VÝZKUMNÝ ÚSTAV ŽIVOČIŠNÉ VÝROBY, v. v. i. Praha Uhříněves
MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ
VĚDECKÝ VÝBOR VÝŽIVY ZVÍŘAT
KOMISE VÝŽIVY ODBORU ŽIVOČIŠNÉ VÝROBY ČAZV

AKTUÁLNÍ POZNATKY VE VÝŽIVĚ A ZDRAVÍ ZVÍŘAT A BEZPEČNOSTI PRODUKTŮ 2023

Sborník z konference

3. listopadu 2023

Praha Uhříněves

ISBN **978-80-7403-305-6**

OBSAH

Konopí, situace, perspektivy, využití
MARIE BJELKOVÁ

Nové potraviny a používání konopí setého v potravinách
PETR BENEŠ

Vliv výživy a vegetační fáze konopí na antistafylokokovou aktivitu
LUCIE MALÍKOVÁ, EVA SKŘIVANOVÁ

Vliv konopného a lněného semínka na enzymovou aktivitu trávicího traktu kuřat
MICHAELA ENGLMAIEROVÁ, TOMÁŠ TAUBNER, MILOŠ SKŘIVAN, LUCIE MALÍKOVÁ

Analýza širokého spektra kanabinoidů a cholesterolu v různých vzorcích biologického původu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie
TOMÁŠ TAUBNER, MARIAN CZAUDERNA, MICHAELA ENGLMAIEROVÁ

Konopí, situace, perspektivy, využití

Ing. Marie Bjelková, Ph.D.

Agritec Plant Research s.r.o., Zemědělská 2520/16, 78701 Šumperk

Abstrakt
Příspěvek představuje konopí jako zemědělskou plodinu a ukazuje variabilitu výnosového potenciálu včetně obsahových látek a s ohledem na její odrůdové zastoupení i na možnosti využití včetně perspektivně možných budoucích cílů.

Úvod
Konopí je jednou z nejstarších a nejznámějších rozmanitých plodin již více než 5000 let. Pěstovalo se po celém světě jako vláknitá plodina, která se vysévala ve velkém množství na velkých plochách (McPartlandet al., 2018; Struik et al., 2000). Konopí pochází ze Střední Asie a bylo šířeno prostřednictvím obchodních cest. Lze jej pěstovat ve všech zónách vhodných pro pěstování zemědělských rostlin. Rozšířený výskyt konopí je založen na cenných a specifických biologických vlastnostech jejích produktů.

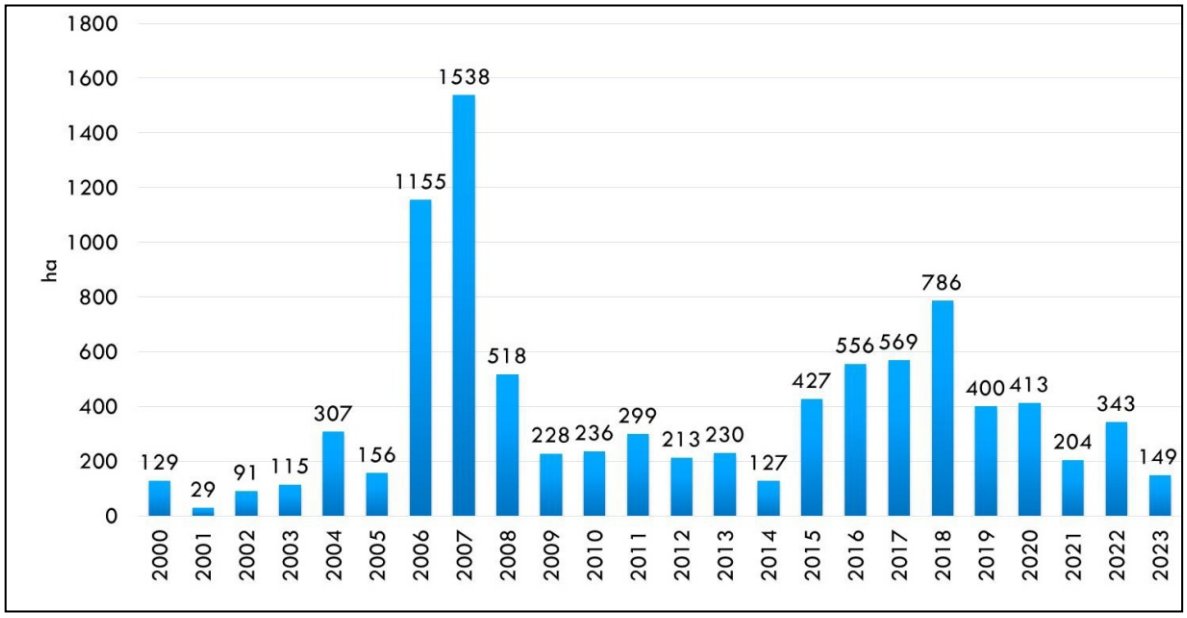
Osevní plochy
Konopí je multifunkční plodina, a právě tato vlastnost v poslední době zvyšuje zájem o jeho pěstování. Dnes je to plodina pěstovaná ve více než 30 zemích, včetně Číny, Spojených států, Francie, Itálie, Nizozemska, Estonska a dalších. Největším pěstitelem konopí v Evropské unii je Francie, přičemž je i nadále počítáno s růstem osevních ploch, které mají do roku 2030 dosáhnout 25 až 30 tisíc hektarů.

Tabulka 1: Osevní plocha konopí setého podle FAOSTAT

	ha	
	2338	2021
Amerika	2327	2338
Asie	206	227
Evropa	8027	8857
Svět	10566	11422

Vývoj osevní plochy konopí setého v České republice kolísá. V roce 2019 došlo k celkem rapidnímu poklesu až na 400 ha, který přes nepatrné zvýšení v roce 2020 se dále snižuje. Příčin takového poklesu je víc, ale nejvážnější je neexistence dostatečné tírenské kapacity na zpracování stonku. Snaha o vybudování nové tírenské kapacity v České republice zatím nevedla k požadovanému cíli. Podobným problémem je i sklizňová technologie.

Graf 1.: Sklizňová plocha konopí setého



Popis a charakteristika konopí

Konopí je přirozeně jednoletá dvoudomá nebo jednodomá bylina patřící do čeledi *Cannabaceae* (čeleď konopovité). Z pohledu diverzity je konopí dále členěno na tři skupiny: průmyslové konopí (*Cannabis sativa* L)., divoké konopí (*Cannabis ruderalis* Janisch) a konopí indické (*Cannabis indica* Lam.). Konopí se stalo textilní a olejnatou plodinou a tento směr určil šlechtitelské programy plodiny v mnoha zemích. Byly vytvořeny tři ekotypy *Cannabis sativa* L.: severní, střední ruský a jižní, které se odlišují délkou vegetační doby od raného do pozdního dozrávání, výnosy stonků a vlákna. Tyto ekotypy jsou vlastní jednodomým odrůdám konopí. Vysoký obsah vlákna a výnos semen jsou prioritními trendy v procesu šlechtění, kde 95 % všech rostlin jsou jednodomé feminizované rostliny, s poměrem samičích/samčích květů 99:1 na 50:50. Výsledkem této práce jsou pak odrůdy, které splňují mezinárodní požadavky na stabilitu jednodomosti (1 % samčích rostlin v porostu konopí). Hlavním účelem pěstování konopí setého je zvýšení kvantitativních a kvalitativních ukazatelů výsledných produktů. Šlechtění a produkce semen hrají při řešení tohoto problému vedoucí roli. Charakteristickým rysem konopí je pěstování pro produkci vlákna a semen (Mygal, 2007, 2017; Bjelková 2017). Ve Společném katalogu odrůd druhů zemědělských rostlin (konsolidované znění) je registrováno 109 odrůd konopí setého. V ČR jsou registrovány 4 odrůdy konopí setého (Bialobrzeskie, Monoica, Carmagnola a Felice), přičemž je možné na našem území pěstovat všechny odrůdy, které jsou registrované ve výše uvedeném Katalogu.

Tabulka 2: Přehled odrůd konopí setého ze Společného katalogu odrůd druhů zemědělských rostlin EU

Francie	Maďarsko	Itálie	Polsko	Rumunsko	Estonsko
Dioica 88	Balaton	Asso	Beniko	Armanca	Estica
Djumbo 20	Cannakomp	CS	Białobrzeskie	Dacia Secuieni	
Earlina 8 FC	Fibrol	Carma	Glyana	Lovrin 110	
Epsilon 68	KC Bonusz	Carmagnola	Henola	Mara 21	

Fedora 17	KC Dora	Carmaleonte	Matrix	Olivia.	
Felina 32	KC Virtus	Codimono	Mietko	Ratza	
Ferimon	KC Zuzana	Eletta Campana	Rajan	Secuieni Jubileu	
Fibror 79	KCA Borana	Fibranova	Sofia	Silvana.	
Futura 75	Kompolti	Fibrante	Tygra	Succesiv	
Futura 83	Kompolti hibrid TC	Glecia	Wielkopolskie	Teodora	
Férimon	Lipko	Gliana	Wojko	Zenit	
Mona 16	Monoica	Villanova			
Muka 76	Tiborszallasi				
Nashinoïde 15	Tisza				
Nordria 3	Uniko B				
Orion 33					
Ostara 9					
Santhica 23					
Santhica 27					
Santhica 70					

Španělsko	**Holandsko**	**Finsko**	**Slovinsko**	**Lotyšsko**	**Litva**	**Bulharsko**
Delta-llosa	Beniko	Finola	Fiona	Adzelvieši	Alive SK	AMX
Delta-405	Chamaeleon	Finola 2	Fukal	Austa SK	Austa SK	Midwest
	Enectarol		Helena	CFX-2	Loja	Northwest
	Ivory		Marina	CRS-1	Pürini	OGK
	MGC 1013		Stara Prekmurska	Loja		Pain killer
	Marcello			Pūriņi		Strawberry H
	Markant			Rodnik		Strawberry K
	Uso-31					Morning Glory
	Enectaliana					Arizona Dream
						Auto Power

Využití konopí

Konopí je výnosná plodina, jejíž semena a stonky lze využít v 50 000 různých produktech, včetně biokompozitů, bioplastů a biopaliv (Vyrovets et al., 2021). Průmyslové potřeby konopí jsou

celosvětově stále více zajímavé (Baraniecki et al., 2022) a tato rostlina by mohla být ekologickou surovinou budoucnosti. Směr použití rostliny závisí na obsahu psychoaktivní látky tetrahydrocannabinol (THC). Technické konopí je konopí, ve kterém obsah psychoaktivní složky tetrahydrocannabiolu (THC) nepřesahuje v České republice 1 % a dle evropské legislativy 0,2 % (Boyko et al., 2018; Vyrovets, 2015). Technologie pěstování v současnosti dle výsledků výzkumu a spolupráce s praxí preferuje oboustranné využití produkce, tedy pěstování vždy jak pro produkci semen, tak pro vlákno. Ve vědeckých publikacích se uvádí, že jednodomé odrůdy konopí jsou mnohem vhodnější pro produkci semen, zatímco dvoudomé odrůdy jsou nevhodné vzhledem k jejich heterogenitě, nadměrné velikosti a v důsledku toho i potížím s mechanickou sklizní. Je nutno brát zřetel na to, že u konopí jsou výnosové ukazatele kromě genotypu silně ovlivněny podmínkami pěstování a často konečný výsledek závisí na prostředí. Růst a vývoj konopí je velmi závislý na fotoperiodě a dlouhý vegetativní růst má za důsledek pozdní kvetení a velký výnos biomasy.

Konopná semena

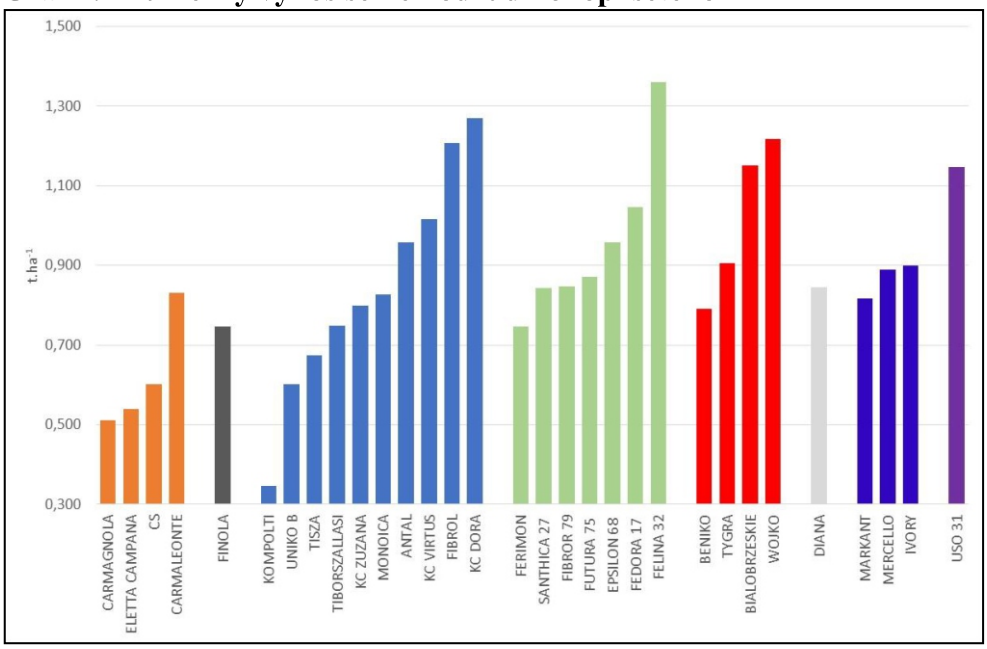
Konopná semena se vyznačují vhodně vybalancovaným obsahem esenciálních mastných kyselin, relativně vysokým obsahem vlákniny a dalších nutričních benefitů. V konopném oleji jsou zastoupeny esenciální mastné kyseliny (EFA) omega-6, například kyselina linolová (18:2, LA), jde zhruba o 55 %, a omega-3, tedy kyselina alfa-linolenová (18:3, ALA), jejíž obsah dosahuje 18–20 %. Kromě těchto významných množství LA a ALA jsou přítomny také kyselina gama-linolenová (18: 3, GLA) s obsahem 1–5 % (v konečném důsledku činí, že jeho nutriční hodnota je vyšší, než většina olejů ze semen různých rostlin) a kyselina stearidonová (18:4, SDA) s 0,5–2 %. Konopná semena jsou bohatým zdrojem mikroelementů a celé semeno obsahuje 35,5 % oleje, 24,8 % bílkovin, 27,6 % sacharidů, 5,6 % popelovin, stravitelnou vlákninu v množství 5,4 %, celkovou dietní vlákninu v obsahu 27,6 % s energií 2200 kJ.100g^{-1}.

