



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ**

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**KOMPLEXNÍ ZPRACOVÁNÍ TECHNICKÉHO KONOPÍ A  
VYUŽITÍ IZOLOVANÝCH FRAKCÍ**

COMPLEX PROCESSING OF TECHNICAL HEMP AND APPLICATION OF ISOLATED FRACTIONS

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Bc. Darina Kohútová**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

**BRNO 2021**

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1629/2020 Akademický rok: 2020/21  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Bc. Darina Kohútová**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

### Název diplomové práce:

Komplexní zpracování technického konopí a využití izolovaných frakcí

### Zadání diplomové práce:

- 1– Přehled – složení technického konopí, zpracování, produkty a jejich aktivní látky.
2. Optimalizace postupů frakcionace rostliny technického konopí a analýza aktivních složek
3. Stanovení aktivních složek a biologických účinků vybraných frakcí ze zpracování konopí.
4. Vyhodnocení a diskuse výsledků

### Termín odevzdání diplomové práce: 6.8.2021:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. Darina Kohútová  
student(ka)

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Konopa je rastlina s obsahom mnohých aktívnych látok a širokým využitím v priemysle. Najvýznamnejšími oblasťami využitia je potravinárstvo, farmaceutický, textilný a kozmetický priemysel. Táto diplomová práca sa zaoberala charakterizáciou frakcií konopy, ktoré vznikajú pri jej spracovaní a ich možnými aplikáciami. Teoretická časť bola zameraná na opis rastliny, jej chemického zloženia a priblížením aktívnych látok, ktoré konopa obsahuje. Ďalej bolo zhrnuté jej priemyselné využitie, postup spracovania konopy a súčasné aplikácie jednotlivých frakcií. V rámci experimentálnej časti boli analyzované konopné frakcie z pohľadu obsahu výživových látok. Taktiež boli pripravené extrakty s použitím troch rozpúšťadiel – hexán, 70% etanol a destilovaná voda, ktoré boli porovnané na základe výťažnosti fenolických látok, flavonoidov, antioxidantov, chlorofylov a kanabinoidov. Pri hexánových a etanolových extraktoch boli analyzované aj antimikrobiálne účinky. Vedľajšie produkty spracovania konopy boli využité do niektorých skríningových aplikácií – biotechnologickej, kozmetickej a potravinárskej. Z výsledkov práce plyní, že extrakt so 70% etanolom mal najvyšší obsah aktívnych látok. Z frakcií konopy mali najvyšší obsah aktívnych látok konopné trichómy a kvety odrody Fedora. Vedľajšie konopné produkty majú potenciál stať sa hodnotnými substrátmi pre kultiváciu kvasiniek. Plet'ový peeling s obsahom konopnej múky ako abrazívnej zložky mal priaznivé výsledky a bol prijateľný pre spotrebiteľov, rovnako ako pripravená raw tyčinka s obsahom konopnej múky, ktorá bola podľa hodnotiteľov na porovnateľnej úrovni ako komerčne dostupné raw tyčinky s konopným proteínom.

## **KLÚČOVÉ SLOVÁ**

Technické konope, kanabinoidy, vedľajšie produkty, senzorická analýza

## **ABSTRACT**

Hemp is a plant containing many active substances and it is widely used in industry. The most common applications are the food, pharmaceutical, textile and cosmetics industries. This diploma thesis dealt with the characterization of hemp fractions, which are created during hemp processing and their potential applications. The theoretical part was focused on the description of the plant, its chemical composition and the research of the active substances in hemp. Also, its industrial use, the technique of hemp processing and the current applications of individual fractions were summarized. In the experimental part, hemp fractions were analysed in terms of nutrient content. Hemp extracts were prepared using three solvents - hexane, 70% ethanol and distilled water, which were compared based on the extraction yield of polyphenols, flavonoids, antioxidants, chlorophylls and cannabinoids. Antimicrobial effects were analysed in hexane and ethanol extracts. By-products of hemp processing were used in some screening application in biotechnology, cosmetics and nutrition. The results show that the extract with 70% ethanol had the highest content of active substances. From the hemp fractions, hemp trichomes and Fedora flowers had the highest content of active substances. Cannabis by-products have the potential to become valuable substrates for yeast cultivation. Face scrub containing hemp flour as an abrasive component had favourable results and was acceptable to consumers, as was the prepared hemp flour raw bar, which was evaluated to be comparable to commercially available hemp protein raw bars.

## **KEYWORDS**

Hemp, cannabinoids, by-products, sensory analysis

KOHÚTOVÁ, Darina. *Komplexní zpracování technického konopí a využití frakcí*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131822>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.

## **Prehlásenie**

.....  
podpis študentky

## **PodĎakovanie**

Rada by som sa poďakovala vedúcej tejto práce prof. RNDr. Ivane Márovej, CSc. za odbornú pomoc a motiváciu, mojej konzultantke Ing. Monike Wikarskej za inšpiráciu, trpezlivosť a ochotu pomôcť. V neposlednom rade by som chcela spomenúť moju rodinu, bez ktorej by som nemohla študovať.

## **OBSAH**

|                                                                 |           |
|-----------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>OBSAH.....</b>                                               | <b>4</b>  |
| <b>1 ÚVOD .....</b>                                             | <b>7</b>  |
| <b>2 TEORETICKÁ ČASŤ .....</b>                                  | <b>8</b>  |
| 2.1 Konopa siata .....                                          | 8         |
| 2.1.1 Botanická charakteristika .....                           | 8         |
| 2.2 Biologicky aktívne látky konopy siatej .....                | 8         |
| 2.2.1 Kanabinoidy .....                                         | 9         |
| 2.2.2 Fenolické látky .....                                     | 10        |
| 2.2.3 Primárne metabolity .....                                 | 10        |
| 2.3 Chemické zloženie produktov spracovania konopy siatej ..... | 12        |
| 2.4 Legislatíva ohľadom použitia kanabinoidov .....             | 13        |
| 2.5 Technológia spracovania konopy siatej .....                 | 13        |
| 2.6 Priemyselné využitie konopy siatej .....                    | 15        |
| 2.6.1 Aplikácia konopy siatej v kozmetike .....                 | 15        |
| 2.6.2 Aplikácia konopy siatej v potravinárstve .....            | 16        |
| 2.6.3 Aplikácia konopy siatej v medicíne .....                  | 16        |
| 2.6.4 Ďalšie aplikácie konopy siatej .....                      | 17        |
| 2.7 Konopa siata v cirkulárnej ekonomike .....                  | 18        |
| 2.8 Analytické metódy .....                                     | 18        |
| 2.8.1 Chromatografia .....                                      | 18        |
| 2.8.2 Spektrofotometria .....                                   | 19        |
| 2.8.3 Antimikrobiálne testy .....                               | 19        |
| <b>3 CIELE PRÁCE .....</b>                                      | <b>21</b> |
| <b>4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....</b>                              | <b>22</b> |
| 4.1 Použité chemikálie, prístroje a mikroorganizmy .....        | 22        |
| 4.1.1 Použité chemikálie .....                                  | 22        |
| 4.1.2 Použité prístroje .....                                   | 23        |
| 4.1.3 Použité mikroorganizmy .....                              | 23        |
| 4.2 Analyzované konopné frakcie .....                           | 23        |
| 4.3 Príprava extraktov frakcií konopy .....                     | 24        |

|          |                                                                           |           |
|----------|---------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.4      | Stanovenie celkových rozpustných sacharidov podľa Duboisa .....           | 25        |
| 4.5      | Stanovenie celkového dusíku a hrubej bielkoviny Kjeldahlovou metódou..... | 25        |
| 4.6      | Stanovenie obsahu lipidov a profilu mastných kyselín pomocou GC.....      | 26        |
| 4.7      | Stanovenie celkových fenolických látok .....                              | 26        |
| 4.8      | Stanovenie celkových flavonoidov.....                                     | 27        |
| 4.9      | Stanovenie antioxidačnej aktivity.....                                    | 27        |
| 4.10     | Stanovenie chlorofylov .....                                              | 28        |
| 4.11     | Stanovenie kanabinoidov pomocou HPLC .....                                | 28        |
| 4.12     | Stanovenie antimikrobiálneho účinku.....                                  | 29        |
| 4.12.1   | Jamkový dilučný test.....                                                 | 29        |
| 4.12.2   | Kontrola schopnosti buniek tvoriť kolónie .....                           | 29        |
| 4.12.3   | Kontrola metabolickej aktivity buniek resazurínom.....                    | 30        |
| 4.13     | Kultivácia kvasiniek na konopnom substráte.....                           | 30        |
| 4.13.1   | Hydrolyza konopných frakcií.....                                          | 30        |
| 4.13.2   | Príprava médií a kultivácia .....                                         | 31        |
| 4.13.3   | Spracovanie a analýza kvasinkovej biomasy .....                           | 31        |
| 4.14     | Využitie konopných frakcií v kozmetike .....                              | 32        |
| 4.14.1   | Výroba plet'ového peelingu .....                                          | 32        |
| 4.14.2   | Hodnotenie plet'ového peelingu.....                                       | 33        |
| 4.14.3   | Meranie hydratácie pokožky a transepidermálnej straty vody.....           | 34        |
| 4.15     | Využitie konopných frakcií v potravinárstve.....                          | 34        |
| 4.15.1   | Výroba raw tyčinky.....                                                   | 34        |
| 4.15.2   | Senzorická analýza raw tyčiniek.....                                      | 34        |
| <b>5</b> | <b>VÝSLEDKY A DISKUSIA.....</b>                                           | <b>36</b> |
| 5.1      | Príprava extraktov.....                                                   | 36        |
| 5.2      | Stanovenie rozpustných sacharidov.....                                    | 37        |
| 5.3      | Stanovenie celkového dusíku a hrubej bielkoviny Kjeldahlovou metódou..... | 38        |
| 5.4      | Stanovenie obsahu lipidov a profilu mastných kyselín pomocou GC.....      | 39        |
| 5.5      | Stanovenie celkových polyfenolov.....                                     | 41        |
| 5.6      | Stanovenie celkových flavonoidov.....                                     | 42        |
| 5.7      | Stanovenie antioxidačnej aktivity.....                                    | 44        |
| 5.8      | Stanovenie chlorofylov v extraktoch.....                                  | 45        |
| 5.9      | Stanovenie kanabinoidov pomocou HPLC.....                                 | 46        |

|          |                                                                           |           |
|----------|---------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.10     | Stanovenie antimikrobiálneho účinku konopných extraktov resazurínom ..... | 50        |
| 5.10.1   | Kontrola schopnosti buniek tvoriť kolónie .....                           | 52        |
| 5.11     | Využitie vedľajších konopných produktov na kultiváciu kvasiniek.....      | 54        |
| 5.11.1   | Kultivačné médiá .....                                                    | 55        |
| 5.11.2   | Nárast biomasy na médiách a stanovenie produkcie lipidov metódou GC       | 56        |
| 5.11.3   | Stanovenie produkcie karotenoidov metódou HPLC .....                      | 58        |
| 5.12     | Využitie vedľajších konopných produktov v kozmetike .....                 | 59        |
| 5.12.1   | Testovanie peelingu hodnotiteľmi .....                                    | 59        |
| 5.12.2   | Meranie hydratácie a transepidermálnej straty vody .....                  | 62        |
| 5.13     | Využitie vedľajších konopných produktov na výrobu raw tyčinky .....       | 64        |
| 5.13.1   | Senzorická analýza raw tyčinky.....                                       | 64        |
| <b>6</b> | <b>ZÁVER .....</b>                                                        | <b>67</b> |
| <b>7</b> | <b>POUŽITÁ LITERATÚRA .....</b>                                           | <b>70</b> |
| <b>8</b> | <b>ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....</b>                                     | <b>75</b> |
| <b>9</b> | <b>PRÍLOHY.....</b>                                                       | <b>76</b> |



# 1 ÚVOD

Konopa (*Cannabis*) je rastlina, ktorej všestranne využiteľné vlastnosti boli ľuďom známe už od staroveku. Bola považovaná za tradičný zdroj obživy, vlákien na výrobu textilu a aj liečivou bylinou s omamnými účinkami. Je možné ju pestovať aj v miernych podnebných pásmach, pričom je odolná voči chorobám a burinám a nevyžaduje náročnú starostlivosť.

V 20. storočí bolo však jej pestovanie a využívanie silno potláčané, a to kvôli zákonom, ktoré ilegализovali látku tetrahydrokanabinol (THC). Dôsledkom toho sa zvýšil záujem o druh konopa siata (*Cannabis sativa*), ktorý obsahuje minimum THC, ale zachováva si všetky výnimočné vlastnosti.

Rastlina okrem jej nenáročnosti pestovania poskytuje mnoho cenných látok. Stonky obsahujú vysokokvalitné celulóзовé vlákna. Semienka majú vysoký obsah oleja, ktorý je spomedzi rastlinných olejov jedným z najzdravších, a to vďaka obsahu esenciálnych mastných kyselín. Taktiež obsahujú proteín predstavujúci jeden z mála rastlinných kompletných zdrojov všetkých esenciálnych aminokyselín. Semienka aj konopné šišky navyše obsahujú množstvo aktívnych látok, ako sú fenolické látky, antioxidanty vitamíny a minerálne látky. V listoch a kvetoch je zas prítomná skupina látok, pre ktorú je konopa najznámejšia – kanabinoidy s protizápalovými, analgetickými, antimikrobiálnymi a ďalšími účinkami.

Pre všetky tieto vlastnosti je konopa rastlinou, ktorej pestovanie a využívanie je v dnešnej dobe veľmi cenené a je naň zameraná pozornosť. Konopa predstavuje obnoviteľný a ekologický zdroj potravinárskych, textilných a farmaceutických surovín. Každá jej časť má potenciál byť využitá do posledného gramu, a tak nezaťažovať životné prostredie odpadmi.

V tejto práci sa zameriavame na chemickú analýzu vybraných častí rastliny a na niektoré netradičné možnosti využitia vedľajších produktov vytvorených jej spracovaním. Cieľom je rozšíriť aplikácie konopy siatej v rámci konceptu tzv. cirkulárnej ekonomiky a bezodpadového hospodárstva a zvýšiť tak perspektívu jej využitia.

## 2 TEORETICKÁ ČASŤ

### 2.1 Konopa siata

Rastlina konopa bola v histórii ľudstva využívaná po tisíce rokov. Prvý konkrétny dôkaz o pestovaní sa datuje do tretieho tisícročia pred n.l. vo Východnej Ázii. Konopa sa pestovala na vlákno a ako potravina. Prvý papier vyrobený v Číne bol práve konopný papier. Kvalitné konopné vlákno našlo využitie aj ako textília, vyrábalo sa z neho ošatenie, či pevné plachty a rybárske siete. Boli známe aj jej opojné účinky, v niektorých kultúrach bola konopa posvätná rastlina. Avšak v minulosti, tak aj dnes sú jednou z hlavných použití konopy jej liečivé účinky. Najmä v Ázii boli známe medicínske vlastnosti konopy, napríklad pri niektorých neurologických chorobách [1][2].

#### 2.1.1 Botanická charakteristika

Konopa siata (*Cannabis sativa*) je jednoročná teplomilná rastlina, dorastá do výšky 1 – 4 m. Patrí do čeľade konopovité (*Cannabaceae*) a do rodu konopa (*Cannabis*). Príbuzným konopy je chmeľ obyčajný (*Humulus lupulus*). Rod konopa zahŕňa tri samostatné druhy: konopa indická, konopa rumovisková a konopa siata.

Konopa indická (*Cannabis indica*) dorastá do výšky 1,5 m a rozkonáruje sa vetvením. Tento druh sa pestuje v trópoch a subtrópoch pre omamné látky obsiahnuté v živici samičieho súkvetia na výrobu marihuany alebo hašiša. Obsah THC je tu vo vysokej koncentrácii 1-25 % [2].

Konopa rumovisková (*Cannabis ruderalis*) je hospodársky nevýznamná burina, prispôbena na samovýsev.

Konopa siata (*Cannabis sativa*) sa inak nazýva aj technické konope. Na rozdiel od konopy indickej obsahuje menej kanabinoidov v živici (CBD 0,5-1 %), pestuje sa pre vlákno a semeno. Má vysoký počet geografických ekotypov, napríklad konopa severná, konopa stredoruská, konopa južná. V Európskej únii môžu pestované odrody technickej konopy obsahovať najviac 0,3 % THC [3].

Konopa má dľaňovité listy na dlhých stopkách, v pazuchách horných listov sa nachádzajú kvety. Je to dvojdomá rastlina, čiže na rastline sa nenachádzajú súčasne samčie a samičie kvety. Samčie rastliny sú menšie, tenšie a svetlejšie v porovnaní so samičími rastlinami, na ktorých sa po opelení vetrom vyvinú plody nažky.

Odrody pestované kvôli kanabinoidom alebo oleju sú malé, rozvetvené, s menšími listami, odrody pestované pre vlákno majú dlhé, málo rozvetvené stopky a produkujú menej semena.

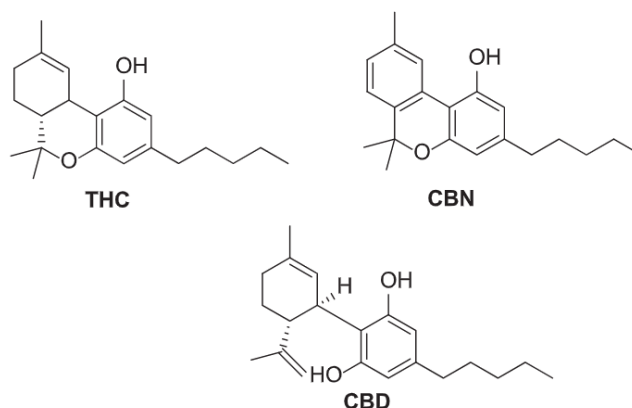
### 2.2 Biologicky aktívne látky konopy siatej

Do dnešnej doby bolo objavených až 483 prirodzených zložiek konopy. Hlavnými zložkami rastliny sú proteíny, sacharidy, lipidy, terpény, kanabinoidy, flavonoidy a ďalšie skupiny látok. Väčšina týchto látok nie je unikátna, obsahujú ich aj iné rastliny alebo živočíchy. Najvýznamnejšie sú však kanabinoidy, ktoré sa vyskytujú takmer výlučne v konope.

### 2.2.1 Kanabinoidy

Kanabinoidy predstavujú najskúmanejšiu skupinu zlúčenín v konope hlavne kvôli ich širokému spektru farmaceutických účinkov na ľudí, vrátane psychotropných aktivít. Táto skupina obsahuje asi 90 preskúmaných terpeno-fenolických zlúčenín zložených z 21-uhlíkového reťazca, ktoré produkujú takmer výhradne rastliny druhu *Cannabis*. Rastlina ich produkuje ako ochrannú látku proti negatívnym vplyvom z prostredia, napríklad proti UV žiareniu, ale aj ako antibiotickú látku. Väčšinou sa v jednej rastline nachádzajú 3-4 druhy kanabinoidov [4].

Kanabinoidy sa podľa chemickej štruktúry priradujú ku jednému z desiatich základných typov kanabinoidov, z ktorých najdôležitejšie typy sú kanabigerol (CBG), kanabichromen (CBC), kanabidiol (CBD), delta-9-tetrahydrokanabinol (THC) a kanabinol (CBN) [2].



Obrázok 1 Štruktúrne vzorce kanabinoidov THC, CBD, CBN [5]

Najznámejším a najpsychoaktívnejším kanabinoidom je THC. Práve THC je látka spôsobujúca omamné efekty marihuany a aj mnohé medicínske vlastnosti. Na psychiku pôsobí upokojujúco, spôsobuje eufóriu a pocit pohody, zintenzívňuje zmyslové vnímanie. Pri vysokých dávkach vyvoláva halucinácie. Vplyvom na nervový systém zmiernuje bolesť (analgetikum), uvoľňuje svalstvo a zvyšuje chuť do jedla. Taktiež zvyšuje tep a rozširuje cievy. Účinky THC však závisia od dávky a od jednotlivca, eventuálne môže vyvolať strach, závraty a nevoľnosť [2].

V technickom konope dominuje kanabidiol CBD, ktorý je v súčasných štúdiách s tematikou konopy najčastejším záujmom. Nemá psychoaktívny efekt ako THC, ale vykazuje protizápalové, analgetické, antioxidačné a antimikrobiálne účinky. Pôsobí upokojujúco a zmiernuje strach.

Ostatné kanabinoidy nie sú hlbšie preskúmané, ale vykazujú taktiež protizápalové, antioxidačné a iné farmakologické účinky. Kanabinol (CBN) je produkt degradácie THC [2][6].

Kanabinoidy sa produkujú v stonkách, listoch a kvetoch rastlín. Najprv sú prítomné v ich karboxylovej forme, teda forme kyselín. Kanabinoidné kyseliny sa považujú za neaktívnu formu, aktivácia nastáva po ich dekarboxylácii na neutrálne formy, ktoré sú stabilnejšie a majú požadované účinky. Slabšia bioaktivita kyslej formy je spôsobená jej štruktúrou a nepriechodnosťou do centrálneho nervového systému cez hematoencefalickú bariéru. Dekarboxylácia nastáva prirodzene v rastline počas starnutia, ale môže byť podporená sušením, teplom, svetlom alebo vplyvom kyslíka. Kanabinoidy sú rozpustné v nepolárnych rozpúšťadlách.

Na vplyv a účinky kanabinoidov majú synergický efekt terpény a terpenoidy. Sú to látky, ktoré nie sú špecifické práve pre rastlinu konope, ale ich prítomnosť podporuje účinky kanabinoidov a zodpovedajú za osobitú arómu a chuť konope. Tieto látky sú nepolárne, čiže sa nachádzajú vo vylišovanom oleji aj v extrakte CBD, hoci sa ich obsah znižuje počas sušenia kvôli ich vysokej prchavosti [7].

### 2.2.2 Fenolické látky

Fenolické látky patria do skupiny prírodných antioxidantov, teda látok rastlinného pôvodu. Ako sekundárne metabolity chránia rastliny od oxidačného stresu, teda znižujú reaktivitu kyslíkových radikálov. Podľa štruktúry ich delíme na štyri skupiny – fenolové kyseliny, stilbény, lignany a flavonoidy [8]. Sú obzvlášť zaujímavé pre potravinársky a farmaceutický priemysel. Z dôvodu ich prínosov pre ľudské zdravie sa radia na úroveň vitamínov či minerálnych látok. Vďaka svojej antioxidačnej aktivite môžu byť prevenciou pred vznikom chronických chorôb ako sú rakovina a kardiovaskulárne ochorenia [9][10].

Konopné fenoly sa nachádzajú hlavne v semienku, ale aj kvetoch či listoch. Fenoly v kvetoch sú zväčša polyfenoly a flavonoidy, ktoré sa bežne vyskytujú v iných druhoch rastlín. Konopa obsahuje asi 21 druhov flavonoidov. Najzastúpenejšími fenolickými látkami v semienku sú kyselina hydroxyškoricová a lignamidy. Nachádzajú sa tu aj flavonoidy pre konopu jedinečné, napríklad kanflavíny a apigenin [1]

### 2.2.3 Primárne metabolity

Z látok, ktoré obsahujú frakcie konopy satej, majú najväčšie zastúpenie primárne metabolity, teda látky so základnými funkciami. Patria sem sacharidy, proteíny a lipidy.

Sacharidy sú obsiahnuté v celej rastline ako súčasť bunkovej steny a stavebná zložka, tvoriaca kvalitné vlákna, vďaka ktorým bola konopa počas histórie jej využívania tak významná. Konopné vlákna obsahujú celulózu (55%), hemicelulózu (16%), pektíny (18%) a lignín (4%) [11]. Celulóza je v prírode najrozšírenejšou organickou zlúčeninou. Je to lineárny polymér D-glukózových jednotiek viazaných glykozidovými väzbami  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). Makromolekuly celulózy sa viažu vodíkovými väzbami a tvoria v stenách rastlinných buniek trojrozmerné štruktúry, ktoré sa nazývajú celulózové vlákna. Celulóza je nerozpustná vo vode a vo väčšine rozpúšťadiel, rozpustiť ju je možné jedine v koncentrovaných kyselinách. Vtedy dochádza ku hydrolýze a štiepeniu na kratšie fragmenty. Hemicelulózy sú necelulózové polysacharidy, ktoré vyplňajú priestor medzi celulózovými vláknami. Okrem jednotiek glukózy obsahujú aj xylózu, galaktózu či arabinózu, do tejto skupiny sa radia aj  $\beta$  – glukány. Pektíny sú polysacharidy s rôznorodým zložením. Štruktúra pektínov je tvorená lineárnym reťazcom, zloženým z jednotiek D – galakturónovej spojených väzbami  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4), ktorý sa nazýva kyselina polygalakturónová. Jednotky galakturónovej kyseliny môžu byť esterifikované metanolom a reťazce polygalakturónovej kyseliny môžu obsahovať aj ďalšie monosacharidové jednotky, najčastejšie rhamnózu, arabinózu a galaktózu [12].

Proteíny sú vysokomolekulové látky nachádzajúce sa vo všetkých živých organizmoch. Tieto makromolekuly sa skladajú z jedného alebo viacerých polypeptidových reťazcov. Každý polypeptid pozostáva z reťazca aminokyselín spojených peptidovými väzbami. Bielkoviny sú

zdrojom dusíka vo výžive a nesú aj energetickú hodnotu. Majú množstvo dôležitých funkcií v bunke aj v organizme, a to štruktúrnú, enzymatickú, transportnú, pohybovú, obrannú, regulačnú a nutričnú. Proteíny sú zložené z aminokyselín, ktoré pre organizmus predstavujú najdôležitejší zdroj dusíkatých zlúčenín. Kvalitu proteínov posudzujeme podľa zastúpenia esenciálnych aminokyselín vo vhodnom pomere a tiež podľa stráviteľnosti konkrétneho proteínu. Miera kvality bielkoviny je charakterizovaná biologickou hodnotou proteínov. Táto hodnota značí množstvo proteínov, ktoré si organizmus nesyntetizuje zo 100 g proteínov prijatých z potravy. Zdroje bielkovín sú živočíšne aj rastlinné. Niektoré zdroje bielkovín sú takzvané kompletne, čo znamená, že obsahujú všetky esenciálne aminokyseliny (vajcia, mlieko, sójový proteín a iné). Konopný proteín ako jeden z mála rastlinných zdrojov obsahuje všetky esenciálne aminokyseliny, teda ide o kompletný zdroj. Na rozdiel od ostatných rastlinných zdrojov obsahuje aj metionín v dostatočnej miere. Obsah aminokyselín je zobrazený v Tabuľke 1. Je výborne stráviteľný, hodnota stráviteľnosti je nad 85 % [13][14].

Tabuľka 1 Obsah aminokyselín v konopnom proteíne

| Aminokyselina | Obsah v proteíne (%) | Aminokyselina   | Obsah v proteíne (%) |
|---------------|----------------------|-----------------|----------------------|
| Tryptofán     | 1,63                 | Tyrozín         | 2,70                 |
| Threonín      | 4,19                 | Arginín         | 10,53                |
| Izoleucín     | 4,90                 | Valín           | 5,87                 |
| Leucín        | 6,67                 | Histidín        | 2,58                 |
| Lyzín         | 4,72                 | Alanín          | 5,06                 |
| Metionín      | 2,03                 | Kys. asparágová | 11,20                |
| Cysteín       | 1,86                 | Kys. glutámová  | 22,10                |
| Fenylalanín   | 5,24                 | Glycín          | 6,83                 |
| Prolín        | 4.41                 | Serín           | 5,31                 |

Lipidy sú estery vyšších mastných kyselín a alkoholov a ich deriváty. Najväčšiu časť lipidov tvoria triacylglyceroly a polárne lipidy obsahujúce zbytok kyseliny fosforečnej – fosfolipidy. Triacylglyceroly majú funkciu zásoby a zdroja energie, sú energeticky najbohatšia potraviná [15].

Základnou stavebnou jednotkou lipidov sú alifatické monokarboxylové kyseliny s reťazcom s 4 až 26 atómami uhlíku, inak nazývané aj mastné kyseliny. Poznáme viac ako 50 druhov mastných kyselín. V prírode sa vyskytujú mastné kyseliny s párnym počtom uhlíkov, s nasýtenými alebo nenasýtenými väzbami. Nenasýtené kyseliny môžu obsahovať jednu alebo viac izolovaných dvojítých väzieb, zvyčajne v strednej časti reťazca. Niektoré nenasýtené mastné kyseliny si ľudské telo nedokáže syntetizovať, a preto sa nazývajú esenciálne [16].

Každý druh oleja má charakteristické zloženie mastných kyselín. Obsah mastných kyselín určuje vhodnosť oleja pre určité aplikácie a z toho dôvodu je najvýznamnejším kritériom pre hodnotenie olejov. Z hľadiska výživy sú najdôležitejšie nenasýtené formy mastných kyselín. Konopný olej obsahuje 70 – 80 % nenasýtených mastných kyselín. Je v ňom obsiahnuté veľké množstvo esenciálnych mastných kyselín, napríklad kyselina linolová a kyselina  $\alpha$ - a  $\gamma$ -linolenová. Pomer kyseliny linolovej a kyseliny  $\alpha$  – linolenovej je v konopnom oleji približne 3:1. Za optimálny pomer týchto mastných kyselín (alebo pomer omega-6 : omega-3) v strave sa považuje 2:1 až 3:1, takže konopný olej má z tohto ohľadu ideálne zloženie [17].

## 2.3 Chemické zloženie produktov spracovania konopy siatej

Cieľovými produktami spracovania konopy sú najčastejšie konopný olej alebo vlákno. Podľa toho sa líši výber najvhodnejšej odrody a postupu spracovania rastliny. Z kvetov a listov sa často ďalším spracovaním získava extrakt kanabinoidov. Vedľajšími produktami sú korene, listy, zbytky stoniek, výlisky a sedimentačný kal.

Výťažok oleja a vlákna sa líši podľa podnebia a konkrétnej odrody. Kvalitnejšie dlhé konopné vlákna sú vhodné na textílie. Stredné a krátke vlákna sú vhodné na výrobu papiera a iných netkaných textílií (plienky). Zvyškové vlákna zo stonky sa môžu použiť rozomleté v produktoch ako sú obaly, stavebné materiály.

Konopné semenka sú podobné slnečnicovým semenkam, s tým rozdielom, že konopné semienko má okrem endospermu jedlé aj semenné obaly. Obsahujú 35 % oleja, 25 % bielkovín a 20–30 % nerozpustnej vlákniny. Môžu obsahovať iba stopy kanabinoidov, ktoré sa do frakcie semienok dostanú kontamináciou z iných častí rastliny. Semienka obsahujú veľmi zdravý olej a takisto proteíny s komplexným obsahom aminokyselín, preto nachádzajú uplatnenie hlavne v potravinárstve. V konopných semenách môžeme nájsť veľa prospešných látok, ako napríklad vitamín A, vitamín C a vitamín E. Obsahujú aj základné minerálne látky (Mg, P, K, S, Zn, Ca, Fe) a sú dobrým zdrojom mangánu. Konopné semienka neobsahujú lepok, teda sú vhodné aj pre celiakov [14].

Konopný olej má využitie ako samostatná potravina, alebo ako prísada v kozmetike, tlačiarenských farbách a náteroch. Vyrába sa zo semien lisovaním za studena. Konopný olej vykazuje výborné vlastnosti pre zdravie vďaka vysokému obsahu esenciálnych mastných kyselín. Je zložený z približne 80 % polynenasýtených mastných kyselín (PUFA), s najvyšším obsahom kyseliny linolovej (LA) a alfa-linolénovej (ALA), pričom ich pomer je približne 3:1, čo je jeden z najzdravších pomerov z pomedzi používaných rastlinných olejov. Na rozdiel od ľanového oleja, ktorý má síce lepší pomer omega-3 a omega-6 mastných kyselín, je konopný olej chutný, teda vhodný na varenie, a taktiež nie je taký náchylný na autooxidáciu ako ľanový olej. Konopný olej obsahuje 5 % kyseliny  $\gamma$ -linolenovú (GLA), ktorá sa nachádza iba v niektorých olejoch rastlín. Vitamíny K a E rozpustné v tukoch sú ďalšou dôležitou zložkou konopného oleja. Konopný olej má preto vynikajúcu výživovú hodnotu [18]. Pri využití v kozmetike sa oceňuje hlavne vysoký pomer nenasýtených mastných kyselín, ktoré pleti dodávajú hebkosť a hydratujú [2].



Obrázok 2 Konopné semenka a konopný olej[19]

Výlisky po lisovaní oleja sú vysoko hodnotnou surovinou. Obsahujú minimum tuku, ale vysoký podiel bielkovín. Konopné bielkoviny sú dobre stráviteľné a vyznačujú sa veľkým množstvom obsahu metionínu, ktorý je napríklad v sójovej bielkovine limitujúci. Bližšie opísaná charakteristika konopných bielkovín je v kapitole 2.2.3. Z výliskov sa dá pripraviť konopná múka alebo konopný proteín na využitie v potravinách. Konopný proteín sa vyrába preosiatím konopnej múky od hrubších otrúb a obsahuje až 50 % bielkovín [20].

## 2.4 Legislatíva ohľadom použitia kanabinoidov

V minulosti bola konopa v svetovom priemysle nenahraditeľná. *Ročenka amerického ministerstva hospodárstva* v roku 1913 písala o konope ako o najstaršej pestovanej plodine, ktorá zlepšuje kvalitu pôdy a produkuje jedno z najsilnejších a najtrvácnejších vlákien. Avšak v roku 1937 bol v USA schválený Marihuanový daňový zákon, s cieľom zakázať rekreačné použitie konope, dôsledkom ktorého sa stalo aj pestovanie technického konope zakázaným. V roku 1961 došlo k celosvetovému zákazu pestovania konope podľa *Jednotného dohovoru OSN o omamných látkach*. To malo za výsledok šľachtenia odrôd so zníženým obsahom psychoaktívneho  $\Delta^9$ -tetrahydrokanabinolu (THC) a v 80. rokoch vznikol pojem technické konope.

Podľa nariadenia Európskej únie rovnako ako vlády Českej republiky č. 463/2013 Zb. o zozname návykových látok sa ako technické konope označuje registrovaná odroda, v ktorej zastúpenie psychoaktívneho THC nepresahuje 0,3 % hmotnosti suchej rastliny. Technické konope môže byť pestované na území o výmere do 100 m<sup>2</sup> bez povolenia. Odrody s obsahom THC nad 0,3 % podľa tohto nariadenia môžu pestovať iba licencovaní pestovatelia [21].

