Hajšlová, 2009). Alberts a kolektiv (2002) uvádí u proteinů rozmezí počtu aminokyselin od 50 do 2000. Aminokyseliny jsou spojené navzájem peptidovou vazbou -CO-NH- do lineárních řetězců. Na vytváření struktury proteinů se podílí i disulfidické můstky (-S-S-), esterové a amidové vazby (spojení serinu, threoninu, argininu nebo lysinu prostřednictvím kyseliny fosforečné). Některé proteiny obsahují navíc jiné fyzikálně nebo chemicky vázané organické sloučeniny: lipidy, sacharidy, nukleové kyseliny, barviva). Proteiny jsou základními chemickými složkami všech živých buněk a jsou součástí potravin rostlinného i živočišného původu. Rostliny jsou schopné syntetizovat proteiny ze základních substrátů jako je oxid uhličitý, voda a anorganické sloučeniny dusíku. Se sacharidy a lipidy se řadí proteiny k tzv. hlavním živinám. Ve výživě člověka jsou nezastupitelné, neboť je není možné dlouhodobě nahrazovat jinými živinami (Velíšek and Hajšlová, 2009).

Vlastnosti proteinů jsou určeny vlastnostmi aminokyselin a prostetických skupin, ze kterých se skládají. Specifické interakce se vyskytují mezi chemickými skupinami a nové vlastnosti vyplývají z komplexního součtu mnoha malých nekovalentních interakcí (Nakai and Modler, 1996).

**Tab. 4:** Rozdělení proteinů podle biologické funkce (upraveno podle: Velíšek and Hajšlová, 2009; Alberts *et al.*, 2002; Verbsky and Richards, 2001; Rogers, 2015)

Typ proteinu	Funkce	Příklad
<b>Strukturní</b>	Stavební složky buněk, tkání živočichů i rostlinných pletiv	Kolagen ve šlachách a chrupavkách, keratin ve vlasech, kožní výrůstky
<b>Hormony</b>	Regulují metabolismus a nervový systém	Inzulín reguluje hladinu glukózy v krvi; růstový hormon reguluje tělesný růst
<b>Enzymy</b>	Katalyzují biochemické reakce v buňkách	Sacharáza katalyzuje hydrolyzu sacharózy; trypsin katalyzuje hydrolyzu proteinů
<b>Transportní</b>	Umožňují přenos sloučenin	Hemoglobin přenáší kyslík; lipoproteiny transportují proteiny
<b>Pohybové</b>	Pohyb svalů	Svalové proteiny aktin a myosin
<b>Obranné</b>	Rozpoznává a ničí cizí látky	Imunoglobuliny stimulují imunitní odezvu
<b>Zásobní</b>	Ukládají živiny	Kasein ukládá proteiny v mléce; feritin ukládá Fe ve slezině a játrech
<b>Senzorické</b>	Optické vlastnosti	Rhodopsin
<b>Regulační</b>	Regulace genové exprese	Histony, hormony
<b>Výživové</b>	Zdroj hmoty k výstavbě a obnově tkání, zdroj N	Esenciální aminokyseliny

### **Z výživového hlediska se dělí na:**

- Plnohodnotné – obsahují všechny esenciální aminokyseliny v množství potřebném pro výživu člověka
- Téměř plnohodnotné – některé esenciální aminokyseliny jsou mírně nedostatkové
- Neplnohodnotné – některé esenciální aminokyseliny jsou nedostatečným množstvím (Velíšek and Hajšlová, 2009).

### **Podle tvaru molekuly se dělí do dvou skupin:**

- Globulární (sféropoteiny) – molekuly oblého až kulovitého tvaru s nepolární funkční skupinou uvnitř molekuly, naopak polární skupiny tvoří vnější obal molekuly, na který se vážou molekuly vody. Proto jsou tyto proteiny převážně rozpustné ve vodě a zředěných roztocích solí, tvoří koloidní roztoky.
- Fibrilární (skleroproteiny) – téměř nerozpustné strukturní proteiny, molekula má tvar makroskopických vláken (Alberts *et al.*, 2002).

### **Podle rozpustnosti (sféropoteiny):**

- Albuminy – neutrální, dobře rozpustné ve vodě. Vysolují se síranem amonným při nasycení > 60 %. Nevratně koagulují při 75 °C (laktoglobulin, leucosin, legumelin aj.).
- Globuliny – dělí se na dva typy: ve vodě rozpustné pseudoglobuliny a nerozpustné euglobuliny. Euglobuliny zůstávají rozpustné při isoelektrickém bodu, pseudoglobuliny ne. Globuliny jsou rozpustné ve zředěných roztocích solí, vysolují se 40 % síranem amonným a za tepla koagulují. Euglobuliny zůstávají rozpustné při isoelektrickém bodu, pseudoglobuliny jsou nerozpustné. (Pseudoglobuliny z mléčné syrovátky; euglobulin edestin, glycin, tuberin aj.).
- Prolaminy – izolovány pouze z rostlin. Jsou nerozpustné ve vodě, ale rozpustné ve zředěných roztocích solí, kyselin a zásad a také v 70 % ethanolu. Za tepla nekoagulují (gliadin, hordein, zein aj.).

- Gluteliny – izolovány jen z rostlin. Ve vodě jsou nerozpustné, ale rozpustné ve zředěných roztocích solí, kyselin a zásad, teplem koagulují (glutelin, oryzenin aj.).
- Protaminy – silně bazické proteiny. Dobře rozpustné ve vodě, zředěných kyselinách a zásadách a také v NH<sub>4</sub>OH. Obsahují velké množství argininu.
- Histony – slabě bazické, dobře rozpustné ve vodě, zředěných kyselinách a zásadách. Od protaminů se liší tím, že jsou nerozpustné v NH<sub>4</sub>OH a teplem nekoagulují. Obsahují vyšší množství lysinu, argininu a histidinu (Jain *et al.*, 2005).

### 3.3.1 Vlastnosti proteinů

#### Rozpustnost

Rozpustnost proteinů je závislá na struktuře proteinu a relativní permitivitě rozpouštědla. Především ale závisí na hodnotě pH roztoku, iontové síle, také na teplotě a dalších faktorech (Velíšek and Hajšlová, 2009).

Při nízkých koncentracích elektrolytu roste se zvyšováním koncentrace solí rozpustnost proteinu do určitého maxima. Po jeho překročení s rostoucí koncentrací soli rozpustnost proteinu klesá. Vzestup rozpustnosti proteinu při zvyšování koncentrace soli v oblasti nízkých koncentrací se nazývá vysolování. Různé proteiny mají odlišnou odezvu na přidavek soli. Vysolování se často používá pro frakcionaci globulinů, které jsou ve vodě téměř nerozpustné a mohou být tedy frakcionovaně rozpuštěny zvyšováním iontové síly roztoku. Snižování rozpustnosti většiny proteinů při vysoké koncentraci soli v roztoku se používá pro tzv. vysolování. Hlavní efekt při vysolování způsobuje anion přidané soli. U polyvalentních aniontů (fosforečnany, sírany) bylo zjištěno, že prokazují vyšší vysolovací účinek než monovalentní anionty (chloridy) ; (Bílková and Králová, 1997).

V přítomnosti organických rozpouštědel mají proteiny tendenci denaturovat. Denuraci lze omezit snížením na teplotu pod 0 °C (-5 °C), protože organická rozpouštědla snižují bod tuhnutí roztoků. Při precipitaci proteinů organickými rozpouštědly přítomnost solí ve vodném roztoku zvyšuje rozpustnost proteinů. Srážení se provádí v rozmezí koncentrace 0 – 80 %. Po oddělení precipitátu je nutné odstranit

zbytky organického rozpouštědla vakuovým sušením nebo dialýzou (Velíšek and Hajšlová, 2009).

V roztocích proteiny disociují na amfolyty. V závislosti na pH prostředí vznikají disociací různých funkčních skupin různých aminokyselin kladně nebo záporně nabitě ionty. Z rozdílu kladných a záporných nábojů se získá volný náboj, který má podle pH prostředí kladný anebo záporný náboj. Oblast pH, při které se peptid (aminokyselina) nepohybuje v elektrickém poli. To znamená, že jeho volný náboj je nulový (Reusch, 2014). Rozpustnost proteinů značně závisí na pH roztoku, ve kterém se protein vyskytuje (nejnižší je v isoelektrickém bodě). V některých případech může dojít v isoelektrickém bodě ke spontánní precipitaci proteinu. Často je nutné po úpravě pH do hodnoty isoelektrického bodu změnit např. koncentraci solí, teplotu, přidat organické rozpouštědlo apod., aby došlo k selektivnímu srážení proteinu. Malá změna pH může mnohonásobně změnit rozpustnost přítomných proteinů. Je potřeba počítat s tím, že některé proteiny jsou v prostředí pH rovnající se hodnotě jejich isoelektrického bodu nevratně denaturovány. Skutečnosti, že se proteiny liší navzájem svými isoelektrickými body, se využívá při tzv. isoelektrickém srážení. Při této metodě se upraví pH roztoku na hodnotu isoelektrického bodu proteinu, která se bude izolovat (Bílková and Králová, 1997).

Roztoky globulárních proteinů tvoří koloidně disperzní soustavy. Molekuly proteinů mají charakter molekulových micel s nepolárním jádrem a polárním obalem, který se ve vodném prostředí hydratuje. Množství vody se pohybuje kolem 0,2 – 0,5 g / 1 g proteinu. Disperze proteinů jsou proto hydrofilními koloidy (Velíšek and Hajšlová, 2009).

## **Denaturace**

Nativní konformace globulárních proteinů a jejich vlastnosti se mění již mírným účinkem fyzikálních faktorů a chemických činidel. Konformační změny mohou být reverzibilní – vratné (konformace může být obnovena navrácením proteinu do původních podmínek) nebo ireverzibilní – nevratné (ztráta biologické aktivity a původní funkce proteinu). Denurací se struktura proteinu mění z nativní formy do stavu nahodile svinutého řetězce. Nové funkční skupiny mohou interagovat s vodou a

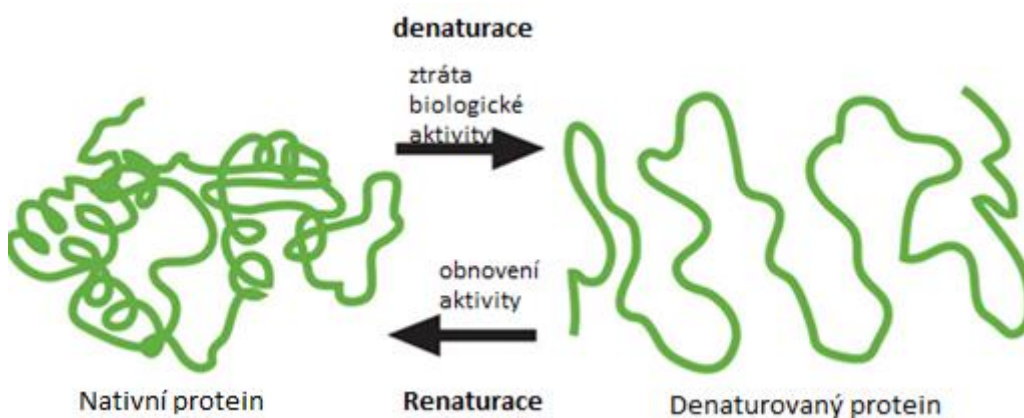
některé proteiny vykazují v denaturovaném stavu zvýšenou schopnost vázat vodu (o 30 – 45 %). Denaturace bývá provázena koagulací proteinů, důsledkem agregace molekul proteinu (funkční skupiny proteinů reagují samy se sebou), čímž se snižuje počet funkčních skupin schopných vstupovat do interakcí s vodou a klesá schopnost vázat vodu (Velíšek and Hajšlová, 2009; Pouchlý, 2008).

Denaturaci vyvolávají fyzikální faktory, mezi které patří např. změna teploty, tlaku, působení ultrazvuku a chemická činidla např. soli kyselin a zásad a tím způsobená změna pH, nebo přítomnost povrchově aktivních látek. K denaturaci proteinů dochází nejen při tepelném zpracování potravin, ale i vlivem nízkých teplot. K vlastní denaturaci dochází následně v důsledku povrchových jevů na rozhraní dvou fází (roztok proteinu a ledových krystalů) a případně v důsledku zmrznutí vody nutné pro zachování nativní konformace proteinu.

Z výživového hlediska je denaturace zpravidla žádoucí, neboť denaturované proteiny bývají přístupnější digestivním enzymům trávicího traktu než nativní proteiny. Denurací se zvýší využitelnost proteinů. Současně dochází k denaturaci či odstranění některých antinutričních faktorů a přirozených toxických látek např. inhibitorů proteas, lektinů, nežádoucí enzymů a mikroorganismů (Velíšek and Hajšlová, 2009).

Proteiny mají významné využití v potravinářském průmyslu pro svoje funkční vlastnosti. Funkční vlastnosti ovlivňují interakce s ostatními složkami jako je voda, sacharidy a tuky. Mezi hlavní funkční vlastnosti patří rozpustnost, pěnivost, gelovatění, emulgace vaznost vody a tuku (Zayas, 1997). Izoláty připravované alkalickou extrakcí, kterou následuje isoelektrické srážení mají výrazně omezené nebo zničené funkční vlastnosti (Malomo and Aluko, 2015b).

**Obr. 3:** Denaturace proteinu



(Zdroj: <https://socratic.org/questions/what-is-denaturation-and-what-causes-denaturation-in-proteins>)

### 3.4 Proteiny konopí

Jak již bylo zmiňováno, konopné semeno obsahuje dvě hlavní frakce zásobních proteinů, a to albumin (2S) a globulin (11S) / (Callaway, 2004; Malomo, 2015). Nadathur a kolektiv (2017) označují globulin jako 12S. Globulin (edestin) zaujímá z celkového obsahu proteinů 60–80 % (Tang *et al.*, 2006). Hlavními limitujícími aminokyselinami jsou lysin a tryptofan, ostatní aminokyseliny jsou zastoupeny v dostatečném množství (tab. 5). Ve vysokém množství je zastoupen arginin a kyselina glutamová (Park *et al.*, 2012). Arginin pomáhá předcházet kardiovaskulárním onemocněním tím, že zvyšuje průtok krve a přispívá k udržení normálního krevního tlaku (Nadathur *et al.*, 2017). Kyselina glutamová patří mezi neurotransmitery a pomáhá nejen při stresu a psychických potížích (Anonym 3, 2014). Na rozdíl od proteinů semen sóji neobsahuje semeno konopí inhibitory trypsinu, což zlepšuje jeho stravitelnost. Konopný protein je bez oligosacharidů, nacházejících se např. v sójovém a hrachovém proteinu, jenž mohou vyvolávat nepříjemné podráždění žaludku a plynatost (Malomo, 2015).

**Tab. 5:** Relativní zastoupení [%] aminokyselin v konopných semenech a proteinových izolátech ve srovnání se sójovým proteinovým izolátem (upraveno podle: Malomo and Aluko, 2015a; Malomo and Aluko, 2015b; Tang, 2013, Malomo *et al.*, 2014; World health organization, 2007)

Aminokyselina	Albumin <sup>1</sup>	Globulin <sup>1</sup>	HPM	iHPI	SPI
Asparagová kyselina	7,9	9,5	10,8	11,3	11,5
Threonin *	4,6	2,6	3,8	3,4	3,8
Serin	5,1	5,7	5,7	5,6	5,2
Glutamová kyselina	20,4	21,5	18,5	19,1	19,0
Prolin	3,8	3,9	4,4	4,3	5,1
Glycin	8,3	4,1	4,7	4,3	4,1
Alanin	3,9	2,8	4,2	3,8	4,2
Cystein	3,2	3,3	1,5	1,3	1,3
Valin *	2,9	3,4	4,7	4,7	5,0
Methionin *	1,7	4,1	2,3	1,9	1,3
Isoleucin *	2,0	2,9	3,6	3,6	4,8
Leucin *	4,1	5,6	6,9	6,5	8,1
Tyrosin	2,0	3,4	3,0	3,6	3,8
Fenylalanin *	1,3	3,3	4,7	4,7	5,2
Histidin *	3,7	3,9	3,3	3,2	2,6
Lysin *	7,4	3,7	3,9	2,7	6,2
Arginin	12,8	16,1	13,2	15,1	7,5
Tryptofan *	0,2	0,3	1,1	1,0	1,3
<b>EAA</b>	<b>27,9</b>	<b>29,7</b>	<b>34,1</b>	<b>31,7</b>	<b>38,3</b>
<b>AAA</b>	<b>3,5</b>	<b>7,0</b>	<b>8,8</b>	<b>9,3</b>	<b>10,3</b>
<b>HAA</b>	<b>17,8</b>	<b>22,1</b>	<b>26,1</b>	<b>21,7</b>	<b>24,7</b>
<b>Obsah proteinů</b>			<b>44,3</b>	<b>84,2</b>	<b>&gt;90</b>

\* = esenciální aminokyseliny; 1 = v konopném semeni; HPM = mouka s konopným proteinem; iHPI = isoelektricky pH vysrážený konopný proteinový izolát; SPI = sójový proteinový izolát; EAA = součet esenciálních aminokyselin; AAA = aromatické aminokyseliny; HAA = hydrofobní aminokyseliny

Rostlinné globuliny jsou klasifikovány na základě sedimentačního koeficientu jako 11S nebo 7S (Jain *et al.*, 2016). Sedimentační koeficient je definován jako rychlost radiálního pohybu částice v závislosti na aplikovaném odstředivém poli. Sedimentační koeficient je přímo úměrný molekulové hmotnosti částice a nepřímo úměrný jejímu frikčnímu koeficientu. Frikční koeficient závisí na tvaru a velikosti sedimentující částice (objemné a protáhlé částice mají vyšší hodnoty frikčního koeficientu než malé kulovité částice). Různé molekuly sedimentují při různých hodnotách sedimentačního koeficientu ( $s$ ) v závislosti na své hmotnosti a tvaru. Hodnota sedimentačního koeficientu, je typická pro sedimentaci určité částice v daném prostředí. Sedimentační koeficient se udává v jednotkách Svedberg (S), které jsou v soustavě SI definovány jako  $10^{-13}$  sekundy. Pro většinu látek nabývají hodnoty sedimentačního koeficientu 1 – 100 S. Pro proteiny jsou charakteristické hodnoty 1 až 10 S (Brown *et al.*, 2008; Vaněk and Bezouška, 2010).

