



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Rok CERAR

**VPLIV KALJENJA SEMEN INDUSTRIJSKE
KONOPLJE (*CANNABIS SATIVA* L.) NA VSEBNOST
SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij – 1. stopnja Živilstvo in prehrana

Ljubljana, 2019

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Rok CERAR

VPLIV KALJENJA SEMEN INDUSTRIJSKE KONOPLJE (*CANNABIS SATIVA* L.) NA VSEBNOST SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij - 1. stopnja Živilstvo in prehrana

THE IMPACT OF GERMINATION ON THE CONTENT OF TOTAL PHENOLIC COMPOUNDS OF INDUSTRIAL HEMP SEEDS (*CANNABIS SATIVA* L.)

B. SC. THESIS
Academic Study Programmes: Field Food Science and Nutrition

Ljubljana, 2019

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študijskega programa 1. stopnje Živilstvo in prehrana. Delo je bilo opravljeno na Katedri za tehnologije, prehrano in vino na Biotehniški fakulteti v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Petro Terpinc in za recenzentko izr. prof. dr. Leo Pogačnik.

Mentorica: doc. dr. Petra TERPINC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Recenzentka: izr. prof. dr. Lea POGAČNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Mentorica:

Recenzentka:

Datum zagovora:

Rok Cerar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du1
DK UDK 632.522:577.1:547.56(043)=163.6
KG industrijska konoplja, *Cannabis sativa* L., fenolne spojine, kaljenje konoplje, Folin-Ciocalteu
AV CERAR, Rok
SA TERPINC, Petra (mentorica), POGAČNIK, Lea (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2019
IN VPLIV KALJENJA SEMEN INDUSTRIJSKE KONOPLJE (*CANNABIS SATIVA* L.) NA VSEBNOST SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja Živilstvo in prehrana)
OP VIII, 26 str., 5 pregl., 5 sl., 75 vir.
IJ sl
JI sl
AI V okviru diplomskega dela smo želeli ugotoviti, kako različen čas kaljenja semen industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.) vpliva na vsebnost skupnih fenolnih spojin. Odstotek suhe snovi smo v izhodnem materialu za pripravo ekstraktov določili s sušenjem homogeniziranih delno posušenih in razmaščenih semen do konstantne mase. Fenolne spojine smo iz nekaljenih semen in tistih, kaljenih 24, 48, 72 in 96 ur, pridobili s pomočjo metanola (99,8 %). Za ovrednotenje vsebnosti skupnih fenolnih spojin v vzorcih smo uporabili Folin-Ciocaltevo metodo, rezultate pa podali kot ekvivalent klorogenske kisline (KK) v suhi snovi (SS). Raziskava je pokazala zanemarljive razlike v vsebnosti SS med delno posušeni razmaščenimi semeni, ki so kalili različno dolgo. Ponovljivost ekstrakcije je bila 99,9 %. Vsebnost fenolnih spojin se v semenih konoplje prvih 48 ur kaljenja ni spreminjala, ob naslednjem vzorčenju (72 ur) pa smo zabeležili močan prirast. V naslednjih 24 urah je bil vpliv časa kaljenja še vedno pozitiven, vendar manjši. Po 96 urah kaljenja smo tako določili najvišjo vrednost (4,53 mg KK/g SS), kar je pomenilo 1,7-krat večjo vsebnost skupnih fenolnih spojin kot v nekaljenih semenih. Uživanje kaljenih semen industrijske konoplje predstavlja nove možnosti pri razvoju funkcionalnih živil.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du1
DC UDC 632.522:577.1:547.56(043)=163.6
CX hemp, *Cannabis sativa* L., phenolic acids, germinated hemp, Folin-Ciocalteu
AU CERAR, Rok
AA TERPINC, Petra (supervisor), POGAČNIK, Lea (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2019
TI THE IMPACT OF GERMINATION ON THE CONTENT OF TOTAL PHENOLIC COMPOUNDS OF INDUSTRIAL HEMP SEEDS (*CANNABIS SATIVA* L.)
DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes: Field Food Science and Nutrition)
NO VIII, 26 p., 5 tab., 5 fig., 75 ref.
LA sl
AL sl/en
AB In the course of the diploma thesis, we wanted to investigate how different time of germination of industrial cannabis seeds (*Cannabis sativa* L.) affects the content of total phenolic compounds. The percentage of the dry matter in the starting material for the preparation of extracts was determined by drying homogenized partially dried and defatted seeds to a constant weight. Phenolic compounds were extracted with methanol (99.8 %) from non-germinated seeds and from those, germinated for 24, 48, 72 and 96 hours. Folin-Ciocalteu's method was used to evaluate the total phenolic content in the samples, and results were given as the equivalent of chlorogenic acid (KK) in the dry matter (SS). The study showed negligible differences in the content of SS between the partially dried defatted seeds, which germinated for different periods of time. Repeatability of the extraction of the experiment was 99.9 %. Content of phenolic compounds in cannabis seeds did not change during the first 48 hours of germination, however on the next sampling (72 hours) there was a strong increase. In the next 24 hours, the effect of germination time was still positive, but lower. After 96 hours of germination the highest value was determined (4.53 mg KK/g SS), which meant 1.7-fold higher content of phenolic compounds compared to non-germinated seeds. The consumption of germinated seeds of industrial cannabis offers new opportunities for the development of functional foods.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VI
KAZALO SLIK	VII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VIII
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 INDUSTRIJSKA KONOPLJA	3
2.2 HRANILNA VREDNOST KONOPLJENIH SEMEN	4
2.3 KALJENJE	6
2.4 FENOLNE SPOJINE.....	7
2.5 FENOLNE SPOJINE V SEMENIH INDUSTRIJSKE KONOPLJE	7
2.5.1 Fenolne kisline.....	7
2.5.2 Flavonoidi	8
2.5.3 Lignani in lignanamidi	9
2.6 DOLOČANJE VSEBNOST SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN S FOLIN- CIOCALTEUJEVO METODO	10
3 MATERIALI IN METODE.....	11
3.1 MATERIALI	11
3.1.1 Laboratorijska oprema	11
3.1.2 Reagenti	11
3.2 METODE.....	12
3.2.1 Določanje suhe snovi v semenih.....	12
3.2.2 Priprava vzorcev	12
3.2.3 Folin-Ciocalteu-jeva metoda.....	13
3.2.3.1 Priprava umeritvene krivulje	13
3.2.3.2 Izračun vsebnosti skupnih fenolnih spojin	14
3.2.4 Statistična analiza	14
4 REZULTATI Z RAZPRAVO	15
4.1 ANALIZA VSEBNOSTI SUHE SNOVI.....	15
4.2 ANALIZA SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN	16
5 SKLEPI.....	18
6 POVZETEK	19
7 VIRI	20

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Hranilna in energijska vrednost konopljenih semen (Callaway, 2004)	4
Preglednica 2: Flavonoidi, izolirani iz semen konoplje (Brenneisen, 2007)	9
Preglednica 3: Kanabisina, izolirana iz konopljinih semen (Pollastro in sod., 2018)	10
Preglednica 4: Uporaba različnih prostornin klorogenske kisline (KK), metanola, bidestilirane vode, Folin-Ciocalteujevega (FC) reagenta in natrijevega karbonata (Na_2CO_3) za pripravo umeritvene krivulje	13
Preglednica 5: Sprememba vsebnosti fenolnih spojin in ponovljivost ekstrakcije	16

KAZALO SLIK

Slika 1: Najbolj zastopana fenolna kislina v semenih industrijske konoplje: <i>p</i> -hidroksibenzojska kislina (Liang in sod., 2018)	8
Slika 2: Zmleta razmaščena semena konoplje pripravljena na nadaljnjo analizo	12
Slika 3: Odvisnost absorbance od masne koncentracije klorogenske kisline (γ KK)	13
Slika 4: Vsebnost suhe snovi med kalitvijo konopljinih semen	15
Slika 5: Vpliv kaljenja na vsebnost fenolnih spojin v razmaščenih semenih industrijske konoplje	16

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CBD	kanabinol
DHA	dokozaheksaenojska kislina
EPA	eikozapentaenojska kislina
FC	Folin-Ciocalteu
GK	galna kislina
KK	klorogenska kislina
LDL	lipoproteini z nizko gostoto
MV	masa vzorca
PV	prehranska vlaknina
SS	suha snov
THC	tetrahidrokanabinol
ω -3	omega-3 maščobna kislina
ω -6	omega-6 maščobna kislina

1 UVOD

V diplomski nalogi smo se ukvarjali s študijo fenolnih spojin v kaljenih in nekaljenih semenih industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.).

Industrijska konoplja je poljščina s tisočletno tradicijo, prvi dokazi o njeni kultivaciji segajo 8500 let pred našim štetjem na področje današnje Kitajske. Odnos ljudi do industrijske konoplje se je s stoletji močno spreminjal. Vrsto let se je rastlina uporabljala zaradi užitnih semen ter zaradi močnih vlaken, iz katerih je bilo možno ustvarjati trpežne vrvi, oblačila, ribiške mreže itd. Proti koncu 20. stoletja je prišlo do velikega preobrata, saj so rastlino prepovedali gojiti predvsem na račun njenih psihedeličnih učinkov njej sorodne indijske konoplje (*Cannabis sativa indica*). Potrebno je bilo več kot pol stoletja, da je bila njena uporaba spet dovoljenja (Small, 2015).