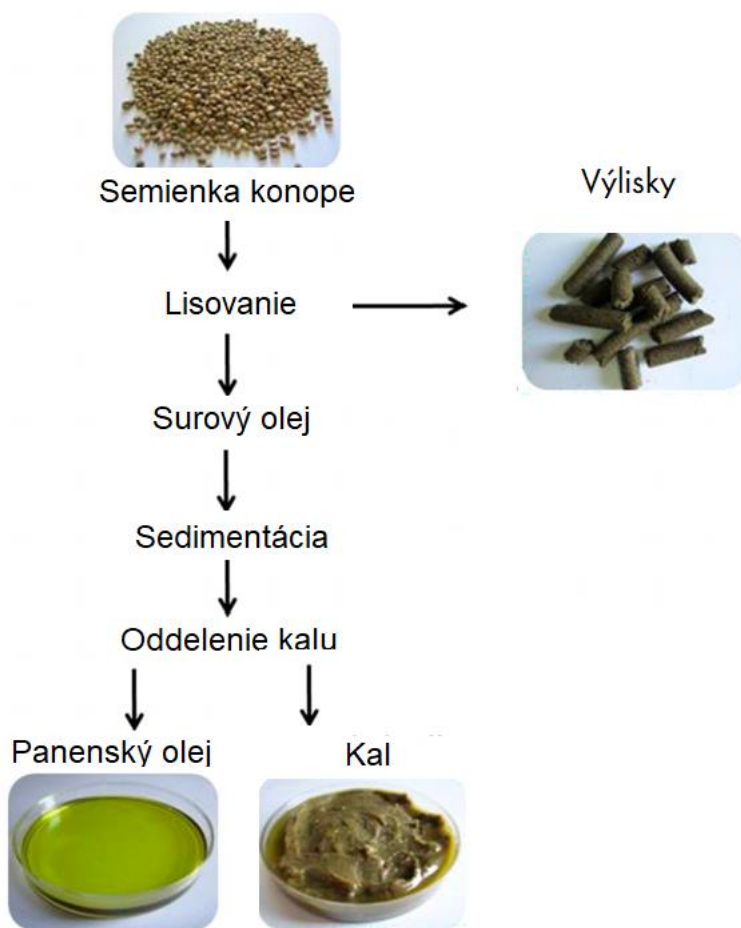
## 2.5 Technológia spracovania konopy siatej

Postupy pestovania aj spracovania konopy sa líšia z závislosti na požadovanom produkte. Najčastejšími produktami pestovania konopy siatej sú jej vlákna, konopný olej a extrakt kanabinoidov.

V prípade konopných vlákien sú vybrané odrody produkujúce silné stonky. Rastlina je nahusto vysiatá, aby sa podporila vysoká a štíhla stonka a zber sa uskutočňuje ešte pred začatím kvitnutia, čiže nedochádza k vývinu šišiek bohatých na živice s kanabinoidmi ani k dozretiu semena. V čase žatvy sa konope odreže a zroluje do veľkých kôp, ktoré sú pripravené na prepravu do zariadení na extrakciu a tvorbu vlákien [22].

V prípade pestovania konopy na semeno sa vyberajú odrody, ktoré produkujú vysoký obsah oleja v semenách. Rastlinné oleje, najmä panenské oleje, sa dnes vyrábajú hlavne metódou lisovania za studena. Takto získané oleje majú lepšiu výživovú hodnotu, pretože sa lepšie zachovávajú ich pôvodné vlastnosti, čo je v potravinárskom priemysle veľmi žiadúce. Okrem toho môže olej získaný pomocou systému lisovania za studena obsahovať vyššie podiely bioaktívnych zlúčenín, ako sú esenciálne mastné kyseliny, fenolické látky, flavonoidy a tokoferol. Nevýhodou je, že oleje získané spôsobom lisovania za studena sú veľmi citlivé na oxidačné procesy [23]. Závody na výrobu oleja používajú na mechanické lisovanie za studena skrutkový alebo hydraulický lis. Postup nezahŕňa rafinačné kroky, iba čistenie jednoduchou sedimentáciou, aby sa odstránili nečistoty, ako je jemná buničina, živice a voda. Studené

lisovanie vytvára rôzne vedľajšie produkty: kaly, výlisky alebo múčky. Kal predstavuje komplexnú zmes pozostávajúcu z malých kúskov lisovaného semena a šupky, ako aj fosfolipidov, oleja, voskov a v malom množstve aj látok, ako sú fytosteroly, tokoferoly, pigmenty a masné kyseliny. Výlisky z konopných semien sú vedľajším produktom po lisovaní semien na extrakciu oleja [20].



Obrázok 3 Schéma lisovania konopného oleja

Extrakt kanabinoidov je získavaný zo spracovania kvetov a listov konopy, keďže obsahujú najvyšší podiel týchto látok. Voľba odrody konopy je kľúčová, keďže jednotlivé odrody sa významne líšia v obsahu kanabinoidov.

Na extrakciu kanabinoidov sa môžu využívať rôzne extrakčné metódy, ktoré však musia spĺňať požiadavky na bezpečnosť a kvalitu výsledného produktu. Najčastejšie sa využíva extrakcia do organických rozpúšťadiel s označením GRAS (Generally Recognized as Safe) alebo technológia extrakcie superkritickým CO<sub>2</sub>. Podľa parametrov rozpustnosti je etanol najúčinnnejším rozpúšťadlom pre kanabinoidy. Extrakcia superkritickým CO<sub>2</sub> je síce pomalšia a nákladnejšia metóda v porovnaní s tradičnou extrakciou etanolom, ale vyznačuje sa malými dopadmi na životné prostredie: nepoužívajú sa organické rozpúšťadlá a ako extrakčná kvapalina sa používa oxid uhličitý s možnosťou recyklovať použitý CO<sub>2</sub> na pestovanie rastlín.

V tejto diplomovej práci sa zameriavame na extrakciu organickými rozpúšťadlami, a preto je bližšie opísaná práve táto metóda.



Vysušené kvety konopy sa zomelú (na častice asi 50 µm) pomocou nožového mlynu. Nasleduje regulované tepelné spracovanie v sušiarňi, počas ktorého dôjde ku dekarboxylácii kyselých foriem kanabinoidov na ich aktívnu formu. Nasleduje samotná extrakcia v extrakčnom prístroji. Voľba extrakčného systému závisí od veľkosti prevádzky a spracovávaného objemu rastliny. Po počiatočnej extrakcii obsahuje extrakt ešte mnoho iných zložiek, čiže je podrobený kroku purifikácie. Extrakt sa môže čistiť stužením a odstránením voskov, lipidov a chlorofylu pri nízkej teplote, čo sa nazýva zimovanie alebo odparaľovanie. Zmes sa ochladí na -20 až -80 °C a nechá sa 24-48 hodín usádzať, následne je zmes filtrovaná. Ďalšími metódami čistenia extraktu je destilácia, kryštalizácia alebo chromatografické metódy.

Kvôli využívaniu organických rozpúšťadiel, ktoré môžu byť hrozbou pre životné prostredie alebo zdravie, je tento extrakčný proces v priemysle regulovaný a podlieha dodržiavaniu predpisov. Aj preto je najvhodnejším rozpúšťadlom etanol, ktorý je považovaný za bezpečný na použitie vo farmaceutických a potravinárskych produktoch [24][25].

## 2.6 Priemyselné využitie konopy siatej

Všestrannosť využitia konopy prináša veľa materiálov, ktoré sa môžu spracovať na tisíce rôznych produktov. Časopis *Popular Mechanics* z roku 1938 uviedol, že „z konopy sa dá vyrobiť viac ako 25 000 produktov, od celofánu až po dynamit.“ Hlavnými surovinami sú lykové a buničité vlákna zo stonky, semená, konopný olej a výlisky. Konopa ako technická plodina je obnoviteľným zdrojom týchto surovín, ktoré sa môžu využiť v širokom spektre. Pestovanie konopy je najrozšírenejšie v Číne, Anglicku, Francúzsku, Holandsku, Maďarsku a Rusku (1999) [26].

### 2.6.1 Aplikácia konopy siatej v kozmetike

Kanabinoidy sa nedávno dostali do popredia v reťazcoch ako súčasť produktov v starostlivosti o pleť. CBD sa stalo modernou ingredienciou, čo inšpiruje mnoho značiek k jej začleňovaniu do svojich výrobkov. Výrobky s CBD sľubujú protizápalové, analgetické a hydratačné účinky, s redukciou vrások, alebo inak povedané, poskytujú pomoc s akné, s liečbou ekzémov, psoriázy a iritácie. Vedecké štúdie v tejto oblasti potvrdzujú potenciál CBD v liečbe kožných ochorení, avšak ich rozsah ešte nie je dostatočný [27].

V kozmetike je často využívaný aj samotný konopný olej, niektoré značky sa špecifikujú výhradne na použitie tohto druhu oleja. Kozmetické prípravky s konopným olejom sú zamerané hlavne na problematickú pleť s ekzémom či náchylnosťou k akné. Prednosti konopného oleja sú jeho výborné vstrebávanie sa do pokožky a obsah prospešných aktívnych látok ako sú nenasýtené mastné kyseliny, chlorofyly a antioxidanty. Konopná olej pokožku hydratuje, ale nezanecháva na nej mastný film, a je hypoalergénny [28][29].

Využitie má aj esenciálny (alebo éterický) olej z konopy. Esenciálny olej je zmes prchavých látok ako sú terpény, získava sa destiláciou s vodnou parou z kvetov a listov. Nesie koncentrovanú arómu konopy a preto má využitie ako prímies do kozmetických výrobkov a v arómaterapii. Inhaláciou pary s obsahom esenciálneho oleja môže byť liečený zápal nosných dutín [30]. Najprchavejšia frakcia obsahuje monoterpény a seskviterpény (napríklad eugenol, cineol, linalool), z ktorých niektoré majú protirakovinové, analgetické a dezinfekčné účinky

alebo podporujú pamäť. Menej prchavá frakcia obsahuje kanabinoidy, ktorých pozitívne zdravotné účinky sú rozobrané v kapitole 2.2.1, ale v prípade aplikácie éterického oleja je najprospešnejší ich analgetický a protizápalový účinok [31][2].

### 2.6.2 Aplikácia konopy siatej v potravinárstve

Konopný olej je zatiaľ stále najhodnotnejší produkt konopného priemyslu. Primárne sa využíva v studenej kuchyni a ako potravinový doplnok vo forme olejových kapslí. Má príjemnú orieškovú chuť a zaujímavú zelenkastú farbu. Kvôli vysokému obsahu nenasýtených mastných kyselín nie je vhodný na tepelnú úpravu, ale využíva sa na výrobu dresingu, majonézy či zálievky šalátu. Netradičné využitie konopy je v prichucovaní piva [14]. Jeho najväčším benefitom je vysoký obsah nenasýtených mastných kyselín a ideálny pomer  $\omega-6$  a  $\omega-3$  mastných kyselín, ktorý bol opísaný v kapitole 2.2.3. Okrem toho je zaujímavý aj obsah antioxidantov, vitamínov A a E, ktorý prispieva k jeho zdravotným účinkom – znižuje obsah cholesterolu a krvný tlak, má preventívne účinky proti kardiovaskulárnym ochoreniam a rakovine.

Konopné semienka sú konzumované lúpané alebo nelúpané. Vďaka obsahu všetkých esenciálnych aminokyselín a vysokému obsahu nenasýtených mastných kyselín s optimálnym pomerom omega-6 a omega-3 sú považované za superpotravinu. Okrem tohto obsahujú mnohé minerálne látky, vitamíny a fenolické látky, ako je pojednávané v kapitole 2.3. Konopné semienka bývajú komerčne dostupné aj pražené. Tepelná úprava zvyšuje dostupnosť aktívnych látok, ako sú polyfenoly, uvoľnením týchto látok z bunkovej steny [32].

Z výliskov konopných semienok sa vyrába konopná múka, použiteľná pri pečení a varení. Jej chemické zloženie je opísané v kapitole 2.3. Jej prídavkom do potravín sa zvyšuje obsah bielkovín a vlákniny, v porovnaní s použitím pšeničnej alebo kukuričnej múky. Takisto je významný obsah fenolických látok, teda antioxidantov. Konopná múka je bezlepková, čiže má využitie v pečive pre celiatikov, napríklad v bezlepkových chleboch alebo sušienkach. Napriek tomu, že prídavok konopnej múky zlepšuje nutričnú hodnotu jedla, má negatívny vplyv na organoleptické vlastnosti. Dodáva jedlu horkú pachuť a tmavozelenú farbu, čo znižuje prijateľnosť výrobkov pre spotrebiteľa [33].

Preosiatím konopnej múky sa oddeľuje jemnejšia frakcia, takzvaný konopný proteín. Ten sa stáva zaujímavým hlavne kvôli vysokému obsahu metionínu a arginínu. Arginín je prekursor pre oxid dusnatý, takže je považovaný za látku prospešnú pre srdce. Komerčne dostupné sú proteínové koncentráty s obsahom proteínu do 70 %, ale obsahujú aj pomerne vysoké množstvo kyseliny fytovej, ktorá je antinutrient a znižuje stráviteľnosť proteínu a teda funkčnosť [33][34].

### 2.6.3 Aplikácia konopy siatej v medicíne

Konope sa dnes používa na liečbu najrôznejších zdravotných problémov. Najčastejšie sa používa na úľavu od bolesti u pacientov s rakovinou, chronickými bolesťami alebo bolesťami spojenými so sklerózou multiplex. Konope sa tiež používa na zmiernenie zápalu a na zmiernenie príznakov súvisiacich s neurodegeneratívnymi poruchami, ako je Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba a epilepsia [1].

Látky zodpovedné za prospešné zdravotné účinky konopy sú kanabinoidy. THC podporuje chuť do jedla, čím pomáha pacientom, ktorí kvôli svojej chorobe pociťujú nechutenstvo, prijímať potrebné živiny. Pacientom podstupujúcim chemoterapiu zase pomáha potlačiť nevoľnosť a potrebu zvracania. Pri liečbe roztrúsenej sklerózy je zase prospešné zmiernenie bolesti a svalových kŕčov. Analgetické účinky THC sa taktiež využívajú pri pacientoch, ktorí trpia na chronické bolesti spôsobené akoukoľvek diagnózou. Nevýhodou látky THC je to, že môže spôsobovať úzkostné stavy a tým podnecovať psychotické stavy u pacientov. Typická denná dávka pri užívaní THC je 5 – 30 mg/deň. Výskum pri iných ochoreniach je zatiaľ nedostatočný, keďže bolo THC dlhodobo ilegálne [35].

Zaujímavejším a všestrannejším kanabinoidom pri aplikovaní v medicíne je kanabidiol (CBD), ktorý nemá psychoaktívne účinky ako THC a dokonca potláča psychoaktívne účinky THC. Hlavným benefitom užívania CBD sú jeho antipsychotické účinky, a to konkrétne v potláčaní pocitu úzkosti a zlepšovaní kognitívnych funkcií. Dlhodobé užívanie CBD znižuje výskyt panických stavov [2]. Používa sa pri liečbe schizofrénie, kvôli zmierneniu paranoje a halucinácií. CBD sa používa pri ťažších formách epilepsie, aj u detí, lebo výrazne znižuje až eliminuje počet záchvatov. Má takisto neuroprotektívnu funkciu, čiže nachádza využitie pri liečbe Alzheimerovej choroby. Vďaka antioxidáčnému a protizápalovému účinku prispieva k prevencii autoimunitných chorôb, ako sú diabetes mellitus 1. typu alebo artritída. CBD je v dnešnej dobe intenzívne študovaná látka a okrem vymenovaných medicínskych použití má ešte mnoho priaznivých účinkov pri liečbe rôznych ochorení bez závažných vedľajších účinkov. Typická denná dávka CBD je 200-600 mg/deň [35][2].

#### 2.6.4 Ďalšie aplikácie konopy siatej

Ako bolo spomínané, konopa siata má tisíce využití. Okrem aplikácií bližšie rozobratých v predchádzajúcich podkapitolách je použitie konopy rozšírené v textilnom a stavebníckom priemysle.

Textilný priemysel je tretím najväčším odvetvím na svete. V dnešnej dobe sa z prírodných rastlinných vlákien najčastejšie využívajú bavlna, juta či ľan, avšak na našom území boli v minulosti najvýznamnejšími zdrojmi vlákna práve ľan a konopa. Pred viac ako storočím začal význam konopy klesať, vzhľadom na rozšírenie dovozu bavlny, a neskôr kvôli výrobe umelých vlákien. Spotrebiteľské trendy v odevnom priemysle sa však stále viac sústreďujú na organické a ekologické materiály. Technické konope je rastlina s vysokou výťažnosťou vlákna, až 36 % zo stonky, respektíve 1 tona vlákna na hektár. Konopné vlákna majú mnoho dobrých vlastností. V porovnaní s ostatnými vláknami sú hlavne aseptické, vysoko absorpčné a hypoalergénne. Ich pevnosť a pružnosť je porovnateľná s ľanovým vláknom. Z technologického hľadiska je možné použiť na spracovanie konopy už existujúce technológie a prístroje na spracovanie ľanového vlákna, čiže by sa pri zvýšenom dopyte o konopný textil nemuseli vyvíjať nové postupy [22][36].

V stavebníctve je možné využiť celú stonku konopy. Tvrdá časť stonky je využívaná v materiáloch na budovanie stien, mäksie časti skôr ako súčasť omietok. Betón s konope je stále viac a viac používaný stavebný materiál kvôli jeho dobrým vlastnostiam a obnoviteľnosti tohto zdroja. V porovnaní s ostatnými stavebnými materiálmi má nižšiu hustotu, dobré akustické a izolačné vlastnosti a vysoké pohlcovanie vlhkosti. Betón s časťami konopy obsahuje okrem

rastliny aj vápno a vodu. Jeho využitie je na výrobu tehly, formovanie omietky alebo výplň stien [37].

## **2.7 Konopa siata v cirkulárnej ekonomike**

Konopa siata je obnoviteľný zdroj obživy a materiálu. Jej spracovanie vytvára málo vedľajších produktov. Tieto odpady sú hodnotné svojím chemickým zložením a majú mnoho využití, čím sa konopa siata stáva ideálnou komoditou na zaradenie do cirkulárnej ekonomiky.

Cirkulárna ekonomika je jedným z nástrojov na dosiahnutie udržateľného hospodárstva a zabezpečenie lepšej kvality života na planéte. Je založená na myšlienke, aby všetky produkty mohli byť opätovne zapojené do cyklu po ich použití, kde sa stanú opätovne zdrojmi pre nové produkty alebo služby. To znamená, že odpad ako taký už nebude viac existovať [38][39].

V súčasnosti, keď rastie vo svete uvedomenie si potreby ochrany životného prostredia na ďalšie prežitie ľudstva a hľadajú sa ekonomické alternatívy, narastá záujem o pestovanie a spracovanie konopy. Rastliny konopy sú všestranne využiteľné a zaručujú kompatibilitu s princípmi zachovania životného prostredia. Ekonomika ich pestovania sa zvyšuje prostredníctvom účinných spracovateľských technológií a vývojom nových produktov s využitím technických odrôd. Tieto aspekty viedli k nárastu pestovateľských plôch v EÚ, kde sa výrazne rozširuje trh s konopnými produktami. Rastúce úspory pri veľkoplošnom pestovaní konopy sú spôsobené vylepšenou technológiou zberu a moderným spracovaním rastliny [26].

Konopa siata je cennou a lacnou biosurovinou, ktorá sa môže pestovať vo väčšine klimatických pásiem. Je to rýchlorastúca bylina odolná voči chorobám a burinám, čo minimalizuje použitie pesticídov a herbicídov. Konopa môže byť významná pri ekonomickom rozvoji poľnohospodárskych oblastí; môžu sa vytvoriť nové pracovné miesta a podporiť tak lokálne výroby.

Technické konope je rastlina s vysokou výťažnosťou vlákna a je považovaná za ekologickú, takže má potenciál stať sa udržateľným zdrojom vlákien na textílie. V porovnaní s najpoužívanejším zdrojom textilného vlákna – bavlnou, je jej pestovanie kratšie, keďže sa vlákno zbiera už pred kvitnutím a vyžaduje aj menej zavlažovania. Ďalšou výhodou je jej pestovanie primárne v Európe, čo vyhovuje zvyšujúcemu sa dopytu po lokálnych produktoch hlavne v Európe, ktorá je svetový líder v ekologických zámeroch [36][40].

Tým, že je celosvetový trend legalizovať pestovanie technickej konopy, začína byť jej pestovanie viac konkurencieschopné. Na rozdiel od pôvodných surovín, ako bavlna, nie je konopa závislá na chemikáliách. Jej využitím ako suroviny na výrobu papiera sa obmedzí zasahovanie do lesov, naopak, jej samotný rýchly rast znižuje koncentráciu CO<sub>2</sub> v atmosfére [26].

## **2.8 Analytické metódy**

### **2.8.1 Chromatografia**

Chromatografia je separačná metóda využívajúca dve fyzikálne odlišné fázy na oddelenie separovaných látok. Jedna fáza je nepohyblivá – stacionárna, druhá pohyblivá – mobilná. Pohybom mobilnej fázy sú molekuly vzorky unášané a na základe odlišnej afinity ku mobilnej

a stacionárnej fáze sú látky separované. Uplatňujú sa tu intermolekulárne sily (hydrofilné, hydrofóbne, elektrostatické...) [41].

Podľa mechanizmu interakcie látky s fázami sa rozlišuje adsorpčná, rozdeľovacia, ionexová, gélová permeačná a afinitná chromatografia.

Tabuľka 2 Typy interakcií v chromatografii

| Typ                    | Rozdeľovacia vlastnosť zložiek            |
|------------------------|-------------------------------------------|
| Adsorpčná rozdeľovacia | Schopnosť zložiek pútať sa na SF          |
| Rozdeľovacia           | Rozpustnosť zložiek v MF a SF             |
| Ionexová               | Príťažlivé sily pôsobiace na zložky od SF |
| Gélová permeačná       | Veľkosť zložiek na pórovitej SF           |
| Afinitná               | Úzko selektívna afinita zložky ku SF      |

Mobilnou fázou je pri plynovej chromatografii plyn, pri kvapalinovej chromatografii kvapalina, alebo tekutina v nadkritickom stave pri chromatografii s nadkritickou mobilnou fázou.

V chromatografickej sústave je zaradený aj detektor, teda chromatografická separácia súčasne poskytuje identifikáciu látky a stanovenie koncentrácie pri porovnaní so štandardmi, čiže kvalitatívnu aj kvantitatívnu analýzu. Pri kolónovej chromatografii vzniká chromatogram, ako vyhodnotenie signálov z detektoru. Plocha píku je priamo úmerná množstvu látky [42].

## 2.8.2 Spektrofotometria

Spektrofotometria UV-VIS (ultrafialová a viditeľná oblasť) je inštrumentálna analytická metóda využívajúca optické vlastnosti chemických látok. Počas analýzy je sledovaná interakcia molekúl so žiarením. Molekuly absorbujúve žiarenie v rozmedzí 200-800 nm vytvárajú zmeny množstva žiarenia dopadajúceho na detektor. Využitím spektrofotometrie je možné analyzovať látku kvalitatívne, keď sú absorpčné spektrá analyzovaných látok porovnané so spektrami štandardov. Princíp kvantitatívnej analýzy opisuje Lambert-Beerov zákon, podľa ktorého je absorbancia lineárne závislá na koncentrácii vzorky, molárnom absorpčnom koeficiente a hrúbke kyvety. Ako zdroj žiarenia v spektrofotometrii sa používa wolfrámová lampa, vodíková alebo deutériová výbojka. Žiarenie je rozdelené na jednotlivé vlnové dĺžky monochromátorom, a tie sú zamierené na kyvetu so vzorkou. Meraná veličina je absorbancia žiarenia pri prestupe vzorkou. Na konci prístroja je umiestnený detektor, najčastejšie sa využíva fotodióda [43].

## 2.8.3 Antimikrobiálne testy

Testy citlivostí mikroorganizmov na analyzovanú látku patria medzi základné mikrobiologické metódy. Týmito metódami možno zistiť hodnotu minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC), čo je kľúčový ukazovateľ antimikrobiálneho účinku látky. Označuje sa tak koncentrácia danej látky, ktorá viditeľne zabraňuje rastu kultúry za definovaných podmienok [44].

Ďalšia hodnota, ktorá sa dá určiť antimikrobiálnymi testami je minimálna antimikrobiálna (baktericídna) koncentrácia, MBC, teda koncentrácia danej látky, pri ktorej mikroorganizmus za daných podmienok neprežije a nie je schopný sa množiť.

Jamkový dilučný test sa vykonáva na mikrotitračných doštičkách s 96 jamkami. Jamky obsahujú kultúru skúmaného mikroorganizmu a antimikrobiálnu látku. Po inkubácii v optimálnych podmienkach pre daný mikroorganizmus je do jamiek pridaná modrá látka resazurín, ktorá sa v prostredí aktívneho metabolizmu bunky zoxидуje na ružovú látku resorufín. Antimikrobiálny účinok je vyhodnocovaný vizuálne alebo fotometricky. Zároveň s meraním účinku vzoriek na mikroorganizmus je potrebné vykonať aj kontroly čistoty jednotlivých zložiek obsahu jamky [43].

Minimálna antimikrobiálna koncentrácia je zistená preočkovaným inkubovaným kultúr na tuhý agar bez inhibítorov. Misky sú po inkubácii v optimálnych podmienkach pre daný mikroorganizmus vyhodnotené vizuálne, hodnotí sa nárast kolónie, čo znamená, že daná kultúra je schopná sa množiť a tvoriť kolónie.

### **3 CIELE PRÁCE**

Ciele diplomovej práce so zameraním na komplexné využitie frakcií konopy siatej sú tieto:

- Teoretický prehľad – zloženie technickej konopy, spracovanie, produkty a ich aktívne látky.
- Optimalizácia postupov frakcionácie rastliny technickej konopy a analýza aktívnych zložiek
- Stanovenie aktívnych zložiek a biologických účinkov vybraných frakcií zo spracovania konopy.
- Vyhodnotenie a diskusia výsledkov

## 4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 4.1 Použité chemikálie, prístroje a mikroorganizmy

#### 4.1.1 Použité chemikálie

ABTS, Sigma Aldrich (SRN)  
Acetón, p.a., LachNer (ČR)  
Acetonitril pre HPLC, Gradient Grade, Sigma-Aldrich (SRN)  
Dusitan sodný, p.a., Lachema (ČR)  
Etanol, p.a., LachNer (ČR)  
Etanol pre UV-VIS, Lachema (ČR)  
Fenol, p.a., LachNer (ČR)  
Folin-Ciocalteu činidlo, Serva (SRN)  
Hydroxid sodný, p.a., LachNer (ČR)  
Hydroxid draselný, p.a., LachNer (ČR)  
Chlorid hlinitý, p.a., LachNer (ČR)  
Chloroform, VWR Chemicals BDH PROLABO (USA)  
Kanabidiol CBD, Sigma Aldrich (SRN)  
Kanabigerol CBG, Sigma Aldrich (SRN)  
Kanabichromen CBC, Sigma Aldrich (SRN)  
Kanabinol CBN, Sigma Aldrich (SRN)  
Katechín, Sigma Aldrich (SRN)  
Kyselina gallová, Sigma Aldrich (SRN)  
Kyselina sírová (96%), LachNer (ČR)  
Metanol pro HPLC, VWR Chemicals BDH PROLABO (GB)  
Octan amónný, p.a., Lachema (ČR)  
Peroxodisíran draselný, p.a., Sigma Aldrich (SRN)  
Trolox, Sigma Aldrich (SRN)  
Uhlíčan sodný, p.a., LachNer (ČR)  
Cetearylalkohol, Cetylalkohol Míča a Harašta s.r.o., Blansko (ČR)  
Glycerin bezvodý, p.a., LachNer (ČR)  
Polysorbát 80, Dr. Kulich Pharma, s. r. o. (ČR)  
Agar Powder, Himedia (IND)  
BHI médium, Himedia (IND)  
Glukóza monohydrát, p.a., LachNer (ČR)  
Kvasničný autokatalyzát, Himedia (IND)  
LB médium, Sigma-Aldrich (SRN)  
NB médium, Himedia (IND)  
Peptón, Himedia (IND)



#### 4.1.2 Použité prístroje

Analytické váhy Boeco (SRN)  
ELISA Reader BioTek ELx808, Biotek (SRN)  
Centrifúga Sigma Laborzentrifugen (SRN)  
Kolóna Arion Plus C18 3,0  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 150 mm, ARION CHROMATOGRAPHY  
Kolóna Kinetex 5  $\mu\text{C18}$ , 4,6 x 150 mm, Agilent Technologies (USA)  
Laminárny box Airstream, ESCO (SN)  
Magnetická miešačka, Lavat (ČR)  
Predvážky Kern 440-43, Kern & Sohn GmbH (SRN)  
HPLC/UV-VIS, ThermoFisher Scientific, Finnigan SURVEYOR (USA)  
HPLC/PDA/UV-VIS, ThermoFisher Scientific, ultimate 3000 (USA)  
Spektrofotometer VIS, Helios  $\delta$ , Unicam (GB)  
Sušiareň, Memmert GmbH + Co. KG (SRN)  
Temperovaná trepačka HeidolphUnimax 1010, Labicom (ČR)  
Ultrazvukový kúpeľ PS 02000 (ČR)  
Vakuová odparka RV 06, IKA (SRN)  
Vodný kúpeľ EL-20, Merci a.s. (ČR)  
Vortex, TK35, Kartell spa (USA)  
Systém MPA 5, Courage + Khazaka (SRN)  
Sonda Corneometer® CM 825  
Sonda Tewameter® TM 300

#### 4.1.3 Použité mikroorganizmy

|                                   |          |
|-----------------------------------|----------|
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | CCM 4418 |
| <i>Cutibacterium acnes</i>        | CCM 3437 |
| <i>Escherichia coli</i>           | CCM 3954 |

*Rhodospiridium toruloides* CCY 062-0002-001

#### 4.2 Analyzované konopné frakcie

V tejto diplomovej práci boli analyzované frakcie konopy siatej a vedľajšie produkty jej spracovania na CBD extrakt a konopný olej.

Konopa siata je spracovávaná nasledujúcim postupom: Z rastliny sú oddelené kvety a listy, ktoré sú spolu sušené a drvené. Počas tohto procesu z povrchu listov prirodzene opadávajú trichómy a usadzujú sa. Táto zmes kvetov a listov je extrahovaná 70% etanolom a vzniká CBD extrakt a vyextrahované zbytky. Stonky sú tiež oddelené a predstavujú odpadný produkt, čiže sú kompostované. Semienka konopy sú lisované za studena, pričom vznikajú výlisky (pelety) a surový olej, ktorý sedimentuje a je filtrovaný.

Frakcie konopy, ktoré boli analyzované boli nasledovné: 1) zmesi listov a kvetov konopy, 2) trichómy, 3) konopné semienka, 4) výlisky vo forme peliet, 5) sedimentačný kal a 6) konopné stonky. Zmes listov a kvetov je sypká zmes podobná čaju, ktorá obsahuje sušené listy a šišky konopy. Trichómy sú chlípky na povrchu listov rastliny a po sušení tvoria najjemnejšiu frakciu

usadenú pod zmesou listov a kvetov. Konopné semenka sú plody rastliny, v našom prípade sa jednalo o nelúpané semenka. Pri lisovaní semienok vzniká surový olej a výlisky – pelety. Tieto pelety boli pre účely každej analýzy a použitia pomleté v kuchynskom mixéri alebo vibračným mlynom podľa požadovanej veľkosti častíc a po pomletí boli označované ako konopná múka. Po vylisovaní oleja zo semien vzniká surový olej, ktorý sa nechá sedimentovať. Po odtečení panenského oleja ostáva sedimentačný kal obsahujúci konopný olej a nečistoty zo semienok, ktoré udávajú kalu vyššiu viskozitu. Konopné stonky sú zmes malých aj hrubších stoniek rastliny.

Zmesi listov a kvetov boli k dispozícii v troch odrodách – Fedora, Futura a Santhica. Z odrody Santhica boli frakcie z dvoch ročníkov. Z odrody Santhica boli analyzované aj vedľajšie produkty jej spracovania z roku 2019 aj 2021: konopné pelety a sedimentačné kaly. Prehľad vzoriek je uvedený v Tabuľke 3.

Tabuľka 3 Analyzované frakcie konopy siatej

| Frakcia              | Odroda   | Ročník | Označenie |
|----------------------|----------|--------|-----------|
| Zmes kvetov a listov | Fedora   | 2019   | KveFed19  |
|                      | Futura   | 2020   | KveFut20  |
|                      | Santhica | 2019   | KveSan19  |
|                      | Santhica | 2020   | KveSan20  |
| Semienka             | Santhica | 2020   | SemSan20  |
| Trichómy             | Santhica | 2020   | TriSan20  |
| Múka                 | Santhica | 2019   | MukSan19  |
| Múka                 | Santhica | 2020   | MukSan20  |
| Kal                  | Santhica | 2019   | KalSan19  |
| Kal                  | Santhica | 2020   | KalSan20  |
| Stonky               | Santhica | 2020   | StoSan20  |

#### 4.3 Príprava extraktov frakcií konopy

Z vybraných frakcií boli pripravené extrakty s použitím troch rozpúšťadiel – hexánu, 70% etanolu a destilovanej vody. Tieto rozpúšťadlá sú dobre dostupné, majú označenie GRAS (Generally Recognized as Safe) a sú rôznej polarít – nepolárny je hexán, stredne polárny etanol a polárna voda.