### 3.4.1 Globulin

Globulinová frakce je zastoupena proteinem edestinem, který je hlavním zásobním proteinem v konopném semeni (Nadathur *et al.*, 2017). Má jednoduchou terciální strukturu (Malomo, 2015). Globulin v konopném semeni je tvořen dvěma typy proteinů 11S a 7S, které mohou být odděleny díky rozdílným isoelektrickým bodům pomocí isoelektrické precipitace, jak popisuje Wang a kolektiv (2008). Edestin je složen ze šesti identických monomerů tzv. hexamer. Každý monomer je tvořen kyselou a bazickou podjednotkou spojenou jednou disulfidickou vazbou (Teh *et al.*, 2016). Edestin se však za redukujících podmínek na polyakryamidovém gelu separuje na kyselé podjednotky o molekulové hmotnosti 34 kDa a bazické podjednotky o molekulové hmotnosti 18 – 20 kDa (Raikos *et al.*, 2015). Odhadovaná molekulová hmotnost nativního edestinu je přibližně 300 kDa (Wang *et al.*, 2008).

Edestin je podobný lidskému proteinu v krevní plazmě, s čímž souvisí jeho dobrá stravitelnost a jeho „nealergenní“ povaha (Anonym 3, 2014). Albumin, globulin a fibrogin patří mezi tři hlavní proteiny v krevní plazmě. Tyto proteiny v plazmě slouží v případě potřeby jako zásoba rychle dostupných aminokyselin. Globulin je třetím nejčastějším proteinem, nacházejícím se v lidském těle. Globuliny vykonávají mnoho enzymatických funkcí v krevní plazmě. Jsou odpovědné za činnost buněk, které tvoří imunitní systém (Osburn, 1992).

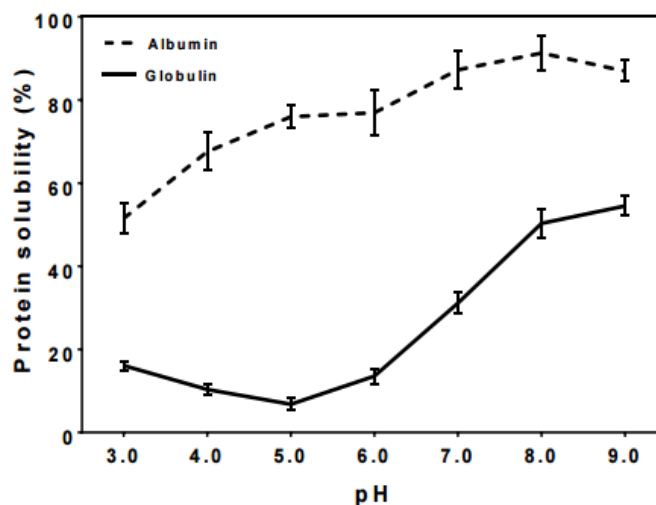
### 3.4.2 Albumin

Konopí obsahuje 35 % albuminu. Konopný albumin patří mezi vysoce kvalitní proteiny a je podobný albuminu vaječného bílku.

Albumin má vysokou relativní rozpustnost ve vodě (globulin je ve vodě rozpustný velmi málo). Albumin má minimální rozpustnost při pH 3 a globulin při pH 5 (obr. 4); (Malomo, 2015). Struktura albuminu je velmi málo kompaktní a hydrofilní. Pěnicí schopnost odráží vysoká rozpustnost albuminu s 90 % navýšením objemu při pH 3 ale i při pH 7 a 9. Další vlastností albuminu i globulinu je schopnost tvořit emulze (Nadathur, 2017). Molekulová hmotnost albuminu je přibližně 4 – 9 kDa (Day, 2013).



**Obr. 4:** Rozpustnost konopného albuminu a globulinu při různých hodnotách pH (převzato od Malomo, 2015)



### 3.4.3 Konopný proteinový izolát

Běžně používaným a jednoduchým způsobem izolace proteinu je použití alkalické solubilizace a následné kyselé srážení na hodnotu isoelektrického bodu (pI) (Malomo, 2015). Hodnota isoelektrického bodu konopných proteinů se nejčastěji pohybuje v rozmezí pH 5 – 6 (Yin *et al.*, 2009). Podle Pearsall a Ewing (1924) je pI edestinu v rozmezí hodnot pH 5,5 – 6. Další zdroje uvádí hodnotu pI desetinu 6,9 (Niir Board Of Consultants & Engineers, 2005). Při hodnotách pH nad isoelektrický bod (alkalické prostředí), dochází k převedení proteinu do roztoku za laboratorní teploty. Naopak v kyselém prostředí, které se shoduje s hodnotou isoelektrického bodu, dochází k precipitaci rozpuštěného proteinu. Sraženina se oddělí odstředěním. Získaná sraženina se znovu disperguje v destilované vodě za účelem upravení pH na 7 pomocí NaOH. Posledním krokem je sušení (Malomo, 2015).

Izolát má omezené funkční vlastnosti, zejména rozpustnost. Rozpustnost se zlepšuje enzymatickou hydrolyzou (např. trypsinem, alkalasou) a vzniká tzv. hydrolyzovaný konopný proteinový izolát (Tang *et al.*, 2006; Yin *et al.*, 2009). Hydrolyzovaný proteinový izolát, také vykazuje antioxidační aktivitu (Tang *et al.*, 2009). Za účelem získání nového proteinového izolátu se zlepšenými funkčními vlastnostmi by bylo vhodné použít metodu membránové ultrafiltrace, která se využívá při výrobě sójového izolátu. Při ní se odstraní nežádoucí (neproteinové) látky, které

nepříznivě ovlivňují vysrážení proteinu. Ultrafiltrací se získá vysoký výtěžek proteinu s funkčními vlastnostmi pro použití v potravinářském průmyslu. Metoda zatím nebyla patentována a použita pro komerční výrobu konopného proteinového izolátu (Wang *et al.*, 2014).

## 4. MATERIÁL A METODY

### 4.1 Popis vybraných odrůd konopí

Jako výchozí materiál byly zvoleny jednodomé odrůdy konopí USO 31 a Fedora 17. Vlastnosti obou těchto odrůd jsou popsány v tab. 6. Z uvedených hodnot je patrné, že odrůda Fedora 17 je vyššího vzrůstu, s čímž souvisí i větší výtěžnost biomasy. Odrůda Fedora 17 obsahuje značné množství cannabinoidu CBD, který je ceněný pro farmakologické účinky. Obě odrůdy mají značný obsah mastných kyselin v semeni, který je žádoucí.

**Tab. 6:** Vlastnosti odrůd: USO 31 a Fedora 17 (upraveno podle: Ihempfarms, 2017; Len a konopí, 2006)

	<b>USO 31</b>	<b>Fedora 17</b>
<b>Původ</b>	Ukrajina	Francie
<b>Doba vegetace</b>	< 125 dní	< 135 dní
<b>Výška rostliny</b>	200 – 250 cm	250 – 350 cm
<b>Výnos semen</b>	0,8 – 1 t/ha	0,8 – 1 t/ha
<b>Obsah oleje v semeni</b>	28 – 30 %	30 – 32 %
<b>HTS</b>	16 – 18 g	16 – 18 g
<b>Výnos suché biomasy</b>	< 8 t/ha	8 – 10 t/ha
<b>Obsah vlákna ve stonku</b>	> 35 %	30 – 35 %
<b>Obsah CBD</b>	0,5 – 1 %	1,5 – 2 %
<b>Obsah THC</b>	< 0,06 %	< 0,06 %
<b>Použití</b>	Semeno/vláknno	Semeno/CBD/vláknno

HTS = hmotnost tisíce semen, THC = tetrahydrocannabinol, CBD = cannabidiol

### 4.2 Příprava materiálu

Jako základní materiál byly použity výlisky v podobě pelettek, získané po lisování semen na konopný olej od pěstitele konopí pana Říhy z Chraštic. Peletky byly nahrubo nadrceny v třecí misce s tloučkem a poté mlety na ultraodstředivém mlýnu

ZM 100 (Schoeller instruments, Německo) na jemnou mouku. Získaná konopná mouka byla uskladněna v polyethylenovém uzavíratelném sáčku v chladicím boxu a byla použita jako výchozí materiál pro další analýzu.

### **4.3 Laboratorní metody**

#### **4.3.1 Stanovení obsahu sušiny**

Obsah sušiny umleté mouky z výlisků daných odrůd byl stanoven gravimetricky. Mouka byla navažována ve třech opakování do hliníkových váženek po 5 g a sušena 2 h při 110 °C v sušárně UN 75 (Memmert, Německo).

#### **4.3.2 Extrakce proteinů**

##### **Optimalizace pH podmínek pro extrakci**

Optimalizace pH byla prováděna za laboratorní teploty (20 °C) v rozmezí hodnot pH 3 – 11, vždy ve 3 opakováních. Hodnoty pH v kyselé oblasti byly upraveny pomocí 1M roztoku HCl (1M roztok připraven z 35 % HCl), pro hodnoty pH v bazické oblasti byl použit 1 M roztok NaOH (obojí PENTA, ČR). Do 50 ml centrifugačních tub bylo v rámci každého opakování naváženo 2 g konopné mouky. K navážce bylo napipetováno 10 ml destilované vody. Po protřepání se nechal roztok odstát na 15 minut. Poté byly upraveny hodnoty pH jednotlivých roztoků od 3 do 11 za současného míchání na magnetickém míchadle. Pro měření pH byla použita kombinovaná mikro pH elektroda HC 153 (THETA '90, ČR – Ing. Stanislav Skákal) připojená na pH metr (METTLER TOLEDO) a pomocí pipety bylo upraveno pH na požadovanou hodnotu 1M roztokem HCl nebo 1M roztokem NaOH. Po úpravě pH se nechaly upravené vzorky po dobu 30 minut inkubovat při laboratorní teplotě. Následovala centrifugace na centrifuze ROTINA 420 R (Hettich, Německo) při 20 °C po dobu 20 minut při 4500 rpm. Kvůli odstranění tuku byl supernatant po odstředění filtrován přes filtr Filpap KA 2 - M (VERKON, ČR). Pelet byl postupně dvakrát promyt 5 ml destilované vody, znovu odstředěn na centrifuze a supernatant zfiltrován. Veškerý filtrát byl slit do

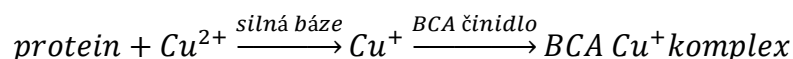
předem zvážených 50 ml centrifugačních zkumavek. Supernatant s obsahem extrahovaných proteinů byl pro další použití zmražen a lyofilizován na lyofilizátoru Alpha 1-4 LSC (Martin Christ, Německo), za následujících podmínek: teplota: -50 °C, tlak: 0,520 mbar, doba: cca 72 h.

### **Extrakce vzorků pro stanovení koncentrace proteinů a SDS-PAGE**

Lyofilizáty extrahovaných proteinů byly zhomogenizovány a navažovány po 25 mg ve čtyřech opakováních do 2 ml centrifugačních mikrozkuvek (Eppendorf, Německo). Následně byly extrahovány v 1 ml extrakčního pufru (0,0625M Tris-HCl + 2% SDS) na ledu po dobu 90 minut. V průběhu extrakce s extrakčním pufrem byly vzorky dvakrát promíchány. Poté byla provedena centrifugace při 4 °C po dobu 10 minut při 12 000 rpm. Do připravených centrifugačních mikrozkuvek bylo odpipetováno z každé varianty 400 µl supernatantu pro stanovení koncentrace proteinů pomocí metody BCA a 400 µl supernatantu pro SDS-PAGE.

#### **4.3.3 Stanovení proteinů bicinchoninovou metodou**

Metoda využívá kyseliny bicinchoninové (BCA) ke spektrofotometrickému stanovení celkových proteinů. Je založena na alkalické redukci měďnatého iontu na měďný pomocí proteinu a následné chelataci měďného iontu kyselinou bicinchoninovou za vzniku purpurového zbarvení.



Tento, ve vodě rozpustný komplex, vykazuje silnou absorpenci při 562 nm, která je lineární se zvyšující se koncentrací proteinů v rozsahu od (20 – 2000 µg /ml). BCA není metodou koncového bodu, to znamená, že výsledné zbarvení se stále vyvíjí. Nicméně po inkubaci je rychlost pokračujícího vývoje zbarvení nízká (Peč *et al.*, 2008; Thermo Fisher Scientific, 2015).

Bicinchoninová metoda je velmi citlivá na podmínky při provedení (zejména na přesnosti pipetování, na době a teplotě inkubace, na charakteru proteinu použitého

k standardizaci). Metoda BCA je tolerantnější k přítomnosti interferujících sloučenin (redukující sacharidy a amonné ionty interferují velmi silně). Pokud jsou však odstraněny (např. dialýzou), je metoda srovnatelná s metodou Lowryho (Káš *et al.*, 2006; Walker, 1994).

### **Příprava vzorků a stanovení metodou BCA**

Pro analýzu byl použit kit Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Standardem je bovinní sérový albumin (BSA). Pracovní činidlo se připravuje vždy čerstvé smícháním 50 dílů *reagentu A* s 1 dílem *reagentu B*. *Reagent A* obsahuje uhličitan sodný, hydrogenuhličitan sodný, kyselinu bicinchoninovou a vinan sodný v 0,1M roztoku hydroxidu sodného. *Reagentem B* je 4 % síran měďnatý.

Pro vysokou koncentraci proteinu bylo nutné provést ředění vzorků destilovanou vodou v poměru 1 : 1. Každá varianta extrahovaných proteinů byla provedena ve čtyřech opakováních. Naředěné vzorky byly nanášeny o objemu 25  $\mu$ l na mikrodestičku do jamek. Následně bylo přidáno pracovní činidlo o objemu 200  $\mu$ l (poměr nanášeného vzorku a činidla 1 : 8). Po přidání pracovního činidla ke vzorkům se mikrodestička přiklopila víčkem a dala se promíchat na třepačce po dobu 30 sekund. Následovala inkubace při teplotě 37 °C po dobu 30 minut. Poté se mikrodestička ochladila na pokojovou teplotu. Celkové proteiny byly měřeny na přístroji xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer (Bio-Rad, USA) při vlnové délce 562 nm.

### **4.3.4 SDS-PAGE**

Denaturační vertikální elektroforéza na polyakrylamidovém gelu je základní metodou pro separaci makromolekul tedy i proteinů na základě velikosti molekul (molekulové hmotnosti) separovaných látek (Kerese, 1984). Účinkem anionaktivního detergentu SDS (sodiumdodecylsulfát) dochází k rozpadu kvarterní struktury proteinů na jednotlivé proteinové podjednotky. SDS váže proteiny v konstantním poměru 1,4 g SDS na 1 g proteinu. Vzniklé komplexy SDS-protein mají stejnou zápornou hodnotu povrchového náboje a migrují v polyakrylamidovém gelu podle své velikosti ke

kladné anodě. Mezi migrační dráhou proteinu a jeho molekulovou hmotností existuje hyperbolická závislost. Podle dostupných standardů (markerů) o známé molekulové hmotnosti lze stanovit molekulové hmotnosti proteinů a identifikovat je. SDS-PAGE se používá také pro analýzu čistoty proteinu, sledování purifikačního procesu cílového proteinu, pro detekci proteinových modifikací a dalších postupech (Laemmli, 1970; Bárta *et al.*, 2010)

### **Příprava vzorků a SDS-PAGE**

Na základě stanovení celkových proteinů rozpuštěných v roztocích podle pH od 3 – 11 metodou BCA byla zvolena množství nanášek pro SDS-PAGE na systému vertikální elektroforézy SE 600 (Hoeffer, USA). Vzorky byly separované na 12 % separačním gelu a 3,75 % zaostřovacím gelu. Separační gel měl následující složení: 36,7 ml destilované vody, 31,9 ml akrylamidu, 10 ml pufru A, 800  $\mu$ l sodiumdodecylsulfátu (SDS), 400  $\mu$ l persíranu amonného, 40  $\mu$ l tetramethylethylendiaminu (TEMED). Zaostřovací gel obsahoval: 12,15 ml destilované vody, 2,5 ml akrylamidu, 5 ml pufru B, 200  $\mu$ l sodiumdodecylsulfátu (SDS), 150  $\mu$ l persíranu amonného a 20  $\mu$ l tetramethylethylendiaminu (TEMED).

Po extrakci popsané v kapitole 5.2.2 bylo do nových 1,5 ml centrifugačních mikrozkušavek odpipetováno 40  $\mu$ l a přidáno 10  $\mu$ l nanášecího pufru (2-merkaptoethanol). Směs vzorků byla zahřáta v termobloku na teplotu 99 °C po dobu tří minut. Byla zchlazena a nanášena na gel o koncentraci 30  $\mu$ g/slot v množství uvedených v tab. 7. Jako hmotnostní marker byl použit Blue Protein ladder 5 – 245 kDa (Central European Biosystems, ČR). Gel s nanesenými vzorky byl vložen do vertikální elektroforetické vany s pufrem o složení: 0,192 M glycin + 0,025 M Tris + 0,1 % SDS. Vlastní separace byla provedena za podmínek napětí 150 V prvních 30 minut a následně při napětí 200 V po dobu 4-6 hodin. Z důvodu účinnějšího chlazení byla sestava v průběhu separace umístěna v chladničce.

Po separaci byly gely vyjmuty, opláchnuty v destilované vodě a separované proteiny byly přes noc obarveny v roztoku obsahující 1 g barviva Coomassie Brilliant Blue R- 250, 500 ml methanolu, 100 ml kyseliny octové a 400 ml destilované vody. Následné vymytí detekčního roztoku z pórů gelů, tzv. „odbarvení“, bylo provedeno

pomocí odbarvovacího roztoku (obsahující 25 % ethanolu, 10 % kyseliny octové a 65 % destilované vody) po dobu 6 h za podmínek aktivního třepání gelů o velmi nízké intenzitě na třepačce. Po odbarvení byly gely digitalizovány pomocí fotodokumentačního zařízení Gel Doc XR+ (Bio-Rad, USA) a získaný elektronický záznam byl vyhodnocen pomocí software Image Lab (Bio-Rad, USA).