Z nedavno spremenjeno zakonodajo se je v Sloveniji odprl širok trg pridelave in predelave industrijske konoplje. Na trgu se pojavljajo razni novi izdelki iz industrijske konoplje, kot so konopljina semena, konopljin čaj, smola cvetov konoplje in konopljini proteini kot vrsta prehranskega dopolnila. Najbolj razširjeno je konopljino olje, ki se ga zaradi ugodnega razmerja med omega-3 (ω -3) in omega-6 (ω -6) maščobnimi kislinami priporoča za vsakodnevno uživanje (Callaway, 2004).

Semena poleg za zdravje ugodnega razmerja maščobnih kislin in visoke vsebnosti beljakovin vsebujejo tudi fenolne spojine. V živilu imajo ti vlogo antioksidantov, se pravi spojin, ki odstranjujejo proste radikale. Prosti radikali nastajajo neprestano v našem telesu. Problem nastane, ko je teh spojin v našem telesu preveč. Zato je priporočljivo, da v naš dnevni jedilnik vnašamo živila, ki so bogata s polifenoli (Chen in sod., 2012).

Sadje in zelenjava spadajo med živila, bogata s fenolnimi spojinami. Ker lokalna samooskrba s svežimi pridelki v Sloveniji ni možna celo leto, bi lahko z uživanjem konopljinih semen pomembno prispevali k pokritju potreb po tovrstnih spojinah. Gan in sod. (2017) v svojem pregledu literature povzemajo, da lahko z naravnim procesom kaljenja že sicer visoko prehransko vrednost žit, stročnic in oljnic še izboljšamo. Prav tako navajajo, da se v kalečem semenu kopičijo bioaktivne snovi (vitamini, γ -aminomaslena kislina in fenolne spojine) bodisi kot rezultat novo sintetiziranih spojin kot tudi medsebojnih transformacij. V kaljenih sojinih semenih so tako določili povečano vsebnosti vitamina C (Huang in sod., 2014) in E (Fernandez-Orozco in sod., 2008). Kopičenje vitamina C so zaznali tudi med kaljenjem čičerike in mungo fižola (Masood in sod., 2014). O izboljšanju antioksidativnega potenciala, vsebnosti flavonoidov in fenolnih kislin so na primeru kaljenih semen različnih stročnic, ajde, amaranta in riža poročali tudi drugi raziskovalci (Xu in sod., 2018; Kim in sod., 2006; Terpine in sod., 2016; Perales-Sánchez in sod. 2014; Cho in Lim, 2018), medtem ko je vpliv kaljenja na prehransko vrednost industrijske konoplje še precej neraziskan.

1.1 NAMEN NALOGE

Naš namen je bil pripraviti ekstrakte fenolnih spojin iz razmaščenih semen industrijske konoplje in določiti optimalen čas kaljenja konopljinih semen, ki v primerjavi z nekaljenimi semeni vsebujejo največ fenolnih spojin.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predvidevamo, da se bo vsebnost fenolnih spojin v ekstraktih iz nekaljenih in kaljenih semen razlikovala ter da se bo koncentracija fenolnih spojin v kaljenih semenih konoplje med kaljenjem povečevala.

2 PREGLED OBJAV

2.1 INDUSTRIJSKA KONOPLJA

Industrijska konoplja izvira s področja današnje centralne Azije. Mnogo stoletij so jo gojili zaradi njene vsestranske uporabe, in sicer za izdelavo vrvi, ribiških mrež, oblačil, papirja itd. (Small, 2015).

Konoplja (*Cannabis sativa*) spada med poljščine, in sicer v družino konopljev *Cannabaceae*, med katero uvrščamo tudi navadni hmelj. Konopljo delimo na dve podvrsti: industrijsko konopljo (*Cannabis sativa* L.) in indijsko konopljo (*Cannabis sativa indica*) (Small, 2015).

Največja razlika med podvrstama je pristop pridelovalca do vzgoje in selekcije rastlin. Pri industrijski konoplji selekcija poteka v smeri večje vsebnosti finih vlaken in celuloze ter tvorbe bolj kompaktnih cvetov (Hartsel in sod., 2016). Rastline, ki imajo večjo vsebnost finih vlaken, tvorijo tudi močnejša vlakna, kar izkoriščajo v gradbeni, agrotekstilni in geotekstilni industriji predvsem na račun izdelave novih materialov in kompozitov (Clarke in Watson, 2007). S selekcijo rastlin z bolj kompaktnimi cvetovi pripomoremo k izboljšanju donosa semen na rastlini. Semena so tako uporabljena kot vir hrane in krme za živali ter pri proizvodnji etanola in piva. Iz semen s stiskanjem lahko pridobimo tudi jedilno olje ali olja, ki se nato uporabljajo v kozmetiki, premazih in v raznih topilih. Tako nam ostane še listje in socvetje, ki pa gre v nadaljnjo predelavo za proizvodnjo kanabinoidov, terpenov, herbicidov in insekticidov (Salentijn in sod., 2015).

Predvsem zaradi svoje vsestranske uporabe je konoplja v zadnjem času deležna številnih raziskav. Študije se osredotočajo predvsem na razvoj novih materialov, izolacijo bioaktivnih snovi in njihovo uporabnost v medicini ter samo selekcijo, ki omogoča večje in kvalitetnejše pridelke (Salentijn in sod., 2015).

Pri indijski konoplji selekcija poteka v smeri čim večjega razmerja med kanabinolom (CBD) in tetrahidrokanabinolom (THC). Večje kot je to razmerje, manjši so psihoaktivni učinki THC. Za indijsko konopljo je značilna večja vsebnost psihoaktivnih snovi, še posebej THC, ki lahko preseže tudi 20 % (Andre in sod., 2016). Uporablja se jo predvsem kot rekreativno drogo, zadnja leta pa vse več raziskav kaže na njen potencial za lajšanje simptomov nekaterih bolezni. Nedavna študija nakazuje, da zdravljenje z ekstraktom konoplje s povišano vsebnostjo CBD lahko zmanjša epileptične napade pri majhnih otrocih in odraslih (Hausman-Kedem in sod., 2018).

V Sloveniji je od leta 2010 možno gojiti industrijsko konopljo. Pri setvi mora biti pridelovalec pozoren, da izbere vrsto, ki ne vsebuje več kot 0,2 % THC v suhi snovi. (Pravilnik o pogojih za pridobitev dovoljenja za gojenje konoplje in maka, 2011).

2.2 HRANILNA VREDNOST KONOPLJENIH SEMEN

Konopljna semena predstavljajo bogat vir maščob in beljakovin. Z uvajanjem polnozrnatih konopljinih izdelkov v jedilnik med drugim pridobimo pester nabor mineralov, kot so fosfor, kalij, kalcij in magnezij (Callaway, 2004). Kot je razvidno iz Preglednice 1, visoko hranilno vrednost ohrani tudi preostanek po stiskanju olja, t.i. oljna pogača. Slednja zahvaljujoč visoki vsebnosti proteinov, prehranske vlaknine in drugih bioaktivnih spojin predstavlja naravni odpadni material kot neizkoriščen vir sestavin, ki ugodno vplivajo na naše zdravje in bi jih lahko uporabili pri razvoju funkcionalnih živil (Pojić in sod., 2014).

Preglednica 1: Hranilna in energijska vrednost konopljenih semen (Callaway, 2004)

	Seme	Pogača
Olje	33,5 %	11,1 %
Ogljikovi hidrati	27,6 %	42,6 %
Beljakovine	24,8 %	35,5 %
Prehranska vlaknina	27,6 %	42,6 %
Topna vlakna	5,4 %	16,4 %
Netopna vlakna	22,2 %	26,2 %
Vlaga	6,5 %	5,6 %
Pepel	5,6 %	7,2 %
Energija (kJ/100g)	2200	1700

Ker je odpadnega materiala pri pridobivanju olja razmeroma veliko, bi bilo oljne pogače različnega izvora smiselno izkoristiti kot poceni substrat za fermentacijo v trdnem stanju, s katero še povečamo vsebnost fenolnih spojin v pogači. Sadh in sod. (2018) v eni izmed takšnih raziskav navajajo, da bi bilo fermentirano pogačo arašidov smotrno dodati drugim živilom z namenom izboljšanja hranilne vrednosti.

Olje konopljinih semen vsebuje več kot 80 % večkrat nenasičenih maščobnih kislin in je odličen vir ω -6 in ω -3 maščobnih kislin (Callaway, 2004).

Linolna kislina spada med esencialne maščobne kisline in je predstopnja arahidonske kisline. Obe kislini pripomoreta k oksidaciji lipoproteinov z nizko gostoto (ang. low density lipoprotein - LDL). Visoka vsebnost LDL v krvi povzroča številne težave še posebej pri starejših ljudeh, saj se akumulira v stenah žil in zmanjša pretok krvnih delcev. Dolgoročna posledica nalaganja LDL je ateroskleroza, ki se v razvitih državah smatra za eno najpogostejših srčno-žilnih bolezni in lahko vodi v prezgodnjo smrt (Nayeri in sod., 2017).

α -linolenska kislina prav tako spada med esencialne maščobne kisline in je predstopnja eikozapentaenojske kisline (EPA) in dokozaheksaenojske kisline (DHA). Prehranske smernice izhajajo iz stališča, da je količina zaužitih DHA in EPA premajhna. Maščobni kislini ugodno vplivata na zmanjševanje srčnih zastojev in zmanjšanje možnosti za depresijo. Zadosten vnos je še posebej pomemben pri nosečnicah, saj vpliva na normalen razvoj možganov in očesne mrežnice pri otrocih.