Hexánové a etanolové extrakty boli pripravené pomocou prístroja Soxtherm s príslušným extrakčným programom podľa manuálu výrobcu. Boli pripravené hexánové a etanolové extrakty ôsmich vybraných frakcií – štyroch zmesí listov a kvetov, semienok, trichómv a dvoch múk. Na analytických váhach bolo navážaných 5 g (iba v prípade múk 10 g) vzorky do celulózovej patróny, ktorá bola vložená do sklenenej nádoby od výrobcu. Extrahovaná vzorka bola prekrytá vatou a cez patrónu bolo pridaných 100 ml daného rozpúšťadla. Nádoba bola umiestnená do prístroja Gerhardt Soxtherm. Po ukončení extrakcie bol extrakt kvantitatívne prevedený do predom odváženej slzičkovej banky a zvyšky rozpúšťadla boli odparené na rotačnej vákuovej odparke. Extrakt bol zvážený na analytických váhach a z rozdielu navážok bol gravimetricky stanovený obsah lipidických látok vo vzorke. Extrakty boli následne

rozpustené v presnom objeme daného rozpúšťadla a boli uschovávané v sklenených liekovkách pri teplote -20 °C.

Vodný výluh bol pripravený zo všetkých jedenástich frakcií. Na analytických váhach bolo navážených 0,5 g vzorky, prevedených do 250 ml Erlenmayerovej banky a doplnených destilovanou vodou do 100 ml. Banky boli uzavreté a ponechané na trepačke 24 hodín. Po extrakcii boli tuhé zvyšky vzoriek odfiltrované a výluh bol uchovávaný v plastových skúmavkách v mrazničke.

#### **4.4 Stanovenie celkových rozpustných sacharidov podľa Dubois**

Rozpustné sacharidy boli stanovené spektrofotometricky podľa Dubois. Na zostrojenie kalibračnej krivky bol použitý základný vodný roztok glukózy o koncentrácii 1 mg/ml a bolo merané koncentračné rozpätie 0,02 – 0,1 mg/ml. Pre stanovenie celkových sacharidov vo vzorkách bol do plastových uzatvárateľných skúmaviek odpipetovaný 1 ml roztoku vzorky, následne bol pridaný 1 ml 5% roztoku fenolu a 5 ml koncentrovanej kyseliny sírovej. Bolo potrebné dbať na čerstvosť roztoku fenolu, inak bola analýza nepresná. S chemikáliami bolo pracované v digestore a s rukavicami. Zmes bola pretrepaná a ponechaná 30 minút inkubovať pri laboratórnej teplote. Napokon bola na spektrofotometri zmeraná absorbanca pri vlnovej dĺžke 490 nm oproti slepej vzorke. Na dávkovanie zmesi do kyvety bola použitá automatická pipeta s cieľom obmedziť kontakt s kyselinou sírovou. Prípadné potrebné riedenie vzoriek bolo prevádzané destilovanou vodou.

#### **4.5 Stanovenie celkového dusíku a hrubej bielkoviny Kjeldahlovou metódou**

Na stanovenie obsahu bielkovín v konopných frakciách bola využitá Kjeldahlova metóda. Na filtračný papier bol navážený 1 g analyzovaného materiálu, bol do papiera zabalený a vložený do mineralizačných trubíc spolu s 2 g Weiningerovho katalyzátoru. V digestore bolo do trubíc pridaných 10 ml koncentrovanej kyseliny sírovej. Trubice boli vložené do mineralizačného bloku v prístroji Gerhardt Kjeldatherm, bol zapnutý program (whey flour) a prebehla mineralizácia, ktorá trvala asi 3 hodiny.

Po vychladnutí bol mineralizát premiešaný, podľa potreby bola pridaná destilovaná voda a tyčinkou boli rozmiešané vzniknuté kryštály. Bol pridaný indikátor fenoltaleín a trubica bola umiestnená do destilačného prístroja Gerhardt. Do prístroja bola vložená aj titračná banka s predlohou na spätnú titráciu – 25 ml 0,05M kyseliny sírovej. V prístroji bol k mineralizátu automaticky pridaný 33% roztok hydroxidu sodného a vzniknutý amoniak bol predestilovaný s vodnou parou do predlohy, program trval cca 4 minúty. Predloha bola po ukončení destilácie z prístroja vybratá s tým, že hadička bola opláchnutá destilovanou vodou, kvôli kvapkám vzniknutého hydroxidu amónneho. Predloha bola titrovaná 0,1M odmerným roztokom hydroxidu sodného (štandardizovaným na kyselinu salicylovú), na Tashirov indikátor. Ak množstvo predestilovaného amoniaku presiahlo kapacitu predlohy kyseliny sírovej (2,5 mmol dusíka, čo odpovedá asi 0,2 g bielkovín), predloha bola hneď po pridaní Taširovho indikátoru sfarbená na zeleno. Z tohto dôvodu bolo potrebné vedieť dopredu predpokladaný obsah bielkovín a prípadne mineralizát pred destiláciou vhodne nariediť (kvantitatívne preniesť do odmernej banky a doplniť destilovanou vodou; do destilačnej trubice pipetovať také množstvo

roztoku, aby bola vzorka vhodne zriedená). Zo spotreby bol vypočítaný obsah dusíka vo vzorke (Rovnica (1)).

$$w = \frac{\left[ c_{H_2SO_4} \cdot V_{H_2SO_4} - \left( \frac{c_{NaOH} \cdot V_{NaOH}}{2} \right) \right] \cdot 2 \cdot M}{m_{navážka}} \cdot 100\% \quad (1)$$

#### 4.6 Stanovenie obsahu lipidov a profilu mastných kyselín pomocou GC

Obsah lipidov a profil mastných kyselín bol stanovený pomocou plynovej chromatografie po transesterifikácii mastných kyselín vo vzorke. Bola pripravená transesterifikačná zmes, ktorej zloženie bolo 15%obj roztok  $H_2SO_4$  v metanole s obsahom interného štandardu – kyseliny heptadekanovej  $C_{17}$  v koncentrácii 0,5 g/l. Táto zmes bola uchovávaná v chlade, takže bola pred každým použitím zahriatá na izbovú teplotu.

V prípade analýzy hexánových extraktov bolo 300  $\mu$ l extraktu pipetovaných do krymplovacej vialky a odparených v termobloku v digestori pri 60 °C. V prípade stanovenia lipidov v biomase nakultivovaných kvasiniek bolo do krymplovacej vialky na analytických váhach navážených 10-15 mg lyofilizovanej biomasy.

Do vialky so vzorkou bolo pridaných 1,8 ml transesterifikačnej zmesi, vialka bola zakrymplovaná a inkubovaná dve hodiny v termobloku pri 85 °C, kedy prebehla transesterifikácia mastných kyselín. Po ochladení bolo do 4 ml vialky pridaných 0,5 ml 0,05M roztoku NaOH, ku ktorým bol pridaný obsah krymplovacej skúmavky a bol pridaný 1 ml hexánu pre HPLC. Táto zmes bola extrahovaná na multi-pozičnom vortexe asi 10 min. Po ustálení fáz bolo z hornej hexánovej vrstvy odpipetovaných 0,1 ml do GC vialky a doplnených 0,9 ml hexánu pre HPLC. Takto pripravené vzorky mohli byť analyzované na GC alebo skladované v mrazničke.

Bol použitý plynový chromatograf Trace GC s automatickým dávkovačom, objem dákovanej vzorky bol 0,1  $\mu$ l. Analýza na GC prebiehala pri 250 °C s prietokom 1 ml/min, nosný plyn bol vodík a analýza trvala 25,5 minúty. Na detekciu jednotlivých zložiek prístroj využíval plameňový ionizačný detektor.

Získané hodnoty boli vyhodnotené v programe Chromeleon 7.2, prevedené do MS Excel a spracované. Vyhodnocovaný bol celkový obsah lipidov a pomer nasýtených, mononenasýtených a polynenasýtených mastných kyselín.

#### 4.7 Stanovenie celkových fenolických látok

Na stanovenie obsahu fenolických látok bola použitá spektrofotomerická metóda. Kalibračná závislosť bola zhotovená s použitím kyseliny gallovej ako zástupcu polyfenolov. Boli pripravené kalibračné roztoky kyseliny gallovej v koncentráciách 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 a 0,5 mg/ml. Do skúmaviek bolo napipetovaných 1 ml Folin-Ciocaltovho činidla zriedeného destilovanou vodou v pomere 1:9, 1 ml destilovanej vody a 50  $\mu$ l vzorky. Zmes bola vortexovaná a inkubovaná 5 minút. Následne bol pridaný 1 ml nasýteného roztoku uhličitanu sodného, skúmavky boli vortexované a inkubované 15 minút. Pri slepej vzorke bolo namiesto vzorky pridané dané rozpúšťadlo.

Analýza polyfenolov v extraktoch prebiehala obdobne, rozdiel bol iba v tom, že bolo do slepej vzorky pridávané dané rozpúšťadlo. Na analýzu hexánových extraktov bolo do

skúmaviek napipetovaných 50  $\mu$ l extraktu, ktorý bol v digestore odparený (asi 30 min) a následne bol rozpustený v acetóne. Výmena hexánu za acetón bola nevyhnutná, pretože hexán nie je miešateľný s vodnými roztokmi používanými v priebehu analýzy. Bol zvolený acetón kvôli rozpustnosti organických molekúl, ale súčasnej miešateľnosti s vodou, nevýhodou bolo jeho rýchle odparovanie, čo bolo eliminované používaním mrazeného acetónu. Tieto vzorky boli merané oproti slepému vzorku obsahujúceho acetón.

Vzorky boli spektrofotometricky analyzované pri vlnovej dĺžke 750 nm. Z regresie kalibračnej krivky bola vypočítaná lineárna závislosť koncentrácie kyseliny gallovej na absorbancii, z ktorej bol vypočítaný celkový obsah polyfenolov v jednotlivých analyzovaných vzorkách frakcií konopy.

#### **4.8 Stanovenie celkových flavonoidov**

Na stanovenie obsahu flavonoidov bola použitá spektroskopická metóda s použitím katechínu na zostrojenie kalibračnej závislosti. Boli pripravené roztoky katechínu v koncentráciách 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 a 0,4 mg/ml. Do skúmaviek bolo napipetovaných 1,5 ml destilovanej vody, 0,5 ml vzorky a 0,2 ml 5% roztoku dusičnanu sodného. Skúmavka bola vortexovaná a inkubovaná 5 minút. Následne bolo do zmesi pridaných 0,2 ml 10% roztoku chloridu hlinitého, skúmavka bola opäť vortexovaná a inkubovaná ďalších 5 minút. Potom bolo pridaných 1,5 ml 1M roztoku hydroxidu sodného a 1 ml destilovanej vody, zmes bola vortexovaná a inkubovaná 15 minút. V prípade slepej vzorky bolo použité rozpúšťadlo namiesto roztoku katechínu.

Analýza extraktov prebiehala rovnako, s rozdielom hexánových vzoriek, ktoré boli pipetované do skúmavky a nechané v digestore na odparenie hexánu (pri zvislej polohe to trvalo asi 6 hodín) a boli rozpustené v acetóne.

Počas inkubácie skúmaviek boli v zmesi tvorené zrazeniny, takže boli vzorky pred analýzou prevedené do Eppendorfovej skúmavky a centrifugované pri 14000 Hz 1 minútu. Vzorky boli spektroskopicky merané pri vlnovej dĺžke 510 nm oproti slepej vzorke. Z regresie kalibračnej krivky bola vypočítaná lineárna závislosť koncentrácie katechínu na absorbancii, z ktorej bol vypočítaný obsah celkových flavonoidov v jednotlivých analyzovaných vzorkách frakcií konopy.

#### **4.9 Stanovenie antioxidačnej aktivity**

Spektrofotometrické stanovenie antioxidačnej aktivity využíva látku ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina) ako oxidovadlo, ktoré po reakcii s antioxidantom zhaša radikál a roztok ABTS stráca sfarbenie. Meria sa prebytok ABTS v roztoku.

Roztok ABTS bol zriedený etanolom pre UV-VIS na výslednú absorbáciu 0,7 pri vlnovej dĺžke 734 nm. Boli pripravené kalibračné roztoky Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2- karboxylová kyselina) v 60% vodnom roztoku etanolu pre UV-VIS s koncentráciou 50; 100; 200; 300 a 400  $\mu$ g/ml. Na spektrometrickú analýzu boli použité zúžené kvety.

Do skúmaviek bolo napipetovaných 10  $\mu$ l vzorky. Následne bol do slepej vzorky pridaný 1 ml roztoku ABTS a ešte pred pipetovaním do analyzovaných vzoriek bola zmeraná absorbancia slepej vzorky v čase 0 oproti 60% roztoku etanolu pre UV-VIS. Potom bol

pridaný 1 ml roztoku ABTS do všetkých vzoriek a boli inkubované 10 minút v tme a následne bola zmeraná absorbancia oproti 60% roztoku etanolu pre UV-VIS. V prípade hexánových extraktov bolo 10 µl vzorky odparené a rozpustené priamo v 1 ml roztoku ABTS. Slepá vzorka v tom prípade predstavovala iba roztok ABTS.

Výsledné absorbancie vzoriek, ktoré boli použité na vyhodnotenie analýzy, boli dosiahnuté odčítaním hodnoty absorbancie vzorky v čase 10 min od absorbancie slepej vzorky v čase 0 min. Z regresie kalibračnej krivky bola vypočítaná lineárna závislosť koncentrácie Troloxu na absorbancii, z ktorej bol vypočítaný obsah antioxidantov v jednotlivých analyzovaných vzorkách frakcií konopy.

#### 4.10 Stanovenie chlorofylov

Množstvo chlorofylov bolo stanovené spektrofotometricky. Extrakty boli vhodne nariadené príslušným rozpúšťadlom a boli spektroskopicky analyzované pri vlnovej dĺžke  $\lambda = 645$  nm a  $\lambda = 663$  nm. Koncentrácie chlorofylu A (ca) a chlorofylu B (cb) boli vypočítané podľa nasledujúcich vzťahov:

$$c_a = 12,70 \cdot A_{663} - 2,69 \cdot A_{645} [mg \cdot l^{-1}]$$

$$c_b = 22,90 \cdot A_{645} - 4,68 \cdot A_{663} [mg \cdot l^{-1}]$$

#### 4.11 Stanovenie kanabinoidov pomocou HPLC

Obsah kanabinoidov v hexánových a etanolových extraktoch bol analyzovaný na HPLC. Vzorky hexánových extraktov boli vhodne riedené, hexánové extrakty boli odparené a rozpustené v acetonitrile.

Mobilnou fázou A bol acetonitril pre HPLC a mobilná fáza B bola Milli-Q voda. Bola použitá gradientová elúcia (Tabuľka 4) s prietokom 1 ml/min a kolóna Arion Plus C18 3,0 µm 150 mm x 4,6 mm. Teplota separácie bola 30 °C a bol využitý detektor s diódovým poľom.

Bola nameraná kalibrácia zmesi kanabinoidov (CBG, CND, CBN, CBC) v koncentračnom rozpätí 5 – 200 mg/ml a z jej rovnice krivky kalibračnej boli vypočítané koncentrácie jednotlivých kanabinoidov vo vzorkách.

Tabuľka 4 Tvar gradientu u elúcie kanabinoidov pri HPLC stanovení

| Čas (min) | MF A (%) | MF B (%) |
|-----------|----------|----------|
| 0,0       | 30       | 70       |
| 0,3       | 30       | 70       |
| 2,3       | 100      | 0        |
| 5,3       | 100      | 0        |
| 8,3       | 30       | 70       |
| 11,0      | 30       | 70       |

#### 4.12 Stanovenie antimikrobiálneho účinku

Hexánové a etanolové extrakty frakcií konopy boli testované na antimikrobiálny účinok dilučným jamkovým testom, kontrolou usmrtenia buniek a kontrolou životaschopnosti buniek. Antimikrobiálny účinok bol stanovovaný voči 3 mikroorganizmom, a to *Staphylococcus epidermidis*, *Cutibacterium acnes* a *Escherichia coli*.

Na kultiváciu *Staphylococcus epidermidis* a *Cutibacterium acnes* bolo používané médium BHI (Brain heart infusion) a na kultiváciu *Escherichia coli* médium LB (Lysogeny Broth). Pred prípravou mikrotitračných doštičiek boli zaočkované kultúry mikroorganizmov do tekutého média a ponechané inkubovať 24 hodín pri teplote 37°C.

##### 4.12.1 Jamkový dilučný test

Na jednej mikrotitračnej doštičke s 96 jamkami boli analyzované hexánové a etanolové extrakty v štyroch koncentráciách. Ďalej boli vykonané kontroly čistoty média, merania antimikrobiálneho účinku rozpúšťadiel, takisto v štyroch koncentráciách a antimikrobiálneho účinku antibiotika ampicilín v štyroch koncentráciách (pozitívna kontrola). Na doštičke boli aj jamky s čistou kultúrou bez inhibície a jamky so vzorkami extraktov bez kultúry (negatívna kontrola).

Pred očkovaním doštičky boli 24-hodinové kultúry mikroorganizmov vhodne zriedené sterilným médiom. Na začiatku očkovania doštičky bolo do všetkých jamiek pridaných 100 µl média s použitím multikanálovej pipety. Do jamiek s najvyššou (výslednou) koncentráciou vzorky bolo pridaných 50 µl média navyše a 50 µl extraktu, pipetou bol obsah jamky zamiešaný a 100 µl bolo prenesených do druhej koncentračnej rady. Postup bol štyrikrát zopakovaný a posledných 100 µl bolo odpipetovaných do odpadu, čím bolo dosiahnuté postupné riedenie a rovnaký objem v každej jamke. Podobný postup riedenia bol použitý na pipetovanie koncentračnej rady ampicilínu, kontrol rozpúšťadiel a kontrol extraktov. Nakoniec bolo do každej jamky (okrem kontroly extraktov) pipetovaných 100 µl kultúry.

Takto pripravené mikrotitračná doštička bola analyzovaná pomocou ELISA readeru pri  $\lambda = 630 \text{ nm}$  v čase 0 a potom po 24-hodinovej kultivácii pri 37 °C.

Výsledky boli vyhodnotené v programe MS Excel. Hodnoty nárastu buniek vo všetkých jamkách boli prepočítané na percento nárastu oproti nárastu čistej kultúry bez inhibície.

##### 4.12.2 Kontrola schopnosti buniek tvoriť kolónie

Boli pripravené tuhé agarové médiá v Petriho miskách a zo spodku misky boli prilepené mriežky (vid' Tabuľka 5) s 96 okienkami odpovedajúcimi rozloženiu jamiek v mikrotitračnej doštičke. Po 24-hodinovej inkubácii mikrotitračnej doštičky a po zmeraní v ELISA readri v čase 24 hod boli zmesi z jednotlivých jamiek zaočkované na tuhé agarové médium pomocou sterilných špáradiel. Vpichy boli umiestňované na základe nalepenej mriežky, aby odpovedali jamke na doštičke. Takto zaočkované Petriho misky boli 24 hodín inkubované pri 37 °C a následne bolo vizuálne vyhodnotené, ktoré jamky obsahovali živé mikroorganizmy.

Tabuľka 5 Mriežka pod Petriho miskou

|   | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| B |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| C |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| D |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| E |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| F |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| G |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| H |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |

#### 4.12.3 Kontrola metabolickej aktivity buniek resazurínom

Po 24 hodinách inkubovania a po druhom zmeraní pri  $\lambda = 630$  nm bolo do jamiek obsahujúcich kultúru pridaných 20  $\mu$ l sterilného roztoku resazurínu s koncentráciou 0,15 mg/ml. Resazurín je farebný (tmavofialový) indikátor, ktorý je redukovaný na ružový resorufín aeróbnym dýchaním metabolicky aktívnych buniek a bol používaný ako indikátor životaschopnosti buniek. Mikrotitračná doštička bola inkubovaná 30 minút pri 37°C a bola zmeraná absorbancia obsahu jamiek pomocou ELISA readeru pri vlnových dĺžkach 570 a 607 nm. Výsledky boli vyhodnotené vizuálne na základe zafarbenia jamiek.

#### 4.13 Kultivácia kvasiniek na konopnom substráte

Na kultiváciu karotenogénnej kvasinky *Rhodospiridium toruloides* boli použité tri druhy odpadných substrátov z výroby CBD extraktov, a to konopná múka, sedimentačný kal a zvyšky kvetov po extrakcii etanolom. Boli použité štyri rôzne odrody kvetov a dva ročníky konopných múk.

##### 4.13.1 Hydrolýza konopných frakcií

Konopné substráty bolo potrebné upraviť hydrolýzou na získanie dostupného zdroja uhlíku. V prípade substrátu z kalov bola prevedená bázičná hydrolýza triacylglycerolov. Do pyrexovej fľaše bolo pridaných 500 ml destilovanej vody, 50 g kalu a 12 g hydroxidu draselného. Fľaša bola zahrievaná a miešaná na magnetickej miešačke pri 65 °C asi 4 hodiny. Po prebehnutí hydrolýzy bol nadbytok hydroxidu zneutralizovaný na neutrálne pH kyselinou sírovou. V prípade ostatných substrátov bola vykonaná kyslá hydrolýza polysacharidov. Do pyrexovej fľaše boli navážené 4 g zvyškov po extrakcii, respektíve 45 g múky a boli doplnené 250 ml 1% roztoku kyseliny sírovej. Táto zmes bola autoklávovaná. Po ochladení bola zmes neutralizovaná na ideálne pH pre enzým celulóza (4,5 – 5,5) a bolo pridaných 200  $\mu$ l enzýmu. Fľaše boli umiestnené na magneticú miešačku a boli ponechané hydrolyzovať počas noci pri 75 °C.

Vo všetkých hydrolyzátoch bol analyzovaný obsah sacharidov. V prípade hydrolyzátoch kalu bola zmes filtrovaná Büchnerovou filtráciou, do skúmavky boli odpipetované 2 ml vzorky hydrolyzátu, boli pridané 2 ml hexánu a zmes bola pretrepaná. Pre vyčistenie vodnej fázy bola skúmavka centrifugovaná. Vzorka spodnej vodnej fázy bola prefiltrovaná a bola analyzovaná kvapalinovou chromatografiou na určenie obsahu glycerolu. Hydrolyzáty múk a zvyškov po extrakcii boli prefiltrované Büchnerovou filtráciou. Boli odobrané vzorky, ktoré boli 400 až 500-krát zriedené a na analýzu obsahu sacharidov bola použitá metóda podľa Duboisu opísaná v kapitole 4.4.



#### 4.13.2 Príprava médií a kultivácia

Boli pripravené a sterilizované inokulačné médiá YPD do Erlenmayerových baniek. Inokulum I bolo zaočkované kvasinkou z pevnej agarovej pôdy. Po 24 hodinách inkubácie na trepačke za laboratórnych podmienok pod stálym zdrojom svetla bolo 15 ml Inokula I zaočkovaných do Inokula II. Aj toto inokulum bolo za rovnakých podmienok inkubované 24 hodín a následne boli produkčné médiá pripravené z hydrolyzátov konopných frakcií zaočkované 10 ml Inokula II.

Produkčné médiá boli pripravené z hydrolyzátov konopných frakcií. Bol známy obsah glycerolu v hydrolyzátach kalov a obsah sacharidov v hydrolyzátach múk a zbytkov po extrakcii. Obsah dusíku bol známy z Kjeldahlovej metódy stanovenia dusíku. Do Erlenmayerovej banky bolo pridaných 50 ml hydrolyzátu a dopredu vypočítané množstvo glukózy a močoviny, aby bola v médiu dostatočná koncentrácia zdroja uhlíku a dusíku – 30 g/l sacharidov a 0,84 g/l dusíku. Ďalej boli pridané zlúčeniny s biogénnymi prvkami, a to  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,7 g/l. Pridané látky do hydrolyzátov opisuje Tabuľka 6.

Zaočkované produkčné médiá boli inkubované 96 hodín na trepačke pod stálym zdrojom svetla za laboratórnych podmienok.

Tabuľka 6 Pridávky látok do 50 ml hydrolyzátu konopných frakcií pre kultiváciu kvasiniek

|                                                                  | KveFed<br>19 | KveFut<br>20 | KveSan<br>19 | KveSan<br>20 | MukSan<br>19 | MukSan<br>20 | KalSan<br>19 | KalSan<br>20 |
|------------------------------------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <b>Pridavok glukózy (g)</b>                                      | 0,54         | 0,62         | 1,27         | 1,17         | 0,98         | 0,99         | 0,98         | 0,94         |
| <b>Pridavok močoviny (g)</b>                                     | 0,06         | 0,05         | 0,06         | 0,06         | -            | -            | 0,08         | 0,08         |
| <b><math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math> (g)</b>                   | 0,20         | 0,20         | 0,20         | 0,20         | 0,20         | 0,20         | 0,20         | 0,20         |
| <b><math>\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}</math> (g)</b> | 0,04         | 0,04         | 0,04         | 0,04         | 0,04         | 0,04         | 0,04         | 0,04         |

#### 4.13.3 Spracovanie a analýza kvasinkovej biomasy

Po štyroch dňoch kultivácie bolo z médií odobraných 50 ml do centrifugačnej skúmavky. Skúmavky boli dvakrát centrifugované, medzi jednotlivými stáčaniami bola biomasa premytá destilovanou vodou. Supernatant bol vyliaty a biomasa bola lyofilizovaná. Lyofilizát bol zvážený na analytických váhach a boli odobraté malé množstvá na analýzu lipidov (postup stanovenia opísaný v kapitole 4.6) a analýzu karotenoidov a ergosterolu na HPLC.

Na analýzu na HPLC bolo do závitových plastových skúmaviek navážených 15-20 mg biomasy a bol pridaný 1 ml destilovanej vody. Po 30-minútovej rehydratácii boli skúmavky centrifugované (1400 Hz/3 min) a bol odliaty supernatant. Bolo pridaných asi 0,5 ml sklenených guľčiek a skúmavky boli na 10 sekúnd vortexované na homogenizéri. Obsah bol preliaty do 15ml skúmavky, boli pridané 2 ml chloroformu a skúmavky boli vortexované 10 minút na multi-pozičnom vortexe. Do zmesi bol pridaný 1 ml destilovanej vody, skúmavka bola zamiešaná a centrifugovaná pri 3000 Hz 1 minútu. Spodná chloroformová vrstva bola kvantitatívne odpipetovaná do 15 ml sklenenej skúmavky. Roztok bol v termobloku odparený

s pôsobením dusíka pri 45 °C. Odparok bol rozpustený v 1 ml zmesi acetonitril:etylacetát 2:1, prefiltrovaný cez PTFE filter a analyzovaný na prístroji HPLC.

#### 4.14 Využitie konopných frakcií v kozmetike

Na báze vedľajších produktov zo spracovania konopy siatej bol vyrobený plet'ový peeling. Produkt bol určený na odstraňovanie odumretých častí pokožky a čistenie pórov od starého mazu. Na jeho výrobu bol použitý sedimentačný kal v kombinácii s konopným olejom, ktoré v peelingu slúžili ako rozpúšťadlo na odstránenie mazu. Okrem tejto funkcie konopný olej obsahuje aktívne látky, ktoré predchádzajú tvorbe akné. Druhým odpadným produktom použitým v peelingu bola konopná múka zastávajúca abrazívnu funkciu. V komerčne dostupných peelinguoch sú na tento účel často používané polyetylénové mikroguličky, ktoré avšak v podobe mikroplastov kontaminujú životné prostredie, predovšetkým povrchové vody. Správne namletá konopná múka by mohla predstavovať ich prírodnú a biodegradabilnú alternatívu.

##### 4.14.1 Výroba plet'ového peelingu

Do čistej kadičky boli navážené všetky tukové zložky a emulgátor (olej, kal, cetearyl alkohol a polysorbát 80). Kadička bola umiestnená do vriaceho vodného kúpeľa a zmes bola miešaná, až do rozpustenia cetearyl alkoholu. Medzitým boli do druhej čistej kadičky navážené sypké zložky (kaolín a konopná múka) a následne boli vmiešané do rozpustenej tekutej časti. Po ochladení boli do zmesi pridané vonné esencie. Zmes bola poriadne premiešaná a ešte v tekutom stave dávkovaná do čistej plastovej fľaštičky.

Tabuľka 7 Receptúra plet'ového peelingu

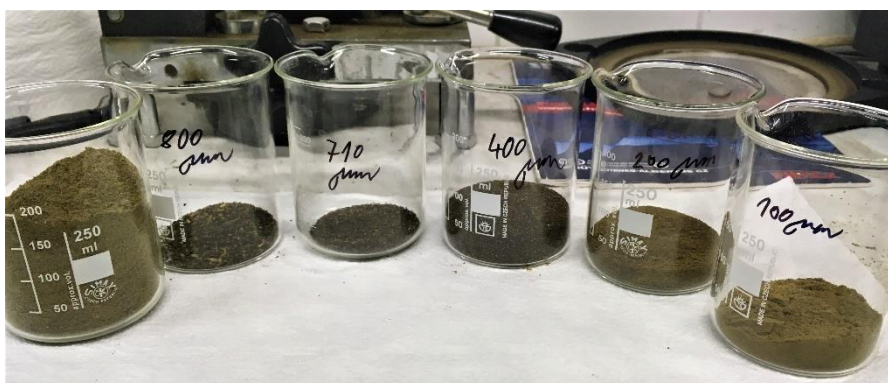
| Zložka              | Obsah (%) |
|---------------------|-----------|
| Konopný kal         | 31,70     |
| Kaolín              | 28,20     |
| Konopný olej        | 17,70     |
| Konopná múka 400 µm | 8,56      |
| Konopná múka 200 µm | 2,14      |
| Cetearyl alkohol    | 8,50      |
| Polysorbát 80       | 2,70      |
| Esencia kajeput     | 0,40      |
| Esencia geranium    | 0,10      |

Po prvotnom vyskúšaní produktu bola optimalizovaná hustota prídavkom kaolínu (zahusťovadlo). Peelingový efekt prvého produktu bol príliš silný, až nepríjemný. Bolo to spôsobené veľkosťou a tvarom častíc múky pomixovanej v kuchynskom mixéri. Preto boli vyisované konopné pelety pomleté pomocou vibračného mlyna a častice múky boli rozdelené na sústave sít (viď Obrázok 4). Boli použité sítá s veľkosťou ôk 100, 200, 400, 710 a 800 µm. Preosiate frakcie sa od seba líšili farbou, tvarom častíc a distribúciou (viď Obrázok 5). Pri nasledujúcej príprave peelingu boli do produktu vmiešané múčne frakcie s veľkosťou častíc

200 a 400  $\mu\text{m}$  a bolo vyhodnotené, že do výsledného produktu budú pridané obe frakcie v pomere 8:2. Frakcia s veľkosťou častíc 200  $\mu\text{m}$  zabezpečovala jemný abrazívny efekt, na druhú stranu frakcia s veľkosťou častíc 400  $\mu\text{m}$  pôsobila masážnym dojmom a prekrvila pokožku. Daný pomer zabezpečil účinný mechanický peeling odumretých buniek pokožky a zároveň príjemný pocit pri aplikácii. Po optimalizácii zloženia peelingu boli vybraté esencie pre vhodnú parfumáciu. Výsledné zloženie produktu znázorňuje Tabuľka 7.



Obrázok 4 Vibračný mlyn a sústava síť



Obrázok 5 Frakcie konopnej múky (zľava pomixovaná múka, frakcia 800  $\mu\text{m}$ , frakcia 710  $\mu\text{m}$ , frakcia 400  $\mu\text{m}$ , frakcia 200  $\mu\text{m}$ , frakcia 100  $\mu\text{m}$ )

#### 4.14.2 Hodnotenie plet'ového peelingu

Peeling bol senzoricky analyzovaný respondentami, ktorý produkt dva týždne používali. Senzorická analýza obsahovala vyplnenie dvoch online dotazníkov - po prvom použití a po dvoch týždňoch používania. Prvý dotazník bol zameraný na hodnotenie prvého dojmu z produktu, druhý dotazník na celkový dojem a pozorované účinky na plet'. Ukážka dotazníkov je v Prílohe E.

Respondenti používali peeling trikrát do týždňa podľa návodu na použitie. Hodnotitelia dostali vzorku peelingu nadávkovaného do plastových fľaštičiek. Odhadnuté potrebné množstvo na jedno použitie bolo 5 g, čiže 30 g na 6 použití. Počas trvania testovania bol s hodnotiteľmi udržiavaný kontakt a priebežne im bolo pripomínané, aby na aplikovanie nezabudli.

#### 4.14.3 Meranie hydratácie pokožky a transepidermálnej straty vody

Na meranie hydratácie pokožky a transepidermálnej straty vody (TEWL) boli použité sondy Corneometer a Tewameter zapojené v systéme MPA 5 Courage + Khazaka. Na vnútorné predlaktie boli fixou vyznačené dve oblasti na prikladanie sond. V prípade merania hydratácie bolo zmeraných osem hodnôt, z ktorých bola vypočítaná priemerná hodnota a v prípade TEWL bolo meranie opakované trikrát. Následne bol vypočítaný priemer z dvoch oblastí predlaktia. Bola premeraná pokožka bez aplikovaného produktu, 15 minút po aplikácii produktu a 24 hodín po aplikácii produktu.

#### 4.15 Využitie konopných frakcií v potravinárstve

##### 4.15.1 Výroba raw tyčinky

Raw tyčinka bola vyrobená s použitím konopnej múky a receptúrou podobnou komerčne dostupným raw tyčinkám s obsahom konopného proteínu. Vylisované pelety boli pomixované v kuchynskom mixéri na konopnú múku. Mixovanie bolo opakované dvakrát s cieľom dosiahnuť textúru podobnú hladkej múke a po prvom mixovaní bola múka preosiatá kuchynským sitom, za účelom odstránenia najväčších častíc.

Receptúra tyčinky je zobrazená v Tabuľke 8. Najprv bolo navážené kakaové maslo, ktoré bolo rozpustené vo vriacom vodnom kúpeli. Vlašské orechy boli kuchynským nožom nasekané na malé kúsky. Do misky boli navážené suroviny, bolo pridané rozpustené kakaové maslo, zmes bola poriadne premiešaná a následne bola vytvarovaná tyčinka. Produkt bol zabalený do potravinárskej fólie a uchovávaný pri 4 °C.