**Tab. 7:** Nanášky vzorků pro SDS-PAGE

Varianta	Nanášky [ $\mu$ l]	Varianta	Nanášky [ $\mu$ l]
U3A	12,4	F3A	13,0
U3B	12,5	F3B	13,0
U3C	10,6	F3C	13,0
U4A	10,3	F4A	10,0
U4B	9,8	F4B	11,1
U4C	11,0	F4C	10,6
U5A	8,3	F5A	7,5
U5B	8,4	F5B	7,6
U5C	8,5	F5C	7,2
U6A	6,4	F6A	5,7
U6B	6,7	F6B	6,0
U6C	6,9	F6C	5,8
U7A	6,1	F7A	5,7
U7B	6,0	F7B	5,4
U7C	5,9	F7C	5,5
U8A	5,6	F8A	5,6
U8B	5,7	F8B	5,7
U8C	5,6	F8C	5,6
U9A	5,2	F9A	5,4
U9B	5,0	F9B	5,6
U9C	5,1	F9C	5,4
U10A	5,0	F10A	5,0
U10B	5,0	F10B	5,0
U10C	5,0	F10C	5,0
U11A	5,0	F11A	5,0
U11B	5,0	F11B	5,0
U11C	5,0	F11C	5,0

U = odrůda USO 31; F = odrůda Fedora 17; číslice značí pH (3 – 11); A, B, C = varianta opakování

#### 4.3.5 Stanovení obsahu dusíku

Stanovení obsahu dusíku bylo provedeno pomocí modifikované Dumasovy metody. Výhodou metody v kombinaci s použitou instrumentací je jednoduché použití a plně automatizovaný proces. Ve srovnání s metodou podle Kjeldahla je výrazně rychlá (proces trvá 3 – 4 minuty), (Jung *et al.*, 2003). Vzorek se spaluje za přítomnosti kyslíku v komoře při vysoké teplotě nad 900 °C. Dochází k uvolnění oxidu uhličitého, vody a oxidu dusíku. Plyny jsou hnány přes speciální sorpční kolony, které pohlcují oxid uhličitý a vodu. Plynné oxidy dusíku jsou katalyticky redukovány na dusík, který

je detekován tepelně-vodivostním detektorem. Přepočítání koncentrace dusíku ve vzorku na obsah dusíkatých látek se provádí přepočtovým faktorem 6,25 (Elementar, 2016).

### **Příprava vzorků a stanovení obsahu dusíku**

Stanovení bylo provedeno u neupravené konopné mouky, z lyofilizovaných extraktů a precipitátů, které bylo nutné zhomogenizovat. Pro analýzu bylo použito 25 mg vzorků zabalených v cínových kapslích. Před vlastní analýzou na analyzátoru rapid N cube (Elementar, Germany) se stanovil denní faktor, jako standard se používá kyselina asparagová. Standard byl navážen do kapslí po 25 mg v pěti opakováních. Po stanovení denního faktoru byly vzorky vloženy do autosampleru k vlastnímu stanovení obsahu dusíku.

#### **4.3.6 Srážení proteinů**

Z výsledků stanovení obsahu dusíku a BCA metody byly zvoleny pro srážení varianty extrahované při pH 9,10 a 11. Do 50 ml centrifugačních tub bylo naváženo po 4 g konopné mouky, která byla rozpuštěna ve 20 ml destilované vody. Následoval stejný postup optimalizace pH, jako u předešlé extrakce pomocí 1M NaOH. Získané extrakty byly sráženy za laboratorní teploty 1M HCl k hodnotě isoelektrického bodu, tedy okyseleny na pH 4, 5 a 6. Po okyselení byly koaguláty 30 minut inkubovány při laboratorní teplotě. Následovala centrifugace při 20 °C po dobu 20 minut při 4500 rpm. Pelet, v tomto případě precipitát, byl postupně dvakrát promyt 10 ml destilované vody a znovu centrifugován. Precipitát byl zmrazen a lyofilizován za následujících podmínek: teplota: - 50 °C, tlak: 0,520 mbar, doba: cca 72 h.

#### **4.3.7 SDS-PAGE precipitátu**

Lyofilizovaný precipitát byl zhomogenizován. Od každé varianty bylo naváženo do 2 ml centrifugačních mikrozkušavek 10 mg precipitátu, který byl extrahován



v extrakčním pufru (0,0625M Tris-HCl + 2 % SDS) na ledu 2 hodiny. V průběhu extrakce byly vzorky dvakrát promíchány. Poté byla provedena centrifugace při 4 °C po dobu 10 minut při 12 000 rpm. Do nových 1,5 ml centrifugačních mikrokumavek bylo odpipetováno 40 µl supernatantu a přidáno 10 µl nanášecího pufru (5 ml 1,25M Tris-HCl, pH 6,8 + 2.3 g SDS + 10 ml glycerol + 5 mg Bromophenol Blue; na 500 µl tohoto pufru se přidá 170 µl 2-sulphanylethanol). Směs vzorků byla zahřáta v termobloku na teplotu 99 °C po dobu 3 minut., po ochlazení byla nanášena na gel v objemu 5 µl/slot. Vzorky byly separované na 12 % separačním gelu a 3,75 % zaostřovacím gelu. Další postup stejný jako u předešlé SDS-PAGE elektroforézy.

#### **4.3.8 Stanovení obsahu dusíku precipitátu**

Stanovení bylo provedeno po lyofilizaci precipitátů a následné homogenizaci. Postup přípravy vzorků a měření byl stejný jako u předchozího měření, podrobně uvedený v kapitole 4.3.5.

#### **4.3.9 Gravimetrické stanovení výtěžnosti extrahovaných a vysrážených proteinů**

Okamžitě po lyofilizaci byly váženy tuby s lyofilizovaným extraktem, stejně i tak s vysráženým proteinem. Výsledek stanoven gravimetricky.

### **4.4 Vyhodnocení výsledků**

Výsledky byly zpracovány do grafů v programu Microsoft Excel. Statistické vyhodnocení bylo provedeno v programu Statistica 12. Byla použita třífaktorová analýza rozptylu – ANOVA s F-testem. Dalším testem byl Fisherův LSD test mnohonásobného porovnávání. Digitalizované gely byly dále vyhodnocovány za účelem zjištění přibližných molekulových hmotností jednotlivých proteinových pruhů a relativní zastoupení pruhů v láně v programu Image Lab 6.0 pro analýzu snímku.

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 Obsah sušiny a dusíkatých látek v mouce

Obsah sušiny namletých výlisků vybraných odrůd nebyl výrazně rozdílný. Sušina u odrůdy USO 31 činila 92,38 % a u odrůdy Fedora 17 byla mírně vyšší 94,21 %.

Následně byl změřen obsah dusíku v konopné mouce odrůd USO 31 a Fedora 17. Ten byl přepočítán koeficientem 6,25 na obsah dusíkatých látek (NL). Z výsledků uvedených v tab. 8 je zjevné, že odrůda Fedora 17 má vyšší obsah NL (34 %) než odrůda USO 31 (29 %).

**Tab. 8:** Obsah dusíkatých látek v konopné mouce

Vzorek	Obsah NL [%]	Průměr NL [%]	NL (%) (Sm.odch.)	Podobnost
<b>USO 31</b>	28,83	<b>28,98</b>	1,15	b
<b>USO 31</b>	30,61			
<b>USO 31</b>	28,56			
<b>USO 31</b>	27,91			
<b>Fedora 17</b>	33,52	<b>34,05</b>	0,55	a
<b>Fedora 17</b>	33,67			
<b>Fedora 17</b>	34,70			
<b>Fedora 17</b>	34,32			

NL = dusíkaté látky; Odlišná písmena indikují průkazný rozdíl na hladině významnosti  $p < 0,05$  (LSD test).

### 5.2 Extrakce konopných proteinů

Před samotnou optimalizací pH bylo měřeno pH suspenze mouky a destilované vody, která se před měřením nechala 15 minut odstát. U odrůdy USO 31 bylo pH v průměru 6,68 a u odrůdy Fedora 17 6,74.

### 5.2.1 Stanovení obsahu proteinů a dusíkatých látek v sušině extraktu

Výsledky stanovené BCA metodou, čili obsah proteinů [ $\mu\text{g/ml}$ ], byly přepočítány na obsah proteinů ve 100 g mouky. Relativní zastoupení proteinů v sušině extraktu získaného solubilizací konopné mouky ve vodných roztocích o různém pH je znázorněno v obr. 5.

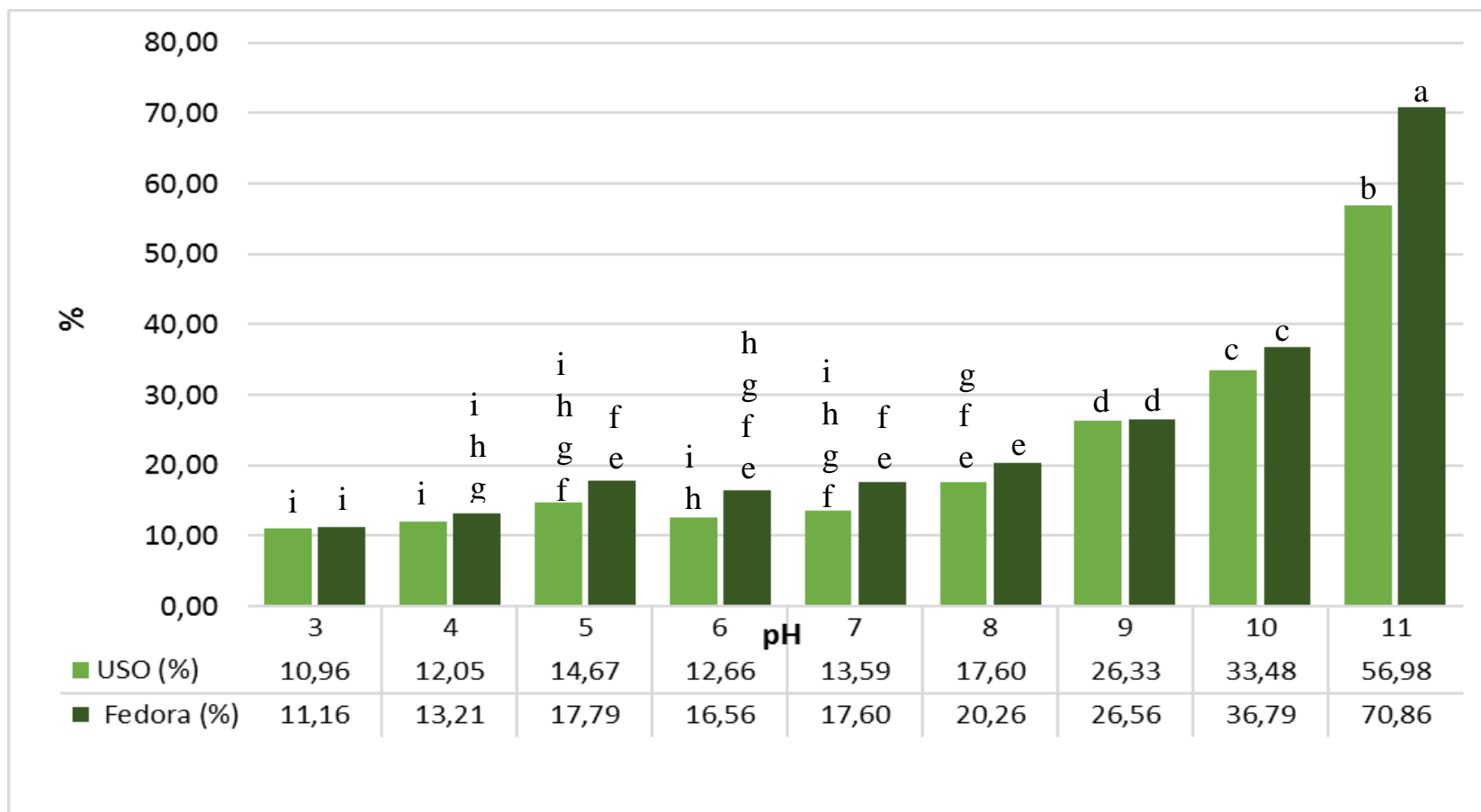
Obsah dusíkatých látek byl stanoven za využití standardního koeficientu  $N \times 6,25$  automaticky pomocí softwaru příslušícího k přístroji rapid N Cube. U výsledků bylo nutné udělat korekci látek použitých pro úpravu pH (1 M HCl a 1M NaOH) a odečíst je od dusíkatých látek, aby nedocházelo ke zkreslení výsledků (obr. 6).

Nejvyšší obsah proteinů a dusíkatých látek byl zjištěn u obou odrůd při pH 11. Z grafů je patrné, že se zvyšujícím se pH mírně roste i obsah extrahovaných proteinů a dusíkatých látek. V obrázku 5, který znázorňuje relativní zastoupení proteinů v extraktu konopné mouky v závislosti na pH, je možné pozorovat mírný propad při pH 6 u obou odrůd, který lze přisoudit blízkosti se hodnotě isoelektrického bodu.

Součinem dusíkatých látek a hmotnostního výtěžku extraktu byla spočítána celková výtěžnost dusíkatých látek v konopné mouce (obr. 7). Výtěžek extrahovaných proteinů byl stanoven gravimetricky po lyofilizaci extraktu. U hmotnostního výtěžku byla provedena korekce hmotnosti přidané HCl a NaOH upravujících pH. Relativní hmotností výtěžky extraktu z konopné mouky se výrazně neliší, jen u pH 11 byl u obou odrůd výraznější hmotnostní výtěžek (obr. 8).

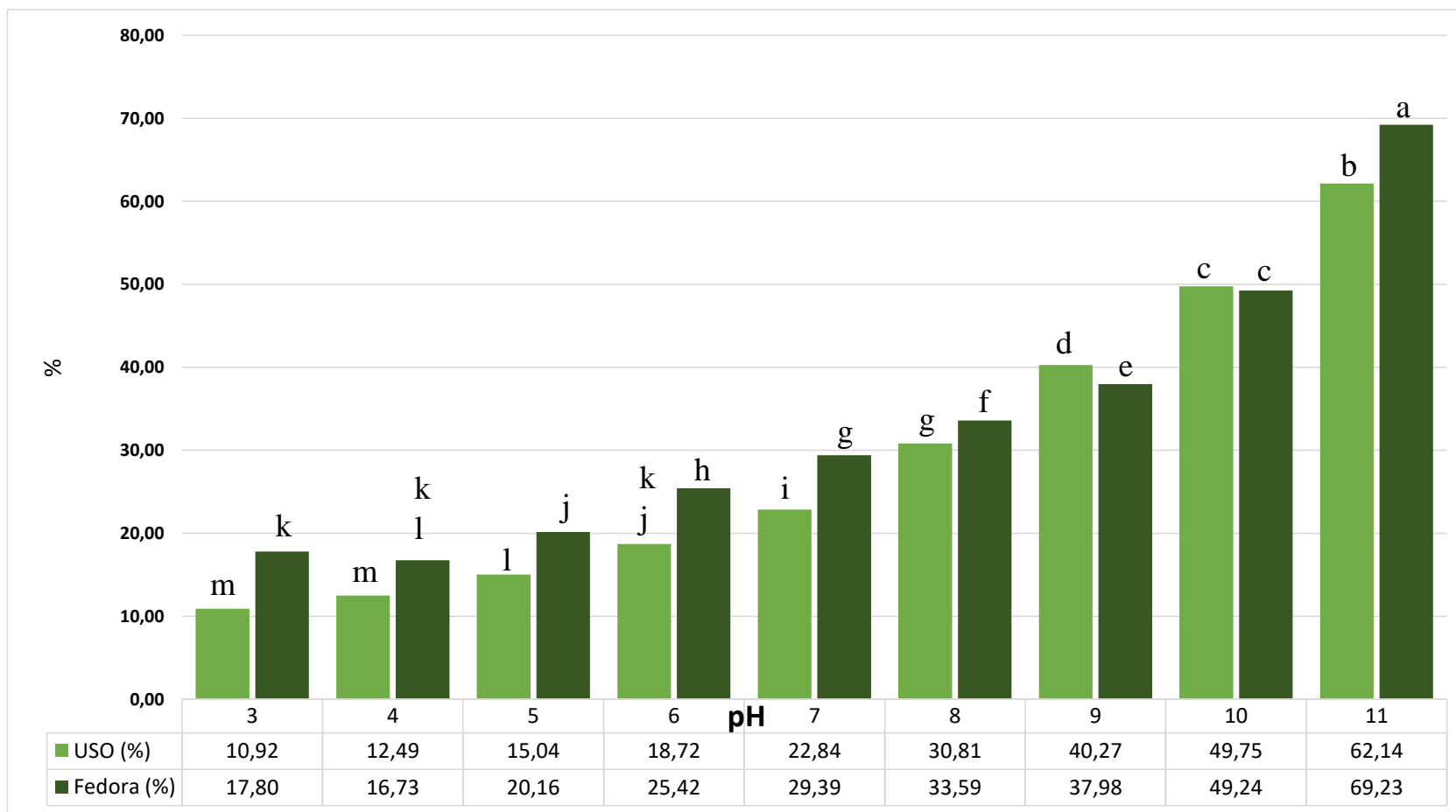
Statistickými metodami byl zhodnocen a prokázán vliv pH na extrakci proteinů (tab. 9) i dusíkatých látek (tab. 10). Dalším zhodnocením bylo prokázání vlivu pH na výtěžnost dusíkatých látek z konopné mouky (tab. 11) a ovlivnění hmotnostního výtěžku extrahovaných proteinů (tab. 12).