Dále jsou v semeni konopí setého obsaženy vitamíny A, B1, B2, B6, C, E a minerální látky (Mn, Na, Ca, P, Mg, K, Fe, Si). Relativně vysoký obsah bílkovin z konopného semene je lépe stravitelný než jiné bílkoviny (obiloviny, luskoviny) a s odstraněním slupek se tento parametr ještě vylepší. Nedílnou součástí celkového pohledu na konopné semeno je jeho kvalita a vyzrálost, která může být ovlivněna klimatickými parametry (nevhodné počasí při sklizni), ale také nedodržením posklizňových metodických postupů. Podmínkou zdravého a kvalitního semene, které je určeno ke skladování je jeho vyzrálost, eliminace zápachu, plísní, škůdců a absence jeho mechanického poškození, zápachu nebo zatuchlosti. Dalším sledovaným znakem je lesklá barva semene a olejově příjemná oříšková chuť. Jak bylo napsáno výše, klimatické podmínky pěstitelských roků se mohou odrazit na výnosovém a kvalitativním potenciálu semen, kdy z našich výsledků bylo zjištěno, že pozdní odrůdy a odrůdy s potřebou teplejšího klimatu nebyly schopny poskytnout dostatečný výnos semen a jejich ekonomická efektivita byla tak negativní.

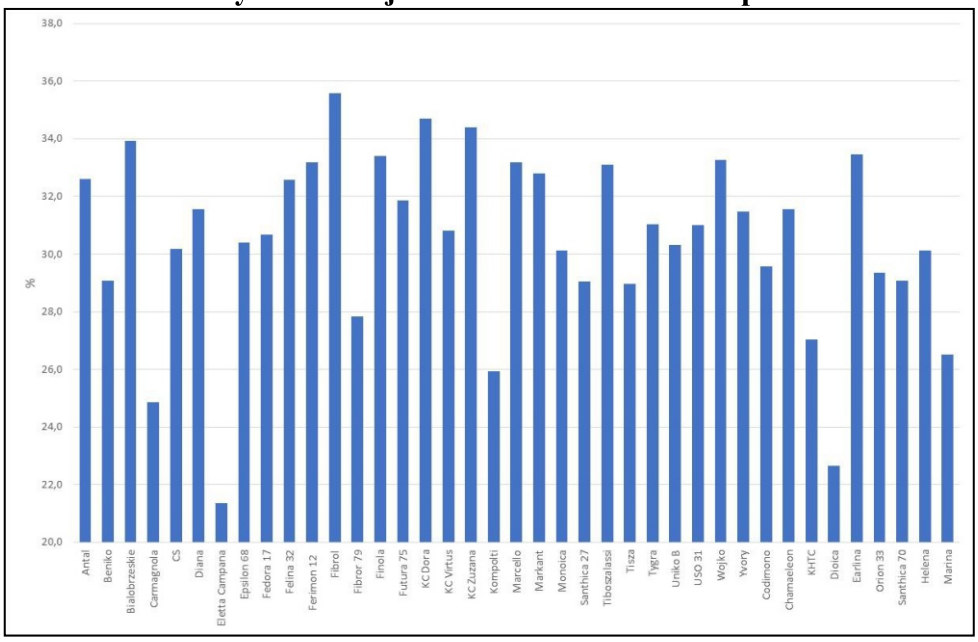
Při hodnocení meziročních výsledků u výnosu semen a obsahu oleje v semenech byl zjištěn průkazný vliv na úrovni $P \geq 0{,}05$ mezi jednotlivými odrůdami konopí setého, jak představuje graf 1 a graf 2. Zajímavé byly i výsledky obsahů mastných kyselin, kdy bylo zjištěno, že průměrný obsah kyseliny linolové [(LA - C18, n-6 (omega 6)] byl 55,8 %, u α linolenové [(ALA - C18, n-3 (omega 3)] činil 18,09, u kyseliny olejové (ω9) 11,6 %, u kyseliny palmitové 7,3%, u kyseliny γ linolenové [(GLA - C18, n-6 (omega 6)] byl 2,6 % a stearové 2,3 %. Jak ukazuje tabulka 4 obsahy jednotlivých zastoupených mastných kyselin měly široké rozpětí. Velké rozdíly byly zjištěny u kyseliny γ linoleové, kdy bylo možno na základě výsledků analýz rozdělit soubor odrůd konopí setého na několik skupin.

Obrázek 1: Mramorování u semen konopí setého (příklad)

Graf 1: Průměrný výnos semen odrůd konopí setého



Graf 2: Průměrný obsah oleje v semenech odrůd konopí setého



Tabulka 3: Obsah mastných kyselin u odrůd konopí setého (průměr)

Odrůda	Obsah kyselin (%)								
	Palmitová	**Stearová**	**Olejová**	**Linolová**	**γ-linolenová**	**α-Linolenová**	**Arachová**	**Oktadekatetraenová**	**Eikosenová**
Antal	7,7	2,2	13,4	55,7	1,5	18,3	0,7	0,6	0,2
Beniko	7,3	2,4	10,4	56,4	3,6	17,9	1,2	1,1	0,1
Bialobrzeskie	7,2	2,5	12,0	55,7	2,5	18,7	0,9	0,5	0,2
Carmagnola	7,7	2,0	11,5	54,6	2,1	20,7	1,0	0,4	0,2
CS	7,0	2,0	10,1	55,6	1,5	22,7	0,8	0,4	0,2
Diana	6,9	2,7	15,1	55,6	1,8	16,8	0,6	0,4	0,2
Eletta Campana	8,6	2,1	10,5	53,4	1,7	22,3	0,8	0,7	0,3
Epsilon 68	7,6	2,4	11,4	56,9	2,4	18,1	0,8	0,4	0,2
Fedora 17	7,5	2,4	10,9	55,7	3,3	18,4	1,2	0,5	0,3
Felina 32	6,9	2,2	11,1	56,7	3,3	18,1	1,1	0,5	0,2
Ferimon 12	7,3	2,3	10,3	56,3	3,8	18,1	1,3	0,5	0,3
Fibrol	7,4	2,5	13,1	56,7	1,7	17,5	0,6	0,5	0,2
Fibror 79	7,7	2,4	11,9	56,5	2,6	17,2	1,0	0,6	0,2
Finola	7,1	2,1	9,1	54,6	4,8	20,1	1,7	0,6	0,2
Futura 75	7,2	2,6	11,4	55,6	2,3	19,4	0,9	0,5	0,3
KC Dora	8,2	2,2	15,4	55,0	1,8	16,7	0,5	0,3	0,2
KC Virtus	7,9	2,8	12,7	55,8	2,3	17,1	0,8	0,7	0,2
KC Zuzana	7,8	2,3	12,7	55,0	2,0	19,1	0,8	0,5	0,2
Kompolti	7,6	2,3	11,9	56,1	1,6	19,4	0,7	0,5	0,2
Marcello	7,5	2,3	13,1	55,5	3,3	16,9	1,0	0,3	0,2
Markant	6,7	2,0	13,0	58,1	3,0	15,9	0,9	0,5	0,2
Monoica	7,6	2,4	13,7	55,6	1,9	17,6	0,7	0,5	0,2
Santhica 27	7,5	2,3	9,5	56,1	3,3	19,4	1,3	0,5	0,3
Tiboszalassi	7,4	2,4	13,9	55,1	1,7	17,8	0,6	1,0	0,2
Tisza	7,2	2,1	13,3	55,4	1,6	19,3	0,6	0,4	0,2
Tygra	7,6	2,6	12,1	56,1	3,1	16,8	1,0	0,6	0,2
Uniko B	7,5	2,2	13,7	55,1	1,4	19,1	0,6	0,5	0,2
USO 31	7,1	2,6	11,7	55,3	2,7	19,0	1,0	0,5	0,2
Wojko	7,7	2,6	11,1	55,4	3,7	17,5	1,4	0,5	0,2
Yvory	7,0	2,1	9,9	57,7	2,9	19,0	1,0	0,3	0,2
Codimono	7,4	2,2	10,8	55,4	1,7	21,3	0,7	0,5	0,1
Chamaeleon	7,8	2,3	11,2	55,8	2,3	19,2	0,8	0,6	0,2
KHTC	7,1	2,4	10,0	54,8	1,6	22,9	0,8	0,5	0,3
Dioica	8,0	2,3	11,0	54,1	2,2	20,6	1,0	0,6	0,3
Earlina	7,0	2,3	9,9	54,8	3,6	20,3	1,4	0,5	0,3
Orion 33	7,6	2,5	10,2	55,7	3,0	19,1	1,1	0,5	0,3
Santhica 70	7,2	2,1	9,9	56,3	2,9	19,8	1,2	0,4	0,2

Helena	7,3	2,5	10,3	56,0	2,0	20,4	0,8	0,6	0,3
Marina	7,3	2,4	10,4	54,3	1,0	23,4	0,7	0,6	0,3
Futura 83	8,1	2,1	9,5	54,3	2,9	20,8	1,4	0,5	0,4
Henola	7,5	2,9	12,3	54,3	2,2	19,0	0,9	0,6	0,3

Využití konopného semene

Konopná semena tedy obsahují řadu cenných biologicky aktivních látek, a tak poskytují možnost zpracování do nejvíce se rozvíjejících druhů potravin, jako jsou potraviny funkčního typu (např. konopná chlebová směs, konopné karbanátky, konopné těstoviny, loupané konopné semeno, pražená semena, syrová semena, čokoláda, limonáda, pivo, víno, mouka, konopné müsli (Lachenmeier & Walch, 2005). Hodnotný, konopný olej po hydrogenaci je použitelný pro výrobu margarinů a ztužených tuků. Vzhledem ke složení konopného oleje se ale ukazuje, že je to spíše vhodná surovina pro salátové zálivky. Příkladem takového produktu je za studena lisovaný, konopný olej vyrobený ze semen vybraných registrovaných odrůd konopí, téměř bez obsahu THC, při jehož výrobě se nepoužívají žádná rozpouštědla či rafinace. Dalším využitím konopného oleje jsou produkty péče o tělo a kosmetika, ke kterým je možno zařadit mýdlo, šampon, koupelové gely, balzám, masážní olej (Vogl et al., 2004, House et al. 2010). Průmyslové využití konopného oleje pro svou vlastnost dobrého průniku povrchy má široké spektrum aplikací jako jsou barvy, laky, tmely, čističe a mazadla, ale také jako základ pro bioplasty (House et al. 2010).

Kanabinoidy

Konopí mimo jiné obsahuje i další významné biologicky aktivní sloučeniny, kterými jsou například kanabinoidy (terpenofenoly). Kanabinoidy jsou terpenofenolické sloučeniny a mnoho z nich je bez psychoaktivity se zajímavými farmakologickými vlastnostmi. Hlavním kanabinoidem je THC (Δ9-trans-tetrahydrokanabinol), jako hlavní nositel psychoaktivního účinku, který se vyskytuje v rostlinách od stopového množství až po 95 % celkového obsahu kanabinoidů. Dalším kanabinoidem je CBD (kanabidiol) jehož přítomnost je ve velkém množství u odrůd konopí s nízkým obsahem THC. CBD, který do oleje dostává při lisování, má celou řadu pozitivních farmakologických účinků, hlavně při nízkých koncentracích kolem 10 $mg.kg^{-1}$ oleje. CBD snižuje třes při pohybových poruchách, má protikřečové a protiepileptické účinky. Na centrální nervový systém působí na rozdíl od THC selektivně, tedy bez psychoaktivních účinků. CBD bioprekurzorem THC, působí proti psychoaktivnímu účinku THC a zpomaluje jeho nástup, avšak zároveň ho prodlužuje. THC se v konopí tvoří přeměnou svého prekurzoru, a to kyseliny tetrahydrokanabinolové (THCA - (Δ9-trans-tetrahydrokanabinolová kyselina) a její dekarboxylací vzniká neutrální THC (například působením tepla). Dekarboxylací kyseliny kanabidiolové (CBDA) vzniká neutrální CBD. Důležitým kanabidiolem je také kanabigerol (CBG), který je nepsychoaktivní a obsažen je v odrůdách konopí s velmi malým množstvím THC. CBG opět vzniká jako důsledek dekarboxylace kyseliny kanabigerolové, ale tato je i prekurzorem THC, CBD a CBC, kdy se enzymatickými pochody (THC syntáza, CBD syntáza). V rámci studia vybraných odrůd konopí setého nás zajímala i otázka obsahů výše uvedených sloučenin, jejichž výsledky byly variabilní, jak ukazuje tabulka 5. Zajímavý výsledek byl zjištěn u odrůdy Santhica 27, kdy obsah THC byl průkazně snížený oproti ostatním odrůdám a jedná se o její genetickou vlastnost.

Tabulka 4: Průměrný obsah kanabinoidů u odrůd konopí setého

	CBD	CBDA	THC	THCA	CBG	CBGA	CBN
Santhica	$64,874^{a}$	$576,25^{a}$	$7,7302^{a}$	$27,722^{a}$	$829,122^{b}$	$6438,062^{b}$	$0,432^{a}$
Bialobrzeskie	$1095,056^{a}$	$8565,38^{ab}$	$92,1618^{a}$	$328,552^{ab}$	$35,498^{a}$	$352,945^{a}$	$4,813^{a}$
Finola	$1959,917^{a}$	$6299,42^{ab}$	$88,4813^{a}$	$190,849^{a}$	$9,019^{a}$	$157,762^{a}$	$8,767^{a}$
Carmagnola	$2717,474^{a}$	$22686,31^{b}$	$644,1879^{a}$	$1897,906^{b}$	$184,881^{a}$	$1570,063^{a}$	$13,480^{a}$

Konopná vlákna

V kontextu komplexnosti rostliny konopí není možno zapomenout i na stonek a vlákno konopí setého. S ohledem na celkovou délku rostliny, může délka konopného vlákna dosahovat až 4 m. Ve výčtu jeho vlastností je v popředí jeho odolnost proti vodě a povětrnostním podmínkám, vysoká pevnost, která se ve vlhku zvyšuje, odolnost vůči teplu, protože doutná, ale nevzplane. Směsové konopné tkaniny pohltí až 95 % UV záření, je antistatické, odolné proti znečištění a odolné vůči hnilobě. Konopná vlákna mohou být zdrojem jemných konopných přízí na ošacení a hrubých pro výrobu lan, motouzů, provazů, pytlovin, batožin a podobně.

Vize do budoucnosti

Globální environmentální problémy zhoršují současné klimatické změny, které jsou většinou výsledkem lidské činnosti. Některé z těchto problémů a ztráta biologické rozmanitosti vznikají z nezodpovědné spotřeby přírodních zdrojů. Zemědělská udržitelnost společně s ekonomickými a ekologickými vstupy jsou vzájemně závislé a jsou celosvětové sledovány. Hlavní cestu udržitelnosti pak představuje bioekonomika a tato využívá obnovitelné biologické zdroje k výrobě potravin, krmiv, chemických látek, textilu a energie udržitelným způsobem. Všechny tyto faktory splňuje i konopí seté, plodina s velkým potenciálem (Rivas-Aybar et al., 2023). Literatura dokonce uvádí, že kromě zlepšení kvality vzduchu, tepelné bilance a dopadu na životní prostředí mohou rostliny konopí odstranit ze vzduchu až 10 tun oxidu uhličitého v jednom vegetačním cyklu (Zimniewska, 2022). Rostlina konopí má vysoký výnos a na stejném množství půdy může generovat o 250 % více vláken než bavlna a o 600 % více vláken než len (Rupasinghe et al., 2020). Konopí i částečně zabraňuje erozi a vyplavování živin. Dalším pozitivem je jeho fytoremediační schopnost (Cleophas et al., 2022).