Kislini pomagata tudi pri vzdrževanju normalnega ravnovesja prostih maščobnih kislin v telesu, prekomerna vsebnost vodi do povišanje vsebnosti LDL v krvi (Vas Dias, 2015; Lin in sod., 2017). Visoka vsebnost linolne in α -linolenske kisline v živilu še ne pomeni, da bi tako živilo brez pomisleka dodali k našim vsakodnevnim obrokom. Pomembno je predvsem razmerje teh dveh maščob v živilu. V konopljinem olju je to razmerje 3:1 (ω -6/ ω -3) in je po zadnjih smernicah optimalno razmerje za delovanje našega metabolizma (Borhade, 2013). Rodriguez-Leyva in Pierce (2010) sta prišla do ugotovitve, da ima to razmerje v konopljinih semenih ugoden vpliv za preprečevanje srčno-žilnih bolezni.

Iz Preglednice 1 je razvidno, da je raven beljakovin dokaj visoka. Prevladujoči beljakovini v konopljinih semenih sta edestin in albumin. Obe beljakovini sta dobro prebavljivi in vsebujeta pester nabor esencialnih aminokislin (Callaway, 2004). Zato ne preseneča, da so konopljine beljakovine v obliki prehranskih dodatkov zadnja leta precej v porastu.

Prehranska vlaknina (PV) je pogosto spregledana sestavina v naših jedilnikih. Večina ljudi ne doseže priporočenega dnevnega vnosa, ki je za ženske 16-20 g/dan in za moške 18-24 g/dan (Stephen in sod., 2017). Vnos PV ima koristne fiziološke učinke na naš organizem, predvsem na zmanjšanje LDL holesterola in presežka glukoze v krvi (Anderson in sod., 2009). Topna vlaknina oziroma prebavljiva vlaknina vpliva na viskoznost črevesne vsebine. Uživanje prebavljive PV privede do podaljšanja časa prehoda hrane skozi prebavni trak. Na drugi strani pa netopna vlaknina (tj. neprebavljiva) pospešuje peristaltiko, kar pomeni, da pogosteje odvajamo blato. Netopne vlaknine z lastnimi encimi ne moremo razgraditi, kljub temu pa je vnos le-te odličen vir hrane za bakterije v tankem črevesju (Makki in sod., 2018).

Na trgu je moč zaslediti številne konopljine proteinske koncentrate, ki poleg proteinov vsebujejo tudi dokaj visok delež PV (Lu in sod., 2010). Yin in sod. (2009) so v svoji študiji dokazali, da višja vsebnost PV v koncentratih negativno vpliva na samo funkcionalnost proteinov in s tem posledično omejuje uporabo tovrstnih prehranskih dopolnil. Proteinske koncentrate praviloma pridobivajo iz pogače.

2.3 KALJENJE

Kaljenje je proces sprejemanja vode v seme in aktivacije encimov za razvoj kalčka. Za uspešno kaljenje so potrebni trije temeljni dejavniki: zadostna količina vode, toplota in prekinjena dormanca (Bewley, 1997).

Seme mora pred kaljenjem preстати določeno časovno obdobje mirovanja, preden lahko razvije mehanizme za normalno kalitev. To obdobje imenujemo dormanca. To je obdobje razvoja semena, ko je le-to kljub ustreznim pogojem za rast nezmožno vzkliti zaradi delovanja protolitičnih encimov, inhibitorjev kalitve ali mehanskih ovir (Finch-Savage in Leubner-Metzger, 2006).

Pri procesu kaljenja moramo biti pozorni na parametre, s katerimi vzpodbujamo oziroma zaviramo rast semena. Najpomembnejša med njimi sta predvsem temperatura in vlažnost. Z visoko vlažnostjo omogočamo prehod vode v seme in aktivacijo encimov kaljenja. Za doseg tega cilja semena namakamo v vodi ali izpostavimo visoki zračni vlažnosti v kalilni komori.

S primerno temperaturo želimo spodbuditi delovanje encimov, ki bodo razvili mehanizme za črpanje zaloge hrane v zrnu. Ustrezna koncentracija kisika je ključna za razvoj in celično dihanje rastline (Penfield, 2017).

Številna semena za kalitev potrebujejo vodo z čim manjšo vsebnostjo soli, saj dodatek večje koncentracije soli zavira kaljenje. Hu in sod. (2018) je zanimalo, kakšen vpliv bo imela koncentracija različnih soli na rast semen konoplje. Prišli so do ugotovitve, da so bila semena ob dodatku nizke koncentracije (50 mM) natrijevega karbonata bolj dovzetna za kalitev v primerjavi s kontrolno skupino, ki ni vsebovala soli.

Kaljenje vpliva na katabolizem in degradacijo makromolekul, kot so ogljikovi hidrati, proteini ter maščobne kisline, kar privede do povečane vsebnosti enostavnih sladkorjev, prostih aminokislin in organskih kislin v semenu (Shi in sod., 2010; Wang in sod., 2005). Med kaljenjem se zmanjšuje vsebnost anti-nutritivnih in neprebavljivih snovi, kot so proteazni zaviralci in lecitin (Taiz in Zeiger, 1998).

2.4 FENOLNE SPOJINE

Fenolne spojine so praviloma polihidroksi fenolne spojine, ki vsebujejo vsaj en aromatski obroč z eno ali več hidroksilno skupino (Balasundram in sod., 2006). Kot številne bioaktivne snovi rastlinskega izvora se tvorijo s pomočjo sekundarnega metabolizma. Sekundarni metabolizem rastlin je odgovoren za nastanek številnih zdravnih aromatičnih učinkovin in obrambnih metabolitov. Topne fenolne spojine se v rastlinah sintetizirajo v endoplazmatskem retikulumu in nadalje shranjujejo v vakuolah rastline. Celice poleg prostih fenolov in topnih konjugatov vsebujejo tudi vezane fenolne spojine, ki sodelujejo pri tvorbi celične stene kot njen sestavni gradnik (Davey, 2017).

Med procesom kaljenja postanejo aktivni številni encimi, ki akumulirajo različne bioaktivne snovi. Koncentracija fenolnih spojin se med kaljenjem poveča na račun delovanja encimov, ki razgradijo celično steno in s tem sprostijo proste fenolne spojine iz vezanih oblik (Duodu, 2014). Perales-Sánchez in sod. (2014) so prišli do podobne ugotovitve, ko so spremljali vpliv kaljenja na vsebnost flavonoidov v semenih amaranta. Med kaljenjem se tvorijo tudi nekateri sekundarni metaboliti, kar posledično vodi do sinteze novih fenolnih spojin in vitamina C v semenu (Gan in sod., 2016).

Fenolne spojine delujejo kot antioksidanti, saj varujejo naš organizem pred prostimi radikali in s tem zmanjšajo ali inhibirajo celične poškodbe z oksidacijo lipidov ali drugih molekul (Chen in sod., 2012). Antioksidativna učinkovitost fenolnih spojin je odvisna od številnih faktorjev. Največji vpliv ima razporeditev in število hidroksilnih skupin v obroču (Balasundram in sod., 2006).

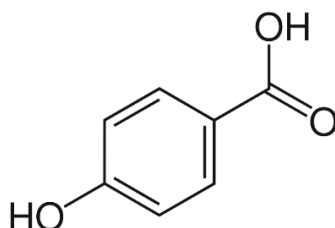
Fenolne spojine spadajo med najpomembnejše antioksidante v rastlinah in rastlinskih plodovih. Prisotne so v robidah, borovnicah, grozdju, brokoliju, čebuli, čokoladi, čaju in drugod (Manach in sod., 2004). Nedavne študije nakazujejo, da imajo fenolne spojine protivnetne (Yan in sod., 2013), antimikrobne (Michel in sod., 2012) in antioksidativne (Sekhon-Loodu in sod., 2013) mehanizme delovanja v našem telesu. Dokazani so bili tudi pozitivni učinki fenolnih spojin na zniževanje visokega krvnega tlaka (Medina-Remon in sod., 2013).

2.5 FENOLNE SPOJINE V SEMENIH INDUSTRIJSKE KONOPLJE

2.5.1 Fenolne kisline

Fenolne kisline razdelimo na hidroksibenzojske in hidroksicimetne kisline. Fenolne spojine nastanejo s pomočjo deaminacije fenilalanina ali tirozina. Produkt deaminacije je lahko cimetna kislina ($C_9H_8O_2$) ali *p*-kumarna kislina ($C_9H_8O_3$). Aromatski obroč omenjenih kislinskih je lahko hidroksiliran in/ali metiliran, kar vodi v nastanek derivatov, kot so galna kislina, kavna kislina, ferulna kislina itd. Slednji dve kislini sta tudi najbolj pogosti in najbolj raziskani fenolni spojini (Heleno in sod., 2015).

Tudi v oljnih pogačah konoplje najdemo številne fenolne kisline. V večjih koncentracijah najdemo predvsem *p*-hidroksibenzojsko kislino (Slika 1) in v nekoliko nižjih koncentracijah tudi ferulno kislino. V primerjavi z ostalimi oljnimi pogačami (kokos, lan, arašidi, sezam) in s semeni bombaža ima konopljna pogača znatno višjo koncentracijo *p*-hidroksibenzojske kisline (Liang in sod., 2018).



Slika 1: Najbolj zastopana fenolna kislina v semenih industrijske konoplje: *p*-hidroksibenzojska kislina (Liang in sod., 2018)

2.5.2 Flavonoidi

V skupino flavonoidov spada več kot 6500 spojin. Sestavljeni so iz ene heterociklične spojine in dveh aromatskih spojin. Flavonoide lahko razvrstimo glede na stopnjo oksidacije in nasičenosti vezi, in sicer na: flavone, izoflavone, flavonole, flavanone, flavanole, aurone in antociane (Schendel, 2019). V rastlinah flavonoidi vplivajo na preprečevanje oksidativnega stresa in nekaterih bolezni, prav tako pa lahko sodelujejo pri izražanju nekaterih fenotipov (Kumar in Pandey, 2013).