Tabuľka 8 Receptúra raw tyčinky

| Zložka         | Obsah (%) |
|----------------|-----------|
| datľová pasta  | 45        |
| konopná múka   | 25        |
| kakaové maslo  | 17        |
| kakaový prášok | 5         |
| vlašské orechy | 8         |

##### 4.15.2 Senzorická analýza raw tyčiniek

Senzorická analýza raw tyčiniek s konopným proteínom prebiehala dňa 13.7.2021 od 9. do 14. hodiny v laboratóriu senzorickej analýzy VUT FCH. Na jej prevedenie boli použité tanieri s označením kódov vzoriek, poháre na vodu, vytlačené dotazníky a perá. Hodnotenia sa

zúčastnilo celkom 22 hodnotiteľov - študentov a zamestnancov VUT FCH. Hodnotitelia reprezentovali bežných spotrebiteľov, nakoľko neboli špeciálne zaučení, dotazník bol vyplnený na základe úvodných inštrukcií. Boli hodnotené štyri vzorky, z toho jedna bola raw tyčinka vyrobená z analyzovanej konopnej múky, dve komerčne dostupné raw tyčinky s obsahom konopného proteínu a jedna komerčne dostupná tyčinka s iným druhom proteínu. Dodávatelia, kódy a zloženie tyčínok je uvedené v Tabuľke 9.

Tabuľka 9 Špecifikácia vzoriek

| Názov                                        | Kód | Zloženie (uvedené výrobcom)                                                                                                                      |
|----------------------------------------------|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Marva (grizly.cz)                            | A1  | Datle 53 %, konopný proteín, kešu maslo 11 %, kakao z nepražených kakaových bobů, konopné semínko, dýňové semínko                                |
| naša tyčinka                                 | A2  | Tabuľka 8                                                                                                                                        |
| Lifebar                                      | A3  | Datlová pasta 54%, orechy (kešu, mandle, lieskovooriešková pasta) 30 %, čokoláda 15,5 %, vanilka                                                 |
| Raw cannabis protein bar (konopex-market.cz) | A4  | Datlová pasta, konopná bielkovina 10 %, pražené lískové orechy 10 %, konopné semínko, kakaové maslo, kakaový prášok so zníženým obsahom tuku 6 % |

Senzorická analýza pozostávala z hodnotenia vzoriek s použitím stupníc, hodnotenia senzorického profilu a zostavenia poradia podľa celkovej prijateľnosti vzorku. Pre hodnotenie vzhľadu, konzistencie, vône a celkovej chuti bola použitá grafická neštruktúrovaná stupnica hedonického typu. Pri profilovom teste boli hodnotené deskriptory chuti (sladká, kyslá, horká a pachuť) na stupnici intenzitného typu. Formulár pre senzorické hodnotenie je uvedený v Prílohe F. Na spracovanie výsledkov bol použitý program MS Excel.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

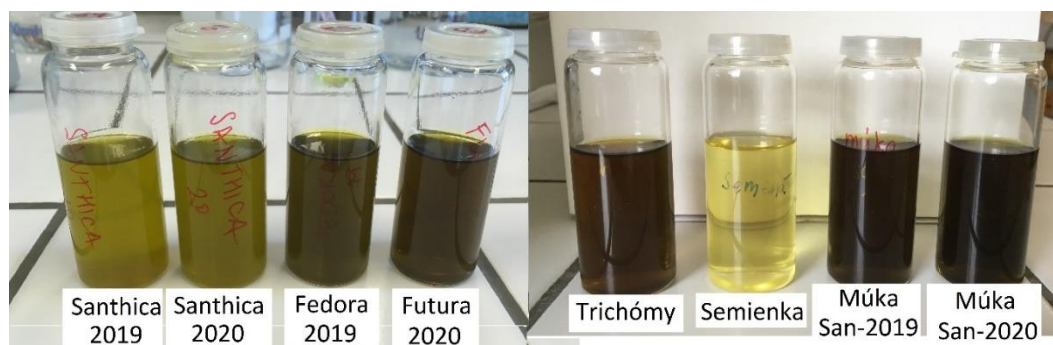
### 5.1 Príprava extraktov

Podľa postupu v kapitole 4.3 boli pripravené extrakty vybraných ôsmich konopných frakcií (Tabuľka 10) s použitím hexánu a 70% etanolu ako extrahovadiel pomocou prístroja Soxtherm. Po ukončení extrakčných programov a po dodatočnom odparení zvyšku rozpúšťadla bolo gravimetricky stanovené množstvo vyextrahovaných lipidov a lipidických látok. Po opätovnom rozpustení v určenom množstve rozpúšťadla (hexánové extrakty 20 ml, etanolové extrakty 50 ml) bola vypočítaná koncentrácia extraktov (viď Tabuľka 10). Vzhľadom na rozdielnu polaritu použitých rozpúšťadiel boli aj výsledné extrakty odlišné, etanolové boli vizuálne tmavšie a po zmrazení obsahovali vyšší podiel nerozpustných častí, preto boli odparky rozpustené vo väčšom objeme rozpúšťadla ako hexánové. Extrakty boli uchovávané v sklenených liekovkách.

Okrem extraktov boli pripravené aj výluhy všetkých jedenástich frakcií konopy v destilovanej vode, podľa kapitoly 4.3, a boli uskladňované v plastových skúmavkách. V týchto výluhoch bol okrem obsahu ostatných meraných látok stanovený aj obsah rozpustných sacharidov. Všetky tri druhy konopných extraktov boli uchovávané uzavreté pri teplote -20 °C.

Tabuľka 10 Koncentrácia extraktov

| Vzorka   | Koncentrácia extraktu (mg lipidických látok/ml extr. činidla) |                    |
|----------|---------------------------------------------------------------|--------------------|
|          | Hexánové extrakty                                             | Etanolové extrakty |
| KveFed19 | 10,35                                                         | 22,38              |
| KveFut20 | 18,85                                                         | 23,81              |
| KveSan19 | 7,92                                                          | 17,07              |
| KveSan20 | 7,93                                                          | 27,43              |
| SemSan20 | 16,76                                                         | 10,38              |
| TriSan20 | 37,71                                                         | 29,91              |
| MukSan19 | 43,19                                                         | 23,62              |
| MukSan20 | 43,90                                                         | 23,03              |



Obrázok 6 Hexánové extrakty





Obrázok 7 Etanolové extrakty

## 5.2 Stanovenie rozpustných sacharidov

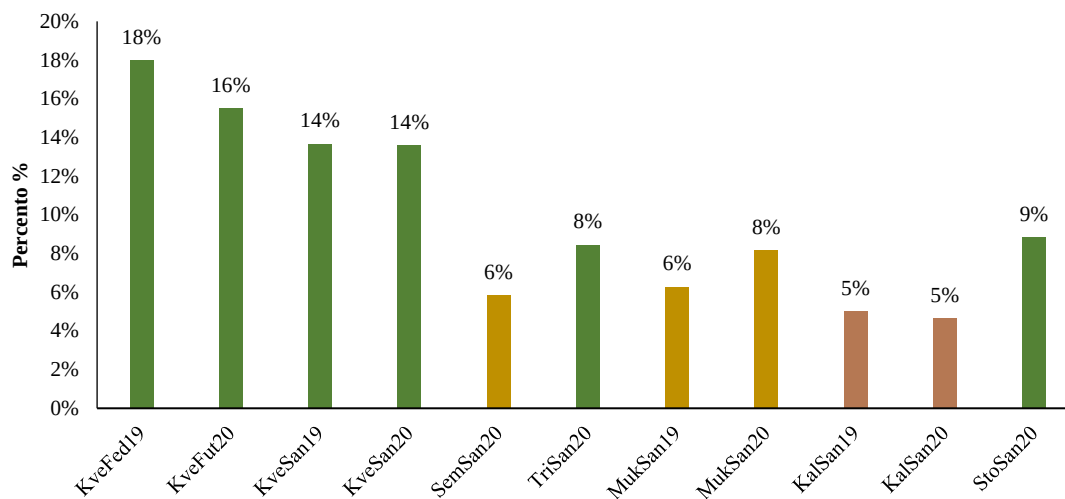
Podľa postupu podľa Duboisa opísaného v kapitole 4.4 bol stanovený obsah rozpustných sacharidov vo vodných výluhoch konopných frakcií. Pre výpočet koncentrácie bola použitá kalibračná závislosť roztoku glukózy s rovnicou  $A = 9,5481 \cdot c$  (Príloha A).

Obsah rozpustných sacharidov vo frakciách je znázornený v Tabuľke 11. Vzhľadom k tomu, že sa jednalo o vodné výluhy bez chemickej úpravy (hydrolýzy polysacharidov), výsledky nezahŕňajú celkový obsah sacharidov. Podiel rozpustných sacharidov sa pohyboval medzi 4,66 % až 17,98 %, z toho najvyšší podiel mali konopné kvety. Namerané výsledky sa rádovo zhodujú s inými štúdiami [45], kde je uvedený obsah sacharidov (bez vlákniny) v listoch 15,3 % a v stonke 5,3 %.

Rozdiely medzi odrodami boli rozpoznateľné, najvyšší obsah rozpustných sacharidov obsahovala Fedora. Vysoký obsah rozpustných sacharidov v kvetoch môže mať využitie pri príprave konopných čajov. Nameraný obsah rozpustných sacharidov je však závislý na podmienkach extrakcie a veľkosti častíc.

Tabuľka 11 Obsah rozpustných sacharidov vo výluhoch frakcií konopy

| Vzorka   | Koncentrácia rozpustených sacharidov - výluh (g/l) | Obsah rozpustných sacharidov – pôvodná frakcia (%) |
|----------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| KveFed19 | $0,90 \pm 0,07$                                    | 17,98 %                                            |
| KveFut20 | $0,81 \pm 0,03$                                    | 15,51 %                                            |
| KveSan19 | $0,71 \pm 0,11$                                    | 13,68 %                                            |
| KveSan20 | $0,67 \pm 0,01$                                    | 13,59 %                                            |
| SemSan20 | $0,29 \pm 0,02$                                    | 5,85 %                                             |
| TriSan20 | $0,44 \pm 0,06$                                    | 8,45 %                                             |
| MukSan19 | $0,34 \pm 0,02$                                    | 6,28 %                                             |
| MukSan20 | $0,41 \pm 0,04$                                    | 8,16 %                                             |
| KalSan19 | $0,36 \pm 0,05$                                    | 5,01 %                                             |
| KalSan20 | $0,26 \pm 0,02$                                    | 4,66 %                                             |
| StoSan20 | $0,49 \pm 0,06$                                    | 8,84 %                                             |



Graf 1 Obsah rozpustných sacharidov vo frakciách konopy

### 5.3 Stanovenie celkového dusíku a hrubej bielkoviny Kjeldahlovou metódou

Celkový obsah hrubých bielkovín bol stanovený vo všetkých frakciách konopy Kjeldahlovou metódou podľa kapitoly 4.5, stanovenie bolo opakované dvakrát a hrubá bielkovina bola vypočítaná pomocou prepočítavacieho faktoru 6,25.

Najvyšší podiel proteínov mali frakcie semienok (22,27 %) a múk (15,55-15,59 %). Obsah proteínov v semienku sedí s literatúrou [2], avšak nameraný obsah bielkovín v múkach je nižší ako v iných štúdiách, kde v pomletých výliskoch bolo nameraných až 27,9 % [20]. Tento rozdiel môže byť spôsobený rozdielnym postupom pri lisovaní konopného oleja, kedy vznikajú výlisky. V prípade, že štúdie pracovali s múkou bez častí semenných obalov, môže to byť dôvod rozdielných výsledkov.

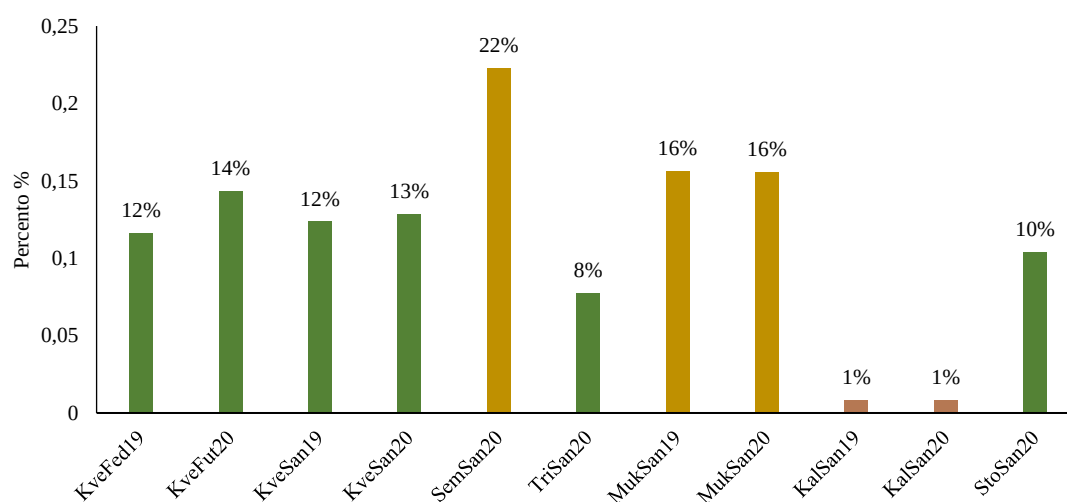
Nasledovali frakcie kvetov, rozdiely v odrodách neboli veľmi výrazné. Obsah bielkovín v kvetoch a listoch sa pohyboval medzi 11,58 – 14,29 %. V porovnávanej štúdii [45] bol nameraný v listoch konopy obsah bielkovín 13 %, čo sa zhoduje s našimi výsledkami pre zmes kvetov a listov. V štúdii bol nameraný obsah proteínov v stonke nižší (5,3 %) ako bol u nás, avšak to môže byť spôsobené výberom hrúbky stoniek. Naša vzorka stoniek obsahovala zväčša tenké stonky, ktoré majú iné zloženie ako napríklad najhrubšia časť rastliny, kde je vytvorené celulóзовé vlákno. Najmenej proteínov sa nachádzalo v sedimentačných kaloch, pod 1 %. Obsah bielkovín (priemerné hodnoty z dvoch stanovení) vo frakciách konopy je znázornený v Tabuľke 12 a v Grafe 2.



Tabuľka 12 Obsah bielkovín vo frakciách konopy

| Vzorka   | Obsah dusíka % | Obsah bielkovín % |
|----------|----------------|-------------------|
| KveFed19 | 1,85           | 11,58             |
| KveFut20 | 2,29           | 14,29             |
| KveSan19 | 1,98           | 12,34             |
| KveSan20 | 2,05           | 12,84             |
| SemSan20 | 3,56           | 22,27             |
| TriSan20 | 1,24           | 7,75              |
| MukSan19 | 2,49           | 15,59             |
| MukSan20 | 2,49           | 15,55             |
| KalSan19 | 0,13           | 0,79              |
| KalSan20 | 0,13           | 0,82              |
| StoSan20 | 1,66           | 10,40             |

Porovnanie ročníkov konopy naznačuje, že rastliny vypestované v roku 2020 mali vyšší podiel bielkovín ako rastliny z roku 2019. Tento trend však nie je pozorovaný pri porovnaní kalu a semienok z týchto dvoch rokov, práve naopak, u nich je nameraný obsah bielkovín veľmi podobný. Zloženie kvetov a listov je pravdepodobne náchylnejšie na malé rozdiely v poľnohospodárskych podmienkach, ako je napríklad počasie v daný rok.



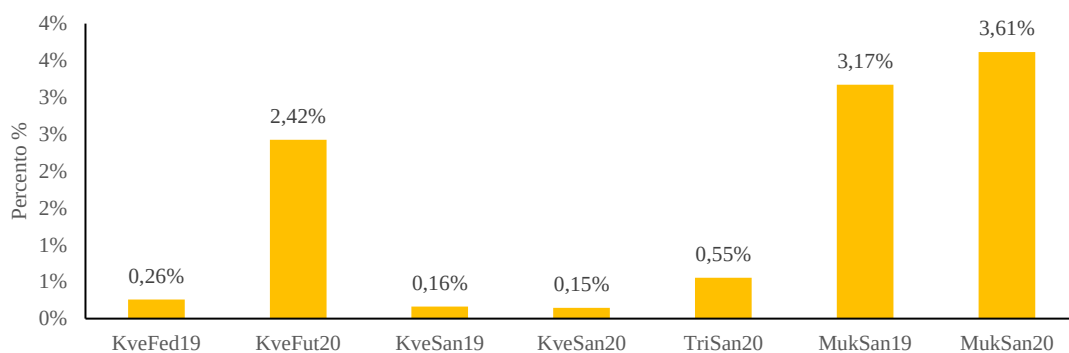
Graf 2 Obsah bielkovín vo frakciách konopy

#### 5.4 Stanovenie obsahu lipidov a profilu mastných kyselín pomocou GC

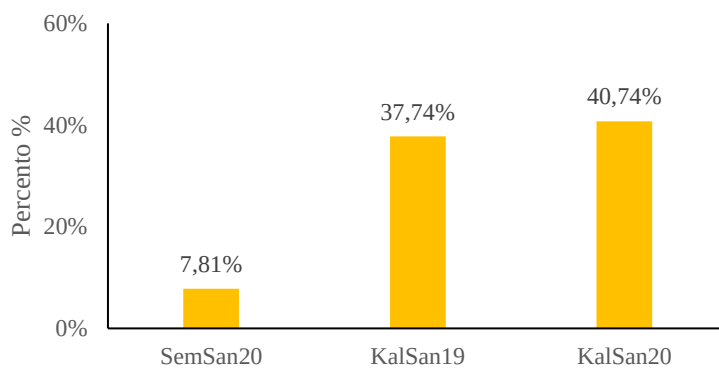
Lipidy a profil mastných kyselín boli merané podľa postupu v kapitole 4.6 GC analýzou hexánových extraktov. Kvety a trichómy obsahovali 0,15 % až 0,55 % lipidov, s výnimkou odrody Futura, pri ktorej bol nameraný obsah lipidov 2,42 %. Múky obsahovali 3,17 – 3,61 % a semienka 7,81 % lipidov. Obsah lipidov v sedimentačných kaloch bol 37,74 a 40,74 %. Percentuálny podiel lipidov vo frakciách je znázornený na Grafe 3 a Grafe 4.

Tieto výsledky sú celkovo nižšie ako je uvádzané v iných štúdiách. Prvá štúdia [13] uvádza obsah lipidov v semienkach 25 – 35 % a v múke 8 – 10 %, čo je potvrdené aj literatúrou s tematikou konopných semienok. V druhej štúdii [45] bol nameraný obsah lipidov v listoch 8,9 % a v kvetoch 12,5 %. Naše výsledky sú v porovnaní s týmito dvoma štúdiami viac ako trikrát nižšie. Tento rozdiel môže byť spôsobený účinnosťou transesterifikácie mastných kyselín, ktorá je pre následné stanovenie methylesterov kyselín zásadná. Čo je ale s ostatnými štúdiami v súlade je porovnanie obsahu lipidov medzi frakciami. Ako sme očakávali, najvyšší obsah tukov je v kaloch, ktoré sú olejová frakcia s časticami podrvených semienok. Ako aj podľa výsledkov, tak aj podľa vizuálneho porovnanie kalu z roku 2019 a z roku 2020 bolo zrejmé, že kal 2020 je tekutejší, a teda obsahuje viac oleja. Môže to byť spôsobené rozdielnosťami v spracovaní kalu, najmä rôznou dobou sedimentácie surového oleja, alebo odobratím kalu z inej hĺbky.

Takisto sa dá vyčítať, že vylisovaná múka obsahuje výrazne menšie množstvo tuku ako semienka, čo je logické, vzhľadom na proces lisovania semienok.



Graf 3 Obsah lipidov vo frakciách konopy – kvety a múky

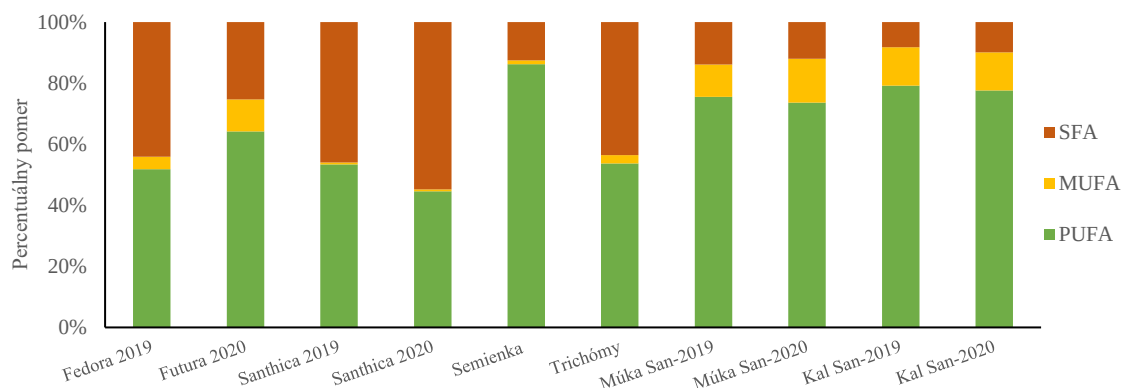


Graf 4 Obsah lipidov vo frakciách konopy – semienka a kaly

Graf 5 znázorňuje profil nasýtenia mastných kyselín. Ten sa v rámci rôznych odrôd zmesí a trichómov líšil v zastúpení mononenasýtených mastných kyselín. Futura mala v porovnaní s ostatnými odrodami vyšší podiel MUFA, zato oba ročníky odrody Santhica tieto mastné kyseliny vôbec neobsahovali. Podielovo najviac polynenasýtených mastných kyselín obsahovali semienka, ktoré zároveň obsahovali minimum mononenasýtených mastných kyselín. Profil mastných kyselín v múkach a sedimentačných kaloch bol zistený skoro totožný a obsahoval pomerne najviac mononenasýtených mastných kyselín zo všetkých frakcií konopy.

Prekvapivý je rozdiel profilu mastných kyselín v kale a v semienkach, kde v mastných kyselinách zo semienok nie je prítomná skoro žiadna časť mononenasýtených mastných

kyselín. Profil mastných kyselín v kale je však veľmi podobný s profilom v múkach. Predpokladáme, že vo frakciách múky a kalov, kde už prebehlo lisovanie a dlhšie skladovanie, mohlo dôjsť ku čiastočnej oxidácii polynenasýtených mastných kyselín. Napriek tomu je obsah PUFA v kale aj múke stále veľmi priaznivý pre využitie v potravinárstve či kozmetike.



Graf 5 Profil mastných kyselín vo frakciách konopy

## 5.5 Stanovenie celkových polyfenolov

Podľa postupu uvedeného v kapitole 4.7 bol nameraný obsah polyfenolov v extraktoch vzoriek. Koncentrácia celkových polyfenolov bola vypočítaná podľa kalibračnej rovnice kyseliny gallovej  $A = 1,647 \cdot c$  (Príloha B).

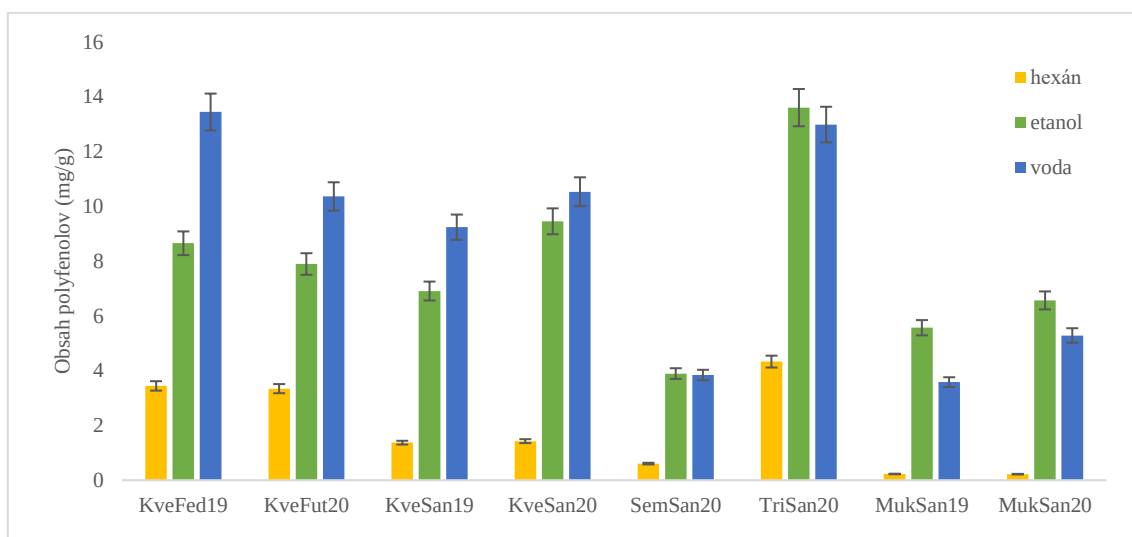
Merania vzoriek extraktov boli opakované trikrát a bol vypočítaný priemer a smerodajná odchýlka. Tabuľka 13 zobrazuje výsledné koncentrácie polyfenolov v extraktoch a výluhoch aj množstvo prepočítané na 1 g pôvodnej vzorky (s použitím vypočítanej koncentrácie extraktov z kapitoly 5.1).

Z pohľadu extrakcie polyfenolov boli najefektívnejšie rozpúšťadlá etanol a voda, zatiaľ čo hexánové extrakty obsahovali výrazne menej polyfenolov, čiže výsledky môžu byť iba orientačné. Polyfenoly sú polárne látky rozpustné vo vode, čo je dôvod ich slabého uvoľnenia do nepolárneho hexánu.

Tabuľka 13 Obsah polyfenolov v konopných vzorkách a extraktoch

| Vzorky          | Hexánová extrakcia    |                               | Etanolová extrakcia   |                               | Vodný výluh           |                               |
|-----------------|-----------------------|-------------------------------|-----------------------|-------------------------------|-----------------------|-------------------------------|
|                 | Extrakty<br>c (mg/ml) | Pôvodná<br>vzorka<br>c (mg/g) | Extrakty<br>c (mg/ml) | Pôvodná<br>vzorka<br>c (mg/g) | Extrakty<br>c (mg/ml) | Pôvodná<br>vzorka<br>c (mg/g) |
| <b>KveFed19</b> | 0,87 ± 0,09           | 3,44 ± 0,36                   | 0,86 ± 0,02           | 8,65 ± 0,19                   | 0,07 ± 0,00           | 13,45 ± 0,41                  |
| <b>KveFut20</b> | 0,84 ± 0,02           | 3,34 ± 0,81                   | 0,79 ± 0,01           | 7,90 ± 0,11                   | 0,05 ± 0,00           | 10,36 ± 0,43                  |
| <b>KveSan19</b> | 0,34 ± 0,03           | 1,37 ± 0,11                   | 0,70 ± 0,02           | 6,91 ± 0,21                   | 0,05 ± 0,00           | 9,24 ± 0,36                   |
| <b>KveSan20</b> | 0,36 ± 0,03           | 1,43 ± 0,12                   | 0,95 ± 0,00           | 9,46 ± 0,03                   | 0,05 ± 0,00           | 10,54 ± 0,20                  |
| <b>SemSan20</b> | 0,15 ± 0,02           | 0,61 ± 0,09                   | 0,39 ± 0,01           | 3,89 ± 0,11                   | 0,02 ± 0,00           | 3,84 ± 0,47                   |
| <b>TriSan20</b> | 1,10 ± 0,07           | 4,33 ± 0,26                   | 1,37 ± 0,03           | 13,61 ± 0,25                  | 0,07 ± 0,00           | 12,99 ± 0,39                  |

|                 |             |             |             |             |             |             |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>MukSan19</b> | 0,11 ± 0,01 | 0,23 ± 0,01 | 1,12 ± 0,01 | 5,57 ± 0,05 | 0,02 ± 0,00 | 3,58 ± 0,14 |
| <b>MukSan20</b> | 0,11 ± 0,02 | 0,22 ± 0,04 | 1,31 ± 0,01 | 6,57 ± 0,05 | 0,03 ± 0,00 | 5,29 ± 0,11 |



Graf 6 Obsah polyfenolov vo frakciách konopy – extrakcie rôznymi rozpúšťadlami

Zo všetkých troch extrakčných metód však vyplýva, že najvyšší obsah polyfenolov sa nachádza v trichómoch (13,61 mg/g). Pri kvetoch bol vodný výluh vhodnejší na extrakciu (9,24 – 13,45 mg/g) a boli zaznamenané aj rozdiely v odrodách - najviac polyfenolov obsahovala Fedora (13,45 mg/g). Takisto sa líšili porovnávané dva ročníky odrody Santhica, ako v prípade zmesí tak aj pri múkach bola bohatšia na polyfenoly Santhica 2019. Porovnanie frakcií z pohľadu obsahu polyfenolov je ukázané v Grafe 6.

Vysoký obsah polyfenolov v kvetoch konopy môže byť spôsobený tým, že tieto časti boli sušené, čo zvyšuje obsah aktívnych látok v materiáli z dôvodu ich odštiepenia z bunkovej steny rastliny [32].

## 5.6 Stanovenie celkových flavonoidov

Podľa postupu uvedeného v kapitole 4.8 bol nameraný obsah flavonoidov v extraktoch vzoriek. Koncentrácia celkových flavonoidov bola vypočítaná podľa kalibračnej rovnice katechínu -  $A = 0,3471 \cdot c$  (Príloha C).

Merania vzoriek extraktov boli opakované trikrát a bol vypočítaný priemer a smerodajná odchýlka. Tabuľka 14 zobrazuje výsledné koncentrácie flavonoidov v extraktoch a výluhoch aj množstvo prepočítané na 1 g pôvodnej vzorky (s použitím vypočítanej koncentrácie extraktov z kapitoly 5.1).

Ako je vidno na Grafe 7 Výťažok extrakcie flavonoidov bol výrazne vyšší pri použití vody, výťažky s použitím etanolu a hexánu sú porovnateľné. Flavonoidy sú látky stredne polárne až polárne, čiže sú menej afinitné ku polárnemu hexánu.

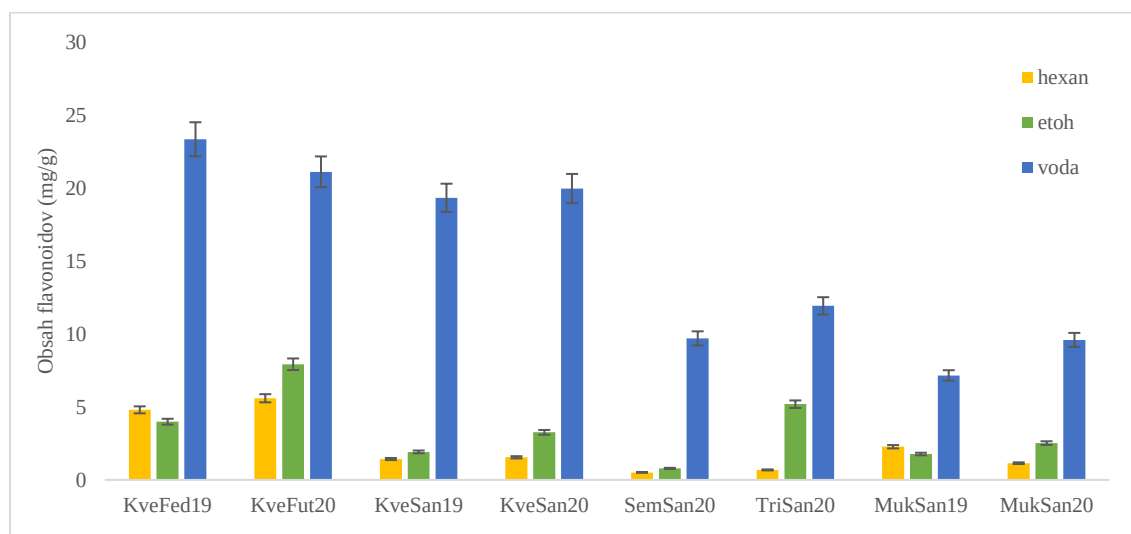
Najvyššie koncentrácie flavonoidov sú obsiahnuté v kvetoch konopy (19,32 – 23,33 mg/g) a následne v trichómoch. Rovnako ako v prípade polyfenolov, sušenie zvyšuje dostupnosť flavonoidov a tak sušené časti obsahujú vyššie množstvo týchto látok. Pri porovnaní odrôd

konopy, najvyšší obsah flavonoidov mala Fedora a najnižší Santhica. V porovnávaných ročníkoch odrody Santhica sú mierne rozdiely, a to také, že Santhica v roku 2020 obsahovala viac flavonoidov, čo sa potvrdilo aj v prípade múk.

Vodné výluhy semienok a múk poskytli záver, že obsah flavonoidov sa v týchto frakciách výrazne nelíši (7,15 – 9,69 mg/g), ale extrakty v hexáne aj etanole naznačujú, že múky obsahujú mierne vyšší obsah flavonoidov ako semienka. Tento rozdiel môže byť spôsobený odlišnými podmienkami extrakcie v prístroji Soxtherm oproti lúhovaniu za laboratórnej teploty, čo má vplyv na uvoľnenie látok do extraktu.

Tabuľka 14 Obsah flavonoidov v konopných vzorkách a extraktoch

| Vzorky          | Hexánová extrakcia |                         | Etanolová extrakcia |                         | Vodný výluh        |                         |
|-----------------|--------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|--------------------|-------------------------|
|                 | Extrakty c (mg/ml) | Pôvodná vzorka c (mg/g) | Extrakty c (mg/ml)  | Pôvodná vzorka c (mg/g) | Extrakty c (mg/ml) | Pôvodná vzorka c (mg/g) |
| <b>KveFed19</b> | 1,21 ± 0,02        | 4,80 ± 0,07             | 0,40 ± 0,03         | 3,99 ± 0,11             | 0,12 ± 0,00        | 23,33 ± 0,72            |
| <b>KveFut20</b> | 1,40 ± 0,20        | 5,59 ± 0,79             | 0,79 ± 0,14         | 7,92 ± 0,48             | 0,11 ± 0,01        | 21,1 ± 2,71             |
| <b>KveSan19</b> | 0,36 ± 0,02        | 1,43 ± 0,08             | 0,19 ± 0,02         | 1,92 ± 0,06             | 0,10 ± 0,01        | 19,32 ± 1,39            |
| <b>KveSan20</b> | 0,39 ± 0,04        | 1,55 ± 0,17             | 0,33 ± 0,01         | 3,26 ± 0,04             | 0,10 ± 0,01        | 19,96 ± 1,98            |
| <b>SemSan20</b> | 0,13 ± 0,03        | 0,51 ± 0,11             | 0,08 ± 0,02         | 0,79 ± 0,08             | 0,05 ± 0,01        | 9,69 ± 1,98             |
| <b>TriSan20</b> | 0,17 ± 0,07        | 0,68 ± 0,26             | 0,52 ± 0,04         | 5,19 ± 0,15             | 0,06 ± 0,06        | 11,92 ± 1,15            |
| <b>MukSan19</b> | 0,23 ± 0,11        | 2,27 ± 0,36             | 0,36 ± 0,07         | 1,77 ± 0,06             | 0,04 ± 0,01        | 7,15 ± 1,34             |
| <b>MukSan20</b> | 0,57 ± 0,22        | 1,15 ± 0,44             | 0,50 ± 0,03         | 2,52 ± 0,02             | 0,05 ± 0,01        | 9,59 ± 1,95             |



Graf 7 Obsah flavonoidov vo frakciách konopy - extrakcie rôznymi rozpúšťadlami

## 5.7 Stanovenie antioxidačnej aktivity

Spektrofotometrická metóda pre stanovenie antioxidačnej aktivity sa nazýva TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Podľa postupu uvedeného v kapitole 4.9 boli namerané absorbancie vzoriek extraktov a antioxidačná aktivita je vyjadrená ako hodnota ekvivalentu štandardu Troloxu. Koncentrácia celkových antioxidantov bola vypočítaná podľa kalibračnej rovnice Troloxu -  $A = 0,0013 \cdot c$  (Príloha D).