**Obr. 5:** Obsah proteinů v získaném extraktu z konopné mouky v závislosti na použitém pH při extrakci



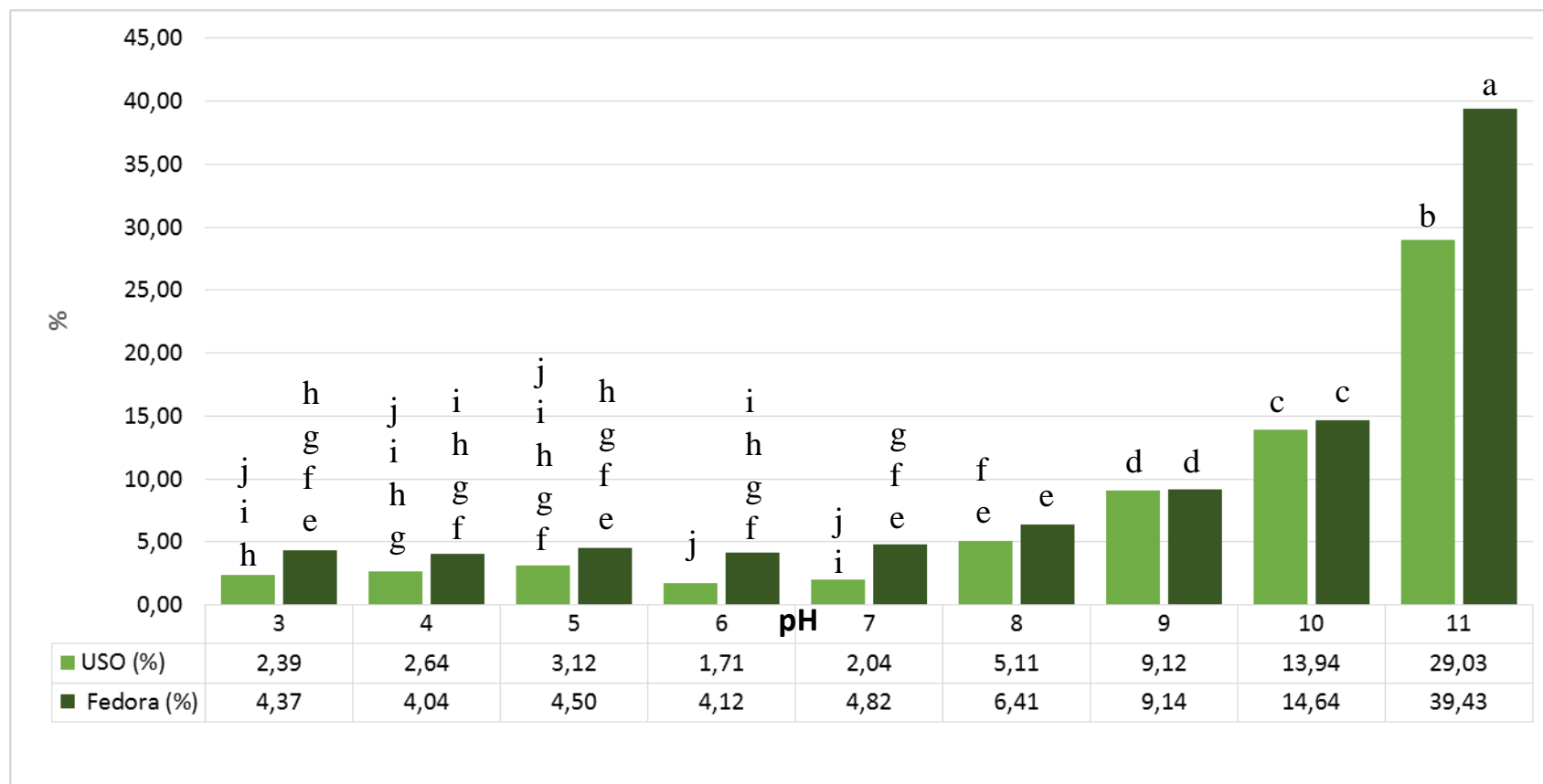
Odlišná písmena nad sloupci v grafu indikují průkazný rozdíl na hladině významnosti  $p < 0,05$  (Fisherův LSD test).

**Obr. 6:** Obsah dusíkatých látek v získaném extraktu po korekci v závislosti na pH



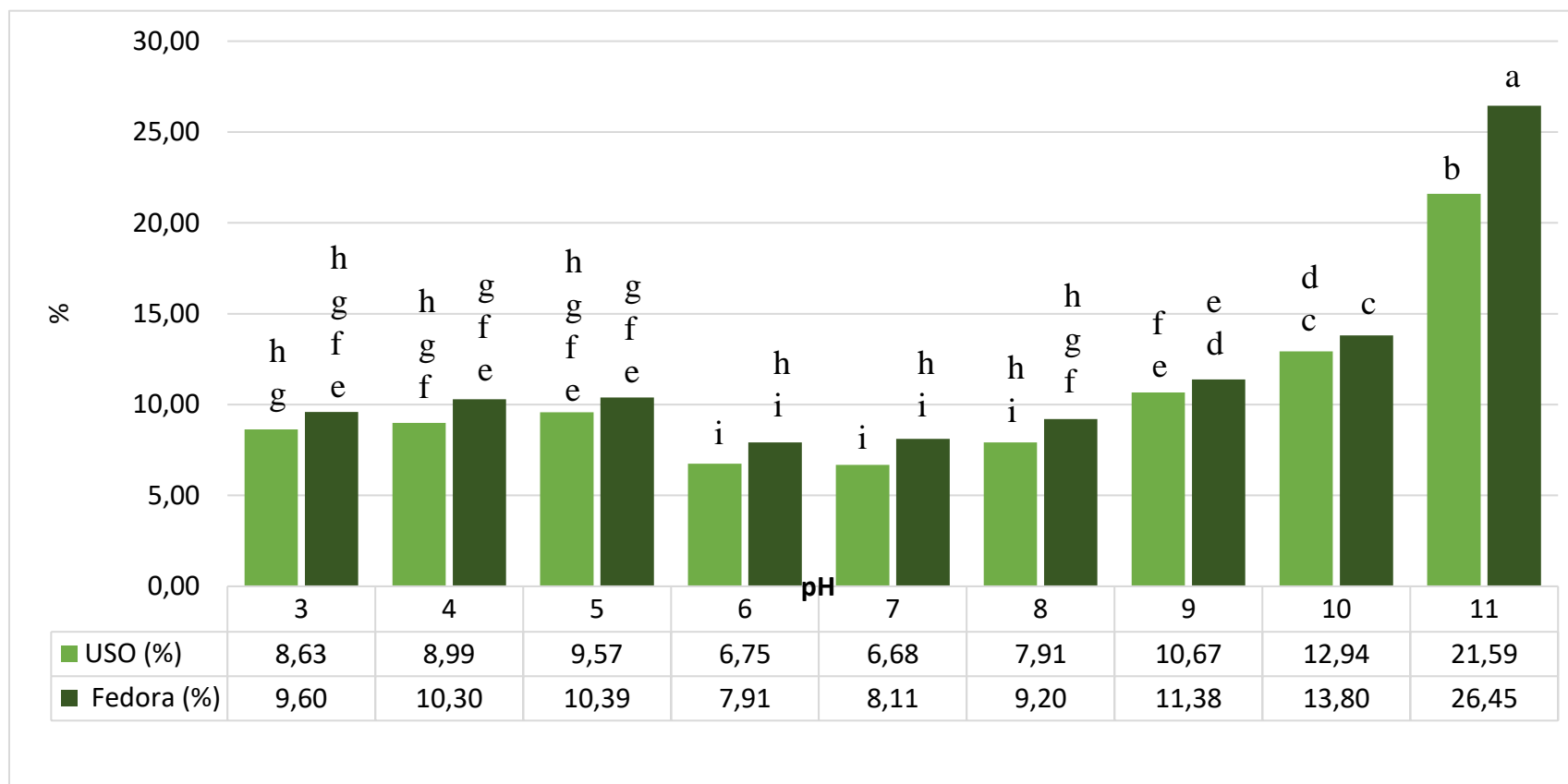
Odlíšná písmena nad sloupci v grafu indikují průkazný rozdíl na hladině významnosti  $p < 0,05$  (Fisherův LSD test).

**Obr. 7:** Výtěžnost dusíkatých látek z konopné mouky po extrakci v závislosti na použitém pH



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

**Obr. 8:** Hmotnostní výtěžek lyofilizovaného extraktu podle pH v konopné mouce



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

**Tab. 9:** ANOVA – Vyhodnocení vlivu pH na extrakci proteinů

Efekt interakce	Suma čtverců	Stupeň volnosti	Průměrný čtverec	F test	p
Absolutní člen	30686,79	1	30686,79	4356,506	0,000000
Odrůda	175,70	1	175,70	24,944	0,000015
Varianta extrakce	13590,22	8	1698,78	241,170	0,000000
Odrůda* varianta extrakce	203,90	8	25,49	3,618	0,003512
Chyba	253,58	36	7,04		

Prostřednictvím analýzy rozptylu byl ( $p < 0,05$ ) potvrzen statisticky průkazný vliv pH na rozpustnost proteinů.

**Tab. 10:** ANOVA – vyhodnocení vlivu pH na extrakci dusíkatých látek

Efekt interakce	Suma čtverců	Stupeň volnosti	Průměrný čtverec	F test	p
Absolutní člen	49958,65	1	49958,65	42342,11	0,000000
Odrůda	211,31	1	211,31	179,10	0,000000
Varianta extrakce	14503,79	8	1812,97	1536,57	0,000000
Odrůda* varianta extrakce	137,26	8	17,16	14,54	0,000000
Chyba	40,12	34	1,18		

Prostřednictvím analýzy rozptylu byl ( $p < 0,05$ ) potvrzen statisticky průkazný vliv pH na rozpustnost dusíkatých látek.

**Tab 11:** ANOVA – vyhodnocení vlivu pH na výtěžnost dusíkatých látek v konopné mouce

Efekt interakce	Suma čtverců	Stupeň volnosti	Průměr čtverec	F test	p
Absolutní člen	4297,834	1	4297,834	2378,314	0,000000
Odrůda	83,552	1	83,552	46,236	0,000000
Varianta extrakce	5000,293	8	625,037	345,880	0,000000
Odrůda*varianta extrakce	114,010	8	14,251	7,886	0,000005
Chyba	65,055	36	1,807		

Prostřednictvím analýzy rozptylu byl ( $p < 0,05$ ) potvrzen statisticky průkazný vliv pH na výtěžnost dusíkatých látek.

**Tab 12:** ANOVA – vyhodnocení vlivu pH na hmotnostní výtěžek sušiny extraktu

Efekt interakce	Suma čtverců	Stupeň volnosti	Průměr čtverec	F test	p
Absolutní člen	6725,965	1	6725,965	5370,914	0,000000
Odrůda	29,923	1	29,923	23,894	0,000021
Varianta extrakce	1282,796	8	160,349	128,045	0,000000
Odrůda* varianta extrakce	19,925	8	2,491	1,989	0,076271
Chyba	45,083	36	1,252		

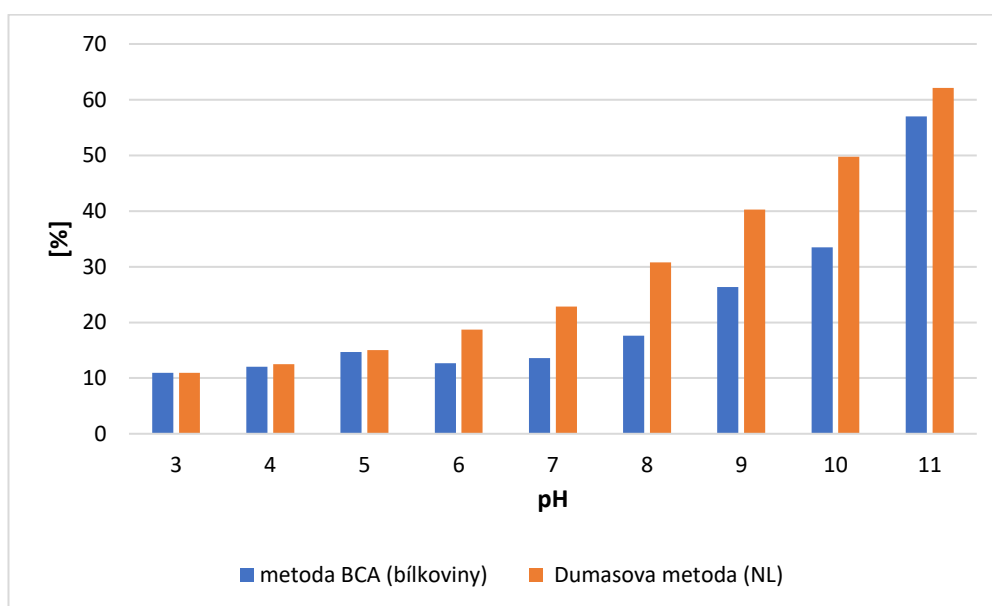
Prostřednictvím analýzy rozptylu byl ( $p < 0,05$ ) potvrzen statisticky průkazný vliv pH na výtěžnost sušiny extraktu. Působení těchto dvou faktorů navzájem nebylo potvrzeno ( $p > 0,05$ ).



## Grafické srovnání metody BCA a Dumasovy

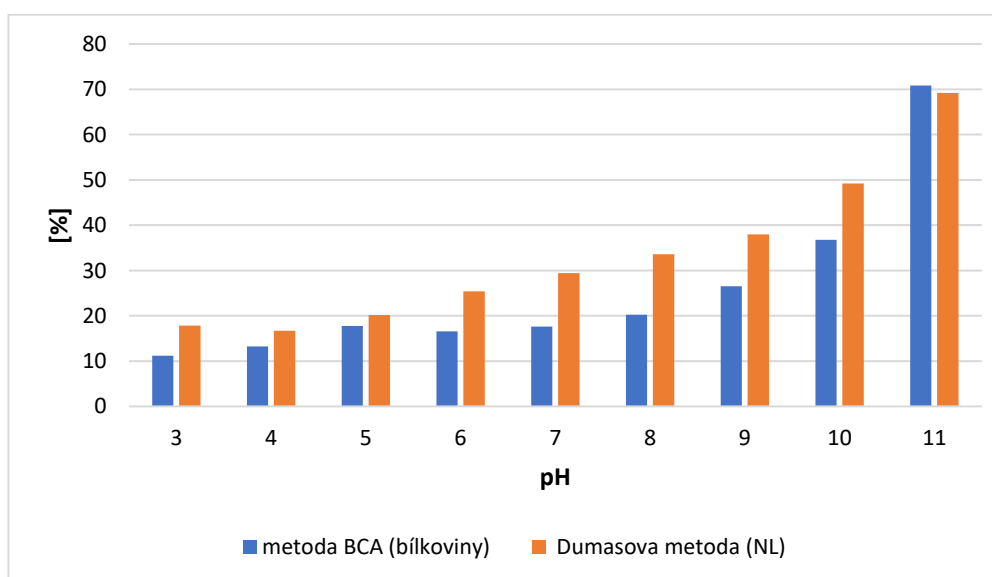
Dumasova metoda zahrnuje veškeré dusíkaté látky, tedy i látky neproteinové povahy a proto jsou hodnoty BCA metody nižší. Obě metody u obou odrůd potvrzují, že nejvíce proteinů a dusíkatých látek se extrahuje při pH 11 a nejméně při pH 3 (Obr. 9 a 10).

**Obr. 9:** Porovnání stanovení obsahu proteinů metodou BCA a dusíkatých látek Dumasovo metodu v extraktu u odrůdy USO 31



NL = dusíkaté látky

**Obr. 10:** Porovnání stanovení obsahu proteinů metodou BCA a dusíkatých látek Dumasovo metodu v extraktu u odrůdy Fedora 17

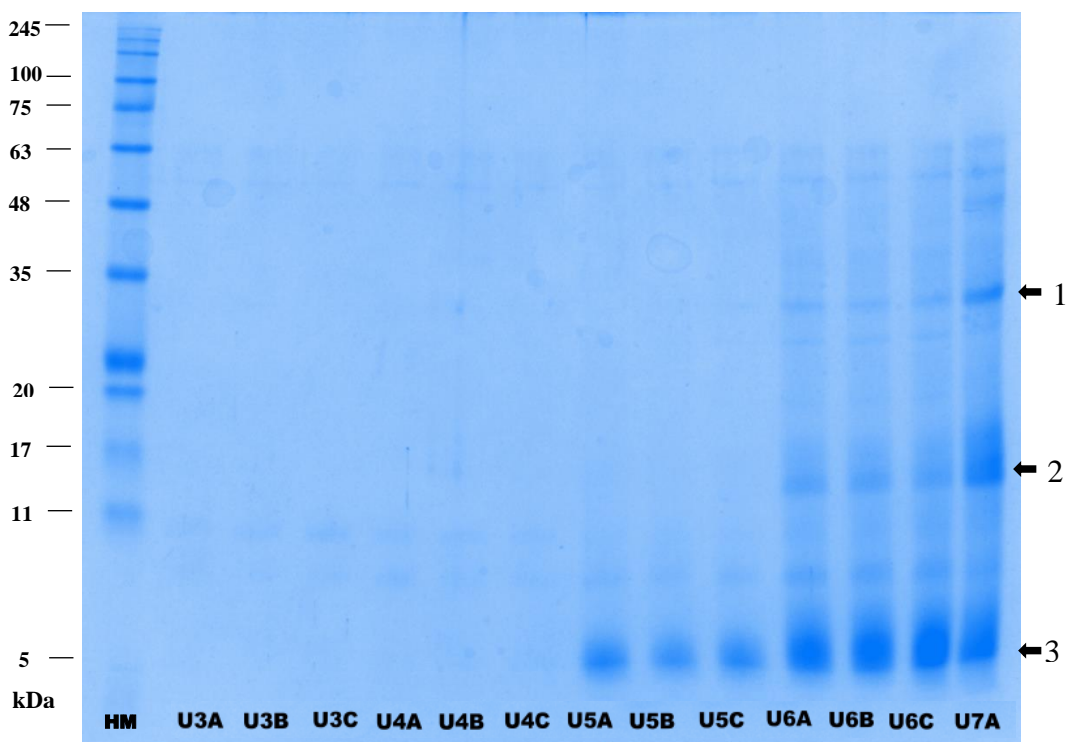


NL = dusíkaté látky

### 5.2.2 Elektroforetická analýza proteinových profilů po extrakci

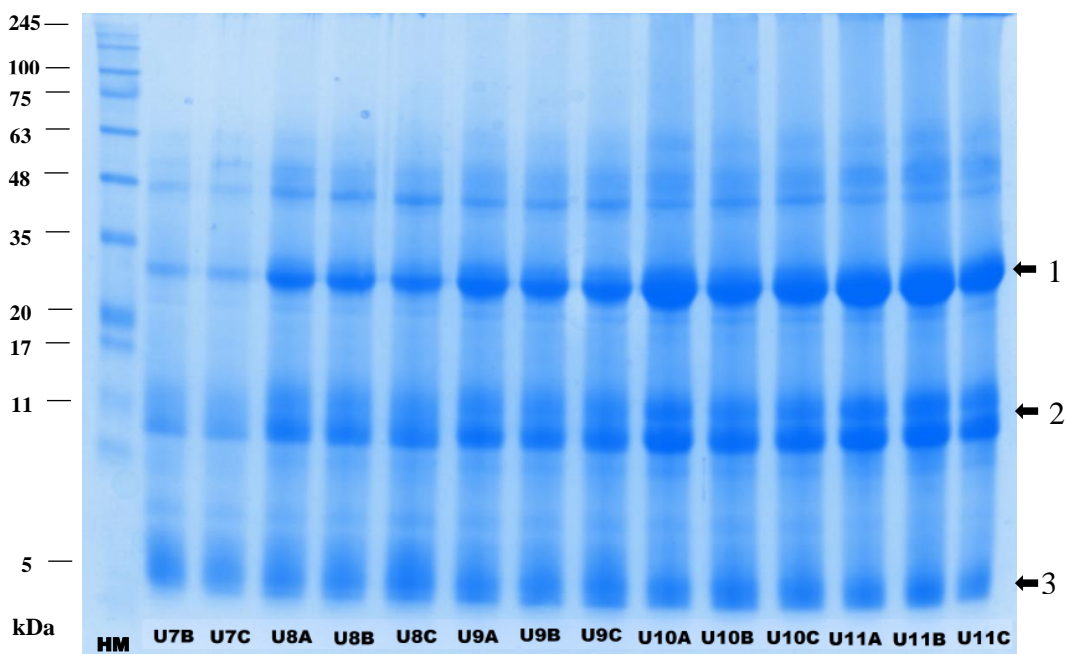
Z celkového pohledu na gely je viditelný rozdíl mezi kyselými a bazickými variantami u obou odrůd. Kyselé varianty do hodnoty pH 5 u odrůdy USO 31 (Obr. 11 a 12) a do pH 4 u odrůdy Fedora 17 (obr. 13 a 14) byly hůře detekovatelné a nebyla viditelně zastoupena globulinová frakce proteinů. Lze usoudit, že kyselé pH snižuje rozpustnost, ale i destrukci části proteinů pravděpodobně patřících do globulinové frakce (edestin). Od hodnoty pH 7 se zvyšuje intenzita pruhů globulinových proteinů, které se dělí na kyselé a bazické podjednotky. Na gelech je viditelná separace dalších menších proteinů o molekulové hmotnosti 42 – 65 kDa, které byly přítomny v malém poměru oproti ostatním pruhům v profilu. Jelikož nejsou určeny isoformy albuminových a globulinových frakcí, můžou to být naštěpené úseky proteinů těchto frakcí narušené vlivem pH. V zobrazených spektrech se jednalo dle použitého hmotnostního markeru o hodnoty jednotlivých frakcí v rozsahu 5 – 245 kDa.