Závěr

A co říci závěrem? KONOPÍ, to je pěstitelská technologie, zpracování, využití v široké škále produktů a sektorů, recyklace, opětovné použití, biologická rafinace a nakládání s odpady. Jak vidíme, jedná se o komplexní, hodnotový řetězec rostliny a tato tak splňuje principy udržitelnosti a může být jednou z plodin zamezující změně klimatu.

Literatura

1. Struik PC, Amaducci S, Bullard MJ et al (2000) Agronomy offibre hemp (Cannabis sativa L.) in Europe. Ind Crops Prod11:107–118.
2. Vogl, C.R. a kol. Hemp (2004). (Cannabis sativa L.) as a Resource for Green Cosmetics: Yield of Seed and Fatty Acid Compositions of 20 Varieties Under the Growing Conditions of Organic Farming in Austria. Journal of Industrial Hemp. 9(1), 51-68. DOI: 10.1300/J237v09n01_06. ISSN 1537-7881.
3. Vyrovets VH, Layko IM, Vereshchagin IV, Tymchuk SM, Pozdniakov VV (2011). Prospects ofbreeding for optimization of fatty acid composition of oil from modern non-narcotic hemp va-rieties. Sel. Nasinn. 2011; 100: 247–254. DOI: 10.30835/2413-7510.2011.66619.8.
4. Mygal MD, Shulga IL.(2009) Characteristics of the morphological structure and secretory activity ofplant hairs. Zbirnyk naukovykh prats Instytutu lubjanykh kultur UAAN. 5: 63–75.9.
5. Mygal MD, Kmets IL, Layko IM. Hemp trichomes and cannabinoids. Sumy: FShPShcherbyna IV, 2017. 228 p. (PDF) The uniqueness of biological characteristics of technical hemp and prospects for its practical use. Available from: https://www.researchgate.net/publication/348106268_The_uniqueness_of_biological_char

acteristics_of_technical_hemp_and_prospects_for_its_practical_use [accessed Oct 26 2023].
6. Cleophas, F. N., Zahari, N. Z., Murugayah, P., Rahim, S. A., & Mohd Yatim, A. N. (2022). Phytoremediation: ANovel Approach of Bast Fiber Plants (Hemp, Kenaf, Jute and Flax) for Heavy Metals Decontamination inSoil. Toxics, 11(1), 5 (PDF) A review of the industrial use and global sustainability of Cannabis sativa. Available from: https://www.researchgate.net/publication/374381925_A_review_of_the_industrial_use_and_global_sustainability_of_Cannabis_sativa [accessed Oct 26 2023].
7. Rivas-Aybar, D., John, M., & Biswas, W. (2023). Can the Hemp Industry Improve the Sustainability Performanceof the Australian Construction Sector?. Buildings, 13(6), 1504.Rupasinghe, H. V., Davis, A., Kumar, S. K., Murray, B., & Zheljazkov, V. D. (2020). Industrial hemp (Cannabissativa subsp. sativa) as an emerging source for value-added functional food ingredients andnutraceuticals. Molecules, 25(18), 4078
(PDF) A review of the industrial use and global sustainability of Cannabis sativa. Available from:
https://www.researchgate.net/publication/374381925_A_review_of_the_industrial_use_and_global_sustainability_of_Cannabis_sativa [accessed Oct 26 2023].
8. Zimniewska, M. (2022). Hemp fibre properties and processing target textile: A review. Materials, 15(5), 1901.
9. Baraniecki, P.; Latterini, F.; Stefanoni, W.; Frankowski, J.; Wielgusz, K.; Pari, L.(2022) Assessment of the Working Performance of an Innovative Prototype to Harvest Hemp Seed in Two Different Conditions of Terrain Slope. Agronomy 12, 185. [Google Scholar] [CrossRef].
10. Šmirous, P., Bjelková, P., Souček, J. (2015) Metodická příručka pro pěstování olejného lnu. Agritec Plant Research s.r.o. 54 s. https://docplayer.cz/45577912-Metodicka-prirucka-pro-pestovani-olejneho-lnu.html.
11. McPartland, J. M. (2018) .Cannabis Systematics at the Levels of Family, Genus, and Species.Cannabis and Cannabinoid Research.Dec.203-212.http://doi.org/10.1089/can.2018.0039.
12. Boyko,T., V., Longaker, M., T.and George P (2018). Yang.Review of the Current Management of Pressure Ulcers.Advances in Wound Care.Feb 2018.57-67.http://doi.org/10.1089/wound.2016.0697
13. Lachenmeier, D. W., & Walch, S. G. (2005). Analysis and Toxicological Evaluation of Cannabinoids in Hemp Food Products - a review. Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry, 4(1), 812–826. https://doi.org/10.5281/zenodo.438133.
14. House, E. R. (2010). *Evaluating with validity*. IAP.

Poděkování
Příspěvek vznikl v rámci řešení výzkumného projektu MZe RO1023 a MZe NAZV QK21010151, QJ1910302

Použití konopí v potravinách a problematika nových potravin

Ing. Petr Beneš

Ministerstvo zemědělství, Odbor bezpečnosti potravin

Shrnutí

Za nové potraviny nebo nové složky potravin jsou považovány potraviny, u nichž nebyla doložena historie konzumace ve významné míře před datem 15. 5. 1997 na území kteréhokoliv členského státu EU bez ohledu na datum přistoupení k EU. Velkému zájmu spotřebitelů se v ČR těší produkty získané z rostlin konopí setého (*Cannabis sativa L.*). Kromě částí rostlin, o kterých víme, že jsou dlouhodobě konzumovány (např. semínka), se na trhu objevují také potraviny obsahující složky izolované z rostlin konopí setého, o jejichž bezpečnosti a historii konzumace nemáme v tuto chvíli dostatek informací a je předmětem zjišťování.

Nové potraviny

Novými potravinami nebo novými složkami potravin se rozumí potraviny, u nichž nebyla doložena historie konzumace ve významné míře před datem 15. 5. 1997 (datum, kdy vstoupilo v účinnost předchozí nařízení (ES) č. 258/1997) na území kteréhokoliv členského státu EU bez ohledu na datum přistoupení k EU. V EU je uvádění tzv. „nových potravin“ v kompetenci nařízení EP a R (EU) 2015/2283 o nových potravinách (dále jen „nařízení“). Jedná se o potraviny nebo složky potravin definované v čl. 3 odst. 2 písm a) i) až x) nařízení:

- s novou nebo záměrně modifikovanou molekulární strukturou;
- sestávající, izolované nebo vyrobené z
    - mikroorganismů, hub, řas;
    - z látek minerálního původu;
    - rostlin nebo jejich částí;
    - z těl živočichů nebo jejich částí;
    - z buněčné nebo tkáňové kultury získané ze zvířat, rostlin, mikroorganismů, hub či řas;
- potraviny získané výrobním postupem, který způsobuje významné změny ve složení nebo struktuře potraviny, které mají vliv na její výživovou hodnotu, metabolizaci nebo množství nežádoucích látek;
- potraviny obsahující umělé nanomateriály.

Nové potraviny mohou být uvedeny na trh EU až po prokázání jejich bezpečnosti v rámci schvalovacího procesu a zapsání na seznam EU nových potravin. Je to z toho důvodu, že s konzumací nových potravin nemáme v EU historickou zkušenost a nevíme, jaké může mít jejich konzumace dopady na zdraví. Bez předchozího schválení nelze nové potraviny uvádět na trh EU.

Schvalovací proces podle nařízení 2015/2283 probíhá kompletně celý na úrovni EK, žádosti se podávají přímo EK elektronicky pomocí nově vytvořeného e-submission systému, dostupného na webu EK. Hodnocení bezpečnosti provádí Evropský úřad pro bezpečnost potravin na základě vědeckých studií a dalších informací, které dodá žadatel.

Pro posuzování, zda látky spadají do působnosti nařízení, je od 1. 1. 2015 kompetentním úřadem MZe, Odbor bezpečnosti potravin.

Používání části a látek získaných z rostlin konopí v potravinách

Pokud jde o používání části rostlin konopí v potravinách z pohledu nařízení o nových potravinách, mezi členskými státy EU je koncensus na tom, že byla prokázána historie konzumace konopných semínek, konopného oleje, mletých konopných semínek, (částečně) odtučněných konopných semínek a dalších potravin vyrobených z konopných semínek. V EU byla rovněž prokázána historie spotřeby vodního nálevu z konopných listů (pokud nejsou doprovázeny kvetoucími a plodonosnými vrcholky), které se konzumují samostatně nebo jako součást bylinných nálevů.

Rostlina konopí seté (*Cannabis sativa L.*) obsahuje více než 100 různých kanabinoidů, z nichž nejběžnější jsou kanabidiol (CBD), kanabigerol (CBG), kanabinol (CBN), kanabichromen (CBC) a delta-9-tetrahydrokanabinol (THC). THC je považován za psychotropní látku ve smyslu Jednotné úmluvy OSN o psychotropních látkách z roku 1971, a proto jej nelze považovat za potravinu.

V rozsudku ve věci C-663/18 Soudní dvůr Evropské unie dospěl k závěru, že CBD by neměl být považován za omamnou látku ve smyslu Jednotné úmluvy OSN o omamných látkách z roku 1961. Evropská komise (dále jen „Komise“) proto CBD považuje za potravinu, pokud jsou splněny ostatní podmínky článku 2 Nařízení (ES) č. 178/2002, kterým se stanoví obecné zásady a požadavky potravinového práva.

CBD a jiné kanabinoidy z konopí setého nemají prokázanou historii konzumace ve významné míře před 15. květnem 1997, a tudíž jsou považovány za nové potraviny ve smyslu nařízení EU 2015/2283 o nových potravinách a bez předchozího schválení nesmí být uváděny na trh EU. Evropská komise obdržela již více než 190 žádostí podle nařízení o nových potravinách o povolení CBD a extraktů z *Cannabis sativa L.* a odvozených produktů obsahujících kanabinoidy. Z těchto žádostí jich Komise zatím 20 uznala za platné, tzn. splňující formální i obsahové náležitosti, a tedy spadající do působnosti nařízení (EU) 2015/2283 o nových potravinách. Schvalovací proces byl u všech produktů dočasně pozastaven z důvodu sbírání dat potřebných pro posouzení jejich bezpečnosti. Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) totiž konstatoval, že na základě dostupných dat není možné potvrdit bezpečnost CBD. Ve svém prohlášení z června 2022 úřad EFSA identifikoval několik potenciálních rizik a upozornil, že je třeba doplnit mnoho chybějících údajů týkajících se možných účinků na zdraví. Zejména je třeba prozkoumat účinek CBD na játra, gastrointestinální trakt, endokrinní systém, nervový systém a na psychologické funkce.

Vliv výživy a vegetační fáze konopí na antistafylokokovou aktivitu

Ing. Lucie Malíková, Ph.D.[a,b]; prof. MVDr. Eva Skřivanová, Ph.D. [a,b]; Ing. Matěj Malík, Ph.D.[c]

[a]Oddělení Fyziologie výživy a jakosti produkce, Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Přátelství 815, 104 00 Praha 22 - Uhříněves

[b]Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 00, Praha 6 – Suchdol

[c]Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 00, Praha 6 – Suchdol

Abstrakt

Konopí (*Cannabis sativa* L.) je rostlina, která v posledních letech získává stále větší pozornost díky svým potenciálním léčebným vlastnostem a významu v oblasti zemědělství a průmyslu. Jednou z podstatných oblastí výzkumu týkající se konopí je jeho antistafylokoková aktivita. Stafylokokové infekce představují závažný zdravotní problém jak u lidí, tak i v chovech hospodářských zvířat. Vážné vedlejší účinky v současnosti používaných antibiotik a šíření genů antibiotické rezistence bakterií, jako je methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*, představují stále větší hrozbu pro veřejné zdraví. Předložená práce zkoumá vliv výživy a vegetační fáze konopí na jeho antistafylokokový účinek.

Úvod

Staphylococcus aureus patří mezi hlavní příčiny infekcí a onemocnění u lidí a zvířat, což má významný dopad na veřejné zdraví a zemědělství (Peton a Le Loir 2014). Jako vysoce adaptabilní patogen je tato bakterie zodpovědná za širokou škálu klinických problémů, od menších kožních infekcí po život ohrožující bakterémie či meningitidu (Prestinaci a kol. 2015). V minulosti byly onemocnění způsobené *S. aureus* úspěšně léčeny antibiotiky penicilinové řady (Daum 2008). V průběhu let se však používání běžných antibiotik jako standardního léčebného postupu stafylokokových infekcí stalo problematickým z důvodu závažných vedlejších účinků (Rodvold a McConeghy 2014) a šíření rezistentních kmenů *S. aureus* (Peton a Le Loir, 2014). V současné době je globální šíření methicilin rezistentního *S. aureus* (MRSA) jednou z největších výzev ve veřejném zdraví. MRSA kmeny vykazují odolnost nejen vůči methicilinu, ale také vůči dalším skupinám antibiotik, jako jsou aminoglykosidy, makrolidy, tetracykliny nebo beta-laktamová antibiotika (Akpaka a kol. 2017). Navíc, MRSA kmeny způsobují významně vyšší míru nemocnosti a úmrtnosti ve srovnání s kmeny *S. aureus* citlivými na methicilin (MSSA) (15,6 % vs. 6,2 %) (Castro a kol. 2016). Proto se nyní vynakládá značné úsilí na vývoj nových látek s vylepšenou účinností proti stafylokokům (Prestinaci a kol. 2015).

Z klinických studií a testů provedených *in vitro* a *in vivo* je dobře známo, že některé léčivé rostliny a jejich obsahové složky vykazují antimikrobiální vlastnosti (Goñi a kol. 2009, Kokoska a kol. 2019, Shedoeva a kol. 2019). Jednou z těchto rostlin je konopí seté, jednoletá bylina, u níž byly prokázány mnohé farmakologické a antibakteriální účinky (Naveed a kol. 2014, Malik a kol. 2022). Profil metabolitů v *C. sativa* je nesmírně bohatý, bylo detekováno více než 480 sloučenin (Karas a kol. 2020). Kromě fenolických a terpenických sloučenin se předpokládá, že antimikrobiální účinky této rostliny jsou také spojeny s kanabinoidy (Klahn 2020). Aktuální *in vitro* studie naznačují, že kanabinoidy prokazují silnou aktivitu proti

grampozitivním i gramnegativním patogenům, jako jsou *S. aureus* (včetně MRSA), *Streptococcus mutans*, *Listeria monocytogenes* (Aqawi a kol. 2021, Blaskovich a kol. 2021) nebo *Neisseria gonorrhoeae* (Blaskovich a kol. 2021). Navíc, několik studií naznačuje, že kanabinoidy mohou být schopny potlačit produkci virulenčních faktorů bakterií, například tvorbu biofilmu (Sionov a Steinberg 2022), který se vyznačuje vysokou odolností vůči antibiotikům (Sharma a kol. 2019, Ciofu a kol. 2022). Nicméně, antibakteriální aktivita konopí setého závisí na dalších faktorech, včetně konkrétního kanabinoidu, jeho koncentrace a typu cílové bakterie (Scott a kol. 2022).