Merania absorbancie vzoriek extraktov boli opakované trikrát a bol vypočítaný priemer a smerodajná odchýlka. Tabuľka 15 zobrazuje výsledné koncentrácie antioxidantov v extraktoch a výluhoch aj množstvo prepočítané na 1 g pôvodnej vzorky (s použitím vypočítanej koncentrácie extraktov z kapitoly 5.1).

Z pohľadu účinnosti extrakcie bola vhodná extrakcia etanolom a vodný výluh, tieto dve metódy sú porovnateľné v hodnote TEAC (viď Graf 8). Hexánové extrakty však obsahovali výrazne menšie koncentrácie. Ako v prípade polyfenolov a flavonoidov, látky s antioxidačnou aktivitou sú často polárne a tak majú nižšiu rozpustnosť v hexáne.

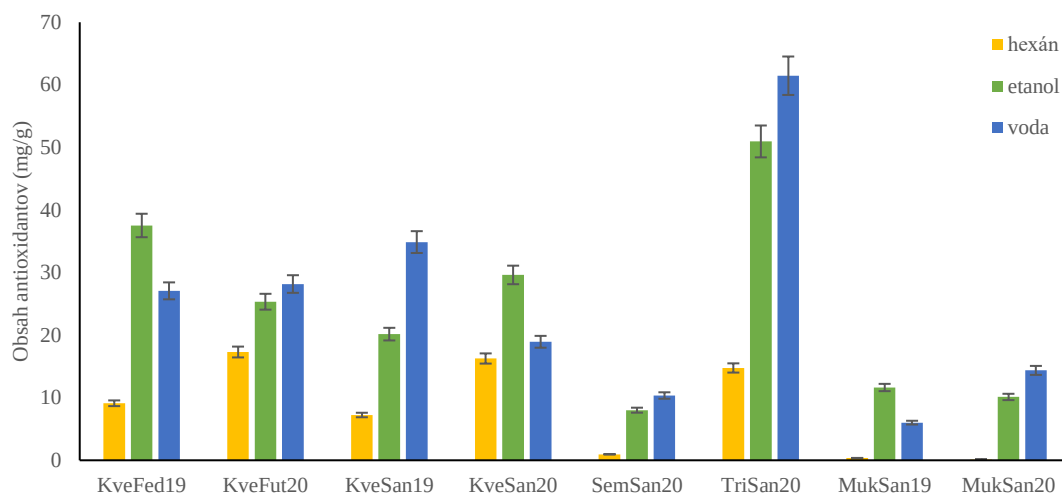
Všetky metódy však odhalili najvyššiu koncentráciu antioxidantov v trichómovej frakcii konopy (50,95, resp. 61,45 mg/g) a následne v kvetoch (18,94 – 37,52 mg/g). Frakcie pochádzajúce zo semien a múk konopy obsahovali oproti listom a kvetom menej antioxidantov, 6,02 – 14,36 mg/g. Týmto výsledkom odpovedajú hodnoty celkových fenolických látok aj celkových flavonoidov, ktoré sú zrejme zodpovedné za antioxidačné účinky extraktov. Vplyvom sušenia listov a kvetov je z materiálu uvoľnených viac fenolických látok a takisto dochádza ku dekarboxylácii niektorých látok, čím sa stávajú biologicky aktívnejšie (napr. kanabinoidy).

Rozdiely v skúmaných odrodách konopy sú viditeľné (najmä v prípade hexánových extraktov), ale nie sú v troch extrakčných metódach porovnateľné. Táto rôznorodosť môže byť spôsobená tým, že meranie antioxidačnej aktivity zahŕňa viacero skupín látok rôznej polarity, ktorých obsah sa v odrodách môže líšiť.

Tabuľka 15 Obsah antioxidantov v konopných frakciách a extraktoch

| Vzorky          | Hexánová extrakcia    |                               | Etanolová extrakcia   |                               | Vodný výluh           |                               |
|-----------------|-----------------------|-------------------------------|-----------------------|-------------------------------|-----------------------|-------------------------------|
|                 | Extrakty<br>c (mg/ml) | Pôvodná<br>vzorka<br>c (mg/g) | Extrakty<br>c (mg/ml) | Pôvodná<br>vzorka<br>c (mg/g) | Extrakty<br>c (mg/ml) | Pôvodná<br>vzorka<br>c (mg/g) |
| <b>KveFed19</b> | 2,30 ± 0,04           | 9,12 ± 0,18                   | 3,75 ± 0,04           | 37,52 ± 0,44                  | 0,13 ± 0,01           | 27,08 ± 1,63                  |
| <b>KveFut20</b> | 4,34 ± 0,04           | 17,30 ± 0,18                  | 2,53 ± 0,08           | 25,34 ± 0,84                  | 0,15 ± 0,03           | 28,17 ± 5,53                  |
| <b>KveSan19</b> | 1,81 ± 0,02           | 7,24 ± 0,09                   | 2,04 ± 0,05           | 20,16 ± 0,47                  | 0,18 ± 0,04           | 34,87 ± 8,39                  |
| <b>KveSan20</b> | 4,06 ± 0,04           | 16,27 ± 0,17                  | 2,96 ± 0,37           | 29,62 ± 3,37                  | 0,09 ± 0,02           | 18,94 ± 3,32                  |
| <b>SemSan20</b> | 0,24 ± 0,05           | 0,96 ± 0,19                   | 0,81 ± 0,04           | 8,01 ± 0,37                   | 0,05 ± 0,04           | 10,35 ± 8,32                  |
| <b>TriSan20</b> | 3,75 ± 0,10           | 14,76 ± 0,38                  | 5,11 ± 0,02           | 50,95 ± 0,16                  | 0,32 ± 0,04           | 61,45 ± 7,69                  |
| <b>MukSan19</b> | 0,18 ± 0,04           | 0,36 ± 0,07                   | 2,35 ± 0,04           | 11,63 ± 0,22                  | 0,03 ± 0,02           | 6,02 ± 2,85                   |

|                 |             |             |             |              |             |              |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|--------------|
| <b>MukSan20</b> | 0,09 ± 0,05 | 0,12 ± 0,12 | 2,03 ± 0,04 | 10,12 ± 0,22 | 0,07 ± 0,01 | 14,36 ± 1,65 |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|--------------|



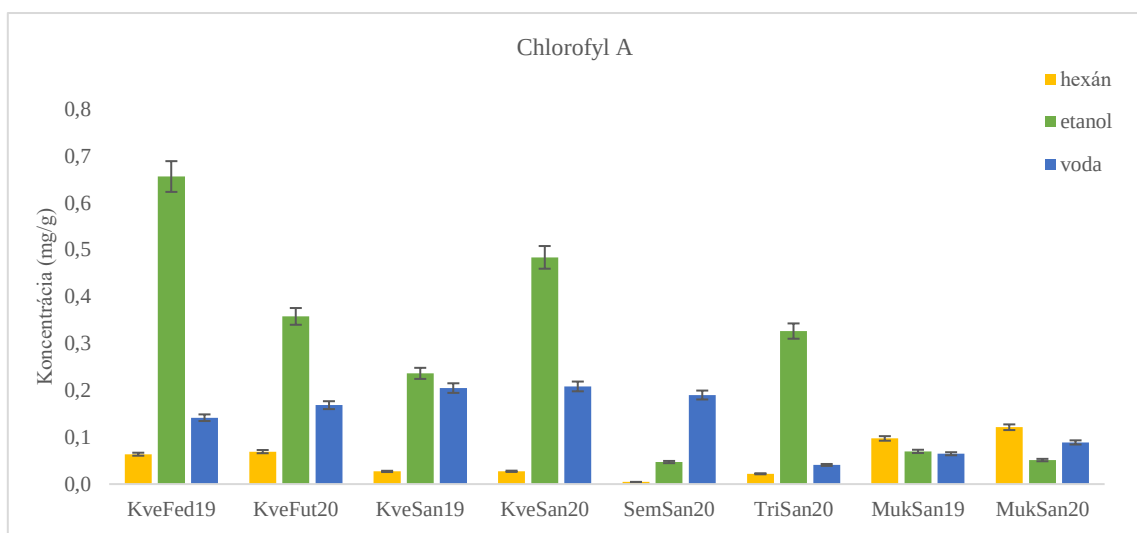
Graf 8 Obsah antioxidantov vo frakciách konopy - extrakcie rôznymi rozpúšťadlami

## 5.8 Stanovenie chlorofylov v extraktoch

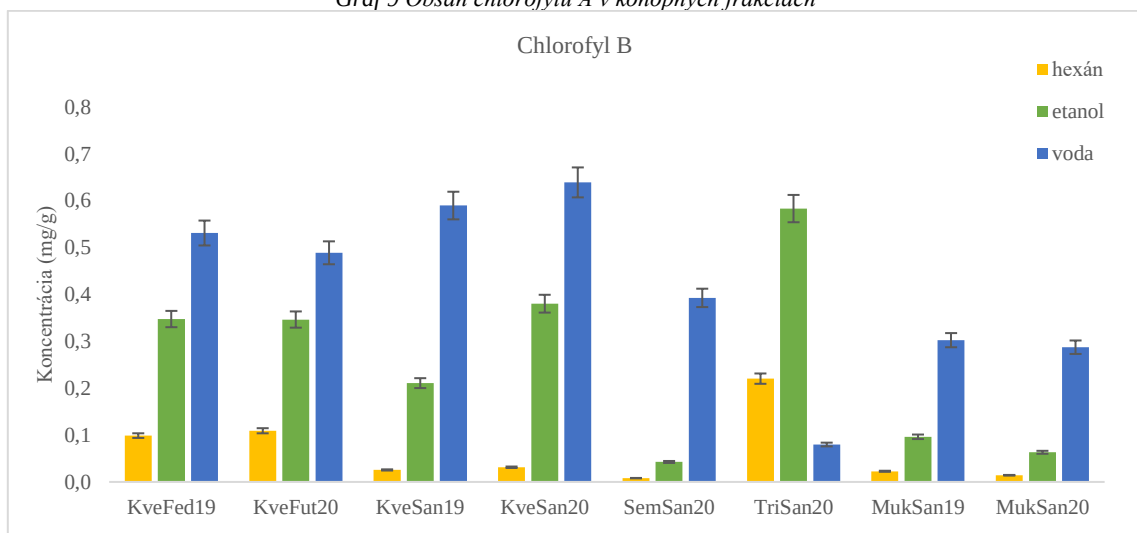
V troch druhoch extraktov frakcií konopy bol stanovený obsah chlorofylu A a B spektrofotometrickou metódou opísanou v kapitole 4.10. Absorbancie boli merané trikrát, ich priemerné hodnoty boli dosadené do rovníc uvedených v kapitole 4.10 a bol vypočítaný obsah chlorofylu A (ca) a B (cb). Grafy 9 a 10 zobrazujú obsahy chlorofylov prepočítané na 1 g pôvodnej vzorky (s použitím vypočítanej koncentrácie extraktov z kapitoly 5.1).

Najviac chlorofylu A bolo vyextrahovaného do 70% etanolu a chlorofylu B do vody. Kvety konopy a trichómy obsahovali najviac pigmentu, zatiaľ čo najmenej chlorofylov obsahovali frakcie múk. Kvety a listy konopy sú zelené časti rastliny podieľajúce sa na fotosyntéze rastliny najviac, naopak semienko a múka túto funkciu nenesú.

Štruktúrny rozdiel medzi chlorofylom A a B je taký, že nepolárna metylová skupina chlorofylu A je v chlorofyle B nahradená polárnou aldehydovou, čo spôsobuje rozdiel v ich rozpustnosti. Chlorofyl A je rozpustný hlavne v polárnych rozpúšťadlách a etanole, vo vode veľmi nízko, čo potvrdzujú aj namerané výsledky.



Graf 9 Obsah chlorofylu A v konopných frakciách



Graf 10 Obsah chlorofylu B v konopných frakciách

## 5.9 Stanovenie kanabinoidov pomocou HPLC

Stanovenie kanabinoidov bolo uskutočnené pomocou HPLC metódy opísanej v kapitole 4.11. Táto metóda bola vybraná kvôli schopnosti odseparovať CBG a CBD, čo je veľmi problematické, keďže sa tieto dve molekuly líšia iba v polohe jednej väzby, a preto majú podobnú polaritu, veľkosť aj vytvárajú podobné interakcie.

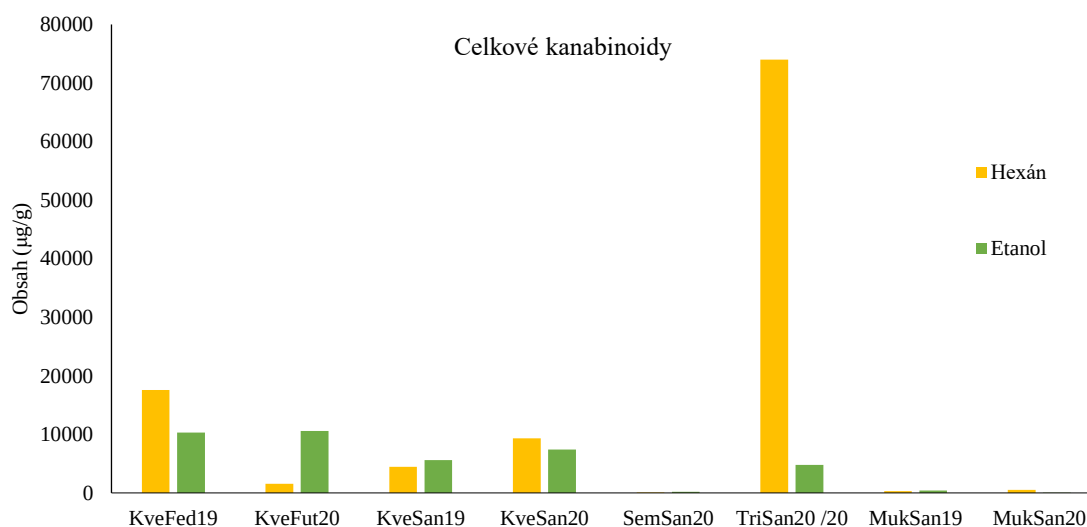
Hexánové (prevedené do acetonitrilu) aj etanolové extrakty boli na analýzu vhodne zriedené tak, aby obsah kanabinoidov nepresiahol separačnú kapacitu kolóny, ale zároveň boli látky vo vzorke detegovateľné. Namerané plochy píkov boli vložené do kalibračných rovníc jednotlivých kanabinoidov a bol vypočítaný obsah v  $\mu\text{g/ml}$  extraktu aj v  $\mu\text{g/g}$  pôvodnej vzorky. Analýzy boli prevedené dvakrát, výsledky sú uvedené ako priemery z dvoch stanovení.

Boli porovnávané výťažnosti extrakcie pri použití hexánu a 70% etanolu. Z Grafu 11 sa dá odčítať, že rozpúšťadlo malo výrazný vplyv na extrakciu kanabinoidov. Avšak rozdiely nie sú koherentné, v prípade extraktov kvetov mala pri niektorých odrodách vyššiu výťažnosť extrakcia 70% etanolom, niekedy naopak hexánom. Najväčší rozdiel bol však zaznamenaný pri frakcii trichómov, kde bol s použitím hexánovej extrakcie nameraný obsah kanabinoidov



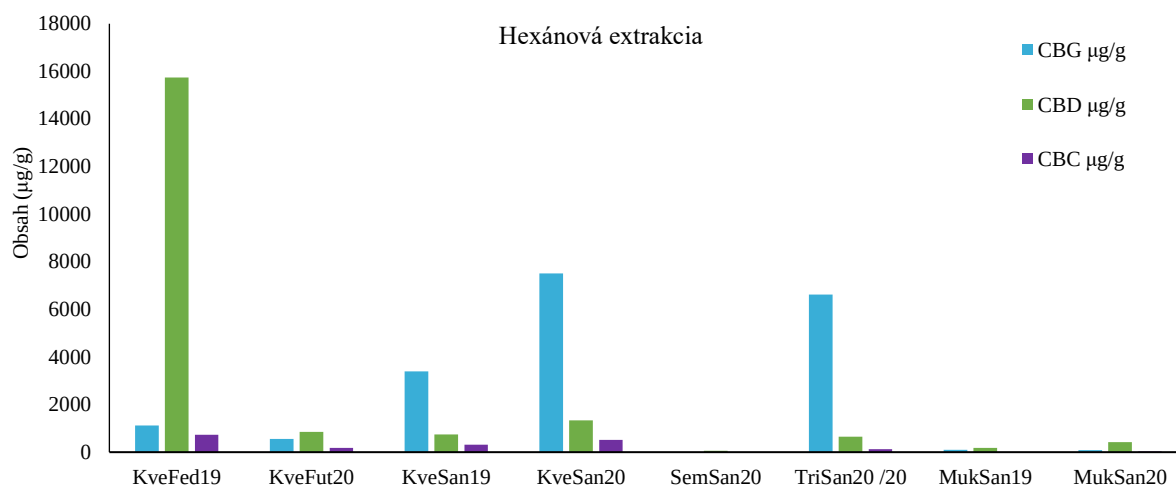
73 998,6  $\mu\text{g/g}$  (7,4 %), zatiaľ čo s použitím etanolu iba 4 785,5  $\mu\text{g/g}$  (0,5 %). Trichómy sú chlípky na povrchu listov a kvetov, tvoria najjemnejšiu frakciu vysušenej zmesi a obsahujú najviac aktívnych látok. Bolo to potvrdené aj v predchádzajúcich kapitolách, kde boli vyhodnotené koncentrácie fenolických látok a antioxidantov v extraktoch. Vzhľadom na to, že v etanolovom extrakte bol nameraný nižší obsah kanabinoidov ako v samotných kvetoch, predpokladáme, že tento výsledok nie je úplne smerodajný. Nezrovnalosť mohla byť spôsobená chybou v riedení alebo vyhodnocovaní HPLC chromatogramu.

Podľa Grafu 11 je však zrejmé, že frakcia trichómov obsahuje podstatne viac kanabinoidov ako samotné kvety a listy. Z troch odrôd mala najvyšší obsah kanabinoidov práve Fedora 2019, ktorá bola zo sledovaných odrôd aj najbohatšia na fenolické látky a antioxidanty. Z dvoch ročníkov odrody Santhica bol obsah kanabinoidov vyšší v roku 2020, čo je pozorované na výsledkoch hexánových aj etanolových extraktov a rovnako to koreluje aj s vyšším obsahom fenolických látok aj antioxidantov v ročníku 2020. Obsah celkových kanabinoidov v kvetoch sa pohyboval medzi 4 447,4  $\mu\text{g/g}$  (0,4 %) až 17 594,5  $\mu\text{g/g}$  (1,8%), čo je nižšie v porovnaní so štúdiou [46], ktorá zistila obsah kanabinoidov v kvetoch po hexánovej extrakcii 3,2 %. V štúdiu sa uvádza, že sa pracovalo s kvetmi, čiže šiškami konopy, na rozdiel od našej vzorky, ktorá predstavovala zmes listov a kvetov. Taktiež uvedená štúdia využívala iný postup extrakcie, čo má vplyv na výsledný výťažok. Všetky priemerné namerané hodnoty sú uvedené v Tabuľkách 16 a 17.



Graf 11 Obsah celkových kanabinoidov vo frakciách konopy – rôzne extrakcie

Ako sa aj uvádza v literatúre [14], v semienkach sa nenachádzajú žiadne kanabinoidy, jedine z dôvodu kontaminácie inými časťami rastliny. Tým pádom nie sú kanabinoidy ani vo frakciách pochádzajúcich zo semienok, čo sú kal a múka. Tento predpoklad bol potvrdený aj našou analýzou. Semienka obsahovali iba stopy kanabinoidov (5,54  $\mu\text{g/g}$ ). Múky obsahovali trochu vyššie množstvo (27,35-52,70  $\mu\text{g/g}$ ), čo mohlo byť zapríčinené práve tým, že sa jedná o už spracovanú frakciu, takže počas procesov mohlo dôjsť ku kontaminácii, napríklad ak boli v lisovaných semienkach časti stoniek alebo listov.



Graf 12 Obsah kanabinoidov v extraktoch a frakciách konopy - hexánová extrakcia

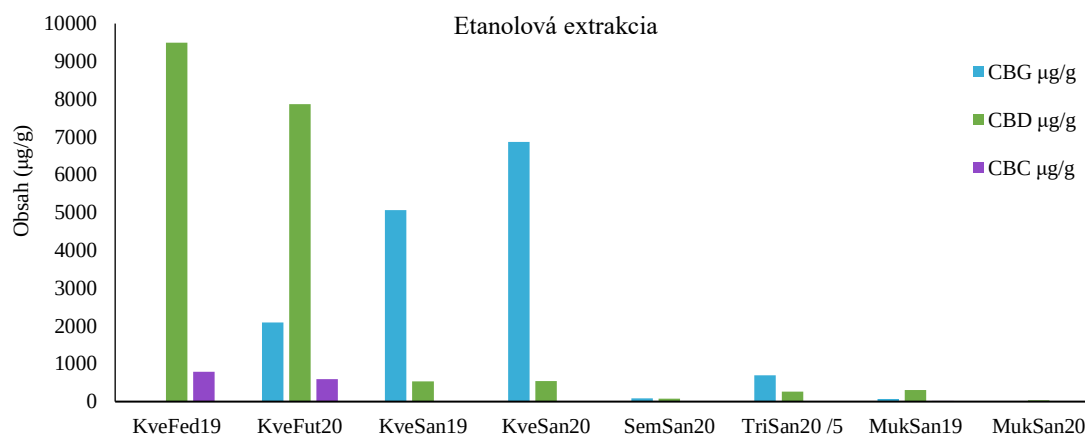
Tabuľka 16 Obsah kanabinoidov v extraktoch a frakciách konopy - hexánová extrakcia

| Hexánová extrakcia | CBG               |                          | CBD               |                          | CBC               |                          | Celkové kanab.    |                          |
|--------------------|-------------------|--------------------------|-------------------|--------------------------|-------------------|--------------------------|-------------------|--------------------------|
|                    | Extrakt c (µg/ml) | Pôvodná vzorka c (µg /g) | Extrakt c (µg/ml) | Pôvodná vzorka c (µg /g) | Extrakt c (µg/ml) | Pôvodná vzorka c (µg /g) | Extrakt c (µg/ml) | Pôvodná vzorka c (µg /g) |
| KveFed19           | 189,25            | 1126,48                  | 2644,79           | 15742,81                 | 121,83            | 725,19                   | 2955,87           | 1759,45                  |
| KveFut20           | 92,62             | 554,12                   | 142,19            | 850,70                   | 28,80             | 172,28                   | 263,61            | 157,71                   |
| KveSan19           | 565,24            | 3394,45                  | 124,12            | 745,35                   | 51,22             | 307,57                   | 740,58            | 444,74                   |
| KveSan20           | 1247,94           | 7503,27                  | 221,28            | 1330,45                  | 84,63             | 508,85                   | 1553,86           | 934,26                   |
| SemSan20           | 0,00              | 0,00                     | 9,18              | 55,39                    | 0,00              | 0,00                     | 9,18              | 5,54                     |
| TriSan20           | 11231,51          | 66266,49                 | 1101,04           | 6496,17                  | 209,48            | 1235,97                  | 12542,03          | 7399,86                  |
| MukSan19           | 32,90             | 98,64                    | 58,33             | 174,88                   | 0,00              | 0,00                     | 91,23             | 27,35                    |
| MukSan20           | 26,22             | 78,55                    | 141,10            | 422,70                   | 8,59              | 25,72                    | 175,91            | 52,70                    |

Tabuľka 16 a Graf 12 zobrazujú namerané hodnoty obsahu jednotlivých kanabinoidov v hexánových extraktoch v µg/ml a aj obsah látok v pôvodnej vzorke v µg/g.

Ako sa zmieňujeme už v kapitole 2.2.1, každá odroda konopy produkuje 3-4 druhy kanabinoidov. V žiadnej skúmanej frakcii nebol detegovaný kanabinol (CBN), čo bola predpokladané, keďže CBN je produkt degradácie THC, ktoré sa v konope sietej vyskytuje iba v minimálnych množstvách.

Z nameraných profilov kanabinoidov sú jasne viditeľné charakteristiky jednotlivých odrôd: Fedora produkuje dominantne CBD, v menšej miere CBC a CBG. Futura produkuje najvýraznejšie CBD, potom CBG a najmenej CNC, ale ich rozdiel nie je taký výrazný. Santhica má najdominantnejší kanabinoid CBG, nasleduje CBD a v najmenšej miere produkuje CBC. Identický profil je pozorovaný v oboch ročníkoch odrody Santhica aj v trichómoch tejto odrody.



Graf 13 Obsah kanabinoidov v extraktoch a frakciách konopy - etanolová extrakcia

Tabuľka 17 Obsah kanabinoidov v extraktoch a frakciách konopy - etanolová extrakcia

| Etanolová extrakcia | CBG               |                          | CBD               |                          | CBC               |                          | Celkové kanab.    |                          |
|---------------------|-------------------|--------------------------|-------------------|--------------------------|-------------------|--------------------------|-------------------|--------------------------|
|                     | Extrakt c (µg/ml) | Pôvodná vzorka c (µg /g) | Extrakt c (µg/ml) | Pôvodná vzorka c (µg /g) | Extrakt c (µg/ml) | Pôvodná vzorka c (µg /g) | Extrakt c (µg/ml) | Pôvodná vzorka c (µg /g) |
| <b>KveFed19</b>     | 0,00              | 0,00                     | 947,56            | 9491,57                  | 78,94             | 790,69                   | 1026,50           | 1028,23                  |
| <b>KveFut20</b>     | 209,48            | 2095,47                  | 786,69            | 7869,26                  | 59,12             | 591,42                   | 1055,30           | 1055,61                  |
| <b>KveSan19</b>     | 511,33            | 5063,84                  | 53,94             | 534,19                   | 0,00              | 0,00                     | 565,27            | 559,80                   |
| <b>KveSan20</b>     | 686,64            | 6867,91                  | 54,54             | 545,52                   | 0,00              | 0,00                     | 741,18            | 741,34                   |
| <b>SemSan20</b>     | 8,99              | 88,82                    | 7,85              | 77,56                    | 0,00              | 0,00                     | 16,83             | 16,64                    |
| <b>TriSan20</b>     | 349,15            | 3479,63                  | 131,03            | 1305,90                  | 0,00              | 0,00                     | 480,18            | 478,55                   |
| <b>MukSan19</b>     | 14,22             | 70,52                    | 61,57             | 305,28                   | 3,83              | 18,98                    | 79,63             | 39,48                    |
| <b>MukSan20</b>     | 0,00              | 0,00                     | 7,34              | 36,69                    | 0,00              | 0,00                     | 7,34              | 3,67                     |

Graf 13 a Tabuľka 17 zobrazuje profil kanabinoidov v etanolových extraktoch v µg/ml a aj obsah látok v pôvodnej vzorke v µg/g.

Profil kanabinoidov charakteristický pre jednotlivé odrody je rovnaký ako v prípade hexánovej extrakcie, mierne rozdielne sú v pomeroch koncentrácie kanabinoidov. Táto rozdielnosť naznačuje, že jednotlivé kanabinoidy majú mierne rozdielu afinitu ku použitým rozpúšťadlám – hexán, 70% etanol.

Ako aj v prípade hexánových extraktov sa potvrdilo, že profil kanabinoidov je rovnaký v oboch ročníkoch odrody *Santhica*.

### 5.10 Stanovenie antimikrobiálneho účinku konopných extraktov resazurínom

Na vzorkách hexánových a etanolových extraktov bol vykonaný dilučný jamkový test s prídavkom resazurínu po 24 hodinách. Princíp metódy a postup sú opísané v kapitolách 2.8.3 a 4.12. Boli merané antimikrobiálne účinky extraktov voči trom baktériám, *Escherichia coli*, *Cutibacterium acnes* a *Staphylococcus epidermidis*.

Etanolové extrakty boli najprv zakoncentrované na koncentráciu 200 mg/ml a následne riedené na štyri rôzne výsledné koncentrácie v jamke, a to 50; 25; 12,5 a 6,25 mg/ml. Odparený hexánový extrakt nebolo možné úspešne rozpustiť v 50% DMSO, ktoré je miesiteľný s vodou a zároveň sa v ňom rozpúšťajú organické látky. Hexánové extrakty nie sú miešateľné s vodou, a teda po pridaní do jamky vytvorili oddelenú vrstvu na hladine. Všetky hexánové extrakty sme zriedili na uniformnú koncentráciu 8 mg/ml.

Inhibícia každej koncentrácie daného extraktu bola stanovovaná iba v jednom opakovaní, jednalo sa teda o skríningové stanovenie, ktoré malo za cieľ ukázať antimikrobiálny potenciál jednotlivých extraktov. Rozloženie extraktov v jamkách je znázornené v Tabuľke 18.

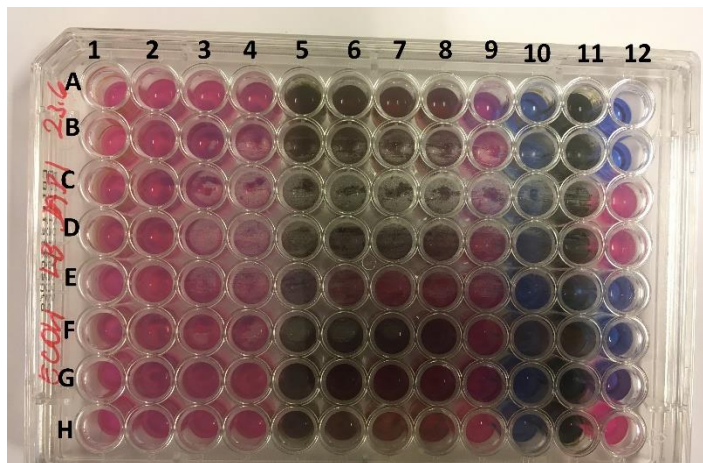
Tabuľka 18 Rozloženie obsahu jamiek

|          | Hexánové extrakty<br>+ kultúra |         |           |            | Etanolové extrakty<br>+ kultúra |          |            |            | Rozpúšťadlá  | Hexánové<br>extrakty | Etanolové<br>extrakty | Kontroly                |
|----------|--------------------------------|---------|-----------|------------|---------------------------------|----------|------------|------------|--------------|----------------------|-----------------------|-------------------------|
| KveFed19 | 2 mg/ml                        | 1 mg/ml | 0,5 mg/ml | 0,25 mg/ml | 50 mg/ml                        | 25 mg/ml | 12,5 mg/ml | 6,25 mg/ml | 25 % hex.    | 2 mg/ml              | 50 mg/ml              | Čisté médium            |
| KveFut20 |                                |         |           |            |                                 |          |            |            | 12,5 % hex.  |                      |                       |                         |
| KveSan19 |                                |         |           |            |                                 |          |            |            | 6,25 % hex.  |                      |                       | Neinhibovaná<br>kultúra |
| KveSan20 |                                |         |           |            |                                 |          |            |            | 3,125 % hex. |                      |                       |                         |
| SemSan20 |                                |         |           |            |                                 |          |            |            | 25 % etoh    |                      |                       |                         |
| TriSan20 |                                |         |           |            |                                 |          |            |            | 12,5 % etoh  |                      |                       |                         |
| MukSan19 |                                |         |           |            |                                 |          |            |            | 6,25 % etoh  |                      |                       |                         |
| MukSan20 |                                |         |           |            |                                 |          |            |            | 3,125 % etoh |                      |                       |                         |

Po inkubácii (24 hod, 37 °C) bolo do jamiek pridaných 20 µl roztoku resazurínu (c = 12,5 mg/ml). Po 30 minútach bol vyhodnotený inhibičný efekt daného nariedeného vzorku. Resazurín je modrá látka, ktorá je oxidovaná na resorufín – látku s ružovou farbou, ktorá v jamke indikovala, že bunky nie sú inhibované. Z farebnej zmeny v jamke sa vyhodnocuje, či je kultúra schopná metabolizmu, a teda na ňu extrakt mal alebo nemal inhibičný účinok [47].