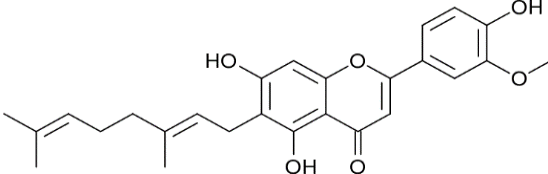
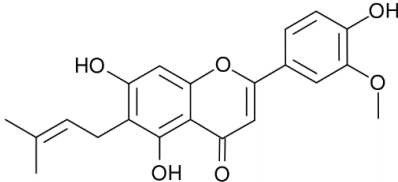
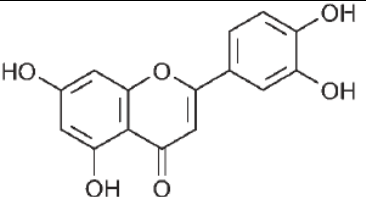
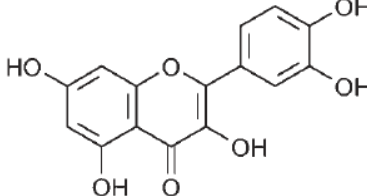
V industrijski konoplji je bila nedavno odkrita nova skupina flavonoidov, imenovana kanflavini (Preglednica 2), ki imajo antioksidativne, protimikrobne, protivnetne in tudi protivirusne učinkovine. Širok spekter delovanja tem molekulam pripisujejo vezani prenilni (granilni) skupini, saj ta poveča lipofilni značaj na membrani (Chen in sod., 2014). V kalčkih so potrdili prisotnost dveh strukturno različnih oblik: kanflavina A in kanflavina B, ki inhibirata delovanje nekaterih ključnih encimov za proizvodnjo vnetnih posrednikov. Vsebnost kanflavinov in razmerje med njimi je sortno pogojeno (Werz in sod., 2014).

Poleg kanflavinov so v oljnih pogačah konopljinih semen potrdili prisotnost kvercetina in luteolina, ki sta prikazana v Preglednici 2 (Teh in Morlock, 2015).

Luteolin ima dokazane antioksidativne, protivnetne in antikancerogene učinke, prav tako je inhibitor encimov oksidacije (Lopez-Lazaro, 2009). Ali in sod. (2019) so luteolin umestili kot potencialno spojino za zdravljenje Alzheimerjeve bolezni.

Kvercetin se praviloma pojavlja v glikolizirani obliki (Xiao in sod., 2011). Številne študije so dokazale, da ima kvercetin širok spekter delovanja. Po absorpciji ima v telesu funkcijo protivnetne, protivirusne, antibakterijske, antikancerogene in antiagregacijske učinkovine. Prav tako varuje pred nastankom kardiovaskularnimi boleznimi ter boleznimi jeter. Vendar je zaradi visoke hidrofobnosti, slabe stabilnosti in slabe biorazpoložljivosti v telesu uporaba kvercetina kot zdravila omejena (Khushnud in Mousa, 2013; Nam in sod., 2016).

Preglednica 2: Flavonoidi, izolirani iz semen konoplje (Brenneisen, 2007)

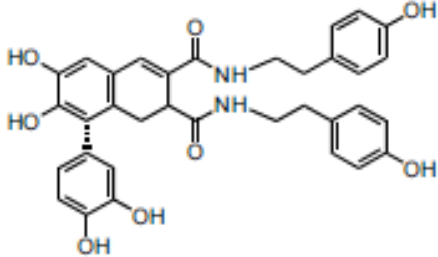
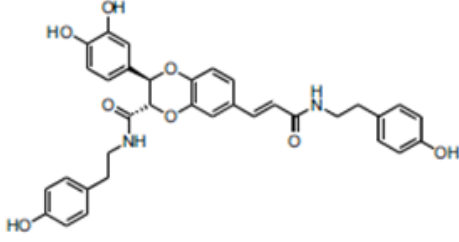
Flavonoid	Skeletna formula
Kanflavin A	
Kanflavin B	
Luteolin	
Kvercetin	

2.5.3 Lignani in lignanamidi

Lignani so fenolne spojine, ki jih najdemo v rastlinah in njenih plodovih. V rastlini se začnejo akumulirati ob poškodbah tkiv in izpostavljenosti UV svetlobi, s čimer naj bi delovali kot obramba pred patogenimi napadi (Back in sod., 2001). Med lignane spadajo tudi lignanamidi, ki jih v konoplji najdemo v večjih koncentracijah predvsem v listih, semenih in koreninah. Izoliranih je bilo že več kot 20 lignanamidov iz semen konoplje (Zhou in sod., 2018). Omenjeni lignanamidi so običajno poimenovani kot kanabisini.

V semenih najdemo kanabisine A, B, C, D, E, F, M in N. Kanabisin M (Preglednica 3) se je izkazal kot zelo dober zaviralec nastanka prostih radikalov. Na drugi strani se je kanabisin N izkazal kot šibek inhibitor encima acetilholin-esteraza, ki degradira sinapse pri Alzheimerjevih bolnikih (Flores-Sanchez in Veerporte. 2008; Pollastro in sod., 2018; Yan in sod., 2015). Najbolj zastopan kanabisin v semenih je kanabisin B (Preglednica 3), ki doseže razmeroma visoke koncentracije ($153 \pm 8,62$ mg/kg suhe mase) (Pojić in sod., 2014). Ko in sod. (2015) so v nedavni raziskavi razkrili, da ima kanabisin B protivnetni učinek.

Preglednica 3: Kanabisina, izolirana iz konopljinih semen (Pollastro in sod., 2018)

Kanabisin	Skeletna formula
Kanabisin B	
Kanabisin M	

2.6 DOLOČANJE VSEBNOST SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN S FOLIN-CIOCALTEUJEVO METODO

Folin-Ciocalteujeva (FC) metoda je konvencionalna analitska metoda z dobro ponovljivostjo in se uporablja za določanje vsebnosti fenolnih spojin. Metoda temelji na nastanku modro obarvanega kompleksa kot posledice redukcije FC reagenta (raztopina fosfovolframove in fosfomolibdenske kisline) pri rahlo alkalnem pH. Raztopina je pri kislem pH nestabilna in reakcija zato ne poteče. Po redukciji nastali produkt določimo s pomočjo spektrofotometra z merjenjem absorbance pri 765 nm (Waterhouse, 2002).

Glavna prednost uporabe FC metode je njeno vsestransko določanje fenolnih spojin v različnih živilih, kot so: vino, sadni sokovi, žgane pijače, rastlinski material (Singleton in sod., 1999). Metoda ima tudi pomanjkljivosti. FC metoda temelji na selektivni oksidaciji fenolom podobnih substanc, ki lahko prispevajo k napačnem rezultatu, saj lahko dobimo večjo vsebnost fenolnih spojin v vzorcu, kot jih v resnici imamo (Rover in Brown, 2013). Merjenje prav tako otežujejo prisotni sladkorji, aromatični amini, askorbinska kislina, organske kisline, žveplov dioksid in Fe^{2+} (Prior, 2005).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Naš izhodni material so predstavljala razmaščena zmleta nekaljena in kaljena konopljinna semena, njihova priprava je bila naloga drugega študenta. Namakanju semen industrijske konoplje do približno 45 % vsebnosti vode je sledilo kaljenje semen (24, 48, 72 in 96 ur) v kalilni komori pri temperaturi 20 °C in visoki relativni vlagi. Da bi zagotovili enake pogoje za razmastitev, je bilo potrebno kaljena semena pred razmastitvijo posušiti pri 40 °C do vsebnosti vode, značilne za nekaljena semena. Predhodna priprava nekaljenih in delno posušenih kaljenih konopljinah semen (delo drugega študenta) na ekstrakcijo je vključevala še mletje in razmastitev semen s heksanom.

3.1.1 Laboratorijska oprema

Za eksperiment smo potrebovali naslednjo opremo:

- analitska tehtnica (Mettler Toledo),
- avtomatske pipete,
- centrifuga (Avanti JXN-26, ZDA),
- centrifuga (Eppendorf, 5415, Kanada),
- centrifugirke (15 in 50 mL),
- kapalke,
- kivete (2 mL),
- mlin za semena (IKA, A11 basic, Nemčija),
- mikrocentrifugirke (2 mL),
- stojala za epruvete in mikrocentrifugirke,
- stresalnik (EV-403, Slovenija),
- sušilnik (Termoproc),
- štoparica,
- tehtiči,
- UV-VIS spektrofotometer (ceci, CE 2021, Anglija),
- vrtinčnik (IKA, Nemčija).

3.1.2 Reagenti

- 99,8 % metanol (CH_3OH , Merck KGaA, Nemčija).
- Folin-Ciocalteu reagent (Merck KGaA, Nemčija): pred uporabo smo ga razredčili z destilirano vodo v razmerju 1:2.
- 20 % raztopina natrijevega karbonata (Na_2CO_3 , Sigma-Aldrich, Nemčija): zatehtali smo 5 g Na_2CO_3 v 25 mL bučko in dopolnili z destilirano vodo do oznake.

- 2,0 mM raztopina klorogenske kisline: zatehtali smo 7,1 mg klorogenske kisline v 10 mL bučko in dopolnili z metanolom do oznake in jo nato premešali.