**Obr. 11:** Spektrum proteinových profilů odrůdy USO 31 po extrakci (pH 3 – 7)



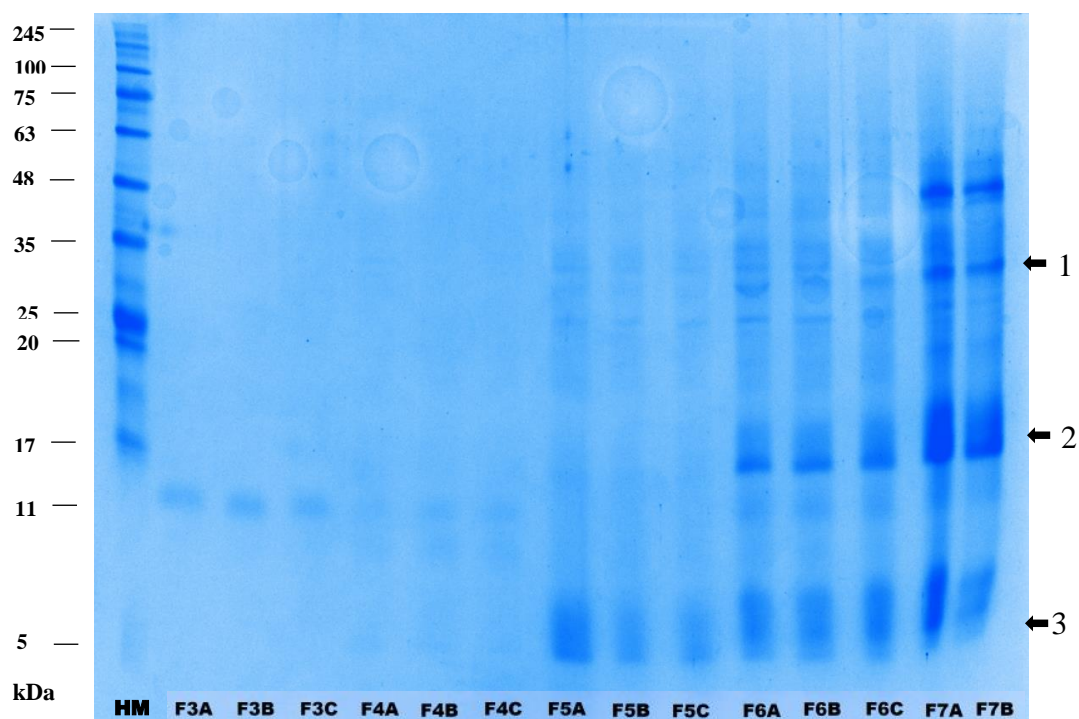
HM = hmotnostní marker; U = odrůda USO 31; číslice 3 - 7 značí pH; A, B, C = varianta opakování;  
1 = kyselá podjednotka edestinu; 2 = bazické podjednotky edestinu; 3 = proteiny albuminové frakce;

**Obr. 12:** pokračování proteinových profilů odrůdy USO 31 po extrakci (pH 7 – 11)



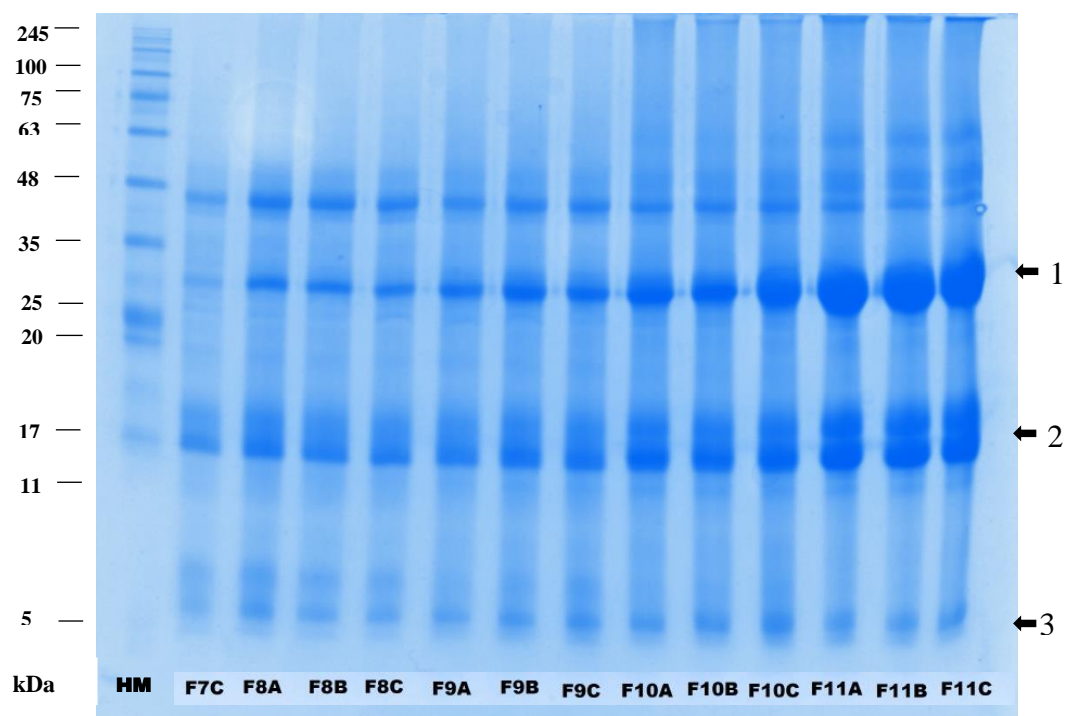
HM = hmotnostní marker; U = odrůda USO 31; číslice 7 - 11 značí pH; A, B, C = varianta opakování;  
1 = kyselá podjednotka edestinu; 2 = bazické podjednotky edestinu; 3 = proteiny albuminové frakce;

**Obr. 13:** Spektrum proteinových profilů odrůdy Fedora 17 po extrakci (pH 3 – 7)



HM = hmotnostní marker; F = odrůda Fedora 17; číslice 3 - 7 značí pH; A, B, C = varianta opakování;  
 1 = kyselá podjednotka edestinu; 2 = bazické podjednotky edestinu; 3 = proteiny albuminové frakce;

**Obr. 14:** Pokračování proteinových profilů odrůdy Fedora 17 po extrakci (pH 7 – 11)

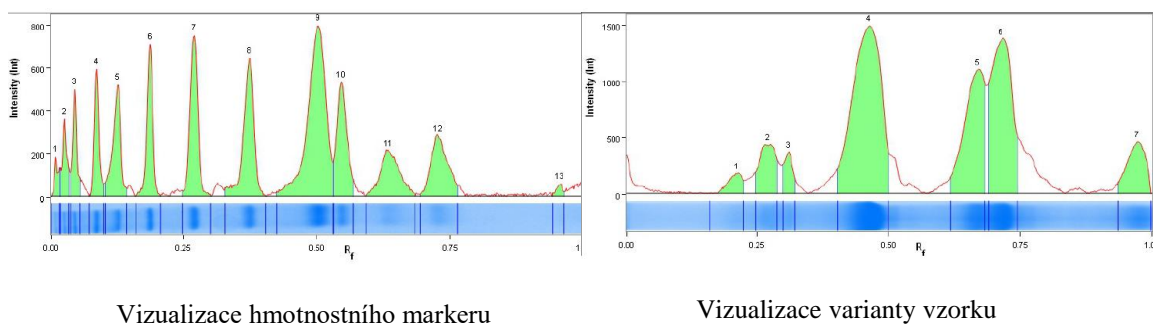


HM = hmotnostní marker; F = odrůda Fedora 17; číslice 7 - 11 značí pH; A, B, C = varianta opakování;  
 1 = kyselá podjednotka edestinu; 2 = bazické podjednotky edestinu; 3 = proteiny albuminové frakce;

## Vyhodnocení elektroferogramů

Elektroferogramy SDS-PAGE analýz byly vyhodnocovány v programu Image Lab 6.0 (Bio-Rad, USA). Po editaci linií, byla provedena identifikace pruhů na gelu. V programu byl označen marker, podle kterého došlo k vyhodnocení přibližných molekulových hmotností. Byla provedena kvantitativní analýza vizualizovaných pruhů v rámci jednotlivých linií. Názorná vizualizace relativního zastoupení proteinových frakcí viz obr. 15. Podle umístění a molekulové hmotnosti (MW) byly proteinové pruhy o MW 5 – 10 kDa přiřazeny k albuminu. U odrůdy USO byly proteinové pruhy o MW 11,8 – 17,4 kDa přiřazeny mezi bazické podjednotky edestinu a pruhy o hmotnosti 28 – 32,3 kDa ke kyselým podjednotkám. Bazické jednotky u odrůdy Fedora měly nižší MW v rozmezí hodnot 9,4 – 12,6 kDa a kyselé jednotky edestinu měly 27,8 – 33,7 kDa. Z tabulek 13 a 14 lze vyvodit, že od pH 4 (5) se s rostoucím pH zvyšovalo zastoupení edestinu u obou odrůd.

**Obr. 15:** Znázornění relativního zastoupení proteinových frakcí v Image Lab 6,0 (Bio-Rad)



**Tab. 13:** Odhad relativního zastoupení jednotlivých podjednotek v rámci proteinových profilů odrůdy USO 31 v programu Image Lab 6.0

Varianta	Molekulová hmotnost [kDa]			Relativní zastoupení proteinových pruhů na gelu [%]	
	Albumin	Edestin		Albumin	Edestin
		Kyselé podjednotky	Bazické podjednotky		
U3A	7,9 - 10			72,4	
U3B	8,1 - 10			50,8	
U3C	8,0 - 10			88	
U4A	7, 8 - 9,9			66,3	
U4B	8 - 9,9			42	
U4C	7,8 - 9,8			44,3	
U5A	5,3 - 7,9			96,2	
U5B	5,3 - 8			90,4	
U5C	5,3 - 8			92,6	
U6A	5,4 - 8	31	13,6 - 16,3	74,9	20,3
U6B	5,5 - 8,1	31,2	13,9 - 16,8	77,5	17,1
U6C	5,6 - 8,3	31,7	14,4 - 17	78,5	16
U7A	5,6 - 8,4	32,3	15,2 - 17,4	39,2	41,2
U7B	5,2	30,6	14,2	49,3	43,3
U7C	5,1	30,1	13,7	42,7	50,7
U8A	5	29,3	13,1 - 16,3	23,8	61,9
U8B	5	29,1	12,8 - 15,7	23,1	60,8
U8C	5	29	12,6	27,7	57,5
U9A	5	28,7	12,4 - 15,8	20,1	67
U9B	5	28,5	12,2 - 15,3	14,4	71,4
U9C	5	28,2	12,1 - 15,1	15,6	68,2
U10A	5	28,1	11,9 - 15,2	8,3	76,7
U10B	5	28	11,8 - 15,1	9	74,8
U10C	5	28,2	11,9 - 15,4	7,9	76,8
U11A	5	28,2	12,1 - 15,3	7,5	81,6
U11B	5	28,5	12,2 - 16,6	16,6	64,5
U11C	5	29,8	13,3 - 16,9	14,5	73,6

**Tab. 14:** Odhad relativního zastoupení jednotlivých podjednotek v rámci proteinových profilů odrůdy Fedora 17 v programu Image Lab 6.0

Varianta	Molekulová hmotnost [kDa]			Relativní zastoupení proteinových pruhů na gelu [%]	
	Albumin	Edestin		Albumin	Edestin
		Kyselé podjednotky	Bazické podjednotky		
F3A	8,7			74,4	
F3B	8,3			95,2	
F3C	8,3			95,1	
F4A	7,2 - 8,3			46,1	
F4B	6,9 - 8,2			56,4	
F4C	8,1			74,1	
F5A	5	31,3	9,5	42,3	33,5
F5B	5 - 5,2	31,3	9,4	27,8	43
F5C	5 - 5,2	31,3	9,4	30,4	44,3
F6A	5,2	28,8 - 31,5	10 - 10,9	42,5	51,9
F6B	5,2	29,5-33,2	10	34,4	59,6
F6C	5,3	29,5 - 33,7	10,4	42,5	52,1
F7A	5,4	30,8 - 33,7	11,1	35,7	50,5
F7B	5,7	31,4	10,9 - 12,6	25,9	59,5
F7C	5,1 - 6	29,5	10,8 - 12,4	7,4	72,1
F8A	5	29,2	10,6	7,8	60,6
F8B	5 - 5,8	28,7	10,3	5,8	64,6
F8C	5 - 5,8	28,5	10,2	7,1	67,3
F9A	5 - 5,6	28,3	10,2	19,1	62,7
F9B	5 - 5,7	28,2	10,1 - 11,2	7,7	71,2
F9C	5 - 5,6	27,9	9,9 - 10,7	8,2	67,2
F10A	5	27,8	10 - 11,7	9,2	65,7
F10B	5	28,2	10,1 - 11,5	11	72,4
F10C	5	28,2	10,1 - 11,6	10,6	76,9
F11A	5	28,2	10,2 - 12,1	6,3	74
F11B	5	28,5	10,2 - 12,3	6,3	85
F11C	5	29,5	10,5 - 12,6	5,9	78,6

## 5.3 Vysrážený konopný protein

Pro srážení byly vybrány varianty extrahované při pH 9,10 a 11 a sráženy na hodnotu isoelektrického bodu 4, 5 a 6.

### 5.3.1 Obsah dusíkatých látek

Stanovení obsahu dusíkatých látek bylo měřeno na analyzátoru dusíku ze sušiny vysrážených proteinů. Obsah dusíkatých látek (Nx6,25) se pohyboval u odrůdy USO 31 v rozpětí 62,56 – 92,9 % a u odrůdy Fedora 17 v rozmezí 59,94 – 92,6 %. Vysokého obsahu dosahovaly varianty extrahované při pH 11, které byly sráženy na hodnotu isoelektrického bodu 5 a 6 (obr. 16).

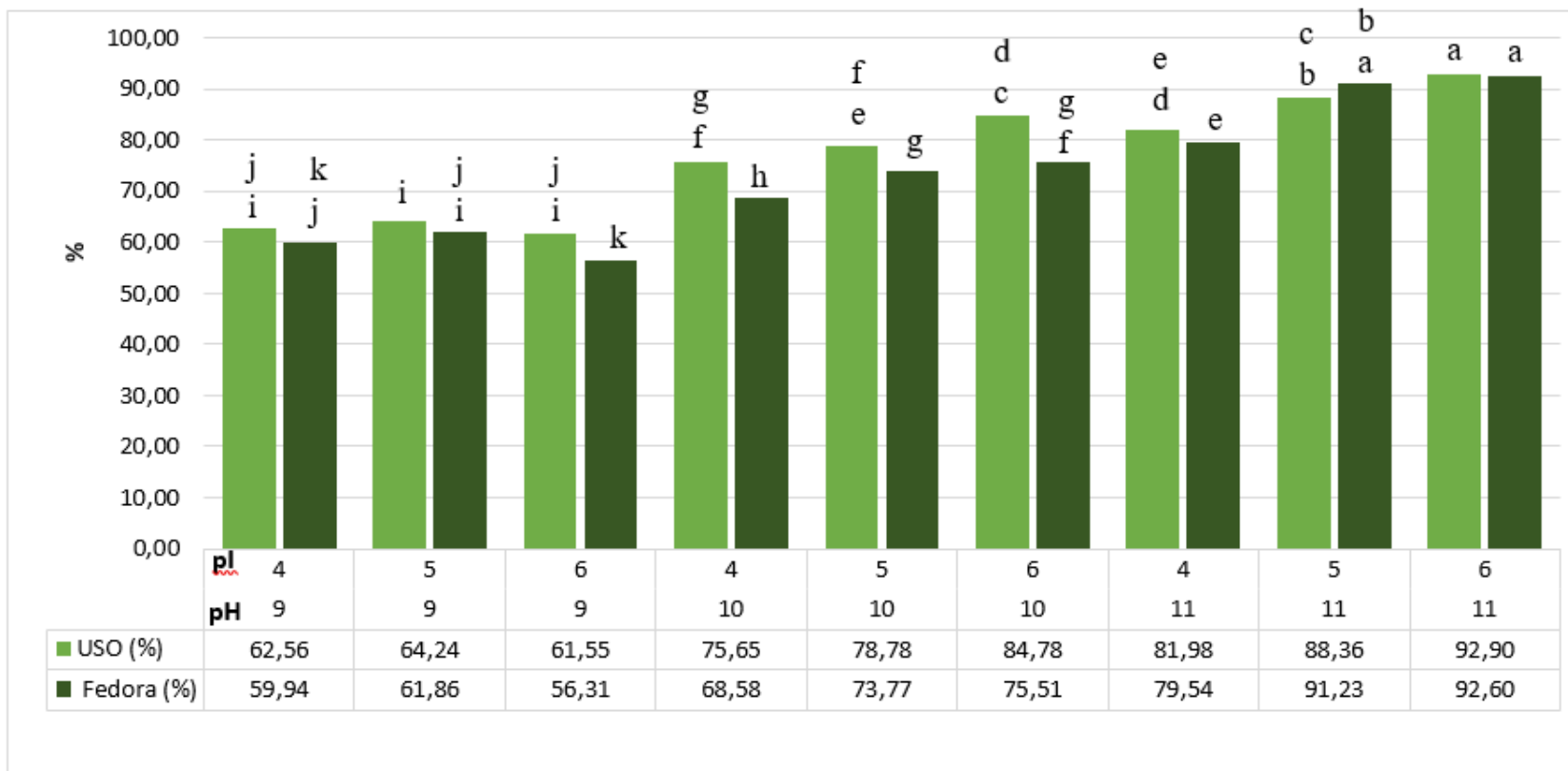
Součinem obsahu dusíkatých látek a hmotnostního výtěžku sraženiny byla spočítána celková výtěžnost dusíkatých látek ve vysráženém proteinu (obr. 17).