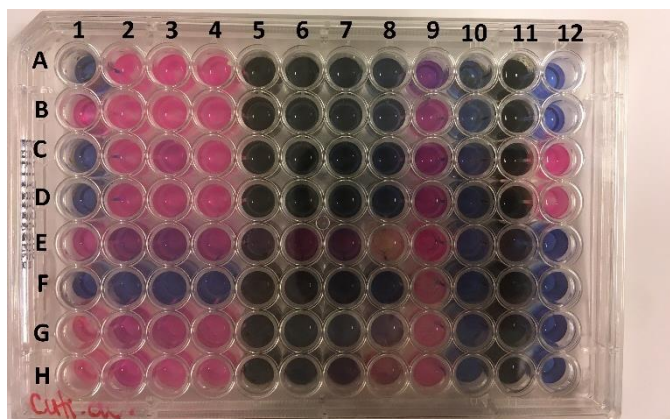
Z Obrázku 8 jasne vyplýva, že žiadny hexánový extrakt (stĺpce 1 – 4) nemal v použitých koncentráciách na *Escherichia coli* inhibičný efekt (MIC > 2 mg/ml). Etanolové extrakty (stĺpce 5 – 8) boli zakoncentrované, čím bol zvýšený aj obsah chlorofylov. Tie spôsobovali silné zafarbenie média a znemožňovali analýzu. Z jamiek obsahujúcich etanolový extrakt semienok však vidno, že koncentrácie extraktu 25; 12,5 a 6,125 mg/ml (E6, E7, E8) nie sú inhibičné. Tento výsledok sa zhodoval s meraním MIC v inej štúdii [46], kde hexánový extrakt konopy taktiež neinhiboval rast *E. coli* (výsledná MIC > 2,5 mg/ml)

V posledných štyroch stĺpcoch boli vykonané kontroly extraktov – modrá farba kontroly extraktov (stĺpce 10,11) značí, že neboli kontaminované. Rovnako ani čisté médium (A12, B12) nebolo kontaminované. Kontrola kultúry (C12, D12) preukázala jej životaschopnosť. Bol sledovaný aj inhibičný efekt ampicilínu v koncentráciách 3,125; 1,56; 0,78 a 0,39 mg/ml (E12, F12, G12, H12) a bolo zistené, že najnižšia koncentrácia už nemá inhibičný efekt na *E. coli*, teda hodnota MIC ampicilínu bola 0,78 mg/ml.



Obrázok 8 Inhibičný efekt extraktov - *Escherichia coli*

*Cutibacterium acnes* bol v porovnaní s *E.coli* citlivejší na skúmané koncentrácie extraktov. Inhibičný efekt bol pozorovaný pri hexánových extraktov KveFed19, KveSan19, KveSan20 a TriSan20 pri koncentrácii 2 mg/ml (A1, C1, D1, F1). Nižšie koncentrácie už nemali inhibičný efekt, s výnimkou trichómov, ktorých hexánový extrakt inhiboval *C. acnes* pri všetkých koncentráciách, aj najnižšej 0,25 mg/ml. Pri etanolových extraktoch (stĺpce 5 – 8) opäť nebolo možné identifikovať inhibíciu, jedine môžeme konštatovať, že najnižšie koncentrácie extraktu semienok neinhibovali rast kultúry (E8). Kontroly extraktov, čistého média aj kultúry vyšli priaznivo. Ampicilín inhiboval *C. acnes* pri všetkých koncentráciách. Výsledky zobrazuje Obrázok 9.

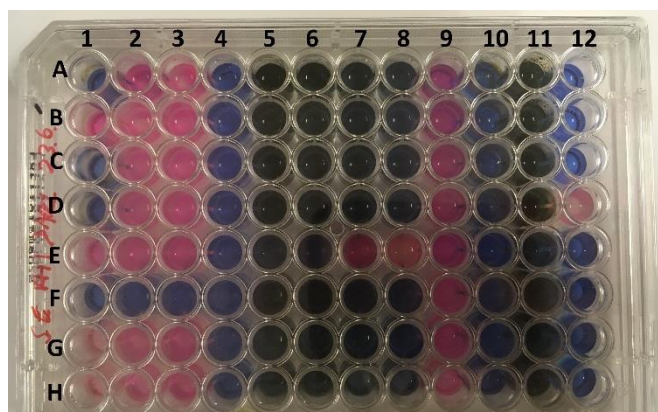


Obrázok 9 Inhibičný efekt extraktov - *Cutibacterium acnes*

*Staphylococcus epidermidis* vykazoval podobnú citlivosť na skúmané extrakty ako *C. acnes* (Obrázok 10). Inhibičný efekt mali hexánové extrakty KveFed19, KveSan19, KveSan20 a TriSan20 v koncentrácii 2 mg/ml (A1, C1, D1, F1) s tým, že trichómový extrakt si inhibíciu



zachoval až do koncentrácie 0,25 mg/ml. Modré zafarbenie štvrtého stĺpca je pravdepodobne chyba v pipetovaní kultúry, ale dá sa silno predpokladať, že v tejto koncentrácii extrakty nemali inhibičný efekt. U etanolových extraktoch je opäť nemožné s istotou vyhodnotiť výsledky, až na extrakt semienok v koncentrácii 12,5 a 6,125 mg/ml (E7, E8), ktoré baktériu neinhibujú. Kontroly extraktov a médií vyšli priaznivo, jedna kontrola kultúry vyšla negatívne (C12), čo môže byť spôsobené chybou v pipetovaní. Ampicilín inhiboval rast *S. epidermidis* vo všetkých koncentráciách.



Obrázok 10 Inhibičný efekt extraktov - *Staphylococcus epidermidis*

#### 5.10.1 Kontrola schopnosti buniek tvoriť kolónie

Po nameraní absorbancie jamiek v čase 24 hodín bol obsah každej jamky zaočkovaný pichnutím pomocou špáradla do tuhého média. Médium bolo inkubované 24 hodín pri 37 °C. V prípade, že jamka obsahovala nejaké bunky schopné sa množiť, v mieste zaočkovania vyrástla kolónia. Ak v mieste kolónia nevznikla, indikovalo to úplné usmrtenie buniek počas inkubácie v doštičke. Ukážka je na Obrázku 11. V nasledujúcich tabuľkách sú znázornené výsledky, – je symbol pre živé bunky, + pre neživé.



Obrázok 11 Kontrola schopnosti kultúry tvoriť kolónie

Výsledky tejto analýzy dopĺňajú meranie inhibičného efektu, ktorý je vyhodnotený v predchádzajúcej podkapitole. Keď je kultúra neschopná tvoriť kolóniu, poukazuje to na antimikrobiálny efekt daného extraktu v použitej koncentrácii. Stanovenie inhibície kultúry pomocou resazurínu nám síce dáva informáciu o obmedzení rastu buniek, ale tieto bunky môžu byť schopné sa ďalej množiť v prípade, že sa dostanú do priaznivejšieho prostredia. V predchádzajúcej analýze boli vzorky s etanolovým extraktom príliš koncentrované a

zafarbené, a tak nebolo možné jednoznačne vyhodnotiť inhibičný efekt etanolových extraktov, ale v prípade kontroly schopnosti tvoriť kolónie je vyhodnotenie bezproblémové.

V niektorých aplikáciách je potrebné dosiahnuť antimikrobiálny účinok, napríklad pri liečivách alebo dezinfekčných prostriedkoch. V prípade aplikácie konopných extraktov do kozmetiky je postačujúca aj inhibícia rastu nežiadúcich baktérií.

Z kontroly usmrtenia baktérie *E. coli* jasne vyplýva, že žiadna koncentrácia extraktov neusmrtila bunky úplne. Na základe merania zákalu a kontroly metabolizmu resazurínom (predchádzajúca analýza) je potvrdené, že niektoré extrakty baktériu inhibovali v raste a metabolizme. Kontrola tvorby kolónií však dokázala, že bunky zostali schopné prežiť a ďalej sa množiť, keď boli opäť preočkované do vhodného prostredia. V Tabuľke 19 sú výsledky životaschopnosti kultúr v jamiek.

Tabuľka 19 Kontrola usmrtenia *Escherichia coli*

| <i>Escherichia coli</i> | Hexánové extrakty |         |           |            | Etanolové extrakty |          |            |            | Rozpúšťač*<br>-t'adlo* |
|-------------------------|-------------------|---------|-----------|------------|--------------------|----------|------------|------------|------------------------|
|                         | 2 mg/ml           | 1 mg/ml | 0,5 mg/ml | 0,25 mg/ml | 50 mg/ml           | 25 mg/ml | 12,5 mg/ml | 6,25 mg/ml |                        |
| KveFed19                | +                 | +       | +         | +          | +                  | +        | +          | +          | +                      |
| KveFut20                | +                 | +       | +         | +          | +                  | +        | +          | +          | +                      |
| KveSan19                | +                 | +       | +         | +          | +                  | +        | +          | +          | +                      |
| KveSan20                | +                 | +       | +         | +          | +                  | +        | +          | +          | +                      |
| SemSan20                | +                 | +       | +         | +          | +                  | +        | +          | +          | +                      |
| TriSan20                | +                 | +       | +         | +          | +                  | +        | +          | +          | +                      |
| MukSan19                | +                 | +       | +         | +          | +                  | +        | +          | +          | +                      |
| MukSan20                | +                 | +       | +         | +          | +                  | +        | +          | +          | +                      |

(\*rozpúšťač – Hexán 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,125 %; EtOH 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,125 %)

V Tabuľka 20 je zobrazená schopnosť kultúr *C. acnes* tvoriť kolónie po tom, ako boli inkubované s extraktami. Zo stanovovania inhibície resazurínom (predchádzajúca analýza) vyplýva, že hexánové extrakty KveFed19, KveSan19, KveSan20 a TriSan20 v koncentrácii 2 mg/ml mali inhibičný efekt, ale antimikrobiálny efekt z nich mal iba extrakt KveFed19 v danej koncentrácii a extrakt TriSan20 vo všetkých koncentráciách. Znamená to, že v prípade extraktu KveSan19 a KveSan20 boli antimikrobiálne účinky príliš slabé na usmrtenie baktérie. Etanolové extrakty mali zväčša antimikrobiálny efekt, s výnimkou extraktu semienok vo všetkých koncentráciách a extraktov múk v koncentrácii 12,5 mg/ml a nižšej. Tento antimikrobiálny efekt etanolových extraktov nebol spôsobený samotným etanolom, vzhľadom k tomu, že kultúry inhibované roztokmi etanolu kolónie tvorili.

Tabuľka 20 Kontrola usmrtenia *Cutibacterium acnes*

|  | Hexánové extrakty | Etanolové extrakty |  |
|--|-------------------|--------------------|--|
|--|-------------------|--------------------|--|

| <i>Cutibacterium acnes</i> | 2 mg/ml | 1 mg/ml | 0,5 mg/ml | 0,25 mg/ml | 50 mg/ml | 25 mg/ml | 12,5 mg/ml | 6,25 mg/ml | Rozpúšťadlo* |
|----------------------------|---------|---------|-----------|------------|----------|----------|------------|------------|--------------|
| KveFed19                   | -       | +       | +         | +          | -        | -        | -          | -          | +            |
| KveFut20                   | +       | +       | +         | +          | -        | -        | -          | -          | +            |
| KveSan19                   | +       | +       | +         | +          | -        | -        | -          | -          | +            |
| KveSan20                   | +       | +       | +         | +          | -        | -        | -          | -          | +            |
| SemSan20                   | +       | +       | +         | +          | +        | +        | +          | +          | +            |
| TriSan20                   | -       | -       | -         | -          | -        | -        | -          | -          | +            |
| MukSan19                   | +       | +       | +         | +          | -        | -        | +          | +          | +            |
| MukSan20                   | +       | +       | +         | +          | -        | -        | +          | +          | +            |

(\*rozpúšťadlo – Hexán 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,125 %; EtOH 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,125 %)

Podobne ako u *C. acnes*, aj pri *Staphylococcus epidermidis* mali inhibičný účinok viaceré hexánové extrakty (viď Tabuľka 21). Avšak antimikrobiálny účinok bol zistený iba u extraktov z trichómov, a to vo všetkých skúmaných koncentráciách. Obsah jamiek s hexánovými extraktami v najnižšej koncentrácii nevytvoril žiadnu kolóniu, čo bolo spôsobené chybou pipetovania kultúry. Na základe výsledkov však predpokladáme, že v najnižšej koncentrácii extrakty nemali antimikrobiálny účinok. Na druhej strane, etanolové extrakty mali antimikrobiálny účinok na *S. epidermidis* zväčša všetky, dokonca aj extrakt semienok až po koncentraciu 25 mg/ml. Z kontroly samotných rozpúšťadiel je zrejmé, že antimikrobiálne efekty extraktov neboli spôsobené samotných rozpúšťadlom.

Tabuľka 21 Kontrola usmrtenia *Staphylococcus epidermidis* (\*rozpúšťadlo – Hexán 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,125 %; EtOH 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,125 %)

| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hexánové extrakty |         |           |            | Etanolové extrakty |          |            |            | Rozpúšťadlo* |
|-----------------------------------|-------------------|---------|-----------|------------|--------------------|----------|------------|------------|--------------|
|                                   | 2 mg/ml           | 1 mg/ml | 0,5 mg/ml | 0,25 mg/ml | 50 mg/ml           | 25 mg/ml | 12,5 mg/ml | 6,25 mg/ml |              |
| KveFed19                          | +                 | +       | +         | -          | -                  | -        | -          | -          | +            |
| KveFut20                          | +                 | +       | +         | -          | -                  | -        | -          | -          | +            |
| KveSan19                          | +                 | +       | +         | -          | -                  | -        | -          | -          | +            |
| KveSan20                          | +                 | +       | +         | -          | -                  | -        | -          | -          | +            |
| SemSan20                          | +                 | +       | +         | -          | -                  | -        | +          | +          | +            |
| TriSan20                          | -                 | -       | -         | -          | -                  | -        | -          | -          | +            |
| MukSan19                          | +                 | +       | +         | -          | -                  | -        | -          | -          | +            |
| MukSan20                          | +                 | +       | +         | -          | -                  | -        | -          | -          | +            |

(\*rozpúšťadlo – Hexán 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,125 %; EtOH 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,125 %)

### 5.11 Využitie vedľajších konopných produktov na kultiváciu kvasiniek

Odpadné produkty výroby CBD extraktu z konopy satej boli použité pri biotechnologickej produkcii aktívnych látok pomocou karotenogénnej kvasinky druhu *Rhodospiridium toruloides*. Použitými odpadnými substrátmi boli vyextrahované zvyšky kvetov po extrakcii etanolom, vylisované pelety (pomleté na konopnú múku) a sedimentačné olejové kaly.



### 5.11.1 Kultivačné médiá

Kultivačné médiá určené pre kvasinky musia obsahovať ako zdroj uhlíka monosacharidy, keďže kvasinky neutilizujú polysacharidy. Ako zdroj dusíka sú vhodné močovina a síran amónny, ale aj proteíny nachádzajúce sa v substrátoch, keďže kvasinky produkujú proteázy.

Používané konopné substráty obsahujú ako zdroj uhlíka polysacharidy (kvety a múky) a triacylglyceroly (kaly), čiže bolo potrebné ich hydrolyzovať na monosacharidy, resp. glycerol, podľa postupov v kapitole 4.13.1. Tabuľka 22 znázorňuje zloženie substrátov pred hydrolýzou.

Koncentrácie potrebných živín boli optimalizované prídavkom glukózy, respektíve močoviny, aby bol dosiahnutý obsah sacharidov 30 g/l a dusíka 0,84 g/l. Po hydrolýze bol v olejových hydrolyzátoch zistený obsah glycerolu pomocou kvapalinovej chromatografie, v sacharidových hydrolyzátoch bol určený obsah sacharidov metódou podľa Dubois. Obsah dusíka v substráte bol prepočítaný zo známeho obsahu dusíka vo frakciách, zisteného metódou podľa Kjeldahla (viď kapitola 5.3). Obsah živín v substrátoch po hydrolýze a aj množstvo doplnených látok do 50 ml médií ukazuje Tabuľka 22.

Tabuľka 22 Kultivačné médiá

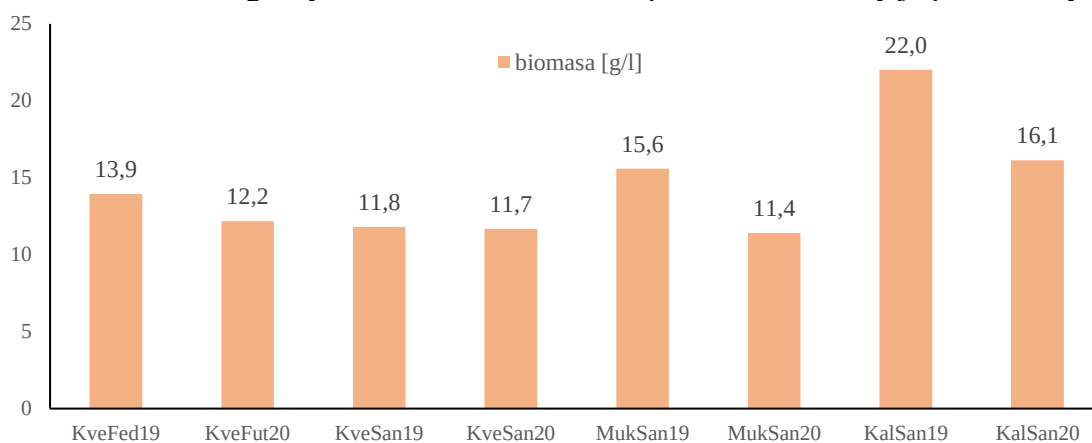
| Príprava substrátov na hydrolýzu                        |                     |              |              |              |              |              |              |              |
|---------------------------------------------------------|---------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Substrát                                                | Zbytky po extrakcii |              |              |              |              |              |              |              |
|                                                         | KveFed<br>19        | KveFut<br>20 | KveSan<br>19 | KveSan<br>20 | MukSan<br>19 | MukSan<br>20 | KalSan<br>19 | KalSan<br>20 |
| Objem (ml)                                              | 250,0               | 250,0        | 250,0        | 250,0        | 250,0        | 250,0        | 500,0        | 500,0        |
| Navážka (g)                                             | 3,8                 | 3,6          | 4,1          | 3,9          | 45,0         | 45,0         | 50,0         | 50,0         |
| Koncentrácia substrátu (g/l)                            | 15,3                | 14,6         | 16,5         | 15,7         | 180,0        | 180,0        | 100,0        | 100,0        |
| Zloženie substrátov po hydrolýze                        |                     |              |              |              |              |              |              |              |
| Obsah sacharidov (g/l)                                  | 19,25               | 17,52        | 4,61         | 6,62         | 10,39        | 10,18        | 10,36        | 11,19        |
| Obsah dusíka (g/l)                                      | 0,28                | 0,33         | 0,33         | 0,32         | 4,49         | 4,48         | 0,13         | 0,13         |
| Množstvo doplnených živín do jednotlivých médií (50 ml) |                     |              |              |              |              |              |              |              |
| Glukóza (g)                                             | 0,54                | 0,62         | 1,27         | 1,17         | 0,98         | 0,99         | 0,98         | 0,94         |
| Močovina (g)                                            | 0,06                | 0,05         | 0,06         | 0,06         | -            | -            | 0,08         | 0,08         |

### 5.11.2 Nárast biomasy na médiách a stanovenie produkcie lipidov metódou GC

Po dokončení kultivácie bolo 50 ml média centrifugovaných a biomasa bola lyofilizovaná. Z hmotnosti lyofilizovanej biomasy bol vypočítaný nárast biomasy na liter média. Výsledky sú zobrazené v Grafe 14. Kultivácia bola z časových príčin prevedená iba raz a výsledky je treba považovať za skriningové.

Zdanlivo najvyšší výsledok produkcie biomasy dosiahli kvasinky kultivované na médiách z kalu. Avšak tieto výsledky boli skreslené tým, že pri separácii biomasy od média centrifúgou bolo náročné oddeliť frakciu biomasy od častíc, ktoré hydrolyzát kalu obsahoval. Preto daný výsledok nie je presný. Do budúcnosti navrhujeme zmeniť postup separácie tak, aby boli čiastočky kalu dostatočne premyté, alebo ešte pred kultiváciou médium filtrovať.

Nárast biomasy na médiách zo zvyškov extraktov a z múk bol porovnateľný, najlepšie sa kvasinkám darilo na médiu z múky San19 (15,6 g/l) a zvyškoch odrody Fedora (13,9 g/l). Z výsledkov kultivácií sa dá urobiť záver, že odpadné frakcie konopy sú vhodnými substrátmi na kultiváciu karotenogénnych kvasiniek, dosiahnutá produkcia biomasy je pomerne vysoká.

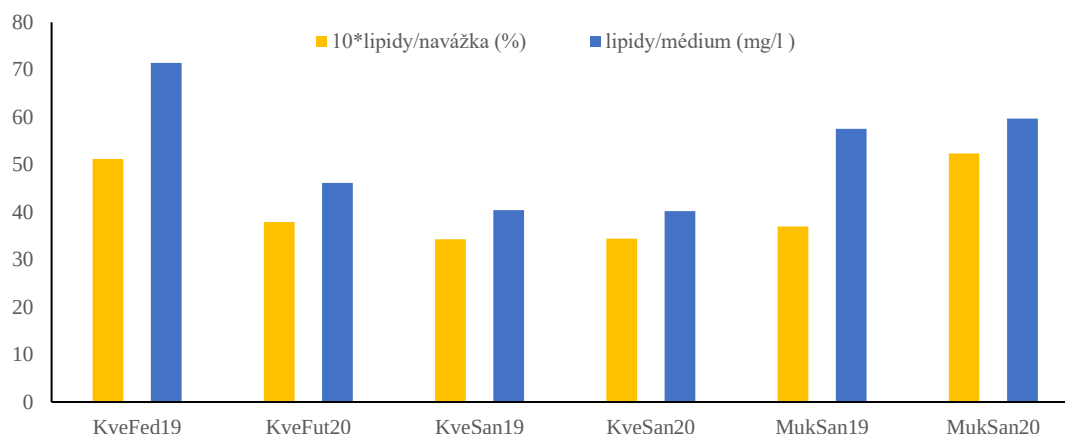


Graf 14 Nárast biomasy

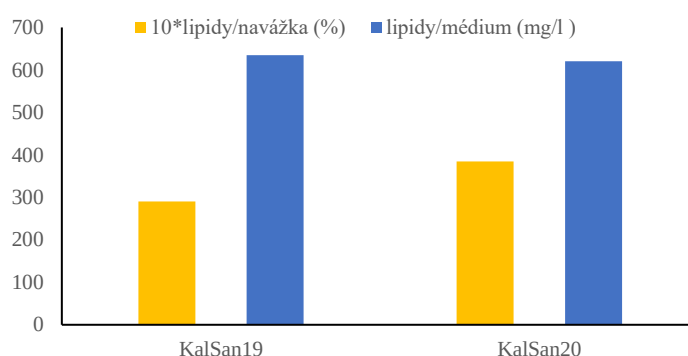
Lipidy boli z biomasy extrahované v podobe metylesterov a analyzované na plynovom chromatografe. Vyhodnocovaný bol ich profil z hľadiska nasýtenosti a percentuálny obsah v biomase a v kultivačnom médiu a výsledky sú znázornené v Grafoch 15 a 16.

Najviac lipidov v médiu aj v biomase sa nachádzalo pri použití hydrolyzátov kalu. Avšak tento výsledok môže byť skreslený tým, že pri separácii biomasy od média centrifúgou bolo náročné oddeliť frakciu biomasy od častíc, ktoré hydrolyzát kalu obsahoval. Zistené lipidy teda nie sú iba produktami kvasinky, ale aj lipidy, ktoré sa už nachádzali v médiu. Pre presnejšiu analýzu bude potrebné použiť účinnejší spôsob separácie biomasy, alebo hydrolyzát pred kultiváciou filtrovať.

Z ostatných použitých substrátov indukovali biosyntézu lipidov najviac múky (59,73 mg/l) a vyextrahované kvety Fedora 2019 (71,42 mg/l). Všeobecne však produkcia lipidov v týchto médiách bola na porovnateľnej úrovni a dosahovala koncentráciu lipidov v médiu od 40,19 do 71,42 mg/l. Vzhľadom na zloženie média, ktoré obsahovalo v prípade kvetov aj múk rovnaký obsah sacharidov, ale médium z múk obsahovalo viac proteínov, čiže malo nižší pomer C/N. Tento rozdiel mohol byť dôvodom vyššej produkcie lipidov.

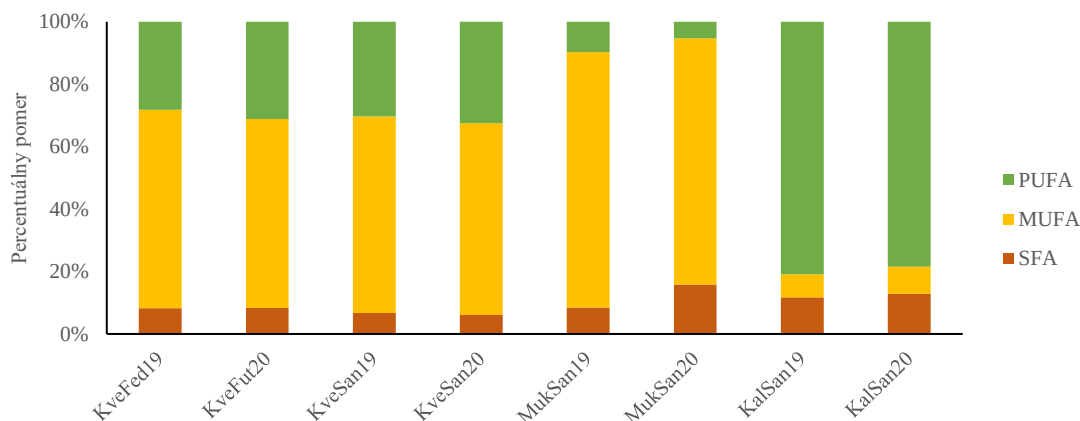


Graf 15 Obsah lipidov v biomase a médiu (sacharidové hydrolyzáty)



Graf 16 Obsah lipidov v biomase a médiu (kaly)

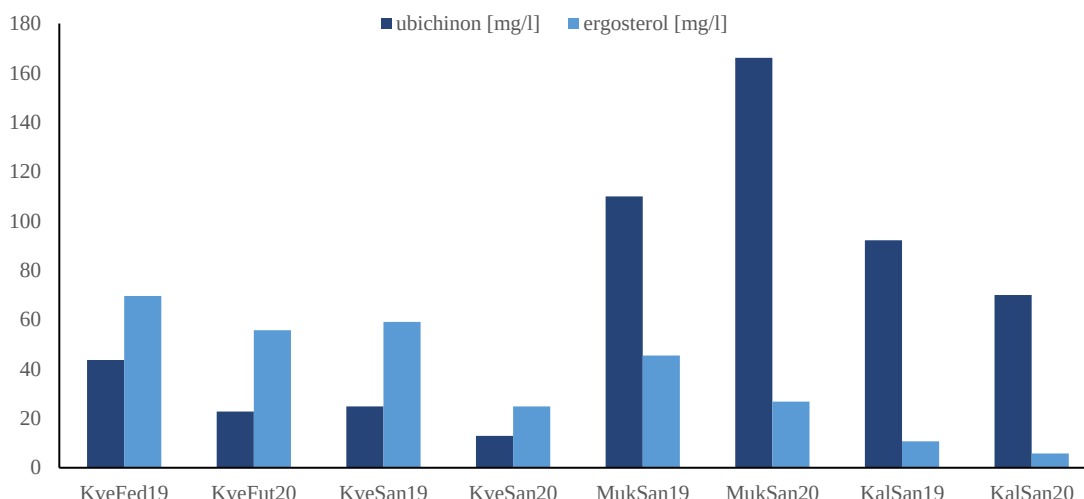
Bol zistený vplyv konopného substrátu na pomer produkovaných mastných kyselín, ktorý je viditeľný na Grafe 17. V prípade kalového hydrolyzáty bol profil mastných kyselín podobný profilu samotného konopného oleja, čiže to opäť potvrdzuje, že lipidy boli pozostatok oleja v médiu. Obsah nasýtených mastných kyselín sa zásadne nelíšil naprieč použitými médiami, avšak použitím vyextrahovaných kvetov sa dosiahol vyšší podiel polynenasýtených mastných kyselín ako u médií z múk. Najväčší rozdiel v médiách z múk je v tom, že hydrolyzáty múk obsahovali viac dusíka (prítomného už v múke), takže médium malo iný pomer C/N, čo mohla byť príčina zníženej produkcie polynenasýtených mastných kyselín. Kvôli vysokému obsahu dusíka je hydrolyzáty konopnej múky zaujímavým substrátom a mohol by byť použitý v kombinácii s uhľikátym substrátom, ktorý dusík neobsahuje (napr. melasa).



### 5.11.3 Stanovenie produkcie karotenoidov metódou HPLC

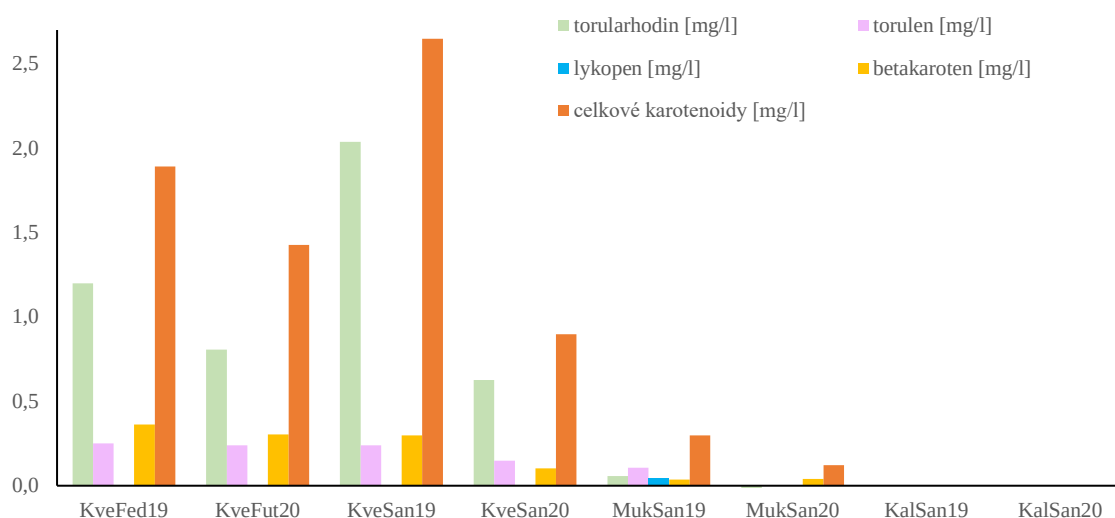
Vyprodukované karotenoidy, ubichinón a ergosterol boli stanovené pomocou HPLC podľa postupu v kapitole 4.13.3.

Graf 18 zobrazuje produkciu ubichinónu a ergosterolu. Podľa použitých druhov substrátov sa dá pozorovať odlišný pomer týchto dvoch látok. Médiá z vyextrahovaných kvetov obsahovali asi dvakrát viac ergosterolu ako ubichinónu. V produkcii ergosterolu a ubichinónu použitím vyextrahovaných kvetov rôznych odrôd nebol pozorovaný takmer žiadny rozdiel, iba KveSan20 mali nižšiu produkciu oboch látok. Najviac ergosterolu bolo vyprodukovaného na médiu z vyextrahovaných zbytkov KveFed19 (69,6 mg/l). V prípade múk a kalov bol pomer úplne odlišný, ergosterolu bolo oproti ubichinónu vyprodukovaného výrazne menej. Múky produkovali jednoznačne najviac ubichinónu, MukSan20 až 166 mg/l. Vzhľadom na zloženie substrátov sa dá predpokladať, že vysoký obsah bielkovín v médiách z múky spôsobil, že kvasinky produkovali ubichinón vo vyššej miere.

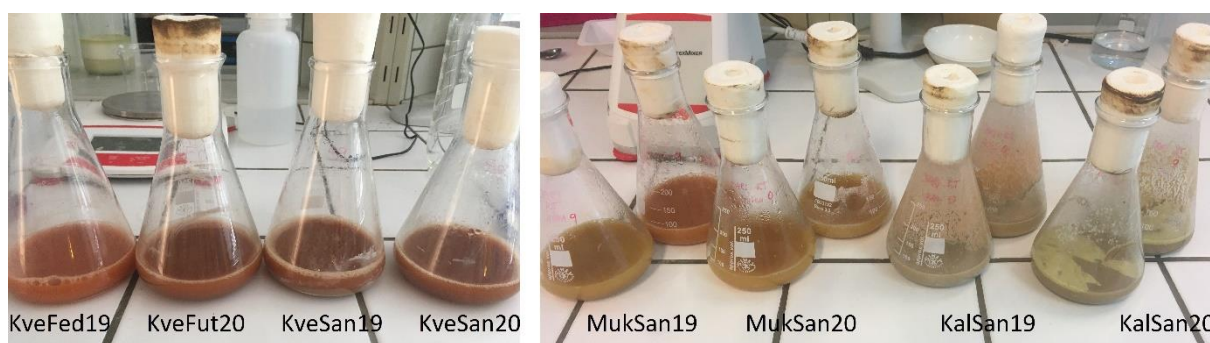


Graf 18 Obsah ubichinónu a ergosterolu v médiách

Karotenogénne kvasinky v médiách okrem steroidných molekúl produkovali ako sekundárne metabolity aj karotenoidy. Ich produkcia bolo výrazne odlišná medzi použitými substrátmi, ako je možné vidieť na Obrázku 12. Médium z hydrolyzátu kalov nebolo na produkciu karotenoidov vôbec vhodné, pri analýze neboli detegované prakticky žiadne množstvá týchto látok. Naopak, médiá z vyextrahovaných kvetov dosahovali vysoké koncentrácie karotenoidov, najviac KveSan19, kde bolo nameraných až 2,65 mg/l celkových karotenoidov (Graf 19). Substráty z múk indukovali produkciu karotenoidov v menšej miere, médium s MukSan19 obsahovalo 0,30 mg/l celkových karotenoidov. Keď porovnáme výsledky produkcie karotenoidov a ubichinónu pri médiách z kvetov, potvrdzuje sa fakt, že produkcia týchto látok je antagonistická. Je to zapríčinené kompetíciou dráhou biosyntézy karotenoidov a ubichinónu, keďže majú rovnaký prekursor [48]. Médium z vyextrahovaných kvetov konopy výrazne podporoval produkciu pigmentov na úkor ubichinónu.



Graf 19 Obsah karotenoidov v médiu



Obrázok 12 Médiá po kultivácii

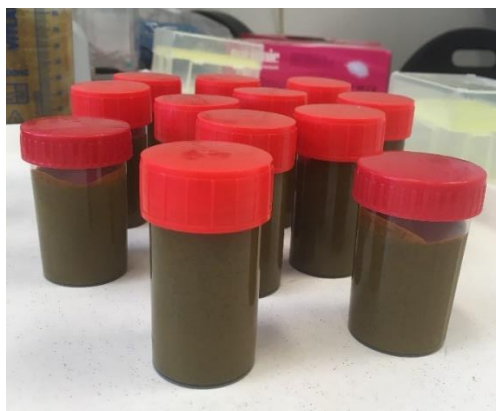
## 5.12 Využitie vedľajších konopných produktov v kozmetike

### 5.12.1 Testovanie peelingu hodnotiteľmi

Pripravený pleťový peeling bol senzoricky zhodnotený 16 osobami. Testovanie trvalo dva týždne, počas ktorých hodnotitelia peeling používali podľa návodu na použitie. Návod na použitie bol nasledovný: Aplikovať približne pol čajovej lyžičky na navlhčenú pleť, produkt rozotrieť po tvári a pleť masírovať asi minútu. Vyhnúť sa oblasti očí. Aplikáciu opakovať trikrát do týždňa po dobu dvoch týždňov.