Ostale kemikalije:

- bidestilirana voda

3.2 METODE

3.2.1 Določanje suhe snovi v semenih

V predhodne stehtane tehtiče smo zatehtali po 3,00 g homogeniziranih delno posušenih razmaščenih semen. Nato smo vzorce s tehtiči prestavili v sušilno komoro, kjer smo jih sušili 5 ur na 105 °C. Po sušenju smo tehtiče ohladili v eksikatorju in ponovno stehtali. Suho snov smo določali v 2 paralelkah, rezultate pa podali kot njuno povprečje in standardni odklon. Vsebnost suhe snovi (SS) v semenih smo izračunali s pomočjo enačbe:

$$\% \text{ vode} = (\text{izguba vode (g)}/\text{zatehta (g)}) \times 100 \quad \dots(1)$$

$$\% \text{ SS} = 100 - \% \text{ vode} \quad \dots(2)$$

3.2.2 Priprava vzorcev

Predhodno delno posušena razmaščena in zmlata semena so razvidna na Sliki 2. Semena (1,00 g) smo zatehtali v 50 mL falkonko ter jim dodali 9 mL metanola (99,8 %). Metanol nam je služil kot topilo, s katerim smo iz nekaljenih in kaljenih razmaščenih semen ekstrahirali fenolne spojine. Vsebino falkonke smo stresali 2 uri na stresalniku pri 200 obratih/min na sobni temperaturi. Nato smo vzorec 10 minut centrifugirali pri 8000 obratih/min. Supernatant smo odlili v 2 mL mikrocentrifugirke, ki smo jih prestavili v zmogljivejšo centrifugo. Centrifugiranje je potekalo 3 minute na 13200 obratih/min. Supernatant v mikrocentrifugirki je predstavljal metanolni ekstrakt fenolnih spojin iz kaljenih oziroma nekaljenih semen.



Slika 2: Zmlata razmaščena semena konoplje pripravljena na nadaljnjo analizo

3.2.3 Folin-Ciocalteu-jeva metoda

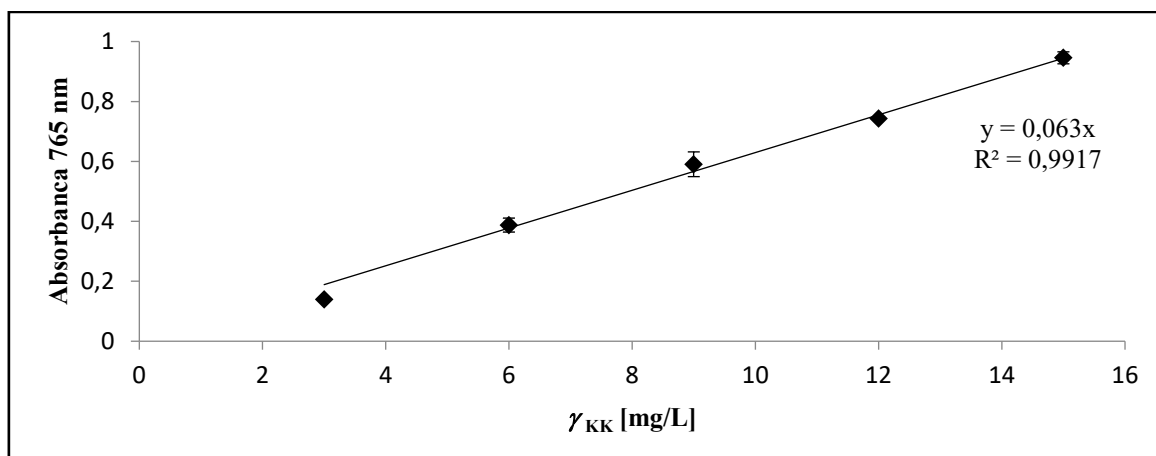
3.2.3.1 Priprava umeritvene krivulje

Pri pripravi umeritvene krivulje smo uporabili standardno raztopino 2,00 mM klorogenske kisline (KK). Za pripravo različnih koncentracij KK smo odpipetirali 20 – 100 μL standardne raztopine in jo dopolnili z metanolom, kot je prikazano v Preglednici 4. V posamezno mikrocentrifugirko smo dodali 1300 μL bidestilirane vode in 300 μL razredčenega Folin-Ciocalteujevega (FC) reagenta. FC reagent je slabo obstojen, zato smo ga pripravili tik pred analizo in zaščitili z aluminijasto folijo pred svetlobo. Vsebino mikrocentrifugirke smo nato premešali in vanjo po 5 minutah dodali še 300 μL Na_2CO_3 (20 %, w/v). Po enourni inkubaciji v temi pri sobni temperaturi smo vsebino mikrocentrifugirke prelili v kiveto in ji s pomočjo spektrofotometra pri valovni dolžini 765 nm izmerili absorbanco.

Preglednica 4: Uporaba različnih prostornin klorogenske kisline (KK), metanola, bidestilirane vode, Folin-Ciocalteujevega (FC) reagenta in natrijevega karbonata (Na_2CO_3) za pripravo umeritvene krivulje

	$V_{2,00 \text{ mM KK}} (\mu\text{L})$	$V_{\text{metanol}} (\mu\text{L})$	$V_{\text{bidestilirana voda}} (\mu\text{L})$	$V_{\text{FC reagent}} (\mu\text{L})$	$V_{20 \% \text{ Na}_2\text{CO}_3} (\mu\text{L})$
1	20	80	1300	300	300
2	40	60	1300	300	300
3	60	40	1300	300	300
4	80	20	1300	300	300
5	100	0	1300	300	300

Po izmerjeni absorbanci smo s pomočjo programa Excel izrisali umeritveno krivuljo. Smerni koeficient premice smo določili s pomočjo linearne regresijske analize. Vrednost koeficienta je znašala: 0,063 L/mg (Slika 3). Analizo smo izvedli v 2 paralelkah.



Slika 3: Odvisnost absorbance od masne koncentracije klorogenske kisline (γ_{KK})

Analiza vzorcev je potekala na enak način kot priprava umeritvene krivulje. Namesto KK in metanola smo odpipetirali po 100 μL ustreznega razredčenega ekstrakta fenolnih spojin.

3.2.3.2 Izračun vsebnosti skupnih fenolnih spojin

Umeritvena krivulja nam je služila kot izhodišče za izračun vsebnosti skupnih fenolnih spojin v nekaljenih in kaljenih semenih industrijske konoplje.

Masno koncentracijo fenolnih spojin v reakcijski zmesi (γ_{rz}) smo izračunali s pomočjo izmerjene absorbance (A_{765}) in smernega koeficienta (k) umeritvene krivulje:

$$\gamma_{rz} = A_{765} / k \quad \dots(3)$$

Maso fenolnih spojin v mikrocentrifugirki (m_{mc}) smo izračunali s pomočjo izračunane masne koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi (γ_{rz}) in prostornine vzorca (V_{vzorec}):

$$m_{mc} = \gamma_{rz} \times V_{vzorec} \quad \dots(4)$$

Masno koncentracijo skupnih fenolnih spojin v pripravljenelem ekstraktu ($\gamma_{ekstrakt}$) smo izračunali s pomočjo mase fenolnih spojin v mikrocentrifugirki (m_{mc}) in prostornine metanolnega ekstrakta, uporabljenega za analizo (V_{vzorec}):

$$\gamma_{ekstrakt} = m_{mc} / V_{vzorec} \quad \dots(5)$$

Maso fenolnih spojin v ekstraktu ($m_{ekstrakt}$) smo izračunali kot produkt masne koncentracije skupnih fenolnih spojin v ekstraktu ($\gamma_{ekstrakt}$) in prostornine celotnega ekstrakta ($V_{falkonka}$):

$$m_{ekstrakt} = \gamma_{ekstrakt} \times V_{falkonka} \quad \dots(6)$$

Za izračun vsebnosti fenolnih spojin v 1 g razmaščenih delno posušenih konopljinih semen (MV) smo potrebovali maso fenolnih spojin v ekstraktu ($m_{ekstrakt}$) in maso svežega vzorca (m_{vzorec}), ki smo ga uporabili za pripravo tega ekstrakta:

$$\text{mg FS/g MV} = m_{ekstrakt} / m_{vzorec} \quad \dots(7)$$

Upoštevali smo še delež SS in rezultate podali kot ekvivalent KK v 1 g suhe snovi vzorca (mg KK/g SS):

$$\text{mg KK/g SS} = (m_{ekstrakt} / m_{vzorec}) \times (100 / \% \text{ SS}) \quad \dots(8)$$

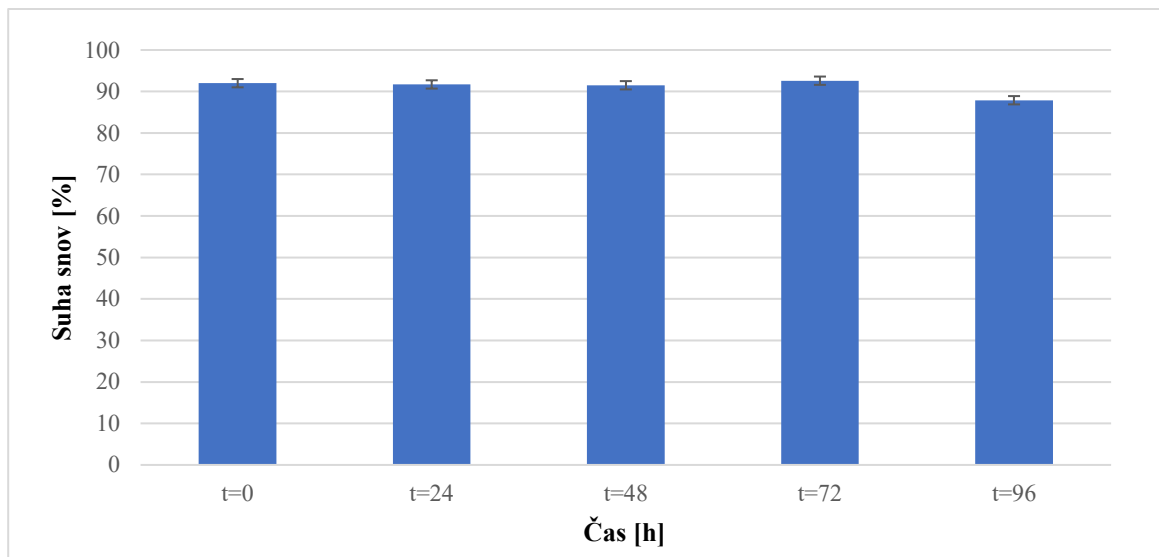
3.2.4 Statistična analiza

Dobljene podatke smo uredili s pomočjo programa Microsoft Excel. Ekstrakcijo smo izvajali v dveh paralelkah, vsako paralelko pa analizirali v dveh ponovitvah. Rezultati analize so podani kot povprečje \pm standardni odklon.