Výtěžek vysrážených proteinů získaný z konopné mouky byl stanoven gravimetricky. Nejvyšších hmotností výtěžků vysrážených proteinů z konopné mouky u obou odrůd bylo dosaženo u variant extrakce při pH 11 (obr. 18).

Statistickými metodami byl zhodnocen a prokázán vliv pH a isoelektrického bodu na obsah dusíkatých látek v sušině vysrážených proteinů (tab. 15). Prokázán vliv pH a isoelektrického bodu na výtěžnost dusíkatých látek v sušině vysrážených bílkovin (tab. 16). Posledním statistickým zhodnocením byl potvrzen vliv pH a isoelektrického bodu na hmotnostní výtěžek vysrážených proteinů z konopné mouky (tab. 17).

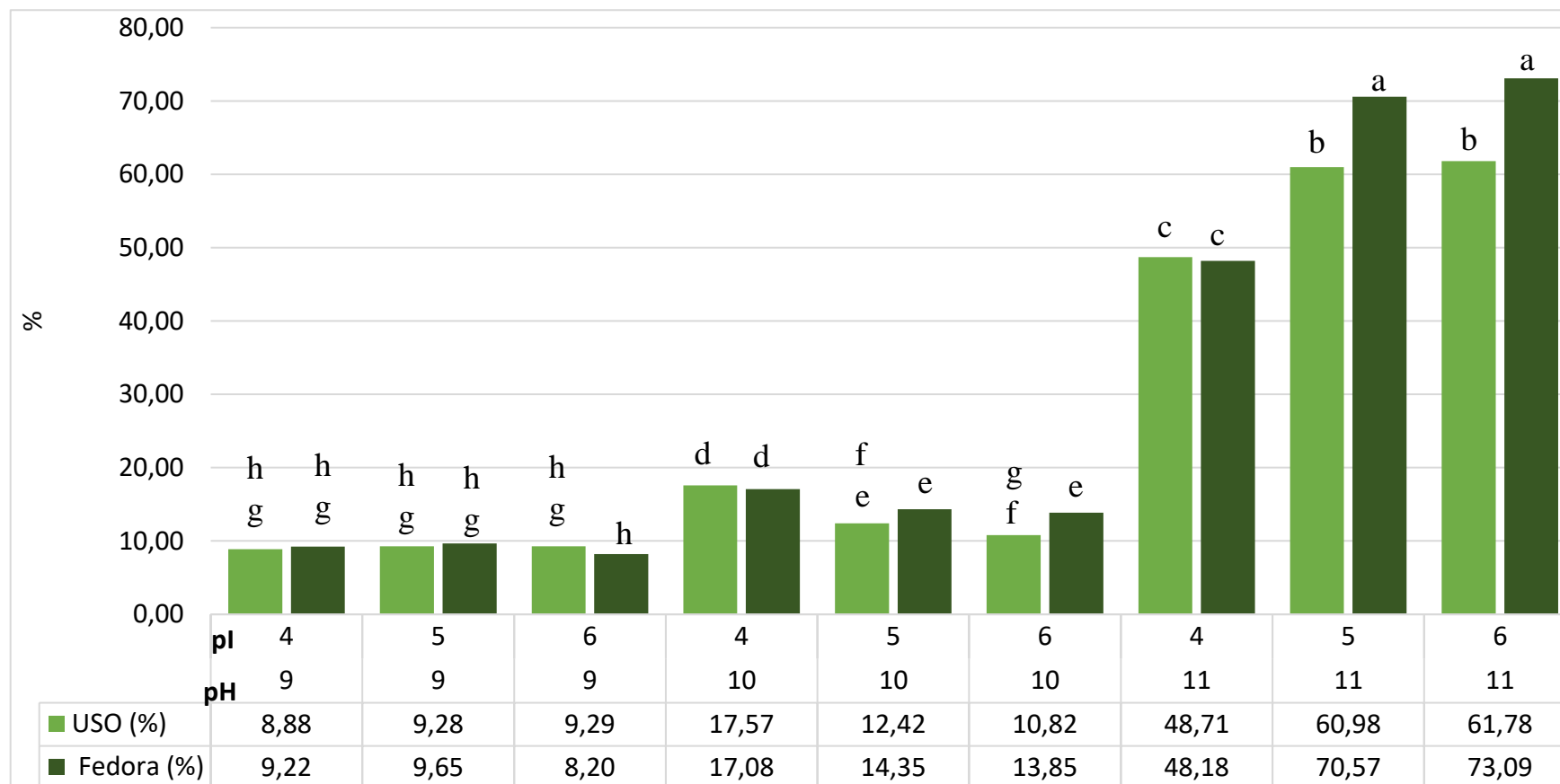


**Obr. 16:** Obsah dusíkatých látek v sušině vysrážených proteinů v závislosti na pH a isoelektrickém bodu



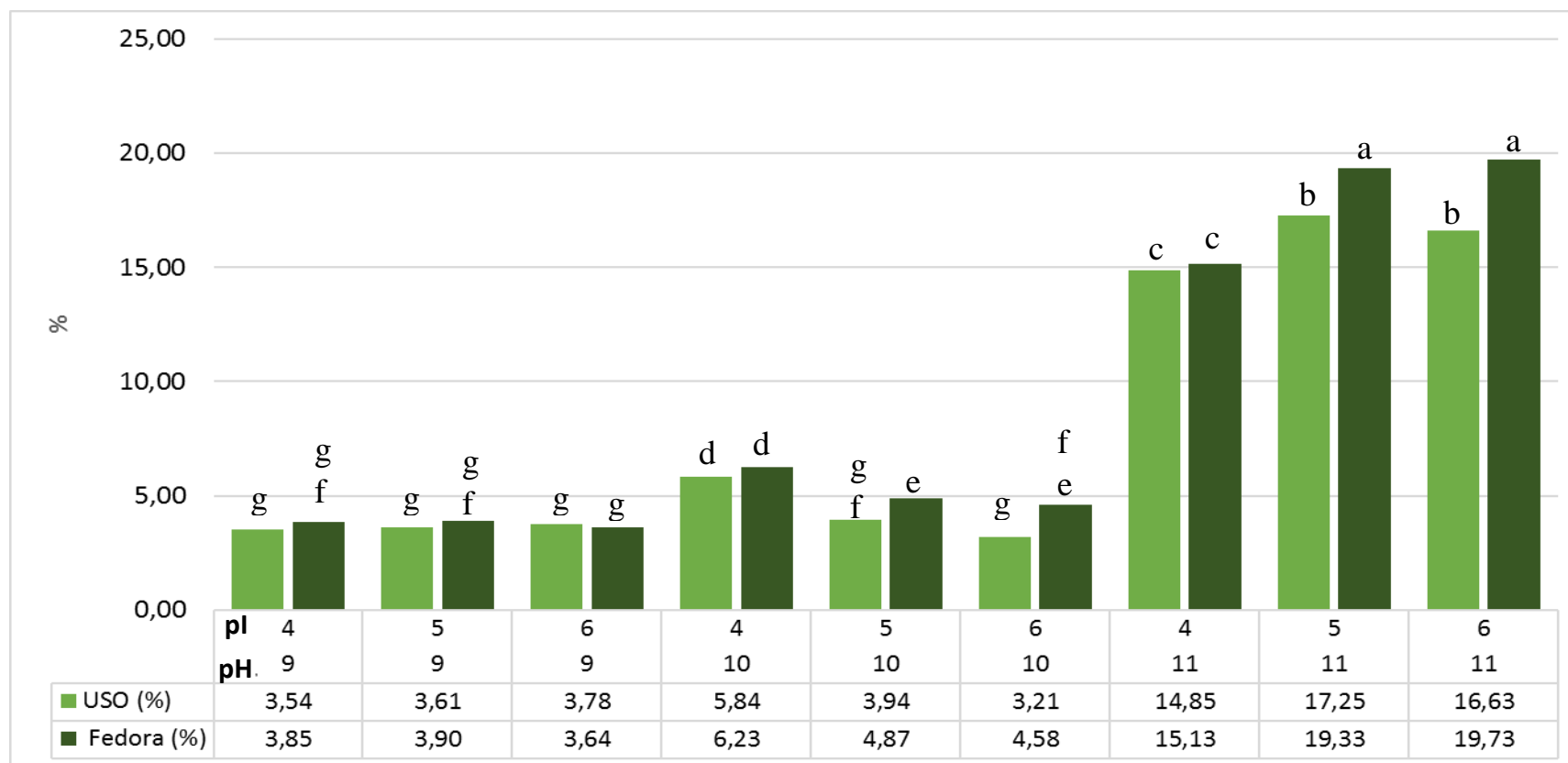
pI= isoelektrický bod; Odlišná písmena nad sloupci v grafu indikují průkazný rozdíl na hladině významnosti  $p < 0,05$  (Fisherův LSD test).

**Obr. 17:** Výtěžnost dusíkatých látek z konopné mouky po vysrážení proteinů v závislosti na použitém pH a isoelektrickém bodu



pI= isoelektrický bod; Odlišná písmena nad sloupci v grafu indikují průkazný rozdíl na hladině významnosti  $p < 0,05$  (Fisherův LSD test).

**Obr. 18:** Hmotnostní výžitek lyofilizovaných vysrážených proteinů v závislosti na pH a isoelektrickém bodu v konopné mouce



pI= isoelektrický bod; Odlišná písmena nad sloupci v grafu indikují průkazný rozdíl na hladině významnosti  $p < 0,05$  (Fisherův LSD test).

**Tab. 15:** ANOVA – vyhodnocení vlivu pH a isoelektrického bodu na obsah dusíkatých látek v sušině vysrážených proteinů

Efekt interakce	Suma čtverců	Stupeň volnosti	Průměr čtverec	F test	p
Absolutní člen	303803,2	1	303803,2	55256,39	0,000000
Odrůda	165,0	1	165,0	30,02	0,000003
Varianta extrakce	6449,5	2	3224,7	586,52	0,000000
Varianta srážení	363,8	2	181,9	33,08	0,000000
Odrůda*varianta extrakce	115,3	2	57,6	10,48	0,000258
Odrůda*varianta srážení	28,5	2	14,2	2,59	0,088884
Varianta extrakce*varianta srážení	349,1	4	87,3	15,87	0,000000
Odrůda*varianta extrakce*varianta srážení	14,1	4	3,5	0,64	0,637024
Chyba	197,9	36	5,5		

Prostřednictvím analýzy rozptylu byl ( $p < 0,05$ ) potvrzen statisticky průkazný vliv pH na výtěžnost sušiny extraktu NL. Působení vlivu těchto interakcí navzájem nebylo statisticky potvrzeno ( $p > 0,05$ ).

**Tab. 16:** ANOVA – vyhodnocení vlivu pH a isoelektrického bodu na výtěžnost dusíkatých látek v sušině vysrážených proteinů

Efekt interakce	Suma čtverců	Stupeň volnosti	Průměr čtverec	F test	p
Absolutní člen	42322,56	1	42322,56	17767,73	0,000000
Odrůda	99,62	1	99,62	41,82	0,000000
Varianta extrakce	28867,48	2	14433,74	6059,53	0,000000
Varianta srážení	251,69	2	125,84	52,83	0,000000
Odrůda*varianta extrakce	117,58	2	58,79	24,68	0,000000
Odrůda*varianta srážení	59,08	2	29,54	12,40	0,000080
Varianta extrakce*varianta srážení	1160,00	4	290,00	121,75	0,000000
Odrůda*varianta extrakce*varianta srážení	75,45	4	18,86	7,92	0,000110
Chyba	85,75	36	2,38		

Prostřednictvím analýzy rozptylu byl ( $p < 0,05$ ) potvrzen statisticky průkazný vliv pH a isoelektrického bodu na výtěžnost dusíkatých látek v sušině vysráženého proteinu.

**Tab. 17:** ANOVA – vyhodnocení vlivu pH a isoelektrického bodu na hmotnostní výtěžek vysráženého proteinu v konopné mouce

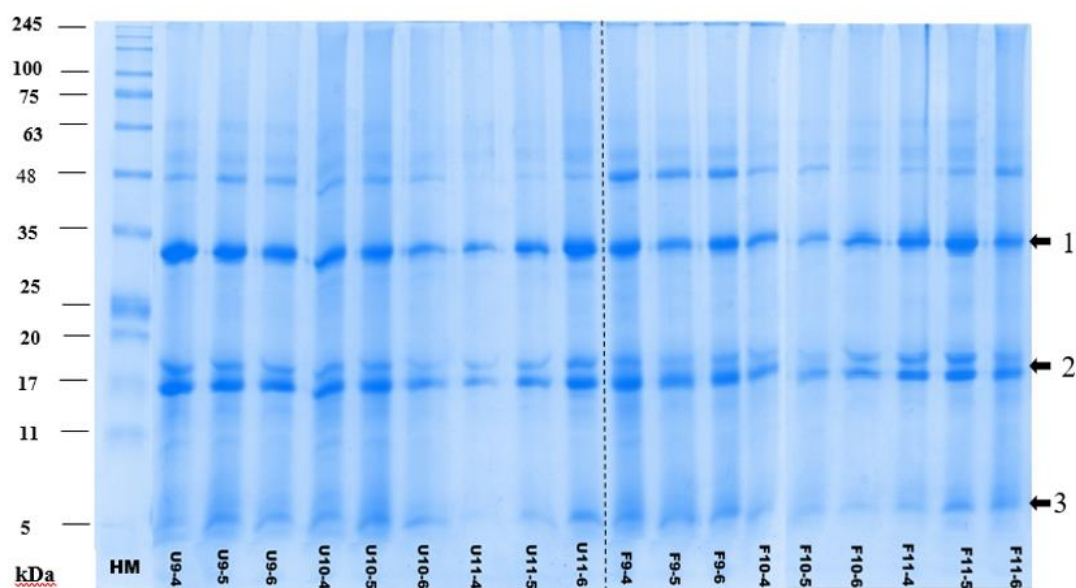
<b>Efekt interakce</b>	<b>Suma čtverců</b>	<b>Stupeň volnosti</b>	<b>Průměr čtverec</b>	<b>F test</b>	<b>p</b>
<b>Absolutní člen</b>	3948,324	1	3948,324	17530,93	0,000000
<b>Odrůda</b>	12,400	1	12,400	55,06	0,000000
<b>Varianta extrakce</b>	2008,547	2	1004,274	4459,07	0,000000
<b>Varianta srážení</b>	3,041	2	1,520	6,75	0,003239
<b>Odrůda*varianta extrakce</b>	6,261	2	3,131	13,90	0,000034
<b>Odrůda*varianta srážení</b>	2,951	2	1,476	6,55	0,003744
<b>Varianta extrakce*varianta srážení</b>	54,103	4	13,526	60,06	0,000000
<b>Odrůda*varianta extrakce*varianta srážení</b>	4,082	4	1,020	4,53	0,004564
<b>Chyba</b>	8,108	36	0,225		

Prostřednictvím analýzy rozptylu byl ( $p < 0,05$ ) potvrzen statisticky průkazný vliv pH a isoelektrického bodu na výtěžek lyofilizovaného vysráženého proteinu v konopné mouce.

### 5.3.2 Elektroforetické analýza proteinových profilů po vysrážení

Po elektroforetické separaci vysráženého proteinu byly na gelu viditelné intenzivní pruhy globulinové frakce (Obr. 19). Lze usoudit, že albumin se dokonale nevysráží a proteinový izolát je téměř tvořen edestinem. Sken gelu byl vyhodnocen v programu Image Lab 6.0 (Bio-Rad). Molekulová hmotnost (MW) albuminu u odrůdy USO 31 byla vizualizována v rozmezí 5,6 – 5,9 kDa. Kyselé podjednotky edestinu měly MW 31,5 – 33,5 kDa a MW bazických podjednotek se pohybovala v rozpětí 13,6 – 15,8 kDa (tab. 18). U odrůdy Fedora 17 byla MW albuminu 5,8 – 6,3 kDa. Kyselé podjednotky edestinu byly vizualizovány v rozmezí 33,1 – 35,7 kDa a u bazických podjednotek byla MW v rozpětí 14 – 18 kDa (tab. 19).