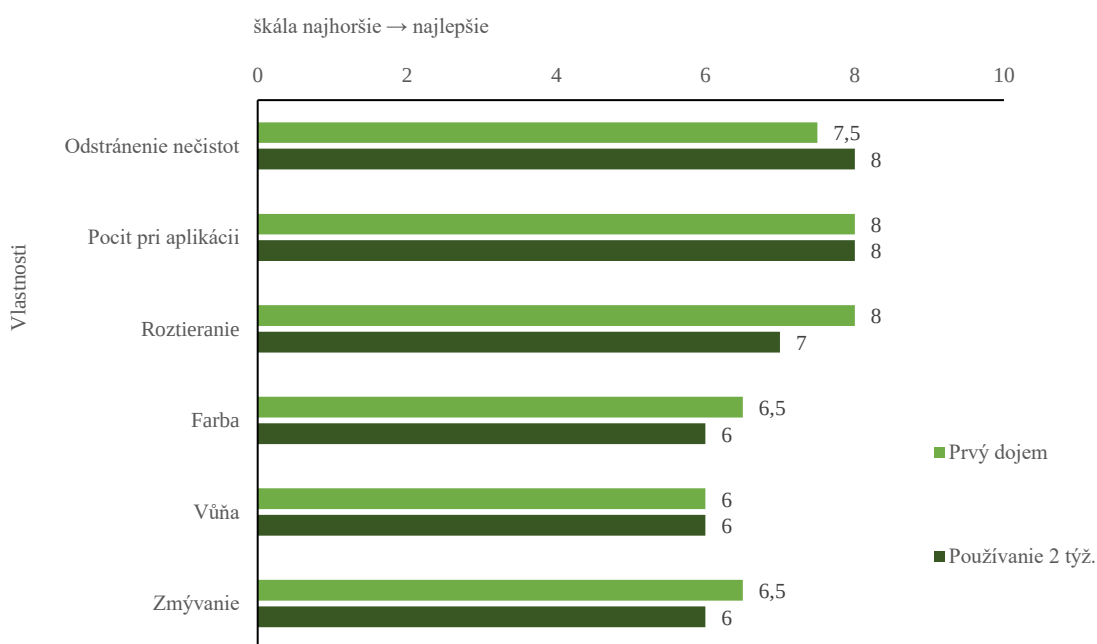
Respondenti hodnotili produkt v dvoch dotazníkoch – po prvom použití a po dvoch týždňoch požívania (Príloha E). Prvý dotazník sa zameriaval na hodnotenie prvého dojmu z produktu, druhý dotazník na celkový dojem a pozorované účinky na pleť. Z výsledkov boli vypočítané mediány a boli porovnané rozdiely medzi prvým a celkovým dojmom.

Škála hodnotenia vlastností peelingu bola od 0 do 10, s tým, že 10 znamenala najlepšiu známku a 0 najhoršiu. Škála na zhodnotenie hustoty častíc a konzistencie produktu bola taktiež medzi hodnotami 0 až 10, ale známka 0 znamenala príliš nízku hustotu častíc/riedku konzistenciu a známka 10 príliš vysokú hustotu častíc/riedku konzistenciu, čiže najlepšie hodnotenie bolo v strede rozmedzia.

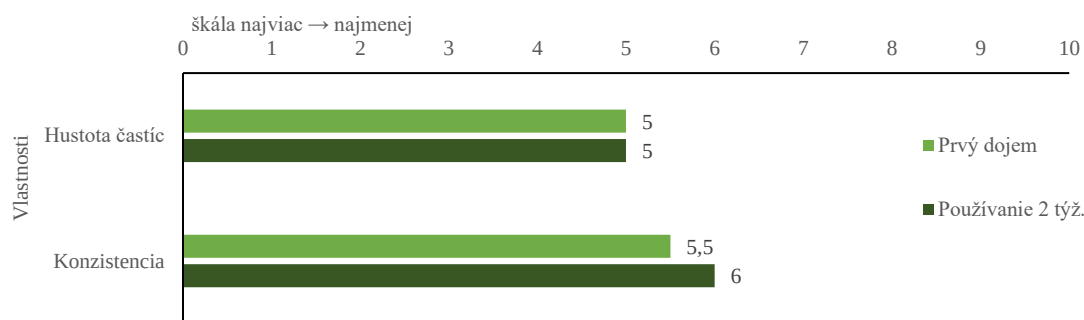


Obrázok 13 Vzorky peelingu pre hodnotiteľov

Respondenti hodnotili vlastnosti peelingu vo všeobecnosti pozitívne, lebo žiadny z atribútov neprekročil polovicu škály najlepšie – najhoršie. Za najpríjemnejšiu vlastnosť bol považovaný celkový pocit pri aplikácii (známka 2), čo znamená, že veľkosť častíc konopnej múky a pomer veľkostí 200 a 400  $\mu\text{m}$  bol zvolený veľmi vhodne. K tomuto pocitu prispievali aj ostatné charakteristiky ako konzistencia a roztierateľnosť, ktoré boli taktiež hodnotené veľmi kladne. Hustota častíc bola zhodnotená známkou 5, čo znamená, že bola považovaná za ideálnu. Pociť odstránenia nečistôt z pleti bol taktiež hodnotený veľmi pozitívne (známka 2), takže sa dá konštatovať, že peeling spĺňal funkciu odstránenia nečistôt a odumretých častíc z pleti výborne. Neutrálne boli hodnotené farba, vôňa a zmývateľnosť peelingu. Farba bola tmavo zelená, kvôli vysokému obsahu zeleného sedimentačného kalu a zelenej farbe konopnej múky. Túto farbu nie je možné zmeniť, ale bolo by možné upraviť jej odtieň, a to použitím kaolínu vhodnej farby. Zmývateľnosť produktu je možné ovplyvniť nižším obsahom peelingových častíc, čo by ale znížilo aj účinnosť odstraňovania nečistôt. Mediány známok od súboru hodnotiteľov z prvého aj druhého dotazníka sú znázornené v Grafoch 20 a 21.



Graf 20 Hodnotenie vlastností peelingu - prvý a celkový dojem

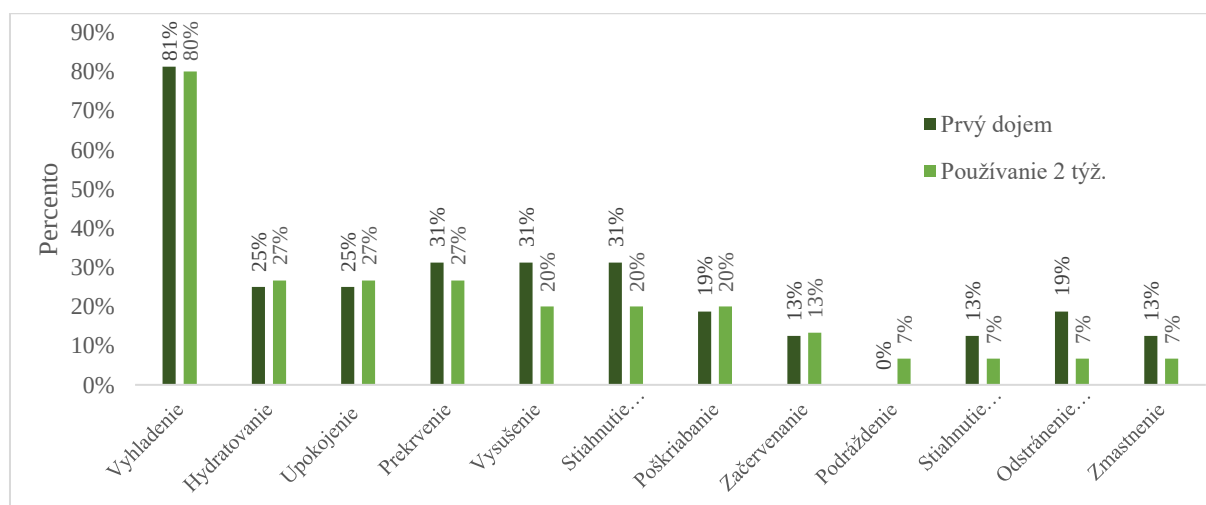


Graf 21 Hodnotenie vlastností peelingu - prvý a celkový dojem

Vplyv používania peelingu na stav pokožky bol hodnotený výberom možností. Možnosti obsahovali negatívne aj pozitívne možnosti a aj kolónku iné. Respondenti zhodnocovali okamžitý vplyv na pokožku – viditeľný ihneď po aplikácii (pocit nie viac ako hodinu po aplikácii) a dlhodobý vplyv, ktorý zaznamenali po dvoch týždňoch používania.

V prípade efektu viditeľného ihneď po aplikácii boli mierne rozdiely v prvom dojme a dojme po dvoch týždňoch. Môže to byť spôsobené tým, že hodnotitelia si po viacerých použitíach uvedomili reálny efekt, zatiaľ čo pri prvom dojme boli ovplyvnení očakávaniami alebo momentálnym stavom pleti. Pri vyhodnocovaní výsledkov bol za relevantnejší považovaný dojem po dvoch týždňoch.

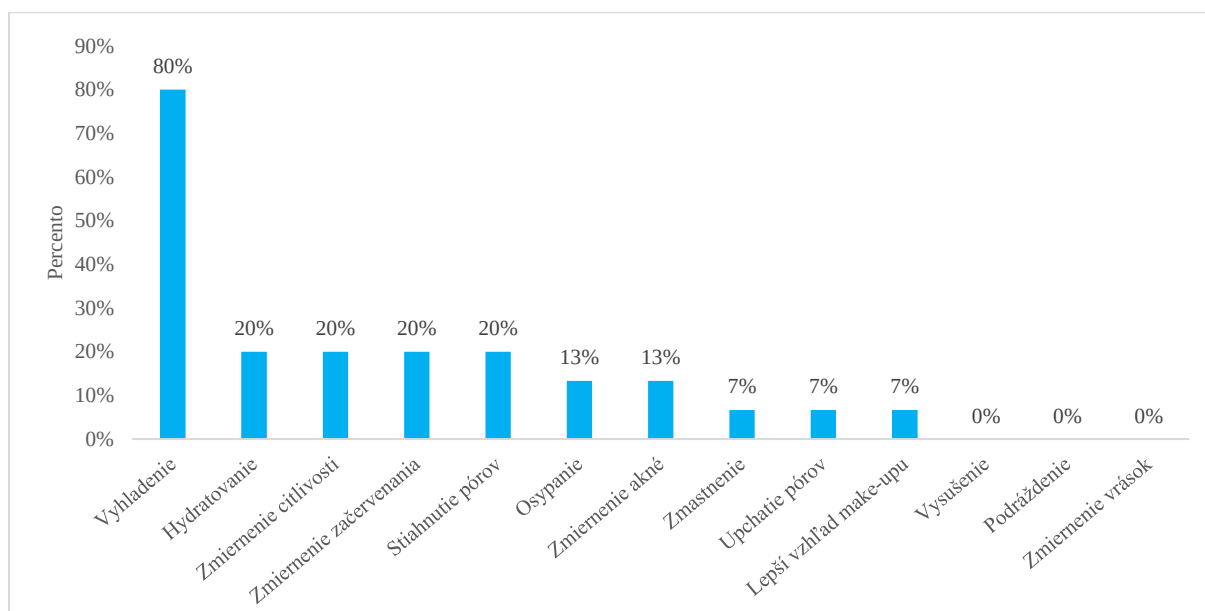
80 % hodnotiteľov zaznamenalo po ihneď použití vyhladenejšiu pleť, čo bol hlavný účel vyrobeného produktu. Pocit hladšej pleti je spôsobený odstránením odumretých buniek z povrchu pleti. Už podľa hodnotenia vlastností peelingu bolo zjavné, že abrazívna funkcia peelingu bola ideálna. 27 % respondentov uviedlo, že ich pleť bola po aplikácii hydratovaná, upokojená a prekrvená. Hydratovaný a upokojujúci dojem bol dosiahnutý vďaka olejovej zložke, pocit prekrvenia kvôli časticiam peelingu, ale aj masáži pleti počas aplikácie. 20 % osôb malo pocit vysušenej pokožky. Pocit hydratácie alebo vysušenia môže byť daný aj typom pleti, keďže suchá pokožka je náchylná na dehydratáciu. Peeling vo všeobecnosti nie je produkt určený na hydratovanie pleti, ale na čistenie, takže by po ňom mala nasledovať aplikácia pleťového produktu na obnovenie ochrannnej vrstvy pokožky. Všetky zaznamenané okamžité efekty sú znázornené v Grafe 22.



Graf 22 Efekty na pokožku hodnotiteľov – momentálny pocit po aplikácii



Za najvýznamnejší dlhodobý efekt bolo považované vyhladenie pleti, až 80 % respondentov uviedlo, že ich pleť bola po dvoch týždňoch používania hladšia. Obnovenie poslednej vrstvy pokožky, *stratum corneum*, trvá približne 20 dní, takže jej mechanické vyhladenie peelingom má efekt trvajúci niekoľko dní. 20 % osôb hodnotilo svoju pleť po používaní ako hydratovanejšiu, menej citlivú, menej začervenanú a všimlo si stiahnutie pórov. Hydratácia bola spôsobená olejovou zložkou, ktorá na pleti zanecháva ochrannú vrstvu, teda zníži stratu vody. Rovnako mohla pleť pôsobiť hydratovane aj vďaka odstráneniu suchých buniek z povrchu pokožky. Ochranná bariéra taktiež prispieva ku zmierneniu citlivosti pleti. Stiahnutie pórov je spôsobené rozpustením mazu pomocou olejových zložiek a abrazívnemu efektu častíc múky, ktoré čistia upchaté póry. Bol zaznamenaný aj negatívny efekt – osypanie pleti, v relatívne vysokej miere 13 %. Po preskúmaní týchto prípadov bolo zistené, že sa jednalo o probandov, ktorí majú citlivú pleť a už v minulosti ich pleť reagovala osypaním. Môžu byť citliví na niektorý esenciálny olej prítomný v peelingu, Výskyt všetkých zaznamenaných dlhodobých efektov je znázornený na Grafe 23.



Graf 23 Efekty na pokožku hodnotiteľov - dlhodobé

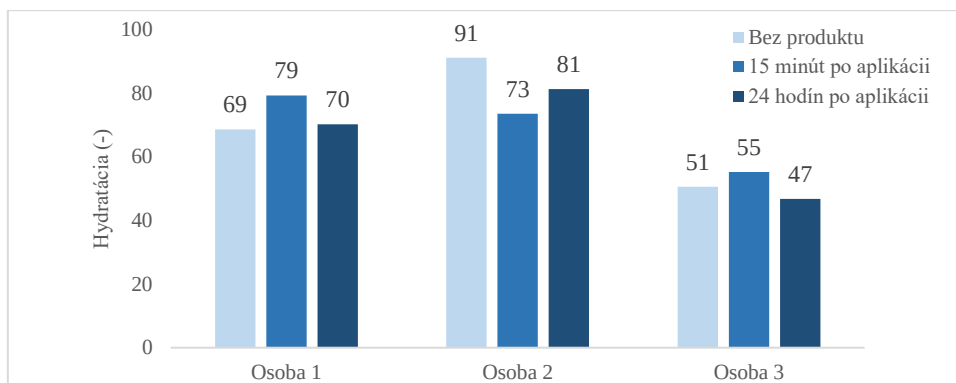
### 5.12.2 Meranie hydratácie a transepidermálnej straty vody

Hydratačné účinky peelingu boli merané pomocou korneometrickej a TEWL sondy podľa postupu v kapitole 4.14.3. Meranie prebiehalo pred aplikáciou produktu, 15 minút po aplikácii a 24 hodín po nej, merania sa zúčastnili tri osoby. Počas priebehu experimentu si probandi na skúmanú oblasť pokožky neaplikovali žiadnu inú kozmetiku ani mydlo.

Peeling je produkt určený na čistenie pleti z dvoch smerov – rozpustením mazu olejnatou zložkou a mechanickou exfoliáciou abrazívnymi časticami. Nie je teda primárne určený na hydratáciu. Daný peeling však obsahoval konopný olej, ktorý na pleti zanecháva hydrofóbnu ochrannú vrstvu, čím predchádza stratám vody, a tak bol predpokladaný aj pozitívny vplyv na hydratáciu pokožky.

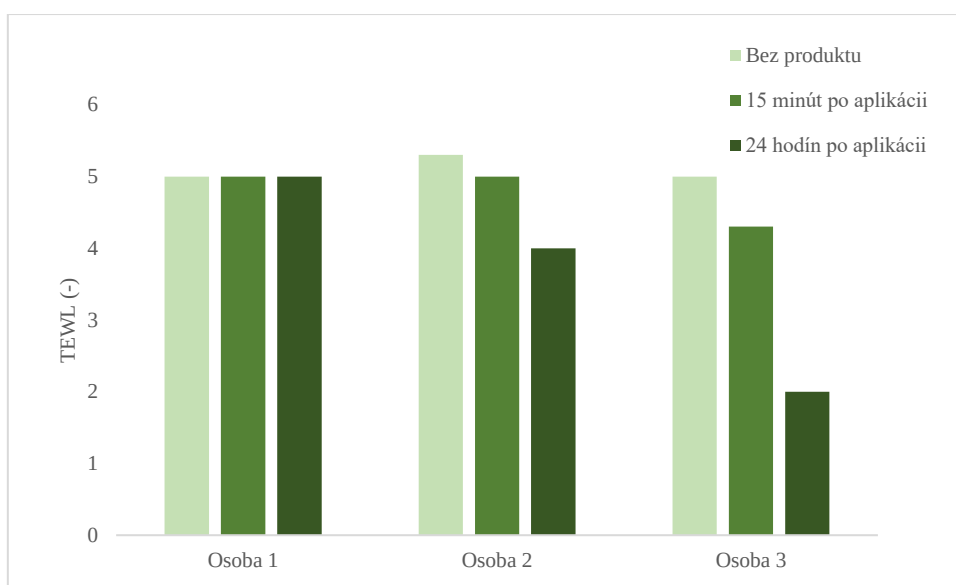


Na Grafe 24 je znázornené, ako sa vyvíjala hydratácia pokožky troch probandov. Hydratácia je bezrozmerná veličina v rozmedzí od 0-100, kde hodnoty do 40 značia suchú pokožku, 40 – 60 normálnu a hodnoty nad 60 masťnú pokožku. Vývin hydratácie u osoby 1 a 3 je veľmi podobný, ale nezhoduje sa s trendom u osoby 2. Hydratácia pokožky u osoby 1 a 3 bola 15 minút po aplikácii viditeľne zvýšená, ale hydratačný účinok nemal trvácny účinok, po 24 hodinách bola hydratácia pokožky opäť znížená. U osoby 2 bol efekt opačný, aplikácia peelingu pokožku zdanlivo vysušila. Táto nezrovnalosť môže byť spôsobená individuálnym stavom pokožky osoby 2.



Graf 24 Vplyv peelingu na hydratáciu pokožky v čase

Meranie vplyvu na transepidermálnu stratu vody naznačuje, že peeling účinne znižuje jej hodnotu (viď Graf 25). Peeling bol na báze oleja, čiže jeho aplikáciou sa vytvorila lipofilná vrstva na pokožke, ktorá účinne zamedzuje odparovaniu vody. U osoby 2 a 3 bola zaznamenaná mierne znížená hodnota TEWL 15 minút po aplikácii, ale 24 hodín po aplikácii bola výrazne nižšia. Pokožka osoby 1 sa chovala inak, plet'ový peeling nemal žiadny zaznamenaný vplyv na jej hodnotu TEWL. Zistené výsledky podporujú výsledky testovania produktu respondentmi, z ktorých si 20 % všimlo, že ich plet' bola hydratovanejšia pri dlhodobom používaní produktu.



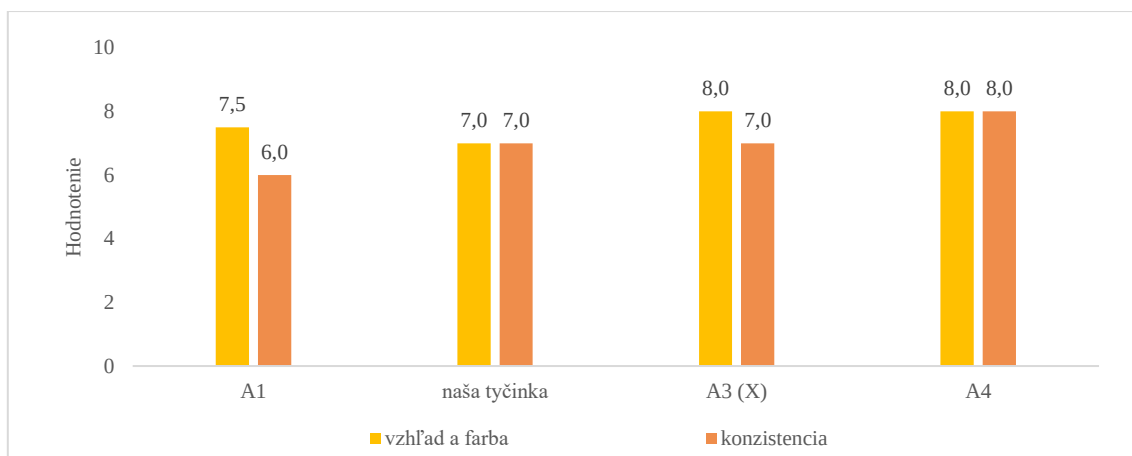
Graf 25 Vplyv peelingu na TEWL pokožky v čase

## 5.13 Využitie vedľajších konopných produktov na výrobu raw tyčinky

### 5.13.1 Senzorická analýza raw tyčinky

Vyrobená tyčinka (A2) bola porovnávaná s dvoma komerčne dostupnými tyčinkami podobného zloženia, ktoré tiež obsahujú konopný proteín (A1 a A4) a s jednou tyčinkou s ryžovým proteínom (A3), ktorých zloženie je opísané v kapitole 4.15.2. Tyčinka bola senzoricky hodnotená 22 respondentami, študentami a zamestnancami fakulty, formou vyplňania dotazníku (Príloha F). Na grafických škálach hodnotili vzhľad, konzistenciu, celkovú chuť a chuťový profil tyčiniek. Tieto škály boli neštruktúrované, takže na ich vyhodnotenie bola použitá mierka, aby boli zaznačeným značkám priradené číselné hodnoty. Z týchto dát bol vypočítaný medián a boli zhotovené grafy. Respondenti mali možnosť aj slovne vyjadriť názor na jednotlivé tyčinky.

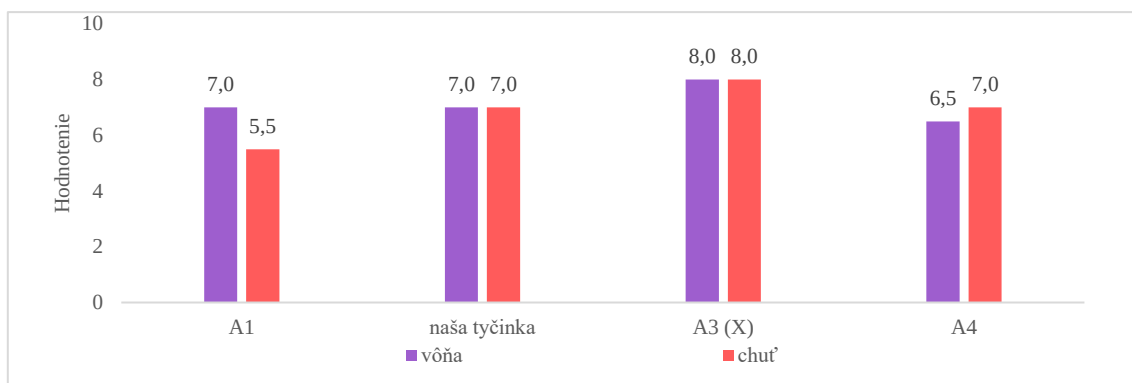
Graf 26 znázorňuje hodnotenie vzhľadu a konzistencie tyčiniek. Z výsledkov vyplýva, že pre respondentov mali všetky tyčinky príjemný vzhľad, najvyššie boli hodnotené tyčinky A3 a A4. Vyrobená raw tyčinka síce obdržala najnižšie hodnotenie, ale oproti ostatným tyčinkám sa líšila iba o jeden stupeň, čiže sa im vzhľadom veľmi približovala. Konzistencia tyčiniek bola respondentami tiež hodnotená pozitívne, najvyššiu známku dostala tyčinka A4, naša tyčinka bola spolu s A3 na druhom mieste. V slovných komentároch respondenti opisovali konzistenciu vyrobenej tyčinky ako jemnú, mäkučkú, príjemnú, ale aj suchú a piesčitú. Tuhosť tyčinky najviac závisela od pomeru sypkých ingrediencií ku kakaovému maslu, takže podľa hodnotenia bol pomer zvolený správne. Obsah datľovej pasty zase určoval lepivosť, čo je opak piesčitej textúry, takže by bolo vhodné jej pomer mierne zvýšiť.



Graf 26 Senzorické hodnotenie tyčiniek - vzhľad a konzistencia

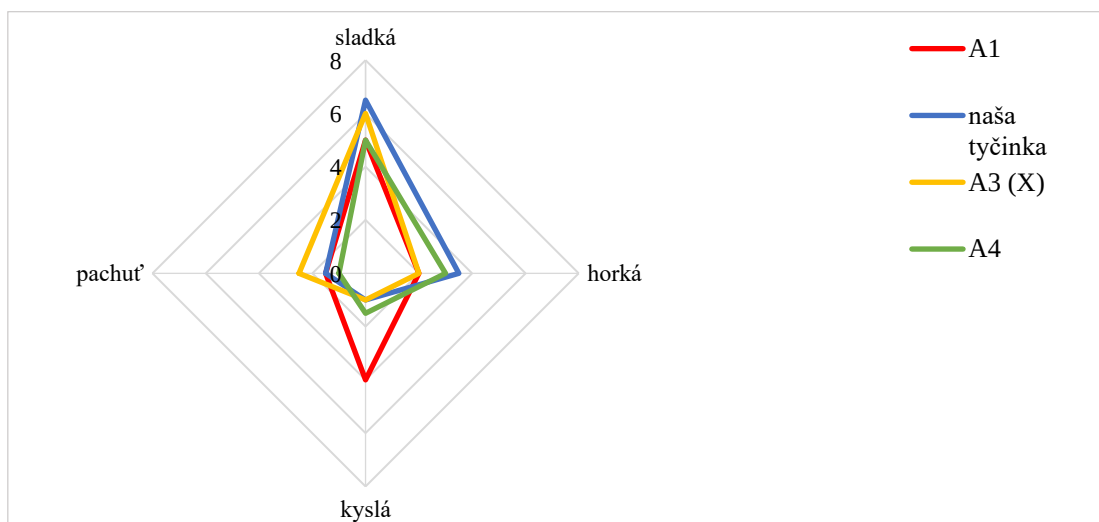
Graf 27 znázorňuje hodnotenie vône a celkovej chuti tyčiniek. Najlepšiu vôňu mala podľa respondentov tyčinka A3 (ktorá ako jediná obsahovala vanilku), naša tyčinka bola spolu s A1 na druhom mieste. V hodnoteniach bola pri vône našej tyčinky spomínaná jej príjemná čokoládová aróma, ktorá bola dosiahnutá použitím kakaového masla a zároveň kakaového prášku. Najlepšiu známku za celkovú chuť dosiahla tiež tyčinka A3, na druhom mieste bola naša tyčinka spolu s A4. Najčastejšie spomínaná poznámka ku chuti našej tyčinky bola jej výrazná sladká chuť, čo bolo niektorými respondentami považované za

pozitívne, ale niektorými naopak za negatívne. Naša, ani žiadna z komerčne dostupných tyčíniek neobsahovali spracované cukry, sladká chuť pochádzala iba z datlovej pasty. Naša tyčinka jej obsahovala najmenej (45 %), takže dojem sladkej chuti bol pravdepodobne spôsobený prepojením chutí ostatných zložiek, respektíve nedostatkom inej príchute, ktorá by sladký vnem potlačila.



Graf 27 Senzorické hodnotenie tyčíniek - vôňa a celková chuť

Bol hodnotený aj profil jednotlivých chutí tyčíniek. Graf 28 zobrazuje chuťové rozloženie jednotlivých tyčíniek. Všetky tyčinky mali veľmi podobný tvar chuťového profilu, až na tyčinku A1, ktorá sa od ostatných odlišovala výraznou kyslosťou. Za najsladšiu bola vyhodnotená naša tyčinka, čo sa zhoduje s komentármi respondentov. Rovnako bola hodnotená ako najviac horká.



Graf 28 Chuťový profil tyčíniek

Ako posledné bolo zhodnotené celkové poradie tyčíniek podľa kritéria prijateľnosti. V tomto hodnotení sa na prvom mieste umiestnila tyčinka A4. Táto tyčinka obsahovala konopný proteín, mala vysoko hodnotený vzhľad a konzistenciu. V chuťovom profile bola vyhodnotená ako menej sladká, ale relatívne horká. Na druhom mieste bola tyčinka A3 bez konopného proteínu. Naša tyčinka sa umiestnila na treťom mieste. Všetky charakteristiky – vzhľad, konzistenciu, vôňu aj chuť mala ohodnotené na hodnotu 7 z 10, čiže relatívne vysoko. Jej chuťový profil

ukázal, že bola najsladšia a zároveň najviac horká. Napriek tejto horkosti bola chuť našej tyčinky hodnotená prijateľne, čo znamená, že sa podarilo kakaovou príchuťou dostatočne prekryť horkosť konopnej múky. Posledná sa umiestnila tyčinka A1.

Zo všetkých porovnávaní vyplýva, že naša tyčinka je z pohľadu spotrebiteľa na úrovni komerčne dostupných tyčiniek. Z výsledkov tejto senzorickej analýzy dokonca vyplývajú možnosti, ako by sa jej receptúra dala vylepšiť tak, aby bola tyčinka na trhu preferovaná.

## 6 ZÁVER

Konopa siata je rastlina so širokým uplatnením v potravinárskom, textilnom, kozmetickom a farmaceutickom priemysle. Je nenáročná na pestovanie a poskytuje kvalitné suroviny a cenné aktívne látky.

Táto diplomová práca je zameraná na literárnu rešerš o rastline konopa siata, jej zložení charakteristike aktívnych látok. Je opísané zloženie jednotlivých surovín konopy a jej súčasné využitie v priemysle.

V experimentálnej časti boli jednotlivé frakcie konopy analyzované z pohľadu zloženia, a to obsahu rozpustných sacharidov, bielkovín, tukov a profilu mastných kyselín. Následne boli pripravené extrakty frakcií konopy s použitím troch rozpúšťadiel s rôznou polaritou – hexán, 70% etanol a destilovaná voda. V týchto extraktoch boli analyzované koncentrácie polyfenolov, flavonoidov, antioxidantov, chlorofylov a kanabinoidov. Následne bol analyzovaný antimikrobiálny účinok hexánových a etanolových extraktov.

V ďalšej časti bolo formou skrínungu testovaných niekoľko možností využitia konopných frakcií – pre biotechnologické účely, v kozmetickej aplikácii a v potravinárstve. Vedľajšie produkty spracovania konopy boli použité na prípravu raw tyčinky a plet'ového peelingu. Tieto produkty boli podrobené senzorickým analýzám s cieľom zistiť ich prijateľnosť medzi spotrebiteľmi. Odpadné substráty boli spracované a využité biotechnologicky na kultiváciu karotenogénnych kvasiniek. Kultivácia bola hodnotená z pohľadu celkového nárastu kultúry, vyprodukovaných karotenoidov a iných aktívnych látok a vyprodukovaných lipidov.

Z analýzy obsahu rozpustných sacharidov vo frakciách konopy bolo zistené, že najvyšší podiel rozpustných sacharidov majú frakcie kvetov (13,6 - 17,9 %), z toho najviac odroda Fedora. Obsah bielkovín bol najvyšší v semienkach a múkach (15,6 – 22,3 %), ale pomerne vysoký obsah bol zistený aj u kvetov. Najviac lipidov obsahovali olejnaté sedimentačné kaly, následne semienka a nezanedbateľný obsah tukov obsahovali aj konopné múky. Profil nasýtenosti lipidov vo frakciách ukázal, že semená, kaly a múky obsahujú lipidy s vysokým podielom nenasýtených mastných kyselín. Tieto analýzy potvrdili, že najcennejšími surovinami konopy sú semienka a múka. Z výživového hľadiska sú však zaujímavé aj sedimentačný kal a kvety.

Z hľadiska obsahu aktívnych látok vo frakciách kvetov boli zistené rozdiely medzi jednotlivými odrodami konopy. Najviac polyfenolov, flavonoidov, antioxidantov aj kanabinoidov obsahovala odroda Fedora. Boli porovnávané aj dva ročníky odrody Santhica a boli zistené, že ročník 2020 bol na všetky aktívne látky bohatší ako ročník 2019, takže na kvalitu plodiny majú vplyv aj klimatické podmienky a pestovanie.. Semienka a múky obsahovali fenolických a antioxidačných látok v porovnaní s kvetmi menej, ale stále sú ich významnými zdrojmi vo výžive. Najviac aktívnych látok však obsahovali trichómy. Trichómy sú chlípky na listoch a kvetoch konopy, ktoré obsahujú látky najkoncentrovanejšie.