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 ANALIZA VSEBNOSTI SUHE SNOVI

Semena smo po sušenju ohladili in jih ponovno stehali. Suho snov smo izračunali posredno iz vsebnosti vode v semenih. Slika 4 prikazuje spremembo suhe snovi med kaljenjem konopljinih semen.



Slika 4: Vsebnost suhe snovi med kalitvijo konopljinih semen

Vsebnost SS oziroma vsebnost vode v semenu je tesno povezana s kaljenjem. Med procesom kaljenja je v prvi fazi rasti sprejemanje vode pospešeno, dokler niso celice v celoti hidrirane. V drugi fazi se sprejem vode zmanjša. Sprejem v tretji fazi kaljenja je izrazito povečan na račun rasti kalčka, saj pride do povečane rasti in delitve celic. Semena, ki niso uspešno prestala dormance, in mrtva semena ne preidejo v tretjo fazo, saj se razvoj in delitev celic ne nadaljuje oziroma se niti ne aktivira (Nonogaki in sod., 2010). Poleg delitve celic pride med kaljenjem tudi do spremembe same sestave semena. Zaradi delovanja encimov pride do razgradnje škroba in nekaterih bioaktivnih snovi, kar privede do zmanjšanja vsebnosti suhe snovi (Lin in sod., 2017).

Poudariti moramo, da je bil naš namen določiti vsebnost SS v delno posušenih in razmaščenih semenih, ki smo jih uporabili za ekstrakcijo. V predposkusu se je namreč pokazalo, da je učinkovitost razmastitve semen pogojena s količino vode, ki jo ta vsebujejo. Zato je bilo potrebno sveža vzorčena semena pred razmastitvijo delno posušiti, da je bila vsebnost vode v različno starih kaljenih semenih čim bolj podobna, pogoji razmastitve pa čim bolj ponovljivi. Slika 4 prikazuje zanemarljive razlike v vsebnosti suhe snovi med delno posušenimi razmaščenimi semeni, ki so kalili različno dolgo.

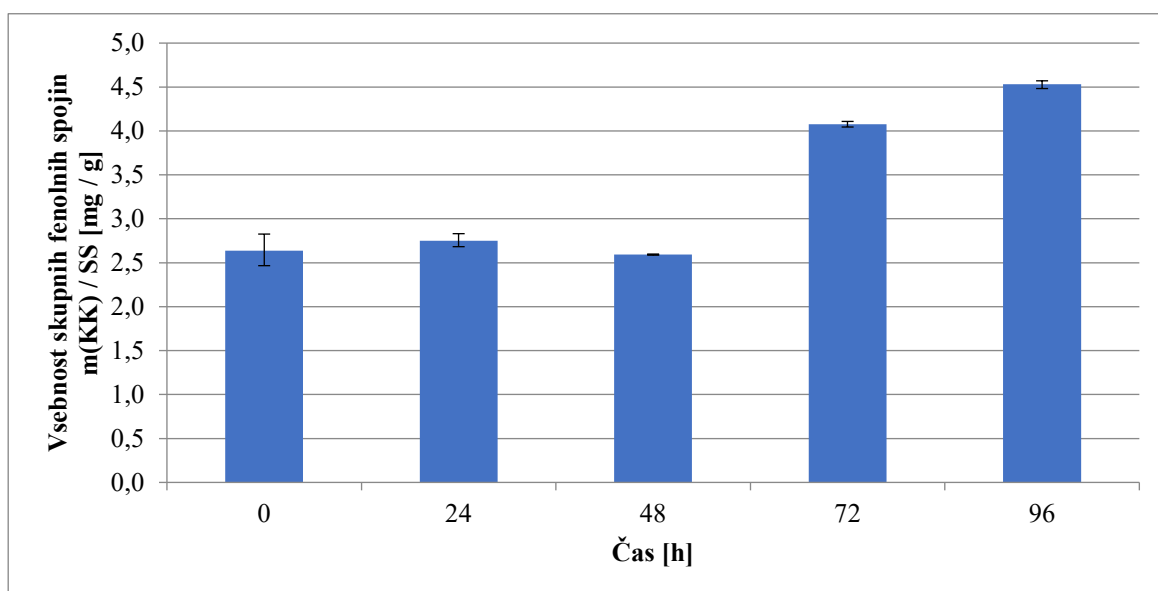
4.2 ANALIZA SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN

Vsebnost skupnih fenolnih spojin v semenih smo določili s pomočjo FC metode. Kot je razvidno iz Preglednice 5, je bila ponovljivost ekstrakcije vseskozi izjemno visoka. Malce slabša je bila le v primeru nekaljenih semen, verjetno na račun začetniških napak analiziranja.

Preglednica 5: Sprememba vsebnosti fenolnih spojin in ponovljivost ekstrakcije

Čas [h]	Vzorec A [mg/g]	Vzorec B [mg/g]	Ponovljivost ekstrakcije [%]
0	2,77	2,51	99,95
24	2,81	2,70	99,98
48	2,60	2,59	100,00
72	4,05	4,10	99,99
96	4,56	4,50	99,99

Slika 5 prikazuje spremembo v vsebnosti skupnih fenolnih spojin med kalitvijo konopljinih semen. V nekaljenih semenih smo določili ($2,64 \pm 0,19$) mg KK/g SS. Vsebnost skupnih fenolnih spojin se po prvih 24 urah kaljenja ni bistveno spremenila. Absolutna vrednost se je povečala za 4 %, vendar gre za spremembo v okviru eksperimentalne napake. Tretji dan analize nam je dal presenetljive rezultate, saj smo izmerili padec v vsebnosti skupnih fenolnih spojin (6 % od meritve prejšnjega dne). Glede na ponovljivost ekstrakcije lahko sklepamo, da ne gre za napako v analizi vzorcev.



Slika 5: Vpliv kaljenja na vsebnost fenolnih spojin v razmaščenih semenih industrijske konoplje

Zmanjšanje vsebnosti fenolnih spojin v 48 ur kaljenih semenih nas je presenetil, zato smo ponovili analize drugega, tretjega in četrtega dne, vendar smo prišli do enakih zaključkov. Po 72 urah kaljenja je sledil drastičen skok, in sicer kar za 57 % v primerjavi s prejšnjim dnevom. Zadnji dan analize se je vrednost ustalila na ($4,53 \pm 0,04$) mg KK/g SS.

Tudi Frassinetti in sod. (2018) so vsebnost skupnih fenolnih spojin v ekstraktih določili s pomočjo Folin-Ciocalteujevega reagenta in prišli do podobnih rezultatov, in sicer da se s kaljenjem vsebnost skupnih fenolnih spojin v konopljenih semenih povečuje. Vsebnost fenolnih spojin so analizirali v nekaljenih semenih in v semenih, ki so kalila 72 ur. Za pripravo umeritvene krivulje so namesto KK uporabili galno kisline (GK) ter rezultat podali kot mg GK/g SS. V nekaljenih semenih so določili ($2,33 \pm 0,07$) mg GK/g SS, kar je primerljivo z našimi rezultati. Tretji dan analize so opazili dvig koncentracije za 116,31 %. Vsebnost pri 72 urah je bila znatno višja v primerjavi z našo analizo, saj presega tudi vrednost zadnjega dne naše analize. Razlika je po vsej verjetnosti posledica uporabe druge sorte industrijske konoplje. Pri 120 urah so izmerili vrednost ($6,16 \pm 0,057$) mg GK/g SS. Rezultatov ne moramo primerjati, saj smo našo analizo prekinili že po 96 urah, lahko le predvidevamo, da bi bila vsebnost skupnih fenolnih spojin v naših semenih ob istem času znatno manjša.

Med začetno fazo namakanja se koncentracija fenolnih spojin skorajda ni spremenila, kar ni bilo v skladu s pričakovanji. Med namakanjem semen lahko pride do izločanja fenolnih spojin v vodo in posledično zmanjšanja koncentracije (Singh in Sharma, 2017). Do podobne ugotovitve v prvi fazi kaljenja je prišla tudi Terpinc (2006), ko je določala vsebnost fenolnih spojin v semenih ajde. Pri vzorčenju konopljinih semen po 48 urah kaljenja je prišlo do manjšega odklona. Odklon pri 48 urah so opazili tudi Xu in sod. (2018), ko je vsebnost fenolnih spojin v kaljenem rumenem grahu padla, nato pa je bila naslednji dan spet opažena naraščajoča tendenca. Cho in Lim (2018) sta poskušala raziskati vpliv kaljenja na spremembo sestave fenolnih spojin v rjavem rižu. Zmanjšanje vsebnosti fenolnih spojin po 48 urah kaljenja sta pripisala izgubi vodotopnih fenolnih spojin med samim kaljenjem.