**Obr. 19:** Proteinové profily odrůdy USO 31 a Fedora 17 po vysrážení



HM = hmotnostní marker; U = odrůda USO; F = odrůda Fedora; číslice 9 - 11 značí pH; číslice 4 – 6 značí isoelektrický bod; 1 = kyselá jednotka edestinu; 2 = bazické jednotky edestinu; 3 = proteiny albuminové frakce;

## Vyhodnocení elektroferogramů

**Tab. 18:** Odhad relativního zastoupení jednotlivých podjednotek v rámci proteinových profilů odrůdy USO v programu Image Lab 6.0

Varianta	Molekulová hmotnost [kDa]			Relativní zastoupení bílkovinných pruhů na gelu [%]	
	Albumin	Edestin		Albumin	Edestin
		Kyselé podjednotky	Bazické podjednotky		
U9 - 4	5,6	32,5	13,6 - 15,2	9,7	83,6
U9 - 5	5,8	32,5	13,8 - 15,5	14,3	78
U9 - 6	5,8	32,4	13,8 - 15,2	12,2	70,7
U10 - 4	5,8	31,5	13,5 - 15,1	24,2	69,5
U10 - 5	5,7	32,5	13,8 - 15,4	24	61,8
U10 - 6	5,7	33,1	14 - 15,4	18	65,2
U11 - 4	5,9	33,5	14,2 - 15,6	7,6	84
U11 - 5	5,9	33,5	14,1 - 15,6	10,1	84,4
U11 - 6	5,9	33,2	14 - 15,8	18,5	72

**Tab. 19:** Odhad relativního zastoupení jednotlivých podjednotek v rámci proteinových profilů odrůdy Fedora v programu Image Lab 6.0

Varianta	Molekulová hmotnost [kDa]			Relativní zastoupení bílkovinných pruhů na gelu [%]	
	Albumin	Edestin		Albumin	Edestin
		Kyselé podjednotky	Bazické podjednotky		
<b>F9 - 4</b>	5,9	33,5	14 - 15,9	17,3	60,3
<b>F9 - 5</b>	5,9	34,1	14,3 - 15,9	20,4	58,2
<b>F9 - 6</b>	6,1	34,3	14,5 - 16,1	17,8	62,4
<b>F10 - 4</b>	6,3	35,7	15,3 - 16,4	14,8	75,3
<b>F10 - 5</b>	5,8	33,9	17,4 - 17,9	18,2	71
<b>F10 - 6</b>	6	33,1	17,5 - 18	24,9	66
<b>F11 - 4</b>	5,9	33,4	17,5 - 18	8,1	80,4
<b>F11 - 5</b>	5,9	33,2	17,4 - 18	10,8	78,7
<b>F11 - 6</b>	5,8	32,8	17,4 - 18	18,3	70

## **6. DISKUZE**

### **6.1 Obsah dusíkatých látek v extraktu z konopné mouky**

Obsah dusíkatých látek v rozemletých konopných výliscích (mouce) činil u odrůdy USO 31 29 % a u odrůdy Fedora 17 34%. Callaway (2004) uvádí ve své studii u odrůdy Finola zastoupení dusíkatých látek v konopné mouce o obsahu 33,5 %. Rozdíly jsou logicky způsobené genotypem a typem odrůdy. Mezi další faktory ovlivňující obsah dusíkatých látek v semeni konopí patří hnojení, agrotechnika a klimatické podmínky.

Pomocí BCA metody bylo prokázáno, že v podmínkách kyselého pH se špatně solubilizují konopné proteiny ve srovnání se zásaditým pH. Při hodnotách pH 6 a 7 byl u obou odrůd mírný pokles v obsahu proteinů, který lze přisoudit blízké hodnotě isoeletrického bodu obsažených proteinů, ve kterém vykazují tyto proteiny nejnižší rozpustnost.

Stanovení obsahu dusíkatých látek pomocí modifikované Dumasovy metody prokázalo, že při podmínkách kyselého pH se proteiny extrahují v malém množství. Se zvyšujícím se pH narůstal i obsah dusíkatých látek. Při této metodě nebyl zaznamenán vliv isoelektrických bodů obsažených proteinů na obsah dusíkatých látek.

Malomo a Aluko (2015b) se mimo jiné ve své studii zabývali rozpustností proteinu z konopné mouky při hodnotách pH od 3 do 9, při kterém zjistili nejvyšší rozpustnost v rámci jimi vytvořené stupnice při pH 9 (25 % NL). V mé studii byla sledována rozpustnost do pH 11. Při variantě pH 11 byl výrazně vysoký obsah dusíkatých látek oproti ostatním variantám. Bylo by zajímavé zkoumat i možnosti extrakce dusíkatých látek při vyšším pH. Nevýhodou použití vysokých hodnot pH by však mohlo být narušení struktury proteinů.

### **6.2 Spektra extrahovaných proteinů**

Pomocí SDS-PAGE byly jako nejvíce s největší intenzitou vizualizovány pruhy v alkalické oblasti pH. Proteinové pruhy globulárních proteinů nebyly



detekované u odrůdy USO 31 do hodnoty pH 5 a u odrůdy Fedora 17 do pH 4. Přibližná molekulová hmotnost albuminů se pohybovala od 5 do 10 kDa. Molekulová hmotnost bazických podjednotek edestinu byla 9,4 – 17,4 kDa a kyselých podjednotek edestinu 27,8 – 33,7 kDa.

Raikos a kolektiv (2015) ve své studii uvádí separaci kyselých podjednotek edestinu při molekulové hmotnosti 34 kDa a u bazických podjednotek při 18 – 20 kDa. Rozdílnost molekulových hmotností přisuzují vlivu štěpení disulfidických vazeb vlivem rozpouštědla a doposud nezjištěnými isoformami konopných proteinů, které se mohou lišit i u jednotlivých odrůd.

### **6.3 Obsah dusíkatých látek v proteinovém izolátu**

Obsah dusíkatých látek stanovený Dumasovo metodou se pohyboval od 56,3 – 92,9%. Nejvyšší obsah byl u varianty extrahované při pH 11 a srážené na hodnotu isoelektrického bodu 6. Jak již bylo potvrzeno při extrakci, že nejvíce dusíkatých látek se extrahuje při pH 11, prokazuje i hmotnostní výtěžek vysráženého proteinu, který byl 14,85 – 19,73 g/100 g mouky.

Malomo a Aluko (2015a) také uvádí, že pH narušuje strukturu proteinů a tím snižuje funkční vlastnosti. Protein získaný isoelektrickým srážením, má špatnou rozpustnost. Pro zachování funkčních vlastností se nabízí použití membránové ultrafiltrace, která je šetrná a zajišťuje vysoký výtěžek proteinů. Malomo a Aluko (2015b) porovnávali rozpustnost proteinového koncentráta získaného membránovou ultrafiltrací, isoelektricky sráženého proteinového izolátu a komerční proteinový koncentrát z konopných semen. Nejlepší rozpustnosti (90%) při pH 9 dosáhl koncentrát získaný membránovou ultrafiltrací.

## 6.4 Spektra vysrážených proteinů

Pomocí elektroforetické separace došlo k separaci podjednotek edestinu, které byly intenzivně vizualizovány na elektroferogramech (kyselé podjednotky – 33,1 – 35,7 kDa; bazické podjednotky – 13,6 – 18 kDa). Došlo také k zachycení pruhu o přibližné molekulové hmotnosti 48 kDa, který v žádné studii nebyl přiřazen mezi albuminovou nebo globulinovou frakci. Lze usuzovat, že došlo k nedokonalému vysrážení albuminy a tím pádem proteinový izolát získaný pomocí isoelektrické precipitace je téměř tvořen edestinem.

Pro detailnější separaci a analýzu spekter konopných proteinů by kromě SDS-PAGE bylo vhodné využít pokročilejší metody identifikace proteinových frakcí a dílčích proteinů, například 2D elektroforézu a techniky hmotnostní spektrometrie.

## 7. ZÁVĚR

Na základě výsledků získaných v rámci řešení této práce bylo možno vyvodit následující závěry:

- Nejvyšší výtěžnosti proteinů získané extrakcí z konopné mouky bylo dosaženo při hodnotě pH 11. Tato varianta měla nejvyšší zastoupení proteinů a nejvyšší hmotnostní výtěžek extraktu u obou sledovaných odrůd. Zastoupení proteinů u odrůdy USO 31 57 % a u odrůdy Fedora 17 71 %.
- Pro srážení proteinů z extraktu byly zvoleny pro větší variabilitu varianty o hodnotách pH 9, 10 a 11 a sráženy k hodnotám blízkých isoelektrickému bodu (4, 5 a 6). Z těchto možností se opět potvrdila jako nejlepší varianta při hodnotě pH 11, která byla srážena na hodnoty pH ekvivalentním k isoelektrickým bodům 5 a 6.
- Spektrum extrahovaných proteinů při různých hodnotách pH získané SDS-PAGE analýzou, vykazovalo variabilitu mezi kyselým a bazickým pH. Globulinová frakce u odrůdy USO 31 byla viditelná od pH 6 a u odrůdy Fedora 17 od pH 5. Globulinová frakce (edestin) se rozdělila na kyselé a bazické podjednotky. Přibližná molekulová hmotnost bazických podjednotek se pohybovala v rozmezí 9,4 – 17,4 kDa a kyselých podjednotek 27,8 – 33,7 kDa. Molekulová hmotnost albuminové frakce se pohybovala od 5 do 10 kDa. Na základě rozpětí molekulových hmotností proteinů lze říci, že došlo ke kvalitativním změnám narušením disulfidických vazeb. Pro detailnější separaci by bylo vhodné použít 2D elektroforézu doplněnou hmotnostní spektrometrií.
- Proteinový izolát byl podroben elektroforetické separaci. Pruhy globulinové frakce (edestinu) byly intenzivnější než pruhy albuminové frakce. Jelikož se zvolené varianty extrakce nacházely v podmínkách alkalických hodnot pH, byly přibližné molekulové hmotnosti vyrovnanější. Molekulová hmotnost albuminové frakce se pohybovala v rozmezí 5,6 – 6,3 kDa. Podjednotky

bazických podjednotek edestinu měly molekulovou hmotnost 13,6 – 18 kDa a molekulová hmotnost kyselých podjednotek byla od 31,5 – 35,7 kDa.

Poznatky, kterých bylo v této práci dosaženo, by bylo vhodné z hlediska výzkumu rozšířit o výsledky extrakce do pH 14 a zjistit vliv extrakce s úpravou pH na funkční vlastnosti proteinů. Taktéž by bylo přínosné zahrnout do souboru hodnocení více odrůd konopí setého.

## 8. POUŽITÁ LITERATURA

ALBERTS, B., A. JOHNSON, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS a P. WALTER. *Molecular Biology of the Cell*. 4. New York: Garland Science, 2002, 114-160. ISBN 10:0-8153-3218-1.

AMADUCCI, S., D. SCORCIA, F.H. LIU, Q. ZHANG, H. GUO, G. TESTA a S.L. CONSENTINO. Key cultivation techniques for hemp in Europe and China. *Industrial Crops and Products*. 2015, 68: 2-16.

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

BÍLKOVÁ, K. a B. KRÁLOVÁ. *Izolace biomakromolekul*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1997, 206. ISBN 80-708-0288-X.

BROWN, P. H., A. BALBO a P. SCHUCK. Characterizing Protein-Protein Interactions by Sedimentation Velocity Analytical Ultracentrifugation. *Current Protocols in Immunology* 2008, 1-18.

CALLAWAY, J. C. *Hempseed as a nutritional resource: An overview*. *Euphytica*. 2004, 140, 65-72. ISSN 14-2336.

DAY, L. Proteins from land plants—potential resources for human nutrition and food security. *Trends in Food Science & Technology*, 2013, 32.1: 25-42.

GABRIELOVÁ, H. *Konopí - biomasa pro život*. Chvaleč: Konopa, 2007, 26. ISBN 978-80-254-1149-0.

GEIWITZ, J. *THC in Hemp Foods and Cosmetics: The Appropriate Risk Assessment*. 2001 [cit. 2017-02-25]. Dostupné z: <http://www.drugpolicy.org/docUploads/HempReport.pdf>

JAIN, A., A. KUMAR a D. M. SALUNKE. Crystal structure of the vicilin from *Solanum melongena* reveals existence of different anionic ligands in structurally similar pockets. *Scientific reports*, 2016, 6.

JAIN, J.L., S. JAIN a N. JAIN. *Fundamentals of biochemistry: for university and college students in India and abroad*. New Delhi: S. Chand, 2005, 132-229. ISBN 81-219-2453-7.

JUNG, S., D. A. RICKERT, N. A. DEAK, E. D. ALDIN, J. RECKNOR, L. A. JOHNSON a P. A. MURPHY. Comparison of Kjeldahl and Dumas methods for determining protein contents of soybean products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2003, 1169-1173.

KÁŠ, J., M. KODÍČEK a O. VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-708-0586-2.

KERESE, I. *Methods of protein analysis*. Budapest: Akademiai Kiado, 1984, 371 s. ISBN 96-305-3195-X.

KLVAŇOVÁ, L. a M. RUMAN. *Konopí - staronový přítel člověka. Zelená pumpa - Chraštické ekocentrum: o.s. Konopa*, 2008. ISBN 978-80-254-1825-3.

KOTYZA, P. *Think Together 2012: Ekonomika pěstování technického konopí v ČR: Případová studie Rakovnícka*. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, 2012. ISBN 978-80-213-2275-2.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227: 680-685

*Len a konopí: situační a výhledová zpráva*. Praha: Ministerstvo zemědělství ČR, 2006, 6: 40. ISBN 8070845201.

LESON, G. a W. RUSSELL. The Amazing Benefits of Hemp Seeds - Too Bad the DEA Is Curtailing the Industry: Unlike fish and flax oil supplements and assorted protein powders - hemp can taste really good. In: *Alternet* [online]. [cit. 2017-03-12].

Dostupné z: <http://www.alternet.org/food/amazing-benefits-hemp-seeds-too-bad-dea-curtailing-industry>

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

MALOMO, S. A. a R. E. ALUKO. Conversion of a low protein hemp seed meal into a functional protein concentrate through enzymatic digestion of fibre coupled with membrane ultrafiltration. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2015b, 151 – 159.

MALOMO, S.A. *Structure-function properties of hemp seed proteins and protein-derived acetylcholinesterase-inhibitory peptides*. Manitoba, 2015.

MALOMO, S. A., R. HE, a R. E. ALUKO. Structural and functional properties of hemp seed protein products. *Journal of food science*, 2014, 79.8: C1512-C1521

MIOVSKÝ, M., T. BLAHA, M. DĚDIČOVÁ, J.DVOŘÁČEK, R. GABRHELÍK, H. GABRIELOVÁ, H. GAJDOŠÍKOVÁ, O. HANUŠ, J. HORÁČEK, P. KRMENČÍK, P. KUBŮ, L. MIOVSKÁ, A. B. IZŠTĚCJÁ.NERADOVÁ, J.M. NERAD, J. RADIMECKÝ, M. RUMAN, V. SIVEK, J. ŠEJVL, A. ŠULCOVÁ, J. VACEK, J. VOPRAVIL, F. VOREL, T. ZÁBRANSKÝ. *Konopí a konopné drogy: adiktologické kompendium*. Praha: Grada, 2008, 533. ISBN 978-802-4708-652.

MOUDRÝ, J., J. BÁRTA, V. BÁRTOVÁ, J. BUBENÍK, J. DIVIŠ, R. DOSTÁLOVÁ, M. HÝBL, P. KONVALINA, M. PETERKA, J. PEXOVÁ-KALINOVÁ, A. PONÍŽIL, M. SEIDENGLANZ, Z. STRAŠIL, P. ŠMIROUS, M. ŠTOLCOVÁ, A. VACULÍK. *Alternativní plodiny*. Praha: Profi Press, 2011, 142. ISBN 978-80-86726-40-3.

NADATHUR, S. R., J. P. D. WANASUNDDARA a L. SCANLIN. *Sustainable Protein Sources*. Academic Press, 2017. ISBN 978-012-8027-783.

NAKAI, S. a H. W. MODLER. *Food proteins: Properties and characterization*. New York: VCH, 1996, 544. ISBN 15-608-1691-0.

NIIR BOARD OF CONSULTANTS & ENGINEERS. *Handbook of fine chemicals, vitamins, amino acids and proteins*. Delhi: National Institute of Industrial Research, 2005, 608. ISBN 81-866-2396-5.

OSBURN, L. Hemp seed: the most nutritionally complete food source in the world. *Hemp Line Journal*. 1992, 1: 14-15.

PARK, S. K., J. B. SEO a M. Y. LEE. Proteomic profiling of hempseed proteins from Cheungsam. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. Korea, 2012, 1824.2: 374-382.

PEARSALL, W. H. a J. EWING. *The isoelectric points of some plant proteins*. *Biochemical Journal*, 1924, 330-339.

PEČ, P., M. ŠEBELA, L. LUHOVÁ, I. FRÉBORT, L. ZAJONCOVÁ a M. PETŘIVALSKÝ. *Laboratorní cvičení z biochemie*. 2. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2004, 99 s. ISBN 80-244-0912-7.

POUHLÝ, J. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008, 205 s. ISBN 978-80-7080-674-6.

ROGERS, K. Rhodopsin: *Visual purple*. In: *Encyclopaedia Britannica* [online]. Canada, 2015 [cit. 2017-03-03]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/rhodopsin>

RUMAN, Michal. *Cannabis konopí: Průvodce světem univerzální rostliny*. Praha: Malý princ, 2014, 306 s. ISBN 978-80-87754-13-9.

RUSSO, R. a R. REGGIANI. Evaluation of Protein Concentration, Amino Acid Profile and Antinutritional Compounds in Hempseed Meal from Dioecious and Monoecious Varieties. *American Journal of Plant Sciences*. Milano: Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria, 2015, 6: 14-22

STRÁNSKÁ, K. a M. ANDĚLOVÁ. *Referenční hodnoty pro příjem živin*. V ČR 1. vyd. Praha: Společnost pro výživu, 2011, 192 s. ISBN 9788025469873.



TANG, C. H., X.S. WANG a X. Q. YANG. Enzymatic hydrolysis of hemp (*Cannabis sativa L.*) protein isolate by various proteases and antioxidant properties of the resulting hydrolysates. *Food Chemistry*. 2009, 114.4: 1484-1490.

TANG, C.H., Z. TEN, X.S. WANG a X. Q. YANG. *Physicochemical and Functional Properties of Hemp (Cannabis sativa L.) Protein Isolate*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, 54. 23: 8945-8950.

TANG, Q. N. *Protein concentrates and isolates, and processes for the production thereof*. U.S. Patent No 8,529,981, 2013.