Celkový obsah kanabinoidů je ovlivňován jak vnějšími faktory, jako je hladina oxidu uhličitého (Chandra a kol. 2011), závlaha (Caplan a kol. 2019), světelné podmínky a výživa (Malik a kol. 2021), tak vnitřními faktory, jako je genotyp rostliny v kontextu různých chemických fenotypů a vegetační fáze nebo fáze sklizně (Malik a kol. 2021, Malik a kol. 2022). S ohledem na vysoký antibakteriální potenciál konopných extraktů může znalost optimálního času pro sklizeň konopí přispět k vývoji nových antimikrobiálních látek. Tato studie hodnotí vliv výživy a vegetační fáze konopí setého (první až sedmý týden růstu) na dva kmeny *S. aureus*, včetně forem odolných a citlivých na antibiotika.

Materiál a metody

Rostlinný materiál

Rostliny konopí byly pěstovány ve 4 různých výživových variantách (B, C, D) v porovnání s kontrolní výživou (A) a byly sklízeny týdně během 1 až 7 týdnů vegetace. Výživová varianta B byla doplněna o aminokyseliny, výživová varianta B byla doplněna o P, K a Fe. Poslední ošetření D bylo kombinací B a C. Obsah živin byl upraven v závislosti na stáří rostlin.
Rostliny byly během vegetační fáze sklízeny týdně ve 3 replikátech. Nadzemní biomasa byla rozdělena na stonky, listy a květy. Extrakty byly připraveny pomocí ethanolu metodou zvaná dynamická macerace.

Bakteriální kmeny a růstové médium

Standardní kmeny *S. aureus*, ATCC 29213 a ATCC 43300, pocházely z Americké sbírky typových kultur (ATCC, USA). Pro kultivaci a testování obou kmenů bakterií byl použit Mueller-Hinton bujón (Oxoid, UK).

Stanovení antibakteriální aktivity konopných extraktů

Antibakteriální aktivita byla stanovena v 96-jamkových mikrotitračních destičkách pomocí mikrodiluční metody v bujonu proti standardním kmenům *S. aureus* (ATCC 29213, ATCC 43300) a byla vyjádřena jako minimální inhibiční koncentrace (MIC - nejnižší koncentrace s redukcí růstu bakterií o ≥ 80%).

Výsledky

Všechny testované extrakty z konopí vykazovaly inhibiční účinek na oba kmeny *S. aureus* (Tabulka 1 a 2). Nejsilnější antibakteriální aktivita byla pozorována od 5. do 7. týdne růstu *C. sativa*, kdy MIC nabývaly hodnot v rozmezí 32 až 64 µg/ml. Oproti tomu, extrakty 1. až 4. týdne růstu vykazovaly střední inhibiční aktivitu vůči kmenům *S. aureus* (MICs 128-256 µg/ml).

Tabulka 1. Minimální inhibiční koncentrace (µg/ml) ethanolových extraktů z konopí proti růstu *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Výživová varianta	**Růstové týdny *Cannabis sativa* L.**						
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
A[a]	256	128	256	256	64	64	32
B[b]	256	128	256	256	64	64	32
C[c]	256	256	256	256	64	32	32
D[d]	256	256	256	256	64	64	32

[a]A, kontrolní výživa; [b]B, výživa s doplňkem aminokyselin; [c]C, výživa s doplňkem P, K a Fe; [d]D, výživa s doplňkem aminokyselin, P, K a Fe.

Tabulka 2. Minimální inhibiční koncentrace (µg/ml) ethanolových extraktů z konopí proti růstu *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

Výživová varianta	**Růstové týdny *Cannabis sativa* L.**						
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
A[a]	256	128	128	128	64	64	32
B[b]	256	128	128	256	64	64	32
C[c]	256	256	256	256	64	32	32
D[d]	256	256	256	256	64	64	32

[a]A, kontrolní výživa; [b]B, výživa s doplňkem aminokyselin; [c]C, výživa s doplňkem P, K a Fe; [d]D, výživa s doplňkem aminokyselin, P, K a Fe.

Diskuze a závěr

Všechny ethanolové extrakty z konopí prokázaly *in vitro* inhibiční účinek na růst obou testovaných kmenů *S. aureus* (MIC 32-256 µg/ml). Podle nedávných studií bylo zjištěno, že konopné extrakty mají inhibiční účinek na růst stafylokokových kmenů v širokém rozsahu hodnot MIC, od 4 do 8 000 µg/ml (Ali a kol. 2012, Kaur a kol. 2015, Skala a kol. 2022, Giselle a kol. 2023), což do jisté míry odpovídá výsledkům předložené studie. Drobné odchylky lze vysvětlit použitím odlišných metod a bakteriálních kmenů. Například, studie Skala a kol. (2022) a Giselle a kol. (2023) stanovili pomocí mikrodiluční bujonové metody hodnoty MIC pro ethanolové konopné extrakty v rozmezí od 8 do 115,25 µg/ml. Oproti tomu, Kaur a kol. (2015) uvádí, že za použití diskového difuzního testu dosáhli hodnoty MIC methanolového extraktu z *C. sativa* vůči *S. aureus* ATCC 25923 1 560 µg/ml. Diskový difuzní test je však založen na jiném principu detekce, než mikrodiluční meoda, která je považována za zlatý standard hodnocení antibakteriální aktivity.

Již dříve bylo zdokumentováno, že kanabinoidy vykazují membránovou aktivitu, která způsobuje depolarizaci cytoplazmatické membrány a narušení mitochondriálního membránového potenciálu u *S. aureus* (Wassmann a kol. 2020). Appendino a kol. (2008) dospěli k závěru, že rezorcinolová část kanabinoidů slouží jako antibakteriální farmakofor, přičemž alkyl, terpenoidní a karboxylové skupiny modulují tuto aktivitu. Zmíněné funkční skupiny činí kanabinoidy vysoce hydrofobními sloučeninami (Challapalli a Stinchcomb 2002). Grampozitivní bakterie se vyznačují silnou vrstvou peptidoglykanu spojenou s dalšími hydrofobními molekulami jako jsou proteiny a teichoová kyselina (Nikaido 1994). Je možné předpokládat, že tato hydrofobní vrstva obklopující buňku grampozitivních bakterií může usnadňovat vstup hydrofobních molekul (Angane a kol. 2022). Navíc, výše uvedená karboxylová skupina může uvolnit proton/y (Bhdara a kol. 2022), což může vést k poškození buněčné membrány a poklesu vnitřního pH (Guan a Liu 2020) a tedy k negativnímu ovlivnění enzymatických reakcí a metabolických drah v bakteriích (Tran a kol. 2021).

Závěrem, předložená studie prokázala antistafylokokovou aktivitu ethanolových extraktů *C. sativa* proti oběma testovaným bakteriálním kmenům, MSSA a MRSA, napříč všemi

testovanými vegetačními fázemi (první až sedmý týden růstu). Nejvyšší antistafylokokový účinek byl u všech výživových variant zaznamenán v sedmém týdnu; u výživové varianty C i v týdnu šestém.

Zdroj financování
Práce byla financována projektem IGA DKRVO 2023, V-03-02.

Použitá literatura

Akpaka PE, Roberts R, Monecke S. 2017. Molecular characterization of antimicrobial resistance genes against *Staphylococcus aureus* isolates from Trinidad and Tobago. J Infect Public Health 10:316-323. https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.05.010.

Ali EMM, Almagboul AZI, Khogali SME, Gergeir UMA. 2012. Antimicrobial activity of Cannabis sativa L. Chin Med 1:1-4. https://doi.org/10.4236/cm.2012.31010.

Angane M, Swift S, Huang K, Butts ChA, Quek SY. 2022. Essential oils and their components: An updated review on antimicrobial activities, mechanism of action and their potential application in the food industry. Foods 11:1-26. https://doi.org/10.3390/foods11030464.

Appendino G, Gibbons S, Giana A, Pagani A, Grassi G, Stavri M, Smith E, Rahman MM. 2008. Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: A structure-activity study. J Nat Prod 71:1427-1430. https://doi.org/10.1021/np8002673.

Aqawi M, Sionov RV, Gallily R, Friedman M, Steinberg D. 2021. Anti-bacterial properties of cannabigerol toward *Streptococcus mutans*. Front Microbiol 12:1-15. doi: https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.656471.

Blaskovich MAT, Kavanagh AM, Elliott AG, Zhang B, Ramu S, Amado M, Lowe GJ, O Hinton A, Thu Pham DM, Zuegg J, Beare N, Quach D, Sharp MD, Pogliano J, Rogers AP, Lyras D, Tan L, West NP, Crawford DW, Peterson ML, Callahan M, Thurn M. 2021. The antimicrobial potential of cannabidiol. Commun Biol 4:1-18. https://doi.org/10.1038/s42003-020-01530-y.

Caplan D, Dixon M, Zheng Y. 2019. Increasing inflorescence dry weight and cannabinoid content in medical cannabis using controlled drought stress. HorstScience 54:964-969. https://doi.org/10.21273/hortsci13510-hortsci13518.

Castro A, Santos C, Meireles H, Silva J, Teixeira P. 2016. Food handlers as potential sources of dissemination of virulent strains of *Staphylococcus aureus* in the community J Infect Public Health 9:153-160. https://doi.org/10.1016/j.jiph.2015.08.001.

Ciofu O, Moser C, Jensen PØ, Høiby N. 2022. Tolerance and resistance of microbial biofilms. Nat Rev Microbiol 20:621-635. https://doi.org/10.1038/s41579-022-00682-4.

Daum RS. 2008. *Staphylococcus aureus* vaccines, p 1307-1315. *In* Plotkin SA, Orenstein WA, Offit P (ed), Vaccines, 5th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia.

Giselle F, Azucena I, Dalila O, Florencia F, Facundo R, Giulia M, Sandra F, Maggi M, Ramirez CL. 2023. Antibacterial activity of cannabis (*Cannabis sativa* L.) female inflorescence and root extract against Paenibacillus larvae, causal agent of American foulbrood. Biocatal Agric Biotechnol 47:1-11. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102575.

Goñi P, Lopez P, Sanchez C, Gomez-Lus R, Becerril R, Nerin C. 2009. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. Food Chem 116:982-989. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.058.

Guan N, Liu L. 2020. Microbial response to acid stress: mechanisms and applications. Appl Microbiol Biotechnol 104:51-65. https://doi.org/10.1007/s00253-019-10226-1.

Challapalli PV, Stinchcomb AL. 2002. *In vitro* experiment optimization ofr measuring tetrahydrocannabinol skin permation. Int J Pharm 241:329-339. https://doi.org/10.1016/s03738-5173(02)00262-4.

Chandra S, Lata H, Khan IA, ElSohly MA. 2011. Photosyntetic response of *Cannabis sativa* L., an important medicinal plant, to elevated levels of CO2. Physiol Mol Biol Plants 17:291-295. https://doi.org/10.1007/s12298-011-0066-6.

Karas JA, Wong LJM, Paulin OKA, Mazeh AC, Hussein MH, Li J, Velkov T. 2020. The antimicrobial activity of cannabinoids. Antibiotics 9:1-10. https://doi.org/10.3390/antibiotics9070406.

Kaur S, Sharma C, Chaudhry S, Aman R. 2015. Antimicrobial potential of three common weeds of kurukshetra: an *in vitro* study. Res J Microbiol 10:280-287. https://doi.org/10.3923/jm.2015.280.287.

Klahn P. 2020. Cannabinoids-Promising antimicrobial drugs or intoxicants with benefits? Antibiotics 9:1-27. https://doi.org/10.3390/antibiotics9060297.

Kokoska L, Kloucek P, Leuner O, Novy P. 2019. Plant-derived products as antibacterial and antifungal agents in human health care. Curr Med Chem 26:5501-5541. https://doi.org/10.2174/0929867325666180831144344.

Malik M, Doskocil I, Pavlik J, Ulman M, Praus L, Kourimsky P, Lampova B, Kuklina A, Tlustos P. 2022. Selective cytotoxicity of medical cannabis (*Cannabis sativa* L.) extracts across the whole vegetation cycle under various hydroponic and nutritional treatments. Cannabis Cannabinoid Res. 0:1-12. https://doi.org/10.1089/can.2022.0243.

Malik M, Velechovsky J, Tlustos P. 2021. The overview of existing knowledge on medical cannabis plants growing. Plant Soil Environ 67:425-442. https://doi.org/10.17221/96/2021-pse.

Naveed M, Khan TA, Ali I, Hassan A, Ali H, Din ZU, Hassan Z, Tabassum S, Majid A, Rehman MU. 2014. *In vitro* antibacterial activity of *Cannabis sativa* leaf extracts to some selective pathogenic bacterial strains. Int J Biosci 4:65-70. http://dx.doi.org/10.12692/ijb/4.4.65-70.

Nikaido H. 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux. Science 264:382-388. https://doi.org/10.1126/science.8153625.

Peton V, Le Loir Y. 2014. *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. Infect Genet Evol 21:602-615. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.08.011.

Prestinaci F, Patrizio P, Annalisa P. 2015. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. Pathog Glob Health 109:309-318. https://doi.org/10.1179/2047773215Y.0000000030.

Rodvold KA, McConeghy KW. 2014. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* therapy: Past, present, and future. Clin Infect Dis 58:20-27. https://doi.org/10.1093/cid/cit614.

Scott C, Agonh DN, Lehmann Ch. 2022. Antibacterial effects of phytocannabinoids. Life 12:1-12. https://doi.org/10.3390/life12091394.

Sharma D, Misba L, Khan AU. 2019. Antibiotics versus biofilm: An emerging battleground in microbial communities. Antimicrob Resist Infect Control 8:1-10. https://doi.org/10.1186/s13756-019-0533-3.

Shedoeva A, Leavesley D, Upton Z, Fan C. 2019. Wound healing and the use of medicinal plants. Evid.-Based Complementary Altern Med 2684108:1-30. https://doi.org/10.1155/2019/2684108.

Sionov RV, Steinberg D. 2022. Anti-microbial activity of phytocannabinoids and endocannabinoids in the light of their physiological and pathophysiological roles. Biomedicines 10: 1-48. https://doi.org/10.3390/biomedicines10030631.

Skala T, Kahankova Z, Tauchen J, Janatova A, Kloucek P, Hubka V, Frankova A. 2022. Medical cannabis dimethyl ether, ethanol and butane extracts inhibit the *in vitro* growth of bacteria and dermatophytes causing common skin diseases. Front Microbiol 13:1-10. https://doi.org./10.3389/fmicb.2022.953092.