Največji preskok je bil pri našem eksperimentu opazen tretji dan kaljenja, ko je količina skupnih fenolnih spojin v ekstraktu narastla kar za 54 % v primerjavi z nekaljenimi semeni. Večji skok je bil po vsej verjetnosti odziv na oksidativni stres, proti kateremu se rastlina odzove s povečano sintezo fenolnih spojin (Gunenc in sod., 2017). Med kaljenjem pride do sprememb v vsebnosti mineralov in vitaminov ter povečane aktivnosti endogenih encimov (hidrolaza in polifenol oksidaza), ki vplivajo na sestavo ter vsebnost fenolnih spojin v semenu (López-Amorós in sod., 2006). Zadnji dan smo izmerili največjo količino skupnih fenolnih spojin, in sicer smo uspeli z 96-urnim kaljenjem povečati njihovo vsebnost kar za 1,4-krat v primerjavi z netretiranimi semeni.

5 SKLEPI

V sklopu diplomskega dela smo ovrednotili vsebnost skupnih fenolnih spojin v nekaljenih in različno dolgo kaljenih delno posušenih in razmaščenih semenih.

Na podlagi naših rezultatov lahko sklepamo:

- Fenolne spojine so prisotne tako v nekaljenih kot v kaljenih semenih konoplje.
- V kaljenih semenih industrijske konoplje je vsebnost fenolnih spojin večja kot v nekaljenih.
- Kaljenje je povečalo vsebnost skupnih fenolnih spojin. Za znatno povečanje je semena potrebno kaliti 72 ali 96 ur.

Na podlagi izvedenega eksperimenta in ovrednotenja rezultatov smo prišli do zaključka, da smo na začetku raziskave pravilno postavili delovni hipotezi.

6 POVZETEK

Namen diplomskega dela je bilo ovrednotiti, kako kaljenje vpliva na vsebnost skupnih fenolnih spojin v industrijski konoplji (*Cannabis sativa* L.). Vsebnost fenolnih spojin smo določili v nekaljenih semenih in tistih, kaljenih 24, 48, 72 in 96 ur.

Poleg tega smo določali delež suhe snovi (SS) v delno posušenih in razmaščenih semenih. Suho snov smo določili s sušenjem semen na 105 °C za 5 ur.

Za pripravo ekstraktov fenolnih spojin smo uporabili metanol. Vsebnost fenolnih spojin smo določili s pomočjo Folin-Ciocalteujeve (FC) metode. Metoda temelji na redukciji FC reagenta, ki vodi v nastanek modro obarvanega kompleksa. Ekstrakt smo ovrednotili z merjenjem absorbanca pri 765 nm. Rezultat smo podali kot ekvivalent klorogenske kisline (KK) v 1 gramu suhe snovi razmaščenih semen (mg KK/g SS).

Prišli smo do ugotovitve, da kaljenje ugodno vpliva na vsebnost fenolnih spojin, saj se je ta po 96 urah biološke aktivacije zrn povečala za več kot dve tretjini v primerjavi z nekaljenimi semeni. Z uporabo bolj donosnih vrst industrijske konoplje bi verjetno lahko dosegli višje koncentracije fenolnih spojin v semenih. Potrebne bi bile še nadaljnje analize, da se prepričamo, kako vsebnost fenolnih spojin variira pri drugih vrstah konoplje.

Poleg najbolj znanega in najbolj raziskanega metabolita, THC, vse več raziskav govori v prid ostalim bioaktivnim snovem, ki se še nahajajo v konoplji. Nekatere izmed njih dokazano pripomorejo k dobremu počutju človeka in jih je zato tudi v prihodnje smotrno uporabljati za zdravljenje določenih bolezni.

Kmetje se v zadnjih letih vedno pogosteje odločajo za gojenje industrijske konoplje. Potrošniki imamo tako na voljo kupiti številne konopljine izdelke, med njimi tudi semena. Kaljena semena industrijske konoplje nam tako omogočajo vir fenolnih spojin tudi v zimskih mesecih, ko je lokalno pridelana zelenjava in sadje v primanjkljaju.

7 VIRI

- Ali F., Rahul J. S., Naz F., Ashafaq M., Shahid M., Siddique Y. S. 2019. Therapeutic potential of luteolin in transgenic *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 692: 90-99
- Anderson J. W., Baird P., Davis R. H. 2009. Health benefits of dietary fiber. *Nutrition Reviews*, 67, 4: 188-205
- Andre C. M., Hausman J. F., Guerriero G. 2016. *Cannabis sativa*: The plant of the thousand and one molecules. *Frontiers in Plant Science*, 7: 19, doi: [10.3389/fpls.2016.00019](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00019): 13 str.
- Back K., Jang S. M., Lee B. C., Schmid, A., Strack D., Kim K. M. 2001. Cloning and characterization of a hydroxycinnamoyl CoA:tyramine N-(hydroxycinnamoyl) transferase induced in response to UV-C and wounding from *Capsicum annuum*. *Plant and Cell Physiology*, 42, 5: 475-481
- Balasundram N., Sundram K., Samman S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 1: 191-203
- Bewley J. 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell*, 9, 7: 1055-1066
- Borhade S. 2013. Chemical composition and characterization of hemp (*Cannabis sativa*) seed oil and essential fatty acids by HPLC method. *Archives of Applied Science Research*, 5: 5-8
- Brenneisen R. 2007. Chemistry and analysis of phytocannabinoids and other *Cannabis* constituents. V: Marijuana and the cannabinoids. ElSohly M. A. (ur.). New Jersey, Humana Press Inc.: 17-49
- Callaway J. C. 2004. Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica*, 140, 1: 65-72
- Chen T., He J., Zhang J., Li X., Zhang H., Hao J., Li L. 2012. The isolation and identification of two compounds with predominant radical scavenging activity in hemp seed (seed of *Cannabis sativa* L.). *Food Chemistry*, 134, 2: 1030-1037
- Chen X., Mukwaya E., Wong M. S., Zhang Y. 2014. A systematic review on biological activities of prenylated flavonoids. *Pharmaceutical Biology*, 52, 5: 655-660

- Cho D. W., Lim S. L. 2018. Changes in phenolic acid composition and associated enzyme activity in shoot and kernel fractions of brown rice during germination. *Food Chemistry*, 256: 163-170
- Clarke R. C., Watson D. P. 2007. Cannabis and natural cannabis medicines. V: Marijuana and the cannabinoids. ElSohly M. A. (ur.). New Jersey, Humana Press: 1-15
- Davey M. 2017. Secondary metabolism in plant cell cultures. V: Encyclopedia of applied plant sciences. 2nd ed. Thomas B., Murray B. G., Murphy D. J. (ur.). Amsterdam, Academic Press: 462-467
- Duodu K. G. 2014. Effects of processing on phenolic phytochemicals in cereal and legumes. *Cereal Foods World*, 59: 64–70
- Fernandez-Orozco R., Frias J., Zielinski H., Piskula K. M., Kozłowska H., Vidal-Valverde C. 2008. Kinetic study of the antioxidant compounds and antioxidant capacity during germination of *Vigna radiata* cv. *emerald*, *Glycinemax* cv. *jutro* and *Glycine max* cv. *Merit*. *Food Chemistry*, 111, 3: 622-630
- Finch-Savage W. E., Leubner-Metzger G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171, 3: 501-523
- Flores-Sanchez I. J., Veerporte R. 2008. Secondary metabolism in cannabis. *Phytochemistry Reviews*, 7: 615-639
- Frassinetti S., Moccia E., Caltavuturo L., Gabriele M., Longo V., Bellani L., Giorgi G., Giorgetti L. 2018. Nutraceutical potential of hemp (*Cannabis sativa* L.) seeds and sprouts. *Food Chemistry*, 262: 55-56
- Gan R., Lui W. Y., Wu K., Chan C. L., Dai S. H., Sui Z. Q., Corke H. 2017. Bioactive compounds and bioactivities of germinated edible seeds and sprouts: An updated review. *Trends in Food Science & Technology*, 59: 1-14
- Gan R., Wang M., Lui W., Wu K., Corke H. 2016. Dynamic changes in phytochemical composition and antioxidant capacity in green and black mung bean (*Vigna radiata*) sprouts. *International Journal of Food Science and Technology*, 51: 2090-2098
- Gunenc A., Yeung M. H., Lavergne C., Bertinato J., Hosseinian F. 2017. Enhancements of antioxidant activity and mineral solubility of germinated wrinkled lentils during fermentation in kefir. *Journal of Functional Foods*, 32: 72–79