TEH, S.S., A.E.D.A. BEKHIT, A. CARNE a J. BIRCH. 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*. New Zealand, 2016, (203), 199-06.

THEUER, R. *Fat compositions for infant formula and methods therefor*. U.S. Patent Application No 10/464,375, 2003.

VALÍČEK, P. *Léčivé rostliny a omamné drogy*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003. ISBN 80-715-7725-1.

VANĚK, O. a K. BEZOUŠKA. Analytická ultracentrifugace a její využití v biochemické laboratoři. *Chemické listy*. 2010, 104: 1155-1162.

VELÍŠEK, J. a J. HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, 580 s. ISBN 978-80-86659-15-2.

VERBSKY, M.L. a E.J. RICHARDS. Chromatin remodeling in plants. *Current Opinion in Plant Biology* [online]. USA, 2001, 4. 6: 494-500.

WALKER, J. M. *Basic protein and peptide protocols*. Totowa: Humana Press, 1994, 5-8. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), v. 32. ISBN 08-960-3269-8.

WANG, H., Y. CHEN, Y. HUA, X. KONG a C. ZHANG. Effects of Phytase-Assisted Processing Method on Physicochemical and Functional Properties of Soy Protein Isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014, 62. 45: 10989-10997.

WANG, Xian-Sheng, Chuan-He TANG, Xiao-Quan YANG a Wen-Rui GAO. Characterization, amino acid composition and in vitro digestibility of hemp (*Cannabis sativa* L.) proteins. *Food Chemistry* [online]. China, 2008, 107. 1: 11-18.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Codex Alimentarius: Cereals, Pulses, Legumes and Vegetable Proteins: CODEX GENERAL STANDARD FOR SOY PROTEIN PRODUCTS*. Rome, 2007, 86 - 89. ISBN 978-92-5-105842-8.

YIN, S.W., CH.H. TANG, Q.B. WEN a X.Q. YANG. Functional and structural properties and in vitro digestibility of acylated hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolates. *International Journal of Food Science and Technology*. China, 2009, 44: 2653-2661.

ZAYAS, J. F. Introduction. In: *Functionality of proteins in food*. Springer Berlin Heidelberg, 1997. 1-5.

### **Ostatní zdroje:**

ANONYM 1. *Správné skladování konopných semínek* [online]. [cit. 2017-12-26]. Dostupné z: <http://www.zelenazeme.cz/konopny-magazin/256-spravne-skladovani-konopnych-seminek>

ANONYM 2. *Konopná semena* [online]. [cit. 2017-02-12]. Dostupné z: <http://www.gurmanland.cz/konopna-semena/>

ANONYM 3. Hemp nutrition: HEMP CAN REPAIR DNA. In: *Ergogenics Nutrition* [online]. Canada, 2014 [cit. 2017-04-01]. Dostupné z: <http://ergogenicsnutrition.com/blog/hemp-can-repair-dna/>

BRYNDOVÁ, B. *Není konopí jako konopí* [online]. 2015 [cit. 2017-03-17]. Dostupné z: <http://disuk.cz/bushka-bryndova-neni-konopi-jako-konopi/>

Elektroforéza: SDS elektroforéza. *Biochemie.sweb* [online]. [cit. 2017-03-23]. Dostupné z: <http://biochemie.sweb.cz/x/metody/elektroforeza.htm>

*Elementar.de: Dumas – A well-established method for N/protein analysis* [online]. Germany: Elementar Analysensysteme, 2016 [cit. 2017-03-24]. Dostupné z: <http://www.elementar.de/en/products/nprotein-analysis/rapid-n-exceed.html>

Food Composition Databases Show Foods: National Nutrient Database for Standard Reference Release 28. *United States Department of Agriculture: Agricultural Research Service* [online]. [cit. 2017-02-12]. Dostupné z: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/3716?fgcd=&manu=&lfacet=&format=&count=&max=50&offset=&sort=default&order=asc&qlookup=flaxseeds&ds=&qt=&qp=&qa=&qn=&q=&ing=>

Hemp varieties: EU certified hemp sowing seed. *Ihempfarms: Sowing seed commodities solutions* [online]. [cit. 2017-03-19]. Dostupné z: <http://www.ihempfarms.com/>

*Vyhláška č. 225/2008 Sb., kterou se stanoví požadavky na doplňky stravy a na obohacování potravin: Příloha č.5.: Doporučené denní dávky (DDD) vitaminů a minerálních látek.* 71/2008. Dostupné také z: <http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/ostatni/100065067.html>

## 9. PŘÍLOHY

Tab. 20: Výsledky stanovení extrahovaných proteinů po lyofilizaci BCA metodou

Varianta	Konc. [µg/ml] průměr	Proteiny [g/100g] mouky	Varianta	Konc. [µg/ml] průměr	Proteiny [g/100g] mouky
U3A	1243,08	11,05	F3A	1125,20	10,86
U3B	1203,11	10,14	F3B	1178,89	11,17
U3C	1385,38	11,68	F3C	1186,66	11,44
U4A	1478,60	12,29	F4A	1436,34	13,83
U4B	1484,57	12,44	F4B	1346,43	12,66
U4C	1377,69	11,44	F4C	1382,65	13,13
U5A	1787,80	13,17	F5A	2024,77	18,13
U5B	1811,31	15,88	F5B	1941,11	16,94
U5C	1759,41	14,97	F5C	2041,16	18,29
U6A	2324,05	12,74	F6A	2595,51	15,93
U6B	2316,86	12,70	F6B	2516,38	16,63
U6C	2242,69	12,53	F6C	2560,66	17,12
U7A	2465,21	13,29	F7A	2625,92	16,87
U7B	2498,84	13,31	F7B	2724,67	18,57
U7C	2570,93	14,18	F7C	2705,91	17,37
U8A	2698,36	19,18	F8A	2659,34	18,99
U8B	2628,07	17,17	F8B	2630,52	20,49
U8C	2664,44	16,44	F8C	2682,19	21,30
U9A	2863,74	27,54	F9A	2767,15	26,27
U9B	2976,30	25,40	F9B	2704,40	25,03
U9C	2957,75	26,05	F9C	2851,60	28,38
U10A	2998,94	43,80	F10A	3075,91	38,74
U10B	3061,76	24,49	F10B	3112,14	35,17
U10C	3031,28	32,13	F10C	3180,06	36,47
U11A	3083,61	57,35	F11A	3204,42	74,65
U11B	3114,08	55,17	F11B	3150,30	70,63
U11C	3081,02	58,43	F11C	3123,57	67,29

U = odrůda USO 31; F = odrůda Fedora 17; číslice značí pH (3 – 11); A, B, C = varianta opakování

Tab. 21: Výsledky stanovení dusíkatých látek extrahovaných proteinů po lyofilizaci Dumasovou metodou + korekce obsahu látek upravujících pH

Varianta	N [%]	NL [%]	NL po korekci [%]	Varianta	N [%]	NL [%]	NL po korekci [%]
U3A	1,66	10,40	10,18	F3A	2,93	18,28	17,84
U3B	1,90	11,85	11,60	F3B	2,99	18,71	18,26
U3C	1,80	11,22	10,98	F3C	2,84	17,72	17,30
U4A	2,16	13,50	13,30	F4A	2,52	15,77	15,52
U4B	2,12	13,24	13,05	F4B	2,82	17,64	17,36
U4C	1,80	11,28	11,12	F4C	2,81	17,59	17,31
U5A	2,36	14,74	14,64	F5A	3,27	20,44	20,29
U5B	2,49	15,57	15,46	F5B	3,27	20,46	20,32
U5C	2,42	15,12	15,01	F5C	3,20	20,00	19,86
U6A	3,03	18,96	18,93	F6A	4,07	25,44	25,39
U6B	2,97	18,53	18,50	F6B	4,06	25,35	25,30
U7A	3,68	22,99	22,98	F6C	4,10	25,63	25,58
U7B	3,64	22,72	22,70	F7A	4,69	29,33	29,30
U8A	5,12	31,98	31,87	F7B	4,89	30,55	30,53
U8B	4,85	30,30	30,20	F7C	4,54	28,37	28,35
U8C	4,87	30,46	30,35	F8A	5,55	34,68	34,57
U9A	6,85	42,84	42,60	F8B	5,46	34,12	34,01
U9B	6,28	39,22	39,00	F8C	5,17	32,30	32,20
U9C	6,31	39,42	39,19	F9A	6,00	37,47	37,25
U10A	8,25	51,54	51,08	F9B	6,00	37,48	37,26
U10B	7,98	49,84	49,39	F9C	6,34	39,65	39,42
U10C	7,87	49,21	48,77	F10A	7,81	48,84	48,38
U11A	9,83	61,46	60,58	F10B	7,90	49,36	48,90
U11B	10,40	64,98	64,04	F10C	8,15	50,91	50,44
U11C	10,03	62,70	61,79	F11A	11,45	71,56	70,43
				F11B	11,04	69,01	67,93
				F11C	11,27	70,43	69,32

U = odrůda USO 31; F = odrůda Fedora 17; číslice značí pH (3 – 11); A, B, C = varianta opakování; NL = dusíkaté látky

Tab. 22: Gravimetrické vyhodnocení extrahovaných proteinů po lyofilizaci

Varianta	m extraktu	Výtěžek extraktu [%]	Výtěžek extraktu po korekci [%]	Varianta	m extraktu	Výtěžek extraktu [%]	Výtěžek extraktu po korekci [%]
U3A	0,2222	11,11	9,01	F3A	0,2414	12,06	9,68
U3B	0,2107	10,53	8,44	F3B	0,2369	11,84	9,45
U3C	0,2108	10,54	8,44	F3C	0,241	12,05	9,66
U4A	0,2078	10,39	8,97	F4A	0,2408	12,04	10,45
U4B	0,2095	10,47	9,05	F4B	0,2351	11,75	10,17
U4C	0,2076	10,38	8,96	F4C	0,2374	11,87	10,28
U5A	0,1842	9,21	8,51	F5A	0,2238	11,19	10,48
U5B	0,2192	10,96	10,26	F5B	0,2182	10,91	10,20
U5C	0,2128	10,64	9,94	F5C	0,224	11,20	10,49
U6A	0,137	6,85	6,70	F6A	0,1534	7,67	7,49
U6B	0,1371	6,85	6,71	F6B	0,1652	8,26	8,08
U6C	0,1397	6,98	6,84	F6C	0,1671	8,35	8,17
U7A	0,1348	6,74	6,66	F7A	0,1606	8,03	7,95
U7B	0,1332	6,66	6,58	F7B	0,1704	8,52	8,44
U7C	0,1379	6,90	6,82	F7C	0,1605	8,02	7,94
U8A	0,1777	8,88	8,54	F8A	0,1785	8,92	8,60
U8B	0,1634	8,17	7,83	F8B	0,1947	9,73	9,41
U8C	0,1543	7,71	7,37	F8C	0,1985	9,92	9,60
U9A	0,2405	12,02	11,46	F9A	0,2373	11,86	11,28
U9B	0,2134	10,67	10,11	F9B	0,2314	11,57	10,99
U9C	0,2202	11,01	10,45	F9C	0,2488	12,44	11,86
U10A	0,3652	18,26	17,36	F10A	0,3149	15,74	14,81
U10B	0,2	10,00	9,10	F10B	0,2825	14,12	13,19
U10C	0,265	13,25	12,35	F10C	0,2867	14,33	13,40
U11A	0,465	23,25	21,81	F11A	0,5824	29,12	27,55
U11B	0,443	22,15	20,71	F11B	0,5605	28,03	26,46
U11C	0,4741	23,70	22,26	F11C	0,5386	26,92	25,35

U = odrůda USO 31; F = odrůda Fedora 17; číslice značí pH (3 – 11); A, B, C = varianta opakování

Tab. 23: Výsledky stanovení dusíkatých látek isoelektricky sráženého proteinového izolátu po lyofilizaci Dumasovo metodou

<b>varianta</b>	<b>N [%]</b>	<b>NL [%]</b>	<b>varianta</b>	<b>N [%]</b>	<b>NL [%]</b>
<b>U9 - 4A</b>	10,42	65,15	<b>F9 - 4A</b>	10,08	62,98
<b>U9 - 4B</b>	9,70	60,61	<b>F9 - 4B</b>	9,32	58,26
<b>U9 - 4C</b>	9,91	61,92	<b>F9 - 4C</b>	9,37	58,56
<b>U9 - 5A</b>	10,21	63,82	<b>F9 - 5A</b>	9,93	62,08
<b>U9 - 5B</b>	10,47	65,46	<b>F9 - 5B</b>	9,79	61,16
<b>U9 - 5C</b>	10,15	63,43	<b>F9 - 5C</b>	9,97	62,32
<b>U9 - 6A</b>	9,89	61,78	<b>F9 - 6A</b>	9,35	58,41
<b>U9 - 6B</b>	10,03	62,69	<b>F9 - 6B</b>	8,74	54,65
<b>U9 - 6C</b>	9,63	60,17	<b>F9 - 6C</b>	8,94	55,87
<b>U10 - 4A</b>	11,62	72,65	<b>F10 - 4A</b>	11,32	70,75
<b>U10 - 4B</b>	12,69	79,31	<b>F10 - 4B</b>	10,75	67,17
<b>U10 - 4C</b>	12,00	74,98	<b>F10 - 4C</b>	10,17	67,81
<b>U10 - 5A</b>	12,36	77,26	<b>F10 - 5A</b>	10,24	76,35
<b>U10 - 5B</b>	12,41	77,54	<b>F10 - 5B</b>	10,30	69,05
<b>U10 - 5C</b>	13,05	81,54	<b>F10 - 5C</b>	10,37	75,91
<b>U10 - 6A</b>	12,68	79,24	<b>F10 - 6A</b>	10,44	74,89
<b>U10 - 6B</b>	13,93	87,08	<b>F10 - 6B</b>	10,50	76,03
<b>U10 - 6C</b>	14,08	88,01	<b>F10 - 6C</b>	10,57	75,62
<b>U11 - 4A</b>	13,13	82,08	<b>F11 - 4A</b>	10,63	82,51
<b>U11 - 4B</b>	13,07	81,68	<b>F11 - 4B</b>	10,70	75,94
<b>U11 - 4C</b>	13,15	82,19	<b>F11 - 4C</b>	10,76	80,16
<b>U11 - 5A</b>	14,41	90,04	<b>F11 - 5A</b>	10,83	89,81
<b>U11 - 5B</b>	13,87	86,67	<b>F11 - 5B</b>	10,90	91,27
<b>U11 - 5C</b>	14,14	88,36	<b>F11 - 5C</b>	10,96	92,59
<b>U11 - 6A</b>	14,66	91,62	<b>F11 - 6A</b>	11,03	93,09
<b>U11 - 6B</b>	14,83	92,68	<b>F11 - 6B</b>	11,09	91,65
<b>U11 - 6C</b>	15,10	94,41	<b>F11 - 6C</b>	11,16	93,06

U = odrůda USO 31; F = odrůda Fedora 17; číslice značí pH (3 – 11); A, B, C = varianta opakování;  
NL = dusíkaté látky

Tab. 24: Gravimetrické vyhodnocení isoelektricky sráženého proteinového izolátu po lyofilizaci

varianta	m proteinu [g]	Výtěžek proteinu [%]	varianta	m proteinu [g]	Výtěžek proteinu [%]
U9 - 4A	0,1572	3,93	F9 - 4A	0,1453	3,63
U9 - 4B	0,1169	2,92	F9 - 4B	0,1394	3,48
U9 - 4C	0,1506	3,76	F9 - 4C	0,1772	4,43
U9 - 5A	0,1444	3,61	F9 - 5A	0,1364	3,41
U9 - 5B	0,1552	3,88	F9 - 5B	0,1643	4,11
U9 - 5C	0,1333	3,33	F9 - 5C	0,1674	4,18
U9 - 6A	0,1533	3,83	F9 - 6A	0,1545	3,86
U9 - 6B	0,1368	3,42	F9 - 6B	0,1426	3,56
U9 - 6C	0,1631	4,08	F9 - 6C	0,1395	3,49
U10 - 4A	0,2671	6,68	F10 - 4A	0,2343	5,86
U10 - 4B	0,174	4,35	F10 - 4B	0,2575	6,44
U10 - 4C	0,2603	6,51	F10 - 4C	0,2563	6,41
U10 - 5A	0,1445	3,61	F10 - 5A	0,1869	4,67
U10 - 5B	0,1659	4,15	F10 - 5B	0,2106	5,26
U10 - 5C	0,1622	4,05	F10 - 5C	0,1875	4,69
U10 - 6A	0,1539	3,85	F10 - 6A	0,1856	4,64
U10 - 6B	0,1228	3,07	F10 - 6B	0,1969	4,92
U10 - 6C	0,1086	2,71	F10 - 6C	0,1676	4,19
U11 - 4A	0,6013	15,03	F11 - 4A	0,6216	15,54
U11 - 4B	0,577	14,42	F11 - 4B	0,5924	14,81
U11 - 4C	0,6042	15,10	F11 - 4C	0,6021	15,05
U11 - 5A	0,6856	17,14	F11 - 5A	0,7606	19,01
U11 - 5B	0,6926	17,31	F11 - 5B	0,779	19,47
U11 - 5C	0,6926	17,31	F11 - 5C	0,7807	19,51
U11 - 6A	0,6789	16,97	F11 - 6A	0,8077	20,19
U11 - 6B	0,6634	16,58	F11 - 6B	0,7761	19,40
U11 - 6C	0,6531	16,33	F11 - 6C	0,7838	19,59

U = odrůda USO 31; F = odrůda Fedora 17; číslice značí pH (3 – 11); A, B, C = varianta opakování



Obr. 20: Konopné semeno



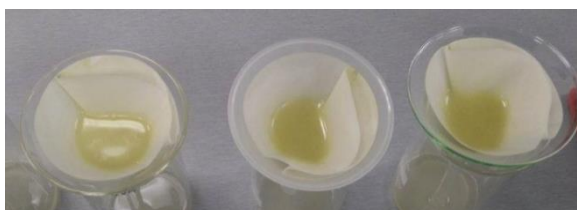
Obr. 21: konopné výlisky



Obr. 22: Mlýn s namletými výlisky



Obr. 23: Filtrace supernatantu s extrahovanými proteiny



Obr. 24: vlevo nevysrážený extrakt, vpravo po isoelektrickém srážení



Obr. 25: odstředěný precipitát