Ďalej boli porovnávané aj výťažnosti extrakcií fenolických a antioxidačných látok s použitím troch rôznych rozpúšťadiel. Z výsledkov vyplýva, že na extrakciu polyfenolov, flavonoidov a antioxidantov bola vo všeobecnosti najvhodnejšia destilovaná voda, kvôli jej polarite podobnej obsahovým látkam. Etanol bol tiež vhodný, i keď väčšinou dosahoval mierne nižšiu výťažnosť ako voda. Hexán ako nepolárne rozpúšťadlo nebolo vhodné na extrakciu týchto látok. Z pohľadu extrakcie kanabinoidov boli porovnávané iba rozpúšťadlá hexán a 70%

etanol a bolo zistené, že obe rozpúšťadlá mali porovnateľnú výťažnosť. Z hľadiska obsahu aj ostatných aktívnych látok je však celkovo 70% etanol rozpúšťadlo, ktorým získame cennejší konopný extrakt.

Tento výsledok bol potvrdený aj pri stanovení antimikrobiálneho účinku. Všetky štyri skúšané koncentrácie etanolových extraktov kvetov a trichómov mali tak silné antimikrobiálne účinky, že nebola stanovená hodnota MIC. Ďalšie práce by mohli nadviazať na zloženie extraktov skúmané v tejto práci. Z hexánových extraktov, ktoré boli menej koncentrované, sa potvrdilo, že odroda Fedora je najbohatšia na antimikrobiálne látky, pretože jej hexánový extrakt ako jediný spomedzi extraktov kvetov usmrcoval *Cutibacterium acnes* v koncentrácii 2 mg/ml. Obsah antimikrobiálnych látok v hexánovom aj etanolovom extrakte bol tak vysoký, že usmrcoval *Cutibacterium acnes* aj *Staphylococcus epidermidis* dokonca aj v najnižších skúmaných koncentráciách (2 mg/ml, resp. 6,25 mg/ml).

V druhej časti experimentálnej práce boli vedľajšie konopné frakcie podrobené screeningu možného využitia v biotechnológii, kozmetike a potravinárstve.

Kultivácia karotenogénnych kvasiniek rodu *Rhodospiridium toruloides* bola prevedená na hydrolyzátoch kalov, múk a zbytkov po etanolovej extrakcie kvetov konopy. Bolo zistené, že všetky vyskúšané médiá dosahovali vysoké nárasty biomasy (11,4 – 22,0 g/l), takže boli vhodnými substrátmi pre kvasinku. Médiá z kalov však neobsahovali žiadne detegované karotenoidy, čo znamená, že pre ich bioprodukcii nie sú vhodné. Na rozdiel od kalov, médiá z kvetov dosahovali najvyššie obsahy karotenoidov a zároveň produkovali vysoké koncentrácie ergosterolu. Médiá z múk neprodukovali vysoké obsahy karotenoidov, ale zato vysoké koncentrácie ubichinónu (160 mg/l). V ďalších prácach by mohli byť aplikované niektoré stresové faktory, ktoré by mohli podmieniť ešte vyššiu produkciu týchto látok. V produkcii lipidov nebol medzi médiami z kvetov a múk veľký rozdiel, produkovali priemerne 52,6 mg/l lipidov. Z profilu mastných kyselín bolo zistené, že kvasinky produkovali najviac mononenasýtených mastných kyselín a minimum nasýtených. Médium z kalov obsahovalo častice, ktoré nebolo možné dostatočne odcentrifugovať, a preto bola analýza lipidov čiastočne skreslená.

V kozmetickej aplikácii bol pripravený pleťový peeling, ktorý obsahoval sedimentačný kal a vhodne pomletú konopnú múku pre abrazívnu frakciu. Jeho zloženie bolo optimalizované z pohľadu hustoty a veľkosti častíc múky. Používalo ho 16 respondentov a hodnotili ich prvý dojem z produktu a účinky produktu po 2 týždňoch pravidelného používania. Z výsledkov bolo vyhodnotené, že respondenti boli s peelingom spokojní, 87 % z nich by malo záujem používať produkt aj naďalej. Na ich pleť mal vyhladzujúci efekt, ďalšie spomínané efekty boli hydratácia, zmiernenie citlivosti, začervenania a stiahnutie pórov.

Skríningovou potravinárskou aplikáciou bola príprava raw tyčinky s použitím konopnej múky. Jej receptúra bola tvorená tak, aby bola čo najpriateľnejšia pre spotrebiteľov a porovnateľná s komerčne dostupnými konopnými raw tyčinkami. Tyčinka bola hodnotená senzorickou analýzou, ktorej sa zúčastnilo 22 hodnotiteľov. Počas analýzy bola porovnávaná s ďalšími dvoma podobnými komerčnými tyčinkami a s jednou bez obsahu konopného proteínu. Bolo zistené, že naša tyčinka s danou receptúrou je spotrebiteľmi prijateľná chuťou aj ostatnými organoleptickými vlastnosťami. Na základe vyhodnotenia chuťového profilu bolo

zistené, že v prípade miernej úpravy jej sladkosti a horkosti by bola spomedzi konkurencie najpriateľnejšia.

Záverom diplomovej práce je možné potvrdiť, že konopa siata je všestranne využiteľná rastlina s mimoriadnym obsahom nielen výživových, ale aj aktívnych látok. Jej zaradenie do mnohých produktov v rámci viacerých odvetví je veľmi žiadané a relatívne jednoduché, vzhľadom na jej výnimočné vlastnosti. Nadväzujúce práce ohľadom využitia konopy by sa mohli zamerať na biotechnologické využitie vyextrahovaných zvyškov kvetov, prípadne na rozšírenie aplikácií v kozmetike, potravinárskom aj krmivárskom priemysle.

## 7 POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] KOLTAI, Hinanit and Dvora NAMDAR. *Cannabis Phytomolecule “Entourage”: From Domestication to Medical Use* [online]. B.m.: Elsevier Ltd. 1. October 2020 [accessed. 2020-12-19]. ISSN 13601385. Available at: doi:10.1016/j.tplants.2020.04.007
- [2] GROTENHERMEN, Franjo. *Konopí jako lék*. Olomouc: FONTÁNA, 2009. ISBN 978-80-7336-552-3.
- [3] PORVAZ, Pavol. *Význam a pestovanie konopy siatej Cannabis sativa L. preenergetické účely na Slovensku* Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany Výskumný ústav agroekológie Michalovce 2011. no date. ISBN 9788089417360.
- [4] PDQ INTEGRATIVE, ALTERNATIVE, AND COMPLEMENTARY THERAPIES EDITORIAL BOARD. *Cannabis and Cannabinoids (PDQ®): Health Professional Version* [online]. 2002 [accessed. 2021-02-12]. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26389198>
- [5] DE VITA, Daniela, Valentina Noemi MADIA, Valeria TUDINO, Francesco SACCOLITI, Alessandro DE LEO, Antonella MESSORE, Patrizia ROSCILLI, Alfonso BOTTO, Ivano PINDINELLO, Gianluigi SANTILLI, Luigi SCIPIONE, Roberta COSTI and Roberto DI SANTO. Comparison of different methods for the extraction of cannabinoids from cannabis. *Natural Product Research* [online]. 2020, **34**(20), 2952–2958 [accessed. 2021-05-03]. ISSN 14786427. Available at: doi:10.1080/14786419.2019.1601194
- [6] LACHENMEIER, Dirk W., Stephanie HABEL, Berit FISCHER, Frauke HERBI, Yvonne ZERBE, Verena BOCK, Tabata RAJCIC DE REZENDE, Stephan G. WALCH and Constanze SPROLL. Are side effects of cannabidiol (CBD) products caused by tetrahydrocannabinol (THC) contamination? *F1000Research* [online]. 2020, **8**, 1394 [accessed. 2021-02-12]. Available at: doi:10.12688/f1000research.19931.3
- [7] MORENO, Teresa, Fernando MONTANES, Stephen J. TALLON, Tina FENTON and Jerry W. KING. Extraction of cannabinoids from hemp (*Cannabis sativa* L.) using high pressure solvents: An overview of different processing options. *Journal of Supercritical Fluids* [online]. 2020, **161**, 104850 [accessed. 2020-11-23]. ISSN 08968446. Available at: doi:10.1016/j.supflu.2020.104850
- [8] ANDRE, Christelle M., Jean Francois HAUSMAN and Gea GUERRIERO. Cannabis sativa: The plant of the thousand and one molecules. *Frontiers in Plant Science* [online]. 2016, **7**(FEB2016) [accessed. 2021-03-01]. ISSN 1664462X. Available at: doi:10.3389/fpls.2016.00019
- [9] FIGUEROA-ROBLES, Alejandra, Marilena ANTUNES-RICARDO and Daniel GUAJARDO-FLORES. Encapsulation of phenolic compounds with liposomal improvement in the cosmetic industry. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2020, **593**, 120125 [accessed. 2020-12-19]. ISSN 03785173. Available at: doi:10.1016/j.ijpharm.2020.120125
- [10] MARCANÍKOVÁ, Kateřina. Využití coulometrického detektoru pro analýzu fenolických látek. *Chemické Listy*. 2010, **104**, 27–30.



- [11] VISWANATHAN, Mothi Bharath, Kiyoul PARK, Ming Hsun CHENG, Edgar B. CAHOON, Ismail DWEIKAT, Tom CLEMENTE and Vijay SINGH. Variability in structural carbohydrates, lipid composition, and cellulosic sugar production from industrial hemp varieties. *Industrial Crops and Products* [online]. 2020, **157**, 112906 [accessed. 2021-07-31]. ISSN 0926-6690. Available at: doi:10.1016/J.INDCROP.2020.112906
- [12] VELÍŠEK, Jiří. *Chemie potravin* 1. 2. vyd. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 80-86659-00-3.
- [13] HOUSE, James D., Jason NEUFELD and Gero LESON. Evaluating the Quality of Protein from Hemp Seed (*Cannabis sativa* L.) Products Through the use of the Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score Method. *Journal of agricultural and food chemistry* [online]. 2010, **58**(22), 11801–11807 [accessed. 2021-08-03]. Available at: doi:10.1021/JF102636B
- [14] KOŁODZIEJCZYK, P., L. OZIMEK and J. KOZŁOWSKA. The application of flax and hemp seeds in food, animal feed and cosmetics production. In: *Handbook of Natural Fibres* [online]. B.m.: Elsevier, 2012. Available at: doi:10.1533/9780857095510.2.329
- [15] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie*. 2. opr. vydání. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-0600-1.
- [16] TAKÁCSOVÁ, M. *Chémia potravin*. Bratislava: STU, 1993.
- [17] LEIZER, Cary, David M. RIBNICKY, Alexander POULEV, David DUSHENKOV and Ilya RASKIN. The composition of hemp seed oil and its potential as an important source of nutrition. *Journal of Nutraceuticals, Functional and Medical Foods* [online]. 2000, **2**(4), 35–53 [accessed. 2021-07-31]. Available at: doi:10.1300/J133V02N04\_04
- [18] SIUDEM, Paweł, Iwona WAWER and Katarzyna PARADOWSKA. Rapid evaluation of edible hemp oil quality using NMR and FT-IR spectroscopy. *Journal of Molecular Structure* [online]. 2019, **1177**, 204–208 [accessed. 2020-12-20]. ISSN 00222860. Available at: doi:10.1016/j.molstruc.2018.09.057
- [19] <https://www.thespruceeats.com/easy-hempseed-oil-vinaigrette-salad-dressing-3377583>. [dostupné 1.7.2021].
- [20] POJÍČ, Milica, Aleksandra MIŠAN, Marijana SAKAČ, Tamara Dapčević HADNACROSSED D SIGNEV, Bojana ŠARIĆ, Ivan MILOVANOVIĆ and Miroslav HADNACROSSED D SIGNEV. Characterization of byproducts originating from hemp oil processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2014, **62**(51), 12346–12442. ISSN 15205118. Available at: doi:10.1021/jf5044426
- [21] ZÁKON Č. 167/1998 SB. *o návykových látkách a o změně některých dalších zákonů. Sbírka zákonů*. . 11. June 1998. ISSN 1211-1244
- [22] DUQUE SCHUMACHER, Ana Gabriela, Sérgio PEQUITO and Jennifer PAZOUR. Industrial hemp fiber: A sustainable and economical alternative to cotton. *Journal of Cleaner Production* [online]. 2020, **268**, 122180 [accessed. 2020-11-23]. ISSN 09596526. Available at: doi:10.1016/j.jclepro.2020.122180
- [23] MOCZKOWSKA, Malgorzata, Sabina KARP, Olaf K. HORBANCZUK, Monika HANULA, Jaroslaw WYRWISZ and Marcin A. KUREK. EFFECT OF ROSEMARY EXTRACT ADDITION ON OXIDATIVE STABILITY AND QUALITY OF HEMP

- SEED OIL. *Food and Bioproducts Processing* [online]. 2020, **124**, 33–47 [accessed. 2020-12-20]. ISSN 09603085. Available at: doi:10.1016/j.fbp.2020.08.002
- [24] TERÄSVALLI, Heini. Extraction and purification of cannabidiol [online]. 2020 [accessed. 2021-07-31]. Available at: <https://lutpub.lut.fi/handle/10024/161311>
- [25] MARZORATI, Stefania, Danilo FRISCIONE, Enrico PICCHI and Luisella VEROTTA. Cannabidiol from inflorescences of *Cannabis sativa* L.: Green extraction and purification processes. *Industrial Crops and Products* [online]. 2020, **155**, 112816 [accessed. 2020-12-20]. ISSN 09266690. Available at: doi:10.1016/j.indcrop.2020.112816
- [26] HEMPTECH. Konope v priemysle: praktické produkty: od papiera cez plasty ku kozmetike . 1999.
- [27] JHAWAR, Nikita, Elizabeth SCHOENBERG, Jordan v. WANG and Nazanin SAEDI. The growing trend of cannabidiol in skincare products. *Clinics in Dermatology* [online]. 2019, **37**(3), 279–281 [accessed. 2020-12-20]. ISSN 18791131. Available at: doi:10.1016/j.clindermatol.2018.11.002
- [28] CANNADERM [ONLINE] [CIT. 2021-07-06]. Proč konopí? <https://encyklopedie.biooo.cz/vyhledat-slozeni/eugenol/>. 2014.
- [29] SAPINO, S., M. E. CARLOTTI, E. PEIRA and M. GALLARATE. Hemp-seed and olive oils: Their stability against oxidation and use in O/W emulsions. *International Journal of Cosmetic Science* [online]. 2005, **27**(6). ISSN 01425463. Available at: doi:10.1111/j.1467-2494.2005.00290\_2.x
- [30] BRYNDOVÁ, B. Esenciální olej: další poklad skrytý v konopí. . *Bushka.cz* [online]. [cit. 2021-07-01] Dostupné z: <http://www.bushka.cz/archiv/esence.html>. 2005.
- [31] FIORINI, Dennis, Arnaud MOLLE, Massimo NABISSI, Giuseppe SANTINI, Giovanni BENELLI and Filippo MAGGI. Valorizing industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) by-products: Cannabidiol enrichment in the inflorescence essential oil optimizing sample pre-treatment prior to distillation. *Industrial Crops and Products* [online]. 2019, **128**, 581–589 [accessed. 2020-11-23]. ISSN 09266690. Available at: doi:10.1016/j.indcrop.2018.10.045
- [32] BABIKER, Elfadıl E., Nurhan USLU, Fahad AL JUHAIMI, Isam A. MOHAMED AHMED, Kashif GHAFOR, Mehmet Musa ÖZCAN and Ibrahim A. ALMUSALLAM. Effect of roasting on antioxidative properties, polyphenol profile and fatty acids composition of hemp (*Cannabis sativa* L.) seeds. *LWT* [online]. 2020, 110537 [accessed. 2020-11-23]. ISSN 00236438. Available at: doi:10.1016/j.lwt.2020.110537
- [33] LEONARD, William, Pangzhen ZHANG, Danyang YING and Zhongxiang FANG. Hempseed in food industry: Nutritional value, health benefits, and industrial applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2020, **19**(1), 282–308 [accessed. 2021-08-01]. ISSN 1541-4337. Available at: doi:10.1111/1541-4337.12517
- [34] MALOMO, Sunday A. and Rotimi 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* [online]. 2015, **31**, 151–159 [accessed. 2020-11-23]. ISSN 14668564. Available at: doi:10.1016/j.ifset.2015.08.004

- [35] LANDA, Leoš. *Léčebné konopí v současné medicínské praxi*. Praha: Grada Publishing, 2020. ISBN 978-80-247-3967-0.
- [36] VANDEPITTE, Katrien, Simona VASILE, Sofie VERMEIRE, Myrène VANDERHOEVEN, Wouter VAN DER BORGHT, Joos LATRÉ, Alexandra DE RAEVE and Veronique TROCH. Hemp (*Cannabis sativa* L.) for high-value textile applications: The effective long fiber yield and quality of different hemp varieties, processed using industrial flax equipment. *Industrial Crops and Products* [online]. 2020, **158**, 112969 [accessed. 2020-11-23]. ISSN 09266690. Available at: doi:10.1016/j.indcrop.2020.112969
- [37] DELHOMME, F., A. HAJIMOHAMMADI, A. ALMEIDA, C. JIANG, D. MOREAU, Y. GAN, X. WANG and A. CASTEL. Physical properties of Australian hurd used as aggregate for hemp concrete. *Materials Today Communications* [online]. 2020, **24**, 100986 [accessed. 2020-11-23]. ISSN 23524928. Available at: doi:10.1016/j.mtcomm.2020.100986
- [38] RUSSO, Roberto and Remo REGGIANI. Evaluation of Protein Concentration, Amino Acid Profile and Antinutritional Compounds in Hempseed Meal from Dioecious and Monoecious Varieties. *American Journal of Plant Sciences* [online]. 2015, **06**(01), 14–22 [accessed. 2021-05-03]. ISSN 2158-2742. Available at: doi:10.4236/ajps.2015.61003
- [39] JAROSLAV BEDNÁRIK. CIRCULAR ECONOMY AS A PREREQUISITE OF SUSTAINABLE DEVELOPMENT IN THE GLOBAL ENVIRONMENT. In: *GLOBALIZATION AND ITS SOCIO-ECONOMIC CONSEQUENCES*. 2018, p. 986–993.
- [40] GÁBOR Andrej. *Všestranné využitie konopy siatej v udržateľnom hospodárstve*. B.m., 2015. b.n.
- [41] SOMMER, Lumír. *Teoretické základy analytické chemie II*. Brno: Vysoké učení technické, 1995. ISBN 80-214-0659-3.
- [42] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [43] HOLZBECHER, Závěš and JAROSLAV CHURÁČEK. *Analytická chemie*. Praha: SNTL/ALFA, 1987.
- [44] ELSHIKH, Mohamed, Syed AHMED, Scott FUNSTON, Paul DUNLOP, Mark MCGAW, Roger MARCHANT and Ibrahim M. BANAT. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnology Letters* [online]. 2016, **38**(6), 1015 [accessed. 2021-08-03]. Available at: doi:10.1007/S10529-016-2079-2
- [45] KLEINHENZ, Michael D., Geraldine MAGNIN, Stee M. ENSLEY, Jason J. GRIFFIN, John GOESER, Eva LYNCH and Johann F. COETZEE. Nutrient concentrations, digestibility, and cannabinoid concentrations of industrial hemp plant components. *Applied Animal Science* [online]. 2020, **36**(4), 489–494. ISSN 25902865. Available at: doi:10.15232/aas.2020-02018
- [46] MUSCARÀ, Claudia, Antonella SMERIGLIO, Domenico TROMBETTA, Giuseppina MANDALARI, Erminia la CAMERA, Cristina OCCHIUTO, Gianpaolo GRASSI and

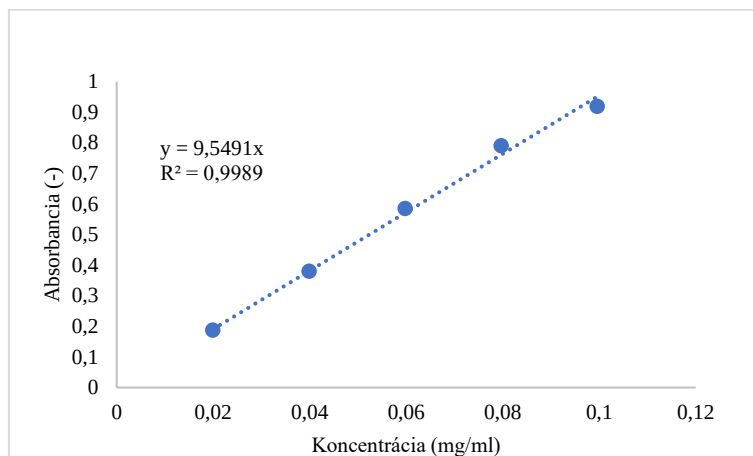
- Clara CIRCOSTA. Antioxidant and antimicrobial activity of two standardized extracts from a new Chinese accession of non-psychotropic *Cannabis sativa* L. *Phytotherapy Research* [online]. 2021, **35**(2), 1099–1112 [accessed. 2021-08-03]. ISSN 1099-1573. Available at: doi:10.1002/PTR.6891
- [47] SARKER, Satyajit D., Lutfun NAHAR and Yashodharan KUMARASAMY. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods (San Diego, Calif.)* [online]. 2007, **42**(4), 321 [accessed. 2021-08-03]. Available at: doi:10.1016/J.YMETH.2007.01.006
- [48] XU, W., X. MA, J. YAO, D. WANG, W. LI, Li. LIU, L. SHAO and Y. WANG. Increasing coenzyme Q10 yield from *Rhodopseudomonas palustris* by expressing rate-limiting enzymes and blocking carotenoid and hopanoid pathways. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 2021, **73**(1), 88–95 [accessed. 2021-08-02]. ISSN 1472-765X. Available at: doi:10.1111/LAM.13479

## 8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

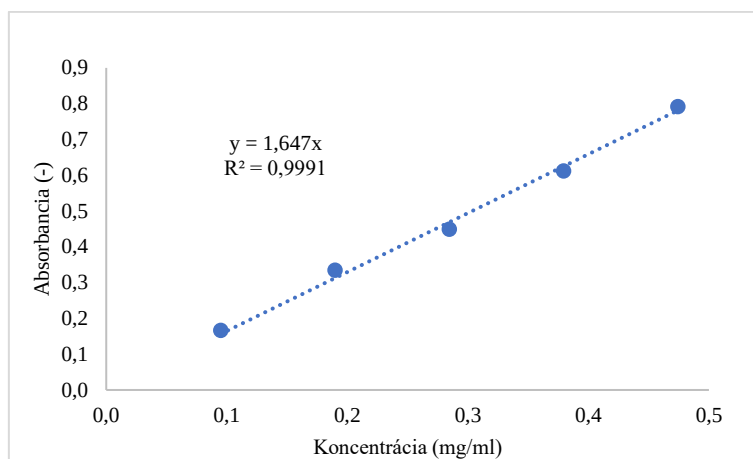
|           |                                                                    |
|-----------|--------------------------------------------------------------------|
| ABTS      | 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny)          |
| BHI       | Brain Heart Infusion (médium)                                      |
| CBC       | Kanabichromen                                                      |
| CBD       | Kanabidiol                                                         |
| CBG       | Kanabigerol                                                        |
| CBN       | Kanabinol                                                          |
| CCM       | Czech Collection of Microorganisms (česká zbierka mikroorganizmov) |
| HPLC      | Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia                            |
| LB        | Lysogeny Broth (médium)                                            |
| MIC       | minimálna inhibičná koncentrácia                                   |
| TEAC      | Trolox equivalent antioxidant capacity                             |
| UV        | žiarenie v ultrafialovej oblasti spektra                           |
| VIS       | žiarenie vo viditeľnej oblasti spektra                             |
| YPD       | Yeast Peptone Dextrose (médium)                                    |
| $\lambda$ | lambda (vlnová dĺžka)                                              |
| A         | absorbancia                                                        |

## 9 PRÍLOHY

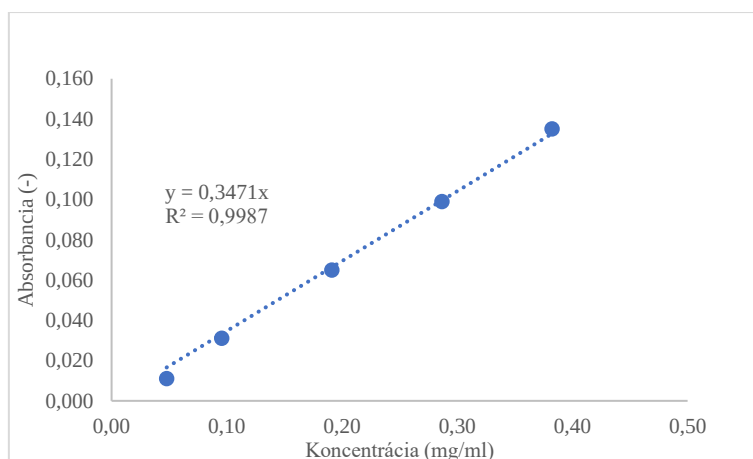
### A. Kalibračná krivka glukózy na stanovenie sacharidov podľa Dubois



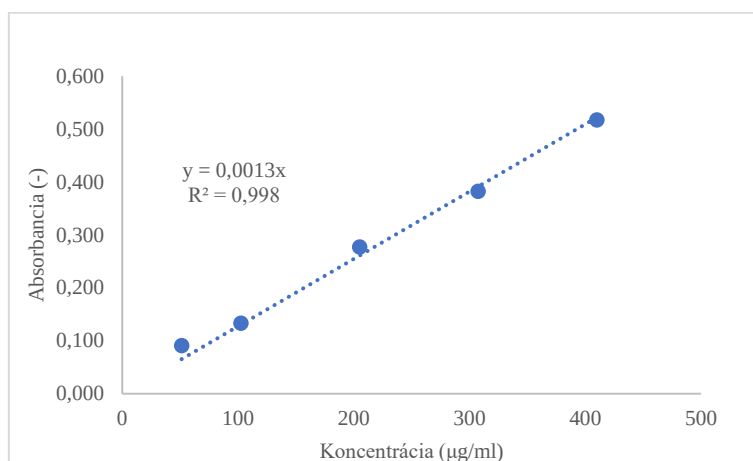
### B. Kalibračná krivka kyseliny gallovej na stanovenie polyfenolov



### C. Kalibračná krivka katechínu na stanovenie flavonoidov



#### D. Kalibračná krivka troloxu na stanovenie antioxidačnej aktivity



#### E. Otázky v dotazníku o peelingu – po dvoch týždňoch používania

Ako sa vám páči farba peelingu?

Ako vnímate vôňu peelingu?

Vyhovovala Vám konzistencia produktu?

Všimli ste si zmenu textúry na produkte? (oddelenie olejovej fázy, usadenie častí, zrazenie...)

Ako sa Vám produkt roztieral po pleti?

Zhodnoťte hustotu peelingových častíc

Máte pocit, že Vám peeling odstraňoval nečistoty z povrchu pleti?

Zhodnoťte pocit, ktorý ste mávali počas aplikácie (pocit masáže, pocit škrabania...)

Zhodnoťte, ako sa produkt zmýval po aplikácii

Označte efekty, ktoré ste pocíťovali IHNEĎ po aplikácii peelingu

Všimli ste si nejaký vplyv peelingu na Vašu pleť po DVOCH TÝŽDŇOCH používania? (dlhodobý, nie priamo po aplikácii)

Aký vplyv mal produkt na Vašu pleť po DVOCH TÝŽDŇOCH používania? Ak sa nenachádza v možnostiach, prosím dopíšte do možnosti INÉ

Celkový dojem z pravidelného používania produktu

V porovnaní s ostatnými peelingami, ktoré ste už niekedy vyskúšali, kde by ste zaradili tento produkt? (lepší-porovnateľný-horší)

Po Vašej skúsenosti s produktom, mali by ste záujem ho používať naďalej?

Ak by ste MALI záujem používať ho ďalej, vyberte Vaše dôvody:

Ak by ste záujem NEMALI, vyberte Vaše dôvody:

Ak by ste si produkt kúpili v drogérii, ako by ste boli spokojní?

## F. Dotazník pre senzorické hodnotenie konopných raw tyčínok

|                          |                          |
|--------------------------|--------------------------|
| <b>Meno hodnotiteľa:</b> | <b>Vek:</b>              |
| <b>Dátum:</b> 13.7.2021  | <b>Hodina:</b>           |
| <b>Zdravotný stav:</b>   | <b>Fajčiar/Nefajčiar</b> |

Vážení hodnotiteľa,

zhodnoťte prosím predložené vzorky konopných raw tyčínok s použitím uvedených možností a grafických stupníc. Jedna z predložených vzoriek bola vytvorená v rámci diplomovej práce a bude porovnávaná s komerčne dostupnými tyčinkami a s tyčinkou, ktorá neobsahuje konopný proteín.

Ďakujem za spoluprácu a verím, že sa Vám ochutnávka a hodnotenie bude páčiť.

### Konzumujete raw tyčinky?

- a) konzumujem pomerne často
- b) konzumujem príležitostne
- c) nekonzumujem vôbec

V nasledujúcej časti prosím vždy najprv uveďte kód vzorky a následne zaškrtnite ľubovoľné miesto na uvedenej grafickej stupnici.

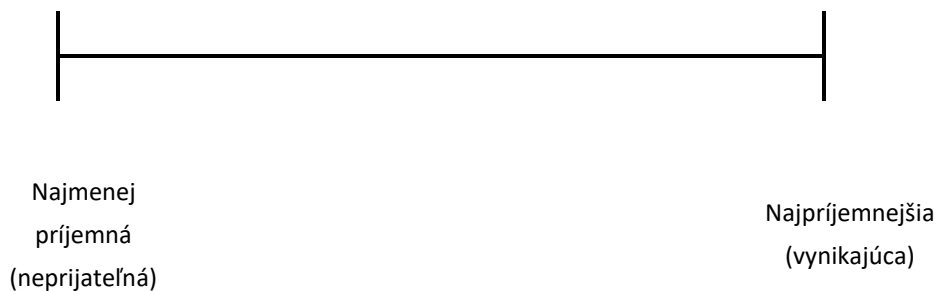
- 1) **Vzhľad a farba** – Pomocou grafickej stupnice zhodnoťte príjemnosť vzhľadu a farby vzorky

|                    |           |
|--------------------|-----------|
| <b>Kód vzorky:</b> | <b>A1</b> |
|--------------------|-----------|



- 2) **Vôňa** – Pomocou grafickej stupnice zhodnoťte príjemnosť vône vzorky

|                    |           |
|--------------------|-----------|
| <b>Kód vzorky:</b> | <b>A1</b> |
|--------------------|-----------|





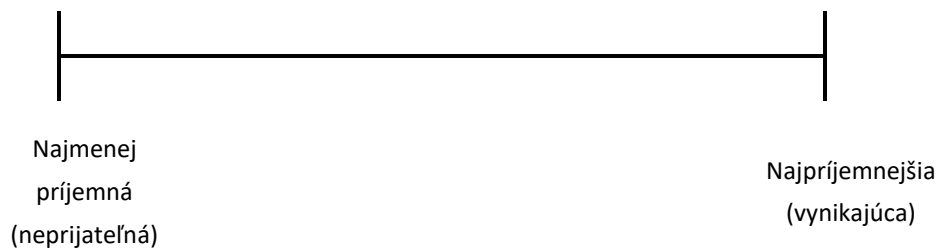
**3) Konzistencia** – Pomocou grafickej stupnice zhodnoťte príjemnosť konzistencie vzorky (drobenie, tuhosť, lepivosť)

|             |    |
|-------------|----|
| Kód vzorky: | A1 |
|-------------|----|



**1) Chuť** – Pomocou grafickej stupnice zhodnoťte príjemnosť chuti vzorky

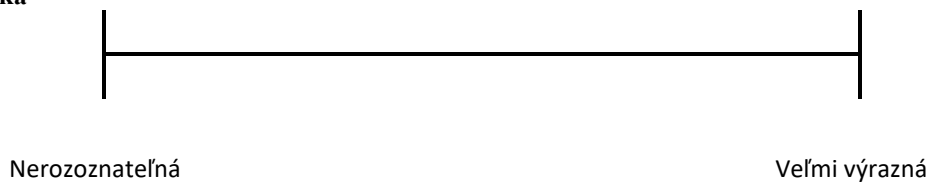
|             |    |
|-------------|----|
| Kód vzorky: | A1 |
|-------------|----|



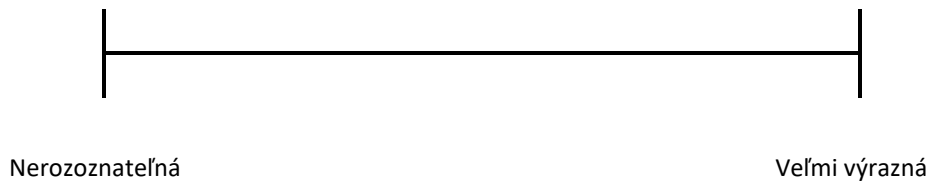
**2) Profilový test vybraných chutí**

|             |    |
|-------------|----|
| Kód vzorky: | A1 |
|-------------|----|

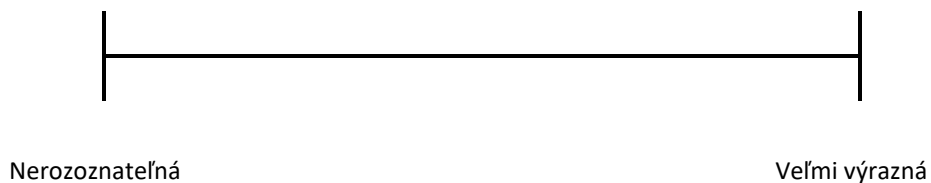
**Sladká**



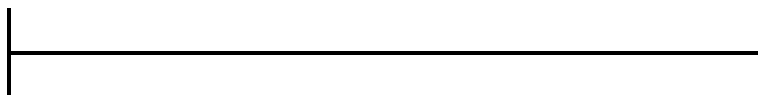
**Horká**



**Kyslá**



**Iná (pachuť)**



Nerozoznateľná

Veľmi výrazná

**3) Poradový test celkovej prijateľnosti vzoriek**

Predložené vzorky zoradíte od najchutnejšej (1.) po najmenej chutnú (4.). Do sekcie „Poznámky“ môžete bližšie popísať, ako Vám vzorka chutila, jej dominantnú chuť, prednosti, či nedostatky.

| Hodnotenie | Kód vzorky | Poznámky |
|------------|------------|----------|
| 1.         |            |          |
| 2.         |            |          |
| 3.         |            |          |
| 4.         |            |          |