- Hartsel J. A., Eades J., Hickory B., Makriyannis A. 2016. *Cannabis sativa* and hemp. V: Nutraceuticals. Gupta R. C. (ur.). Boston, Academic Press: 735-754
- Hausman-Kedem M., Menascu S., Kramer U. 2018. Efficacy of CBD-enriched medical cannabis for treatment of refractory epilepsy in children and adolescents – An observational, longitudinal study. *Brain and Development*, 40, 7: 544-551
- Heleno A. S., Martins A., Queiroz R. P. M. J., Ferreira C. F. R. I. 2015. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chemistry*, 173: 501-513
- Hu H., Liu H., Liu F. 2018. Seed germination of hemp (*Cannabis sativa* L.) cultivars responds differently to the stress of salt type and concentration. *Industrial Crops and Products*, 123: 254-261
- Huang X., Cai W., Xu B. 2014. Kinetic changes of nutrients and antioxidant capacities of germinated soybean (*Glycine max* L.) and mung bean (*Vigna radiata* L.) with germination time. *Food Chemistry*, 143: 268-276
- Khushnud T., Mousa S. A. 2013. Potential role of naturally derived polyphenols and their nanotechnology delivery in cancer. *Molecular Biotechnology*, 55: 78–86
- Kim S. J., Kawaharada C., Suzuki T., Saito K., Hashimoto N., Takigawa S., Noda T., Matsuura-Endo C., Yamauchi H. 2006. Effect of natural light periods on rutin, free amino acid and vitamin C contents in the sprouts of common (*Fagopyrum esculentum* Moench) and tartary (*F-tataricum* Gaertn.) buckwheats. *Food Science and Technology Research*, 12: 199-205
- Ko H. J., Ahn E. K., Oh J. S. 2015. N-trans-p-caffeoyl tyramine isolated from *Tribulus terrestris* exerts anti-inflammatory effects in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 36: 1042–1048
- Kumar S., Pandey A. K. 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Scientific World Journal*, 2013: ID 162750, doi: 10.1155/2013/162750: 16 str.
- Liang J., Zago E., Nandasiri R., Khattab R., Eskin N. A., Eck P., Thiyam-Holländer U. 2018. Effect of solvent, preheating temperature, and time on the ultrasonic extraction of phenolic compounds from cold-pressed hempseed cake. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 95: 1319-1327

- Lin P. Y., Chang C. H., Chong M. F. F., Chen H., Su K. P. 2017. Polyunsaturated fatty acids in perinatal depression: A systematic review and meta-analysis. *Biological Psychiatry*, 82, 8: 560-569
- Lopez-Lazaro M. 2009. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 9: 31–59
- López-Amorós M. L., Hernández T., Estrella I. 2006. Effect of germination on legume phenolic compounds and their antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 4: 277-283
- Lu R. R., Qian P., Sun Z., Zhou X. H., Chen T. P., He J. F., Zhang H., Wu J. P. 2010. Hempseed protein derived antioxidative peptides: Purification, identification and protection from hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells. *Food Chemistry*, 123: 1210–1218
- Makki K., Deehan E. C., Walter J., Bäckhed F. 2018. The impact of dietary fiber on gut microbiota in host health and disease. *Cell Host and Microbe*, 23, 6: 705-715
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 5: 727–747
- Masood T., Shah H. U., Zeb A. 2014. Effect of sprouting time on proximate composition and ascorbic acid level of mung bean (*Vigna radiate* L.) and chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 24: 850-859
- Medina-Remon A., Estruch R., Tresserra-Rimbau A., Vallverdu-Queralt A., Lamuela-Raventos R. M. 2013. The effect of polyphenol consumption on blood pressure. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 13: 1137-1149
- Michel T., Destandau E., Floch G., Lucchesi M. E., Elfakir C. 2012. Antimicrobial, antioxidant and phytochemical investigations of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) leaf, stem, root and seed. *Food Chemistry*, 131, 3: 754-760
- Nam J. S., Sharma A. R., Nguyen L. T., Chakraborty C., Sharma G., Lee S. S. 2016. Application of bioactive quercetin in oncotherapy: From nutrition to nanomedicine. *Molecules*, 21: 108–130
- Nayeri H., Naderi G. A., Asgari S., Sadeghi M., Boshtam M., Mohamadzadeh S., Babaknejad N. 2017. LDL fatty acids composition as a risk biomarker of cardiovascular disease. *Artery Research*, 20: 1-7

- Nonogaki H., Bassel G. W., Bewley D. J. 2010. Germination: Still a mystery. *Plant Science*, 179: 574-581
- Penfield S. 2017. Seed dormancy and germination. *Current Biology*, 27, 17: R874-R878
- Perales-Sánchez J. X. K., Reyes-Moreno C., Gómez-Favela M. A., Milán-Carrillo J., Cuevas-Rodríguez E. O., Valdez-Ortiz A., Gutiérrez-Dorado R. 2014. Increasing the antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents by optimizing the germination conditions of Amaranth seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 69: 196–202
- Pojić M., Mišan A., Sakač M., Hadnađev T. D., Šarić B., Milovanović I., Hadnađev M. 2014. Characterization of byproducts originating from hemp oil processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 51: 12436-12442
- Pollastro F., Minassi A., Fresu L. G. 2018. Cannabis phenolics and their bioactivities. *Current Medicinal Chemistry*, 25: 1160-1185
- Pravilnik o pogojih za pridobitev dovoljenja za gojenje konoplje in maka. 2011. Uradni list Republike Slovenije, 21, 40: 5276-5277
- Prior R. L., Wu X., Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 10: 4290-4302
- Rodriguez-Leyva D., Pierce G. N. 2010. The cardiac and haemostatic effects of dietary hempseed. *Nutrition & Metabolism*, 7: 32, doi: 10.1186/1743-7075-7-32: 9 str.
- Rover M. R., Brown R. C. 2013. Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin-Ciocalteu method. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 104: 366-371
- Sadh P. K., Chawla P., Duhan J. S. 2018. Fermentation approach on phenolic, antioxidants and functional properties of peanut press cake. *Food Bioscience*, 22: 113-120
- Salentijn E. M. J., Zhang Q., Amaducci S., Yang M., Trindade L. M. 2015. New developments in fiber hemp (*Cannabis sativa* L.) breeding. *Industrial Crops and Products*, 68: 32-41
- Schendel R. R. 2019. Phenol content in sprouted grains. V: *Sprouted grains: Nutritional value, production, and applications*. Feng H., Nemzer B., DeVries J. W. (ur.). Duxford, Woodhead Publishing, AACC International: 247-315

- Sekhon-Loodu S., Warnakulasuriya S. N., Rupasinghe H. P. V., Shahidi F., 2013. Antioxidant ability of fractionated apple peel phenolics to inhibit fish oil oxidation. *Food Chemistry*, 140, 1–2: 189-196
- Shi H., Nam P. K., Ma Y. 2010. Comprehensive profiling of isoflavones, phytosterols, tocopherols, minerals, crude protein, lipid, and sugar during soybean (*Glycine max*) Germination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8: 4970-4976
- Singh A., Sharma S. 2017. Bioactive components and functional properties of biologically activated cereal grains: A bibliographic review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57, 14: 3051-3071
- Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventós R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299: 152-178
- Small E. 2015. Evolution and classification of *Cannabis sativa* (marijuana, hemp) in relation to human utilization. *Botanical Reviews*, 81: 189-294
- Stephen A. M., Champ M. M. J., Cloran S. J., Fleith M., Lieshout L., Mejbourn H., Burley V. J. 2017. Dietary fibre in Europe: current state of knowledge on definitions, sources, recommendations, intakes and relationships to health. *Nutrition Research Reviews*, 30, 2: 149-190
- Taiz L., Zeiger E. 1998.: *Plant physiology*. 2nd ed. Sunderland, Sinauer Associates: 347–376
- Teh S. S., Morlock G. E. 2015. Effect-directed analysis of cold-pressed hemp, flax and canola seed oils by planar chromatography linked with (bio)assays and mass spectrometry. *Food Chemistry*, 187: 460-468
- Terpine P. 2006. Arheje in antioksidanti. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 47 str.
- Terpine P., Cigić B., Polak T., Hribar J., Požrl T. 2016. LC–MS analysis of phenolic compounds and antioxidant activity of buckwheat at different stages of malting. *Food Chemistry*, 210: 9–17
- Vas Dias F. W. 2015. Authorised EU health claims for DHA and EPA. V: *Foods, nutrients and food ingredients with authorised EU health claims*. Vol. 2. Sadler M. J. (ur.). Sawston, Woodhead Publishing: 237-256

- Wang K. H., Lai Y. H., Chang J. C., Ko T. F., Shyu S. L., Chiou R. Y. Y. 2005. Germination of peanut kernels to enhance resveratrol biosynthesis and prepare sprouts as a functional vegetable. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2: 242-246
- Waterhouse A. L. 2002. Determination of total phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 6: I1.1.1-I1.1.8
- Werz O., Seegers J., Schaible A. M., Weinigel C., Barz D., Koeberle A., Allergone G., Pollastro F., Zampieri L., Grassi G., Appendino G. 2014. Cannflavins from hemp sprouts, a novel cannabinoid-free hemp food product, target microsomal prostaglandin E2 synthase-1 and 5-lipoxygenase. *PharmaNutrition*, 2: 53-60
- Xiao Z. P., Peng Z. Y., Peng M. J., Yan W. B., Ouyan, Y. Z., Zhu H. L. 2011. Flavonoids health benefits and their molecular mechanism. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 11: 169–177
- Xu M., Jin Z., Peckrul A., Chen B. 2018. Pulse seed germination improves antioxidative activity of phenolic compounds in stripped soybean oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 250: 140-147
- Yan X., Tang J., Passos S. C., Nurisso A., Simões-Pires A. C., Ji M., Lou H., Fan P. 2015. Characterization of lignanamides from hemp (*Cannabis sativa* L.) seed and their antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 49: 10611-10619
- Yan Y. Y., Wang Y. W., Chen S. L., Zhuang S. L., Wang C. K. 2013. Anti-inflammatory effects of phenolic crude extracts from five fractions of *Corchorus Olitorius* L. *Food Chemistry*, 138, 2–3:1008-1014
- Yin S., Tang C., Wen Q., Yang X. 2009. Functional and structural properties and in vitro digestibility of acylated hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolates. *International Journal of Food Science & Technology*, 44: 2653-2661
- Zhou Y., Wang S., Lou H., Fan P. 2018. Chemical constituents of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed with potential anti-neuroinflammatory activity. *Phytochemistry Letters*, 23: 57-61