Tran TTT, Kannoorpatti K, Padovan A, Thennadil S. 2021. Sulphate-reducing bacteria´s response to extreme pH environments and the effect of their activities on microbial corrosion. Appl Sci 11:1-19. https://doi.org/10.3390/app11052201.

Wassmann CS, Højrup P, Klitgaard JK. 2020. Cannabidiol is an effective helper compound in combination with bacitracin to kill Gram-positive bacteria. Sci Rep 10:1-12. https://doi.org/10.1038/s41598-020-60952-0.

Vliv konopného a lněného semínka na enzymovou aktivitu trávicího traktu kuřat

Ing. Michaela Englmaierová, Ph.D.[a]; Ing. Tomáš Taubner, Ph.D.[a]; prof. Ing. Miloš Skřivan, DrSc.[a]; Ing. Lucie Malíková, Ph.D.[a,b]

[a]Oddělení Fyziologie výživy a jakosti produkce, Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Přátelství 815, 104 00 Praha 22 - Uhříněves

[b]Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 00, Praha 6 – Suchdol

Úvod

Konopí seté (*Cannabis sativa* L.) je široce studováno pro svůj vliv na organismus a obohacování krmných směsí o části rostliny konopí je relativně novým směrem ve výživě zvířat. Konopí obsahuje řadu biologicky aktivních sloučenin a působí jako antioxidant či protizánětlivě a antibakteriálně (Andre et al., 2016). Lipidová frakce konopných semen obsahuje γ-tokoferol jako hlavní antioxidant a steroly, včetně β-sitosterolu a derivátů sterolů, které mohou ovlivnit metabolismus lipidů. Konopný olej obsahuje více než 80 % polynenasycených mastných kyselin s vhodným poměrem n-6 ku n-3 3:1 (Jurgoński et al., 2020). Látky obsažené v konopném semínku vstupují během trávicího procesu do reakcí a mohou tak ovlivnit prostředí pro působení enzymů v trávicím traktu. Hlavními bioaktivními sloučeninami ve lněném semínku (*Linum usitassimum*) jsou kyselina α-linolenová, lignany a vláknina (Katare et al., 2012). Lněné semínko obsahuje značné množství rozpustné i nerozpustné vlákniny. Mimo to jsou ve lněném semínku také obsaženy nízké hladiny sloučenin s potenciálními nepříznivými účinky na zdraví, jako je kadmium, inhibitory proteázy, kyanogenní sloučeniny, kyselina fytová, oxalát a linatin (Katare et al., 2012; Chishty a Bissu, 2016).

Enzymy jsou nejpočetnějšími biokatalyzátory, které katalyzují biologické reakce. Enzymy jsou velmi citlivé na podmínky prostředí, ve kterých fungují, a nejlépe fungují při optimální teplotě a pH (Zargi, 2018). Degradace organické hmoty v trávicím traktu zahrnuje řadu hydrolytických reakcí katalyzovaných enzymy endogenního a/nebo mikrobiálního původu (Marounek et al., 1995). Enzymová aktivita je nejvyšší v ileu a céku. Střevní mikroflóru významně ovlivňuje složení krmiva, probiotika, prebiotika, antibiotika, růstové stimulanty, kokcidiostatika a exogenní enzymy (Bedford a Apajalahti, 2001).

Krmivo představuje největší náklady v produkci drůbeže a ziskovost závisí na ceně a nutriční hodnotě krmiva. Krmné směsi lze upravit tak, aby podporovaly enzymatickou aktivitu v různých částech trávicího traktu. Lněné a konopné semínko jsou zdrojem bílkovin, tuků a vlákniny a složení těchto látek je pro organismus velmi příznivé. Konopné semínko a konopné výlisky lze použít jako krmnou surovinu pro všechny druhy zvířat. Doporučená dávka se pohybuje na úrovni 3 % u drůbeže na výkrm a 5–7 % pro nosnice (EFSA 2011). Pozitivní vliv konopného a lněného semínka na užitkovost, kvalitu masa a vajec a pevnost kostí je patrný z předchozích studií Skřivan et al. (2019 a 2020). Předpokládáme, že přidání těchto komponent do krmné směsi ovlivní enzymatickou aktivitu v trávicím traktu a tím zvýší nebo sníží stravitelnost a příjem živin. Příjem živin má vliv na růstové parametry a užitkovost.
Cílem pokusu bylo zjistit účinky extrudovaného lněného semínka, konopného semínka a kombinace obou semínek na užitkovost kuřat, stravitelnost vybraných živin a aktivitu základních enzymů ze skupiny polysacharidáz (amyláza, celuláza, pektináza, xylanáza a

inulináza) a disacharidáz (maltáza, invertáza a laktáza) a proteáz a lipázy v trávicím traktu brojlerových kuřat.

Materiál a metody

Pokus byl realizován se sedmi sty dvaceti jednodenními kohoutky Ross 308, kteří byli náhodně rozděleni do 48 kotců. Bylo porovnáváno 6 skupin s 8 opakováními (kotci, 15 kohoutků na kotec). Jednotlivé skupiny se lišily množstvím konopného (odrůda Futura) a lněného semínka v krmivu. Kontrolní skupina byla krmena dietou bez lněného nebo konopného semínka. Krmná směs druhé skupiny obsahovala 80 g/kg lněného semínka, dieta třetí skupiny obsahovala 40 g/kg konopného semínka a krmivo čtvrté až šesté skupiny obsahovalo 80 a 30 g/kg, 80 a 40 g/kg a 80 a 50 g/kg lněného a konopného semínka. Extrudované lněné semínko se sestávalo ze lněného semene (70 %) a pšeničných otrub (30 %). Jako zdroj tuku v dietách byl zvolen řepkový olej. Kohouti měli volný přístup k vodě a krmivu a byli ustájeni v kotcích na podestýlce z dřevěných hoblin, které byly vybaveny kapátkovými napáječkami, krmítky a plynovým hořákem. Během experimentu byly dodrženy standardní mikroklimatické a technologické podmínky pro kuřata Ross 308. Světelný režim v prvním týdnu byl 23 hodin světla a 1 hodiny tmy a poté byla délka tmy zvýšena na 8 hodin (světlo bylo 16 hodin). Kohoutci byli na konci pokusu zváženi (věk 35 dnů) a byl zaznamenáván příjem krmiva.

Ve věku 28 dnů bylo z každé skupiny vybráno 16 kuřat (2 kuřata z každého kotce (2 x 8), n = 8) s průměrnou tělesnou hmotností na skupinu a jednotlivě umístěno do klecí ke stanovení ileální stravitelnosti tuku a bílkovin. Jako indikátor byl použit oxid chromitý, který byl smíchán s dietou v množství 3,0 g/kg na úkor fosforečnanu vápenatého. Kuřata byla krmena touto dietou po dobu sedmi dnů. Osmý den kuřata po dobu 1 hodiny lačnila a poté jim byl opět umožněn přístup ke krmivu po dobu 2 hodin. Následně byla okamžitě poražena. Ileální trávenina byla odebrána v úseku mezi Meckelovým divertiklem a bodem asi 40 mm proximálně od ileocekálního spojení. Trávenina byla jemně vytlačena do malé plastové nádoby a vzorky byly okamžitě zmraženy a poté lyofilizovány a analyzovány. Stanovení obsahu tuku a dusíkatých látek v trávenině ilea bylo provedeno dle metod AOAC (2005).

Ve věku 35 dnů bylo z každé skupiny vybráno 16 kuřat (2 kuřata z každého kotce (2 x 8), n = 8) s průměrnou tělesnou hmotností a poraženo. Segmenty trávicího traktu (žaludek, ileum a slepé střevo) byly vyprázdněny jemným zmáčknutím. Obsah jednotlivých segmentů byl zvážen a bylo změřeno pH. Obsah byl poté uložen pod CO_2 v uzavřených lahvích při -40 °C až do analýzy, která byla provedena dle metodiky uvedené v Taubner et al. (2023).

Zjištěné výsledky byly zpracovány analýzou variance (ANOVA) pomocí general linear modelu (GLM) programem SAS. Experimentální jednotkou byl box (n = 8). Hodnota $P \leq 0,05$ byla považována za průkaznou. Výsledky v tabulkách jsou prezentovány formou průměru a střední chyby průměru (SEM).

Výsledky a diskuze

Přidání samotného lněného a konopného semínka nebo v kombinaci významně ($P < 0,001$) zvýšilo živou hmotnost kuřat ve věku 35 dnů (Tabulka1). Nejvyšší živá hmotnost kuřat byla zjištěna u skupiny se samotným konopným semínkem přidaným do krmiva (2827 g). Živá hmotnost těchto kuřat se nelišila od skupiny, které byla podávána směs obsahující kombinaci 80 g/kg lněného a 30 g/kg konopného semínka (2753 g). Kuřata z kontrolní skupiny měla pouze 2555 g. U všech pokusných skupin došlo ke zvýšení příjmu krmiva ($P = 0,036$) a poklesu konverze ($P = 0,041$) ve srovnání s kontrolní skupinou. Mimo to přídavek obou semínek, zejména pak konopného semínka, měl pozitivní vliv na ileální stravitelnost tuku ($P = 0,043$) a dusíkatých látek ($P = 0,038$) u kuřat. Tato zjištění jsou v souladu s výsledky Skřivan et. al. (2020).

Zjištění týkající se stravitelnosti korespondují s výsledky užitkovosti. Synergický efekt lněného semínka s konopným semínkem na živou hmotnost je patrný z pokusu Skřivana et al. (2020). Pozitivní vliv lněného semínka na stravitelnost lze vysvětlit zlepšením zdravotního stavu střev u drůbeže, jak bylo uvedeno ve studii Popescu et al. (2021). Na druhou stranu ale Rodríguez et al. (2001) uvedli, že zařazení lněného semínka do krmné směsi brojlerů mělo negativní vliv na stravitelnost živin. Tento účinek byl pravděpodobně způsoben přítomností antinutričních látek ve lněném semínku, jednou z nich byl sliz, který způsobil významné zvýšení viskozity jejunální tráveniny. Dále Høøk Presto et al. (2011) prokázali vyšší stravitelnost tuků u prasat, kterým bylo podáváno krmivo s konopnými výlisky na rozdíl od lněných a řepkových výlisků. pH a teplota významně ovlivňují enzymatickou aktivitu. Vyšší pH v žaludku není optimální pro proteolytickou aktivitu. Vyšší hodnoty pH v žaludku však podporují aktivitu dalších enzymů. Podobný efekt byl pozorován v ileu, kde je pro aktivitu většiny enzymů optimální vyšší hodnota pH. Optimální rozsah pH v žaludku pro dobrou aktivitu proteolytických enzymů je 1,5-3,5 (ideální 2,5) (Tabata et al., 2017). Optimální pH je 6,4 v ileu a 6,6 ve slepém střevě (Mabelebele et al., 2014). Průměrné hodnoty pH pro všechny skupiny zde prezentovaného pokusu byly 4,21 v žaludku, 5,32 v ileu a 6,58 ve slepém střevě.

Tabulka 1. Ukazatele užitkovosti a ileální stravitelnost vybraných živin u kuřat (Taubner et al., 2023).

Lněné semínko (g/kg)	0	80	0	80	80	80	SEM	Průkaznost
Konopné semínko (g/kg)	0	0	40	30	40	50		
Živá hmotnost (35. den, g)	2555^{c}	2718^{b}	2827^{a}	2753^{ab}	2732^{b}	2721^{b}	11,7	<0,001
Konverze krmiva (kg/kg)	1,47^{a}	1,42^{b}	1,43^{b}	1,41^{b}	1,44^{b}	1,45^{ab}	0,028	0,041
Spotřeba krmiva (g/den/kus)	102,3^{d}	105,7^{c}	106,3^{c}	106,3^{c}	107,4^{b}	109,0^{a}	2,33	0,036
Ileální stravitelnost (%)								
Tuk	73,2^{c}	75,8^{b}	77,9^{a}	76,0^{b}	76,3^{b}	76,5^{b}	0,62	0,043
Dusíkaté látky	79,5^{c}	81,9^{b}	83,7^{a}	81,9^{b}	82,0^{b}	82,5^{b}	0,58	0,038

$^{a-d}$Hodnoty na stejném řádku označené jinými písmeny se průkazně liší; SEM = střední chyba průměru.

Výsledky uvedené v Tabulce 2 dokládají zvýšení enzymové aktivity v trávicím traktu kuřat po podání krmných směsí s přídavkem lněného a konopného semínka samostatně, ale zejména pak v jejich kombinaci. Škrob je obvykle plně využit ve výživě (Clavijo a Vives Flórez, 2018). Úspěšná přeměna pozřeného škrobu na glukózu je kriticky důležitá pro energetický stav (Cowieson et al., 2019). Pšeničný, kukuřičný a sójový šrot byly hlavními složkami krmné směsi pro brojlery. Lze předpokládat, že hlavním zdrojem energie v tomto experimentu byl škrob. Nejvyšší aktivita amylázy a maltázy byla zaznamenána v ileální trávenině. V žaludku nebo slepém střevě nebyla detekována žádná aktivita amylázy. Zde uváděné výsledky jsou v souladu s výsledky Gracia et al. (2003), kteří detekovali pouze stopová množství amylázové aktivity ve slepém střevě a žádnou amylázovou aktivitu v žaludku, přičemž nejvyšší amylázová aktivita byla zjištěna v ileu. Nulová aktivita amylázy ve slepém střevě je překvapivá. Protože kukuřičný škrob je bohatý na amylózu, která je součástí rezistentního škrobu a přechází do slepých střev a tlustého střeva. Jejunum je považováno za hlavní místo trávení škrobu u kuřat (Gracia et al., 2003). Stanovení nejvyšší naměřené aktivity amylázy v ileu je v souladu s touto představou. Krmná směs s obsahem konopného semínka nebo v kombinaci se lněným semínkem může mírně podporovat aktivitu amylázy. Obsah škrobu v konopných semenech je menší než 2 % (Schultz et al., 2020). Obsah škrobu ve lněném semínku je 6 % (Filipovic et al., 2016). Pankreatická α-amyláza je hlavním enzymem zodpovědným za trávení škrobu u ptáků. Pro

usnadnění vytěžení maxima energie z krmiva podávaného drůbeži je důležité zařadit komponenty s vysokým obsahem škrobu (pšenice a kukuřice).

Celulolytickou aktivitu vykazují v gastrointestinálním traktu pouze mikroorganismy (Kopečný a Bartoš, 1990). Podobně jako u amylázy byla aktivita celulázy nejvyšší v ileu u brojlerů, kterým bylo podáváno lněné i konopné semeno (80 g/kg a 50 g/kg). Diety obsahující konopné semeno měly vyšší obsah hrubé vlákniny, což mohlo ovlivnit aktivitu celulázy (Smolová et al., 2019; Schultz et al., 2020). Hlavní přeměna polysacharidů, zahrnující pektinázy, xylanázy a inulinázy, proběhla v ileu. Vysokou aktivitu celulázy, pektinázy a xylanázy lze vysvětlit přítomností mikroorganismů v této koncové části trávicího traktu. Pankreatické šťávy také obsahují amylázu, která pokračuje ve štěpení škrobu a glykogenu na maltózu, což je disacharid. Disacharidy se maltázou štěpí na monosacharidy. Aktivity ostatních enzymů (invertáza a laktáza) jsou převážně výsledkem mikroorganismů trávicího traktu (Marounek et al., 1995). Aktivita enzymů štěpících disacharidy (maltáza, invertáza a laktáza) byla nejnižší v žaludku a byla významně vyšší v ileu a ve slepých střevech. V případě maltázy byl příznivý účinek pozorován u krmných směsí obsahujících lněné semínko.

Protein je pro zvířata nezbytný jako zásoba aminokyselin. Proteázy jsou velmi důležité enzymy, které jsou zodpovědné za štěpení proteinů na peptidy a poté na aminokyseliny. Bílkoviny mají ve výživě drůbeže velký význam a patří mezi hlavní živiny. Proteolytická aktivita byla výrazná v ileu. Proteolytická aktivita byla přibližně desetkrát nižší v žaludku a ve slepém střevě. Štěpení proteinu bylo tedy nejvyšší v ileu (Antalis et al., 2007). Žaludek je pro tuto činnost také důležitý, protože v tomto segmentu začíná působení proteáz. Skupiny, které dostávaly samotné konopné a lněné semínko, ale i v kombinaci, vykazovaly zvýšenou proteolytickou aktivitu v ileu. Nejvyšší hodnota proteolytické aktivity byla naměřena u brojlerových kuřat krmených kombinací 80 g/kg lněného semene a 50 g/kg konopného semene.

Lipidy představují pro brojlery hlavní zdroj energie. Stravitelnost tuků a olejů závisí na chemických a fyzikálních vlastnostech mastných kyselin, které je tvoří. Trávení ovlivňuje mnoho faktorů (včetně zdroje a typu lipidů, složení potravy a stáří brojlerů) (Hu et al., 2018). Vyšší lipázová aktivita byla pozorována u skupin, které dostávaly diety obsahující lněné a konopné semínko, a hlavně kombinaci obou. Získaná data prokázala, že v trávicím traktu brojlerových kuřat jsou přítomny všechny hydrolázy nezbytné pro enzymatickou přeměnu komplexních živin na dostupné formy.

Tabulka 2 . Distribuce aktivity enzymů na hmotnost tráveniny v jednotlivých segmentech gastrointestinálního traktu (Taubner et al., 2023).

Segment	Skupina	Lněné /konopné s. (g/kg)	Amyláza[1]	Celuláza[1]	Pektináza[1]	Xylanáza[1]	Inulináza[1]	Maltáza[2]	Invertáza[2]	Laktáza[2]	Proteinázy[3]	Lipáza[4]
Žaludek	I	0/0	0,00^{c}	0,00^{e}	5,3^{f}	0,00^{d}	0,18^{i}	3,4^{h}	5,7^{d}	5,9^{d}	108^{ef}	0,18^{g}
	II	80/0	0,00^{c}	0,25^{e}	11,5^{f}	0,19^{d}	10^{hi}	6,9^{gh}	7,8^{d}	1,5^{d}	133^{ef}	0,34^{g}
	III	0/40	0,00^{c}	1,9^{e}	34^{ef}	8,7^{d}	44^{efghi}	16^{gh}	14^{d}	8,1^{d}	104^{f}	0,09^{g}
	IV	80/30	0,00^{c}	0,39^{e}	29^{ef}	5,1^{d}	17^{fghi}	3,3^{h}	2,0^{d}	0,00^{d}	72^{f}	0,05^{g}
	V	80/40	0,00^{c}	0,53^{e}	43^{def}	5,7^{d}	16^{ghi}	3,4^{gh}	4,1^{d}	0,68^{d}	75^{f}	0,04^{g}
	VI	80/50	0,00^{c}	0,00^{e}	126^{de}	13^{d}	75^{cdef}	14,9^{gh}	31^{cd}	3,0^{d}	169^{ef}	0,10^{g}
Ileum	I	0/0	494^{b}	550^{d}	526^{c}	452^{c}	274^{a}	476^{e}	683^{a}	396^{a}	2241^{d}	20^{d}
	II	80/0	460^{b}	627^{cd}	485^{c}	535^{b}	125^{c}	895^{a}	677^{a}	270^{b}	3146^{c}	33^{c}
	III	0/40	536^{ab}	755^{bc}	727^{b}	543^{b}	216^{b}	737^{d}	699^{a}	238^{b}	3309^{c}	40^{bc}
	IV	80/30	542^{ab}	828^{b}	928^{a}	587^{b}	242^{ab}	848^{ab}	726^{a}	391^{a}	3857^{b}	52^{a}
	V	80/40	546^{ab}	756^{bc}	763^{b}	514^{bc}	240^{ab}	682^{d}	707^{a}	378^{a}	3832^{b}	40^{bc}
	VI	80/50	791^{a}	109^{a}	873^{a}	685^{a}	190^{b}	807^{bc}	779^{a}	380^{a}	4463^{a}	46^{ab}
Slepé střevo	I	0/0	0,00^{c}	9,9^{e}	31^{ef}	25^{d}	60^{defgh}	116^{f}	142^{b}	86^{c}	393^{e}	11^{ef}
	II	80/0	0,00^{c}	0,00^{e}	23^{ef}	16^{d}	67^{defg}	115^{f}	81^{bcd}	105^{c}	128^{ef}	9,1^{f}
	III	0/40	0,00^{c}	22,5^{e}	82^{def}	47^{d}	80^{cde}	105^{fg}	103^{bcd}	59^{cd}	153^{ef}	9,9^{f}
	IV	80/30	0,00^{c}	20,5^{e}	122^{de}	54^{d}	124^{c}	147^{f}	118^{bcd}	87^{c}	217^{ef}	18^{de}
	V	80/40	0,00^{c}	0,42^{e}	136^{de}	39^{d}	94^{cd}	131^{f}	142^{bc}	104^{c}	223^{ef}	15^{def}
	VI	80/50	0,00^{c}	0,96^{e}	152^{d}	70^{d}	106^{cd}	115^{f}	157^{b}	112^{c}	177^{ef}	17^{def}
SEM			22,584	36,596	32,576	24,135	9,056	30,872	29,865	15,785	145,576	1,794
P-hodnota	Segment		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	Skupina		NS	0,004	<0,001	0,004	0,007	<0,001	NS	0,017	<0,001	<0,001
	Segment x skupina		NS	0,001	<0,001	NS	0,001	<0,001	NS	0,021	<0,001	<0,001

Vyjádřeno jako mg uvolněného cukru/h[1], uvolněné glukózy/h[2], mg rozloženého azokaseinu/h[3], mmol butyrátu uvolněného z tributyrinu/h[4].

[a-d]Hodnoty na stejném řádku označené jinými písmeny se průkazně liší; SEM = střední chyba průměru; NS = neprůkazný.

Závěr

Přídavek lněného a konopného semínka nebo jejich kombinace v krmné směsi se zdá mít velmi příznivý vliv na zvýšení aktivity enzymů a stravitelnosti živin, doplnění látek prospěšných pro organismus, zvýšení růstových parametrů kuřat a snížení konverze krmiva. K hlavní enzymatické přeměně došlo v ileu, kde přidání konopného a lněného semínka do krmiva zvýšilo aktivitu enzymů nejvíce. Nejvyšší úroveň enzymatické aktivity byla zaznamenána u krmiva s kombinací lněného a konopného semínka 80 a 50 g/kg. Hlavní zvýšení aktivity enzymů (amyláza, celuláza, pektináza, xylanáza, maltáza, invertáza, proteinázy a lipáza) na úrovni ilea vykazovaly všechny skupiny s přídavkem konopného semene. Tyto výsledky ukázaly výhody využití diet obsahujících lněné a konopné semínko, a především kombinaci obou.

Poděkování

Tato práce vznikla za podpory Ministerstva zemědělství České republiky (projekt MZE-RO0723).

Seznam literatury

Andre, Ch.M., Hausman, J.-F., Guerriero, G., 2016. Cannabis sativa: The plant of the thousand and one molecules. Frontiers in Plant Science.

Antalis, T.M., Shea-Donohue, T., Vogel, S.N., Sears, C., Fasano, A., 2007. Mechanisms of disease: protease functions in intestinal mucosal pathobiology. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology 4, 393-402.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 2005. Official Methods of Analysis (18th ed.). AOAC, Gaithersburg, MD, USA.

Bedford, M.R..; Apajalahti, J., 2001. Microbial interactions in the response to exogenous enzyme utilization. In Enzymes in farm animal nutrition (ed. Bedford, M.R., Patridge, G.G.). Centre for Agriculture and Biosciences International, Wallingford, UK, 299-314.

Chishty, S., Bissu, M., 2016. Health benefits and nutritional value of flaxseed – a review. Indian Journal of Applied Research 6, 243-245.

Clavijo, V., Vives Flórez, M.J., 2018. The gastrointestinal microbiome and its association with the control of pathogens in broiler chicken production: A review. Poultry Science 97, 1006-1021.

Cowieson, A.J., Vieira, S.L., Stefanello, C., 2019. Exogenous microbial amylase in the diets of poultry: What do we know? Journal of Applied Poultry Research 28, 556-565.

European Food Safety Authority, (2011). Scientific opinion on the safety of hemp (Cannabis genus) for use as animal feed. EFSA Journal 9, 2011.

Filipovic, J., Ivkov, M., Košutič, M., Filipovic, V., 2016. Ratio of omega-6/omega-3 fatty acids of spelt and flaxseed pasta and consumer acceptability. Czech Journal of Food Sciences 34, 522-529.

Gracia, M.I., Arabinar, M.J., Lázaro, R., Medel, P., Mateos, G.G., 2003. A-Amylase supplementation of broiler diets based on corn. Poultry Science 82, 436-442.

Hu, Y.D., Lan, D., Zhu, Y., Pang, H.Z., Mu, X.P., Hu, X.F., 2018. Effect of diets with different energy and lipase levels on performance, digestibility and carcass trait in broilers. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 31, 1275-1284.

Jurgoński, A., Opyd, P.M., Fotschki, B, 2020. Effects of native or partially defatted hemp seeds on hindgut function, antioxidant status and lipid metabolism in diet-induced obese rats. Journal of Functional Foods 72, 104071.

Katare, Ch., Sonali, S., Agrawal, S., Prasad, G.B.K.S., Bisen, P.S., 2012. Flax seed: A potential medicinal food. International Journal of Food Sciences and Nutrition 2, 1–8.

Kopečný, J., Bartoš, S., 1990. Activity of hydrolases in the gastrointestinal tract of goats. Small Ruminant Research 3, 25-35.

Mabelebele, M., Alabi, O.J., Hg`ambi, J.W., Norris, D., Ginindza, M.M., 2014. Comparison of gastrointestinal tracts and pH values of digestive organs of Ross 308 broiler and Indigenous Venda chickens fed the same diet. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances 9, 71–76.

Marounek, M., Vovk, S.J., Skřivanová, V., 1995. Distribution of activity of hydrolytic enzymes in the digestive tract of rabbits. British Journal of Nutrition 73, 463-469.

Popescu, R.G., Voicu, S.N., Pircalabioru, G.G., Gharbia, S., Hermenean, A., Georgescu, S.E., Panaite, T.D., Turcu, R.P., Dinischiotu, A., 2021. Impact of dietary supplementation of flaxseed meal on intestinal morphology, specific enzymatic activity, and cecal microbiome in broiler chickens. Applied Sciences 11, 6714.

Høøk Presto, M., Lyberg, K., Lindberg, J.E., 2011. Digestibility of amino acids in organically cultivated white-flowering faba bean and cake from cold-pressed rapeseed, linseed and hemp seed in growing pigs. Archieves of Animal Nutrition 65, 21-33.

Rodriguez, M.L., Alzueta, C., Rebol, A., Ortiz, L.T., Centeno, C., Trevio, J. 2001. Effect of inclusion level of linseed on the nutrient utilisation of diets for growing broiler chickens British Poultry Science 42, 368-375.

Schultz, C.J., Lim, W.L., Khor, S.F., Neumann, K.A., Schulz, J.M., Ansari, O., Skewes, M.A., Burton, R.A., 2020. Consumer and health-related traits of seed from selected commercial and breeding lines of industrial hemp, Cannabis sativa L. Journal of Agriculture and Food Research 2, 100025.

Skřivan, M., Englmaierová, M., Taubner, T., Skřivanová, E., 2019. Hempseed increases gamma-tocopherol in egg yolks and the breaking strength of tibias in laying hens. PLoS One 14.

Skřivan, M., Englmaierová, M., Taubner, T., Skřivanová, E. 2020. Effects of dietary hemp seed and flaxseed on growth performance, meat fatty acid compositions, liver tocopherol concentration and bone strenght of cockerels. Animals 10, 458.

Smolová, J., Němečková, I., Klimešová, M., Švandrlík, Z., Bjelková, M., Filip, V., Kyselka, J., 2017. Flaxseed varieties: Composition and influence on the growth of probiotic microorganisms in milk. Czech Journal of Food Sciences 35, 18-23.

Tabata, E., Kashimura, A., Wakita, S., Ohno, M., Sakaguchi, M., Sugahara, Y., Kino, Y., Matoska, V., Bauer, P.O., Ovama, F., 2017. Gastric and intestinal proteases resistence of chicken acidic chitinase nominates chitin-containing organisms for alternative whole edible diets for poultry. Scientific Reports 7, 6662.

Taubner, T., Skřivan, M., Englmaierová, M., Malá, L. 2023. Effects of hemp seed and flaxseed on enzyme activity in the broiler chicken digestive tract. animal 17, 100765.

Zargi, H., 2018. Application of xylanase and β-glucanase to improve nutrient utilization in poultry fed cereal base diets: Used of enzymes in poultry diet. Insights in Enzyme Research 2, 2.

Analýza širokého spektra kanabinoidů a cholesterolu v různých vzorcích biologického původu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Ing. Tomáš Taubner, Ph.D.[1], Prof. Dr. Marian Czauderna[2], Ing. Michaela Englmaierová, Ph.D.[1]

[1]Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Praha Uhříněves, Česká republika

[2]The Kielanowski Institute of Animal Physiology and Nutrition, Jablonna, Polsko

Úvod

Konopí seté (*Cannabis sativa* L.) je rostlina s širokým spektrem využití, je zdrojem významných látek a je pěstováno zejména pro průmyslové nebo lékařské použití (Farinon et al., 2020). Od 1.1.2022 vstoupil v účinnost zákon č. 366/2021 Sb., který novelizuje především zákon č. 167/1998 Sb. Došlo zde k navýšení povolené výše obsahu THC (tetrahydrokanabinol) z 0,3 % na 1 %. Extrakt a tinktura konopí obsahující méně než 1 % THC se za návykovou látku nepovažují. Technické konopí je rostlinou s velkým potenciálem nabízející řešení různých environmentálních problémů od čištění půdy, vody a vzduchu přes potravinářské, chemické, farmaceutické a energetické využití. Průmyslové využití lze dále rozdělit v závislosti na zpracovávané části rostliny (Visković et al., 2023).

Na žádost Evropské komise vypracoval Evropský úřad pro bezpečnost potravin, jeho panel pro aditiva a produkty nebo látky používané do živočišných krmiv (EFSA–FEEDAP) vědecké stanovisko k bezpečnosti (nezávadnosti) konopí použitého jako živočišné krmivo. Z konopí lze získat čtyři zcela odlišné typy krmných materiálů. Konopná semena (26–37,5 % lipidů, 25 % hrubé bílkoviny, 28 % vlákniny), šrot/koláč z konopných semen (asi 11 % lipidů, 33 % hrubé bílkoviny, 43 % vlákniny), olej z konopných semen (asi 56 % linolové kyseliny, 22 % alfa-linolenové kyseliny), celou rostlinu konopí (včetně konopného pazdeří, čerstvá nebo sušená). Dalšími produkty jsou konopná mouka (mleté sušené listy konopí) a konopný bílkovinný izolát ze semen.

Panel FEEDAP bral do úvahy, že konopná semena a koláč z konopných semen by se daly využít jako krmné materiály pro všechny živočišné druhy. Maximální podíl konopných semen a koláče z konopných semen v kompletních krmivech by mohl činit 3 % u drůbeže pro výkrm, 5–7 % u nosnic, 2–5 % u prasat, 5 % u přežvýkavců pro koláč z konopných semen, 5 % u ryb pro konopná semena. Celá rostlina konopí (stonek a listy) by mohla být, vzhledem k vysokému obsahu vlákniny, vhodným krmivem pro přežvýkavce (a koně).

Do denní dávky dojnic by se pravděpodobně dalo začlenit 0,5–1,5 kg sušiny celého konopí. Všechny tyto pozitivní aspekty pro použití této rostliny však limituje přítomnost psychotropní látky Δ^9-THC (Δ^9-tetrahydrokanabinol), která se z této skupiny psychotropních látek obvykle vyskytuje v nejvyšší koncentraci. Konopná semena mají nízký obsah Δ^9-THC na rozdíl od ostatních částí rostliny. Uvedená látka se nachází hlavně ve vnějších vrstvách semen, což je způsobeno převážně fyzickou kontaminací listy rostliny.

Výsledky předchozích studií, které měla vědecká komise k dispozici, se týkaly zejména přítomností této látky v mléce dojnic. Studiemi na lidech se zjistilo, že nejnižší dávka Δ^9-THC, při které se projevují psychotropní účinky (LOEL), je 0,04 mg THC/kg tělesné hmotnosti. Aplikací faktoru nejistoty 100 se získá PMTDI (přechodný maximální tolerovatelný denní příjem) ve výši 0,0004 mg THC/kg tělesné hmotnosti. Ve všech případech při zkrmování rostliny konopí byla

expozice spotřebitelů látce Δ^9-THC značně nad hodnotou PMTDI pro dospělé i děti. Při stejném výpočtu expozice spotřebitelů látce Δ^9-THC z krmiv na bázi konopných semen byla expozice pod hodnotou PMTDI. Žádné údaje o transferu Δ^9-THC a jeho lipofilních metabolitů do tkání zvířat a vajec po opakovaném podávání nebyla publikována. Tuk lze považovat za cílovou tkáň po expozici Δ^9-THC.

Na základě dvou studií panel FEEDAP odsouhlasil, že u dojnic při orálním příjmu Δ^9-THC přejde 0,15 % této látky do mléka. Na základě získaných výsledků panel FEEDAP doporučil zařadit krmiva získaná z celé rostliny konopí na seznam materiálů, jejichž umístění na trh nebo použití pro výživu zvířat je omezeno nebo zakázáno a v krmivech na bázi konopných semen zavést maximální obsah THC ve výši 10 mg/kg (EFSA, 2011). Závěry vědeckého stanoviska o rizicích pro lidské zdraví souvisejících s přítomností THC v mléce a jiných potravinách živočišného původu přijala v roce 2015 komise pro kontaminující látky v potravinovém řetězci v rámci Evropského úřadu pro bezpečnost potravin. THC, konkrétněji Δ^9-THC, je významnou složkou rostliny konopí *Cannabis sativa*. Úřad stanovil akutní referenční dávku na 1 µg Δ^9-THC/kg tělesné hmotnosti (EFSA, 2015).

Evropská komise vydala dne 11.8.2022 nařízení č. 2022/1393, kterým se mění nařízení č. 1881/2006 a definuje maximálních limity Δ^9-THC v konopných semenech a produktech z nich získaných v zájmu zajištění vysoké úrovně ochrany lidského zdraví. Maximální limity vztahující se na sumu Δ^9-THC a kyseliny Δ^9-tetrahydrokanabinolové (Δ^9-THCA), vyjádřeno jako Δ^9-THC, kdy se použije přepočítávací faktor 0,877 a maximální limit je pak na sumu Δ^9-THC + 0,877 x Δ^9-THCA (pokud se provádí samostatné stanovení a kvantifikace Δ^9-THC a Δ^9-THCA) jsou pro konopná semena 3,0 mg/kg, mletá konopná semena, (částečně) odtučněná konopná semena a jiné získané/zpracované výrobky z konopných semen 3,0 mg/ kg a olej z konopných semen 7,5 mg/kg.

Aby bylo možné získat více údajů o přítomnosti Δ^9-THC a dalších relevantních nepsychoaktivních prekurzorů v potravinách získaných z konopí a potravinách obsahujících konopí nebo složky získané z konopí, bylo přijato doporučení komise (EU) č. 2016/2115. Členské státy by měly za aktivního zapojení provozovatelů potravinářských podniků a dalších zúčastněných stran provádět monitorování přítomnosti Δ^9-THC v potravinách živočišného původu, jeho nepsychoaktivního prekurzoru Δ^9-THCA a další kanabinoidy (jako je Δ^8-tetrahydrokanabinol (Δ^8-THC), kanabinol (CBN), kanabidiol (CBD) a Δ^9-tetrahydrokanabivarin (Δ^9-THCV) v potravinách získaných z konopí a potravinách obsahujících konopí nebo složky získané z konopí.

Pro sledování potravin živočišného původu by měl být k dispozici důkaz, že potraviny živočišného původu jsou produkovány zvířaty krmenými krmivem obsahujícím konopí nebo krmné suroviny z konopí. Metodou analýzy, která se má použít pro monitorování, je zejména chromatografická separace spojená s např. hmotnostní spektrometrií (LC-MS nebo GC-MS) po vhodném kroku čištění (extrakce kapalina-kapalina) nebo extrakce na pevné fázi (SPE). Přednost by měla být dána chromatografickým technikám, které umožňují samostatné stanovení Δ^9-THC, jeho prekurzorů a dalších kanabinoidů v potravinářských produktech obsahujících konopí.

Ve výživě drůbeže je použití konopí odůvodněno příznivým složením mastných kyselin, zejména přítomností kyseliny linolenové (Jurgoński et al., 2020). Konopná semínka přidávaná do krmných směsí mají pozitivní vliv na řadu faktorů ovlivňující ekonomiku chovu, pevnost, kostí, ovlivnění enzymové aktivity atd. (Skřivan et al., 2020; Taubner et al. 2023). Jelikož vědeckých publikací a dat je v této problematice velice málo a na základě doporučení evropské komise o získávání dalších poznatků pro výskyt kanabinoidů v živočišných produktech bylo cílem vyvinout chromatografickou metodu pro stanovení kanabinoidů v různých vzorcích biologického původu a to jak výchozích komponent pro krmnou směs zahrnující části rostliny konopí (semena, listy, různé mixy konopné biomasy), tak i analýzu krmných směsí, živočišných produktů zejména maso a žloutek a v neposlední řadě i analýza trusu pro sledování retence látek v organismu. Kanabinoidy

jsou lipofilní látky vyskytující se ve velké míře v konopí a jejich přechod na vaječný žloutek a tukovou tkáň je reálný. Dostupná literatura se zabývá analýzou kanabinoidů (Križman, 2020), ale neposkytuje spolehlivou metodu pro stanovení kanabinoidů v krmivech a živočišných produktech a je nutné využít dosavadních zkušeností, zejména se stanovením sterolů, lipofilních vitamínů a mastných kyselin pro vývoj této metody. Vedlejší kapitolou při stanovení kanabinoidů je možnost simultánní analýzy cholesterolu a sledování, jak daná krmná směs s různým obsahem dané komponenty ovlivní hladinu cholesterolu v živočišných produktech a v trusu hospodářských zvířat.

Materiál a metody

Biologický materiál

Pro analýzu bylo použito 8 vzorků: (1) konopná semínka *Cannabis sativa* L. odrůdy Futura (Agritec Plant Research s.r.o., Šumperk), (2) konopná biomasa jako odpadní produkt po čištění konopného semínka obsahující semena a části rostlin směs odrůd Biolobrzeski, Santhica a Futura v poměru 10:10:40 (Biohemp s.r.o., Praha), (3) konopná biomasa odrůdy Futura rané sklizně a pozdní sklizně po čištění konopného semínka obsahující semena a části rostlin (Biohemp s.r.o., Praha), (4) krmná směs pro brojlerová kuřata s obsahem 9 % konopné biomasy odpovídající vzorku 2, (5) krmná směs pro nosnice s obsahem 9 % konopné biomasy odpovídající vzorku 3, (6) maso brojlerových kuřat krmených krmnou směsí odpovídající složení krmné směsi vzorku 4, (7) vaječný žloutek nosnic krmených krmnou směsí odpovídající složení krmné směsi vzorku 5 a (8) trus brojlerových kuřat krmených krmnou směsí odpovídající složení vzorku 5.

Chemikálie

Standardy 17 kanabinoidů: kanabidivarin (CBDV), kanabigerol (CBG), kanabidiol (CBD), tetrahydrokanabidivarin (THCV), kanabinol (CBN), Δ^8-tetrahydrokanabinol (Δ^8-THC), Δ^9-tetrahydrokanabinol (Δ^9-THC), kanabicyklol (CBL), kanabichromen (CBC), kanabidivarinová kyselina (CBDVA), kanabidiolová kyselina (CBDA), kanabigerolová kyselina (CBGA), tetrahydrokanabidivarinová kyselina (THCVA), kanabinolová kyselina (CBNA), tetrahydrokanabinolová kyselina (THCA), kanabichromenová kyselina (CBCA), kanabicyklolová kyselina (CBLA) (Ceriliant, USA), cholesterol, 3,5-dimethylfenol byly zakoupeny v Merck Life Sciences a.s. (Česká republika). Organická rozpouštědla jako acetonitril a methanol s HPLC čistotou byly zakoupeny v Chromservis s.r.o. (Česká republika). Běžná rozpouštědla pro extrakci jako methanol, hexan a ethanol, spolu s kyselinou mravenčí byly zakoupeny v P-Lab a.s. (Česká republika).

Příprava vzorků

Před samotným navažováním vzorků byla konopná semínka nejprve vymražena při teplotě -75 °C a rozetřena v třecí misce. Konopná biomasa a krmná směs byla také rozetřena na třecí misce. Maso brojlerových kuřat bylo mixováno 30 s pomocí ručního mixéru. Trus byl před analýzou lyofilizován. Extrakce vzorků byla rozdělena na 4 kroky, kdy v prvních dvou krocích byly vzorky extrahovány methanolem a pro zbylé dva kroky byl použit jako extrakční činidlo hexan. U vaječných žloutků byl použit pro všechny 4 kroky extrakce pouze hexan. K extrakci byla využita třepačka a ultrazvuková vodní lázeň, přičemž extrakce probíhala pokaždé 45 min. Jako vnitřní standard byl použit 3,5-dimethylfenol. Po shromáždění všech částí z různých kroků extrakce bylo veškeré rozpouštědlo odpařeno na odparce nebo pomocí dusíku. Vzorek byl pak rekonstituován v methanolu a nastříknut pomocí autosampleru na kolonu.

Analýza

Metoda pro stanovení koncentrace kanabinoidů v semenech konopí, konopné biomasy, krmných směsích, vaječných žloutcích, mase a exkrementech byla vyvinuta pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s reverzní fází (RP) s detekcí fotodiodového pole (DAD). Chromatografická separace 17 kanabinoidů a celkového volného cholesterolu v těchto vzorcích

byla provedena pomocí kolony Shim-Pak (Shimadzu velikost částic 2,2 µm, délka 75 mm, vnitřní průměr 3 mm) a dvou kolon Phenomenex C18 (Synergi velikost částic 2,5 µm, Hydro-RP, 100Å, délka 100 mm) s vnitřním průměrem 3 mm. Systém HPLC (SHIMADZU, Japonsko) zahrnoval LC-kapalinový chromatograf, automatický dávkovač vzorků, modul komunikační sběrnice CBM-20A (UFLC), kolonovou pec CTO-20A, odplyňovač a SPD detektor fotodiodového pole (DAD). Termostat automatického dávkovače vzorků byl nastaven na 5 ºC. DAD byl provozován v rozsahu 190–800 nm. Předkolona Phenomenex C18 (5 mm x 2 mm) byla umístěna před tři analytické kolony pro jejich ochranu. Vyhřívání kolony bylo nastaveno na teplotu 40 °C. Všechny biologické vzorky byly analyzovány za použití lineárního gradientu acetonitrilu s 0,1 % kyseliny mravenčí (v/v; rozpouštědlo A), rozpouštědlo B byla voda s 0,1 % kyseliny mravenčí (v/v) a rozpouštědlo C byl čistý methanol; maximální tlak v systému se pohyboval kolem hodnoty 24,5 MPa.

Výsledky a diskuze

První část práce zahrnovala vývoj analytické metody pro stanovení kanabinoidů. Na základě znalostí a předchozích prací (Križman 2020, Zivanovic et al., 2018) byly nastaveny parametry pro chromatografickou separaci, nicméně publikace zahrnovaly pouze využití izokratické eluce a musel být nastaven gradient, který dokázal separovat všech 17 použitých kanabinoidů a zvolený vnitřní standard. Jednalo se o látky v neutrální aktivní formě a jejich prekurzory ve formě kyselin. Jako vnitřní standard byl nejprve zvolen 2,6-di-*tert*-butyl-*p*-kresol (butylhydroxytoluen, BHT), jelikož se ale nepovedlo pomocí nastavení gradientu rozdělit tuto látku od jednoho z kanabinoidů byl zvolen 3,5-dimethylfenol. Pomocí standardů byly zaznamenány retenční časy jednotlivých látek a sestaveny kalibrační křivky, kdy koeficienty regrese se pohybovaly těsně pod hodnotou 1 (Tabulka 1). Na základě analýzy absorpčního spektra jednotlivých látek bylo pozorováno, že většina kanabinoidů kromě svého hlavního absorpčního maxima má ještě vedlejší nižší absorpční maximum, obvykle při vyšší vlnové délce, ale stále v UV oblasti spektra. Jelikož analyzované vzorky jsou komplexní matrice různých látek je toto velkou výhodou, jelikož mnohdy není možné při jediné vlnové délce vyhodnotit danou analyzovanou látku. V rámci validace této metody byl u všech analyzovaných látek kromě kalibračních křivek stanoven limit detekce, limit kvantifikace, preciznost nástřiku, stabilita látek při 48 °C po dobu 24 h. Naměřená data, vztahující se k použité analytické metodě, jsou uvedena v Tabulce 1.

Tabulka 1. Seznam analyzovaných kanabinoidů a cholesterolu, retenční časy, vlnové délky pro vyhodnocení, koeficienty regrese

Látka	Zkratka	Retenční čas (min)	DAD 1 a DAD 2 (nm)	Koeficient regrese pro DAD 1 a DAD 2
3,5-dimethylfenol (vnitřní standard)	IS	9,096	206	
Kanabidivarinová kyselina	CBDVA	22,821	221, 268	0,99997, 099997
Kanabidivarin	CBDV	23,611	205, 273	0,99998, 0,99994
Kanabidiolová kyselina	CBDA	27,115	221, 268	0,99995, 099999
Kanabigerolová kyselina	CBGA	28,153	220, 268	0,99996, 0,99998
Kanabigerol	CBG	28,485	205, 273	0,99998, 099997
Kanabidiol	CBD	29,174	205, 274	0,99996, 0,99990
Tetrahydrokanabidivarin	THCV	29,399	205, 278	0,99995, 099997
Tetrahydrokanabidivarinová kyselina	THCVA	33,761	220, 269	0,99998, 0,99997
Kanabinol	CBN	34,608	215, 284	0,99994, 0,99993
Δ^9-Tetrahydrokanabinol	Δ^9-THC	38,994	209	0,99989

Δ^8-Tetrahydrokanabinol	Δ^8-THC	39,821	207	0,99993
Kanabinolová kyselina	CBNA	40,288	262	0,99998
Kanabicyklol	CBL	42,031	210	0,99993
Kanabichromen	CBC	43,031	230, 279	0,99988, 0,99994
Tetrahydrokanabinolová kyselina	THCA	43,904	220, 271	0,99999, 0,99999
Kanabichromenová kyselina	CBCA	46,372	254, 199	0,99973, 0,99959
Kanabicyklolová kyselina	CBLA	46,562	227, 273	0,99989, 0,99968
Cholesterol	Chol	67,254	205	0,98920

Druhá část práce zahrnovala samotnou analýzu biologických vzorků. Seznam použitých analyzovaných vzorků je uveden v kapitole materiál a metody. Při samotné analýze biologických vzorků byl gradient metody upraven a doplněn o promytí a regeneraci kolony čistým methanolem, jelikož velký problém při analýze biologických vzorků je přítomnost ostatních látek v matrici vzorku a zejména cholesterolu u živočišných produktů. Dochází pak ke zvyšování tlaku systému a postupnému zanesení kolony. Tento samotný fakt byl pak paradoxně výhodou pro nastavení takového gradientu a kombinace rozpouštědel, že bylo možné metodu doplnit o současnou analýzu volného cholesterolu. Byla tedy provedena kalibrace pomocí standardu cholesterolu (Tabulka 1), která následně umožnila i odečtení obsahu volného cholesterolu ve vzorku. Naměřená data cholesterolu jsou uvedena v Tabulce č. 1. Práce Paulazo a Sodero et al. (2020) zabývající se stanovení cholesterolu v tkáni hlodavců pak umožnila vyhodnocení a přesné odečtení píku cholesterolu. Pro extrakci jednotlivých biologických vzorků z rostlinných materiálů je v literatuře doporučováno použít methanol nebo ethanol ve 3 krocích (Križman 2020). U připravené metody byla zvolena kombinace rozpouštědel, a to methanolu a hexanu. U všech vzorků a pro jednotlivé látky byla stanovena účinnost extrakce, která se u takto zvoleného způsobu obvykle pohybovala nad hranicí 90 %. Samotné výsledky analýz kanabinoidů a volného cholesterolu jednotlivých vzorků jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2. Koncentrace kanabinoidů a volného cholesterolu v jednotlivých vzorcích biologického původu

Označení vzorku	1	2	3	4	5	6	7	8
Původ vzorku	Konopné semínko	Konopná biomasa	Konopná biomasa	Krmná směs	Krmná směs	Kuřecí maso	Vaječný žloutek	Kuřecí trus
Koncentrace µg/g (mg/kg)								
CBDVA	1,03	173,68	141,45	41,11	21,73	0,03	0,36	12,51
CBDV	1,24	177,77	54,20	24,89	3,00	0,35		21,15
CBDA	64,13	4842,90	4569,61	1134,82	575,86	0,53	0,11	45,81
CBGA	3,52	822,93	157,48	358,79	38,41	0,01	0,09	17,28
CBG	0,51	1053,04	45,69	41,85	11,77	0,07	0,02	7,61
CBD	12,61	5323,62	2436,92	208,82	273,82	0,31	0,42	15,51
THCV								
THCVA								
CBN		56,29	36,40	1,16				0,30
Δ^9-THC	0,55	638,56	20,91	39,96	0,96			2,01
Δ^8-THC								
CBNA	0,12	12,64	20,50	3,45	0,17		0,02	1,63
CBL		53,38	22,86	1,79	0,17			
CBC	1,07	730,39	196,72	41,27	2,18	0,05	0,16	2,14

THCA	0,77	94,54	68,48	65,27	0,85	0,03	0,10	1,77
CBCA	2,78	409,61	233,44	92,02	2,57	0,04		8,04
CBLA	1,00	123,04	8,19	38,52	0,29			
Celkový obsah kanabinoidů (µg/g, mg/kg)	89,34	14512,39	8013,04	2093,73	931,76	1,43	1,27	135,74
Celkový obsah kanabinoidů %	0,009	1,451	0,801	0,209	0,093	0,000	0,000	0,014
Volný cholesterol (µg/g, mg/kg)						?	10506,80	689,63

Z výsledků vyplývá, že koncentrace všech analyzovaných kanabinoidů v konopném semínku je velice nízká 89,34 mg/kg. Literatura uvádí, že obsah kanabinoidů se u jednotlivých odrůd konopí liší (Jung et al., 2022). Obvykle koncentrace kanabinoidů v semínku koreluje s koncentrací kanabinoidů v celé rostlině. Analýza potvrzuje, že obsah Δ^9-THC u konopného semínka Futura (0,55 mg/kg) nepřekračuje limit daný EU s hodnotou 3 mg/kg.

Odlišná situace je pak u analyzované konopné biomasy, která byla poskytnuta jako odpadní produkt po čištění konopného semínka obsahující jak konopné semínko s různými defekty, tak i obalové vrstvy a části rostliny. Zde je patrný velký nárůst celkového obsahu kanabinoidů, více jak stonásobně. S nárůstem kanabinoidů jako je CBD, CBDA či CBG obvykle přímo úměrně roste i obsah Δ^9-THC. Analýza krmných směsí pak z kalkulace obsahu kanabinoidů odrážela přídavek 9 % konopné biomasy, i když v některých případech se mírně lišila. V tomto místě stojí za zmínku, že u hospodářských zvířat se vždy jedná pouze o komponentu v krmné směsi s nízkým obsahem a nastavených 9 % je již limitní obsah této komodity v krmné směsi, panel FEDAP doporučoval původně nižší hodnoty pro přídavek rostliny konopí do krmné směsi.

U krmné směsi pro nosnice (vzorek 5) byl obsah Δ^9-THC 0,96 mg/kg. Nižším přídavkem konopné biomasy do krmné směsi a využitím odrůdy s nízkým obsahem Δ^9-THC je pak možné tyto hodnoty ještě snížit. Zajímavé výsledky poskytly analýzy živočišných produktů, a to masa brojlerových kuřat nebo vaječných žloutků nosnic. Jak je patrné z Tabulky 2, konopná biomasa pro pro pokusy s kuřaty a nosnicemi měla odlišné složení a různý obsah kanabinoidů. Analýza masa brojlerových kuřat prokázala velice nízké hodnoty kanabinoidů, obvykle látek, které se v krmné směsi vyskytovaly v té nejvyšší koncentraci (CBD a CBDA). Přítomnost Δ^9-THC detekována nebyla. Analýza vaječného žloutku pak prokázala přítomnost kanabinoidů a to CBD, CBG a CBDA, ale opět ve velmi nízkých koncentracích. Přítomnost látky Δ^9-THC opět detekována nebyla. Analýza trusu z pokusu s brojlerovými kuřaty ukázala, že určité množství kanabinoidů se v nezměněné formě z organismu vyloučí (135,74 mg/kg).

Analýza celkového cholesterolu zahrnuje v prvním kroku rozklad za vysoké teploty působením např. hydroxidu (Rotenberg a Christensen, 1976). U navržené metody dochází pouze k extrakci látek za pomoci různých rozpouštědel. Dochází tedy k extrakci pouze volného cholesterolu. Vázaný cholesterol tedy do rozpouštědla nepřechází. Z literatury vyplývá, že obsah volného cholesterolu v porovnání k celkovému cholesterolu je u vaječného žloutku 96,7 % (Rotenberg a Christensen, 1976) a u masa obvykle ještě nižší (Tu et al., 2006). Hodnota volného cholesterolu ve vzorku vaječného žloutku dosahovala 10,5 g/kg, což po přepočtu na celkový cholesterol odpovídá hodnotě 10,9 g/kg. Ve vzorku masa zatím hodnota uváděna není, jelikož metoda poskytovala v porovnání s literaturou velmi vysoké hodnoty volného cholesterolu v mase.

Celkový obsah cholesterolu v mase se obvykle pohybuje kolem hodnoty 0,7 g/kg. Pro tuto matrici je zřejmě ještě nutné upravit finální gradient metody, jelikož je možné, že nízký pík cholesterolu překrývá pík jiné látky, což u vaječného žloutku není díky vysokým koncentracím cholesterolu ve vaječném žloutku. Hodnota volného cholesterolu v trusu kuřat dosahovala hodnoty 0,69 g/kg, což odpovídá literatuře (Marounek et al., 2021). V této matrici potíže s odečtením koncentrace volného cholesterolu nenastaly. Díky analýze kanabinoidů a volného cholesterolu je pak možné sledovat vliv komponent v krmné směsi s kanabinoidy na hladinu cholesterolu v živočišných produktech nebo v trusu.

Závěr

Byla zavedena metoda pro stanovení kanabinoidů v různých vzorcích biologického původu. Metoda zahrnovala 17 kanabinoidů. Součástí metody bylo možné odečíst obsah volného cholesterolu v různých vzorcích živočišného původu. Tato metoda bude v budoucnu ještě upravena pro použití u různých typů vzorků živočišného původu. V práci bylo analyzováno konopné semínko, kde hodnoty koncentrace kanabinoidů dosahují velmi nízkých hodnot. Dále byly analyzovány dvě rozdílné směsi konopné biomasy, kde je patrný výrazný nárůst obsahových hodnot kanabinoidů. Ve sbírce zákonů, nařízení a směrnic nebyl dohledán zákon omezující použití této komponenty, veškeré směrnice se zabývají použitím konopného semínka a limitních koncentrací Δ^9-THC. Analýza krmných směsí s přídavkem 9 % konopné biomasy odrážela snížení koncentrace kanabinoidů na tuto hodnotu. Důležitou částí této práce byla detekce kanabinoidů v mase brojlerových kuřat a ve vaječném žloutku, kdy sice došlo k naměření stopových koncentrací těchto látek a prokázání jejich přítomnosti. Psychotropní látka Δ^9-THC však detekována nebyla. Z výsledků je patrné, že určitý podíl kanabinoidů se z organismu vyloučí a k ukládání nedochází, velmi nízký podíl se ukládá v tukové tkáni nebo vaječném žloutku a zbytek se pak v organismu dále přemění různými biologickými procesy.

Poděkování

Tato práce vznikla za podpory projektu MZE-RO0723.

Literatura

EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), 2011. Scientific Opinion on the safety of hemp (Cannabis genus) for use as animal feed. EFSA Journal 9, 41.

EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain), 2015. Scientific Opinion on the risks for human health related to the presence of tetrahydrocannabinol (THC) in milk and other food of animal origin. EFSA Journal 13, 4141.

Farinon, B., Molinari, R., Constantini, L., Merendino, N., 2020. The seed of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.): Nutritional quality and potential functionality for human health and nutrition. Nutrients 12, 1935.

Jung, Y., An, S., Moon, J., Han, M., Lee, S., Chung, H., 2022. Contents of cannabinoids in commercial hemp seed oil capsules in Korea. Toxicology Analytique et Clinique 34, 124.

Jurgoński, A., Opyd, P.M., Fotschki, B, 2020. Effects of native or partially defatted hemp seeds on hindgut function, antioxidant status and lipid metabolism in diet-induced obese rats. Journal of Functional Foods 72, 104071.

Križman, M., 2020. A simplified approach for isocratic HPLC analysis of cannabinoids by fine tuning chromatographic selectivity. European Food Research and Technology 246, 315-322.

Marounek, M., Volek, Z., Taubner, T., Czauderna, M., 2021. Metabolic effects of a hydrophobic alginate derivative and tetrahydrolipstatin in rats fed a diet supplemented with palm fat and cholesterol. Folia Biologica 67, 143-149.

Paulazo, M.A., Sodero, A.O., 2020. Analysis of cholesterol in mouse brain by HPLC with UV detection. PLoS One 15, e0228170.

Rotenberg, S., Christensen, K., 1975. Spectrophotometric determination of total and free cholesterol in egg yolk and animal tissues. Acta Agriculturae Scandinavica 26, 94-98.

Skřivan, M., Englmaierová, M., Taubner, T., Skřivanová, E. 2020. Effects of dietary hemp seed and flaxseed on growth performance, meat fatty acid compositions, liver tocopherol concentration and bone strenght of cockerels. Animals 10, 458.

Tu, C., Powrie, W.D., Fennema, O., 2006. Free and esterified cholesterol content of animal muscles and meat products. Journal of Food Science 32, 30-34.

Visković, J., Zheljazkov, V.D., Sikora, V., Noller, J., Latković, D., Ocamb, C.M., Koren, A., 2023. Hemp (Cannabis sativa L.) Agronomy and Utilization: A Review. Agronomy 13, 931.

Zivanovic, S., Alder, R., Allenspach, M.D., Steuer, Ch., 2018. Determination of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. samples for recreational, medical, and forensic purposes by reversed-phase liquid chromatography-ultraviolet detection. Journal of Analytical Science and Technology 9, 27.

POZNÁMKY

POZNÁMKY

Název: AKTUÁLNÍ POZNATKY VE VÝŽIVĚ A ZDRAVÍ ZVÍŘAT
A BEZPEČNOSTI PRODUKTŮ 2023

Vydal: **Výzkumný ústav živočišné výroby, v. v. i.**
Přátelství 815, 104 00 Praha Uhříněves

ISBN 978-80-7403-305-6

Vydáno bez jazykové úpravy.

© Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Praha Uhříněves

Výzkumný ústav živočišné výroby, v. v. i.
Přátelství 815, 104 00 Praha Uhříněves

www.vuzv.cz